

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



**KİTOSAN İÇERİKLİ BİR POLİMERİN SU ÜRÜNLERİ KAYNAKLI BAZI
PATOJENLER ÜZERİNDE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

EBRU POLAT ÖZMEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

I. DANIŞMAN

Doç.Dr. Nermin KARATON KUZGUN

II. DANIŞMAN

Doç.Dr. Pınar ERECEVİT SÖNMEZ

TUNCELİ – 2024

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KİTOSAN İÇERİKLİ BİR POLİMERİN SU ÜRÜNLERİ KAYNAKLI BAZI
PATOJENLER ÜZERİNDE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ

EBRU POLAT ÖZMEN
(210100009)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI

I. DANIŞMAN

Doç. Dr. Nermin KARATON KUZGUN

II. DANIŞMAN

Doç. Dr. Pınar ERECEVİT SÖNMEZ

TUNCELİ – 2024

T.C.
MUNZUR ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**KİTOSAN İÇERİKLİ BİR POLİMERİN SU ÜRÜNLERİ KAYNAKLI BAZI
PATOJENLER ÜZERİNDE ANTİMİKROBİYAL ÖZELLİKLERİNİN
İNCELENMESİ**

EBRU POLAT ÖZMEN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
SU ÜRÜNLERİ ANABİLİM DALI**

Bu Tez 25.12.2024 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **oybirliği** ile kabul edilmiştir.

İmza:.....

Prof.Dr. Ayşe GÜREL İNANLI
(Fırat Üniversitesi) **BAŞKAN**

İmza:.....

Doç.Dr. Güzin PIHTILI YILDIZ
(Munzur Üniversitesi) **ÜYE**

İmza:.....

**Doç. Dr. Nermin
KARATON KUZGUN**
(Munzur Üniversitesi)
DANIŞMAN

Bu Yüksek Lisans Tezi, Enstitümüz Su Ürünleri Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. Altuğ KAZAR
Enstitü Müdürü
İmza ve Mühür

NOT: Bu Yüksek Lisans Tezinde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı "Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu"ndaki hükümlere tabidir

20.01.2025

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

İmza
EBRU POLAT ÖZMEN

Danışman
Doç.Dr. Nermin KARATON KUZGUN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında öncelikle sayın danışmanım Doç. Dr. Nermin KARATON KUZGUN hocama, ikinci danışmanım sayın Doç. Dr. Pınar ERECEVİT SÖNMEZ hocama, Doç. Dr. Güzin PIHTILI YILDIZ hocama sonsuz özverisi, yönlendirmesi ve yardımseverliğinden ötürü ve ayrıca çalışmanın yürütülmesi için maddi imkan sağlayan Munzur Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Koordinatörlüğü (YLMUB023-10 nolu proje)'ne teşekkürü bir borç bilirim.

Ebru POLAT ÖZMEN
Tunceli-2024



İÇİNDEKİLER

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	I
TEŞEKKÜR.....	II
İÇİNDEKİLER.....	III
ŞEKİLLER LİSTESİ	V
TABLOLAR LİSTESİ	VI
KISALTMALAR LİSTESİ	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT	IX
1. GİRİŞ.....	1
2. İNSANLARDA HASTALIK YAPAN BAZI GIDA KAYNAKLI PATOJEN BAKTERİLER	7
2.1. Su Ürünleri Kaynaklı Patogen Mikroorganizmalar.....	7
2.1.1. Gram negatif.....	8
2.1.1.1. <i>Escherichia coli</i>	8
2.1.1.2. <i>Klebsiella</i>	9
2.1.2. Gram pozitif bakteriler	10
2.1.2.1. <i>Enterococcus</i>	10
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	11
3. KİTOSAN.....	13
3.1. Kitosanın Patogen Mikroorganizmalara Karşı Etki Modları	13
3.1.1. Hücre zarı/hücre duvarının bozulması.....	14
3.1.2. Hücre yüzeyinde yoğun bir polimer filminin oluşumu	15
3.1.3. Kitosan ile besinlerin şelasyonu	15
3.2. Kitosan Modifikasyonu	16
4 . MATERYAL VE METOT	18
4.1. Materyal.....	18
4.2. Metot.....	18
4.2.1. Kitosan-graft- poli(n-(2-hidroksipropil)metakrilamid) graft polimerinin sentezi	18
4.2.2. Kitosan-graft- poli(n-(2-hidroksipropil)metakrilamid) graft polimerinin karakterizasyonu	19
4.2.2.1. FTIR (fourier dönüşümlü kızılötesi) spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskopisi (sem)	19
4.2.2.2. Polimerin TGA analizleri	19
4.2.3. In vitro antimikrobiyal aktivitenin tespiti	20
4.2.3.1. Çalışmada kullanılan polimerin analize hazırlanması	20
4.2.3.2. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve ekim	20
4.2.3.3. Disk diffüzyon metodu	21
4.2.3.4. Mikrodilüsyon Broth Yöntemi (MİK).....	21
4.2.3.5. İstatistik Analizi.....	22
5. BULGULAR	23
5.1. Kitosan-Graft-Poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin FT-IR Spektrum Analiz Sonuçları	23
5.2. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin Termal Analiz Ölçüm Sonuçları	24
5.3. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin SEM Analizi Sonuçları.....	24

5.4. Disk Diffüzyon Analiz Değerleri	25
5.5. Minimal İnhibisyon Konsantrasyon Analiz Değerleri.....	28
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	33
7. KAYNAKLAR.....	35
ÖZGEÇMİŞ	39



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.	CTS-g- N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid) graft polimerinin sentez reaksiyonu.....	19
Şekil 4.2.	Disk diffüzyon metodu için 1,2,3,4, numaralı solisyonların petri kutularındaki disk olarak hazırlanmış görüntüsü.....	21
Şekil 5.1.	Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil) metakrilamid) graft Polimerinin FT-IR Spektrumu.....	23
Şekil 5.2.	Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin TGA Eğrisi.....	24
Şekil 5.3.	Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin SEM Görüntüsü	25
Şekil 5.4.	Disk diffüzyon metodu ile yüksek konsantrasyonda (0.118 gr'lık) 1: K+S, 2: K+A, 3:K+HPMA+A, 4: A solisyonları'nın (300 µL /disk) antimikrobiyal özelliğinin petri kutularındaki görüntüsü ampisilin sulbaktam: 5µg disk-1.....	27
Şekil 5.5.	Disk diffüzyon metodu ile düşük konsantrasyonda (0.059 gr'lık) 1: K+S, 2: K+A, 3:K+HPMA+A, 4: A solisyonları'nın (300 µL /disk) antimikrobiyal özelliğinin petri kutularındaki görüntüsü ampisilin sulbaktam: 10µg disk-1...	28
Şekil 5.6.	Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK:250 µL) ile 1:K+S, 2:K+A, 3.K+HPMA+A, 4: A solisyonları'nın antimikrobiyal özelliğinin mikropalak'daki' görüntüsü.	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1. Disk diffüzyon yöntemi kullanılarak 300 mikrolitre (8.85 mg' lik) konsantrasyonda polimer emdirilmiş disklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri.....	26
Tablo 5.2. Disk diffüzyon yöntemi kullanılarak 300 mikrolitre (4.425 mg' lik) konsantrasyonda polimer emdirilmiş disklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri.....	27
Tablo 5.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonu ile (MİK:250 µL) yüksek konsantrasyondaki polimer (7.375 mg' lik) solisyonlarının en küçük dozajdaki antibakteriyel etkileri	28



KISALTMALAR LİSTESİ

A	: Asetik Asit Çözeltisi
HPMA	: N-2-Hidroksipropil Metakrilamit
K+A	: Kitosanın %2 lik Asit Çözeltisi ile Muamele Edilmesi
K+HAPMA	: Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid)(HPMA)
K+HPMA+A	: Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid)(HPMA) polimerinin %2 lik Asit Çözeltisi ile Muamele Edilmesi
K+S	: Kitosanın %2 lik Asit Çözeltisi ile Muamele Edilmesi
MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
µL	: Mikrolitre



ÖZET

Bu çalışmada poli N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid(HPMA) polimerine antimikrobiyal bir ajan olan kitosan eklenerek yeni bir polimer elde edilmiştir. FT-IR, TGA ve SEM analizleri Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid) (HPMA) polimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve istenen özelliklere sahip olduğunu göstermiştir. Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid) (HPMA) polimerinin %2'lik asetik asit solisyonu (K+HPMA+A) balıklarda bulunan gıda kaynaklı patojenlerin (*Klebsiella pneumoniae* klinik izolatu, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) gelişimi üzerinde disk difüzyon ve mikrodilüsyon broth yöntemi olan antibakteriyel duyarlılık testleri ile antimikrobiyal etkisi incelenmiştir. Bu amaçla kitosanın %2 lik asit çözeltisi ile (K+A) , kitosanın safsu ile (K+S), kitosan içerikli HPMA' nın %2 lik asetik asit çözeltisi (K+HPMA+A) ile muamele edilmesi sonucu; gr (-) ve gram (+) bakteriler üzerinde HPMA+A ve K+A 'nın yüksek konsantrasyonu (300µL: 8,85 mg) daha yüksek düzeyde antimikrobiyal etki gösterirken K+HPMA+A' nın düşük konsantrasyonu ise (300µL: 4,425 mg) *E. coli* dışındaki tüm bakterilerde daha düşük inhibisyon zonu göstermiştir. Antibakteriyel etki üzerinde belirleyici olan minimal inhibisyon testi yapıldığında; K+A'nın bakteriler üzerinde Mik değeri 15,62 µL, K+HPMA+A'nın ise Mik değeri 31,85 µL dir. Standart antibiyotik ile kıyaslandığında; gram (+) bakteriler üzerinde aynı antimikrobiyal özellikte, gram(-) bakteriler üzerinde ise daha etkili antimikrobiyal özellik taşıdığı saptanmıştır.

Çalışma bulgularımız, uygun dozlarda (300-31,85 µL) kitosan içeren K+HPMA+A çözeltisinin, insan ve toplum sağlığının iyileştirilmesine yönelik tedaviyi desteklemede önemli bir özellik olan bakteri üremesini durduracak bakterisidal özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca konuyla ilgili gıda güvenliğinin artırılmasına yönelik yapılan çalışmalara da katkı sağlamaktadır.

Anahtar kelimeler: N-2-Hidroksipropil metakrilamid (HPMA), kitosan, Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid)(HPMA), patojen, uygun dozaj.

ABSTRACT

The Investigation of Antimicrobial Properties on Some Aquatic Products-Borne Pathogens of A Chitosan-Containing Polymer

In this study, a new polymer was obtained by adding chitosan, an antimicrobial agent, to poly N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide(HPMA) polymer. FT-IR, TGA and SEM analyzes showed that Chitosan-graft-poly(N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide)(HPMA) polymer was successfully synthesized and had the desired properties. 2% acetic acid solution (K+HPMA+A) of chitosan-graft-poly(N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide)(HPMA) polymer was used to kill foodborne pathogens found in fish (*Klebsiella pneumoniae* clinical isolate, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) on the development of disc diffusion and Its effectiveness was examined with antibacterial susceptibility tests, which is the microdilution broth method. For this purpose, as a result of treating chitosan with 2% acid solution (K+A), chitosan with pure water (K+S) and chitosan-graft-poly(N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide)(HPMA) with 2% acetic acid solution (K+HPMA+A); While the high concentration of K+HPMA+A and K+A (300 μ L: 8.85 mg) have a higher antimicrobial effect on gram (-) and gram (+) bacteria, the lower concentration of K+HPMA+A (300 μ L: 4.425 mg) showed a lower inhibition zone in all bacteria except on *E. coli*. When the minimal inhibition test, which is decisive for the antibacterial effect, is examined, the Mic value of K+A on bacteria is 15.62 μ L and the Mic value of K+HPMA+A is 31.85 μ L. Compared to standard antibiotics; It has been determined that it has the same antimicrobial properties on gram (+) bacteria and more effective antimicrobial properties on gram (-) bacteria.

Our study findings show that K+HPMA+A solution containing chitosan in appropriate doses (300-31.85 μ L) has bactericidal properties that will stop the growth of bacteria, which is an important feature in supporting treatment for improving human and public health. In addition, it contributes to the studies carried out to increase food safety on the subject.

Key words: N-2-Hydroxypropyl methacrylamide (HPMA), chitosan, Chitosan-graft-poly(N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide)(HPMA), pathogen, appropriate dosage

1. GİRİŞ

Bilim insanları virüsler, bakteriler, mantarlar, protozoalar ve helmintler dahil olmak üzere insanları etkileyen toplam ~1400 bilinen patojen türü olduğunu tahmin etmektedir. Bunlar, Dünya'daki mikrop sayısının %1'inden daha azını temsil etmesine rağmen, bu patojenler yılda ortalama 16 milyon ölüme katkıda bulunmaktadır ve bu ölümlerin çoğu önlenemez. Bulaşıcı mikropların kontrolsüz büyümesi yalnızca erken ölümlere neden olmakla kalmaz, aynı zamanda 2019'da COVID-19 salgınında görüldüğü gibi toplumları ve ekonomileri de durma noktasına getirebilir. Bu nedenle, Louis Pasteur ve Robert Koch'un öncü keşiflerinden bu yana araştırmacılar ve genel olarak sağlık sistemleri, bu bulaşıcı mikropların neden olduğu hastalıklar için tedaviler geliştirmiştir. Antibiyotikler, bakterileri öldürerek veya büyümelerini engelleyerek bakteriyel enfeksiyonları olan insanları ve hayvanları tedavi etmek için kullanılan ilaçlardır. Antibiyotikler, birçok zararlı bakteri türünü öldürmede etkilidir, ancak bazı dezavantajları dikkate alınmalıdır. İlk olarak, antibiyotikler bakterilere karşı etkili çözümler olsa da, virüslere karşı o kadar etkili değildirler. İkinci olarak, belirli bakteriler her üç antimikrobiyal ilaç kategorisinden en az birine karşı dirençli hale gelmiştir ve bu durum genellikle hastaların dış semptomlar azalır azalmaz antibiyotik tedavilerini sonlandırmalarından veya sağlık hizmeti sağlayıcılarının aşırı antibiyotik reçete etmelerinden kaynaklanır . Üç antimikrobiyal ilaç kategorisi, aktivite spektrumları dar, geniş veya geniş spektrumlu ajanlar olarak sınıflandırılmalarına göre tanımlanır. Penisilin G gibi dar spektruma giren antibiyotikler, Gram pozitif bakteriler üzerinde daha etkilidir; buna karşın tetrasiklinler ve kloramfenikol gibi geniş spektrumlu olarak sınıflandırılan antibiyotikler Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde etkilidir. Geniş spektrumlu bir antibiyotik, kimyasal modifikasyon nedeniyle genellikle Gram negatif olarak sınıflandırılan ek bakteri türlerini etkileyen bir antibiyotiktir (Alkarri ve ark., 2024).

Antimikrobiyal polimerler, mikroorganizmaları öldüren veya çoğalmalarını ve büyümelerini durduran madde(ler) içerir. Antimikrobiyal polimer maddeleri (i) mikropların yapışmasını önlemek ve/veya (ii) mikropları öldüren işlevsel gruplara sahip olmak veya (iii) mikropları yok eden nano katkı maddeleri içermek üzere tasarlanabilir. Bu tasarlanmış yöntemlerin belirli avantajları vardır. İlk olarak, ilk etapta bir enfeksiyonun ortaya çıkmasını önlemek için uygulanabilen önleyici bir çözüm sağlarlar. İkinci olarak, polimer içeren kısımlar patojenler tarafından alt edilemeyen çoklu antimikrobiyal

mekanizmalarla birleştirilebilir. İkinci olarak, antibiyotiklerin aksine, bu polimerler mikropların direnç geliştirme potansiyelini dūřürür. Üçüncüsü, bu polimerler virüslere ve bakterilere karşı etkili olan katkı maddeleri ile birleştirilebilir. Bir kez geliştirildikten sonra, bu antimikrobiyal polimerler daha geniş uygulamalara kolayca uyarlanabilir. Bunlar, çalışma yüzeylerini ve tıbbi aletleri mikrobiyal büyümeye karşı korumak için bir kaplama olarak uygulanabilir veya eritilerek birleştirilebilir ve elle tutulan ve mikropların birikme noktaları olan kapı kolları, tuř takımları, alışveriş arabası kulpları vb. gibi nesnelere kalıplanabilir. Antimikrobiyal özelliklere sahip plastikler, tüketilebilir dezenfektanların yerini alabilir veya bulaşıcı mikroplara karşı savaşta ek bir savunma olabilir (Alkarri ve ark. 2024).

Antimikrobiyal polimerler, polimerik biyositler olarak da bilinirler. Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalarda büyümede engel teşkil eden bir malzemedir. İmidazol halkası veya onun türevlerini içeren polimerler, antimikrobiyal aktivite gösterdikleri ve gelişmiş biyobozunurluğa sahip oldukları için kullanışlı biyomateryaller olarak bilinirler. Antimikrobiyal tıbbi polimerlerin temel araştırma alanlardan biri, antimikrobiyal polimer kompozitlerin geliştirilmesidir. Bu amaçla farklı yöntemler kullanılarak hazırlanan polimerik kompozitler literatürde yer almaktadır. İdeal antimikrobiyal polimerlerin aşağıdaki karakteristiklere sahip olmaları istenmektedir (şafaklı, 2014):

- Kolay ve ucuz bir şekilde sentezlenmelidir,
- Uzun süreli kullanımlara dayanıklı olmalı ve uygulamanın gerektirdiği
- sıcaklıklarda saklanabilmelidir,
- Toksik ürünler oluşturmamalıdır,
- Kullanacak kişide toksik ya da tahriş edici etki göstermemelidir,
- Temas ettiği süre zarfında patolojik mikroorganizmaların geniş bir spektrumu
- için bakteri ve mantarları öldürebilmelidir.

Mikroorganizmalar en geleneksel antibiyotiklerin bazılarına karşı direnç geliştirmiştir. Bu mikroorganizmalar kendi kendine birleşerek mikrobiyal bir biyofilm oluşturabilir. Mikrobiyal biyofilm oluşumu, neredeyse her yüzeyde doğal bir olaydır ve insan sağlığı ve çevre üzerinde sayısız yan etkiye neden olur. Bu nedenle, doğal polimerler gibi yenilenebilir kaynaklara dayalı çok sayıda bilimsel öneri geliştirilmiştir. Doğal polimerler veya biyopolimerler arasında doğada yaygın olarak bulunan selüloz, kitosan, nişasta, kolajen, jelatin, hyaluronik asit, aljinatlar, fibrin ve pektin bulunur. Biyopolimerler,

biyoyumluluk ve biyolojik olarak parçalanabilirlik gibi birçok ilginç özellik göstermiştir. Bununla birlikte, bu malzemeler genellikle kendi başlarına antimikrobiyal özelliklere sahip değildir (kitosan hariç). Bu nedenle, antimikrobiyal ajanlar doğal polimerik matrise dahil edilerek biyokompozite antimikrobiyal bir özellik kazandırılmıştır. Biyokompozitler, antimikrobiyal ajanların biyoyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir ilaç taşıyıcıları olarak incelenen iki farklı malzemeden (biri doğal kökenli) oluşur. Ek olarak, antimikrobiyal ajanların dahil edilmesi nedeniyle biyokompozitler birçok yüzeyde biyofilm oluşumunu ve bakteri çoğalmasını engelleyebilir. Bu inceleme, farklı yüzeylerde biyofilm oluşumunu ortadan kaldırmak veya azaltmak için bir biyokompozit oluşturmak üzere antimikrobiyal ajanların bir platformu olarak doğal polimerlerin kullanılmasını açıklar (Bustamante- Torres ve ark. 2022).

Kitosan, eczacılık alanında en çok tercih edilen biyo-malzemelerdendir. Canlıda birikme riskinin olmaması, biyobozunurluk, iyi biyoyumluluk, düşük toksisite, mukoadesiflik, antioksidan, antifungal, antibakteriyel, yara iyileştirici, hemostatik, antikanser ve antiinflamatuvar gibi özellikleri ile kitosan biyomedikal anlamda ve eczacılık alanında kullanımı için tercih edilen bir ürün haline getirmektedir (Öztürk ve Arslan, 2023). Ayrıca gıdanın raf ömrünü uzatmasının yanında, paketleme materyali ekonomik verimliliği artırabilen yenilebilir filmler için kullanılan en yeni materyallerden biride kitosandır (Uçan ve Mercimek, 2013; Karaton Kuzgun ve Gürel İnanlı, 2018). Kitosan ve türevleri bahsedilen tüm olumlu sürecini teşvik etmek amacıyla yaygın olarak kullanımı gerçekleştirilmektedir ve ayrıca bu konuyla ilgili çalışmalar in vivo ve in vitro olarak sürdürülmektedir (Öztürk ve Arslan 2023).

Kitosanın moleküler ağırlığı ve deasetilasyon derecesi biyolojik aktivitelerini önemli ölçüde etkiler . Kitosan, ilaç taşıyıcıları, su arıtımı ve doku mühendisliği için bir iskele dahil olmak üzere çeşitli biyomedikal ve biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Benzersiz biyolojik aktiviteleri nedeniyle, kitosan son yıllarda önemli ölçüde ilgi görmüştür.

Yapılan araştırmalar incelendiğinde geleneksel anlamda yapılan tedavi yaklaşımlarından uzaklaşarak yeni nanofarmasötikler gibi yeni ilaç taşıyıcı sistemlere odaklanıldığı görülmektedir (Dadar ve ark., 2017). Genellikle kabukluların ve böceklerin dış iskeletinde bulunan kitosan ise doğal bir biyopolimerdir. Biyoadeziv, biyoyumlu, toksik olmayan ve biyo bozunur yapısı nedeniyle kitosan kaynaklı formülasyonlar ağırlıklı olarak biyonanosensörler, yenilebilir kaplamalar ve ilaç taşıyıcı araçlar olarak farklı

biyolojik alarlarda kabul görmektedir. Bir araştırmada kırmızı tilapların kolumnaris hastalığına neden olan *Flavaobacterium columnare* bakterisine karşı muko-adeziv bir polimer olan kitosan içerikli bir nanoaşı oluşturulmuş ve bu aşının hastalığa bağlı ölüm oranını ciddi anlamda düşürdüğü ve güçlü bir bağışıklık alanı geliştirdiği saptanmıştır (Dönmez, 2023).

Kitosan mikro ve nanopartikülleri *Vibrio cholerae*, *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* ve *Streptococcus uberis* gibi patojen mikroorganizmlara karşı etkili olduğu araştırmalar doğrultusunda belirlenmiştir. Kitosan ayrıca başka maddeler ile beraber de kullanımı kolay olduğundan, kitosan ve başka bir maddenin birleşimi ile antimikrobiyal özellikleri bakımından yapılan çalışmalar son zamanlarda ivme kazanmıştır. Bir araştırmada *Olibanum gumm* adında literatürde tanınan ve aromatik bir reçine ile kitosanın beraber kullanımıyla gıdayı patojen mikroorganizmalar bakımından tatmin edici bir düzeyde koruduğu bildirilmiştir. Selülozün antimikrobiyal özelliğe sahip olmadığı bilinmektedir ama bazı filmlerle birleştirilerek oluşturulan ϵ -poli-1-lizin ve montmorillonite filmlerin *E. coli*, *S. aureus*, *Rhizopus oligosporus* ve *Botrytis cinerea* mikroorganizmaları üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir. Kitosan ve selüloz bir araya getirildiğinde ise etkili bir film oluşumu olur ve selüloz kitosanın oksijen bariyeri ile suya olan direncini arttırmaktadır. Kitosanın (D-glukozamin ve N'den oluşan amin açısından zengin bir polisakarit olan) harmanlanmasıyla oluşturulan selüloz baz özellikli bir ko-polimerdir. Hidroksipropil ve metil gruplarının β -1'e kimyasal olarak bağlanması ile üretimi yapılan ve film oluşturucu bir selüloz eter üzerine 1,4-glikosidik bağlar ile bağlanan -asetil-D-glukozamin birimleri, 4-D-glukan selülozik omurga oluşumu, kitosanın pozitif yüklü özellikli olması ve antimikrobiyal özelliğe sahip olduğunun bilinmesi sebebiyle bu birleşimde kitosan kısmı, ko-polimerin polielektrolit birleşmesi sonrası polianyonlar ile antimikrobiyal filmler oluşmasını sağladığı düşünülmektedir ve bu bilgiler ışığında kitosan uygun maddeler ile birleştirildiğinde mükemmel gıda koruyucu film tabakası oluşturabileceğini göstermiştir (Kaynacı ve Pekşen, 2023). Yapılan araştırmalar %85 ve üstüde olan deasetilasyon derecesine sağıp kitosanların gıdaların raf ömrünü uzatmada daha etkili olduklarının altını çizmektedir. Kitosan, gıdaların muhafazasında etkili antibakteriyel bir madde olduğu konusunda yapılan araştırmalar sonucunda görülmüştür. Kitosanın bakteriostatik ve bakterisidal etkisi bakımından oluşan mekanizmanın, bakterinin hücre membranı yüzeyine kitosanın pozitif yüklü amino (-NH₃⁺) grupları ve negatif yüklü karboksil (-COO⁻) gruplarının bağlanması

sonucu olduğu belirlenmiştir. Elektronlar bu şekilde bakterilerin hücre membranını kimyasal olarak bağlanması, negatif ve pozitif yüklerin dağılımı değiştirebilmektedir. Dağılımın değişimi, bakteri hücresinde membran zayıflamasına ve zarar görmesine sebep olmaktadır, ayrıca hücre içi bileşenlerin hücre dışına çıkmasına neden olmaktadır. Kitosan, bakterilerin gelişimleri bakımından önemli olan çinko ve demir gibi iz metalleri bağlar ve bu sebeple antimikrobiyal etki göstermektedir (Rabea ve ark., 2003). Kitosan, faaliyetini sürdürdüğü mikro çevrenin pH'sını, protonlanmamış ve protonlanmış amino grupların konsantrasyonlarını belirlemektedir ve buna göre;



Kitosanın antimikrobiyal yeteneği, yapısında bulunan pozitif yükün, hücre içi bileşenlerinden gelen negatif yüklerle veya mikroorganizmanın hücre proteinlerle etkileşime girmesinden kaynaklıdır. Ek olarak kitosan, metallerle kelat oluşturup mikrobiyal çoğalmayı azalttığıda ileri sürülmekte ve (Turan, 2011) kitosan bazlı filmler, özellikle gümüş kaplama içinde en fazla oranda antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Kılınç ve Sürengil, 2015).

Kalsiyum Oksit ile birleştirilmiş karboksimetil kitosan bazlı biyo-kompozit filmlerin sentezi ve antimikrobiyal etkisi ile ilgili bir çalışmada kalsiyum oksidin (CaO) karboksimetil kitosan (CMCH) biyo-kompozit filmlerinin antimikrobiyal aktivitesi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. CMCH, karides kitosandan karboksimetilasyon yoluyla sentezlenirken, CaO, stabilizatör olarak polietilen glikol ile birlikte bir eş-çöktürme yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentezlenen CaO, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Escherichia coli* (*E. coli*) 'ye karşı mükemmel antimikrobiyal aktivite gösterdiği ve CMCH'ye CaO eklenmesi, CMCH-CaO filmlerinin özellikle, *E. coli* (%98,8 R) ve *S. aureus* (%91,8 R)'a karşı olağanüstü antimikrobiyal aktivite gösterdi tespit edilmiştir (Thanakkasaranee ve ark. 2024).

Antimikrobiyal polimerlerin kimyasal yapılarına ve uygulamalarına dair kapsamlı bir bakış ile biyomedikal alanlarda kullanılan polimerlerin etkinliği üzerine güncel veriler olduğu ifade edilmiştir (Kenawy ve ark.2007). Antibiyotiklere dirençli bakterilere karşı polimerlerin antibiyotiklerle birlikte kullanımının sinerjik etkilerini araştıran bir çalışmada, bakterilere karşı polimerlerin direnç geliştirme potansiyelinin azaldığı tespit edilmiştir (Ng ve ark., 2014). Kitosanın, yararlı bakterilerin kolon mukozal popülasyonlarını artırmak ve proinflamatuvar bakterileri azaltmak için prebiyotik olarak hizmet edebilir olduğu, dengesiz bağırsak mikrobiyotasını ve mukozal inflamasyonu iyileştirebildiği yapılan çalışmalarda

tespit edilmiştir (Yan ve ark. 2021). Yapılan bir çalışmada N,O-karboksimetillenmiş kitosan adlı bir tür türetilmiş kitosan hazırlanmıştır. N,O-karboksimetillenmiş kitosan E. coli'ye karşı türetilmemiş kitosandan daha yüksek antibakteriyel özelliğe sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Hafdani ve Sadeghinia, 2011). Kitosan ve türevlerinin antimikrobiyal ve antioksidan özellikleri ve uygulamalarının yapıldığı bir incelemede gram pozitif, Gram negatif bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir (Abd El- Hack ve ark., 2020).

Balık kası besleyici değeri yüksek amino asitler ve yağ asitleri bakımından zengindir. Bu özellikleri ve ayrıca su içeriği yüksek bri gıda olduğu için balığın bozulması daha çabuk olabilmektedir (Huss, 1995). Avlama ile balıkların bozulması başlar ve bu süreçten sonra balık pekçok farklı mikroorganizma ile karşı karşıya gelir. Balıklarda bulunan mikroorganizmaların yükü, cinsi; avlama metodu, avlanma bölgesi, avlanma sezonu, sıcaklık, su kirliliği, saklama koşulları, taşıma, işleme şekli gibi pekçok faktör ile etkilenebilmektedir. Balığın avlancılığının yapıldığı an itibarı ile soğuk zincir kurallarına uygun halde ulaşımının sağlanması ve işlenmesi gerekir (Hussain ve Uddin, 1995; Jayasinghe ve Rajakaruna, 2005).

Bu çalışma kapsamında öncelikle kitosan içerikli polimer sentezlenip hakkında bilgi verilecek, daha sonra kitosan içerikli polimerin besin değeri yüksek, beslenmede önemli bir protein kaynağı olan balıkların yüzeyinde ve balık tezgahlarında bulunabilecek biyofilm oluşturabilen bazı bakteriler üzerinde antimikrobiyal duyarlılıkları test edilmiştir. Böylece gıda endüstrisinde balık yetiştiriciliğinde doğal ajanı olarak kitosan içeren polimerlerin kullanıldığı geleneksel ve modern ilaç taşıyıcı sistemlerden bahsedilmiştir. Bu çalışma antimikrobiyal özellik gösteren bu tür polimerlerin araştırma ve geliştirmede görev alan bilim insanlarına görüş sağlayacağı düşünülmektedir. İnsan ve toplum sağlığını iyileştirmeye yönelik yapılan bu araştırma, bu alanda kullanılacak ürünlerin biyoyumlu ve biyobozunur özellik taşıması gerektiğini vurgulamaktadır.

2. İNSANLARDA HASTALIK YAPAN BAZI GIDA KAYNAKLI PATOJEN BAKTERİLER

İnsanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hastalık oluşturan bakteriler patojen bakteriler olarak tanımlanmaktadır. İnsanlarda gıda intoksikasyonlarına ve infeksiyonlarına neden olan virüs, fungus ve bakteri türlerindeki sayı yaklaşık 50 dolaylarında olduğu ve bunlar arasında en yaygın olanını bakteriler olduğu bilinen bir gerçektir. Patojen bakterilerin oluşturduğu gıda intoksikasyonları ve infeksiyonları bütün dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olarak önemini korur. WHO yani Dünya sağlık örgütü, dünyada yaklaşık olarak yıllık 1.5 milyar diare vakasının görüldüğünü, 5 yaşın altındaki çocuklarda 3 milyondan fazlasında ölüme gerçekleştiği ve bu olayların önemli bir bölümünün mikrobiyal patojenler tarafından kontamine edilen gıda tüketiminden kaynaklandığını tahminler arasındadır. Epidemiyolojik çalışmalar ile veri tabanı iyi gelişmiş ülkelerde gıda kaynaklı hastalıklarda ciddi ekonomik kayıplara sebep olduğu da bilinmektedir (Erol, 2007).

Bakteriyel patojen kaynaklı hastalıklar gıda enfeksiyonları ve intoksikasyonları olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Gıda enfeksiyonları mikroorganizmalar gıdalarla (*Salmonella*, *Campylobacter* vb.) alınması ve bunların gastrointestinal sisteme ulaşması sonucu meydana gelmektedir. Buna karşın gıda intoksikasyonları, toksin oluşturan mikroorganizmaların gıdadaki üremeleri sonucu toksinlerini-ekzotoksin gıdaya salgılamaları ile, gıda ile alınan toksinlerin miktarına bağlı olarak zehirlenme olur. Bu nedenle intoksikasyonlarda canlı mikroorganizmanın gıda ile alınmasının bir önemi yoktur (Erol, 2007).

Gıda enfeksiyon ve intoksikasyonlarının oluşumları ve seyirleri; patojen mikroorganizmaların toksinleri ve yüzey proteinleri gibi virülens faktörleri; yaş diyet, beslenme, diğer hastalıkların varlığı, immun sistemin baskılanmış olması gibi bireysel faktörler ile gıdanın yapısı ve kompozisyonuna bağlı olarak değişir (Erol, 2007).

2.1. Su Ürünleri Kaynaklı Patojen Mikroorganizmalar

Buzdolabı koşullarında (0°C) balıklarda mikrobiyal aktivite yavaşlatılabilir ancak inhibe edilememektedir. Taze balıkta solungaç, deri ve bağırsakta mevcut olan mikroorganizma cinsleri; *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Clostridium*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Photobacterium*, *Micrococcus*,

Pseudomonas, Rhodotorula, Serratia, Candida ve Torulopsis'dir (Göktaş, 1990; Nollet ve Toldrá, 2010; Kocatepe ve ark., 2013).

Taze ya da canlı balıklarda $10^2 - 10^7$ /cm, bağırsakta ise $10^3 - 10^8$ /g, solungaç dokusunda $10^3 - 10^6$ /g, canlı bakteri bulunabilmektedir (Göktaş, 1990). Mikrobiyolojik bozulmayla beraber mikroorganizma sayısında artış olmakta ve mikrobiyal florada da değişim olmaktadır. Su ürünleri kaynaklı zehirlenmelerde pek çok balık ile kabuklu su ürünü etkili olabilmektedir. Bunlar arasında; kaya balığı, tuna, uskumru, lapin, ringa balığı, levrek, barakuda, yengeç, istiridy ve midye sayılabilir. Su ürünleri zehirlenmesinde etken olan mikroorganizmalar arasında ise *E. coli*, *S. aureus*, *V. vulnificus*, *Salmonella spp.*, *V.parahaemolyticus*, *C. botulinum*, *L. monocytogenes* gibi bakteriler sayılabilmektedir (İşgöz ve Yücel, 1993; FDA, 2012).

2.1.1. Gram negatif

2.1.1.1. *Escherichia coli*

Theodor Escherich' in ilk olarak tanımladığı *E. coli*, Enterobacteriaceae familyası üyesi olup günümüz enterik bakterilerinin en önemlilerinden biridir. İnsanlarda ve hayvanlarda bağırsak kanalında yayılım gösteren fakültatif anaerobik bakterilerdendir. *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alan fakültatif anaerob gram negatif, spor oluşturmeyen bir bakteridir. 35°C 'de 48 saat içerisinde laktozdan asit ve gaz oluşturabilen, çubuk şeklinde ki bakterisidir. *E. coli*, katalaz pozitif bir bakteridir ve laboratuvar şartlarında tanınması için en çok triptofandan indol oluşturma ve sitratı yıkımlama ile pH 4,4 'ün altındaki şartlarda asit oluşturma kabiliyetlerinden faydalanılmaktadır. Mezofiliktir ve gelişme sıcaklığı 37°C 'dir. Mevcudiyetleri 4°C ile 5°C arasında devam etmektedir. Su ve gıdalarda *E. coli* bulunması, o gıdaların dışkı ile temas ettiğini göstermektedir ve bu yüzden fekal kirlenme indikatörü olarak kabul edilmiştir. *E.coli* patojenitesine göre 6 grupta tanımlanmaktadır;

1. Enterohemorajik (EHEC),
2. Enteropatojenik (EPEC),
3. Enterotoksikojenik (ETEC),
4. Enteroinvasiv (EIEC),
5. Difuzadhering (DAEC)

6. Enteroaggregatif (EaggEC) *E. coli*.

E. coli besinlerde; hem hijyen açısından hem de fekal kontaminasyonun indikatörü olarak oldukça önemlidir ve gıda güvenliği-gıda hijyeni bakımından indikatör bakteri olarak kabul görmüştür (Balpetek, 2009).

Enterobacteriaceae türleri için, nutrient agar, kanlı agar ve diferensiyel -selektif olan besiyerlerinde 37°C'de 24 saat içinde S tipi gözle görülebilir koloniler meydana getirirler. Nutrient buyyon içerisinde 37°C'de 24 saat içinde bulanıklık yapar ve ürerler. *E. coli* birçok karbonhidrat ile (glukoz, laktoz, mannitol) gaz ve asit oluşturur fermente ederler. MacConkey agarda laktoza ayrıştırma yaptığı için pembe renkli koloni oluşturur ve EMB agarda da metalik refle (parlak yeşil) görünümünde koloni oluştururlar. *E. coli* suşları intestinal hastalıklar oluştururlar ve bunlar 6 serolojik sınıfa ayrılırlar: Bunlar:

1. Avian patojenik *E.coli* (APEC),
2. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC),
3. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC),
4. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC),
5. Diffuz-Adherent *E. coli* (DAEC),
6. ohemorajik *E. coli* (EHEC),
7. Entero-Agregatif *E. coli* (EAEC)'dir (Jahed, 2012)

2.1.1.2. *Klebsiella*

Cins adı 19. yüzyıllarda Alman bakteriyolog Edwin Klebs onuruna oluşturulmuş ve Sonrasında Carl Friedlander adlı araştırmacı ile tanımlanmış olan *Klebsiella pneumoniae*'nin oluşturduğu ağır ve sık olarak öldürücü pnömoni ile bakteri uzun yıllar Friedlander basili olarak dile gelmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesinin *Klebsiella* türlerinin cinsleri *Serratia*, *Enterobacter* ve *Citrobacter* ile beraber yer anılmaktadır. *K. pneumoniae* tıbbi olarak en önemli türüdür. İnsan, hayvan gastrointestinal sistem florasında ve doğada da yaygın olarak bulunabilmektedirler. Pnömoni, üriner sistemlerde enfeksiyon, bakteriyemi gibi çeşitli enfeksiyon rahatsızlıklarına sebep olabilmektedirler. *Klebsiella* türleri başta *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere diğer türler ise; *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiellaterrigena* ve *Klebsiellatrevisanii*'dir. *Klebsiella* cinsleri arasında bulunan ve hastalık oluşturan türler ise şunlardır; *K.*

pneumoniae, *K.granulomatis* ve *K.oxytoca*' dir. *Klebsiella* türleri Gram negatif, 2-5 µm boyunda, 0,7-1,5 µm eninde, sporsuz, hareketsiz ve kapsüllü bakterilerdir. Tek tek, ikili veya kısa zincir şeklinde gözlemlenebilirler. *Klebsiella* suşlarının hemen hemen hepsi ilk izolasyonda, nemli ve karbonhidrat bakımından zengin besiyerinde oluşturulan kültürlerde bakterinin çevresinde geniş bir kapsül oluşturmaktadır. *Klebsiella* türleri fakültatif anaerop'tur ve optimum üreme koşulları 37°C'dir. *K. pneumoniae* hariç diğer türler 4-44°C sıcaklık aralığında üreme gösterirler. Basit besiyerlerinde kapsülü olmayan suşları 18-24 saatte S tipi koloni, kapsülü olan suşları da M tipinde koloni oluşturur ve *Klebsiella* aktif metabolik bir bakteridir. *Klebsiella*, barsakta ve deride düşük oranlarda bulunabiliyorken, insanlarda üst solunum yollarında, hayvan floralarında ve doğada cansız ortamlarda yaygın olarak bulunurlar. Deri boğaz ve kolonda hızlıca kolonize olur, immün sistemi baskılı hastalarda enfeksiyonel hastalıklara sebep olabilmektedir. Bazı suşları enterotoksin salgılar. Nozokomiyal enfeksiyonlarda *K. pneumoniae* enfeksiyonu ilk sıralarda sayılabilmektedir. Özellikle bazı ülkelerde çoklu direnç hõstermektedir. Pek çok antibiyotiğe karşı dirençlidir, bununla birlikte kuru ortam ve dış koşullara karşı dirençli olması hastane ortamında daha kolay yayılım göstermesine neden olmaktadır. (Albayrak, 2018).

2.1.2. Gram pozitif bakteriler

2.1.2.1. *Enterococcus*

Enterococların çoğu dondurulma işlemine dahi dirençlidir ve donmuş ürünlerin fekal kirlenme indikatörü olarak kabul görmüştür. Diğer taraftan et ürünleri ve fermente sütlerde enterococlar değişik miktarlarda bulunabilmektedirler. Bu ürünlere enterococlar hijyen bakımından sorun teşkil ederler ve gıda kaynaklı olan bazı enterococlar meydana getirdikleri bakteriosinlerle beraber (bakteriosin, enterosin, sitosil) *listeria*'lara karşı bir etki gösterirler (Erol, 2007). 1984 yılı ve öncelerine kadar, *Streptococcus* cinsi içerisinde bulunan, Lancefield serolojik D grubu olan kokların bazılarını teşkil eden bu cins, fekal streptokok grubunu ifade etmektedir ve *Str. Faecalis* ile *Streptococcus faecium* türleri ile birlikte *Str. faecium* subsp. *casseliflavus* *Str. Faecalis* subsp. *Zymogenes*, ve *Str. faecalis* subsp. *liquefaciens* alt türlerini de içermektedir ve 1984 yılında Schleifer ve Kilpper-Balnz tarafından *Enterococcus* cinsi olarak ayrılmıştır. Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology isimli kitapta Enterokokları *Enterococcus* olarak önerilmiştir ve *Str. Avium*, *Str. faecalis*, *Str. gallinarum* ve *Str. Faecium* türlerine yer verilmiştir. 1984 'den sonra yapılan çalışmalarla *Str. faecium* ve *Str. faecalis* 'un isimleri *E. faecium* ve *E. faecalis* şeklinde değiştirilerek *Enterococcus* cinsi adı altında toplanmıştır. Yeni literatürlerde *Enterococcus* cinsi altında toplanan tür sayısı 16 olup bunlar; *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. saccharolyticus*, *E. cecorum*, *E. avium*, *E. dispar*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. solitarius* , *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. seriolicida*, *E. faecium* ve *E. hirae* 'dir. Enterokoklar her zaman ve hemen her yerde mevcut olabilen mikroorganizmalardır ve gıdalarda da yüksek oranlarda bulunabilen bu bakteriler, bakteriyosin üretimi, probiyotik karakteri ve süt endüstrisinde kullanılabilir (Halkman, 2005).

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Fakültatif anaerob, sporsuz, küre şekilli, gram pozitif ve 0.5-1.5 µm çapı olan *Stafilokoklar* genellikle kapsülü olmayan bakterilerdir. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37°C'dir. Anilin boyaları ile boyanır ve bu cinsin bir özelliği olan kümeler oluşturmak yani üzüm salkımı şeklinde büyüme oluştururlar. Stafilokokların bu görünüşü daha çok katı kültürlerde yapılan preparatlarda karşılaşılmaktadır. Sıvı besiyerlerinde oluşturulan preparatlarında ise kümelere çok fazla rastlanılmamaktadır. Dağıtma ile oluşturulan preparatlar görünüşde küçük kümeler ve kısa zincirler şeklindedirler. İkişer ikişer veya tek tek görünürler ve katı besi yerinde de stafilokoklar 24-48 saat bol şekilde üreme yapabilirler. Genellikle 1-2 mm çapında ve konveks, yuvarlak, parlak olan koloniler meydana getirirler. Özellikle patojen olan *S. aureus* 'ta kolonide hemoliz ve pigment görülebilmektedir. Kolonilerin renkleri limon sarısı ve beyaz arasında farklılık gösterebilmektedir. MacConkey agarla üreme yeteneği gösterebilmekte ve patojen özelliklerinin yanında stafilokoklar kültürde +4°C'de 2-3 ay, -20°C' de 3-6 ay canlılıklarını sürdürebilmeleri ile de bilinmektedir. Fakat 60°C'de 30 dk kalabilir ve *Staphylococcus*'un bazı türleri in vitro şartlarında kapsül oluşturabilmektedirler. *S. aureus* 'larda hücre duvarında bulunan ve teşhisinde önemli bir rolü olan Protein-A maddesini de bulundurmaktadır. Stafilokoklarda hücre zarını etkileyen 5 sitotoksin mevcuttur ve bunlardan alfa, gama, delta, beta toksinleri hemolizin yeteneği ile bilinir ve Leukosidin isimli toksin ise lökositlerde büyük etki gösterir. Ek olarak *stafilokoklar* enterotoksin

üretebilirler. Bazı *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının enterotoksin üretme yeteneği olduğu belirlenmiştir. A, B, C, D ve E harfleri ile serolojik olarak ifade edilirler ve ayrıca *Stafilokoklar* çeşitli enzimlerde sahiptirler. Bunlardan katalaz enzimi tüm stafilokoklarda mevcuttur fakat koagülaz enzimi bir patojenite kriteri olarak bilinir ve *Staphylococcus* türleri koagülaz pozitif ve negatif olarakda ikiye ayrılır (Halkman, 2005).



3. KİTOSAN

Kitosan doğal bir biyopolimer olan kitosanda elde edilmiş olup, oldukça iyi derecede antimikrobiyal özellik göstermektedir. Kitin doğal ortamda selülozdan sonra en çok olarak bulunan ikinci polimerdir. β -D bağları ile birbirlerine bağlanan, N-asetil-D-glukozamin grupları ile oluşan bir polisakkarittir ve kimyasal yapısı selüloza çok benzer. Ancak asetoamino grubu, selülozun 2. karbon atomuna bağlı olan hidroksil grubu yerine konumlanmıştır. Amino grubunun varlığı ile kitosan selülozden farklı olarak, antimikrobiyal etki de kazanmıştır. (+) yüklü olan amino grubu, (-) yüklü mikroorganizma iyonunu tutarak gelişimini engeller. Kitin suda çözünmez. Kimyasal reaktifliği oldukça düşüktür ve bu özelliğinden dolayı endüstriyel uygulamada yaygın bir kullanım alanı bulabilmektedir. Kitin, omurgasız deniz canlılarının kabuklarından, planktonlardan ve mantarlardan elde edilebilmektedir. Kabuklar et kısımlarından ayrıldıktan sonra kurutulup öğütülür. Ardından seyreltik NaOH ile işleme bırakılarak protein uzaklaştırılır. Daha sonra derişik HCl ile muamele edilir ve mineraller uzaklaştırılmaktadır. kitosan, kitinin'in deasetilasyonu ile elde edilmektedir (Süpüren ve ark., 2006).

Kitosanın antimikrobiyal özelliğini polikatyonik yapısına bağlayabiliriz, çünkü bakteri membranını polianyoniktir ve polikatyonik kitosanla etkileşime girince bu etkileşim sonucu bakterinin hayati fonksiyonları durur. Ayrıca kitosanın DNA'yı etkilemeside antimikrobiyal ajan olarak kullanımına sebep olur. Doğada bulunan kaynaklardan bol miktarda elde edilebilen bir polimer olan kitosan, biyolojik olarak parçalanabilirliği, canlılara karşı toksik özelliğinin olmaması, kimyasal ve fiziksel özellikleri, biyoyoumluluğu bakımından diğer biyopolimerlere oranla üstün özellikler gösterdikleri için tıp, gıda, kozmetik, ziraat, tekstil ve kağıt gibi endüstri alanlarında kullanılabilir (Şafaklı, 2014).

3.1. Kitosanın Patojen Mikroorganizmalara Karşı Etki Modları

Pek çok bakteriyel hücre duvarı, temel bileşen olarak fosfatidiletanolamin (%70) içerir ve negatif yüklüdür, bu nedenle antimikrobiyal polimerlerin pek çoğu da pozitif yüklüdür. Böylece kuaterner amonyum grupları içeren polimerler, polimerik biositler içerisinde muhtemelen en etkili olanlardır. Polikatyonik biositlerin, hücre duvarı veya sitoplazmik zarla etkileşerek tahribat yaptığı kabul edilmektedir. Kuaterner amonyum

grubu taşıyan ve aromatik veya heterosiklik yapılar içeren katyonik polimerlerden en çok bilinen ve üzerinde en çok çalışılanlar; polistiren ve polivinilpiridin türevleridir. İmidazol türevleri, antimikrobiyal aromatik/heterosiklik polimerlerdir. İmidazol halkası veya onun türevlerini içeren polimerler, antimikrobiyal aktivite gösterdikleri ve gelişmiş biyobozunurluğa sahip oldukları için kullanışlı biyomateryaller olarak bilinirler (Şafaklı, 2014).

Kitosan ve kitosan türevleri Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı farklı etki modları sergiler. Mekanizmalardaki bu fark, hücre duvarının bileşenindeki farklılığa bağlanabilir. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikandan, peptidoglikana kovalent olarak bağlı duvar teikoik asitlerinden (WTA'lar) ve mikroorganizma hücre zarına bağlı lipoteikoik asitlerden (LTA'lar) oluşur . WTA'lar ve LTA'lar negatif yüklü bir anyonik omurga içerir. Teikoik asitler hücre duvarında düzenlenmiş, düzgün, yüksek yoğunluklu negatif yükler sağlayabilir ve böylece iyonların zar boyunca geçişini engeller. Gram-negatif bakterilerde hücre zarfı, ince bir peptidoglikan tabakası içeren periplazmik bir boşlukla bölünmüş iki zardan oluşur, Gram-negatif bakterilerin dış zarının (OM) lipid bileşimi asimetriktir: dış yaprakçık lipopolisakarit (LPS) içerirken, iç yaprakçık çeşitli fosfolipitlerden oluşur. Gram-negatif bakterilerin yüzeyi, OM'nin dış tabakasındaki LPS'nin fosfat ve pirofosfat gruplarından gelen negatif yüklerden oluşur. Kitosanın antimikrobiyal etkilerinin yaygın olarak kabul gören mekanizmaları aşağıdaki üç modelde açıklanabilir (Yan ve ark 2021).

3.1.1. Hücre zarı/hücre duvarının bozulması

İlk ve en yaygın kabul gören model, Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin anyonik yüzeyi ile kitosan arasındaki elektrostatik etkileşimleri içerir ve bu etkileşimler hücre zarının bozulmasına neden olur .

Gram pozitif bakterilerde, pozitif yüklü kitosan, peptidoglikanlardaki negatif yüklü teikoik asitle elektrostatik olarak etkileşime girebilir ve bu da hücre zarında yıkıma, hücre içi bileşenlerin sızmasına ve kitosanın mikrobiyal hücrelere girmesine yol açabilir . Önceki bir çalışma, kitosanın neden olduğu proteinlerin ve diğer hücre içi bileşenlerin sızdığını doğrulamıştır. Daha ileri çalışmalar, peptidoglikanların hidrolizinin, bakteri karışımının elektriksel iletkenliğinin değerlendirilmesi *E. coli'den* kültür ortamına sitoplazmik β -

galaktozidaz aktivitesinin salınması yoluyla doğrulanan gelişmiş bir elektrostatik etkileşime yol açabileceğini göstermiştir.

Gram-negatif bakterilerde, LPS tarafından verilen yüksek negatif yükler, kitosandan gelen pozitif yükler tarafından nötralize edilebilir ve bu da OM'nin bozulmasına, kitosanın hücre zarına nüfuz etmesine ve böylece bakteriyel hücre ölümüne yol açabildiğini göstermektedir.

Son zamanlarda, kitosanın *E. coli* üzerindeki etkisine dair çalışmalar, sadece OM geçirgenliğinin arttığına dair gözlemi göstermekle kalmayıp aynı zamanda iç hücre zarının da hasar gördüğünü, bunun da sitozolik içeriğin sızmasına ve mikrobiyal hücre ölümüne yol açtığını göstermektedir. Benzer sonuçlar, antimikrobiyal dimetilaminoetil-kitosanın *S. aureus* ve *E. coli* 'ye karşı etki mekanizması için de gözlemlenmiştir. Kitosanın ve kitosan türevi mikrokürelerin bakteri hücre zarını bozduğu bildirilmiştir.

3.1.2. Hücre yüzeyinde yoğun bir polimer filminin oluşumu

Yüksek molekül ağırlıklı (Yüksek-MW) kitosan, hücre yüzeyinde yoğun bir polimer film oluşturarak, Gram-negatif bakterilerin OM'sindeki gözenekleri kapatarak besin alışverişini engelleyebilir ve mikrobiyal hücre ölümüne yol açabilmektedir. Bu tür bir profil, hücre duvarlarının daha kalın görünmesiyle tespit edilmiştir ve bu da hücre yüzeyinde kitosan birikimi anlamına gelmektedir (Yan ve ark., 2021).

3.1.3. Kitosan ile besinlerin şelasyonu

Kitosan şelat oluşturma özelliklerine sahiptir. Ortamın pH değeri kitosanın veya kitosan türevlerinin pKa değerinden yüksek olduğunda, kitosanın protonlanmamış amino grupları yalnız elektron çiftlerini hücre zarı yüzeyindeki LPS veya WTA'lardaki fosfat gruplarının metal iyonlarına bağışlayarak bir metal kompleksi oluşturabilir. Kitosanın pozitif yüklü amino grupları hücre zarı yüzeyindeki LPS veya WTA'lardaki fosfat grupları için iki değerlikli katyonlarla rekabet edebilir. Bu nedenle, böyle bir şelat oluşturma reaksiyonu hücre yüzeyi potansiyelinin dengesizliğine ve negatif yüklü fosfat grupları arasında karşılıklı itmeye yol açabilir ve böylece mikrobiyal hücre zarının yırtılmasına neden olabilir.

Biyouyumluluğun bariz koşullarının dışında, polimerin kendisi depolama sırasında bileşim ve yapı açısından nispeten kolay elde edilebilir ve kararlı olmalıdır. Böyle bir polimerik malzemenin bozunma süresi büyük ölçüde polimer zincirinin bileşimi ve yapısı tarafından kontrol edilmelidir. Ancak en önemlisi, bu polimerin hem dokular hem de hücrelerle biyouyumluluğunu korurken kısa temas sürelerinde patojenik mikroorganizmaların geniş bir spektrumunda net bir biyosidal etkiye sahip olması ve açığa çıkan bozunma ürünlerinin toksik olmaması ve organ toksisitesi veya patojenitesi ile kendini gösteren uzun vadeli yan etkilere neden olmamasıdır. Söz konusu malzemeler söz konusu olduğunda, özellikle ikinci koşulu karşılamak zordur (Smola-Dmochowska ve ark. 2023).

3.2. Kitosan Modifikasyonu

Kitosanın amino gruplarından gelen pozitif yükler, mikrobiyal membran üzerindeki negatif yüklü bileşenlerle elektrostatik olarak etkileşime girerek antimikrobiyal özellikler yarattığı ve bu Antimikrobiyal özellikler öncelikle 6'nın altındaki bir pH ile sınırlı olduğundan nötr ve alkali koşullar altında uygulamaları ve araştırmaları sınırlayabilir; fonksiyonel grupların kimyasal modifikasyonu, kitosanın türevlerine gelişmiş biyoaktivite ve iyileştirilmiş sulu çözünürlük sağlayabilir, bu da kitosanın doğal özelliklerini korurken uygulama kapsamını da büyüttüğü yapılan çalışmalar ile ifade edilmiştir. Asidik ortamda (pH 6'nın altında) antimikrobiyal özelliklerin var olduğu sınırlamaları hafifletmek için, kitosanın nötr ve bazik ortamda antimikrobiyal özellikler kazanmasını sağlayan kalıcı bir pozitif yük elde etmek için trimetil, 2-hidroksi-3-trimetilamonyumil, guanidini, trimetil amonyumil, piridinyumil ve kuaterner alkil grupları kitosana katılarak yapılan çalışmalar mevcuttur (Yan ve ark., 2021).

N, N, N-trimetil kitosan, kitosanın kuaternize bir türevidir. Kitosan, çoğunlukla *N*-metil piroldon (NMP) olmak üzere metilasyon reaktifleriyle reaksiyona girerek TMC oluşturabilir. Fizikokimyasal olarak, TMC nötr veya alkali ortamlarda çözünür ve hidrofilik (*N*-(CH₃)₃) ve hidrofobik grupları (*N*-(CH₃)₂), TMC'yi doğada amfifilik yapar ve bu da nanopartikül işleme için uygundur. TMC, sıkı bağlantıları etkileyen bir emilim artırıcı olarak işlev görebilir. Bu bağışak, burun ve akciğer üzerindeki ilaç iletiminde kullanımını kolaylaştırır (Yan ve ark. 2021).

N-(2-Hidroksil) Propil-3-Trimetil Amonyum Kitosan (HTC) HTC veya HTC klorür (HTCC), asidik, nötr ve alkali ortamlarda iyi sulu çözünürlüğe sahip olan kitosanın bir diğer yaygın kuaternize türevidir. Kitosan ve glisidil trimetil amonyum klorür arasındaki reaksiyonla sentezlenir. HTCC iyi antibakteriyel özellikler, mukoadezif aktivite ve geçirgenliği artırıcı aktivite gösterir. HTCC polimerlerinin çeşitli ilaca duyarlı ve ilaca dirençli bakterilere, hatta klinik olarak izole edilmiş çoklu ilaca dirençli bakterilere ve patojenik mantarlara karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Ek olarak, polimerlerin mikrobiyal membran bütünlüğünü bozarak patojenleri öldürdüğü bulunmuştur (Yan ve ark. 2021)

Tiyoglikolik kitosan, antimikrobiyal özelliklere sahip bir tiyollenmiş kitosan türevidir (TGC). Son zamanlarda, düşük molekül ağırlıklı TGC diğer türevlere (CMC ve TMC) göre mükemmel antimikrobiyal aktivite göstermiştir: 30 dakikalık bir tedavi %100 *Streptococcus sobrinus*'u (Gram pozitif bakteriler) öldürmüştü ve *Neisseria subflava*'da (Gram negatif bakteriler) %99,99 ve *Candida albicans*'ta (mantarlar) %99,97 oranında bakteriyi azaltmıştır (Yan ve ark. 2021).

TACin ayrıca, kuaterner N, N, N-trimetilamonyum grupları içeren kitosanın kuaternize bir türevidir. TACin, Boc ve tert-bütildimetilsilil (TBDMS) koruma stratejilerinin bir kombinasyonu kullanılarak sentezlenir Bu türevin iyi bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve umut verici bir geçirgenlik artırıcı olarak hizmet ettiği gösterilmiştir (Yan ve ark. 2021).

4 . MATERYAL VE METOT

4.1. Materyal

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Başlatıcı: Serbest Radikalik Polimerizasyon başlatıcısı 2,2-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN)

İnert gaz: Argon gazı

Monomerler: N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid

Kitosan (low molecular weight)

Asetik asit çözeltisi (%1'lik)

Kullanılan Cihazlar

Tartımlar için elektronik terazi, Radwag AS 220/X

IR spektrumları için Jasco 6700 FT-IR spektrometresi

Kurutma işlemleri için Nuve EV-018 marka etüv

Polimerizasyon için yağ banyosu

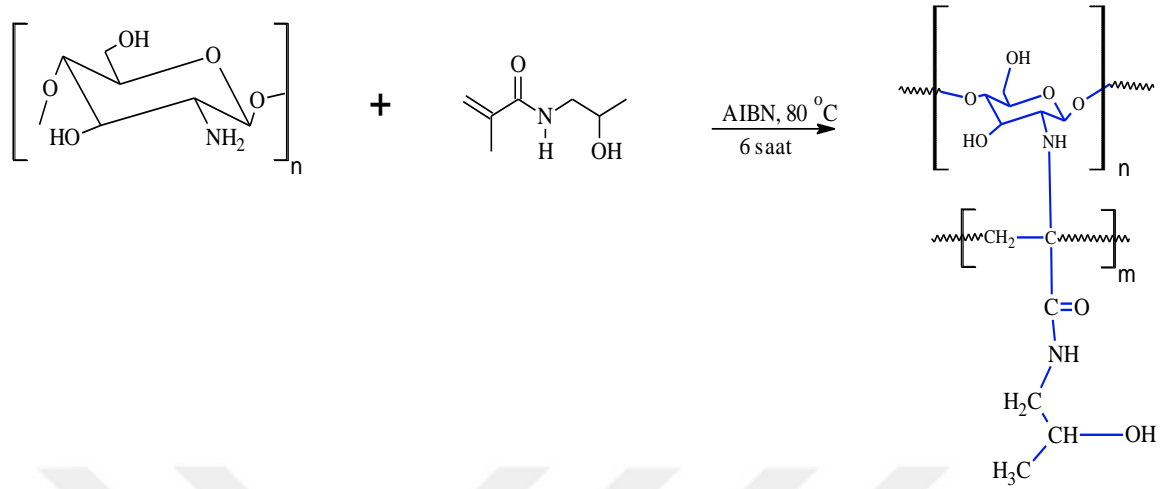
SEM görüntüleri için Hitachi S-3500 cihazı

4.2. Metot

4.2.1. Kitosan-graft- poli(n-(2-hidroksipropil)metakrilamid) graft polimerinin sentezi

N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid monomeri, başlatıcı olarak AIBN kullanılarak 80°C'de manyetik karıştırıcı altında Serbest Radikal Polimerizasyonu ile kitosan üzerine aşılandı. Kitosan (0,5 g) 50 mL %1 v/v asetik asit çözeltisinde çözüldü. NHPMA (1 g) ve AIBN (0,015 g) az miktarda dioksanda (5 mL) çözüldü ve kitosanın sulu asetik asit çözeltisiyle karıştırıldı. Karışım, inert bir ortam sağlamak için nitrojenden geçirildi. Polimerizasyon yaklaşık 6 saat boyunca devam etti. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra, kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid)[CTS-g-N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid)] oda sıcaklığında asetonda çökeltme yoluyla reaksiyon karışımından ayrıldı. Elde edilen kopolimer birkaç kez damıtılmış suyla ve daha sonra karışımda bulunan homopolimerleri veya tepkimeye girmeyen monomerleri uzaklaştırmak için etanolle yıkandı. Çözünmeyen aş kopolimeri filtrasyonla uzaklaştırıldı ve en az 24 saat boyunca 50

°C'de vakumlu bir fırında kurutuldu. CTS-g- N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin sentezi Şekil 5.1'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1. CTS-g- N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid) graft polimerinin sentez reaksiyonu

4.2.2. Kitosan-graft- poli(n-(2-hidroksipropil)metakrilamid) graft polimerinin karakterizasyonu

4.2.2.1. FTIR (fourier dönüştümlü kızılötesi) spektroskopisi ve taramalı elektron mikroskopisi (sem)

Çalışma hizmet alımı ile yapılmıştır. SEM bir yüzey görüntüleme tekniği olup, malzeme üzerine yüksek enerjili elektron ışınları gönderilir. Taramalı elektron mikroskop çalışmaları (SEM) için alınan polimer numuneleri kullanılmıştır. Polimer örneği FTIR spektrumları Perkin Elmer/Spectrum 100 ATR-FTIR spektrometrede 4000-650 cm⁻¹ aralığında kaydedilmiş olup, yüzey morfolojileri Hitachi Regulus 8230 model FE-SEM cihazında incelenmiştir (Çankaya ve Sökmen, 2021).

4.2.2.2. Polimerin TGA analizleri

Sentezlenen polimer numunelerinin TGA analizleri hizmet alımı ile yapılmış olup Shimadzu, DTG-60H Simltaneous DTA-TGA Apparatus cihazı kullanarak, 35-1100 °C aralığında, dakikada 10°C artarak, azot gazı atmosferi altında (100 cm³ /dk) yapılmıştır.

4.2.3. In vitro antimikrobiyal aktivitenin tespiti

Kitosan içerikli polimer örneklerinin antimikrobiyal analiz bakımından, disk difüzyon ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) yapıldı. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza altına alınan polimer örnekleri 3 tekerrürlü analizleri yapıldı.

4.2.3.1. Çalışmada kullanılan polimerin analize hazırlanması

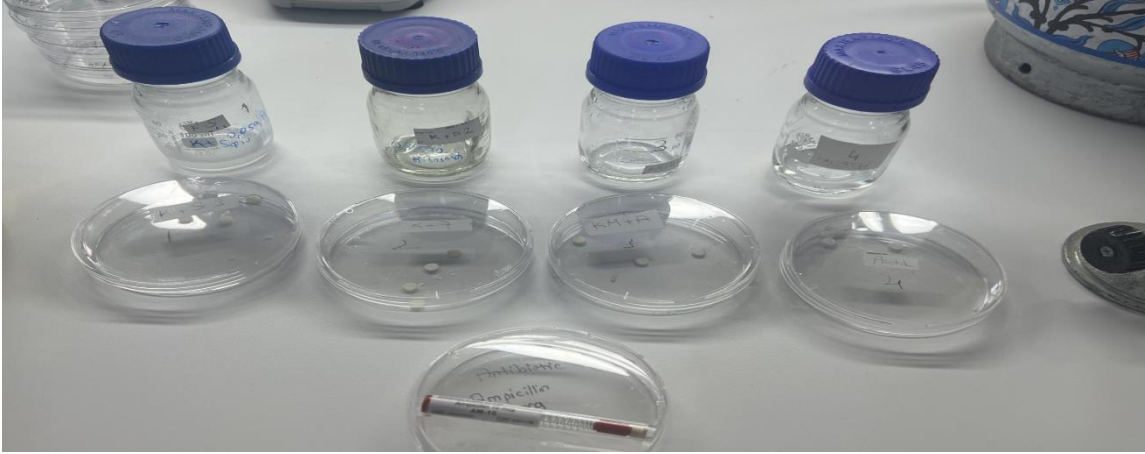
0.68 gr polimer 40 mL metanol de çözündürülmesi planlanmıştır. Ancak polimer metanolde çözünmediğinden, etanol, dimetilsülfoksit, %2'lik asetik asit çözeltileri denenmiştir. Bu çözücüler içinden %2'lik asetik asit'de çözülmüştür. Buna göre; 0.059 gr ve 0.118 gr polimer: Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid)(HPMA) ve 0.059 gr kitosan 4 mL %2 lik asetik asit de, 0.059 gr kitosan 20 mL saf su da çözündürülmüştür Daha sonra çözünen solisyonulardan 300 μL başlangıç konsantrasyonu ile antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir.

4.2.3.2. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması ve ekim

Tez çalışmasında 4 mikroorganizma kullanılmıştır ve bakteri olarak; *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatları kullanılmıştır. Bakteri suşları İstanbul Medical Park Göztepe Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir ve bu mikroorganizmalar, önemli insan patojenleri olmaları ve balıklarda gıda kaynaklı patojenler olmasının yanında son çalışmalarda çoğu araştırmacı için çalışma konusu olan antibakteriyel özelliklerinin belirlenmesi polimerlerin bu organizmalara etkisinin araştırılması nedeniyle seçilmiştir. Bakteri suşları; Nutrient Buyyon'a aşı yapılarak ve $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gün inkübasyona alınmıştır. Sıvı besiyerlerinde gelişen kültürler, Mc Farland standart tüpüne (0.5) göre bulanıklık ayarı yapılmış ve sonra buyyon tüplerine alınmış ve daha sonra erlenmayerde steril edilip, $45-50^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar soğutulduktan sonra Müller Hinton Agar bahsi geçtiği şekilde hazırlanıp bakterilerin buyyondaki kültürü ile %1 oranında aşılanmıştır (10^6 bakteri/ml). İyice çalkalama yapıldıktan sonra 9 cm çap genişliğindeki steril petri kutusuna 15'er ml aktararak besiyerlerinin homojen bir şekilde dağıtılması sağlanmıştır.

4.2.3.3. Disk diffüzyon metodu

300 µL biyopolimer örnekleri ile daha önceden emdirilen diskler, katılaşıp agar üzerine bırakılmış ve bu şekilde hazırlanan petripler 4°C’de 1.5-2 saat beklemeye alındıktan sonra bakteri aşılması yapılan plaklar 37±1°C’de 24 saat inkübasyona alınmıştır (Şekil 6.2). Çalışma 3 paralel olarak yürütülmüş, sonuçlar ortalama değer olarak inhibisyon zonu (mm) şeklinde değerlendirmeye tabi tutulmuştur (Collins ve Lyne, 1987; Özçelik, 1992). Kontrol grubu için standart antimikrobiyal duyarlılık test diski yerleştirilmiştir ve tüm test mikroorganizmaları için yapılan antimikrobiyal aktivite 3 kez tekrarlanmıştır.



Şekil 4.2. Disk diffüzyon metodu için 1,2,3,4, numaralı solisyonların petri kutularındaki disk olarak hazırlanmış görüntüsü

4.2.3.4. Mikrodilüsyon Broth Yöntemi (MİK)

Elde edilen polimerlerin asetik asit ile oluşturulan solisyonu mikroorganizmalara karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ’nu belirleyebilmek için mikrodilüsyon broth yöntemi (NCCLS, 2000) kullanılmıştır. Bakteriler için Mueller Hinton Broth (Accumix® AM1072) besiyeri ve mikroorganizma pasajları bakteriler de 37±1°C’de 18-24 saat broth kültürlerinde hazırlanmıştır. Bulanıklık 0,5 Mc Farland standardı’na göre ayarlanmıştır ve bu biyomalzeme solüsyonu öncesinde maksimum 250 µL konsantrasyonda derişimi azaltılmıştır. Daha sonra, broth içerikli aseptik mikrotitre plakalarının üzerinde 250 µL den 15.625 µL’ye kadar 5 kez seri ve 2 katlı dilüsyonu yapılmıştır. Bu seri seyreltmeler bir optik yoğunluk ölçer ile okunan bakterilerin buyyon kültürleri üzerinde test edilmiştir. Daha sonra üreme açısından incelenecek olan mikroplaklar bakteriler için 37±1°C’de 18-24 saat inkübe edilmiştir. Bakteriler için 5 x10⁵

log/mL olacak şekilde her kuyucuk içerisine 50 µL mikroorganizma süspansiyonu eklenmiş ve mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek amacıyla kullanılan antimikrobiyal örneğin nominal değeri için o numunenin en küçük değeri olarak tanımlanmaktadır. Kuyucuklar da renk değişiminin olmadığı yani mikrobiyal büyüme olmayan son tüp ise kullanılan polimer örneklerinin MİK değeri olarak kabul edilmiştir (mg mL⁻¹) (NCCLS, 2000) ve test üç kez tekrarlanmıştır.

4.2.3.5. İstatistik Analizi

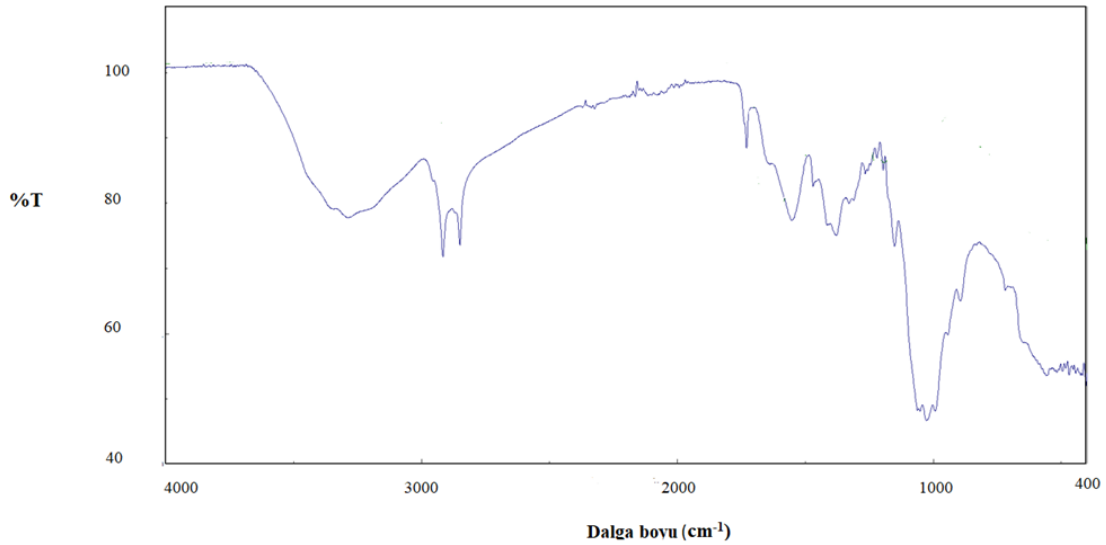
İstatistiksel analizler IBM SPSS®22 (Windows) bilgisayar paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arası farklılığın belirlenmesi için ANOVA (One Way) testi kullanılmıştır. Nicel değerle ortalama ± standart hata (Ort.±SH) olarak ifade edilmektedir.

5. BULGULAR

5.1. Kitosan-Graft-Poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin FT-IR Spektrum Analiz Sonuçları

Tez kapsamında sentezlenen polimerin karakterizasyonu FT-IR analiz yöntemi ile yapıldı. IR spektrumları, ATR (azaltılmış toplam yansıtma) ile Jasco 6700 FT-IR marka spektrometresi ile yapıldı. Filmler tarama için preslenme yöntemi ile oluşturuldu. Spektrumu 400 ile 4000 cm^{-1} aralığında kaydedildi. Şekil’de Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) FT-IR spektrumunu göstermektedir. Sentezlenen polimerin yapı karakterizasyonu sadece IR ile aydınlatılmıştır. Kitosana ait FT-IR spektrumuna bakıldığında,

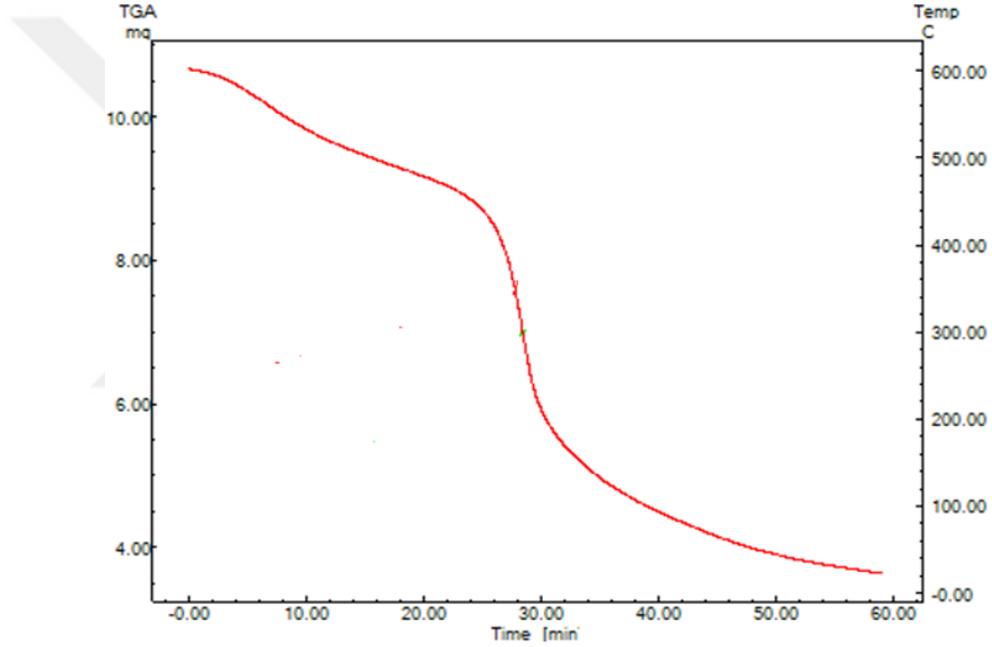
3445-3452 cm^{-1} dalga boyundaki geniş pik kitosanın karakteristik piki olan –OH grubuna, 1659-1660 cm^{-1} dalga boyundaki pik amit N-H eğilmesine, 2930 cm^{-1} ’daki pik ise yine kitosanın karakteristik piki olan CH₂’nin asimetrik eğilme pikine aittir. Amitli monomerin karakteristik piklerine bakılacak olursa; 3270 cm^{-1} ’deki band amit grubuna, 3000-3450 cm^{-1} ’deki geniş band hidroksil grubuna (kitosana iç içe geçmiş olabilir), 3042 cm^{-1} ’deki band vinil grubuna, 2790 cm^{-1} ’deki band alifatik karbonlara, 1650 cm^{-1} ’deki band karbonil grubuna ve 1600 cm^{-1} ’deki band karbon-karbon ikili bağına aittir.



Şekil 5.1. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil) metakrilamid) graft Polimerinin FT-IR Spektrumu

5.2. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin Termal Analiz Ölçüm Sonuçları

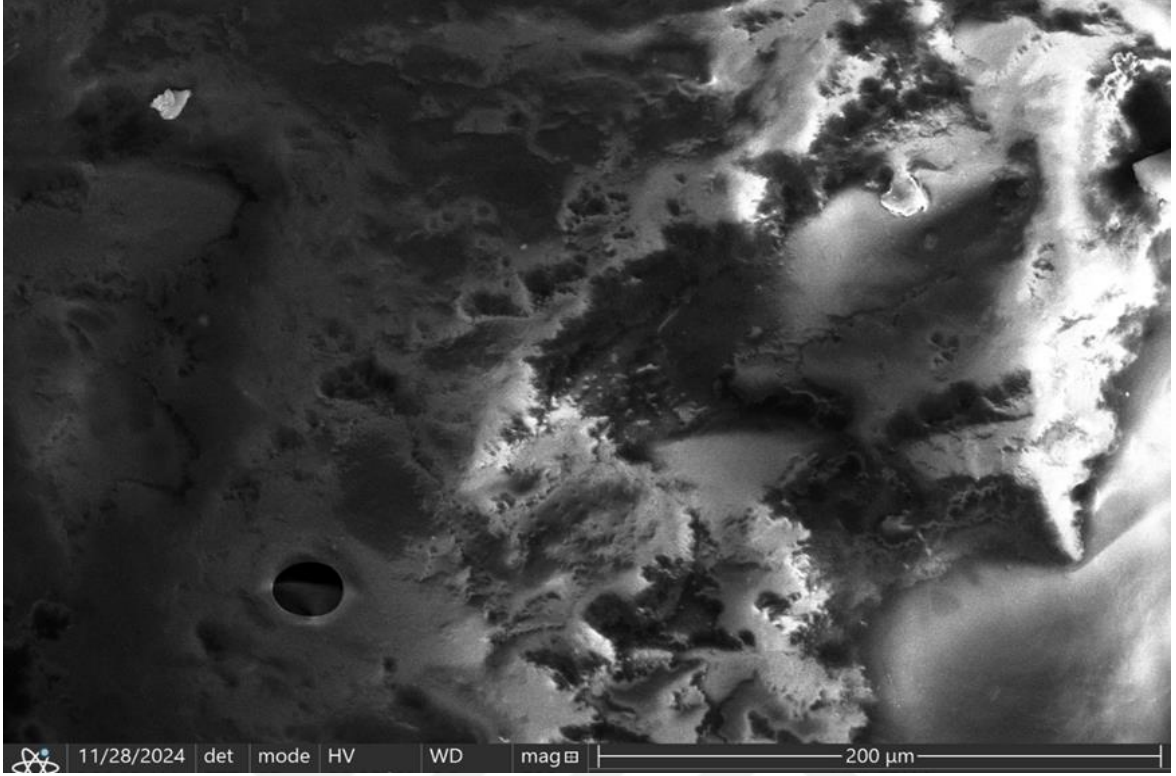
Termal analiz cihazı ile polimerlerin termal bozunması termogravimetrik analiz (TGA) ölçümleri ile belirlendi. Bu amaçla alınan belirli miktarlardaki polimer örnekleri azot gazı atmosferinde TGA da 10 °C/dk ısıtma hızıyla 600 °C' ye kadar ısıtılarak TGA eğrileri kaydedildi. Bu çalışmada hazırlanan. Polimerin termal bozunma sıcaklığı 216 °C olarak belirlenmiştir. %50 bozunma sıcaklığına karşılık gelen değer 360,06 °C'dir. 600 °C'deki atık miktarı yaklaşık olarak %3 civarındadır. Yani bozunmadan kalan madde miktarı tüm madde miktarının yaklaşık % 3'ü kadardır.



Şekil 5.2. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin TGA Eğrisi

5.3. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin SEM Analizi Sonuçları

Aşılınmış polimerin yüzey morfolojileri, Şekil 6.3'de verilen SEM analizi ile incelenmiştir. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) numunesinin SEM görüntüsünde kitosan omurgasındaki aşılınmış zincirler nedeniyle pürüzlü yüzeyleri olduğu görülmektedir. Kitosan polimeri, poliN-HPMAA zincirleriyle eş zamanlı aşılama, daha kompakt bir yüzey morfolojisi üretmek için gözenekleri doldurur (Bahramzadeh vd. 2019).



Şekil 5.3. Kitosan-graft-poli(N-2-Hidroksipropil)metakrilamid) Polimerinin SEM Görüntüsü

5.4. Disk Diffüzyon Analiz Değerleri

1 numradaki kitosan ve saf suyun karışımı ile elde edilen solisyon (K+S) disklere emdirilmiş olup gram negatif bakterilerden *K. pneumoniae* üzerinde ve gram pozitif bakterilerden *S. aureus*, *E. faecalis* üzerinde 12,3 mm / inhibisyon zon çapı ile gelişimi üzerinde anlamlı düzeylerde engellemiştir ($p < 0,0001$; cd). 2 numara kitosan ve % 2 lik asetik asit ile çözündürülmüş solisyonun (K+A) antibakteriyel etkisi incelendiğinde 12,3-14,3 mm / inhibisyon zon çapı ile tüm bakterilerin gelişimini oldukça anlamlı düzeyde engellemiştir ($p < 0,001$; d). Kitosan asetik asit çözeltisi (K+A), kitosan safsu çözeltisi (K+S) emdirilmiş disklerle göre bakteriler üzerinde daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olması asetik asidin kitosanın etkinliğini dahada arttırdığını göstermektedir. 3(K+HPMA+A) numaraya bakıldığında antibakteriyel etkinliğin daha da arttığı tespit edilmiştir (*K. pneumoniae*: 16,3 mm / inhibisyon zon çapı, *E. coli*:14,3 mm / inhibisyon zon çapı, *S. aureus* ve *E. faecalis*: 16,3 mm / inhibisyon zon çapı). Kontrol antibiyotiğine bakıldığında (10 µg disk-1); N-2-Hidroksipropil metakrilamid (K+HPMA+A) ve % 2'lik asetik asit çözeltisi emdirilmiş disklerin *S. aureus*, *E. faecalis* üzerinde gösterdiği antibakteriyel özelliğin aynı olduğu, *K. pneumoniae* ve *E. coli* üzerinde ise polimerin

antibakteriyel etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak polimerin hem kitosan hemde standart antibiyotik den daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kitosanın dozajının arttırılması ile bakterisidal özelliğe sahip olduğuda görülmüştür (Tablo 6.1, şekil 6.4).

Tablo 5.1. Disk diffüzyon yöntemi kullanılarak 300 mikrolitre (8.85 mg' lik) konsantrasyonda polimer emdirilmiş disklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri

Patojenler	İnhibisyon zon çapı (mm / inhibisyon zon apı)				Pozitif Kontrol Standart Antibiyotik
	1 (K+S)	2(K+A)	3(K+HPMA+A)	4(A)	
<i>K. pneumoniae</i>	12.3±0.3 ^{cd}	14.3±0.3 ^d	16.3±0.3 ^d	-	-
<i>E. coli</i>	-	12.3±0.3 ^d	14.3±0.3 ^d	-	-
<i>S. aureus</i>	12.3±0.3 ^{cd}	14.3±0.3 ^d	16.3±0.3 ^d	-	-
<i>E. faecalis</i>	12.3±0.3 ^{cd}	14.3±0.3 ^d	16.3±0.3 ^d	-	-

Pozitif Kontrol: ampisilin sulbaktam antibakteriyel disk 5 µg disk-1, Negatif kontrol olarak %2 asetik asit (4:A) kullanıldı. Zon çaplarının yorumlanması (mm); zon çapı >11 mm (bakterisidal; p<0,0001; cd, p<0.001; d), bakteriyostatik; 8-10 c: p<0.01, duyarlı değil (-) (a: p>0.05)

Tablo 6.2 de 1(K+S), 2(K+A), 3(K+HPMA+A), 4(A) numaralı solisyonların dozajı düşürülerek bakteriler üzerinde denendiğinde 1(K+S) ve 4(A) numaranın test edilen bakteriler üzerinde herhangi bir antibakteriyel etkinliğinin olmadığı görülmüştür. 2 (K+A) ve 3(K+HPMA+A) numaraya bakıldığında *E. coli* dışında tüm bakterilerin gelişimini bakteriyostatik ve bakterisidal olarak engellediği görülmüştür. 10 µg disk⁻¹ konsantrasyondaki standart antibiyotik gram pozitif bakteriler üzerinde antibakteriyel özellik gösterirken 5 µg disk⁻¹ konsantrasyondaki antibiyotik herhangi bir bakteri üzerinde etkili olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 6.2, şekil 6.4, şekil 6.5).

Tablo 5.2. Disk diffüzyon yöntemi kullanılarak 300 mikrolitre (4.425 mg' lik) konsantrasyonda polimer emdirilmiş disklerin mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri

Patojenler	İnhibisyon zon çapı (mm / inhibisyon zon çapı)				
	1 (K+S)	2(K+A)	3(K+HPMA+A)	4(A)	Pozitif Kontrol Standart Antibiyotik
<i>K. pneumoniae</i>	-	9.3±0.3 ^c	12.3±0.3 ^{cd}	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	10.3±0.3 ^c	12.3±0.3 ^{cd}	-	16.33±0.33 ^d
<i>E. faecalis</i>	-	9.3±0.3 ^c	12.3±0.3 ^{cd}	-	16.33±0.3 ^d

Pozitif Kontrol: ampisilin sulbaktam antibakteriyel disk 5 µg disk-1, Negatif kontrol olarak %2 asetik asit (4:A) kullanıldı. Zon çaplarının yorumlanması (mm); zon çapı >11 mm (bakterisidal; p<0,0001; cd, p<0.001; d), bakteriyostatik; 8-10 c: p<0.01, duyarlı değil (-) (a: p>0.05)



K. pneumoniae

E. coli

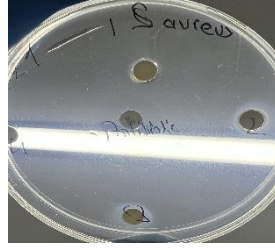
S. aureus

E. faecalis

Şekil 5.4. Disk diffüzyon metodu ile yüksek konsantrasyonda (0.118 gr' lık) 1: K+S, 2: K+A, 3:K+HPMA+A, 4: A solisyonları'nın (300 µL /disk) antimikrobiyal özelliğinin petri kutularındaki görüntüsü ampisilin sulbaktam: 5µg disk-1



K. pneumoniae



S. aureus



E. faecalis

Şekil 5.5. Disk diffüzyon metodu ile düşük konsantrasyonda (0.059 gr'lık) 1: K+S, 2: K+A, 3:K+HPMA+A, 4: A solisyonları'nın (300 µL /disk) antimikrobiyal özelliğinin petri kutularındaki görüntüsü ampisilin sulbaktam: 10µg disk-1

5.5. Minimal İnhibisyon Konsantrasyon Analiz Değerleri

Tablo 6.3 ve Şekil 6.6 incelendiğinde *E. coli* üzerinde 1 (K+S), 2 (K+A), 3 (K+HPMA+A), 4 (A) solisyonlarının 250 µL başlayan konsantrasyonları incelendiğinde; 1 (K+S) ve 4 (A) hariç 2 (K+A) ve 3 (K+HPMA+A) numaralı solisyonların tüm konsantrasyonlarda etkili olduğu bulanıklık gözlenmediği tespit edilmiştir. *S. aureus* ve *K. pneumoniae* bakterisinin üzerinde ise 1 (K+S) ve 4 (A) de bakteri üremesi gözlenirken, 2 (K+A) ve 3 (K+HPMA+A) numaralar da 5' inci kuyucuk da (Mik değeri: 15.625 µL) bakteri üremesinin olmadığı tespit edilmiştir. *E. faecalis* bakterisinin gelişimine bakıldığında; 1(K+S) ve 4 (A) de üreme olurken, 2 (K+A) de 5. kuyucuk (Mik değeri: 15.625 µL) ve 3 de ise 3. kuyucuk da (Mik değeri: 62.5 µL) bakteri üremesi olmamıştır.

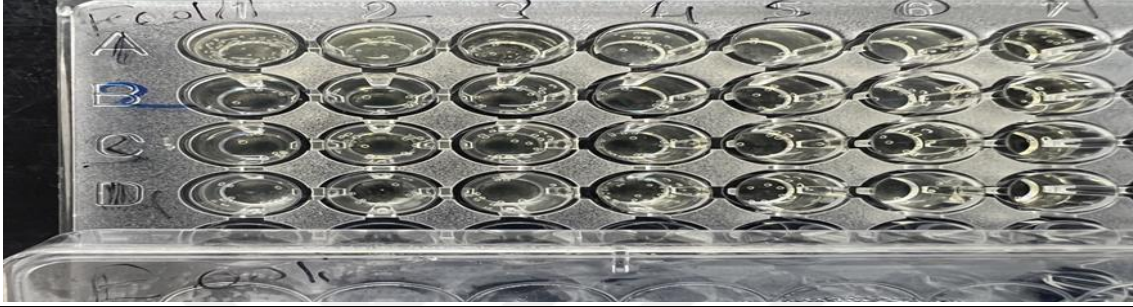
Tablo 5.3. Minimum inhibisyon konsantrasyonu ile (MİK:250 µL) yüksek konsantrasyondaki polimer (7.375 mg' lik) solisyonlarının en küçük dozajdaki antibakteriyel etkileri

Patojenler	İnhibisyon Bölgesi (µL)			
	MİK Değerleri			
Test Mikroorganizmaları	1:K+S	2:K+A	3(K+HPMA+A)	4(A)
<i>K. pneumoniae</i>	-	15.625	15.625	-
<i>E. coli</i>	-	15.625	62.5	-
<i>S. aureus</i>	-	15.625	31.85	-
<i>E. faecalis</i>	-	15.625	62.5	-

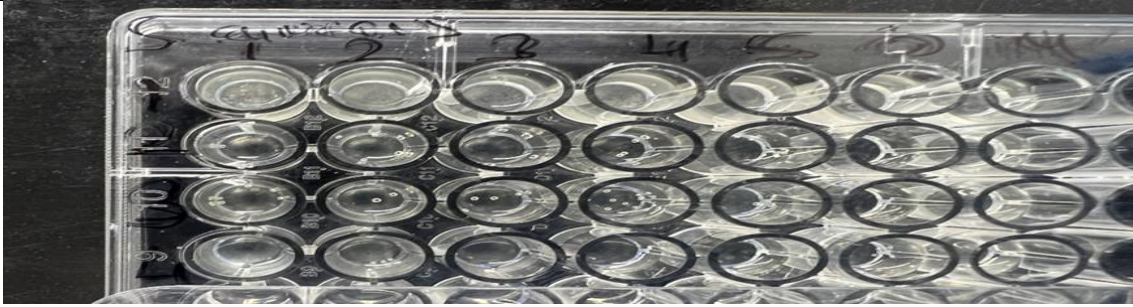
K. pneumoniae



E. coli



S. aureus



E. faecalis



Şekil 5.6. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK:250 µL) ile 1:K+S, 2:K+A, 3:K+HPMA+A, 4: A solisyonları'nın antimikrobiyal özelliğinin mikroplak'daki görüntüsü.

Not: Seyreltmeler mikroplak içindeki soldan sağa doğru 1.2.3.4.5.kuyucuklarda yapılmıştır. 250, 125, 62.5, 31.85, 15.625 mikrolitre örnek ilavesi + 50 mikrolitre mikroorganizma kültürleri ve broth ilavesi. Yukarıdan aşağıya 1.2.3.4 ile işaretlenmiş kuyucuklar örneklerin listelendirilmesidir.

Yapılan bir çalışmada kitosan film formülasyonuna iki farklı (%1 ve %3) konsantrasyonda etil pirüvat ilave edilerek, çevre dostu bir ambalaj materyali geliştirilmek istenmiş bu film örnekleri incelendiğinde; %1 etil pirüvat eklenmiş filmlerin *E. coli* O157:H7, *B. cereus* ve *S. aureus* suşlarına karşı gösterdiği antibakteriyel etkiyi önemli düzeyde arttırmıştır. Ayrıca film formülasyonunda, etil pirüvat konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkinin önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir (Kaya ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda kitosana poli N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid(HPMA) polimer eklenmesi ile *S. aureus*, *E. faecalis* suşlarına karşı gösterdiği antibakteriyel özelliğini arttırdığı gözlenmiştir.

Doğada yaygın ve bol miktarda bulunması, yüksek canlılara karşı toksik etki göstermemesi, mikroorganizmaları inhibe etmesi, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyoyumlu olması gibi özellikleri nedeniyle kitosan başta gıda olmak üzere kozmetik, ziraat, tıp, tekstil, biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanım olanağı bulunduğu yapılan bir çalışma ile ifade edilmiştir (Yıldırım ve ark., 2016). Buna göre kitosanın gösterdiği antibakteriyel özellik hem bu ifadeyi bir kez daha doğrularken hemde toksik etki göstermemesi nedeni ile kullanımı çalışmanın bir başka önemli niteliğini vurgulamaktadır.

N-2-hidroksipropil metakrilamit (HPMA), bir polimer olarak çeşitli antimikrobiyal özellikler göstermektedir. Bu özellikleri sayesinde bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde potansiyel bir malzeme olarak dikkat çekmektedir.

N-(2-hidroksipropil)metakrilamidin kopolimerlerinin *Staphylococcus aureus* 209 P'nin büyümesini engelleyen antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Solovsky ve ark., 1983).

N-(2-hidroksipropil)metakrilamit homopolimerlerin kullanıldığı kemodegradasyona uğrayan polimerlerin çeşitli sınıflardaki antibiyotiklerin taşıyıcıları olarak kullanılabilceği başka bir çalışmada belirtilmiştir (Solovskij ve ark., 2004).

poli(N-2-hidroksipropil metakrilamid) poli(HPMA) dayalı oksasilin polyesterlerinin *St. aureus*'a göre kayda değer antimikrobiyal aktivite sergilediği saptanmıştır (Solovskii ve ark. 2005).

Yapılan bir çalışmada poli(metilmetakrilat-ko-dimetilakrilamid) ile kaplama yapılmış kataterlerde bakterileri %96 azaltarak en iyi performansı göstermiştir (Haktaniyan ve Bradley, 2022).

Son yıllarda N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide diğer adı ile HPMA kopolimerlerine dayalı konjugatlar, oligopeptid araparçalarına polimer zinciri ile

bağlanmış bakteriyostatik özellikteki ilaçlar olarak canlıda gerekli ilaç salınımını sağlamada geniş uygulama alanı bulmuştur. HPMA kopolimerleri biyolojik olarak uyumlu ve suda çözünür özelliktedir (Nzarova ve ark., 1993).

Bir çalışmada, kendi kendine iyileşme problemi olan ve enfeksiyon riski yüksek yaralar için, poli(4-vinil piridin) ve hidrokispropil metakrilamid (HPMA) bazlı, iyileşme mekanizmasını güçlendiren çift katmanlı yara pansuman malzemelerinin üretilmesi ile bu malzemeler yarayı mikroorganizma istilasından kaynaklanan ikincil travmalardan korumak için tasarlanmış olup, toksik madde salınımı sorunu taşımamakta olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca materyallerin antimikrobiyal özellikleri sırasıyla *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'a karşı incelendi. Sonuçlara göre *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'a karşı çift katmanlı, antibakteriyel ve antifungal, yara iyileşmesini uyarabilen ve şişme kapasitesi yüksek geçici yara örtüleri başarıyla elde edildiği belirtilmiştir. Bu tür uygulamalar, bakteriyel biofilmlerin önlenmesi ve tedavisinde etkili olmuştur (İşoğlu ve ark., 2018).

Antimikrobiyal peptidler ve HPMA, siprofloksasin ile kombinasyon halinde uygulandığında *Acinetobacter baumannii* biyofilm oluşumuna karşı güçlü bir sinerjistik etki gösterdi. HPMA ve antibiyotiklerin diğer kombinasyon aktivitelerinin kısmi veya ilave sinerjistik etkileşimler olduğu etkinliğinin arttığı gözlemlenmiştir (Gopal ve ark., 2014).

Bir çalışmada, kendiliğinden antibakteriyel özelliğe sahip bir hidrojel üretimi ile ilgili yapılan çalışmada biyomedikal alanlarda en çok kullanılan hidrofilik polimerlerden N-2-hidroksipropil metakrilamid (HPMA) eklenmesi ile yüksek biyo-uyumluluk özelliği kazanacağı ve bu sayede başta yara örtüsü olmak üzere çeşitli doku mühendisliği çalışmalarında kullanımının elverişli olacağı düşünüldüğü belirtilmiş, aynı zamanda yüksek biyoyumluluk göstermesi, toksik etki yaratmaması ve yüzey adsorbsiyonunu azaltması gibi önemli özellikleri olduğu ifade edilmiştir (Nikbay, 2021). Kitosanın olumlu özelliklerinin yanısıra, N-2-hidroksipropil metakrilamid (HPMA) kopolimerinde taşıdığı önemli özellikler ve bu iki bileşiğin bir araya gelerek antimikrobiyal etkilerinin artmasında çalışmanın insan sağlığını tehdit edecek bir durumun söz konusu olmadığını ispatlamaktadır.

HPMA ile ilgili Yara örtüleri ve diğer biyomedikal uygulamalar için, HPMA'nın bakteriler üzerindeki etkisinin moleküler düzeyde incelenmesi, HPMA'nın diğer antimikrobiyal ajanlarla birlikte kullanıldığında gösterdiği sinerjik etkiler ile ilgili konulara odaklanılmıştır. HPMA'nın antimikrobiyal özellikleri üzerine yapılan

araştırmalar, bu polimerin potansiyelini ve uygulama alanlarını genişletmektedir. Çalışmamızda elde edilen verilere göre; N-(2-hidroksipropil)metakrilamidin kopolimerlerinin ve kitosanın kombinasyonu ile gösterdiği antibakteriyal özelliğın daha yüksek oluşu, her iki polimerin bir araya gelip sinerjistik etki göstermesinin sonucudur.

Kitosan, bakteriyostatik ve antifungal özellikleri ile bilinen bir biyopolimerdir. Çeşitli mikroorganizmalara karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Kitosanın antimikrobiyal aktivitesi, molekül ağırlığına, deasetilasyon derecesine ve ortam pH'ına bağılı olarak değişiklik göstermektedir. Genel olarak, belirli molekül ağırlıklarının antimikrobiyal etkinliği artırdığı bulunmuştur (Cesur, 2024). Benzer şekilde, kitin ve kitosanın birkaç türevinin, *E.coli*, *S. aureus* ve bazı *Bacillus* türlerinin gelişimlerini engellediğı gösterilmiştir (Kurtuluş ve Vardar, 2020). Antimikrobiyal aktivite açısından, kitosan film oluşturma çözeltileri *Escherichia coli* ve *Lactobacillus plantarum*'a karşı antimikrobiyal davranış gösterdiği saptanmıştır (Leceta ve ark., 2013) Kitosan filmlerin hazırlanması, mekanizması, antimikrobiyal aktivitesi, biyosit özelliklerinin optimizasyonu ve gıdaların kalitesinin ve raf ömrünün iyileştirilmesi için biyokatalizörler dahil olmak üzere uygulamaları mevcut olduğuna dair bir çalışmada ifade edilmiştir (Dutta ve ark., 2011). *S. aureus* gibi gram pozitif bakterilerin yanısıra *E. coli* ve *Salmonella* spp. gibi gram negatif bakterilere karşı Kitosanın mikro veya nanopartiküller formunun antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ayrıca Kitosanın nanopartiküller *L. monocytogenes* üzerinde etkili olduğu saptanmıştır (Pereira ve ark. 2023). Bir çalışmada *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarının gelişimini düşüren kitosanın olduğu saptanmıştır (Campana ve ark., 2017). Elde ettiğimiz veriler bu ifadeler ile paralel nitelikte taşımaktadır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gıdalarda görülebilecek mikrobiyal gelişme, biyotoksinler, mikotoksinler, kimyasal kontaminantlar insan sağlığını tehdit edecek boyuta gelebilmektedir. Bu nedenle gıda kaynaklı hastalıkların ortaya çıkması ve bunların salgın haline dönüşebilmesi bir toplumu sağlık, ekonomik ve sosyal açıdan etkilemektedir. Dünyada birçok ülke gıda güvenliği konusunda pek çok girişimde bulunmasına rağmen her yıl milyonlarca insanın mikrobiyal kontaminasyona maruz kalmış gıdaları tüketmesi sonucunda sık sık gıda enfeksiyonu ve zehirlenme vakaları görülmektedir. Gıdalarda güvenliğin artırımını sağlayacak tekniklerin geliştirilmesi tüm dünyada gıda alanında öncelikli araştırma konularından biri haline gelmiştir. Antimikrobiyal maddelerin çeşitli şekillerde gıdalara uygulanması ile gıda güvenliğini artırıcı çalışmalara katkıda bulunulmuştur.

Antimikrobiyal maddelerden biri olan biyopolimerlerin pekçok sentetik kaynaklı ilaçlar gibi insan vücudunda beklenmedik ve istenmeyen yan etki oluşturmaması, çok fazla etkiye sahip olurken sentetik ilaçların genelde tek bir etkiye sahip olabilmesi gibi özelliklerinden dolayı ilgi odağı haline gelmiştir. Ayrıca sağlık açısından güvenilir olması, basit teknoloji gerektirmesi, üretim maliyetlerinin düşük olması ve çevreyi kirletici etkilerinin olmaması en önemli avantajlarıdır.

Bu yüzden çalışmanın ilk amacı doğal kaynaklı bir polimerin antimikrobiyal bir ajan olan kitosan eklenerek sentezlenmesidir. Bu polimerin yani Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid) polimerinin sentezi ve karakterizasyonu ile polimerin sentezi, karakterizasyonu ve potansiyel uygulamaları hakkında ayrıntılı bir bilgi vermektedir. Buna göre: İnfrareddeki (IR) ipikler yapıyı destekler niteliktedir. Polimerin termal kararlılığını ölçmek için TGA analizi yapılmıştır. Polimerin termal bozunma sıcaklığı 216 °C olarak belirlenmiştir. %50 bozunma sıcaklığına karşılık gelen değer 360.06 °C'dir. 600 °C'deki atık miktarı yaklaşık olarak %3 civarındadır. Yüzey morfolojisi için SEM görüntüleri alınmıştır. Yapının gözenekli olması monomerin kitosana aşılındığının göstermektedir. Bu polimerin biyolojik olarak uyumlu olması ve biyomalzemeler, ilaç taşıma sistemleri ve doku mühendisliği gibi çeşitli alanlarda potansiyel uygulamaları bulunmaktadır. Bu sayede polimerin hücre uyumluluğu, biyolojik bozunabilirliği ve doku rejenerasyonunda potansiyel kullanımı araştırılabilecektir. İkinci ve temel amacı da; Antimikrobiyal ajanların polimerik materyallere dahil edilmesiyle ortaya çıkan üründen "Kitosan-graft-poli(N-(2-Hidroksipropil)metakrilamid" balıklarda

bulunan gıda kaynaklı bazı patojenler üzerindeki antimikrobiyal özelliklerinin besiyeri ortamında belirlenmesidir. Kitosan doğal bir biyopolimerdir. Ancak beraber sentezi yapılan monomerin amin (NH₂) gruplarında polimerin biyolojik olarak aktif olmasına etkendir.

Dünyada gıda kökenli hastalıklar önem arz eden bir problem teşkil etmeye devam etmektedir. Gıda zehirlenmeleri, koruyucu önlemler alınmasına karşın halen hem tüketicileri hem de gıda endüstrisinde tehdit unsuru olmaktadır. Buna karşın tüketicilerin, koruyucu eklenmiş gıdalardaki güvenlik konusunda endişeleri mevcuttur. Bu nedenle, gıda kökenli hastalık olaylarının azımsanması için daha etkili ve daha yeni tekniklere ilgi dahada artmaktadır (Alzokery ve Nakahara, 2003; Koyuncu ve ark. 2008). Yapılan araştırmaların sonucunda, kitosan gibi doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal maddelerin daha güvenilir bir gıda üretimine katkıda bulunduğunun altı çizilmektedir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar kitosan içerikli polimerlerin antibakteriyal özelliğini ortaya koymuştur. Elde edilen veriler, de bu durumu destekler nitelik taşımaktadır.

7. KAYNAKLAR

- Abd El-Hack , M. E., El-Saadony , M.T., Shafi , M.E., Zabermaawi , N. M., Arif , M., Elsaber Batiha, G., Khafaga, A.F., Abd El-Hakim, Y.M., Al-Sagheer, A.A.,** 2020. Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 164(1): 2726-2744.
- Albayrak, Ö.,** 2018. *Escherichia coli* ve *Kelebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapem direnci ve dirençten sorumlu enzimlerin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s82, Afyon.
- Alkarri, S., Bin Saad and Soliman, M.,** 2024. On antimicrobial polymers: Development, mechanism of action, *International Testing Procedures, and Applications, Polymers*, 16(6): 771.
- Alzokery, N.S., Nakahara, K.,** 2003. Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly consumed in Asia, *International Journal of Microbiology*, 80, 223-230.
- Bahramzadeh, E., Yilmaz , E., Adali, T.** 2019. Chitosan-graft-poly(N-hydroxy ethyl acrylamide) copolymers: Synthesis, characterization and preliminary blood compatibility in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123, 1257–1266.
- Balpetek, D.,** 2009. Bazı et Ürünlerinde *E. coli* 0157:H7 varlığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 53392s, Konya.
- Bustamante- Torres, M., Arcenteles-Vera, B., Estrealla Nunez, J., Yane-Vega, H., Bucio, E.,** 2022. Antimicrobial Activity of Composites-Based on Biopolymers, *Macromol*, 2 (3): 258-283.
- Campana, R., Casettari, L., Ciandrini, E., Illum, L., Baffone, W.,** 2017. Chitosans inhibit the growth and the adhesion of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates on urinary catheters, *Intenational journal of Antimicrobial Agents*, 50(2):135-141. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.031.
- Cesur, S., Köroğlu, C., Sırma, B.,** 2024. Kitosan, özellikleri, üretimi ve uygulama alanları. <https://www.plastik-ambalaj.com/tr/plastik-ambalaj-makale/1921-kitosan-ozellikleri-ueretimi-ve-uygulama-alanlar>
- Collins, C.H., Lyne, P.M.** 1987. Mikrobiyological methots. Butter Morths & Co (Publishers) Ltd. London, 450s.
- Çaket, A.,** 2013. Poli(Metakrilamid/Sepiyolit) kompozit hidrojellerin hazırlanması, karakterizasyonu ve invertaz immobilizasyonunda kullanılması. Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, FenBilimleri Enstitüsü, Sivas, s 88.

- Çankaya, N., Sökmen, Ö.** 2021. Polimerler-Kil Nanokompozitlerinde Kullanılan Bazı Yüzeysel Analiz Yöntemleri, *Teknik Bilimleri Dergisi*, 11(1), 20-32.
- Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hosenifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C., Joshi, S.K.,** 2017. Advances in aquaculture vaccines against fish pathogens, *Global Status and Current Trends, Rev Fisheries and Science Aquatic*, 25:184-217.
- Dönmez, A.E.,** 2023. Su ürünleri aşılarda nanoparçacıklar, *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 34:121-128.
- Dutta, J., Tripathi, S., Dutta, P.K.,** 2011. Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications, *Food Science and Technology International*, 18:1, pp. 3–34.
- Erol, İ.,** 2007. Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi, *Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi*,
- Fu Chun Shin (FCS)** 2024. – Plastik enjeksiyon makineleri, <https://www.plastik-ambalaj.com/tr/plastik-ambalaj-makale/1921-kitosan-ozellikleri-ueretimi-ve-uygulama-alanlar>
- Gopal, R., Kim, Y. G., Lee, J. H., Lee, S. K., Chae, J. D., Son, B.K., Seo, Yoon, C.H., Park, K.,** 2014. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Strains, *ASM Journals Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(3).
- Hafdani, F.N., Sadeghinia, N.,** 2011. A Review on application of chitosan as a natural antimicrobial, *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Medical, Health, Biomedical, Bioengineering and Pharmaceutical Engineering* 5(2): 46-50.
- Haktaniyan, M., Bradley, M.** 2022. Polymers showing intrinsic antimicrobial activity, *Royal Society of Chemistry Review*, 51, 8584-8611.
- Halkman, A.K.,** 2005. Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları, Başak Matbaacılık, Ankara.
- İşoğlu, İ.A., Demirkan, C., Şeker, M.G. et al.,** 2018. Antibacterial bilayered skin patches made of HPMA and Quaternary Poly(4-vinyl pyridine), *Fibers Polymer*, 19, 2229–2236.
- Jahed, R.,** 2012. Tavuklardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının çeşitli antibiyotiklere dirençliliğinin saptanması, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, s69, Ankara.
- Kaya, B., Zorba, N.N., Caner, C.,** 2021. Kitosan bazlı etil pirüvat filmlerim fizikokimyasal, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-quorum sensing özelliklerinin belirlenmesi, *Gıda*, 46 (6) 1425-1439.

- Kaynacı, E., Pekşen, İ.S.,** 2023. Et ve et ürünlerinde doğal koruyucular: Nisin ve Kitosan. Doğa ve Mühendislik Bilimlerinde Güncel Tartışmalar 8. Bilgin Kültür Sanat Yayınları, Ankara, 49s.
- Kenawy, E. R., Worley, S. D., Broughton, R.,** 2007. The chemistry and applications of antimicrobial polymers: A state-of-the-art review, *Biomacromolecules*, 8 (5):1359-1384.
- Kılınç, B., Sürengil, G.,** 2015. Taze alabalık filetolarının gümüş antimikrobiyal yenilebilir film kaplanarak bozulmaya neden olan bakterilerin tanımlanması. *Su Ürünleri Dergisi, Ege Journal of Fisheries Aquatic Science*, 32: 183-192.
- Koyuncu, İ., Yıldırım, İ., Duranoğlu, S.,** 2008. Tıbbi ve aromatik bitkilerin antimikrobiyal özellikleri, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, 21-23 Mayıs, 913-916, Erzurum.
- Kurtuluş, G., Vardar, F.,** 2020. Kitosanın özellikleri, uygulama alanları, bitki sistemlerine etkileri. *International Journal of Advances Engeneering Pure Science*, 2020, 32(3): 258-269.
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas, M.T., de la Caba, K.,** 2013, Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films, *Journal of Food Engineering*, 116: 4, pp. 889-899.
- Nazarova, O. V., Ulbrich, K., Panarin, E. F., Chetverikova, T. D., Afinogenov, G. E., Strohalm, J.,** 1993. Synthesis and antimicrobial activity of chloramphenicol derivatives based on N-[2-hydroxypropyl]methacrylamide copolymers having oligopeptides spacers, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 27, 101–105.
- NCCLS,** 2000. Methods for dilution and antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard- Fifth Edition. NCCLS document M7-A5, NCCLS: Wayne, PA, USA, 13s.
- Nikbay, E.,** 2021. Kendiliğinden antibakteriyel özelliğe sahip kriyojellerin üretilmesi, *Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya- Metalurji Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Bitirme Tezi*, s.63.
- Onbaşı, D., Yuvalı Çelik, G., Durbilmez, G. D., Öçsoy, İ.,** 2018. Kitosan-Gümüş nanopartikülü ve Kitosan-Gümüş-Grafen Oksit nanokompozitinin sentezi, karakterizasyonu ve antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(3): 208-215.
- Özçelik, S.,** 1992. Gıda mikrobiyolojisi laboratuvar kılavuzu. Fırat Üniv Fen-Edebiyat Fak Yayın No:1, Elazığ, 85s.
- Öztürk, A.A., Arslan, S.,** 2023. Biyouyumlu ve biyobozunur doğal bir polimer olan kitosan ve kitosanın diş hekimliğinde remineralizasyon ajanı olarak kullanıldığı ilaç taşıyıcı sistemler: Geleneksel Derleme, *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 12:143-156.

- Pereira, S., Costa-Ribeiro, A., Teixeira, P., Rodríguez-Lorenzo, L., Prado, M., Cerqueira, M. A., Garrido-Maestu, A.,** 2023. Evaluation of the antimicrobial activity of Chitosan nanoparticles against *Listeria monocytogenes*, *Polymers*, 15, 11.
- Rabea, E.I., Badawy, M.E., Stevens, C.V., Smagghe, G. and Steurbaut, W.,** 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action, *Biomacromolecules*, 4:1457-1465.
- Smola-Dmochowska, A., Lewicka, K., Macyk, A., Rychter, P., Pamuła, E., Dobrzyński, P.,** 2023. Biodegradable polymers and polymer composites with antibacterial properties, *International Journal of Molecular Science*, 24(8): 7473.
- Solovskii, M. V., Nikol'skaya, N. V., Zaikina, N. A.,** 2005. Synthesis and antimicrobial activity of oxacillin polyesters, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 39, 70–73.
- Solovskij, M.V., Nikolskaya, N.V., Tarabukina, E.V., Denisov, V.M., Adamov, A.V., Klenin, S.I.,** 2004. Synthesis and properties of branched chemodegradable polymers based on N-vinylpyrrolidone and N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide, carriers of biologically active compounds, *Designed Monomers and Polymers*, 7 (1–2), 63–83.
- Solovsky, M.V., Ulbrich, K., Kopecek, J.,** 1983. Synthesis of N-(2-hydroxypropyl) methacrylamide copolymers with antimicrobial activity, *Biomaterials*, 4 (1), 44-48.
- Süpüren, G., Çay, A., Kanat, E., Tarakçıoğlu, I.,** 2006. Antimikrobiyal lifler, *Tekstil ve Konfeksiyon*, 16(2): 80-89.
- Şafaklı, A.,** 2014. Antimikrobiyal özelliğe sahip yeni polimerik kompozitlerin sentezi ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, s63, Kocaeli.
- Thanakkasaranee, S., Rachtanapun, P., Rachtanapun, Ç., Kanthiya, T., Kasi, G., Sommano, S. G., Jantanasakulwong, K., Seo J.,** 2024. Bio-Composite films based on Carboxymethyl Chitosan incorporated with Calcium Oxide: synthesis and antimicrobial activity, *Polymers*, 16(17): 2393.
- Yan, D., Li, Y., Liu, Y., Li, N., Zhang, X. and Yan, C.,** 2021. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections, *Molecules*, 26, 7136.
- Yıldırım, Z., Öncül, N., Yıldırım, M.,** 2016. Kitosan ve antimikrobiyal özellikleri, Derleme, *Niğde Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 5, 1, 19-36.