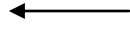


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**PSEUDOMONAS AERUGINOSA'NIN PLANKTONİK VE
BİYOFİLM KÜLTÜRLERİNE KARŞI ÇEŞİTLİ
DEZENFEKTANLARIN ANTİMİKROBİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

EMEL MATARACI

**DANIŞMAN
PROF.DR.A.ALEV GERÇEKER**

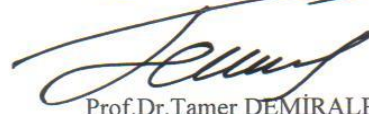
**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

03 / 08 / 2010

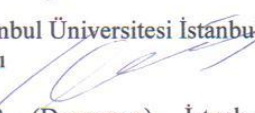
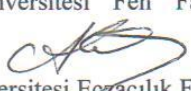
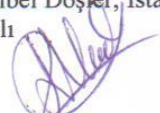


Prof.Dr.Tamer DEMİRALP
V. Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmasötik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Emel MATARACI
Tez Başlığı : Pseudomonas aeruginosa'nın planktonik ve biyofilm kültürlerine karşı çeşitli dezenfektanların antimikrobik etkilerinin araştırılması
Sınav Yeri : İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Seminer Salonu
Sınav Tarihi : 26 / 07 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

- 1.Prof.Dr.Gülten ÖTÜK, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 2.Prof.Dr.Bülent GÜRLER, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 3.Prof.Dr.A.Alev GERÇEKER (Danışman), İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 4.Prof.Dr.Ayşın ÇOTUK, İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 
- 5.Yard.Doç.Dr.Sibel Döşler, İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

EMEL MATARACI

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim esnasında her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, danışmanım olarak tezimi hazırlamamda büyük titizlik gösteren ve sürekli yanımda olarak, içtenlikle bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bilim sevgisini aşıl原因, canım hocam Prof.Dr.A.Alev GERÇEKER'e, yüksek lisans eğitimim boyunca ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız, değerli hocam Prof.Dr.Gülten ÖTÜK'e, tez çalışmamın her safhasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yakınlık ve anlayış gösteren Anabilim Dalı'mızdaki değerli hocalarım Yard.Doç.Dr.Seher BİRTEKSÖZ TAN, Yard.Doç.Dr.Berna ÖZBEK ÇELİK, Yard.Doç.Dr.Sibel DÖŞLER ve Araş.Gör.Dr.Çağla BOZKURT GÜZEL ile Kimyager Emine TUNCER'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım esnasında nazımı çeken, yakın ilgi, destek ve anlayışlarını gördüğüm sevgili dostlarım Hande TÜRKKAN, Nesime Gül MALKOÇ ve Fırat KARA'ya teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimleriyle bana ışık tutan, varlığıyla güç veren sevgili amcam İsmail MATARACI'ya, varlığıyla hayatıma anlam ve değer katmış olan canım dedem Sabri MATARACI'ya, tüm hayatım boyunca beni her koşulda destekleyen, yalnız bırakmayan, kendimi şanslı hissetme nedenlerim olan canım anneme, babama ve kardeşlerime içtenlikle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2812

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biyofilmi.....	4
2.1.1. Geriye Dönüşümlü Bağlanma	5
2.1.1.1. Bakteri Kirpiğinin Hareketi.....	5
2.1.1.2. Ortamda İnorganik Fosfatın Varlığı.....	6
2.1.2. Geriye Dönüşümsüz Bağlanma.....	6
2.1.2.1. Bakteri Yüzeyinin Ve Yapıştığı Yüzeyin Kimyasal Yapısı.....	6
2.1.2.2. Bakterinin Tip IV Pili Hareketi.....	7
2.1.3. Olgunlaşma-1	7
2.1.3.1. "Quorum sensing"’in <i>P. aeruginosa</i> Biyofilminin Olgunlaşmasındaki Rolü8	
2.1.3.2. Ekstraselüler Polisakkarit Maddeler	9
2.1.3.3. Ekstraselüler DNA	12
2.1.3.4. Rhamnolipit.....	12
2.1.3.5. Çevre Koşullarının Biyofilmin Oluşumunda Etkisi	13
2.1.4. Olgunlaşma-2	14
2.1.5. Dağılma.....	14
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ve Dezenfeksiyonun Önemi.....	15
2.3. İdeal Bir Dezenfektanın Özellikleri	18
2.3.1. Antimikrobiyal Aktivite	19

2.3.2. Çözünürlük.....	19
2.3.3. Stabilite	19
2.3.4. Toksik Olmamalı.....	19
2.3.5. Homojenite.....	19
2.3.6. Ortamdaki Maddelerden Minimum Düzeyde İnaktif Olmalı	19
2.3.7. Normal Sıcaklıklarda Aktivite	19
2.3.8. Nüfuz Etme Yeteneği.....	20
2.3.9. Materyal Emniyeti.....	20
2.3.10. Koku Giderme Yeteneği	20
2.3.11. Deterjan Yeteneği	20
2.3.12. Bulunabilirlik Ve Düşük Maliyet.....	20
2.4. Dezenfektanın Aktivitesini Etkileyen Faktörler	20
2.4.1. Kimyasal Ajanın Özellikleri	20
2.4.2. Mikroorganizmaya Ait Özellikler	21
2.4.3. Çevresel Faktörler	22
2.4.4. Dezenfektanın Seçiminde Etkili Olan Diğer Faktörler	22
2.5. Sodyum hipoklorit (NaOCl)	23
2.5.1. Yapı-Aktivite İlişkisi.....	23
2.5.2. Etki Spektrumu ve Kullanım Alanları	24
2.6. Benzalkonyum klorür (BAK)	25
2.6.1. Yapı-Aktivite İlişkisi.....	25
2.6.2. Etki Spektrumu ve Kullanım Alanları	26
2.7. Dezenfektanların Etkinliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Bakteri Suşu	29
3.2. Dezenfektanlar	29
3.3. Besiyerleri ve Çözeltiler	29
3.3.1. Triptik Soya Agar.....	29
3.3.2. Nötralizanlı Triptik Soya Agar	29
3.3.3. Triptik Soya Buyyonu.....	30
3.3.4. Glukozlu Triptik Soya Buyyonu	30
3.3.5. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisi	30
3.3.6. Fosfat Tamponlu Sodyum Klorür Çözeltisi	30

3.3.7. Sığır Albümini Çözeltisi	30
3.3.8. Sert Su	30
3.3.9. Nötralizan Çözeltiler	31
3.4. Deneylerde Kullanılan İnokulumların Hazırlanması	32
3.4.1. Triptik Soya Buyyonunda 10^8 kob/ml'lik İnokulum	32
3.4.2. Triptik Soya Buyyonunda 10^6 kob/ml'lik İnokulum	32
3.4.3. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^8 kob/ml'lik İnokulum.....	32
3.4.4. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^6 kob/ml'lik İnokulum.....	32
3.4.5. Sığır Albümini İçeren Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^6 kob/ml'lik İnokulum	33
3.4.6. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^3 kob/ml'lik İnokulum.....	33
3.4.7. İnokulumdaki Bakteri Sayısının Saptanması	33
3.5. Deneylerde Kullanılan Bakteri Biyofilmlerinin Hazırlanması	33
3.5.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Biyofilminin Seçimi	33
3.5.2. Temiz Koşullarda Hazırlanan Biyofilm	34
3.5.3. Kirli Koşullarda Hazırlanan Biyofilm.....	35
3.5.4. Biyofilmdeki Bakteri Sayısının Saptanması	35
3.6. Diğer Malzemeler	35
3.7. Validasyon Testleri	36
3.7.1. Deney Koşullarının Validasyonu	36
3.7.2. Nötralizan Etkinlik Testi	36
3.7.3. Nötralizan Toksisite Testi	37
3.7.4. Test Yönteminin Validasyonu	37
3.7.5. Validasyon Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	38
3.8. Dezenfektanların Minimum Bakterisidal Konsantrasyonunun (MBK) Saptanması	39
3.8.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı MBK Değerinin Saptanması.....	39
3.8.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı MBK Değerinin Saptanması.....	40
3.9. Dezenfektanların Bakterisidal Aktivitelerinin Tayini.....	41
3.9.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanması	41
3.9.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanması	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Biyofilminin Seçimine Ait Bulgular	44

4.2. Nötralizanların Validasyon Testlerine Ait Bulgular	44
4.3. Dezenfektanların Minimum Bakterisidal Konsantrasyonlarının (MBK) Saptanmasına Ait Bulgular	45
4.3.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular.....	45
4.3.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular	46
4.4. Dezenfektanların Bakterisidal Aktivitelerinin Tayinine Ait Bulgular	46
4.4.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanmasına Ait Bulgular.....	46
4.4.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanmasına Ait Bulgular.....	47
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	80

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 4-1: Farklı konsantrasyonlarda nötralizan madde içeren çözeltilerin <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15422 ile elde edilen nötralizan validasyon testi sonuçları.....	49
Tablo 4-2: Dezenfektanların triptik soya buyyonunda hazırlanan süspansiyon halindeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı saptanan MBK değerleri (µg/ml).....	50
Tablo 4-3: Sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml).....	50
Tablo 4-4: Benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml).....	50
Tablo 4-5: Sodyum hipokloritin biyofilmdeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml).....	51
Tablo 4-6: Benzalkonyum klorürün biyofilmdeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml).....	51
Tablo 4-7: Sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri.....	52
Tablo 4-8: Benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri.....	53
Tablo 4-9: Sodyum hipokloritin biyofilmdeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri.....	54
Tablo 4-10: Benzalkonyum klorürün biyofilmdeki <i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri.....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biyofilminin oluşumu.....	15
Şekil 2-2: Katerner amonyum bileşiklerinin genel yapısı (a) ve benzalkonyum klorürün kimyasal formülü (b).....	26
Şekil 4-1: Farklı koşulların uygulanması sonucunda elde edilen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442 suşuna ait biyofilm kütlelerinin kristal viyole deneyi ile verdikleri absorbans değerleri.....	48

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- AHL: Açıl Homoserin Lakton
- ANFOR: Association Française de Normalisation
- AOAC: Association of Official Agricultural Chemists
- BAK: Benzalkonyum klorür
- CDC: Centers for Disease Control and Prevention
- CEN: Comité Européen de Normalisation
- CFTR: Kistik fibroz transmembran kondüktans regülatör
- CLSI: Clinical Laboratory Standards Institution
- D/E buyyonu: Dey/Engley Neutralizing Buyyonu
- DGHM: Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie
- DNA: Deoksiribonükleik asit
- EN: European Committee for Standardisation
- EPA: Environmental Protection Agency
- GDP: Guanosin difosfat
- GMP: Good Manufacturing Practice
- MBK: Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
- Pel: pellicle
- Psl: polisakkarit sentezleyen lokus
- QS: Quorum sensing (Yeter çoğunluğu algılama)
- TSA: Tryptic Soy Agar
- TSB: Tryptic Soy Broth
- USP: United States Pharmacopeia

ÖZET

Mataracı E. *Pseudomonas aeruginosa*'nın Planktonik ve Biyofilm Kültürlerine Karşı Çeşitli Dezenfektanların Antimikrobik Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2010.

Pseudomonas aeruginosa su sistemlerinde, kaynaklarında veya suyla ilgili her ortamda genellikle biyofilmler içerisinde gömülü mikrokoloniler halinde üreme eğilimindedir. Biyofilmler planktonik hücrelere göre dezenfektanlara karşı çok daha dirençli olduğundan, biyofilmler için dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin tayin edilmesinde bir standart teste gereksinim duyulmaktadır. Bu amaçla, mikroplaklarda ve deney tüplerinde hazırlanan biyofilmlerde sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün (BAK) minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) ve bakterisidal aktiviteleri sırasıyla, mikrodilüsyon yöntemi ve bazı modifikasyonların uygulandığı standart Avrupa dezenfektan testi (EN 1276) kullanılarak tayin edilmiştir. Temas sürelerinin 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat uygulandığı deneylerde temiz koşullarda sodyum hipoklorit ve BAK'ın planktonik hücrelere karşı MBK değerleri sırasıyla, 60µg/ml ve 16µg/ml olarak saptanırken, kirli koşullarda sodyum hipoklorit ve BAK'ın MBK değerleri sırasıyla, dört ve iki kat artmıştır. Sodyum hipokloritin biyofilmdeki bakteriye karşı MBK değerinin 10 dakikalık temas süresinin sonunda 6000µg/ml olduğu ve 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas süresinin sonunda sırasıyla, 4000, 2000 ve 1500µg/ml'ye indiği tespit edilmiştir. BAK ise biyofilme karşı belirgin bir bakterisidal aktivite göstermemiştir. EN 1276 standardına göre, planktonik bakterilere karşı sodyum hipokloritin %1 ve %0,1'lik çözeltileri uygulanan tüm temas sürelerinde, %0,01'lik çözeltisi 30 dakikada bakterisidal aktivite gösterirken, BAK'ın sadece %1 ve %0,1'lik çözeltileri uygulanan tüm temas sürelerinde bakterisidal aktivite göstermiştir. Biyofilmdeki bakteriye karşı sodyum hipokloritin sadece %1'lik çözeltisi uygulanan tüm temas sürelerinde bakterisidal aktivite gösterirken, BAK'la denenen koşullarda herhangi bir aktivite saptanmamıştır. Sonuç olarak, bulgularımız dezenfeksiyon işlemi yapılırken kullanılan dezenfektanın ve dezenfektan konsantrasyonunun biyofilm üzerinde oluşturduğu bakterisidal aktivitenin dikkate alınması sonucu seçilmesi gerektiğini göstermekte ve çalışmamızda geliştirilen yöntemin bu etkilerin araştırılmasında araştırmacılara yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm, bakterisidal aktivite, sodyum hipoklorit, benzalkonyum klorür

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2812

ABSTRACT

Mataracı E. Evaluation of the Bactericidal Activity of Various Disinfectants Against *Pseudomonas aeruginosa* in Planktonic and Biofilm Cell Cultures. Istanbul University, Institute of Health Science, Pharmaceutical Microbiology Department, Master Thesis. İstanbul. 2010.

In water systems, sources or any aqueous environment *Pseudomonas aeruginosa* tend to grow as microcolonies embedded in biofilms. Since biofilms are much more resistant to disinfectants than planktonic cells, there is a need for a standard test in order to evaluate the bactericidal activity of disinfectants for biofilms. For this purpose, using biofilm cultures prepared in microplates and test tubes the minimum bactericidal concentrations (MBC) and bactericidal activity of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride (BAC) were assessed by microdilution method and the standard European disinfectant test (EN 1276) with some modifications, respectively. By applying 5, 10, 15, 30, 60 minutes and 24 hours contact time, under clean conditions the MBC values of sodium hypochlorite and BAC against planktonic cells were obtained as 60µg/ml and 16µg/ml, respectively, whereas under dirty conditions the MBC values were increased four and two fold for hypochlorite and BAC, respectively. The MBC values of sodium hypochlorite against cells in biofilms was 6000µg/ml after an exposure time of 10 minutes and decreased to 4000, 2000 and 1500µg/ml after contact time of 30, 60 minutes and 24 hours, respectively. BAC didn't show any significant bactericidal activity against biofilms. According to EN 1276 standards, against planktonic bacteria sodium hypochlorite showed bactericidal activity at 1% and 0,1% concentrations in all exposure times, at 0,01% concentration in 30 minutes; whereas, BAC showed bactericidal activity only at 1% and 0,1% concentrations in all exposure times. Against cells in biofilms sodium hypochlorite at 1% concentration showed only in all exposure times its bactericidal activity, BAC didn't show any activity under tested conditions. Consequently, the findings of this study shows that when an disinfectant and disinfectant concentration has been chosen for a disinfection procedure its bactericidal activity against biofilms should be taken into consideration, and the method developed in this study might be helpful for the investigators who aim to evaluate these effects.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, bactericidal activity, sodium hypochlorite, benzalkonium chloride.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 2812

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pseudomonas aeruginosa çevre kaynaklı bir mikroorganizma olup suda, toprakta ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunur. Dünyanın her yerinde bu kadar yaygın bulunuşunun başlıca nedeni sahip olduğu benzersiz üreme özellikleridir. *P. aeruginosa* nemli ortamlarda kolaylıkla çoğalabilmekte, karbon kaynağı olarak atmosferik CO₂'i kullanabilmekte, yüksek tuz konsantrasyonlarını tolere edebilmekte ve geniş sıcaklık derecelerinde (20-42°C) üreyebilmektedir. Ancak, özellikle sulu sistemlerdeki varlığını kolaylıkla sürdürebilme yeteneği ve hastanede kullanılanlar dahil olmak üzere birçok antibiyotik ve dezenfektan maddeye karşı direnç göstermesi, başta hastaneler olmak üzere, ilaç ve gıda endüstrisinde su kaynaklı ciddi sorunların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Doğada yaygın bir şekilde bulunan bu bakteriye potansiyel patojen özelliğini veren başlıca niteliklerinden biri ise üreme şeklidir. *P. aeruginosa* sulu ortamlarda planktonik bir şekilde üreyebildiği gibi biyofilm denilen, bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit matriksin içinde mikrokoloniler halinde de üreyebilmektedir (24).

Biyofilm terimine ait ilk veriler, Leeuwenhoek'ün 1680'lerde dış yüzeyindeki mikroorganizmalar şeklinde yaptığı basit tarifine kadar dayanmaktadır. Bunu Heukelekian ve Heller'in (1940) yüzeyle temasın bazı deniz bakterilerinin çoğalmasını ve aktivitesini arttırdığı yönündeki gözlemleri ve üç yıl sonra Zobell'in yüzey üzerindeki deniz bakterilerinin yoğunluğunun çevredeki planktonik bakterilere oranla dikkat çekici bir şekilde yüksek olduğuna dair bildirisi takip etmiştir (54, 127). Jones ve ark.'nın (1969) ise spesifik bir polisakkarit boyası kullanarak toplu haldeki bakterileri çevreleyen matriks materyalini göstermeleri, daha sonra yapılan biyofilmin yapısı konusundaki araştırmalara damgasını vurmuştur (59). Biyofilmin genel bir özelliği olarak bilinen geleneksel dezenfektanlara karşı olan direnci, ilk olarak 1973 yılında Characklis tarafından keşfedilmiştir (18). Ancak sofistike optik ve moleküler araçların ortaya çıkışına kadar, içinde hücrelerin rastgele gömülü olduğu matriks materyalden oluşmuş kalın bir tabaka olarak basit bir şekilde değerlendirilen biyofilmin, 4-boyutlu gözlemini sağlayan konfokal lazer scanning mikroskobunun kullanımı sonucunda fonksiyon ve davranışlarıyla organize kompleks bir yapıya sahip olduğu anlaşılmış, yapılan çalışmalarla sağlık ve endüstri alanındaki önemi ortaya koyulmuştur (21, 23).

P. aeruginosa'ya ait biyofilmin oluşumunda, biraraya gelen bakterilerin belirli bir çoğunluğa ulaşarak “quorum sensing” (QS-yeter çoğunluğu algılama) denilen ve hücreler arası iletişimi sağlayan sinyallerin tetiklenmesi önemli bir rol oynar (30). Bunun yanı sıra, biyofilm içerisindeki bakterilerde aljinat sentezini indükleyen *algC* geninin harekete geçmesiyle, *P. aeruginosa* fenotipik değişime uğrar ve mukoid şeklini almaya başlar (29). *AlgC* ve *algD* genlerindeki ekspresyonun artmasıyla artan aljinat sentezi bakterilerin yüzeye yapışmasını sağlayarak ardından gelişecek biyofilmin temelini oluşturur. Bu şekilde bakterinin oluşturduğu biyofilm onun, bulunduğu ortamdaki bakterisidal etkilerden korunmasını ve uzun süre varlığını sürdürmesini sağlar (24).

P. aeruginosa'nın dezenfektanlar, kremler, sabunlar, göz damlaları ve diyaliz sıvıları dahil olmak üzere sulu ortamlardaki kolay üreme yeteneği, hastanelerde tıbbi girişimler için kullanılan gereçlerin kontamine olmasına ve bunun sonucunda ciddi hastane infeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Özellikle kateterizasyon ve trakeostomi gibi tıbbi girişimlere maruz kalan hastalarda bu risk artmaktadır. Bunun dışında *P. aeruginosa* havalandırma sistemlerinde, lavabo giderlerinde, hidroterapi banyolarında, solunum tedavisinde kullanılan cihazlarda ve duş başlıklarında bulunabilmektedir (45). Sahip olduğu bu özelliklerinin yanı sıra birçok antimikrobik maddeye karşı hızla direnç geliştirmesi onun hala önemli bir hastane infeksiyonu etkeni olarak varlığını sürdürmesine neden olmaktadır (17). Ancak sadece hastane infeksiyonu etkeni olarak değil, hastane dışındaki sağlıklı kişilerde de yüzme havuzu, jakuzi ve kontakt lens kullanımına bağlı infeksiyonların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (45).

Biyofilmlerin neden olduğu biyolojik kirlilikler mühendislik sistemlerine de zarar verebilmektedir. İlaç sanayiinde ödün vermeksizin uygulanan Good Manufacturing Practice (GMP) kurallarının etkisiyle ürünü olumsuz yönde etkileyen zararlar görülüyorsa da, kozmetik ve gıda sanayiinde üretimde kullanılan kazanların ve su sistemlerinin bakterilerin oluşturduğu biyofilmleri içermesi, ürünün kontamine olmasına ve sağlıklı kişilerin biyofilmin içerdiği bakterilerle infekte olmasına neden olabilmektedir. Ancak sadece kontaminasyon kaynağı olarak değil, endüstrinin her alanında, suyun girdiği her sistemde biyofilmlerin varlığı paslanmayı hızlandırmakta, borulardaki basıncı arttırmakta veya sıcaklığın gerektiği şekilde iletilmesini önleyerek sistemin verimini düşürebilmektedir (49). Ayrıca binalardaki soğutma kuleleri veya

içme suyunu besleyen borularda biyofilmlerin bulunması, suyun kontamine olmasına ve halk sağlığı açısından ciddi risk teşkil etmesine neden olabilmektedir (49, 122).

Kontaminasyonu kontrol etmenin başlıca yollarından biri etkili bir dezenfeksiyon işleminin yapılmasıdır. Dezenfektan maddeler infeksiyon oluşturabilecek patojen mikroorganizmaların tahrip edilmesi için kullanılan kimyasal maddeler olup genellikle mikroorganizmaların spor şekillerine karşı etkisiz iken, uygulandığı yerdeki patojen mikroorganizma sayısını kabul edilebilir seviyelere indirmekte veya tamamiyle yok edebilmektedirler (72). Ancak ortamın sıcaklığı, pH'ı, dezenfektanın tipi, aktivitesi, kullanım konsantrasyonu ve seyreltmede kullanılan suyun kalitesi, mikroorganizmanın tipi, miktarı ve üreme hızı, ortamda bulunabilecek organik maddelerin varlığı ve temas süresi dezenfeksiyon işleminin başarısını etkileyebilmektedir (56, 72). En çok kullanılan dezenfektanlar arasında klorlu bileşikler, özellikle sodyum hipoklorit yer alır. Genellikle % 1-5 konsantrasyonlarda kullanılan sodyum hipoklorit birçok bakterinin vejetatif şeklini kolaylıkla öldürebilmektedir (72). Oksidasyon yoluyla öldürücü etkisini gösteren bu dezenfektan, hücre membranında hasarlar oluşturup, hücre içeriğinin dışarıya akmasına neden olabildiği gibi deoksiribonükleik asite (DNA) de hasar verebilmektedir (48). Çalışmada kullanılan diğer dezenfektan olan benzalkonyum klorür (BAK) ise katyonik yüzey aktif bir deterjan olup, bakterinin hücre membranına hasar vererek etkisini göstermektedir (72).

Dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan standart yöntemler genellikle dezenfektanların süspansiyon halindeki planktonik mikroorganizmalara karşı olan etkisini araştırmaktadır. Ancak bu deneylerle elde edilen sonuçlar dezenfektanların bakterinin biyofilm içinde bulunan şekline olan etkisi konusunda bilgi verememektedir. Oysa ki, sağlık veya endüstri alanında önem taşıyan bakteriler genellikle biyofilmlerin içinde bulunmaktadır ve klasik dezenfektan aktivite testleri ile bunlara karşı olan aktivite belirlenmemektedir.

Bu nedenlerle hastane ve endüstrinin çeşitli alanlarında yüzey ve ekipman dezenfeksiyonunda sık kullanılan dezenfektanlar olan sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün *P. aeruginosa*'nın süspansiyon içinde serbest halde bulunan planktonik kültürünün yanı sıra, katı yüzey üzerinde oluşturduğu statik biyofilm kültürüne karşı antimikrobik aktivitelerinin belirlenmesi, çalışmamızın amacını oluşturmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Pseudomonas aeruginosa* Biyofilmi

Biyofilm, inert veya yaşayan bir yüzeye yapışarak oluşturduğu polimerik matriks içerisinde birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerini yerine getiren bakteri topluluğundan oluşan organize bir yapıdır (23). Bu tanımı içine alan yüzeyler cam, bakır ve çelik borulardan toprak, tıbbi gereçler ve epitel hücrelerine kadar genişleyebilmektedir (121, 122). Ancak her ne kadar bakterinin cinsine ve çevre koşullarına bağlı olarak değişiklik gösteriyor ise de, planktonik bir bakteriyi bir yüzeye yapışma arayışına sokan ve biyofilm oluşturmaya iten tetikleyici nedenlerin başında açlık gelmektedir. Açlık başlangıçtaki yüzey kolonizasyonunu sağlarken, besine erişebilme isteği, biyofilmi oluşturmak üzere yüzeydeki ilk bakteri topluluğunun oluşumunu sağlar. Sonuçta, planktonik şekilden biyofilm şekline geçiş hücresel stres, bakteri hücrelerinin yoğunluğu ve besin mevcudiyeti gibi çeşitli çevresel ve fizyolojik faktörlerle düzenlenmektedir (66, 121)

Biyofilme adapte olan bu bakteri topluluklarının planktonik şekillerine göre önemli avantajları bulunmaktadır. Öncelikle sahip oldukları polimerik matriks karbon, nitrojen, fosfat gibi çevredeki besinlerin yakalanıp, konsantre edilmesini sağladığı gibi; bakterilerin birbirine yakın olmaları, genlerin horizontal transferini ve metabolik yan ürünlerin paylaşımını da kolaylaştırmaktadır. Bunun dışında, biyofilm halinde üremenin bakteriye sağladığı bir diğer avantaj antimikrobik ve bozulmayı önleyici ajanlar, kayma gerilimi, konağın savunma mekanizmasına ait oksijen radikalleri ve proteazlar gibi çeşitli yok edici stratejilere karşı planktonik şekillerine göre daha dirençli olmalarıdır. Antimikrobik etkili faktörlere olan bu doğal direnç, biyofilmin oluşturduğu bariyerin yanı sıra, derine gömülmüş bakterilerin çok düşük seviyede metabolik aktivite göstermeleri ve çok düşük hızda bölünmelerinden de kaynaklanmaktadır. Biyofilm halinde üremenin bakteriye sağladığı son avantaj ise, yapıştığı yerden ayrılması sonucunda yayılma potansiyelinin olmasıdır. Biyofilmin sahip olduğu bu avantaj antimikrobik etkili maddelere ve konağın savunma sistemine dirençli bakteri kaynağının sürekliliğine izin verdiği gibi, aynı zamanda rezervuar görevini üstlenerek bakterinin aralıksız bir şekilde yayılmasını da sağlamaktır (33, 113).

P. aeruginosa'nın doğadaki doğal bulunuş şekli genellikle biyofilmler halindedir. Uygun laboratuvar koşulları altında ise birkaç yüz mikrometre kalınlığına kadar ulaşabilen karakteristik biyofilmler oluştururlar (110). *P. aeruginosa*'nın biyofilm oluşumu boyunca yapılan mikroskopik ve gen ekspresyonu analizleri, farklı gelişim aşamalarından ibaret olduğunu ve her aşamada farklı fenotipin bulunduğunu göstermektedir. Her aşamada bakteri hücrelerinin göstermiş olduğu fizyolojik yapı diğerine göre farklılık gösterirken, olgun biyofilmde tümü bir arada görülür. Buna göre *P. aeruginosa* biyofilminin oluşumu beş aşamadan ibarettir: (1) geriye dönüşümlü bağlanma, (2) geriye dönüşümsüz bağlanma, (3) olgunlaşma-1, (4) olgunlaşma-2 ve (5) dağılma. Yapılan incelemeler her beş aşamada biyofilm oluşumunda rol alan düzenleyici proteinlerin % 35 oranında değişiklik gösterdiğini (yaklaşık 525 protein); planktonik hücreler ile olgunlaşma-2 fazındaki hücreler karşılaştırıldığında ise, 800'den fazla proteinin ekspresyon seviyesinde altı kattan fazla değişimin görüldüğünü göstermektedir (110).

2.1.1. Geriye Dönüşümlü Bağlanma

Biyofilmin gelişimindeki ilk aşama, hareket eden planktonik bakteri ile yüzey arasındaki etkileşimdir. Birkaç dakika süren bu aşamada bakterilerin bir kısmı yüzeye kısa bir süre için yapışır, sonra ayrılırlar. Koşullar biyofilmin oluşumu için uygun değilse, bakteri hücresi kendisini yüzeye bağlayan kuvvetlerin üstesinden gelerek, tekrar planktonik faza geçer ve yeni yüzey çevrelerinin arayışına girer (121). Bu aşamada rol oynayan faktörlerin başında, bakteriye hareketini sağlayan kutupsal kirpiği ile ortamdaki inorganik fosfatın varlığı gelir.

2.1.1.1. Bakteri Kirpiğinin Hareketi

Bakteri kirpiği hücrelerin sıvı ortamda yüzmesini sağlayan bir ekstraselüler yapıdır. *Pseudomonas*ların sahip olduğu kutupsal kirpiği bazı çevre koşullarında kolonizasyonu başlatan yüzey adhesyonu için anahtar faktör olarak görülmektedir (110). *P. aeruginosa* plastik gibi cansız veya epitel hücre ve müsin gibi canlı yüzeylere yapışmak için kirpiğe gereksinim duyar; çünkü kirpiğini dolayısıyla hareketliliğini kaybeden bakterinin cansız yüzeye yapışma şansı azalmaktadır (82). Bugüne kadar yapılan çalışmalar kirpiğin biyofilm oluşumunda iki rolü olduğunu göstermektedir. Bunlardan ilki bakterinin yüzeye doğru göçünü sağlamasıdır ki, bakteri ile yüzey arasındaki itici kuvvetlerin üstesinden gelebilmek için hareketlilik gerekli bir unsurdur.

Kirpiğin ikinci rolü ise bakterinin yüzeye bağlanmasını sağlayan yapışma organeli olarak görev almasıdır (121).

2.1.1.2. Ortamda İnorganik Fosfatın Varlığı

Ortamda inorganik fosfatın varlığı *Pseudomonas*larda biyofilm oluşumunu etkileyebilmektedir. İnorganik polifosfat ile onun sentezinden sorumlu bir enzim olan polifosfat kinaz, *P. aeruginosa* biyofilminin oluşumunda önemli roller üstlenen kirpik ve piliye dayalı hareketin gerçekleşmesinden sorumludur. Bunun dışında bu iki madde biyofilmin olgunlaşma aşamasında gerekli olan quorum sensing (QS) oluşumunda ve rhamnolipidin üretiminde de görev almaktadırlar (103, 104). Bu veriler, inorganik fosfatın biyofilmin gelişiminde yer alan her aşamada bir rolü olduğunu göstermektedir.

2.1.2. Geriye Dönüşümsüz Bağlanma

Biyofilm gelişimindeki ikinci aşamada bakteri, yüzeye geriye dönüşümsüz bir şekilde bağlanır ve hareketliliğini kaybeder. Bu safhada kirpiğini kaybeden bakteri hareketini tip IV pilusun aracılığıyla gerçekleştirmeye başlar. Yaklaşık iki saat süren bu sürecin sonunda yüzeye ve birbirine yapışan bakteriler mikrokoloni oluşumunu başlatmış olur (110). Bakteri yüzeyinin ve yapıştığı yüzeyin kimyasal yapısı ile bakterinin twitching (uzanma ve hızla geri çekiş) hareketini sağlayan tip IV pilusu bu aşamada önemli rol oynayan faktörlerdir.

2.1.2.1. Bakteri Yüzeyinin Ve Yapıştığı Yüzeyin Kimyasal Yapısı

Bakteri hücrelerinin yapıştığı yüzeyin doğası bağlanmada önemli bir rol oynar. Genellikle, yapışma yüzeyinin pürüzlülüğünün arttığı oranda bağlanma oranı da artmaktadır. Bunun dışında bakteri ile yüzey arasındaki etkileşimin gücü, kısmen elektrostatik etkileşimler tarafından yönlendirilmektedir. *P. aeruginosa*'nın polistiren gibi hidrofobik yüzeylere yapışmasını sağlayan başlıca unsuru, yüzeyinde ona O-antijeni özelliğini veren ve hidrofobik yapıda olan lipopolisakkarit tabakasıdır. O-antijeni olmayan suşlar hidrofilik özellik kazanarak, daha çok cam gibi hidrofilik yüzeylere yapışma eğilimini gösterirler (71). Bunun dışında ortamda Zn^{2+} , Fe^{3+} , K^+ ve Mg^{2+} gibi katyonların konsantrasyonu arttıkça, lipopolisakkarit tabakada yer alan zincirlerin stabilitesi, buna bağlı olarak bakteri membranının hidrofobisitesi, dolayısıyla yüzeylere yapışma gücü artmaktadır (51, 57).

2.1.2.2. Bakterinin Tip IV Pili Hareketi

P. aeruginosa'nın sahip olduğu tip IV pili, kirpikle aynı hücresel kutupta yer alır ve “twitching” denilen uzanma ve hızla geri çekmeden oluşan, bakterinin bir yüzey üzerindeki hareketinden sorumludur. Yapılan çalışmalar pili oluşturmamayan mutantların yüzeye yapışıp tek tabaka halinde üreyebildiklerini, ancak yüzeyde kümelenmiş bakterilerden oluşan mikrokolonileri oluşturmadıklarını göstermiştir. Öte yandan, mutasyon taşımayan *P. aeruginosa* suşunun ise cansız yüzeyin üzerinde öncelikle tek tabaka halinde ürediği, daha sonra oluşan bu tek tabaka boyunca bakterilerin mikrokoloniler halinde yayıldığı bildirilmiştir. Sonuçta, bakterinin kirpik hareketi ile başlayarak cansız yüzeyle gerçekleştirdiği ilk bağlanma, tip IV pili hareketinin etkisiyle stabil hale gelmekte ve mikrokolonilerin oluşabilmesi için gerekli olan hücreler arası etkileşimi sağlamaktadır (82, 110). Bu bulgular bakterinin olgun bir biyofilm oluşturabilmesi için gerekli ilk koşul olan mikrokoloni oluşumunun tip IV pili hareketine bağlı olduğunu göstermektedir. Ancak tip IV pili hareketi, sadece biyofilm oluşumunun başlangıç safhasında değil, biyofilmin olgunlaştığı diğer aşamalarda da görevler üstlenmektedir. Yapılan çalışmalar, biyofilmin olgunlaşma safhasında meydana gelen mantara benzer oluşumlara ait sap kısımları, *P. aeruginosa*'nın hareketsiz alt-popülasyonlarının çoğalarak üst üste birikmesiyle şekillenirken, başlık kısımları tip IV piliyi kullanarak sapı tırmanan ve tepesinde kümelenen hareketli alt-popülasyonlar tarafından şekillendiğini göstermektedir (64, 88). Ancak daha sonra yapılan araştırmalarla başlığın oluşmasında pilus hareketinden ziyade bakterinin kirpik hareketinin rol aldığı keşfedilmiş, tip IV pilinin başlıktaki varlığının ise ekstraselüler DNA'ya olan yüksek bağlanma affinitesinden kaynaklandığı öne sürülmüştür (7). Biyofilmin olgunlaştığı bu safhada, bakteride meydana gelen hareketli fenotip yönündeki değişimin, mantarın tepe kısmında daha fazla bulunan besine ulaşma isteğiyle gerçekleştiği düşünülmektedir.

2.1.3. Olgunlaşma-1

Biyofilm gelişiminin üçüncü aşaması olan olgunlaşma-1'de, ekstraselüler polisakkarit maddeler, ekstraselüler DNA ve proteinlerden ibaret matriks oluşur ve bu süreç üç günde gerçekleşir. Biyofilm gelişiminin ikinci aşamasında başlayan mikrokoloni oluşumu artarak, çok tabakalı bir hal almaya başlar ve bu tabakaların kalınlığı 10 µm'ye kadar ulaşır (110). Non-mukoid *P. aeruginosa* suşlarında Psl ve Pel

ekzopolisakkaritleri matriksin başlıca bileşenlerini oluştururken, mukoid suşlarda başlıca ekzopolisakkarit madde aljinattır (16, 108). Bu aşamada biyofilm mantar şekline geliştikçe, bakterinin rhamnolipidi sentezlemesi sonucunda hücrelerin arasında su kanalları oluşur (28, 83). Bu aşamada gerçekleşen birçok olay ancak belirli bir çoğunluğa ulaşmış bakteriler arasında gerçekleşebilen “Quorum sensing” denilen haberleşme sisteminin kontrolü ve çevre koşullarının etkisi altında gerçekleşmektedir.

2.1.3.1. “Quorum sensing”'in *P. aeruginosa* Biyofilminin Olgunlaşmasındaki Rolü

Quorum sensing (QS) sistemi ancak bakteri topluluğu kritik bir çoğunluğa ulaştığı zaman, yeterli konsantrasyonda salgıladıkları bileşiklere karşı gelişen bir oto-indükleyici yanıttır (112, 113). Bu nedenle, belirli bir amaca yönelik olarak gelişen fonksiyonunun oluşabilmesi için, bakteri hücresinin belirli bir çoğunluğa ulaşması gerekmektedir. *P. aeruginosa* virülans faktörlerinin ekspresyonunu düzenlemek için açıl-homoserin lakton (AHL) esaslı QS sistemini kullanmaktadır (89). *P. aeruginosa*'da *las* ve *rhl* olmak üzere, *las*'ın öncelikli olduğu hiyerarşik bir düzen içerisinde işleyen AHL esaslı iki QS sistemi belirlenmiştir. *Las* sisteminin transkripsiyonel aktivitesi *lasR* tarafından düzenlenirken, AHL sinyali olan N-(3-okso-dodekanoyil)-L-homoserin laktonu (3OC12-HSL) *lasI* tarafından sentezlenmektedir (42, 89). Benzer şekilde, *rhl* sisteminin transkripsiyonel aktivitesi *rhlR* tarafından düzenlenmekte, AHL sinyali olan N-bütiril-L-homoserin laktonu (C4-HSL) ise *rhlI* tarafından sentezlenmektedir (84, 85). Moleküllerin yapısında bulunan N-açıl yan zincirlerinin uzunluğu, oto-indükleyicilerin hücreden dışarıya çıkmak için seçtikleri yolu belirler. Kısa zincirli bir sinyal molekülü olan C4-HSL hücre membranından dışarıya kolayca diffüze olabilirken, uzun bir zincir taşıyan 3OC12-HSL'nun hücre dışına transportu *mexAB-oprM* efflux pompası tarafından sağlanmaktadır (39, 91). Hücre dışına transportu sağlanan 3OC12-HSL'ların ekstraselüler ortamdaki konantrasyonu yeterli düzeye ulaştığında *P. aeruginosa* tarafından hücre içine alınarak *lasR*'ye bağlanır ve onu aktive eder. Oluşan *lasR*-3OC12-HSL kompleksi daha sonra *P. aeruginosa*'nın elastaz (*lasA* ve *lasB*), alkalın proteaz ve ekzotoksin A gibi virülans faktörlerinden sorumlu genlerin ekspresyonunu sağlar. Benzer şekilde işleyen *rhl* QS sistemi ise rhamnolipidin sentezini ve *lasB* tarafından kodlanan elastaz, piyosiyanın ve lektini oluşturan genlerin ekspresyonunu kontrol altında tutmaktadır (62, 90, 113). Aslında QS yüzlerce genin ekspresyonunu dolaylı veya dolaysız olarak kontrol eden düzenleyici bir iletişim sistemi olarak çalışır

ve bunların önemli bir bölümü bakterinin varlığını sürdürebileceği hücrel fonksiyonlara dönüşür. Ancak, *P. aeruginosa*'da 3OC12-HSL ve C4-HSL dışında “pseudomonas kinolon sinyali” olarak bilinen 2-heptil-3-hidroksi-4-kinolon gibi HSL esaslı olmayan ve yeterli hücre yoğunluğuna ihtiyaç duymayan ekstraselüller sinyal moleküllerinin de bulunduğu bildirilmiştir (95).

QS'in biyofilm ile olan ilişkisi ilk olarak Davies ve ark. tarafından gösterilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında yabani tip ve *rhlI* mutant *P. aeruginosa* suşlarının normal biyofilm yapısını oluşturabilirken, *lasI* mutantının ince, yassı bir biyofilm oluşturduğunu, oluşan bu biyofilmin vahşi tipin oluşturduğu biyofilme göre biyositlere karşı daha duyarlı olduğunu ve biyofilmin oluşumu için *las* sistemi tarafından düzenlenen fonksiyonlara ihtiyaç duyulduğunu bildirmişlerdir (30). Yapılan bir diğer çalışmada ise, 8 günlük bir biyofilm gelişimi sırasında *lasI* ekspresyonunun zaman içerisinde azaldığı; buna karşılık *rhlI* ekspresyonunun biyofilm gelişiminin her aşamasında varlığını koruduğu, ancak gen ekspresyonunun *lasI*'e göre daha düşük oranda olduğu bildirilmiştir (32).

Biyofilm oluşumu boyunca yapılan mikroskopik ve gen ekspresyonu analizleri şunu göstermektedir ki *las* sistemi, *P. aeruginosa*'nın biyofilmini oluştururken aktive olan ilk QS sistemidir. *LasB* aktivitesi geriye dönüşümsüz bağlanmadan 24 saat sonra, hücrelerin biyofilmde kümelenmeye başlamasıyla aynı zamanda başlamaktadır. *Rhl* QS sistemi ise daha sonra, olgunlaşma-I aşamasında aktive olmaktadır (110). Bugüne kadar yapılan araştırmalarda, olgun biyofilmin şekillenmesinde rol alan bakterinin katı yüzey üzerindeki kayma hareketinden ve biyofilmin pel ekzopolisakkariti, rhamnolipit, ekstraselüler DNA gibi bileşenlerinin üretiminden QS sisteminin sorumlu olduğu gösterilmiştir (3, 33, 35, 65, 109).

2.1.3.2. Ekstraselüler Polisakkarit Maddeler

P. aeruginosa biyofilminin oluşumunda Psl, Pel ve aljinat olmak üzere en az üç çeşit ekzopolisakkarit rol almaktadır (16, 108). Bunlardan Psl ekzopolisakkariti, polisakkarit sentezleyen lokus (PA2231-2245) tarafından kodlanmakta ve bakterinin yüzeye yapışarak biyofilm yapısını muhafaza edebilmesi için gerekmektedir. Psl'nin yapısı mannoz ve galaktozca zengin olup rhamnoz, glukoz ve düşük oranda ksilozdan oluşur (70). Psl sarmal bir düzende yüzeye ve yanındaki hücrelere yapışarak, bakterilerin biyofilm içerisinde birbirlerine ve yapıştıkları yüzeye tutulmasını sağlar. Bu

şekilde hücreler arası etkileşimin oluşmasına ve ekzopolisakkarit matriksin bir araya gelmesine katkıda bulunur. Biyofilmin olgunlaşma süreci devam ederken, Psl biyofilmin dış yüzeyinde birikerek, merkezde Psl'nin bulunmadığı bir boşluğun oluşmasına neden olur. Bu durumun ilginç yanı dağılma aşamasında bu boşlukta yüzen bakterilerin belirerek biyofilmden dışarı çıkmaları sonucunda biyofilmin yüzeyde yayılmasını sağlamalarıdır (69).

Mukoid olmayan suşların bir diğer ekzopolisakkariti olan Pel, PA2231-2245 genleri tarafından kodlanmakta olup olgun biyofilmden glukozca zengin hidrofobik ekzopolisakkaritin üretiminden sorumludur (41). Bu ekzopolisakkarit buruşuk koloni fenotipine neden olur ve yüzeye bağlı biyofilmlerin veya sıvı yüzeyindeki zarların (pellicle) oluşabilmesi için gereklidir. Yapılan bir çalışmada Pel biyosentezinin QS'in kontrolü altında olduğu, *las* mutant suşlarda katı yüzeye bağlı biyofilmin ve hava-sıvı arasındaki zarın oluşumunda anlamlı derecede bir azalmanın olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada Pel biyosentezini sağlayan genlerin transkripsiyonunda, *las* QS sisteminin ve daha düşük oranda *rhl* sisteminin etkili olduğu bildirilmiştir (109).

P. aeruginosa'nın mukoid suşlarının başlıca ekzopolisakkariti olan aljinat ise PA3540-3551 genleri tarafından kodlanır ve hücrelerin yüzeye yapışıp, mukoid suşlarda biyofilmin temel yapısını oluşturmada önemli rol oynar (29, 118). *P. aeruginosa*'da aljinat üretiminin uyarılması, non-mukoid bir suşun mukoid şekline dönüşmesine neden olur. *P. aeruginosa*'nın aljinatı anyonik bir polisakkarit olup, asidik şekerler olan D-mannuronik asit (M) ve α -L-guluronik asidin (G) birbirine β -1-4 bağlarıyla bağlanıp, gelişigüzel dizilmesiyle oluşan bir polimerdir. Aljinatın biyolojik özelliklerini, üronik asitlerin düzeni yani blok yapısı ve M/G oranı belirler. Poli-M bloklarından oluşan molekül, şerite benzer gevşek bir yapı gösterirken, poli-G bloklarından oluşan molekül kutuya benzer bir şekilde katlanmış durumdadır. Mukoid *P. aeruginosa* suşlarının poli-G bloklarından yoksun olması, bakterinin mikrokoloniler halinde üremesine imkan veren, etrafını saran geniş hacimli elastik bir matriksin oluşmasını sağlar. Aljinatın öncül maddesi olan guanosin difosfat (GDP), mannuronik asidin meydana gelebilmesi için ise GDP mannozun sentezi ve bir kilit enzim olan GDP mannoz dehidrogenaz tarafından işlenmesi gerekmektedir. GDP mannozun sentezi *P. aeruginosa*'da bulunan *algA* ve *algC* genleri tarafından kodlanan enzimler tarafından sağlanırken, GDP mannoz dehidrogenaz enzimi ise *algD* geni tarafından kodlanmakta ve bu genin

transkripsiyonel aktivitesi *algR* geninin kontrolü altında olmaktadır. *AlgR* geni çevresel faktörlere duyarlı bir regülatör gendir (43, 102). Bugüne kadar aljinatın yapısal biyosentezinde, biyosentezinin düzenlenmesinde ve genotipik değişikliğin gerçekleşmesinde rol oynayan 25'ten fazla *alg* geni tarif edilmiştir. Yüksek ozmolarite, dehidratasyon, ortamda azot ve fosfatın azalması, NaCl ve KCl'ün varlığı gibi çevresel faktörler başta *algD* olmak üzere, bu genlerin belirli bir kaskat içerisinde aktive olmasını ve bakteride aljinat sentezinin gerçekleşmesini sağlar (1). Özellikle ortamda bulunan kalsiyum, negatif yüklü aljinat polimerlerinin arasında katyon köprüleri kurarak biyofilmin jel görünümünü kazanmasına neden olur. Oluşan bu jel ise biyofilm içerisinde hücrelerin kolayca süspande olmasını ve hücreler arasındaki mesafenin artmasını sağlamaktadır. Ortamda kalsiyum noksanlığı biyofilm içerisindeki bakterilerin paketlenmiş bir şekilde kümelenmelerine neden olur (53). Yüksek miktarda aljinat üreten *P. aeruginosa* suşunun oluşturduğu biyofilmin, izojenik non-mukoid suşla oluşturulan biyofilm ile karşılaştırıldığında daha hacimli olduğu gözlenir. Mukoid suş, cansız bir yüzeyde geciken bir başlangıç sürecinin ardından su kanallarıyla ayrılmış geniş mikrokolonilerin bulunduğu biyofilmler oluştururken, non-mukoid suş hemen yüzeye yapışıp çoğalmaya başlar, ancak mukoid suşun aksine geniş yapıya sahip bir biyofilm oluşturamaz (53, 81, 118).

Özellikle kistik fibrozlu hastalarda *P. aeruginosa*'nın neden olduğu kronik akciğer infeksiyonlarında bakterinin oluşturduğu bu aljinat yapısındaki biyofilmler onun, bulunduğu ortamdaki fagositik hücrelerin ve antibiyotiklerin bakterisidal etkilerinden korunmasına ve uzun süre varlığını sürdürebilmesine neden olmaktadır (55, 58). Aljinatın neden olduğu bu antifagositik etki, nötrofillerin ve makrofajların kemotaksisini inhibe etmesinden ve komplemanı alternatif yoldan aktive edememesinden kaynaklanmaktadır (92). Bunun dışında, bu hastaların serumunda aljinata özgü antikor bulunmasına rağmen bu antikorlar bakterinin opsonofagositik ölümünü sağlayamamaktadır (97). Yapılan çalışmalar aljinatın aşırı derecede üretilmesiyle oluşan mukoid suşların nerdeyse tamamının O yan zincirinden yoksun lipopolisakkarit oluşturduğunu göstermektedir (50). Bu da bakterinin akciğer epitel hücrelerinde reseptör görevini üstlenen CFTR (Kistik fibroz transmembran kondüktans regülatör) proteinine bağlanmasını engelleyerek, kistik fibrozlu hastalarda zaten iyi işlemeyen, bakterinin solunum yollarından temizlenmesi işlemini yerine

getirememesine ve mukoid fenotiplerin konağın ilk savunma yanıtında önemli rol oynayan doğal bağışıklık yanıtından kaçmasına neden olmaktadır (68, 98).

2.1.3.3. Ekstraselüler DNA

Polisakkaritlerin yanı sıra *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilimde bir diğer önemli bileşen ekstraselüler DNA'dır (125). Ekstraselüler DNA'nın başlıca rolü, hücreleri bir arada tutması ve biyofilm matriksini stabilize etmesidir. Ancak biyofilmin olgunlaşma süreci ilerledikçe ekstraselüler DNA'nın yerini başka birleştirici faktörler alır. Yapılan bir çalışmada *P. aeruginosa* biyofilminde bulunan ekstraselüler DNA'nın, az sayıdaki hücrenin iki farklı yolla parçalanması sonucu oluştuğu bildirilmiştir (3). Bu yollardan biri QS sistemine bağlı olarak gelişip fazla miktarda DNA'nın serbest kalmasını sağlarken; diğeri QS'den bağımsız bir şekilde sadece temel düzeylerde ekstraselüler DNA'yı serbest bırakır. QS sisteminin kontrolünde mikrokolonilerden serbest bırakılan bu ekstraselüler DNA'lar özellikle olgun biyofilmin oluşumunda mantar başlıklarının şekillenmesinde önemli rol oynarlar (7).

2.1.3.4. Rhamnolipit

Rhamnolipitler, amfipatik glikolipitler olup yüzey gerilimini azaltan biyosüpfaktanlar gibi davranırlar. *P. aeruginosa* rhamnolipidinin üretiminde rol oynayan *rhlAB* operonlarının ekspresyonu QS'in kontrolü altında olup, biyofilmin olgunlaşma-1 aşamasında tespit edilmeye başlanır (83, 85, 90, 110). Mikroskopik incelemeler, ekzopolisakkarit matriksin içinde gömülü bakterilerin arasında, besin ve oksijen girişini ve artık ürünlerin çıkışını sağlayan açık kanalların varlığını gösterir (67). Rhamnolipidin başlıca görevi, bu kanalların açık kalmasını sağlamaktır (28). *RhlA* mutant suşlarla yapılan bir diğer çalışmada rhamnolipidin ayrıca mikrokolonilerin oluşumunda ve *P. aeruginosa* biyofilminde mantar başlıklarının şekillenmesinde rol oynadığı bildirilmiştir (87). *P. aeruginosa*'nın yüzeye tutunarak gerçekleştirdiği iki hareketten biri olan "twitching" hareketi, daha önce bahsedildiği gibi tip IV pili tarafından gerçekleştirilirken, "swarming" (kayma) hareketi ise QS'e bağlı olarak, fonksiyonel kirpiğin, bir biyosüpfaktan işlevi gören rhamnolipidin ve kısmen tip IV pilinin aracılığıyla gerçekleşmektedir (35, 65, 73). Bunların dışında rhamnolipidin, bakterilerin biyofilmden ayrılmasından sorumlu olduğu, *rhlAB* mutant suşların oluşturduğu biyofilimde ise kopmaların gerçekleşemediği öne sürülmüştür (12). Yapılan bu çalışmaları destekleyen bir diğer çalışmada ise, *rhl* QS sisteminin ve *rhlAB*'nin *algR*

tarafından baskılanmasının biyofilmin normal bir şekilde olgunlaşması için gerekli unsurlar olduğu, *algR* geni çıkartılmış mutant suşta ise rhamnolipit ve C4-HSL üretiminin biyofilimde yüksek olduğu ancak planktonik kültürlerinde olmadığı, dolayısıyla bu sistemin biyofilme özgü olduğu bildirilmiştir (78).

2.1.3.5. Çevre Koşullarının Biyofilmin Oluşumunda Etkisi

Ortamin pH'ı, biyofilmin içinde bulunduğu sıvının akış hızı, demir ve karbon kaynağı olarak ortamda glukozun varlığı *P. aeruginosa* biyofilminin şeklini ve oluşumunu etkilemektedir.

Biyofilimde QS'in gerçekleşebilmesi için açıl-homoserin laktonların stabil kalmaları önemli bir yer tutar. AHL'ların homoserin laktonlarının bazik pH değerlerine karşı duyarlı oldukları; yarılanma süreleri pH 7'de saatlerle ifade edilirken, 8'in üzerindeki pH değerlerinde dakikalar içerisinde gerçekleştiği gösterilmiştir (111).

Kimyasal yapının yanı sıra, içinde bulunduğu çevrenin fiziksel koşulları da *P. aeruginosa* biyofilminin oluşumunu etkilemektedir. Bakterinin oluşturduğu AHL'lar biyofilmden dışarıya diffüze olarak, bulundukları bölgeden sıvının akış hızına bağlı olarak uzaklaşırlar, dolayısıyla da ortamın hidrodinamik yapısına bağlı olarak eşik düzeye ulaşamayan AHL'lar biyofilmin gelişimini etkilerler. Öte yandan sıvının akış hızı da biyofilmin şeklini etkileyebilmektedir. Hidrodinamik stresin *P. aeruginosa*'da eksprese edilen genler üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, yavaş sıvı akışında *las* genlerinin ekspresyonunda herhangi bir farkın görülmediği, ancak QS'in kontrolü altında olan Psl ve rhamnolipidi eksprese eden genlerdeki artışın etkisiyle süspansiyon şeklinde gevşek biyofilmlerin, hızın artmasıyla ise yüzeye yapışık biyofilmlerin olduğu bildirilmiştir (25). Bunun aksine, turbülent akım altında gelişen biyofilmin oluşumunda QS sisteminin beklendiği gibi önemli bir etkisi olmamaktadır (61, 101).

P. aeruginosa biyofilminin oluşumunda rol oynayan bir diğer faktör, QS sisteminin kontrolü altında olan bakterinin sideroforu piyoverdindir. Bilindiği gibi piyoverdin ortamdaki demirin bakterinin içine alınması için anahtar rol oynar. Piyoverdin oluşturamayan mutant suşlar yassı biyofilmler oluştururken, bu siderofora sahip olan *P. aeruginosa* suşu hacimli, normal yapıda biyofilmler oluşturmaktadır (6).

Karbon kaynağı, biyofilmin olgunlaşmasında yer tutan bir diğer önemli çevre faktörüdür. Yapılan çalışmalar, QS sisteminin kontrolü altında *P. aeruginosa*'nın gerçekleştirdiği biyofilmin ürettiği ortamdaki karbon kaynağına, özellikle glukozun varlığına bağlı olduğunu göstermiştir (32, 114). QS sisteminin kontrolü altında *P. aeruginosa*'nın katı yüzey üzerinde gerçekleştirdiği kayma hareketinin indüklendiği süksinat ve glutamat varlığında *P. aeruginosa* yassı bir biyofilm oluştururken, bu hareketin kısıtlandığı glukoz varlığında ise yer yer mikrokolonilerle bölünen bir biyofilm oluşturmaktadır (114). Benzer şekilde, glukoz varlığında üreyen *P. aeruginosa*'nın, mantar şeklindeki yapıların su kanallarıyla bölündüğü normal, hacimli, biyofilmlerini oluşturduğu, sitrat varlığında ise normal olmayan, yassı biyofilmlerini oluşturduğu yapılan diğer çalışmalarla gösterilmiştir (63, 64). *P. aeruginosa*'nın biyofilmini oluştururken geçirdiği aşamalar ve biyofilmin gelişiminde bu karbon kaynaklarının etkisi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

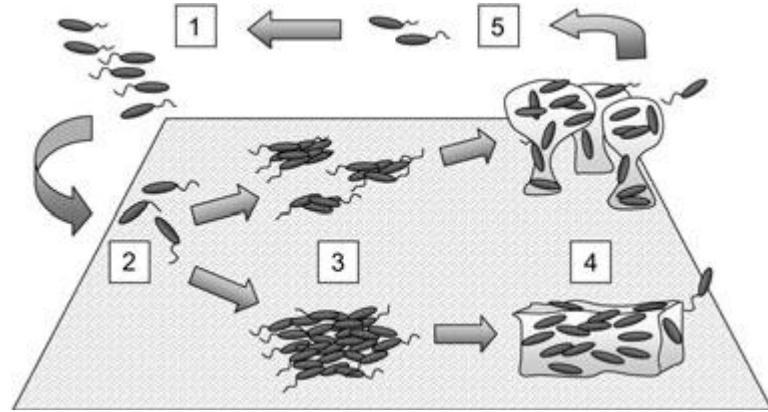
2.1.4. Olgunlaşma-2

Biyofilm gelişiminin dördüncü aşaması olan olgunlaşma-2'de biyofilm maksimum kalınlığına ulaşır (yaklaşık 100 μm) ve bu süreç altı günde gerçekleşir. Yapılan mikroskopik incelemelerde kümelenmiş bakterilerin hareketsiz olduğu, mantar veya koni şeklinde oluşan bu kümelerin ulaşabildikleri en büyük boyuta ulaştıkları ve biyofilm içerisindeki bakterilerin kümeler halinde toplandıkları görülür. Bu aşamanın önemli özelliği, olgunlaşma-2 fazındaki hücreler planktonik hücreler ile karşılaştırıldığında 800'den fazla proteinin ekspresyon seviyesinde altı kattan fazla değişimin görülmesidir, bu da neredeyse planktonik hücrede eksprese edilen proteinlerin % 50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Muhtemelen bu durum ortamda azalan oksijen miktarına bağlı olarak, ortama uyabilmek için bakterinin eksprese ettiği ilave genlerden kaynaklanmaktadır (110).

2.1.5. Dağılma

Biyofilm gelişiminin beşinci ve son aşaması olan dağılma ise biyofilm oluşumunun 9-12. gününde gerçekleşir (110). Bu aşamada biyofilmden bakteri kümeleri koparak ayrılır ve sıvının akışıyla gittiği diğer bölgelerde, yapıştığı bakir yüzeylerde yeni olgun biyofilmlerin oluşumuna neden olur. Bu büyük kopmalar mantar şeklinde kümelenmiş mikrokolonilerin sıvının mekanik akış kuvvetiyle ayrılması sonucunda gerçekleşebildiği gibi, genetik olarak programlanan bir yanıtın aracılığıyla da

oluşabilmektedir. Özellikle *algL* geni tarafından kodlanan aljinat liyaz enzimi bu aşamada devreye girerek aljinatın parçalanmasına ve bu şekilde biyofilmin parçalanarak dağılmasına neden olabilmektedir (15). *P. aeruginosa* biyofilmlerinde dağılma ayrıca hareketsiz hücrelerden oluşan mantar şeklindeki bakteri kümesinin merkezinde oluşan boşlukta hareketli hücrelerin belirip, yüzerek ayrılmasıyla da gerçekleşebilmektedir (110). Mantarın merkezinde beliren bu boşluk, Psl ekzopolisakkaritin, olgunlaşma döneminde biyofilmin dış yüzeyinde birikerek, merkezin ekzopolimer matriksinin bir araya gelmesinde katkıda bulunan bu polisakkaritten yoksun kalmasından ve *rhlAB*'nin ekspresyonu sonucunda biyofilmin 10-12. gününde merkezde biriken rhamnolipitten kaynaklanmaktadır (12, 69). Bu dönemin ilginç yanı, bakterilerin eksprese etmiş oldukları proteinlerin profiline bakıldığında olgunlaşma-2 dönemindeki bakterilerden ziyade planktonik bakterilerle benzerlik göstermesi ve biyofilmin olgunlaşma safhaları boyunca süren yükselen protein ekspresyonunun sadece bu dönemde azalma göstermesidir (110). Bu bulgular dağılma döneminde bakterinin biyofilmden planktonik fenotipine geçtiğini göstermektedir.



Şekil 2-1: *Pseudomonas aeruginosa* biyofilminin oluşumu. Planktonik hücreler (1) önce geriye dönüşümlü daha sonra geriye dönüşümsüz bir şekilde yüzeye bağlanır (2) ve mikrokoloniler oluşur (3). Olgunlaşma-1 safhasında hareketin indüklendiği süksinat ve glutamat varlığında yassı, hareketin kısıtlandığı glukoz varlığında ise mantara benzeyen normal, hacimli biyofilm yapısını oluşturur (4). Olgunlaşma-2 safhasında maksimum kalınlığa ulaşan biyofilm bundan sonra son aşama olan dağılma safhasına girer (5) ve bakir alanlarda yeni biyofilmlerin oluşumunu başlatır (33).

2.2. *Pseudomonas aeruginosa* ve Dezenfeksiyonun Önemi

P. aeruginosa ilk kez Gessard tarafından 1882 yılında izole edilmiş ve bir patojen mikroorganizma olarak ilk kez Charrin tarafından 1890'da fark edilmiştir (117). 19. yüzyılın sonuna doğru ise insanın hemen hemen tüm anatomik bölgelerinden infeksiyon etkeni olarak izole edilmeye başlanmış, 1917'de Fraenkel *P. aeruginosa*

infeksiyonunun klasik tanımını yapmıştır (27). 1960'lı yıllarda *P. aeruginosa*'nın neden olduğu infeksiyonların özellikle hastane kaynaklı olduğu fark edilmiş ve zaman içinde bir hastane infeksiyonu etkeni olarak gittikçe artan sıklıkla izole edilmeye başlanmıştır (2). Ancak *P. aeruginosa*'nın hastane infeksiyonu etkeni olarak önem kazanmasının başlıca nedeni immün sistemi baskılanmış, kanser, kistik fibröz, travma ve yanık gibi belirli hasta gruplarını seçmesi ve bu hastaların tedavisinde güçlük yaratmasından dolayı yüksek oranda mortaliteye neden olmasıdır. İmmün sistemi normal olan kişilerde ciddi *P. aeruginosa* infeksiyonlarına çok ender rastlanılmaktadır. Konak kendisini öncelikle epitelyum bariyeri daha sonra hümmoral ve hüccresel bağışıklık sistemleri ile savunmaktadır (96). Öte yandan, konağın mekanik bariyeri trakeostami, kateterizasyon, cerrahi girişim, yanık gibi travmalar sonucu hasara uğradığında bakteri dokuya yerleşme imkanını bulabilmektedir. Bakteri bundan sonra sahip olduğu virölans faktörleri ile yerleştiğı bölgeye göre farklı tipte oluşturduğu infeksiyonlarını başlatmaktadır (11, 36, 43).

Hastanedeki infeksiyon kaynaklarını ise nemin bulunduğu her türlü ortam oluşturmaktadır. *P. aeruginosa* birçok organik maddeyi metabolize etme yeteneğinden kaynaklanan basit beslenme gereksiniminden ve biyofilm denilen, bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit matriksin içinde mikrokoloniler halinde üreyebilme yeteneğinden dolayı, sulu sistemlerde aylarca canlı kalabilmekte ve dezenfektanlara direnç gösterebilmektedir (24, 27, 106). Bu şekilde, kontamine su veya dezenfektanların tatbik edilmiş olduğu, genel kullanımda yararlanılan araçlar ve tıbbi girişimler için kullanılan gereçler yoluyla bakteri, hastalarda kolonize olabilmektedir (14).

Özellikle kateterizasyon ve trakeostomi gibi tıbbi girişimlere maruz kalan hastalarda bu risk artmaktadır. Çoğul antibiyotik direncinin biyofilm içerisinde üreyen bakteri topluluklarıyla ilişkisi ilk olarak kateter ve eklem protezleri gibi implantların yaygın kullanılmaya başlandığı 1980'li yıllarda ortaya konulmuştur (46, 80). Bazı durumlarda implantasyonun akabinde bakteriyemi vakaları rapor edilmiş, uygun antibiyotik tedavisine rağmen, tedavi kesildikten kısa bir süre sonra infeksiyon tekrarlamış ve ancak protezlerin çıkartılması sonucunda sorun çözülebilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda implantlara yapışık biyofilm içerisinde üreyen bakterilerin infeksiyona neden olduğu tespit edilmiştir. *P. aeruginosa*'nın bu şekilde septisemi,

idrar yolu infeksiyonları ve osteomiyelite neden olan önemli bir hastane infeksiyonu etkeni olmasının yanı sıra, yanıklarda ve kistik fibrozlu hastalarda mortalitesi yüksek infeksiyonlara da neden olmaktadır (68, 76, 99). Yapılan araştırmalar *P. aeruginosa* ile kontamine dezenfektanların hastane infeksiyonuna neden olan önemli kaynaklar arasında yer aldığını göstermektedir. Özellikle izotiyazolonlar, katerner amonyum ve fenolik bileşiklerle hazırlanmış dezenfektanlarda bakterinin biyofilmler halinde üreme yeteneği hastane infeksiyonlarında patlamaların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (44, 124).

Sadece hastane infeksiyonu etkeni olarak değil, modern yaşam tarzlarının etkisiyle hastane dışındaki sağlıklı kişilerde jakuzilerin, yüzme ve termal havuzların, kullanımından kaynaklanan *P. aeruginosa* infeksiyonları ve buna bağlı olarak epidemiler ortaya çıkabilmektedir (126). *P. aeruginosa*'ya bağlı korneal ülserasyon ve keratit özellikle kontakt lenslerin yaşamımıza girmesiyle görülmeye başlanmıştır (45, 76). *P. aeruginosa*'ya bağlı orta kulak iltihabı ise kontamine yüzme havuzlarından kaynaklanmaktadır. *P. aeruginosa*'nın termal havuzlarda ve jakuzi gibi sıcak su kaynaklarında yaygın bir şekilde, bazen 2400 kob/ml'ye ulaşabilen konsantrasyonlarda, bulunabilmesi kişilerde folikülite yol açan epidemilere neden olabilmektedir (75, 126). Bu tür kaynaklardaki varlığı, bakterinin 42°C'de kolaylıkla üreme özelliğinden ve suyun havalandırılmasıyla bakterinin üremesini kolaylaştıran koşulların artmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan araştırmalar sıcak su havuzlarında *P. aeruginosa*'nın bulunmasının ve infeksiyonlara yol açmasının başlıca nedeninin yetersiz klorlama işleminden kaynaklandığını ortaya koymaktadır. Bu havuzlarda biyofilm oluşumu dahil olmak üzere *P. aeruginosa*'nın üremesini kontrol altına almak için sudaki serbest klor konsantrasyonunun 2 ppm'in üzerinde ve pH değerlerinin pH 7.2-7.8 arasında tutulmasının yeterli olduğu kabul edilse de, 3 ppm serbest klor varlığında dahi izole edildiğine dair bulgular bulunmaktadır (100, 126).

Sadece kontaminasyon kaynağı olarak değil, endüstrinin her alanında suyun girdiği her sistemde biyofilmlerin varlığı paslanmayı hızlandırmakta, borulardaki basıncı arttırmakta veya ısının gerektiği şekilde iletilmesini önleyerek sistemin verimini düşürebilmektedir. *P. aeruginosa* içme suyu kaynaklarında yüksek oranda bulunmamasına rağmen, içme suyunu besleyen borularda, özellikle sistemin bağlantı parçalarında biyofilmlerin bulunması, suyun kontamine olmasına neden olabilmektedir

(49, 75). Boru sistemlerinde bulunan biyofilmler bakterisidal ajanlara direnç gösterdiklerinden dolayı arındırılmasında güçlükler yaşanmakta, biyofilimde gömülü bakterinin öldürülmesi için planktonik tipe oranla çok daha yüksek konsantrasyonda dezenfektanın kullanılması gerekmektedir (8).

Kontaminasyonu kontrol etmenin başlıca yollarından biri etkili bir dezenfeksiyon işleminin yapılmasıyla gerçekleşir. *Dezenfeksiyon*, potansiyel patojenler dahil olmak üzere mikroorganizmaların cansız nesnelerin yüzeyinden uzaklaştırılması işlemidir. İngiliz Standartları Enstitüsü tarafından dezenfeksiyon, tüm mikroorganizmaların ölmesini gerektirmeyen, ancak belirli bir amaca yönelik olarak sağlığa zararlı olmamak ve bozulabilecek materyallerin kalitesini bozmamak koşuluyla mikroorganizma sayısının kabul edilebilir bir seviyeye indirilmesini sağlayan işlem olarak tanımlanmıştır (56). *Dezenfektan* ise hastalığa yol açabilen mikroorganizmaların vejetatif şekillerini öldüren, ancak spor şekillerinin öldürülmesini gerektirmeyen kimyasal maddelerdir (20).

Kimyasal dezenfektanlar farklı seviyelerde etki oluşturma yeteneğine sahiptirler. Yüksek seviyeli dezenfeksiyon terimi çok dirençli bir kısım bakteri sporları dışında tüm mikroorganizmaların yok edilmesi işlemi içerir. Orta seviyeli dezenfeksiyon *Mycobacterium tuberculosis* dahil olmak üzere tüm bakterilerin vejetatif şekillerini tahrip eden, ancak bazı virüs ve mantarları içine almayan, az veya herhangi bir sporosidal aktivite göstermeyen tahrip işlemidir. Düşük seviyeli dezenfeksiyon ise vejetatif bakterilerin, virüslerin ve mantarların büyük bir kısmını tahrip edebilen, ancak bakterilerin sporlu şekillerini ve daha yüksek direnç gösteren mikroorganizmaları içine almayan işlemidir. Bazı yüksek seviyeli dezenfektan maddeler iyi sporosidal aktivite gösterirler ve sterilizasyonda olduğu gibi mikroorganizmaların tümünü tamamiyle öldürme yeteneğine sahip olduklarından “kemosterilan” veya “sıvı kimyasal sterilan” şeklinde adlandırılırlar (47, 56).

2.3. İdeal Bir Dezenfektanın Özellikleri

İdeal bir dezenfektanın tüm koşullar altında antimikrobik etkisini gösterebilme yeteneğine sahip olması istenir. Ne yazık ki, istenen tüm koşulları karşılayan tek bir kimyasal ajan bulunmamaktadır. Bununla beraber, böyle bir ajanda olması gereken başlıca özelliklerin bilinmesinde yarar vardır. Böyle bir bilgi belirli bir uygulama için

var olan en uygun ürünün seçilmesinde yardımcı olur. İdeal bir dezenfektanda aranan özellikler aşağıda belirtildiği gibi özetlenebilir (20):

2.3.1. Antimikrobiyal Aktivite

Dezenfektanın mikroorganizmaların üremesini durdurması veya tercihen onları öldürmesi istenen bir aktivitedir. Kimyasal ajan düşük konsantrasyonlarda dahi farklı türden mikroorganizmaları inhibe edecek veya öldürebilecek geniş antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip olmalıdır.

2.3.2. Çözünürlük

Dezenfektan madde etkili bir şekilde antimikrobiyal aktivitesini gösterebilmesi için su veya uygun bir çözücüde (alkol gibi) çözünebilir olmalıdır.

2.3.3. Stabilité

Dezenfektan maddenin makul bir süre içerisinde saklanması antimikrobiyal etkisinde ciddi bir azalmaya neden olmamalıdır.

2.3.4. Toksik Olmamalı

Dezenfektanın insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkisi bulunmamalıdır.

2.3.5. Homojenite

Hazırlanan ürünün aktif içeriği her uygulamada varlığını sağlayabilecek bir homojeniteye sahip olmalıdır. Öyle ki, içeriğin topaklar oluşturmaması veya saklama kabının tabanına çökmemesi gerekir.

2.3.6. Ortamdaki Maddelerden Minimum Düzeyde İnaktif Olmalı

Bazı dezenfektanlar muamele edilen maddede bulunan proteine veya başka organik maddelere kolaylıkla bağlanma özelliğine sahiptirler. Bu da mikroorganizmalara karşı etkili olabilmek için gerekli olan kimyasal madde miktarının azalmasına neden olur.

2.3.7. Normal Sıcaklıklarda Aktivite

Dezenfektanın normal çevre sıcaklığında aktivite gösterebilmesi ve kullanıldığı ortamda etkisini gösterebilmek için sıcaklığın arttırılması gibi zorunlulukları taşıması istenir.

2.3.8. Nüfuz Etme Yeteneği

Dezenfektanın yüzeye nüfuz etme yeteneği olmadığı taktirde antimikrobiyal aktivitesi uygulandığı yerle sınırlı kalır; kaldı ki, yüzey etkisi bazen herşeyden önce istenen bir durumdur.

2.3.9. Materyal Emniyeti

Dezenfektan olarak kullanılan kimyasal maddenin uygulandığı yüzeyde ne metalin paslanmasına veya şeklinin bozulmasına ne de kumaşın lekelenmesine veya hasarlanmasına neden olmaması istenir.

2.3.10. Koku Giderme Yeteneği

İdeal olarak, bir dezenfektanın kokusuz veya hoş kokulu olması gerekir. Ancak, ayrıca koku giderici bir yapısının olması da istenen özellikler arasında yer alır.

2.3.11. Deterjan Yeteneği

Dezenfektanın temizleme yeteneğine sahip olması, uygulandığı yüzeydeki mikroorganizmaların mekanik olarak da uzaklaştırılmasını sağlar.

2.3.12. Bulunabilirlik Ve Düşük Maliyet

Dezenfektanı oluşturan kimyasal maddelerin kolay bulunabilir ve düşük maliyetli olması gerekir.

2.4. Dezenfektanın Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Uygulanacak belirli bir amaç için en uygun dezenfektan seçilirken dikkat edilmesi gereken hususların başında kullanılan dezenfektanın aktivitesini etkileyen faktörlerin bilinmesi gelmektedir. Ortamın sıcaklığı ve pH'ı; dezenfektanın tipi, aktivitesi, uygulanan konsantrasyonu ve seyreltilmesinde kullanılan suyun kalitesi (sertlik derecesi); mikroorganizmanın tipi, miktarı ve üreme hızının yanı sıra biyofilm içerisinde oluşu; ortamda dezenfektanın etkisine müdahale edebilecek çevre kaynaklı organik maddelerin varlığı ve temas süresi dezenfeksiyon işleminin başarısını etkileyebilmektedir (56, 72, 107, 126).

2.4.1. Kimyasal Ajanın Özellikleri

Bir dezenfektanın kullanılmasıyla mikroorganizmanın öldürülmesi veya üremesinin durdurulması işlemi esasen bir kimyasal reaksiyon olup, bu reaksiyonun hızı ve süresi kimyasal maddenin konsantrasyonuna, formülasyonuna, ortamın sıcaklığı ve

pH'ına bağılı olarak değişmektedir. Bu nedenle dezenfektanların etkinliği belirlenirken ön görölen uluslararası standartların doğrultusunda bakterisidal aktivitelerinin tayin edilmesi gerekmektedir. Öte yandan belirli bir uygulama için dezenfektan seçilirken oluşturduğu toksik etki de göz önünde bulundurulmalıdır. Sağlık ve güvenlik konusunda artan kaygılar, toksik ve potansiyel toksik olan ajanların kullanımı sırasında gerekli olan önlemleri belirleyen Sağlığa Zararlı Maddelerin Kontrolü (Control of Substances Hazardous to Health=COSHH) kurumunun bu konuda yapmış oldukları düzenlemeleri de etkilemiştir. Dezenfektan kullanımı açısından bu düzenlemeler özellikle fenol, formaldehit ve glutaraldehitin kullanımını etkilemektedir. Dezenfeksiyon amacıyla kullanılan kimyasal ajanın insan ve hayvanlar üzerinde toksik olmaması istendiği gibi, uygulandığı materyale de zarar vermemesi gerekir. Örneğin metallerin paslanmasına, lenslerin berraklığını veya bütönlüğünü kaybetmesine veya sentetik polimerlerin yapısında değişikliklere neden olmamalıdır. Kumaş, kauçuk veya plastik gibi materyallerin bazı dezenfektanları adsorbe etme yeteneği bulunur; örneğin katerner amonyum bileşikleri kumaşlara, fenolik bileşikler ise kauçuğa adsorbe olarak aktif madde konsantrasyonunun azalmasına neden olurlar (56, 126).

2.4.2. Mikroorganizmaya Ait Özellikler

Dezenfekte edilecek ortamdaki mikroorganizmanın tipi ve kontaminasyonun derecesi dezenfeksiyon işleminin başarısını önemli bir şekilde etkilemektedir. Canlı organizma yükü fazla ise, dezenfektanın daha yüksek konsantrasyonlarda ve uzun temas sürelerinde kullanılması gerekebilmektedir. Kimyasal ajanın oluşturduğu etki mekanizmasına bağılı olarak mikroorganizmalar farklı duyarlılıklar gösterebilmektedir. Örneğin bazı bakterilerin oluşturduğu sporlar vejetatif şekillerine göre dezenfektanlara karşı daha fazla direnç gösterebilmektedirler (56).

Bunun dışında mikroorganizmanın üreme fazı da dezenfektanın aktivitesini etkileyebilmektedir. Genellikle logaritmik gelişme fazında bulunan hücreler gerileme fazındaki hücrelere oranla dezenfektanlara çok daha duyarlıdır. Bunun başlıca nedeni gerileme fazında sayıları yüksek olan ölü hücrelerin canlı olanları korumasından kaynaklanmaktadır (107).

Öte yandan bakterilerin biyofilm içerisinde gömölü bulunan şekilleri serbest planktonik şekilleriyle kıyaslandığında dezenfektanlara karşı direnç gösterirler ve inaktive edilmeleri için bazen 1000 katı konsantrasyonda çözeltilerin kullanılması

gerekmektedir. Biyofilm içerisindeki bakteri bir takım mekanizmalarla dezenfektanlara karşı direnç gösterir. Öncelikle bu bakterileri saran polimerik matriksin bir bariyer olarak işlev görmesinin yanı sıra, derine gömülmüş bakterilerin çok düşük seviyede metabolik aktivite göstermeleri ve çok düşük hızda bölünmeleri dezenfektanın nüfuz etmesini engellemektedir. Öte yandan biyofilm içerisindeki bakteri quorum sensing'in etkisiyle genetik değişikliğe uğrar ve biyofilm içerisindeki mikroçevrenin fizyolojik değerleri değişir. Ürettikleri parçalayıcı enzimlerin etkisiyle dezenfektanları inaktive edebilirler. Son olarak, rezervuar görevini üstlenerek, dirençli bakterinin aralıksız bir şekilde yayılmasını ve yeni kontaminasyon kaynaklarını oluşturmasını sağlar (107, 113, 126).

2.4.3. Çevresel Faktörler

Ortamda bulunan organik maddeler dezenfektanın antimikrobiyal aktivitesini adsorpsiyon veya kimyasal inaktivasyon yoluyla, ya çözeltideki aktif maddenin konsantrasyonunu azaltarak ya da dezenfektanın nüfuz etmesini engelleyen bir bariyer gibi davranarak, belirgin bir şekilde azaltabilmektedir. Kan, vücut sıvıları, cerahat, süt, toprak, gıda kalıntıları, dışkı materyali veya koloidal proteinler düşük miktarlarda bulunsalar dahi antimikrobiyal ajanın etkinliğini farklı derecelerde, bazılarında ise önemli oranda azaltırlar. Bu azalan aktivite, özellikle klor gibi reaktif bileşiklerde daha belirgin bir şekilde görülmektedir. Bunun dışında sudaki iyonların varlığı da dezenfektanın aktivitesini etkileyebilmektedir (56, 107). Bu nedenle dezenfektanların biyosidal aktiviteleri test edildiğinde damıtık suya iyonların ilave edilmesiyle hazırlanan yapay sert suyun deneyde kullanılması standartlar tarafından istenmektedir (38).

2.4.4. Dezenfektanın Seçiminde Etkili Olan Diğer Faktörler

Tüm bunların dışında, kullanılacak dezenfektanın seçilmesinde rol oynayan faktörlerin başında kimyasal maddenin Environmental Protection Agency (EPA) tarafından tescil edilmiş olması gelir. Üretici firmanın kimyasal ajan hakkında net ve doğru veriler sağlamış olması, kapların üzerindeki etiketlerin ve kullanma talimatının kolay okunur ve anlaşılır olması, ürün kalıntısına ait aktivitenin, ürünün emniyetli oluşu ve çevresel uygunluğu hakkında bilgilerin bulunması gerekir. Bunun dışında seyretilmemiş ürünün raf ömrünün kabul edilebilir uzunlukta olması ve maliyetinin düşük olması da seçimini etkileyen diğer faktörlerin arasında yer alır (72).

2.5. Sodyum hipoklorit (NaOCl)

Sodyum hipoklorit halojenler ailesinin bir üyesi olup, klor grubunun altında yer alan antimikrobik etkili bir maddedir. Halojenler genellikle güçlü okside edici ajanlardır ve bu özellikleri nedeniyle mikroorganizmalar üzerinde yüksek düzeyde aktif ve yıkıcı etkilidirler (20).

1843 yılında Lefevre'nin ilk olarak klorlu suyu kullanıma tanıtmasının ardından, Semmelweis Viyana Hastanesinde doğumda görev alan herkesin ellerini klorlu suyla yıkaması konusunda ısrarcı davranarak bebek infeksiyonlarının insidansında önemli bir azalma görülmesini sağlamıştır (40). Ancak 1916'da cerrahi-klorlanmış soda çözeltisinin (Dakin's çözeltisi) gelişimine kadar olan süreçte, kullanımda olan geleneksel klor salan dezenfektanlar sabit içerikli olmayıp serbest alkali ve bazen serbest klor içermekteydiler. Dakin's çözeltisinin (alkali ortamda % 0,5 konsantrasyondaki sodyum hipoklorit çözeltisi) I. Dünya Savaşı'nda açık yaraların dezenfeksiyonu için büyük çapta kullanılmasıyla sodyum hipoklorit de kullanıma girmiştir (9, 77).

Klor bileşiklerinin arasında en sık kullanılanlar hipokloritler ve *N*-kloro bileşikleridir. Klorlu bileşikler sahip oldukları yüksek antimikrobiyal aktiviteleri, insanlar üzerine olan düşük toksisiteleri, yaygın uygulanabilme alanları ve düşük maliyetlerinden dolayı genellikle gıda endüstrisinde sıhhileştirici ajan olarak kullanılırlar. Ancak, bunun yanı sıra tahriş edici ve paslanmaya neden olmaları gibi dezavantajları da bünyelerinde barındırmaktadırlar (77).

2.5.1. Yapı-Aktivite İlişkisi

Oksidasyon yoluyla öldürücü etkisini gösteren sodyum hipoklorit (NaOCl) hücre membranında hasarlar oluşturup, hücre içeriğinin dışarıya akmasına neden olabildiği gibi DNA'ya da hasar verebilmektedir (48). Ancak, sodyum hipokloritin antimikrobiyal aktivitesi ortamda bulunan organik maddelerden, pH değerinden ve ışıktan etkilenmektedir. Öncelikle klor, oldukça yüksek derecede reaktif bir madde olduğundan organik maddelere kolaylıkla bağlanabilmekte, bu da çözeltideki aktif klor konsantrasyonunun azalmasına neden olmaktadır. Ancak organik maddenin ortamdaki uzaklaştırılması veya hipoklorit konsantrasyonunun artırılmasıyla bu sorun giderilebilmektedir. Bir diğer konu ise, asit pH HOCl'in hidrolize olmasını kolaylaştırdığından, asit pH'da alkali pH'ya oranla daha yüksek aktivite göstermeleridir.

Özellikle pH 5’de sodyum hipokloritin antimikrobiyal aktivitesi en elverişli düzeye ulaşır, ancak bu da çözeltinin stabilitesini yitirmesine yol açar. Sodyum hipoklorit çözeltisine % 1,5-4 oranında sodyum hidroksitin ilave edilmesi sonucunda çözeltinin stabilitesinin arttığı gibi, buna bağlı olarak sporosidal aktivitesinin de arttığı görülmüştür. Sodyum hipokloritin sporosidal aktivitesi ayrıca çözeltiye düşük miktarda amonyum veya bromürün ilavesiyle de artırılabilir (56, 77).

2.5.2. Etki Spektrumu ve Kullanım Alanları

Klor gazı, kamu su kaynaklarının, sodyum hipoklorit ise genellikle yüzme havuzlarının dezenfeksiyonu için kullanılmaktadır (77).

Evrensel bir dezenfektan olan klor daha çok % 1-5 konsantrasyonlarında NaOCl çözeltisi olarak bulunur. Bu çözelti “ev çamaşır suyu” olarak bilinir ve genellikle aktif madde konsantrasyonu % 5,25 NaOCl içerecek şekilde satışa sunulur, ancak bu konsantrasyondan daha düşük NaOCl içeren çamaşır suları da piyasada bulunmaktadır. Serbest klor < 5 ppm konsantrasyonunda vejetatif bakterileri öldürmektedir. Ancak bakteri sporlarını öldürmek için gereken konsantrasyon vejetatif bakteriler için gerekli olandan 10-1000 kat daha fazladır. Mikobakterileri öldürmek için gerekli olan klor miktarı ise 1000 ppm ile 10.000 ppm arasındadır. Virüsler 200 ppm serbest klor ile 10 dakikada inaktif olmaktadır. Mantarlar 100 ppm konsantrasyonlarında 1 saatte ölürlerken, mantar sporlarını öldürmek için 500 ppm klor konsantrasyonu gereklidir.

NaOCl’in % 5,25’lik stok çözeltisinin 1:10 dilüsyonu olan ve yaklaşık olarak 5000 ppm serbest klora eşdeğer olan çözeltisi, Centers for Disease Control and Prevention tarafından kanla bulaşık yüzeylerin temizlenmesi için önerilmektedir. Klor kan, serum ve diğer protein içeren organik maddeler tarafından inaktif edildiğinden dolayı, çamaşır suyu kullanmadan önce yüzeyin temizlenmesi tavsiye edilmektedir. Güncel Occupational Safety ve Health Administration’ın talimatlarına göre kontaminasyon kaynağında mikobakteriler bulunduğu zaman, tuberkulosidal etkili bir dezenfektanın da gerekebileceği bildirilmiştir. Hasta çıkartılarıyla kontamine yüzeyleri temizlemek için en iyi yöntem çamaşır suyu çözeltisinin taze hazırlanmasıdır. pH 8,0 musluk suyu ile hazırlanan NaOCl çözeltisi ışık geçirmeyen bir kapta saklandığında bir ay süreyle stabil kalır. Bununla beraber, bir ay boyunca bu kaplar kısa sürede açılıp kapatıldığında dahi, çözeltideki aktif klor konsantrasyonunda % 50 kadar azalma görülebilmektedir. Bu nedenle, % 5,25 konsantrasyonunda aktif klor içeren bu stok

çözeltiden 30 gün sonra bir çözelti hazırlandığında sadece 1:5 dilüsyonla 5000 ppm konsantrasyona ulaşılacağı göz önünde bulundurulmalıdır (72).

Hipokloritler en eski dezenfektanlardan olup kolayca erişilebilir olmaları ve pahalı olmamaları ile klor içeren dezenfektanlar arasında en kullanışlıları olarak anılmalarına yol açmıştır. Hipokloritler mantar ve virüsleri de içeren geniş bir mikroorganizma spektrumuna karşı hızlı bir öldürme yeteneğine sahip olup yüksek seviyelerdeki serbest klor, bakteriyel sporların ve aside dirençli bakterilerin yok edilmesine de olanak sağlamaktadır (56).

2.6. Benzalkonyum klorür (BAK)

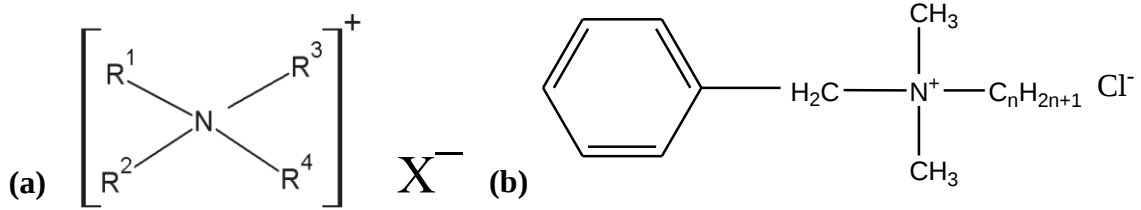
2.6.1. Yapı-Aktivite İlişkisi

Yüzey aktif ajanlar (süfaktanlar), moleküldeki hidrofilik gruplarının iyonlaşmasına bağlı olarak amfoterik, iyonik olmayan, katyonik ve anyonik olmak üzere 4 gruba ayrılırlar. Bu gruplarda bulunan maddeler deterjanla dezenfektan arasında farklı düzeylerde etki gösterebilirler. Örneğin, anyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif ajanlar güçlü deterjan özelliğine sahip olmakla birlikte ya düşük antimikrobiyal aktivite gösterir veya hiç göstermezler. Ancak bu maddeler dış membranın geçirgenliğini değiştirerek belli bakteri türlerini bazı antimikrobiyal ajanlara karşı daha duyarlı hale getirebilirler. Amfoterik veya amfolitik ajanlar anyonik, katyonik ya da zwitteriyonik (pozitif ve negatif yüklü iyonları aynı molekülde taşıyanlar) aktivite göstermek üzere iyonize olabilmekte ve hem anyonik yüzey aktif ajanların deterjan özelliğini hem de katyonik ajanların antimikrobiyal aktivitesini gösterebilmektedirler Katyonik yüzey aktif ajanlar ise antimikrobiyal aktiviteleri ile kullanılmakta olup, katerner amonyum bileşikleri olarak bilinen grup içinde yer alırlar (56).

Katerner amonyum bileşiklerinin antimikrobiyal özellikleri ilk olarak 1916 yılında bileşiği geliştiren Jacobs tarafından belirlenmiş, ancak 1935'te Domagk'ın çalışmasına kadar önem kazanmamıştır. İlk araştırmacılar bu bileşiklerin önemli derecede sporosidal aktivitesi olduğunu iddia etmişlerse de, test metotlarının geliştirilmesiyle bu düşüncenin hatalı olduğu ispat edilmiştir (77).

Katerner amonyum bileşikleri merkezde bulunan bir azot molekülüne çeşitli organik kimyasal yapıların eklenmesi ile elde edilen amonyum bileşikleri olup genel kimyasal formülü şekil 2.2.a'da gösterilmiştir. R grupları birbiri ile benzer ya da farklı

yapılardaki alkil veya heterosiklik radikaller, X^- ise genellikle klor ya da brom gibi bir anyondur (20, 72, 77). Katerner amonyum bileşiklerinin yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olabilmesi için R gruplarından en az birinin C_8-C_{18} arasında bir zincir uzunluğuna sahip olması gerekmektedir (77). Örneğin benzalkonyum klorür çözeltisinin R gruplarından biri C_8-C_{18} arasında zincir uzunluklarına sahip moleküllerin karışımlarından oluşmuştur ve bu yapı moleküle yüksek bir dezenfektan aktivitesi kazandırmaktadır (Şekil 2.2.b).



Şekil 2-2: Katerner amonyum bileşiklerinin genel yapısı (a) ve benzalkonyum klorürün kimyasal formülü (b).

Katerner amonyum bileşikleri, güçlü yüzey aktif özellikleri ile deterjan etkisi göstermelerinin yanı sıra mikroorganizmaların proteinlerini denatüre etmek, enzimlerini inaktive etmek ve hücre membranını bozmak suretiyle kuvvetli dezenfektan aktivitesine de sahiptirler. Ancak, katerner amonyum bileşiklerinin antimikrobiyal aktiviteleri organik madde, anyonik deterjanlar (sabunlar), divalen katyonlar, gazlı bez ve pamuk gibi gözenekli materyallerin varlığında azalmaktadır (72). Katerner amonyum bileşikleri nötral veya hafif alkali pH'ta mikroorganizmalara karşı en etkili iken pH değeri 3,5'tan düşük olduğunda neredeyse etkisiz olurlar. Bu durum anyonik ajanların katyonik ajanların aktivitesini büyük ölçüde azaltmalarını da açıklamaktadır. Benzer şekilde katerner amonyum bileşiklerinin iyonik olmayan ajanlarla da uyumsuz olduğu gösterilmiştir (56).

2.6.2. Etki Spektrumu ve Kullanım Alanları

Katerner amonyum bileşikleri hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için çok düşük konsantrasyonlarda bile bakterisidal etkilidirler. Katerner amonyum bileşikleri Gram pozitif bakterilere karşı 1:200.000 gibi düşük konsantrasyonda dahi oldukça iyi bir aktivite gösterirler. Gram negatif bakteriler için ise özellikle *P.*

aeruginosa varlığında 1:30.000 veya daha yüksek konsantrasyona ihtiyaç duyulmaktadır (56). Katerner amonyum bileşiklerinin Gram negatif bakterilerle kontaminasyonu da sık sık rapor edilmiştir (77). Özellikle *Pseudomonas* türlerinin amonyum asetat içeren katerner amonyum bileşiklerinde çoğalabildiği ve salgınlara neden olabildiği bildirilmiştir (72, 77).

D’Arcy (1971) tarafından yapılan bir çalışmada, katerner amonyum bileşiklerinin antifungal özelliklere sahip olduğu, ancak daha çok fungustatik özellik gösterdiği bildirilmiştir. Katerner amonyum bileşikleri ayrıca tripanosidal aktivite de göstermekle birlikte mikobakterisidal aktiviteleri bulunmamaktadır. Virüsler ise katerner amonyum bileşiklerine karşı bakteri veya mantarlardan daha dirençlidir. Grossgebauer (1970) tarafından yapılan bir çalışmada, katerner amonyum bileşiklerinin yüksek protein hasarına yol açtığı ve zarflı virüslere karşı virüsidal aktiviteye sahipken, zarfsız virüslere karşı sadece zayıf bir etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (77).

Aktivitedeki bu dar spektrum, katerner amonyum bileşiklerinin kullanılışını da sınırlamaktadır. Bu bileşikler genellikle deri ve mukoz membranlara uygulandığında iyi tolere edildiklerinden ve toksik olmadıklarından sıklıkla yara ve sıyrıkların tedavisinde ve belli preparatlarda prezervatif olarak kullanılmaktadır. Benzalkonyum klorür ve setrimit, sulu ve alkolik çözelti olarak veya krem şeklinde jinekoloji, üroloji ve cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar genellikle klorheksidin gibi biguadin bir dezenfektanla kombine edilerek de kullanılırlar (56). Ayrıca germisidal aktivitelerinin yanı sıra sahip oldukları deterjan etkisi, kokusuz ve berrak olmaları, düşük toksisite göstermeleri, suda yüksek çözünürlük, çözeltide yüksek kararlılık ve paslandırmazlık özellikleriyle hastanelerde, bakım evleri ve diğer kamu alanlarında yerlerin, duvarların ve diğer yüzeylerin; gıda işletme tesislerinde ekipmanların ve yüzeylerin; restoranlarda yiyecek ve içecek kaplarının dezenfekte edilmesinde tercih edilirler (77).

2.7. Dezenfektanların Etkinliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Kimyasal maddelerin antimikrobik etkinliklerinin değerlendirilmesi konusunda literatüre geçen ilk çalışma 1775 yılında Joseph Pringle’in geliştirdiği ve standart olarak deniz tuzunun kullanıldığı “tuz” testidir. Bundan 153 yıl sonra Rideal ve Walker, fenolik dezenfektanları ve *Salmonella typhi*’yi kullanarak benzer bir deney geliştirmişler ve dezenfektanların etkinliklerinin değerlendirilmesinde “fenol katsayısı”

terimini ortaya koymuşlardır. Bucholtz (1875) ise fenol, krezol, benzoik ve salisilik asidin bakterilerin üremesini inhibe eden etkilerini araştırarak, bugün kullandığımız anlamda minimum inhibitör konsantrasyonun temelini atmışlardır. Robert Koch ise civa klorürün *Bacillus anthracis* sporları üzerine inhibitör etkisini araştırırken, deneylerde nötralizan kullanmadığı için bu maddenin etkisini olduğundan yüksek değerlendirmiştir. Etkinlik testlerinde antimikrobik etkinin aktarımını önlemek amacıyla, dezenfektanı nötralize eden uygun bir maddenin deneylere ilave edilmesi zorunluluğunu ilk ortaya koyan Geppert (1889) ise, yapmış olduğu deneylerde civa klorürü nötralize eden ajan olarak amonyum sülfürü kullanarak civa klorürün antimikrobiyal aktivitesi hakkında daha gerçekçi değerlere ulaşmıştır (40).

Günümüzde dezenfektanların bakterisidal, fungusidal ve sporosidal aktivitelerinin değerlendirilmesinde yaygın bir şekilde kullanılan yöntem ise “kantitatif süspansiyon” testidir. Bu yöntemin esası süspansiyon halindeki mikroorganizmanın, dezenfektanın araştırılması istenen konsantrasyondaki çözeltisiyle belirlenen sürede temas ettirilmesinden sonra alınan örnekte inokulumdaki mikroorganizmanın ölüp ölmediğinin kontrol edilmesidir. Temas süresinin sonunda dezenfektanın nötralize edilmesinde uygulanan yöntemler ise dilüsyon, dezenfektanı nötralize eden maddelerin ilave edilmesi veya membran filtrasyon olabilmektedir. Bu konuda Fransızların ANFOR’u (Association Française de Normalisation) ve Almanların DGHM’si (Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie) gibi Avrupadaki farklı ülkelerin hazırlamış oldukları standart tüzükler temelde aynı olup, küçük detaylarda farklılık gösterirler. Son yıllarda CEN’in (Comité Européen de Normalisation / European Committee for Standardisation) kantitatif süspansiyon testini dikkate alarak kimyasal dezenfektan ve antiseptiklerin bakterisidal, fungusidal veya sporosidal etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılmak üzere önermiş olduğu EN Avrupa standartları en çok kabul görenlerdir (105). Ancak biyofilm içerisindeki bakteriye karşı dezenfektanların etkinliklerinin değerlendirilmesine yönelik standart bir tüzük henüz bulunmamaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Suşu

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (KÜKENS) temin edilen *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 standart suşu kullanılmıştır.

3.2. Dezenfektanlar

Çalışmada kullanılan dezenfektanlardan sodyum hipoklorit (% 13,77'lik çözelti) Unilever Sanayi ve Ticaret A.Ş., benzalkonyum klorür (% 50'lik çözelti) Kale Kimya Kimyevi Maddeler Sanayi ve Ticaret A.Ş. tarafından temin edilmiştir. Dezenfektanların stok çözeltileri +4°C'de saklanmış, deney günü istenilen konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanmıştır.

Çalışma süresince her ay sodyum hipokloritin içerdiği aktif klor miktarı standart iyodometrik titrasyon yöntemi ile düzenli bir şekilde tayin edilmiş, oluşan değişiklikler uygulanan deneylere yansıtılmıştır.

3.3. Besiyerleri ve Çözeltiler

3.3.1. Triptik Soya Agar

Toz halindeki triptik soya agardan (Difco) 40 g tartılmış, damıtık suda çözündürülüp, 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra tüplere 5 ml veya 15 ml olacak şekilde dağıtılmış, ardından otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyonun akabinde 5'er ml besiyeri içeren tüpler yatık durumda bekletilerek soğutulmuş ve eğik triptik soya agar besiyerleri elde edilmiştir. 15 ml triptik soya agar besiyeri bulunan tüpler ise kullanılacağı zaman eritilerek Petri kutularına dökülmüştür.

3.3.2. Nötralizanlı Triptik Soya Agar

Toz halindeki triptik soya agardan (Difco) 40 g tartıldıktan sonra 1 g L- histidin, 3 g lesitin ve 30 g polisorbata 80 ilave edilmiş, damıtık suda çözündürüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Ph-metrede (WTW İmolab) pH değeri 7,2'ye ayarlandıktan sonra otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edilmiş, ardından Petri kutularına uygun miktarlarda dağıtılmıştır.

3.3.3. Triptik Soya Buyyonu

Toz halindeki triptik soya buyyonundan (Difco) 30 g tartılıp, damıtık suda çözündürülüp, 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra tüplere 3 ml ve 9 ml miktarlarda dağıtılmış ve otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.3.4. Glukozlu Triptik Soya Buyyonu

Hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen 9 ml triptik soya buyyonu içeren tüplere, 0,20 µm gözenek çapındaki filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiş glukozun damıtık sudaki % 10'luk stok çözeltisinden 1'er ml ilave edilmesiyle hazırlanmıştır.

3.3.5. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisi

Toz halindeki 1 g tripton ve 8,5 g NaCl tartılıp damıtık suda çözündürüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanmış, pH değeri 7,2'ye ayarlanıp, Erlen Meyer şişelerine 200 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.3.6. Fosfat Tamponlu Sodyum Klorür Çözeltisi

5,2 g KH_2PO_4 , 10,8 g K_2HPO_4 ve 8,5 g NaCl tartılmış, damıtık suda çözündürüldükten sonra 1000 ml'ye tamamlanmış, pH değeri 7,2'ye ayarlanıp, Erlen Meyer şişelerine 200 ml olacak şekilde dağıtıldıktan sonra otoklavda 120°C'de 15 dakika steril edilmiştir.

3.3.7. Sığır Albümini Çözeltisi

Kristalize toz halindeki sığır albümininden (Cohn V Fraksiyonu, Sigma) 3 g tartılıp, 100 ml damıtık suda çözündürüldükten sonra 0,20 µm gözenek çapındaki filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiştir. Hazırlanan çözelti deneylerde kullanılmak üzere + 4°C'de saklanmıştır.

3.3.8. Sert Su

Öncelikle, 19,84 g anhidrit magnezyum klorür ve 46,24 g anhidrit kalsiyum klorürün damıtık suda çözündürülüp 1000 ml'ye tamamlanmasıyla A çözeltisi, 35,02 g sodyum bikarbonatın yine damıtık suda çözündürülüp 1000 ml'ye tamamlanmasıyla ise B çözeltisi hazırlanmıştır. A çözeltisinden 6 ml ve B çözeltisinden 8 ml alınıp, damıtık su ile 1000 ml'ye tamamlanması sonucunda standart sert su elde edilmiştir. Hazırlanan çözeltinin pH değeri $7,0 \pm 0,2$ 'ye ayarlandıktan sonra 0,20 µm gözenek çapındaki

filtreden (Sartorius) geçirilerek steril edilmiş ve deneylerde bir ay içinde kullanılmak üzere +4°C’de saklanmıştır.

3.3.9. Nötralizan Çözeltiler

Aşağıda 1-10 numaralı nötralizanolarda bildirilen maddeler 0,0025 M, pH 7,2 fosfat tamponunda, 12-16 numaralı nötralizanolarda çözeltideki nihai miktarları bildirilen maddeler 11 numaralı nötralizan olarak belirtilen pH 7,6 Dey/Engley Neutralizing Buyyonunda (D/E buyyon), 17 numaralı nötralizanolarda bildirilen maddeler ise peptonlu pH 7,0 fosfat tamponunda çözündürölüp, 1000 ml’ye tamamlandıktan sonra 100 ml olacak şekilde Erlen Meyer şişelerine dağıtılmış, ardından 120°C’de 15 dakika steril edilerek hazırlanmıştır.

Nötralizan No. 1: 5 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 30 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 2: 5 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 32 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 3: 5 g sodyum tiyosülfat, 7 g lesitin, 1 g histidin, 30 g polisorbitat 80, 30 g saponin.

Nötralizan No. 4: 5 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 150 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 5: 5 g sodyum tiyosülfat, 7 g lesitin, 1 g histidin, 150 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 6: 7 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 32 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 7: 25 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 30 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 8: 25 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 150 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 9: 50 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 30 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 10: 125 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 1 g histidin, 30 g polisorbitat 80.

Nötralizan No. 11 (Dey/Engley (D/E) Neutralizing Buyyonu): İçeriğinde yukarıda belirtilen nötralizan maddelerden iyot ve klor içeren bileşiklerin nötralize edilmesi için 6 g sodyum tiyosülfat, katerner amonyum bileşikleri için 7 g lesitin, non-iyonik yüzey aktif maddeler için 5 g polisorbitat 80’in dışında, ayrıca civa bileşikleri için 1 g sodyum tiyoglikolat ve aldehitler için sodyum bisülfid bulunan toz haldeki Dey/Engley buyyondan (Difco) 39 g tartılmış, damıtık suda çözündürölüp, 1000 ml’ye tamamlandıktan sonra pH değeri kontrol edilmiş, Erlen Meyer şişelerine dağıtılıp steril edilmiştir.

Nötralizan No. 12: 25 g sodyum tiyosülfat, 7 g lesitin, 150 g polisorbat 80.

Nötralizan No. 13: 125 g sodyum tiyosülfat, 7 g lesitin, 5 g polisorbat 80.

Nötralizan No. 14: 6 g sodyum tiyosülfat, 7 g lesitin, 30 g polisorbat 80, 30 g saponin.

Nötralizan No. 15: 20 g sodyum tiyosülfat, 7 g lesitin, 30 g polisorbat 80, 30 g saponin.

Nötralizan No. 16: 6 g sodyum tiyosülfat, 14 g lesitin, 30 g polisorbat 80, 30 g saponin.

Nötralizan No. 17: 5 g sodyum tiyosülfat, 3 g lesitin, 30 g polisorbat 80, 1 g histidin.

3.4. Deneylerde Kullanılan İnokulumların Hazırlanması

3.4.1. Triptik Soya Buyyonunda 10^8 kob/ml'lik İnokulum

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşunun eğik triptik soya agar besiyerindeki kültüründen Petri kutusundaki triptik soya agar besiyerine azaltma yöntemi ile ekimi yapılmış, 37°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra oluşan birbirine benzeyen 3-4 koloniden içinde 3 ml triptik soya buyyonu bulunan tüpe süspansiyonu hazırlanmıştır. Ekim yapılan tüpün 50 rpm hızda, 360°'lik dönümlerle rotatörde 37°C'de yaklaşık 4 saat bekletilmesi sonucunda bakterinin spektrofotometrede (Hitachi, U-1800) 600 nm'de 0,170 absorbans veren 10^8 kob/ml'lik süspansiyonu elde edilmiştir.

3.4.2. Triptik Soya Buyyonunda 10^6 kob/ml'lik İnokulum

Hazırlanışı 3.4.1. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml'lik bakteri süspansiyonunun deneylerde kullanılmak üzere hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen triptik soya buyyonunda 1/100 oranında seyreltilmesiyle 10^6 kob/ml'lik inokulumu hazırlanmıştır.

3.4.3. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^8 kob/ml'lik İnokulum

EN 1276 Avrupa standardının öngördüğü koşulların uygulandığı ve bakterisidal aktivitenin araştırıldığı deneylerde $1,5 \times 10^8$ ile 5×10^8 kob/ml arasında bakteri içeren inokulum, 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisinde 3.4.1. kısmında bildirildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.4.4. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^6 kob/ml'lik İnokulum

Hazırlanışı 3.4.3. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml'lik bakteri süspansiyonunun deneylerde kullanılmak üzere hazırlanışı 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum

klorür çözeltisinde 1/100 oranında seyreltilmesiyle 10^6 kob/ml'lik inokulumu hazırlanmıştır.

3.4.5. Sığır Albümini İçeren Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^6 kob/ml'lik İnokulum

Organik madde varlığının dezenfektanın aktivitesine olan etkisinin araştırıldığı deneylerde kullanılmak üzere, hazırlanışı 3.4.3. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml'lik bakteri süspansiyonu 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisinde 1/100 oranında seyreltilirken, 3.3.7. kısmında bildirilen sığır albümini çözeltisi 1/10 oranında ilave edilmiştir. Bu şekilde 3 g/l konsantrasyonda sığır albümini içeren 10^6 kob/ml'lik inokulum elde edilmiştir.

3.4.6. Triptonlu Sodyum Klorür Çözeltisinde 10^3 kob/ml'lik İnokulum

Validasyon testlerinde kullanılmak üzere, hazırlanışı 3.4.3. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml'lik bakteri süspansiyonunun hazırlanışı 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisinde 10^{-5} oranında seyreltilmesiyle 6×10^2 ile 3×10^3 kob/ml arasında bakteri içeren inokulum hazırlanmıştır.

3.4.7. İnokulumdaki Bakteri Sayısının Saptanması

Hazırlanan inokulumlardaki bakteri sayısını saptamak amacıyla, hazırlanışı 3.3.6. kısmında bildirilen fosfat tamponlu sodyum klorür çözeltisinde 10^6 kob/ml'lik inokulumlar için 10^{-3} ve 10^{-4} , 10^8 kob/ml'lik inokulumlar için ise 10^{-6} ve 10^{-7} oranında seyreltmeler hazırlanmış ve hazırlanan her seyreltmeden 2×100 'er µl alınarak, ayrı Petri kutularındaki triptik soya agar besiyerlerinin yüzeyine yayılarak tatbik edilmiştir. Yüzeyi kuruyan Petri kutuları 37°C'lik etüvde bir gece bekletildikten sonra, ertesi gün oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak inokulumun mililitresinde bulunan bakteri sayısı (kob/ml) saptanmıştır.

3.5. Deneylerde Kullanılan Bakteri Biyofilmlerinin Hazırlanması

3.5.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Biyofilminin Seçimi

Dezenfektanlara ait minimum bakterisidal konsantrasyonların ve bakterisidal aktivitenin saptanmasında uygulanan deneylere elverişli, istenen bakteri yoğunluğuna sahip, düzgün ve tekrarlanabilir biyofilmlerin elde edilebilmesi için deneylerin öncesinde mikropklarda en uygun statik biyofilmi oluşturan koşullar belirlenmiştir.

Bu amaçla aşağıda belirtilen parametreler uygulanmıştır:

a. İnokulumun hazırlandığı besiyeri: Hazırlanış şekli 3.4.1. kısmında bildirilen bakteri süspansiyonu, hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen triptik soya buyyonunda veya hazırlanışı 3.3.4. kısmında bildirilen glukozlu triptik soya buyyonunda hazırlanmıştır.

b. Rotatörde çevrilme süresi: Hazırlanış şekli 3.4.1. kısmında bildirilen bakteri süspansiyonu rotatörde 4 saat veya 24 saat çevrilerek hazırlanmıştır.

c. İnokulumun mikroplağa uygulanan hacmi: Hazırlanan inokulum hücre kültürü çalışmalarına uygun (Greiner) 96 kuyuluk mikropklara 100 µl veya 200 µl'lik hacimlerde veya 24 kuyuluk mikropklara 500 µl'lik hacimlerde uygulanmıştır.

d. İnokulumun mikropklarda inkübasyon süresi: Mikropklara uygulanan inokulumun 37°C'de 24 saat, 48 saat veya 4 saatlik ön inkübasyon süresinin sonunda üst sıvının alınıp, yüzeye yapışan bakterilerin taze besiyeri ile 20 saat daha inkübe edilmesiyle farklı kalitede biyofilmler elde edilmiştir.

Farklı uygulamalar sonucunda elde edilen biyofilmin kütlesi, kristal viyole deneyi ile belirlenmiştir. Bu amaçla kuyuların içeriği mikropipet yardımıyla alındıktan sonra kuyulara alınan hacim kadar metanol ilave edilmiş, 15 dakika bekletilme süresinin sonunda biyofilm tespit edilmiştir. Biyofilmler % 0,1'lik kristal viyole çözeltisiyle 5 dakika boyandıktan sonra, çeşme suyuyla boya fazlası akıtılmış, biyofilm oluşumu kontrast faz mikroskobunda (Olympus CKX 41) gözlemlenmiştir. Biyofilme difüze olan boyanın serbest bırakılması amacıyla mikropklara % 95'lik etanol ilave edildikten sonra orbital çalkalayıcıda 30 dakika tutulmuştur. Biyofilm kütlelerinin serbest bırakmış olduğu kristal viyolenin verdiği absorbans değerleri etanole karşı mikropklak okuyucusunda 595 nm'de (Bio-Rad 3550) ölçülmüştür. Her koşul için en az 6 deneyin ortalaması alınmıştır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda deneylerde aşağıda bildirilen koşullarda hazırlanan biyofilmler kullanılmıştır.

3.5.2. Temiz Koşullarda Hazırlanan Biyofilm

Bakterinin, hazırlanışı 3.3.4. kısmında bildirilen glukozlu triptik soya buyyonundaki 24 saatlik kültüründen 3.4.1. kısmında bildirildiği şekilde 10^8 kob/ml'lik süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonundan 500'er µl alınarak

24 kuyuluk mikropklara dağıtılmış, 4 saat 37°C’de inkübe edildikten sonra üst sıvı alınarak fizyolojik tuzlu su (FTS) ile bir defa yıkanmıştır. Kuyulara hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen triptik soya buyyonundan 500’er µl ilave edildikten sonra inkübasyona 20 saat daha devam edilmiştir. İnkübasyon süresi sona erdikten sonra üst sıvı alınmış, kuyuların FTS ile bir defa yıkanmasıyla bakteri biyofilmleri deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.5.3. Kirli Koşullarda Hazırlanan Biyofilm

Organik madde varlığının dezenfektan aktivitesine olan etkisinin araştırıldığı deneylerde hazırlanışı 3.5.2. kısmında bildirildiği şekilde biyofilm oluşturulurken kullanılan besiyerlerine 1/10 oranında, hazırlanışı 3.3.7. kısmında bildirilen sığır albümini çözeltisi ilave edilmiştir.

3.5.4. Biyofilmdeki Bakteri Sayısının Saptanması

Hazırlanan biyofilmlerdeki bakteri sayısını saptamak amacıyla kuyudaki biyofilmin üzerine 500 µl hazırlanışı 3.3.6. kısmında bildirilen fosfat tamponlu sodyum klorür çözeltisi konulduktan sonra hücre kazıyıcısıyla biyofilm yüzeyden ayrılmış ve 15 ml’lik polipropilen tüpe aktarılmıştır. Tüpteki sıvı miktarı 2 ml’ye tamamlandıktan sonra, biyofilmi parçalamak amacıyla 5 dakika süren sonikasyon (Bandelin Sonopuls HD 2200, 2. devir) işleminin ardından 1 dakika süreyle girdap karıştırıcıda (Heidolph Reax Top) çalkalanmıştır. Hazırlanan süspansiyon içerisindeki bakteri sayısı (kob/ml), uygun seyreltmeler yapılarak 3.4.7. kısmında bildirildiği şekilde belirlenmiştir.

3.6. Diğer Malzemeler

Minimum bakterisidal konsantrasyonların araştırıldığı deneylerde bakterinin planktonik kültürleri için 96 kuyulu, U tabanlı polistirenden yapılmış steril mikropklar (Greiner); biyofilm kültürleri için ise hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere özel fiziksel işlemlerden geçmiş 24 kuyulu, düz tabanlı polistirenden yapılmış steril mikropklar ile 12 ml’lik tüpler (Greiner); biyofilmi yüzeyden ayırmak için steril hücre kazıyıcısı (TPP) veya polyester eküvyon (Fisherbrand) kullanılmıştır. Besiyerlerinin, dezenfektan çözeltilerinin ve bakteri süspansiyonlarının mikropklara tatbik edilmesinde 8 kanallı otomatik pipetör (Gilson, Pipetman) veya tek kanallı otomatik pipetörler (Gilson, Pipetman) ile pipetörlere uygun, otoklavlanarak steril edilen

polipropilen uçlar ve inkübasyon süresi boyunca mikroplakların üstünü örtmek için yapışkan bantlar (Nunc) kullanılmıştır.

3.7. Validasyon Testleri

Çalışma süresinde kullanılan bakterinin deneylerde seçilen koşullardan, nötralizandan ve test prosedüründen olumsuz yönde etkilenmediğini doğrulamak ve çalışmada kullanılan dezenfektanları etkin bir şekilde nötralize edebilen nötralizanın seçimini sağlamak amacıyla CEN'in (Comité Européen de Normalisation / European Committee for Standardisation) dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin tayin edilmesinde önerdiği EN 1276 standardında bildirilen validasyon testleri uygulanmış, sonuçlar bu standardın önerdiği kriterler doğrultusunda değerlendirilmiştir (38).

3.7.1. Deney Koşullarının Validasyonu

Deney, organik ve inorganik madde içeren kirli yüzey koşullarını sağlamak amacıyla kullanılan sığır albümini (3 g/l) ve sert suyun 5, 10 ve 30 dakikalık temas süresince deneyde kullanılan standart *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşunun üremesini olumsuz yönde etkilemediğini doğrulamak amacıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla, hazırlanışı 3.3.7. kısmında bildirilen sığır albümini çözeltisinden 1 ml alınıp, hazırlanışı 3.3.8. kısmında bildirilen 8 ml sert su içeren tüpe ilave edilmiş, üzerine hazırlanışı 3.4.6. kısmında bildirilen 10^3 kob/ml'lik bakteri süspansiyonu ilave edildikten sonra 5, 15 ve 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme sürelerinin sonunda karışımlardan 1'er ml iki örnek alınarak, hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen iki ayrı katı besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. 37°C'de bir gece bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak hesaplanan karışımdaki kob/ml sayısının 3.7.5. kısmında bildirilen deney koşullarının validasyonu (K_V) için istenen kritere uygun olup olmadığı saptanmıştır.

3.7.2. Nötralizan Etkinlik Testi

Deney, hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 17 farklı nötralizan arasından dezenfektanların çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyondaki çözeltisini etkili bir şekilde nötralize edebilen nötralizanı saptamak amacıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla, dezenfektanın damıtık suda hazırlanan, % 10 oranında aktif madde içeren çözeltisinden 1 ml alınıp 8 ml nötralizanın bulunduğu tüpe ilave edilmiş, 5 dakika bekletildikten sonra hazırlanışı 3.4.6. kısmında bildirilen 10^3 kob/ml'lik bakteri

süspansiyonundan 1 ml ilave edilip 5 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda karışımdan 1'er ml iki örnek alınarak, hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen iki ayrı katı besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. 37°C'de bir gece bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak hesaplanan karışımdaki kob/ml sayısının 3.7.5. kısmında bildirilen nötralizanın etkinlik validasyonu (N_E) için istenen kriterlere uygun olup olmadığı saptanmıştır.

3.7.3. Nötralizan Toksisite Testi

Deney, hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 17 farklı nötralizan arasından çalışmada kullanılan bakteri üzerinde toksik etkisi olmayan nötralizanı saptamak amacıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla, içinde 1 ml damıtık suyun bulunduğu tüpe 8 ml nötralizan ilave edilmiş, ardından deney tüpüne hazırlanışı 3.4.6. kısmında bildirilen 10^3 kob/ml'lik bakteri süspansiyonundan 1 ml ilave edilip, 5 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda karışımdan 1'er ml iki örnek alınarak, hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen iki ayrı katı besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. 37°C'de bir gece bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak hesaplanan karışımdaki kob/ml sayısının 3.7.5. kısmında bildirilen nötralizanın toksisite validasyonu (N_T) için istenen kritere uygun olup olmadığı saptanmıştır.

3.7.4. Test Yönteminin Validasyonu

Deney, 17 nötralizan arasından seçilen çözeltiyle birlikte dezenfektanların çalışmada kullanılan bakteri üzerindeki bakterisidal aktivitelerinin tayini için kullanılan yöntemin uygunluğunu doğrulamak amacıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla, hazırlanışı 3.3.7. kısmında bildirilen sığır albümini çözeltisinden 1 ml alınıp, hazırlanışı 3.3.5. kısmında bildirilen 1 ml triptonlu sodyum klorür çözeltisi içeren tüpe ilave edilmiş, üzerine dezenfektanın hazırlanışı 3.3.8. kısmında bildirilen sert suda hazırlanan ve deneylerde kullanılan en yüksek konsantrasyondaki çözeltisinden 8 ml ilave edilerek 5, 15 ve 30 dakika bekletilmiştir. Bekleme sürelerinin sonunda karışımlardan 1'er ml alınarak sodyum hipoklorit için hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 13 numaralı nötralizan, benzalkonyum klorür için ise 14 numaralı nötralizandan 8'er ml çözeltinin bulunduğu tüplere ilave edilmiştir. 5 dakikalık bekleme süresinin sonunda hazırlanışı 3.4.6. kısmında bildirilen 10^3 kob/ml'lik bakteri

süspansiyonundan 1'er ml ilave edilmiş, 30 dakika bekletildikten sonra karışımlardan 1'er ml çift örnek alınarak, hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen iki ayrı katı besiyerlerinin yüzeyine yayılmıştır. 37°C'de bir gece bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörü dikkate alınarak hesaplanan karışımdaki kob/ml sayısının 3.7.5. kısmında bildirilen yöntemin validasyonu (Y_V) için istenen kritere uygun olup olmadığı saptanmıştır.

3.7.5. Validasyon Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Validasyon deneylerinde, kullanılan bakteri için aşağıda bildirilen kriterlerin uygunluğu saptanmıştır:

C = Bakteri süspansiyonundaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.6.):

$6 \times 10^2 - 3 \times 10^3$ arasında olmalı;

K_V = Deneysel koşulların validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.1.):

C değerinin 0,05 katına eşit veya büyük olmalı;

N_E = Nötralizan etkinlik validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.2.):

N_T değerinin 0,5 katına eşit veya büyük olmalı;

N_T = Nötralizan toksisite validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.3.):

C değerinin 0,05 katına eşit veya büyük olmalı;

Y_V = Test yönteminin validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.4.):

N_T değerinin 0,5 katına eşit veya büyük olmalıdır.

Nötralizanın USP 29 standardına göre etkili kabul edilmesi için N_E 'nin N_T 'ye bölünmesiyle elde edilen sayının 0,70'den az olmaması, toksik kabul edilmemesi için ise N_T 'nin C 'ye bölünmesiyle elde edilen sayının 0,70'den az olmaması gerekmektedir (123). Deneylerde her iki standarda göre etkili olup, toksik olmayan nötralizanlar kullanılmıştır.

3.8. Dezenfektanların Minimum Bakterisidal Konsantrasyonunun (MBK) Saptanması

3.8.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı MBK Değerinin Saptanması

Çalışmada Clinical Laboratory Standards Institution (CLSI) tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün MBK değerleri, yöntemde uygulanan bazı modifikasyonlarla araştırılmıştır (19).

Bu amaçla hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen triptik soya buyyonu içinde dezenfektan maddelerden sodyum hipoklorit için mikroploitaki son konsantrasyonlar 5000 µg/ml ile 30 µg/ml ve benzalkonyum klorür için ise 512 µg/ml ile 0,5 µg/ml arasında olacak şekilde iki katı konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler azalan konsantrasyonlarda 96 kuyulu mikroploitın 1-11 numaralı kuyularına 50'şer µl olacak şekilde tatbik edilmiş, ardından tüm kuyulara hazırlanışı 3.4.2. kısmında bildirilen bakteri süspansiyonundan 50'şer µl ilave edilmiştir. Böylece kuyularda dezenfektanların istenilen son konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Deneyde kullanılan besiyerini içeren mikroploitın A sırasındaki 12 numaralı kuyu sterilite, mikroploitın B sırasındaki 12 numaralı kuyu ise çalışılan suşun üremesini kontrol etmek amacıyla kullanılmıştır. Deneyin uygulandığı mikroploitlar 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, kuyulara yapılan nötralizan ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur. Sodyum hipoklorit içeren kuyulara hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 13 numaralı nötralizanın 5 katı konsantrasyondaki çözeltilisinden 80 µl; benzalkonyum klorür içeren kuyulara ise 14 numaralı nötralizandan 100'er µl ilave edilip, karıştırıldıktan sonra, her kuyudan ikişer örnek olmak üzere kuyu içeriğinin % 10'u alınarak hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen nötralizan ilaveli triptik soya agarın yüzeyine tatbik edilmiştir. 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra oluşan koloniler sayılarak, inokulumun % 0,1'ini temsil eden rejeksiyon değerine eşit veya altında olan sayı tayin edilmiştir. Bu şekilde rejeksiyon değeri esas alınarak inokulumun % 99,9'unu öldüren en düşük dezenfektan konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir. Her temas süresi için deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

Besiyeri olarak hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen triptik soya buyyonunun kullanıldığı bu deneylerde elde edilen MBK değerleri, muhtemelen besiyerinin sahip olduğu yüksek orandaki organik bileşiklerden dolayı, beklenenden yüksek konsantrasyonlarda saptandığından, EN 1276 Avrupa standardının öngördüğü şartlar

dikkate alınarak, dezenfektanların seyreltilmesinde hazırlanışı 3.3.8. kısmında bildirilen sert su, inokulum olarak ise hazırlanışı 3.4.4. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisinde hazırlanan inokulum kullanılarak deneyler aynı koşullar altında tekrar edilmiştir. Bu koşullarda uygulanan deneylerde minimum seviyede organik madde bulunduğundan, EN 1276 Avrupa standardının önerdiği şekilde kirli yüzey koşullarının dezenfektanın aktivitesine olan etkisini araştırmak amacıyla, bu deneyler organik madde olarak hazırlanışı 3.4.5. kısmında bildirilen sığır albümini (3 g/l) içeren inokulumun kullanılmasıyla aynı deney gününde paralel uygulanmıştır. Her temas süresi ve deney koşulu için üç kez tekrar edilen deneylerde MBK değerleri yukarıda bildirildiği şekilde belirlenmiştir.

3.8.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı MBK Değerinin Saptanması

Bu amaçla hazırlanışı 3.3.8. kısmında bildirilen sert su içinde dezenfektanların deneyde kullanılan konsantrasyonlarının iki katı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler hazırlanışı 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisi içinde 1:1 oranında sulandırılarak dezenfektanların deneyde kullanılacak son konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Sodyum hipoklorit için mikropłaktaki son konsantrasyonlar 12.000 µg/ml ile 250 µg/ml, benzalkonyum klorür için ise 20.000 µg/ml ile 2000 µg/ml arasında olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler hazırlanışı 3.5.2. kısmında bildirilen bakteri biyofilmlerinin bulunduğu 24 kuyuluk mikropłanın kuyularına azalan konsantrasyonlarda 550'şer µl olacak şekilde tatbik edilmiştir. Deneyde kullanılan besiyerini içeren mikropłanın D sırasındaki 6 numaralı kuyu sterilite, dezenfektanın tatbik edilmediği 3, 4 ve 5 numaralı kuyular ise biyofilmdeki bakteri sayısının saptanması amacıyla kullanılmıştır. Deneyin uygulandığı mikropłaklar 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra üst sıvı mikropıpet yardımıyla alınmış, kuyulara yapılan nötralizan ilavesiyle reaksiyon durdurulmuştur. Sodyum hipoklorit için hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 13 numaralı nötralizan, benzalkonyum klorür için ise 14 numaralı nötralizandan 600 µl olacak şekilde kuyulara tatbik edilmiştir. Biyofilmi parçalamak amacıyla hücre kazıyıcısının yardımıyla biyofilm yüzeyden ayrılmış, ardından 3 dakika süren sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Her kuyudan ikişer örnek olmak üzere kuyu içeriğinin % 10'u alınarak hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen nötralizan ilaveli triptik soya agarın yüzeyine tatbik edilmiştir. 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra oluşan

koloniler sayılarak, biyofilmdeki bakteri sayısının % 0,1'ini temsil eden rejeksiyon değerine eşit veya altında olan sayı tayin edilmiştir. Bu şekilde rejeksiyon değeri esas alınarak biyofilmdeki bakterinin % 99,9'unu öldüren en düşük dezenfektan konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir.

Kirli yüzey koşullarının dezenfektanın aktivitesine olan etkisini araştırmak amacıyla, bu deneyler organik madde olarak sığır albümini (3 g/l) içeren dezenfektan çözeltilerinin ve hazırlanışı 3.5.3. kısmında bildirilen bakteri biyofilminin kullanılmasıyla aynı deney gününde paralel uygulanmıştır. Her temas süresi ve deney koşulu için deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

3.9. Dezenfektanların Bakterisidal Aktivitelerinin Tayini

3.9.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanması

Çalışmada CEN'in EN 1276 numaralı standart yöntemi kullanılarak *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün farklı kullanım konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin bakterisidal aktiviteleri araştırılmıştır (38).

Bu yöntem, istenen koşullar altında standart suşa ait canlı bakteri sayısını en az 10^5 azaltma yeteneğinde olan ve 3.7. kısmında bildirilen validasyon kriterlerini karşılayan dezenfektan konsantrasyonunun bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu kabul etmektedir.

Bu amaçla hazırlanışı 3.3.8. kısmında bildirilen sert su içinde sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün farklı dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılan konsantrasyonları dikkate alınarak, aktif maddenin son konsantrasyonları % 1, % 0,1 ve % 0,01 olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır.

Deney için hazırlanışı 3.3.7. kısmında bildirilen sığır albümini çözeltisinden 1 ml alınıp deney tüpüne konulduktan sonra üzerine hazırlanışı 3.4.3. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml'lik inokulumdan 1 ml ilave edilmiş ve 2 dakika bekletilmiştir. Ardından tüpe 8 ml denenecek dezenfektan çözeltisi ilave edilmiş, 5, 15 ve 30 dakika bekletilmiştir. Temas süresinin sonunda tüp içeriğinden 1 ml alınıp, içinde 1 ml distile su ve 8 ml nötralizan (sodyum hipoklorit için hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 13 numaralı nötralizan, benzalkonyum klorür için ise 14 numaralı nötralizan) bulunan tüpe ilave edilmiştir. Bu şekilde 5 dakika bekletildikten sonra karışımdan 1'er ml iki örnek

alınarak, hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen iki ayrı nötralizanlı triptik soya agar besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. 37°C’de bir gece inkübe edildikten sonra 15 – 300 arasında koloni bulunan Petri kutuları değerlendirmeye alınmış, aşağıda belirtilen formüle göre dezenfektanın uygulanan konsantrasyonda azalttığı canlı bakteri sayısı hesaplanmıştır (3-1):

$$R = \text{Canlı bakteri sayısındaki azalma} = \frac{N \times 10^{-1}}{N_a} \quad (3-1)$$

N : İnokulumdaki kob/ml değeri (kısım 3.4.3.)

N_a: Bakterisidal aktivitenin tayini sonunda elde edilen kob/ml değeri

Her deney süresi ve dezenfektan dilüsyonu için deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

3.9.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanması

Çalışmada EN 1276 numaralı standart yöntem esas alınarak *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün bakteri biyofilmi üzerine oluşturdıkları bakterisidal aktivite araştırılmıştır. 3.9.1. kısmında belirtildiği gibi dezenfektana ait dilüsyonun bakterisidal etkili kabul edilebilmesi için biyofilmdeki standart suşa ait canlı bakteri sayısını en az 10⁵ azaltma yeteneğine sahip olmalıdır.

Bu amaçla hazırlanışı 3.3.8. kısmında bildirilen sert su içinde sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün farklı dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılan konsantrasyonları dikkate alınarak aktif maddenin son konsantrasyonları % 1, % 0,1 ve % 0,01 olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır.

Deneye başlamadan önce 12 ml’lik deney tüplerinde (hücre kültürü çalışmalarına uygun, Greiner) 1,5 x 10⁸ ile 5 x 10⁸ kob/ml arasında bakteri sayısı içeren biyofilmler hazırlanmıştır. Bunun için hazırlanışı 3.5.3. kısmında bildirilen 3 g/l sığır albümini ve % 1 oranında glukoz içeren triptik soya buyyonunda hazırlanan 10⁸ kob/ml’lik bakteri süspansiyonundan 1’er ml’nin alındığı tüpler 10° eğimle, 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresini sonunda üst sıvı dökülüp, biyofilm zedelenmeden bir kez FTS ile yıkandıktan sonra, hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen triptik soya buyyonundan 2’şer ml ilave edilerek inkübasyona 20 saat daha devam

edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda üst sıvının dökülüp, 2 ml FTS ile yıkanmasıyla bakteri biyofilmleri deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Deney için, hazırlanan biyofilmin üzerine hazırlanışı 3.3.7. kısmında bildirilen sığır albümini çözeltisinden 1 ml konulduktan sonra, hazırlanışı 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisinden 1 ml ilave edilmiş ve 2 dakika beklenmiştir. Ardından tüpe 8 ml denenecek dezenfektan çözeltisi ilave edilmiş, 5, 15 ve 30 dakika temasta bırakılmıştır. Temas süresinin içinde kalmak koşuluyla, sürenin sonuna doğru 5000 devirde 2 dakika santrifüj edilerek tüpte biyofilmin çökmesi sağlanmıştır. Üst sıvı döküldükten sonra, çökeltinin üzerine sodyum hipoklorit için hazırlanışı 3.3.9. kısmında bildirilen 13 numaralı nötralizan, benzalkonyum klorür için ise 14 numaralı nötralizandan 8'er ml ilave edilip, biyofilm eküvyon yardımıyla yüzeyden ayrılmıştır. Biyofilmi parçalamak amacıyla tüp içeriği 1 dakika süreyle sonikasyon işlemine tabi tutulduktan sonra girdap karıştırıcıda karıştırılmıştır. Deney tüpüne 1'er ml distile su ve hazırlanışı 3.3.5. kısmında bildirilen triptonlu sodyum klorür çözeltisi ilave edildikten sonra 1 dakika süreyle tekrar karıştırılmıştır. Ardından karışımdan 1'er ml iki örnek alınarak, hazırlanışı 3.3.2. kısmında bildirilen iki ayrı nötralizanlı triptik soya agar besiyerinin yüzeyine yayılmıştır. 37°C'de bir gece inkübe edildikten sonra 15 - 300 arasında koloni bulunan Petri kutuları değerlendirmeye alınmış, 3.9.1. kısmında bildirilen formüle göre dezenfektanın uygulanan konsantrasyonda biyofilimde azalttığı canlı bakteri sayısı hesaplanmıştır. Formüldeki (N) değerini belirlemek amacıyla deney günü ayrı bir tüpte hazırlanan biyofilmdeki bakteri sayısı tespit edilmiştir. Her deney süresi ve dezenfektan dilüsyonu için deneyler 3 kez tekrar edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Biyofilminin Seçimine Ait Bulgular

Dezenfektanlara ait minimum bakterisidal konsantrasyonların ve bakterisidal aktivitenin saptanmasında uygulanan deneylere elverişli *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna ait biyofilmin oluşturulması amacıyla farklı koşulların uygulanmasıyla elde edilen biyofilmlere ait bulgular Şekil 4-1’de gösterilmiştir. Uygulanan bu farklı koşullar inokulumun hazırlandığı besiyeri (triptik soya buyyonu-TSB veya glukozlu triptik soya buyyonu-TSB-G), inokulum hazırlanırken rotatörde çevrildiği süre (4 veya 24 saat), inokulumun mikropklara uygulandığı hacim (100, 200, veya 500 µl), inokulumun mikropklarda inkübe edildiği süreden (37°C’de 24 saat, 48 saat veya 4 saatlik ön inkübasyon süresinin sonunda taze besiyeri ile ilave 20 saat) oluşmaktadır. Elde edilen biyofilm kütlelerine ait absorbands değerleri kristal viyole deneyinin akabinde etanole karışı mikropklak okuyucusunda 595 nm’de ölçülerek saptanmıştır.

4.2. Nötralizanların Validasyon Testlerine Ait Bulgular

Dezenfektanların çalışmada kullanılan en yüksek konsantrasyondaki çözeltisini etkili bir şekilde nötralize edebilen, öte yandan çalışmada kullanılan bakteri üzerinde toksik etkili olmayan nötralizanı saptamak amacıyla araştırılan 17 farklı nötralizana ait validasyon testlerinin sonuçları Tablo 4-1’de verilmiştir.

Buna göre, nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının (N_T) deneyde kullanılan bakteri süspansiyonundaki canlı bakteri sayısına (C) bölünmesiyle elde edilen oranın CEN’in EN 1276 standardına göre $\geq 0,05$, USP 29’a göre ise $\geq 0,70$ olması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, 5 numaralı nötralizan dışındaki tüm nötralizanların her iki kritere de uygunluk gösterdiği ve bakteri üzerine toksik etkili olmadıkları saptanmıştır.

Nötralizan etkinlik testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının (N_E) nötralizan toksiste testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısına (N_T) bölünmesiyle elde edilen oranın CEN’in EN 1276 standardına göre $\geq 0,5$, USP 29’a göre ise $\geq 0,70$ olması gerektiği göz önünde bulundurulduğunda, her iki kritere uygunluk gösteren ve sodyum hipokloritin deneyde kullanılan % 10 oranında aktif madde içeren çözeltisini nötralize edebilen çözeltilerin 7, 8, 9, 10, 13 ve 15 numaralı nötralizanlar oldukları saptanmıştır.

Benzalkonyum klorürün deneyde kullanılan % 10 oranında aktif madde içeren çözeltisini nötralize edebilen çözeltilerin ise 8, 12, 14 ve 16 numaralı nötralizanlar oldukları saptanmıştır.

Elde edilen bulgular doğrultusunda deneylerde sodyum hipokloritin inaktive edilmesinde D/E buyyonunda hazırlanan ve % 12,5 sodyum tiyosülfat, % 0,7 lesitin, % 0,5 polisorbata 80 içeriğine sahip 13 numaralı nötralizan; benzalkonyum klorürün inaktive edilmesinde ise D/E buyyonunda hazırlanan ve % 0,6 sodyum tiyosülfat, % 0,7 lesitin, % 3 polisorbata 80 ve % 3 saponin içeriğine sahip 14 numaralı nötralizanlar seçilmiştir.

4.3. Dezenfektanların Minimum Bakterisidal Konsantrasyonlarının (MBK) Saptanmasına Ait Bulgular

4.3.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular

Çalışmada CLSI tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak, *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün MBK değerleri yöntemde uygulanan bazı modifikasyonlarla araştırılmış, 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas süreleri sonucunda dezenfektanların MBK değerleri saptanmıştır. Besiyeri olarak TSB'nin kullanıldığı deneylerde saptanan MBK değerleri Tablo 4-2'de gösterilmiştir.

Bu deneylerde sodyum hipoklorit ile elde edilen MBK değerleri muhtemelen besiyerinin bileşiminde bulunan yüksek orandaki organik maddelerden dolayı, yüksek konsantrasyonlarda saptandığından, CEN'in EN 1276 standardının öngördüğü şartlar dikkate alınarak, temiz yüzey koşullarını sağlamak için dezenfektanların seyreltilmesinde sert su, inokulumun hazırlanmasında ise triptonlu sodyum klorür çözeltisi kullanılmış, kirli yüzey koşullarını sağlamak amacıyla ise deneylerde sığır albümini (3 g/l) ilave edilmiştir. Tablo 4-3'de gösterildiği gibi sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz koşullarda saptanan MBK değerinin uygulanan her temas süresi için 60 µg/ml, kirli koşullarda saptanan MBK değerlerinin ise 5-15 dakika için 250 µg/ml, diğer temas süreleri için 125 µg/ml olduğu belirlenmiştir; TSB'nin kullanıldığı deneylere oranla, elde edilen bazı MBK deneylerinde 100 kattan fazla azalma gözlenmiştir.

Benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz koşullarda saptanan MBK değeri uygulanan her temas süresi için 16

$\mu\text{g/ml}$, kirli koşullarda saptanan MBK değerinin ise 5 dakika için $64 \mu\text{g/ml}$, diğer temas süreleri için $32 \mu\text{g/ml}$ olduğu belirlenmiştir. TSB'nin kullanıldığı deneylere oranla belirgin bir farkın gözlenmediği bu sonuçlar Tablo 4-4'te gösterilmiştir.

4.3.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna ait mikropalaklarda hazırlanan statik biyofilme karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün MBK değerleri 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas sürelerinin sonunda CLSI'nin bildirmiş olduğu rejeksiyon değerlerinin esas alınmasıyla saptanmıştır.

Temiz yüzey koşullarının sağlandığı ve dezenfektan olarak sodyum hipokloritin kullanıldığı deneylerde MBK değerleri 5 dakikalık temas süresinde $> 12.000 \mu\text{g/ml}$ iken, 10-15 dakikada $6000 \mu\text{g/ml}$, temas süresinin uzatılmasıyla $1500 \mu\text{g/ml}$ 'ye kadar inmiş olduğu; sığır albüminin (3 g/l) ilavesiyle kirli yüzey koşullarının sağlandığı deneylerde ise 5 dakikalık temas süresinde $> 12.000 \mu\text{g/ml}$, 10-15 dakikada $10.000 \mu\text{g/ml}$, temas süresinin uzatılmasıyla $2000 \mu\text{g/ml}$ 'ye kadar inmiş olduğu belirlenmiş, bu değerlere ait sonuçlar Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Temiz yüzey koşullarının sağlandığı ve dezenfektan olarak benzalkonyum klorürün kullanıldığı deneylerde MBK değerinin 5-30 dakikada $> 20.000 \mu\text{g/ml}$ iken, temas süresinin uzatılmasıyla $20.000 \mu\text{g/ml}$ 'ye inmiş olduğu; sığır albüminin (3 g/l) ilavesiyle kirli yüzey koşullarının sağlandığı deneylerde ise 5-60 dakikada $> 20.000 \mu\text{g/ml}$, temas süresinin 24 saate uzatılmasıyla $20.000 \mu\text{g/ml}$ 'ye inmiş olduğu belirlenmiş, bu değerlere ait sonuçlar Tablo 4-6'da gösterilmiştir.

4.4. Dezenfektanların Bakterisidal Aktivitelerinin Tayinine Ait Bulgular

4.4.1. Süspansiyon Halindeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanmasına Ait Bulgular

Çalışmada CEN'in EN 1276 numaralı standart yöntemi kullanılarak *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün farklı kullanım konsantrasyonlarındaki çözeltilerinin bakterisidal aktiviteleri saptanmıştır. Bu yöntemle göre sığır albüminin (3 g/l) varlığıyla oluşturulan kirli yüzey koşullarının altında standart suşa ait canlı bakteri sayısını en az 10^5 azaltma yeteneğinde olan ve 3.7. kısmında bildirilen validasyon kriterlerini karşılayan dezenfektan konsantrasyonunun bakterisidal aktiviteye sahip olduğu kabul edilmiştir. Bu amaçla,

çalışmada kullanılan bakteri süspansiyonu dezenfektanların % 1, % 0,1 ve % 0, 01 oranında aktif madde içeren çözeltileriyle 5, 15 ve 30 dakika temasta bırakılmıştır.

Buna göre, sodyum hipokloritin % 1 ve % 0,1'lik çözeltilerinin uygulanan her temas süresinde, % 0,01'lik çözeltisinin ise ancak 30 dakikalık temas süresinin sonunda bakterisidal aktivite gösterdikleri saptanmış, bu deneylere ve validasyon testlerine ait sonuçlar Tablo 4-7'de gösterilmiştir.

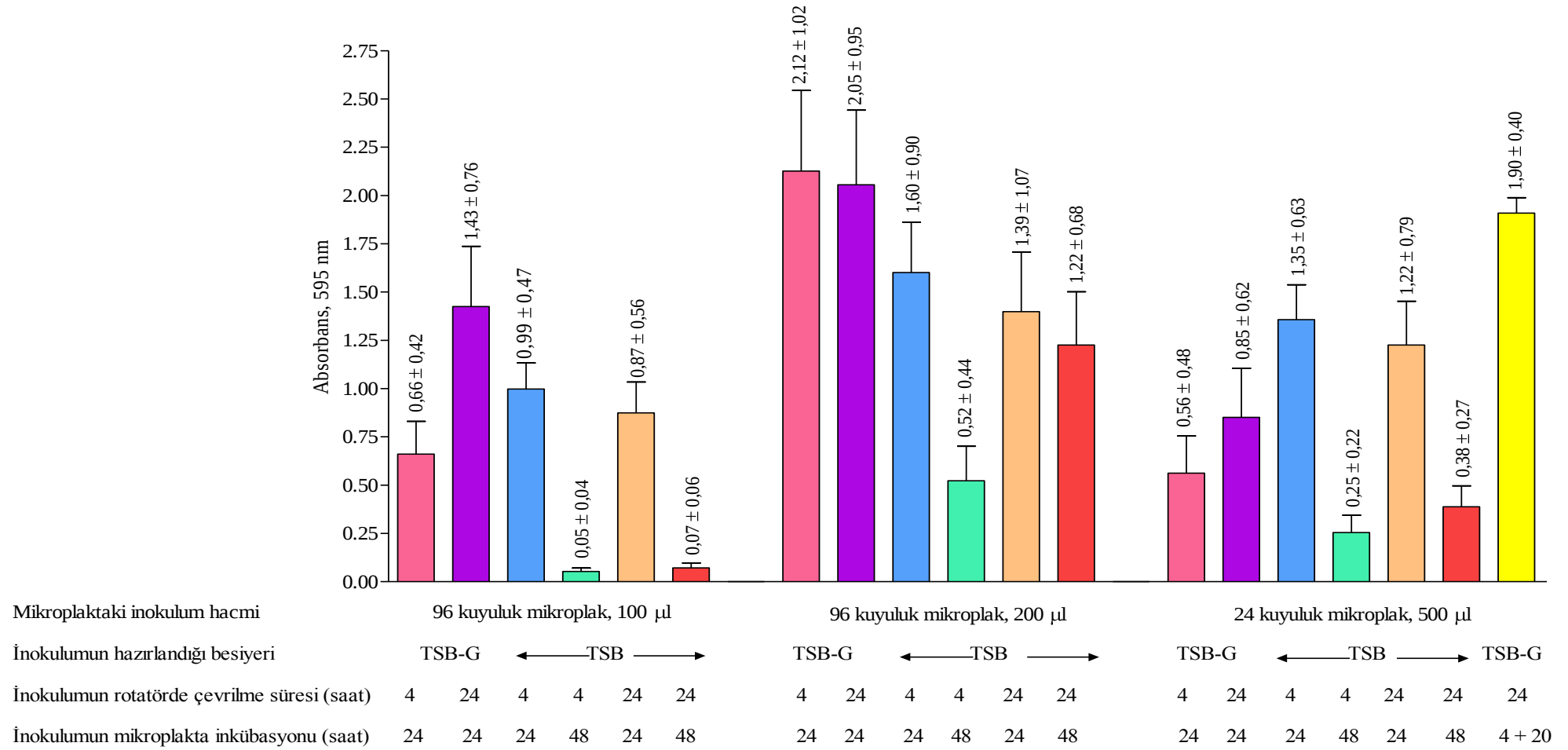
Çalışmada kullanılan diğer dezenfektan olan benzalkonyum klorürün ise sadece % 1 ve % 0,1'lik çözeltilerinin uygulanan her temas süresinde bakterisidal aktivite gösterdiği saptanmış, bu deneylere ve validasyon testlerine ait sonuçlar Tablo 4-8'de gösterilmiştir.

4.4.2. Biyofilmdeki Bakteriye Karşı Bakterisidal Aktivitenin Saptanmasına Ait Bulgular

Çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna ait mikropalaklarda hazırlanan statik biyofilme karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün bakterisidal aktiviteleri CEN'in EN 1276 numaralı standardı esas alınarak saptanmıştır. Bu yöntemle göre sığır albüminin (3 g/l) varlığıyla oluşturulan kirli yüzey koşullarının altında standart suşa ait biyofilmdeki canlı bakteri sayısını en az 10^5 azaltma yeteneğinde olan ve 3.7. kısmında bildirilen validasyon kriterlerini karşılayan dezenfektan konsantrasyonunun bakterisidal aktiviteye sahip olduğu kabul edilmiştir. Bu amaçla, çalışmada kullanılan bakteri biyofilmi dezenfektanların % 1, % 0,1 ve % 0,01 oranında aktif madde içeren çözeltileriyle 5, 15 ve 30 dakika temasta bırakılmıştır.

Buna göre, sodyum hipokloritin % 1 oranında aktif madde içeren çözeltisinin uygulanan her temas süresinde bakterisidal aktivite gösterdiği saptanmış, bu deneylere ve validasyon testlerine ait sonuçlar Tablo 4-9'da gösterilmiştir.

Benzalkonyum klorürün ise çalışmada kullanılan hiçbir çözeltisinin uygulanan temas sürelerinde bakterinin biyofilm içerisindeki şekline karşı bakterisidal aktivite gösteremediği saptanmış, bu deneylere ve validasyon testlerine ait sonuçlar Tablo 4-10'da gösterilmiştir.



Şekil 4-1: Farklı koşulların uygulanması sonucunda elde edilen *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna ait biyofilm kütlelerinin kristal viyole deneyi ile verdikleri absorbans değerleri. Hata çizgileri 6 deneyin standart sapmasını göstermektedir.

Tablo 4-1: Farklı konsantrasyonlarda nötralizan madde içeren çözeltilerin *P. aeruginosa* ATCC 15422 ile elde edilen nötralizan validasyon testi sonuçları

Nötr. No.	Nötralizan İçeriği, %					Canlı kalan bakteri sayısının oranı			
	Na ₂ S ₂ O ₃	Lesitin	Histidin	Polisorbat 80	Saponin	Toksosite ¹		Etkinlik ²	
						NaOCl	BAK ³	NaOCl	BAK
1	0.5	0.3	0.1	3		0.97	0.94	0	0
2	0.5	0.3	0.1	3.2		1.05	1.13	0	0
3	0.5	0.7	0.1	3	3	1.16	0.85	0	0.02
4	0.5	0.3	0.1	15		0.81	1.16	0	0.24
5	0.5	0.7	0.1	15		0.44	0.57	0	0.53
6	0.7	0.3	0.1	3.2		0.94	1.18	0	0
7	2.5	0.3	0.1	3		1.04	0.84	1.04	0
8	2.5	0.3	0.1	15		1.05	1.2	1.10	0.95
9	5	0.3	0.1	3		0.98	0.98	0.76	0
10	12.5	0.3	0.1	3		1.2	1.21	0.70	0
11	0.6	0.7		0.5		1.84	1.84	0	0
12	2.5	0.7		15		1.8	0.92	0.2	0.80
13	12.5	0.7		0.5		1.06	0.96	1.1	0
14	0.6	0.7		3	3	1.31	0.93	0.1	0.92
15	2	0.7		3	3	1.15	0.87	0.81	0
16	0.6	1.4		3	3	1.10	0.88	0	1.09
17	0.5	0.3	0.1	3		1.13	0.97	0	0

¹ Nötralizan toksisite sayıları (N_T), nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının deneyde kullanılan bakteri süspansiyonundaki canlı bakteri sayısına bölünmesiyle elde edilen oranı vermektedir. Kabul edilebilir N_T oranları $\geq 0,70$ 'dir.

² Nötralizan etkinlik sayıları (N_E), nötralizan etkinlik testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısına bölünmesiyle elde edilen oranı vermektedir. Kabul edilebilir N_E oranları $0,70$ 'dir.

³ BAK: Benzalkonyum klorür

Tablo 4-2: Dezenfektanların triptik soya buyyonunda hazırlanan süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan MBK değerleri (µg/ml)

Dezenfektan	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
NaOCl	4000	3500	3000	2000	1500	500
BAK ¹	32	32	32	16	16	16

¹ BAK: Benzalkonyum klorür

Tablo 4-3: Sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml)

Koşul	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
Temiz ¹	60	60	60	60	60	60
Kirli ²	250	250	250	125	125	125

¹ Temiz Koşul: Dezenfektanların seyreltilmesinde sert su, inokulumun hazırlanmasında triptonlu sodyum klorür çözeltisi kullanılmıştır.

² Kirli Koşul: Deneylerde sığır albüminin (3 g/l) ilavesiyle sağlanmıştır.

Tablo 4-4: Benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml)

Koşul	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
Temiz ¹	16	16	16	16	16	16
Kirli ²	64	32	32	32	32	32

¹ Temiz Koşul: Dezenfektanların seyreltilmesinde sert su, inokulumun hazırlanmasında triptonlu sodyum klorür çözeltisi kullanılmıştır.

² Kirli Koşul: Deneylerde sığır albüminin (3 g/l) ilavesiyle sağlanmıştır.

Tablo 4-5: Sodyum hipokloritin biyofilmdeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml)

Koşul	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
Temiz ¹	> 12.000	6000	6000	4000	2000	1500
Kirli ²	> 12.000	10.000	10.000	8000	4000	2000

¹ Temiz Koşul: Dezenfektanların seyreltilmesinde sert su, inokulumun hazırlanmasında triptonlu sodyum klorür çözeltisi kullanılmıştır.

² Kirli Koşul: Deneylerde sığır albüminin (3 g/l) ilavesiyle sağlanmıştır.

Tablo 4-6: Benzalkonyum klorürün biyofilmdeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (µg/ml)

Koşul	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
Temiz ¹	> 20.000	> 20.000	> 20.000	> 20.000	20.000	20.000
Kirli ²	> 20.000	> 20.000	> 20.000	> 20.000	> 20.000	20.000

¹ Temiz Koşul: Dezenfektanların seyreltilmesinde sert su, inokulumun hazırlanmasında triptonlu sodyum klorür çözeltisi kullanılmıştır.

² Kirli Koşul: Deneylerde sığır albüminin (3 g/l) ilavesiyle sağlanmıştır.

Tablo 4-7: Sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri

Süre	Validasyon test sonuçları				Bakteri test süspansiyonu		Aktif madde konsantrasyonu, %		
	Bakteri süspansiyonu	Deney koşullarının kontrolü	Nötralizan toksisite kontrolü	Test yöntem validasyonu			1	0.1	0.01
5 dakika	Vc: 203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 102;112 Kv: $1,07 \times 10^3$	Vc: 100;107 Nt: $1,03 \times 10^3$	Vc: 92;101 Yv: $9,6 \times 10^2$	10^{-6} : 203;206 N: $2,4 \times 10^8$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$
15 dakika	Vc:203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 134;139 Kv: $1,35 \times 10^3$		Vc: 85;97 Yv: $9,1 \times 10^2$	10^{-6} : 203;206 N: $2,4 \times 10^8$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$
30 dakika	Vc: 203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 90; 105 Kv: $9,7 \times 10^2$		Vc: 81;96 Yv: 9×10^2	10^{-6} : 203;206 N: $2,4 \times 10^8$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	2;4 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$

Vc: Petri kutusunda sayılan canlı bakteri sayısı

C: Bakteri süspansiyonundaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.6.)

Kv: Deneysel koşulların validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.1.)

Nt: Nötralizan toksiste validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.2.)

Yv: Test yönteminin validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.4.)

N: İnokulumdaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.3.)

Na: Bakterisidal aktivitenin tayini sonunda elde edilen kob/ml sayısı

R: Canlı bakteri sayısındaki azalma

Tablo 4-8: Benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri

Süre	Validasyon test sonuçları				Bakteri test süspansiyonu		Aktif madde konsantrasyonu, %		
	Bakteri süspansiyonu	Deney koşullarının kontrolü	Nötralizan toksisite kontrolü	Test yöntem validasyonu			1	0.1	0.01
5 dakika	Vc: 203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 132;145 Kv: $1,38 \times 10^3$	Vc: 117;95 Nt: $1,06 \times 10^3$	Vc: 85;105 Yv: $9,5 \times 10^2$	10^{-6} : 203;206 N: $2,4 \times 10^8$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	2;2 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$
15 dakika	Vc:203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 153;150 Kv: $1,5 \times 10^3$		Vc: 85;100 Yv: $9,2 \times 10^2$	10^{-6} : 203;206 N: $2,4 \times 10^8$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$
30 dakika	Vc: 203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 140;149 Kv: $1,4 \times 10^3$		Vc: 80;83 Yv: $8,1 \times 10^2$	10^{-6} : 203;206 N: $2,4 \times 10^8$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$

Vc: Petri kutusunda sayılan canlı bakteri sayısı

C: Bakteri süspansiyonundaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.6.)

Kv: Deneysel koşulların validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.1.)

Nt: Nötralizan toksiste validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.2.)

Yv: Test yönteminin validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.4.)

N: İnokulumdaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.3.)

Na: Bakterisidal aktivitenin tayini sonunda elde edilen kob/ml sayısı

R: Canlı bakteri sayısındaki azalma

Tablo 4-9: Sodyum hipokloritin biyofilmdeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri

Süre	Validasyon test sonuçları				Bakteri test süspansiyonu		Aktif madde konsantrasyonu, %		
	Bakteri süspansiyonu	Deney koşullarının kontrolü	Nötralizan toksisite kontrolü	Test yöntem validasyonu			1	0.1	0.01
5 dakika	Vc: 203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 102;112 Kv: $1,07 \times 10^3$	Vc: 100;107 Nt: $1,03 \times 10^3$	Vc: 92;101 Yv: $9,6 \times 10^2$	10^{-7} : 116; 115 N: $1,15 \times 10^9$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$
15 dakika	Vc:203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 134;139 Kv: $1,35 \times 10^3$		Vc: 85;97 Yv: $9,1 \times 10^2$	10^{-7} : 116; 115 N: $1,15 \times 10^9$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$
30 dakika	Vc: 203;206 C: $2,4 \times 10^3$	Vc: 90; 105 Kv: $9,7 \times 10^2$		Vc: 81;96 Yv: 9×10^2	10^{-7} : 116; 115 N: $1,15 \times 10^9$	Vc: Na: R:	0;0 $<1,5 \times 10^2$ $>10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$	>300 ; >300 $>3 \times 10^3$ $<10^5$

Vc: Petri kutusunda sayılan canlı bakteri sayısı

C: Bakteri süspansiyonundaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.6.)

Kv: Deneysel koşulların validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.1.)

Nt: Nötralizan toksiste validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.2.)

Yv: Test yönteminin validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.4.)

N: İnokulumdaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.3.)

Na: Bakterisidal aktivitenin tayini sonunda elde edilen kob/ml sayısı

R: Canlı bakteri sayısındaki azalma

Tablo 4-10: Benzalkonyum klorürün biyofilmdeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan bakterisidal aktivite değerleri

Süre	Validasyon test sonuçları				Bakteri test süspansiyonu		Aktif madde konsantrasyonu, %		
	Bakteri süspansiyonu	Deney koşullarının kontrolü	Nötralizan toksisite kontrolü	Test yöntem validasyonu			1	0.1	0.01
5 dakika	Vc: 203;206	Vc: 132;145	Vc: 117;95	Vc: 85;105	10^{-7} : 317; 264	Vc:	>300;>300	>300;>300	>300;>300
	C: $2,4 \times 10^3$	Kv: $1,38 \times 10^3$	Nt: $1,06 \times 10^3$	Yv: $9,5 \times 10^2$	N: $2,9 \times 10^9$	Na: R:	$>3 \times 10^3$ $<10^5$	$>3 \times 10^3$ $<10^5$	$>3 \times 10^3$ $<10^5$
15 dakika	Vc:203;206	Vc: 153;150		Vc: 85;100	10^{-7} : 317; 264	Vc:	>300;>300	>300;>300	>300;>300
	C: $2,4 \times 10^3$	Kv: $1,5 \times 10^3$		Yv: $9,2 \times 10^2$	N: $2,9 \times 10^9$	Na: R:	$>3 \times 10^3$ $<10^5$	$>3 \times 10^3$ $<10^5$	$>3 \times 10^3$ $<10^5$
30 dakika	Vc: 203;206	Vc: 140;149		Vc: 80;83	10^{-7} : 317; 264	Vc:	>300;>300	>300;>300	>300;>300
	C: $2,4 \times 10^3$	Kv: $1,4 \times 10^3$		Yv: $8,1 \times 10^2$	N: $2,9 \times 10^9$	Na: R:	$>3 \times 10^3$ $<10^5$	$>3 \times 10^3$ $<10^5$	$>3 \times 10^3$ $<10^5$

Vc: Petri kutusunda sayılan canlı bakteri sayısı

C: Bakteri süspansiyonundaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.6.)

Kv: Deneysel koşulların validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.1.)

Nt: Nötralizan toksiste validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.2.)

Yv: Test yönteminin validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı (kısım 3.7.4.)

N: İnokulumdaki kob/ml sayısı (kısım 3.4.3.)

Na: Bakterisidal aktivitenin tayini sonunda elde edilen kob/ml sayısı

R: Canlı bakteri sayısındaki azalma

5. TARTIŞMA

Hastane infeksiyonlarının kontrol altında tutulması amacıyla hazırlanan tüzükler su kaynaklı kontaminasyonun risklerini işaret etmesine rağmen, başta *P. aeruginosa* olmak üzere, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium* cinsinden türler, atipik mikobakteriler ve *Legionella* cinsinden türlerin etken olduğu ve hastanelerin su sisteminden kaynaklanan infeksiyonlar ortaya çıkmaya devam etmektedir (116). Sadece hastane infeksiyonu etkeni olarak değil, modern yaşam tarzlarının etkisiyle hastane dışındaki sağlıklı kişilerde de jakuzilerin, yüzme ve termal havuzların kullanımından kaynaklanan *P. aeruginosa* infeksiyonları ve buna bağlı olarak epidemiler ortaya çıkabilmektedir (26, 126). Sonuçta bu bakteri kontamine su sistemlerinin kullanıldığı her alanda, ilaç, kozmetik ve gıda endüstrisinde su kaynaklı ciddi sorunların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

Kontaminasyonu kontrol etmenin başlıca yollarından biri etkili bir dezenfeksiyon işleminin düzenli bir şekilde yapılmasıdır. Bu nedenle, etkili olan bir dezenfektanın yeterli konsantrasyonlarda ve temas süresinde uygulanması dezenfeksiyon işleminin başarısını önemli bir şekilde etkilemektedir. Yetersiz konsantrasyonlarda yapılan dezenfeksiyon işlemi, kontaminasyon kaynağının ürüne veya kişilere bulaşmasına neden olabildiği gibi, etkenin dezenfektana karşı direnç kazanma riskini de doğurmakta, ayrıca dezenfektanın gereğinden yüksek konsantrasyonlarda uygulanması maliyeti arttırmakta ve çevreye zarar verebilmektedir. Bu nedenle dezenfektanın etkinliğinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin yeterliliği önem taşımaktadır.

Amerika Birleşik Devletlerinde (A.B.D.) ve Avrupa'da dezenfektanların antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler kantitatif süspansiyon testi esaslıdır (5, 38). Dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bu standart yöntemler genellikle dezenfektanların süspansiyon halindeki planktonik mikroorganizmalara karşı olan etkisini araştırmaktadır. Ancak bu deneylerle elde edilen sonuçlar dezenfektanların bakterinin biyofilm içinde bulunan şekline olan etkisi konusunda bilgi verememektedir. Oysa ki, gerek sağlık gerekse endüstri alanındaki bakteriler serbest yaşayan şeklinden ziyade genellikle yüzeye yapışık bir halde bulunurlar. Bu durumu dikkate alarak, A.B.D.'de AOAC (Association of Official Agricultural Chemists), Avrupa'da DGHM ve diğer

komiteler temelde aynı olup, küçük detaylarda farklılık gösteren ve sert yüzeylerde dezenfektanın aktivitesini değerlendiren “taşıyıcı testini” geliştirmişlerdir (4, 10, 13). Bu yöntemin esası, sert bir yüzeye mikroorganizmanın test süspansiyonu tatbik edilip kurutulduktan sonra dezenfektanla belirlenen süre boyunca muamele edilmesinin ardından alınan örnekte, inokulumda bulunan mikroorganizmanın ölüp ölmediğinin kontrol edilmesinden oluşmaktadır. Yüzeylere uygulanan dezenfeksiyon işleminin etkisini ölçmede kullanılan bu testler, kantitatif süspansiyon testlerine oranla önemli bir aşama kaydetmiş olsa dahi yeterlilikleri hala tartışmalıdır. Bu testlerde bakterinin sadece yüzeye yapışabileceği kadar bir inkübasyon süresi uygulanmaktadır. Oysa ki, biyofilmin içerisindeki bakterinin çoğalıp, biyofilmin olgun şeklini alabilmesi için çok daha uzun bir sürenin geçmesi gerekmektedir (110). Bakterilerin biyofilm içerisinde gömülü bulunan şekilleri, serbest planktonik şekilleriyle kıyaslandığında dezenfektanlara karşı çok daha yüksek direnç gösterirler ve inaktive edilmeleri için bazen 1000 katı konsantrasyondaki çözeltilerin kullanılması gerekmektedir (22, 107, 113). Bunun başlıca nedenleri arasında biyofilmi oluşturan polimerik matriksin bir bariyer olarak işlev görmesi, biyofilme gömülü bakterilerin genetik değişikliğe uğramış olması ve çok düşük seviyede metabolik aktivite ve bölünme hızı göstermeleri yer almaktadır. Özellikle su sistemlerinin bağlantı parçalarında yerleşme eğilimi gösteren *P. aeruginosa* biyofilmi, rezervuar olarak işlev görerek biyofilm içerisinde gelişen dirençli bakterinin aralıksız bir şekilde su sistemine yayılmasına ve yeni kontaminasyon kaynaklarını oluşturmaya neden olmaktadır (49, 110). Bu nedenle, dezenfektanların biyofilmler için aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik standart bir test prosedürüne gereksinim duyulmaktadır.

Başta antibiyotikler olmak üzere antimikrobik etkili maddelerin biyofilmler üzerine etkilerinin araştırılması için çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. Bunların başında biyofilmdeki bakterinin % 99,9'unu öldüren en düşük konsantrasyon olan MBK değerinin tespit edilmesine yönelik testler gelmektedir (52, 93, 94). Araştırmacılar bu testler için bakteri biyofilmini hazırlarken birbirinden farklı koşulları kullanmışlardır.

Çalışmamızda *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna ait, uygulanan deneylere elverişli, istenen bakteri yoğunluğuna sahip, kararlılık gösteren ve tekrarlanabilir statik biyofilmi elde edebilmek için farklı koşulların etkisi denenmiştir. Uygulanan bu farklı koşullar arasında inokulumun hazırlandığı besiyerinin, mikropklara uygulanan hacmin ve inkübasyon süresinin biyofilmin oluşumunda rolleri olduğu belirlenmiştir. Bunlar

arasında dikkati çeken koşullardan biri, TSB besiyerine glukozun ilave edildiği denemelerde glukozun ilave edilmediği denemelere oranla kütleleri daha yüksek biyofilmlerin elde edilmesidir. Benzer şekilde, yapılan birçok çalışmada, *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmin, ürettiği ortamdaki karbon kaynağına, özellikle de glukozun varlığına bağlı olduğu gösterilmiştir (32, 114). QS sisteminin kontrolü altında, *P. aeruginosa*'nın katı yüzeyler üzerinde gerçekleştirdiği kayma hareketinin indüklenmesine neden olan süksinat ve glutamatın varlığında yassı bir biyofilm gelişirken, bu hareketin kısıtlanmasına neden olan glukozun varlığında ise yer yer mikrokolonilerle bölünen bir biyofilm oluşmaktadır. Benzer şekilde, glukoz varlığında üreyen *P. aeruginosa*'nın su kanallarıyla bölünen, mantar şeklinde, hacimli, normal biyofilmler oluşturduğu; sitrat varlığında ise yassı, anormal biyofilmler oluşturduğu yapılan başka çalışmalarla da gösterilmiştir (63, 64). Çalışmamızda kristal viyole deneyleri sonucunda elde etmiş olduğumuz bulgular, glukozun *P. aeruginosa*'nın normal, hacimli biyofilmler oluşturabilmesi üzerine olan etkisini doğrulamıştır.

Zengin bir biyofilmin oluşumunu etkileyen bir diğer koşul ise mikroplağa uygulanan inokulumun hacmi olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda 96 kuyulu mikropklara 100 µl uygulanan inokulumlar ile 200 µl'lik hacimlerde uygulananlara göre belirgin bir şekilde çok daha düşük biyofilm kütlesi elde edilmiştir. Bunun başlıca nedeni, oksijeni seven bir bakteri olan *P. aeruginosa*'nın 96 kuyulu mikropklara 200 µl'lik hacimlerde uygulanması sonucunda daha fazla oksijene ulaşabilirlik kazanmasından kaynaklanmıştır. Ancak 96 kuyulu mikropklarda uygulanan bu hacim, nötralizan ilavesi ve biyofilmin yüzeyden ayrılması gibi işlemler için yeterli çalışma alanı bırakmadığından, deneylerde 1,9 cm² üreme alanı ve 0,5 ile 1,5 ml arasında çalışma hacmi olanağı sağlayan 24 kuyulu mikropkların kullanılması tercih edilmiştir.

Çalışmamızda zengin ve kararlı bir biyofilmin oluşumunu etkileyen son koşul ise mikropklaktaki inkübasyon süresi olarak belirlenmiştir. Inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate uzatılması, biyofilm kütlesinin ciddi bir şekilde azalmasıyla sonuçlanmıştır. Bu durum muhtemelen aynı ortamda bulunan planktonik ve biyofilm içerisindeki bakterilerin aynı besin kaynağını kullanmalarına bağlı olarak biyofilmdeki bakterilerin ölmeye başlamasından kaynaklanmıştır. Bu nedenle, planktonik bakterilerin, biyofilmdeki bakterinin besin kaynağına ortak olmasını engellemek amacıyla, 4 saatlik bir ön inkübasyon sürecinin akabinde planktonik bakteriler ortamdan uzaklaştırılmış, ardından taze besiyerinin ilavesiyle inkübasyon süresi 24 saate

tamamlanmıştır. Ön inkübasyon süreci için belirlenen bu süre ayrıca, bakteri biyofilminin oluşumunda ilk gerekli aşamalar olan geriye dönüşümsüz biçimde yüzeye bağlanması ve birbirine yapışan bakterilerin mikrokoloni oluşumunu başlatabilmesi için gereken 2 saatlik süreyi de karşılamaktadır (110). Tüm bu denemelerin sonucunda, bakterinin rotatördeki 24 saatlik inkübasyon süreci sonucunda hazırlanan glukozlu TSB'deki inokulumunun, mikropaktaki 4 saatlik bir ön inkübasyon sürecinin akabinde, yüzeye yapışan bakterilerin taze besiyeri ile 20 saat daha inkübe edilmesiyle hazırlanan biyofilmler kullanılmıştır. Bu koşulları içeren biyofilmi seçmemizin başlıca nedeni zengin bir biyofilm kütlesi vermesinin yanı sıra diğer koşullara göre, denemeler arasında görülen standart sapmanın ($1,90 \pm 0,40$) çok daha düşük olması, dolayısıyla deneylerde kullanılmaya elverişli, daha kararlı ve tekrarlanabilir biyofilmlerin elde edilmesini sağlamasıdır.

Çalışmanın ikinci önemli aşamasını, biyofilmlerin kullanıldığı deneylerde uygulanmak üzere, dezenfektanların yüksek konsantrasyondaki çözeltilerini nötralize edebilen, öte yandan çalışmada kullanılan bakteri üzerinde toksik etkili olmayan çözeltilerin arayışı oluşturmuştur. Antimikrobik etkili maddeleri içeren ürünlerin, özellikle de dezenfektanların antimikrobik etkilerinin araştırıldığı deneylerde, temas süresinin sonunda bu maddelerin uygun bir nötralizan ile etkili bir şekilde inaktive edilememeleri hatalı sonuçların elde edilmesine yol açmaktadır (34). Farklı kimyasal yapılara sahip oldukları için tüm dezenfektanları nötralize edebilen tek bir yöntem bulunmamaktadır. Ancak uygun kimyasal maddelerin yeterli konsantrasyonda kullanılmalarıyla yapılan nötralizasyon işlemi en sık tercih edilen yöntem olup, deney öncesinde nötralizan etkinlik ve toksisite testleriyle seçilen nötralizanın valide edilmesi gerekmektedir (34, 38, 119).

Çalışmamızda dezenfeksiyon işlemlerinde yaygın bir şekilde kullanılan dezenfektanlar olan sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün % 10 oranında aktif madde içeren çözeltilerinin, içeriğinde sırasıyla % 0,5, % 0,3, % 0,1 ve % 3 oranında sodyum tiyosülfat, lesitin, histidin ve polisorbata 80 bulunan universal nötralizan ile nötralize edilemediği tespit edilmiştir. Bu nedenle, klor içeren bileşiklerin nötralize edilmesinde kullanılan ve standartların önermiş olduğu veya ticari olarak satılan nötralizanların formülünde yer alan sodyum tiyosülfatın konsantrasyonu artırılarak, farklı kombinasyonlarda hazırlanan nötralizanların sodyum hipoklorite olan etkinlikleri araştırılmıştır (34, 38). Yapılan incelemeler sonucunda çözeltideki sodyum tiyosülfat

konsantrasyonunun % 2,5'a yükseltilmesinin yeterli olduğu, ancak % 3 polisorbata 80 varlığında % 5 ve % 12,5'a yükseltildiğinde canlı kalan bakteri sayısına ait oranın sırasıyla 0,76 ve 0,70 gibi sınıra yakın değerlere denk düştüğü gözlemlenmiştir. Ancak biyofilm çalışmalarında daha yüksek konsantrasyonlardaki sodyum hipoklorit çözeltilerinin biyofilm üzerindeki bakterisidal aktivitesini tespit edebilmek için % 12,5 oranında sodyum tiyosülfat içeren çözeltiye ihtiyaç duyulduğundan dolayı, polisorbata 80'i % 0,5 gibi düşük bir oranda içeren D/E buyyonundaki sodyum tiyosülfat oranı % 12,5'a yükseltilerek elde edilen nötralizan, sodyum hipokloritin nötralize edilmesinde kullanılmıştır.

Katerner amonyum bileşikleri anyonik yüzey aktif maddeler, polisorbata 80 gibi non-iyonik yüzey aktif maddeler, saponin gibi amfipatik yüzey aktif maddeler, lesitin gibi fosfolipitler ve yağ içeren maddeler tarafından inaktive edilebilmektedir (77). Bu özelliğinden yararlanılarak katerner amonyum bileşiklerinin nötralize edilmesinde lesitin kullanılmakta ve standartların önermiş olduğu veya ticari olarak satılan nötralizanların formülünde yer almaktadır (34, 38). Ancak çalışmamızda araştırılan % 10 oranında aktif madde içeren benzalkonyum klorür çözeltilisinin % 0,3 ve hatta % 0,7 oranında lesitin içeren, sırasıyla universal nötralizan ve D/E buyyonu ile inaktive olmadığı tespit edilmiştir. Bunun üzerine katerner amonyum bileşiklerinin nötralize edilmesinde kullanılan diğer maddelerin formüle ilave edilmesi veya var olanların konsantrasyonlarının artırılması yönünde araştırmalar yapılmıştır. Yapılan incelemeler sonucunda % 0,7 oranında lesitin içeren D/E buyyonunda polisorbata 80 oranının % 15'e yükseltilmesinin veya % 3 oranında polisorbata 80 ve saponinden oluşan bir karışımın bulunmasının benzalkonyum klorürün nötralize edilmesinde etkili olduğu belirlenmiştir. Tüm bu denemeler sonucunda dikkat çekici olan, dezenfektanın deneylerde kullanılması düşünülen konsantrasyonları dikkate alınarak, nötralizandaki maddelerin konsantrasyonlarının gerektiği takdirde değiştirilmesi gerektiği, öte yandan oluşan bu değişikliğin nötralizanın formülünde bulunan diğer maddelerle geçimsizlik oluşturabileceğinin, hatta deneyde kullanılan mikroorganizmalar üzerinde toksik etki oluşturabileceğinin de göz önünde bulundurulması gerekliliğidir.

Hastanelerde, endüstride, kamu alanlarında ve evlerde en çok kullanılan dezenfektanlar arasında klorlu bileşikler, özellikle de sodyum hipoklorit yer alır. Genellikle % 1-5 konsantrasyonlarda kullanılan sodyum hipoklorit, birçok bakterinin vejetatif şeklini kolaylıkla öldürebilmektedir (72). Sodyum hipokloritin

dezenfeksiyonda kullanılan çözeltilisinin konsantrasyonuna bağlı olarak dezenfeksiyonun seviyesi değişebilmektedir (47). 650 ile 675 ppm serbest klor içeren çözeltisi yüksek seviyede dezenfeksiyon sağlarken, 100 ppm serbest klor içeren çözeltisi düşük seviyede dezenfeksiyon işlemleri için kullanılmaktadır. Ancak aktivitesi ortamdaki organik maddelerden etkilendiği için Centers for Disease Control and Prevention (CDC), kan, serum ve benzeri protein yapıdaki hasta örnekleriyle bulaşık yüzeylerin dezenfeksiyonunda sodyum hipokloritin % 5.25'lik stok çözeltilisinin 1:10 oranında seyreltilmiş şekli olan ve 5000 ppm serbest klor içeren çözeltilisini önermektedir (72).

Çalışmamızda CLSI tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak, sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında saptanan MBK değerlerinin uygulanan her temas süresi için 60 µg/ml, ortama sıgır albümininin ilavesiyle oluşturulan kirli koşullarda ise 5, 10 ve 15 dakika için 250 µg/ml, 30, 60 dakika ve 24 saat için ise 125 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Aynı deney daha yüksek oranda organik madde içeren TSB ile uygulandığında ise MBK değerlerinin 5 dakikalık temas süresi için 4000 µg/ml'ye kadar yükselebildiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, sodyum hipokloritin ortamdaki organik madde varlığından olumsuz bir şekilde etkilendiğini, bu organik maddelere bağlanması sonucunda çözeltideki aktif klor miktarının azalmasına bağlı olarak bakterisidal aktivitesinin ortamda bulunan organik maddenin yoğunluğuna bağlı olarak 4-60 kat azalabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda sodyum hipokloritin biyofilmdeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında oluşturduğu MBK değerleri araştırıldığında 12.000 µg/ml'lik konsantrasyonun uygulandığı deneyde 5 dakikada herhangi bir bakterisidal aktivitenin saptanamadığı, 10 dakikalık temas süresinin sonunda elde edilen MBK değerinin 6000 µg/ml olduğu, temas süresinin 30, 60 dakika ve 24 saate kadar uzamasıyla bu değerlerin sırasıyla 4000, 2000 ve 1500 µg/ml'ye kadar düşebildiği ve temas süresinin sodyum hipokloritin biyofilme nüfuz edebilmesi için etkili bir faktör olduğu belirlenmiştir. de Beer ve ark. mikroeletrotlar kullanarak yapmış oldukları araştırmalarında, ortamdaki klor konsantrasyonunun arttığı ve temas süresinin uzadığı ölçüde dezenfektanın biyofilme nüfuz etme oranında da artış olduğunu gözlemlemişlerdir (31). Çalışmamızda da ortama organik maddenin ilave edilmesi MBK değerinin 10 dakikalık temas süresinde 10.000 µg/ml'ye yükselmesine neden olmuştur. Elde edilen bu bulgular, sodyum hipokloritin biyofilmdeki bakteriyi

öldürebilmesi için gereken en düşük konsantrasyonunun planktonik bakteriyi öldürmek için gerekenden 100 kat daha fazla olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda dezenfektanların bakterisidal etkinliklerinin saptanmasında, araştırma merkezleri tarafından yaygın bir şekilde kullanılan CEN'in EN 1276 standart kantitatif süspansiyon testi esas alınarak uygulandığında % 1 ve % 0,1 oranında aktif klor içeren sodyum hipoklorit çözeltilerinin 5, 15 ve 30 dakikalık, % 0,01 oranında aktif klor içeren çözeltinin ise sadece 30 dakikalık temas süresinin sonunda *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı bakterisidal aktivite gösterdikleri saptanmıştır. *P. aeruginosa*'nın planktonik hücrelerine karşı CEN'in standart kantitatif süspansiyon testini kullanarak elde ettiğimiz bu bulguların CLSI'in mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak elde edilenlerle uyum içerisinde olduğu saptanmış, benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir.

Mazzola ve ark. (74) su sistemlerinde yaygın bir şekilde bulunan Gram negatif bakterilere karşı çeşitli dezenfektanların bakterisidal aktivitelerini araştırdıkları çalışmalarında, sodyum hipokloritin % 0,5'lik çözeltisinin *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan D-değerinin (ondalık redüksiyon süresi) 4.54 dakika olduğunu bildirmişlerdir. Deneylerinde TSB kullandıklarını bildiren araştırmacılar D-değerini, dezenfektanın % 0,5'lik çözeltisinin kullanılmasıyla başlangıçtaki 10^5 - 10^6 kob/ml'lik bakteri sayısının 1 ondalık logaritmik azalmasını sağlamak için gereken süre olarak belirlemiş ve temas süresinin 7. dakikasında süspansiyondan alınan örnekte canlı bakterinin kalmadığını saptamışlardır.

Nakipoğlu ve Gürler (79) çeşitli dezenfektan ve antiseptiklerin antibakteriyal etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, % 3'lük sodyum hipoklorit çözeltisinin 30 dakikalık temas süresinin sonunda *P. aeruginosa* NCTC 6749 suşuna karşı % 100 bakterisidal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, kullanılan dezenfektanların biyofilm içerisindeki bakteriye olan etkisini belirleyebilmek için, planktonik bakterilere karşı dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin araştırılmasında kullanılan CEN'in EN 1276 standart yönteminde bazı modifikasyonlar uygulanmıştır. Dezenfektanların MBK değerlerinin saptanmasında kullanılan statik biyofilm istenen bakteri yoğunluğunu verdiği, kararlılık gösterdiği ve tekrarlanabilir özelliklere sahip olduğu için, aynı koşullardaki biyofilm EN 1276 standart yöntemi uygulayabilmek üzere tüplerde hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu biyofilm ile yapılan deneylerde, % 1 oranında aktif klor içeren sodyum hipoklorit çözeltisinin 5, 15 ve 30 dakikalık temas süresinin sonunda *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşunun biyofilmde gömülü şekline karşı bakterisidal aktivite gösterdiği, ancak % 0,1 ve % 0,01 oranında aktif klor içeren çözeltilerin etkisiz kaldığı saptanmıştır. Bu yöntemi kullanarak elde ettiğimiz bulguların CLSI'in mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak elde edilenlerle uyum içerisinde olduğu saptanmış, benzer bulgular başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir.

Tote ve ark. (120) *Staphylococcus aureus* ve *P. aeruginosa* biyofilmlerinin canlılık kütlesi ve matriksi üzerinde çeşitli biyositlerin inhibitör etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, sodyum hipokloritin % 1'lik çözeltisinin *P. aeruginosa* ATCC 700928 suşuyla oluşturulan biyofilmdeki canlı bakteri sayısını 1 dakika gibi kısa bir süre içerisinde % 92 ± 9 oranında azalttığını, *P. aeruginosa*'ya ait matriksin ise 1 dakikada % 66 ± 3 oranında azaldığını ve bu oranın 15 dakikada % 91 ± 2 'ye ulaştığını bildirmişlerdir.

Eginton ve ark. (37) dezenfektanların tatbikatı sonucunda mikroorganizmaların yüzeye tutunma gücündeki değişiklikleri araştırdıkları çalışmalarında, sodyum hipokloritin % 0,02'lik çözeltisinin 5 dakikalık temas süresinin sonunda *P. aeruginosa*'nın planktonik fazdaki bakteri sayısında $2.3 \log_{10}$ 'luk bir azalmaya neden olduğunu, ancak biyofilmin dezenfektana karşı daha dirençli olduğu ve biyofilmdeki bakteri sayısında sadece $0.5 \log_{10}$ 'luk bir azalma saptadıklarını, buna karşılık dezenfektanla temasın biyofilmi gevşetebildiğini ve uygulama sonucunda yüzeyden ayrılan biyofilmdeki bakteri sayısının $1 \log_{10}$ olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve ark. (60), klor, gümüş iyonları ve tobramisin, *P. aeruginosa*'nın PAO-1 suşu ile hazırlanmış oldukları biyofilm üzerindeki antimikrobik etkilerini araştırmış oldukları çalışmalarında, aktif klorun bakterinin % 90'ını inaktive etmek için gereken CT-değerinin (C aktif klorun mg/ml cinsinden konsantrasyonu, T ise dakika cinsinden temas süresi) planktonik fazdaki bakteri için $0.05 \text{ mg} \cdot \text{dakika/litre}$ olduğunu, ancak biyofilmdeki bakteri için $300 \text{ mg} \cdot \text{dakika/litre}$ 'den fazla klora gereksinim duyulduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada kullanılan diğer bir dezenfektan madde, gerek güçlü deterjan özelliği gerekse kuvvetli dezenfektan aktivitesi ile hastanelerde, gıda yada ilaç üretim alanlarında, antiseptik özelliği ile cerrahi girişimlerin öncesi yada sonrasında ve düşük konsantrasyonlardaki koruyucu özelliği ile gıda, ilaç ve kozmetiklerde kullanılan katerner amonyum bileşiklerinden olan benzalkonyum klorürdür. Benzalkonyum klorür

sporosidal aktiviteye sahip olmamakla birlikte, güçlü bakterisidal etkili bir madde olup, renksiz ve kokusuz bir madde oluşu ve non-korozif özellikleriyle uzun yıllardır birçok alanda güvenle kullanılmaktadır (72). Benzalkonyum klorür, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler için çok düşük konsantrasyonlarda bakterisidal etkili olup, Gram pozitif bakterilere karşı 1:200.000 gibi düşük konsantrasyonda dahi oldukça iyi bir aktivite gösterirken, Gram negatif bakteriler için, özellikle *P. aeruginosa* varlığında 1:30.000 veya daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulduğu, ayrıca antimikrobiyal aktivitesinin organik madde, anyonik deterjanlar (sabunlar), divalan katyonlar ve gazlı bez ve pamuk gibi gözenekli materyallerin varlığında azaldığı bilinmektedir (56, 72).

Çalışmamızda CLSI tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak, benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında saptanan MBK değerinin uygulanan her temas süresi için 16 µg/ml, ortama sığır albümininin ilavesiyle oluşturulan kirli koşullarda ise 5 dakika için 64 µg/ml, deneyde uygulanan diğer temas süreleri için ise 32 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Aynı deney daha yüksek oranda organik madde içeren TSB ile uygulandığında ise MBK değerinin 5 dakikalık temas süresi için 32 µg/ml olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular benzalkonyum klorürün organik maddelerin varlığından sodyum hipoklorit kadar etkilenmediğini göstermektedir.

Ohta ve ark. (86) katyonik dezenfektanların çeşitli bakteriler üzerinde MBK değerlerini araştırmış oldukları çalışmalarında, klinik materyalden izole etmiş oldukları *P. aeruginosa* suşuna karşı benzalkonyum klorürün MBK değerini 3 dakikalık temas süresinin sonunda 16 µg/ml olarak belirlemişlerdir. Bu bulgu çalışmamızda elde etmiş olduğumuz değerle uygunluk göstermektedir.

Çalışmamızda benzalkonyum klorürün biyofilmdeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında gösterdiği MBK değerleri araştırıldığında ise ancak 60 dakikalık temas süresinin sonunda 20.000 µg/ml konsantrasyonda MBK değeri saptanmış ve bu dezenfektanın *P. aeruginosa*'nın biyofilmine karşı etkisiz olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda, dezenfektanların bakterisidal etkinliklerinin saptanmasında yaygın bir şekilde kullanılan CEN'in EN 1276 standart kantitatif süspansiyon testi esas alınarak uygulandığında % 1 ve % 0,1 oranında aktif madde içeren benzalkonyum klorür çözeltilerinin 5, 15 ve 30 dakikalık temas süresinin sonunda *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı bakterisidal aktivite gösterdikleri, ancak % 0,01 oranında

aktif madde içeren çözeltinin etkisiz kaldığı saptanmıştır. *P. aeruginosa*'nın planktonik hücrelerine karşı elde ettiğimiz bu bulguların CLSI'in mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak elde edilenlerle uyum içerisinde olduğu saptanmış, benzer sonuçlar başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir.

Nakipoğlu ve Gürler (79) çeşitli dezenfektan ve antiseptiklerin antibakteriyal etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında, % 2'lik katerner amonyum bileşikler içeren çözeltinin, 20 dakikalık temas süresinin sonunda *P. aeruginosa* NCTC 6749 suşuna karşı % 100 bakterisidal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

CEN'in EN 1276 standart yönteminde bazı modifikasyonlarla, MBK değerlerinin saptandığı deneylerde biyofilmin oluşturulması için kullanılan koşulların tüpte oluşturulmasıyla hazırlanan biyofilm kullanıldığında, deneyde uygulanan % 1, % 0,1 ve % 0,01 oranında aktif madde içeren çözeltilerden hiçbirinin biyofilm üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır. Bu yöntemi kullanarak elde ettiğimiz bulguların CLSI'in mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak elde edilenlerle uyum içerisinde olduğu saptanmış, benzer bulgular başka araştırmacılar tarafından da elde edilmiştir.

Tote ve ark. (120) *S. aureus* ve *P. aeruginosa* biyofilmlerinin canlılık kütlesi ve matriksi üzerinde çeşitli biyositlerin inhibitör etkilerini araştırmış oldukları çalışmalarında, benzalkonyum klorürün % 0,1'lik çözeltisinin *P. aeruginosa* ATCC 700928 suşuyla oluşturulan biyofilmdeki canlı bakteri sayısını 1 dakikada % 72 ± 7 oranında azalttığını, bu oranın 60 dakikada % 86 ± 5 'e yükseldiğini, ancak *P. aeruginosa*'ya ait matrikste belirgin bir azalmanın tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Smith ve Hunter (115), hastanede kullanılan biyositlerin, kliniklerden izole etmiş oldukları çoğul dirençli bakterilerin oluşturdukları biyofilmler üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, kistik fibrozlu çocuklardan izole edilen sekiz *P. aeruginosa* suşuna karşı MBK değerlerinin % 0,1 ile % 0,01 (a/h) arasında değiştiğini, ancak biyofilmdeki bakterilerin % 4-80 oranında canlı kaldığını bildirmişler ve biyositlerin etkinliklerinin araştırılmasında klasik CLSI yöntemi yerine bakteriyel biyofilmler üzerinde testler yapılması gerektiğini vurgulamışlardır.

Çalışmamızda ve diğer araştırmacılar tarafından elde edilen bulgular şunu göstermektedir ki, dezenfektanların bakterisidal etkilerinin değerlendirilmesinde CLSI'in önermiş olduğu mikrodilüsyon yöntemi ile MBK değerinin saptanmasına yönelik bir yöntem veya AOAC, ANFOR veya CEN'in önermiş oldukları standart kantitatif süspansiyon testleri yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin hiçbiri

biyofilm içerisindeki bakteri üzerinde dezenfektanların bakterisidal etkileri hakkında fikir verememektedir. Oysa ki, *P. aeruginosa* su sistemlerinde, kaynaklarında veya suyla ilgili her ortamda genellikle biyofilm içerisinde gömülü mikrokoloniler halinde üreme eğilimi göstermektedir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgular, sodyum hipokloritin bakterisidal aktivitesinin ortamda bulunan organik maddenin yoğunluğuna bağlı olarak 4-60 kat azalabildiğini; çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* suşunun biyofilm içerisindeki şekline karşı bakterisidal aktivite gösterebilmesi için planktonik şekline göre 100 kat daha yüksek konsantrasyonlardaki çözeltilerin kullanılması gerektiğini ve temas süresinin uzatılmasıyla biyofilme nüfuz etme şansı bulabildiğini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan diğer dezenfektan olan benzalkonyum klorürün ise sodyum hipoklorite göre daha düşük konsantrasyonlarda bakterisidal aktivite gösterdiği, organik maddelerin varlığından sodyum hipoklorit kadar etkilenmediği, ancak çalışmada kullanılan *P. aeruginosa* suşunun biyofilm içerisindeki şekline karşı etkisiz kaldığı belirlenmiştir.

Bulgularımız dezenfeksiyon işlemi yapılırken kullanılan dezenfektanın ve dezenfektan konsantrasyonunun, dezenfektanın biyofilm üzerinde oluşturduğu bakterisidal aktivitesinin dikkate alınarak seçilmesi gerektiğini göstermekte ve çalışmamızda geliştirilen yöntemin bu etkilerin araştırılmasında araştırmacılara yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Ahmed M, Ahmed N. Genetics of bacterial alginate: alginate genes distribution, organization and biosynthesis in bacteria. *Curr Genomics* 2007; **8**: 191-202.
2. Akalın HE, Baykal M, Akın S. Hastane infeksiyonlarına neden olan bakterilerin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları. *KÜKEM Derg* 1985; **8**: 174.
3. Allesen-Holm M, Barken KB, Yang L, Klausen M, Webb JS, Kjelleberg S ve ark. A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. *Mol Microbiol* 2006; **59(4)**: 1114–1128.
4. AOAC International. AOAC official method 991.49. Testing disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa*. Hard surface carrier test method. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Arlington, Va. 1995.
5. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC International, Arlington, Va. 1995.
6. Banin E, Vasil ML, Greenberg EP. Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 11076–11081.
7. Barken KB, Pamp SJ, Yang L, Gjermansen M, Bertrand JJ, Klausen M ve ark. Roles of type IV pili, flagellum-mediated motility and extracellular DNA in the formation of mature multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 2008; **10(9)**: 2331-2343.
8. Blenkinsopp SA, Khoury AE, Costerton JW. Electrical enhancement of biocide efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 1992; **58(11)**: 3770-3773.
9. Block SS. Historical Review. İçinde Block SS, editor. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. 5. ed. USA: Lippincott Williams Wilkins. 2001. pp. 3-19.
10. Bloomfield SF, Arthur M, Klinger BV, Pullen W, Holah JT, Elton R. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants. *J Appl Bacteriol* 1994; **76**: 86–94.

11. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis* 1983; **5**: 279-313.
12. Boles BR, Thoendel M, Singh PK. Rhamnolipids mediate detachment of *Pseudomonas aeruginosa* from biofilms. *Mol Microbiol* 2005; **57**: 1210–1223.
13. Borneff J, Eggerss HJ, Grün L ve ark. Richtlinien für die Prüfung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren. Erster Teilabschnitt. Stuttgart. Gustav Fiischer Verlag. 1981.
14. Botzenhart K, Ruden H. Hospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1987; **39**: 1-15.
15. Boyd A, Chakrabarty AM. Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1994; **60(7)**: 2355-2359.
16. Branda SS, Vik A, Friedman L, Kolter R. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* 2005; **13**: 20–26.
17. Centers for Disease Control and Prevention, Health Inspections Program. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) report, data summary from January 1992-June 2004, issued October 2004: a report from the NNIS System. *Am J Infect Control* 2004, **32(8)**: 470-485.
18. Charaklis WG. Attached microbial growths II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Res* 1973; **7**: 1249-1258.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*: 7. ed. Approved Standard M7-A7. Wayne, PA, USA: 2006, CLSI.
20. Control of Microorganisms: Chemical Agents. İçinde Pelczar MJ Jr, Chan ECS, Krieg NR, editörler. *Microbiology Concepts and Applications*. International edition McGraw-H II Inc; 1993. pp. 221-242.
21. Costerton JW, Cheng KI, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TI. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987; **41**: 435-464.
22. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 1995; **49**: 711-745.

23. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; **284**: 1318-1322.
24. Costerton JW. The role of electron microscopy in the elucidation of bacterial structure and function. *Annu Rev Microbiol* 1979; **33**: 459- 479.
25. Crabbé A, de Boever P, van Houdt R, Moors H, Mergeay M, Cornelis P. Use of the rotating wall vessel technology to study the effect of shear stress on growth behavior of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Environ Microbiol* 2008; **10**: 2098–2110.
26. Craun GF, Calderon RL, Craun MF. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* 2005; **15**: 243-262.
27. Cross AS. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Eur J Clin Microbiol* 1985; **4**: 156-159.
28. Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 2003; **185**: 1027–1036.
29. Davies DG, Chakrabarty AM, Geesey GG. Exopolysaccharide production in biofilms: substratum activation of alginate gene expression by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol* 1993; **59(4)**: 1181-1186.
30. Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 1998; **280**: 295-298.
31. de Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994; **60(12)**: 4339-4344.
32. de Kievit TR, Gillis R, Marx S, Brown C, Iglewski BH. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67(4)**: 1865–1873.
33. de Kievit TR. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Environmental Microbiology* 2009; **11(2)**: 279–288.

34. Dey BP, Engley Jr FB. Neutralization of antimicrobial chemicals by recovery media. *J Microbiol Methods* 1994; **19**: 51-58.
35. Deziel E, Lepine F, Milot S, Villemur R. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 2003; **149**: 2005–2013.
36. Döring G, Maier M, Müller E, Bibi Z, Tümmler B, Kharazmi A. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother* 1987; **39**: 136-148.
37. Eginton PJ, Holah J, Allison DG, Handley PS, Gilbert P. Changes in the strength of attachment of micro-organisms to surfaces following treatment with disinfectants and cleansing agents. *Lett Appl Microbiol* 1998; **27**: 101–105.
38. European Committee for Standardization. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test method and requirements. European Standard EN 1276, Brussels. 1997.
39. Evans K, Passador L, Srikumar R, Tsang E, Nezezou J, Poole K. Influence of the mexAB-oprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1998; **180**: 5443–5447.
40. Fraise AP. Historical introduction. İçinde Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editörler. *Principles and Practice of Disinfection Preservation Sterilization*. 4. ed. USA: Blackwell Publishing; 2004. pp. 3-8.
41. Friedman L, Kolter R. Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilm. *Mol Microbiol* 2004; **51**: 675–690.
42. Gambello MJ, Iglewski BH. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase production. *J Bacteriol* 1991; **173**: 3000–3009.
43. Gerçeker AA. *Pseudomonas aeruginosa*'nın virülans faktörlerinin akut ve kronik infeksiyonların patogeneziindeki yerleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1992; **22**: 92-100.

44. Gilbert P, Rickard AH, McBain AJ. Biofilms and antimicrobial resistance. İçinde Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editörler. *Principles and Practice of Disinfection Preservation Sterilization*. 4. ed. USA: Blackwell Publishing; 2004. pp. 128-139.
45. Gilligan PH. *Pseudomonas* and *Burkholderia*. İçinde Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editörler. *Manuel of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: ASM Pres; 1995. pp. 509-519.
46. Gristina AG, Costerton JW. Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis. *J Bone Joint Surg Am* 1985; **67**: 264-273.
47. Günaydın M, Gürler B. Hastane infeksiyonlarının kontrolünde Dezenfeksiyon, Antisepsi ve Sterilizasyon “DAS” uygulamaları. *ANKEM Derg* 2008; **22(4)**: 221-231.
48. Haas CN, Engelbrecht RS. Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from aqueous chlorination. *J Water Pollut Control Fed* 1980; **52(7)**: 1976-1989.
49. Hallam NB, West JR, Forster CF, Simms J. The potential for biofilm growth in water distribution systems. *Water Res* 2001; **35(17)**: 4063-4071.
50. Hancock REW, Mutharia LM, Chan L, Darveau RP, Speert DP, Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis: a class of serum-sensitive, nontypeable strains deficient in lipopolysaccharide O side chains. *Infect Immun* 1983; **42**: 170–177.
51. Hancock REW, Wong PGW. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; **26(1)**: 48-52.
52. Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA, Stan MA, Chan CS, Allan ND, Vrionis HA, Olson ME, Ceri H. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52(8)**: 2870–2881.

53. Hentzer M, Teitzel GM, Balzer GJ, Heydorn A, Molin S, Givskov M ve ark. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *J Bacteriol* 2001; **183(18)**: 5395–5401.
54. Heukelekian H, Heller A. Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *J Bacteriol* 1940; **40**: 547-558.
55. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010; **35(4)**: 322-332.
56. Hugo WB, Russel AD. Evaluation of non-antibiotic antibacterial agents. İçinde Hugo WB, Russel AD, editörler. *Pharmaceutical Microbiology*. 6th ed. United Kingdom: Blackwell Science; 2002. pp. 229-255.
57. Jana TK, Srivastava AK, Csery K, Arora DK. Influence of growth and environmental conditions on cell surface hydrophobicity of *Pseudomonas fluorescens* in non-specific adhesion. *Can J Microbiol* 2000; **46(1)**: 28-37.
58. Jensen ET, Kharazmi A, Lam LK, Costerton JW, Høiby N. Human polymorphonuclear leukocyte response to *Pseudomonas aeruginosa* grown in biofilms. *Infect Immun* 1990; **58(7)**: 2383-2385
59. Jones HC, Roth IL, Saunders WM III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* 1969; **99**: 316-325.
60. Kim J, Pitts B, Stewart PS, Camper A, Yoon J. Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52(4)**: 1446–1453.
61. Kirisits MJ, Margolis JJ, Purevdorj-Gage BL, Vaughan B, Chopp DL, Stoodley P ve ark. Influence of the hydrodynamic environment on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol* 2007; **189**: 8357–8360.
62. Kirisits MJ, Parsek MR. Does *Pseudomonas aeruginosa* use intercellular signalling to build biofilm communities?. *Cell Microbiol* 2006; **8(12)**: 1841–1849.
63. Klausen M, Heydorn A, Ragas P, Lambertsen L, Aaes-Jørgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 2003; **48(6)**: 1511–1524.

64. Klausen M, Jørgensen AA, Molin S, Tolker-Nielsen T. Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 2003; **50(1)**: 61–68.
65. Köhler T, Curty LK, Barja F, Van Delden C, Pechere JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* 2000; **182(21)**: 5990–5996.
66. Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; **86**: 813–823.
67. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *J Bacteriol* 1991; **173**: 6558–6567.
68. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with Cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002; **15(2)**: 194–222.
69. Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog* 2009; **5(3)**: 1–11.
70. Ma L, Lu H, Sprinkle A, Parsek MR, Wozniak DJ. *Pseudomonas aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. *J Bacteriol* 2007; **189**: 8353–8356.
71. Makin SA, Beveridge TJ. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiology* 1996; **142**: 299–307.
72. Marsik FJ, Denys GA. Sterilization, decontamination, and disinfection procedures for the microbiology laboratory. İçinde Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH. Editörler. *Manuel of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: ASM Press; 1995. pp. 86–71.
73. Mattick JS. Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 2002; **56**: 289–314.

74. Mazzola PG, Martins AMS, Penna TCV. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. *BMC Infect Dis* 2006; **6(131)**: 1-11.
75. Mena KD, Gerba CP. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 2009; **201**: 71-115.
76. Molina DN, Colón M, Bermúdez RH, Ramírez-Ronda CH. Unusual presentation of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a review. *Bol Asoc Med P R* 1991; **83(4)**: 160-163.
77. Moore SL, Payne DN. Types of antimicrobial agents. İçinde Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editörler. *Principles and Practice of Disinfection Preservation Sterilization*. 4. ed. USA: Blackwell Publishing; 2004. pp. 8-98.
78. Morici LA, Carterson AJ, Wagner VE, Frisk A, Schurr JR, Höner zu Bentrup K ve ark. *Pseudomonas aeruginosa* algR represses the rhl quorum-sensing system in a biofilm-specific manner. *J Bacteriol* 2007; **189**: 7752–7764.
79. Nakipoğlu Y, Gürler B. Çeşitli dezenfektan ve antiseptik maddelerin antibakteriyel etkinliğinin araştırılması. *ANKEM Derg* 2004; **18(4)**: 220-223.
80. Nickel JC, Gristina AG, Costerton JW. Electron microscopic study of an infected Foley catheter. *Can J Surg* 1985; **28(1)**: 50-54.
81. Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol* 2001; **183**: 1047–1057.
82. O'Toole GA, Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 1998; **30(2)**: 295–304.
83. Ochsner UA, Fiechter A, Reiser J. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa* *rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 1994; **269**: 19787–19795.

84. Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1994; **176**: 2044–2054.
85. Ochsner UA, Reiser J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 6424–6428.
86. Ohta S, Misawa Y, Miyamoto H, Makino M, Nagai K, Shiraishi T, Nakagawa Y, Yamato S, Tachikawa E, Zenda H. A comparative study of characteristics of current-type and conventional-type cationic bactericides. *Biol Pharm Bull* 2001; **24(9)**: 1093-1096.
87. Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007; **189**: 2531–2539.
88. Parsek MR, Tolker-Nielsen T. Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr Opin Microbiol* 2008; **11**: 560–566.
89. Passador L, Cook JM, Gambello MJ, Rust L, Iglewski BH. Expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes requires cell-to-cell communication. *Science* 1993; **260**: 1127–1130.
90. Pearson JP, Pesci EC, Iglewski BH. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *J Bacteriol* 1997; **179**: 5756–5767.
91. Pearson JP, van Delden C, Iglewski BH. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* 1999; **181**: 1203–1210.
92. Pedersen SS, Kharazmi A, Espersen F, Høiby N. *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis sputum and the inflammatory response. *Infect Immun* 1990; **58**: 3363-3368.
93. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Evaluation of the efficacy of disinfection procedures against *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *J Hosp Infect* 2008; **70(4)**: 361-368.

94. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 801-809.
95. Pesci EC, Milbank JBJ, Pearson JP, McKnight S, Kende AS, Greenberg EP, Iglewski BH. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 11229–11234.
96. Peterson PK. Host defense against *Pseudomonas aeruginosa*. İçinde Sabath LD, editör. *Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes, and their treatment*. Bern: Hans Huber Publishers; 1980. p. 103.
97. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa*: a key problem in cystic fibrosis. *ASM News* 1998; **64**: 339–347.
98. PierGB. Role of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in innate immunity to *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97(16)**: 8822–8828.
99. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. İçinde Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editörler. *In principles and practices of infectious diseases*. New York, NY: Churchill Livingstone; 1995. pp. 1673–1691.
100. Price D, Ahearn DG. Incidence and persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in whirlpools. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 1650-1654.
101. Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**: 4457–4464.
102. Ramsey DM, Wozniak DJ. Understanding the control of *Pseudomonas aeruginosa* alginate synthesis and the prospects for management of chronic infections in cystic fibrosis. *Mol Microbiol* 2005; **56(2)**: 309–322.
103. Rashid MH, Kornberg A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97(9)**: 4885–4890.

104. Rashid MH, Rumbaugh K, Passador L, Davies DG, Hamood AN, Iglewski BH, Kornberg A. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97(17)**: 9636–9641.
105. Reybrouck G. Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of disinfectants. İçinde Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editörler. *Principles and Practice of Disinfection Preservation Sterilization*. 4. ed. USA: Blackwell Publishing; 2004. pp. 220-241.
106. Rhame FS. The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa*. İçinde Sabath LD, editör. *Pseudomonas aeruginosa the organism, diseases it causes, and their treatment*. Bern: Hans Huber Publishers; 1980. p. 31.
107. Russell AD. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents İçinde Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY, editörler. *Principles and Practice of Disinfection Preservation Sterilization*. 4. ed. USA: Blackwell Publishing; 2004. pp. 98-128.
108. Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol* 2007; **10**: 644–648.
109. Sakuragi Y, Kolter R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2007; **189(14)**: 5383–5386.
110. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 2002; **184(4)**: 1140-1154.
111. Schaefer AL, Hanzelka BL, Parsek MR, Greenberg EP. Detection, purification, and structural elucidation of the acylhomoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Methods Enzymol* 2000; **305**: 288–301.
112. Shapiro JA. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annu Rev Microbiol* 1998; **52**: 81–104.
113. Shirtliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem Biol* 2002; **9**: 859-871.

114. Shrouf JD, Chopp DL, Just CL, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Mol Microbiol* 2006; **62**: 1264–1277.
115. Smith K, Hunter IS. Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol* 2008; **57**: 966–973.
116. Squier C, Yu VL, Stout JE. Waterborne Nosocomial Infections. *Curr Infect Dis Rep* 2000; **2**: 490-496.
117. Stanley MM. *Bacillus pyocyaneus* infections. A review report of cases and discussion of never therapy including streptomycin. *Am J Med* 1947; **2**: 253.
118. Stapper AP, Narasimhan G, Ohman DE, Barakat J, Hentzer M, Molin S ve ark. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 679–690.
119. Sutton SVW, Proud DW, Rachui S, Brannan DK. Validation of Microbial Recovery From Disinfectants. *PDA J Pharm Sci Technol* 2002; **56(5)**: 255-266.
120. Tote K, Horemans T, Vanden Berghe D, Maes L, Cos P. Inhibitory effect of biocides on the viable masses and matrices of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2010; **76**: 3135-3142.
121. Toutain CM, Caiazza NC, O'Toole GA. Molecular basis of biofilm development by Pseudomonads. İçinde Ghannoum M, O'Toole GA, editörler. *Microbial biofilms*. USA: ASM Pres; 2004. pp.43-63.
122. Türetgen İ, Çotuk A. Formation of bacterial biofilms in model recirculating water system, Journal of Environmental Micropaleontology, Microbiology and Meiobenthology 2005; **2**: 136-142.
123. USP 29, NF 24. Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles. The United States Pharmacopeia (İnternette) Erişim 13.01.2009, http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c1227.html.

124. Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51(12)**: 4217–4224.
125. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; **295**: 1487.
126. Yoder JS, Hlavsa MC, Craun GF, Hill V, Roberts V, Yu PA, Hicks LA, Alexander NT, Calderon RL, Roy SL, Beach MJ. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events-United States, 2005-2006. *MMWR Surveill Summ*. 2008 Sep **12;57(9)**: 1-29.
127. Zobel CE. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *J Bacteriol* 1943; **46**: 39-56.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Emel	Soyadı	MATARACI
Doğ.Yeri	Şişli	Doğ.Tar.	03.06.1985
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	65140222798
Email	emelmataraci@yahoo.com	Tel	05325620219

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2010
Lisans	İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Şişli Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	2008-
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	İyi	63,750	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	81,303	82,253	82,116
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Ms Office	Çok İyi

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Kitap okumak, sinema ve tiyatroya gitmek.