

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**GÜMÜŞ KATKILI HİDROKSİAPATİTİN
BAZI DERİ İŞLENTİ BASAMAKLARINDA
KULLANILABİLİRLİĞİ VE ANTİMİKROBİYAL
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Meruyert KOİZHAİGANOVA

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gürbüz GÜLÜMSER

İkinci Danışmanı: Doç. Dr. İhsan YAŞA

Deri Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 501.11.01

Sunuş Tarihi: 12.03.2012

**Bornova-İZMİR
2012**

Meruyert KOİZHAİĞANOVA tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Gümüş Katkılı Hidroksiapatitin Bazı Deri İşlenti Basamaklarında Kullanılabilirliği ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 12.03.2012 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Gürbüz GÜLÜMSER

Raportör Üye : Doç. Dr. Mehmet Mete MUTLU

Üye : Yrd. Doç. Dr. İrfan CİRELİ

Üye : Doç. Dr. Ali Nail YAPICI

Üye : Doç. Dr. Ahmet ASLAN

ÖZET**GÜMÜŞ KATKILI HİDROKSİAPATİTİN BAZI DERİ İŞLENTİ
BASAMAKLARINDA KULLANILABİLİRLİĞİ VE
ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

KOİZHAİGANOVA, Meruyert

Doktora Tezi, Deri Mühendisliği Bölümü
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gürbüz GÜLÜMSER
İkinci Danışmanı: Doç. Dr. İhsan YAŞA

Mart 2012, 128 sayfa

Bu araştırmada mikrodalga yöntemiyle üretilmiş gümüş (Ag) katkılı hidroksiapatit (HA) ayakkabı astarlık deri üzerine uygulanmış ve antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. Elde edilen hidroksiapatit çözeltisindeki gümüş miktarı Endüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir. Çok amaçlı X-ışını Difraktometresi (XRD), X-ışını Floresans Spektrometresi (XRF), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) ve Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM-EDS) cihazları kullanılarak materyalin fiziksel, kimyasal ve yapısal özellikleri ortaya konulmuştur. % 0 – 5 oranında gümüş içeren hidroksiapatit çözeltileri pistole yöntemi ile 1:1:1 oranlarda (HA:lak:su) finisaj karışımı içinde ve toplam hacim üzerinden %5 penetratör eklenerek deri örneklerinin cilt yüzeyine uygulanmıştır. Daha sonra deri örnekleri kurutma ve ütü işleminden geçirilerek kaplama filmleri elde edilmiştir. (% 0 – 5) Gümüş katkılı hidroksiapatit uygulanan derilerdeki gümüş miktarı ICP-OES cihazında belirlenmiş ve derilerin yapısal ve yüzeysel özellikleri SEM, FTIR, Raman cihazlarıyla incelenmiştir.

Broth Mikrodilüsyon yöntemi ile Ag katkılı hidroksiapatitin test mikroorganizmalara karşı etkin konsantrasyonu (MIC değeri) belirlenmiştir. Kontrol ve (% 0 – 5) Ag katkılı hidroksiapatit uygulanan derilerin antimikrobiyal özellikleri Agar yayma, Paralel çizgi (nitel), Bakteri sayısındaki % azalma (nicel) ve Küf gelişimi direnci testleri ile mukayese edilmiştir. Denemelerde, *Escherichia coli* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P bakterileri, funguslardan *Candida albicans* ATCC 10239, *Aspergillus niger* TEM ve *Trichoderma viride* TEM test mikroorganizmaları olarak incelenmiştir. Araştırma sonucunda % 2 ve

üzeri oranda Ag içeren hidroksiapatit ile muamele edilen derilerin iyi bir antimikrobiyal özelliğe sahip oldukları tespit edilmiş ve Ag katkılı hidroksiapatitin deride antimikrobiyal madde olarak kullanılabilirliği net biçimde ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: Gümüş katkılı Hidroksiapatit, Astarlık deri, Kaplama filmi, Antimikrobiyal aktivite

ABSTRACT**USABILITY OF SILVER DOPED HYDROXYAPATITE
IN SOME LEATHER PROCESS STEPS AND
INVESTIGATION OF ITS ANTIMICROBIAL EFFECTS**

KOIZHAIGANOVA, Meruyert

Ph.D in Leather Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Gürbüz GÜLÜMSER

Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. İhsan YAŞA

March 2012, 128 pages

In this study, silver doped hydroxyapatite produced by microwave method was applied as antimicrobial agent on shoe lining leather and its antimicrobial effect was investigated. Silver (Ag) content in the hydroxyapatite (HA) obtained was confirmed by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). By using X-ray Diffraction (XRD), X-ray Fluorescence Spectrometer (XRF), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Scanning Electron Microscope (SEM-EDS) devices physical, chemical and structural properties of the material have been determined. HA solutions containing 0 – 5 % of Ag in a finishing mixture with 1:1:1 ratio of HA: lacquer: water and penetrator (5 % of total volume) were applied on the surface of the leather samples by spraying. After that, the leather samples were passed through drying and ironing processes to obtain coating films. Silver content in the (0 – 5 %) Ag doped hydroxyapatite treated leather samples were determined by ICP-OES, structure and surface characteristics of the leathers were investigated by SEM, FTIR and Raman equipments.

After determining the effective concentrations (MIC value) to microorganisms tested, antimicrobial properties of the control leather samples and the (0 – 5 %) Ag doped hydroxyapatite treated samples were compared by (qualitative) Agar spread and Parallel steak, (quantitative) Percentage of bacterial reduction and Mold growth resistance tests. In the experiments, the following test microorganisms: *Escherichia coli* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P, as bacteria and *Candida albicans* ATCC 10239, *Aspergillus niger*

TEM ve *Trichoderma viride* TEM as fungi were studied. According to the results of the study, the leather treated with Ag doped hydroxyapatite containing 2 % and above amount of silver showed strong antimicrobial activity and it was decided about possible usability of Ag doped hydroxyapatite as antimicrobial agent on lining leathers.

Keywords: Silver doped hydroxyapatite, Shoe lining leather, Coating film, Antimicrobial activity

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen, bilgi birikimini, tecrübesini ve değerli zamanını paylaşan Sayın danışman hocam Prof. Dr. Gürbüz GÜLÜMSER, ikinci danışman hocam Sayın Doç. Dr. İhsan YAŞA'ya sonsuz teşekkürümü sunarım. Bu çalışma süresince bilimsel katkılarını gördüğüm ve kıymetli görüşlerinden yararlandığım değerli Yrd. Doç. Dr. İrfan CİRELİ ve emekli bölüm başkanımız sayın Prof. Dr. Özcan SARI hocalarıma, önerileri ve yardımları ile yanımda bulunan sevgili ablama teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Ayrıca, destek ve katkılarından dolayı başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Altan AFŞAR olmak üzere, Doç. Dr. Bahri BAŞARAN'a, Doç. Dr. Hasan ÖZGÜNAY'a, Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Ata KARAVANA'ya, Dr. Nuray Olcay IŞIK'a, Dr. Natsag LKHAGVAJAV'a, uzmanlar Dr. Deniz KALENDER'e ve Mete SAĞLAM'a, ve katkısı olan tüm Deri Mühendisliği bölümü öğretim üyeleri, öğretim görevlileri, kimyagerler, personeline ve arkadaşlarıma da teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğüne teşekkür ederim.

Ayrıca, her konuda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, eğitim süresince beni sabır ve anlayışlarıyla bekleyen ve her zaman kalbimde olan sevgili aileme en içten şükranlarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	v
ABSTRACT	vii
TEŞEKKÜR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xx
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ayak Sağlığı ve Ayakkabı	4
2.1.1. Ayak enfeksiyonları	6
2.1.2. Ayakkabılık astarlık deri	10
2.2. Deride Karşılaşılan Mikroorganizma Türleri.....	13
2.2.1. Test mikroorganizmalar yapısı ve özellikleri.....	16
2.3. Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları	27
2.3.1. Antimikrobiyal maddeler	27
2.3.2. Antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmaları etkileme modelleri	28
2.3.3. Antimikrobiyal seramikler	30

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	37
3.1. Deride Antimikrobiyal Çalışmalar	37
3.2. Metal İyonu Katkılı Kalsiyum Fosfat Uygulamaları.....	41
4. MATERYAL VE YÖNTEM	45
4.1. Materyal	45
4.1.1. Deri materyali	45
4.1.2. Kimyasal maddeler	45
4.1.3. Test mikroorganizma kültürleri	45
4.2. Yöntem	46
4.2.1. Gümüş katkılı hidroksiapatit çözeltilerinin hazırlanması	47
4.2.2. Gümüş katkılı hidroksiapatit karakterizasyonu	47
4.2.3. Hidroksiapatitin deriye uygulanması.....	51
4.2.4. Hidroksiapatit uygulanan derilerin karakterizasyonu.....	52
4.2.5 Mikrobiyolojik analizler	55
5. BULGULAR VE TARTIŞMALAR	59
5.1. Hidroksiapatit Karakterizasyonuna Ait Bulgular	59

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

5.1.1. X-ışını Difraksiyonu analizine ait bulgular	59
5.1.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDS) analizine ait bulgular...	62
5.1.3. X-ışını Floresans (XRF) spektrometresi analizine ait bulgular.....	67
5.1.4. ICP-OES analizine ait bulgular	68
5.1.5. FTIR analizine ait bulgular	70
5.2. Deri Karakterizasyonuna Ait Bulgular	74
5.2.1. Derinin yüzey morfolojisine ait bulgular	74
5.2.2. Derinin gümüş içeriğine ait bulgular.....	78
5.2.3. Derinin FTIR analizine ait bulgular	79
5.2.4. Derinin Raman analizine ait bulgular.....	81
5.3. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları	84
5.3.1. MIC değeri sonuçları.....	86
5.3.2. Agar yayma testi sonuçları.....	87
5.3.3. AATCC 147 testi sonuçları	91
5.3.4. % Azalma AATCC 100 testi sonuçları	94
5.3.5. ASTM D 4576-08 testi sonuçları	97

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	106
KAYNAKLAR DİZİNİ	108
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>E. coli</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	19
2.2. <i>S. aureus</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	21
2.3 <i>C. albicans</i> 'ın taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	23
2.4 <i>A. niger</i> 'in taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	24
2.5 <i>Trichoderma</i> 'nın petri kabında geliştirilmiş bir görüntüsü	26
2.6 Kalsiyum hidroksiapatit yapısı	32
3.1 Ag'li yüzeyin sır bünyesindeki etkisi	42
3.2 Antibakteriyel sırlı geleneksel vitrifiye ürünü.....	43
4.1 HAP çözeltilerinin üretimi ve deriye uygulanmasına ilişkin genel akış şeması	46
4.2 X-ışınları Difraksiyonu (XRD) cihazı	48
4.3 Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dispersif Spektrometre cihazı ...	49
4.4 X-ışını Floresans Spektrometresi cihazı.....	50
4.5 Endüktif Eşleşmiş Plazma – Optik Emisyon Spektrometre cihazı.....	50
4.6 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi cihazı.....	51
4.7 Isıtmalı yakma ünitesi.....	53
5.1 Saf HAP ve % 0.5-5 Ag katkılı HAP'ın XRD sonuçları.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.2 HAP tozlarının SEM görüntüleri	64
5.3 HAP örneklerinin EDS görüntüleri.....	67
5.4 HAP örneklerindeki Ag miktarları.....	69
5.5 Saf HAP ve % 0.5-5 Ag katkılı HAP'in IR spektrumları	71
5.6 HAP kafesindeki Ca'un Ag iyonu ile yer değiştirmesinin şematik görüntüsü.....	73
5.7 Kontrol deri örneği (işlem görmemiş) ve % 0-5 Ag-HAP ile işlem görmüş deri örneklerinin SEM görüntüleri	77
5.8 Ag-HAP uygulanan derilerdeki Ag miktarları.....	79
5.9 Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin FTIR spektrumları.....	80
5.10 Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin Raman spektrumları	83
5.11 Saf HAP ve % 0.5-5 aralığında Ag-HAP çözeltilerinin MIC değerlerinin belirlendiği mikropate görüntüleri	85
5.12 Derilerin <i>E. coli</i> 'ye karşı agar yayma test sonuçları	88

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
5.13. Derilerin <i>S. aureus</i> 'a karşı agar yayma test sonuçları	89
5.14. Derilerin <i>C. albicans</i> 'a karşı agar yayma test sonuçları	90
5.15. Derilerin <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> ve <i>S. typhimurium</i> 'e karşı AATCC 147 testi sonuçları	92
5.16. Derilerin <i>C. albicans</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>B. subtilis</i> ve <i>E. faecalis</i> 'e karşı AATCC 147 testi sonuçları	93
5.17. Derilerin <i>T. viride</i> fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 3. gün sonuçları.....	99
5.18. Derilerin <i>T. viride</i> fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 7. gün sonuçları.....	100
5.19. Derilerin <i>A. niger</i> fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 3. gün sonuçları.....	102
5.20. Derilerin <i>A. niger</i> fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 7. gün sonuçları.....	103

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Ciddi diabetik ayak enfeksiyonlarında etken bakteriler (%).....	7
2.2. Kültürde üreyen mikroorganizmalar	8
4.1. ICP-OES'deki enstrumental analiz koşulları	63
5.1. XRF analizi sonuçları	68
5.2. Hidroksiapatite doplanan gümüş miktarı	68
5.3. % 0-5 Ag katkılı HAP'in FTIR spektrumlarında gözlenen fonksiyonel gruplar	71
5.4. % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerdeki hesaplanan ve ölçülen gümüş miktarları	78
5.5. Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin FTIR spektrumlarında gözlenen fonksiyonel gruplar.....	81
5.6. Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin Raman spektrumlarında gözlenen fonksiyonel gruplar	83
5.7. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltilerinin gram-negatif bakterilere karşı MIC değerleri (µg/ml)	85
5.8. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltilerinin gram-pozitif bakteriler ve <i>C.albicans</i> 'a karşı MIC değerleri (µg/ml)	86

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
5.9. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltileri uygulanan derilerin <i>E. coli</i> 'ye karşı % azalma test sonuçları	95
5.10. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltileri uygulanan derilerin <i>S. aureus</i> 'a karşı % azalma test sonuçları	95
5.11. Derilerin <i>T. viride</i> fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testi sonuçları.....	104
5.12. Derilerin <i>A. niger</i> fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testi sonuçları.....	104

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	santigrat derece
pH	hidrojen konsantrasyonunun kologaritması
µm	mikrometre
nm	nanometre
M	molarite
g	gram
µg	mikrogram
mg	miligram
ml	mililitre
CFU	koloni oluşturan birim
ppm	toplam madde miktarının milyonda bir birimlik kısmı

Kısaltmalar

Ag	Gümüş
HAP	Hidroksiapatit
TCP	Trikalsiyum fosfat
TCMTB	2-(Thiocyanomethylthio) benzothiazole
MIC	Minimum inhibe edici konsantrasyon
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
MHA	Müller Hinton Agar
MHB	Müller Hinton Broth
UV	Ultraviyole
USEPA	United States Environmenal Protection Agency
DNA	Deoxyribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid

1. GİRİŞ

İnsanoğlu varolduğu andan itibaren sürekli olarak kendine yarar sağlayacak nesnelerin arayışı ve bu nesneleri keşfetme çabasında olmuştur. Daha ilk çağlarda hayvanları avlayarak gıda ihtiyaçlarını karşılamışlar ve sonra da tabiat şartlarından korunmak için deri ve kürklerinden yararlanmışlardır.

Deri endüstrisinin temel ham maddesi avlanan ve beslenen hayvanların yüzülmesi ile elde edilen ham derilerdir. Ham deri hayvanın sırtından yüzüldüğü andan itibaren mikroorganizmaların tehdidi altındadır. Çeşitli konserveleme yöntemleri ile korunmaya çalışılan deriler, deri üretim prosesleri sırasında da mikroorganizma faaliyetleri ile karşı karşıya kalırlar (Sarı, 2003).

Biyolojik materyal olmalarından dolayı ham derilerin yüzüldükten hemen sonra kullanılması mümkün olmamakta ve bazı özelliklerinin iyileştirilmesi için kimyasal ve fiziksel bazı işlemlere tabi tutulması gerekmektedir. Farklı özelliklerde kullanılabilir ve farklı kullanım alanlarına yönelik faydalı bir ürün elde etmek için tabaklama işlemi yapılmaktadır.

Tabaklama deri teknolojisinin temel işlemi olarak kabul edilmektedir. Tabaklama işleminde bitkisel tanenler, mineral ve sentetik tabaklayıcılar gibi farklı tabaklayıcı özelliğe sahip maddeler kullanılabilir. Tabaklama işleminden sonra deri yarı mamul hale getirilmiş olur, istendiği zaman yağlama işlemi uygulanarak deri krast halinde saklanabilir veya boyama, yağlama, retenaj ve finisaj işlemleri yapılarak mamul hale getirilir.

Çok fazla kullanım alanına sahip olan deri, günlük hayatta insanların karşısına çok farklı şekillerde çıkabilmektedir. Kimi zaman bir giysi ya da ayakkabı, kimi zaman çanta-cüzdan kimi zaman ise koltuk kaplaması olarak rastlamaktayız.

Mukavemet özellikleri, hava ve su buharı geçirgenliği, uzama ve form tutma özelliği gibi üstün kullanım özelliklerinden dolayı deri, giysilik ve ayakkabı yapımında vazgeçilmez doğal bir materyaldir. Deri materyali her yaşta insanların her çeşit ayakkabı modelinde kullanılmaktadır. Dolayısıyla, ayakkabılık deri özelliklerinin ve kalitesinin iyileştirilmesi konusu şüphesiz önem taşımaktadır. Uzun süre ayakla temas eden ayakkabı; ter, nem ve sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmaların hayat bulmaları için

iyi bir ortam oluşturur. Bu ortamda gelişen mikroorganizmalar ayakta koku, mantar ve diğerk hastalıkların oluşmasına zemin hazırlar. Bu oluşumları engelleyici özellikte deri ayakkabı kullanımı ayak sağığı bakımından son derece önemlidir.

Günümüzde dünya ticaretinin hızlı bir şekilde gelişmesi, uluslar arası platformda ticari ilişkilerin önem kazanması ve ülkelerin ekonomik güçlerinin önemli ölçüde ihracata bağılı hale gelmesi, dünya genelinde oldukça yoğun bir rekabet ortamı yaratmıştır. Ülkeler bu rekabet ortamında ekonomilerini ayakta tutabilmek için pazar paylarını artırma çabası içine girmişler ve buna bağılı olarak da üretimde birinci planda tüketici taleplerini dikkate almaya başlamışlardır.

Giderek sağıık bilinci artan tüketiciler ayakkabı üreticilerinden ayakkabıda antimikrobiyal özelliklerin bulundurulmasını talep etmektedirler. Ayakkabılık deri materyalleri içine mikroorganizmalara karşı aktif ajanların ilave edilmesi sadece konfor ile ilişkili olmayıp aynı zamanda giyim fizyolojisi ve sağıık ile de ilgilidir. Diğerk taraftan antimikrobiyal ajanlar, ayakkabıda terleme sonucu bakteriyel bozunmadan dolayı oluşan istenmeyen koku ve ayakkabıdaki nemden kaynaklanan mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek amacı ile de kullanılmaktadır (Wuertz, 2006). Deri üretiminde antimikrobiyal özellik kazandıran birkaç yöntem ve/veya ajan (izothiazolinon ve TCMTB) bilinmektedir, fakat bunların çoğı insan sağıığı için zararlıdır ve mikroorganizma sayılarını belirli bir düzeeye kadar azaltabilmektedir (Dean and Stephen, 1999).

Gümüş (Ag) ve gümüş iyonlarının güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğı uzun zamandan beri bilinmekte olup, mikroorganizmalar üzerindeki inhibitör etkisi birçok araştırmacı tarafından araştırılmaktadır. Gümüş, DNA moleküllerine etki ederek mikroorganizmaların çoğalma yeteneklerini kaybetmelerini ve bakteriyel proteinlerdeki –SH gruplarıyla etkileşerek onların inaktif olmalarını sağılamaktadır (Kim et al., 1998). Güçlü bir antimikrobiyal etkiye sahip olmasının yanında toksik etki göstermemesi nedeniyle gümüş iyonları, günlük hayatta sürekli kullanılan ve mikroorganizmaların yoğun olarak bulunduğı birçok malzeme yüzeyinin (seramik, cam, fayans, plastik, kağıt, boya, tekstil vs) üretimleri sırasında veya daha sonra kaplamada kullanılan materyallerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (Kawashita et al., 2000).

Yapılan literatür taramalarında doğrudan gümüş katkılı hidroksiapatitin herhangi bir deri işleminde kullanımı ile ilişkili kaynaklara rastlanmamıştır. Bu

nedenle deri materyaline yakın ve konu ile ilgisi olan bazı literatürler incelenmiş ve uygun görülenlerden yararlanılmaya çalışılmıştır.

Gümüş katkılı hidroksiapatitin (Ag-HAP) mikroorganizmalara karşı bazı tekstil materyallerinde başarı ile uygulandığı yakın zamanlarda bildirilmiştir. Bununla beraber hidroksiapatitin deri ve deri mamullerindeki uygulamasının henüz tam olarak araştırılmadığı ve bazı çalışmaların ise henüz başlangıç aşamasında olduğu literatür taramalarından anlaşılmaktadır.

Bu araştırmada, gümüş katkılı hidroksiapatitin antimikrobiyal madde olarak deri kaplamasında kullanımıyla, bakteri ve fungus oluşumunu engelleyecek özellikte ayakkabı astarlık derilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu özellikte deri ayakkabı kullanımı insan sağlığı için son derece önem taşımaktadır ve her tür deri ayakkabıda uygulanabilirliği söz konusu olacağından geniş bir kullanım kitlesine hitap edebilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ayak Sağlığı ve Ayakkabı

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından bedensel, ruhsal ve sosyal yönden tam bir iyilik hali olarak tanımlanan “sağlık” kavramını etkileyen üç temel unsur; insan, hastalık yapıcı etmenler ve çevredir. İnsanın dışındaki her şey olarak nitelendirilen, içinde yaşadığımız çevre, hastalıklara yol açan en önemli etkenlerin başında gelen mikroorganizmalar ile her an temasta bulunduğumuz ortamdır (Akdur vd., 1998).

Günümüzde yaşam koşullarının değişmesi ve bireylerin zamanlarının çoğunu ev dışında geçirmeleri, değişen beslenme alışkanlıkları ve ulaşım olanakları, uluslar arası ziyaretler gibi faktörler, mikroorganizmaların, toplu yaşam alanlarında kolayca bireyden bireye geçişine ve bulaşıcı hastalıkların artmasına neden olmaktadır. Mikroorganizma miktarı belli oranın üzerine çıktığı takdirde kişisel ve çevresel özelliklere bağlı olarak değişik şiddetlerde bulaşıcı hastalıklara hatta salgınlara (epidemilere) yol açabilmektedir. Toplumun sağlıklı olabilmesi için toplumu oluşturan bireylerin sağlıklarının korunması gerekmektedir. Bu nedenle, yaşadığımız mekanlarda, çalıştığımız ortamlarda ve kullandığımız ürünlerde hijyenin sağlanması, yani hastalık oluşturabilecek mikroorganizmalardan arındırılması günlük yaşamımızda giderek önem kazanmaktadır (Üçışık, 1994).

Sağlıklı ayaklar için en önemli unsur ayakkabıdır. Vücudumuzun yerle temas eden son noktası, bütün ağırlığımızı taşıyan ayaklar için rahat ve güvenli ayakkabı seçimi sağlık açısından dikkat edilmesi gereken en önemli husustur.

İnsanın tüm yükünü taşıyan organlardan biri olan ayaklar, vücudumuzun en çok hasara uğrayabilecek kısımlarındandır. Ayaklar, çalışma koşullarına ve spor vb. etkinliklere bağlı olarak oldukça yüksek basınçlara maruz kalmakta ve normal yaşam koşullarında bile her gün yeterince zorlanmaktadır. Örneğin, yapılan sporun cinsine bağlı olmakla birlikte, spor yaparken beden ağırlığının 3-4 katı fazlası yük ayaklara binmektedir. Bu nedenle, ayak sağlığına gereken duyarlılık gösterilmeli ve ayakları korumak için amaca uygun ayakkabılar giyilmelidir.

Ayakkabı tercihi ayak sağlığı için çok önemlidir. Sağlıklı ayağın olmazsa olmaz şartı, kullanılan ayakkabının kalitesi ve ayağa uyumudur. Günümüzde

tüketiciler bilinçlenmiş ve farklı özelliklerin yanı sıra antimikrobiyal ayakkabılar da talep etmektedirler. Standartlara uygun kaliteli ürün ve hizmet talep eden bilinçli tüketici, haklarını arama konusunda duyarlı davranmakta ve organize bir şekilde üreticiler üzerine baskı oluşturabilmektedir. Ülke içinde giderek bilinçlenen tüketici isteklerini karşılamak, iç ve dış piyasada rekabet edebilmek için kuruluşlar kaliteye önem vermek durumundadırlar (Türker, 2010).

Bilindiği üzere, ayakkabı ayağı; sivri cisimlerden, darbelerden, basınçlardan, soğuktan, sıcaktan, yağmurdan vs. iklim şartlarından korur. Fakat, “Ayağı ayakkabıdan nasıl korumalı?” sorusunu hiç düşündünüz mü? Mr. William Rossi “Footwear News” gazetesinde bu soruyu şu şekilde açıklamaktadır; “Bir damla saf suyu ayakkabının içine bırakalım, daha sonra mikroskopta incelediğimizde, binlerce mikroorganizmanın sağa sola kaçıştığını görürüz”. Bu demektir ki “Ayakkabının içindeki çevre, dış çevreye nazaran daha saldırgandır”. Sıcaklık, nem, ve ayakkabının içindeki ortam, bakterilerin en çok sevdiği koşullardır.

Bu koşullar sırası ile incelendiğinde; normal ayak sıcaklığı 34°C’dir. Normal şartlarda ayakkabı içinde sıcaklık 41°C civarındadır. Sıcak ve nemli havalarda, spor veya koşma gibi aktivitelerde 43-46°C arasındadır. Ayakkabı sıkı ve dar, ayrıca suni deri astar ile üretilmişse sıcaklık 49°C’ye ulaşmaktadır. Ayak tabanı her adımda fren yapar, ayak içeride kayarak ayakkabının iç tabanına sürtünür. Normal olarak günde 8000 adım attığımız düşünülürse, ayakkabı içinde yüksek ısı oluşur. Isı ayağı şişirmekte ve hacmi %5 artırmaktadır, ve böylece ayakta rahatsızlığa sebep olmaktadır.

Terleme, çeşitli nedenlere göre değişiklik gösterir. Bunlar: Yaş-cinsiyet-aktivite (spor)-ayak-ayakkabı uyumu-malzeme vs. Ayakta bir inç karede ortalama 3000 adet ter bezi mevcuttur. Böylece bir çift ayakta 180000 adet ter bezi vardır. Bir çift ayak, ortalama günde 0.5 litre ter üretir. Başka bir hesaplama, bir çift ayak yılda 180 litre ter üretir. Böylece ter ve ısı bileşimi neticesinde ayakkabının içinde nem oluşur. Nemin % 60’ı mokasen ayakkabılarda, % 30’u bağcıklı ayakkabılarda dışarı kaçar. Terin % 98’i su, % 2’si tuz ve asitten oluşur (Ünal, 2010).

İstirahat halinde bir ayaktan günde 72 ml kadar ter atılmaktadır. İnsan derisinden salgılanan ter taze haldeyken hafif asidik karakterlidir ve pH değeri 5.2-7 arasındadır. Bu hafif asidik karakter taşıyan taze ter içinde bulunan üre, üreaz enziminin yardımı ile parçalanır ve amonyak açığa çıkar. Böylece ter alkalik

karakter kazanarak pH seviyesi 9'a kadar yükselir. Teri oluşturan bileşiklerden üre, derideki bitkisel tabaklama maddeleri üzerinde doğrudan doğruya çözücü etki yaparak tabaklamanın bozulmasına sebep olabilir. Ayrıca terin parçalanması sırasında açığa çıkan alkali ortam, deri üzerine daha da önemli rol oynamaktadır. Lif dokusu, alkali ortam ve ayakkabı içerisinde meydana gelen sıcaklık, rutubetin etkisiyle daha fazla zarar görmekte ve derinin kırılgan hale gelmesine yol açmaktadır (Sarı, 2000).

Yukarıdaki nedenler, ayağa ve ayakkabıya zarar verir. Erişkin bir insanın vücudunda 10 trilyon mikroorganizma bulunur. Bir çift ayakta ise 2 trilyon mikroorganizma bulunmaktadır (Ünal, 2010). Ayakkabının içi genellikle temizlenemediğinden bu mikroorganizmalar hızla çoğalır ve problemlere yol açarlar. Neticede ayakta cilt problemlerine ve enfeksiyonlara neden olurlar.

2.1.1. Ayak enfeksiyonları

Ayak enfeksiyonlarında olayın başlangıcı fark edilmeden tekrarlayan mikrotravmalar sonucu oluşan deri lezyonlarıdır. Bu lezyonla oluşan giriş kapısı, mikroorganizmaların cilt altına oradan da derin dokulara ulaşması ve yerleşmesine fırsat verir. Kas ve tendonların hareketleriyle enfeksiyon daha derinlere ilerler. Etken mikroorganizmalar hastanın kendi florasıdır. Lezyonlar klinik, cerrahi, radyolojik ve histopatolojik olarak üç gruba ayrılır.

1. *Düşük riskli, ekstremitayı tehdit etmeyen enfeksiyonlar:* İlk kez oluşan, tedavi görmemiş, enfeksiyonun deri ve deri altı dokuda sınırlı olup, kas dokusunun sağlam olduğu, sistemik toksisite ve iskemi bulgularının bulunmadığı, çapı 2 cm'yi geçmeyen selülit tipi enfeksiyonlar.

2. *Yüksek riskli, ekstremitayı tehdit eden enfeksiyonlar:* Kronik veya tekrarlayan, daha önce tedavi görmüş, kas ve/veya kemik dokuya ilerlemiş, nekrotik dokuların olduğu, iskemi bulgularının bulunduğu, çapı 2 cm'den büyük selülit ve lenfanjitle seyreden enfeksiyonlar.

3. *Ciddi, hayatı tehdit eden enfeksiyonlar:* İkinci grup bulgulara ek olarak, sistemik toksisite ve sepsis bulguları gösteren, genellikle geç kalmış olgulardır (Grayson, 1995).

Lezyonlarda Gram pozitif kok, Gram negatif basil ve anaerob bakteriler izole edilebilir. Ayak enfeksiyonlarında sıklıkla izole edilen bakteriler şu şekildedir:

- *Gram pozitif (+) koklar: Staphylococcus aureus, B grubu streptokoklar, enterokoklar, Staphylococcus epidermidis.*
- *Gram negatif (-) basiller: Escherichia coli, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniæ, Enterobacter ve Citrobacter türleri.*
- *Anaerob bakteriler: Bacteroides fragilis, Peptokoklar, Clostridium türleri, Prevotella melaninogenica (Grayson, 1995; Lipsky et al., 1990; West, 1995).*

Dünyada diyabetik hasta sayısı 100 milyonun üzerindedir ve bu sayının 2010 yılında 2 misli artması beklenmiştir. Tüm bu hastaların % 5-10'nun ayaklarında yaralar mevcut veya yaşamlarının bir döneminde oluşmaktadır. Ayak sorunları diyabetik hastaların en sık hastaneye başvuru nedeni, en sık hastanede yatma nedeni ve en uzun hastanede kalma nedenini oluşturmuştur (Açar, 2006).

Lipsky et al. (1990) hastane dışında tedavi edilen diyabetik ayak enfeksiyonları incelediği araştırmada olguların % 46'sında monomikrobiyal, % 47'sinde polimikrobiyal etken saptamışlar ve % 7 olguda üreme olmamıştır. Bu grupta olguların % 13'ünde etkenler arasında anaeroplarda yer almaktadır. Apse, osteomyelit, nekroz ile seyreden ağır enfeksiyonlardaki durumu yansıtan araştırma sonuçları Çizelge 2.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 2.1. Ciddi diyabetik ayak enfeksiyonlarında etken bakteriler (%)

	Wheat 1986	Bamberger 1987	Grayson 1995
Monomikrobiyal	29	16	16
Polimikrobiyal	69	84	80
Üreme olmayan	2	-	4
Sadece aerob	59	19	58
Aerop+anaerob	41	78	40
Sadece anaerob	-		2

Açar (2006)' ın yaptığı çalışmada 2002-2004 yıllarında Gözpete Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Cerrahi Kliniğinde diyabetik ayak nedeniyle yatarak tedavi gören 30'u (% 61.2) erkek 19'u (% 38.8) kadın olan toplam 49 hasta çeşitli değerleri göz önüne alınarak incelenmiştir. Hastalar içinde en yaşlısı 80 en genci 39 yaşındadır. Yaş ortalaması 61.4 olarak saptanmıştır. Hastalar kliniğe yatar yatmaz antibiyotiklere başlanmadan yara yerinden kültür antibiogram incelenmesi yapılmış ve bunun sonucunda üreyen mikroorganizmalar Çizelge 2.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.2. Kültürde üreyen mikroorganizmalar

Mikroorganizma	Sayı	%
MRSA (<i>S. aureus</i>)	11	22.4
MSSA (<i>S. aureus</i>)	9	18.4
<i>E. coli</i>	7	14.2
Proteus	5	10.2
Grup D streptokok	3	6.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	6.1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	4.2
Üreme yok	9	18.4

Ayak mantarı enfeksiyonu, dermatofitler denilen mantarlar tarafından yapılan enfeksiyondur (Crawford et al., 2001). Dermatofitler canlılarda deri, saç ve tırnakta enfeksiyon yapan keratinofilik mantarlardan olup *Epidermophyton*, *Microsporum* ve *Trichophyton* olmak üzere üç cinse ayrılmaktadır. *Microsporum* cinsi dermatofitler saç telleri ve kıllarda, *Epidermophyton* en fazla inguinal bölgede, *Trichophyton* türü dermatofitler ise deri, tırnak ve saçlı deride hastalık oluşturabilmektedir (Güdücüoğlu vd., 2006). Bununla birlikte *Trichophyton* türü dermatofitler, ayak tabanı ve parmak aralarında ayak mantarına sebep olan dermatofit cinsidir.

Mantar enfeksiyonu, vücudumuzda normalde hastalık yapmadan yaşayan mantarların, uygun ortam bulduklarında hızla çoğalıp, enfeksiyona neden olmasından kaynaklanmaktadır. Ayak mantarı, genellikle ergenlikten sonra en sık görülen, çok tekrar eden ve oldukça sık rastlanılan bir cilt hastalığıdır. Bu mantarlar nemli ve ılık bölgelerde üremektedirler. Ayak mantarı enfeksiyonları

bulaşıcıdır, direkt temasla veya aynı ayakkabının ortak kullanımı ile kişiden kişiye geçebilmektedirler (Stratigos et al., 1999).

Kaşınma, yanma, etkilenen bölgenin sızlaması, kızarıklık, içi su toplamış yaralara ve kabuklanıp dökülmelere sebep olan ayak mantarları zor iyileşebilir ve tekrarlama riski yüksek bir hastalıktır (Noble et al., 2001).

Tinea pedis, dermatofitlerin sebep olduğu ayak ve ayak parmaklarının fungal enfeksiyonudur. Aile içinde tüm ev halkına bulaşmaya eğilimlidir ve enfeksiyon var olduğu sürece bulaşıcıdır. Etken sıklıkla *Epidermophyton floccosum*, *T. rubrum* veya *T. mentagrophytes* 'tir. *Tinea pedis*'in en rahatsız edici semptomu ayak kokusu ve kaşıntıdır (Kuyucu, 2003).

Başta ayak mantarı olmak üzere ayak patolojileri genelde ergenlik çağından (veya 12 yaşından) itibaren yaşla birlikte artış göstermektedir (İnanır ve ark., 2002; Lange et al., 2004; Reichert et al., 2002). Sıklığının % 3-51 arasında değiştiği ve endüstrileşmiş ülkelerde yetişkin nüfusun yaklaşık % 15'inde görüldüğü ileri sürülen tanı konulmuş ayak mantarı olgularının yanı sıra toplumun % 25'inde tanı konulmamış (gizli) *Tinea pedis* patolojisinin olduğunu iddia eden araştırmalar bulunmaktadır (Lacroix et al., 2002). Yine ayak mantarı saptanan hastaların yarısından fazlasında (% 59) ayak tırnak mantarı da bulunduğu gözlenmiştir (Ogasawara et al., 2003). Ayak mantarı gelişiminde etkili olabileceği düşünülen birçok faktör bulunmakla birlikte, Ungpakorn et al., 2004 sadece ayakkabı tipinin ayak mantarı gelişiminde etkili olduğunu saptamışlardır.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı'na her yıl periyodik kontrol için müracaat eden 137 futbolcu yüzeysel mantar enfeksiyonu sıklığı ve subjektif şikayetler açısından 2000-2001 sezonu öncesi değerlendirilmiştir. Bu futbolcuların 38'inde (% 27.7) klinik makroskobik bulgu tespit edilmiştir. Makroskobik bulgusu olan 38 olgunun 17'sinde (çalışma grubunun %12.4'ü) mikolojik kültürde üreme gerçekleşmiştir. *Candida albicans* 8 (% 5.8) olguda, *Trichophyton rubrum* 7 (% 5.9) olguda ve *Candida parapsilosis* 1(% 0.7) olguda üremiş, *Malassezia furfur* 1 (% 0.7) olguda saptanmıştır. *Tinea pedis* sıklığı genel popülasyonda % 3-4 arasında değişirken futbolcularda da bu oran % 3 olarak bulunmuştur.

Sporcularda kronik terleme nedeniyle meydana gelen maserasyon, stratum korneumun bariyer fonksiyonunu bozmakta ve fungal enfeksiyonlara zemin

hazırlamaktadır. Ayak parmak arası bu duruma en yatkın bölgedir. Sporcularda sıcaklık, sürtünme, fiziksel temas, duş ve soyunma odalarının ortak kullanımı nedeniyle viral, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar sık görülmektedir (Ergün vd., 2001).

Oğur vd. (2005), yaptıkları bir araştırmada “Günlük ayakkabınızdan şikayetiniz var mı?” sorusuna katılımcıların % 43.0’ü evet cevabını vermiştir. Ayakların çok terlemesi ve ayak kokusu en sık şikayet konusudur. Kullanılan ayakkabıların rugan deriden imal edilmiş olması terleme ve dolayısıyla da ayak kokusunun açıklaması olabilir.

Ayak sağlığı için önemli faktörlerden biri malzeme seçimidir. Ayakkabı malzemelerinde binlerce kimyasal kullanılmaktadır. Bunlar cildi etkilemekte ve bazı problemlere neden olmaktadır. Özellikle kanserojen kimyasallar ile üretilen ayakkabı çocuklar için çok sakıncalıdır.

Yukarıda anlatılan sorunların üstesinden gelmek, ayak sağlığına maksimum faydayı sağlamak için ayakkabıya önem verilmeli, gerek üretim aşamasında, gerek malzeme seçiminde son derece titiz davranılmalıdır.

İdeal malzemeler, doğal malzemelerdir. Ayakkabı sayasında ve iç astarında kesinlikle hakiki deri kullanılmalıdır (Ünal, 2010).

Bir ayakkabı her gün giyilmemelidir. Mutlaka, iki üç gün giyildikten sonra birkaç gün dinlendirilmesi gerekmektedir. Çünkü ayaktaki ter, koku, ayakkabı derisinin yıpranmasına, aşınmasına neden olmaktadır.

Uzun süre ayakla temas eden ayakkabı; ter, nem ve sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle bakteri, mantar ve maya gibi mikroorganizmaların hayat bulmaları için iyi bir ortam oluşturur. Bu nedenle, ayakkabılık deri özelliklerinin ve kalitesinin iyileştirilmesi konusu şüphesiz önem taşımaktadır.

2.1.2. Ayakkabılık astarlık deri

Deri, doğanın en şık ve aynı zamanda en kullanışlı malzemelerinden biri olup, insan yapısına çok uygun doğal materyallerden biridir. Zamanla gelişen üretim yöntemleri sayesinde, deri; giyim, mobilya, aksesuar ve ayakkabı alanında

önemli yer tutmaktadır. Günümüzde lüks ürünler içinde yer alan deri, önemli sanayi dallarını oluşturacak kadar gelişmiştir.

Doğal bir materyal olan derinin, ayakkabılık saya ve astar olarak tercih edilme nedenleri; a) kullanım sırasında ayak hareketiyle uyum sağlayabilmesi b) yumuşaklığı c) çeşitli etkilere karşı gösterdiği dayanım d) giyim fizyolojisi ve hijyen açısından olumlu etkisi e) gerek ayakkabının üretiminde gerekse kullanımında ortaya çıkan pratiklik şeklinde sıralanabilir.

Astarlık deriler ham koyun ve keçi derilerinin türlü usullerle tabaklanmasından oluşan, tabii renkte ve boyanmış, ince yumuşak, elastiki, sırçası düzgün derilerdir. Genelde astarlık deri ifadesi ayakkabı iç yapısında kullanılan ve aynı zamanda ter derisi olarak kullanılan deriler için kullanılmaktadır.

Bitkisel ve krom ile tabaklanmış astarlık derilerin nem çekme, ter dayanımları, çekme dayanımı, dikiş yırtılma dayanımı, fleksometre (bükülme), çatlama-patlama dayanımı, hava geçirgenliği, aside karşı davranışları, yağ ve mineral içeriklerinin belli standartlarda olması istenmektedir.

Astarlık deri için çoğu zaman kalitesi düşük deri kullanılmaktadır. Genelde modaya dayalı olanlar hariç astarlık deride dış görünüme önem verilmemektedir. Örneğin sırça yapısı, sırça kusurları gibi özellikler yüzlük deriye nazaran daha az önem taşımaktadır. Bu şüphesiz fiyatlar ve masraflar ile ilgili bir durumdur. Özellikle astarlık derilerde mümkün olduğunca ucuz maliyete kaçılır. Bu yüzden astarlık deri üretiminde daha düşük kalitede ham madde satın alınmaktadır. Bazen de astarlık deri için diğer derilerin ucuz ikinci kaliteleri işlenmektedir. Örneğin bu amaç için chevro, chevrette, dana derisi, yarma ve benzeri deriler kullanılabilir. Astarlık deri üretiminde kullanılan ham deriler için ise küçükbaş deriler ve sığır derileri kullanıldığı gibi domuz ve beygir derileri de astarlık deri olarak işlenebilir, ancak en uygun deriler koyun ve keçi derilerinden elde edilir (Lkhagvajav, 2009).

Deri materyali her yaşta insanların her çeşit ayakkabı modelinde, örneğin çocuk ayakkabıları, spor ayakkabıları, işçi ayakkabıları, günlük ayakkabılar, askeri botlar gibi çok çeşitli modellerde kullanılmaktadır. Bu yüzden, ayakkabılık deri özelliklerinin ve kalitesinin iyileştirilmesi konusu şüphesiz önem arz etmektedir.

Yapılan araştırmalar yırtılmış ayakkabıların iç ve dış kısmında yüksek miktarda mikroorganizmaların (bakteri, dermatofit, maya ve küfün) bulunduğunu göstermiştir ki bu şüphesiz ayakkabı malzemesine antimikrobiyal uygulamaların gerektiğini ortaya koymaktadır. Antimikrobiyal finisaj uygulanıp satılan deriler hala mikroorganizmalara karşı şaşırtıcı düşük performanslar göstermektedirler. Bu da, antimikrobiyal maddelerin az miktarda kullanıldığından veya deriye doğru bağlanmadığından ya da derinin bu maddelerle doğru kaplanmadığından kaynaklanmaktadır (Wuertz, 2006).

Ayakkabılık deri materyalleri içine mikroorganizmalara karşı aktif ajanların ilave edilmesi sadece konfor ile ilişkili olmayıp aynı zamanda giyim fizyolojisi ve sağlıkla ilgilidir. Ayakkabı astarlık deri ayak cildine direk temas eder, bu nedenle antimikrobiyal ajan ilavesi ayakkabıda temiz çevre oluştırmada, mikroorganizmaların çoğalmasını kontrol etmede ve ayak cildi hastalıkları olasılığını azaltmada yardımcı olabilir.

Fakat uygulanan materyale zarar vermeksizin kısa sürede bakteri, mantar ve maya gibi tüm mikroorganizmaları öldürücü etkiye sahip bir ajanın seçilmesi, uygun konsantrasyonda kullanılması ve mikroorganizma ile kolayca temas edecek bir şekilde materyale uygulanması dikkat edilmesi gereken diğer önemli hususlardır (Dean and Stephen, 1999).

Burada en önemli amaç; finisajı yapılmış derilerin mikroorganizmalarla bulaşmasını, renginin herhangi bir değişikliğe uğramasını ve kalitesinin düşmesini önlemektir. Antimikrobiyal ajanlar, ayakkabıda terleme sonucu bakteriyel bozunmadan dolayı oluşan istenmeyen koku ve ayakkabıdaki nemden kaynaklanan mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek amacı ile kullanılabilir. Patojen mikroorganizmaların bulaşması söz konusu olduğuunda ‘Atlet Ayağı Hastalığı’ gibi enfeksiyonlar meydana gelebilmektedir. Bu nedenle antimikrobiyal ajanlar patojenlerin dağılmasını da engelleyebilmelidir (Wuertz, 2006).

Antimikrobiyal işlemler deri üzerine finisaj kaplaması gibi farklı şekillerde uygulanabilir. Deri malzemesi üzerine antimikrobiyal finisaj veya işlemlerin uygulanması çapraz enfeksiyonu önlemek veya kontrol etmek için yardımcı olabilir, ve mikrobiyal gelişmeyi durdurarak mamul ürünün kullanım süresini (raf ömrünü) uzatabilir. Ancak, tamamen farklı antimikrobiyal spektrumu ve toksisite sorunlarından dolayı, 2-(thiocyanomethylthio) benzothiazole (TCMTB) gibi

normal deri fungusitler ayakkabı astarlık deride kullanımı açısından uygun değildir.

Finisaj işlemi sırasında deri yüzeyine belirli fonksiyonel katkı maddeleri uygulandığında deri ürünü yüzeyinin de istenilen özelliklere sahip olacağı bellidir, ki dolayısıyla deri üzerine uygun antimikrobiyal ajanların uygulanması güçlü antimikrobiyal özellikler sağlayabilir. Bu nedenle, ayakkabılara antimikrobiyal performans kazandırmak amacıyla derideki mikroorganizma türlerini etkisizleştirmek için kullanılabilecek yeni bir antimikrobiyal ajanın bulunması gerekmektedir.

2.2. Deride Karşılaşılan Mikroorganizma Türleri

Deri, içeriği nedeniyle mikroorganizmalar için ideal bir besin maddesi özelliğini taşır. Bir derinin bileşiminde yer alan elementler incelendiğinde % 50 karbon, % 25 oksijen, % 7 hidrojen, % 17.8 azot ve % 0.2 de mineral maddelerden oluştuğu görülmüştür. Ayrıca, ham derinin yapısında % 64 su, % 30 protein, % 3 karbonhidrat, % 2 yağ, % 0.5 mineral maddeler ile % 0.5 diğer maddeler bulunmaktadır (Harmancıoğlu ve Dikmelik, 1993).

Genel olarak deri mikrobiyolojisi konusundaki çalışmalar hem dünya, hem de Türkiye ölçeğinde oldukça sınırlıdır. Yürütülen çalışmalar daha ziyade ham deri ve bir ölçüde kireçlik öncesi ile pikle tabaklama proseslerinde yoğunlaşmıştır.

Bilgi (2007), tabaklama öncesi işlemlerde bakteri ve fungus sayısının belirlenmesi üzerine yapmış olduğu araştırmasında toplam aerobik mezofil, proteolitik ve lipolitik bakterilerin yanı sıra aerob spor gelişiminin olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte proteolitik ve lipolitik fungusların ise tabaklamaya kadar varlıklarını sürdürdüğünü ortaya koymuştur.

Durmuş (2007), çalışmasında derinin ilk işlem basamağından itibaren iyi korunmadığı takdirde tabaklama sonrası yaş işlemler sırasında da proteolitik ve lipolitik bakteri ve funguslara rastlandığını belirterek derinin bu mikroorganizmalarca zarara uğrayabileceğini bildirmiştir.

Deri sektöründe karşılaşılan problemlerden birisi bakteri, maya ve küf gibi mikroorganizmaların faaliyeti sonucunda oluşan zararlardır. Derinin tabaklama

öncesi işlemlerinde daha çok bakteriler, tabaklama ve sonrası işlemlerde de funguslar sorun teşkil etmektedir.

Çeşitli türlere ait bakterilerin deri üzerinde bulundukları bilinmektedir. Araştırmacılar, derinin normal florasında *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* gibi bakterilerin bulunduğunu belirtmişlerdir (Champion et al., 1970; Kuroczkin and Strzelczyk, 1989; Rawlings and Cooper, 1975).

Yapılan diğer bir çalışmada hem ham derilerde, hem de derinin farklı işlenti safhalarında ve işlenmiş derilerde çok sayıda bakteri türünün olduğunu saptanmıştır. Mesela, tuzlanmış derilerde *Bacillus*, *Micrococcus* ve *Staphylococcus* gibi bakteri türlerinin olduğu, kireçleme safhasında genelde sporlu bakterilerin bulunduğu saptanmıştır. Ham deriden, derinin farklı işlenti basamaklarından ve işlenmiş deriden *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus rubens*, *Kurthia variabilis*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus brevis*, *Micrococcus candidus*, *Bacillus firmus*, *Bacillus laterosporus* gibi bakteriler izole edilmiş ve tanımlanmıştır.

Krom tabaklama, retenaj, kurutma ve finisaj işlemleri sonrası deride mikroorganizma sayısında ve çeşidinde azalma görüldüğü, fakat yaşamlarını spor formlarında sürdürdükleri *Bacillus* türlerinin yaygın oldukları, ve pH'ın düşük olmasından bakteriyel gelişmenin inhibe edildiği de bildirilmiştir (Birbir, 1991).

Green (1945) kullanılmakta olan ayakkabılarda *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus faecalis*, *Micrococcus flavus*, *Gaffkya tetragena*, *Sarcina citrea*, *Aerobacter rectii*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *B. fusiformis*, *B. tumescens*, *B. megaterium*, *B. pyocyaneus* gibi organizmaları izole ve identifiye etmiştir. Araştırmacı ayak enfeksiyonlarının ayakkabılar tarafından bulaştırılabileceğini açıklamıştır.

Diğer bir çalışmada normal (hasta olmayan) insanların ve diyabetik hastaların kullandıkları deri ayakkabılardan izole edilen mikroorganizmalar kıyaslanmıştır. Hasta olmayan insanların kullandıkları ayakkabılardan *Echerichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* ve *Candida albicans* mikroorganizma türleri izole edilmişken, diyabetik hastaların

kullandıkları deri ayakkabılardan izole edilerek identifikasyonu yapılan bakteri türlerinin çoğunlukla *Bacillus cereus*, *B. fusiformis*, *B. subtilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae*, *Mycobacterium mucogenicum*, *Klebsiella* sp., ve *Acinetobacter* sp. olduğu, ayrıca *Cryptococcus albidus* ve *Rhodotorula mucilaginosa* mayalarının bulunduğu saptanmıştır (Changqing et al., 2010).

Deri maddesi içerdiği yağ, protein, vb. maddeler ile fungus üremesi için ideal besi ortamını oluşturmaktadır. Derilerin depolandığı yerlerin ve işlenti esnasındaki rutubet, pH ve sıcaklık değerlerinin genellikle fungus gelişimi için ideal tespit olunan değerlere yakın olması deri endüstrisinde fungus gelişimin süregelen bir sorun olmasına sebep olmaktadır. Fungusların üremesinde en önemli faktörlerden biri yeterli nemin besiyeri ortamında bulunmasıdır (Turhan, 2000).

Deri işlentisinde karşılaşılan bazı fungus türleri *Penicillium*, *Absidia*, *Acremomyium*, *Aspergillus*, *Basipetospora*, *Byssochlomyis*, *Chrysonilia*, *Cladosporium*, *Emericella*, *Eupenicillium*, *Euratum*, *Fusarium*, *Monascus*, *Paecilomyces*, *Mucor*, *Moniliella*, *Neosortorya*, *Phialophora*, *Scopulariopsis*, *Stachobotrys*, *Trichoderma*, *Trichosporon* ve *Verticillium*'dur (Birbir et al., 1994).

Özellikle *Aspergillus* cinsi fungusların deride geliştiği en sık görülen fungus türlerinden olduğu bildirilmektedir (Tancous, 1986).

Deri işlentisi sırasında fungus gelişimin en çok gözlemlendiği aşama ise derilerin tabaklama işlemi sonrasında yarı mamul olarak depolandığı durumlardır. Pikle ve kromlu derilerde oluşan % 40-60 ve mamul deride oluşan % 13-25 nem oranlarının fungus gelişimi için yeterli olduğu bilinmektedir (Öztürk, 2004).

Ağırlıklı olarak derinin cildinde faaliyet gösteren funguslar sonraki işlentilerde deriden uzaklaştırılırsalar da faaliyet gösterdikleri bölgelere verdikleri zarar çoğunlukla giderilememektedir. Bu tür zararların önüne geçilebilmesi için pikle işlemi sırasında fungusid kullanımı tavsiye edilmektedir (Sharphause, 1989).

Pikle ve kromlu derilerde farklı fungus çeşitlerinin farklı pigmentasyonlara sebep olduğu tespit edilmiştir (Karaboz vd., 2003). Funguslar deri maddesi içerisindeki yağı hidrolize ederek deriyi sertleştirebilmektedirler. Deriler görünüşte zarar görmemiş olsalar dahi uzama dayanımları düşmekte ve kullanım

özellikleri zarar görmüş olmaktadır. Üredikleri alanı renklendirmeleri ve kötü kokulara sebep olmaları ise asıl zararlarıdır (Reed, 1966).

2.2.1. Test mikroorganizmalar yapısı ve özellikleri

Günümüzde modern teknikler kullanılmasına rağmen, deri, organik yapısı nedeniyle mikroorganizmaların saldırısına uğramakta ve özellikle işlenti arası uzun bekleme sürelerinde adeta mikrop yuvası haline gelebilmektedir.

Mikroorganizmalar, soluduğumuz havada, vücudumuzda, toprakta ve temas ettiğimiz bütün yüzeylerde bulunabilmektedir. Uygun şartlar sağlandığında bu organizmalar üreyerek hızla çoğalmaktadır. Gelişmeleri için gerekli olan şartlar ise; bir beslenme kaynağı (organik malzemeler; C, O, N, S), yeterli sıcaklık ve yeterli nem oranıdır. Mikroorganizmalar, bir miktar nem ve uygun gıda varlığında gelişmeye başlar ve ideal koşullar altında, mikrobik büyüme çok hızlı gelişir, zor koşullar altında bile varlığını devam ettirir. Tek bir bakteri ile başlayan üremede yaklaşık 9 saat sonra 6 milyar bakteri meydana gelmektedir ve bu da yeryüzünde yaşayan insanların sayısına eşittir. İnsan vücudu ile yakın temas halinde bulunan mikroorganizmalar, nem, sıcaklık ve besin gibi büyüme için ideal koşullar bulurlar. Mikrobik saldırı, bazı olumsuz etkilere sahiptir. Mesela, bakteriler, insan terini, karboksilik asit, aldehit ve aminler gibi bazı kötü kokulu maddelere dönüştürmektedirler. Bundan dolayı, mikroorganizmaların üremesi ve gelişmesi sonucu bazı tekstil ve deri ürünlerinde temizlemelere rağmen giderilemeyen koku problemleri ortaya çıkabilmektedir. Bu koku şiddeti küf kokusundan şiddetli amonyak kokusuna kadar değişmektedir. Kötü kokuların yanı sıra küf lekeleri de meydana gelebilmektedir. Mikrobiyal üreme kötü lekelerin oluşumuna ve renk değişimine, ayrıca ürün bozunmasına neden olabilmektedir. Hijyen açısından bakıldığında patojenik (hastalık yapıcı) mikroorganizmaların veya mikropların üremesi hastalıkların ve enfeksiyonların yayılmasına neden olmaktadır (Devrent ve Yılmaz, 2004).

Mikroorganizmaların başka önemli bir etkisi de alerjik hastalıklardır. Küf mantarları ve dust miteler salgılarının alerjik hastalıklar ortaya çıkardığı ispatlanmıştır. *Aspergillus* tipi küf mantarlarının akciğer hastalıklarına neden olduğu bilinmektedir. Antimikrobiyal korumalı ürünlere karşı artan talep kullanılan antimikrobiyal maddenin güvenliği hakkında sorular sorulmasına neden olmuştur (Devrent ve Yılmaz, 2004).

Çok geniş bir taksonomik dağılıma sahip olan mikroorganizmaların ana grupları; bazı metazoonlar (çok hücreli canlılar), protozoonlar (tek hücreli hayvanlar), algler, funguslar, bakteriler ve virüslerdir. Protozoonlar, algler, funguslar ve bakteriler “Protista” alemi altında sınıflandırılmaktadır. Protista alemi, tek hücreli ya da koenositik hücresel organizasyon özelliği ile bitkiler ve hayvanlar aleminden ayrılmaktadır. Ayrıca Protista alemi içindeki çok hücreli formlar (bazı algler) doku tipinde hücre farklılaşması içermez. Koenositik yapı içeren protistlerde (fungusların büyük çoğunluğu ve bazı alg grupları) hücresel alt üniteler yoktur. Çok hücreli gibi görünmelerine rağmen ayırıcı membranlar arasında sitoplazma sürekliliği bulunur. Sitoplazmalarında çok sayıda çekirdek vardır (Akçelik, 2000).

Deri için zararlı mikroorganizmalardan başlıcaları bakteri ve funguslardır. İşlemler sırasında asit veya bazik yapıda olan deri, hem bakteriler hem de funguslarca zarara uğrayabilmektedir (Karaboz vd., 2003).

Araştırmada kullanılan mikroorganizma kültürleri, literatür taraması sonucunda deride en sık rastlanan fungus türleri ve antimikrobiyal testlerde en çok tercih edilen bakteri türleridir.

2.2.1.1. Bakteriler

Bakteriler, daha yüksek yapıli bitki ve hayvan hücrelerinin (ökaryotik hücreler) nükleus yapısına sahip olmayan prokaryotik mikroorganizmalardır. DNA moleküllerini sitoplazmadan ayıran nükleus zarları yoktur. Prokaryotik hücrelerin sitoplazması özel fonksiyonlara ait birimler halinde farklılaşmamaktadır. Boyutları 0.5–5.0 µm arasında değişmektedir. Bakteriler, Gram boyama ile boyanan hücre çeperi bileşenlerinin farklı özelliklerine dayanarak, Gram (+) ve Gram (-) organizmalar şeklinde iki sınıfa ayrılmaktadır. Gram (+) bakteriler temel olarak peptidoglikan polimerinden oluşan ve 20-80 nm kalınlıkta klasik bir hücre çeperine sahiptirler. Birçok Gram (+) bakteride kalın peptidoglikan tabakası hücre çeperi bileşenlerinin yaklaşık % 80’ini oluşturmaktadır. Bileşenlerin geri kalan kısmı teikoik asitler (% 10–20), düşük miktarda lipitler, proteinler ve lipopolisakkaritlerden oluşmaktadır. Gram (-) hücrelerin hücre çeperi kimyasal açıdan daha karmaşıktır. Peptidoglikan tabakası daha incedir (2–6 nm kalınlıkta) ve hücre çeperi sadece % 10’unu oluşturmaktadır. Gram (-) bakterilerin en dış tabakası olan dış membran yaklaşık 6–18 nm kalınlıktadır ve hücre çeperinin geri kalan kısmını oluşturmaktadır. Dış

membran; % 50 lipopolisakkarit, % 35 fosfolipit ve % 15 lipoprotein içermektedir. Peptidoglikan ve dış membran birlikte sağlam hücre morfolojisinin sürdürülmesi için mekanik bir koruma sağlamakta ve Gram (-) hücrelerin fonksiyonlarına benzer şekilde faj enfeksiyonuna duyarlılığı ve antijenisiteyi belirlemektedir. Ayrıca, Gram (-) hücrelerin dış membranı birçok orta ve büyük boyutlu molekülün geçirgenliğini etkilemektedir. Dış membrandan materyal geçişinin ilave zorluğu, belli durumlar altında Gram (-) bakterilerin Gram (+) bakterilere göre birçok kimyasal ajana daha dirençli olmalarının nedenini açıklamaktadır (Blake et al., 1999).

Gram (-) hücrelerdeki periplazmik boşluk, Gram (+) bakterilerde daha az belirgin olup sitoplazmik membran ve hücre çeperi arasında uzanmaktadır. Birçok enzim, protein ve elektron aracısı bu dinamik jel benzeri çevrede bulunmaktadır. Dış membrandan geçerek girişe ulaşmış ve hücre membranından geçiş için hala çok büyük olan materyaller, hidrolitik enzimler tarafından kesilmektedirler. Hücre çeperi ve dış membranının bileşenleri de burada dönüşüme uğratılmakta ve yeni oluşan materyaller son varış yerlerine ulaşmadan önce bu boşluk boyunca hareket etmektedirler. Birçok elektron aracısı bu boşlukta yer almakta ve enerji veren reaksiyonlara katılmaktadır. Bu bölge mikrobun dış çevresinden çok çabuk etkilendiğinden, yabancı ajanlara karşı hücrenin savunmasında kritik bir rol oynamaktadır (Blake et al., 1999).

Escherichia coli

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve önce *Bacterium coli commune* olarak, daha sonra *Escherichia coli* (*E. coli*) olarak adlandırılmıştır. Bugün üzerinde en çok çalışılan ve genetik yapısı en iyi bilinen canlı türüdür.

E. coli'nin doğada bulunduğu tek yer sıcakkanlı hayvanlar olarak bilinen memeli ve kanatlı hayvanlara bağırsak sistemleri ve dolayısı ile bunların dışkılarıdır. Dolayısı ile bir gıda maddesinde, içme ya da kullanma suyunda *E. coli*'ye rastlanması o örneğe doğrudan ya da lağım suyu aracılığı dışkı bulaştığının göstergesidir. *E. coli* tip 1 olarak tanımlanan standart *E. coli* suşları çok kolaylıkla belirlenebildiği için bir materyalde fekal kontaminasyon (dışkı bulaşıklığı) kontrolünde *E. coli* yaygın olarak kullanılan indeks (gösterge) bakteridir (Anonim, 2012).

E. coli yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda ve 1.0-1.5 µm enine düz, uçları yuvarlak çomakcık şeklinde bakterilerdir (Şekil 2.1). Bazı kültürlerde koka benzer küçük ve kısa bazı kültürlerde de normalden uzun hatta Y harfi şeklinde dallanan filamanlı şekiller bulunabilir. Her iki şeklin birlikte bulunması olasıdır. Genellikle etrafında bulunan kirpikleri aracılığı ile hareketli olmakla beraber hareketleri yavaştır, hatta hareketsiz görünebilirler. Bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve gram negatiftirler. Etraflarında kapsül maddeleri bulunmakla beraber organizmada bağırsak dışındaki yerlerden soyutlanan kökenlerin çoğunda kapsül ya da mikrokapsül bulunur.

E.coli buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürerler. Değişebilen anaerob olup, optimal üreme ısısı 37°C'dir. 15-45°C'de üreyebilirler. Özellikle 45°C'de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden ayırt edici bir özelliktir. Ortalama pH 7.2'de iyi ürerler. *E. coli* ısıya karşı oldukça dirençli bir bakteridir. 60°C ısıda 30 dakika, oda ısısına uygun ortamda olmak koşulu ile uzun süre canlı kalabilir. Soğuğa dirençlidir. Dezenfektanlara karşı dirençsizdir (Bilgehan, 2000).



Şekil 2.1. *E. coli* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü, (Anonim, 2012a).

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) adı altında anılan tür özellikte koagüler olumlu, mannitolu aerob ve anaerob koşullarda asit oluşturarak parçalayan alfa oksin yapan, novobiocine duyarlı, insan ve diğer sıcak kanlı hayvanlarda geniş çapta piyogen toksik ve besin zehirlenmesi niteliğinde enfeksiyonlara etken olan stafilokoklar toplanır (Bilgehan, 2000).

Doğada oldukça yaygın olan, tozda, toprakta, eşya üzerinde, insan ve hayvan deri, burun mukozası, ağız ve nazofarinks floralarında bulunan *S. aureus*

bakterilerinin, günümüz için en önemli yönleri kullanılmakta olan kemoterapötik maddelerin birçoğuna hızla dayanıklılık kazanmaları ve bu nedenle eskiye oranla enfeksiyonlarına daha sık rastlanmasıdır.

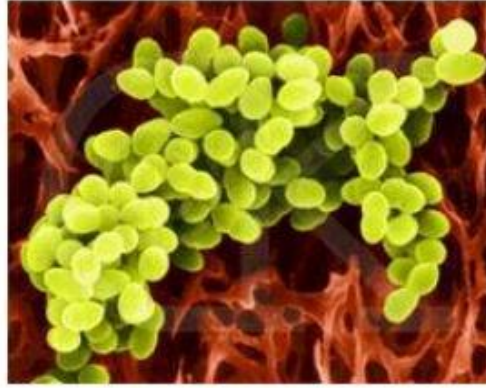
S. aureus insanlarda menenjit, sepsisemi, yara iltihaplarına ve önemli ölçüde gıda zehirlenmelerine neden olur. Stafilokokal gıda zehirlenme riski bakteriyel gelişmenin ve/veya toksin oluşumunun azalması ile kayda değer ölçüde azaltılabilir. Yeterli ısıl işlemi ile gıdanın depolama koşulları bu konuda en etkili önlemlerdir. Genel olarak gıdada 10^5 – 10^9 adet/g *S. aureus* varlığı enterotoksin oluşumu için “toksik düzey” olarak kabul edilir. Bununla birlikte yukarıda belirtildiği gibi gıdada *S. aureus* bulunması o gıdanın stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olacağı anlamına gelmeyeceği gibi tersine olarak gıdada *S. aureus* bulunmaması o gıdanın stafilokokal gıda zehirlenmelerine neden olmayacağına dair güvence vermez. Başta ısıl işlem olmak üzere çeşitli uygulamalar *S. aureus* hücrelerini öldürebilmekte ancak daha önce oluşmuş enterotoksini tahrip edemeyebiliyor (Anonim, 2012b).

Teker teker incelendikleri zaman stafilokok hücreleri diğer koklara göre daha çok olmak üzere tam yuvarlağa yakın şekildedir. Ayrıca gerek aynı ve gerekse çeşitli kültürlerden elde edilen stafilokoklar hücre görünümü bakımından birbirinden önemli bir ayırım göstermezler. Stafilokoklar yaklaşık olarak 1 µm çapındadırlar. Üreme esnasında bölünme sonucu meydana gelen hücreler birbirinden ayrılmazlar ve üç boyut yönünce çoğaldıklarından üzüm salkımına benzer kümeler yaparlar. Şekil 2.2’de *S. aureus* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü verilmektedir. Stafilokoklar çeşitli bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar ve gram pozitifler. Eski kültürlerde bazı koklar çabuk renksizleşerek gram negatif gibi görünürler (Öztürk, 2004).

Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüzlerdir. Bazı kökenlerinde belirgin ve polisakkarid yapısında bir kapsül ya da bir mukus katmanı olur. Stafilokoklar basit besiyerleri dahil birçok besiyerlerinde ürerlerse de kanlı besiyerinde daha iyi çoğalırlar. Fakültatif anaeropturlar. Oksijenli ortamda üremeyi tercih etseler de belli miktarda oksijenli ve hatta tamamen oksijensiz ortamda bile üreyebilirler (Bilgehan, 2000).

Optimal olarak 37°C’de ve pH 7.4’de ürerler. Jeloz besiyerinde bolca ürer ve yuvarlak kenarlı mat, kabarık, parlak yüzeyli, S tipinde ve 1-2 mm çapında

koloniler yaparlar. Uygun ortamda koloniler 6-8 mm çapına ulaşabilirler (Üçışık, 1994).



Şekil 2.2. *S. aureus* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Anonymous, 2012)

2.2.1.2. Funguslar

Canlıların sınıflandırılmasında fungi alemine dahil edilen küfler hif veya hüf denilen çok hücreli filamentler şeklinde gelişen canlılardır. Yaşamaları için gerekli olan enerjiyi içinde bulundukları organik maddeden sağlayan bu canlılar hiflerin uçlarından salgıladıkları hidrolitik enzimlerle içinde bulundukları ortamda bulunan kompleks organik polimerleri parçalayarak daha basit yapılara indirger ve kullanırlar.

Funguslar (küf ve maya) morfolojileri yönünden çok farklıdır. Tek hücreli mayalar hariç birçok fungus çok hücreli filamentler şeklinde yaşamını sürdürmektedir. Funguslar ökaryotik canlılardır (genetik materyalleri bir membran ile çevrelenmiş bir nükleus içinde bulunmaktadır). Ökaryotik hücrelerin diğeri bir özelliğise sitoplazmalarının çok sayıda, son derece farklılaşmış ve her biri spesifik bir hücresel fonksiyon gerçekleştiren organeller içermesidir. Funguslar heterotrof olup, parazitler gibi canlı bir konukçuyu enfekte ederek veya ölü organik materyalin çürümesine yol açarak kendi besinlerini elde etmektedirler. En uygun olarak aseksüel spor oluşturarak çoğalmaktadırlar.

Bakterilere benzer şekilde fungusların sitoplazmik membranı bir hücre çeperi ile çevrelenmiştir. Bakterilerden farklı olarak fungal hücre çeperleri çok tabakalıdır ve her iki tabaka birbirine çeşitli yönlerde çapraz bağlanan fibrillerden oluşmaktadır. Fungal hücre çeperinin ana bileşenleri küçük miktarlarda lipid ve protein içeren polisakkaritlerdir. Kitin, tüm fungal hücre duvarlarında bulunan

genel polisakkarit bileşeni olarak rapor edilmiştir. Bakterilerin gelişemediği çeşitli stres koşullarında fungusların hayatta kaldıkları bilinmektedir. Funguslar daha dayanıklı hücre çeperi yapılarına sahip olduklarından, yüksek ozmotik basınçlara dayanabilmektedirler. Funguslar geniş bir pH aralığına tolerans gösterebilmekte ve canlılıklarını sürdürebilmek için gerektiğinde, tuz veya şeker konsantrasyonunun yüksek olduğu solüsyonlardan suyu alabilmektedirler (Blake et al., 1999).

Sporlar vasıtası ile çoğalan bu organizmalar çok geniş sıcaklık, nem ve pH aralıklarına uyum sağlayabilirler ancak büyük çoğunluğu hafif asidik pH'da, % 70 ve üzeri nispi nem ile 25-35°C sıcaklıklarda optimum koşullarda üreme sağlarlar. Bu durum özellikle wet-blue derilerde, nem içeriği yüksek krast derilerde ve pH'ı yeterince düşürülmemiş pikle derilerde küf üremesi için optimum koşulların sağlandığını ifade etmektedir.

Candida albicans

Candida albicans (*C. albicans*), eşeyli çoğalan, diploit, maya tipi bir mantar türü ve insanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların etmenidir. *Candida* cinsine ait 200 tür olmasına karşın *Candida* enfeksiyonlarının % 75'inin sorumlusu *C. albicans*'tır.

Bağışıklığı baskılanmış hastalarda (AIDS, kanser kemoterapisi, organ veya kemik iliği transferi durumlarında) sistemik mantarsal (fungal) enfeksiyonlar (fungemi), hastalık ve ölümün başlıca nedenleri arasındadırlar. Ayrıca bu yönde riski olmayan hastaların hastanede edindikleri enfeksiyonlar ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

C. albicans insan ağızı ve sindirim sistemi içinde yaşayan pek çok organizmadan biridir. Sağlıklı yetişkinlerin % 40'ının ağızında, sağlıklı kadınların % 20-25'inin vajinasında varlığı gösterilebilir. *C. albicans* sindirim sistemindeki varlığıyla başka patojen bakterilerin çoğalmasını engeller. Vücudun bağışıklık sistemi ve diğer zararsız bakteriler normal şartlarda *Candida*'yı kontrol altında tutarlar.

Ancak, diğer bakterilerin sayısı *C. albicans*'a oranla azalırsa (örneğin antibiyotik kullanımından dolayı), bağışıklık sistemi zayıflamışsa veya mayanın çoğalmasını sağlayan başka şartlar mevcutsa (yüksek şeker, yüksek pH) *C.*

albicans zararsız olan tek hücreli biçiminden, çok hücreli, istilacı (invasif), küf gibi ipliksi biçimine dönüşür ve vücudu istilaya başlar. *C. albicans*'ın iplikçi biçimi hem psödohif hem de gerçek hiflerden oluşabilir. *C. albicans* iplikçi bir biçime dönüşmesine ilaveten, konak dokulara bağlanmasını sağlayan adhesinler, dokuları hem imha etmeye hem de onlara daha iyi yapışmayı sağlayan proteazlar ve vücudun bağışıklık sisteminin tepkisini azaltan faktörler üretir (Anonim, 2012c).

Candida mantarı fırsatçı mantardır. Maya mantarlarından olan bu canlı, deride enfeksiyona neden olur. Normalde sağlıklı insanın derisinde, solunum, sindirim ve üreme bölgelerinin mukoza zarlarında bulunur. Bağışıklık sistemi zayıfladığında çoğalır ve enfeksiyon oluşur. Tomurcuklanarak çoğalan, oval şekilli, tek hücreli bir asalaktır (Şekil 2.3). Candidaların yüzden fazla türleri vardır. Ancak 10-15 tanesi insanda patojendir (Hökelek, 2003)



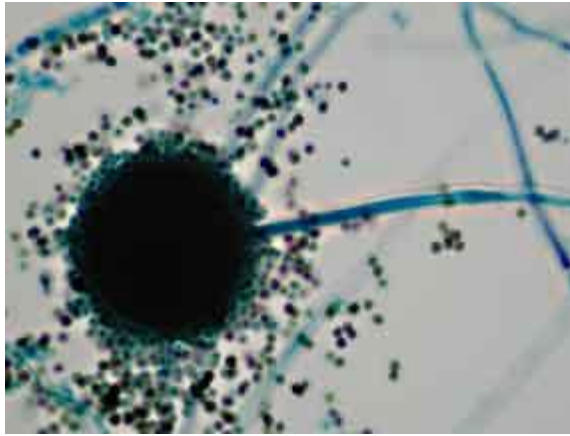
Şekil 2.3. *Candida albicans*'ın taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Anonim, 2012d)

Aspergillus niger

Aspergillus, dünyanın her yerine yayılmış yaklaşık 200 mantar (küf) türünden oluşmuş bir cinstir. Yuvarlak hücrelerden oluşmuş mayalardan farklı olarak, *Aspergillus*'lar hif olarak adlandırılan hücre zincirlerinden oluşan ipliksi mantar türleridir (Şekil 2.4). Doğada saman ve çürüyen bitki artıklarında yaşarlar. *Aspergillus* ilk 1729'da İtalyan rahip ve biyoloğu Pietro Antonio-Micheli tarafından, *Nova plantarum genera juxta Tournafortii methodum disposita* olarak kataloglanmıştır. Mantarın şekli ona Hristiyan ayinlerinde kutsal su serpmeye yarayan *aspergillum*'u hatırlattığı için bu ismi kullanmıştır.

Aspergillus türleri aerobiktirler ve bunlara bol oksijenli hemen her ortamda rastlanır, yüzeyde küf olarak büyürler. Mantarlar genelde bol karbonlu yüzeylerde, glikoz gibi monosakkaritler ile büyümelerine karşın, *Aspergillus* amilaz enzimleri salgıladığı için nişasta gibi polisakkaritleri de kullanabilir. Bu yüzden *Aspergillus* türleri ekmek ve patates gibi nişastalı yiyeceklerin bozulmalarında sıkça görülür, ayrıca çoğu bitki ve ağaç üzerinde de büyürler. Glikoz, früktoz, maltoz ve nişasta gibi karbon kaynakları ile büyüebilmelerinin yanı sıra çoğu *Aspergillus* türü besin maddelerinin çok düşük konsantrasyonda olduğu veya başka organizmaların kullanmadığı besin kaynaklarının olduğu ortamlarda da büyüme yeteneğine sahiptir. Bunun başlıca örneği olan *Aspergillus niger* (*A. niger*), nemli duvarlar üzerinde büyür, banyolardaki küfü oluşturur.

Aspergillus türleri, hem birincil hem ikincil metabolitlerin üretimi nedeniyle ticari önemi en büyük olan mantar türü sayılabilir. *A. niger*'in en önemli kullanımı sitrik asit üretimidir; bu organizma dünya çapındaki üretiminin % 99'u olan yılda 4,5 milyon ton sitrik asitten sorumludur. *A. niger* ayrıca hem kendisine hem başka organizmalara ait enzimlerin üretimi için kullanılır, bunlara örnek glikoz oksidaz ve tavuk yumurta *lizozim*'idir. Bu kullanımlarda kültür katı yüzey üzerinde değil (ancak Japonya'da bu hala yapılır), sıvı ortam içinde, biyoreaktörde büyütülür. Bu sayede büyümeyle ilgili en önemli parametreler ince bir şekilde kontrol edilebilir. Ayrıca elde edilmek istenen kimyasalı veya enzimi kültür ortamından ayıştırmak çok daha kolay olduğu için bu yöntem daha ekonomiktir (Anonim, 2012e).



Şekil 2.4. *Aspergillus niger*'in taramalı elektron mikroskobu görüntüsü

(Anonymous, 2012a)

Trichoderma viride

Trichoderma cinsi çok hızlı üreyen filamentli bir mantardır. Dünyada geniş bir yayılıma sahiptir (Domsch et al., 1980; Klein and Eveleigh, 1998). 1969 yılına kadar sınıflandırma bakımından çok zorluk çekilmiştir, gerçekçi bir sınıflandırma ilk kez Rifai tarafından yapılmıştır, türler bir araya getirilerek morfolojileri araştırılmıştır.

İlk kez Persoon tarafından 1794 yılında tanımlanmıştır. Hızlı üreyip kolonisi 4 günde olgunlaşır. Başlangıçta birkaç gün içinde tüm besiyeri yüzeyini kaplayan beyaz gevşek bir misel görülür. Bir süre sonra misel daha da sıkılaşır yünüksü bir örgü görünümü kazanır ve konidyumların (conidium) oluşması ile yüzeyde yer yer yeşil lekeler belirir, koloni tabanı renksiz, portakalımsı, ten rengi veya sarımsıdır. Belirgin konsentrik halkalar ve hava hifleri gözlenir ve bazı türler özgü tatlı bir hindistan cevizi kokusu üretilir.

Mikroskopta kısa, septalı çok dallanmış hifler ve şişe biçiminde konidioforlar (conidiophore) görülür. Her konidioforun ucunda yuvarlak, tek hücreli, küçük konidyum kümeleri bulunur (Rifai, 1969). Konidium kümeleri kolayca dağıldığından preparasyon yaparken sert devinimlerden kaçınılmalıdır. Konidioforların ana dalları yan dalları oluşturur. Bütün dallanmalar ana eksene göre 90 derecelik açıyla yön alır. Tipik sık dallanmış *Trichoderma* sp. konidioforları; çift dalların birleşmesiyle piramit görünümünü alır. Birçok türünün konidiası elipsoidal olup, boyutları 3-5 x 2-4 µm'dir (Tümbay, 1983).

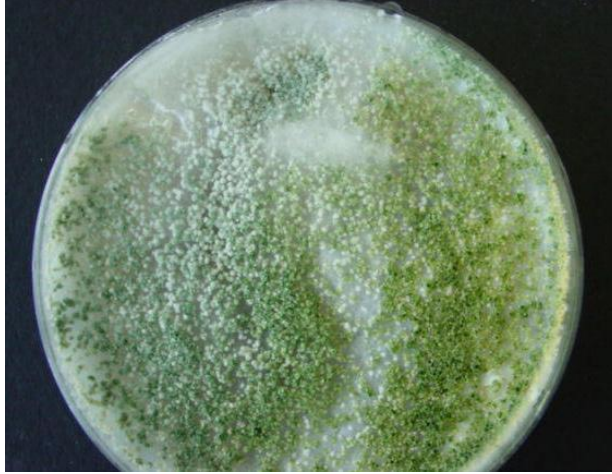
Küf mantarları; mitoz bölünmeyle oluşan aseksüel sporların çimlenmesiyle oluşan funguslardır. *Trichoderma* türleri; eşeysiz üreme ile klamidiosporlar ve konidiasporlar oluşturarak çoğalırlar. Eşeysiz veya aseksüel üreme, somatik yapının belirli bir dönemde kendi benzerlerini oluşturmasına denir. Eşeysiz üreme değişik fungus gruplarında farklı şekillerde olabilmekte ve bunun sonucunda değişik tipte sporlar oluşmaktadır. *Trichoderma* türlerinin; eşeysiz üreme tiplerinden biri olan "fragmentasyon"da, hiflerin uç veya orta kısımlarındaki hücreler hifden kopup ayrılmakta ve yeni bireyleri oluşturmaktadır (Gams and Bissett, 1998).

Hiflerin uç veya orta kısımlarındaki hücrelerin çeperleri kalınlaşıp, yuvarlaklaşarak hifden ayrılmasıyla oluşan sporlara "klamidospor" (chlamidospor) denir. *Trichoderma*'nın aseksüel üremesiyle oluşturulan, ikinci tip

sporlar ise “konidi”lerdir (conidium, çoğulu: conidia). Bunlar “konidiofor” (conidiophore) adı verilen farklılaşmış hiflerin ucunda oluşurlar, tek veya çok hücrelidirler (Samuels, 2006).

Sıcaklık, nem ve pH bütün mantar türlerinde olduğu gibi *Trichoderma* sp. suşlarının kolonizasyonu açısından da önemli bir yere sahiptir. *Trichoderma* sp. türleri, 0°C’den 40°C’e kadar geniş bir sıcaklık aralığında varlıklarını sürdürebilirler fakat gelişimleri için gereken optimum sıcaklık 22-26°C arasında değişmektedir (Domsch et al., 1980). Çok yüksek nem bu fungusun hif gelişimi, spor üretimi ve germinasyonunu negatif düzeyde etkilerken, orta düzeydeki nem optimal gelişimleri ve popülasyonun yayılması açısından sıcaklıktan daha önemlidir (Clarkson et al., 2004). Yapılan araştırmalar pH açısından *Trichoderma* cinsi mantarlarının gelişimi ve spor germinasyonlarının, asidik substratlı ortamlardan pozitif yönde etkilendiğini ve optimal pH aralığının 3.5-5.6 olduğunu göstermiştir (Domsch et al., 1980).

Trichoderma viridae (*T. viride*), suda çözünmeyen (kristal) doğal selüloz bileşiklerinin şekerleştirilmesini sağlayan selüloz enzimlerini en çok üreten bir mantar türüdür. Subgloboze veya dikkat çekici bir şekilde tüberküler yapıdadır. Uzun ve esnek bir merkezi eksene sahiptir, terminalinde birkaç fiyalid bulunur. Koyu yeşil renktedir, besiyerinden kolayca ayrılmaz (Jaklitsch et al., 2006).



Şekil 2.5. Petri kabında geliştirilmiş *Trichoderma viride*’nin bir görüntüsü
(Anonymous, 2012b)

2.3 Antimikrobiyal Maddeler ve Etki Mekanizmaları

2.3.1 Antimikrobiyal maddeler

Antimikrobiyal madde, mikroorganizmaları öldüren veya üremelerini önleyen madde olarak tanımlanmaktadır. Bu fonksiyonları tamamıyla yerine getiren en önemli bileşikler aşağıdaki gibidir:

- Fenol ve türevleri,
- Alkoller,
- Metaller,
- Oksidasyon maddeleri,
- Halojenler,
- Biquanidinler,
- Isothiazolonlar,
- Amonyum bileşikleri,
- Kitin ve Kitosan,
- Zeolitlerdir.

Antimikrobiyal maddeler aşağıda belirtilen özelliklerinden birbiri ile farklılık göstermektedirler.

- Kimyasal yapıları,
- Kalıcılıkları,
- Etkinlikleri,
- Toksiklikleri,
- Güvenlikleri,
- Maliyetleri.

Civa, bakır ve gümüş gibi metal olarak veya metal tuzları şeklindeki durumları, antimikrobiyal tesirler verirler. Fakat civa insanlar için çok zehirlidir. Bakır tuzları da genelde yeşil renkte olup; birçok kullanım sahalarında istenmez. Gümüş antimikrobiyal madde olarak 2000 seneden beri kullanılmaktadır. Romalıların içme sularını temiz ve taze tutabilmek için, su kaplarında gümüş paralar kullandıkları bilinmektedir (Devrent ve Yılmaz, 2004).

2.3.2 Antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmaları etkileme modelleri

Antimikrobiyal maddelerin hepsi aynı mekanizma ile etki göstermemektedir. Bu nedenle doğru seçim yapabilmek için kullanılan antimikrobiyal maddeler arasındaki farklılıkların anlaşılması gereklidir.

Antimikrobiyal maddeler etkilerini beş mekanizmada gösterirler:

- Metabolik antagonistik etki yaparlar,
- Hücre duvar sentezini bozarlar,
- Hücre zarının geçirgenliğini ve fonksiyonunu bozarlar,
- Protein sentezini bozarlar,
- Nükleik asit sentezini bozarlar (Cloete, 2003).

Antibakteriyel etkenler bakterilere çeşitli şekillerde etki yapabilirler. Bu yollardan birçoğu hakkında bilgiler yetersizdir. Bununla beraber, bazı genelleştirmeler yapılabilir. Yüksek konsantrasyonları halinde birçok etken, hücre proteinlerinin kolloidal durumlarını bozarak bunları pıhtılaştırırlar. Bazı etkenler, belirli şartlar altında özgül olarak hücre zarını parçalarlar. Hücrelerin temel enzimlerinin birçoğu sülfidril (-SH) grupları taşırlar ve ancak bu gruplar serbest ve redüklenmiş halde bulunursa iş görebilirler. Bunun içindir ki, sülfidril gruplarını oksitleyen veya bunlarla birleşen etkenler, kuvvetli önleyici etki yaparlar. Son olarak, birçok etkenler, zıt kimyasal etkileriyle bir veya birkaç özgül enzimatik reaksiyonu bozmak suretiyle etkili olabildikleri belirtilmektedir.

Protein pıhtılaşması

Çoğu veya hepsi enzimatik yapıda olan hücre proteinleri, normalde çok ince şekilde dağılmış, kolloidal durumdadır. Eğer proteinlerin özellikleri bir antibakteriyel etken tarafından önemli derecede değiştirilirse, bunlar pıhtılaşarak iş göremez hale gelirler. Yumurtanın beyazı ısıtılınca veya süt ekşiyince oluşan değişiklikler, protein pıhtılaşmasına güzel örneklerdir: fakat bu olaylardan önce veya bu olaylara paralel olarak cereyan eden kimyasal değişiklikler hakkında pek az şey bilinmektedir.

Hücre zarının veya çeperinin bozulması

Hücre zarı, seçici bir baraj olarak iş görür; erimiş bazı maddelerin içeri girmesine izin verdiği halde, diğer bazılarının girişini önler. Bazı bileşikler, zardan aktif olarak geçirilerek hücre içinde yoğun hale gelirler. Halen bu işte rol oynayan mekanizmalar tamamen anlaşılmamışsa da, bu olay için, bozulmamış sağlam bir hücre zarının bulunması gereklidir. Bu nedenle hücrenin yüzeyinde biriken maddeler, zarın fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirip, normal fonksiyonlarını bozarak ya hücreyi öldürür ya da üremesini önleyebilirler.

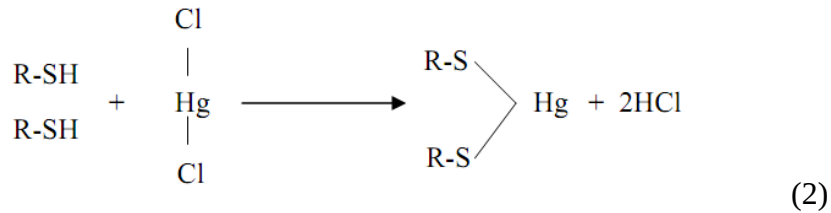
Hücre çeperi, koruyucu bir yapı olarak iş görerek hücreyi osmotik erimeden korur. Bu yüzden, çeperi bozan (örneğin lizozim) ya da normal yapımını önleyen (örneğin penisilin) gibi etkenlerin, hücrenin erimesine sebep olduğu belirtilmektedir.

Serbest sülfidril gruplarının giderilmesi

Sistein taşıyan enzim proteinlerinin, sülfidril grupları ile biten yan zincirleri vardır. Bunlardan başka, anahtar enzimlerden en az bir tanesinin bir serbest sülfidril grubu vardır. Bu gibi enzimler, sülfidril grupları serbest ve redüklenmiş durumda olmadıkça iş göremezler. Oksitleyen etkenler, birbirine komşu olan sülfidril gruplarını 'disülfid' bağları haline çevirmek sureti ile, metabolizmayı bozarlar.



Civa gibi birçok metallerin iyonları, sülfidril grupları ile şu şekilde birleşerek zararlı etki gösterirler:



Hücrede birçok sülfidril enzimleri bulunduğu için, oksitleyici etkenler ve ağır metaller zarara sebep olurlar. Enzimin iş görmesi için serbest sülfidril gruplarının neden gerektiği bilinmemektedir. Koenzim A gibi bazılarında bunlar, muhtemelen altlığın yapışacağı normal bölgeler olarak iş görmektedirler.

Kimyasal zıt etki (antagonizm)

Özel bir enzim ile buna ait substrat arasındaki normal reaksiyona kimyasal bir etkenin karışmasına kimyasal zıt etki denir. Böyle maddeler holoenzimin bir parçası ile birleşmek suretiyle, normal substratın holoenzimle birleşmesini önler. Zıt etki yapan madde, enzimin bir esas bölgesine özel kimyasal ilgisi bulunduğu için enzim ile birleşir. Enzimler katalitik fonksiyonlarını kendi doğal substratlarına ilgileri dolayısıyla yaparlar; bu yüzden, yapısı bakımından bir substrata çok benzeyen herhangi bir bileşikte aynı şekilde enzimin ilgisini çeker.

Eğer bu ilgi yeter derecede yüksek ise, yapıcı benzer olan bu madde normal substratın yerini alarak uygun reaksiyonun husule gelmesini önlemiş olur.

Birçok holoenzimlerde, ya enzim ile koenzim ya da enzim ile substrat arasında köprü olarak bir mineral iyonu vardır. Bu minerallerle çabucak birleşebilen kimyasal etkenlerde, koenzim veya substratın birleşmesini önler. Örneğin, karbonmonoksit ve siyanür porfirin enzimidaki demir atomuna bağlanarak bu enzimin solunumda iş görmesini önlerler.

Zıt etki yapan kimyasal maddeler kolaylık için iki grup halinde gözden geçirilebilirler; enerji oluşturan işlemlerin zıt etkileri ve biyosentetik işlemlerin zıt etkileri. Bu gruplardan ilkinde, karbonmonoksit ve siyanür gibi solunum enzimlerinin zehirleri ve dinitrofenol gibi oksidatif fosforilasyonun zehirleri vardır. İkinci grupta ise, aminoasitler gibi proteinlerin ve nükleotitler gibi nükleik asitlerin yapı taşlarına yapıcı benzer maddeler bulunmaktadır. Bazı hallerde zıt etkili madde, sadece normal metabolitin birleşmesini önler. Diğer hallerde zıt etkili madde büyük molekülün yapısındaki normal metabolitin yerine geçerek bunun iş göremez hale gelmesine sebep olur (Akman ve Gülmezoğlu, 1976).

2.3.3 Antimikrobiyal seramikler

Fabrika, inşaat malzemesi, kozmetik, elektriksel aletler gibi geniş uygulama alanları antimikrobiyal seramiklerin önemini her geçen gün artırmaktadır. Antimikrobiyal seramiklerde bir taşıyıcı bünyenin bulunması ve metal iyonlarının yapıya kolay katılması gereklidir. Taşıyıcı bünye baz alınarak antimikrobiyal seramikler; amorf silika, zeolit ve kalsiyum fosfat bünyeli olarak sınıflandırılabilirler. Bu malzemelerin ortak özelliği geniş kristal yapısına sahip

olmalarıdır. Böylece metal iyonları sisteme girebilmekte ve mikroorganizmalar üzerinde etkin olabilmektedirler (Kim et al., 1998, Kawashita et al., 2000).

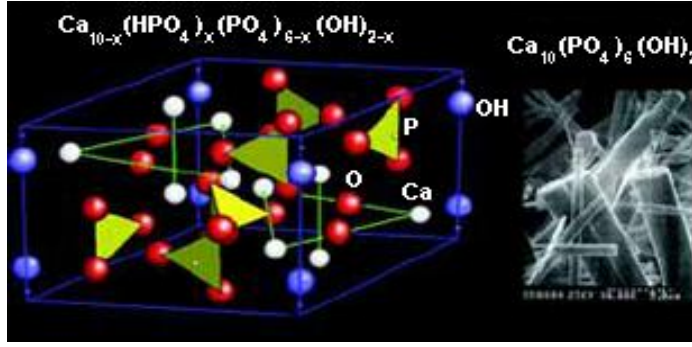
Antimikrobiyal seramikler direkt insanlarla temas halinde olabileceklerinden biyolojik uyumluluğa sahip olmaları gerekmektedir. Kalsiyum fosfat bazlı biyoseramikler 22 yıldır tıbbi alanda ilaç, ortopedik kaplamalar, diş ve implant olarak kullanılmaktadır. Kalsiyum fosfat seramiklerin kararlı fazlarının kullanımı ve üretimi ortam sıcaklığına ve suyun varlığına bağlıdır. Vücut sıcaklığında ortam solüsyonuyla birleşen sadece iki kalsiyum fosfat fazı kararlı halde bulunur. Ortam solüsyonunun pH 4.2'den küçükken dikalsiyum fosfat fazı, pH 4.2'den büyükken hidroksiapatit (HAP) fazı kararlıdır. Hidroksiapatit dokuların bünye içerisinde büyüyerek ilerleyebilmesi için 100 µm'den büyük poroziteli, boşluklu bir yapıya sahip olması gereklidir (Hench et al., 2004).

Bilindiği üzere, kalsiyum fosfat sınıfından hidroksiapatitin biyoyuymumluluğu yüksektir. Hidroksiapatit içerdiği kalsiyum ve fosfordan dolayı insan vücudu içinde yüksek uyumluluğa sahiptir ve bu özelliğinden dolayı insan vücudunun çeşitli bölgelerinde implant olarak kullanılmaktadır. Bununla beraber, hidroksiapatitin Ag^{+1} , Cu^{+2} , Zn^{+2} vb. metal iyonları ile katyon değişim hızı çok yüksektir (Hench and Wilson, 1993).

Kimyasal arınma yöntemlerinden çoğunun insan sağlığını tehdit edecek yönde zararları olduğu düşünülerek hazırlanan metal iyon katkılı antimikrobiyal seramik tozu üretiminde kullanılan metal iyonu gümüş, taşıyıcı bünye ise bu tür malzemelerin insanla temas halinde olabileceğinden dolayı biyoyuymun kalsiyum hidroksiapatit tercih edilmektedir (Doğan vd., 2005).

2.3.3.1. Kalsiyum hidroksiapatit

Canlı vücudundaki doğal kemikler büyük ölçüde apatit adı verilen kalsiyum fosfat minerallerinden meydana gelmektedir. Bu mineraller arasında kısaca HAP ve TCP olarak isimlendirilen ve hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat olarak ifade edilen iki bileşik yapay kemik üretiminde önemli yer tutmaktadır. HAP olarak tanımlanan kalsiyum fosfat bileşiğinin yapısal formülü $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ şeklinde yazılabilir. TCP ise $3CaO \cdot P_2O_5$ bileşiğidir. Bu bileşiklerin seramik tozları olarak üretilibilmeleri için çeşitli kimyasal ve termal sentezleme metodları geliştirilmiştir (Correria et al., 1996; Katsuki et al., 1999; Liu, 1998; Tas et al., 1997).



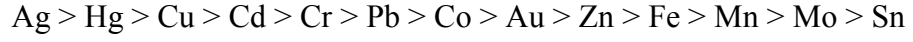
Şekil 2.6. Kalsiyum hidroksiapatit yapısı

HAP kristali, Şekil 2.6’da görüldüğü gibi birbirine yakın konumda Ca^{2+} , PO_4^{3-} ve OH^- gruplarını içerir ve hegzagonal yapıdadır. Saf HAP, Ca/P molar oranı 1.66, Ca/P ağırlık oranı 2.151, ağırlıkça % 18.35 P ve % 39.48 Ca teorik kompozisyonuna sahiptir. Ticari olan veya olmayan yoğun HAP malzemeleri için verilen safsızlık bilgileri yaklaşık β -TCP/HAP oranı hakkında da bilgi verir. Ca/P mol oranı 1.66 ise yapı sadece HAP’dır. Ca/P mol oranı 1.66’dan küçükse sinterleme şartlarına ve sıcaklığına bağlı olarak sinterlenmiş malzemede HAP fazıyla birlikte β -TCP, $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ veya $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ fazları bulunabilir. Ca/P mol oranı 1.66’dan fazlaysa CaO, HAP fazıyla birlikte görülebilir. Buna ek olarak hazırlamada kullanılan orjinal reaktiflerin içinden minör ve eser elementler gelebilir (Nriagu and Moore, 1984).

Sentetik hidroksiapatit tozları genellikle mikron altı boyutlardadır. Bu tozlar granül veya blok parçalar halinde şekillendirildikten sonra yüksek sıcaklıklarda pişirilmek suretiyle canlı vücudundaki sert dokuların tamiri veya değiştirilmesi amacı ile kullanılan seramikler haline dönüştürülmektedir. Sentetik HAP’ın en büyük avantajı canlı vücudundaki yumuşak dokularla fevkalade uyum göstermesidir. HAP’ın biyoaktivitesi yüksektir, canlı vücuduna girdikten kısa bir süre sonra kendi üzerinde doğal kemik dokunun yerleşmesine imkan tanır ve vücudun doğal kemik dokusunun gelişmesinde ve çoğalmasında önemli rol oynar (Balçık et al., 2007).

Bilindiği üzere bazı metal iyonları da mikroorganizmalar metabolizmalarına girmekte ve enzimlerini etkisiz hale getirmektedir. Diğer bazı sistemler ise hidrojen peroksit oluşturarak bakterilerin ölmesine sebep olmaktadır. Bu mekanizmaların açıklanması için çalışmalar devam etmektedir.

Metal iyonlarının mikroorganizmalara karşı gösterdikleri direnç sıralaması aşağıda verilmektedir;



Gümüş metalinin diğer metallere göre daha sık kullanılmasının nedenleri;

- Mikroorganizmalara karşı en dirençli metal olması
- Vücuda karşı zararlı etkilerinin bulunmaması
- Çoğu malzemeye göre nispeten daha ucuz olması
- Kolay üretim işlemidir.

Tıbbi klinik ürünlerde en çok kullanılan gümüş bileşimi gümüş nitrattır (AgNO_3). Çünkü AgNO_3 gümüş iyonlarını en çabuk serbest bırakabilen maddedir (Zhao and Stevens, 1998). Gümüş iyonlarının antimikrobik etki mekanizması onların enzim ve proteinlerindeki tiyol (sulfidril, -SH) gruplarıyla yakın ilişkisine bağlıdır. Bununla birlikte muhtemelen başka hedef yerleri de vardır. *P. aeruginosa* 'nın bölünmesini inhibe eder; hücre zarı ve içeriğini bozar. Virüs etki -SH gruplarına bağlanma sonucudur. Mantar gruplarına bağlanarak bunlar üzerine etkili olur. Gümüş, mikroorganizmalardan K^+ salınımına neden olur; sitoplazma ve sitoplazma membranındaki pek çok enzim gümüş etkisinin hedef yeridir. Gümüş iyonları nükleik asitlerle de ilişkiye girer (Öztürk, 2004).

2.3.3.2 Gümüş ve etkisi

Gümüş, elementlerin periyodik tablosunda simgesi Ag olan, beyaz, parlak, kıymetli bir metalik elementtir. Atom numarası 47, atom ağırlığı 107.87 g'dır. Ergime noktası 961.9°C, kaynama noktası 1950°C ve özgül ağırlığı da 10.5 gr/cm³. Çoğu bileşiklerinde +1 değerliklidir. Ag sembolü Latince Argentum kelimesinden gelir.

Çok eskiden gümüş, dünyanın birçok yerlerinde az miktarda bulunan doğal gümüş kaynaklarından elde ediliyordu. Doğal gümüş; saf veya daha çok altın, bakır, cıva ve diğer metallerle alaşımlar halinde bulunuyordu. Gümüş, daha çok yer kabuğuna dağılmış bileşikler halinde bulunur. En çok rastlanan gümüş filizleri; argentit (Ag_2S) ve gümüş klorür (AgCl) olmaktadır. Arsenik veya antimonla karışmış sülfür filizleri de vardır (Anonim, 2012f).

Gümüş ve gümüş iyonlarının güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Gümüşün ilk kez M.Ö. 3100 yıllarında Mısırlılar ve M.Ö. 2500 yıllarında Çinliler ve Persler tarafından kullanıldığı bilinmektedir. Bu eski uygarlıklar enfeksiyonları ve gıda bozulmalarını önlemek amacıyla gümüş kap kullanmışlar, M.Ö. 800 yıllarına doğru gümüş, Nil nehri civarında para olarak kullanılmaya başlanmıştır. Fenikeliler döneminde su, şarap ve sirkenin gümüş şişelerde saklanılarak mikrobiyal bozunmalarının engellendikleri söylenmektedir. Romalıların yaralanmalarda, kırılmalarda ve deri hastalıklarında gümüş nitrat kullandığı bilinmektedir. M.Ö. 69 yılındaki ilaç kitaplarında gümüş nitrat, mikrop öldürücü etkisi ile geçmiştir. Modern tıbbın babası sayılan Hipokrat notlarında gümüşün iyileştirici ve enfeksiyon oluşumunu azaltıcı bir madde olduğunu belirtmiştir.

Kolloidal gümüşün doğu tıpta asırlardır mikroorganizmalara karşı etkili bir ajan olarak kullanılmış olmasına rağmen, batılı bilim adamları antibakteriyel özellik taşıdığını 18. yüzyıl sonunda tespit etmişler ve 19. yüzyılda en etkin antibakteriyel madde olarak tanıtmışlardır. Bu dönemde bilim adamları insan vücut sıvısının kolloidal olduğunu da bildirmişler. 19. yüzyılın başında kolloidal gümüş en iyi antibakteriyel ajan olarak dikkatleri çekmiştir.

Fakat antibiyotik, keşfedildikten sonra kolloidal gümüş yerine kullanılmaya başlanmıştır. Bu keşiften sonraki 30 yıllık zaman zarfı içinde pek çok bakteri türleri antibiyotiğe karşı ciddi probleme yol açabilecek direnç geliştirmeye başlamıştır. 1870 yılından beri özellikle kolloidal gümüş bakterilerin direnç geliştirmelerine imkan vermeme özelliğinden dolayı antimikrobiyal kullanım için yeniden talep edilmeye başlanmıştır (Yan and Cheng, 2003).

1884 yılının başında Alman asıllı, kadın doğum uzman doktoru Crede, yeni doğan bebekte doğum sonrası oluşan enfeksiyonun neden olduğu körlüğü yok etmek için % 1 gümüş nitrat çözeltisini kullanmıştır (Goodman and Gelman, 1975).

1887 yılında von Behring tifo ve şarbon hastalıklarının tedavisinde benzer çözeltiyi uygulamıştır. 1964 yılında Moyer ilk defa yanık bölgede gümüş kullanmıştır (Moyer et al., 1965). Bundan 4 sene sonra Fox, gümüş sulfadiazin'i (SSD) tıpta ilk defa değerlendirmiştir.

19. yy'ın sonlarına doğru, bir botanikçi olan İsviçreli bilim adamı Karl Wilhelm von Nägeli, gümüşteki bu mikrop öldürücü etkinin gümüş iyonlarından kaynaklandığını tespit etmiştir. 1900'lü yıllarda ise süt şişelerine gümüş paralar atılarak sütün uzun süre taze kalmasını sağlamaya çalışılmıştır. Antibiyotikler geliştirilmeden önce gümüş bileşikleri, enfeksiyonlara karşı kullanılmıştır. Gümüşün yaygın bir şekilde kullanımı, antibiyotiklerin gelişmesi ile oldukça azalmış ve son yıllarda geniş spektrumlu bir antimikrobiyal olmasından dolayı yeniden dikkatleri üzerine çekmiştir. Özellikle son yıllarda birçok antibiyotiğe karşı dayanıklı bakterilerin ortaya çıkması sonucu gümüş, antibiyotiklere alternatif bir antimikrobiyal madde olarak yeni kullanım alanları bulmaktadır (Anonim, 2012g).

Gümüş, bakır gibi, hastane ve otelin su arıtma sistemlerinde dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda bakteri ve mantar büyümelerini engellemek amacıyla gıda sanayi, tavuk çiftliği ve istiridye temizliğinde, MIR uzay istasyonu ve NASA uzay mekiğinde geri dönüşüm suyun sterilize edilmesinde ve uzay programlarında kullanılmaktadır (Searle, 1919).

Güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip metal iyonlarının kullanımlarında en büyük kısıtlama biyoyumluluklarıdır. Diğer metaller ile kıyaslandığında gümüş, insanlar için toksik (zehirli) etkisi en düşük olan elementtir. Gümüş iyonlarının bakteriler üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılmamış olmakla birlikte genellikle iki mekanizma üzerinde durulmaktadır. Bu mekanizmalardan birincisine göre gümüş iyonları, yapılarında elektron verici grup içeren proteinlerle reaksiyona girerek bu proteinleri etkisiz hale getirmektedir. Bakteri zarından besin girişi, metabolik olaylar sonucu oluşan toksik maddelerin hücre dışına atılması gibi birçok işlev zar üzerindeki proteinler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu proteinler gümüş ile kararlı kompleksler oluşturarak işlevini kaybeder dolayısıyla bakteri ölür. Gümüş iyonlarının bakteriler üzerindeki etki mekanizmalarından ikincisi ise bakteri membranından sitoplazmaya geçen gümüş iyonlarının, sitoplazmik proteinlerle ya da hücrenin DNA'sı üzerinde bulunan thio-, amino-, imidazol-, karboksil- ve fosfat gruplarıyla kompleks oluşturması ve bu molekülleri etkisiz hale getirmesiyle açıklanır (Anonim, 2012g).

Gümüş iyonlarının *E. coli* ve *S. aureus* üzerine antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Araştırmacılar, gümüşün, proteinin -SH grupları ile etkileşime girerek proteini inaktif hale getirdiği ve DNA moleküllerine etki ederek DNA'nın replikasyon yeteneğinin yitirilmesine yol açtıkları sonucuna varmışlardır.

DNA, genetik verilerin saklandığı yapı olmasından dolayı hücre için en önemli bileşiktir. Organizmanın mutasyonu ve ölümü, DNA'nın değişimi ve/veya hasarından meydana gelmektedir. Gümüş iyon varlığında hasara uğrayan proteinler, nükleer bölgesinin etrafını sararak DNA yapılarını korumaya çalışır. Böylelikle hücre merkezinde DNA molekül yoğunlaşması meydana gelir. Yoğunlaşan DNA kendi replikasyon yeteneğini kaybetmeye başlar. Bu olay sonucunda bakteri hücrelerinde hücre ölümü gerçekleşmektedir (Feng et al., 2000).

Gümüşün antimikrobiyal etkisi gümüş miktarına ve gümüş salınım oranına bağlıdır. İyonize olmuş gümüş yüksek reaktif özelliğinden dolayı bakteri hücre duvarlarını yapısal değişikliğe uğratar ve hücrenin yıkımına ve ölümüne neden olarak nükleer zarını parçalar (Lansdown, 2002; Castellano et al., 2007).

Bir valentli gümüş iyonunun (Ag^+) sulfidril veya thiol gruplarının hidrojen (H^+) ile yer değiştirdiği, böylelikle proteini inaktive ettiği, membran geçirgenliğini azalttığı ve sonunda hücre ölümüne neden olduğu bilinmektedir (Clement et al., 1994; Feng et al., 2000).

Güçlü bir antibakteriyel etkisinin olması ve toksik olmaması nedeniyle gümüş iyonları, günlük hayatta sürekli kullanılan ve mikroorganizmaların yoğun olarak bulunduğu bir çok malzeme yüzeyinin (seramik, cam, fayans, plastik, kağıt, boya, tekstil vb.) üretimi esnasında veya daha sonra kaplamalarında kullanılan materyallerde katkı maddesi olarak ilave edilmektedir (Kawashita et al., 2000).

3. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

3.1. Deride Antimikrobiale Çalışmalar

Ham derinin hayvanın sırtından yüzüldüğü andan itibaren mikroorganizma tehdidi altında olduğu ve çeşitli yöntemlerle konservasyon yapılan ham derilerin tabakhanelerde uygulanan çeşitli prosesler esnasında mikroorganizma hasarını engellemek için alınan önlemlere rağmen ki bunlar; koruma piklesi, kromla tabaklama, bitkisel tabaklama, krast ve hatta bitmiş derilerin bile mikroorganizmalar için bir besin kaynağı teşkil ettiği bildirilmiştir (Sarı vd., 2003; Bayramoğlu, 2004).

Mikroorganizmalardan zarar gören derilerde, kokuşma, yağ kusmaları, cilt bozulması ve boya düzgünsüzlükleri gibi giderilmesi zaman zaman mümkün olmayan hatalar meydana gelmektedir (Sarı vd., 2003).

Derileri mikroorganizmaların olumsuz etkilerinden koruyabilmek için ıslatma, pikle, tabaklama ve boyama gibi çeşitli işlem basamaklarında biyosid ilavesi yapıldığı farklı araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Anonymus, 2001).

Annamalai et al. (1997), fungal büyümenin deri endüstrisinde genel bir problem olduğunu, fungusların deri üretim basamaklarının çeşitli safhalarında ortaya çıkabileceğini söyleyerek, bunların fungusidlerle kontrol edilebileceğini belirtmişlerdir.

Deri endüstrisinde kullanılan fungusidler genel olarak 2 başlık altında toplanabilirler. Bunlar; fenolik (CMC,OPP,TCP) ve heterosiklik (TCMTB, OITZ, BMC, DIMTS)'dir.

Organik bir materyal olan derinin fungal zararlardan korunmasına yönelik uygulamalar zaman içerisinde geliştirilerek günümüzde TCMTB (2-(Tiyosiyanometiltiy)-benzotiyazol bazlı fungusidler, geniş spektrumlu bir antifungal ajan olarak deri sanayinde yaygın kullanım alanı bulmakta ve pikle, tabaklanmış ve krast derilerin işlentiğinde kullanılmaktadır.

Tarlea et al. (2009a), sülfonik asit formundaki metoksi grubuyla yer değiştirmiş 2-amino-6-benzothiazole'in wet-blue dana derilerin üzerine antifungal

etkisini 3 farklı mantar türlerine karşı incelemişlerdir. Derileri, *Penicillium aurantiogriseum* ve *Scopulariopsis brevicaulis* mantar türlerinden korumak için %0.5 benzothiazole esaslı fungusidin yeterli olduğunu, fakat, *Aspergillus niger* türüne karşı çalışmada kullanılan % 0.5-1 fungusit oranının yetersiz olduğunu ve 7 gün sonra bir kontaminasyon riski oluştuğunu saptamışlardır.

Diğer bir çalışmada araştırmacılar, aniyonik sülfonik grubu yerine metil, metoksi, klorür ve nitro gruplarıyla yer değiştirmiş TCMTB bazlı 4 farklı fungusidin wet-blue dana derileri üzerindeki antifungal etkisini *Aspergillus niger* ve *Trichoderma viride* mantarlarına karşı test etmişler ve incelenen 4 adet fungusidin sadece *Aspergillus niger*'e karşı etkili olduğunu ortaya koymuşlardır (Tarlea et al., 2009b).

Piyasadaki farklı aktif maddeli fungusidler ne yazık ki her fungus türüne aynı etkiyi göstermezler. Bu nedenle fungal zarara neden olan fungus türünün tespit edilerek bu fungusu inhibe edebilen spesifik fungusid türünün seçimi ve kullanılması önem taşımaktadır.

İyi bir deri fungusidinin; yüksek aktiviteli, geniş antimikrobiyal spektrumlu, deri ve işlenti kimyasalları ile uyumlu, deri üstünde stabil, renk vermeyen, çevre açısından kabul edilebilir, insanlara karşı düşük toksisiteli, uygun maliyetli olması aranan özelliklerdir.

Son dönem elde edilen bulgular TCMTB'nin çevre ve insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, daha güvenli ve çevreci fungusidlere olan artan ilgi nedeniyle araştırmacılar ve biyosit üreticileri bu konuda araştırmalarına devam etmektedir (Dalton, 2008).

TCMTB bazlı fungusidlerin kullanım oranları ve koşullarının yeniden değerlendirilmesi, çeşitli analiz yöntemleri ile üretim aşamalarında ve son üründe bulunduğu miktarların tespit edilerek kontrol altında tutulması bir ihtiyaç haline gelmiştir.

Polatdemir (2010), çalışmasında piyasada farklı ticari isimlerle satılan 5 farklı TCMTB bazlı fungusid ile muamele edilen wet-blue koyun derilerinde ve flottelerinde bulunan TCMTB miktarlarını UV spektrofotometresi ve HPLC analiz yöntemleri ile değerlendirerek, uygulanan derilerde ve ticari ürünlerde TCMTB konsantrasyonlarını tespit etmiştir. Aynı zamanda kalıntı miktarlarının

derilerin fungal direncine olan etkisini tropik çember testi ve ASTM D4576 yöntemine göre, deride en sık karşılaşılan fungus türlerinden biri olan *Aspergillus niger* mikroorganizmasına karşı test etmiştir.

Şu anda deri sanayinde fungusit olarak kullanılan kimyasalların çoğu, çevre ve güvenlik bakımından tehlikelidir. Uçucu yağlar, deri ve deri ürünlerinin mikroorganizmalar tarafından bozulmasının önlenmesinde büyük bir potansiyele sahiptirler. Uçucu yağlar, doğal bir organik madde olduklarından biyolojik olarak parçalanabilir ve böylece, çok az veya hiç bir çevresel tehlike oluşturmamaktadırlar. Fakat uçucu yağlar ekstraksiyonunun zor ve pahalı bir yöntem olduğu da bilinmektedir.

Bayramoğlu (2004), yaptığı bir çalışmada *Origanum minutiflorum* (kekik), *Laurus nobilis* (defne), *Foeniculum vulgare* (rezene) ve *Schinus molle* (yalancı karabiber) uçucu yağlarının deri işlentisi sırasında problem teşkil eden *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium rubrum* ve *Trichoderma viride* funguslarına karşı fungisid olarak kullanımını araştırmıştır. Araştırma bulgularına göre kekik uçucu yağının diğer uçucu yağlara göre daha fazla antifungal etkiye sahip olduğu ve % 2 oranında kekik uçucu yağı ile muamele edilen derilerin bazı deney funguslarına karşı ticari fungisid içeren deri numunelerinden bile daha dayanıklı olduğunu tespit edilmiştir.

Diğer bir çalışmada ise *Origanum minutiflorum* (kekik) ve *Schinus molle* (yalancı karabiber) uçucu yağları ile muamele edilen wet-blue koyun derilerinin *Bacillus cereus* (CCM 99), *Pseudomonas aureginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 27999) ve *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) bakterilerine karşı antibakteriyel etkisi incelenmiştir. Çalışma sonucunda, kekik uçucu yağının yalancı karabiber uçucu yağına göre daha fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğu ve % 1 oranında kekik uçucu yağı ile muamele edilen derilerin gram-pozitif bakterilere (*B. cereus* ve *S. aureus*) karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Bayramoğlu et al., 2008).

Akpomie (2010), çalışmasında ayakkabılık deri örnekleri portakal çekirdeği yağının % 5'lik ekstraktı içine daldırılmış ve 4 saat bir orbital çalkalayıcıda çalkalanmış, sonra her bir örnek açık havada bırakılmış ve her gün üzerinde mantar üremesi gözlenmiştir. Çalışma sonucunda, deri ürünlerinin bozulmasına neden olabilen mantarlara karşı koruyucu etkisi saptandığı söz konusu yağın, bazı

deri işlem basamaklarında, ve/veya ayakkabı parlatici veya diğer ayakkabı muamele ajanları içine ilave edilmesi tavsiye edilmiştir.

Ocak (2010) tarafından yapılan çalışmada, antifungal astarlık deri üretimi için, etken madde olarak uçucu ve ayak mantarlarına karşı antifungal özelliğe sahip olan *Melaleuca alternifolia* yağı, mikrokapsül duvar materyali olarak ise biyolojik olarak parçalanabilir ve gözenekli yapısından dolayı doğal bir polimer olan jelatin kullanılmıştır. Mikrokapsülasyon işlemine tabii tutulan antifungal ajan kullanılarak elde edilen astarlık derilerin, ayak mantarına sebep olan test mikroorganizmalarına karşı daha uzun süre antifungal özellik kazandığı saptanmıştır.

Menteş Çolak et al. (2010), deri endüstrisinde kullanılan insan sağlığına ve çevreye zararlı biosidlerin yerine, bitkisel tabaklama maddeleri içinde de doğal olarak yer alan ve toksikolojik etki göstermeyen tannik asidin kullanılabilirliği üzerine yaptıkları çalışmada çeşitli oranlarda tannik asidi pikle prosesinde flotteye ilave etmişlerdir. Disk Difüzyon Metodu'nu kullandıkları araştırmada pikle banyosuna % 3 oranında ilave edilen tannik asidin diğer oranlara kıyasla *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella typhimurium* (CCM 5445), *Proteus vulgaris* (ATCC 6889), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Neisseria canis*, *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus*, *Penicillium granatum*, *P. granulosum*, *Geotricum candidum*, *Yarrowia lypolitica* ve *Rhodotorula rubra* (DSM 70403) mikroorganizmaları üzerinde daha etkili olduğunu tespit etmişler ve pikle prosesinde tannik asidin alternatif antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Günümüzde nanoteknoloji, tüm sektörlerde olduğu gibi deri sanayinde de uygulanmaktadır. Lu et al. (2009) tarafından yapılan çalışmada, oxazolidine-nano-SiO₂ ile tabaklanmış derinin antifungal etkisi, kontrol krom tabaklanmış deriye kıyasla *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* ve *Paecilomyces bainier* karşı test edilmiştir. Çeşitli mantarlar için farklı yöntemler ile modifiye edilmiş numunelerin nitel antifungal etkisini belirlemek için çift plaka yöntemi uygulanmıştır. Krom tabaklanmış derilerin üzerinde test fungusların üremesi 3 günlük inkübasyon sonunda gözlenmiş, oxazolidine-nano-SiO₂ kombinasyonu ile tabaklanmış derilerin üzerinde funguslar 6 gün sonra üremiştir. Çalışma sonucunda, nano-SiO₂ ile muamele edilen derilerin geleneksel wet-

blue'ye göre funguslara karşı daha yüksek bir direnç gösterdiği ortaya konulmuştur.

Lkhagvajav (2009), çalışmasında sol-jel yöntemiyle üretilmiş nano Ag, TiO₂ ve Ag-TiO₂ filmlerinin astarlık derilerde antimikrobiyal madde olarak kullanılabilirliğini araştırmıştır. Bakterilerden *Staphylococcus aureus* ve *Escherichia coli*, mayalardan *Candida albicans* ve filamentöz bir fungus olan *Aspergillus flavus*'a karşı yapılan antimikrobiyal testler sonucunda TiO₂ oranla Ag ve Ag-TiO₂ nanopartiküllerinin deride düşük konsantrasyonlarda bile iyi bir antimikrobiyal özelliğe sahip olduklarını tespit etmiştir.

Nawaz et al. (2011) çöktürme yöntemiyle sentezledikleri nano ZnO'ni antibakteriyel deri elde etmek amacıyla keçi derisinin retanaj işlemi sırasında uygulamışlardır. İşlenmiş krast derileri, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Clostridium perfringens* türlerine karşı antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesi için Disk Difüzyon yöntemine tabi tutulmuş ve deri örneklerinin etrafındaki inhibisyon zonları gözlemlenmiştir. Çalışma sonucunda, nano ZnO'in deri kalitesini etkilemeden bakterilerin büyümesini inhibe ettiği tespit edilmiştir.

3.2. Metal İyonu Katkılı Kalsiyum Fosfat Uygulamaları

Epidemik hastalıkların oluşturduğu risk bilim adamlarını daha sağlıklı bir yaşam için yeni ürünler üretmeye itmektedir. Son on yıl içinde antibakteriyel sistemlerden oluşan özellikle metal iyon esaslı antibakteriyel sistemler üzerinde çok sayıda çalışma yürütülmüştür. Antibakteriyel özellik gösteren biyomalzemelerin geliştirilmesi ve uygulama alanları bulması bu çalışmalar dahilindedir. İmplantasyon sonrası oluşan bakterilerin neden olduğu iltihaplanmayı önlemek için biyomalzemelerin yapısına gümüş iyonlarının katılması biyomühendislikte sıkça tercih edilen yöntemlerden biridir.

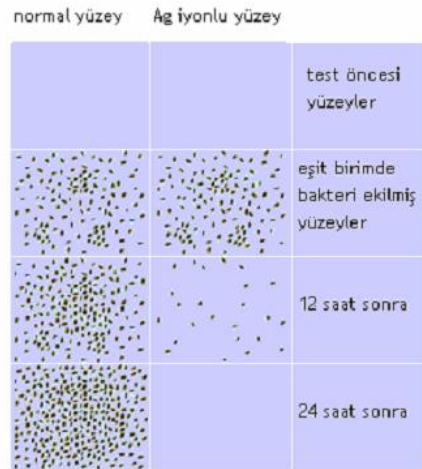
Literatür araştırmalarında gümüş katkılı hidroksiapatitin deride kullanılması ile ilgili spesifik bir araştırmaya rastlanamamış, ancak bu konuya ilişkin bazı sektörlerde yapılan ve konuya yakın ilgisi olduğu düşünülen diğer araştırmalar aşağıda özetlenmiştir.

Doğan ve Pekşen'in (2005) yaptığı bir çalışmada metal iyonu katkılı kalsiyum fosfat esaslı antimikrobiyal seramik tozu yaş kimyasal yöntemi kullanılarak elde edilmiş ve farklı mikrobiyolojik analiz yöntemleri ile test

edilmiştir. Halo test metodu kullanılarak yapılan mikrobiyolojik analiz ile metal iyonu katkılı tozun *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyel etkinliği saptanmıştır. Ayrıca, dilüsiyon yöntemi ile *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı bakteristatik ve bakterisidal etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar elde ettiği antimikrobiyal tozu katı üzerinden % 3-5 aralığında kullanarak karo sırasına, duvar yüzeyi kaplaması için kullanılan boya malzemesine, plastik malzemenin üst katmanına antimikrobiyal özellik kazandırmışlardır. Diğer bir uygulama olarak % 1-3 oranında antimikrobiyal tozu sargı bezi ve ayakkabı keçesine emdirerek hastaya yönelik olarak antimikrobiyal malzemeler elde etmişlerdir.

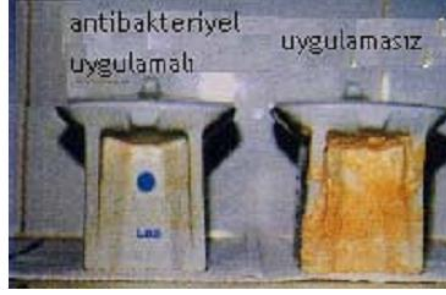
Yüksek verimlilik, uzun kullanım süresi, maliyetleri ve elverişlilik gibi karakteristik özelliklerinden dolayı, inorganik antibakteriyel seramikler yaygın kullanım alanına sahiptirler (Kawashita et al., 2000)

Gümüş iyonları eklenerek geliştirilen sırlar, kendi kendini bakterilerden arındırarak insan sağlığı için hiçbir tehdit oluşturmada Şekil 3.1' de görüldüğü gibi seramik yüzeylerde bakterilere karşı % 99.9 koruma sağlamaktadır.



Şekil 3.1. Ag'li yüzeyin sırt bünyesindeki antibakteriyel etkisi

Böylece birçok insanın kullanımı sonucu bakteri yoğunluğunun fazla olduğu alışveriş merkezleri, eğlence yerleri, lokantalar gibi mekanlarda bakterilerin yayılması riski azaltılmaktadır. Şekil 3.2'de antibakteriyel seramik katkılı ve katkısız vitrifiye ürünleri görülmektedir (Gençer, 2006).



Şekil 3.2. Antibakteriyel sırlı geleneksel vitrifiye ürünü

Antibakteriyel seramikler yalnızca ev içindeki bakterileri öldürmek ve bakterisel hastalıkların etkilerini önlemek için değil, bakterilerin açık havadaki etkilerini önlemek için de kullanılır. Antibakteriyel uygulamalı seramiklerde yıkanma ve aşınma problemi olmamaktadır. Aynı zamanda antibakteriyel tozlar ürünün görünümünü ve üretimini etkilememektedir (Doğan vd., 2000).

Pekşen (2006), çalışmasında metal iyonu olarak Ag^{+1} ve Ag^{+1} ile Zn^{+2} kullanarak yaş kimyasal yöntemle metal iyonu katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozlar elde etmiş ve onların satandart maya ile bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğini incelemiştir. Mikrobiyolojik analiz sonucunda, tozlara katılan metal iyonları oranlarının artması ile antimikrobiyal özelliklerinin de arttığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte, yapılan sitotoksik deneyler sonucu metal iyonu katkılı tozların belirli dozlarda hücre büyümesine sebep oldukları ve sitotoksik etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

Gençer (2006), kalsiyum fosfat bazlı antibakteriyel seramik tozunu yaş kimyasal yöntem ile sentezlemiş ve antibakteriyel emayeler elde etmek amacıyla emaye bileşimi içine ilave etmiştir. Antibakteriyel emaye yüzeyinin zararlı patojenik mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivitesini incelemek için bakteri kontak testleri gerçekleştirilmiştir. Antibakteriyel aktivite testi için indikatör bakteri olarak günlük hayatta insanların en çok rastladıkları *Escherichia coli* bakterisi seçilmiştir. Analiz sonucunda, % 0.5 antibakteriyel tozun emaye kompozisyonuna ilavesiyle bile emayenin antibakteriyel özellik gösterdiği saptanmıştır.

Koyaş (2006), metal iyonu katkılı kalsiyum fosfat esaslı antibakteriyel inorganik tozu yaş kimyasal yöntem ile nano boyutlarda elde etmiştir. Üretilen tozlar tamamen hidroksiapatit yapısında oluşmuştur. Antibakteriyel özellikte seramik filtreler elde etmek amacıyla sentezlenen tozlar farklı oranlarda bir

döküm çamuruna katılmıştır. Çalışmada yapılan antibakteriyel analiz sonuçlarına göre, antibakteriyel toz içerisine katılan gümüş miktarının artması ile bakteri oranında azalma görülmüş, % 7 oranında antibakteriyel toz içeren filtrede bakteriler tamamen öldürülmüştür.

Lv et al. (2006), gümüş konsantrasyonu azaltılarak fakat aynı derecede antimikrobiyal etki gösteren malzemenin elde edilebilmesi için gümüş katkı hidroksiapatit içerisine TiO_2 ilave etmişlerdir. Söz konusu malzemenin tekstil üzerindeki antibakteriyel aktivitesi bakterilere karşı test edilmiş ve disk difüzyon testi sonucu gümüş etkisinin katıldığı miktara bağlı olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir deyişle, kompozit malzemedeki gümüş iyonu konsantrasyonu arttıkça antibakteriyel aktivitesi de artmıştır. Gümüş iyonu konsantrasyonu sabit tutularak TiO_2 ilave edilen malzemeler TiO_2 katılmamış malzemelere göre daha iyi antibakteriyel özellik göstermişlerdir. Üstelik, TiO_2 ilavesi kompozit materyallerin renk bozulmalarını da engellemiştir.

Çavdar (2009) tarafından yapılan çalışmada, yaş kimyasal metodu kullanılarak metal iyonları katkı kalsiyum fosfat esaslı antimikrobiyal toz sentezlenmiş ve uygun bağlayıcı kimyasallar belirlenerek tekstil ürünlerine yönelik yıkamaya dayanıklı antimikrobiyal apre kimyasalı geliştirilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testleri “JIS L 1902-2002” standardına göre *Escherichia coli* bakterisine karşı yapılmıştır. Analizler sonucunda, antimikrobiyal apre kimyasalı ile işlem görmüş pamuklu ve PES kumaşların 20 yıkama sonuna kadar kuvvetli olarak antimikrobiyal etkinliklerini koruduğu, modal ve yünlü kumaşlarda ise yıkama ile beraber antimikrobiyal özelliklerinin azalmasına rağmen, 20 yıkama sonuna kadar kumaşların antimikrobiyal etkinliklerini koruduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, antimikrobiyal apre kimyasalının kumaşların fiziksel özelliklerini olumsuz yönde etkilemediği de tespit edilmiştir.

Çelik (2011), çalışmasında gümüş katkı hidroksiapatit (Ag-HAP) malzemesini EDTA şelat dekompozisyonu metodu ile sentezlemiş ve gümüş katkısının artması ile malzemenin antibakteriyel özelliğinin de artmasını gözlemlemiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. Materyal

4.1.1. Deri materyali

Çalışmada deri materyali olarak kullanılan aynı partiye ait, benzer özelliklere sahip 8 adet kromlu (crust) krast astarlık keçi derisi kullanılmıştır. Derilerin alt işlentisi sırasında hiçbir bakterisit ve fungusit kullanılmamıştır. Deriler, İzmir Menemen’de faaliyet gösteren firmadan tedarik edilmiştir.

4.1.2. Kimyasal maddeler

Araştırmada; gümüş katkılı hidroksiapatit çözeltisinin hazırlanmasında başlangıç malzemeleri olan kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), gümüş nitrat (AgNO_3) Merck firmasından; deri kaplamasında kullanmak üzere, penetratör YM-905 ve % 12’lik hidrolak EL-8181, VERBO firmasından temin edilmiştir. Mikrobiyolojik çalışmalarda PDB (Potato Dextrose Broth), Agar, etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), sodyum tiyoglikolat Merck firmasından, SDB (Saboroud Dextrose Broth), MHB (Mueller Hinton Broth) ve Tween-20 Fluka firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Deneylerde çözücü olarak ultra saf su kullanılmıştır. ICP-OES cihazında gümüş tayini için kullanılan gümüş standardı TETRA Teknolojik Sistemler Ltd. Şti (İzmir) firmasından tedarik edilmiştir.

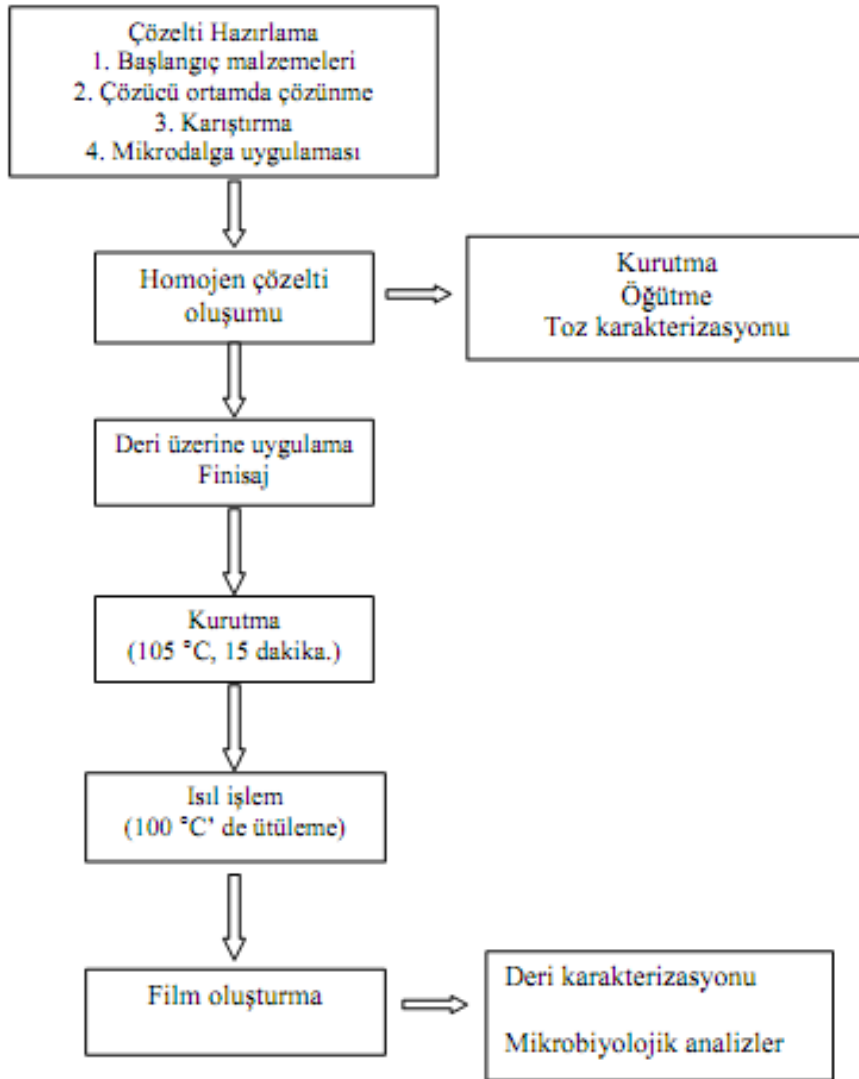
4.1.3. Test mikroorganizma kültürleri

Test mikroorganizmaları olarak kullanılan gram negatif bakteri *Escherichia coli* ATCC 12228, gram pozitif bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P, maya türü *Candida albicans* ATCC 10239; filamentöz funguslar *Aspergillus niger* TEM ve *Trichoderma viride* TEM kültürleri Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve E.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Bölümü’nden temin edilmiştir. *Candida albicans* ve bakteri kültürleri Müller Hinton Agar’da (MHA, Merck), *Aspergillus niger* TEM ve *Trichoderma viride* TEM ise Potato Dextrose Agar’da (PDA, Merck) buzdolabında stoklanmıştır. Araştırmada kullanılan mikroorganizma kültürleri, literatür taraması sonucunda deride en sık rastlanan fungus türleri ve antimikrobiyal testlerde en çok tercih edilen bakteri türleridir. Ayrıca, (% 0-5) gümüş katkılı hidroksiapatit

çözeltilerinin geniş skalada *in vitro* MIC değerlerinin saptanmasında ve (% 0-5) Ag-HAP ile işlem gören derilerin AATCC 147 testinde (Paralel çizgi yöntemi) ek olarak *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 bakterileri kullanılmıştır.

4.2. Yöntem

Araştırmada kullanılan (% 0-5) gümüş katkılı hidroksiapatit çözeltilerinin üretimi ve deriye uygulanmasındaki işlemlerin genel akış şeması Şekil 4.1’te gösterilmektedir. Bu şema, çözeltilerin hazırlanması, deri örneklerinin kaplanması, ısıl işlem ve film oluşturulmasını içermektedir.



Şekil 4.1. HAP çözeltilerinin üretimi ve deriye uygulanmasına ilişkin genel akış şeması

4.2.1. Gümüş katkılı hidroksiapatit çözeltilerinin hazırlanması

Gümüş katkılı ve saf hidroksiapatit çözeltileri mikrodalga yöntemi ile hazırlanmıştır (Rameshbabu et al., 2006). Bunun için başlangıç malzemesi olarak kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), diamonyum hidrojen fosfat ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), gümüş nitrat (AgNO_3), çözücü ortam olarak da ultra saf su kullanılmıştır.

Önce AgNO_3 saf suda oda sıcaklığında iyice karıştırılarak çözündürülmüştür. Bir başka cam beherde saf su ile karıştırılarak 0.3 M kalsiyum hidroksit süspansiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra gümüş nitrat çözeltisi kalsiyum hidroksit süspansiyonu üzerine yavaş yavaş damlatılıp karıştırılarak ilave edilmiştir. Bu çözeltiye 0.3 M diamonyumhidrojen fosfat 5 dk kuvvetli karıştırılarak eklenmiştir. Hazırlanan çözelti beherin üzeri kapatılmadan hemen 30 dk süresince mikrodalga fırınına konulmuştur. Mikrodalga uygulaması sonucu oluşan çökelekteki NH_4^+ ve NO_3^- iyonlarının uzaklaştırılması için, çökelek saf su ile yıkanmıştır. Böylece çeşitli konsantrasyonda (% 0.5–5) gümüş içeren kolloidal pasta şeklindeki hidroksiapatit çözeltileri elde edilmiş ve daha sonraki uygulamalarda kullanılmıştır. XRD, XRF, ICP-OES, SEM-EDS analizlerinin yapılması için çözelti 100°C sıcaklıkta etüvde 12 saat kurutulduktan sonra öğütülmüş ve toz şekline getirilmiştir. Kontrol olarak kullanılan saf hidroksiapatit çözeltisi gümüş nitrati ilave edilmeksizin aynı yöntemle hazırlanmıştır.

4.2.2. Gümüş katkılı hidroksiapatit karakterizasyonu

4.2.2.1. X-ışınları difraksiyonu (XRD) analizi

XRD, katı ve toz örneklerin yapılarındaki çeşitli kristal formlar veya fazlar hakkında bilgi veren analitik bir tekniktir. Bu teknik malzemenin içerdiği fazlar ve bu fazların konsantrasyonu, kristal olmayan fazların miktarı ve kristal boyutu hakkında bilgi vermektedir. Üretilen (% 0–5) Ag-HAP tozlarının faz analizi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan XRD (Phillips X'Pert Pro) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.2). XRD analizleri 10 – 50° açıları arasında $2^\circ/\text{dk}$ hız ve ile yapılmıştır.



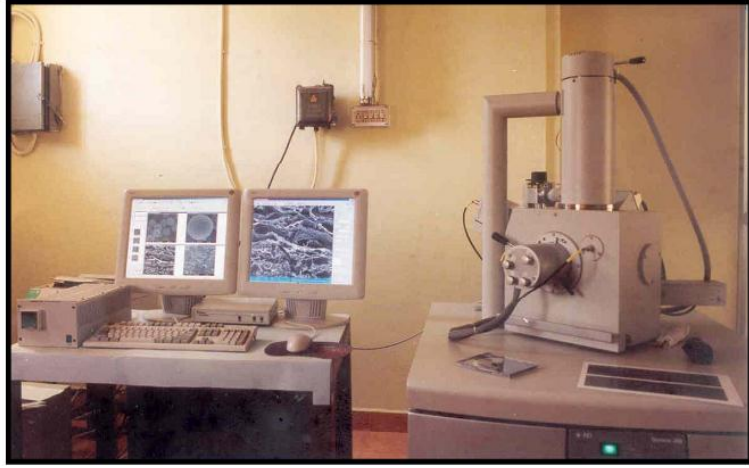
Şekil 4.2. X-ışınları Difraksiyonu (XRD) cihazı

4.2.2.2. Taramalı elektron mikroskobu-enerji dispersif spektrometre (SEM-EDS) analizi

Taramalı elektron mikroskobu katı haldeki numunenin yüzey morfolojisini incelemek için geliştirilen analitik metotlardan biridir. Taramalı elektron mikroskobunun çalışma prensibi; yüksek voltaj altında hızlandırılmış elektronların bir numune üzerine gönderilmesi sonucu, elektronlarla numune atomları üzerinde oluşan çeşitli etkileşimlerden yararlanılarak görüntü elde etme şeklindedir.

Bu cihaz ile malzemelerin mikro ve nano boyuttaki yapılar görüntülenebilmektedir. Cihazdaki SE (ikincil elektron) dedektörü ile topografik üç boyutlu görüntü, BSE dedektörü ile atomik kontrasta bağlı iki boyutlu görüntü elde edilmektedir. EDS (enerji dağıtan spektroskop) ise genellikle SEM cihazına takılır. Enerji dağıtan X-ışınları dedektörü ile yapıların elementel içeriği nitel ve nicel olarak belirlenebilmektedir. Ayrıca haritalama yöntemi ile resim üzerinde elementlerin dağılımı izlenebilmektedir. Onun için SEM-EDS eş zamanlı olarak örneğin hem morfolojisini hem de esas bileşimini tespit eder.

Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda (% 0–5) gümüş içeren hidroksiapatit tozlarının yüzey morfolojilerini belirlemek amacıyla JEOL JSM–6060 marka taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDS) kullanılmıştır. Şekil 4.3’de analizde kullanılan, Dokuz Eylül Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Bölümüne ait SEM-EDS cihazının resmi gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu-Enerji Dispersif Spektrometre cihazı

4.2.2.3. X-ışını floresans spektrometresi (XRF)

Enerji dağılımı X-ışını floresans analizi (XRF), sıvı, katı toz her çeşit numunede elementel analiz yapmak için kullanılan en iyi analitik tekniklerden biridir. X-ışınları Floresan (XRF) spektroskopisi elementel analiz ve kimyasal analiz amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemin başlıca avantajları kısa analiz süresi, duyarlılık, kullanım kolaylığı, hasarsız inceleme yöntemi olması ve düşük fiyatlı ekipmanlarla gerçekleştirilebilmesidir.

X-ışınlarına maruz kalan malzemelerin atomları iyonize olurlar. İyonize olan atomlar bir veya daha fazla sayıda elektron kaybederler. Yüksek enerjili x-ışınları atomların daha içteki yörüngelerinden elektronların koparılmasını sağlayabilir. İç yörüngeden elektron yitirilmesi bu yörüngede bir boşluk oluşmasına ve üst yörüngelerdeki elektronların bu boşluğu doldurmasına neden olmaktadır. Bu durumda iki yörünge arasındaki enerji farkına karşılık gelecek şekilde foton biçiminde enerji açığa çıkar. Bu ışıma malzemede bulunan atomların karakteristik enerjisine sahip radyasyon biçiminde gerçekleşir. Bu enerjilerin tespit edilmesi ile malzeme nicel ve nitel olarak karakterize edilir. Elde edilen (%0–5) Ag-HAP tozlarının XRF analizi İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan XRF (Spectro IQ II) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. X-ışını Floresans Spektrometre cihazı

4.2.2.4. ICP-OES (Endüktif eşleşmiş plazma – optik emisyon spektrometresi) analizi

ICP-OES, birçok elementin aynı anda nicel tayininde kullanılan analitik metotlardan biridir (Skoog vd., 1998). ICP-OES, 70 civarında kimyasal elementin eser, minör ve majör konsantrasyon düzeylerinde analizine olanak tanıyan hızlı bir tekniktir. Çok sayıda örneğin hızlı bir şekilde ölçülebilmesine olanak tanıdığından çevresel analizler için etkin ve tercih nedenidir. ppb'den, % mertebesine kadar geniş bir ölçüm aralığına sahiptir. ICP-OES, nadir toprak elementlerinin saptanmasında tercih edilen önemli bir tekniktir. Her element kendine özgü enerji düzeylerine bağlı olarak emisyon yapabilecekleri dalga boylarına sahiptir. Dalga boyu ve emisyon şiddeti ölçülerek bir örnekte bulunan elementler ve miktarları saptanabilmektedir.

Üretilen (% 0–5) Ag-HAP tozlarının ICP analizleri, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Mühendisliği Bölümü'ndeki ICP-OES (Perkin Elmer Optima 2000) cihazında yapılmıştır (Şekil 4.5).

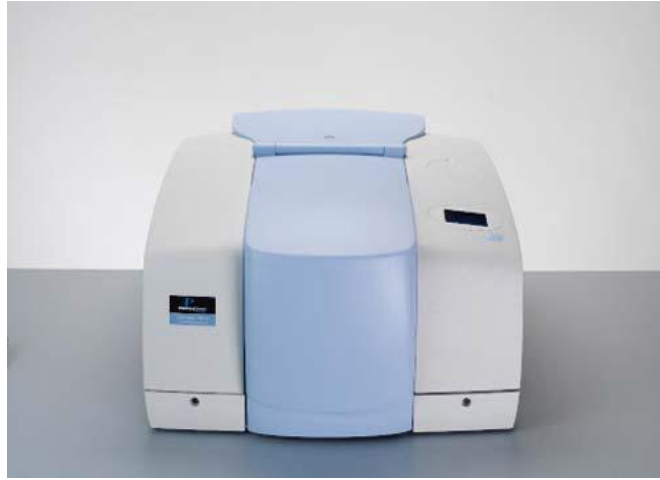


Şekil 4.5. Endüktif Eşleşmiş Plazma – Optik Emisyon Spektrometre cihazı

Öğütülmüş (% 0-5) Ag-HAP toz numunelerinden 1 g $\pm$ 0.001 g tartılarak beherlere konulmuştur ve üzerine 5 ml derişik HNO₃ asidi (% 65'lik, Merck) ilave edilmiştir (Hu et al., 2007). Tozlar çözündükten sonra çözeltiler 10 ml'lik balon jodelere alınmış ve ultra saf su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. Gümüş iyonu değelerinin ICP-OES cihazında okutulması 2 paralel üzerinden yapılmıştır.

4.2.2.5. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir; IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. Her dalga boyunu ayrı ayrı tarama gerekmeksizin hızlı ve yüksek çözünürlükte spektrumlar elde edilebilir. Bu yöntem ile, molekül bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı, yapıdaki bağların durumu ve bağlanma yerleri belirlenebilir. FTIR analizleri, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Mühendisliği Bölümü'ndeki FTIR (Perkin Elmer Spectrum 100) cihazında yapılmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi cihazı

4.2.3. Hidroksiapatitin deriye uygulanması

Astarlık keçi deri örneklerinin cilt yüzeyine % 0.5, % 1, % 1.5, % 2, % 3 ve % 5 gümüş katkılı hidroksiapatit çözeltileri ve ayrıca saf hidroksiapatit çözeltisi pistole yöntemi ile finisaj karışımı içinde (HA:lak:su) 1:1:1 oranlarda ve toplam hacim üzerinden % 5 penetratör eklenerek uygulanmış ve karışımın deriye nüfuz edilmesi sağlanmıştır. Daha sonra ince filmin oluşması için deri örnekleri 105°C

sıcaklıkta etüvde 15 dakika bekletilip kurutulmuş ve numuneler 100°C’de ütü-pres işleminden geçirilmiştir. İşlem görmüş deri örnekleri mikrobiyolojik çalışmalar için polietilen poşetlere konulup buzdolabında saklanmıştır.

4.2.4. Hidroksiapatit uygulanan derilerin karakterizasyonu

4.2.4.1. Derilerin yüzey morfolojilerinin SEM ile incelenmesi

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) katı haldeki numunenin yüzey morfolojisini incelemek için geliştirilen analitik metotlardan birisidir. % 0–5 gümüş katkılı hidroksiapatit uygulanan deri örneklerinin yüzey morfolojileri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi’nde bulunan taramalı elektron mikroskobunda (FEI marka Quanta 250 FEG) incelenmiştir. Deri numuneleri örnek tutucu üzerine konularak saçılımlı kaplayıcı ile (sputter coater) (EMITECH marka K550X model) altınla kaplanmıştır. Daha sonra numuneler taramalı elektron mikroskobuna yerleştirilerek görüntüleri çekilmiştir.

4.2.4.2. Derilerdeki gümüş miktarının ICP-OES cihazında tayin edilmesi

Hidroksiapatit çözeltileri ile muamele edilen derilerin gümüş içeriğini belirlemek ve hesaplanan gümüş miktarları arasında fark olup olmadığını tespit etmek amacıyla deriler yaş yakma işlemine tabi tutulmuştur. Yaş yakma işlemi tamamlandıktan sonra değerlerin kantitatif ölçülmesi ICP-OES’de yapılmıştır.

Araştırma materyali olan deri örnekleri TS EN ISO 4044 (2009) “Deriler - Kimyasal Deneyler - Kimyasal Deney Numunelerinin Hazırlanması” başlıklı standartlarda belirtildiği şekilde test ve analizlere hazırlanmıştır. Deri örnekleri 50°C’yi geçmeyen sıcaklıkta ön kurutma işlemine alınmışlar, daha sonra 20°C sıcaklık ve % 65 bağıl nemli standart ortamda tutularak kondisyonlanmıştır. Kondisyonlama süresi sonunda örnekler 700-1000 devir/dakika dönüş hızına sahip ve 4 mm çaplı delikli elek tablası olan, Retsch Mühle marka kesici-öğütücü değirmende öğütülmüştür. Öğütülen deriler analiz süresince hava almayacak şekilde naylon poşetlerde muhafaza edilmiş ve analizlerin öncesinde 104±2°C’ye ayarlanmış etüvde 2 saat bekletilmiştir. Etüvde kurutulan deriler 1 saat desikatörde bekletilerek sabit tartıma getirilmiş ve bu örneklerden analiz için gerekli tartımlar yapılmıştır.

Deri örneklerindeki gümüş içeriklerinin saptanması için yaş yakma işlemi (H. Ertaş ve N. Ertaş, 2001)'de belirtilen kriterler esas alınarak yapılmıştır. Öğütülmüş her deri numunesinden ~0.5 g tartılarak 250 ml'lik tüplerin içerisine konulmuştur. HNO_3 (% 65'lik, Merck) ve HCl (% 37'lik, Merck) derişik asitlerden 3:1 oranında hazırlanan karışımdan (Kral suyu) 20 ml tüplere ilave edilmiştir. Ağzıları kapatılan tüpler ısıtmalı yakma ünitesinde (Heating digester DK 6, VELP Scientifica) 180°C 2 saat yakma işlemine tabi tutulmuştur (Şekil 4.7). Yaş yakma işlemi tamamlandıktan ve tüp içeriği tamamen bir çözelti haline geldikten sonra çözelti içeriği $0.45\ \mu\text{m}$ 'lik gözenek çapına sahip filtreden süzülerek 25 ml'lik balon jojelere alınmış ve ultra saf suyla 25 ml'ye tamamlanmıştır. Gümüş iyonu değerlerinin ölçülmesi işlemi ICP-OES cihazında 3 paralel üzerinden yapılmıştır.



Şekil 4.7. Isıtmalı yakma ünitesi

Hidroksiapatit çözeltileri ile kaplanan deri örneklerindeki gümüş miktarının belirlenmesi ICP-OES cihazında gerçekleştirilmiştir. Analizler için gümüş standardı kullanılmıştır. ICP analizleri, Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Mühendisliği Bölümü'ndeki ICP-OES (Perkin Elmer 2000) cihazında yapılmıştır. ICP-OES cihazında uygulanan enstrümental analiz koşulları Çizelge 4.1'de verilmiştir.

ICP'de örnek aerosol şeklinde yüksek sıcaklıktaki plazmaya gönderilir ve aerosol tanecikleri plazmada kuruyup parçalanarak atomlarına ve iyonlarına ayrılır, oluşan atomlar ve iyonlar uyarılır. Bir spektrometre ve uygun bir bilgisayar yazılımıyla değerlendirme yapılır. Birçok element için belirleme sınırı ng/ml düzeyindedir.

ICP-OES’de yüksek sıcaklık etkisinde kalan örnekler atomlarına ve iyonlarına ayrılır, her element kendi için karakteristik olan dalga boylarında ışık yayacak düzeye kadar uyarılır. Yayılan bu ışınlar ışığa duyarlı dedektörler tarafından tespit edilir. Bu şekilde çok sayıda elementlerin aynı anda analizi mümkün olmaktadır.

Çizelge 4.1. ICP-OES’deki enstrumental analiz koşulları

Pompa hızı (Pump rate)	15 rpm
Plazma gazı (Plasma gas)	15 L/dk
Dedektör fotomultiplar tüp voltajı (PMT voltage)	800 V
Soğutucu argon gaz hacmi (Auxiliary Gas)	1,50 L/dk
Örnek geçişlerinde yıkama süresi (Sample uptake)	10 sec
Güç (Power RF)	1,35 kW
Tracking window	0,027
Reply	3
% RSD	<1
Element	Ag
Dalga boyu	328 nm

4.2.4.3. Derilerin FTIR+ATR analizi

Hidroksiapatit çözeltileri ile muamele edilen deri örneklerinin kimyasal yapısının belirlenmesi için FTIR analizi yapılmıştır. FTIR çalışmaları ATR ekipmanına sahip olan Perkin Elmer Spectrum 100 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla deri örneklerinin 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki IR spektrumları (4 cm^{-1} ayırım gücü (resolution), 20 tarama (scan), oda sıcaklığında) alınmış, sonuçlar FTIR Spectrum Software (Perkin Elmer) yazılımında değerlendirilmiş ve literatürlerde verilen spektrumlarla karşılaştırılmıştır.

4.2.4.4. Derilerin Raman analizi

Hidroksiapatit çözeltileri uygulanan deri örneklerinin kimyasal yapısının doğrulanması için Raman analizi yapılmıştır. Raman çalışmaları Perkin Elmer Raman Station 400 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla deri örneklerinin 200-3650 shift/cm^{-1} frekans aralığındaki Raman spektrumları (-4 shift/cm^{-1} data alma sıklığında (interval time)) taranmış, sonuçlar Raman Spectrum Software (Perkin Elmer) yazılımında değerlendirilmiş ve literatürlerde verilen spektrumlarla karşılaştırılmıştır.

4.2.5. Mikrobiyolojik analizler

4.2.5.1. Hidroksiapatit çözeltilerinin MIC değerlerinin belirlenmesi

Hazırlanan (% 0-5) Ag katkılı hidroksiapatit çözeltilerinin *in vitro* antimikrobiyal etkilerini saptamak için test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve *Candida albicans* ATCC 10239 türleri seçilmiştir. Çözeltilerin minimum inhibe edici konsantrasyonları (MIC) 96 kuyucuklu mikrotipler kullanılarak broth mikrodilüsyon tekniği ile belirlenmiştir. Mikroorganizmaların aktivasyonu Müller Hinton Broth (MHB) içinde 37°C’de 18–20 saat inkübe edilerek sağlanmıştır (Olson et al., 2005; Sarkar et al., 2007; Holetz et al., 2002). % 0-5 aralığında Ag katkılı hidroksiapatit çözeltileri ise iki katı seyreltmeleri olacak biçimde test edilmiştir. Çift kuvvet MHB içinde 1/100’lük seyreltmeleri hazırlanan test mikroorganizmalarının 100 µl’tsi paralelli olarak kuyucuklara aktarılmış ve bu kuyucukların üzerine ise son hacim 200 µl olacak şekilde % 0-5 aralığında Ag katkılı hidroksiapatit çözeltisinden 100 µl eklenmiştir. Böylece kuyucuklardaki Ag katkılı hidroksiapatit konsantrasyonu ayarlanmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra kuyucukların üzerine % 0,5’lik TTC (Trifenil tetrazolium klorür) çözeltisinden 50 µl ilave edilerek 2 saat daha inkübe edilmiştir. Süre sonunda TTC’nin indirgenmesi ile oluşan kırmızı renkli formazan bileşiği üremenin indikatörü olarak kabul edilmiş ve MIC değerinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Navarro et al., 1996). MIC değeri üremenin görülmediği en düşük madde konsantrasyonu olarak ifade edilmiştir.

4.2.5.2 Agar yayma testi (Nitel test)

Standart Agar yayma metodunda, Müller Hinton Agar (MHA) önce petrilere dökülmüş ve katılaşması sağlanmış, sonra besi yerlerinin üzerine farklı miktarda Ag katkılı HAP çözeltileri uygulanan 2x2 cm² deri örnekleri yerleştirilmiştir. Daha sonra aktive edilmiş test organizmaları içeren 7 ml MHA, deri örneklerini kaplayacak şekilde örnekler üzerine ilave edilmiştir. Böylece deri örneklerinin üst kısmı ince bir besiyeri tabakası ile kaplanmıştır (Balogh et al., 2000). Üst tabakada kullanılan besiyerine ayrı ayrı olarak bakteri (*E. coli* ve *S. aureus*) ve *C.albicans*; ayrıca 0,05 ml % 0,5’lik TTC çözeltisi ilave edilmiştir. Petriler 37°C’de 24 saat süre ile etüvde inkübe edilmiştir. Deri örneklerinin üzerindeki ve

etrafındaki inhibisyon zonları, Ag katkılı HAP'in antimikrobiyal etkilerini nitel olarak belirlenmesine olanak sağlamıştır.

4.2.5.3. Paralel çizgi yöntemi (AATCC 147)

AATCC 147 Antibakteriyel Test Metodu esas alınarak modifiye edilmiş bu metod ile deri üzerindeki mevcut kaplamanın antimikrobiyal etki gösterip göstermediğinin belirlenmesi için kullanılmaktadır (Fernandes et al., 2011). Bu teknik kullanılarak yapılan testler ile kalitatif (nitel) sonuçlar elde edilmektedir. Bu test bakteristatik etkilerin tespit edilmesinde de kullanılmaktadır. Test mikroorganizmaları olarak *Escherichia coli* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC6538-P, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Salmonella typhimurium* CCM 5445, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* CCM 2318, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ve fungus olan *Candida albicans* ATCC 10239 türleri kullanılmıştır. Mikroorganizmaların aktivasyonu Müller Hinton Broth (MHB) içinde 37°C'de 18–20 saat inkübe edilerek sağlanmıştır. Test mikroorganizmaları ile hazırlanan belirli konsantrasyonlar, içerisinde Müller Hinton Agar bulunan petri kaplarına paralel çizgiler halinde aşılanmıştır. Aktivitesini tespit etmek amacıyla saf hidroksiapatit, lak ve % 1, % 2, % 3 Ag katkılı hidroksiapatit ile işlenen deri örnekleri 2.5 x 5cm boyutlarında kesilerek aşılanan mikroorganizma kolonileri ile temas edecek şekilde petrilere yerleştirilmiştir. Petrilere 37°C'de 24 saat süre ile etüvde inkübe edilmiştir. 24 saatlik sürenin ardından, test mikroorganizmalarının deri üzerinde ve etrafında ürememesi deri yüzeyinin antimikrobiyal özellik gösterdiği anlamına gelmektedir.

4.2.5.4. % Azalma testi (AATCC 100)

Deri örneklerinin antimikrobiyal etkisinin araştırılması ile ilgili kesin olarak kabul edilmiş bir standart test yoktur. Uyguladığımız % azalma testi tekstil materyallerine uygulanan AATCC 100 tekstil finisajının antibakteriyel aktivitesini belirleme yöntemi olarak bilinmekte ve çalışmamızda deriye modifiye edilerek uygulanmıştır. Söz konusu test deri örneğinin antimikrobiyal aktivitesinin nicel olarak ortaya konulmasında kullanılabilir bir testtir. Test yöntemine göre farklı miktarda Ag katkılı HAP çözeltileri ile muamele edilmiş 2x2cm² deri örnekleri boş steril petrilere yerleştirilmiştir. Test mikroorganizması olarak kullanılan *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri MHB içinde 37°C'de 18–20 saat aktive edilmiştir. Aktive edilen kültürlerden MHB içinde yapılan seyreltmelerle *E. coli* için 8.1x10⁵ CFU/ml, *S. aureus* için ise 7.3x10⁵ CFU/ml taze bakteri kültürleri hazırlanmıştır.

Saf hidroksiapatit ve (% 0.5-5) Ag-HAP ile işlenmiş deri örnekleri üzerine 200 µL test bakteri karışımı inoküle edilmiş; örnekler 1 ve 2 saat sonra 50 ml fizyolojik tuzlu su (% 0.85 NaCl), % 0.4 sodyum tiyoglikolat ve % 1 Tween 20 içeren 250 ml'lik erlenlere alınmıştır ve 1-2 dakika 37°C ayarlanan inkübatörlü çalkalayıcıda üzerlerindeki mikroorganizmaların çözeltiye geçmesi sağlanmıştır (Gallant-Behm et al., 2005; Wright et al., 1999). 1 saat ile 2 saat sonrası etkilerini saptamak amacı ile erlenlerdeki karışımdan 1 ml alınarak ardışık seyreltmeleri yapılmıştır. Ardışık seyreltmelerden 1 ml steril petri kaplarına alınarak dökme plaka yöntemi ile örnekteki mikroorganizma sayıları belirlenmiştir (Balogh et al., 2001; Kim S. and Kim H., 2006). Besiyeri olarak Müller Hinton Agar (MHA) kullanılmış, mikroorganizma kolonilerinin kolayca görülmesi için % 0.5'lik TTC çözeltisinden 2 ml/100 ml besiyerine eklenmiştir. İşlem görmemiş ve farklı konsantrasyonlarda (% 0.5-5) Ag katkılı HAP ile işlenmiş deri örneklerindeki bakteri azalması Denklem 3'e göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Azalma} = [(A - B)/A] \times 100 \quad (3)$$

A = 1 ve 2 saat sonra kontrol deri örneklerindeki mikroorganizma sayısı

B = 1 ve 2 saat sonra işlenmiş deri örneklerindeki mikroorganizma sayısıdır.

4.2.5.4. ASTM D 4576-08 standart testi

ASTM D 4576-08 standardına göre 2x2 cm² boyutundaki (% 0-5) Ag-HAP uygulanan deri örnekleri 90 mm çapındaki steril plastik petri kaplarının orta kısmına gelecek şekilde yerleştirildikten sonra 20 ml Potato Dextroz Agar (PDA) petri kaplarının içine deri parçalarının üzerine gelmeyecek şekilde dökülmüştür. 20 dakika kadar agar solüsyonunun katılaşması beklendikten sonra 1x10⁵ spor/ml'lik test fungus (*Aspergillus niger* ve *Trichoderma viride*) sporları süspansiyonundan deri örneğinin sağına, soluna ve üzerine olmak üzere 3 noktaya spotlanmıştır.

Daha sonra 26°C'deki inkübatöre yerleştirilen petri kapları 14 gün boyunca inkübe edilmiş; 3., 7. ve 14. günlerde ölçümlendirilip fotoğraflanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Değerlendirme 2x2 cm² boyutlarındaki deri örneklerinin % yüzey alanının küfle kaplanan kısmının 0 - 4 değerleri arasında derecelendirilmesi şeklinde yapılmıştır. Buna göre küf gelişimi % 0 olduğunda 0; küf gelişimi % 12 olduğunda 0,5; küf gelişimi % 25 olduğunda 1; küf gelişimi % 50 olduğunda 2;

küf gelişimi % 75 olduğunda 3, küf gelişimi % 100 olduğunda 4 olacak biçimde tablo halinde değerlendirilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

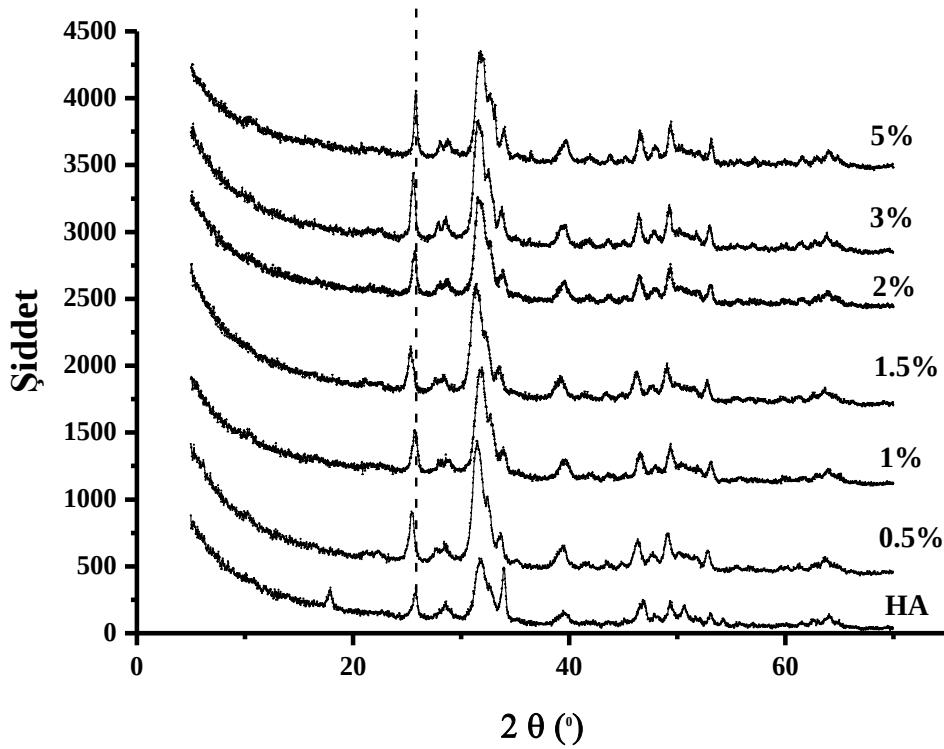
5.1. Hidroksiapatit ve Gümüş Katkılı Hidroksiapatit

Karakterizasyonlarına Ait Bulgular

5.1.1. X-ışını Difraksiyonu analizine ait bulgular

Faz analizleri toz XRD yöntemleri ile yapılmıştır. Numunelerin XRD çekimi Cu-K α radyasyonu altında gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Phillips cihazı kullanılmış, 2°/dk hızla çekilen XRD verileri $2\theta = 10^\circ$ - 70° aralığı taranarak toplanmıştır. Saf HAP ve gümüş katkılı HAP tozlarının oluşumuna ait XRD kırınım grafikleri Şekil 5.1’de verilmiştir. Yapılan XRD analizi sonucu elde edilen grafikteki pikler JCPDS kataloğundaki (2001) verilerle karşılaştırılmış ve Uluslar Arası Kırınım Verileri Merkezi tarafından hidroksiapatit için verilen piklerle uyumlu olan karakteristik pikleri göstermiştir. Burada saf HAP seramiğini oluşturan katı fazların HAP’ in (kalsiyum hidroksit fosfatın) karakteristik pikleri $2\theta \sim 25$ - $34,5^\circ$ zayıf kristalize apatit fazının gelişimini açıkça göstermiştir. Şekil 5.1’de tüm toz örneklerdeki hidroksiapatitle ilgili piklerin 2θ ’da genellikle 25.80° , 28.60° ve 32.10° ’ de bulunduğu açıkça görülmektedir. Buna ek olarak, 2θ ’da düşük yoğunluklu pikler 34.20° , 39.60° , 46.50° ve 49.00° ’de tespit edilmiştir. Ag miktarının % 5 olduğu HAP örneğinin XRD sonuçlarında hidroksiapatitin yanı sıra gümüş oksit karakteristik pikleri de gözlemlenmiştir.

ASTM F 1185-03 standardına göre medikal kalitedeki HAP malzemelerinin içindeki CaO veya TCP miktarlarının % 5 ağırlık oranından düşük olması gerekmektedir. Bu çalışmada ise hazırlanan HAP ve Ag-HAP tozlarında CaO ve TCP’a ait karakteristik pikler görülmemiştir.



Şekil 5.1. Saf HA ve % 0.5-5 Ag katkılı HAP' in XRD sonuçları

Robertson and Morgan (1971), HAP'ın hidrasyon tabakasındaki değişebilir Ca^{2+} iyonlarının miktarı kristallerdeki toplam Ca^{2+} iyonlarının sadece yaklaşık %4'ü kadar olduğunu ifade etmişlerdir. Çalışmalarında Ag-HAP'in XRD paternindeki AgCaP piklerinin Ag^+ iyonları fazlalığından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Feng et al. (1998), antibakteriyel Ag-HAP ince filmini alüminyum üzerinde elde etmişler ve XRD sonuçlarında hem alüminyum hem HAP' in karakteristik piklerinin yanı sıra 2 adet AgCaP piki de gözlemlemişlerdir. Gümüşün saf şekilde olmayıp HAP bünyesinde AgCaP şeklinde olduğunu ve gümüş içeriğinin Ag-HAP kaplamalar yapısını önemli derecede etkilemediğini bildirmişlerdir.

Chung et al. (2005), HAP'e özgü fazın, 350°C sıcaklığın üstünde kalsine edildiği zaman oluştuğunu gözlemişlerdir. Çalışmalarında saf HAP'in kristalleşmesi kalsinasyon sıcaklığının artmasıyla artmış ve 650°C'nin üstünde kalsine edilince CaO piki gözlemlenmiştir. Bunun da, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCO_3 ve $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ gibi tamamıyla çözünmemiş veya tepkimesi tam tamamlanmamış başlangıç ve ara maddelerden kaynaklandığını belirtmişlerdir. 600°C'de kalsine edilen Ag/Zn içeren tozların XRD paternlerinde 20000 ppm Ag içeren örneğin

dışında her örnekte HAP kristal fazının oluştuğu ve başka bir kristal fazın olmadığı saptanmıştır. Ag miktarı 20000 ppm olduğu zaman Ag_2O ve CaO piklerinin görüldüğü tespit edilmiştir. Sol-jel matriksi içindeki gümüş nitrat farklı oksidasyon şekillerine kalsine edilebilir. Ag kaynağı olarak gümüş nitrat kullanılan çalışmada, sol-jel yöntemi düşük sıcaklıkta uygulandığı için Ag_2O oluşumunun HAP ile elektrostatik çekimden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Rameshbabu et al. (2006), çalışmalarında mikrodalga yöntemi ile antibakteriyel Ag katkılı hidroksiapatit sentezlemişler ve elde edilen toz örneklerinin faz analizlerini XRD cihazında karakterize etmişlerdir. XRD sonuçlarına göre, tüm paternlerin JCPDS 9-432 veri tabanındaki altıgen HAP kristaline karşılık geldiği ve hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiştir. Ancak, gümüş miktarı $x \geq 0,4$ 'ün üzerinde olan örneklerde $2\theta \sim 36.68^\circ$ 'de (Ag_3PO_4 , JCPDS 6-505) gümüş fosfatı piki açıkça gözlemlenmiştir. Ayrıca, araştırmacılar ısıtılma işlem görmüş ($700-800^\circ\text{C}$ 'de 2 saat ve 900°C 'de 4 saat) ve görmemiş (ham) Ag-HAP örneklerinin XRD verilerini incelemişler ve % 0.5-3 Ag-HAP içeren ham örneklerde safsızlık fazlarının oluşmadığını, % 4 ve üzeri Ag içeren HAP ham örneklerinde ise gümüş fosfatı fazının bulunduğunu saptamışlardır. Böylece, XRD sonuçlarına göre gümüşün hidroksiapatit bünyesindeki kalsiyum ile yer değiştirme oranının % 4'ün altında olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, 700°C 'de ısıtılma işlem gören Ag-HAP yapısının herhangi bir ikincil faz oluşmadan kararlı olduğunu ortaya koymuşlardır.

Pekşen (2006), antimikrobiyal toz üretimini, farklı oranlarda metal iyonu ilave edilerek yaş kimyasal yöntemle gerçekleştirmiştir. Üretilen tozlar ağırlıkça farklı metal iyonu içeriklerine göre A ve Z serisi olarak sınıflandırılmıştır. Ag^+ iyonu içeren A serisi tozlar kurutma işlemini takiben öğütülmüştür. Ag^+ ve Zn^{+2} içeren Z serisi tozlar ise kurutma işlemlerini takiben yüksek sıcaklıkta ısıtılma işlemine tabi tutulduktan sonra öğütülmüş ve belirli bir tane boyutuna indirilmiştir. A serisi için $10-80^\circ$ açıları arasında $2^\circ/\text{dk}$ hızla çekilen XRD analizi sonucunda elde edilen grafiklerdeki pikler JCPDS kataloğundaki verilerle karşılaştırılmış ve yapının trikalsiyum fosfat (TCP) ve hidroksiapatit (HA) karışımından oluşan kalsiyum fosfat yapısında olduğu belirlenmiştir. Z serisinde ise HA ve TCP fazlarının dışında ayırık fazda çinko oksit yapısının olduğu gözlemlenmiştir.

Diğer bir çalışmada, 600°C 'de 1 saat ısıtılma işlem görmüş ve görmemiş (ham) gümüş katkılı antibakteriyel hidroksiapatit tozlarının XRD paternlerinde hidroksiapatite özgü pikler gözlenmiş, ısıtılma işlem görmemiş (ham) Ag-HAP'in

XRD sonuçlarında ise Ag_3PO_4 fazı belirlenmiştir. Ayrıca, ısıtma işlemi görmüş Ag-HAP verilerinde metalik gümüşe ait birkaç pikin de gözlemlendiği, bunun da ısıtma işlemi sırasında AgNO_3 bozunmasından kaynaklandığı ortaya konulmuştur (Su and Xiong, 2007).

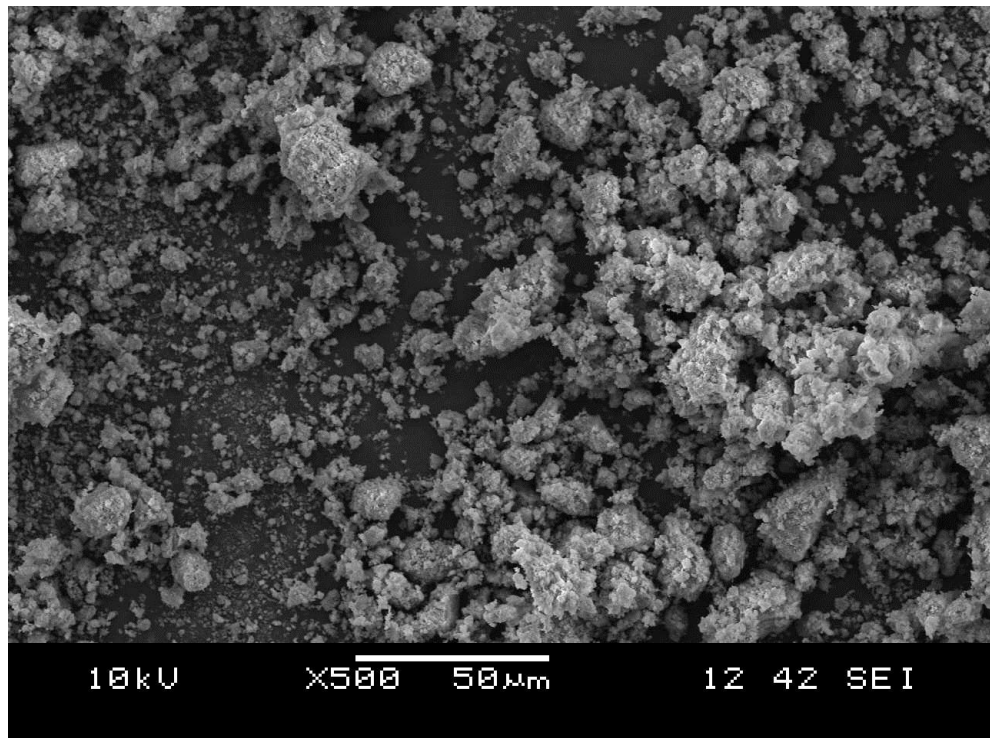
Çelik (2011), çalışmasında gümüş katkılı hidroksiapatit (Ag-HAP) malzemesini EDTA şelat dekompozisyonu metodu ile sentezlemiş ve HAP oluşturma esnasında gümüş katkısının gümüş oksit (Ag_2O) olarak yapıya eklenebildiği sonucuna ulaşmıştır.

Ciobanu et al. (2011) çalışmalarında antibakteriyel (% 0.2) Ag katkılı hidroksiapatit tozunun yapısal ve fiziksel özelliklerini incelemiştir. XRD verilerine göre, 100°C 'de çöktürme yöntemiyle elde edilen hidroksiapatitin iyi kristaliteye sahip olduğunu ve apatit karakterizasyonu taşıdığını, ayrıca yeni fazın ve safsızlıkların oluşmadığını ortaya koymuşlardır. Gümüşe ait piklerin görülmemesinin gümüş miktarının düşük olmasından kaynaklandığını ifade etmişlerdir.

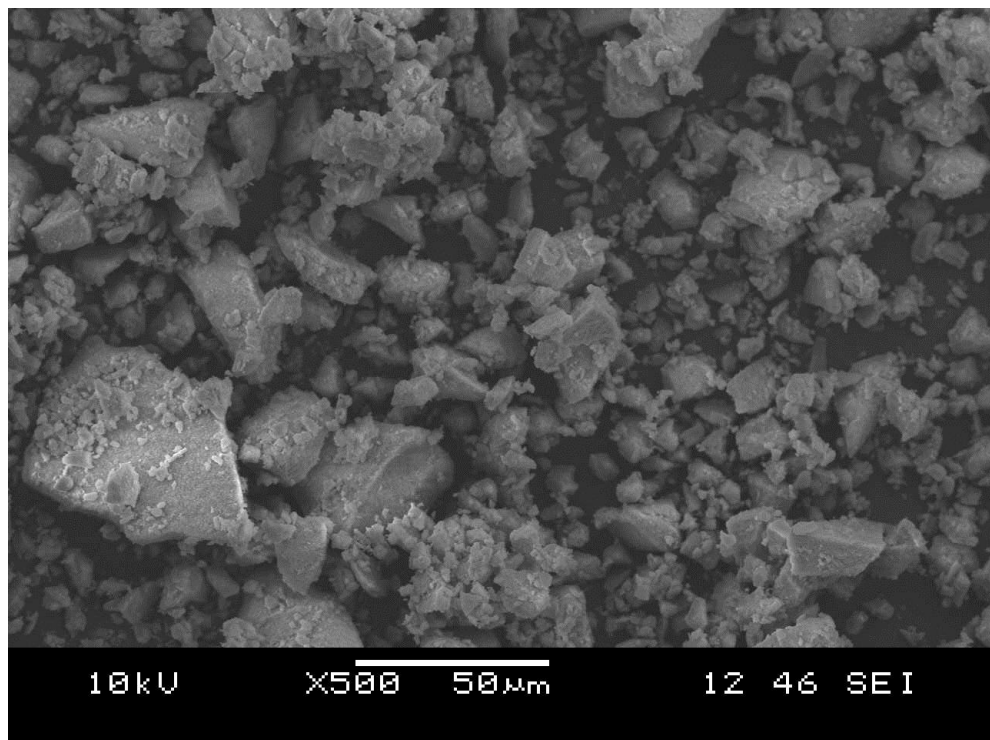
Çalışmamızda elde edilen (% 0-5) Ag katkılı hidroksiapatit 100°C 'de etüvde kurutulması dışında herhangi bir ısıtma işlemi görmemiştir. Bu şartlar altında HAP'e katılan Ag miktarı % 5 olduğunda gümüş oksit fazının gözlemlenmesi dışında herhangi bir safsızlık fazlarına karşılaşmamıştır.

5.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM-EDS) analizine ait bulgular

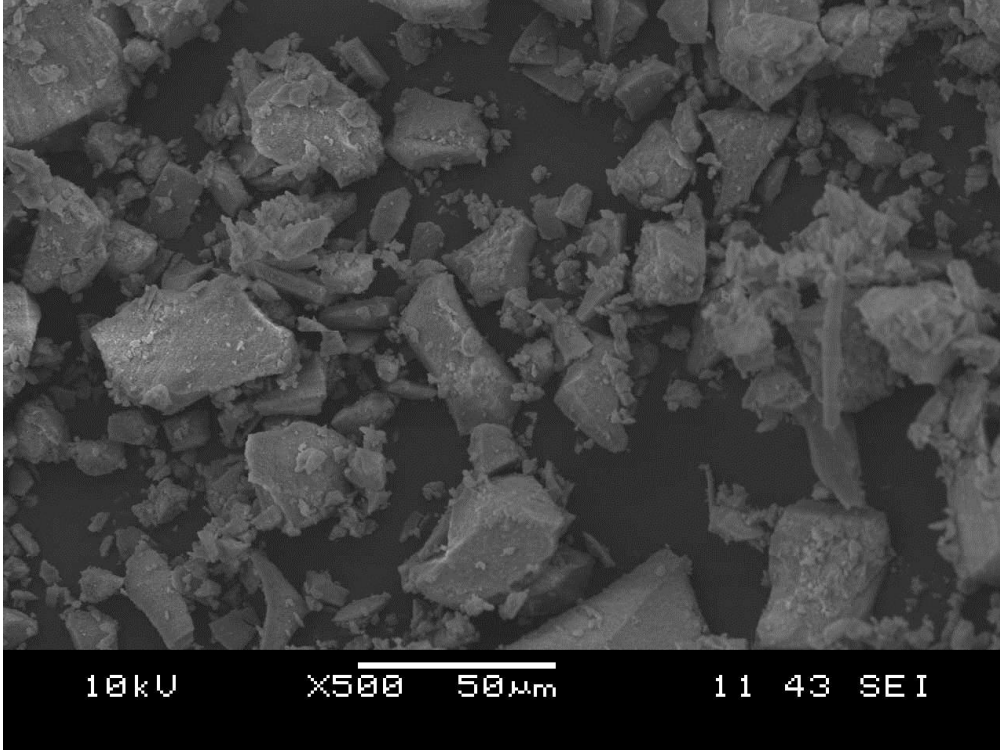
Sentezlenen saf HAP ve gümüş katkılı HAP antimikrobiyal tozların SEM analizleri yapılmıştır. Taramalı elektron mikroskobunda ikincil elektron görüntü alma tekniği ile alınan görüntülerde saf HAP içeren tozun ince ve yuvarlak hatlara, gümüş iyonu katkılı tozların ise morfolojik olarak daha kesin hatlara sahip olduğu belirlenmiştir. SEM analizi sonucu elde edilen mikroyapı incelendiğinde tozların genel olarak tane boyutlarının $50\ \mu\text{m}$ ve altında olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.2). Havanda manuel öğütülmesi nedeniyle sentezlenen HAP tozlarının homojen dağılım göstermediği anlaşılmaktadır. Tozların, tane boyutları küçüldükçe artan yüzey enerjilerini düşürmek için bir araya gelip aglomeratlar oluşturma eğiliminde oldukları tespit edilmiştir.



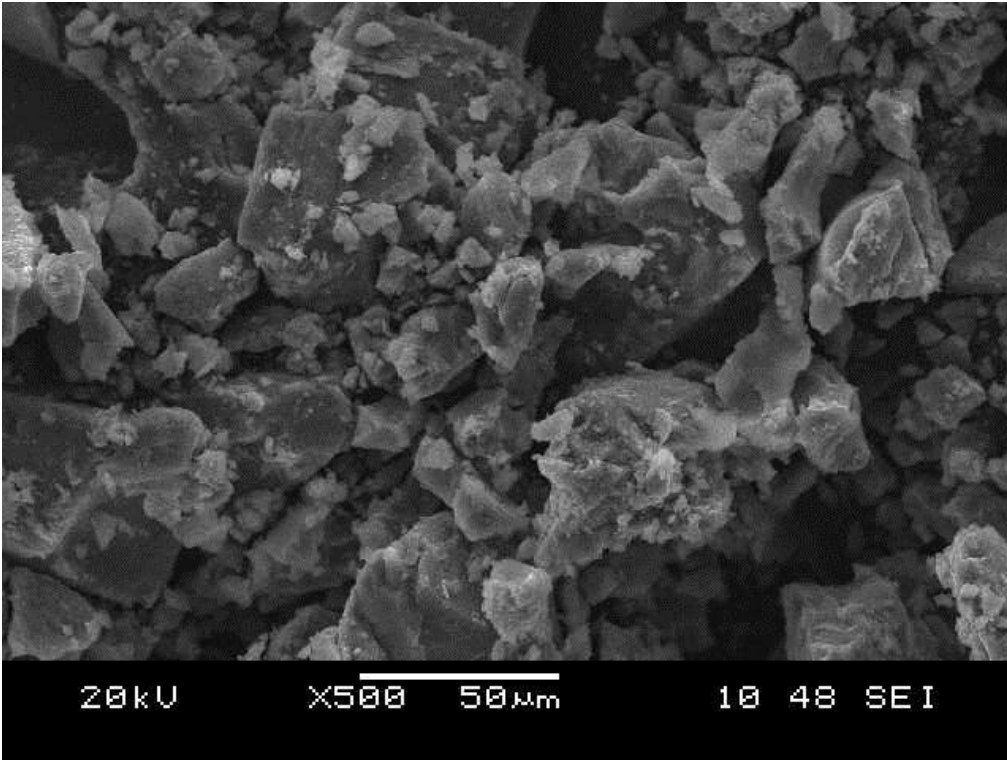
a) Saf HAP



b) % 0.5 Ag-HAP



c) % 1.5 Ag-HAP



d) % 3 Ag-HAP

Şekil 5.2. HAP tozlarının SEM görüntüleri

Chung et al. (2005), sol-jel yöntemiyle elde ettikleri Ag-HAP'in ortalama partikül büyüklüğünün 3 ile 10 μm arasında olduğunu tespit etmişlerdir.

Pekşen (2006), yaş kimyasal yöntemiyle sentezlenen metal iyonu katkılı kalsiyum fosfat esaslı tozun tane boyut analizleri ile desteklenen SEM görüntüleri sonucunda tozun tane boyutunun 200 nm olduğunu belirtmiştir.

Rameshbabu et al. (2006), mikrodalga uygulamasıyla sentezledikleri Ag-HAP morfolojisini incelediklerinde saf HAP ve % 0.5 Ag-HAP partiküllerinin iğne şeklinde, genişliği 15-20 nm ve uzunluğu 60-70 nm olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte, partiküllerin topaklanmaya yüksek bir eğilim gösterdiğini ifade etmişlerdir. Araştırmacılar, % 2 ve % 5 Ag içeren HAP partiküllerinin de iğne formunda olduğunu, böylece Ag-HAP partikül şekillerinin gümüş miktarının artmasına bağlı olmadığını ortaya koymuşlardır. Ancak, % 5 Ag-HAP partiküllerinin belirgin hatlarıyla daha düzenli olduklarını ve daha az yığılma gösterdiklerini, bunun da etrafında bulunan gümüş fosfat fazı etkisinden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Su and Xiong (2007), çalışmalarındaki 600°C'de 1 saat işlem görmüş Ag-HAP kristallerinin yuvarlak şekilde ve boyutunun yaklaşık 60 nm olduğunu SEM görüntülerinden gözlemlemişlerdir. Kristaller etrafında topaklanma (yığılma) oluştuğunu da bildirmişlerdir.

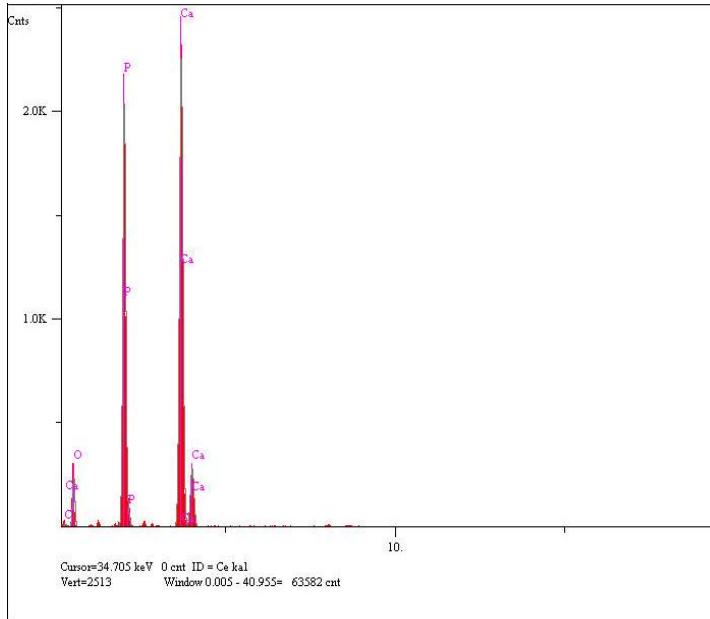
Çalışmamızda elde edilen SEM sonuçları, mikrodalga yöntemiyle üretilen Ag-HAP partiküllerin küçük boyutlarda ve homojen bir dağılıma sahip olduklarını göstermiştir. Nitekim, Lew et al. (2002), yaptıkları araştırmada mikrodalga yöntemi ile su, asetonitril, CH_2Cl_2 , etanol, DMF gibi aktif polar moleküllere sahip reaksiyon karışımlarının hızlı ısındığını ifade etmişlerdir. Cushing et al. (2004), partiküllerin bu tür çözeltilerden hızlı ve nerdeyse aynı anda çöktüklerini ve son ürünlerdeki partiküllerin çok küçük boyutlarda olduklarını ifade etmişlerdir.

Üretilen tozların kristal yapısı içerisinde hapsedilen etkin antimikrobiyal ajanın yani gümüş katyonlarının belirlenmesi için Enerji saçınımlı X-ışınları spektrofotometresi (EDS) kullanılmıştır. EDS ile elde edilen değerler, toz üretimi sırasında yapılan stokiyometrik değerle karşılaştırılmıştır. Saf HAP örneğinde Ca/P oranı (1.667) stokiyometrik hidroksiapatit oranına ($\text{Ca/P}=1.67$) yakın olarak bulunmuşken, bu oranın % 1 Ag-HAP örneğinde 1.573 olduğu tespit edilmiştir (Şekil 5.3). % 1 Ag-HAP örneğinde kalsiyum ve fosfor oranlarında bulunan

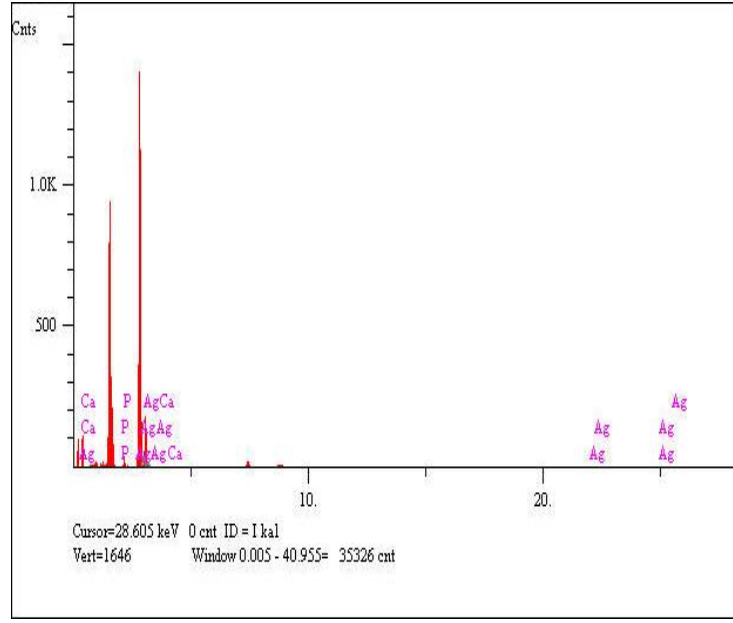
farklılığın HAP kafesindeki kalsiyum iyonlarının gümüş iyonları ile yer değişiminden kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca, mikrodalga yöntemiyle yapılan toz sentezi sonrasında ısıtıl işlem sırasındaki kızdırma kayıpları olarak da değerlendirilmiştir.

Feng et al. (1998), Ag-HAP kaplamaların morfoloji ve kompozisyonunu SEM ve EDS ile incelemişlerdir. Gümüşü X-ışınları ile algılama sonucunda gümüşçe zengin fazın kaplama yüzeyinde homojen bir şekilde dağıldığını görmüşlerdir. Aynı zamanda, ince filmin, uygulandığı substrattan gelen Al iyonunu ve yüzeyinden gelen Ca, P, ve Ag iyonlarını içerdiğini de bildirmişlerdir. EDS ile yapılan kompozisyon analizi, gümüşle muamele görmüş ve görmemiş kaplamalardaki Ca/P atomik oranının sırasıyla 1.19 ve 1.46 olduğunu göstermiştir. Gümüş içeren kaplamanın Ca/P oranı gümüş içermeyene nazaran daha düşük bulunmuştur. Bu da, HAP bünyesindeki Ca^{2+} iyonlarının Ag^+ iyonları ile yer değiştirdiğini doğrulamıştır. Araştırmacılar, kaplama yapısının şu şekildeki $(CaAg)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ Ag katkılı HAP olabildiğini fakat, gümüşün HAP bünyesinde XRD ile gözlemlenen diğer bir faz (AgCaP) şeklinde de olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Pushpakanth et al. (2008), Ag-HAP'in EDS spektrumunda gümüş nanopartiküllerinin artan bir sinyal ile varlığını açıkça gözlemişlerdir. Araştırmacılar, gümüş nanopartiküllerinin HAP bünyesinde fosfat iyonları ile stabilize olduklarını belirtmişlerdir.



a) saf HAP



b) % 1 Ag katkılı HAP

Şekil 5.3. HAP örneklerinin EDS görüntüleri

5.1.3. XRF analizine ait bulgular

XRF analizi vasıtasıyla elde edilen elementlerin ana oksit değerlerinden CaO ve P₂O₅ göre hidroksiapatit bünyesindeki Ca/P oranı hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 5.1’de verilmiştir. Saf hidroksiapatit yapısında bulunan Ca/P oranının, (%0.5-5) Ag-HAP katkılı hidroksiapatit örnekleriyle farklı değerlere sahip olduğu, gümüş miktarının artmasıyla bu oranın orantılı bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Bu farklılığın sebebi, EDS analizinde görüldüğü gibi, gümüş iyonlarının hidroksiapatit kafesindeki kalsiyum iyonları ile iyon değiştirme sonucu kafesteki kalsiyum iyonlarının azalmasıdır ve bu durum akabinde Ca/P oranını düşürmüştür. Çizelge 5.1’deki analiz sonuçlarına göre, saf hidroksiapatitteki Ca/P oranı (1.67) stokiometrik HAP oranına eşit, % 1 gümüş katkılı hidroksiapatitte ise 1.60’tır. Bu sonuçların elde edilen EDS sonuçlarına yakın olduğu görülmektedir.

Koyaş (2006), antibakteriyel toz içeren seramik filtrenin yarı kantitatif element analizini X-ışını floresan spektrometre cihazı ile değerlendirmiş ve bileşiklerin % değerlerini incelemiştir. Ag₂O, CaO ve P₂O₅ içeriği sırasıyla %0.241, % 6.204 ve % 3.751 olarak bulunmuş ve bu verilere göre Ca/P oranının 1.65 olduğu ortaya çıkmıştır.

Çizelge 5.1. XRF analizi sonuçları

Numune	Ca (%)	P (%)	Ca/P oranı
Saf HAP	52.77	31.46	1.67
%0.5 Ag-HAP	51.62	32.02	1.61
%1.0 Ag-HAP	50.03	31.12	1.60
%1.5 Ag-HAP	49.33	31.81	1.55
%2.0 Ag-HAP	48.11	30.96	1.55
%3.0 Ag-HAP	50.52	32.88	1.54
%5.0 Ag-HAP	48.84	33.01	1.48

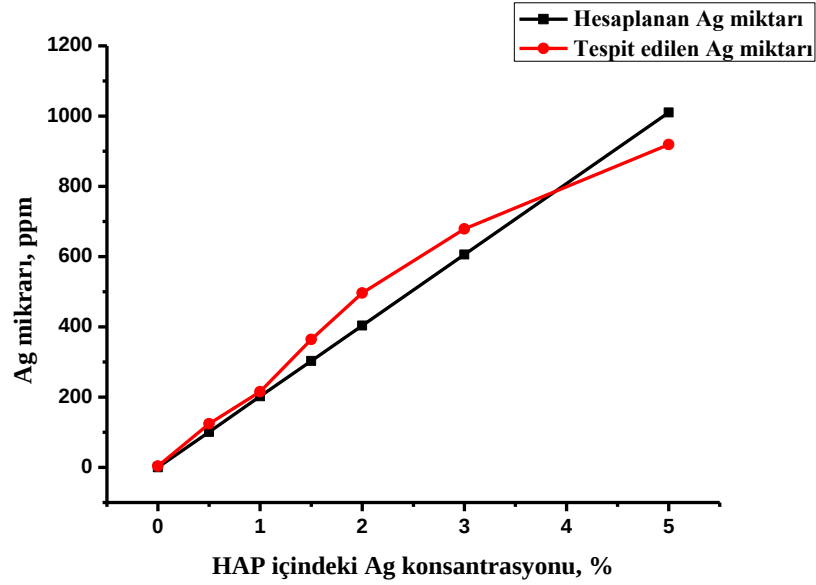
5.1.4. ICP-OES analizine ait bulgular

EDS ve XRF analizleri ile Ag'ün Ca ile yer değiştirdiğini hesaplanan Ca/P oranlarından belirlemiştik. ICP-OES analizi ile Ag-HAP içerisindeki gümüş miktarı tayini yapılmıştır.

ICP-OES spektroskopisi, endüktif eşleşmiş plazma kaynağından oluşan serbest atom ya da iyonların oluşturduğu emisyon spektrumu temeline dayanan bir elementel analiz tekniğidir. Saf HAP ve gümüş katkılı hidroksiapatit tozlarının hesaplanan ve ICP-OES'de ölçülen değerler Çizelge 5.2 ve Şekil 5.4'te sergilenmektedir.

Çizelge 5.2. Hidroksiapatite doplanan gümüş miktarı

Örnek	Hesaplanan değer (ppm)	ICP değeri (ppm)	Aradaki fark (ppm)
Saf HAP	0	4	4
% 0.5 Ag-HAP	101	124	23
% 1.0 Ag-HAP	202	215	13
% 1.5 Ag-HAP	303	364	61
% 2.0 Ag-HAP	404	496	92
% 3.0 Ag-HAP	606	679	73
% 5.0 Ag-HAP	1010	919	-91



Şekil 5.4. HAP örneklerindeki Ag miktarları

ICP-OES sonuçlarına göre, elementel analiz sonrası elde edilen verilerin önceden hesaplanan gümüş miktarı ile orantılı olduğu ve gümüş miktarının artmasıyla bu oranın proporsiyonel bir şekilde artması söz konusudur. Ayrıca, hidroksiapatit bünyesine doplanan gümüş miktarının hidroksiapatitin iyon değiştirme kapasitesine göre farklılıklar da gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu farklılıklar, ICP değerlerindeki gümüş miktarlarında bir artış olarak ortaya çıkmış ve bu da gümüş iyonlarının hidroksiapatit kafesindeki kalsiyum iyonları ile iyon değiştirme sonucu kafesteki kalsiyum iyonlarının azalmasıyla gümüş iyonlarının artmasına sebep olduğu düşüncesini beraberinde getirmiştir. Ancak, HAP'e katılan gümüş miktarı % 5 olduğunda doplanan gümüş miktarında bir azalma söz konusudur. Bu da, yukarıda bahsedilen HAP' in hidrasyon tabakasındaki değişebilir Ca^{2+} iyonları miktarının kristallerdeki toplam Ca^{2+} iyonlarının sadece yaklaşık % 4'ü kadar olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca, Çizelge 5.2'de görüldüğü gibi, saf hidroksiapatit örneğinde bile 4 ppm gümüş bulunduğu tespit edilmiştir. Bu olayın, toz sentezi sırasında kullanılan kimyasallardaki safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Oh et al. (2003), sentezleme sonunda uygulanan buharlaştırarak veya dondurarak kurutma işlemlerinin Ag katkılı nano-HAP'in antimikrobiyal özelliklerine etkisini incelemişlerdir. Bunun için HAP tozunu AgNO_3 çözeltisine daldırarak içine Ag iyonlarını doplamışlardır. AgNO_3 çözeltisi konsantrasyonu, gümüşün HAP'teki toplam katyon oranının ($\text{Ca}+\text{Ag}$) (mol üzerinden) % 5, % 8, %

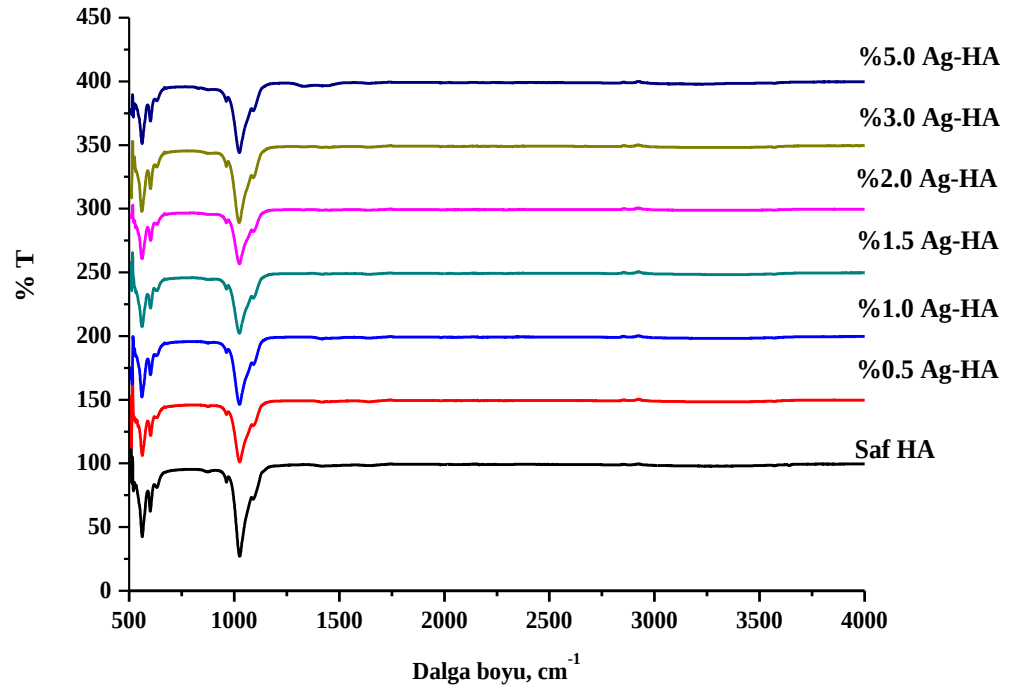
12 ve % 15'i ile yer deşiştireceğini tahmin ederek ayarlanmıştır. HAP'e doplanan gümüş miktarı ICP cihazında tespit edildiğinde, her ne kadar ayarlanan Ag miktarının artmasıyla doplanan Ag miktarında az bir artış gözükse de, toplam kation molü üzerinden % 15 gümüş ile iyon değiştireceği düşünölen Ag-HAP için bile buharlaştırarak kurutmadan sonra % 2.21, dondurarak kurutmadan sonra ise % 4.87 gümüş doplandığını göstermiştir.

Diğer bir çalışmada, çöktürme yöntemiyle elde edilen Ag-HAP'in ihtiva ettiği Ag miktarı ICP cihazında tayin edilmiş ve Ag/Ca oranının artmasıyla doplanan gümüş miktarında bir artış gözlendiği bildirilmiştir. Ayrıca, öktürme ile sentezlenen % 5 Ag-HAP ökeleğine yıkama işleminin uygulanmasının doplanan Ag miktarını etkilediğini; diğer bir deyişle, Ag-HAP' in ieridiği Ag miktarının yıkma işlemi sonrası % 0.1, yıkama işlemi yapılmadan % 1.4, yıkama ve kaynatma işlemi yapılınca % 2.5 olduğu belirtilmiştir (Oh et al., 2004).

Chung et al. (2005), çalışmalarında HAP'e doplanan Ag ve Zn iyonları konsantrasyonlarını ICP cihazında belirlemişlerdir. HAP içine 100 ppm Ag ilave ettiklerinde gerçek doplanan Ag miktarının başlangıç malzemede kullanılan miktarın 2 katı yani 210 ppm, 1000 ppm Ag katıldığında 931 ppm ve 10000 ppm Ag eklendiğinde ise 10235 ppm olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca, HAP tozunun içine 100, 1000 ve 10000 ppm Zn içeren başlangıç malzeme katıldığında HAP'e doplanan gerçek Zn miktarının sırasıyla 150, 1148 ve 9871 ppm olduğunu saptamışlardır. HAP'teki gümüş ve çinko konsantrasyonlarının başlangıç malzemelerde ayarlanan konsantrasyonlara uymadığını; fakat, tespit edilen değerlerin kabul edilebilir sapma oranında olduğunu ve en önemlisi artış olayının bulunduğunu belirtmişlerdir.

5.1.5. FTIR analizine ait bulgular

HAP ve Ag-HAP tozlarının bağ yapıları FTIR spektroskopi tekniği ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Perkin Elmer Spectrum 100 **Fourier** Transform Infrared (FTIR) cihazı kullanılarak 4000-400 cm⁻¹ aralığındaki FTIR spektrum taraması gerçekleştirilmiş, sonuçlar FTIR Spectrum Software (Perkin Elmer) yazılımında değerlendirilmiş ve literatürde verilen spektrumlarla karşılaştırılmıştır. HAP ve gümüş katkılı HAP tozlarındaki bağ yapılarının karakterize edilmesine yönelik olarak yapılan FTIR çalışmasında elde edilen spektrumlar ve gözlenen fonksiyonel gruplar şekil 5.5 ve izelge 5.3'de verilmiştir.



Şekil 5.5. Saf HAP ve % 0.5-5 Ag katkılı HAP'in FTIR spektrumları

Çizelge 5.3. % 0-5 Ag katkılı HAP' in FTIR spektrumlarında gözlenen fonksiyonel gruplar

Fonksiyonel gruplar	Saf HAP	% 0.5 Ag-HAP	% 1 Ag-HAP	% 1.5 Ag-HAP	% 2 Ag-HAP	% 3 Ag-HAP	% 5 Ag-HAP
	Dalga boyu (cm ⁻¹)						
v ₂ PO ₄ titreşim bandı*	471	471	472	472	472	471	472
v ₄ PO ₄ titreşim bandı	562	563	560	562	562	559	561
v ₄ PO ₄ titreşim bandı	600	602	601	601	602	601	601
v ₁ PO ₄ titreşim bandı	962	962	962	962	962	962	962
v ₃ PO ₄ titreşim bandı	1025	1025	1025	1024	1024	1024	1023
-OH bandı	632	632	632	633	632	631	632
v ₃ PO ₄ titreşim bandı	1090	1090	1090	1090	1090	1090	1090
-OH bandı	3570						

* Şekilde yer almamaktadır

Chung et al. (2005), çalışmalarında hidroksiapatitin önemli karakteristik bandların; 962 cm⁻¹ etrafındaki v₁ PO₄³⁻ bandı, 472 cm⁻¹ etrafındaki v₂ PO₄³⁻

bandı, 1025 and 1090 cm^{-1} etrafındaki $\nu_3 \text{PO}_4^{3-}$ bandı, 565, 559 and 603 cm^{-1} etrafındaki $\nu_4 \text{PO}_4^{3-}$ bandı olduğunu FTIR spektrumlarından ortaya koymuşlardır.

Wang et al. (2007), çalışmalarında ~ 1090 ve 962 cm^{-1} 'de uzanan bandların zayıf kristalize olan hidroksiapatit yapısını belirten P-O titreşim modlarını yansıttığını, $\sim 602 \text{ cm}^{-1}$ 'de uzanan bandın ise $(\text{PO}_4)^{3-}$ iyonlarının gerilme modlarına tekabül eden hidroksiapatit piklerini yansıttığını belirtmişlerdir.

Su and Xiong (2007), 600°C 'de ısıtılmış HAP ile ısıtılmış görmüş ve görmemiş Ag-HAP' in FTIR spektrumlarını incelemişler ve 3571 cm^{-1} ile 631 cm^{-1} 'deki keskin piklerin O-H titreşimi ile ilişkili olduğunu, 1090 cm^{-1} , 1041 cm^{-1} , 962 cm^{-1} , 601 cm^{-1} , 567 cm^{-1} and 474 cm^{-1} 'deki piklerin PO_4^{3-} titreşimini yansıttığını bildirmişlerdir.

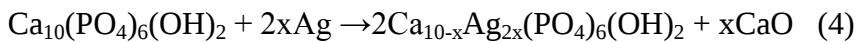
Rameshbabu et al. (2006), etüvde kurutulmuş ve 900°C 'de ısıtılmış görmüş Ag-HAP'in FTIR spektrumlarında her iki örnekte HAP için karakteristik piklerini; $900\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$ 'de PO_4^{3-} gerilme ve eğilme modları; 602 cm^{-1} 'de PO_4^{3-} eğilme modu, 632 and 3571 cm^{-1} -OH titreşim modu olarak gözlemlemişlerdir.

Nath et al. (2010), Ag_2O ve AgO fazlarına ait Ag-O bandının $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu FTIR tarama limiti ile tespit edilemediğini, bu nedenle, 3570 cm^{-1} 'daki O-H grubu titreşim pikinin değişimi dışında Ag katıldığını FTIR sonuçları göstermediğini ifade etmişlerdir.

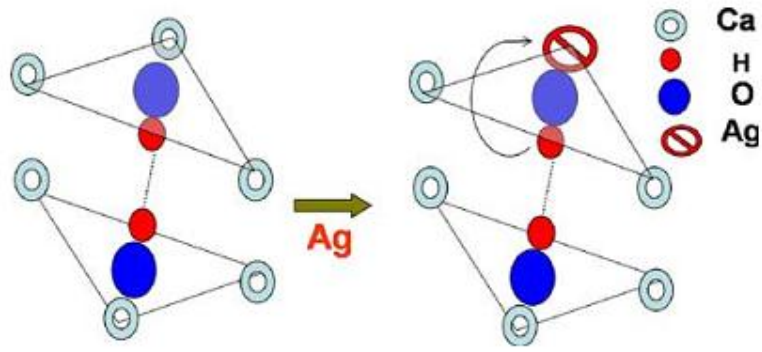
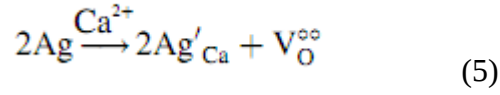
Shirkhanzadeh et al. (1995), HAP'e gümüş doplayınca $400\text{--}4000 \text{ cm}^{-1}$ dalga boyu aralığındaki FTIR spektrumunda herhangi bir ekstra pikin gözlenmediğini ifade etmişlerdir. Lin et al. (2008), Sr^{2+} doplanan HAP ile ilgili çalışmalarında da benzer sonuçlara karşılaştıklarını ve 3570 cm^{-1} dalga boyundaki O-H piki yoğunluğunun düşmesini Sr^{2+} iyonlarının O-H grubunu zayıflattığından kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Bu nedenle, HAP'in dağılmadığının yanı sıra O-H grubunun HAP kafesinde Ag iyonu varlığında modifiye olduğu sonucunu çıkarmışlardır.

Gümüşün HAP kafesine difüzyonu aşağıdaki denklem ile açıklanabilir:



Yukarıdaki tepkime, Ag'ün HAP kafesine girebildiğini işaret etmekte ve bu olayın şematik görüntüsü Şekil 5.6'da gösterilmiştir. Simgesel olarak, HAP'in kompleks kristal yapısı OH sütünü etrafındaki Ca üçgeni ile tanımlanır. Ag mevcut olduğunda (katıldığında) Ca^{2+} bir tarafı Ag ile yer değiştirebilir. Ca ve Ag iyonları arasındaki valens farklılığından aşağıdaki eksik tepkimede olduğu gibi boşluğun aniyon tarafında oluşabileceği işaret edilmiştir.



Şekil 5.6. HAP kafesindeki Ca'nın Ag iyonu ile yer değiştirmesinin şematik görüntüsü

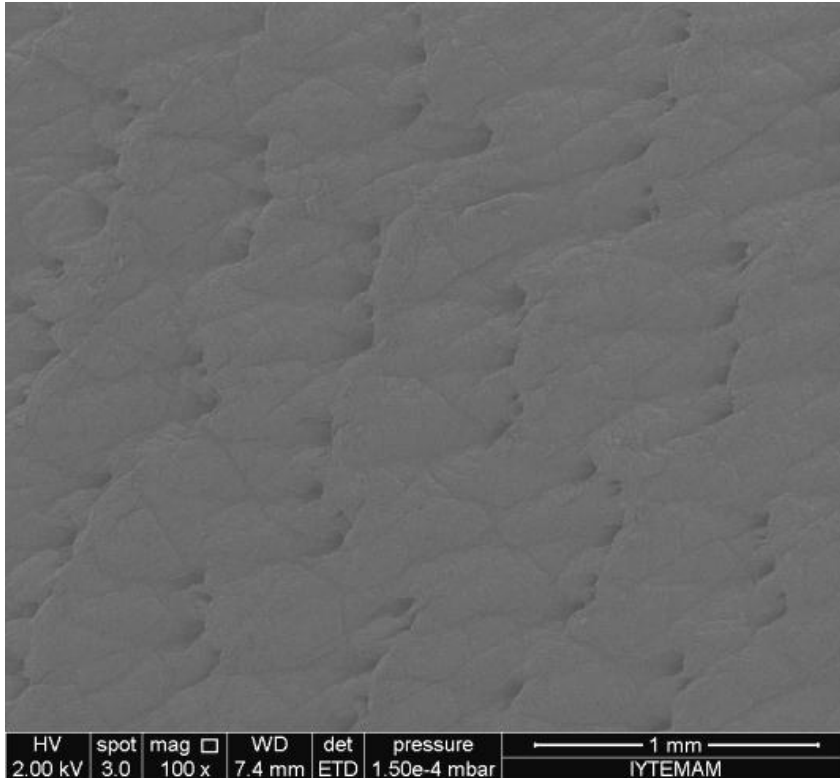
Yukarıdaki tepkimede Kroger-Vink' in sembollerle gösterme yöntemi uygulanmıştır. Böylece, Şekil 5.6'dan oksijen boşluğu oluşmasının O-H grubu protonunun yapıdaki Ag-eksiğine doğru çekimini kolaylaştırdığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle, FTIR sonuçlarında gözlemlendiği gibi, OH grubunun gerilme titreşimi değişebilecektir.

Çalışmamızda hem saf HAP hem Ag-HAP FTIR spektrumunda hidroksiapatite ait karakteristik pikler literatürdeki verilerle uygun çıkmıştır. Ancak, Ag-HAP bileşiğinin FTIR spektrumunda 3570 cm^{-1} hidroksil grubuna ait pik gözlenmemiştir. Gözlenmeme sebebinin, yukarıda anlatıldığı gibi HAP'e yapılan gümüş ikamelerinin, $\text{Ca}_9\text{Ag}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ formülü uyarınca gerçekleştiğine işaret ettiği düşünülmektedir.

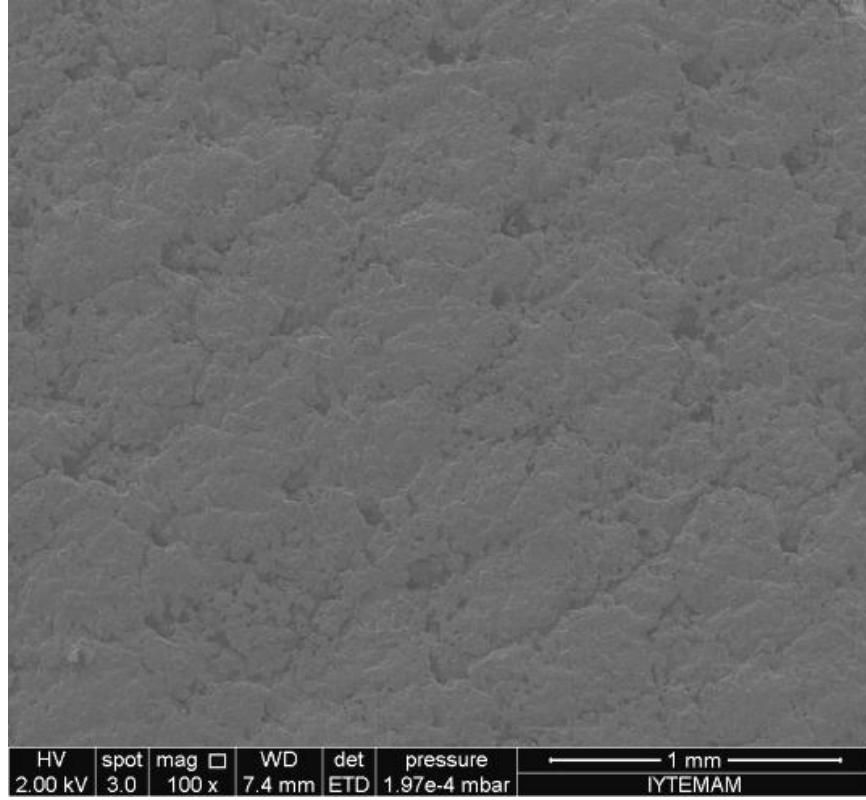
5.2. Deri Karakterizasyonuna Ait Bulgular

5.2.1. Derilerin yüzey morfolojisine ait bulgular

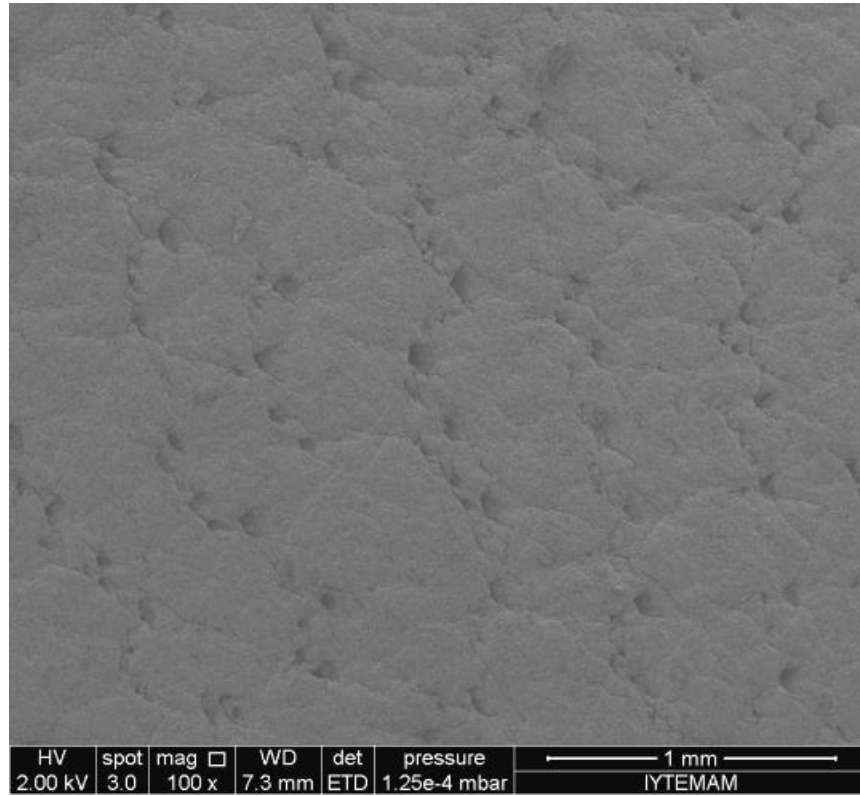
Elde edilen Ag-HAP kolloidal çözeltileri astarlık deri cilt yüzeyine uygulanmıştır. Daha sonra film oluşması için deri örnekleri kurutma ve ısıtma işlemlere tabi tutulmuştur. Kontrol (işlem görmemiş) ve % 0-5 Ag-HAP uygulanan deri örneklerinin yüzey morfolojilerine ait SEM görüntüleri Şekil 5.7’de gösterilmiştir. SEM fotoğraflarından kontrol deri örnekleri yüzeyinin pürüzlü deri gözeneklerinin geniş olduğu, saf HAP uygulanan deri örneklerinin yüzeyinde oluşan filmin HAP partiküllerinin topaklanma eğilimi yüzünden hafif pürüzlü olduğu, Ag katkılı HAP çözeltileri uygulanmış derilerin yüzeyinde ise çok ince, açık renkte mat filmlerin oluştuğu görülmektedir. Astarlık deriler üzerine kaplanan Ag-HAP filmlerin çok ince olduğundan genelde deri yüzeyi formunu aldığı ve gözeneklerin kontrol deri örneğine göre kapanmış olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca, gümüş konsantrasyonunun artmasıyla Ag-HAP partiküllerin deri gözeneklerini doldurduğu ve deri yüzeyinde ince film tabakasının daha homojen olup derilerin cilt yüzeyini tamamıyla kapladığı açıkça görülmektedir. Mikro yapıdaki değişim deri gözeneklerinden, renkten ve parlaklıktan ileri gelmektedir.



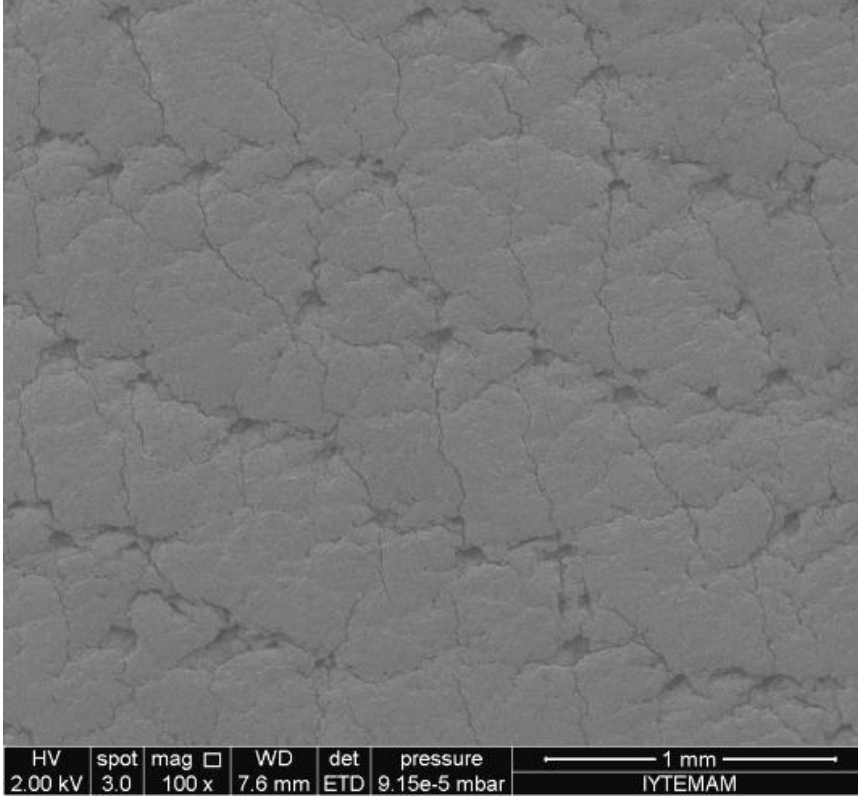
a) Kontrol deri örneği



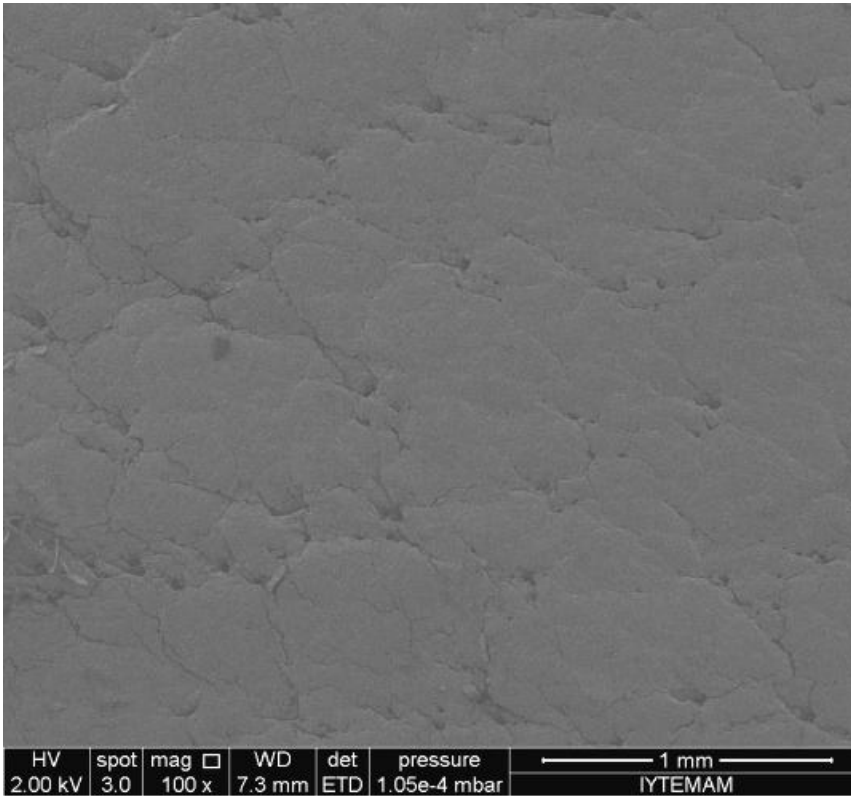
b) Saf HAP uygulanan deri örneği



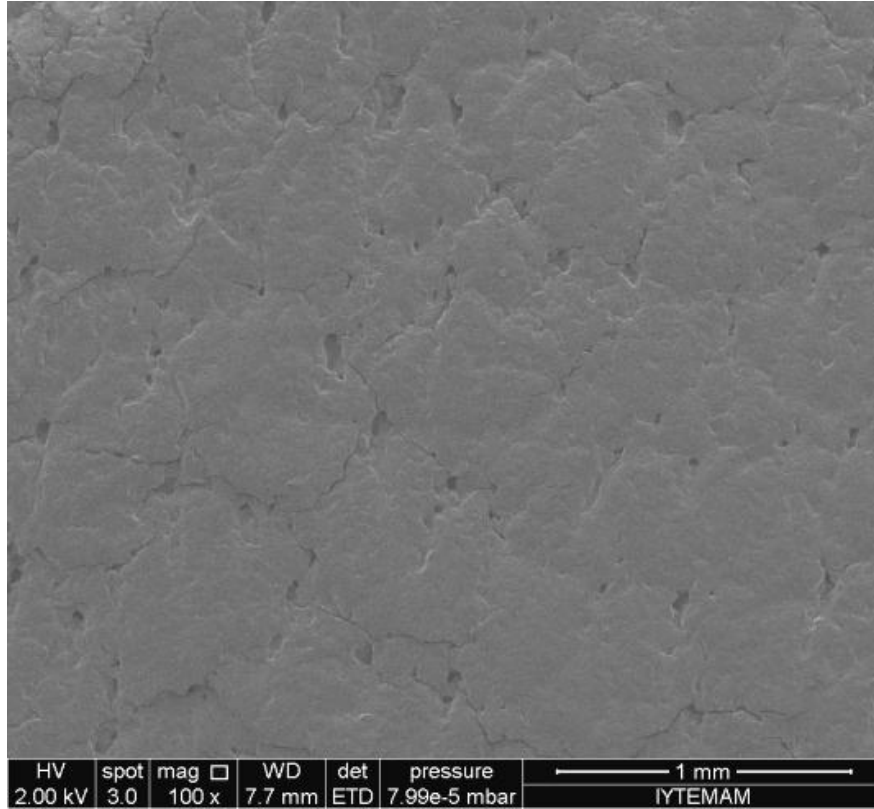
c) % 1 Ag-HAP çözeltisi uygulanan deri örneği



d) % 2 Ag-HAP çözeltisi uygulanan deri örneği



e) % 3 Ag-HAP çözeltisi uygulanan deri örneği



f) % 5 Ag-HAP çözeltisi uygulanan deri örneği

Şekil 5.7. Kontrol deri örneği (işlem görmemiş) ve % 0-5 Ag-HAP ile işlem görmüş deri örneklerinin SEM görüntüleri

Mo et al. (2008), titanyum malzemesi üzerine kaplanan Ag-HAP/Ti nanokompozit ince filminin SEM yüzey tarama görüntülerini incelemişler ve Ti ile Ag' in ince film içinde homojen dağılım gösterdiklerini, bu niteliğin filme iyi antibakteriyel etki sağladığını ileri sürmüşlerdir.

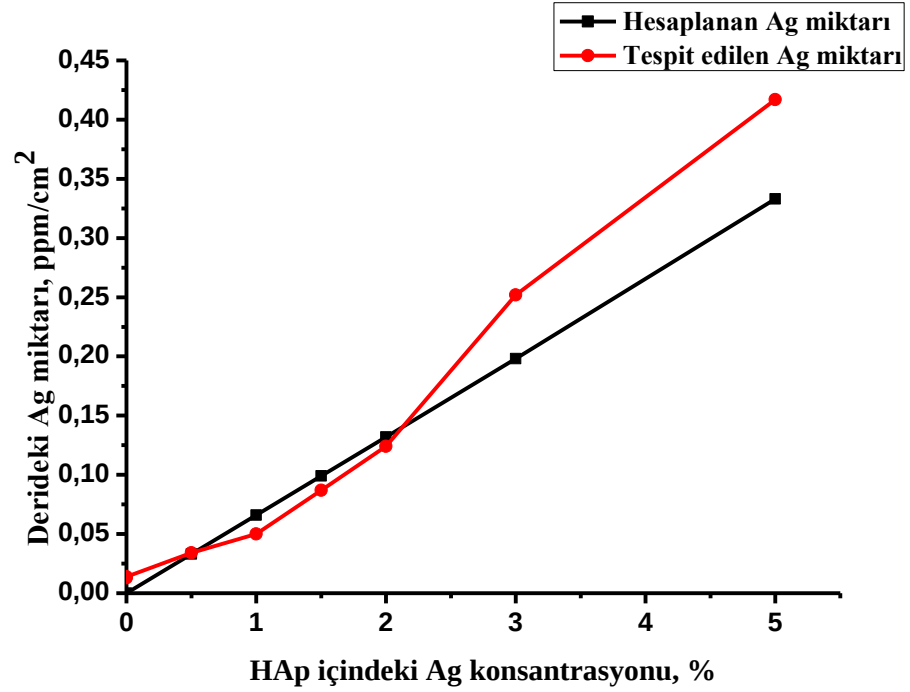
Çavdar (2009), çalışmasında yaş kimyasal metodu kullanarak sentezlediği metal iyonları (% 5 Ag^+ ve % 14 Zn^{2+}) katkılı kalsiyum fosfat esaslı antimikrobiyal tozu tekstil kumaşlarına uygulamış ve kumaşların SEM görüntülerini incelemiştir. Deneylerde kullanılan her kumaş tipi üzerindeki antimikrobiyal tozun homojen bir dağılım gösterdiğini belirtmiştir. Antimikrobiyal tozların yüzey enerjilerini azaltmak için bir araya gelme eğiliminde olmalarına bağlı olarak kumaşların bazı yerlerinde aglomeratların oluştuğunu tespit etmiştir. Tozların dağılımına kumaşların lif yapılarının da etkisinin olduğu, bağlayıcının homojen olarak dağılmayarak birikim yaptığı ve aglomeratların da bu sebeple oluştuğu düşünülmüştür.

5.2.2. Derilerin gümüş içeriğine ait bulgular

ICP-OES analizinden elde edilen gümüş tayini ile ilgili bulgular Çizelge 5.4 ve Şekil 5.8’de verilmiştir. Çizelgede görüldüğü gibi kontrol deri örneklerinde oldukça düşük 1 ppm’in çok altında gümüş olduğu tespit edilmiştir. Nitekim tozların ICP-OES analizinde saf HAP tozunda da gümüş saptandığı gibi. Deri işlem basamaklarında gümüş elementi direkt kullanılmamakta fakat üretim prosesinde kullanılan saf olmayan bazı kimyasallardan deri yapısına dahil olabileceği düşünülmektedir. Ag-HAP uygulanan deri örneklerindeki gümüş miktarlarının hesaplanan miktarlara yakın olduğu ve Ag konsantrasyonunun artmasıyla artış olayının bulunduğu görülmüştür. % 1 – 2 Ag-HAP ile işlem görmüş derilerdeki Ag miktarında bir düşüş söz konusuysa, % 3 ve % 5 Ag-HAP ile işlem gören derilerdeki Ag miktarında artış saptanmıştır. Ancak iki ölçüm değerleri arasındaki fark düşük olduğu için önemli değildir.

Çizelge 5.4. % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerdeki hesaplanan ve ölçülen gümüş miktarları

Deri örnekleri	Hesaplanan değer (ppm/cm ²)	ICP-OES değeri (ppm/cm ²)	Aradaki fark (ppm/cm ²)
Kontrol	0	0,013	0,013
Saf HAP	0	0,014	0,014
% 0.5 Ag-HAP	0,033	0,034	0,001
% 1.0 Ag-HAP	0,066	0,050	-0,016
% 1.5 Ag-HAP	0,099	0,087	-0,012
% 2.0 Ag-HAP	0,132	0,124	-0,008
% 3.0 Ag-HAP	0,198	0,252	0,054
% 5.0 Ag-HAP	0,333	0,417	0,084

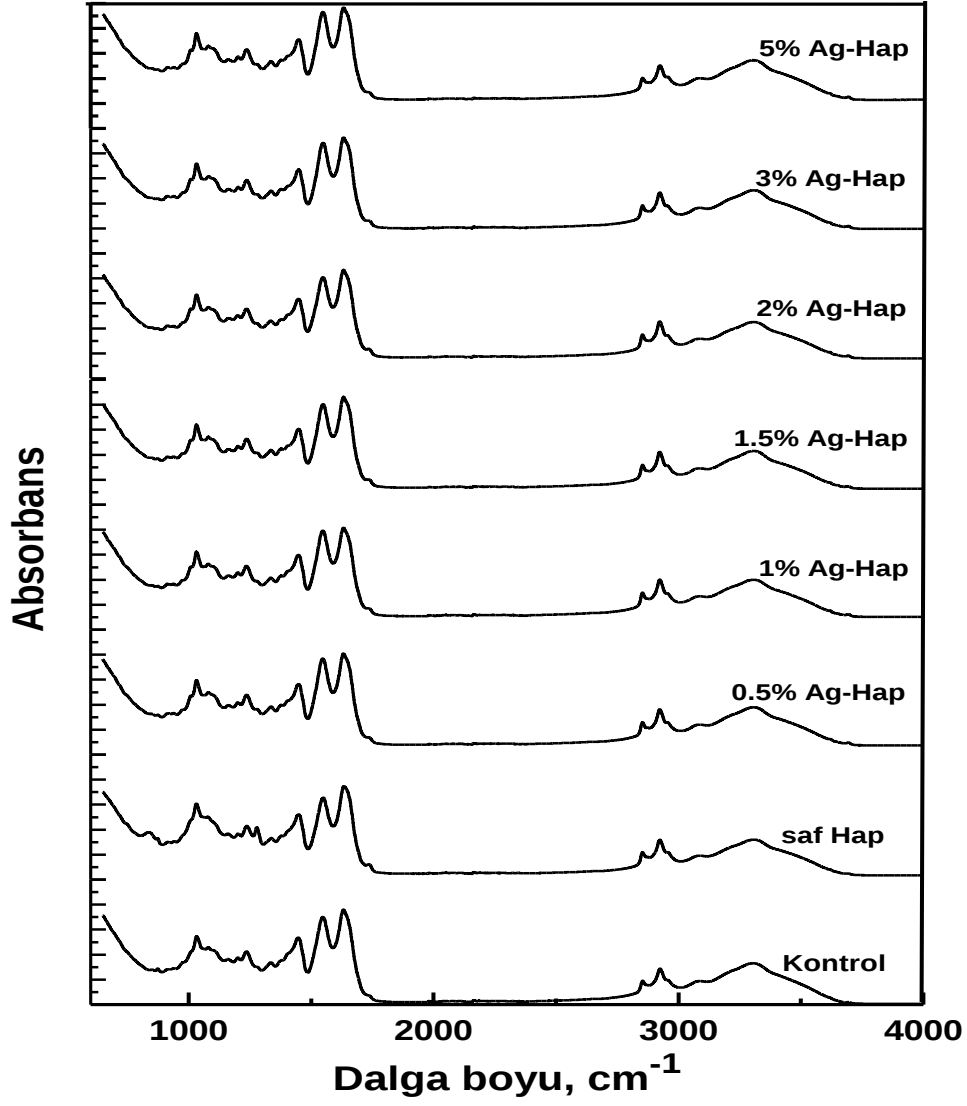


Şekil 5.8. Ag-HAP uygulanan derilerdeki Ag miktarları

5.2.3. Derilerin FTIR analizine ait bulgular

Kontrol deri örneği ve % 0-5 Ag-HAP ile işlem görmüş deri örneklerinde meydana gelen kimyasal değişimlerin belirlenebilmesi için deri örneklerinin FTIR spektrumları alınmıştır. Bu tarama ile % 0-5 Ag-HAP katılarak uygulanan finisaj işlemi sonucunda deri içerisindeki fonksiyonel gruplardaki değişimler tespit edilmeye çalışılmıştır. Yapılan FTIR taramaları sonucu derilerden elde edilen FTIR spektrumları ve fonksiyonel gruplar Şekil 5.9 ve Çizelge 5.5’de verilmiştir.

Çizelge 5.5’de görüldüğü gibi öncelikle derilerin FTIR spektrumlarında krom krust derilere ait fonksiyonel grupların tümü gözlenmiştir. Bununla birlikte, HAP’e ait PO_4^{3-} bandı ($1200\text{-}1202\text{ cm}^{-1}$ aralığında) kontrol deri örneği hariç (%0-5) Ag-HAP ilave edilerek finisajlanan derilerde görülmüştür. Ayrıca % 3 ve % 5 Ag-HAP ile işlem görmüş derilerin spektrumlarında C-O bandı 1161 cm^{-1} dalga boyunda görülmüştür. FTIR spektrumları; (% 0-5) Ag-HAP katılarak uygulanan finisaj kaplamalarının derilerin yüzeyine uygulandığını açıkça ortaya koymaktadır.



Şekil 5.9. Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin FTIR spektrumları

Çizelge 5.5. Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin FTIR spektrumlarında gözlenen fonksiyonel gruplar

Fonksiyonel gruplar	Kontrol	Saf HAP	% 0,5 Ag-HAP	% 1 Ag-HAP	% 1,5 Ag-HAP	% 2 Ag-HAP	% 3 Ag-HAP	% 5 Ag-HAP
	Dalga boyu (cm ⁻¹)							
=C-H	837	835						
C-O	1032	1031	1031	1032	1031	1031	1031	1031
C-O	1080	1080	1080	1080	1080	1080	1081	1081
C-O							1161	1161
PO ₄		1202	1201	1201	1202	1200	1202	1202
C-N	1236	1237	1236	1236	1237	1236	1237	1236
C-N	1335	1337	1335	1335	1336	1335	1336	1336
-C-H	1447	1448	1448	1448	1448	1448	1449	1448
N-O	1547	1549	1547	1547	1548	1548	1548	1547
C=C	1632	1633	1632	1632	1632	1632	1632	1632
C-H	2854	2853	2853	2853	2853	2853	2853	2853
C-H	2924	2923	2923	2923	2923	2923	2923	2924
-OH	3301	3311	3303	3309	3309	3311	3308	3302

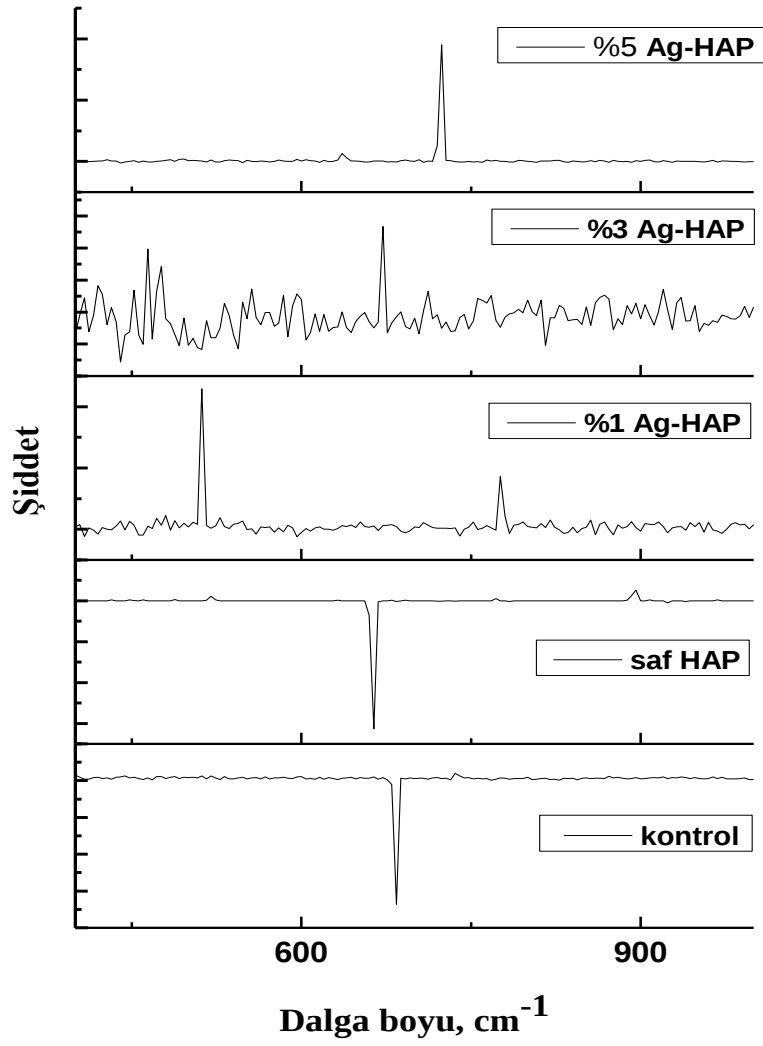
5.2.4. Derilerin Raman analizine ait bulgular

Raman spektroskopisi, bir numunenin görünür bölge veya yakın-IR monokromatik ışıktan oluşan güçlü bir lazer kaynağıyla ışınlanmasıyla saçılan ışının belirli bir açıdan ölçümüne dayanır. Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sırasında ışık absorpsiyonu olayı gerçekleşmiyorsa ışık saçılması olayı meydana gelir. Işık saçılması sırasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur ve bu tür elastik saçılma olayına Rayleigh saçılması denir. Elastik saçılma olayının yanı sıra saçılan ışığın çok az bir kısmı elastik olmayan saçılma olayı ise Raman saçılması adını alır. Rayleigh saçılması olayında Raman saçılmasına göre 104 - 105 kez daha şiddetli bir saçılmış ışık oluşur. Ancak Rayleigh saçılması tek bir pik verir ve titreşim geçişleri hakkında bilgi vermez. Raman saçılması sırasında saçılan ışığın enerjisinde molekül ile etkileşen ışığına göre oluşan fazlalık veya azlık ışıkla etkileşen molekülün titreşim enerji düzeyleri arasındaki enerji farkları kadardır.

Bu nedenle Raman saçılmasının spektroskopik incelenmesi ile de moleküllerin titreşim enerji düzeyleri hakkında bilgi edinilebilir. Bu tür bir spektroskopik yöntem Raman spektroskopisi adını alır. Bu yöntemde molekül ile etkileşen ışığın dalgaboyuna göre saçılan ışığın dalgaboyunda oluşan farklar ölçülür. Bu farklar Raman kayması olarak adlandırılır. Moleküller ile etkileştirilen ışığın kaynağı olarak özellikle son yıllarda genellikle lazer türü kaynaklar kullanıldığından bu yöntem Lazer Raman Spektroskopisi adı da verilir. Raman spektroskopisi inorganik, organik ve biyolojik sistemlerin kalitatif ve kantitatif analizine uygulanır (Smith and Dent, 2005).

Kontrol deri örneği ve % 0-5 Ag-HAP ile işlem görmüş deri örneklerinde meydana gelen kimyasal değişimlerin belirlenebilmesi için deri örnekleri Raman Spektroskopisinde incelenmişlerdir. Bu tarama ile % 0-5 Ag-HAP katılarak uygulanan finisaj işlemi sonucunda deri içerisindeki fonksiyonel gruplarda meydana gelen ve FTIR ile belirlenemeyen değişimler Raman Spektroskopisi ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Yapılan Raman taramaları sonucu kontrol (işlem görmemiş) ve % 0-5 Ag-HAP ile işlem gören ayakkabılık astarlık derilerden elde edilen Raman spektrumları ve bu spektrumlardaki fonksiyonel gruplar Şekil 5.10 ve Çizelge 5.6'da verilmiştir.

Elde edilen Raman spektrumlarında kromlu krust deriye ait fonksiyonel gruplar görülmüştür. Bunun dışında, % 1, % 3, % 5 Ag-HAP ile işlem görmüş derilerde sırasıyla 515 cm^{-1} , 671 cm^{-1} , 723 cm^{-1} dalga boyu aralığında xMeO (Ag_2O) pikler gözlenmiştir. % 0.5 Ag-HAP uygulanan derilerin Raman spektrumlarındaki xMeO (Ag_2O) karakteristik bandının görülmemesi derinin cm^{-2} 'ine düşen gümüş miktarının düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 5.10. Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin Raman spektrumları

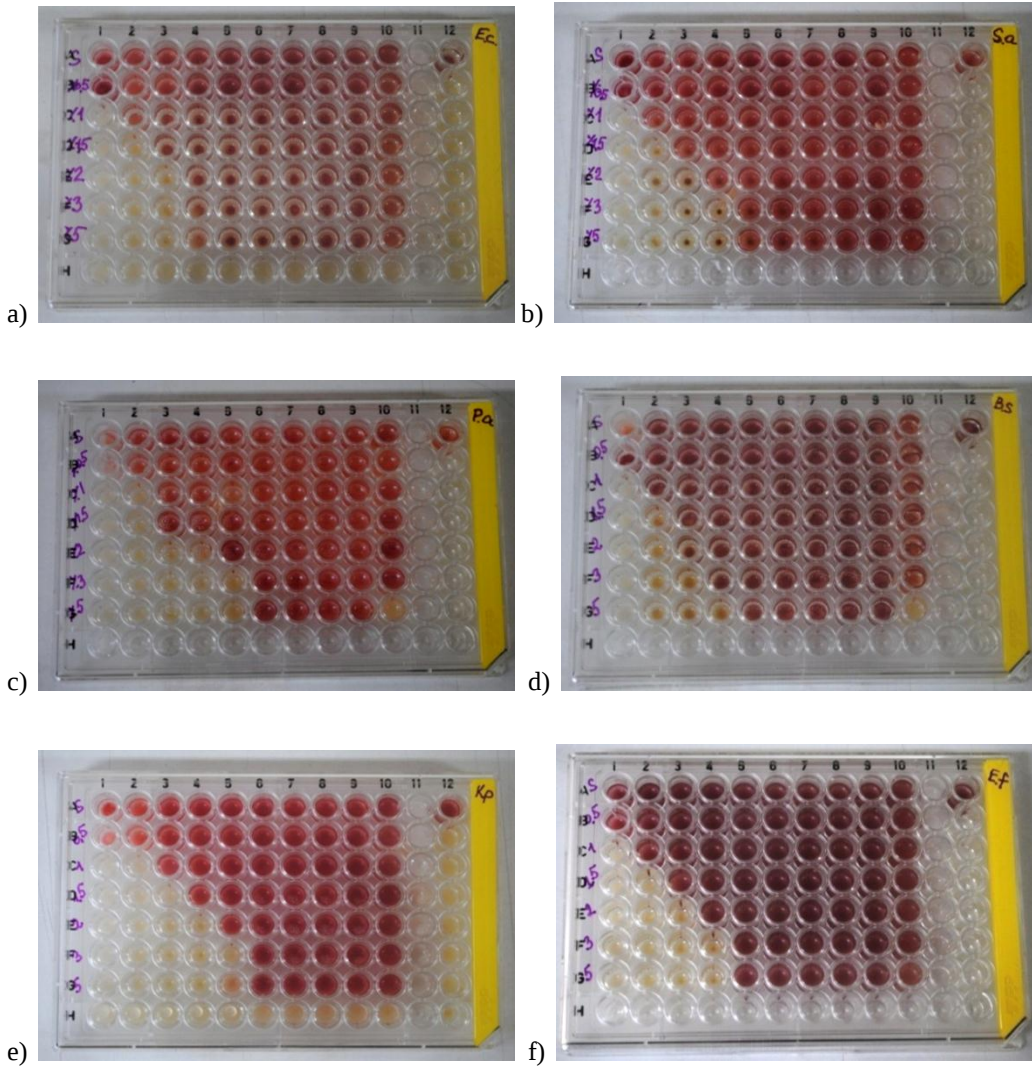
Çizelge 5.6. Kontrol ve % 0-5 Ag katkılı HAP uygulanan derilerin Raman spektrumlarında gözlenen fonksiyonel gruplar

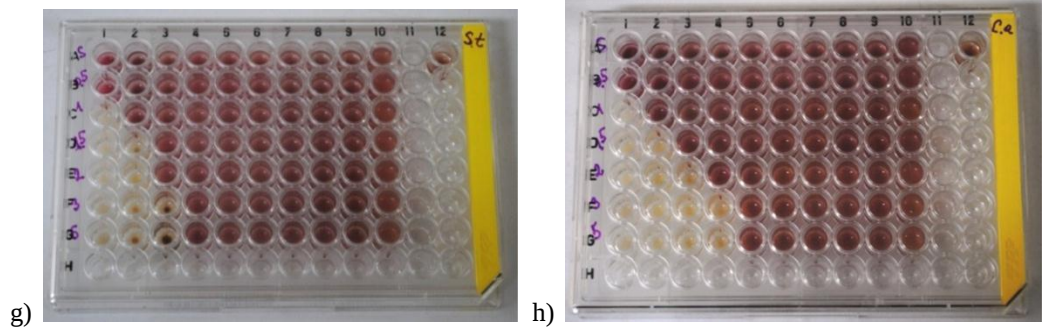
Fonksiyonel gruplar	Kontrol	Saf HAP	% 1 Ag-HAP	% 3 Ag-HAP	% 5 Ag-HAP
	Dalga sayısı (cm ⁻¹)				
νXmetal-O	-	-	515	671	723

5.3. Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

5.3.1. Hidroksiapatit çözeltilerinin MIC değerleri sonuçları

Broth Mikrodilüsyon yöntemi ile 24 saat sonra saf hidroksiapatit ve % 0.5-5 aralığında Ag katkılı HAP çözeltilerinin kullanılan test mikroorganizmalarına karşı MIC değerlerinin belirlendiği mikroplate resimleri Şekil 5.11'de gösterilmiştir. % 1-5 aralığında Ag katkılı HAP çözeltilerinin gram-negatif ve gram-pozitif bakteriler ve *C. albicans*'a karşı hesaplanan MIC değerleri Çizelge 5.7 ve Çizelge 5.8'de verilmiştir.





Şekil 5.11. Saf hidroksiapatit (S) ve % 0.5-5 aralığında Ag-katkılı HAP çözeltilerinin kullanılan test mikroorganizmalarına karşı MIC değerlerinin belirlendiği mikroplatelerin görüntüleri: a) *E. coli*, b) *S. aureus*, c) *P. aeruginosa*, d) *B. subtilis*, e) *K. pneumoniae*, f) *E. faecalis*, g) *S. typhimurium*, h) *C. albicans*. Kırmızı kuyucuklar üremenin olduğunu göstermektedir. En sağdaki sütunler negatif ve pozitif kontrollerdir.

Çalışmamızda mikrodalga yöntemi ile elde edilen Ag katkılı hidroksiapatit çözeltilerinin nicel etkilerini görebilmek amacıyla 7 test bakteri ve bir adet maya türüne karşı MIC değerleri belirlenmiş ve elde edilen sonuçlara göre saf HAP ve % 0.5 Ag-HAP tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinlik göstermediği, % 1-5 oranında Ag doplanan HAP çözeltilerinin mikroorganizma türüne göre farklı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. Gram-negatif bakterilere karşı etkili MIC değerinin 2.09-12.25 $\mu\text{g/ml}$ (Çizelge 5.7), gram-pozitif bakteriler ve *C.albicans* için bu değer 4.18-12.25 $\mu\text{g/ml}$ aralığında olduğu saptanmıştır (Çizelge 5.8). Ag-HAP *K. pneumoniae* (2.09-5.38 $\mu\text{g/ml}$) ve *P. aeruginosa*'ya karşı (2.09-9.10 $\mu\text{g/ml}$) en etkin MIC konsantrasyonu sergilemiştir.

Çizelge 5.7. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltilerinin gram-negatif bakterilere karşı MIC değerleri ($\mu\text{g/ml}$)

	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
Saf HAP	-	-	-	-
% 0.5 Ag-HAP	-	-	-	-
% 1 Ag-HAP	10.76	10.76	5.38	5.38
%1.5 Ag-HAP	9.10	9.10	9.10	4.55
% 2 Ag-HAP	6.12	12.25	6.12	3.06
% 3 Ag-HAP	8.37	8.37	2.09	2.09
% 5 Ag-HAP	11.50	11.50	2.87	2.87

Çizelge 5.8. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltilerinin gram-pozitif bakteriler ve *C.albicans*'a karşı MIC değerleri (µg/ml)

	<i>S.aureus</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C.albicans</i>
Saf HAP	-	-	-	-
% 0.5 Ag-HAP	-	-	-	-
%1 Ag-HAP	10.76	10.76	10.76	10.76
%1.5 Ag-HAP	9.10	9.10	9.10	9.10
%2 Ag-HAP	6.12	12.25	6.12	6.12
%3 Ag-HAP	4.18	8.37	4.18	4.18
%5 Ag-HAP	5.75	5.75	5.75	5.75

Feng et al. (1998), çalışmalarında alüminyum substratı üzerindeki Ag-HAP ince filminin antibakteriyel etkisini gram-negatif *E. coli* ve *P. aeruginosa* ile gram-pozitif *S.aureus* ve *S. epidermidis*'e karşı incelemiştir. Ag-HAP ince filmi, hidroksiapatitin 20 ve 100 ppm AgNO₃ (12.7 ve 63.5 ppm Ag) çözeltisiyle muamele edilerek iyon değiştirme tepkimesi sonucu elde edilmiştir. HAP içindeki 12.7 ppm Ag konsantrasyonunun alüminyum substratı üzerindeki test bakterilerin üremelerini engellediği ve bakterileri öldürdüğü tespit edilmiştir.

Oh et al. (2003), Ag katkılı nano-HAP'in antimikrobiyal özelliklerine buharlaştırarak veya dondurarak kurutma işlemlerin etkisini incelemiştir. Gümüş miktarı artmasının test edilen *E. coli*'ye karşı düşük MIC değeriyle sonuçlanmıştır. Buharlaştırılarak kurutulan % 2.07 ve % 2.21 Ag-HAP için *E. coli*'ye karşı MIC değerleri sırasıyla 1000 ve 500 ppm iken, dondurarak kurutulan % 2.33 ve % 4.87 Ag-HAP için bu değerler 500 ve 100 ppm olarak bulunmuştur.

Oh et al. (2004), diğer bir çalışmalarında iyon değiştirme ve çöktürme yöntemleriyle elde ettikleri Ag-HAP'in gram-pozitif *S. aureus* ve gram-negatif *E. coli* bakterilerine karşı MIC değerlerini kıyaslamışlar. Gümüş miktarının artmasıyla her iki yöntemle sentezlenen Ag-HAP MIC değerlerinin her iki bakteriye karşı daha yüksek seyreltmelerde etkili olduğunu belirtmişlerdir. *S. aureus*'a karşı çöktürme yöntemiyle elde edilen % 0.11 Ag-HAP 10000 ppm, %1.93 Ag-HAP ise 500 ppm MIC değeri göstermiş, buna karşın iyon-değiştirme yöntemiyle elde edilen % 0.16 Ag-HAP 1000 ppm, % 1.59 Ag-HAP ise 100 ppm MIC değeri göstermiştir. *E. coli*'ye karşı bu değerler çöktürme yöntemiyle

sentezlenen % 0.11 ve % 1.93 Ag-HAP için sırasıyla 5000 ve 1000 ppm iken, iyon değiştirme yöntemiyle elde edilen % 0.16 ve % 1.59 Ag-HAP için sırasıyla 10000 ve 100 ppm olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, yaklaşık aynı miktarda gümüş içeren Ag-HAP'in her iki bakteriye karşı MIC değerlerinde sentezlenme yöntemlerine bağlı olan farklılığı da gözlemlemişlerdir.

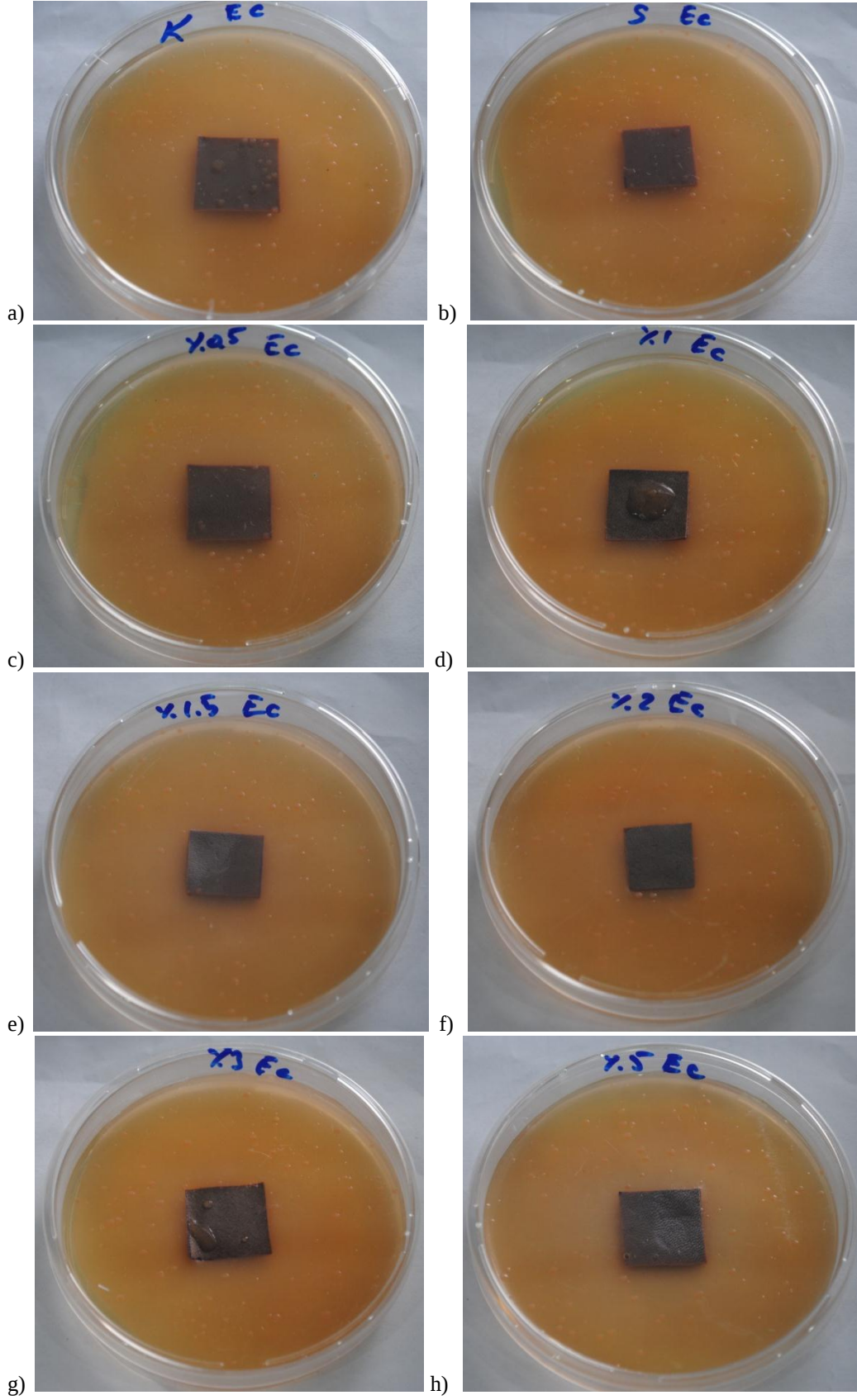
Han et al. (2007), iyon demeti destekli depolanmış kalsiyum fosfat ince filmi içine gümüş katmışlar ve 0.4 mol/L gümüş konsantrasyonunun *E. coli* ile *S. mutans* bakterilerinin azalmasında etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Nirmala et al. (2010), biyomedikal uygulamalar için Ag-HAP'i dana kemiğinden elde edilen hidroksiapatitin AgNO₃ çözeltisiyle muamele sonucu elde etmişler ve *E. coli* ile (Methicillin'e dirençli ve direnci olmayan) *S. aureus* türlerine karşı test etmişlerdir. Ag-HAP'in bakterisidal etkisinin Ag miktarının artmasıyla daha da belirgin olduğunu ve (Methicillin'e dirençli ve direnci olmayan) *S. aureus* türlerine karşı MIC değerinin % 1 Ag içeren HAP, *E. coli*'ye karşı ise % 3 Ag içeren HAP'in gösterdiğini ifade etmişlerdir.

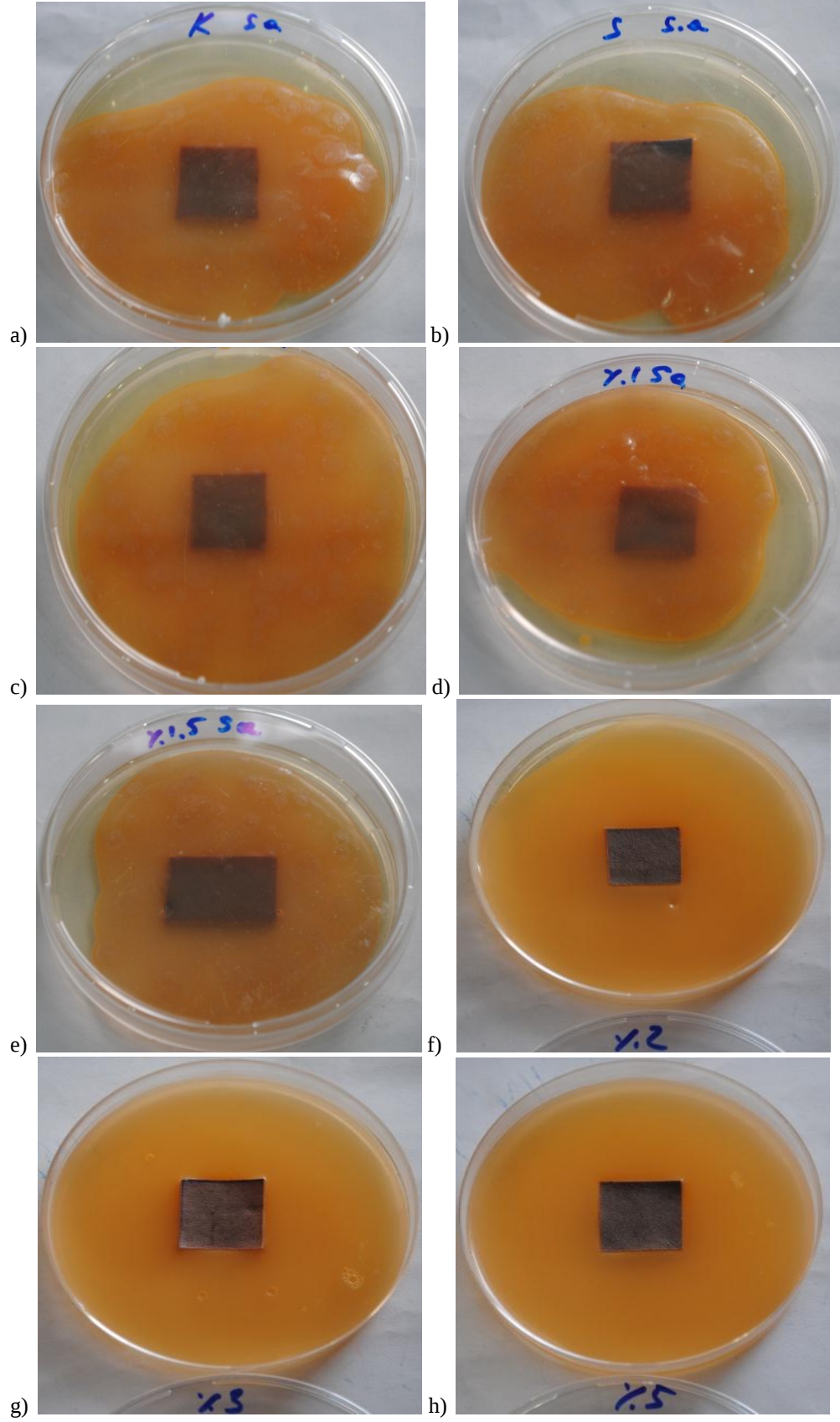
5.3.2. Agar yayma testi sonuçları

Kontrol ve % 0-5 Ag-HAP ile işlem gören derilerin *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkileri Agar yayma yöntemi ile tespit edilmiştir (Şekil 5.12 - Şekil 5.14). Fotoğraflardan görüldüğü gibi kontrol deri örnekleri ile % 0-1.5 Ag içeren çözelti ile muamele edilmiş deri örneklerinin üzerinde mikroorganizmaların gelişimi görölmesine karşın % 2 ve üzeri oranlarda Ag-HAP ile işlem gören deri örnekleri üzerinde mikrobiyal büyüme görölmemiştir. Bu durum Ag katkılı HAP ile işlenmiş deri örneklerinde antimikrobiyal etkinin nitel bir kanıtı olarak kabul edilmiştir.

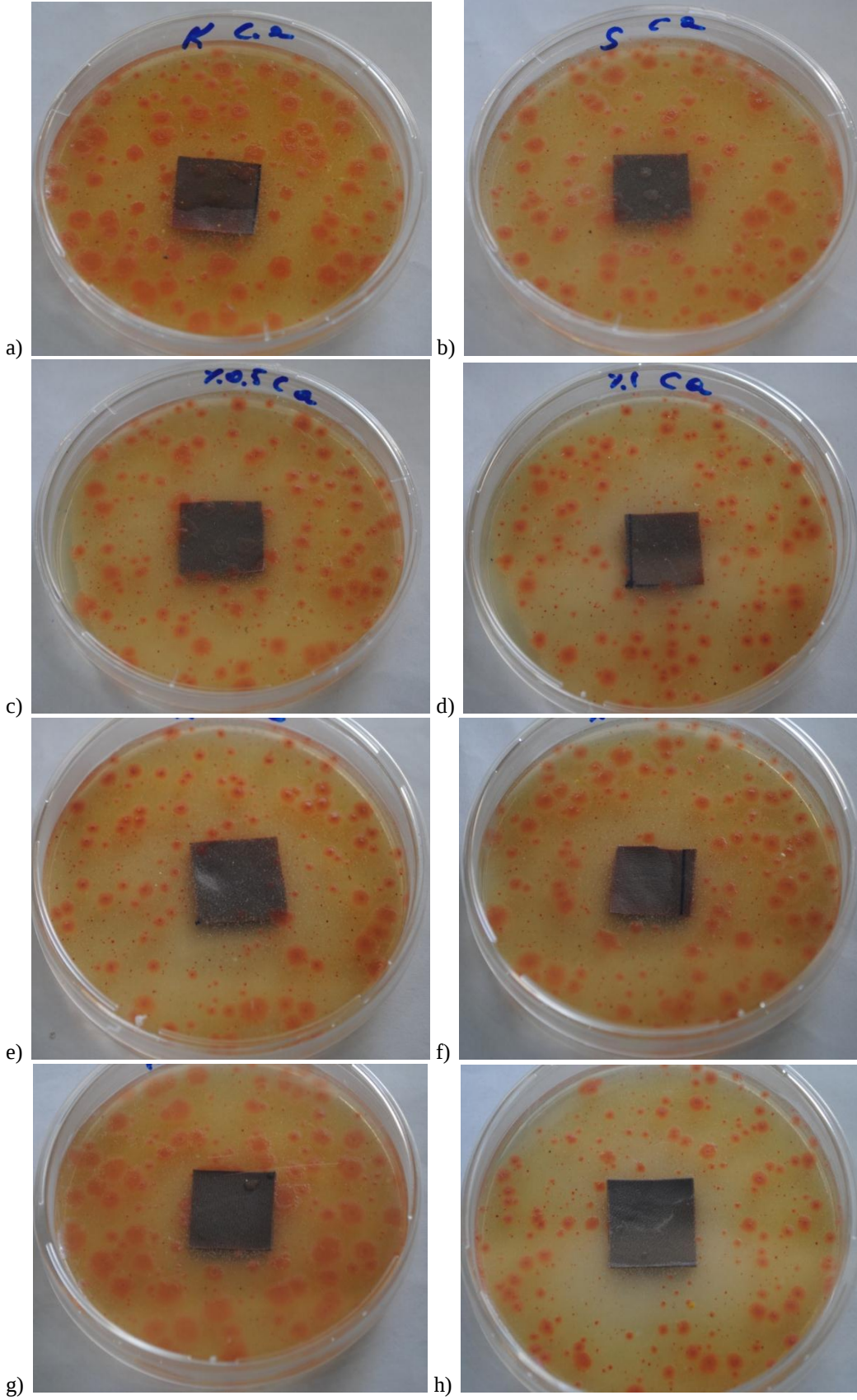
Yapılan test sonucunda % 2 ve üzeri oranlarda gümüş içeren hidroksiapatit ile muamele edilen derilerin, 24 saat sonra tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği ve iyi bir antimikrobiyal özelliğe sahip oldukları tespit edilmiştir.



Şekil 5.12. Derilerin *E. coli*'ye karşı agar yayma test sonuçları: (a) kontrol, (b) saf HAP, (c) % 0.5 Ag-HAP, (d) % 1Ag-HAP, (e) % 1.5 Ag-HAP, (f) % 2 Ag-HAP, (g) % 3 Ag-HAP, (h) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler



Şekil 5.13. Derilerin *S. aureus* 'a karşı agar yayma test sonuçları: (a) kontrol, (b) saf HAP, (c) % 0.5 Ag-HAP, (d) % 1Ag-HAP, (e) % 1.5 Ag-HAP, (f) % 2 Ag-HAP, (g) % 3 Ag-HAP, (h) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler



Şekil 5.14. Derilerin *C. albicans*'a karşı agar yayma test sonuçları: (a) kontrol, (b) saf HAP, (c) % 0.5 Ag-HAP, (d) % 1Ag-HAP, (e) % 1.5 Ag-HAP, (f) % 2 Ag-HAP, (g) % 3 Ag-HAP, (h) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler

Lv et al. (2006), çalışmalarında Ag ve Ti katkılı HAP'i tekstil kumaşına uygulamışlar ve antibakteriyel aktivitesini disk diffüzyon testi ile *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı belirlemişlerdir. Test sonucunda, % 0.5 Ag katkılı HAP uygulanan kumaşların etrafında 3 mm, % 0.5 Ag ve % 5 Ti katkılı HAP uygulanan kumaşların etrafında ise 4 mm inhibisyon zonunun oluştuğunu tespit etmişlerdir.

Çavdar (2009), çalışmasında yaş kimyasal yöntemle sentezlenen % 5 Ag⁺ ve % 14 Zn²⁺ iyonları katkılı kalsiyumfosfat esaslı antibakteriyel tozunu tekstil kumaşları üzerine uygulamış ve gram-negatif *E. coli* bakterisine karşı antibakteriyel niteliğini incelemiş ve test sonucunda kumaşların 20 yıkama sonrasında bile antibakteriyel etkinliklerini koruduklarını belirtmiştir.

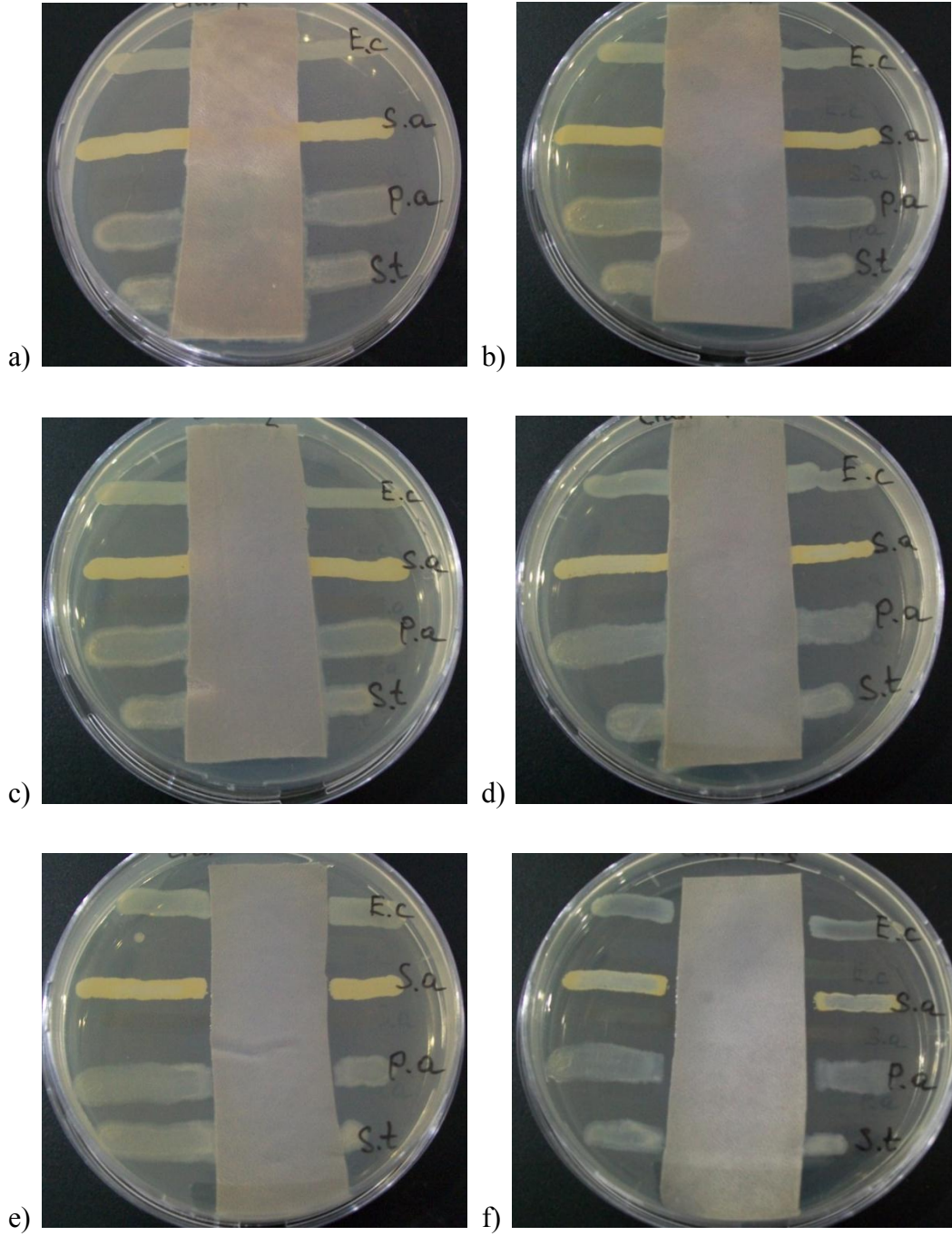
Zhang et al. (2010), Ag katkılı mercan hidroksiapatitin antibakteriyel özelliklerini incelemişler ve 8×10^{-5} (% 1.5) ve 1×10^{-2} (% 4) mol/L gümüş konsantrasyonunun *E. coli* ile *S. aureus* bakterilerine karşı antibakteriyel etki gösterdiğini, ayrıca, yüksek konsantrasyondaki gümüşün antibakteriyel etkisinin artmasına daha geniş inhibisyon zonu çapları oluşmasının işaret ettiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte, aynı konsantrasyondaki gümüşün *S. aureus*'a nazaran *E. coli*'ye daha iyi antimikrobiyal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Çelik (2011), çalışmasında gümüş katkılı hidroksiapatit (Ag-HAP) malzemesini EDTA şelat dekompozisyonu metodu ile sentezlemiş ve gümüş katkısının artması ile malzemenin antibakteriyel özelliğinin de artmasını gözlemlemiştir.

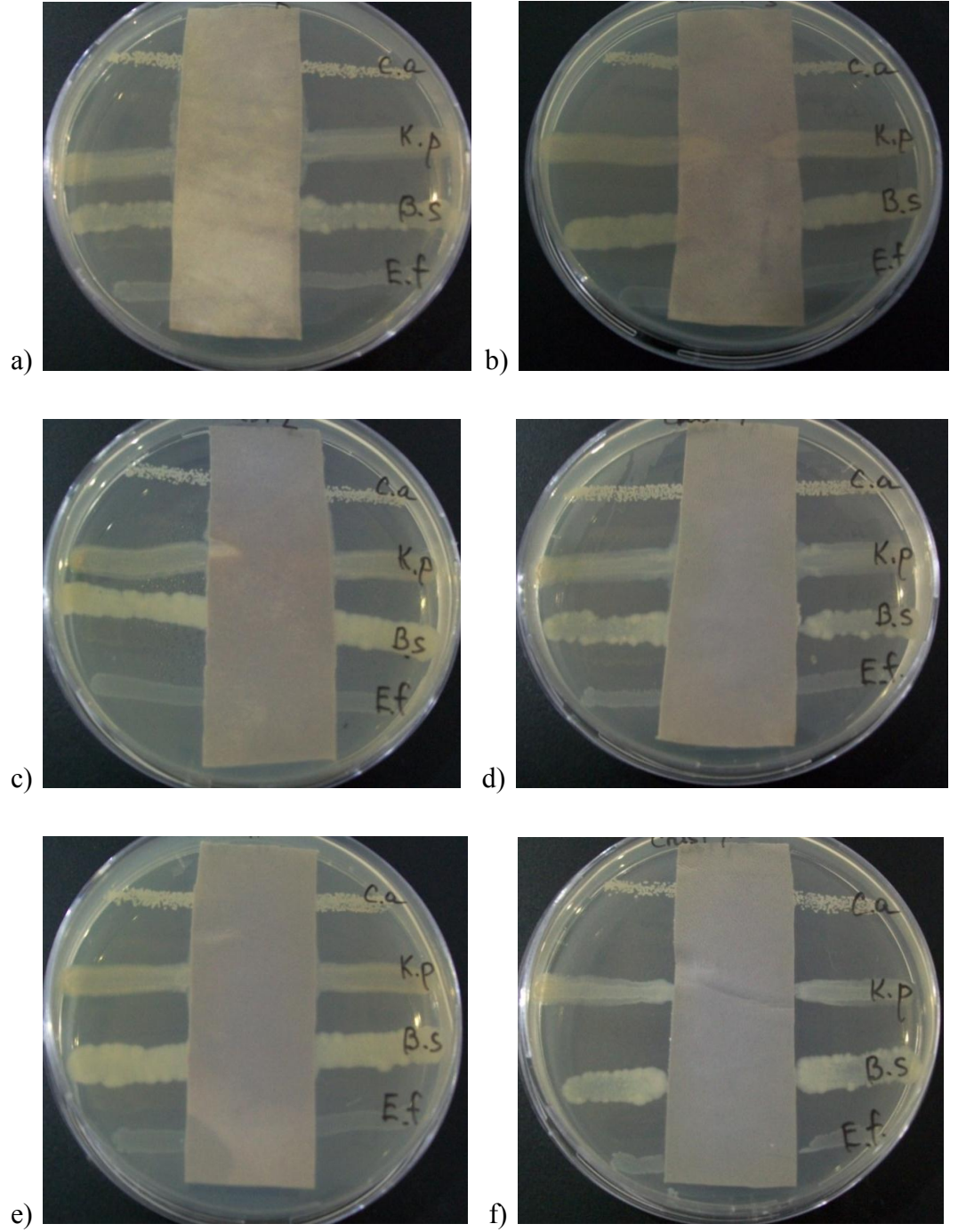
5.3.3. AATCC 147 testi sonuçları

Saf HAP, lak ve % 1-3 oranlarında Ag katkılı HAP ile işlenmiş deri örneklerinin 24 saat sonra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium*'e karşı antimikrobiyal aktivitelere ait sonuçlar Şekil 5.15'de, *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* ve *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal aktivite sonuçları ise Şekil 5.16'da gösterilmiştir. AATCC 147 yöntemine göre yapılan çalışmada, antimikrobiyal madde ile işlem görmemiş ya da az etkili işlem görmüş test materyali üzerinde ve etrafında inhibisyon zonu (engelleme alanı) oluşmaz (Şekil 5.15 a, b, c, d ve Şekil 5.16 a, b, c, d). Yeterli derecede antimikrobiyal madde ile işlem görmüş olan materyal yüzeyinde ve kenarında inhibisyon zonu oluşur (Şekil 5.15 e ve Şekil 5.16e). Etkili bir şekilde işlem görmüş materyal için,

materyal yüzeyinin yanı sıra etrafında da halo efekti denilen bir inhibisyon zonu oluşur (Şekil 5.15 f ve Şekil 5.16 f).



Şekil 5.15. Derilerin *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *S. typhimurium*'e karşı AATCC 147 testi sonuçları: a) kontrol, b) saf HAP, c) lak, d) % 1 Ag-HAP, e) % 2 Ag-HAP, f) % 3 Ag-HAP uygulanan deriler.



Şekil 5.16. Derilerin *C. albicans*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis* ve *E. faecalis*'e karşı AATCC 147 testi sonuçları: a) kontrol, b) saf hidroksiapatit, c) lak, d) % 1 Ag-HA, e) % 2 Ag-HA, f) %3 Ag-HA uygulanan deriler.

Yapılan test sonucunda % 2 ve % 3 oranlarda gümüş içeren hidroksiapatit ile muamele edilen derilerin 24 saat sonra tüm test mikroorganizmlara karşı agar yayma testi sonucunda da gözlendiği gibi antimikrobiyal etkinlik göstermiştir.

Koyaş (2006), gümüş katkılı hidroksiapatit tozunu yaş kimyasal yöntemiyle nano boyutlarda elde etmiş ve antibakteriyel özellikte seramik filtreler elde etmek amacıyla sentezlenen tozu farklı oranlarda bir döküm çamuruna katmıştır. Antibakteriyel analiz sonucunda hidroksiapatit tozu içerisine katılan gümüş miktarının artması ile bakteri oranında azalma görüldüğünü ve % 7 oranında antibakteriyel toz içeren filtrede bakterilerin tamamen inhibe edildiğini belirtmiştir.

Zhang et al. (2010), Ag-HAP'in antibakteriyel mekanizmasının pozitif yüklü gümüşün negatif yüklü bakterilere yaklaşarak onların yüzeyine iyonik etkileşim ile yapışması sonucu, bakteri hücre duvarını bozarak hücre içine girmesi ile açıklanabildiğini ifade etmişlerdir. Burada, Ag lisin, arginin ve sistein ile reaksiyona girer ve onların karboksilik (-COOH) ve tiyol (-SH) gruplarını bozar. Böylece, aktif proteinler pıhtılaşır ve bakterideki temel metabolik enzimlerin aktivitesi düşer. Aynı anda, gümüş ve enzimin -SH grubu, bakteri solunumunu engelleyen S-Ag bileşiğini oluşturur. Ayrıca, Ag nükleik asiti pıhtılaştırarak DNA molekülleri ile bağlanır veya DNA moleküllerinin kimyasal yapısını bozarak serbest radikalleri oluşturmak için katalize olur.

Agar yayma ve Paralel çizgi yöntemleri antimikrobiyal etkinin nitel olarak gözlemlenmesinde hızlı ve basit yöntemler olarak kabul edilir. Bir çok çalışmada bu test metodları uygulanıp malzemenin antimikrobiyal aktivitesi nitel olarak tespit edildikten sonra, antimikrobiyal aktivitenin hangi oranda etkin olduğunu belirlemek için ASTM E 2149-01 veya AATCC 100 test metodu uygulanmaktadır. Çalışmamızda nicel test olarak AATCC 100 test metodu kullanılmış ve test sonuçları aşağıda verilmiştir.

5.3.4. % Azalma AATCC 100 testi sonuçları

Saf ve % 0.5-5 oranda Ag katkılı hidroksiapatit çözeltileri ile işlenmiş deri örneklerinin *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı % azalma test sonuçları Çizelge 5.9 ve Çizelge 5.10'da verilmiştir. % 0.5 Ag katkılı hidroksiapatit uygulanmış olan deri örneğinde 1 saat sonra *Escherichia coli* sayısında % 43.86 azalma görülmüş iken, 2 saat sonra % 100 azalma gözlemlenmiştir; *Staphylococcus aureus* sayısında ise % 0.5 Ag katkılı hidroksiapatit uygulanan deri örneğinde 1 saat sonra % 69.30; 2 saat sonra ise %100 azalma görülmüştür.

Çizelge 5.9. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltileri uygulanan derilerin *E. coli* 'ye karşı % azalma test sonuçları

<i>Escherichia coli</i>	1 saat	% Azalma	2 saat	% Azalma
Başlangıç sayı	35.2 x 10 ³		17.6 x 10 ³	
Kontrol	5.7 x 10 ³		1.1 x 10 ³	
Saf HAP	3.6 x 10 ³	% 36.84	0.8 x 10 ³	% 27.27
% 0.5 Ag katılmış HAP	3.2 x 10 ³	% 43.86	0	% 100
% 1 Ag katılmış HAP	2.6 x 10 ³	% 54.39	0	% 100
% 1.5 Ag katılmış HAP	0.1 x 10 ³	% 98.24	0	% 100
% 2 Ag katılmış HAP	0	% 100	0	% 100
% 3 Ag katılmış HAP	0	% 100	0	% 100
% 5 Ag katılmış HAP	0	% 100	0	% 100

Çizelge 5.10. % 0-5 Ag katkılı HAP çözeltileri uygulanan deri örneklerin *S.aureus* 'a karşı % azalma test sonuçları

<i>Staphylococcus aureus</i>	1 saat	% Azalma	2 saat	% Azalma
Başlangıç Sayısı	27.2 x 10 ³		18.2 x 10 ⁵	
Kontrol	1.14 x 10 ³		0.2 x 10 ⁷	
Saf HAP	0.51 x 10 ³	% 55.26	0.1 x 10 ⁷	% 50
% 0.5 Ag katılmış HAP	0.35 x 10 ³	% 69.30	0	% 100
% 1 Ag katılmış HAP	0.28 x 10 ³	% 75.44	0	% 100
% 1.5 Ag katılmış HAP	0.18 x 10 ³	% 84.21	0	% 100
% 2 Ag katılmış HAP	0	% 100	0	% 100
% 3 Ag katılmış HAP	0	% 100	0	% 100
% 5 Ag katılmış HAP	0	% 100	0	% 100

Gençer (2006), kalsiyum fosfat bazlı antibakteriyel seramik tozunu yaşı kimyasal yöntem ile sentezlemiş ve antibakteriyel emayeler elde etmek amacıyla emaye bileşimi içine ilave etmiştir. Antibakteriyel emaye yüzeyinin zararlı patojenik mikroorganizmalara karşı antibakteriyel aktivitesini incelemek için bakteri kontak testleri gerçekleştirilmiştir. Antibakteriyel aktivite testi için

indikatör bakteri olarak günlük hayatta insanların en çok rastladıkları *Escherichia coli* bakterisi seçilmiştir. Analiz sonucunda, 24 saat inkübasyondan sonra bakteri sayısında % 99.91 azalmanın gözlemlendiği ve % 0.5 antibakteriyel tozun emaye kompozisyonuna ilavesiyle bile emayenin antibakteriyel özellik gösterdiği saptanmıştır.

Pekşen (2006), (Ag^{+1} ve Ag^{+1} ile Zn^{+2}) metal iyonları katkılı kalsiyum fosfat esaslı antimikrobiyal tozların bakteristatik ve bakterisidal etkinliklerini agar dilüsiyon yöntemi ile *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 43300 ve *C. albicans* ATCC 90028'e karşı incelemiş ve tozlara katılan metal iyonları oranlarının artması ile antimikrobiyal özelliklerinin de arttığını tespit etmiştir. Yapılan test sonucunda % 3.5 metal katyonu katkılı hidroksiapatit esaslı tozun 24 saat sonra antibakteriyostatik ve antibakteriyosidal etkinlik gösterdiğini saptamıştır.

Chen et al. (2007), vakum plazma püskürtme yöntemiyle Ag-HAP kaplamasını titanyum substratı üzerine uygulamışlar ve antibakteriyel özelliklerini incelemişlerdir. Çalışma sonucunda, Ag-HAP kaplamasının *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* bakterilerine karşı % 95 antibakteriyel etki gösterdiğini ifade etmişlerdir.

Ruan et al. (2009), antibakteriyel özellikli bileşik malzeme geliştirilmesi için % 3 Ag-HAP kaplamasını vakum plazma püskürtme yöntemiyle titanyum üzerine uygulamışlar ve saf HAP kaplaması ile kıyasla antibakteriyel özelliklerini *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) bakterilerine karşı değerlendirmişlerdir. Ag-HAP kaplamasının her iki bakteri biyofilmleri kalınlıklarını incelttiğini ve canlı bakteriler sayısını önemli derecede azalttığını, böylece Ag-HAP kaplamanın antibakteriyel aktivitesinin test bakteri kültürlerinin hücre duvarı kompozisyonuna bağlı olmadığını bildirmişlerdir.

Jelínek et al. (2010), Ag-HAP ince filmlerin *Escherichia coli* K12 C600 türüne karşı antibakteriyel özelliklerini araştırmışlar ve atom üzerinden % 1.2, 4.4, 8.3 ve 13.7 Ag-HAP filminin > % 99 antibakteriyel etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Bununla birlikte, 1 saat içinde gümüş konsantrasyonu ve zamana bağlı olarak Ag-HAP filmi üzerindeki *E. coli* kolonilerinin azaldığını gözlemişlerdir. Gümüş konsantrasyonuna bağlı olmadan % 90 üstünde bakteri sayısındaki azalmanın gözlenmesi için 2 saat inkübasyon süresinin yeterli olduğu ortaya

çıkıştır. 24 saatlik inkübasyon sonrası ise bakterinin % 100'nün inhibe edildiği saptanmış ve böylece söz konusu çalışmada elde edilen Ag-HAP filminin mükemmel antibakteriyel özellik gösterdiği belirtilmiştir.

Stanic et al. (2010), çalışmalarında monofaz Ag-HAP tozunu nötralize yöntemi kullanarak elde etmişler ve antimikrobiyal etkisini *E. coli*, *S. aureus* ve *C. albicans*'a karşı değerlendirmişlerdir. Antimikrobiyal testler sonucunda yüksek miktarda gümüş içeren Ag-HAP' in tüm test mikroorganizmalarına karşı üstün antimikrobiyal aktivite sergilediğini ve *E. coli* kolonilerinin tümünü öldürdüğünü, *S. aureus* ve *C. albicans* kolonilerinin % 99 azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. AFM çalışması sonucunda Ag-HAP' in test mikroorganizmalar hücreleri yapısında önemli morfolojik değişimlere yol açarak mikroorganizmalar hücrelerinin ölmesine sebep olduğunu ortaya koymuşlardır.

Kasuga et al. (2011), araştırmalarında pamuk ve polipropilen kumaşları Ag ve Ti katkılı hidroksiapatit nanokompoziti ile kaplamışlar ve antibakteriyel aktivitesini *E. coli*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa*'ya karşı belirlemişlerdir. Ag/Ti katkılı HAP ile kaplanan kumaşlar üzerindeki *P. aeruginosa* bakterilerin 3-6 saat sonra, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerin ise 18 saat sonra inhibe olduğunun tespit etmişlerdir.

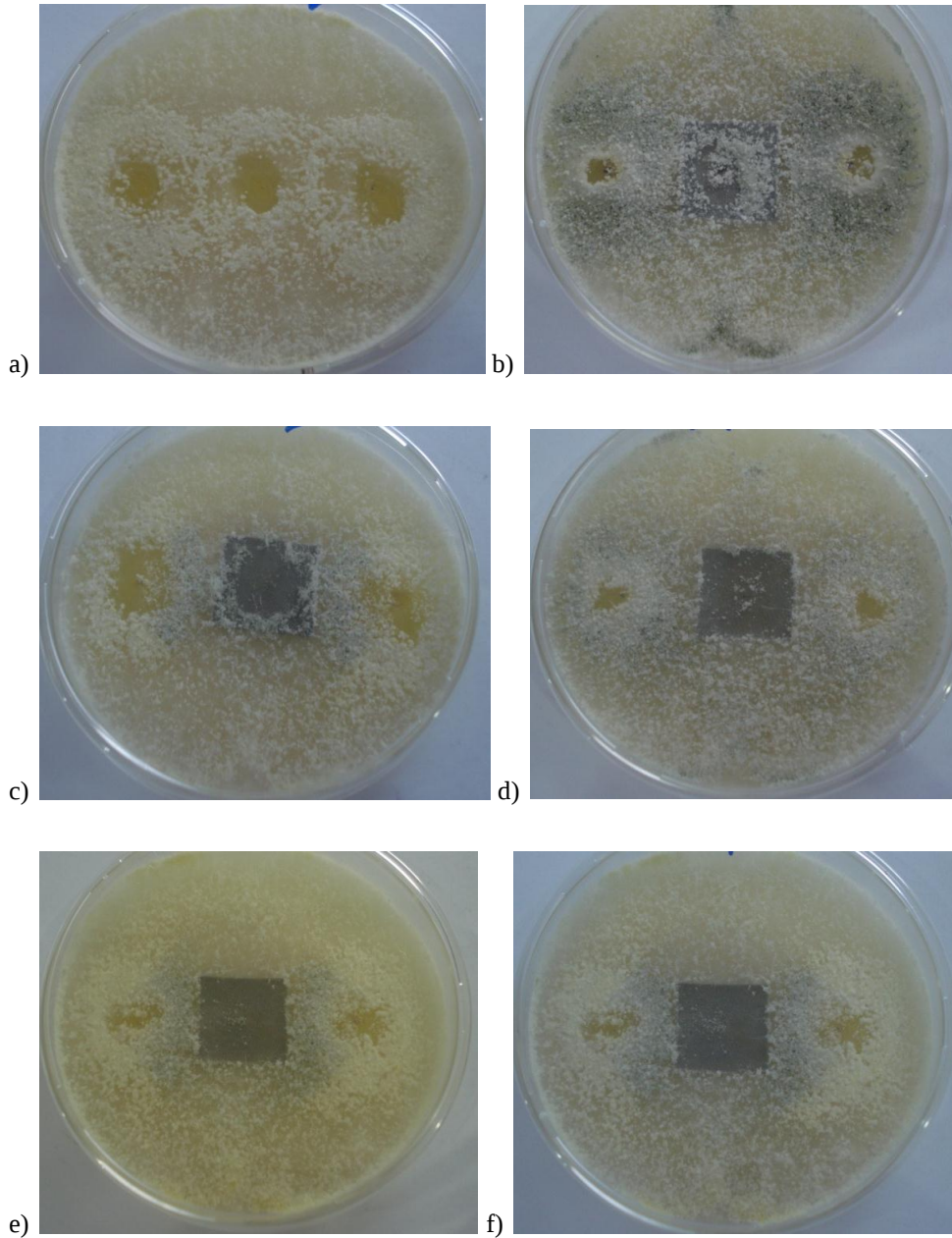
Trujillo (2011), araştırmasında titanyum üzerine Ag-HAP ince filmini kaplamış ve antibakteriyel özelliğini aerobik gram-pozitif *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) ve aerobik gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) bakterilerine karşı test etmiştir. 24 saat sonra % 1.5 Ag-HAP üzerinde *S.epidermidis* kolonileri sayısının % 60'ın üzerinde, *P.aeruginosa*'nın ise % 80'in üzerinde azaldığını gözlemlemiştir.

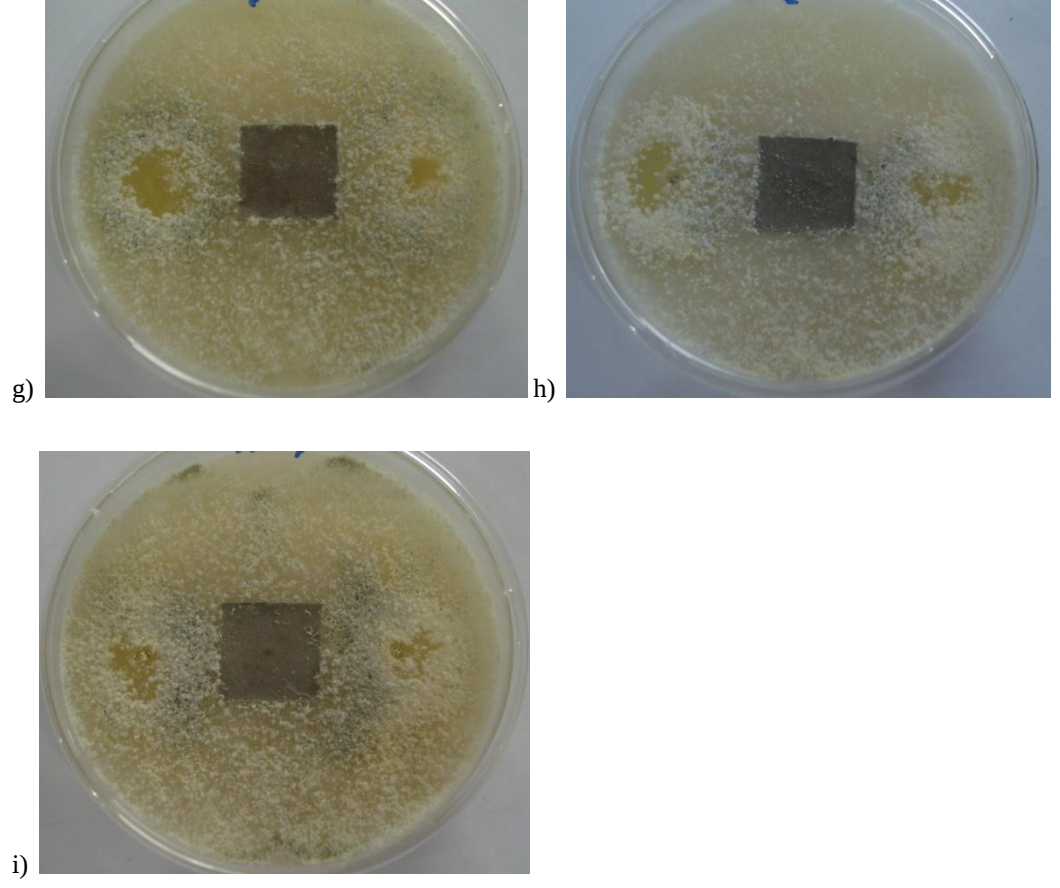
Araştırmamızda deriye uyguladığımız % 2 Ag-HAP her iki test mikroorganizmasına karşı 1 saat sonra % 100 azalma göstermiştir. Düşük miktarda, yani % 0.5 Ag-HAP bu sonucu 2 saat sonra vermiştir. Basit bir uygulama ile derilere antimikrobiyal özellik kazandırılması çalışmamızın ana gayesi olduğundan bu sonuç deri endüstrisi için oldukça ümit verici bulunmuştur.

5.3.4. ASTM D 4576-08 testi sonuçları

ASTM D 4576-08 standardı ile yapılan küf direnci testi sonuçları 3. ve 7. günler için ayrı ayrı verilmiştir (Şekil 5.17-5.20). *T. viride* fungusuna (Şekil

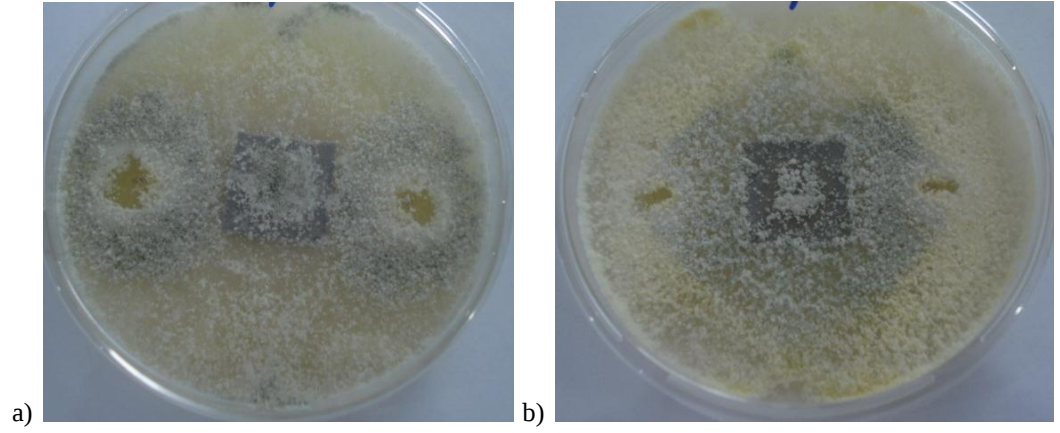
5.17a) karşı uygulanan test sonucunda 3 gün sonra kontrol (Şekil 5.17b) ve saf HAP (Şekil 5.17c) uygulanan deriler üzerinde fungus üremesinin görüldüğü, % 0,5 Ag-HAP (Şekil 5.17d) ile işlenen deri yüzeylerinde üreme görülmeyişi, fakat kenarlarının mikroorganizma ile hafif sarıldığı, % 1 ve üzeri konsantrasyonlarda Ag-HAP (Şekil 5.17e-i) ile muamele edilen deri örnekleri üzerinde hiç bir üremenin olmadığı tespit edilmiştir. 7 gün sonra ise kontrol (Şekil 5.18a) ve saf HAP (Şekil 5.18b) uygulanan deriler üzerinde *T. viride* fungusunun çok geliştiği görülmüş, % 0.5-2 Ag-HAP (Şekil 5.18c-f) ile işlenen deri üzerinde az olsa da fungus üremesinin görüldüğü ve kenarlarının mikroorganizma ile sarıldığı, % 3 ve % 5 konsantrasyonlarda Ag-HAP (Şekil 5.18g-h) ile muamele edilen deri örnekleri üzerinde fungus gelişiminin olmadığı tespit edilmiştir.

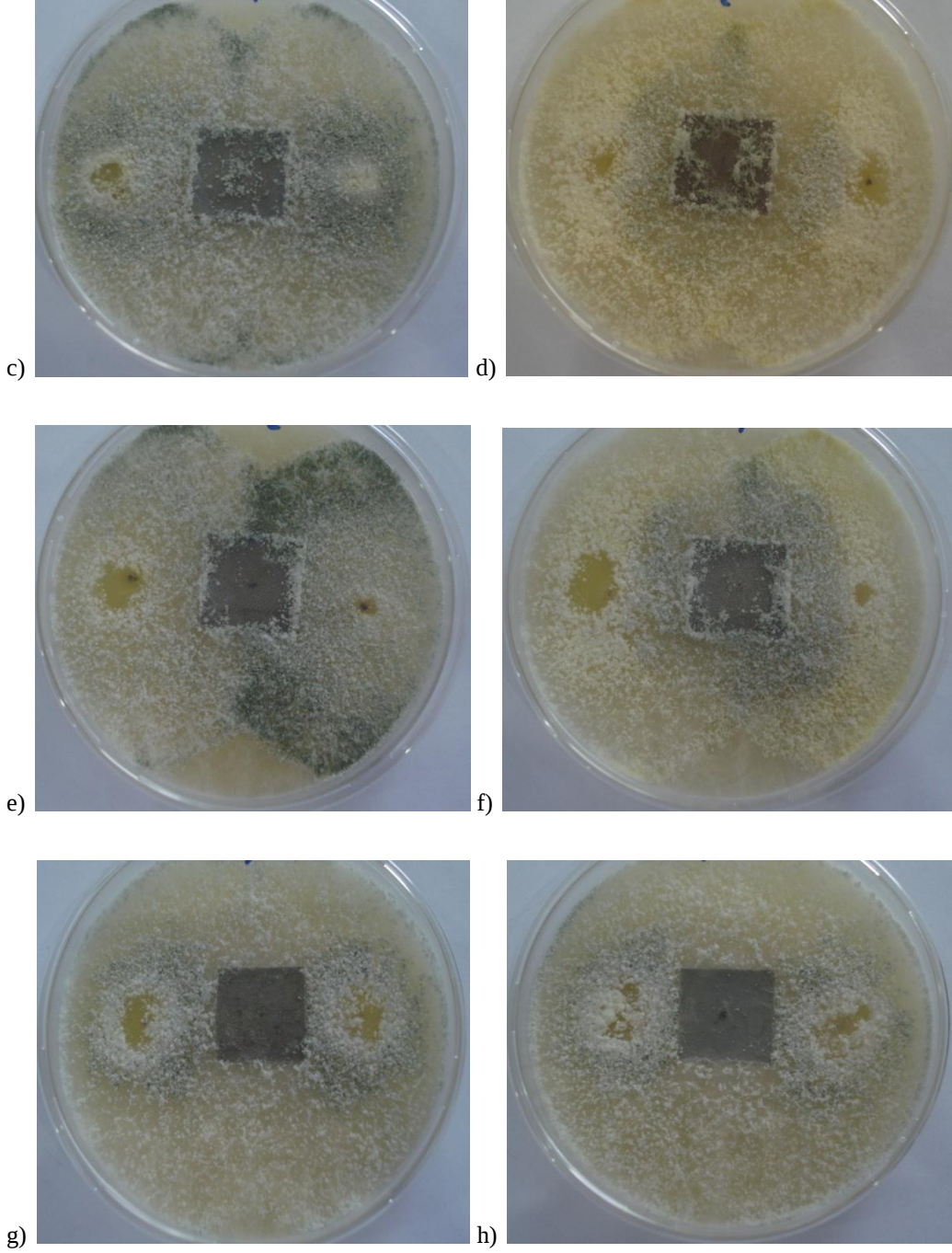




Şekil 5.17. Derilerin *T. viride* fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 3. gün sonuçları:

a) *T.viride* fungusu, b) Kontrol, c) Saf HAP, d) % 0.5 Ag-HAP, e) % 1 Ag-HAP, f) %1.5 Ag-HAP, g) % 2 Ag-HAP, h) % 3 Ag-HAP, i) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler



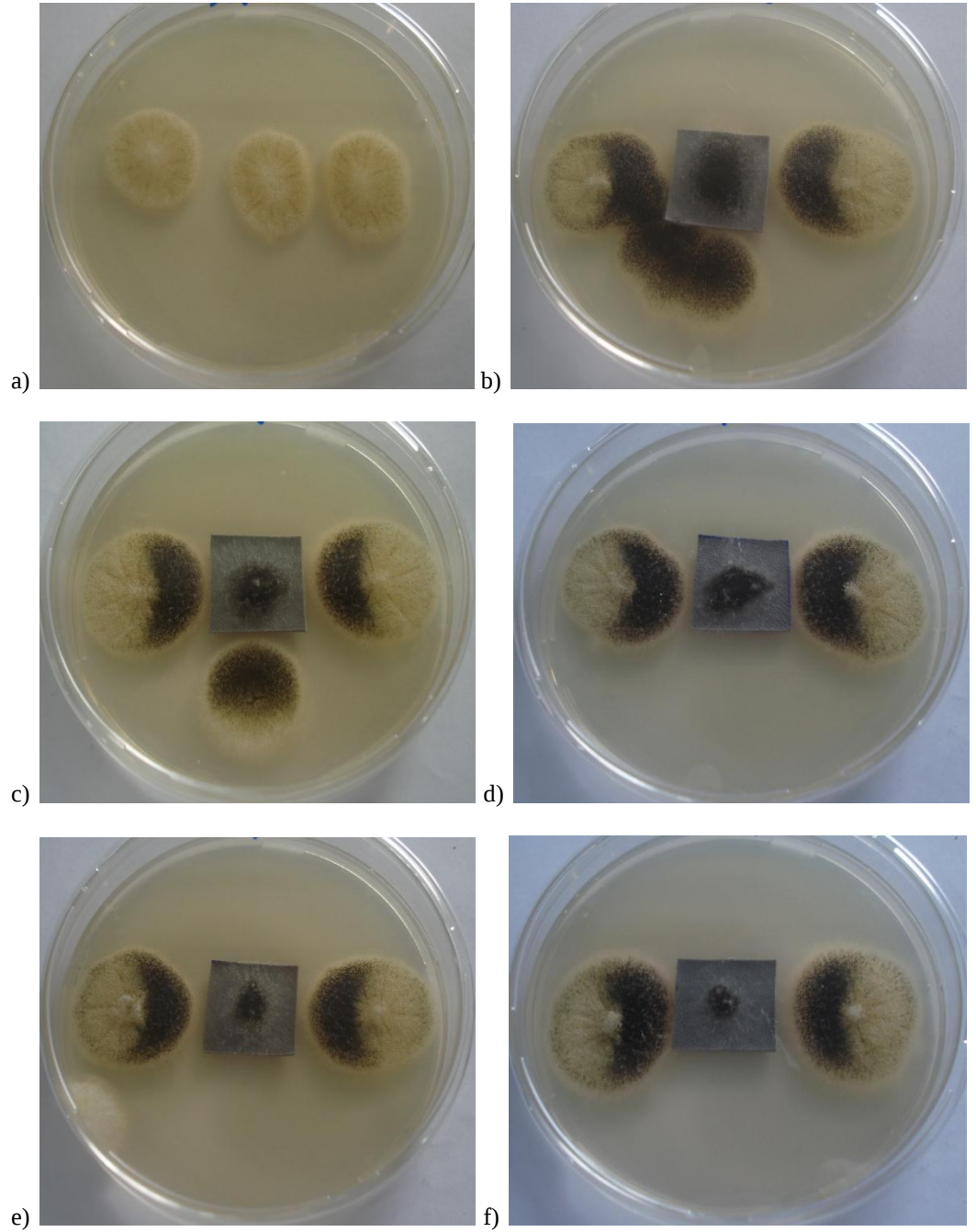


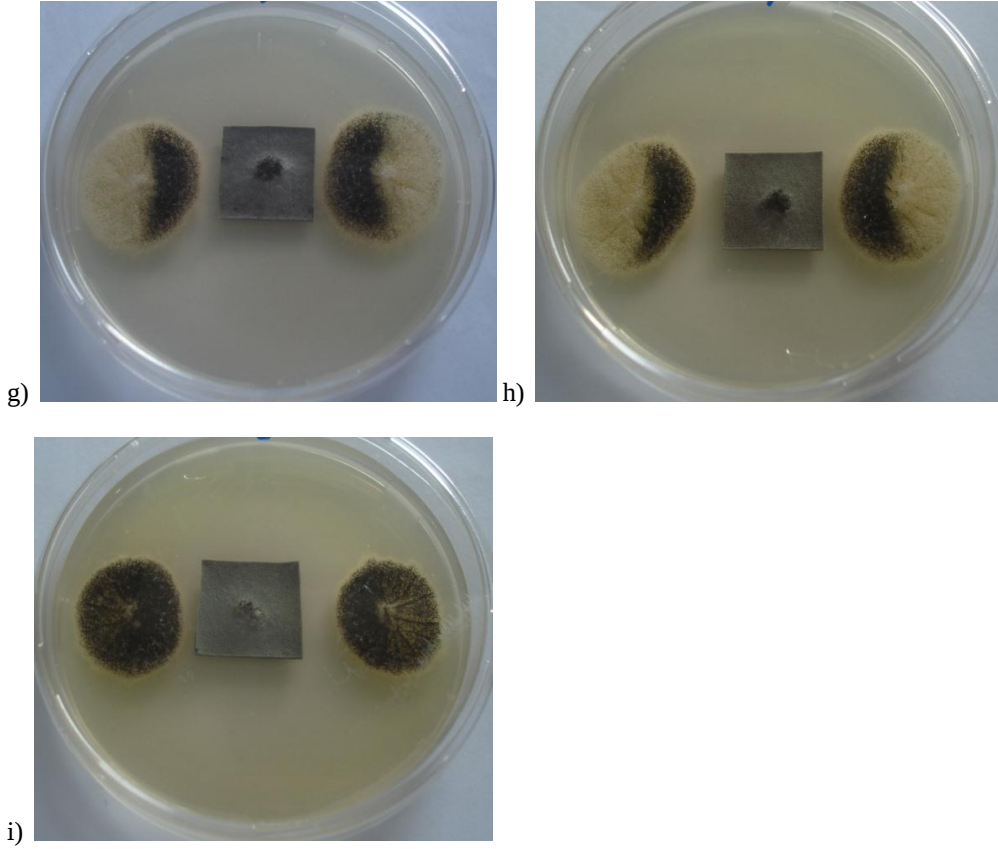
Şekil 5.18. Derilerin *T. viride* fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 7. gün sonuçları:

a) Kontrol, b) Saf HAP, c) % 0.5 Ag-HAP, d) % 1 Ag-HAP, e) % 1.5 Ag-HAP, f) % 2 Ag-HAP, g) % 3 Ag-HAP, h) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler

A. niger fungusuna (Şekil 5.19a) karşı uygulanan test sonucunda 3 gün sonra kontrol (Şekil 5.19b), saf HAP ve % 0.5 Ag-HAP (Şekil 5.19c, d) uygulanan deriler üzerinde fungus üremesinin görüldüğü, % 1 ve % 1.5 Ag-HAP (Şekil 5.19e, f) ile işlenen deri yüzeylerinde çok az üreme görüldüğü, % 2 ve % 3 Ag-HAP (Şekil 5.19g, h) ile muamele gören derilerin üzeri mikroorganizma ile hafif

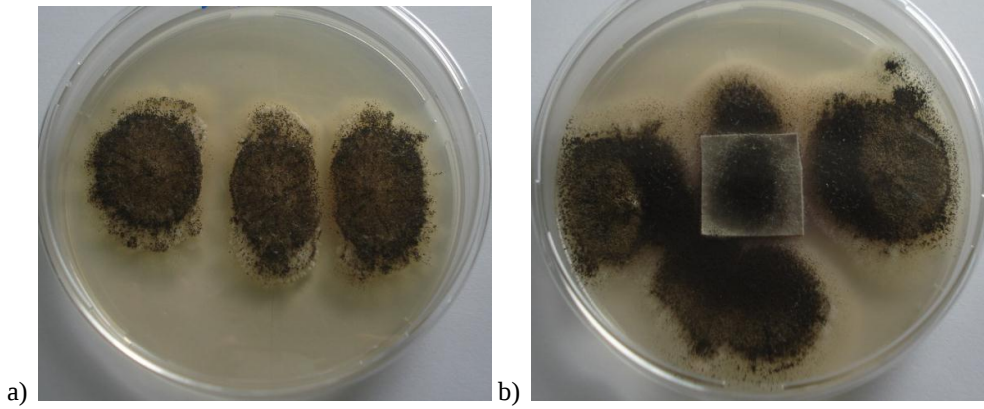
sarıldığı, % 5 konsantrasyonunda Ag-HAP (Şekil 5.19i) ile muamele edilen deri örneği üzerinde hiç bir üremenin olmadığı tespit edilmiştir. 7 gün sonra ise *A. niger* fungusunun (Şekil 5.20a), kontrol (Şekil 5.20b), saf HAP ve % 0.5 Ag-HAP (Şekil 5.20c, d) uygulanan derileri kaplayarak geliştiği görülmüş, % 1 ve %1.5 Ag-HAP (Şekil 5.20e, f) ile işlenen deri üzerinde fungus gelişiminin daha belirgin olduğu, % 2 ve % 3 Ag-HAP (Şekil 5.20g, h) ile muamele gören derilerin üzerinde mikroorganizmanın az da olsa ürediği ama kenarlarına kadar ulaşmadığı, % 5 Ag-HAP (Şekil 5.20g-h) ile muamele edilen deri örneği üzerinde fungus gelişiminin çok hafif olduğu tespit edilmiştir.

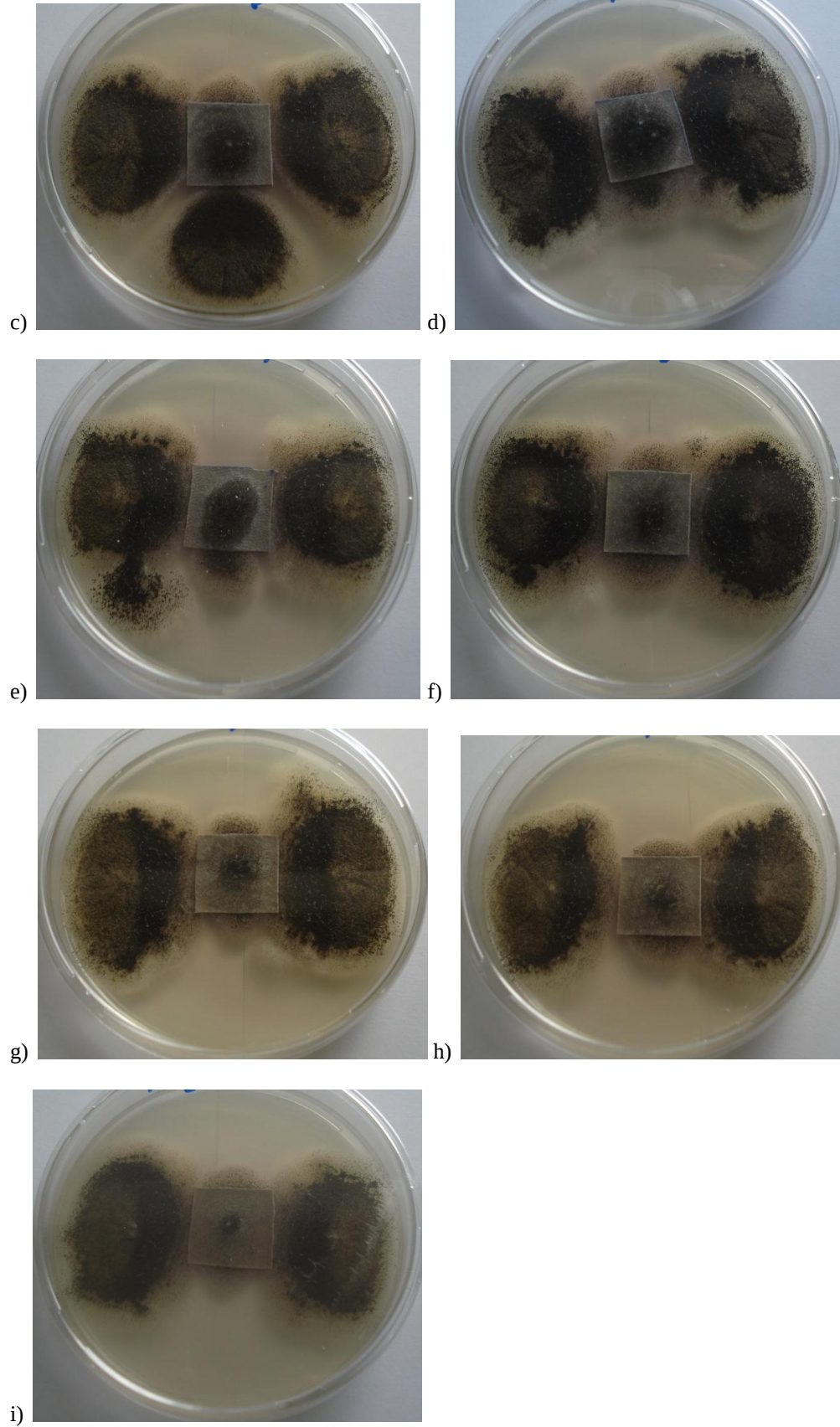




Şekil 5.19. Derilerin *A. niger* fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 3. gün sonuçları

a) *A. niger* fungusu, b) Kontrol, c) Saf HAP, d) % 0.5 Ag-HAP, e) % 1 Ag-HAP, f) % 1.5 Ag-HAP, g) % 2 Ag-HAP, h) % 3 Ag-HAP, i) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler





Şekil 5.20. Derilerin *A. niger* fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testine ait 7. gün sonuçları
 a) *A. niger* fungusu, b) Kontrol, c) Saf HAP, d) % 0.5 Ag-HAP, e) % 1 Ag-HAP, f) %1.5 Ag-HAP, g) % 2 Ag-HAP, h) % 3 Ag-HAP, i) % 5 Ag-HAP uygulanan deriler

Kontrol ve saf HAP ile işlem görmüş deri örnekleri funguslara karşı direnç göstermemişlerdir. Ortalama korunmuş alanlara göre değerlendirildiğinde ise derilerin her iki fungusa karşı performanslarının HAP içerisindeki gümüş miktarının artmasıyla arttığı gözlenmiştir. % 2 ve % 3 Ag-HAP ile işlenmiş deri örnekleri oldukça iyi performans gösterirken, % 5 Ag-HAP ile işlem gören deri örneklerinde antifungal performansı en yüksek olmuştur.

Böylece, Ag-HAP'in astarlık deri üzerinde antibakteriyel özelliğine ilaveten antifungal bir kaplama materyali olarak da kullanılabileceği antimikrobiyal testler sonucunda açıkça ortaya konulmuştur.

Çizelge 5.11. Derilerin *T. viride* fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testi sonuçları

Deri örnekleri	3 gün sonra fungusla kaplanan alan (%)	Puan	7 gün sonra fungusla kaplanan alan (%)	Puan
Kontrol	85	3	100	4
Saf HAP	55	2	90	3
% 0.5 Ag-HAP	12	0.5	50	2
% 1.0 Ag-HAP	5	0	50	2
% 1.5 Ag-HAP	5	0	25	1
% 2.0 Ag-HAP	0	0	12	0.5
% 3.0 Ag-HAP	0	0	0	0
% 5.0 Ag-HAP	0	0	0	0

Çizelge 5.12. Derilerin *A. niger* fungusuna karşı ASTM D 4576-08 testi sonuçları

Deri örnekleri	3 gün sonra fungusla kaplanan alan (%)	Puan	7 gün sonra fungusla kaplanan alan (%)	Puan
Kontrol	75	3	100	4
Saf HAP	65	2	90	3
% 0.5 Ag-HAP	50	2	85	3
% 1.0 Ag-HAP	25	1	65	2
% 1.5 Ag-HAP	12	0.5	50	2
% 2.0 Ag-HAP	12	0.5	25	1
% 3.0 Ag-HAP	12	0.5	25	1
% 5.0 Ag-HAP	5	0	12	0.5

Percival et al. (2005), yaptıkları çalışmada iyonik gümüşün (Ag^+) birçok mikroorganizmaya karşı düşük konsantrasyonda etkili olduğunu ve bakteri, fungus, viral patojenlere karşı 10^{-6} – 10^{-9} M konsantrasyonunun yeterli olduğunu tespit edilmişlerdir. Araştırmacılar, gümüşün mayalarda oksidatif enzimleri, *E.coli*'de solunum zincirini inhibe ettiğini ve DNA replikasyonunu engellediğini bildirmişlerdir.

Doğan ve Pekşen'in (2005), çalışmalarında metal iyonu katkılı kalsiyum fosfat esaslı antimikrobiyal seramik tozunu yaş kimyasal yöntemi ile elde etmişler ve farklı mikrobiyolojik analiz yöntemleri ile antimikrobiyal özelliklerini incelemişlerdir. Antimikrobiyal tozun katı madde üzerinden % 3-5 aralığında sargı bezi, ayakkabı keçesi, karo sırası, duvar yüzeyi kaplaması için kullanılan boya malzemesi, plastik malzemenin üst katmanına eklendiğinde bu malzemelere iyi bir antimikrobiyal özellik kazandırdığını ortaya koymuşlardır.

Shibata et al. (2007), (% 0, 1, 5, 10) TiO_2 -HAP katkılı akrilik reçine elde etmişler ve antifungal etkisini *C. albicans* ATCC 1002'ye karşı değerlendirmişlerdir. UV ışınlamasından sonra % 1 TiO_2 -HAP katkılı akrilik reçine üzerindeki fungus sayısının % 0 TiO_2 -HAP içeren reçineye nazaran daha az olduğu fakat istatistiksel olarak önemli bir fark oluşturmadığı, ancak, 2, 4 ve 6 saat UV ışınlanması sonra % 5 ve % 10 TiO_2 -HAP katkılı akrilik reçine üzerindeki fungus sayısında önemli derecede azalma gözlemlendiği bildirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada mikrodalga yöntemi kullanılarak sentezlenen gümüş katkılı hidroksiapatitin antimikrobiyal madde olarak ayakkabılık astarlık deriye uygulanabilirliği ve antimikrobiyal etkinliği araştırılmıştır. Çok amaçlı X-ışını Difraktometresi (XRD), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi (FTIR) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM-EDS) cihazları kullanılarak materyalin fiziksel, kimyasal ve yapısal özellikleri ortaya konulmuştur. Elde edilen gümüş katkılı hidroksiapatit çözeltilerindeki gümüş miktarları Endüktif Eşleşmiş Plazma Optik Emisyon Spektroskopisi (ICP-OES) cihazı kullanılarak tespit edilmiş ve katılan gümüş miktarının, hesaplanan miktar ile orantılı olduğu saptanmıştır. Sentezlenen çözeltiler deri örneklerinin cilt yüzeyine uygulanmış ve kurutma ile ütü işlemlerinden sonra kaplama filmleri elde edilmiştir.

Gümüş katkılı hidroksiapatitin test mikroorganizmalara karşı etkin konsantrasyonları Broth Mikrodilüsyon tekniği kullanılarak belirlenmiş ve Gram-negatif bakterilere karşı (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aureginosa*, *K. pneumoniae*) etkili MIC değerinin 2.09-12.25 µg/ml, gram-pozitif bakteriler (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*) ve *C. albicans* için bu değerin 4.18-12.25 µg/ml aralığında olduğu saptanmıştır. Hidroksiapatit uygulanan (saf ve % 0.5-5 Ag katkılı HAP) ve kontrol derilerinin antimikrobiyal özellikleri, Agar yayma ve Paralel çizgi yöntemleri (nitel) ve Bakteri sayısındaki % azalma testi (nicel) ile mukayese edilmiştir. Antimikrobiyal aktivite testleri (nitel) sonuçlarına göre % 2 oranında gümüş içeren hidroksiapatit ile muamele edilen derilerin 24 saat sonra tüm test mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği, bu oranın üzerinde ise etkinliğin arttığı görülmüştür. Bakteri sayısındaki % azalma testi (nicel) sonucunda, % 0.5 Ag katkılı hidroksiapatit uygulanmış olan deri örneğinde 1 saat sonra *Escherichia coli* sayısında % 43.86 azalma görülmüş, 2 saat sonra ise % 100 olduğu gözlemlenmiştir; *Staphylococcus aureus* sayısında ise % 0.5 Ag katkılı hidroksiapatit uygulanan deri örneğinde 1 saat sonra % 69.30; 2 saat sonra ise % 100 azalma görülmüştür.

ASTM D 4576-08 testine göre değerlendirildiğinde Ag-HAP ile muamele edilen derilerin *A. niger* ve *T. viride* test funguslarına karşı özelliklerinin HAP içerisindeki gümüş miktarının artmasıyla arttığı gözlenmiştir. % 2 ve % 3 Ag-HAP ile işlenmiş deri örnekleri oldukça iyi özellik gösterirken, % 5 Ag-HAP ile işlem gören deri örnekleri en iyi antifungal özellik göstermiştir.

Mikrobiyolojik testler sonuçlarına göre, elde edilen Ag katkılı hidroksiapatitin etkin antimikrobiyal özellikte olduğu ve astarlık deriye antimikrobiyal özellik kazandırdığı ortaya konmuştur. Bu özellikteki deri materyalinin ayakkabı yapımında kullanılması, ayak sağlığı ve hijyeni açısından oldukça önem taşımaktadır.

Gümüş ile deri uygulamasına ait çalışmaların olmasına karşın, Ag-HAP'in deriye uygulanması tarafımızca ilk defa uygulanmış ve iyi sonuçlar alınmıştır.

Bu yöntemin deriye uygulanmasının hızlı, basit, ucuz ve kolay olması bir üstünlük olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca yöntem astarlık deriler dışındaki derilere de uygulanabilmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

AATCC, 2004, Test Method 100- 2004 Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials, AATCC Committee RA31.

AATCC, 2004, Test Method 147-2004 Antibacterial Activity Assessment of Textile Materials: Parallel Streak Method, AATCC Committee RA31.

Açar, G., 2006, Diyabetik Ayakta Tedavi Yaklaşımları ve Wagner Sınıflamasının Tedaviyi Yönlendirmedeki Rolü, Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2. Cerrahi Kliniği, İstanbul.

Akçelik, M., 2000, Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Sim Matbaacılık, Ankara, 1-2s.

Akdur, R., Çöl, M., Işık, A., İdil A., Durmuşoğlu, M. ve Tunçbilek, A., 1998, “Çağdaş Sağlık ve Sağlık Hizmetleri Kavramları, Bu Kavramlara Etki Eden Dinamikler”, Halk Sağlığı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 10.

Akman, M. ve Gülmezoğlu, E., Tıbbi Mikrobiyoloji, Hacettepe Üniversitesi Yayınları (1976).

Akpomie, O.O., 2010, The preservative potentials of sweet orange seed oil on leather products in Nigeria, *African Journal of Biotechnology*, 9(5), 678-681 pp.

Annamalai, T., Rajkumar, G.A., Arunasri, N., Rajkumar and Perumal, P.T., 1997, Syntheses and Fungicidal Evaluation of Compounds Analogous to 1,3-Oxazine, *Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists*, 81,201-203p.

Anonymus, 2001, Mould-cause and prevention, Leather International, Volume: 203, 4708, UK.

Anonim, 2012, Escherichia coli tip 1, www.mikrobiyoloji.org, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Anonim, 2012a, Escherichia coli, (http://tr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

Anonim, 2012b, Staphylococcus aureus, (<http://www.mikrobiyoloji.org/TR/yonlendir.aspx?F6E10F8892433CFFA79D6F5E6C1B43FFC7D510DFD423D9CA>, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

Anonymous, 2012, Staphylococcus aureus, <http://julieyumi.tumblr.com/post/489618868/green-grapes-no-staphylococcus-aureus-the>, (Available: 17.02.2012).

Anonim, 2012c, Candida albicans, http://tr.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

Anonim, 2012d, Candida albicans, <http://www.biyoloji.egitim.yyu.edu.tr/k/Can/pages/Candida%20albicans%20.jpg.htm>, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

Anonim, 2012e, Aspergillus, <http://tr.wikipedia.org/wiki/Aspergillus>, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

Anonymous, 2012a, Aspergillus niger, http://labmed.ucsf.edu/education/residency/fung_morph/fungal_site/asperpage.html, (Available: 17.02.2012).

Anonymous, 2012b, Trichoderma viride, <http://www.mold.ph/trichoderma.htm>, (Available: 17.02.2012).

Anonim, 2012f, Gümüş, <http://tr.wikipedia.org/wiki/G%C3%BCm%C3%BC%C5%9F>, (Erişim tarihi: 17.02.2012)

Anonim, 2012g, Nanoteknoloji ile yeni ürünler ve yeni pazarlar yaratın, <http://nanoenarge.com.tr/sayfa.asp>, (Erişim tarihi: 17.02.2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

ASTM D 4576 – 86, (Reapproved 1996): Standard Test Method for Mold Growth Resistance of Blue Stock (Leather).

ASTM E 2149-10, Standard Test Method for Determining the Antimicrobial Activity of Immobilized Antimicrobial Agents Under Dynamic Contact Conditions, 2010.

ASTM F 1185-03, Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants, 2009.

Balçık, C., Tokdemir, T., Şenköylü, A., Koç, N., Timuçin, M., Akın, S., Korkusuz, F. and Korkusuz, P., 2007, Early weight bearing of porous HA/TCP ceramics in vivo: A longitudinal study in a segmental bone defect model of rabbit, *Acta Biomaterialia*, 3, 985-96.

Balogh, L., Swanson, D.R., Tomalia, D.A., Hagnauer, G.L. and McManus, A.T., 2001, Dendrimer-silver complexes and nanocomposites as Antimicrobial Agents, *Jour. Nano Letters*, 1 (1):18-21 p.

Bamberger, D.M., Daus, G.P. and Gerding, D.N., 1987, Osteomyelitis in the feet of diabetic patients. *Am J Med*, 83: 653-55 p.

Bayramoğlu, E.E., 2004, Deri İşletisinde Bazı Esansiyel Yağların Fungisid Olarak Kullanım Özelliklerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 134s.

Bayramoğlu, E.E., Gülümser, G. and Karaboz, İ., 2008, The Investigation of Antibacterial Activities of Some Essential Oils in Wet Blue Leather, *International Journal of Natural and Engineering Sciences* 2 (1): 33-36p.

Blake, D.M., Maness, P.C., Huang, Z., Wolfrum, E.J and Huang, J., 1999, Application of the Photocatalytic Chemistry of Titanium Dioxide to Disinfection and The Killing of Cancer Cells, *Separation and Purification Methods*, 28 (1), 1-50 p.

Bilgehan, H., 2000, Klinik Mikrobiyoloji, Barış Yayınları, İstanbul.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bilgi, S.T.**, 2007, Tabaklama Öncesi İşlemlerde Bakteri ve Fungus Sayısının Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 80s.
- Birbir, M.**, 1991, Deri Endüstrisinde Kullanılan İşlenmiş ve İşlenmemiş Sığır Derilerinde Derinin Kalitesine Etki Eden Mikroorganizmaların İzolasyonu ve İdentifikasyonu, Doktora tezi, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 112s.
- Birbir, M., Özyaral, O., Johansson, C. and Ilgaz, A.**, 1994, Mold Strains Isolated From Unfinished and Finished Leather Goods and Shoes, *JALCA*, 89(1),1-34p.
- Castellano, J.J., Shafii, S.M., Ko, F., Donate, G., Wright, T.E. and Mannari, R.J.**, 2007, Comparative evaluation of silver-containing antimicrobial dressings and drugs, *Int Wound J*, 4 (2): 114–122p.
- Champion, R.H., Gilman, T., Rook, A.J. and Sims, R.T.**, 1970, An Introduction to the Biiology of the Skin, Blackwell Scientific Publications, 197-205p.
- Changqing, Z., Haibin, G., Yi, C., Rongqing, Z., Jun, H. and Wuyong, C.**, 2010, *JSLTC*, 93, 197-200p.
- Ciobanu, C.S., Massuyeau, F., Constantin, L.V. and Predoi, D.**, 2011, Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100°C, *Nanoscale Research Letters*, 6:613p.
- Clarkson, J. P., Mead, A., Payne, T. and Whipps, J. M.**, 2004, Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*, *Plant Pathology* 53, 353-362p.
- Clement, J.L. and Jarrett, P.S.**, 1994, Antibacterial Silver, *Metal-Based Drugs*, 1: 467-482p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cloete, T.E.**, 2003, Resistance Mechanism of Bacteria to Antimicrobial Compounds, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 277-282.
- Correria, R.N., Magalhaes, M.C., Marques, P.A.P.P. and Senos, A.M.R.**, 1996, Wet Synthesis and Characterisation of Modified Hydroxyapatite Powders, *J Mat Sci*, 7, 501-505 p.
- Crawford, F., Hart, R., Bell-Syer, S., Torgerson, D., Young, P. and Russel, I.**, 2001, Athlete's foot and fungally infected toenails, *BMJ*, 322 (7281): 288-289 p.
- Chung, R.J., Hsieh, M.F., Huang, C.W., Perng, L.H., Chou, F.I. and Chin, T.S.**, 2005, Anti-Microbial Hydroxyapatite Particles Synthesized by a Sol-Gel Route, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 33, 229-239p.
- Chung, R.J., Hsieh, M.F., Huang, C.W., Perng, L.H., Wen, H.W. and Chin, T.S.**, 2006, Antimicrobial Effects and Human Gingival Biocompatibility of Hydroxyapatite Sol-Gel Coatings, [*J Biomed Mater Res B Appl Biomater*](#), 76(1):169-78p.
- Cushing, B.L., Kolesnichenko, V.L. and O'Connor, C.J.**, 2004, Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. *Chem Rev*, 104:3893-3946p.
- Çavdar, A.**, 2009, Tekstil Sektöründe Kullanılacak Gümüş İçerikli Nano Boyutlu Biyo Antimikrobiyal Malzemelerin Geliştirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 80s.
- Çelik, K.**, 2011, EDTA Şelat Dekompozisyonu Yöntemi ile Gümüş Katkili Hidroksiapatit Üretimi Ve Karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 85s.
- Dalton, D.L.**, 2008, New generation fungicide for the leather industry, http://www.leathermag.com/news/fullstory.php/aid/13476/New_generation_fungicide_for_the_leather_industry.html, (Available: 17.02.2012).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dean, T.D. and Stephen S.Y.**, 1999, Fungicides in military leather, JALCA, 94, 245p.
- Devrent, N. ve Yılmaz, N.D.**, 2004, Tekstil Endüstrisinde Kullanılan Antimikrobiyal Lifler, *Nonwoven Technical Textiles Technology Dergisi*, 4: 48-55s.
- Doğan, A., Kula, S. ve Üzgür, E.**, 2000, Ag⁺ İyonu İçeren Hidrosiapatitin Antibakteriyel Özellikleri ve Karo Sır Bünyesinde Kullanımı, International Metallurgy and Materials Congress.
- Doğan, A. ve Pekşen, C.**, 2005, Metal İyon Katkılı Antimikrobiyal Malzemelerin Hastane Enfeksiyonlarını Önlemede Katkıları ve Uygulamaları, 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi, 59-68s.
- Doğan, A., Pekşen, C., Koparal, A.S., Üzgür, A.E. ve Karel, F.B.**, 2005, “Metal İyon Katkılı Anti-Bakteriyel İnorganik Toz ve Uygulama Alanları”, III. Uluslararası Katılımlı Seramik, Cam, Emaye, Sır ve Boya Semineri, 17-19 Ekim, 417-425 s.
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H.**, 1980. Compendium of Soil Fungi. London; New-York: Academic Pres.
- Durmuş, D.**, 2007, Tabaklama ve Sonrası Yaş İşlemlerde Mikrobiyal Yükün Tespiti Üzerine Bir Araştırma, Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 71s.
- Ertaş, H. ve Ertaş, N.**, 2001, Eser Analizde Örnek Hazırlama Teknikleri, Eser Analiz Yaz Okulu Kitapçığı, Ege Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, İzmir.
- Ergün, M., Ertam, Ü., Aytimur, D. ve Erboz, S.**, 2001, Futbolcularda Yüzeysel Mantar Enfeksiyonu Sıklığının Araştırılması, *Türkderm*, 35 (4).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Feng, Q.L., Kim, T.N., Wu, J., Park, E.S., Kim, J.O., Lim, D.Y. and Cui, F.Z.,** 1998, Antibacterial effects of Ag-HAp thin flms on alumina substrates, *Thin Solid Films*, 335, 214-219pp.
- Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N. and Kim, J.O.,** 2000, A Mechanistic Study of the Antibacterial Effect of Silver Ions On *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed Mater Res.* 52 (4): 662-668p.
- Fernandes, I.P., Barreiro, M.F., Pinto, V., Ferreira, M.J. and Amaral, J.S.,** 2011, Chitosan-based antimicrobial leather coatings: evaluation of the pilot scale production, Biopolymer 2011 Congress, Portugal.
- Gallant-Behm, C.L., Yin, H.Q., Liu, S., Heggors, J.P., Langford, R.E., Olson, M.E., Hart, D.A. and Burrell, R.E.,** 2005, Comparison of in vitro disc diffusion and time kill-kinetic assays for the evaluation of antimicrobial wound dressing efficacy, *Wound repair and regeneration*, 13(4), 413-421p.
- Gams, W. and Bisset, J.,** 1998. Morphology and identification of Trichoderma. In Trichoderma and Gliocladium, Edited by C.P. Kubicek and G.E. Harman . London; Bristol, PA: Taylor and Francis, 3-31pp.
- Gençer, A.,** 2006, Antibakteriyel Oksit Tozlarının Emaye Uygulamaları, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 60s.
- Goodman, L. and Gelman, A.,** 1975, The Pharmacological Basis of Therapeutics, 5th Edition, New York, NY: MacMillan; 930 p.
- Grayson, M.L,** 1995, Diabetic foot infections-antimicrobial therapy, *Journal of Infectious Diseases*, 9: 143-161 p.
- Green, H.S.,** 1945, Report on the Microbiological Flora and Sterilization of Used Shoes, *JALCA*, 11(3), 96-109p.
- Güdücüoğlu, H., Akdeniz, N., Bozkurt, H., Aygöl, K., İzci, H ve Berktaş, M.,** 2006, Beden Eğitimi Bölümü öğrencilerinin yüzeysel mantar hastalıkları açısından değerlendirilmesi, *Van Tıp Dergisi*, 13 (2), 53-55 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Harmancıoğlu, M. ve Dikmelik, Y.**, 1993, Ham Deri, Özen Ofset., İzmir, 343s.
- Hench, L. and Wilson, J.**, 1993, An Introduction to Bioceramics, World Scientific, Singapore.
- Hench L.L., Li P., Zhang K. and Colwell C.W.**, 2004, Antimicrobial treatment of dental osseous defects with silver doped bioglass: Osteoblast cell response, 17th international symposium on ceramics in medicine, New Orleans, LA, 8 - 12, Zurich-Uetikon, Trans Tech Publications Ltd, 435-438pp.
- Holetz, F.B., Pessini, G.L., Sanches, N.R., Garcia Cortez, D.A., Nakamura, C.V. and Dias Filho, B.P.**, 2002, Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 97(7), 1027-1031 p.
- Hökelek, M.**, 2003, “Hastanede Sorun Olan Mikroorganizmalar: Parazit ve Mantarlar”, 3.Sterilizasyon ve Dezenfeksiyon Kongresi, Kongre Kitabı, 408-419s.
- Hu, C., Guo, J., Qu, J. and Hu, X.**, 2007, Efficient destruction of bacteria with Ti(IV) and antibacterial ions in co-substituted hydroxyapatite films, *Applied Catalysis B: Environmental* 73, 345–353pp.
- İnanir, I., Sahin, M.T., Gunduz, K., Dinc, G., Turel, A., Arisoy, A. and Ozturkcan, S.**, 2002, Case Report. Tinea pedis and onychomycosis in primary school children in Turkey, *Mycoses*, 45: 198-201 p.
- Jaklitsch, W.M., Samuels, G.J., Dodd, S.L., Lu, B.S. and Druzhinina, I.S.**, 2006, *Hypocrea rufa*/Trichoderma viride: a reassessment, and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud. Mycol.* 56:135-177p.
- JCPDS** (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) Database, International Centre for Diffraction Data, 2001.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jelínek, M., Kocourek, T., Jurek, K., Remsa, J., Mikšovský, J., Weiserová, M., Strnad, J. and Luxbacher, T.,** 2010, Antibacterial properties of Ag-doped hydroxyapatite layers prepared by PLD method, *Appl Phys A*, 101: 615–620p.
- Karaboz, İ., Gülümser, G. ve Bayramoğlu, E.E.,** 2003, Tabakhanelerde Depolama Sırasında Gelişen Bazı Fungusların Koruma Piklesi ve Kromla Tabaklama Aşamasında Deride Oluşturdukları Pigmentasyonun İncelenmesi, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40(3):129-136s.
- Katsuki H., Furuta, S. and Komarneni, S.,** 1999, Microwave versus Conventional Hydrothermal Synthesis of Hydroxyapatite Crystals from Gypsum, *J. Amer. Ceram. Soc.*, 82, 2557-59 p.
- Kawashita, M., Tsuneyama, S., Miyaji, F., Kokubo, T., Kozuka, H. and Yamamoto, K.,** 2000, Antibacterial silver-containing silica glass prepared by sol-gel method, *Biomaterials*, 21:393-398 p.
- Kim, S. and Kim, H.,** 2006, Antibacterial performance of colloidal silver-treated laminate wood flooring, *Journal of International Biodeterioration & Biodegradation*, 57, 155-162 p.
- Kim, T.N., Feng, Q.I., Wu, J., Wang, H., Chen, G.C. and Cui, F.Z.,** 1998, Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite, *J. Mater Sci Mater Med*, 9:129-134 p.
- Klein, D. and Eveleigh, E.,** 1998. Ecology of Trichoderma. In Trichoderma and Gliocladium, Edited by C.P. Kubicek and G.E. Harman. London; Bristol, PA: Taylor and Francis, pp. 57-69.
- Koyaş, S.,** 2006, Hafif Antibakteriyel Seramik Ve Antibakteriyel Seramik Filtre Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon, 88s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kuroczkin, J. and Strelczyk, B.A.**, 1989, Studies on the Microbial Degradation of Ancient Leather Bookbindings. Part 2, *International Biodeterioration*, 25, 39-47p.
- Kuyucu, N.**, 2003, Non-İnvaziv Mukokutanöz Fungal Enfeksiyonlarda Tedavi, *Güncel Pediatri Dergisi*, s 147.
- Lacroix, C., Baspeyras, M., de La Salmoniere, P., Benderdouche, M., Couprie, B., Accoceberry, I., Weill, F.X., Derouin, F. and Feuilhade de Chauvin, M.**, 2002, Tinea pedis in European marathon runners, *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 16: 139-142 p.
- Landsdown, A.B.G.**, 2002, Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action. *JWound Care*, 11: 125–138p.
- Lange, M., Nowicki, R., Baranska-Rybak, W. and Bykowska, B.**, 2004, Dermatophytosis in children and adolescents in Gdansk, *Mycoses*, 47: 326-329p.
- Lew, A., Krutzik, P.O., Hart, M.E. and Chamberlin, A.R.**, 2002, Increasing rates of reaction: Microwave-assisted organic synthesis for combinatorial chemistry. *J. Comb. Chem.*, 4:95–105p.
- Lin, Y., Zhuoru, Y., Jiang, C. and Lianshi, W.**, 2008, Synthesis, characterization and antibacterial property of strontium half and totally substituted hydroxyapatite nanoparticles. *J Wuhan UnivTech-Mater Sci Ed.* 23:475–9p.
- Lipsky, B.A., Pecorato, R.E and Wheat, L.J.**, 1990, The diabetic foot. Soft tissue and bone infection, *Journal of Infectious Diseases*, 4: 409-432 p.
- Liu, D.M.**, 1998, Preparation and Characterisation of Porous Hydroxyapatite Bioceramic via a Slip-Casting Route, *Cer. Int.*, 24, 441-46.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lkhagvajav, N.**, 2009, Astarlık Deriler Üzerine Ag, TiO₂ ve Ag-TiO₂ Nano Filmlerinin Uygulanması ve Antimikrobiyal Etkilerinin Araştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 129s.
- Lu, Y., Chen, Y., Fan, H.J., Peng, B.Y. and Shi, B.**, 2009, A Novel Nano-SiO₂ Tannage for Making Chrome-Free Leather, International Union of Leather Technologists and Chemists Societies IULTCS XXX. Congress. Beijing, China.
- Lv, G., Li, Y., Yang, A., Zhang, X., Yang, W. and Li, J.**, 2006, Preparation and Antibacterial Activity of Silver Ions-substituted Hydroxyapatite/Titania, *Materials Science Forum*, Vol. 510-511, 78-81pp.
- Menteş Çolak, S., Meriçli Yapıcı, B. and Yapıcı, A.N.**, 2010, Determination of antimicrobial activity of tannic acid in pickling process, *Romanian Biotechnological Letters*, 15(3):5325-5330pp.
- Mo, A., Liao, J., Xu, W., Xian, S., Li, Y. and Bai, S.**, 2008, Preparation and antibacterial effect of silver-hydroxyapatite/titania nanocomposite thin film on titanium, *Applied Surface Science*, 255, 435-438pp.
- Nath, S., Kalmodia, S. and Basu, B.**, 2010, Densification, phase stability and in vitro biocompatibility property of hydroxyapatite-10 wt% silver composites, *J Mater Sci: Mater Med*, 21:1273-1287p.
- Navarro, V., Villareal, M.L., Rajas, G. and Lozoya, X.**, 1996, Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases, *J. Ethnopharmacol.* 53, 143-147 p.
- Nawaz, H. R., Solangi, B.A., Zehra B. and Nadeem, U.**, 2011, Preparation of Nano Zinc Oxide and its Application in Leather as a Retanning and Antibacterial Agent, *Canadian Journal on Scientific and Industrial Research* 2(4), 164-170p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nirmala, R., Sheikh, F.A., Kanjwal, M.A., Lee, J.H., Park, S.J., Navamathavan, R. and Kim, H.Y.,** 2010, Synthesis and characterization of bovine femur bone hydroxyapatite containing silver nanoparticles for the biomedical applications, *J Nanopart Res.*, [13\(5\)](#), 1917-1927p.
- Noble, S.L., Forbes, R.C. and Stamm, P.L.,** 2001, Diagnosis and management of common tinea infections, *American Family Physician*, 58 (1), 163-174 p.
- Nriagu, J.O. and Moore, P.B.,** 1984, Phosphate Minerals, Springer-Verlag, NY., 330-340, 376-377 p.
- Moyer, C.A., Brentono, L., Gravens, D.L., Margrat, H.W. and Monafo, W.W.,** 1965, Treatment of large human burns with 0.5% silver nitrate solution, *Archives of Surgery*, 90: 812 p.
- Ocak, B.,** 2010, Antifungal ayakkabı üretiminde mikrokapsülasyon yönteminin kullanımı üzerine araştırmalar, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 133s.
- Ogasawara, Y., Hiruma, M., Muto, M. and Ogawa, H.,** 2003, Clinical and mycological study of occult *Tinea pedis* and *Tinea unguium* in dermatological patients from Tokyo, *Mycoses*, 46:114-119 p.
- Oğur, R., Babayigit, M.A., Yaren, H., Göçgeldi E., Tekbaş Ö.F. ve Hasde M.,** 2005, Sağlık teknisyeni öğrencilerinin ayak hijyeni konusundaki bilgi, tutum ve davranışlarının belirlenmesi, *Genel Tıp Dergisi* 15(1), 19-25 s.
- Oh, K.S., Kim, K.J., Jeong, Y.K. and Choa, Y.H.,** 2003, Effect of fabrication processes on the antimicrobial properties of silver doped nano-sized Hap, *Key Eng. Mat.* 240-242, 583-586p.
- Oh, K.S., Park, S.H. and Jeong, Y.K.,** 2004, Durability in Antimicrobial Effects of Silver Doped Hydroxyapatite Depending on the Synthesis Route, *Materials Science Forum*, 449-452, 1233-1236p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olson, C.R., Balasubramaniam, T., Shrum, J., Nord, T., Taylor, P.L. and Burrell, R.E.,** 2005, Novel Antimicrobial Activity of Nanocrystalline Silver Dressings, Int. Congress on MEMS.
- Öztürk, R.,** 2004, Antiseptik ve Dezenfektan Maddeler Karşı Direnç Sorunu, Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları, Simad Yayınları, 1, 41-60 s.
- Pekşen, C.,** 2006, Metal İyon Katkı Kalsiyumfosfat Esaslı Antibakteriyel Seramik Tozun Karakterizasyonu ve Sitotoksitesinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 71s.
- Percival, S.L., Bowler, P.G. and Russell, D.,** 2005, Bacterial resistance to silver in wound care, *Journal of Hospital Infection*, 60: 1-7p.
- Polatdemir C.E.,** 2010, Deri Üretiminde TCMTB Esaslı Fungusidlerin Etken Madde ve Deride Kalıntı Miktarlarının Mukayeseli Olarak Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bornova, İzmir, 59s.
- Pushpakanth, S., Srinivasan, B., Sastry, T.P. and Mandal, A.B.,** 2008, Biocompatible and Antibacterial Properties of Silver-Doped Hydroxyapatite, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4, 62–66p.
- Rameshbabu, N., Sampath Kumar T.S., Prabhakar, T.G., Sastry, V.S., Murty, K.V.G.K. and Prasad Rao, K.,** 2006, Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80(3), 581-591 p.
- Rawlings, D.E. and Cooper, D.R.,** 1975, Enumeration of Bacterial Populations in Fellingmongery and Tannery Effluent, *JSLTC*, 59(5), 134-141p.
- Reed, R.,** 1966, Science for Studies of Leather Technology, Pergaman Press, London, 278p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Reichert-Penetrat, S., Contet-Audonneau, N., Barbaud, A., Schurra, J.P., Fortier, B. and Schmutz, J.L.,** 2002, Epidemiology of dermatophytoses in children living in northeast France: A 5-year study, *Pediatr Dermatol*, 19: 103-105 p.
- Rifai, M.A.,** 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116,1-56.
- Robertson, W.G. and Morgan, D.B.,** 1971, Effect of pyrophosphate on the exchangeable calcium pool of hydroxyapatite crystals, *Biochim. Biophys. Acta* 230(3), 495-503p.
- Ruan, H.J., Fan, C.Y., Zheng, X.B., Zhang, Y. and Chen, Y.K.,** 2009, In vitro antibacterial and osteogenic properties of plasma sprayed silver-containing hydroxyapatite coating, *Chinese Sci Bull*, 54: 4438—4445p.
- Samuels, G.J.,** 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology, *Phytopathology* 96:195-206p.
- Sarı, Ö.,** 2000, Deride Kalite Kontrolü, Yayınlanmamış Ders Notları, E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Bornova, İzmir.
- Sarı, Ö.,** 2003, Tabaklama Maddeleri, Yayınlanmamış Ders Notları E.Ü. Mühendislik Fakültesi, Bornova, İzmir, 275s.
- Sarı, Ö., Turhan, G. ve Bayramoğlu, E.E.,** 2003, Tabakhanelerde Ortam Dezenfeksiyonunun Önemi Üzerine bir Araştırma, *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 40(2):129-136p.
- Sarkar, S., Jana, A.D., Samanta, S.K. and Mostafa, G.,** 2007, Facile synthesis of silver nano particles with highly efficient anti-microbial property, *J. Poluhedron*, 26, 4419-4426 p.
- Searle, A.,** 1919, *The Use of Metal Colloids in Health and Disease*, E. P. Dutton and Company, New York, 70 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sharphause, J.H., 1989, Leather Technician's Handbook, Leather Producers Association, Northampton, 575p.

Shibata, T., Hamada, N., Kimoto, K., Sawada, T., Sawada, T., Kumada, H., Umemoto, T. and Toyoda, M., 2007, Antifungal Effect of Acrylic Resin Containing Apatite-coated TiO₂ Photocatalyst, *Dental Materials Journal*, 26(3): 437 – 444p.

Shirkhanzadeh, M., Azadegan, M. and Liu, G.Q., 1995, Bioactive delivery systems for the slow release of antibiotics: incorporation of Ag⁺ ions into micro-porous hydroxyapatite coatings. *Mater Lett.* 24:7–12p.

Skoog, D.A., Holler, F.J. ve Nieman, T.A., 1998, “Enstrümental Analiz İlkeleri”, Çeviri Editörleri, Kılıç, E., Köseoglu, F., Yılmaz, H., *Bilim Yayıncılık*, Ankara, 230-251 p.

Smith, E. and Dent, G., 2005, Modern Raman Spectroscopy, Chapter 1, John Wiley&Sons Ltd., England.

Stratigos, A., Stern, R., and Gonzales, E., 1999, Prevalence o- skin disease in a cohort of shelter-based homeless men, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 41: 197-202 p.

Su, B.H. and Xiong, Z.X., 2007, Preparation of Antibacterial Ceramics with Silver-Carrying Nano-Hydroxyapatite, *Key Engineering Materials*, 336-338, 1563-1566pp.

Tancous, J.J., 1986, Skin, Hide and Leather Defects, USA, 363p.

Tarlea, M.M., Mutlu, M.M., Radulescu, C.H., Adıgüzel Zengin, A.C., Bitlisli, B.O., Başaran, B. and Yaşa, İ., 2009a, “2-Amino-6-Benzothiazole Substituted With Methoxy In The Form Of Sulphonic Acids, Used As Antifungal Product For The Preservation Of Wet-Blue Bovine Hides”, International Union of Leather Technologists And Chemists Societies IULTCS XXX. Congress. Beijing, China.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tarlea, M.M., Mutlu, M.M., Macovescu, G., Radulescu, C.H., Adıgüzel Zengin, A.C., Bitlisli, B.O. and Başaran, B.,** 2009b, Antifungal Compounds for Leather Part II. Testing of Antifungal Activity on Bovine Leathers, *Leather and Footwear Journal*, 9-4.
- Tas, A.C., Korkusuz, F., Timucin, M. and Akkas, N.,** 1997, An Investigation of the Chemical Synthesis and High Temperature Sintering Behaviour of Calcium Hydroxyapatite (HA) and Tricalcium Phosphate (TCP) Bioceramics, *J Mat Sci: Mater Med*, 8, 91-96 p.
- Trujillo, N.A.,** 2011, Antibacterial Effects Of Sputter Deposited Silver-Doped Hydroxyapatite Thin Films, Master of Science Thesis, Colorado State University, Colorado, 62p.
- TS EN ISO 4044,** 2009, Deriler - Kimyasal Deneyler - Kimyasal Deney Numunelerinin Hazırlanması, Türk Standartları Enstitüsü (TSE), Ankara
- Turhan, G.,** 2000, Mikoloji, Yayınlanmamış Ders Notları, E.Ü. Ziraat Fakültesi, Bornova, İzmir, 130s.
- Tümbay, E.,** 1983, Pratik Tıp Mikolojisi, Bilgehan Basımevi, İzmir.
- Türker, A.R.,** 2010, Ayakkabı kalitesi ve ilgili Türk Standardları, *Standard*, 577, 43-47s.
- Ungpakorn, R., Lohapathan, S. and Reangchainam, S.,** 2004, Prevalence of foot diseases in outpatients attending the Institute of Dermatology, *Clin Exp Dermatol*, 29: 87-90 p.
- Üçışık, H. A.,** 1994, Klinik Gelişim, İstanbul Tabip Odası, 7 (12): 3375-3378 s.
- Ünal, D.,** 2010, Ayak sağlığı ve ayakkabı, *Standard*, 577, 54-55s.
- Wang Y., Wang, X., Wei, K., Zhao, N., Zhang, S. and Chen, J.,** 2007, Fabrication, characterization and long term *in vitro* release of hydrophilic drug using PHBV/HA composite microspheres. *Mater. Lett.* 61, 1071–76 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- West, N.J.**, 1995, Systemic antimicrobial treatment of foot infections in diabetic patients. *Am J Health Syst Pharm*, 52: 1199-1202 p.
- Wheat, L.J., Ailen, S.D., Henry, M., Kerek, C.B., Siders, J., Kuebler, T., Fineberg, N. and Norton, J.**, 1986, Diabetic foot infections - Bacteriologic analysis, *Arch Intern Med*, 146: 1935-38 p.
- Wright, J.B., Lam, K., Hansen, D. and Burrell, R.E.**, 1999, Efficacy of topical silver against fungal burn wound pathogens, *American Journal of Infection Control*, 27 (4), 344-350p.
- Wuertz, M.**, 2006, Microbiological testing of leather, *World Leather*, June/July, 31-32 p.
- Yan, J and Cheng, J.**, 2003, Antimicrobial yarn having nanosilver particles and methods for manufacturing the same, United States Patent 6979491, Beijng, China.
- Zhang, Y., Yin, Q.S., Zhang, Y., Xia, H., Ai, F.Z., Jiao, Y.P. and Chen, X.Q.**, 2010, Determination of antibacterial properties and cytocompatibility of silver-loaded coral hydroxyapatite, *J Mater Sci: Mater Med*, 21:2453–2462p.
- Zhao, G. and Stevens, S.E.**, 1998, Multiple Parameters for the Comprehensive Evaluation of the Susceptible of *Escherichia coli* to the Silver Ion, *Biomaterials*, 11, 27-32 p.

ÖZGEÇMİŞ

Meruyert KOİZHAİGANOVA 19 Mayıs 1978 yılında Kazakistan'da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimlerini Kazakistanda'da tamamladı. 2000 yılında Kazakistan'da Shakarim adında Semey Devlet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Teknolojisi bölümünden mezun oldu. 2000-2001 yy. Shakarim adında Semey Devlet Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Teknolojisi bölümünde araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2001-2004 yy. Shakarim adında Semey Devlet Üniversitesi Orta-Mühendislik Fakültesi'nde Dekan yardımcısı olarak görev aldı. 2004 yılında Türkiye'de Doktora programını TCS burslu olarak kazanır ve Ankara Üniversitesi TÖMER'de Türkçe Dili eğitimini aldı. 2005 yılında Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Deri Mühendisliği Bölümünde Doktora programına kaydolar ve eğitimine devam eder.

BİLİMSEL AKTİVİTELER LİSTESİ

PROJELER

1. Kollagenin Saflaştırılması ve Saflaştırılmış Kollagenin Deri Üretim Proseslerinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması, 2006-MÜH-010 Ege Üniversitesi BAP Projesi, Yönetici Prof.Dr. Özcan SARI, Araştırmacılar: B. Ocak, O. Yılmaz, U. Dandar, *M. Koizhaiganova*, G. Yeldiyar, E. Kılıç, E. Karaçakı, N. Lkhagvajav, 2006 – 2009.
2. Gümüş Katkılı Hidroksiapatitin Bazı Deri İşlenti Basamaklarında Kullanılabilirliği ve Antimikrobiyal Özelliklerinin Araştırılması, 2009-MÜH-80 Ege Üniversitesi BAP projesi, Yönetici Prof.Dr. Gürbüz GÜLÜMSER, Araştırmacı: *M. Koizhaiganova*, 2009-2011.

YAYINLAR

SCI dergilerde

1. N. Lkhagvajav, İ. Yaşa, E. Çelik, *M. Koizhaiganova*, Ö. Sarı, Antimicrobial Activity of Colloidal Silver Nanoparticles Prepared by Sol-gel Method, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures Vol. 6, No 1, January-March 2011, p. 149-154. (SCI, C sınıfı IF 2.078)
2. N. Lkhagvajav, *M. Koizhaiganova*, E. Çelik, İ. Yaşa, Ö. Sarı, Assessment of Antimicrobial Activiy of Nanosized Ag Doped TiO₂ Colloids, World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, gönderildi, revizyonda (SCI, C sınıfı IF 1.214)
3. İ. Yaşa, N. Lkhagvajav, *M. Koizhaiganova*, E. Çelik, Ö. Sarı, Characterization and Antimicrobial Performance of Nano Silver Coatings on Leather Materials, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, 2012 gönderildi, (SCI, C sınıfı IF 2.078)

Uluslararası Hakemli dergilerde

1. *M. Koizhaiganova*, N. O. Işık, N. Lkhagvajav, İ. Cireli, Parchment Making Processes, Izdenis, 2(1) 2010, p. 24-27, (ISSN: 1560-1730) (Kazakistan).
2. *M. Koizhaiganova*, N. Lkhagvajav, İ. Yaşa, E. Çelik, Ö. Sarı, New Gelatin-Hydroxyapatite Nanocomposite Films Containing Nano Silver:

Synthesis, and Mechanical and Antimicrobial Properties, Journal of Bionanoscience, 2011, (USA, American scientific publishers) kabul edildi (in press).

3. N. O. Işık, İ. Cireli, M. Koizhaiganova, Determination of Abrasion Resistance of Automobile Upholstery Leathers, Revista Volume 11(3), September 2011, p.177-190 (Romanya).
4. M. Koizhaiganova, İ. Cireli, G. Gülümser, Adsorption of Chromium (III) and Chromium (VI) on Zeolite and Clays: a Review, Materials Science, 2012 gönderildi.
5. N. O. Işık, M. Koizhaiganova, İ. Cireli, Kültürümüzün Vazgeçilmezi Deri, Akademik Bakış, 2012 gönderildi.

Ulusal Hakemli dergilerde

1. N. O. Işık, M. Koizhaiganova, İ. Cireli, Deri ve Deri Mamüllerinin Korunması ve Bakımı, Standard, 577 Haziran 2010, s. 92-95, (ISSN: 1300-8366). (Protection and Care of Leather and Leather Products)
2. İ. Cireli, M. Koizhaiganova, Ö. Sarı, Sulu Çözeltilerdeki Krom (+3) ve Krom (+6) İyonlarının Hidroksiapatit Üzerine Adsorpsiyonu, Deri Bilim Volume 4(2), 2010, s.6-13, (ISSN-1307-427X). (Adsorption of Chromium (+3) and Chromium (+6) Ions from Aqueous Solutions onto Hydroxyapatite, Journal of Leather Science)
3. U. Dandar, M. Koizhaiganova, G. Yeldiyar, O. Yılmaz, B. Ocak, Ö. Sarı, Deriden Kollajen ve Jelatinin Saflaştırılması ve Elde Edilen Protein Materyallerinin Karakterizasyonu, Deri Bilim, Volume 4(2), 2010, s.14-21, (ISSN-1307-427X). (Purification of Collagen and Gelatin from Hides and Characterization of Obtained Proteinic Materials, Journal of Leather Science)
4. B. Üzüm, M. Koizhaiganova, N. O. Işık, İ. Cireli, Termokromik Pigmentlerin Deri Üzerine Uygulanması, Standard, 590 Temmuz 2011, s. 102-105, (ISSN: 1300-8366). (Application of Thermochromic Pigments on Leather)

BİLDİRİLER

Sözel Sunumlar

1. İ. Cireli, M. Koizhaiganova, Ö. Sarı, Sulu Çözeltilerdeki Krom (+3) ve Krom (+6) İyonlarının Hidroksiapatit Üzerine Adsorpsiyonu, Sözlü Sunum, I. Uluslararası Deri Mühendisleri Sempozyumu, 29 Nisan – 1 Mayıs 2009, İzmir/Türkiye, (s. 109-121). (Adsorption of Chromium (+3) and Chromium (+6) Ions from Aqueous Solutions onto Hydroxyapatite)
2. M. Koizhaiganova, İ. Cireli, G. Gülümser, Adsorption of Chromium (III) and Chromium (VI) on Zeolite and Clays: a Review, Oral Presentation, II International Leather Engineering Congress, Innovative Aspects for Leather Industry, 12-13 May 2011, Izmir/Turkey, (p. 215-225).

Poster Sunumlar

1. M. Koizhaiganova, İ. Yaşa, N. Lkhagvajav, Ö. Sarı, Antimicrobial Properties of Gelatin-Hydroxyapatite Composite Films Containing Nano Silver, Poster Presentation, I. International Leather Engineering Symposium, April 29th – May 1st, 2009, İzmir/Turkey, (s. 359-367).
2. M. Koizhaiganova, N. O. Işık, İ. Cireli, Parşömen için Kullanılan Karakterizasyon Teknikleri, Poster Sunumu, Uluslararası Bergama Sempozyumu, Bergama Belediyesi ve Ege Üniversitesi işbirliği ile, 07-09 Nisan 2011, Bergama/Türkiye, (Characterization Techniques of Parchment)
3. U. Dandar, M. Koizhaiganova, G. Yeldiyar, O. Yılmaz, B. Ocak, Ö. Sarı, Deriden Kollajen ve Jelatin Saflaştırılması ve Elde Edilen Protein Materyallerinin Karakterizasyonu, Poster Presentation, II International Leather Engineering Congress, Innovative Aspects for Leather Industry, 12-13 May 2011, Izmir/Turkey, s. 329-338. (Purification of Collagen and Gelatin from Hides and Characterization of Obtained Proteinic Materials)

PATENTLER

Ulusal

1. B. Üzümlü, M. Koizhaiganova, N. O. Işık, İ. Cireli, Termokromik Pigmentlerin Deri Üzerine Uygulanması, Türk Patentler Enstitüsü, başvuru tarihi Mayıs 2011.