



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



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NANOTEKNOLOJİK DEZENFEKTANLARIN FARKLI
FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA ETKİNLİĞİNİN
İNCELENMESİ**

Beyza Nur BAY

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

Danışman

Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN

Mayıs, 2015

İSTANBUL

Bu çalışma 29/05/2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN (Danışman)

İstanbul Üniversitesi

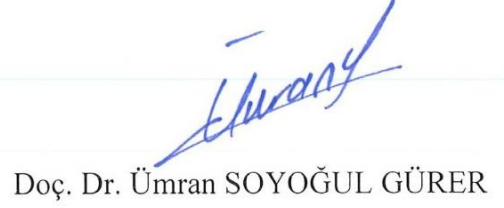
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Aydın ÇOTUK

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Doç. Dr. Ümran SOYOĞUL GÜRER

Marmara Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Ayten KİMİRAN ERDEM

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi



Doç. Dr. Esra İLHAN SUNGUR

İstanbul Üniversitesi

Fen Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 36725 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde beni yönlendiren, her konuda bilgisini ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. İrfan TURETGEN'e,

Çalışmalarında gösterdiği ilgisi, desteği ve yardımlarından dolayı Araş. Gör. Nazmiye Özlem ŞANLI YÜRÜDÜ'ye,

Yardımlarından dolayı Araş. Gör. Cansu VATANSEVER'e,

Tez çalışmalarım boyunca her sorunumda beni dinleyen ve çözüm yolu arayan yol arkadaşım Gökçe IŞIKLI'ya,

Dönem arkadaşlarım Merve GÜLENER, Simge ARKAN, Hazal ZORBOZAN, Büşra DEMİR, Ekin GENÇ ve Uzman Mikrobiyolog İpek ADA'ya,

Aralarında olmaktan mutluluk duyduğum ve bana deneyimleriyle yol gösteren tüm Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ailesi üyelerine,

Destekleri için İ.Ü. Fen Fakültesi Bilgisayar Laboratuvarı çalışma arkadaşlarım Derya KAPLAN, Şifa ÖZTÜRK'e,

Yanımda olmasa da varlığını hep yanımda hissettiğim Münire SÖZERİ'ye,

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen babam Ali BAY, annem Fatma BAY ve kardeşlerime,

Yardımları ve desteği için Fethi ÇETİROL'a teşekkür ederim.

MAYIS, 2015

Beyza Nur BAY

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	10
2.1. DEZENFEKSİYON.....	10
2.1.1. Dezenfeksiyon Tanımı.....	10
2.1.2. Dezenfektan Çeşitleri	11
2.1.3. Dezenfeksiyon Mekanizmaları	12
2.2. BİYOFİLM.....	14
2.2.1. Tarihçe	14
2.2.2. Biyofilm Tanımı ve EPS.....	15
2.2.3. Biyofilm Tabakasının Oluşumu	17
2.2.4. Direnç ve Direnç Mekanizması.....	22
2.3. MİKROBİYAL BİYOFİLMİN ÖNEMİ	24
2.3.1. Biyofilm Oluşumunun Endüstriyel Açıdan Önemi	24
2.3.2. Biyofilm Oluşumunun Klinik Açıdan Önemi.....	26
2.4. TEST EDİLEN MİKROORGANİZMALAR	28
2.4.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
2.4.3. <i>Escherichia coli</i>	33
2.4.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
2.5. DEZENFEKSİYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER.....	37
2.5.1. Mikroorganizmaya Bağlı Faktörler	38
2.5.2. Dezenfektana Bağlı Faktörler	40

2.5.3. Çevreye Bağlı Faktörler.....	41
2.6. NANOTEKNOLOJİ VE DEZENFEKSİYON	42
2.7. NANOTEKNOLOJİK DEZENFEKTANLAR.....	51
2.7.1. Gümüş Sülfadiazin	51
2.7.2. Benzalkonyum Klorür	56
2.8. ALAMAR BLUE BOYAMA YÖNTEMİ.....	60
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	62
3.1. BAKTERİ SUŞLARI.....	62
3.2. DEZENFEKTANLAR.....	62
3.3. BESİYERLERİ VE MALZEMELER	62
3.3.1. Nutrient Agar	62
3.3.2. Nutrient Broth	62
3.3.3. Nötralizan Çözeltiler	63
3.3.4. Fizyolojik Tuzlu Su	63
3.3.5. Alamar Blue Boyası	63
3.3.6. 5-Cyano-2, 3-ditolyt tetrazolium chloride (CTC)	63
3.3.7. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	63
3.3.8. pH Çözeltilerinin Hazırlanışı	64
3.3.8.1. 1 M KOH Çözeltisi.....	64
3.3.8.2. 5 M KOH Çözeltisi.....	64
3.3.8.3. 1 M HCl Çözeltisi	64
3.3.8.4. 5 M HCl Çözeltisi	64
3.3.9. % 3 Tuz Çözeltisinin Hazırlanışı	64
3.4. BAKTERİ VE BİYOSİT SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI.....	64
3.4.1. Deneylerde Kullanılan İnokulumların Hazırlanması	64
3.4.2. Bakteri Biyofilmlerinin Hazırlanması	65
3.4.3. Biyosit Çözeltilerinin Hazırlanması	65
3.5. VALİDASYON TESTLERİ	66
3.5.1. Nötralizan Etkinlik Testi.....	66
3.5.2. Nötralizan Toksisite Testi.....	67
3.5.3. Validasyon Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi	67
3.6.DEZENFEKTANLARIN MİNİMUM BAKTERİSİDAL KONSANTRASYON (MBK) DEĞERLERİNİN SAPTANMASI	68
3.6.1. Süspansiyon Haldeki Bakterilere Karşı MBK Değerlerinin Saptanması	68
3.6.2. Biyofilmdeki Bakterilere Karşı MBK Değerlerinin Saptanması	69

3.6.3. Alamar Blue Boyama Yöntemi	70
3.7. DEZENFEKTANLARIN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA BİYOFİLME KARŞI ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI	71
3.7.1. Bakteriyolojik Analiz	71
3.7.2. Parametrelerin Uygulanması.....	72
3.7.2.1. <i>pH Uygulaması</i>	72
3.7.2.2. <i>Sıcaklık Uygulaması</i>	72
3.7.2.3. <i>Ozmotik Şok Uygulaması</i>	72
3.7.2.4. <i>Çamaşır Suyu Uygulaması</i>	73
3.7.3. Alamar Blue Boyama Yöntemi	73
3.7.4. Epifloresan Mikroskopta Ölü/ Canlı Bakteri İnceleme	73
3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	74
4. BULGULAR.....	75
4.1. NÖTRALİZANLARIN VALİDASYON TESTLERİNE AİT BULGULAR	75
4.2. DEZENFEKTANLARIN MBK DEĞERLERİNİN SAPTANMASINA AİT BULGULAR	78
4.2.1. Gümüş Sülfadiazinin Süspansiyon ve Biyofilm Halindeki Bakteri Suşlarına Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular.....	78
4.2.2. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları.....	79
4.2.3. Benzalkonyum Klorürün Süspansiyon ve Biyofilm Halindeki Bakteri Suşlarına Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular.....	83
4.2.4. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları.....	84
4.3. GÜMÜŞ SÜLFADİAZİNİN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA ETKİNLİĞİNE AİT BULGULAR.....	88
4.3.1. Gümüş Sülfadiazinin Farklı Koşullardaki Fiziksel Değişimi	88
4.3.2. Bakteriyolojik Analiz Sonuçları.....	89
4.3.3. Epifloresan Mikroskop Sonuçları.....	92
4.3.4. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları.....	99
4.4. BENZALKONYUM KLORÜRÜN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA ETKİNLİĞİNE AİT BULGULAR.....	102
4.4.1. Benzalkonyum Klorürün Farklı Koşullardaki Fiziksel Değişimi	102
4.4.2. Bakteriyolojik Analiz Sonuçları.....	103
4.4.3. Epifloresan Mikroskop Sonuçları.....	107
4.4.4. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları.....	113
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	116
KAYNAKLAR.....	137

EKLER.....	157
EK 1: BAKTERİYOLOJİK ANALİZ SONUÇLARININ İSTATİSTİKSEL ANALİZİ.....	157
EK 2: ALAMAR BLUE BOYAMA YÖNTEMİ SONUÇLARININ İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	162
ÖZGEÇMİŞ	168

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Planktonik hücreden biyofilm gelişimi aşamaları.....	18
Şekil 2.2: Biyofilm oluşumu ve döngüsünün şematik görünümü.....	20
Şekil 2.3: <i>S. aureus</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	30
Şekil 2.4: <i>P. aeruginosa</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü	33
Şekil 2.5: <i>E. coli</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	35
Şekil 2.6: <i>K. pneumoniae</i> kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü.....	37
Şekil 2.7: Kuaterner amonyum bileşiklerinin genel yapısı ve benzalkonyum klorürün kimyasal formülü	57
Şekil 3.1: Etanolün bulunduğu gümüş sülfadiazinin ve saf gümüş sülfadiazinin distile su ile sulandırılmasıyla oluşan karışım	66
Şekil 4.1: Gümüş sülfadiazinin (AgS) nötralizan ile etkileşimi sonucu fiziksel değişimi	76
Şekil 4.2: Benzalkonyum klorürün (BK) nötralizan ile etkileşimi sonucu fiziksel değişimi	76
Şekil 4.3: Gümüş sülfadiazinin <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> suşlarının süspansiyon haline karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri	80
Şekil 4.4: Gümüş sülfadiazinin <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri	81
Şekil 4.5: Gümüş sülfadiazinin <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri	82
Şekil 4.6: Benzalkonyum klorürün <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> suşlarının süspansiyon haline karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri.....	85
Şekil 4.7: Benzalkonyum klorürün <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri	86

Şekil 4.8: Benzalkonyum klorürün <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri	87
Şekil 4.9: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin fiziksel değişimi	88
Şekil 4.10: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin <i>S. aureus</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	90
Şekil 4.11: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin <i>P. aeruginosa</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	91
Şekil 4.12: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin <i>E. coli</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.....	91
Şekil 4.13: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin <i>K. pneumoniae</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	92
Şekil 4.14: Farklı koşullara maruz kalmış dezenfektanların bakteri biyofilmleri ile 24 saat etkileşiminin ardından DAPI - CTC floresan boya ile boyanmış epifloresan mikroskop görüntüleri	98
Şekil 4.15: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı <i>S. aureus</i> biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi	100
Şekil 4.16: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı <i>P. aeruginosa</i> biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi	100
Şekil 4.17: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı <i>E. coli</i> biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi	101
Şekil 4.18: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı <i>K. pneumoniae</i> biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi	101
Şekil 4.19: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün fiziksel değişimi	102
Şekil 4.20: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün <i>S. aureus</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	105
Şekil 4.21: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün <i>P. aeruginosa</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	105
Şekil 4.22: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün <i>E. coli</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	106
Şekil 4.23: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün <i>K. pneumoniae</i> biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi	106
Şekil 4.24: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı <i>S. aureus</i> biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi	114

- Şekil 4.25:** Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *P. aeruginosa* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi 114
- Şekil 4.26:** Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *E. coli* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi 115
- Şekil 4.27:** Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *K. pneumoniae* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi 115

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Hücre yapışması ve biyofilm oluşumunda etkili faktörler	17
Tablo 2.2: Mikroorganizmaların dezenfektana karşı direnç sıralaması.....	38
Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda nötralizan madde içeren çözeltilerin bakteri suşları ile elde edilen nötralizan validasyon testi sonuçları.....	77
Tablo 4.2: Gümüş sülfadiazinin farklı temas sürelerinde süspansiyon ve biyofilm halindeki bakteri suşlarına karşı saptanan MBK değerleri (µl/ml)	79
Tablo 4.3: Benzalkonyum klorürün farklı temas sürelerinde planktonik ve biyofilm halindeki bakteri suşlarına karşı saptanan MBK değerleri (µl/ml)	84
Tablo 4.4: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazin farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>S.aureus</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı	94
Tablo 4.5: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazin farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>P. aeruginosa</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı	95
Tablo 4.6: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>E. coli</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı	96
Tablo 4.7: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>K. pneumoniae</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı	97
Tablo 4.8: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>S.aureus</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı	109
Tablo 4.9: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>P. aeruginosa</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.....	110
Tablo 4.10: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>E. coli</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı	111
Tablo 4.11: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından <i>K. pneumoniae</i> biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.....	112

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NANOTEKNOLOJİK DEZENFEKTANLARIN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Beyza Nur BAY

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. İrfan TÜRETGEN

Hızlı gelişim gösteren nanoteknoloji, bilim ve teknoloji uygulamalarının birlikte kullanılması ile nano düzeyde yeni ürünler oluşturulmasını sağlamıştır. Nanopartiküller farklı endüstriyel ürünlerin üretimlerinde kullanılmalarının yanı sıra bilimsel alanlarda da çeşitli faydalar sağlamaktadırlar. Özellikle antimikrobiyal özellikteki nanopartiküller kullanarak endüstriyel açıdan zarar veren ve sağlık sorunlarına yol açan mikroorganizmalara karşı kullanılan dezenfektanların üretimi artmaktadır. Çok uzun yıllardır dezenfektan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşiklerinden olan benzalkonyum ve gümüş sülfadiazinin bakterilere, bazı virüslere, mantarlara ve protozoonlara karşı bakteriyostatik ve bakterisidal etki gösterdiği bilinmektedir. Bu dezenfektanlar endüstri ve sağlık alanlarında mikroorganizma ile kontamine olmuş tüm yüzeylerde kullanılmaktadır. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bakteriler klinik ve endüstriyel açıdan önemli olup ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Planktonik hücreler bu durumdan kolay etkilenebilmelerine rağmen kendini koruma altına alan biyofilm içindeki bakteriler bu dezenfektanlara karşı mücadele edebilmektedirler. Mikroorganizmaya bağlı faktörler dezenfeksiyona etki ettiği gibi dezenfektanın tipi, kullanım konsantrasyonu, temas süresi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, ortamdaki organik madde varlığı gibi faktörler de dezenfeksiyon işlemine etki etmektedir.

Bu çalışmanın amacı nanoteknolojik ürün olan gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum dezenfektanlarının planktonik ve biyofilm halindeki bu bakterilere etki ettiği minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerini tespit edip etki ettiği süreler ve şartları incelemektir. Ayrıca bu dezenfektanların farklı pH, sıcaklık, osmotik basınç ve çamaşır suyu gibi farklı fiziksel ve kimyasal koşullar altındaki etkinliğini klasik mikrobiyolojik kültür yöntemi, alamar blue boyama yöntemi ve DAPI-CTC floresan boyama yöntemi kullanılarak araştırmaktır.

Çalışma sonucunda elde edilen MBK değerlerine göre, dezenfektanların içerisinde bulunan aktif madde konsantrasyonları benzalkonyum klorür için $> \% 0.1$, gümüş sülfadiazin için $\geq \% 2$ olmalıdır. Ayrıca bulgular, benzalkonyum klorürün gümüş sülfadiazine göre daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğunu ve farklı koşullardan daha az etkinlendiği göstermektedir. Çalışmanın sonuçları üretici firma tarafından nano düzeyde gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür dezenfektanları üretmek için ve endüstride, klinik alanda kullanım alanı bulabilmesi için değerlendirilecektir.

Mayıs, 2015, 181 Sayfa.

Anahtar kelimeler: Dezenfeksiyon, nanoteknoloji, benzalkonyum klorür, gümüş sülfadiazin, biyofilm.

SUMMARY

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION THE EFFICACY OF NANOTECHNOLOGICAL DISINFECTANTS IN DIFFERENT PHYSICAL AND CHEMICAL CONDITIONS

Beyza Nur BAY

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. İrfan TÜRETGEN

Rapid development showing nanotechnology has provided creation of new products in nano size with usage in science and technology applications. Nanoparticles provide benefits on different scientific fields as well as using them in production of industrial products. Especially, production of disinfectants using antimicrobial properties of nanoparticles increases against microorganisms that are harmful in industry and lead to health problems. Silver sulfadiazine and the benzalkonium which are examples of the quaternary ammonium compounds, has been used for a long time as a disinfectant, have been known that they show bacteriostatic and bacteriocidal effect on bacteria, some viruses, fungus and protozoa according to the concentration. This disinfectants are used some areas like medicine, industry and all surfaces contaminated with microorganisms. Some bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are clinically and industrially harmful. In addition, these bacteria can cause economic problems with their biofilm structure. Indefensible planktonic cells are affected by this circumstance very easily. The self-protected bacteria which are in biofilm structure continue the fight against the disinfectant. Physical and chemical factors like type of disinfectants, concentration, contact time, pH, temperature, presence of organic material and target object affect disinfection process, as well as microbial factors.

The aim of the recent study is to examine minimum bactericidal concentration (MBC) values of nanotechnological silver sulfadiazine and benzalkonium chloride against planktonic and biofilm forms of these bacteria, to examine time, concentration and

conditions of disinfectants and efficacy of these nanotechnological disinfectants under different physical and chemical conditions like different pH, temperature and osmotic pressure of environment and bleach using classic microbiological culture, alamar blue dyeing and fluorescent staining methods.

According to the MBC values obtained in this study shows that benzalkonium chloride must be used $> 0.1\%$ concentration, silver sulfadiazine must be used $\geq 2\%$ concentration for disinfection. Also benzalkonium chloride is more effective than silver sulfadiazine at lower concentrations and is less affected by different conditions. Results of this study will be evaluated by a local chemical company for producing silver sulfadiazine and benzalkonium chloride disinfectants which are immobilized to nano particles and will be marketed to industrial and clinical field.

May, 2015, 181 Pages.

Keywords: Disinfections, nanotechnology, benzalkonium chloride, silver sulfadiazine, biofilm.

1. GİRİŞ

Dezenfeksiyon, mikrobiyal kontaminasyon sonrası olası bir enfeksiyonu engellemek için cansız nesneler üzerinde bulunan, potansiyel olarak patojen mikroorganizmaları yok eden veya üremesini durduran, genellikle endosporları etkilemeyen, hastanelerde sıklıkla dezenfektan adı verilen kimyasal maddelerle, bazen de mekanik temizlik ve sıcaklık uygulamaları ile gerçekleştirilen bir yöntemdir (Gürler, 2003).

Bakteri kontaminasyonunu kontrol etmenin başlıca yollarından biri etkili bir dezenfeksiyon işleminin yapılmasıdır. Antibakteriyel madde üreten firmalar endüstriyel sistemlerin dekontaminasyonu için çeşitli biyositler ve konsantrasyonlar önermektedir. Fakat üreticiler tarafından önerilen bu konsantrasyonlar her sistem ve hedef mikroorganizma için her zaman uygun olmayabilir (Kimiran-Erdem ve diğ., 2007; Şanlı-Yürüdü ve diğ., 2007). Ayrıca uygulanan geleneksel dezenfektan aktivite testleri ile planktonik bakterilere karşı minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) belirlenirken, biyofilmlere karşı olan belirlenememektedir. Örneğin; klinik ve endüstriyel alanlarda istenmeyen bu bakterilerin ortadan kaldırılması için iyot, iodinopolivinil-pirollidon kompleksi, klor, monokloramin, peroksijenler ve glutaraldehit gibi birçok antimikrobiyal maddeler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla en çok kullanılan dezenfektanlar arasında klorlu bileşikler, özellikle sodyum hipoklorit (NaOCl) yer alır (Hallam ve diğ., 2001). Genellikle % 1-5 konsantrasyonlarda kullanılan NaOCl planktonik bakterilere karşı etkiliyken biyofilm tabakasına etki göstermemektedir. Bu biyositler planktonik hücreler üzerine güçlü bir etki gösterirken biyofilm tabakalarına ulaşamamakta ve bakteriler bunlara karşı direnç oluşturmaktadır. Bu nedenle bakterilerin planktonik hallerine ek olarak biyofilm tabakasına da düşük konsantrasyonlarda bakterisidal etki gösteren dezenfektanların üretimi oldukça önemlidir (Marsik ve Denys, 1995).

Biyofilm genel olarak, yüzeye tutunmuş mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır. Biyofilmler, meydana getirdikleri toplumsal sağlık problemlerine ek olarak, endüstriyel açıdan da zararlı olup ekonomik yönden kayıplara sebep olmaktadır.

Endüstride meydana gelen biyofilmler, verimlilikte önemli kayıplara, süreçlerin aksamasına, ekipmanda zararlara neden olmakla beraber sistemin suyunda bulanıklığa, koku, tat ve renk değişimlerine, borularda ve ekipmanda biyolojik açıdan bozunmalara da sebebiyet vermektedir. Tüm bunlarla birlikte sistemden sıvı geçişine karşı direnç gelişimine, biyofiltrelerin tıkanmasına ve metal yüzeylerde korozyona da neden olmaktadır. Gıda üretim işlemlerinde meydana gelen kontaminasyon, gıdanın temas ettiği yüzeyde biyofilm oluşumu gibi sonuçlara neden olmaktadır. Gemi gövdelerinde oluşan biyofilmden dolayı da, deniz taşımacılığında önemli enerji kayıpları meydana gelmektedir. Ekonomik olarak, biyofilm kaynaklı kayıplar dünya çapında yıllık milyar dolarlara ulaşmaktadır (Hallam ve diğ., 2001; Gilbert ve diğ., 2003; Zhang ve Bishop, 2003).

Biyofilmi oluşturan her mikroorganizma tek başına bulunduğu, herhangi bir antimikrobiyal ajanla kolayca inhibe olmasına rağmen biyofilm yapısı içinde yer aldığı zaman aynı mikrobiyal ajanla inhibe etmek oldukça zordur (Durack ve Beeson, 1972). Biyofilm oluştuğu zaman onu yüzeyden ayırmak son derece güçtür ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir (Ataol, 2011). Biyofilmin doğal yapısı ve biyofilm içindeki mikroorganizmalar antibiyotik, dezenfektan ve germisid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı direnç göstermektedir. Ayrıca laboratuvar koşullarında (*in vitro*) yapılan testlerde biyofilm bakterilerinin, serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIK) birkaç yüz veya bin kez fazla biyosit konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri bulunmuştur (Stewart ve Costerton, 2001).

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* çevremizde sıkça bulunan, insanlarda enfeksiyona neden olan ve klinik önemi bulunan bakterilerdir. Bu bakteriler insanlarda genellikle solunum yolu enfeksiyonları, gastroenterik enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Ünal, 2011; Çelik, 2009; Erdem, 1999; Bayhün, 2008; Kuba, 2012; Baştürk, 2005)

Micrococcaceae ailesinde yer alan *Staphylococcus* cinsinin bir üyesi olan *Staphylococcus aureus*, sporsuz ve hareketsiz kok formunda, Gram pozitif ve katalaz pozitif özelliktedir. Fakültatif anaerop gelişim gösterir ve mezofil karakterlidir. İnsanlarda menenjit, sepsis ve iltihaplı yaralara neden olmakta, ayrıca eklem

romatizmalarına da katılmaktadır. Diğer taraftan *S. aureus* suşlarının birçoğu doku toksinlerinin dışında yüksek toksititeli ve bağırsaklarda etkili olan enterotoksinleri oluşturarak intoksikasyonlara da neden olmaktadır (www.belgeler.com).

Pseudomonas aeruginosa çevre kaynaklı bir mikroorganizma olup suda, toprakta ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Doğada yaygın bir şekilde bulunabilen bu bakteriye potansiyel patojen özelliğini veren başlıca niteliklerinden biri ise üreme şeklidir. *P. aeruginosa* akuatik ortamlarda planktonik bir şekilde üreyebildiği gibi biyofilm denilen, bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit matriksin içinde mikrokoloniler halinde de üreyebilmekte, uygun laboratuvar koşulları altında ise birkaç yüz mikrometre kalınlığa kadar ulaşabilen karakteristik biyofilmler oluşturabilmektedir (Shen ve diğ., 2001).

P.aeruginosa'nın dezenfektanlar dahil olmak üzere sulu ortamlarda sahip olduğu bu kolay üreme yeteneği, hastanelerde tıbbi girişimler için kullanılan gereçlerin kontamine olmasına ve bunun sonucunda ciddi hastane enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Sauer ve diğ., 2002). Ancak sadece hastane enfeksiyonlarına değil, hastane dışındaki sağlıklı kişilerde yüzme havuzu, jakuzi ve kontakt lens kullanımına bağlı enfeksiyonların ortaya çıkmasına da sebep olabilmektedir (Moore ve Flaws, 2011). Kontaminasyon kaynağı olmasının dışında, biyofilmlerin neden olduğu biyolojik kirlilikler mühendislik sistemlerine de zarar verebilmekte; endüstrinin her alanında, suyun girdiği her sistemde biyofilm varlığı paslanmayı hızlandırmakta, borulardaki basıncı arttırmakta veya sıcaklığın gerektiği şekilde iletilmesini önleyerek sistemin verimini düşürebilmektedir. Ayrıca binaların soğutma kulelerinde veya içme suyunu besleyen borularda biyofilmlerin bulunması, suyun kontamine olmasına ve halk sağlığı açısından ciddi risk teşkil etmesine neden olabilmektedir (Yoder ve diğ., 2008)

Koli basili olarak da bilinen, Gram (-) *Escherichia coli*, memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan faydalı bakteri türlerinden biridir. Bağırsak florasının normal bir üyesi olan *E. coli* ile konak organizma arasında uyumlu bir ilişki olduğundan bakteri normalde hastalık yapmaz. Ancak, farklı bir ortama geçmesi halinde (aynı organizmada başka bir organ veya başka bir konak organizmanın bağırsağı olabilir) *E. coli* bir hastalık etmeni olabilir. Bazı *E. coli* tipleri içinde bulundukları hayvan için zararsız olmalarına rağmen insana geçtiklerinde hastalık yapabilirler. Bu hastalıklar arasında

başlıca ishalli hastalıklar olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, mastit, sepsis ve Gram (-) pnömoni de sayılabilir.

K. pneumoniae bakterileri; üriner sistem enfeksiyonları, üst solunum yolu enfeksiyonları ve hastane enfeksiyonlarının önemli bir ajanıdır. *Klebsiella* cinsi bakteriler, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü, Gram (-) ve Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini gösteren çomaklardır (Bilgehan, 2000). *Klebsiella pneumoniae*, insan sağlığı açısından çok önemli olan nosokomial enfeksiyonlar, üst solunum yolu enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları oluşmasında rol alan fırsatçı patojenlerdir (Shen ve diğ., 2001). Kısacası klinik açıdan önemli olan *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterileri cam, tahta, PVC, boyalı metal, laminant gibi çeşitli yüzeylerde ve su sistemlerinde sıkça bulunan ve biyofilm oluşturarak insanlarda enfeksiyona neden olan bakterilerdir (Kuba, 2012; Ünal, 2011; Ataol, 2011; Demirhisar, 2010; Gün ve Ekinci, 2009)

Son yıllarda gelişmekte olan teknoloji, hayatımıza nano adı altında yeni bir terim kazandırmıştır. Hızlı gelişim gösteren bir alan olarak ortaya çıkan nanoteknoloji, bilim ve teknoloji uygulamalarının birlikte kullanılması ile nano düzeyde yeni ürünler oluşturulmasını sağlamıştır. Boyut olarak 10-100 nanometre aralığında yer alan bu ürünler “nano teknolojik ürün” olarak isimlendirilmektedirler. Nanoteknolojide kullanılan nano yapıları materyallerin kimyasal sentezlerinin ve proseslerinin kapsamı çok geniş olup optik, elektronik, manyetik, biyolojik, katalitik ve biyomedikal materyeller gibi birçok uygulama alanına sahiptir (Koch, 2000).

Nanopartiküller farklı endüstriyel ürünlerin üretimlerinde kullanılmalarının yanı sıra bilimsel alanlarda da çeşitli faydalar sağlamaktadırlar. Özellikle çeşitli kimyasallardan hazırlanan nano partiküller pek çok ürüne eklenerek ona yeni özellikler kazandırmaktadır. Örneğin üretilen objenin yapısına eklenen antimikrobiyal özellikteki nanopartiküller, meydana getirilen ürünlerin bakteriyel açıdan sağlıklı olmasını sağlamaktadır. Ayrıca çeşitli kimyasallardan hazırlanan nano partiküller ile yüzeye direk olarak uygulanan nano dezenfektanların üretilmesiyle antimikrobiyal yüzeyler oluşturulmaktadır (Baker, 2005; Kim ve diğ., 2008; Keskin, 2011; Bulut, 2007; Shahverdi ve Fakhimi, 2007).

Bu dezenfektanlar fabrikalar, konutlar, hayvanların temas ettiği yerler, otel ve pansiyonlar, eğitim kurumları, alışveriş merkezleri, toplu taşıma araçları, sinema ve tiyatro salonları, restoran ya da lokantalar, çocuk oyun mekanları gibi kalabalık mekanlarda, gıda üretimi ve sağlık hizmeti veren tüm alanlarda, mikroorganizma ile kontamine olmuş tüm yüzeylerde kullanılmaktadır (Açık ve Güven, 2012).

Nanoteknoloji ürünü dezenfektanlarda, nanopartiküllerin kullanılmasıyla klasik malzeme üretiminde kullanılan ve pek çok yan etkisi bulunan, çevreye zarar verebilen kimyasalların kullanımı da engellenmekte ve böylece çevre dostu dezenfektanların üretimi ve tüketimi mümkün olabilmektedir. Nanoteknolojik dezenfektanlar yağ ve kiri kısa sürede giderebilecek enzim ve benzeri kimyasalları-biyokimyasalları klasik malzemelerden daha az kullanmakta ve sahip olduğu çeşitli nanopartiküller ile antibakteriyel özellik göstermektedir (Şam ve Denkbaş, 2010).

Bu çalışmada kullanılan nano dezenfektanlardan ilki olan benzalkonyum klorür bir kuaterner amonyum bileşiğidir. Kuaterner amonyum bileşikler dezenfektan amacıyla kullanılan katyonik biyositlerdir ve en az bir büyük hidrofobik kısım ile ilişkili bir kuaterner nitrojen içeren amfoterik yüzey aktif maddelerdir. Kuaterner amonyum bileşikler bakterilere, bazı virüslere, mantarlara ve protozoonlara karşı konsantrasyona bağlı olarak bakteriyostatik ve bakterisidal etki gösterir ve bu bileşikler bakteri gelişiminin kontrolünde klinik ve endüstriyel alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bakteriler ile mücadelede yapısal bütünlüğü bozmadan etkili sonuçlar elde edilmektedir (Fazlara ve Ekhtelat, 2012). Düşük düzeyde dezenfeksiyon için suda % 0.1 - 0.2 oranında kuaterner amonyum bileşikler genellikle 10 dakikalık temas süresi ile kullanılabilir (Töreci, 1990).

Kuaterner amonyum bileşikler hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahiptir. Böylece bakteri ile iyonik ve hidrofobik etkileşimler meydana getirebilmektedirler. Materyalin, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin hücre duvarlarındaki fosfat gruplarına ve membran lipopolisakkaritlerine (LPS) katyonik bağlanma yoluyla etki gösterdiği düşünülmektedir (Fazlara ve Ekhtelat, 2012).

Kuaterner amonyum bileşikleri, benzalkonyum klorür, setalkonyum klorür, setilprimidinyum klorür, miristalkonyum klorür ve polisiti kapsamaktadır. Bu ajanlar geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteleriyle birçok bakteriyel biyofilme karşı etkili olmaktadır (Harrison ve diğ., 2008). Özellikle benzalkonyum klorür gıda endüstrisinde, klinik dezenfeksiyonda katyonik yüzey aktif ajanı ve dezenfektan olarak yaygın kullanılan kuaterner amonyum bileşiklerinden biridir. Benzalkonyum klorür alkildimetilen ile benzil klorürün nukleofilik reaksiyonunun ürünüdür. Dezenfektan amaçlı benzalkonyum klorür toksik değildir, kusursuz, kokusuz ve iyonik olmayan, amfolitik, katyonik yüzey aktif maddeleri ile uyumludur (Fazlara ve Ekhtelat, 2012).

Benzalkonyum klorür, düşük konsantrasyonda dış membran hasarı ile sitoplazmik materyalde sitolitik sızıntıya neden olarak, genel membran geçirgenliğinin bozulmasında rol oynamaktadır. Yüksek konsantrasyonda ise karboksilik grupları hedef alır ve bakteri sitoplazmasında genel pıhtılaşmaya neden olmaktadır. Bakteri hücrelerinin dış yüzeyi genellikle iki değerlikli katyonların varlığı ile stabilize edilen net bir negatif yük taşır. Bu Gram (+) bakterilerin sahip olduğu teikoik asit ve polisakkarit elementleri ile Gram (-) bakterilerin lipopolisakkarit yapısı ve sitoplazmik membranları ile ilişkilidir. Birçok antimikrobiyal ajan katyoniktir ve bakteri hücreleri için yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Benzalkonyum hidrofobik özelliği, sürfaktan yetenekleri ve pozitif yükü, penetrasyon ve porlu yüzeye yapışmaları için yüksek kapasite sağlar (Fazlara ve Ekhtelat, 2012).

Daha önce yapılmış benzer çalışmalarda, benzalkonyum klorürün, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Dinç, 2012). Fazlara ve Ekhtelat (2012), yapmış oldukları çalışmada planktonik haldeki *S. aureus* ve *E. coli* bakterileri için benzalkonyum klorürün minimum inhibitör konsantrasyonun (MIK) 40 mg/L, minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) 45 mg/L, *P. aeruginosa* için ise MIK değerinin 60 mg/L ve MBK değerinin 80 mg/L olduğu belirtmişlerdir.

Kuda ve diğ. (2008), paslanmaz çelik yüzeye yapıştırılmış *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* hücrelerinin benzalkonyum klorüre karşı direncini incelemiş ve *E. coli* ve *S.*

aureus 'un 10 dakikada 0.5 mg/ml konsantrasyonla 2 ile 6 log CFU/plak düştüğünü, *P. aeruginosa* 'nın 2.0 mg/ml konsantrasyonda inaktive olduğunu göstermiştir.

Berker (1989)'in yaptığı bir çalışmaya göre, % 0.05'lik konsantrasyondaki kuarterner amonyum bileşiğinin 2.5 dakika içinde serbest haldeki *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Bacillus subtilis*'e karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Yüksek ve diğ., 2001).

Erbay ve diğ. (2002), benzalkonyum klorürün % 1'lik solüsyonu, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarına karşı 5. ve 20. dakikalarda % 100 , *P. aeruginosa* suşlarına karşı 1. dakikada % 40, 5. dakikada % 80 etkin olduğunu gözlemiştir (Özsoy ve diğ., 2001)

Mataracı (2010), benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında saptanan MBK değerinin uygulanan her temas süresi için 16 µg/ml olduğunu belirlemiştir.

Ohta ve diğ. (2001), katyonik dezenfektanların çeşitli bakteriler üzerinde MBK değerlerini araştırmış oldukları çalışmalarında, klinik materyalden izole etmiş oldukları *P. aeruginosa* ve *E. coli* suşlarına karşı benzalkonyum klorürün MBK değerlerini 3, 5, 10, 30, 60 ve 120 dakikalık temas süresinin sonunda 16 µg/ml olarak belirlemişlerdir.

Deneyde kullandığımız nanoteknolojik dezenfektanlardan diğeri ise gümüşün türevlerinden biri olan gümüş sülfadiazindir. Nanoteknolojinin gelişimi, organik ve inorganik nanokompozitlerle birleşmiş antibakteriyel aktiviteli polimerlerin değerli özelliklerinin formasyonu yoluyla gümüşün kullanımı için yeni bir fırsat ortaya çıkarmıştır (Özaslan, 2009). Gümüş nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki gösterdikleri, antibakteriyel özelliklerin nanopartiküllerin yüzey alanı ile ilişkili olduğu, partikül boyutunun küçülmesinin dolayısıyla yüzey alanının artışının antibakteriyel aktivite için daha fazla etki sağladığı belirlenmiştir (Baker ve diğ., 2005)

Gümüş sülfadiazin, sülfadiazinin antibakteriyel etkisi ile gümüşün oligodinamik etkisinin birleşimi ile hazırlanmaktadır. Su bazlı kremlerin içinde % 1 oranında bulunmaktadır. Yanık ve yara enfeksiyonlarının tedavisi için ve bu enfeksiyonları

önlemek için geniş spektrumlu antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır. Yara ile etkileşime girerek, yarada gümüş rezervi olarak gümüş iyonları yayma işlevi görür. Bütün sülf grubu ilaçlar gümüş ile kombine edilerek test edilmiş ve gümüş sülfadiazinin içlerinde en etkili olduğu görülmüştür (Atiyeh ve diğ., 2007). Gümüş sülfadiazin bakterilerin çoğuna karşı etkili bir ajandır. Kimyasal etkisini hücre membranına bağlanıp matriks metalloproteinazlarını inhibe ederek göstermektedir (Mataracı ve Gerçeker, 2011; Carr ve Rosenkranz, 1972; Warriner ve Burrell, 2005).

Carr ve Rosenkranz, gümüş sülfadiazinin bakterilerin hücre membranına bağlandığını ve membrana zarar verdiğini belirtmiştir (Carr ve Rosenkranz, 1972). Charles ve diğ. (1974), gümüş sülfadiazinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için kısmen inhibisyon konsantrasyonu 5 $\mu\text{mol/ml}$ ve en etkili olduğu inhibisyon konsantrasyonu 15 $\mu\text{mol/ml}$ olduğu belirtmiştir. Nano gümüş ile ilgili birçok araştırma olmasına rağmen gümüş sülfadiazin ile yapılan araştırmalar sınırlı kalmıştır.

Endüstriyel sistemlerde biyosit uygulanmadan önce, antibakteriyel ajanın laboratuvar koşullarında hem planktonik hem de biyofilmdeki bakterilere karşı aktivitesinin belirlenmesi gereklidir (Yamamoto ve diğ., 1991; Elsmore, 1993). Dezenfektanların minimum bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan standart yöntemler genellikle dezenfektanların süspansiyon halindeki planktonik mikro-organizmalara karşı olan etkisini araştırmaktadır. Ancak bu deneylerle elde edilen sonuçlar dezenfektanların bakterinin biyofilm içinde bulunan şekline olan etkisi konusunda bilgi verememektedir. Oysa, sağlık veya endüstri alanında önem taşıyan bakteriler genellikle biyo filmlerin içinde bulunmakta ve geleneksel dezenfektan aktivite testleri ile bunlara karşı olan etkinlik belirlenmemektedir (Harrison ve diğ., 2001). Bu nedenle kullanılan dezenfektan maddelerin biyofilm tabakası içerisine girişi önemlidir. Gümüş iyonlarının ve kuaterner amonyum bileşiği olan benzalkonyum klorürün biyofilm tabakasına ulaşabildiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Cabo ve diğ., 2009; Fabrage ve diğ., 2009; Kim ve diğ., 2008; Soumitra ve diğ., 2012). Bu nedenle hastane ve endüstrinin çeşitli alanlarında yüzey ve ekipman dezenfeksiyonunda sık kullanılan dezenfektan olan benzalkonyum klorür ve başta yanık enfeksiyonlarında olmak üzere çeşitli ilaçlarda kullanılan gümüş sülfadiazinin *S.aureus*, *E.coli*, *K. pneumoniae* ve *P.aeruginosa* 'nın, süspansiyon içinde serbest halde bulunan planktonik kültürünün yanı

sıra, katı yüzey üzerinde oluşturduğu statik biyofilm kültürüne karşı minimum bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi önemlidir.

Bakterilerin planktonik ve biyofilm haline etki eden minimum bakterisidal konsantrasyonun bilinmesi, dezenfeksiyonun tam olarak yapıldığını göstermemektedir. Konsantrasyonun yanında enfeksiyon riskini azaltmak için ve dezenfektan uygulamasının doğru yapılabilmesi için dezenfeksiyonu etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi gerekir. Bunlar; temas süresi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, ortamda organik maddelerin varlığı ve miktarı, nesnenin yapısı, nisbi nem ve suyun sertliği ile mikroorganizmanın yapısı, miktarı, üreme periyodu gibi mikroorganizmaya bağlı faktörlerdir (Özyurt, 2000). Gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında bu dezenfektanların farklı fiziksel ve kimyasal koşullarda etkinliğine dair bir araştırma olmadığı görülmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, nanoteknolojik dezenfektan olan gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorürün, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerin biyofilm tabakasına ve planktonik formlarına etki ettiği minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri tespit edip etki ettiği süreler ve şartları incelemektir. Bu nanoteknolojik dezenfektanların kullanım konsantrasyonu, temas süresi, ortamın farklı pH'sı, sıcaklığı, osmotik basıncı ve çamaşır suyu gibi farklı fiziksel ve kimyasal faktörler karşısında nasıl bir değişim gösterdiğini klasik kültür yöntemi, alamar blue boyama ve DAPI-CTC epifloresan boyama yöntemi ile belirlemektir.

Çalışmanın sonucunda, dezenfektanların etkili olduğu minimum bakterisidal konsantrasyonları ve farklı koşullar altında etkinliğine dair elde edilen sonuçlar doğrultusunda üretici firma, üreteceği dezenfektanların konsantrasyonunu ve uygulama koşullarını daha net bilecek ve üretim bu sonuçlara göre yapılacaktır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. DEZENFEKSİYON

2.1.1. Dezenfeksiyon Tanımı

Dezenfeksiyon, mikrobiyal kontaminasyon sonrası olası bir enfeksiyonu engellemek için cansız nesneler üzerinde bulunan, potansiyel olarak patojen mikroorganizmaları yok eden veya üremesini durduran, genellikle endosporları etkilemeyen, hastanelerde sıklıkla dezenfektan adı verilen kimyasal maddelerle, bazen de mekanik temizlik ve sıcaklık uygulamaları ile gerçekleştirilen bir yöntemdir. Dezenfektanlar teknik olarak 5 – 10 dakika arasındaki süre içinde patojen mikroorganizma sayısını % 99.99 oranında düşüren kimyasal maddeler şeklinde tarif edilir (Gürler, 2003). Germisit veya biyosit terimi de dezenfektanla aynı anlama gelmekle birlikte, germisit ve biyositler hem canlı dokuda hem de cansız nesnelerde kullanılabilirler. Dezenfeksiyonun amacı mikroorganizmaların hepsini öldürmek değil, onların ortamdaki miktarını sağlığa zarar vermeyecek bir seviyeye düşürmektir. Ancak dezenfektanlar uygun konsantrasyonda ve sürede kullanılırlarsa sterilizan da olabilirler. Yani ortamdaki tüm mikroorganizmaları öldürebilirler (Özyurt, 2000). Dezenfeksiyon çok geniş kapsamlıdır. Bir ortamdaki mikroorganizmaların azaltılmasından sterilizasyona kadar geniş bir spektruma sahiptir (Saniç, 2002; Dağlı, 2000).

Genellikle dezenfeksiyon için tercih edilecek kimyasal ajandan ideal bir dezenfektanın taşınması gerekli özelliklerin büyük kısmına sahip olması beklenir. Bu özellikler;

1. Antimikrobiyal spektrumunun geniş olması
2. Kısa sürede etki göstermesi
3. Geniş bir pH ve sıcaklık aralığında etkili olabilmesi
4. Organik artıkların (idrar, dışkı ve kan vs.) varlığında dahi etkinliğini göstermesi
5. Antimikrobiyal aktivite süresinin yeterli olması
6. Açık yaraya uygulandığında doğal direnci etkilememesi
7. Raf ömrü uzun olması

8. Minimum yoğunlukta amacına göre maksimum etkili olması
9. Ekonomik olması
10. Kullanımının kolay olması
11. Renksiz ve kokusuz olması
12. Stabil olması
13. Açık yaralara uygulandığında doğal direnç mekanizmalarını bozmaması
14. *In vivo* ve *in vitro* etki mekanizmalarının bilinmesi
15. Suda ve organik sıvılarda çözünebilmesi
16. İrritan olmaması, toksik etkisi bulunmaması
17. Sabun, deterjan ve diğer kimyasallarla karşılaştığında uyumlu olması
18. Alet ve metalik yüzeylere korozif; kumaş, kauçuk, plastik ve diğer materyallere zararlı etkisinin olmaması
19. Kullanılan yüzeylerde antimikrobiyal bir tabaka oluşturarak kalıcı etki göstermesi
20. Konsantre ve dilue formunun ışık, ısı ve diğer çevresel faktörlerin varlığında bile stabil kalabilmesi
21. Temizleyici özelliğe sahip olması
22. Doğal çevreye zarar vermemesi (Saraç, 20009; Zincidi, 2010)

2.1.2. Dezenfektan Çeşitleri

Dezenfektanlar etki seviyelerine göre üç farklı gruba ayrılırlar:

Yüksek Seviyeli Dezenfektanlar: Genellikle bakteriyel endosporlar hariç mikroorganizmaların tümünü 20 dakika veya daha uzun bir sürede öldüren maddelerdir. Bazı dezenfektanlar 6-10 saatte bakteriyel endosporları da öldürebilir. Gluteraldehit, formaldehit, hidrojen peroksit, sodyum hipoklorit, perasetik asit yüksek seviyeli dezenfektanlardır (Özyurt, 2000).

Orta Seviyeli Dezenfektanlar: Bakteri endosporları hariç, tüberküloz basili ve diğer mikroorganizmalara 10 dakika veya bunun altında bir sürede etki eden maddelerdir. Etil ve izopropil alkoller, fenoller, iyodoforlar bu gruba girer (Özyurt, 2000).

Düşük Seviyeli Dezenfektanlar: Bunlar bakteri endosporları ve tüberküloz basiline etki etmezler. Vejetatif bakterilerin çoğunu, bazı mantarları ve 10 dakikanın altında bir sürede bazı virüsleri öldürebilirler. Bu grupta; fenoller, iyodoforlar, dört değerli

amonyum bileşikleri, etil veya izopropil alkoller, sodyum hipoklorit bulunmaktadır (Özyurt, 2000).

Dezenfektanlar; hastanelerde ve diğer sağlık kuruluşlarında, veterinerlikte, hazır gıda sanayinde, kozmetik sanayinde yaygın olarak ve bazen de hatalı olarak kullanılmaktadır. Bunların yaygın kullanımı, antibiyotiklere karşı olan direnç gibi dezenfektanlara da direncin olup olmadığını gündeme getirmiş ve dezenfektan direnci konusu önem kazanmıştır (Öztürk, 2002; Özdemir, 2002).

2.1.3. Dezenfeksiyon Mekanizmaları

Dezenfektan maddelerin etkisi dört şekilde gerçekleşir. Bunlar;

- ❖ Hücre zarını tahrip etme
- ❖ Hücre proteinlerinin denatüre edilmesi
- ❖ Enzim aktivitesinin inhibisyonu
- ❖ Nükleik asit aktivitelerinin bozulması

1. Hücre zarına etkili dezenfektanlar: Hücre zarının mikroorganizmalar için önemi bilinmektedir. Yüzey aktif maddeler, fenoller ve organik çözücüler gibi dezenfektanlar hücre sitoplazma zarının yapısını değiştirerek hücrenin aktif transportunu ve enerji metabolizmasını bozarlar.

- Yüzey aktif dezenfektanlar: Bu maddeler iyonlaşma özelliklerine göre katyonik, anyonik ve noniyonik olmak üzere ayrılırlar. Katyonik dezenfektanlar grubunda örnek olarak benzalkonyum klorürü söyleyebiliriz. Anyonik grupta sabunlar ve yağ asitleri yer alır. Anyonik ve katyonik dezenfektanlar birlikte kullanılmazlar.
- Fenol ve fenol bileşikleri: Hücre zarını parçalayarak hücre yapısının dışarı çıkmasına neden olurlar. Fenollerin bir diğer etkisi de hücre proteinlerini denatüre etmektir. Fenolün yerini bugün daha az toksik olan alkil ve klor türevleri almıştır. Bu maddelerin dezenfektan etkileri hem daha fazla hem de insanlar için daha az toksiktirler. Fenolün alkil türevlerine örnek olarak krezol verilebilir.
- Organik çözücüler: Alkol, eter, kloroform bu gruba örnektir. Bu maddelerin içinde en çok alkol kullanılır. Alkolün en etkili konsantrasyonu % 70'dir. Alkol aynı zamanda proteinleri de denatüre eder. Ancak sporlu bakterilere etkileri yoktur. Dezenfeksiyon

amacıyla en çok kullanılan dezenfektanlardan biridir (Zincidi, 2010; Murray ve diğ., 1990; Çetin, 1982).

2. Hücre proteinlerini denatüre ederek etki gösteren dezenfektanlar: Proteinler, mikroorganizmaların işlevleri için gerekli organik moleküllerdir. Protein moleküllerinin normal işlevlerini görebilmeleri için uzayda uygun bir konumda bulunmaları gerekir. Proteinleri denatüre eden dezenfektanlar bu konumu değiştirerek proteinlerin rastgele şekil almalarına neden olurlar. Böylece bakterisid etki gösterirler. Asitler, alkaliler, alkoller, aseton ve diğer organik çözücü maddeler bu gruptaki dezenfektanlardır.

3. Mikroorganizma enzimlerinin işlevlerini bozarak etki gösteren dezenfektanlar:

- Ağır metal tuzları: Cıva, gümüş, bakır tuzları başlıcalarıdır. Bunların etkileri enzimlerin sülfidril grupları ile birleşerek ortaya çıkar. Cıva bileşikleri bugün önemli yan etkileri ve antiseptik olarak etkisinin azlığı nedeniyle pek kullanılmaz. Merthiolate ve mercurochrome deri dezenfektanı olarak kullanılır. Gümüş nitratın % 1'lik çözeltisi ise çeşitli amaçlarla özellikle yeni doğan bebeklerde göz antiseptiği olarak kullanılmaktadır (Murray ve diğ., 1990; Çetin, 1982; Zincidi, 2010).
- Okside edici maddeler: Hidrojen peroksit, potasyum permanganat, ozon, oksitleyici etkileriyle enzim aktivitesini bozarlar. Halojenlerden klor ve klor vericiler (sodyum hipoklorit, kloraminler), brom ve iyot bileşikleri kuvvetli oksitleyici etkileri olan dezenfektanlardır. Klor ve ozon, suların dezenfeksiyonunda kullanılır (Murray ve diğ., 1990; Çetin, 1982; Kangra ve Ceyhun, 1985; Samasti, 1987; Töreci, 1990).
- Alkileyici maddeler: bu grupta formalin, etilen oksit ve betapropiolakton yer alır. Formalin yüksek konsantrasyonda bütün mikroorganizmalar üzerine öldürücü etkilidir. Kadavra ve dokuların saklanması için kullanılır. Etilen oksit, polietilen araçların sterilizasyonunda kullanılır (Murray ve diğ., 1990; Kangra ve Ceyhun, 1985; Samasti, 1987; Töreci, 1990).

4. Nükleik asit üzerine etkili dezenfektanlar: Bu grupta çoğu mikrobiyolojide de kullanılan boyalar yer alır. Bu boyaların başlıcaları kristal viyole, malaşit yeşili, brilliant yeşili, fuksin, metilen mavisi ve akridindir. Bu boyalar nükleik asitlerle bileşikler yaparak, onların aktivitelerini bozmak suretiyle dezenfektan etki gösterirler. Metilen

mavisi, akridin boyaları mukozalar üzerine dezenfektan olarak kullanılır (Murray ve diğ., 1990; Çetin, 1982; Bilgehan, 1989; Zincidi, 2010; Kangra ve Ceyhun, 1985; Samasti, 1987; Töreci, 1990).

2.2. BİYOFİLM

2.2.1. Tarihçe

Biyofilm kavramı, ilk olarak 17. yüzyılda Antony van Leeuwenhoek'un basit mikroskobu kullanarak biyofilm yapısını diş plaklarında tespit etmesiyle ortaya çıkmıştır. Daha sonra mikrobiyal biyofilmlerin keşfi ile de bu tespitin doğru olduğu kanıtlanmıştır. Heukelekian ve Heller deniz mikroorganizmalarında 'şişe etkisi' yani bakterilerin önce yüzeye tutunduklarını ve bunun bakteriyel gelişim ve aktivitelerini arttırdığını gözlemlemiştir. Zobel ise, herhangi bir yüzeyde oluşan bakteri sayısının su altındakilere kıyasla çok daha fazla olduğunu gözlemlemiştir (Donlan, 2002). Elektron mikroskobu yaygın olarak kullanılmadan önce, bakterilerin planktonik yapıda olduğu yani sıvı içerisinde serbest bir şekilde tek olarak bulunduğu düşünülürken, elektron mikroskobu ile yapılan daha sonraki çalışmalar bunun tam tersini ortaya konmuş ve mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmesi için katı yüzeylere ihtiyaç duyduğu ispatlanmıştır (Denning ve diğ., 1998). Jones ve arkadaşları atık su arıtım tesislerinde kırma taşlı filtrelerinden elektron ve taramalı mikroskop ile farklı morfolojideki mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilm yapısını gözlemlemiştir. Spesifik polisakkarit boyası olan ruthenium kırmızısı ile boyayıp, osmium tetroksitle fikse edip incelediklerinde biyofilm yapısında tutunmayı sağlayan hücre dışı matriksin polisakkarit olduğunu kanıtlamışlardır (Donlan, 2002).

Characklis 1973'ün başlarında endüstriyel su sistemlerinde biyofilm yapısını araştırarak biyofilm yapısının dezenfektan ve klora dirençli olduğunu öne sürmüştür (Donlan, 2002). 1976 yılında Marshall çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini bildirmiştir (Marshall, 1976). 1978 yılında Costerton ve arkadaşları su sistemlerindeki bakteri topluluklarının, doğal olarak polisakkarit içinde bulunurken, yapışmış bakteri topluluklarının ise glikokaliks matriks içinde bulunduğunu ve bu matriks yapısının adhezyona aracılık ettiğini gözlemlemiştir (Costerton ve ark., 1995; Donlan, 2002). O zamandan beri endüstriyel ve ekolojik ortamda biyofilmler üzerine

yapılan çalışmalar halk sağığı ile ilişkili bulunduğundan paralel olarak ilerlemektedir (Donlan, 2002). Biyofilmlerin varlığı derin yer altı suları ve okyanusun derinleri dışında tüm doğal ekosistemlerde saptanmıştır (Lindsay ve Holy, 2006).

2.2.2. Biyofilm Tanımı ve EPS

Biyofilm, geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülü, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan formları ile aralarında farklılıklar olan mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlanmıştır (Donlan 2002).

Watnic ve Kolter (2000)'e göre biyofilm, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları mukoz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan 'mikroplar şehri'dir.

Post ve diğ. (2002) biyofilmi, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyon olarak tanımlamıştır.

Genel olarak biyofilm, bakteriyel hücrelerin mikrobiyal olarak değişime uğramış yüzeye veya birbirine tutunarak, matriks ya da hücre dışı polimerik madde (EPS) içine gömülmüş olan tek hücrelerden çoğalan, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik, makroskobik olarak opak yapıda, ortalama 100-500µ boyutlarında, kaygan, pürüzsüz, giderilmesi zor bir yapıdır (Rijnaarts ve diğ., 1993; Watnick ve Kolter, 2000; Sutherland, 2001; Donlan, 2002).

Ekstrasellüler polisakkarit matriks (EPS): Biyofilmdeki hücreler, polisakkaritler, proteinler, DNA ve su karışımından oluşan ekstrasellüler matriks yapısı (EPS) ile birbirlerine tutunmaktadırlar. Bu yapı, bakterilerin koloniler olarak büyümelerine yardım eden, besleyiciler ile konumlanmış, sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan yapıdır. EPS ya bakteri yüzeyine bağlı olarak kalır ya da yapışkan bir şekilde ekstrasellüler ortamlarda serbest olarak bulunur. Jel oluşumu, flokulasyon, emülsiyon,

absorbsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pek çok role sahip bu polimerler, biyofilm matriksinin ana yapı materyalidir (Yılmaz ve Çelik, 2007). Sutherland (2001) tarafından yapılan çalışmada EPS'nin yüksek seviyede su içerdiği ve yapısında hidrofobik ya da hidrofilik kısımlar barındırdığı saptanmıştır (Ataol, 2011). Yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (Yılmaz ve Çelik, 2007).

Biyofilmdeki bakteriler planktonik hücrelerle karşılaştırıldıklarında genotipik ve fenotipik farklılıklar göstermektedirler. Biyofilm içerisinde yaşamak bakteriler için avantaj sağlamaktadır. Öncelikle matriks hem fiziksel güçlere (nem, sıcaklık, ultraviyole ışık gibi) hem de kimyasal saldırılara karşı (hidrojen peroksit, klor gibi) koruyucu bariyer görevindedir (Elkins ve diğ., 1999; Noorwood ve Gilmours, 2000; Yıldız ve diğ., 2001). Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği diğer avantajlardır. Biyofilm yapısındaki bakteriler birçok antibiyotiğe karşı dirençlidir (Mah ve diğ., 2003; Steawart ve diğ., 2001; Leid ve diğ., 2002). Ekzopolisakkarit matriks içerisinde bulunmaları fagosite edilmelerini zorlaştırır ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (Donlan ve Costerton, 2002; Şahin, 2007; Gün ve Ekinici, 2009).

Biyofilmin planktonik olarak yaşayan hücrelerden üstünlükleri Donlan (2002) tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla;

- 1) Biyofilm içerisindeki bakterinin salgıladığı EPS yapısı ortamdaki besin maddelerinin (C, N, PO₄ gibi) daha konsantre hale gelmesini sağlayarak bakterilerin bu besinleri kullanımını artırmaktadır.
- 2) Biyofilm yapısındaki bakteriler antimikrobiyal maddelere, yüzey gerilimi değiştiren ajanlara, sıcaklığa, konakçıya ait fagositlere, konakçı oksijen radikallerine, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler.
- 3) Yüzeyde bulunan bakterilerin tabakalı dizilimi çeşitli kimyasallara karşı mekanik kalkan oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra yüzeydeki tabakada katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyel ajanlara karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.

4) Biyofilm parçaları zamanla olgun biyofilmden koparak yeni yüzeylere yayılır. Bu şekilde planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirilir. Böylece ortamda biyofilm oluştuğu anda birbirini takip eden tutunmalar daha hızlı gerçekleşecektir (Ataol, 2011).

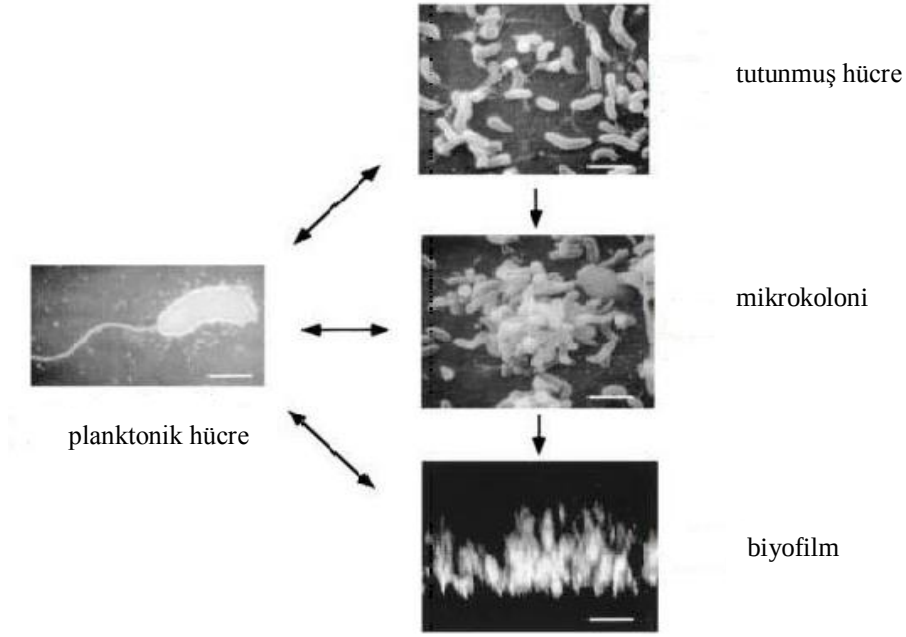
2.2.3. Biyofilm Tabakasının Oluşumu

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve katı yüzeydir. Bu bileşenlerden birinin eksik olması durumunda biyofilm oluşumu gerçekleşemez (Donlan, 2002). Biyofilmin yapısı % 95-97 su olmak üzere % 2-5 mikroorganizma, % 1-2 polisakkarit, % 1-2 protein, % 1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır (Ataol, 2011). Biyofilmin geliştiği çevreye bağlı olarak, matriksinde mineral kristalleri, korozyon parçacıkları, kan bileşenleri bulunabilir. Biyofilm oluşumu bazı iç ve dış faktörlere bağlıdır. Örneğin; su aktivitesi, besin ihtiyacı, antimikrobiyal madde içeriği, potansiyel hidrojen (pH) değeri, asidite, oksijen değişkeni ve elektriksel değişkenlik gibi iç faktörler, yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, sıvının akış hızı, sınırlı besin maddesi gibi dış faktörler etkindir (Donlan, 2002; Donlan ve Costerton, 2002; Douglas, 2003). Biyofilm oluşumuna etkili faktörler Tablo 2.1’de sıralanmıştır (Düzgün, 2009).

Tablo 2.1: Hücre yapışması ve biyofilm oluşumunda etkili faktörler.

Yüzey özellikleri	Sıvının özellikleri	Hücrenin özellikleri
Pürüzlü olması	Akım hızı	Hücre yüzey hidrofobisitesi
Hidrofobisite	pH	Fimbria
Ön film oluşumu	Sıcaklık	Flagella
	Katyonlar	EPS

Biyofilmin temel birimi “mikrokoloniler”dir. Mikrokoloniler bir veya birkaç türdeki bakteri hücresinden oluşurlar. Mikrokolonilerin % 10-25’i hücrelerden, % 75-90’ı ise EPS matriksinden oluşmaktadır. Mikrokoloniler çoğunlukla mantar benzeri şekle sahip yapı olarak tanımlanmıştır (Donlan, 2002).



Şekil 2.1: Planktonik hücreden biyofilm gelişimi aşamaları (Watnick ve Kolter, 2000).

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türünden oluşabileceği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokolonileri birbirlerinden ayıran su kanallarıdır. Su kanalları içindeki su akışı, besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Biyofilm yapısına biyofilmi oluşturan bakterilerin de etkisi vardır. *K. pneumoniae* veya *P. aeruginosa* tek başlarına ince biyofilm oluştururken bir arada iken bu yapı daha kalındır. Bunun nedeni; bir bakterinin diğer bakterinin stabilitesini artırdığı ve bu nedenle biyofilmin kalınlaştığı şeklinde açıklanmıştır (Düzgün, 2009). Ayrıca sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman alabilir. Örneğin; *P. aeruginosa*'nın elektrik yüklü bir yüzeye yapışması sadece 30 saniye alır (Jones ve diğ., 1969).

Biyofilm oluşumu 5 evrede gerçekleşmektedir;

1. *Tutunma*

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır (Uludağ ve Şener, 2008). Bakteriler, çevresel uyarıları fenotipik değişikliklere dönüştürdüğü düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşması için farklılaşma işleminin başlaması, ‘**quorum sensing**’ sistemi adı verilen bir haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem aracılığıyla bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyon yoğunluğunu belirlerler. Yüzeye tutunan her bakteri ortama mesaj veren bir molekül salgılar. Tutunan bakteri sayısı arttıkça, sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu artış ile biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlarlar (Vuong, 2002; Ataol, 2011).

Çeşitli bakteri türlerinde, sekonder metabolit üretimi yüzme ve kümelenme hareketi konjugal plazmid transferi, antibiyotik direnci, biyofilm gelişimi ve virulans gibi fizyolojik süreçler quorum sensing aracılığı ile düzenlenir (Williams, 2006).

2. *Yapışma*

Bakterilerin yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir (Vuong, 2002). Başlangıçta bakteri hücreleri arasında gelişen zayıf etkileşim yüzeye geri dönüşümlü tutunmadır (Marshall ve diğ., 1971). Hücrelerin geri dönüşümsüz tutunması ise biyofilm oluşumundan sonraki basamaktır. İtici güçler bakteri hücrelerinin yüzeye doğrudan temasını engeller. Ancak bakterilerin flagella, fimbria ve pili gibi yüzey uzantılarını ve ekzopolisakkarit fibrillerinin üretiminden dolayı yüzeye temas devam eder (Jones ve Isaacson, 1983; Hancock, 1991). Geri dönüşümsüz tutunma dipol dipol etkileşimi, hidrojen, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrofobik etkileşimleri içeren kısa mesafede etkili çeşitli güçleri içerir. Bakteri hücresi ile yüzey arasında köprü olarak görev yapan polimerik fibriller yüzeye geri dönüşümsüz tutunmayı sağlar. Bu süreçte hücrelerin

yüzeyle ilişkisinin ortadan kaldırılması için fırçalama ve ovalama gibi çok güçlü kuvvetler gereklidir (Marshall ve diğ., 1971).

3. Toplanma

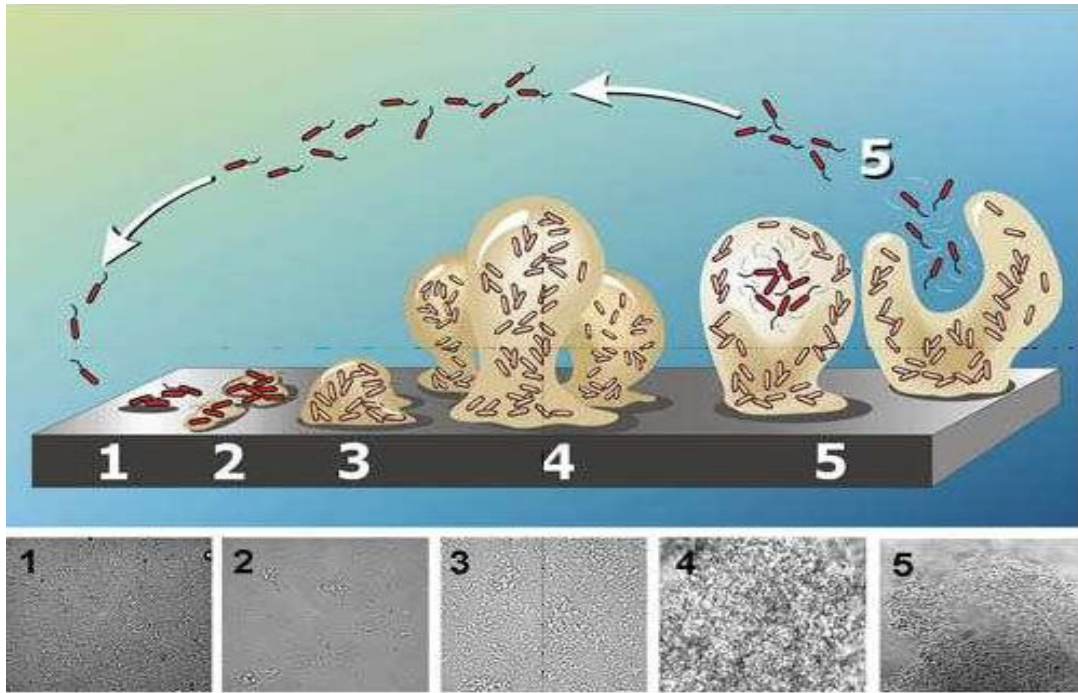
Bakteriler mikrokoloniler haline dönüşürler (Vuong,2002). Geri dönüşümsüz tutunan bakteri hücreleri büyür ve bölünür. Bu da mikrokolonilerin oluşumuna neden olur. Bu periyotta yapışan hücreler polimer (EPS) üretirler. Polimer üretimi hücrelerin yüzeye sabitlenmesini ve çevreden gelen bozucu etkilere karşı koymasını sağlar (Characklis ve Marshall, 1990).

4. Olgun Biyofilm

Mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara dönüşürler.

5. Kopma veya Ayrılma Evresi

Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya çok sayıda hücrelerin emboli şeklinde kopmasının bir sonucudur (Vuong, 2002).



Şekil 2.2: Biyofilm oluşumu ve döngüsünün şematik görünümü (Sakuragi ve Kolter, 2007).

Biyofilm oluşumu; *S. aureus*, *S. epidermidis*, *viridans streptokoklar*, *enterokoklar*, *aktinomiçesler*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Vibrio cholerae*, *Klebsiella spp.* ve *Candida ssp.* gibi birçok mikroorganizmada görülmüştür (Ataol, 2011). Biyofilm gelişimi uygun mikroorganizmaların varlığında hemen hemen her çevre koşulunda ve her katı yüzeyde meydana gelebilir. Mikroorganizmaların çoğunluğu durumunda; mikroorganizmaların normal yaşamı ve üremeleri için katı yüzeylere tutunmasında canlı ya da inert ve/veya organik ya da inorganik oluşumlar esansiyel şartlardır (Costerton ve diğ., 1987; Zottola ve Sasahara, 1994).

Biyofilm tabakasına su ile temas eden tüm yüzeylerde, örneğin; endüstriyel veya evsel su sistemlerinde, ısıtıcılarda, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım sistemlerinde, soğutma kulelerinde, doğal su sistemlerinde, kağıt makinelerinde, tıbbi cihazlarda, medikal aletlerde ve diş ünitlerinde rastlanabilir (Kuba, 2012). Bu ortamlarda biyofilm tabakası, bakterileri biyosidal maddelerden, besin yokluğundan, kuraklıktan, pH değişimlerinden ve toksinlerden korur. Biyofilm, cansız yüzeylerin yanı sıra canlı organizmalarda da çeşitli koşullarda, çeşitli dokularda oluşmaktadır. Biyofilmlerin bir kısmı organizma açısından koruyucu bir rol üstlenirken, bir kısmı da özellikle immün baskılanmış ve kalıcı tıbbi araç veya kateteri olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Biyofilmler insan vücudunda kateterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilir (Uludağ ve Şener, 2008).

Biyofilm tabakasının canlı veya cansız tüm yüzeylerde oluşabilmesi endüstriyel ve sağlık açısından birçok sorunlara sebep olmaktadır. Mikrobiyal biyofilmlerin; aletlerin üzerinde oluşturdukları hasarlar, ürün kontaminasyonları, enerji kayıpları ve neden oldukları enfeksiyon hastalıkları milyonlarca dolarlık zararlara neden olmaktadır (Fujishige ve diğ., 2006). Enfeksiyon hastalıkları ile biyofilm oluşturan mikroorganizmalar arasında kuvvetli bir ilişki vardır. Bu mikroorganizmalar özellikle kalp iç zarı iltihabı, periodontit, kistik fibroz gibi hastalıklara neden olur (Donlan ve Costerton, 2002). Yapılan çalışmalar nozokomiyal enfeksiyonların yaklaşık % 65'inden mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin sorumlu olduğunu ve bu durumun tedavi giderlerini çok yükselttiğini ortaya koymaktadır (Potera, 1999). Tıbbi uygulamalarda uygulanan tekniklerin ve kalıcı tıbbi araçların kullanımının artışı

biyofilm enfeksiyonlarının da artışına neden olmuştur. 1930'lu yıllardan bugüne kadar yoğun bir şekilde araştırılan biyofilm tabakası, endüstriyel/evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, gemi karınalarında, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde “biofouling” olarak da adlandırılan istenmeyen tortu ve tabakalaşmalara yol açarak önemli derecede ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Hallam ve diğ., 2001). Süt ve diğer gıda sanayilerinde biofouling; ısının yüzeyden akışını geciktirmesi, yüzeydeki sıvının sürtünme direncinin artması ve yüzeydeki kimyasal sürtünme oranının artması gibi ciddi sorunlar yaratmaktadır (Kumar ve Anand, 1998). Boru hatlarında oluşan biyofilm, boru hattı boyunca akışın azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşan borularda ısı taşınımı azalabilmekte, biyofilm ürünü kontamine edebilmekte ve biyofilm içindeki asit oluşumu nedeniyle borular korozyona uğrayabilmektedir (Poulsen, 1999; Jayaraman ve diğ., 1997; Gün ve Ekinci, 2009).

2.2.4. Biyofilm Direnç Mekanizmaları

Biyofilmde yer alan mikroorganizmalar, planktonik üreyenlere kıyasla antibiyotiklere karşı 1000 kata kadar daha dirençlidirler (Hoyle ve Consterton, 1991). Antibiyotik direncinin effluks pompası, enzim modifikasyonu ve hedef mutasyonu gibi bilinen mekanizmalarının biyofilmdeki bakterinin korunmasında rolü yoktur. Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan bir mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise tekrar duyarlı hale dönüşebilmektedir (Fux ve diğ., 2005; Drenkard, 2003). Bu da biyofilmdeki bakterilerin mutasyon veya taşınabilir genetik parçalar yoluyla direnç kazanmadığını düşündürür. Biyofilm ortamı sadece antibiyotiklere karşı değil, dezenfektanlara karşı da direnç gelişmesinde rol oynamaktadır. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler sıvı ortamda serbest üreyen bakterilere göre dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençlidir. Biyofilm üreten bakteriler antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmektedir. Dezenfektanlara dirençli biyofilm üreten kökenlerin yol açtığı salgınlar bildirilmiştir (Uludağ ve Şener, 2008)

Biyofilm direnci gerçekte çok etmenli bir durumdur. Direnç nedenleriyle ilgili tezler arasında antimikrobiyal ajanların biyofilm içine düşük penetrasyonları, mikroçevre değişikliği ve biyofilme özgü dirençli bir fenotip oluşumudur (Mah ve O'Toole, 2001)

Biyofilm direncini etkileyen tüm bu faktörler göz önüne alındığında, biyofilmi oluşturan bakteri türü ve kullanılan antimikrobiyal ajana bağlı olarak farklı direnç mekanizmalarının etkili olabileceği ve bu direncin multifaktöriyel olduğu görülmektedir (Sauer, 2002).

Biyofilm hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşimleri sonucunda genetik yapılarında değişiklikler gözükmemektedir ve biyofilmler ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal ortamlar oluşturur. Direnç plazmidlerinin aktarılması sayesinde genetik yapısı değişen hücreler antimikrobiyal ajanlara karşı daha fazla direnç geliştirmiş olur (Uludağ ve Şener, 2008).

Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara direncinden sorumlu olan üç ana mekanizma bildirilmiştir (Mah ve O'Toole, 2001; Gilbert ve diğ., 1997; Stewart, 2000).

Antimikrobiyal ajanın biyofilm matriksinde çok yavaş ilerlemesi

Biyofilm matriksini oluşturan ekstrasellüler polimerik maddeler antimikrobiyal moleküllerin yayılım hızını yavaşlatan ya da matriks ajanlarıyla ilişkisini kesen bir bariyer görevi görmektedir (Patti ve diğ., 1994). Biyofilmin antimikrobiyal ajanlara karşı bir bariyer olup olmadığını belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. *P. aeruginosa* biyofilminin piperasilinin difüzyonunu engellediği, *S. epidermidis* biyofilminin ise rifampisin ve vankomisin difüzyonuna izin verdiği ve bu antibiyotiklerin etkin şekilde biyofilme penetre olabildiği gösterilmiştir. Biyofilm kalınlığı ve antibiyotiklere direnç arasında lineer bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (Melchior ve diğ., 2006). Bu sonuçlar, ekzopolisakkarit matriksin antimikrobiyal ajanların difüzyonuna karşı tam bir engel oluşturmadığını ve farklı mekanizmaların da biyofilmdeki bakterilerin antimikrobiyal direncine katkı sağladığını göstermektedir (Ataol, 2011).

Biyofilm organizmalarının üreme hızlarının değişmesi

Biyofilm hücreleri planktonik fazdaki hücrelere göre çok daha yavaş çoğalır bu da antimikrobiyal ajanları çok daha yavaş hücre içerisine alınmasına sebep olur. (Patti ve diğ., 1994). Bu durum, biyofilmlerde antimikrobiyal ajanların bakterisidal etkilerini göstermeleri için ihtiyaç duydukları aktif üreme gösteren bakterilerin sayısının azalmasına ve sınırlı etki göstermesine yol açmaktadır. Örnek olarak; penisilin

antibiyotikler hücre duvarı sentezini hedefler ve yalnızca büyümekte olan bakterileri öldürebilirler (Stevart ve Consterton, 2001).

Mikroçevre değişikliği

Biyofilmlerin direnç mekanizmalarının bir diğeri ise biyofilmdeki değişmiş kimyasal ortam ve persiste hücrelerdir. Biyofilmlerde üremeyi sınırlandıran kimyasal yapılar antibiyotik potensini de değiştirebilmektedir. Örneğin tek başına biyofilmdeki oksijen konsantrasyonu aminoglikozidlerin etkinliğini sınırlandırabilir. Biyofilmin anaerobik bölümünde bulunan bakteriler fermentatif özellikte olsalar bile bu antibiyotiklerin etkisinden korunabilmektedir. Benzer şekilde biyofilmdeki pH değişimleri de antibiyotik etkinliği üzerine olumsuz etki göstermektedir (Melchior ve diğ., 2006). Biyofilmlerdeki bakteriler sadece antibiyotikler tarafından öldürülmeye değil klor ve glutaraldehit gibi kimyasal dezenfektanlara da direnç göstermektedir (Ataol, 2011).

2.3. MİKROBİYAL BİYOFİLMİN ÖNEMİ

2.3.1. Biyofilm Oluşumunun Endüstriyel Açıdan Önemi

Biyofilmler, meydana getirdikleri toplumsal sağlık problemlerine ek olarak, endüstriyel açıdan da zararlı olup ekonomik yönden kayıplara sebep olmaktadır. Biyofilm oluşumu birçok endüstride problemlere yol açar. Özellikle atık su arıtma sistemleri ve gıda endüstrilerini yakından ilgilendirir. Endüstride meydana gelen biyofilmler, verimlilikte önemli kayıplara, süreçlerin aksamasına, ekipmanda zararlara neden olmakla beraber sistemin suyunda bulanıklığa, koku, tat ve renk değişimlere, borularda ve ekipmanda biyolojik açıdan bozulmalardan da sorumludurlar. Tüm bunlarla birlikte sistemden sıvı geçişine karşı direnç gelişimine, biyofiltrelerin tıkanmasına ve metal yüzeylerde korozyona da neden olmaktadır. Gemi gövdelerinde oluşan biyofilmden dolayı da, deniz taşımacılığında önemli enerji kayıpları meydana gelmektedir (Hallam ve diğ., 2001; Gilbert ve diğ., 2003; Zhang ve Bishop, 2003; Vatansever, 2011).

Gıda işletmelerindeki sıcaklık, besin maddeleri ve nem gibi koşullar mikroorganizmaların çoğalmasını sağlar. Bu koşullarda mikroorganizmalar gıda yüzeylerine ve gıda ile temas halinde olan yüzeylere tutunarak biyofilmleri

oluşturmaktadır (Wong, 1998). Gıdaların bozulmasına ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan mikroorganizmaların çoğu biyofilm oluşturabilmektedir (Demirhisar, 2010). Bunlardan *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* en yaygın olanlarıdır (Mattila-Sandholm ve Wirtanen, 1992; Genigeorgis, 1995). Gıda işletmelerinde biyofilm oluşturmuş olan mikroorganizmalar üretilen ürünlerin sürekli olarak bulaşmasına neden olabilmektedir (Bower ve diğ., 1996; Bagge Ravn ve diğ., 2003). Süt, et ve birçok besin maddesinin üretimi sırasında, üretilen besinin proteinleri (kazein, jelatin), üretimde kullanılan teçhizat (reaktör, kazan, tepsi v.b.) üzerinde hazırlayıcı bir film oluşturarak mikroorganizma yapışmasını kolaylaştırır. Böylece mikroorganizmalar paslanmaz çelik, cam, alüminyum, teflon, naylon gibi gıda teknolojisinde kullanılan birçok malzeme üzerinde film oluşturarak insan sağlığını tehdit edebilir (Zottola ve Sasahara, 1994). Ayrıca süt ve süt ürünleri endüstrisinde uygun olmayan temizlik ve sanitasyon ekipmanları ve hava kökenli mikroflora genellikle süt ve süt ürünlerinin kontaminasyonunun temel nedeni olarak dikkate alınmaktadır (Poulsen, 1999).

Süt ve gıda endüstrisinde biyolojik kirlenme yüzey ısı akımının engellenmesi, yüzeydeki akıcı sürtünme direncindeki artma ve enerji ve ürün kaybına sebep veren aşındırma oranındaki artma gibi ciddi problemlere neden olur. Buna ek olarak biyofilmler, bozulmaya neden olan patojen mikroflorayı içeren, kümes hayvanı etleri ya da diğer et yüzeyleri gibi gıda yüzeylerinde oluşan çapraz kontaminasyon ve işletim sonrası kontaminasyon da problem arz eden oluşumlardır (Ataol, 2011).

Salmonella enteritidis, *S. aureus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* gibi patojenlerle kontamine olmuş gıdaların sadece gıda işletmeleri açısından değil, halk sağlığı açısından da büyük sorun teşkil ettiği bilinmelidir (Ataol, 2011).

Sonuç olarak biyofilm oluşumu gıda ve diğer endüstriyel açıdan bir çok zarara neden olmakta ve ekonomik olarak, biyofilm kaynaklı kayıplar dünya çapında yıllık milyar dolarlara ulaşmaktadır (Hallam ve diğ., 2001; Gilbert ve diğ., 2003; Zhang ve Bishop, 2003).

2.3.2. Biyofilm Oluşumunun Klinik Açıdan Önemi

Biyofilm oluşumu sağlık açısından oldukça önemlidir. Oluşan biyofilmler yüksek ateş, ciddi organ hasarları ve hatta ölüme bile neden olabilirler. Bulaşıcı hastalıklara neden olan biyofilmin özellikleri aşağıda yer almaktadır:

- a) Hücrelerin veya biyofilm kümelerinin ayrılması, kan ve idrar yolu enfeksiyonlarına veya emboli oluşumuna yol açar.
- b) Biyofilm içerisindeki hücreler, dirençli plazmidleri birbirlerine aktarabilmektedir.
- c) Biyofilm içerisindeki hücrelerin, antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılığı azalmaktadır.
- d) Gram (-) bakterilerden oluşan biyofilmler endotoksin üretebilmektedir.
- e) Biyofilmler, konağın bağışıklık sistemine karşı daha dirençlidir (Donlan, 2002).

Klinik olarak biyofilmler canlı dokularda ve vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşabilirler (Jefferson, 2004). Bu tip üreme kronik enfeksiyonları da beraberinde getirir, çünkü biyofilmlerden doğal olarak zaman zaman kopan mikroorganizmalar vücutta başka yerlerde de bir enfeksiyona neden olabilirler (Consterton ve diğ., 1999).

Biyomalzeme olarak metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler kullanılmaktadır. Yapay deri, damar, kalp, eklem gibi birçok protez bu malzemelerden üretilmektedir. Biyomalzemelerin biyouyumlu olma özellikleri aynı zamanda bakteriler içinde elverişli bir ortam oluşturabilir. Örneğin vücut hücrelerinin kaplanması için fibronektin gibi bağlayıcı (yapıştırıcı) proteinler kullanılır. Bu proteinler sadece vücut hücreleri için değil, bakteriler için de bağlayıcı bir fonksiyon göstermektedir. Dokulara tutunan bakteriler uygun yaşam şartları nedeniyle çok hızlı bir biçimde çoğalmaya başlar ve kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler. Ayrıca doku yüzey kimyasındaki değişimler, antibiyotik tedavisi veya yaşlanma sonucunda normal bir bakteriyel flora patojenik hale geçebilir (Ataol, 2011).

Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların neden oldukları hastalıkların bazıları; kistik fibroz, doğal kapak endokarditi, orta kulak iltihabı, periodontit, kronik prostat gibi doğal seyirli hastalıklar ve bunların dışında, protez kapak, santral venöz kateter, üriner kateter,

ortopedik protez, kontakt lens ve rahim içi araç gibi yabancı cisim enfeksiyonlarına yol açmaktadırlar. Sağlık sektöründe kullanılan çok sayıda tıbbi cihazda saptanan biyofilm plakları bu cihazlardan kaynaklanan enfeksiyonlara neden olmaktadır (Donlan, 2002; Wilson ve diğ., 2012; Drenkard ve Ausubel, 2002).

Biyofilm oluşumu; *S. aureus*, *S. epidermidis*, viridans streptokoklar, enterokoklar, aktinomiçesler, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *V. cholerae*, *Klebsiella spp.* ve *Candida ssp.* gibi birçok mikroorganizmada gösterilmiştir. İçme suyu dağıtım şebekelerinde biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ise enterik patojenler, *Legionella pneumophila*, tüberküloz dışı mikobakteriler ve *Helicobacter pylori*'dir.

Biyofilmler doğaları gereği konak savunması ve antibiyotiklerden korunurlar. Biyofilm matriksi, biyofilm bakterilerinin konak savunmasından korunmasında anahtar rol oynar (Fux ve diğ., 2005).

Meluleni ve diğ. (1995), kronik kistik fibrozlu hastalara ait opsonik antikorların, biyofilm mikrokolonilerinde gelişen bakteriyel hücrelerin fagositozu ve uzaklaştırılmasında etkisiz olduğunu göstermiştir. Yasuda ve diğ. (1994), biyofilm içerisinde gelişen *E. coli* hücrelerini fagositoza duyarlı biyofilm dışı bakteriler ile süspanse etmiş ve *in vitro* olarak insan polimorf nüveli lökositlerinin öldürücü aktivitesine karşı daha az duyarlı olduklarını saptamışlardır. Buna dayanarak fagositoza dirençteki artışın, biyofilm bakterilerinin polimorfonükleer lökositlerdeki oksijen ile öldürülemeyen, dirençli türler ortaya çıktığı hipotezini öne sürmüşlerdir. Bu sonuca göre, medikal araçlar veya kronik enfeksiyonlardaki biyofilmlerden ayrılan organizmalar immün sistemi aşarak enfeksiyon oluşturmaya daha hazırdır (Yasuda ve diğ., 1994).

2.4. TEST EDİLEN MİKROORGANİZMALAR

2.4.1. *Staphylococcus aureus*

Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfı, Bacillales takımı, Staphylococcaceae ailesi, *Staphylococcus* cinsi içinde yer alan *S. aureus*, hareketsiz Gram (+) kok şeklindedir ve genellikle düzensiz kümeler oluşturur (Boone ve diğ., 2001). Katalaz (+) olan *S. aureus* fakültatif anaerobik özellik gösterir. En iyi aerobik koşullarda gelişmesine rağmen, anaerobik ve mikroaerofilik koşullarda da gelişebilirler. Genellikle koagülaz üreten *S. aureus* % 10'a kadar olan NaCl konsantrasyonlarında iyi gelişebilirken, % 15 NaCl konsantrasyonlarında gelişimi zayıftır. *S. aureus* suşları 10-45 °C arasında optimum 30-37 °C sıcaklıkta, pH 4.2-9.3 arasında optimum, 7-7.5 pH'da gelişirler (Erk ve diğ., 1994).

Aerobik ve anaerobik şartlarda selektif olmayan nutrient agar, tryptic soy agar, kanlı agar, brain heart infusion agarda ürerler. *S. aureus* kolonilerinin genişliği 6-8 mm çapında keskin kenarlı, düz, konveks, yarı şeffaftır. Kanlı agarda değişik tipte (α , β , γ , δ , ϵ) hemolizli koloniler oluştururlar ve hemoliz, kültürlerin CO₂'li ortamda inkübe edilmeleri durumunda daha belirgindir (Ersoy ve diğ., 2004). 60 °C'lik sıcaklığa 30 dakika dayanabilirler. Ayrıca γ -radyasyonuna oldukça dirençlidirler (Ersoy ve diğ., 2004; Arda ve diğ., 1997; Bayhün, 2008).

S. aureus proteaz, lipaz ve esteraz enzimlerine sahiptir. Üreyebilmek için aminoasit, adenin ve tiamin, anaerop koşullarda ise bunlara ilave olarak urasil ve piruvata da ihtiyaç duyarlar (Arda ve diğ., 1997; Bayhün, 2008). Glikoz, laktoz, maltoz ve mannitolden aerobik ve anaerobik koşullarda asit meydana getirirken arabinoz, sellobioz, inositol, rafinozdan asit oluşturmazlar. Nişasta ve eskulini hidroliz etmezler. Hipurat ve arjinini hidroliz ederler. Nitratları nitrite indirgerler. Metil Kırmızısı (MR) testi genellikle (+), Voges-Proskauer (VP) testi değişkendir. İndol ve H₂S oluşturmazlar. (Ersoy ve diğ., 2004; Jawest ve diğ., 1976).

Tuza dayanıklılıkta en önemli ozmoprotektant maddeler hücre içine biriken glisin, betain ve prolin'dir. Diğer bakteriler tuzlu ve düşük su aktiviteli gıdalarda gelişemezken *S. aureus* diğer bakterilerin rekabetçi etkisinden kurtularak daha rahat bir gelişme gösterir (Tükel ve Doğan, 2000).

Stafilokoklar doğada yaygın olmakla beraber en çok memelilerin ve kuşların cildinde ve mukoz membranlarında bulunur. Konakta, ağız, meme bezleri ve intestinal, ürogenital ve alt solunum sistemlerinde bulunabilir. Stafilokoklar, genelde bulundukları yerde konakla simbiyotik bir ilişkiye sahiptir, ancak kutanöz bariyerdeki travma, iğne ve inokülasyon veya medikal aletlerde direk implantasyon yoluyla dokuya girmesi sonucu patojen olabilir (Çelik, 2009). Bu mikroorganizmaların neden oldukları hastalıklar septisemi, stafilokokkal gıda zehirlenmesi gibi akut enfeksiyonlardır. *S. aureus* formları özellikle ekzotoksin ve aggresinlerle hastalık yapmaktadırlar (Brock ve Madigan, 2006). *S. aureus*'un yol açtığı enfeksiyonların büyük çoğunluğu, fronkül, sellülit, impetigo ve operasyon sonrası yara enfeksiyonları gibi cilt enfeksiyonlarıdır. Bu mikroorganizma bakteriyemi, pnömoni, osteomiyelit, akut endokardit, perikardit, serebrit, menenjit ve birçok doku ve organda apse oluşumu gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilir (Çakır, 2007).

Ağır metallere ve antibiyotiklerin yaygın kullanımının sonucu olarak klinik mikrobiyolojide kullanılan birçok antibiyotiğe karşı genetik olarak kazanılmış çoklu direnç sistemine sahiptir. Bu direnç dünyada çok önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Stafilokoklarda genellikle plazmid aracılığıyla yönetilen ve diğer stafilokok suşlarına da aktarılabilen direnç genleri toplumda birçok antibiyotiğe karşı dirençli suşların artmasına neden olmaktadır (Çalık, 1998).

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde, hastane genelinde en sık izole edilen etken, % 31'lere varan oranıyla *S. aureus*'tur. Hastane enfeksiyonu olarak izole edilen *S. aureus* suşları arasında metisilin direnci (MRSA) % 90'lara varmaktadır (Ersoy ve diğ., 2004). MRSA enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu hastane kaynaklı olmasına rağmen, son yıllarda antibiyotik duyarlılık profili açısından hastane kökenlerinden belirgin farklılıklar gösteren toplumda kazanılmış MRSA enfeksiyonlarında da önemli artışlar gözlenmektedir. Bu toplum kaynaklı MRSA enfeksiyonları her coğrafi bölgede saptanmaya başlanmış olup bazı yerlerde sıklığının % 20'lere ulaştığı bildirilmektedir (Ulusoy ve diğ., 1995).



Şekil 2.3: *S. aureus* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Çavdar, 2009).

2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Proteobacteria şubesi, Gamma Proteobacteria sınıfı, Pseudomonadales takımı, Pseudomonadaceae ailesi, *Pseudomonas* cinsi içinde yer alan *P. aeruginosa* 0.5-0.8 µm eninde, 1.5-3 µm boyunda olabilen Gram (-) çomak veya kokobasil, düz veya hafif kıvrık morfolojiye sahip bakterilerdir. Spor oluşturmazlar. Tek polar flagellası ile hareketlidir ve diğer *Pseudomonas* türlerinde birden fazla flagella bulunabilir (Peabody ve diğ., 2003). Zorunlu aéroptur, fakat oksijen yokluğunda da ortamda elektron alıcı olarak yeterli NO₃ varsa yaşamını devam ettirir. Optimum 37 °C’de olmakla beraber, 20-42 °C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilir.

Kolay üreyen bakterilerdir. Organik üreme faktörlerine gereksinimleri yoktur. Tek bir karbon kaynağı varlığında üreyebilen nadir bakterilerdendir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılan besiyerlerinde kolayca üredikleri için izolasyonları kolaydır. *P. aeruginosa* kolonileri üç farklı tipte olabilir. Doğal ortamdan, toprak ve sudan izole edilenler küçük, kaba koloniler oluşturur. Klinik materyallerden üretilenler ise iki tipte görülür. Bir tipi büyük, yumuşak, düz ve kalkık kenarlı koloniler (non-mukoid) oluştururken virulansı daha yüksek olan diğer tipte alginat üretimi sonucu mukoid tipte koloniler gözlenir. Kanlı besiyerinde genellikle hemoliz oluşturlar. EMB, McConkey agar gibi laktoz içeren besiyerlerinde laktoz negatif koloni yaparlar.

Besiyerinde kendine özgü bir kokusu vardır. Tatlımsı aromatik meyve, tatlı üzüm ya da trimetilamin kokusuna benzeyen özel koku, 2-aminoasetofenon'a aittir ve *P. aeruginosa*'ya özgüdür (Peabody ve diğ., 1995; Düzgün, 2009).

P. aeruginosa'nın değişik pigmentleri vardır. Diğer Pseudomonadlar gibi *Pseudomonas aeruginosa* da piyosiyanin (mavi-yeşil), piyorubin (kırmızı-kahverengi) ve flöressein (yeşil-sarı ve flöresan) gibi pigmentler üretir. Flöresseini tüm Pseudomonadlar oluşturabilirken; piyosiyanini sadece *Pseudomonas aeruginosa* oluşturabilir. (<http://tr.wikipedia.org>)

P. aeruginosa karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterir. *P. aeruginosa* oksidaz pozitifdir. Yani sitokrom c oksidaz içeren elektron transport zinciri sistemine sahiptir. Sitokrom c oksidaz içermeleri *Pseudomonas* cinsini *Enterobacteriaceae* ailesinden ayıran temel özelliklerdendir. Nitrattan gaz oluştururlar.

P. aeruginosa insan normal florasında yer alabilir ve sağlıklı kişilerde nadiren hastalık yapar. Konak savunmasının zayıflaması halinde, ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Deri ve mukozaların bütünlüğünün bozulması, damar içi veya üriner kateter varlığı, endotrakeal tüp kullanılması enfeksiyonu hazırlayıcı faktörlerdir. Nötropeni, hipogamaglobülinemi, kompleman eksikliği gibi bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar da *Pseudomonas* spp. enfeksiyonlarına zemin hazırlar. Yanık yarası enfeksiyonları, kronikleşmeye eğilimli idrar yolları enfeksiyonları, menenjit, kornea ülserleri, panoftalmi, bronşit, bronkopnömoni, sepsisemi, orta kulak enfeksiyonları ayrıca kistik fibrozlu olgularda alt solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olabilirler (Düzgün, 2009)

P. aeruginosa'nın bazı fizyolojik özellikleri çevresel faktörlere karşı avantaj sağlar ve patogeneze katkıda bulunur;

- *P. aeruginosa*'nın besin gereksinimleri oldukça basittir. Distile su içinde bile üreyebilirler. Laboratuvar ortamında karbon kaynağı olarak asetat ve azot kaynağı olarak amonyum sülfat içeren oldukça basit besiyerlerinde üretmek mümkündür.

- Çoğalmasi için ideal çevre sıcaklığı 37 °C olmakla birlikte, 42 °C'ye kadar olan sıcaklıkta üremesi devam eder.
- Farklı çevresel koşullar, yüksek tuz oranı, zayıf antiseptikler ve çoğu antibiyotiklere karşı dirençlidir.
- Nemli ortamlarda daha kolay çoğalır (Düzgün, 2009).

Çevre koşullarındaki olumsuz faktörlere karşı da oldukça dirençlidir. Sıcaklık değişikliklerinden oldukça az etkilenir, çok tuzlu ortamlara dayanıklıdır, zayıf antiseptiklerden etkilenmez. Farklı ekolojik ortamlarda varlığını sürdürmesi onun fırsatçı patojen karakterine katkıda bulunur. Örneğin hastane ortamında; başlıca solunum cihazları, su içeren nemlendiriciler, lavabo, duş, küvet gibi ortamlar yanında yataklar, çarsaflar, gazlı bezler, tamponlar gibi çok sayıda alandan izole edilebilirler (Hilbi ve diğ., 2007).

P. aeruginosa'nın fiziki koşullara uyum sağlayabilmesi, beslenme gereksinimlerinin azlığı ve antibiyotiklere kolay direnç kazanabilmesi patojenitesine katkıda bulunur. Bakterinin virülans faktörleri patogenezin her basamağında düzenleyici rol oynar (Driscoll ve diğ., 2007).

P. aeruginosa antibiyotiklere direnç geliştirme konusunda oldukça başarılıdır (Stein, 2005). Dış membran yapısındaki lipopolisakkaritler doğal bariyer oluşturarak çoğu antibiyotiğin penetrasyonunu engeller. *P. aeruginosa*'nın pek çok virülans faktörleri yanında son yıllarda biyofilm yapma ve Quorum Sensing (QS) yeteneği önem kazanmıştır. Biyofilm oluşturarak koruyucu bir matriks içinde kolonize olması, antibiyotiklerden korunmasını sağlar. Antibiyotik rezistans plazmidleri içerir ve transdüksiyon ve konjugasyon ile bunları transfer eder (Woodford ve Ellington, 2007). Antibiyotik ve dezenfektanların birçoğuna kolaylıkla direnç geliştirebildikleri için tedavi ve kontrol edilmeleri sorun oluşturabilir ve hastane ortamında kolayca yerleşerek hastane kaynaklı ciddi enfeksiyonlara neden olabilirler (Mesaros ve diğ., 2007).



Şekil 2.4: *P. aeruginosa* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Çavdar, 2009).

2.4.3. *Escherichia coli*

Enterik bakterilerin en önemlilerinden birisi olan *Escherichia coli*, ilk olarak Theodor Esherich tarafından tanımlanmıştır. *E.coli* Gamma Proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, Enterobacteriaceae ailesinin üyesi olup 1-2 µm uzunluğunda ve 0.1-0.5 µm çapında Gram (-), sporsuz, çomak şeklinde, glikozdan asit ve gaz oluşturan, katalaz (+) ve fakültatif anaerop bir bakteridir. Genellikle etraflarında bulunan kirpikleri aracılığı ile hareketli olmakla beraber hareketleri yavaş, hatta bazen hareketsiz görülebilirler. Hemagglütinasyon yapan fimbriyaları vardır. Çoğunlukla hemagglütinasyonun mannoz tarafından önlendiği (Mannoza duyarlı MS) Tip 1, az bir kısmında ise hemagglütinasyonu mannoza dirençli tipte (MR) Tip 2 fimbriya bulunur (Kuba, 2012).

Laboratuar koşullarında tanısında en çok sitratı kullanma, triptofandan indol oluşturma ve pH 4.4'ün altında asit oluşturma özelliklerinden faydalanılır. Optimum pH 7.2 ve üreme sıcaklığı 37 °C'dir ve özellikle 44 °C de üreyebilmeleri benzer bazı bakterilerden (*Enterobacter*, *Serratia*) ayırt edici bir özelliktir. Canlılıkları 4-5 °C sıcaklık düzeyleri arasında devam etmektedir.

Sıvı besiyerinde homojen bulanıklık, katı besiyerinde ise hafif kabarık, yuvarlak, düzgün 1-2 mm çapında parlak S tipi koloniler yaparlar. Bazı kökenleri hafif mukoid (M) koloniler, bazıları da R tipi koloniler oluşturulabilir. Jelatinde koloniler küçük,

beyaz ve opaktır. Jelatini ve koagüle serumu eritmezler ancak bazı kökenler (özellikle idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilenler) kanlı jelozda hemoliz yapabilirler (Bilgehan, 2000). EMB besiyerinde; küçük, koyu renkli ve metalik, Endo ve Mac Conkey agarda kırmızı parlak, Salmonella-Shigella besiyerinde ise pembe renkli koloniler olarak görülürler.

Glikozdan gaz oluşturur, laktozu fermente ederler. Metil kırmızısı testi pozitif, Voges Proskauer testi negatiftir. İndol pozitif, sitrat testi negatiftir (IMVIC reaksiyonu: ++-- dir) (Kılıçturgay ve diğ., 1993; Bilgehan, 2000). Genellikle H₂S için ayıraçlı besiyerlerini karartacak kadar H₂S yapmazlarsa da sisteinli besiyerlerinde az miktarlarda H₂S ürettikleri saptanmıştır. Hemen tümünde potasyum siyanür testi negatiftir (Bilgehan, 2000).

Organizmada bağırsak dışındaki yerlerden izole edilen kökenlerin çoğunda kapsül ya da mikrokapsül bulunur. *E. coli*, somatik O, flagellar H ve kapsüler K antijenini taşımakta olup bu antijenlerin bakterideki konumuna göre serotipleri birbirinden ayrılabilir. *E.coli* patojenitesine göre; Enterohemorajik (EHEC), Enteropatojenik (EPEC), Enterotoksikojenik (ETEC), Enteroinvasiv (EIEC), difuzadhering (DAEC) ve Enteroaggregatif (EaggEC) *E. coli* olmak üzere 6 grupta tanımlanmaktadır (Haris, 2005).

Su ve gıdalarda *E. coli*'ye saptanması, o gıdaların dışkı ile temas ettiğini göstermektedir. Normal bir dışkıda, 1cm³'lük hacimde yaklaşık 10¹¹ bakteri bulunmaktadır ve bu sayının 10⁹'dan fazlasını *E. coli* oluşturmaktadır (Berg, 2003). *E. coli*, insan ve diğer sıcakkanlı hayvanların bağırsak mikroflorasının doğal ve zararsız bir üyesidir, hatta bağırsakta bulunan tehlikeli bakteri türlerini baskılamakta ve vitamin sentezine katkı sağlamaktadır. Ancak tüm bu olumlu özelliklerine rağmen *E. coli*'nin bazı türleri patojeniktir ve bu patojenik bakteriler hem bağırsaklarda hem de bağırsak dışında önemli enfeksiyonlara yol açmaktadır (Torun, 2011; Tanyel ve diğ., 2008). Üriner sistem enfeksiyonları ve neonatal menenjitler başlıca önemli enfeksiyonları olmakla beraber nozokomiyal enfeksiyonlar, bakteriyemi, cerrahi yara ve alt solunum yolu enfeksiyonlarına da neden olmaktadır (Kılıçturgay ve diğ., 1993).



Şekil 2.5: *E. coli* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü (Çavdar, 2009).

2.4.4. *Klebsiella pneumoniae*

Gamma Proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, Enterobacteriaceae ailesi, *Klebsiella* cinsi içinde yer alan *Klebsiella pneumoniae* kısa, uçları yuvarlak, 1-2 µm boy ve 0,5- 0,8 µm eninde, Gram (-) hareketsiz, sporsuz bir bakteridir. Genellikle uç uca ikişer ikişer kısa zincirler şeklinde ve tek tek bulunurlar. Çevrelerinde polisakkarit yapıda geniş bir kapsül bulunur. Kapsül, organizmadan yeni ayrılan ve hastalık materyali içindeki türlerde belirgin şekilde görülür. Kanlı, serumlu besiyerlerinde kapsüllerini saklı tutarlar ve en iyi glikozlu besiyerinde kapsülленir (www.mikrobiyoloji.org, Ünal, 2011, Cinel, 2011).

Ayrıca pasajlarla ve özellikle safranlı besiyerlerinde kapsüllerini kaybederler. Deney hayvanlarında yeniden kapsül oluşturur. MacConkey Agar'da koloniler tipik olarak büyük, mukoid ve kırmızıdır. Agar çevresinde difüze olan kırmızı pigment laktoz fermentasyonunu ve asit üretimini gösterir. *Klebsiella* bakterileri sıcaklığa dayanıksız olup nemli ortamda 55 °C'de 30 dakikada ölür, oda sıcaklığında tutulan kültürler haftalarca, +4 °C'de aylarca canlı kalır. Kuruluğa oldukça dirençlidir. Özellikle organik maddelerde kurutulursa aylarca canlı kalabilir. Üremek için kan, serum, asit sıvısı, glikoz gibi özel maddelere gereksinim duymaz (Anğ-Küçüker, 2006; Ünal, 2011).

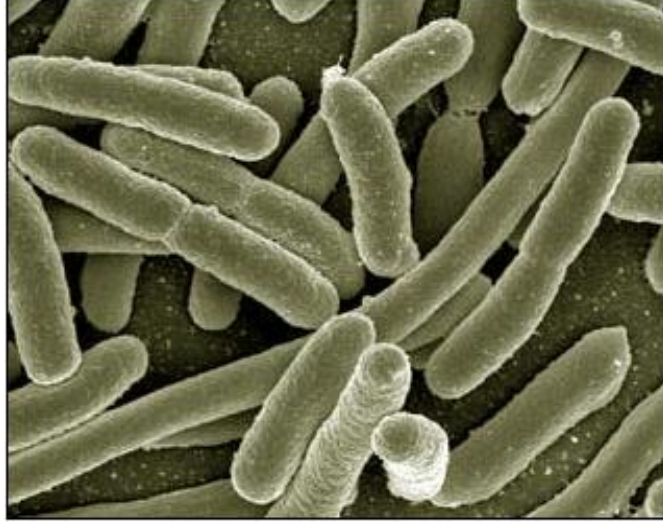
Klebsiella, tüm bağırsak bakterileri gibi genel kullanım besiyerlerinde kolayca ürer. Optimal 37 °C'de ve pH 7'de iyi ürer. Buyyon gibi sıvı besiyerinde heterojen bir bulanıklık ve dipte mukoz bir çöküntü yaparak ürer. Katı besiyerindeki kolonileri tipik mukoid nitelikte büyük, sarımtırak gri renkte ve akıcı kolonilerdir. Uygunsuz koşullarda R ve S kolonilerine dönüşebilir. Yatık jelozdaki birikme sıvısı gri-beyaz mukoid bir kitle şeklindedir. Sıvı besiyerinde birkaç günlük kültürlerde bir kıvamlaşma oluşarak besiyeri eritilmiş jelatin kıvamında bir görünüm alır (Ünal, 2011).

K. pneumoniae suşlarının çoğu, hemen hemen bütün şekerleri asit ve gaz oluşturarak parçalar. Özellikle nişastayı en geç 4 gün içinde parçalayarak gaz yapması, bu türü diğer bağırsak bakterilerinden ayırt eder. Jelatini hidrolize etmez. H₂S oluşturmaz.

Potasyum siyanürlü besiyerinde ürer. Ancak solunum sisteminden izole edilen bazı kökenler değişik biyokimyasal reaksiyonlar verebilir. Benzer morfolojide ancak daha çok su ve toprak ortamlarından izole edilen kökenler 10 °C'de ürer ve 44.4 °C'de laktozdan gaz oluşturabilir (Anđ-Küçüker, 2006; Ünal, 2011).

Sağlıklı bireylerin % 5'inin üst solunum yolu ve bağırsak florasında bulunabilen *Klebsiella* cinsi bakteriler, uygun koşulların oluşması veya yerlerini değiştirmesiyle diğer organ ve sistemlere geçtiklerinde, birçok hastalığa neden olabilirler. Lober pnömoni; diabetiklerde ve alkoliklerde, kronik obstruktif akciğer hastalığı olanlarda genellikle üst solunum yollarında kolonize olmuş bakterilerin aspirasyonu sonucu oluşur. Akciğerde apse ve kavite oluşumu, ampiyem, plevra yapışıklıkları sıktır. *Klebsiella* pnömonisi Gram (-) bakteri pnömonileri içinde daha seyrek görülür ancak ölüm oranı diğerlerine göre çok daha fazladır. Bazen bronkopnömoni ve bronşit olarak seyreden akciğer enfeksiyonlarına da rastlanır. Nozokomiyal idrar yolu, cerrahi yara enfeksiyonları ve bakteriyemiye neden olabilirler. Bakteriyemiye genellikle damar içi kateter uygulaması, bağırsaktan translokasyon veya akciğer enfeksiyonu neden olur. *K. pneumoniae* ile menenjit, kolesistit, çeşitli organlarda abse oluşumu gibi enfeksiyonlar da meydana gelir (Sağlam, 2012). Yapılan bir araştırmada hastanede yatan kişilerdeki üriner enfeksiyonların % 9'undan ve bütün primer bakteriyemilerin % 14'ünden *Klebsiella* cinsi bakteriler izole edilmiştir (Ustaçelebi, 1999).

K. pneumoniae'nin biyofilm yapısı piyojenik karaciğer abseleri gibi doku enfeksiyonlarında çok önemlidir. Antibiyotiklere karşı oldukça dirençlidirler ve bu dirençleri *E. coli*'ninkinden fazladır. Hastane ortamından izole edilen suşlarda dirençlilik düzeyi çok yüksektir.



Şekil 2.6: *K. pneumoniae* kolonisinin taramalı elektron mikroskobu görüntüsü
(www.klebsiella-pneumoniae.org).

2.5. DEZENFEKSİYONU ETKİLEYEN FAKTÖRLER

Enfeksiyon riskini azaltmak için uygulanacak olan dezenfektanın seçimi ve uygulamasının doğru yapılabilmesi için dezenfeksiyonu etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi gerekir. Bunlar; dezenfektanın tipi, kullanım konsantrasyonu, temas süresi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, ortamda organik maddelerin varlığı ve miktarı, nesnenin yapısı, nisbi nem ve suyun sertliği ile mikroorganizmanın yapısı, miktarı, üreme periyodu gibi mikroorganizmaya bağlı faktörlerdir. Dezenfeksiyona maruz kalan nesnenin düzgün, porsuz bir yapıya sahip olması etkiyi artırırken; yüzeylerinde çatlak, por veya eklentinin varlığı uygulamayı olumsuz yönde etkilemektedir. Mikroorganizmaların dezenfeksiyonunda en sık başvurulan yöntem kimyasal dezenfeksiyondur (Özyurt, 2000).

Dezenfeksiyonu etkileyen faktörleri üç ana başlık altında toplayabiliriz.

2.5.1. Mikroorganizmaya Bağlı Faktörler

a. Mikroorganizmalarda Doğal ve Kazanılmış Direnç

Mikroorganizmaların dezenfektan ajanlara karşı duyarlılıkları cins ve türleri ile bulunduğu yaşam evresine bağlı olarak değişmektedir. Doğal direnç, genellikle dezenfektan maddenin hücre içine alımının azalmasıyla ilişkilidir. Vejetatif bakteriler ve zarflı virüsler genellikle en duyarlı mikroorganizmalarken, bakteri sporları ve protozoon kistleri en dirençli grubu oluşturur (Alıcı, 2007).

Her mikroorganizmanın dezenfektan direnci farklıdır, aşağıdaki tabloda mikroorganizmalar dezenfektana karşı dirençleri güçlüden zayıfa doğru sıralanmıştır.

Tablo 2.2: Mikroorganizmaların dezenfektana karşı direnç sıralaması (Russell, 1998).

Prionlar (CSD,BSE)
<i>Coccidia (Cryptosporidium)</i>
Sporlar (<i>Bacillus, Clostridium difficile</i>)
<i>Mycobacteria (M. tuberculosis, M. avium)</i>
Kistler (<i>Giardia</i>)
Küçük, zarfsız virüsler (poliovirüs)
Trofozoitler (<i>Acanthamoeba</i>)
Gram negatif bakteriler (<i>Pseudomonas, Providencia</i>)
Mantarlar (<i>Candida, Aspergillus</i>)
Büyük, zarfsız virüsler (enterovirüs, adenovirüs)
Gram pozitif bakteriler (<i>S. aureus</i> , enterokoklar)
Lipid içeren zarflı virüsler [insan immün yetmezlik virüsü (HIV), hepatit B virüsü (HBV)]

Sporlar sterilizasyona en dirençli yapılardır, bunun temel nedeni ise spor yapısındaki su içeriğinin oldukça az olmasıdır (Alıcı, 2007).

Mikobakterilerin kompleks hücre duvarı ve Gram (-) bakterilerin dış membran tabakası hidrofobik yapıları nedeniyle fiziksel bariyer oluşturarak, dezenfektanların hücreye girişini kısıtlar. Özellikle *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus* spp. ve *Providencia stuartii* birçok dezenfektanlara en fazla dirençli olan bakterilerdir. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin klorheksidin ve fenol türü dezenfektanlarda hayatlarını devam ettirdikleri saptanmıştır (Alıcı, 2007).

Fungusların hücre duvarı, plazma membran yapısı, hangi üreme fazında oldukları fungal dezenfektan direncinde önemlidir. Viruslerin zarflı olup olmaması dezenfektan direncini belirleyen önemli bir faktördür. Zarf içeren virüsler lipofilik olup dezenfektanlara daha duyarlı iken, zarf içermeyenler ise hidrofilik yapıda olup daha dirençlidirler. Protozoon kistleri bakteri sporlarına benzer yapılardır, çevre şartlarına ve dezenfektanlara karşı, bariyer görevi yaparak dayanıklı olmayı sağlamaktadırlar (Alıcı, 2007).

Kazanılmış direnç kromozomal mutasyonlar veya plazmidler/transpozonlar aracılığıyla gelişir. Dezenfektan hedefinde değişiklik olması, permeabilitenin azalması ve hücre dışına atılım pompaları belli başlı mekanizmalardır (Alıcı, 2007).

b. Mikroorganizmaların Sayısı

Diğer koşulların sabit kalması şartıyla, mikroorganizmaların sayısı ne kadar fazla ise antimikrobiyal maddenin onları ortadan kaldırması daha uzun zaman alır (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

c. Biyofilm Oluşumu

Bakterilerin katı yüzeyle teması sonrası oluşan biyofilm tabakası içinde mikroorganizmalar hızla kolonize olurlar. Dezenfektanların bu tabaka içinde yaşayan mikroorganizmalara ulaşmaları fiziksel olarak zorlaşır ve ayrıca biyofilm tarafından üretilen bir takım enzimler ve nötralizan kimyasal maddeler tarafından etkisiz hale getirilebilmektedirler. Biyofilm tabakası içindeki mikroorganizmalar da fizyolojik

olarak değişime uğrayıp daha dirençli hale gelmektedirler (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

2.5.2. Dezenfektana Bağlı Faktörler

a. Dezenfektanın Tipi ve Konsantrasyonu

Seçilecek dezenfektan ve yöntem, araçların infeksiyon riski düzeyine göre belirlenir.

Buna göre;

1. Kritik araçlar: Normalde steril olan dokular, vücut boşlukları ve vasküler sistemle doğrudan temas edenler; cerrahi aletler, tüm implantlar, kardiyak ve üriner kateterler, tüm intravasküler aletler vb.
2. Yarı-kritik araçlar: Mukoza zarına veya bütünlüğü bozulmuş deriye temas eden ancak vücuda penetre olmayanlar; esnek endoskoplar, solunum cihazları, anestezi cihazları, endokaviter problemler, tonometreler vb.
3. Kritik olmayan araçlar ve maddeler: Mukoza zarına veya bütünlüğü bozulmuş deriye temas etmeyen, sadece sağlam deri ile temasa geçenler; Sürgü, komodin, yatak kenarlıkları, stetoskop, tansiyon aleti manşeti, hemodiyaliz makinelerinin yüzeyleri, yerler, duvarlar, mobilyalar vb. (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

Dezenfektanların birçoğu konsantre haldedir ve kullanmadan önce sulandırılmaları gerekir. Sulandırma oranı mutlaka üretici firmanın önerisi doğrultusunda yapılmalıdır. Eğer önerilenden düşük konsantrasyonda hazırlanırsa dezenfektanın etkinliği azalırken, olması gerekenin üstündeki konsantrasyonlar aletlere kimyasal hasar verebilir, aynı zamanda kullanan kişiler üzerindeki toksik etkileri artmış olur. Hazırlanan solüsyonlar uzun süre stabil kalamadığı için üretici firmanın önerdiği süre boyunca kullanılması uygundur. Bu süre her dezenfektan için farklı olabilir. Örneğin; glutaraldehitler sulandırılarak ve ancak belli bir zaman dilimi içinde kullanılırlar (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

b. Dezenfeksiyon Süresi

Dezenfeksiyon işleminde en önemli değişken temas süresidir. Dezenfektan süresinin önerilenden fazla olmasının dezenfeksiyon işleminde bir yararı yoktur. Hatta bu uygulanan alette geri dönüşümsüz hasar oluşturabilir. Bu nedenle dezenfeksiyon süresi de araçların infeksiyon riski düzeyine göre belirlenir. Buna göre; kimyasal

dezenfektanlar ile sporosidal aktivite ancak bakteri sporlarına etkili bir dezenfektanın uzun süre uygulanmasıyla elde edilebilir (dezenfektanın türüne göre 6-20 saat). Yarı kritik araçlarda uygulanan yüksek düzey dezenfeksiyonda seçilen dezenfektanın türüne göre temas süresi 12 ile 45 dakika arasında değişir. Kritik olmayan araçların dezenfeksiyonunda ise aracın cinsine göre minimum bir dakika olmak üzere en fazla 10 dakikalık uygulama yeterlidir (Alıcı, 2007). Her dezenfektan için bu süreler değişebilir.

2.5.3. Çevresel Faktörler

a. Ortam pH'sı ve İşlemin Sıcaklığı

pH düzeyindeki uç değerler mikroorganizmaların çoğalmasını etkili biçimde sınırlandırır. Bununla beraber ortamın pH düzeyinde meydana gelebilecek en ufak bir değişiklik antimikrobiyal aktiviteyi, dezenfektanların molekül yapısını bozarak etkilemektedir. pH düzeyinde artış bazı antimikrobiyallerin aktivasyonunu artırırken (gluteraldehit, kuaterner amonyum bileşikler gibi), bazılarının aktivasyonunu azaltabilmektedir (fenoller, hipoklorit, iyot). Her dezenfektan için geçerli olmasa da, sıcaklık arttıkça birçok dezenfektanın aktivitesi artar. Bilindiği gibi sıcaklık yüzey gerilimini azaltır, böylece solüsyonun maddeyi ıslatması kolaylaşır ve kimyasal reaksiyon hızlanır (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

b. Kullanılan Suyun Sertliği

Suyun kalitesi temizlik sürecinde önemli bir faktördür. Suyun fazla miktarda kalsiyum ve magnezyum tuzu içermesi suyun sertlik derecesini artırır. Çözünmeyen kalsiyum ve magnezyum tuzları zamanla araçlar üzerinde birikip istenmeyen kalıntılar oluşmasına yol açar. Bu kalıntılar uygun dezenfeksiyon yapılmasını engelleyecek bir zemin hazırlayabilir. Ayrıca yıkama sırasında çeşme suyu kullanılıyorsa, içinde bulunan kloridler suya karışabilir. Klor iyonları çelik malzemelere etki ederek demir moleküllerinin suya salınmasına, dolayısıyla metal alette ciddi korozyona neden olmaktadır (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

Kaliteyi arttırmak amacıyla suların filtre edilmesi, distilasyonu, deiyonizasyonu ve ters ozmoz ile iyonlarından arındırılması ve saf su oluşturulması bu sorunların önlenmesi için mutlak gereklidir.

c. Organik ve İnorganik Maddelerin Varlığı ve Tipi

Temizlik her türlü sterilizasyon ve dezenfeksiyon işleminde önemlidir. Özellikle tekrar tekrar kullanılan aletler dezenfeksiyon işleminden önce mutlaka temiz olmalıdır.

Kan, mukus, serum, dışkı, doku parçaları gibi organik artıklar mikroorganizmaları çevrelediği için dezenfeksiyonu olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörler olarak kabul edilir. Bu kirlerin kuruyup, aletlere sıkıca yapışmasını engellemek için, yıkama işlemi en kısa zaman içinde bol miktarda soğuk suyla yapılmalıdır. Lipid içeren artıklar ise suda çözünmezler. Bu nedenle beraberinde suyun, maddelerle temasını kolaylaştırarak yüzey gerilimini düşüren kimyasal maddelere yüzey aktif ajanlara (sümfaktanlar) ihtiyaç duyarlar (Alıcı, 2007).

2.6. NANOTEKNOLOJİ VE DEZENFEKSİYON

Nano kelimesi ilk defa Richard Feynman'ın 1959 yılında bir konferansta yapmış olduğu "Aşağıda daha çok yer var" başlıklı konuşmada kullanılmıştır.

Bu konuşmada Feynman;

- Atomları ve molekülleri çok hassas aletlerle manipüle edilebileceğini,
- Çok küçük boyutlarda operasyon yapılabileceğini,
- Çok küçük boyutlarda yerçekimi gibi kanunlarının öneminin azalacağına, Van der Waals gibi mikro düzeydeki zayıf kuvvetlerin daha önemli hale geleceğini anlatmıştır.

Feynman'ın nanoteknolojide günümüzde yapılabilen olaylara değinmesi, nanoteknolojinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir. Ancak nanoteknoloji kelimesi dünyada ilk kez Norio Taniguchi'un 1974 yılında yayınlamış olduğu makalede kullanılmıştır. Bu makalede "Nano-teknoloji; genel olarak malzemelerin atom ya da molekül molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır" şeklinde tanımlanmıştır. 1981'de nanoteknolojinin ciddi anlamda gelişmesini tetikleyen olay ise "Scanning Tunnelling Microscope" bulunmasıdır. 1986'da Eric Drexler "Nanoteknoloji derecesini alma", "Nanoteknoloji kitabını yazma" ve "Nanoteknoloji" dersini vermiştir. Bu tarihlerden itibaren nanoteknolojideki gelişmeler hızla artmaktadır (Gökmen, 2014).

“Nano-” ön eki yunanca nanos kelimesinden gelir ve “cüce” demektir (Keiper, 2003). “Nano” sözcük olarak, bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri anlamına gelmektedir. “Nanoteknoloji”, “nanobilim” gibi başında “*nano*” ön eki bulunan terimler, “nanometre” teriminden gelmektedir. Temel olarak nanometre, diğer ölçüm skalaları gibi bir ölçüm skalasıdır. Bir metrede 1.000.000.000 nanometre vardır, yani bir nanometre, bir metreden bir milyar kere küçüktür. Bir nanometre, aşağı yukarı orta-boyutta bir molekülün, örneğin 60 karbon atomu içeren bir molekülün boyutundadır (Sharifzadeh, 2006). İnsan saç teli çapının yaklaşık 100.000 nanometre olduğu düşünülürse ne kadar küçük bir ölçekten bahsedildiği daha rahat anlaşılmaktadır. (Özdoğan ve diğ., 2006).

Nano-ölçek seviyesindeki malzemelerin özellikleri makroskobik ölçekten tamamen farklı olup, nano boyutlara yaklaştıkça birçok yeni özellik ortaya çıkmaktadır (Nanoteknoloji Strateji Grubu, 2004). Malzemenin kimyasal ve fiziksel özellikleri, yapının büyüklüğüne ve atom yapısının ayrıntılarına, dışarıdan sisteme bağlanan yabancı bir atomun cinsine ve yerine göre çok farklı ve olağanüstü davranışlar sergilemektedir. Örneğin, üç beş nanometreye kadar boyutu olan malzemelerde, atomların üçte biri yüzey atomlarıdır. İnsan saçının bir telinin genişliğinde olan bir elementte ise, elementin atomlarının yalnızca çok küçük bir miktarı yüzeyde bulunmaktadır. Bu özellik sebebiyle, üç-beş nanometre aralığında olan nanoparçacıkları, katıdan çok gaz parçacıkları halindedir. Bu fazladan açıkta olan yüzey, elementlerin ve nanoparçacıkların birbirleriyle olan etkileşimlerini etkiler. Böylece, kompozit malzemelerde nanoparçacıkların kullanımı, bunların sertliğini artırabilir ve/veya ağırlıklarını düşürebilir, kimyasal ve termal dayanırlıklarını artırabilir ve ışıla diğer ışımlarla olan etkileşimlerini değiştirebilir (Kırca ve Menciloğlu, 2008).

Nanobilim çok küçük boyutlarda ortaya çıkan bu yeni davranışları kuantum kuramı yardımıyla anlamamızı sağlamaktadır (Çıracı, 2006). Nanobilim, hem küçük moleküler olan, hem de tüm boyutlarıyla makroskopik olan sistemlerinkinden çok farklı (genellikle yararlanılabilecek sıra dışı ve beklenmeyen yönlerde) dinamik özelliklere neden olan nanoskopik (1–100 nm) uzamsal boyutların en az birine sahip olan sistemlerin yapılarını, dinamiklerini ve özelliklerini inceleyen bilimdir (DOE, 2002; Sharifzadeh, 2006). Tüm bilim dalları malzemeleri incelediği için nanobilim, tek bir

bilim alanından çok, bir araştırma ve uygulama biçimini tarif etmektedir (Niyogi ve Haddon, 2004; Sharifzadeh, 2006).

Nanoteknoloji, nanobilimin buluşlarının gerçek hayattaki uygulamalarıyla ilgilidir. Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir. Bir başka ifade ile çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, oluşturulması ve manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Balcı, 2006).

Nanoteknolojinin en fazla başvurulan tanımı, ABD “Ulusal Nanoteknoloji Adımı” (NNI) tarafından sağlanmıştır. NNI, nanoteknolojiyi şöyle tanımlamaktadır:

Nanoteknoloji, aşağı yukarı 1 – 100 nanometre aralığında olan boyutlardaki maddenin incelenmesi ve işlenmesidir. Bu boyutlarda yapılan bu çalışmalarda gerçekleşen benzersiz fenomenler, yepyeni uygulamalara olanak sağlamaktadır. Nano-boyuttaki bilimi, mühendisliği ve teknolojiyi kapsayan nanoteknoloji, maddenin bu boyut ölçeğinde görüntüleme tekniğini, ölçümünü, modellemesini ve manipülasyonunu içermektedir. Nano-boyutta, malzemelerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, tek tek atomların ve moleküllerin ya da kütsel haldeki malzemenin özelliklerinden temel olarak ve yararlı bir yönde farklı olmaktadır. Nanoteknoloji alanında AR-GE, bu yeni özelliklere sahip olan gelişmiş malzemeler, aygıtlar ve sistemlerin anlaşılması ve yaratılmasına yönelmiştir (NNI, 2004; Sharifzadeh, 2006). Nanoteknolojinin NNI tanımı genellikle araştırmacılar kadar nanoteknolojiyle uğraşan diğer birimler tarafından da kabul edilmektedir. Ayrıca bu tanım, nanoteknoloji alanında AR-GE’nin ana planı olarak da kabul edilmektedir (Kırca ve Menceloğlu, 2008).

Nanoteknolojiye olan ilginin gün geçtikçe artmasının en önemli nedeni bu teknolojinin getirmiş olduğu yenilikler ve faydalardır. Bunlar;

- Nanometre ölçekli yapıların analizi,
- Nanometre boyutunda yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması,
- Alışıldan farklı ve üstün malzeme özellikleri/üretim süreçlerinin elde edilmesi,
- Daha dayanıklı, daha hafif, daha hızlı yapılar,

- Daha az malzeme ve enerji kullanımı,
- Nanometre ölçekli yapıların imalatı,
- Nano hassasiyetli cihazların geliştirilmesi,
- Nano ölçekli cihazların geliştirilmesi,
- Uygun yöntemler bulunarak nanoskopik ve makroskopik dünya arasındaki bağın kurulmasıdır (Bozkaya, 2006). Bu maddeler ayrıca nanoteknolojinin amaçlarını da oluşturmaktadır.

Nanoteknoloji genel amaçlı bir teknoloji olması nedeniyle hayatın her alanında etkili olmaktadır. Kullanılan arabalardan, alınan ilaçlara, giysilerden, duvar boyalarına, uçaklardan bilgisayar parçalarına kadar her sektörde ve her türlü sanayi dalında etkili olmakta ve kullanılmaktadır (Güneşoğlu, 2006). Nanoteknoloji, kaynakların daha verimli ve sürdürülebilir kullanımı için yol gösterebilme ve dünya çapındaki insanların büyük çoğunluğu için yararlı bir etkiye sahip olabilme potansiyeli taşımaktadır (www.nanoforum.org). Daha hafif, sağlam, uzun ömürlü, fonksiyonel ve taşınması kolay materyaller üreten nanoteknoloji; bu üretimleri yaparken minimum maliyet ve minimum çevre kirliliği gibi faktörlere de önem verdiği için gelecekte yaşamımızın her anında yer alacağını sinyallerini vermektedir (Kaplan ve diğ., 2007).

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki giderek artan gelişmeler ve toplum üzerindeki oluşan etkisi ile tüm teknolojik gelişmeleri gölgede bırakacak devrim niteliğindeki yeniliklerin bilhassa nanoteknoloji ile destekleneceği düşünülmektedir (Güneşoğlu, 2006). Nanometre ölçeklerinde malzemelerin sahip oldukları üstün fiziksel özellikleri kullanarak çeşitli alanlarda (bilişim ve iletişim, elektronik, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp, gıda, savunma, tekstil, makine ve inşaat sanayileri vb.) teknolojik devrim niteliğinde yeni ürünler elde edilebilmektedir ve bu ürünlerden ciddi gelirler elde edilmektedir (Özdoğan ve diğ., 2006).

Nanoteknolojinin kullanım alanlarına baktığımızda hayati öneme sahip en önemli sektör tıp ve sağlık alanıdır. Nanoteknolojinin bu alanlardaki kullanımı, hem ürünlerin nano ölçekli olarak üretim ve karakterizasyonu hem de nano ölçekli işlem ve değerlendirmelerden oluşmaktadır. Öte yandan tıp ve sağlık bilimlerinde nanoteknoloji konusu, bir başka yaklaşımla başlıca üç ana grupta toplanabilmektedir. Bunlar sırayla;

- Nano parçacıklardan oluşan sistemler,
- Biyomalzemelerin moleküler düzeyde modifiye edilmesi,
- Nano malzeme (veya nano cihazların) üretimi şeklinde sıralanabilir (Ulutepe, 2010).

Nanoteknoloji tıp alanında; ilaç sektöründe, gen uygulamalarında, kardiyak tedavide, kanser tedavisinde, diş bakımında, ortopedi uygulamalarında ve moleküler tanılarda kullanılmaktadır. Ayrıca diyagnostik görüntüleme sistemleri, moleküler diyagnostikler ve biyomoleküler tanıma sistemleri, doku mühendisliği uygulamaları, göz ile ilgili uygulamalar ve biyomalzeme yüzeylerinin antibakteriyel özellik kazandırmak üzere veya biyolojik uyumluluğunu artırmak üzere uygulamalarda yapılmaktadır (Ulutepe, 2010).

Nanoteknolojinin gıda endüstrisindeki uygulamaları, taşıma sistemleri (miseller, nanoemülsiyonlar, lipozomlar, biyopolimerik nanoparçacıklar vb.), gıda güvenliği ve biyogüvenlik (nanosensörler vb) ve nanotoksisite gibi uygulamaları kapsamaktadır. Nanoteknolojinin gıda endüstrisindeki amacı, gıda bileşenleri ve biyopolimerlerinin kendi yapıları içerisinde bir araya gelerek oluşturdukları molekülleri ve özelliklerini anlamak ve bunu esas alarak geleneksel gıdalara göre besin ögesi yüksek ve daha lezzetli, aynı zamanda biyomoleküllerin istenen hedeflerde salınımını gerçekleştirebilecek özelliğe sahip yeni gıdalar üretmek yer almaktadır (Açık ve Güven, 2012).

Gıdaların ambalajlanması, gıdanın kalitesinin depolama ve taşıma sırasında korunması, raf ömrünün uzaması, gazların geçirgenliğinin kontrol edilebilmesi açısından çok önemlidir. Geleneksel paketleme yöntemlerinde kullanılan ambalaj materyali sadece gıdayı dış etkenlerden belli bir miktarda koruyan bir bariyer görevi görmektedir. Bariyer görevinin yanında gıdanın besin değerini koruyarak raf ömrünü güvenli biçimde artırmayı sağlayan ek fonksiyonlara sahip paketleme malzemeleri geliştirilmesi konusunda pek çok çalışma yapılmaktadır ve yeni ambalajlar geliştirilmektedir. Bu noktada da nanoteknolojiden yararlanılmaktadır (Açık ve Güven, 2012). Nanoteknoloji, ambalaj malzemesi üretiminde de kullanılarak daha iyi, daha ekonomik materyal üretimine yardımcı olur. Penn State Üniversitesi Gıda Bilimleri Departmanı ile Gıda Teknolojileri Enstitüsünün (Institute of Food Technology (IFT) Başkanı Prof. John

Floros'un da belirttiği gibi; bu teknolojide çalışmaların yaygınlaşması iki önemli ambalaj çeşidinin gelişmesine yardımcı olmuş olup bunlar; akıllı ve aktif ambalajlardır (Ulutepe, 2010).

Gıda içi değişimleri kontrol eden aktif ambalajlar dışında, gıda saklama koşullarını (sıcaklık, zaman) takip eden nano sensörler daha basit bir şekilde müşterileri bilgilendirmektedir. Bu sensörler ambalajın içindeki gıdanın güvenli bir şekilde, perakendeciler ve tüketici tarafından kontrollü olarak tüketilmesini sağlayacaktır. Aktif sensörler sayesinde oluşan gıda israfının ve gıda zehirlenmeleri riskinin ve parasal kayıpların büyük oranda azalacağı kabul edilmektedir. Akıllı ambalajlar ise üreticilerin, perakendecilerin, tüketicilerin, nano sensörler ile gıdanın tüm bilgilerini içererek taşıması, taşıma koşulları, raf saklama süresi, sıcaklık bilgilerinin takip edilmesini sağlamaktadır (Ulutepe, 2010).

Nanoteknolojik gelişimler sayesinde gıda kaynaklarının gereksiz tüketimi engellenebilecek, gıdalar daha rahat ve daha etkin bir biçimde piyasada dolaşabilecek, para kayıpları engellenmiş olabilecek, az yatırım ile çok daha etkin ambalajlar üretilebilecektir.

Tekstilde nanoteknoloji uygulamaları, nano-tekstiller olarak adlandırılabilir (OİK, 2001). Nano-tekstil tanımı, nanoteknoloji uygulamaları sonucu elde edilen tüm tekstil yüzeylerini ifade etmektedir (Güneşoğlu, 2006). Tekstillerde life uygulanacak tüm yüzey işlemleri tekstilin özelliğini değiştirebilmektedir.

Nanoteknoloji ve nanomalzemeleri uygun koşul ve miktarlarda kullanarak tekstil ürünlerine;

- Mekanik, kimyasal, fotokimyasal veya termal bozulmalara karşı dayanıklılığın artırılması,
- Su, yağ ve kirlenmeye karşı iticiliğin geliştirilmesi,
- Mor ötesinden kızılötesine elektromanyetik dalgayı soğurma ve ısıtma özelliğinin değiştirilebilmesi,
- Antistatik ve elektromanyetik koruyucu etkiler için elektrik iletkenliğinin geliştirilmesi,
- Aktif ajanların tutulabilmeleri (hareketsizleştirme) ve kontrollü salınımları,
- Buruşmazlık gibi özellikler kazandırılmaktadır (Dağ, 2006).

Ayrıca bu ürünlerin masaj yapma, vücut sıcaklığını dengede tutma ve havalandırma, ateşte yanmama gibi üstün özellikleri vardır. En önemli özelliği ise nefes alıp teri dışarı verebilmeleridir. Ayrıca istenirse, sivrisinek ve zararlı böcekleri de uzaklaştırma özelliği sağlanabilir. Bu ürünler, havadaki sıcaklık değişikliklerine göre vücuda serinlik veya sıcaklık hissi verebilmektedirler. Yıkılırken çok az deterjan kullanılan, yumuşatıcı gerektirmeyen ve en kısa yıkama programında yıkanabilen bu ürünler, yıkama sırasında dahi ekonomi sağlamaktadır (Açık ve Güven, 2012). Nanoteknoloji ile akıllı tekstiller olarak adlandırılan ve yukarıdaki özelliklere sahip olan kıyafetlerin geliştirilmesi konusunda ciddi çalışmalar sürdürülmektedir.

Nanoteknolojinin tıp, gıda ve tekstil alanı dışında bilişim ve iletişim, elektronik, biyoteknoloji, farmakoloji, savunma, makine ve inşaat sanayileri vb. alanlarda da insanlara ve bilime faydalı çok önemli gelişmeleri de vardır. Ayrıca nanoteknoloji ile diğer tüm alanları da kapsayan hijyen konusunda da birçok çalışma yapılmış ve yapılmaya devam etmektedir.

Konutlardaki koruma amaçlı yüzey uygulamalarında kendi kendini temizleyen, kirlenmeyen, su ve kir tutmayan yüzeylerin geliştirilmesi, yanma geciktiricili nano katkı malzemelerinin kullanımı, antimikrobiyel kaplamalar önemli gelişmelerdir.

Boya sanayisinde önemli gelişmeler yaşanmakta ve nanoteknolojiyle birlikte kir tutmayan, antibakteriyel boyalar üretilmektedir. Binaların dış cephelerinin ve iç mekanların kirlenmemesi uzun vadede bakım masraflarından ve enerjiden tasarruf etmek anlamına gelmektedir (Açık ve Güven, 2012).

Ayrıca kendi kendini temizleyebilen camlar yapışan kirin kısa süre içerisinde okside olmasını ve yağmurla birlikte kolayca akıp gitmesini sağlamaktadır. Kendi kendini temizleyen cam, aslında normal camın üzerine dökülmüş ve milimetrenin 50 milyonda biri kalınlığında titanyum dioksit nanopartiküllerinden oluşan bir tabakadır. Yıllar süren çalışmalar sonucu elde edilen bu yeni buluş, camın yüzeyine kalıcı bir “kirlenmezlik” sağlamaktadır. Bu nanopartiküller suyu kendine doğru çekerek, tek tek damlaların, tozun ve kirin birikmesini engellemekte ve güneş ışınlarının foto katalitik etkisiyle adeta

bir temizleyici elemana dönüştürerek her türlü hava koşulunda yüzeydeki kirleri itici bir etki yapmaktadır. Çok kötü hava koşullarının ardından bile, nanopartiküller sayesinde cam kendi yüzeyini birkaç gün içinde tamamen temizleyebilmektedir (Şam ve Denkbaş, 2010).

Günümüzde akıllı tekstil ürünlerinin bazıları ticarileşmiştir. Pazarlaması yapılan akıllı tekstil ürünlerinin bazıları, bakteri üretmeyen tişörtler, leke tutmayan elbiselerdir. Daha önceleri ordudaki özel birlikler ve bazı spor dallarındaki profesyonel sporcular gibi özel ihtiyaçları olanların giysilerinde kullanılan akıllı kumaşlar artık hazır giyim markalarının ürünlerinde de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Balcı, 2006). Akıllı tekstillerin yaygınlaşması sonucu deterjan, çamaşır makinesi gibi birçok sektör derinden etkilenecek belki de tarihe karışacaktır (Coşkun, 2007).

Teknolojide meydana gelen değişikliklerle birlikte yeni ve çeşitli elektrikli ev araçları piyasa çıkmış ve bunları kullanan ailelerin sayısı artmıştır (Şahin ve Erkal, 2008). Ocak, fırın ve mikrodalga fırınlarda nanoteknolojiyle üretilen yağ ve kir tutmayan kaplama uygulamaları ile kolay temizlenebilir yüzeyler üzerinde çalışılmaktadır. Zamanla fırın kapaklarındaki camda kir ve yağ birikmekte ve bunları temizlemek zorlaşmaktadır. Nanoteknoloji ile üretilmiş fırın kapakları ile uzun süreli kullanımlardan sonra kapağı nemli bir bezle silmek yeterli hale gelmiştir. Bu hem temizlik işine fazla zaman ayrılmasının önüne geçmekte hem de daha az su ve deterjan kullanılmasını sağlamaktadır. Bu özelliğinin yanında fırın iç camları yıllarca parlaklıklarını yitirmeden kullanılabilir (biralisveris.com). Türkiye’de piyasaya sürülen ilk nanoteknoloji ürünü, kapı sapları antibakteriyel nano kaplama özelliğine sahip buzdolapları olmuştur. Bu uygulama sayesinde mutfak ortamında kirli eller ile temas eden buzdolabı sapında istenilen hijyenik ortam sağlanabilmektedir (Çakmak, 2009).

Son zamanlarda bulaşık makineleri, çamaşır makineleri ve diğer bazı ürünlerde olduğu gibi buzdolaplarında da, bakteri öldürücü özelliğinden dolayı gittikçe artan bir şekilde küçük gümüş parçacıkları kullanılmaktadır (Göktürk, 2009). Gümüş nano-antibakteriyel ve nano-karbon koku giderici teknolojileri buzdolaplarının yemek saklama ve koruma özelliklerinin gelişmesini sağlamıştır (www.kimyaturk.net). Gümüş iyonlarının antibakteriyel özelliği ile çamaşır makinesinde yıkanan kıyafetlerdeki bakteriler % 99.9

seviyesinde engellenirken, yıkamayı takip eden 30 gün boyunca da çamaşırlarda bakteri barınmamaktadır. Çamaşır makinelerinde nano-gümüş teknolojisi 650 çeşit bakteriyi öldürmektedir (Tosyalı, 2009). Elektrikli süpürgeler evlerde pek çok yüzeyde yer alan tozları ve kirleri ortadan kaldırmak için kullanılmaktadır. Diğer bir kullanım nedeni ise; temizlikte harcanan insan enerjisini en aza indirmesidir (Şahin ve Erkal, 2008). Gümüş iyonlarının anti bakteriyel özelliği süpürgelerin içindeki toz torbaları, hava filtreleri ve motor filtrelerinde uygulamaya geçmiştir. Böylece elektrik süpürgeleri bakteri ve koku birikimini önlemekte ve yayılan havanın kokusuz ve bakterisiz olmasını sağlamaktadır (Oklahoma Nanotechnology Initiative).

Nanoteknoloji uygulamalarıyla üretilen diğer bir tüketim ürün grubu dezenfektanlardır. Dezenfektanlar fabrikalar, konutlar, hayvanların temas ettiği yerler, otel ve pansiyon, eğitim kurumları, alışveriş merkezleri, toplu taşıma araçları, sinema ve tiyatro salonları, restaurant, çocuk oyun mekanları gibi kalabalık mekanlarda, gıda üretimi ve sağlık hizmeti veren tüm alanlarda, mikroorganizma ile kontamine olmuş tüm yüzeylerde kullanılmaktadır. Dezenfeksiyon konusunda nanoteknolojik yaklaşımlar başlıca iki ana grupta değerlendirilebilmektedir. Bunlardan birincisi; dezenfektanların üretiminde nanoteknolojik yaklaşımların kullanılması, diğeri ise nanoteknolojik yaklaşımlarla yüzey geliştirme yöntemlerinin kullanıldığı ve kendi kendini temizleyebilen, bir başka deyimle “akıllı yüzeyler” olarak adlandırılan uygulamalardır (Açık ve Güven, 2012).

Nanoteknoloji ürünü dezenfektanlarda, nanopartiküllerin kullanılmasıyla klasik malzeme üretiminde kullanılan ve pek çok yan etkisi bulunan, çevreye zarar verebilen kimyasalların kullanımı da engellenmekte ve böylece çevre dostu dezenfektanların üretimi ve tüketimi mümkün olabilmektedir. Öte yandan nanoteknoloji ürünü dezenfektanlar, klasik malzemelerden farklı olarak sadece yağı ve kiri çözmekle kalmayıp aynı zamanda temizlenen malzemelere daha hijyenik ve daha kullanışlı (özellikle daha hoş ve uzun süreli koku verebilen) özellikler kazandırabilen nitelikte olmaktadır. Bu durum doğal olarak özellikle beslenme amaçlı kullanılan kapların ve giyim malzemelerinin temizlenmesinde ön plana çıkmaktadır. Ayrıca nanoteknoloji ürünü dezenfektanlar yağ ve kiri kısa sürede giderebilecek enzim ve benzeri kimyasalları-biyokimyasalları klasik malzemelerden daha az kullanmakta ve sahip olduğu çeşitli nanopartiküller ile antibakteriyel özellik göstermektedir. Nanoteknoloji

ürünü sabunlar, temel olarak klasik sabunların fonksiyonlarını yerine getirmekle beraber çeşitli antibakteriyel nanopartiküllerin eklenmesi ile mikrop öldürücü, bazı biyokimyasallarla donatılarak hücre yenileyici, yağı ve kiri daha etkin ve sağlıklı temizleme özelliklerinin artırılması ile ön plana çıkmaktadır (Şam ve Denkbaş, 2010).

Leke ve kir tutmayan kumaş ve yüzeyler, çevreyi kirletmeyen dezenfektanlar, kolayca geri dönüştürülebilen ambalajlar gibi uygulamalar çevre sorununa çözüm olabilecek etkin yeni imkanlar olarak değerlendirilmektedir. Kir tutmayan yüzey kullanımının yaygınlaşmasıyla her alanda temizlik alışkanlıkları da değişecektir. Çevre kirliliğine ve sağlık sorunlarına neden olan deterjan kullanımı azalacak belki de tamamen ortadan kalkacaktır. Bu sayede yüzey temizliği daha az suyla gerçekleştirilecek ve böylece su gibi yaşamsal öneme sahip bir kaynağın daha az tüketilmesi sağlanacaktır (Açık ve Güven, 2012).

2.7. NANOTEKNOLOJİK DEZENFEKTANLAR

2.7.1. Gümüş Sülfadiazin

Metaller genellikle ısıyı ve elektriği iyi ileten parlak yüzeyli elementlerdir. Suda pozitif iyonlar (katyonlar) şeklinde bulunmaları metallerin antimikrobiyal ve toksik etkilerinin temelini oluşturur (McDonnell, 2007). Antiseptik ve dezenfektan olarak kullanılan metaller sıklıkla ağır metallerdir. Ağır metaller, mikroorganizmaların enzimlerindeki sülfidril(-SH) gruplarına bağlanarak, aktif enzim merkezlerini engelleyici ve öldürücü etkisine oligodinamik etki denir. Ağır metallerin, mikrobiyosit veya mikrobiyostatik olmalarına rağmen, sporosidal değildir (Alcamo, 1983) Gümüş, bakır, çinko, titanyum, magnezyum, altın gibi metallerin iyonlarının güçlü bir antibakteriyel etkiye sahip olduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Metal iyonlarının mikroorganizmalara karşı gösterdikleri etkinlik sıralaması “Ag > Hg > Cu > Cd > Cr > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn” şeklindedir (Wells ve diğ., 1995). Antibakteriyel etkiye sahip bu metallerin kullanımında en büyük kısıtlama biyouyumluluklarıdır. Gümüş, antibakteriyel olarak diğer metallere göre daha sık kullanılır. Bunun nedenleri:

- Bakterisidal etkisi olan en etkili metal iyonu olması
- İnsanlara karşı toksik etkisi en düşük olan element olması

- Çoğu malzemeye göre daha ucuz olması
- Kolay üretim işlemidir (Zhao ve Stevens, 1998).

Gümüş metalinin antimikrobiyal aktivitesinin ilk modern tanımı gümüş kaplarda *Aspergillus niger* yetiştiremediğini gözlemleyen Raulin tarafından 1869'da yapılmıştır (Clement ve Jarrett, 1994). Kolloidal gümüşün, Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından yara tedavisi için etkili olduğu 1920'lerde kabul edilmiştir. Daha sonra 1940 yıllarında penisilinin tanıtımından sonra antibiyotikler, bakteriyel infeksiyonların standart tedavisi haline gelmiş ve gümüş kullanımı azalmıştır. Ancak 1960'larda gümüşün yanık tedavisinde yeniden kullanılması gümüşün önemini bir kez daha ortaya çıkarmıştır (Chopra, 2007). Gümüş, uzun yıllardan beri kolloidal gümüş iyonları şeklinde birçok bulaşıcı hastalığın tedavisi için kuvvetli ve doğal bir antibiyotik olarak kullanılmaktadır. Özellikle kolloidal gümüşün atom yapılı olmasından dolayı bakterilerin bağışıklık geliştirememesi ile birlikte yüksek antimikrobiyal aktivitesi ve düşük insan toksisitesi gümüşün yaygın olarak kullanımını olanaklı hale getirmektedir. Çok hücrelilerin enzimleri ilkel tek hücrelilerin enzimlerinden çok farklı olduğu için kolloidal gümüş bu yararlı enzimlere dokunmaz. Böylece kolloidal gümüş; insanlar, sürüngenler, bitkiler ve tüm çok hücreliler için kesinlikle güvenlidir (www.belgeler.com).

İçinde bulunduğumuz yüzyılda nanoteknoloji, metalleri nano boyuta indirgeyerek, fiziksel, kimyasal ve optik özelliklerini değiştirmedeki kabiliyetine bağlı olarak büyük bir hızla gelişmektedir. Nanoteknolojinin gelişimi, organik ve inorganik nanokompozitelerle birleşmiş antibakteriyel aktiviteli polimerlerin değerli özelliklerinin formasyonu yoluyla gümüşün kullanımı için yeni bir fırsat ortaya çıkarmıştır (Özaslan, 2009). Nano ölçekli metal partiküllerin biyoaktivitesi ve moleküler problemler olarak kullanımı ilginin giderek arttığı araştırma alanları arasında yer almaktadır. Normal metal ile karşılaştırıldığında geniş yüzey alanına ve yüksek reaktiviteye sahip nano ölçekli metal partiküller dikkate değer fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler gösterir (Lok ve diğ., 2007). Gümüşün sahip olduğu özellikler ve kullanım alanları onu en çok araştırma yapılan metallerden biri olmasını sağlamıştır (Popa ve diğ., 2007). Gümüş metali, sahip olduğu kimyasal kararlılık, yüksek sıcaklık, elektrik iletkenliği ve katalitik

özellikleri sayesinde çok yüksek bir ilgiye sahiptir. Son yıllarda gümüş iyonları birçok araştırmacını ilgisini, yarı iletken fotokatalizör nano kristalleri üzerine olan özgün etkileri ve antibakteriyel aktiviteleri nedeniyle çekmiştir (Sobana ve diğ., 2006). Gümüş nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarda antimikrobiyal etki gösterdikleri, antibakteriyel özelliklerin nanopartiküllerin yüzey alanı ile ilişkili olduğu, partikül boyutunun küçülmesinin dolayısıyla yüzey alanının artışının antibakteriyel aktivite için daha fazla etki sağladığı belirlenmiştir (Baker ve diğ., 2005)

Gümüş, üç farklı yolla hücreler üzerinde etkili olmaktadır. Bu yollardan ilki gümüş nanopartiküllerinin direkt olarak hücre membranına zarar vermesidir. Gümüş nanopartikülleri hücre membranına tutunmakta ve bakterinin içine girebilmektedir. Gümüş bakterinin sitoplazma membranında bulunan sülfür içeren proteinler ile etkileşime girmektedir. Bu etkileşim sonucunda sitoplazma zarı zarar görmekte ve hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. İkinci yol ise serbest gümüş iyonları ATP, DNA gibi fosfor içeren komponentlerle etkileşime girmektedir. Bunun sonucunda ATP üretimi ve DNA replikasyonunda bozulmalar meydana gelmektedir. Üçüncü yol ise gümüş nanopartiküllerinin hücre içindeki solunum zincirine saldırması ile gerçekleşmektedir. Yukarıda bahsi geçen aktivitelere sahip olan gümüş bu yollarla antibakteriyel, antiviral ve antimikotik etki gösterebilmektedir (Dallas ve diğ., 2011; Kumar ve Munstedt, 2005; Lok ve diğ., 2006; Smetana ve diğ., 2008; Asharani ve diğ., 2009; Banerjee ve diğ., 2010; Marambio-Jone ve Hoek, 2010; Kim ve diğ., 2008; Inoue ve diğ., 2002; Hwang ve diğ., 2008).

Fox ve Modak (1974), gümüşün *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *Klebsiella* sp. gibi bakterilere karşı etkili olduğunu ayrıca antifungal ve antiviral özelliğe de sahip olduğunu vurgulamıştır. Sondi ve Salopek-Sondi (2004), gümüş nanopartiküllerin Gram (-) bakteriler için model olarak seçtiği *E. coli*'ye karşı antimikrobiyal etkilerini araştırmış ve gümüş nanopartiküllerin oluşturduğu kümeleşmeyi ve ölü bakteri hücrelerini gözlemlemiştir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2007). Yamanaka ve diğ.(2005), gümüş iyonlarının ribozom ile ilişki kurduğunu ve ATP üretimi için gerekli protein ve enzimlerin ekspresyonuna neden olduğunu belirtmiştir. Panacek ve diğ. (2006), gümüş nanopartiküllerin metisiline dirençli *S. aureus* gibi direnç kazanmış Gram (+) bakterilere ve Gram (-) bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal ve bakterisidal

aktivitesini bulmuştur. Nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitenin boyuta bağlı olduğunu ve 25 nm boyutunda en iyi antibakteriyel etkiyi gösterdiğini belirtmiştir (Panaček, 2006). Kim ve Kuk (2007), *E. coli*, *S. aureus* ve mayalara karşı gümüş iyonlarının antibakteriyel etkisini göstermiştir.

Diğer çalışmalarda da *Bacillus megaterium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* ve *Shigella sonnei* kullanılmış ve gümüş nanopartiküllerin *P. aeruginosa*'ya karşı olduğu gibi bu bakterilere karşı da güçlü antibakteriyel etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (Bhupendra ve diğ., 2010; Shahverdi ve diğ., 2007). *In vitro* yapılan başka bir araştırmada ise değişik konsantrasyonlarda ticari olarak kullanılan gümüş içeren dezenfektanların emdirildiği kumaşların 10^5 KOB *E. coli* ve *Proteus vulgaris*'i hemen *Enterobacter cloacae*, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'yi ise 30 dakika ile 24 saat içinde inhibe ettiği saptanmıştır. Gram (+) bakterileri ise en erken 24 saat sonra inhibe ettiği belirlenmiştir (Ip ve diğ., 2006). Başka bir araştırmada koloidal gümüş nanopartiküllerinin 2 µg /mL konsantrasyonda bile birçok antibiyotige dirençli olan metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (*Staphylococcus epidermidis*), vankomisin dirençli *Enterococcus faecium*, ve ESBL-pozitif *K. pneumoniae*'ye oldukça etkili olduğunu *in vitro* olarak saptanmıştır (Panaček ve diğ., 2006). Ki-Young ve diğ. (2007) tarafından yapılan bir araştırmada da değişik konsantrasyonlarda gümüş nanopartiküllerinin *B. subtilis* ve *E. coli* üzerinde etkinliği incelenmiş ve 70 µg/mL konsantrasyondaki gümüş nano-partiküllerinin mikroorganizmalar üzerine etkili olduğu, *B. subtilis*'in ise gümüş *E. coli*'den daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Baker ve diğ. (2005), gümüş nanopartiküllerin sıvı ve katı besiyerinde *E. coli*'ye karşı antibakteriyel aktivitesinin düşük konsantrasyonlarda bile etkili olduğunu ve 8 µg/cm² konsantrasyonda sitotoksik olduğunu göstermiştir. Athirah ve diğ. (2012), ilaçlara direnç kazanmış *P. aeruginosa* suşuna karşı gümüş iyonlarının antimikrobiyal etkisini disk difüzyon ve sıvı dilüsyon teknikleri kullanarak çalışmıştır ve minimum inhibitör konsantrasyon (MIK) değerinin 15 µg/ml olduğunu saptamıştır.

Atimikrobiyal etkiye sahip olan gümüş nanopartikülleri çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu alanlar;

- Hastane odaları ve ameliyat giysileri;

- Ameliyat elbiseleri ve ameliyathane döşemeleri
- Sağlık personeli üniforması, hastane odalarının döşemeleri, banyo havluları, perdeler
- El sabunu
- Cerrahi maske
- Yara tedavisi
- Pansumanda polietilen nefes alabilen filmler
- Oyuk yaralarda hidrojel poliüretan köpük
- Kişisel temizlik
- Pantolon ve gömleklerde koku önleyici
- Çoraplarda ayak kokusunu önleyici
- Cildin tahriş olmasına ve şiddetli ağrılara karşı çocuk bezlerinde
- Sağlık araçları, vücuda takılan parçalar (implantlar)
- Damar içine girip besin vermek ya da film çekmek için kullanılan ince uzun boruların kaplanması
- Yumuşak dokulara takılan parçalar ve tendonların onarılması
- Mesleki deri hasarlarını önlemek için eldiven astarları
- Saklama ve muhafaza işlemleri
- Antik kitaplar, el yazmaları ve haritaları mantar ve kurtlardan korumak
- Gözenekli duvarların yalıtım malzemelerinde mantar ve küflerin hasarını engellemek
- Ağaç yapıların iç ve dış duvarlarını mantar ve küflerin hasarından korumak
- Çevre
- Banyo ve mutfak döşemelerinde küflere karşı dolgu maddesi olarak
- Yiyeceklerin saklandığı alanlarda bozulmayı ve zehirlenmeyi önlemek
- Yiyecek paketleme
- Yiyecek kapları ve paketleme materyallerinde bozulmayı önlemek
- Kozmetik
- Sivilce ve akne jellerinde (www.jrnanotech.com/applications.html.2007).

Deneyde kullandığımız nanoteknolojik dezenfektanlardan biri de gümüşün türevlerinden biri olan gümüş sülfadiazindir. Gümüş sülfadiazin, sülfadiazinin antibakteriyel etkisi ile gümüşün oligodinamik etkisinin birleşimi ile hazırlanmaktadır. Su bazlı kremlerin içinde % 1 oranında bulunmaktadır. Yanık ve yara enfeksiyonlarının tedavisi için ve bu enfeksiyonları önlemek için geniş spektrumlu antimikrobiyal madde

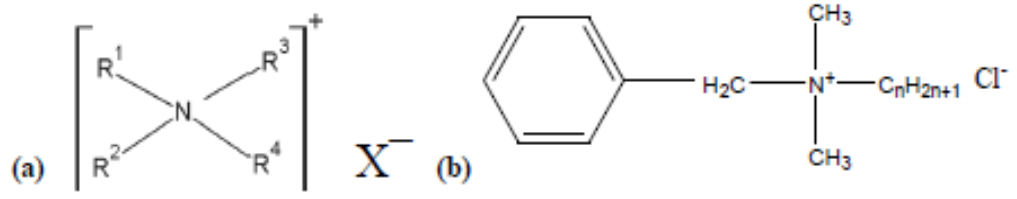
olarak kullanılmaktadır. Yara ile etkileşime girerek, yarada gümüş rezervi olarak gümüş iyonları yayma işlevi görür. Bütün sülf grubu ilaçlar gümüş ile kombine edilerek test edilmiş ve gümüş sülfadiazinin en etkili olduğu görülmüştür (Atiyeh ve diğ., 2007). Gümüş sülfadiazin bakterilerin çoğuna karşı etkili bir ajandır. Kimyasal etkisini hücre membranına bağlanıp matriks metalloproteinazlarını inhibe ederek göstermektedir (Mataracı ve Gerçeker, 2011; Carr ve Rosenkranz, 1972; Warriner ve Burrell, 2005).

Carr ve Rosenkranz, gümüş sülfadiazinin hücre membranına bağlandığını ve membrana zarar verdiğini belirtmiştir (Carr ve Rosenkranz, 1972) Charles ve diğ. (1974), gümüş sülfadiazinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için kısmen inhibisyon konsantrasyonu 5 $\mu\text{mol/ml}$ ve en etkili olduğu inhibisyon konsantrasyonu 15 $\mu\text{mol/ml}$ olduğu belirtmiştir. Nano gümüş ile ilgili birçok araştırma olmasına rağmen gümüş sülfadiazin ile yapılan araştırmalar sınırlı kalmıştır.

2.7.2. Benzalkonyum Klorür

Kuaterner amonyum bileşikleri dezenfektan amacıyla kullanılan en iyi bilinen antimikrobiyal etkili ajan olup, genel kimyasal formülü şekil 2.7’de gösterildiği gibi 1 azot atomuna 4 alkil grubunun bağlanması ile oluşmuşlardır. Bu yapıdaki R1, R2, R3, R4; alkil, metil, benzil ve setilbenzil gibi organik gruplardır, X^- ise genellikle brom ya da klor gibi bir anyondur (Moore ve Payne, 2004). Kuaterner amonyum molekülünün kation olarak yüklü kısmı aktif olan kısımdır, anyon kısmı ise hidrofilik özellik gösterir. Bu yüzden bu bileşikler genellikle ‘kationik yüzey aktive edici maddeler’ diye tanımlanır. Kationik kısım hidrofobiktir (Troller, 1993).

Kuaterner amonyum bileşiklerinin yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olabilmesi için R gruplarından en az birinin C8-C18 arasında bir zincir uzunluğuna sahip olması gerekmektedir (Moore ve Payne, 2004). Kuaterner amonyum bileşikleri, benzalkonyum klorür, setalkonyum klorür, setilprimidinyum klorür, miristalkonyum klorür ve polisiti kapsamaktadır. Benzalkonyum klorür de alkil benzil dimetil amonyum klorür ile C8-C18 arası alkil gruplarının karışımından oluşur ve genel formülü Şekil 2.7’de gösterildiği gibi $[C_6H_5-CH_2-N(CH_3)_2R]Cl^+$ dir. (R= C₈H₁₇-C₁₈H₃₇) (Moore ve Payne, 2004). Bu yapı moleküle yüksek bir dezenfektan aktivitesi kazandırmaktadır.



Şekil 2.7: Kuaterner amonyum bileşiklerinin genel yapısı (a) ve benzalkonyum klorürün kimyasal formülü (b).

Benzalkonyum klorür katyonik yüzey aktif bir maddedir. Doğada berrak sarı veya saman renginde sıvı, beyaz veya sarı amorf toz şeklinde veya jel kıvamında bulunmaktadır. Higroskopik ve sabunumsudur. Alkolde ve suda çok iyi çözünür, sulu çözeltisi alkali reaksiyon verir, çalkalandığında köpük oluşturur. Erime noktası 241.02 °C, yoğunluğu 0.94 g/ml'dir (Belousova ve Shkidchenko, 2004; Watanabe ve diğ., 1998).

Renksiz, kokusuz, boyamayan, aşındırıcı olmayan, ucuz ve toksik etkileri çok az olan maddelerdir. En iyi dezenfektan etkiyi pH 6 üzerinde gösterir. Alkalilik arttıkça aktivitesi artar. Emülsiyonlarda düşük aktivite gösterir ve pH 3.5'da inaktive olur. Organik madde varlığında etkileri çok azalır. Diğer katyonik yüzey aktif ajanlar gibi sabun ve diğer anyonik ajanlarla uyumsuzdur. Nitrik asit ve nitratlar benzalkonyum klorürün çökmesine neden olur (Haliki ve diğ., 2004; Steinberg, 2006; Watanabe ve diğ., 1998).

Kuaterner amonyum bileşiklerinin hedefi, bakterilerde sitoplazmik membran, mayalarda plazma membranıdır. Benzalkonyum klorür, düşük konsantrasyonda bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonda ise bakterisidal etkilidir. Benzalkonyum klorür, düşük konsantrasyonda dış membran hasarı ile sitoplazmik materyalde sitolitik sızıntıya neden olarak, genel membran geçirgenliğinin bozulmasında rol oynamaktadır. Yüksek konsantrasyonda ise karboksilik grupları hedef alır ve bakteri sitoplazmasında genel pıhtılaşmaya neden olmaktadır (Fazlara ve Ekhtelat, 2012). Ardından hücre içi düşük molekül ağırlıklı maddeler dışarı sızar. Protein ve nükleik asitleri degrade eder ve otolitik enzimler tarafından hücre lizisi meydana gelir. Kısaca bakterilerde yapı ve sitoplazma membranı bütünlüğünü bozar. Sferoplast ve protoplast lizisine neden olur (Saraç, 2009).

Kuaterner amonyum bileşikleri hidrofilik ve hidrofobik gruplara sahiptir. Böylece bakteri ile iyonik ve hidrofobik etkileşimler meydana getirebilmektedirler. Bakteri hücrelerinin dış yüzeyi genellikle iki değerlikli katyonların varlığı ile stabilize edilen net bir negatif yük taşır. Bu Gram (+) bakterilerin sahip olduğu teikoik asit ve polisakkarit elementleri ile Gram (-) bakterilerin lipopolisakkarit yapısı ve sitoplazmik membranları ile ilişkilidir. Birçok antimikrobiyal ajan katyoniktir ve bakteri hücreleri için yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Benzalkonyum hidrofobik özelliği, sürfaktan yetenekleri ve pozitif yükü, penetrasyon ve porlu yüzeye yapışmaları için yüksek kapasite sağlar (Fazlara ve Ekhtelat, 2012)

Benzalkonyum klorüre Gram (+) bakteriler, Gram (-) bakterilere göre daha duyarlıdır. Bazı Gram (-) bakteriler özellikle *Pseudomonas cepacia*'nın benzalkonyum klorür çözeltilerinde ürediği, hastane enfeksiyonlarına ve salgınlara neden olduğu bilinmektedir. Bakteri sporları ve bazı virüsler üzerine etkisiz, küfler üzerine az etkili, mantar enfeksiyonlarında ise sınırlı etkiye sahiptir (Haliki ve diğ., 2004; Steinberg, 2006; Watanabe ve diğ., 1998; Quintana ve diğ., 2005).

Benzalkonyum klorürün antiseptik çözeltisi yavaş etki gösterir, deride bulunan flora bakteri sayısını 7 dakikada yarıya indirir, 25 dakikada ise bakteri sayısının % 90 azaltılmasını sağlar (Reilly, 2000).

Bir kuaterner amonyum bileşiği (QAC) olan benzalkonyum klorür, birçok farmasötik formülasyonda, kozmetiklerde, ticari dezenfektanlarda, endüstriyel sıhhileştirici maddelerde ve gıda koruyucularında aktif madde olarak kullanılmaktadır (Bilgin, 2011). Temizleyici maddelerle karıştırılarak hem dezenfeksiyon, hem de temizleme yapmak üzere hastanelerde yerlere, duvarlara, mobilyalara, alet yüzeylerine ve tuvaletlere uygulanırlar. Düşük toksisite ve deterjan özellikleri bunları çok iyi sanitasyon araçları yapar (Özbakkaloğlu, 2003).

Kritik ve yarı kritik tıbbi gereçlerin dezenfeksiyonunda kullanılmazlar. Cerrahi el yıkamasında ve tıbbi aletler üzerine germisid etkili olarak kullanılırlar. Açık olmayan yaralarda ve yaralı olmayan derinin ameliyat öncesi antisepsisinde % 0.1- 0.2, mukoza zarlarına % 0.1, mesane ve üretra lavajlarında % 0.005 oranındaki çözeltileri kullanılır.

Benzalkonyum klorür, amonyak üreten mikroorganizmaların neden olduğu çocuk bezinden kaynaklanan pişigin tedavisinde kullanılan kremlerin ve yüzeysel ağız ve boğaz enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan pastillerin formülasyonunda da bulunmaktadır. İngiltere’de % 0.01’lik benzalkonyum klorürün göz damlalarında kullanılan dört koruyucudan biri olduğu resmi olarak kabul edilmiştir (*Pharmaceutical Codex 1994, British Pharmacopoeia, 2002*). Benzalkonyum klorür ayrıca sert kontakt lens temizleme çözeltilerinde % 0.001-0.01 konsantrasyonlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Bilgin, 2011) .

Çoğu kuaterner amonyum bileşiği gibi benzalkonyum klorür de cilde ve göze iritan etki gösterebilir, epidermise zarar verebilir ve alerjiye neden olabilir. Buruna ve göze uygulanacak çözeltileri 1/5000 oranında seyreltilmelidir (Haliki ve diğ., 2004; Steinberg, 2006; Watanabe ve diğ., 1998; Quintana ve diğ., 2005). Benzalkonyum klorür anyonik maddeler, polisorbattlar ve lesitin tarafından nötralize olur. (Steinberg, 2006).

Daha önce yapılmış benzer çalışmalarda, benzalkonyum klorürün, *S. mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Dinç, 2012). Fazlara ve Ekhtelat (2012) yapmış oldukları çalışmada *S. aureus* ve *E. coli* için benzalkonyum klorürün minimum inhibitör konsantrasyonun (MIK) 40 mg/L, minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) 45 mg/L, *Pseudomonas aeruginosa* için ise MIK değerinin 60 mg/L ve MBK değerinin 80 mg/L olduğu belirtmişlerdir.

Berker (1989)’in yaptığı bir çalışmaya göre, % 0.05’lik konsantrasyondaki kuarterner amonyum bileşiğinin 2.5 dakika içinde serbest haldeki *E.coli*, *P.mirabilis*, *S. aureus*, *S. faecalis* ve *B.subtilis*’e karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Yüksek ve diğ., 2001).

Kuda ve diğ. (2008) paslanmaz çelik yüzeye yapıştırılmış *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* hücrelerinin benzalkonyum klorüre karşı direncini incelemiş ve *E. coli* ve *S. aureus* ’un 10 dakikada 0.5 mg/ml konsantrasyonla 2 ile 6 log KOB/plak düştüğünü, *P. aeruginosa* ’nın 2.0 mg/ml konsantrasyonda inaktif olduğunu göstermiştir.

Erbay ve diğ. (2002) benzalkonyum klorürün % 1'lik solüsyonu, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarına karşı 5 ve 20. dakikalarda % 100 , *P.* suşlarına karşı 1. dakikada % 40, 5. dakikada % 80 etkin olduğunu gözlemiştir (Özsoy ve diğ., 2001) 10 gr/100 ml'lik benzalkonyum klorürün 1/100'lik dilüsyonunun beş dakikalık süre içerisinde *P. aeruginosa* suşlarını elimine ettiğini belirlemiştir.

2.8. ALAMAR BLUE BOYAMA YÖNTEMİ

Biyofilmlerin klinik önemi göz önüne alındığında, bakteriyel biyofilmin biyosit duyarlılığını araştırmak için standart bir yöntemin olmayışı şaşırtıcıdır. Çeşitli yöntemler mevcuttur ancak bu yöntemler pahalı reaktif ve ekipmanlar, uzun işlem süreleri ve uyumsuzluk gibi nedenlerden dolayı sınırlanmıştır ya da canlılık yerine biyofilm kütlelerini ölçen yöntemlerdir (Amorena ve diğ., 1999; Baillie ve Douglas, 1999; Ceri ve diğ., 1999; Hodson ve diğ., 1995; Kharazmi ve diğ., 1999; Polonio ve diğ., 2001; Ramage ve diğ., 2001). Bakterilerin kristal viyole ve safranin ile boyanma yöntemi, biyofilm kütlelerini ölçüp duyarlılık değerlendirilmesinin yapıldığı yaygın bir yöntemdir (Balaban ve diğ., 2003; Polonio ve diğ., 2001). Fakat bu yöntem bize bakterilerin canlılıkları hakkında hiçbir bilgi vermez. Biyofilm duyarlılığını ölçen yaygın olan diğer bir yöntem ise mililitredeki bakteri sayısını tespit eden kazıma, vorteks ve sonikasyondur (Spoering ve Lewis, 2001; Stone ve diğ., 2002; Walters ve diğ., 2003). Bu yöntemin de ciddi sınırlamaları vardır. Bunlar; biyofilm küme halinde olduğu için ayırma işleminin zor olması, zahmetli ve antibiyotik harcamasının fazla olmasıdır. Mantarlar için yaygın olan yöntem XTT [2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide] redüksiyon yöntemidir ve bu bakteri biyofilmleri için de kullanılabilir (Adam ve diğ., 2002). XTT redüksiyon metabolik aktiviteyi ölçerken bir elektron eşleme reaktif maddesi ilave edilmesini gerekir. Ayrıca bu reaktifler araştırmacı ve hücreler için toksiktir.

Açıkcası, canlılığı tespit etmek için kolay, düşük maliyetli ve tekrarlanması mümkün olan ve biyofilm duyarlılığını ölçen bir yöntem ihtiyacı vardır. Alamar blue boyama yöntemi, metabolik aktivite tespitine dayanan kolorimetrik / florometrik büyüme indikatörü içerir. Redoks indikatörü olan Alamar blue yaygın olarak, planktonik bakteri ve mantar duyarlılık testlerinde, memeli hücre kültürü sitotoksite testlerine

kullanılmaktadır (Back ve diğ., 1999; Baker ve Tenover, 1996; Collins ve Franzblan, 1997; Page ve diğ., 1993; Pfaller ve Barry, 1994; To ve diğ., 1995). Alamar blue boyama testi kolay, tek adımdan oluşan prosedüre sahip ve yüksek verimlilik gösteren bir testtir. Alamar blue suda çözünebilir olduğundan diğer yaygın yöntemlerde ihtiyaç duyulan yıkama, fiksasyon ve ekstraksiyon gibi işlemlere gerek duyulmaz. Alamar blue araştırıcı ve uygulanan hücreler için toksik değildir bu nedenle çalışılması güvenlidir ve test hücrelerinin metabolizmalarına müdahale etmez. Alamar blue, çok uzun inkübasyonun mümkün olduğu kinetik çalışmalarda bile stabildir (Pettit ve diğ., 2005).

Hücrelerin bulunduğu örneğe alamar blue boyası eklendiğinde, boyanın okside formu sitosole girer ve FMNH₂, FADH₂, NADH, NADPH ve sitokromlardan gelen elektronların oluşturduğu mitokondrideki enzim aktivitesi tarafından indirgenmiş forma dönüştürülür (Al-Nasiry, 2007). İndirgenme ile alamar blue floresan yayar ve renk değişimine uğrar. Değişimin oranı hücre canlılığının oranını belirtir. Üremenin devam etmesi indirgenmiş bir ortam oluştururken, üremenin azalması oksidatif bir ortam oluşturur. Oksitlenmiş ortam floresan içermez ve mavi renkli, redüklenmiş ortam ise floresan içerir ve pembe renklidir. Kısacası eğer ortamda bir üreme gerçekleşiyorsa mavi renk olan boya redüksiyon ile pembe renge dönüşür. Renk değişimi ile veriler gözle görülebilir ya da duyarlılık artışı absorban bazlı veya floresan bazlı araçlarla ölçülebilir (Pettit ve diğ., 2005).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. BAKTERİ SUŞLARI

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Temel ve Endüstriyel Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Klebsiella pneumoniae* suşları kullanılmıştır. Bu suşlar insan sağlığı açısından oldukça zararlı enfeksiyonlara ve endüstriyel açıdan da önemli ekonomik kayıplara sebep olduğu için çalışmamızda test edilmiştir.

3.2. DEZENFEKTANLAR

Çalışmada kullanılan Nasiol markalı nano dezenfektanların içinde bulunan aktif maddeler olan benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin kimyasalları Artekya Ltd. Şti. tarafından temin edilmiştir.

3.3. BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.3.1. Nutrient Agar

Pepton	5.0 g
Et özeti	3.0 g
Agar	12.0 g
Distile su	1000 ml
pH	7.0±0.2

121 °C'de 15 dk steril edilir.

3.3.2. Nutrient Broth

Pepton	5.0 g
Et özeti	3.0 g
Distile su	1000 ml

pH 7.0±0.2
121 °C’de 15 dk steril edilir.

3.3.3. Nötralizan Çözeltiler

Aşağıda belirtilen 1-3 numaralı nötralizan konsantrasyonları gümüş sülfadiazin, 4 numaralı nötralizan konsantrasyonları benzalkonyum klorür için seçilmiş ve bu çözeltiler distile su içerisinde hazırlanmıştır.

Nötralizan No. 1: % 1 sodyum tiyosülfat ve % 0.5 sodyum tiyoglikolat

Nötralizan No. 2: % 2.5 sodyum tiyosülfat ve % 1 sodyum tiyoglikolat

Nötralizan No. 3: % 5 sodyum tiyosülfat

Nötralizan No. 4: % 3 Tween 80 ve % 0.3 Lesitin (Şanlı Yürüdü, 2004)

3.3.4. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Sulandırım sırasında hücreler için izotonik ortam sağlaması amacıyla distile su ile % 0.85 NaCl hazırlanmıştır.

3.3.5. Alamar Blue Boyası

Üremenin artmasıyla sahip olduğu oksidasyon-redüksiyon (redoks) indikatörünün redüklenerek floresan yayma ve renk değiştirme özelliğine bağlı olarak ortamda canlı hücrelerin varlığını tespit etmek için kullanılmaktadır.

Hazır olarak satın alınan alamar blue boyası (Invitrogen) +4 °C’de saklanmıştır.

3.3.6. 5-Cyano-2, 3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC)

Aktif olarak solunum yapan hücrelerin epifloresan mikroskopta görüntüleyerek sayılabilmesi için kullanılmaktadır.

50 mM stok solüsyon için 50 mg tüpe 3209 µl filtre edilmiş bidistile su eklenip 100 µl hacimlerde Eppendorf tüplerine paylaştırılarak -20 °C’de saklanmıştır.

3.3.7. 4,6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)

DNA’ya bağlanma özelliğinde olan bu boya ile toplam hücre sayısının epifloresan mikroskopta tespit edilmesi sağlanmıştır.

1 mg/ml stok solüsyon için 50 mg DAPI, 50 ml filtre edilmiş bidistile su içinde çözülmüş ve işlemin ardından filtre edilmiş bidistile su ile 50 kat sulandırarak 20 mg/l'lik çalışma süspansiyonu elde edilmiştir. Elde edilen bu süspansiyon Eppendorf tüplerine bölünerek -20 °C'de saklanmıştır.

3.3.8. pH Çözeltilerinin Hazırlanışı

Çalışmada kullanılacak pH 4, 7 ve 9'luk süspansiyonlar için dezenfektanlar içerisine hazırlanan 1 ve 5M'lık KOH ve HCl çözeltilerinin eklenmesiyle uygun pH değerleri elde edilmiştir.

3.3.8.1. 1M KOH çözeltisi

KOH	56.1 g
Distile su	1000 ml

3.3.8.2. 5M KOH çözeltisi

KOH	280.55 g
Distile su	1000 ml

3.3.8.3. 1M HCl çözeltisi

HCl	36.46 g
Distile su	1000 ml

3.3.8.4. 5M HCl çözeltisi

HCl	182.3 g
Distile su	1000 ml

3.3.9. % 3 Tuz çözeltisi

NaCl	3 g
Distile su	100 ml

3.4. BAKTERİ VE BİYOSİT SÜSPANSİYONLARININ HAZIRLANMASI

3.4.1. Deneylerde Kullanılan İnokulumların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının Petri kutusundaki nutrient agar besiyerine azaltma yöntemi ile ekimi yapılmış, 37 °C'lik

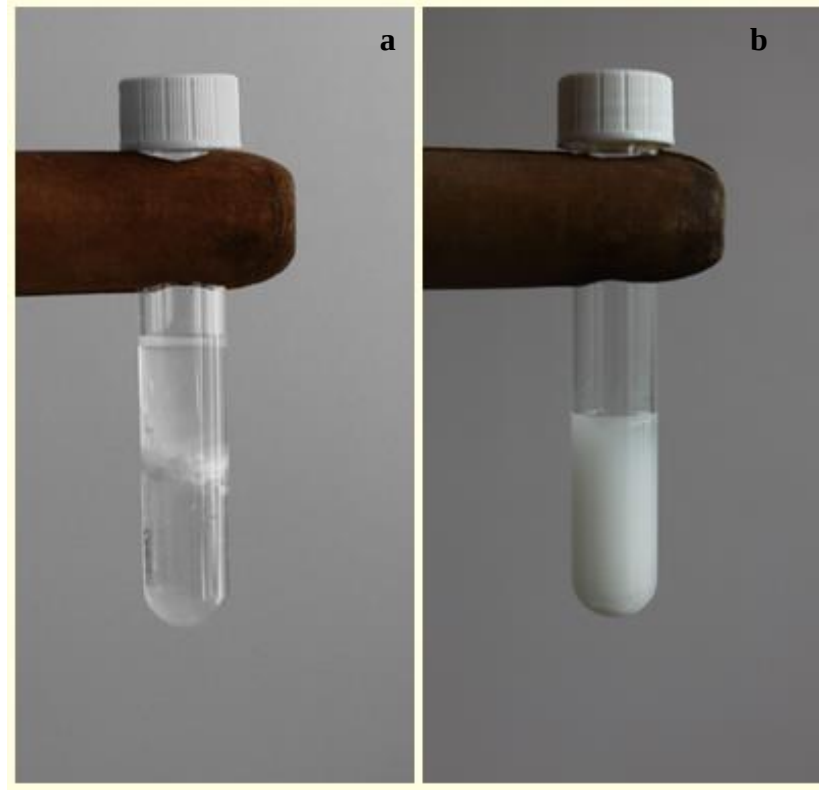
etüvde bir gece bekletildikten sonra oluşan kolonilerden 10 ml nutrient broth bulunan tüpte süspansiyon hazırlanmıştır. Tüpteki mikroorganizma sayısı Mc Farland 0.5 standartlarına göre spektrofotometrede 600 nm’de 0.132 absorbans veren 10^8 kob/ml olarak ayarlanmıştır.

3.4.2. Bakteri Biyofilmlerinin Hazırlanması

Bakteri suşlarının nutrient agarda bulunan 24 saatlik kolonilerinden 3.4.1. kısmında belirtildiği şekilde 10^8 kob/ml’lik süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyon $1/10^6$ oranında seyreltilerek 10^2 kob/ml olarak hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 200’er µl alınarak 96 kuyucuklu mikropalakalara dağıtılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda planktonik olarak bulunan bakteri hücrelerini ortadan kaldırmak için üst sıvı alınıp 24 saatlik biyofilm tabakası deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

3.4.3. Biyosit Çözeltilerinin Hazırlanması

Firmadan hazır olarak gelen ve içerisinde % 0.5’lik gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür ile birlikte başka kimyasalların da bulunduğu iki ayrı biyosit çözeltileri deneylerde kullanılmak üzere son konsantrasyonları % 0.4, % 0.3, % 0.2 olacak şekilde % 96’lık etanol ile sulandırılarak hazırlanmıştır. Fakat her iki biyosit içerisinde bulunan % 96’lık etanol ve diğer kimyasal maddeler bakteriler için çok kısa sürede bakterisidal etki gösterdiğinden gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorürün bakterisidal etkisi anlaşılamamıştır. Bunun üzerine hazır olarak gelen dezenfektanlar distile su ile sulandırılmıştır. Fakat bu da homojen olan gümüş sülfadiazinin 3 katmanlı bir sıvıya dönüşmesine neden olmuştur (Şekil 3.1). Ayrıca içerisinde bulunan diğer kimyasalların sahip olduğu ağır koku nedeniyle bu halinin kullanılmamasına karar verilmiştir. Bunların sonucunda gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorürün bakterisidal etkisini tam olarak anlamak amacıyla firma ile görüşülüp firmadan saf gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorürün bulunduğu saf solüsyon istenmiş ve distile su ile homojen bir çözelti hazırlanarak kimyasalların su ile reaksiyona girmemesi için kısa sürede kullanılmıştır. Benzalkonyum klorürün bulunduğu biyositin son konsantrasyonu % 0.5, gümüş sülfadiazinin ise % 4 olarak hazırlanmıştır.



Şekil 3.1: Etanolün bulunduğu gümüş sülfadiazinin (a) ve saf gümüş sülfadiazinin (b) distile su ile sulandırılmasıyla oluşan karışım.

3.5. VALİDASYON TESTLERİ

Çalışma süresinde kullanılan bakterilerin deneylerde seçilen koşullardan, nötralizandan ve test prosedüründen olumsuz yönde etkilenmediğini doğrulamak ve çalışmada kullanılan dezenfektanları etkin bir şekilde nötralize edebilen nötralizanın seçimini sağlamak amacıyla CEN'in (European Committee for Standardisation) dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin tayin edilmesinde önerdiği EN 1276 standardında bildirilen validasyon testleri uygulanmış, sonuçlar bu standardın önerdiği kriterler doğrultusunda değerlendirilmiştir (CEN, 1997; Mataracı, 2010)

3.5.1. Nötralizan Etkinlik Testi

Deney, hazırlanışı 3.3.3. kısmında bildirilen benzalkonyum klorür için 1 ve gümüş sülfadiazin için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış nötralizanlar arasından dezenfektanların üretimde kullanılan en yüksek konsantrasyondaki çözeltisini etkili bir şekilde nötralize edebilen nötralizanı saptamak amacıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla, dezenfektanların % 0.5 oranında aktif madde içeren çözeltilisinden 1 ml alınıp 8 ml nötralizanın bulunduğu tüpe ilave edilmiş, 5 dakika bekletildikten sonra hazırlanışı 3.4.1. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml’lik bakteri süspansiyonu 10^{-5} oranında seyreltilerek, hazırlanan 10^3 kob/ml’lik bakteri süspansiyonundan 1 ml ilave edilip 5 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda karışımdan 100’er µl alınarak iki ayrı nutrient agar besiyerine yayılmıştır. 37 °C’de 24 saat bekletildikten sonra koloni sayımı yapılarak nötralize edici maddelerin dezenfektanları nötralize edip etmediği 3.5.3 kısmında belirtilen nötralizanın etkinlik validasyonu (NE) için istenen kriterlere uygunluğu saptanarak belirlenmiştir (Mataracı, 2010).

3.5.2. Nötralizan Toksisite Testi

Deney, hazırlanışı 3.3.3. kısmında benzalkonyum klorür için 1 ve gümüş sülfadiazin için 3 farklı konsantrasyonda hazırlanmış nötralizanlar arasından çalışmada kullanılan bakteri üzerinde toksik etkisi olmayan nötralizanı saptamak amacıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla, içinde 1 ml distile suyun bulunduğu tüpe 8 ml nötralizan ilave edilmiş, ardından deney tüpüne hazırlanışı 3.4.1. kısmında bildirilen 10^8 kob/ml’lik bakteri süspansiyonu 10^{-5} oranında seyreltilerek hazırlanan 10^3 kob/ml’lik bakteri süspansiyonundan 1 ml ilave edilip, 5 dakika bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda karışımdan nutrient agara iki tekrarlı 100 µl yayma ekim yapılmıştır. 37 °C’de 24 saat bekletildikten sonra koloni sayımı yapılarak nötralize edici maddelerin toksik olup olmadığı 3.5.3. kısmında bildirilen nötralizanın toksisite validasyonu (NT) için istenen kriterlere uygunluğu saptanarak belirlenmiştir (Mataracı, 2010).

3.5.3. Validasyon Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

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

C = Bakteri süspansiyonundaki kob/ml sayısı;

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

NE = Nötralizan etkinlik validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı;

NT değerinin 0.5 katına eşit veya büyük olmalı

NT = Nötralizan toksisite validasyonunda elde edilen kob/ml sayısı;

C değerinin 0.05 katına eşit veya büyük olmalı.

Nötralizanın USP 29 standardına göre etkili kabul edilmesi için *NE*'nin *NT*'ye bölünmesiyle elde edilen sayının 0,70'den az olmaması, toksik kabul edilmemesi için ise *NT*'nin *C*'ye bölünmesiyle elde edilen sayının 0,70'den az olmaması gerekmektedir (Mataracı, 2010). Deneylerde her iki standarda göre etkili olup, toksik olmayan nötralizanlar kullanılmıştır.

3.6. DEZENFEKTANLARIN MBK DEĞERLERİNİN SAPTANMASI

3.6.1. Süspansiyon Haldeki Bakterilere Karşı MBK Değerinin Saptanması

Çalışmada, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Klebsiella pneumoniae* bakteri suşlarına karşı benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin nano dezenfektanlarının minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri, Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI) tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak araştırılmıştır (CLSI, 2006)

Böylece *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Klebsiella pneumoniae* bakteri suşlarının nutrient agarda bulunan 24 saatlik kolonilerinden 3.4.1. kısmında anlatıldığı gibi hazırlanan 10^8 kob/ml'lik süspansiyon 100 kat seyreltilerek 10^6 kob/ml bakteri içeren tüpler hazırlanmıştır. 96 kuyucuklu mikroparka kuyucuklarına 50 µl gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür dezenfektanlarının ikişer kat azalan konsantrasyonları eklenmiş ve daha sonra bu kuyucuklara hazırlanan bakteri süspansiyonundan 50 µl ilave edilmiştir. Böylece dezenfektanın son konsantrasyonları % 4'lük gümüş sülfadiazin için 256 µl/ml (% 1.024), 128 µl/ml (% 0.512), 64 µl/ml (% 0.256), 32 µl/ml (% 0.128), 16 µl/ml (% 0.064) olacak şekilde uygulanmıştır. % 0.5'lik benzalkonyum klorür için 256 µl/ml (% 0.128), 128 µl/ml (% 0.064), 64 µl/ml (% 0.032), 32 µl/ml (% 0.016), 16 µl/ml (% 0.008), 8 µl/ml (% 0.004), 4 µl/ml (% 0.002) konsantrasyonları ayarlanmıştır. Biyosit-bakteri karışımına 0, 15, 30, 60. dakika ve 24. saat temas süreleri sonunda 100 µl nötralize edici karışım (gümüş sülfadiazin için % 2.5 sodyumtiyosülfat- % 1 sodyum tiyoglikolat benzalkonyum klorür için % 3 tween 80 - % 0.3 lesitin) eklenmiştir. 5 dakika bekleme süresinin ardından bu karışım 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltilmiş ve

nurient agar yüzeyine ikişer tekrarlı 100 µl yayılmıştır. Ekim yapılan nutrient agar Petri kutuları etüvde 37 °C’de 24 saat bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve her iki agarda sayılan kolonilerin ortalaması alınmıştır.

Bakteri sayısındaki azalmanın sayısal olarak ifade edilebilmesi için başlangıçtaki miktarın bilinmesi gerekmektedir. Bunun için ayrıca nötralize edici çözelti ile bir kontrol set deneye eklenmiştir. Üreyen bakteri sayısı başlangıç kontrol bakteri sayısı ile karşılaştırılmıştır.

3.6.2. Biyofilmdeki Bakterilere Karşı MBK Değerinin Saptanması

Bakteri suşlarının nutrient agarda bulunan 24 saatlik kolonilerinden 3.4.2. kısmında belirtildiği şekilde 10^2 kob/ml süspansiyonları hazırlanmıştır. Bu süspansiyonlardan 200’er µl alınarak 96 kuyucuklu mikropalakalara dağıtılmış ve 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda üst sıvı alınmıştır. Böylece planktonik olarak bulunan bakteri hücreleri ortadan kaldırılarak 24 saatlik biyofilm tabakası deneylerde kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Biyofilm tabakası bulunan kuyulara, % 4’lük gümüş sülfadiazin için 512 µl/ml (% 2.048), 256 µl/ml (% 1.024), 128 µl/ml (% 0.512), 64 µl/ml (% 0.256), 32 µl/ml (% 0.128) ve % 0.5’lik benzalkonyum klorür için 512 µl/ml (% 0.256), 256 µl/ml (% 0.128), 128 µl/ml (% 0.064), 64 µl/ml (% 0.032), 32 µl/ml (% 0.016), 16 µl/ml (% 0.008), 8 µl/ml (% 0.004) konsantrasyonlardan 100’er µl eklenmiştir. 0, 15, 30, 60. dakika ve 24. saat temas süreleri sonunda biyosit-biyofilm karışımına 100 µl nötralize edici karışım (gümüş sülfadiazin için % 2.5 sodyumtiyosülfat - % 1 sodyum tiyoglikolat benzalkonyum klorür için % 3 tween 80 - % 0.3 lesitin) eklenmiştir. 5 dakika bekleme süresinin ardından bu karışıma yavaşça pipetaj yapılarak yüzeydeki biyofilm tabakası kaldırılıp homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltilmiş ve nurient agar yüzeyine ikişer tekrarlı 100 µl yayılmıştır. Ekim yapılan nutrient agar Petri kutuları 37 °C’de 24 saat bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve her iki agarda sayılan kolonilerin ortalaması alınmıştır.

Bakteri sayısındaki azalmanın sayısal olarak ifade edilebilmesi için başlangıçtaki miktarın bilinmesi gerekmektedir. Bunun için ayrıca nötralize edici çözelti ile bir kontrol set deneye eklenmiştir.

3.6.3. Alamar Blue Boyama Yöntemi

Alamar blue boyası, metabolik aktivite tespitine dayanan kolorimetrik / florometrik büyüme indikatörü içerir. Hücrelerin bulunduğu örneğe alamar blue boyası eklendiğinde, boyanın okside formu sitosole girer ve FMNH₂, FADH₂, NADH, NADPH ve sitokromlardan gelen elektronların oluşturduğu mitokondri enzim aktivitesi tarafından indirgenmiş forma dönüştürülür (Al-Nasiry, 2007). İndirgenme ile alamar blue boyası floresan ışık yayar ve renk değişimine uğrar. Değişimin oranı hücre canlılığının oranını belirtir. Üremenin devam etmesi indirgenmiş bir ortam oluştururken, üremenin azalması oksidatif bir ortam oluşturur. Oksitlenmiş ortam floresan içermez ve mavi renkli, redüklenmiş ortam ise floresan içerir ve pembe renklidir. Kısacası eğer ortamda bir üreme gerçekleşiyorsa mavi renk olan boya redüksiyon ile pembe renge dönüşür. Renk değişimi ile veriler gözle görülebilir ya da duyarlılık artışı absorbands bazlı veya floresan bazlı araçlarla ölçülebilir (Pettit ve diğ., 2005).

Çalışmada aktif üremenin olduğu örnekleri tespit etmek amacıyla, biyosit-biyofilm karışımına nötralize edici çözelti eklendikten sonra 5 dakika bekleme süresinin ardından bu karışımdan 96 kuyucuklu mikropalakaya 100 µl alınarak üzerine 10 µl alamar blue boyası (son konsantrasyon % 10 alamar blue) eklenerek iyice karıştırılmış ve 2 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır (Al-Nasisry ve diğ., 2007). Süre sonunda oluşan renk değişimlerinde mavi renk canlı mikroorganizmanın olmadığını ya da üremenin azaldığını, pembe renk ise canlı mikroorganizmanın olduğunu ve üremenin arttığını göstermektedir. Ayrıca Thermo (multiskan go) ELISA okuyucusunda 570 nm’de redüksiyon ve 600 nm’de oksidasyon absorbands değerleri ölçülerek elde edilen verilerle gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarının bakterilere karşı etkileri saptanmıştır.

3.7. DEZENFEKTANLARIN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA BİYOFİLME KARŞI ETKİNLİKLERİNİN SAPTANMASI

3.7.1. Bakteriyolojik Analiz

Enfeksiyon ve kontaminasyon riskini azaltmak için uygulanacak olan dezenfektanın seçimi ve uygulamasının doğru yapılabilmesi için dezenfeksiyonu etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi gerekir. Bunlar; dezenfektanın tipi, kullanım konsantrasyonu, temas süresi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, ortamda organik maddelerin varlığı ve miktarı, nesnenin yapısı, nisbi nem ve suyun sertliği ile mikroorganizmanın yapısı, miktarı, üreme periyodu gibi mikroorganizmaya bağlı faktörlerdir (Özyust, 2000).

Çalışmanın bu kısmında elimizdeki nanoteknolojik dezenfektanların 24 saatlik biyofilm tabakasına karşı farklı fiziksel ve çevresel koşullarda etkinliklerinin değişip değişmediği araştırılmıştır. Etkinliğin bakteriler üzerindeki etkisini görmek için ortamda üremenin olması gerekmektedir. Bu nedenle dezenfektanların biyofilme karşı etki ettiği minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerine en yakın konsantrasyon seçilerek dezenfektanlar 24 saat farklı koşullara maruz bırakılmıştır. Gümüş sülfadiazin için MBK değerine yakın ve genelde yanık kremlerinin içerisindeki konsantrasyon değeri olan % 1, benzalkonyum klorür için MBK değerine en yakın konsantrasyon olan % 0.05 değerleri seçilmiş ve farklı koşullara maruz bırakılmıştır. Dezenfektanların uygulanacağı biyofilm tabakası için mikropalaklarda *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* bakterilerinin 3.4.2. de belirtildiği gibi biyofilm tabakası oluşturulmuştur. Oluşan biyofilm tabakası üzerine 100 µl farklı şartlara maruz kalmış dezenfektan konsantrasyonları uygulanıp 15 dakika ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda biyosit-biyofilm karışımına 100 µl nötralize edici karışım (gümüş sülfadiazin için % 2.5 sodyumtiyosülfat - % 1 sodyumtiyoglikolat benzalkonyum klorür için % 3 tween 80 - % 0.3 lesitin) eklenmiştir. 5 dakika bekleme süresinin ardından bu karışıma yavaşça pipetaj yapılarak yüzeydeki biyofilm tabakası kaldırılıp homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltilmiş ve nutrient agar yüzeyine ikişer tekrarlı 100 µl yayılmıştır. Ekim yapılan nutrient agar Petri kutuları 37 °C'de 24 saat bekletildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve her iki agarda sayılan kolonilerin ortalaması alınmıştır.

Bakteri sayısındaki azalmanın sayısal olarak ifade edilebilmesi için başlangıçtaki miktarın bilinmesi gerekmektedir. Bunun için ayrıca nötrale edici çözelti ile bir kontrol set deneye eklenmiştir.

3.7.2. Parametrelerin Uygulanması

3.7.2.1. pH Uygulaması

Dezenfektanlar hazırlanmadan önce, pH 4, 7 ve 9 değerlerinin ön deneyler sonucunda bakteriler için toksik olmadığı saptanmıştır. pH değişimlerinin dezenfektanlar üzerine etkisini anlamak amacıyla dezenfektanların son konsantrasyonları gümüş sülfadiazin için % 1, benzalkonyum klorür için % 0.05 olacak şekilde pH değerleri 4, 7 ve 9'a ayarlanan distile su içinde seyreltilmiştir ve 24 saat bekletilmiştir. Dezenfektanlar hazırlandıktan sonra tekrar pH değerleri ölçülüp, son pH değerlerinin değişmediği saptanmıştır. Süre sonunda biyofilm tabakasına bölüm 3.7.1.'de anlatıldığı gibi uygulanarak nutrient agara 2 tekrarlı olarak ekilip inkübasyona bırakılmıştır. Yine aynı süspansiyondan alınan örnekler alamar blue boyası ile 2 saat bekletilmiş ve canlı ve toplam bakteri sayısının tespiti için bölüm 3.7.4.'de belirtildiği şekilde DAPI ve CTC boyası ile boyanmasının ardından epifloresan mikroskopta incelenmiştir.

3.7.2.2. Sıcaklık Uygulaması

Farklı sıcaklığın uygulanan dezenfektanlar üzerine etkisini anlamak için konsantrasyonları ayarlanmış dezenfektanlar -20 °C'ye ayarlanmış buzdolabında 24 saat ve 121 °C'ye ayarlanmış otoklavda 20 dakika bekletilmiştir. Böylece dezenfektanın hem donma hemde kaynama durumunda bozulma riski olup olmadığı anlaşılacaktır. Süre sonunda biyofilm tabakasına bölüm 3.7.1.'de anlatıldığı gibi uygulanarak nutrient agara 2 tekrarlı olarak ekilip inkübasyona bırakılmıştır. Yine aynı süspansiyondan alınan örnekler alamar blue boyası ile 2 saat bekletilmiş ve canlı ve toplam bakteri sayısının tespiti için bölüm 3.7.4.'de belirtildiği şekilde DAPI ve CTC boyası ile boyanmasının ardında epifloresan mikroskopta incelenmiştir.

3.7.2.3. Ozmotik Şok Uygulaması

Deneyde kullanılan tüm bakterilere toksik olmayacak en yüksek tuz konsantrasyonu uygulamak için ön deneme deneyleri ile bakteriler 24 saat % 1, % 3, % 5, % 7 ve % 10 tuz çözeltisinin bulunduğu besiyerinde bekletilmiş ve süre sonunda nutrient agara 2 tekrarlı ekim yapılmıştır. Sayılan bakteri kolonilerine göre tüm bakteriler için kontrol

grubuna en yakın değerin % 3 tuz konsantrasyonu olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle ortam konsantrasyonunun dezenfektanlar üzerine etkisini anlamak için saf kimyasalların % 3 tuz çözeltisi içinde son konsantrasyonları ayarlanarak 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda biyofilm tabakasına bölüm 3.7.1.'de anlatıldığı gibi uygulanarak nutrient agara 2 tekrarlı olarak ekilip inkübasyona bırakılmıştır. Yine aynı süspansiyondan alınan örnekler alamar blue boyası ile 2 saat bekletilmiş ve canlı ve toplam bakteri sayısının tespiti için 3.7.4.'de belirtildiği şekilde DAPI ve CTC boyası ile boyanmasının ardında epifloresan mikroskopta incelenmiştir.

3.7.2.4. Çamaşır Suyu Uygulaması

Çamaşır suyu yüzeylerde kullanılan genel bir temizlik maddesidir. Yüzeye uygulanan dezenfektanların çamaşır suyu ile karşılaştığında etkisinin değişip değişmediğini anlamak için saf dezenfektanlar, temizlikte yeterli olacak % 3'lük çamaşır suyunda seyreltilmiş ve 24 saat bekletilmiştir. Süre sonunda biyofilm tabakasına bölüm 3.7.1.'de anlatıldığı gibi uygulanarak nutrient agara 2 tekrarlı olarak ekilip inkübasyona bırakılmıştır. Yine aynı süspansiyondan alınan örnekler alamar blue boyası ile 2 saat bekletilmiş ve canlı ve toplam bakteri sayısının tespiti için 3.7.4.'de belirtildiği şekilde DAPI ve CTC boyası ile boyanmasının ardında epifloresan mikroskopta incelenmiştir.

3.7.3. Alamar Blue Boyama Yöntemi

Farklı koşullara maruz bırakılan dezenfektanların biyofilm tabakasına uygulandığı süre sonunda canlı kalan bakterilerin tespiti bölüm 3.6.3.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.7.4. Epifloresan Mikroskopta Ölü / Canlı Bakteri İnceleme

Redüklenmiş CTC boyası, örneklerdeki aktif olarak solunum yapan bakterilerin epifloresan mikroskopta sayılmasını sağlamaktadır. Okside CTC boyası renksizdir ve floresan ışımaya yapacak özellikte değildir. Bileşik elektron transport sisteminde redüklenince floresan ışımaya yapacak hale gelmekte ve çözülmeyen CTC bileşiği hücre içinde birirmektedir. Böylece CTC boyası içeren hücreler, epifloresan mikroskobu görünür hale gelmektedir. CTC ile boyama işleminin ardından mikroskopta gözükken kırmızı renkli sinyaller aktif solunum yapan hücreleri, canlı olmayan partiküller ve arka taraftaki diğer bileşiklerden kolayca ayırmaktadır. CTC kullanımı, solunum gibi metabolik olarak aktif olan mikroskobik canlıların keşfedilmesi ve sayılmasını

kolaylaştırmaktadır (Rodriguez ve diğ., 1992). CTC uygulanmış örnekler DNA'ya özgü DAPI boyasının da eklenmesiyle, benzer preparatlarda aktif ve toplam bakteri alt populasyonları sayılabilir. Hücrelerin CTC'yi takiben DAPI ile boyanmalarının ardından 0.2 mm por çaplı filtreden geçirilmesi ile hem toplam hem de canlı bakteri sayımı yapılabilmektedir (Trouessellier ve diğ., 1998, Vatansever, 2011).

Çalışmada, aktif olarak solunum yapan bakterileri tespit etmek üzere biyosit-biyofilm karışımına nötralize edici çözelti eklendikten sonra 5 dakika bekleme süresinin ardından 100 µl CTC boyası ile 900 µl 1/10 sulandırılmış biyofilm homojenatı steril koşullarda karıştırılmış ve 28 °C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon süresinin sonunda karışıma 110 µl DAPI boyası eklenerek 28 °C'de 1 saat beklenmiştir. Daha sonra bu örnekler vorteks cihazı ile karıştırılarak 10 kuyucuklu teflon lam üzerine 2 µl alındıktan sonra üzerine immersiyon yağı eklenmiştir. Yağın koyulmasının ardından 100'lük objektifte inceleme yapılmıştır.

Teflon lam epifloresan mikroskopta incelenip 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan alınan kırmızı (CTC) ve mavi (DAPI) renkli sinyaller sayılarak ortalamaları alınmıştır. Daha sonra toplam yüzeye ulaşmak amacıyla ortalamalar katsayılarla çarpılarak santimetrekaredeki mikroorganizma sayısı tespit edilmiştir.

3.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Farklı koşullara maruz bırakılan örneklerdeki bakteriyolojik analiz sonuçlarında, canlı bakteri sayıları açısından farklar olup olmadığı istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Farklı koşullara maruz kalan benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazinin uygulandığı *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının 15. dakikada ve 24. saatte mikroorganizma sayıları arasında fark olup olmadığı, sayılan Petri kutuları sonuçlarının ortalamaları baz alınarak, tek yönlü varyans analiziyle (One-way ANOVA) incelenmiştir. Tek yönlü varyans analizi sonucunda ortalamaların birbirinden anlamlı olarak farklı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durumda hangi koşullara ait ortalamaların anlamlı farklar gösterdiğini saptamak için Post-Hoc (çoklu karşılaştırma) analizi gerçekleştirilmiştir. Yapılan Post-Hoc analiziyle hangi parametrelerin birbirinden anlamlı olarak farklılaştığı Least Significant Difference (LSD) testi ile incelenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. NÖTRALİZANLARIN VALİDASYON TESTLERİNE AİT BULGULAR

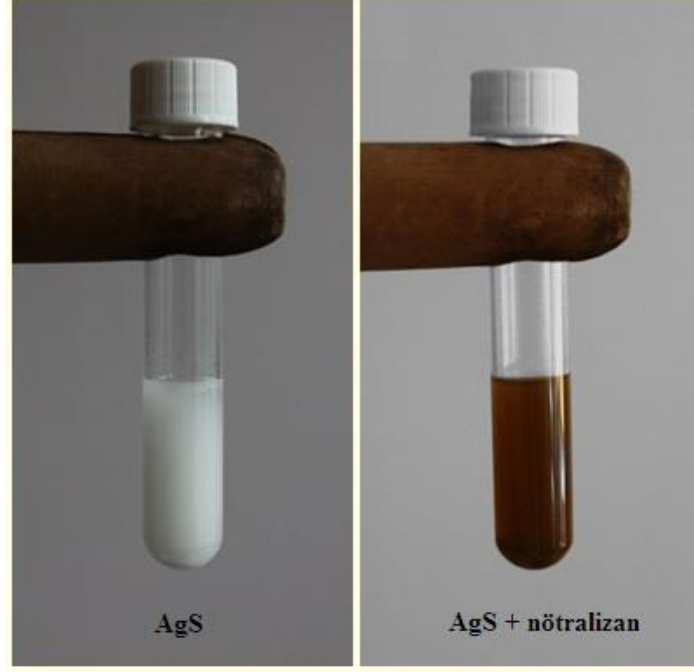
Çalışmada kullanılan gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür dezenfektanlarını nötralize etmek için kullanılacak nötralizan, hem kullanılan en yüksek konsantrasyona etkili olabilmeli hem de bakteriler üzerinde toksik etki oluşturmamalıdır. Bu şartlara uygun nötralizanı saptamak amacıyla araştırılan gümüş sülfadiazin için 1, 2, 3, benzalkonyum klorür için 4 numaralı nötralizana ait validasyon testlerinin sonuçları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının (*NT*) deneyde kullanılan bakteri süspansiyonundaki canlı bakteri sayısına (*C*) bölünmesiyle elde edilen oranın CEN’in EN 1276 standardına göre ≥ 0.05 , USP 29’a göre ise ≥ 0.70 olması gerektiğinden, test edilen tüm nötralizanların her iki duruma da uygun olduğu ve bakteriler üzerine toksik etkili olmadıkları saptanmıştır.

Nötralizan etkinlik testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının (*NE*) nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısına (*NT*) bölünmesiyle elde edilen oranın CEN’in EN 1276 standardına göre ≥ 0.5 , USP 29’a göre ise ≥ 0.70 olması gerektiğinden, her iki kritere uygunluk gösteren ve % 1 gümüş sülfadiazin içeren dezenfektanı nötralize edebilen çözeltinin 2, % 0.5 benzalkonyum klorür içeren dezenfektanı nötralize edebilen çözeltinin 4 numaralı nötralizan olduğu saptanmıştır.

Buna göre gümüş sülfadiazinin inaktive edilmesinde % 2.5 sodyum tiyosülfat ve % 1 sodyum tiyoglikolat içeriğine sahip 2 numaralı nötralizan; benzalkonyum klorürün inaktive edilmesinde ise % 3 Tween 80 ve % 0.3 lesitin içeriğine sahip 4 numaralı nötralizanlar seçilmiştir. Gümüş sülfadiazin 2 numaralı nötralizan madde ile birleştiğinde beyazdan kahverengiye dönüşmekte (Şekil 4.1), benzalkonyum klorür 4

numaralı nötralizan ile birleştiğinde ise herhangi bir renk değişimi olmamaktadır (şekil 4.2).



şekil 4.1: Gümüş sülfadiazinin (AgS) nötralizan ile etkileşimi sonucu fiziksel değişimi.



şekil 4.2: Benzalkonyum klorürün (BK) nötralizan ile etkileşimi sonucu fiziksel değişimi.

Tablo 4.1: Farklı konsantrasyonlarda nötralizan madde içeren çözeltilerin bakteri suşları ile elde edilen nötralizan validasyon testi sonuçları.

Nötr.	Nötralizan içeriği (%)		Canlı kalan bakteri sayısının oranı		
No	Sodyum tiyosülfat	Sodyum tiyoglikolat	Bakteri suşları	Toksisite ¹	Etkinlik ²
1	1	0.5	<i>S. aureus</i>	0.85	0.583
			<i>P. aeruginosa</i>	1.36	0.56
			<i>E. coli</i>	0.89	0.597
			<i>K. pneumoniae</i>	1.60	1.106
2	2.5	1	<i>S. aureus</i>	0.714	1.3
			<i>P. aeruginosa</i>	1.31	0.75
			<i>E. coli</i>	0.92	0.827
			<i>K. pneumoniae</i>	1.35	1.210
3	5	-	<i>S. aureus</i>	0.74	0.46
			<i>P. aeruginosa</i>	1.25	0.265
			<i>E. coli</i>	0.83	0.825
			<i>K. pneumoniae</i>	0.80	1.55
Tween 80		Lesitin			
4	3	0.3	<i>S. aureus</i>	0.70	0.75
			<i>P. aeruginosa</i>	1.25	0.86
			<i>E. coli</i>	0.9	0.96
			<i>K. pneumoniae</i>	1.65	0.78

¹ Nötralizan toksisite sayıları (**NT**), nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının deneyde kullanılan bakteri süspansiyonundaki canlı bakteri sayısına bölünmesiyle elde edilen oranı vermektedir. Kabul edilebilir **NT** oranları ≥ 0.70 'dir.

² Nötralizan etkinlik sayıları (**NE**), nötralizan etkinlik testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısının nötralizan toksisite testi sonucunda canlı kalan bakteri sayısına bölünmesiyle elde edilen oranı vermektedir. Kabul edilebilir **NE** oranları ≥ 0.70 'dir.

4.2. DEZENFEKTANLARIN MBK DEĞERLERİNİN SAPTANMASINA AİT BULGULAR

4.2.1. Gümüş Sülfadiazinin Süspansiyon ve Biyofilm Halindeki Bakteri Suşlarına Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular

Çalışmada farklı konsantrasyondaki gümüş sülfadiazinin *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* bakteri suşlarının süspansiyon ve mikropalakalarda oluşturulmuş 24 saatlik biyofilmine karşı 0, 15, 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas süreleri sonucunda bakteri üremesindeki düşüşün $> \log 3$ olduğu değer bulunarak gümüş sülfadiazinin MBK değerleri saptanmıştır. Besiyeri olarak nutrient agarın kullanıldığı deneylerde elde edilen MBK değerleri Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Süspansiyon halindeki bakteriler için % 4’lük gümüş sülfadiazinden son konsantrasyonları 256 µl/ml (% 1.024), 128 µl/ml (% 0.512), 64 µl/ml (% 0.256), 32 µl/ml (% 0.128), 16 µl/ml (% 0.064) , biyofilm için ise % 4’lük gümüş sülfadiazinden son konsantrasyonları 512 µl/ml (% 2.048), 256 µl/ml (% 1.024), 128 µl/ml (% 0.512), 64 µl/ml (% 0.256), 32 µl/ml (% 0.128) olacak şekilde uygulanmıştır.

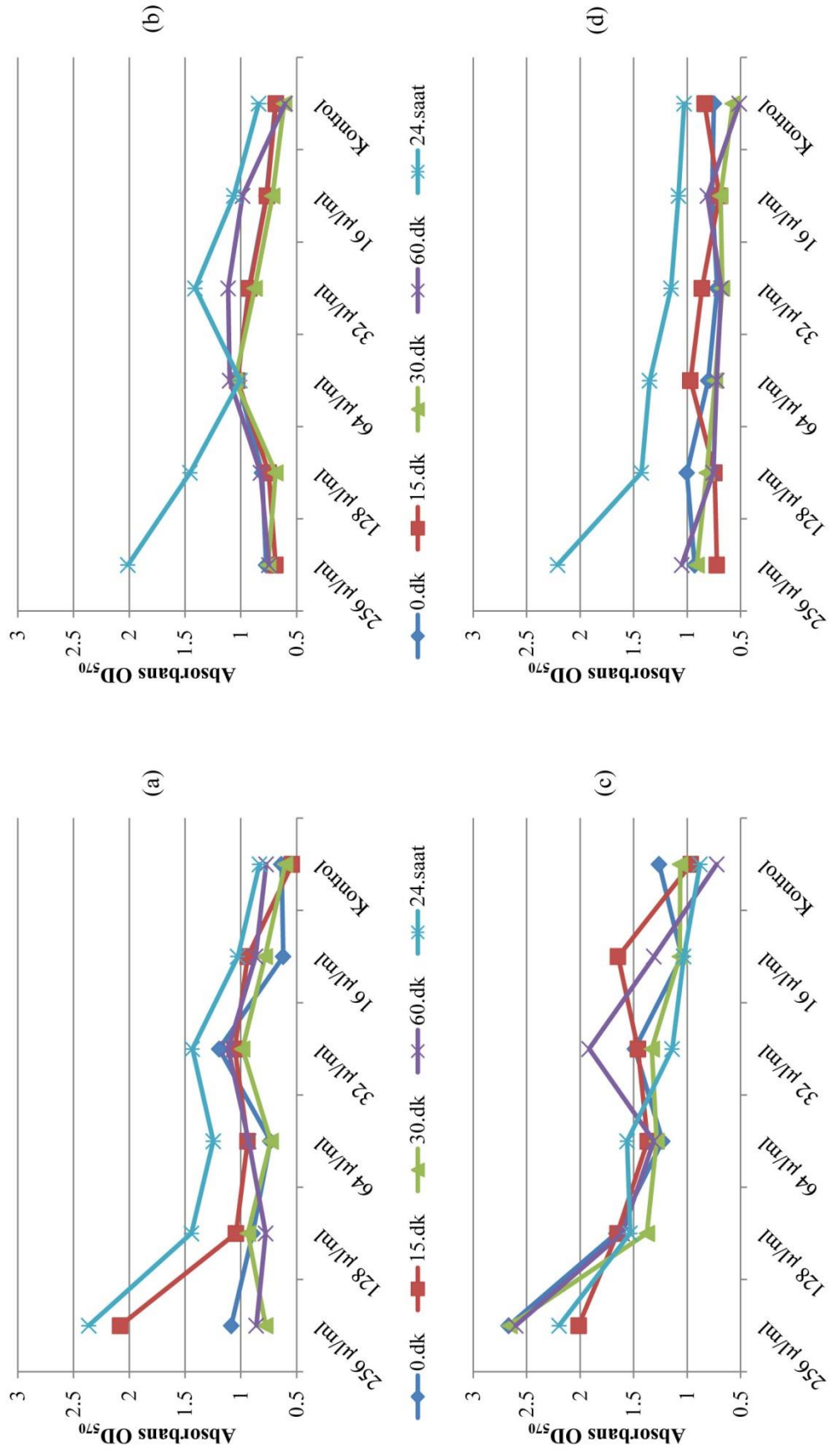
Tablo 4.2’deki sonuçlara göre *S. aureus* suşunun diğer Gram (-) bakterilere göre gümüş sülfadiazine daha dirençli olduğu, süspansiyon halindeki bakterilerin biyofilm oluşturdıkları zaman MBK değerlerinin artış gösterdiği ve en fazla artışın *P. aeruginosa* suşunda meydana geldiği saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda gümüş sülfadiazinin 24 saatlik temas sürelerine bakıldığında süspansiyon halindeki bakteriler için 256 µl/ml (% 1.024), biyofilm için ise 512 µl/ml (% 2.048) gümüş sülfadiazin içeren dezenfektanın bakteriler üzerinde bakterisidal etki oluşturduğu görülmüştür.

Tablo 4.2: Gümüş sülfadiazinin farklı temas sürelerinde süspansiyon ve biyofilm halindeki bakteri suşlarına karşı saptanan MBK değerleri ($\mu\text{l/ml}$).

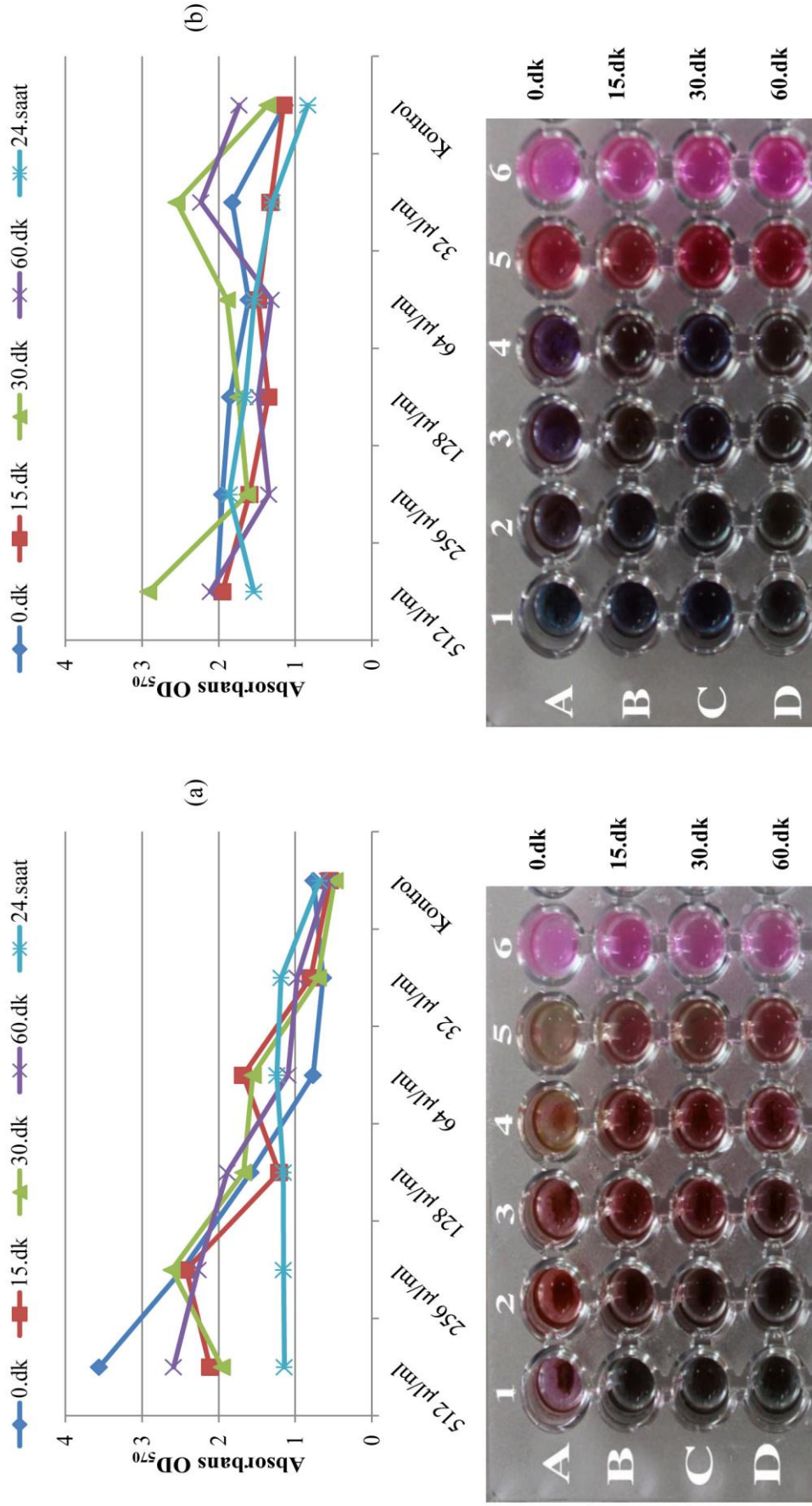
Bakteri türü	Planktonik					Biyofilm				
	0.dk	15.dk	30.dk	60.dk	24.saat	0.dk	15.dk	30.dk	60.dk	24.saat
<i>S.aureus</i>	>256	>256	>256	>256	256	>512	>512	>512	>512	512
<i>P.aeruginosa</i>	>256	128	128	128	128	>512	>512	512	512	512
<i>E.coli</i>	>256	>256	128	128	128	512	512	256	256	256
<i>K.pneumoniae</i>	>256	>256	128	128	128	512	512	256	256	256

4.2.2. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları

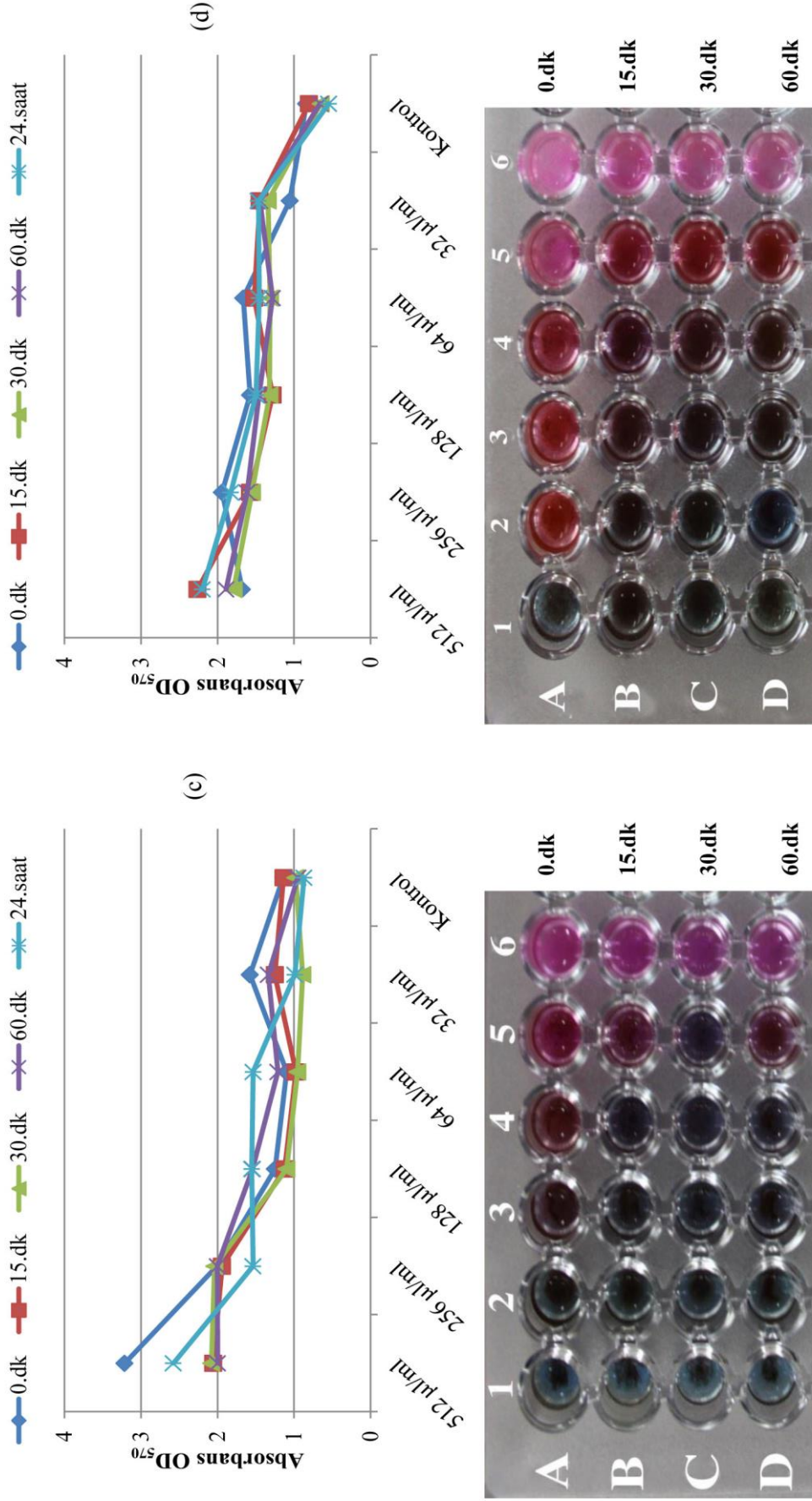
Bakterilerin süspansiyon hali ve biyofilmi ile farklı konsantrasyonlardaki gümüş sülfadiazin 0, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat bekletildikten sonra hücrelerin bulunduğu örneğe alamar blue boyası eklendiğinde, ortamda bir üremenin olmadığı durumda mavi olan boyada renk değişimi olmazken, ortamda üremenin gerçekleştiği durumda ise mavi renk olan boya redüksiyon ile pembe renge dönüşmüştür. Renk değişimi gözle görülmüş ve duyarlılık artışı absorbands bazlı okuyucu ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre Şekil 4.1’de gösterilen gümüş sülfadiazinin nötralizan ile etkileşiminin sonucunda ortaya çıkan kahverengi durum alamar blue testinde renk değişiminin net olmadığını göstermektedir. Üremenin olmadığı ya da az olduğu ortam mavi ve açık mor yerine siyah ve yeşile yakın, üremenin olduğu ortam ise kırmızıya yakın bir renk almıştır. Ayrıca gümüş sülfadiazin dibe çöken bir dezenfektan olduğu için örneklerin absorbands değerleri ölçüldüğünde dezenfektanın dibe çöken kısmının da ölçüldüğü ortaya çıkmaktadır. Absorbans değeri sonuçlarına göre ortamın gümüş sülfadiazin konsantrasyonu ne kadar fazlaysa absorbands değeri o kadar fazladır. Bu nedenle de içerisinde dezenfektanın bulunmadığı ve üremenin en fazla olduğu kontrol örneğinde absorbands değeri en az çıkmıştır (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.3: Gümüş sülfadiazinin *S. aureus* (a), *P. aeruginosa* (b), *E. coli* (c), *K. pneumoniae* (d) suslarının süspansiyon haline karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri.



Şekil 4.4: Gümüş sülfadiazinin *S. aureus* (a), *P. aeruginosa* (b) suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri.



Şekil 4.5: Gümüş sülfadiazinin *E. coli* (c), *K. pneumoniae* (d) suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri.

4.2.3. Benzalkonyum Klorürün Süspansiyon ve Biyofilm Halindeki Bakteri Suşlarına Karşı MBK Değerlerinin Saptanmasına Ait Bulgular

Çalışmada farklı konsantrasyondaki benzalkonyum klorürün *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* bakteri suşlarının süspansiyon ve mikropalakalarda oluşturulmuş 24 saatlik biyofilmine karşı 0, 15, 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas süreleri sonucunda bakteri üremesindeki düşüşün $> \log 3$ olduğu değer bulunarak benzalkonyum klorürün MBK değerleri saptanmıştır. Besiyeri olarak nutrient agarın kullanıldığı deneylerde elde edilen MBK değerleri Tablo 4.3’de gösterilmiştir.

Süspansiyon halindeki bakteriler için % 0.5’lik benzalkonyum klorürden son konsantrasyonları 256 µl/ml (% 0.128), 128 µl/ml (% 0.064), 64 µl/ml (% 0.032), 32 µl/ml (% 0.016), 16 µl/ml (% 0.008), 8 µl/ml (% 0.004), 4 µl/ml (% 0.002), biyofilm için ise % 0.5’lik benzalkonyum klorürden son konsantrasyonları 512 µl/ml (% 0.256), 256 µl/ml (% 0.128), 128 µl/ml (% 0.064), 64 µl/ml (% 0.032), 32 µl/ml (% 0.016), 16 µl/ml (% 0.008), 8 µl/ml (% 0.004) olacak şekilde uygulanmıştır.

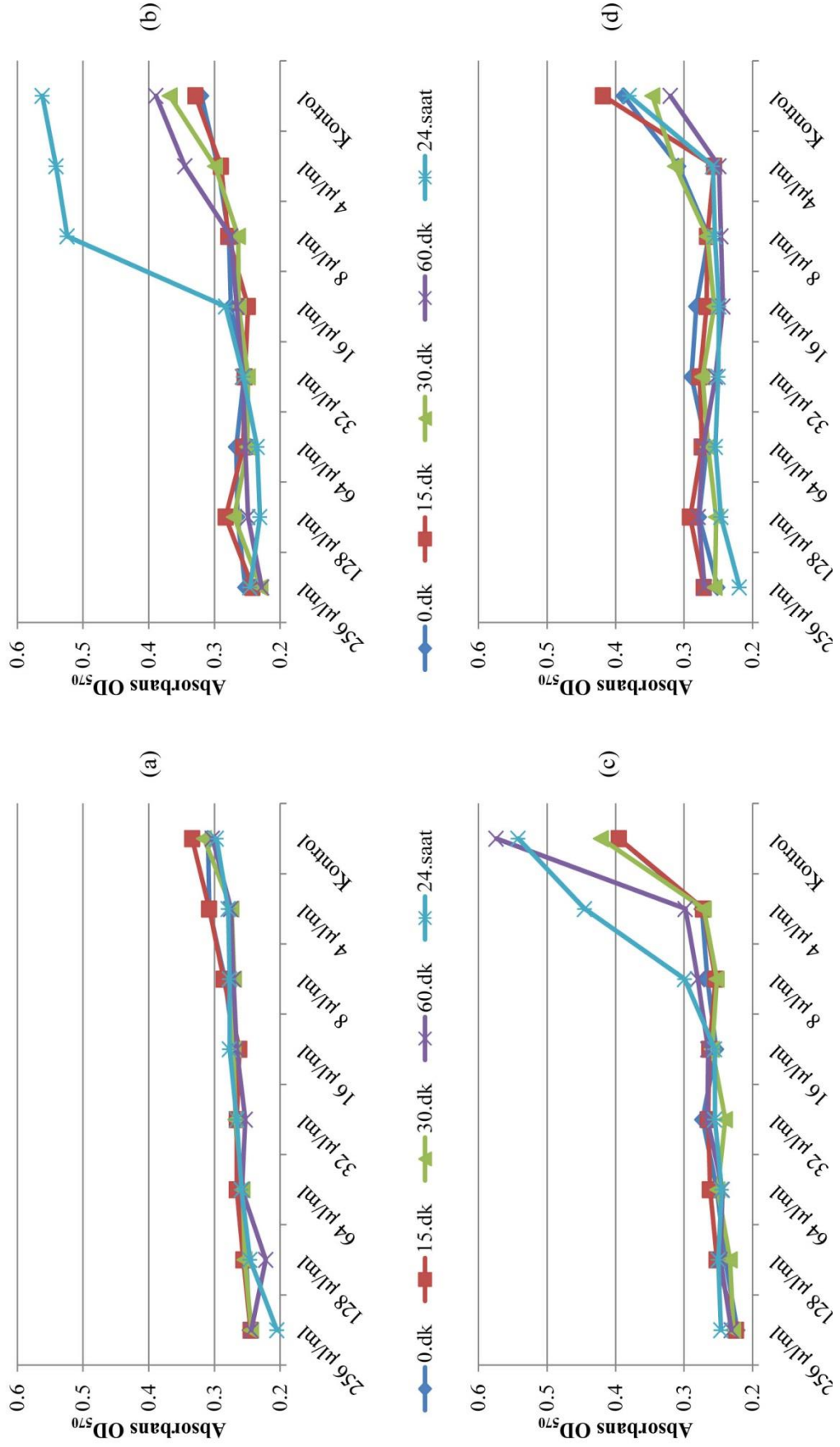
Tablo 4.3’deki sonuçlara göre benzalkonyum klorüre karşı bakterilerin süspansiyon hallerinden en fazla direnci *K. pneumoniae* göstermiştir. Biyofilm durumunda ise en az direnç *K. pneumoniae* suşuna aittir. Gümüş sülfadiazinde olduğu gibi biyofilm oluşturdıklarında bakterilere etki eden MBK değerleri artmış ve süspansiyon haline göre biyofilmde en fazla direnç mekanizması oluşturan bakteri *P. aeruginosa* olmuştur. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde benzalkonyum klorürün 24 saatlik temas sürelerinde süspansiyon halindeki bakteriler için 64 µl/ml (% 0.032), biyofilm için ise 128 µl/ml (% 0.064) değerlerinin etkili olduğu görülmektedir.

Tablo 4.3: Benzalkonyum klorürün farklı temas sürelerinde planktonik ve biyofilm halindeki bakteri suşlarına karşı saptanan MBK değerleri ($\mu\text{l/ml}$).

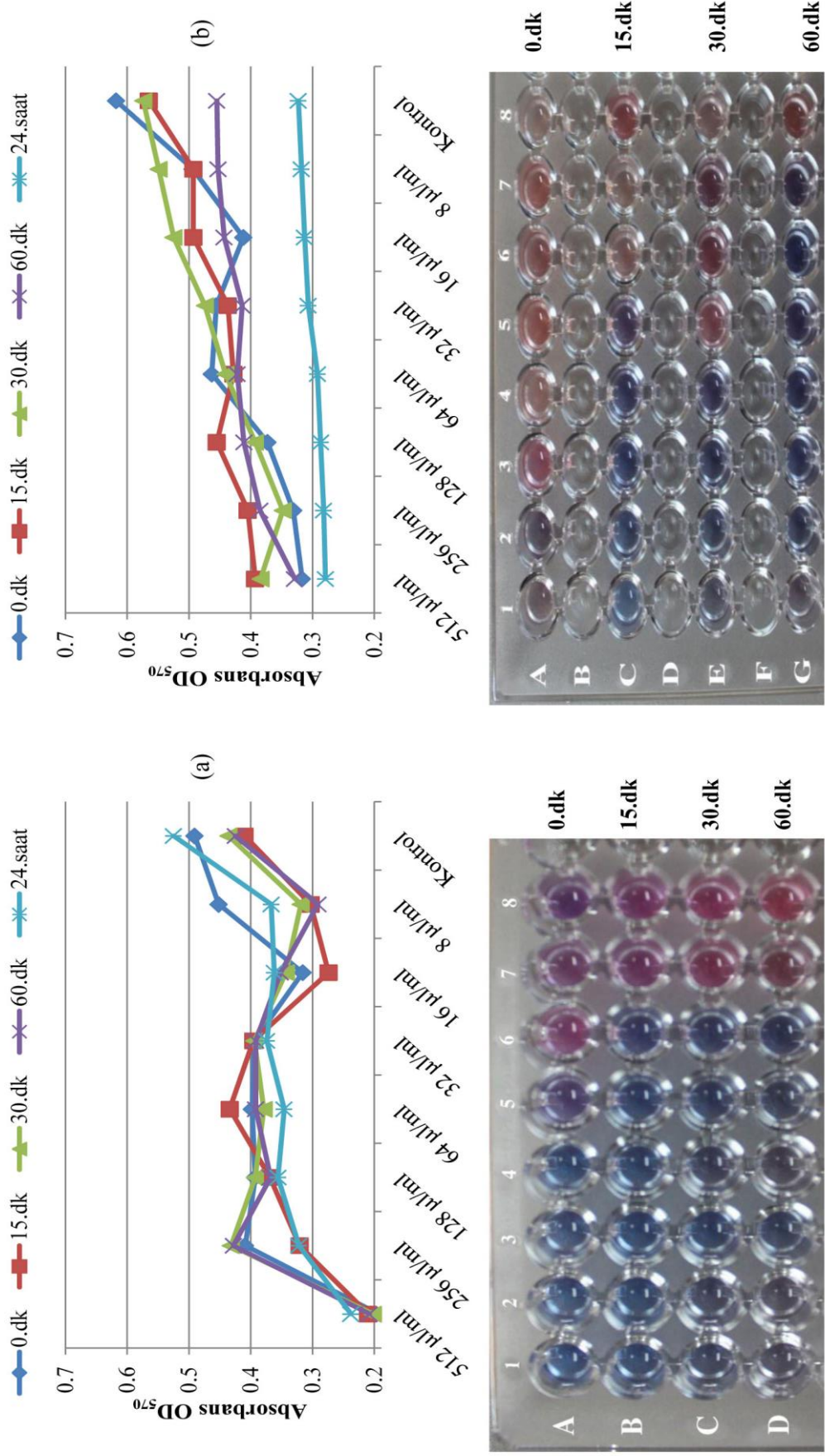
Bakteri türü	Planktonik					Biyofilm				
	0.dk	15.dk	30.dk	60.dk	24.saat	0.dk	15.dk	30.dk	60.dk	24.saat
<i>S.aureus</i>	16	16	16	16	16	>512	128	128	128	64
<i>P.aeruginosa</i>	32	16	16	16	16	256	128	128	128	128
<i>E.coli</i>	16	16	16	16	16	512	128	128	64	64
<i>K.pneumoniae</i>	64	64	64	64	64	128	64	64	64	64

4.2.4. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları

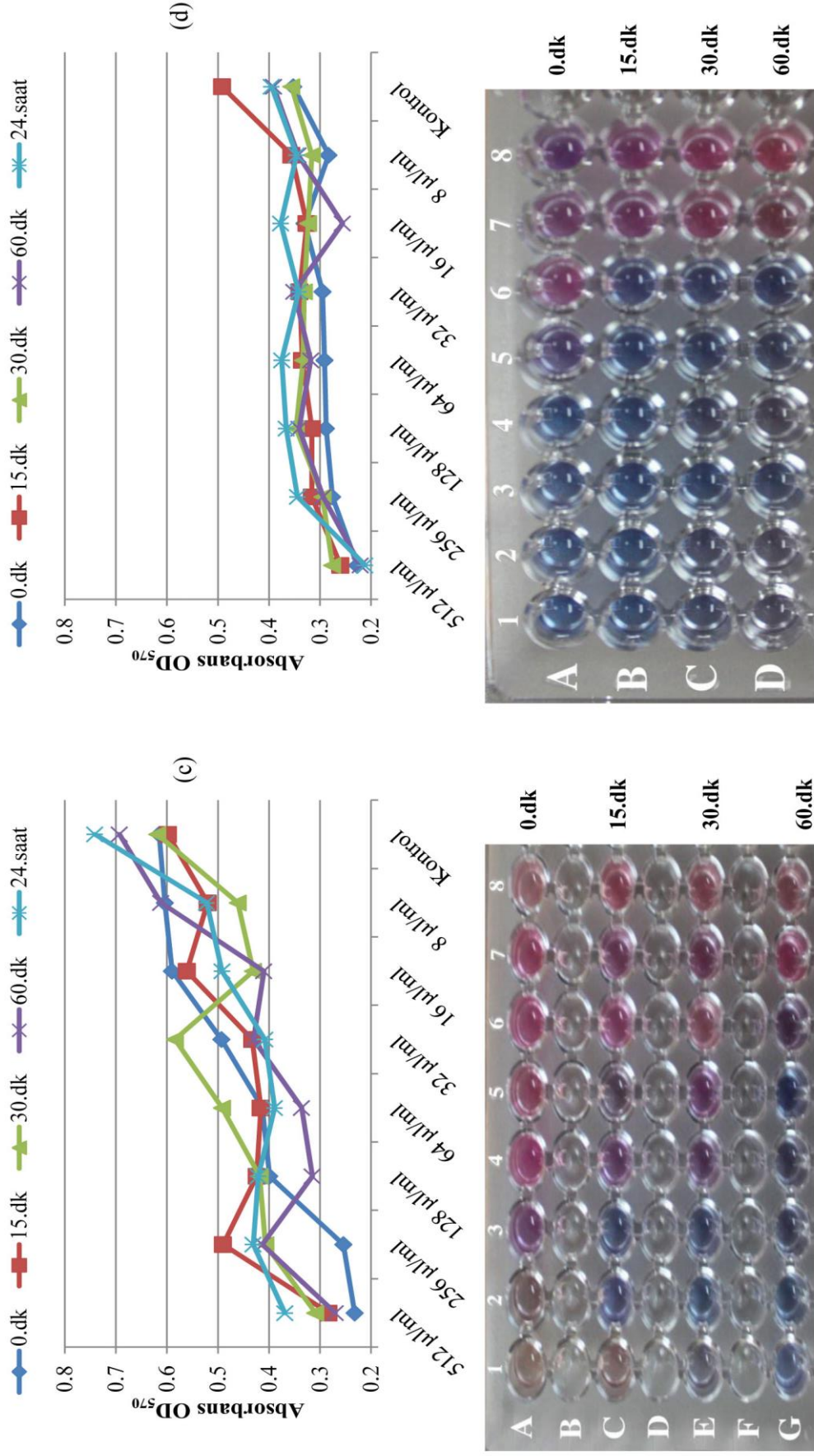
Bakterilerin süspansiyon hali ve biyofilmi ile farklı konsantrasyonlardaki benzalkonyum klorür 0, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat bekletildikten sonra hücrelerin bulunduğu örneğe alamar blue boyası eklendiğinde, ortamda bir üremenin olmadığı durumda mavi olan boyada renk değişimi olmazken, ortamda üremenin gerçekleştiği durumda ise mavi renk olan boya redüksiyon ile pembe renge dönüşmüştür. Renk değişimi gözle görülmüş ve duyarlılık artışı absorbans bazlı okuyucu ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre planktonik durumdaki *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinin absorbans-konsantrasyon grafiklerindeki absorbans değerlerinin tüm sürelerde genel olarak $16 \mu\text{l/ml}$ 'den sonra artış gösterdiği ve MBK değerlerinin $\geq 16 \mu\text{l/ml}$ olduğunu ortaya koymaktadır (Şekil 4.6). Bakterilerin biyofilm halinde ise kuyucuklardaki renk değişimleri MBK değerlerinin $\geq 64 \mu\text{l/ml}$ olduğunu göstermektedir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).



Şekil 4.6: Benzalkonyum klorürün *S. aureus* (a), *P. aeruginosa* (b), *E. coli* (c), *K. pneumoniae* (d) susularının süspansiyon haline karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri.



Şekil 4.7: Benzalkonyum klorürün *S. aureus* (a), *P. aeruginosa* (b) suşlarının 24 saatlik biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri.

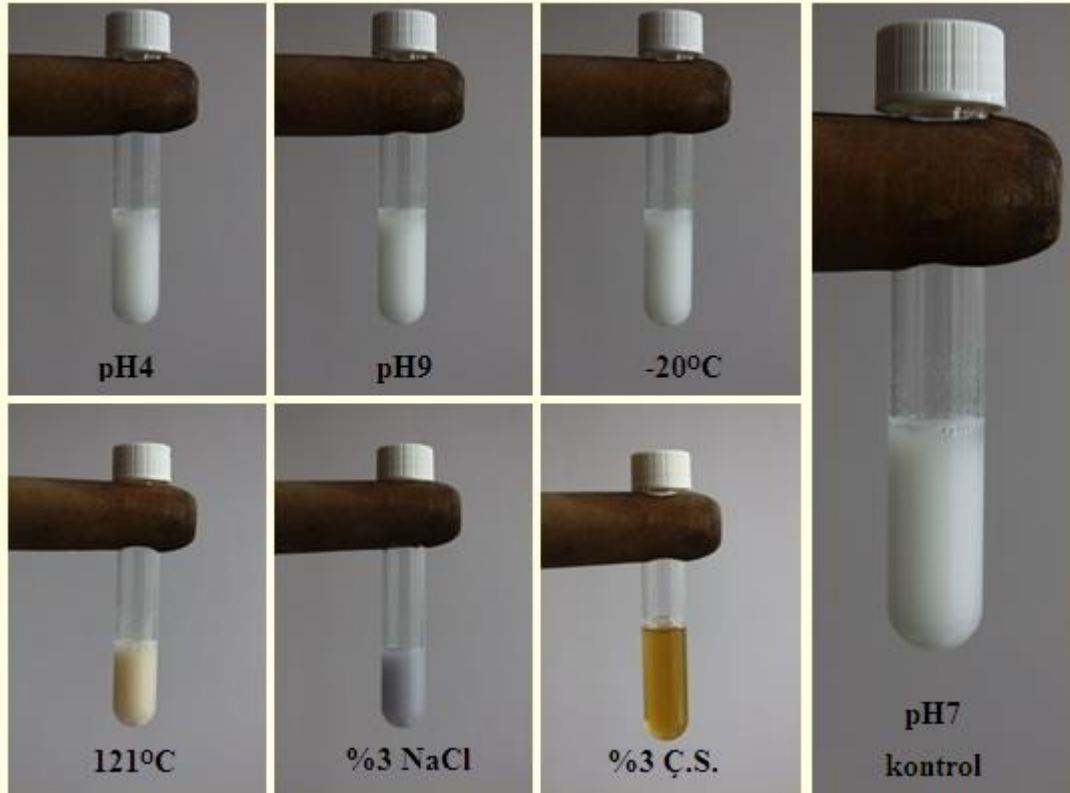


Şekil 4.8: Benzalkonyum klorürün *E. coli* (c), *K. pneumoniae* (d) suşlarının 24 saatlık biyofilmine karşı MBK değerlerinin alamar blue boyası ile spektrofotometrede saptanan absorbans değerleri ve renk değişimleri.

4.3. GÜMÜŞ SÜLFADIAZİNİN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA ETKİNLİĞİNE AİT BULGULAR

4.3.1. Gümüş Sülfadiazinin Farklı Koşullardaki Fiziksel Değişimi

Bakterilerin 24 saatlik biyofilmleri üzerine uygulanan dezenfektanların farklı fiziksel ve kimyasal koşullarda etkinliğini incelemek için gümüş sülfadiazin farklı pH, sıcaklık, osmotik ortamlara ve çamaşır suyuna 24 saat süreyle maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda % 1'lik gümüş sülfadiazinin fiziksel olarak değişimi Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak gümüş sülfadiazinin pH değeri 7 olan distile su ile elde edilen süspansiyonu kullanılmıştır. pH'ı 7 olan gümüş sülfadiazin ile diğer koşullardaki gümüş sülfadiazin karşılaştırıldığında pH4, pH9 ve -20 °C'de bekletilmiş olan gümüş sülfadiazinde hiçbir değişimin olmadığı, 121 °C , % 3 NaCl çözeltisinde ve % 3 çamaşır suyunda bekletilen gümüş sülfadiazinde renk değişimi gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 4.9: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin fiziksel değişimi.

4.3.2. Bakteriyolojik Analiz Sonuçları

Farklı koşullara maruz bırakılan % 1 gümüş sülfadiazinin bakterilere karşı 15. dakika ve 24. saatteki etkinliğini incelemek için nutrient agara yapılan ekimler sonucunda elde edilen bakteri sayısındaki düşüş, dezenfektana maruz kalmayan kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Ayrıca dezenfektanın hangi koşullarda etkinliğinin değiştiğini saptamak için seçilen ikinci kontrol grubu, pH7 koşuluna maruz kalan dezenfektanın bakteri biyofilmine uygulandığı deney grubudur.

S. aureus biyofilmindeki bakteri sayısı 15. dakikada % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış gümüş sülfadiazinde yarıya inmiş ve diğer durumlarda log 1 azalma olmuştur. 24 saatten sonra ise pH7 ve 121 °C’de bekletilen örneklerde log 2 azalma olurken, diğer tüm durumlarda $>\log 3$ olduğu görülmektedir. Her iki sürede bakteri sayısındaki azalmanın en az % 3 NaCl, 121 °C ve pH4, en fazla -20 °C ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış gümüş sülfadiazinin bulunduğu örneklerde olmuştur (Şekil 4.10).

P.aeruginosa biyofilmindeki bakteri sayısı 15. dakikada % 3 NaCl ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış gümüş sülfadiazinde $>\log 2$, diğer durumlarda ise $<\log 2$ azalma olmuştur. 24 saatten sonra -20 °C, % 3 NaCl, % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde azalma $\geq \log 3$, diğer tüm durumlarda $<\log 3$ olduğu görülmektedir. Her iki sürede bakteri sayısındaki azalma en az 121 °C ve pH4, en fazla -20 °C, % 3 NaCl ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış örneklerde görülmüştür (Şekil 4.11).

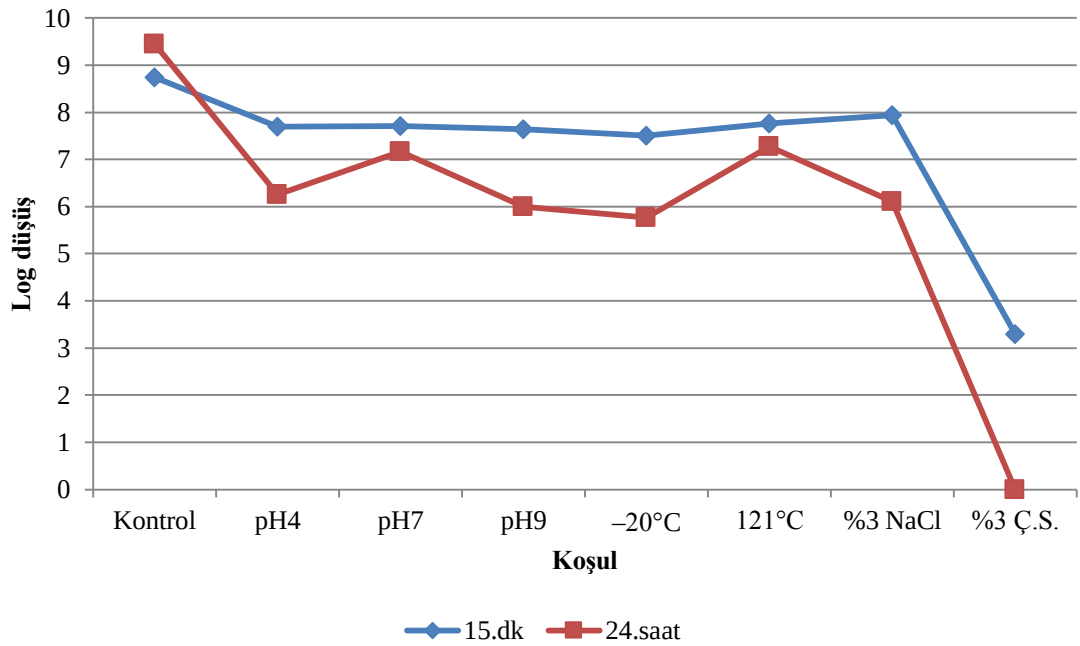
E. coli biyofilmi % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış gümüş sülfadiazinde 15 dakika bekledikten sonra Petri kutularında üreme görülmemiş, diğer durumlarda log 1 – log 2 azalma görülmüştür. 24 saatten sonra % 3 NaCl ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde üreme gerçekleşmemiş, diğer koşullarda ise bakteri sayısı $>\log 3$ azalmıştır. Her iki sürede bakteri sayısındaki azalma en az 121 °C ve pH4, en fazla -20 °C, % 3 NaCl ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış gümüş sülfadiazinin bulunduğu örneklerde olmuştur (Şekil 4.12)

K. pneumoniae biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalma 15. dakikada pH4 ve 121 °C’ye maruz kalmış gümüş sülfadiazinde $<\log 2$, diğer durumlarda $>\log 2$ olmuştur. 24 saatten sonra ise tüm durumlarda $\geq \log 3$ azalma görülmüştür. Diğer bakteri

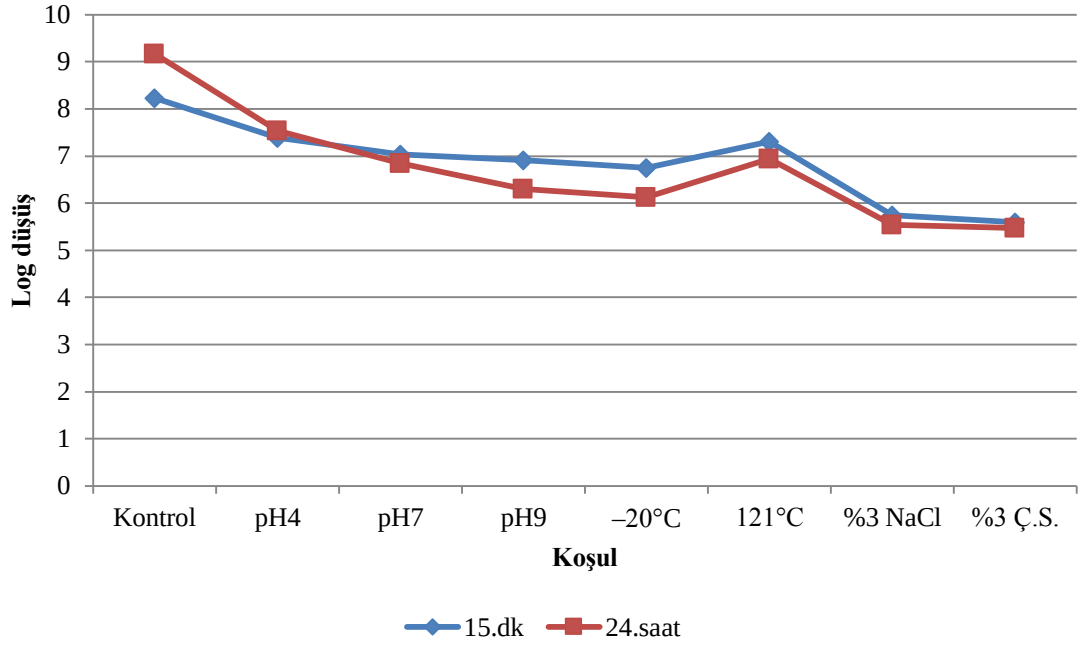
biyofilmlerinde görüldüğü gibi her iki sürede bakteri sayısındaki azalma en az 121 °C ve pH4 koşuluna maruz kalan örneklerde görülmüştür (Şekil 4.13).

Tüm bakteri biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalma, gümüş sülfadiazinin etkinliğinin en çok -20 °C ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış durumda, en az ise 121 °C ve pH4'e maruz kalmış durumda olduğu göstermektedir.

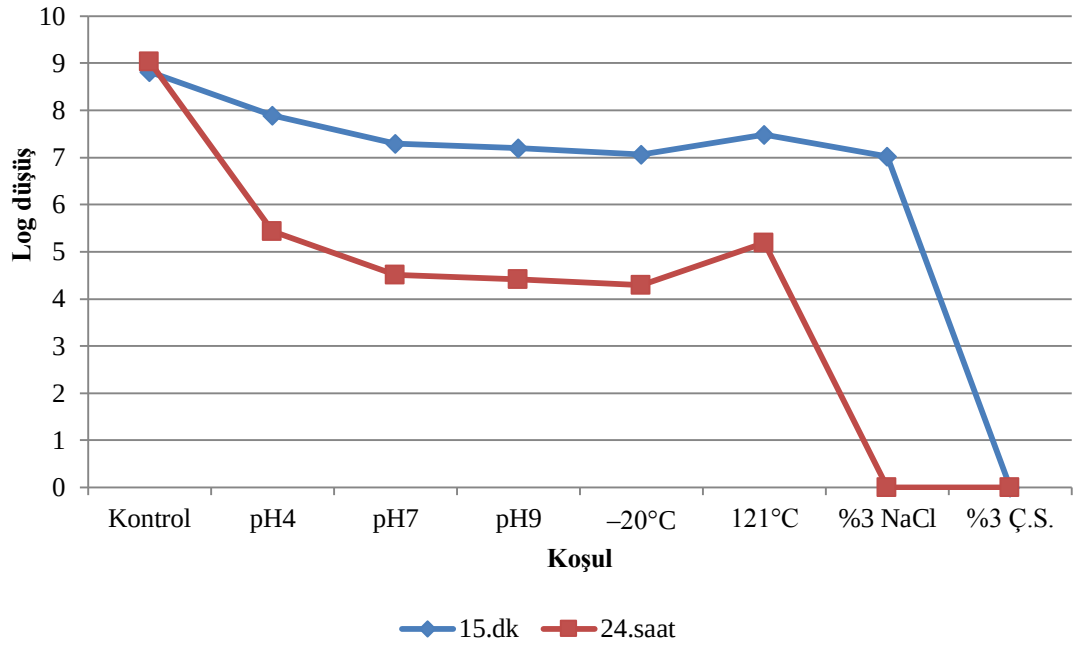
Gümüş sülfadiazinin kültür sonuçlarıyla yapılan istatistiksel karşılaştırma analizleri ile her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı tüm koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Dezenfektanın etkinliği anlamak için karşılaştırdığımız ikinci kontrol grubu olan pH7 koşuluna göre ise her iki sürede anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$).



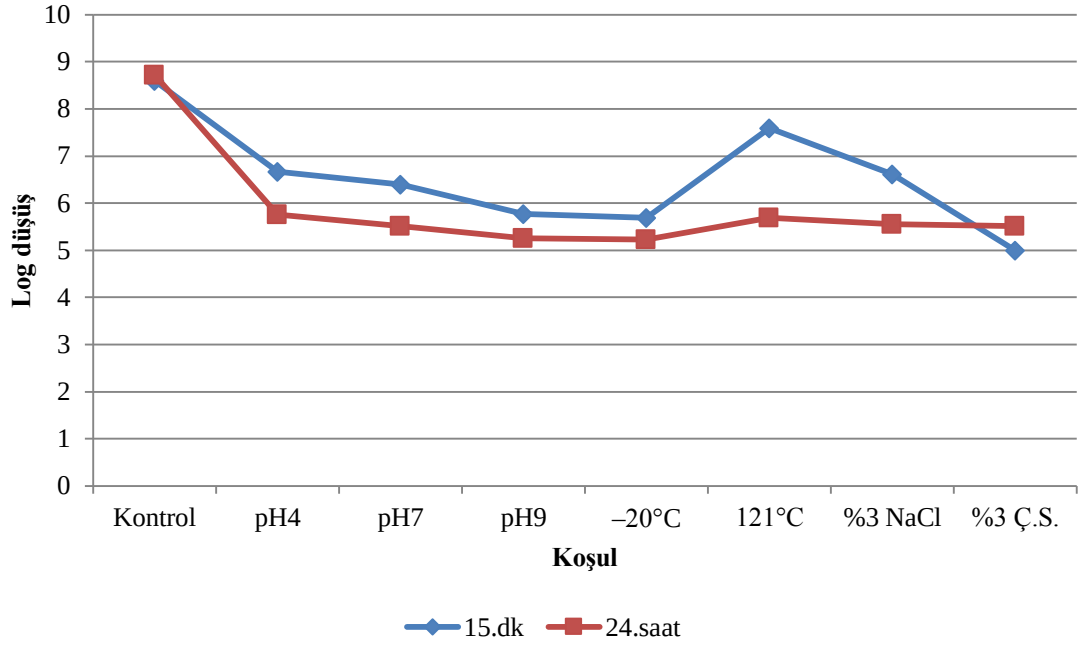
Şekil 4.10: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin *S. aureus* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.



Şekil 4.11: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin *P. aeruginosa* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.



Şekil 4.12: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin *E. coli* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.



Şekil 4.13: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin *K. pneumoniae* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.

4.3.3. Epifloresan Mikroskop Sonuçları

Farklı koşullara maruz bırakılan % 1 gümüş sülfadiazinin bakterilere karşı 15. dakika ve 24. saatteki etkinliğini incelemek için DAPI-CTC boyası ile boyanan örnekler epifloresan mikroskopta incelenmiş ve bakteri biyofilmlerinde toplam ve canlı mikroorganizma sinyal sayısı elde edilmiştir (Tablo 4.4 - 4.7). Canlı sinyal sayısındaki azalma karşılaştırmak için kontrol grubu olarak dezenfektana maruz kalmayan biyofilm örneği seçilmiştir. Dezenfektanın hangi koşullarda etkinliğinin değiştiğini saptamak için ise ikinci kontrol grubu olarak, pH7 koşuluna maruz kalan dezenfektanın uygulandığı bakteri biyofilm örneği seçilmiştir.

Toplam ve canlı mikroorganizma sayılarına göre *S. aureus* biyofilminin dezenfektana maruz bırakılan sürenin 15. dakikasında sayılan canlı bakteri oranının en çok % 3 NaCl ve 121 °C, en az ise -20 °C'de maruz kalmış dezenfektanın uygulandığı örneklerde olduğu görülmektedir. 24. saatte ise her örnekte canlı bakteri sayısında azalma görülürken % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örnekte azalma görülmediği, 15. dakikada

olduğu gibi en çok canlı bakterinin 121 °C’de, en az canlı bakteri sayısının -20 °C’de bekletilen gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerde olduğu saptanmıştır (Tablo 4.4).

P. aeruginosa biyofilminin dezenfektanla temasının 15. dakikasında en fazla canlı bakteri % 3 çamaşır suyu ve 121 °C’ye, en az canlı bakteri sayısı ise -20 °C’ye maruz kalan örneklerde sayılmıştır. 24. saatte ise en çok canlı bakteri sayısı pH4 ve 121 °C’de, en az -20 °C ve % 3 NaCl’de bekletilen gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerde görülmüştür (Tablo 4.5).

E. coli biyofilminin dezenfektanla temas sürenin 15. dakikasında sayılan canlı bakteri oranının en çok % 3 çamaşır suyu ve pH4, en az ise -20 °C’de maruz kalmış dezenfektanın uygulandığı örneklerde olduğu görülmektedir. 24. saatte ise % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örnekte çok az azalma görülmekle beraber en fazla canlı bakteri sayısının da bu örnekte ve 121 °C’de, en az canlı bakteri sayısının -20 °C ve % 3 NaCl’de bekletilen gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerde olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.6).

K. pneumoniae biyofilminin dezenfektanla temasının 15. dakika ve 24. saatinde en fazla canlı bakteri sayısı oranı 121 °C ve pH4’e, en az canlı bakteri sayısı ise % 3 çamaşır suyu ve -20 °C’ye maruz kalan örneklerde görülmüştür. (Tablo 4.7).

Genel olarak tüm bakteri biyofilminin farklı koşullara maruz kalan dezenfektan ile 15 dakika ve 24 saatlik temasından sonra canlı bakteri sayısındaki en az azalmanın pH4 ve 121 °C’ye, en fazla azalmanın ise -20 °C’ye maruz kalan örneklerde olduğunu görmekteyiz.

Epifloresan mikroskopta elde edilen canlı bakteri sayıları ile kültür sonuçlarını karşılaştırdığımızda, gümüş sülfadiazinin maruz kaldığı koşullara göre etkinlik sıralamasının birbirine tutarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak % 3 çamaşır suyuna maruz kalan gümüş sülfadiazinin sonuçlarında iki yöntemde farklılaşma görülmüştür. *S.aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakteri biyofilmlerinin kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyuna maruz kalan koşulda üreme çok az ya da yokken, DAPI-CTC boyama sonuçlarında canlı sinyal sayısı oldukça fazladır. *K. pneumoniae* biyofilminde bu durum geçerli değildir. *K. pneumoniae* için hem kültür hem de DAPI-CTC boyama yöntemi sonuçları tüm koşullarda tutarlıdır.

Tablo 4.4: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazin farklı sürelerde uygulanmasının ardından *S.aureus* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	4.59x10 ⁶	1.24x10 ⁶		4.95 x10 ⁶	2.6 x10 ⁵	
	±21.31	±4.57	27.01	±25.38	±2.21	5.25
	(log 6.66)	(log 6.09)		(log 6.69)	(log 5.41)	
pH7 (kontrol)	2.92 x10 ⁶	1.08x10 ⁶		4.52 x10 ⁶	4.55 x10 ⁵	
	±43.86	±34.22	36.98	±40.36	±3.59	10.06
	(log 6.46)	(log 6.03)		(log 6.65)	(log 5.65)	
pH9	1.93x10 ⁶	1.5x10 ⁵		3.17 x10 ⁶	1 x10 ⁵	
	±22.01	±2.07	7.77	±21.75	±0.89	3.15
	(log 6.28)	(log 5.17)		(log 6.50)	(log 5)	
-20 °C	3.85 x10 ⁶	2 x10 ⁵		1.87 x10 ⁶	3 x10 ⁴	
	±44.28	±3.59	5.19	±17.10	±1.16	1.60
	(log 6.58)	(log 5.30)		(log 6.27)	(log 4.47)	
121°C	3.76 x10 ⁶	1.48 x10 ⁶		2.39 x10 ⁶	3.5 x10 ⁵	
	±42.71	±17.78	39.36	±10.20	±4.74	14.64
	(log 6.57)	(log 6.17)		(log 6.37)	(log 5.54)	
% 3 NaCl	1.95 x10 ⁶	1.12 x10 ⁶		1.5 x10 ⁶	8.5 x10 ⁴	
	±22.58	±14.33	57.43	±16.27	±2.34	5.66
	(log 6.29)	(log 6.04)		(log 6.17)	(log 4.92)	
% 3 çamaşır suyu	1.73 x10 ⁶	5 x10 ⁵		1.96 x10 ⁶	5.7 x10 ⁵	
	±13.16	±16.30	28.90	±33.97	±10.83	29.08
	(log 6.23)	(log 5.69)		(log 6.29)	(log 5.70)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	3.27 x10 ⁶	2.93 x10 ⁶		1.46 x10 ⁶	1.2 x10 ⁶	
	±24.05	±17.96	89.60	±14.63	±5.98	82.19
	(log 6.51)	(log 6.46)		(log 6.16)	(log 6.07)	

Tablo 4.5: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazin farklı sürelerde uygulanmasının ardından *P. aeruginosa* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

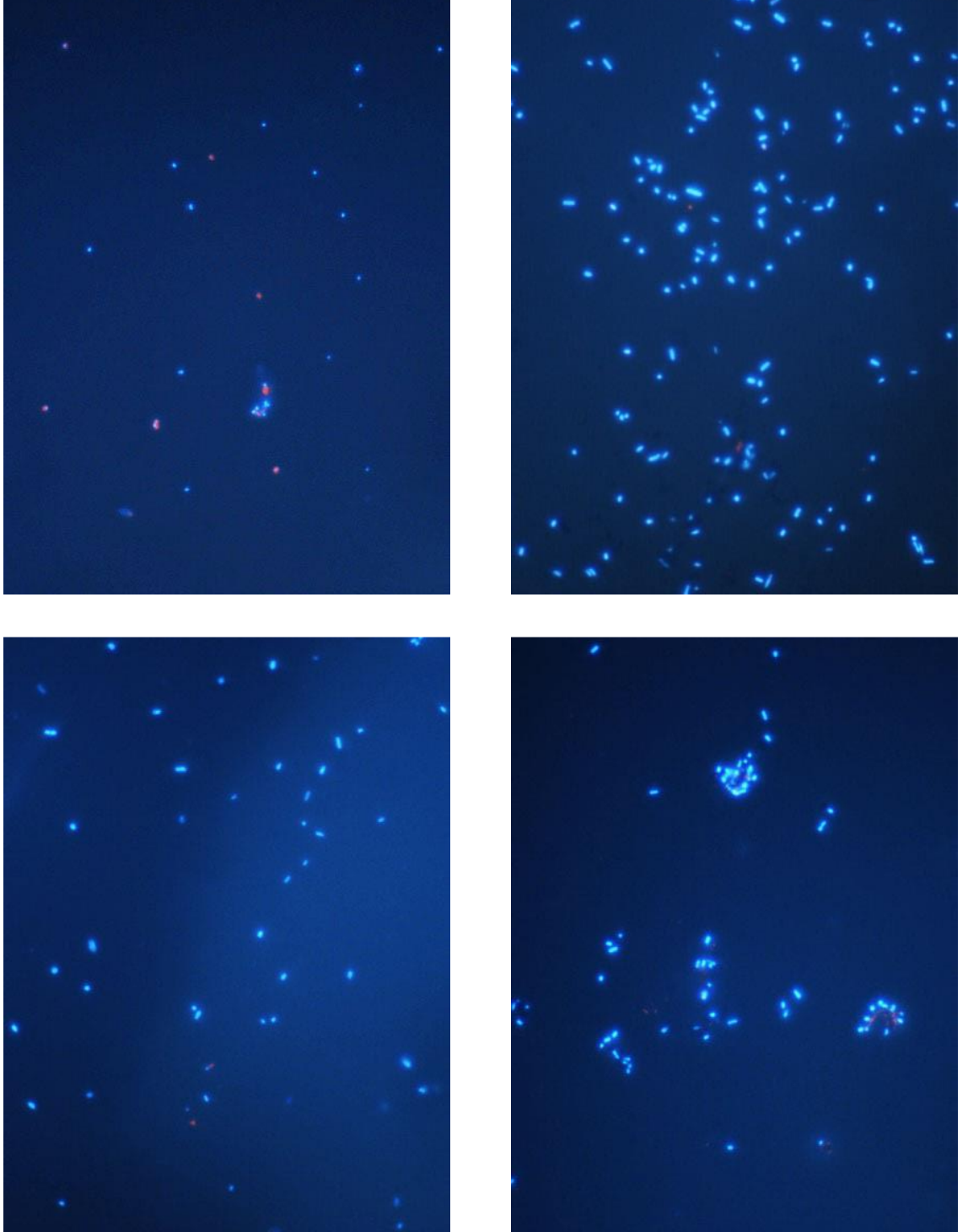
Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	3.1x10 ⁶	4.6x10 ⁵		2.45 x10 ⁶	7.1x10 ⁵	
	±38.55	±6.19	14.83	±25.34	±9.46	28.97
	(log 6.49)	(log 5.66)		(log 6.38)	(log 5.85)	
pH7 (kontrol)	3.65x10 ⁶	4.15x10 ⁵		4.91x10 ⁶	8.1 x10 ⁵	
	±39.69	±6.48	11.36	±22.21	±8.22	16.49
	(log 6.56)	(log 5.61)		(log 6.69)	(log 5.94)	
pH9	5.06x10 ⁶	4.7x10 ⁵		9.3x10 ⁶	1.48x10 ⁶	
	±27.96	±8.07	9.29	±56.00	±9.24	15.91
	(log 6.70)	(log 5.67)		(log 6.96)	(log 6.17)	
-20 °C	3.33x10 ⁶	2.3 x10 ⁵		6.09x10 ⁶	7.1 x10 ⁵	
	±34.90	±2.87	6.90	±23.07	±11.34	11.65
	(log 6.52)	(log 5.36)		(log 6.78)	(log 5.85)	
121°C	4.11x10 ⁶	1.03 x10 ⁶		4.8 x10 ⁶	1.32x10 ⁶	
	±42.66	±11.23	25.06	±26.45	±12.99	27.50
	(log 6.61)	(log 6.01)		(log 6.68)	(log 6.12)	
% 3 NaCl	3.92x10 ⁶	2.4 x10 ⁵		7.56 x10 ⁶	8.35 x10 ⁵	
	±31.28	±1.86	6.12	±26.41	±5.97	11.04
	(log 6.59)	(log 5.38)		(log 6.87)	(log 5.92)	
% 3 çamaşır suyu	7.49x10 ⁶	3.08 x10 ⁶		7.09x10 ⁶	3.5 x10 ⁵	
	±110.86	±86.02	41.12	±19.49	±2.43	4.93
	(log 6.87)	(log 6.48)		(log 6.85)	(log 5.54)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	2.94 x10 ⁶	2.74 x10 ⁶		5.08 x10 ⁶	4.59x10 ⁶	
	±42.59	±35.33	93.19	±60.63	±54.32	90.35
	(log 6.46)	(log 6.43)		(log 6.70)	(log 6.66)	

Tablo 4.6: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin farklı sürelerde uygulanmasının ardından *E. coli* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	7.6×10^5	3.1×10^5		2.52×10^6	3.5×10^5	
	± 5.61	± 2.77	40.78	± 20.66	± 3.80	13.88
	(log 5.88)	(log 5.49)		(log 6.40)	(log 5.54)	
pH7 (kontrol)	2.21×10^6	4×10^5		1.2×10^6	1.6×10^5	
	± 13.30	± 4.73	18.09	± 6.59	± 2.69	13.33
	(log 6.34)	(log 5.60)		(log 6.07)	(log 5.20)	
pH9	3.9×10^6	5.5×10^5		4.7×10^6	6.2×10^5	
	± 20.55	± 4.96	14.10	± 18.59	± 12.79	13.19
	(log 6.59)	(log 5.74)		(log 6.67)	(log 5.79)	
-20 °C	1.7×10^6	1.7×10^5		1.5×10^6	1.4×10^5	
	± 22.80	± 1.72	10	± 8.09	± 2.15	9.33
	(log 6.23)	(log 5.23)		(log 6.17)	(log 5.14)	
121 °C	2.21×10^6	4.3×10^5		5.7×10^6	1.54×10^6	
	± 20.07	± 4.64	19.45	± 37.42	± 18.91	27.01
	(log 6.34)	(log 5.63)		(log 6.75)	(log 6.18)	
% 3 NaCl	3.46×10^6	5.7×10^5		2.45×10^6	2.35×10^5	
	± 26.88	± 5.85	16.47	± 28.31	± 6.06	9.59
	(log 6.53)	(log 5.75)		(log 6.38)	(log 5.37)	
% 3 çamaşır suyu	2.86×10^6	2.08×10^6		2×10^6	1.11×10^5	
	± 24.46	± 22.69	72.72	± 24.87	± 16.61	55.50
	(log 6.45)	(log 6.31)		(log 6.30)	(log 5.04)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	2.27×10^6	2.09×10^6		3×10^6	2.85×10^6	
	± 19.24	± 10.89	92.07	± 31.21	± 25.24	95
	(log 6.35)	(log 6.32)		(log 6.47)	(log 6.45)	

Tablo 4.7: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin farklı sürelerde uygulanmasının ardından *K. pneumoniae* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	2.28 x10 ⁶	7.3 x10 ⁵		5.58 x10 ⁶	5.9 x10 ⁵	
	±15.40	±5.84	32.01	±22.34	±5.68	10.57
	(log 6.35)	(log 5.86)		(log 6.74)	(log 5.77)	
pH7 (kontrol)	1.99 x10 ⁶	5.9 x10 ⁵		2.9 x10 ⁶	2.3 x10 ⁵	
	±21.12	±5.71	29.64	±30.15	±4.42	7.93
	(log 6.29)	(log 5.77)		(log 6.46)	(log 5.36)	
pH9	2.07 x10 ⁶	5 x10 ⁵		3.2 x10 ⁶	1.45 x10 ⁵	
	±29.59	±5.94	24.15	±28.16	±3.07	4.53
	(log 6.31)	(log 5.69)		(log 6.50)	(log 5.16)	
-20 °C	7.42 x10 ⁶	1.32 x10 ⁶		2.72 x10 ⁶	8.5 x10 ⁴	
	±26.27	±17.65	17.79	±22.32	±2.12	3.12
	(log 6.87)	(log 6.12)		(log 6.43)	(log 4.92)	
121 °C	1.97 x10 ⁶	9.35 x10 ⁵		2.48 x10 ⁶	2.4 x10 ⁵	
	±24.67	±6.63	47.46	±21.87	±3.84	9.67
	(log 6.29)	(log 5.97)		(log 6.39)	(log 5.38)	
% 3 NaCl	3.17 x10 ⁶	9 x10 ⁵		3.22 x10 ⁶	2.3 x10 ⁵	
	±22.66	±8.63	28.39	±25.29	±4.33	7.14
	(log 6.50)	(log 5.95)		(log 6.50)	(log 5.36)	
% 3 çamaşır suyu	3.07 x10 ⁶	2.2 x10 ⁵		4.31 x10 ⁶	1.95 x10 ⁵	
	±25.91	±6.02	7.16	±24.03	±5.18	4.52
	(log 6.48)	(log 5.34)		(log 6.63)	(log 5.29)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	3.08 x10 ⁶	2.71 x10 ⁶		3.43 x10 ⁶	3.05 x10 ⁶	
	±20.65	±17.89	87.98	±35.85	±33.45	88.92
	(log 6.48)	(log 6.43)		(log 6.53)	(log 6.48)	



Şekil 4.14: Farklı koşullara maruz kalmış dezenfektanların bakteri biyofilmleri ile 24 saat etkileşiminin ardından DAPI - CTC floresan boya ile boyanmış epifloresan mikroskop görüntüleri.

(Kırmızı renkli sinyaller canlı hücreleri temsil etmektedir.)

4.3.4. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları

Farklı koşullara maruz kalan gümüş sülfadiazinin uygulandığı biyofilm örneklerinin alamar blue boyası ile boyanmasının ardından 570 nm’de ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimleri Şekil 4.15 – 4.18’de verilmiştir. Absorbans değerleri, kontrol grubu olan dezenfektana maruz kalmayan biyofilm örneği ile kıyaslanmıştır. Dezenfektanın hangi koşullarda etkinliğinin değiştiğini saptamak için ise ikinci kontrol grubu olarak, pH7 koşuluna maruz kalan dezenfektanın uygulandığı biyofilm örneği seçilmiştir.

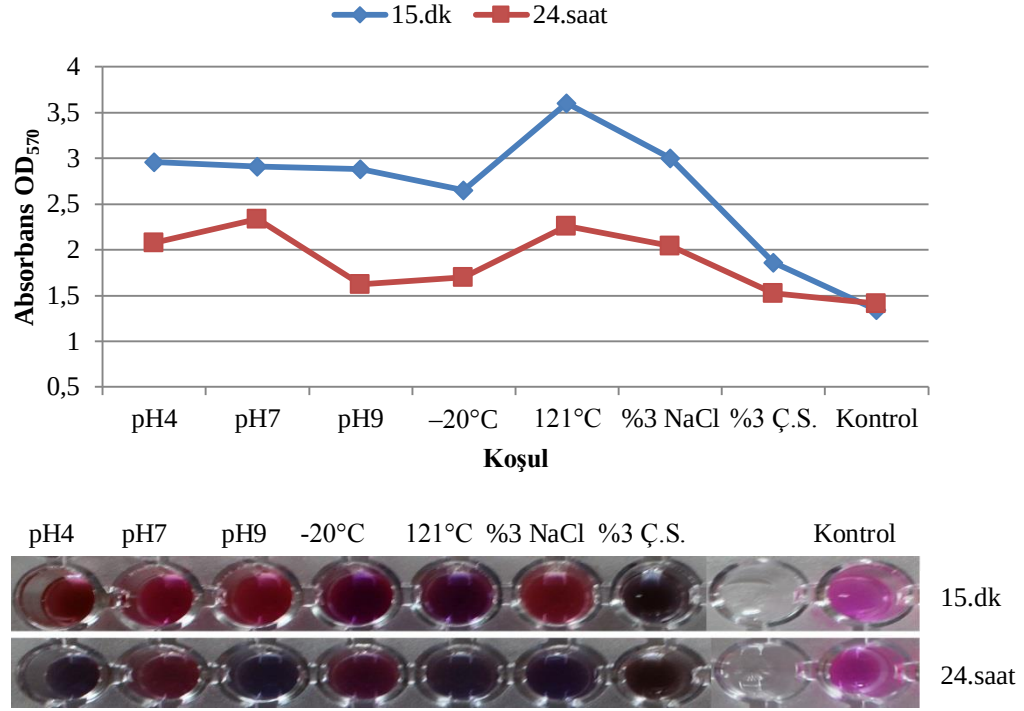
S. aureus biyofilmindeki en fazla değer her iki süre için 121 °C ve % 3 NaCl bulunan örneklerde, en az değer ise -20 °C ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde görülmektedir (Şekil 4.15).

P. aeruginosa biyofilminde en fazla değer 15. dakikada % 3 çamaşır suyu, 121 °C ve pH4’e maruz kalan örneklerde, en az ise -20 °C’de, 24. saatte ise en çok 121 °C ve pH4’de görülürken en az 15. dakikanın aksine % 3 çamaşır suyunda görülmektedir (Şekil 4.16).

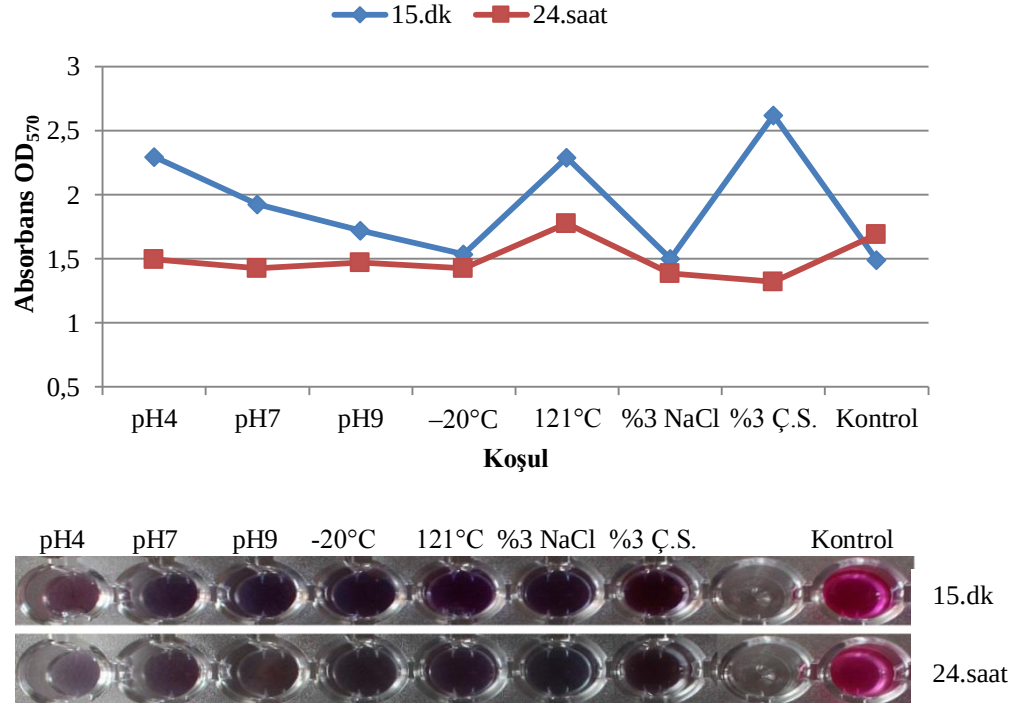
Ölçülen absorbans değerleri her iki süre için *E. coli* biyofilmindeki en fazla üremenin 121 °C ve pH4’de, en az üremenin ise 15. dakikada -20 ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde, 24. saatte ise -20 °C ve % 3 NaCl’ye maruz kalan örneklerde olduğunu göstermektedir (Şekil 4.17).

K. pneumoniae biyofilmine baktığımızda absorbans değerinin iki süre için de en fazla 121°C ve pH4’e, en az ise -20 °C ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış gümüş sülfadiazinin uygulandığı biyofilm tabakalarında olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18).

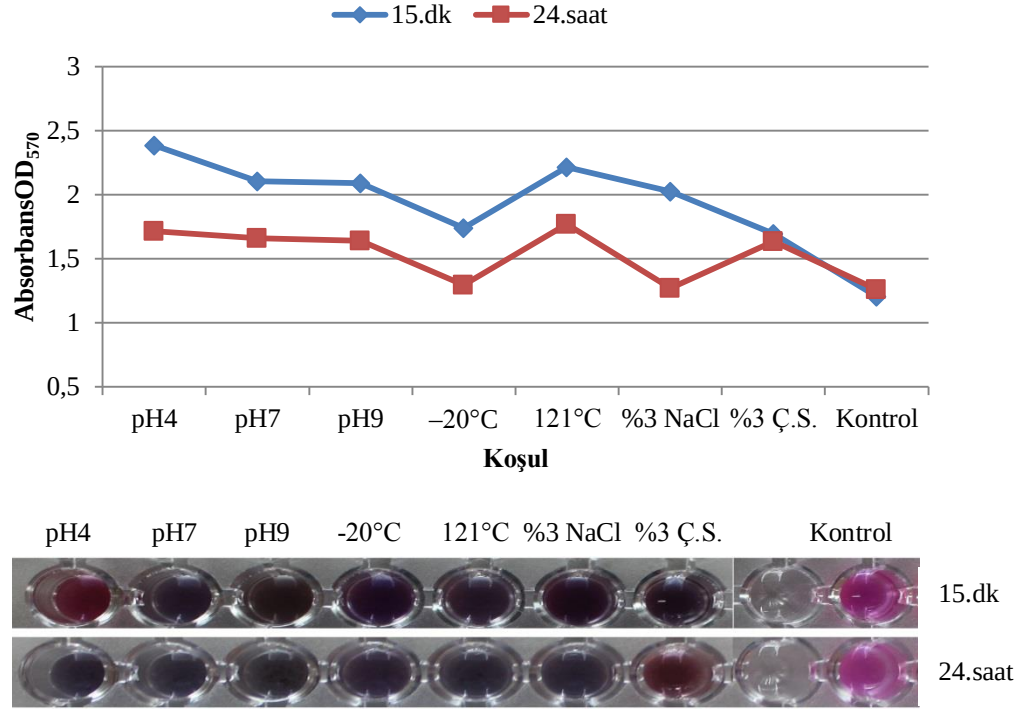
Genel olarak her iki süre için de tüm bakterilerde 121 °C ve pH4’ün uygulandığı örneklerde üremenin fazla, -20 °C’de bekletilen gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerde az olduğu ortaya çıkmıştır. Alamar blue boyama yönteminde ölçülen absorbans değerlerine göre yapılan istatistiksel analizler her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubu ve bakterinin bulunmadığı blank grubu ile anlamlı bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$).



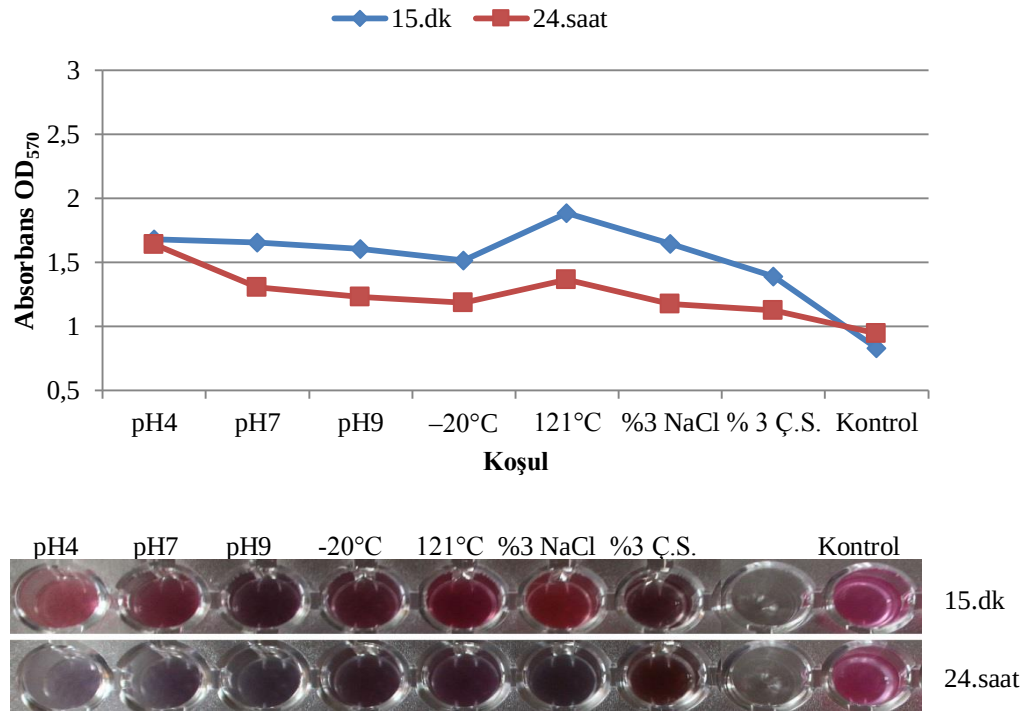
Şekil 4.15: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı *S. aureus* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.



Şekil 4.16: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı *P. aeruginosa* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.



Şekil 4.17: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı *E. coli* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.

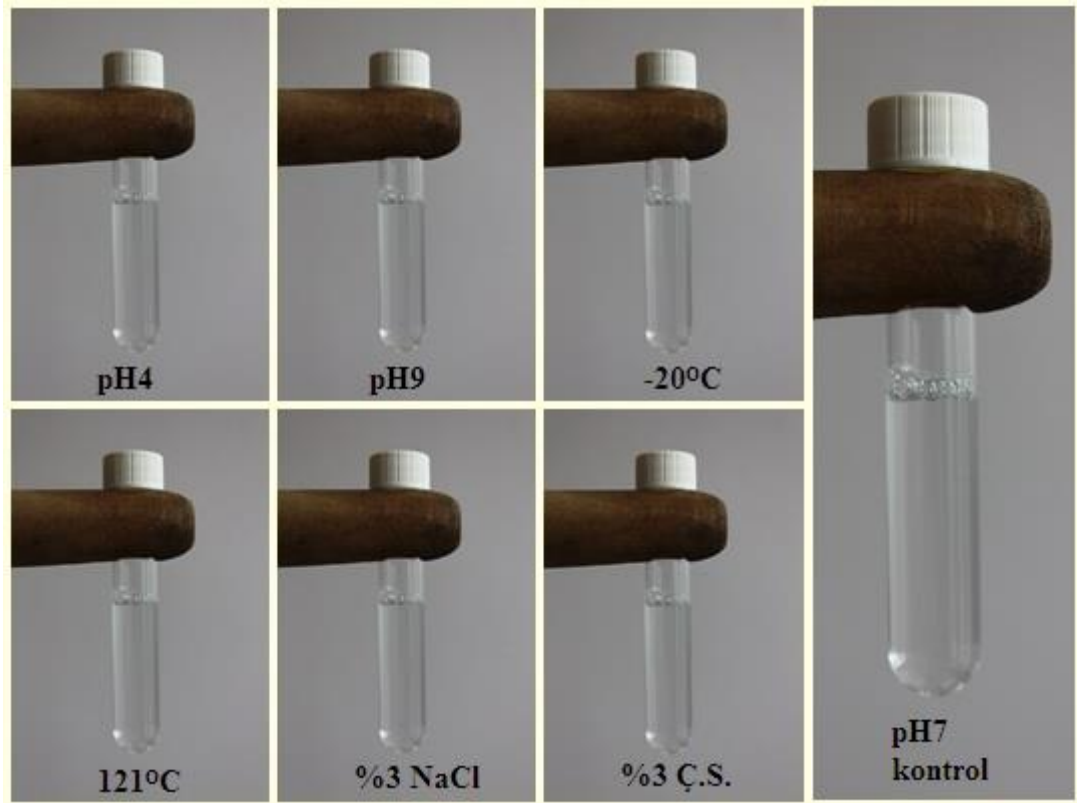


Şekil 4.18: Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazinin uygulandığı *K. pneumoniae* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.

4.4. BENZALKONYUM KlorÜRÜN FARKLI FİZİKSEL VE KİMYASAL KOŞULLARDA ETKİNLİĞİNE AİT BULGULAR

4.4.1. Benzalkonyum Klorürün Farklı Koşullardaki Fiziksel Değişimi

Bakterilerin 24 saatlik biyofilmleri üzerine uygulanan dezenfektanların farklı fiziksel ve kimyasal koşullarda etkinliğini incelemek için benzalkonyum klorürün farklı pH, sıcaklık ve osmotik ortamlara 24 saat maruz bırakılmıştır. Bu süre sonunda % 0.5 lik gümüş sülfadiazinin fiziksel olarak değişimi Şekil 4.19’de gösterilmiştir. Kontrol grubu olarak benzalkonyum klorürün pH değeri 7 olan distile su ile elde edilen süspansiyonu kullanılmıştır. pH’ı 7 olan benzalkonyum klorür ile diğer koşullardaki gümüş sülfadiazin karşılaştırıldığında pH4, pH9, -20 °C, 121 °C , % 3 NaCl çözeltisinde ve % 3 çamaşır suyunda bekletilmiş olan benzalkonyum klorürde fiziksel olarak hiçbir değişimin olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.19: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün fiziksel değişimi.

4.4.2. Bakteriyolojik Analiz Sonuçları

Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün bakterilere karşı 15. dakika ve 24. saatteki etkinliğini incelemek için nutrient agara yapılan ekimler sonucunda elde edilen bakteri sayısındaki düşüş, dezenfektana maruz kalmayan kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. Ayrıca dezenfektanın hangi koşullarda etkinliğinin değiştiğini saptamak için seçilen ikinci kontrol grubu, pH7 koşuluna maruz kalan dezenfektanın bakteri biyofilmine uygulandığı deney grubudur.

Çamaşır suyuna maruz bırakılan benzalkonyum klorürün tüm bakteri biyofilmleri ile 15 dakika ve 24 saat temas süresinin ardından Petri kutularında herhangi bir üreme görülmemiştir. Ancak diğer koşullarda üreme olmuştur.

S. aureus biyofilmindeki bakteri sayısında, 15. dakikada % 3 çamaşır suyu hariç tüm durumlarda $< \log 2$ azalma görülürken, 24. saatte $> \log 2$ azalma görülmüştür. Her iki süre için en fazla üreme pH9, pH7 ve 121 °C'de görülürken, en az üreme pH4 ve % 3 çamaşır suyuna maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerde olmuştur (Şekil 4.20).

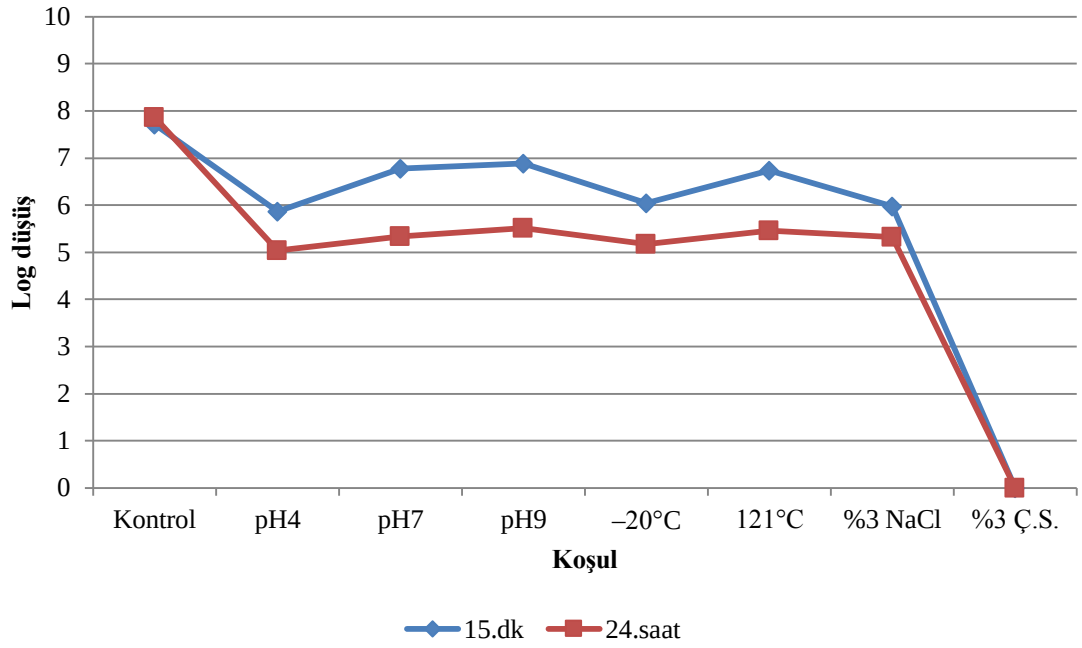
P.aeruginosa biyofilmindeki bakteri sayısı 15. dakikada % 3 çamaşır suyu hariç tüm durumlarda $\log 2$ azalma görülmüştür. 24. saatte azalma $\log 2$ ile $\log 3$ arasındadır. Her iki süre için en fazla üreme pH9, pH7 ve 121 °C'de görülürken, en az üreme pH4 ve % 3 çamaşır suyuna maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerde olmuştur (Şekil 4.21).

E. coli biyofilminde, 15. dakikada % 3 çamaşır suyu hariç tüm durumlarda $< \log 2$ azalma görülürken, 24. saat maruz bırakılan örneklerde $\geq \log 3$ azalma görülmüştür. Her iki süre için en fazla üreme pH9, pH7 ve 121 °C'de görülürken, en az üreme pH4 ve % 3 çamaşır suyuna maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerde olmuştur (Şekil 4.22).

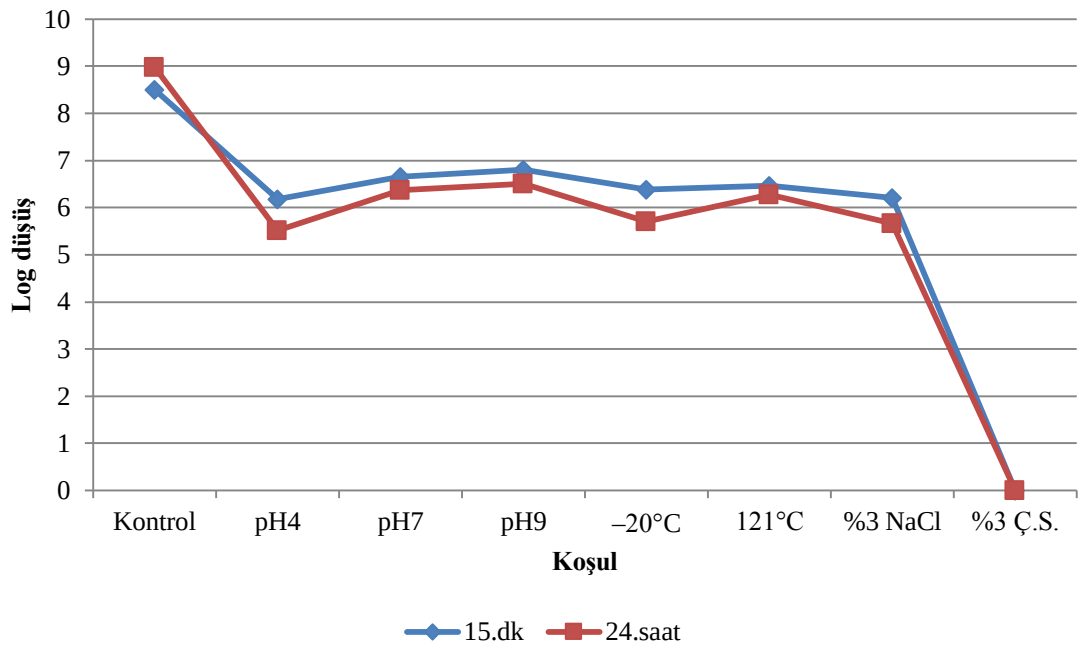
K. pneumoniae biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalma 15. dakikada $\log 2$ ile $\log 3$ arasındadır. 24. saatte ise $\geq \log 3$ azalma görülmüştür. Her iki süre için en fazla üreme pH9, pH7 ve 121 °C'de görülürken, en az üreme pH4 ve % 3 çamaşır suyuna maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerde olmuştur (Şekil 4.23).

Tüm bakteri biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmaya genel olarak baktığımız zaman, benzalkonyum klorürün en çok pH4 ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalmış durumda, en az ise pH9, pH7 ve 121 °C'ye maruz kalmış örneklerde etkili olduğu görülmektedir.

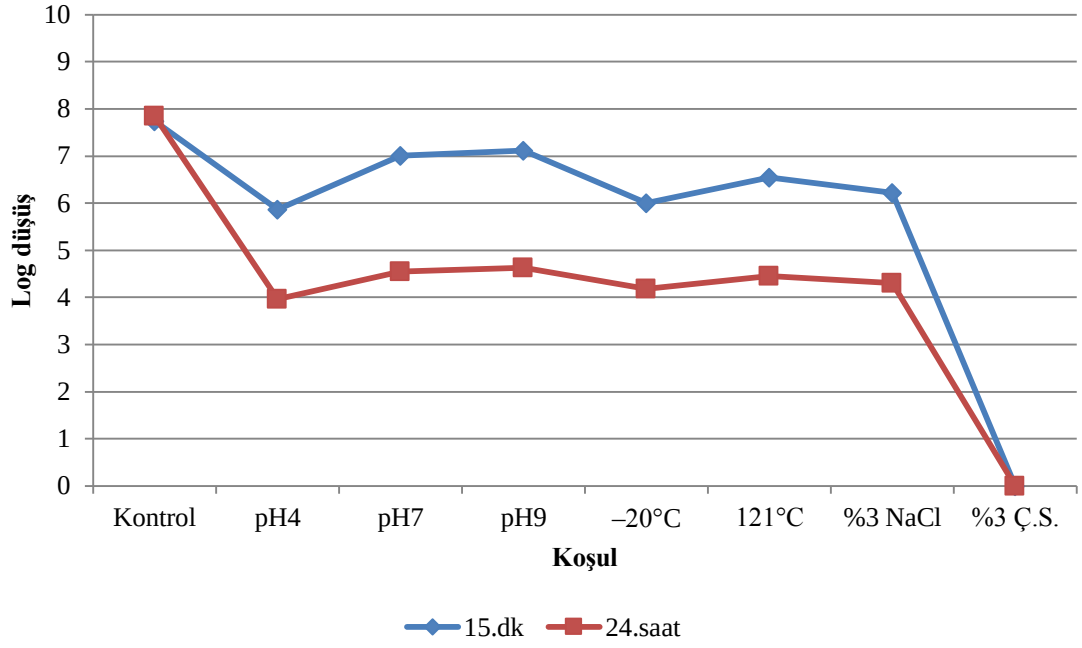
Benzalkonyum klorürün kültür sonuçlarına göre yapılan istatistiksel karşılaştırma analizleri ile her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı tüm koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubuna göre anlamlı bir fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Dezenfektanın etkinliği anlamak için karşılaştırdığımız ikinci kontrol grubu olan pH7 koşuluna göre ise her iki sürede anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$).



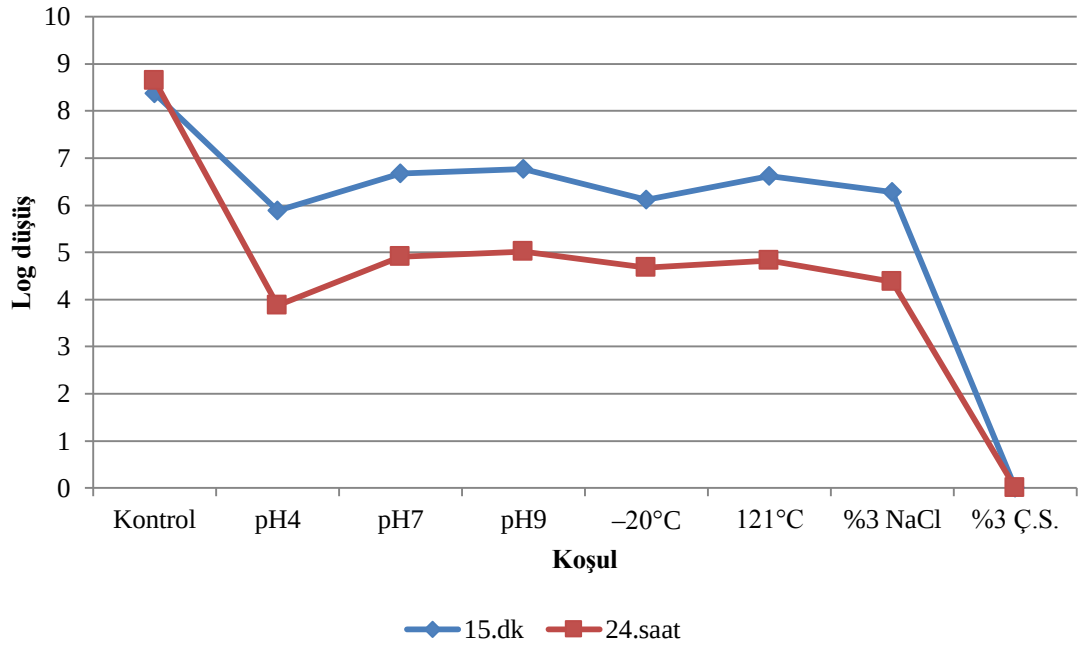
Şekil 4.20: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün *S. aureus* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.



Şekil 4.21: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün *P. aeruginosa* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.



Şekil 4.22: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün *E. coli* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.



Şekil 4.23: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün *K. pneumoniae* biyofilmindeki bakteri sayısındaki azalmayı gösteren log düşüş eğrisi.

4.4.3. Epifloresan Mikroskop Sonuçları

Farklı koşullara maruz bırakılan % 0.05 benzalkonyum klorürün bakterilere karşı 15. dakika ve 24. saatteki etkinliğini incelemek için DAPI-CTC boyası ile boyanan örnekler epifloresan mikroskopta incelenmiş ve bakteri biyofilmlerinde toplam ve canlı mikroorganizma sinyal sayısı elde edilmiştir (Tablo 4.8 - 4.11). Canlı sinyal sayısındaki azalma karşılaştırmak için kontrol grubu olarak dezenfektana maruz kalmayan biyofilm örneği seçilmiştir. Dezenfektanın hangi koşullarda etkinliğinin değiştiğini saptamak için ise ikinci kontrol grubu olarak, pH7 koşuluna maruz kalan dezenfektanın uygulandığı bakteri biyofilm örneği seçilmiştir.

Toplam ve canlı mikroorganizma sayılarına göre *S. aureus* biyofilminin dezenfektanla temasının 15. dakikası ve 24. saatinde sayılan canlı bakteri oranının fazla olduğu örneklerin, % 3 çamaşır suyu, pH9, pH7 ve 121 °C, en az ise pH4 ve -20 °C'ye maruz kalmış dezenfektanın uygulandığı örnekler olduğu görülmektedir (Tablo 4.8).

P. aeruginosa biyofilminin dezenfektanla temasının 15. dakikası ve 24. saatindeki canlı bakteri sayısını en çoktan en aza doğru sıraladığımızda, sıralamanın pH9, pH7, 121 °C, % 3 çamaşır suyu, -20 °C, % 3 NaCl ve pH4'e maruz kalan örnekler olduğu görülmektedir (Tablo 4.9).

E. coli biyofilmi dezenfektanla 15. dakika ve 24. saat temas ettikten sonra sayılan canlı bakteri oranının en çoktan en aza doğru, pH9, 121 °C, pH7, % 3 NaCl , % 3 çamaşır suyu, -20 °C ve pH4'e maruz kalan örnekler olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.10).

K. pneumoniae biyofilminin dezenfektanla temasının 15. dakika ve 24. saatinde ise en çoktan en aza doğru canlı bakteri sayısı oranı sıralaması, pH9, 121 °C, pH7, % 3 NaCl , % 3 çamaşır suyu, -20 °C ve pH4 şeklindedir (Tablo 4.11).

Tüm bakteri biyofilminin farklı koşullara maruz kalan dezenfektan ile 15 dakika ve 24 saatlik temasından sonra canlı bakteri sayısına baktığımızda benzer sonuçlar görülmektedir. Bakteri sayısındaki en az düşüşün pH9, 121 °C, pH7'e maruz kalan örneklerde, en fazla düşüşün ise pH4 ve -20 °C'de saklanmış örneklerde olduğu tespit edilmiştir.

Epifloresan mikroskopta elde edilen canlı bakteri sayıları ile kültür sonuçlarını karşılaştırdığımızda, benzalkonyum klorürün maruz kaldığı koşullara göre etkinlik sıralamasının birbirine tutarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak gümüş sülfadiazinde olduğu gibi % 3 çamaşır suyuna maruz kalan benzalkonyum klorür sonuçlarında da iki yöntemde farklılaşma görülmüştür. *S.aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakteri biyofilmlerinin kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyuna maruz kalan koşulda üreme çok az ya da yokken, DAPI-CTC boyama sonuçlarında canlı sinyal sayısı oldukça fazladır. *K. pneumoniae* biyofilminde bu durum geçerli değildir. *K. pneumoniae* için hem kültür hem de DAPI-CTC boyama yöntemi sonuçları tüm koşullarda tutarlıdır.

Tablo 4.8: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından *S.aureus* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	49x10 ⁴	3.5x10 ⁴		182.5x10 ⁴	10 ⁴	
	± 4.44	± 0.82	7.14	± 13.40	± 0.46	0.54
	(log 5.69)	(log 4.54)		(log 6.26)	(log 4)	
pH7 (kontrol)	89x10 ⁴	10 ⁵		65.5x10 ⁴	2x10 ⁴	
	± 27.6	± 1.92	11.23	± 11.91	± 0.78	3.05
	(log 5.94)	(log 5)		(log 5.81)	(log 4.30)	
pH9	62x10 ⁴	7x10 ⁴		48x10 ⁴	2x10 ⁴	
	± 5.26	± 1.13	11.29	± 7.65	± 0.81	4.16
	(log 5.79)	(log 4.84)		(log 5.68)	(log 4.30)	
-20°C	83x10 ⁴	6.5x10 ⁴		64x10 ⁴	10 ⁴	
	± 5.91	± 1.01	7.83	± 8.07	± 0.46	1.56
	(log 5.91)	(log 4.81)		(log 5.80)	(log 4)	
121°C	68.5x10 ⁴	6.5x10 ⁴		43x10 ⁴	1.5x10 ⁴	
	± 5.05	± 1.41	9.48	± 3.96	± 0.54	3.48
	(log 5.83)	(log 4.81)		(log 5.63)	(log 4.17)	
% 3 NaCl	34x10 ⁴	3x10 ⁴		37x10 ⁴	10 ⁴	
	± 5.98	± 1.21	8.82	± 5.24	± 0.51	2.70
	(log 5.53)	(log 4.47)		(log 5.56)	(log 4)	
% 3 çamaşır suyu	78.5x10 ⁴	18x10 ⁴		51x10 ⁴	2.5x10 ⁴	
	± 8.92	± 1.83	22.92	± 7.98	± 1.00	4.90
	(log 5.89)	(log 5.25)		(log 5.70)	(log 4.39)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	184x10 ⁴	169x10 ⁴		89.5x10 ⁴	83x10 ⁴	
	± 14.36	± 22.64	91.84	± 6.55	± 5.68	92.73
	(log 6.26)	(log 6.22)		(log 5.95)	(log 5.91)	

Tablo 4.9: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından *P. aeruginosa* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	67.5x10 ⁴	1.5x10 ⁴		46x10 ⁴	0.5x10 ⁴	
	± 6.99	± 0.51	2.22	± 5.95	± 0.33	1.08
	(log 5.83)	(log 4.17)		(log 5.66)	(log 3.69)	
pH7 (kontrol)	20x10 ⁴	2x10 ⁴		29.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴	
	± 1.51	± 0.53	10	± 2.13	± 0.75	11.86
	(log 5.30)	(log 4.30)		(log 5.46)	(log 4.54)	
pH9	30x10 ⁴	5x10 ⁴		19x10 ⁴	3x10 ⁴	
	± 1.41	± 0.51	16.66	± 1.14	± 0.83	15.78
	(log 5.47)	(log 4.69)		(log 5.27)	(log 4.47)	
-20°C	65.5x10 ⁴	3x10 ⁴		62x10 ⁴	10 ⁴	
	± 3.20	± 1.29	4.58	± 8.28	± 0.48	1.61
	(log 5.81)	(log 4.47)		(log 5.79)	(log 4)	
121°C	157.5x10 ⁴	10.5x10 ⁴		40x10 ⁴	3x10 ⁴	
	± 10.39	± 1.00	6.66	± 5.71	± 0.89	7.5
	(log 6.19)	(log 5.02)		(log 5.60)	(log 4.47)	
% 3 NaCl	46.5x10 ⁴	2x10 ⁴		34x10 ⁴	0.5x10 ⁴	
	± 5.57	± 0.51	4.30	± 4.08	± 0.50	1.47
	(log 5.66)	(log 4.30)		(log 5.53)	(log 3.69)	
% 3 çamaşır suyu	20x10 ⁴	10 ⁴		46x10 ⁴	4x10 ⁴	
	± 1.58	± 0.54	5	± 4.32	± 0.69	8.69
	(log 5.30)	(log 4)		(log 5.66)	(log 4.60)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	98x10 ⁴	86x10 ⁴		88x10 ⁴	80.5x10 ⁴	
	± 10.41	± 4.66	87.75	± 11.37	± 5.56	90.9
	(log 5.99)	(log 5.93)		(log 5.94)	(log 5.90)	

Tablo 4.10: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından *E. coli* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	61x10 ⁴	3x10 ⁴		73x10 ⁴	1.5x10 ⁴	
	±5.39	±0.84	4.91	±2.50	±0.54	2.05
	(log 5.78)	(log 4.47)		(log 5.86)	(log 4.17)	
pH7 (kontrol)	72.5x10 ⁴	8x10 ⁴		78x10 ⁴	5.5x10 ⁴	
	±8.19	±2.13	11.03	±5.79	±1.09	7.05
	(log 5.86)	(log 4.90)		(log 5.89)	(log 4.74)	
pH9	56.5x10 ⁴	9.5x10 ⁴		10 ⁶	8x10 ⁴	
	±5.89	±1.36	16.81	±11.17	±1.11	8
	(log 5.75)	(log 4.98)		(log 6)	(log 4.90)	
-20°C	103x10 ⁴	7.5x10 ⁴		39x10 ⁴	10 ⁴	
	±3.45	±1.06	7.28	±2.85	±0.48	2.56
	(log 6.01)	(log 4.87)		(log 5.59)	(log 4)	
121°C	70x10 ⁴	8.5x10 ⁴		45x10 ⁴	3.5x10 ⁴	
	±5.83	±0.99	12.14	±2.36	±0.75	7.77
	(log 5.84)	(log 4.92)		(log 5.65)	(log 4.54)	
% 3 NaCl	73.5x10 ⁴	5x10 ⁴		26.5x10 ⁴	10 ⁴	
	±4.92	±0.92	6.80	±1.27	±0.48	3.77
	(log 5.86)	(log 4.69)		(log 5.42)	(log 4)	
% 3 çamaşır suyu	71.5x10 ⁴	6x10 ⁴		80x10 ⁴	3x10 ⁴	
	±4.49	±0.89	8.39	±4.88	±0.89	3.75
	(log 5.85)	(log 4.77)		(log 5.90)	(log 4.47)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	92.5x10 ⁴	78.5x10 ⁴		166x10 ⁴	143x10 ⁴	
	±8.04	±6.95	84.86	±11.90	±11.53	86.14
	(log 5.96)	(log 5.89)		(log 6.22)	(log 6.15)	

Tablo 4.11: Farklı fiziksel ve kimyasal koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün farklı sürelerde uygulanmasının ardından *K. pneumoniae* biyofilm tabakasındaki toplam ve canlı mikroorganizma sayısı.

Maruz bırakılan koşullar	Temas süresi					
	15. dakika			24. saat		
	Toplam Sinyal Sayısı /ml	Canlı Mikroorganizma		Toplam Sinyal Sayısı/ml	Canlı Mikroorganizma	
		Sinyal Sayısı/ml	%		Sinyal Sayısı/ml	%
pH4	80x10 ⁴	2x10 ⁴		130x10 ⁴	0.5x10 ⁴	
	±7.18	±0.86	2.5	±11.50	±0.40	0.38
	(log 5.90)	(log 4.30)		(log 6.11)	(log 3.69)	
pH7 (kontrol)	26.5x10 ⁴	2x10 ⁴		135x10 ⁴	2x10 ⁴	
	±4.89	±0.78	7.54	±11.07	±0.78	1.48
	(log 5.42)	(log 4.30)		(log 6.13)	(log 4.30)	
pH9	32.5x10 ⁴	4x10 ⁴		127.5 x10 ⁴	2x10 ⁴	
	±3.19	±0.89	12.30	±11.72	±0.81	1.568
	(log 5.51)	(log 4.60)		(log 6.10)	(log 4.30)	
-20°C	44.5x10 ⁴	2.5x10 ⁴		125x10 ⁴	0.5x10 ⁴	
	±4.66	±0.88	5.61	±8.38	±0.37	0.4
	(log 5.64)	(log 4.39)		(log 6.09)	(log 3.69)	
121°C	35.5x10 ⁴	3.5x10 ⁴		94x10 ⁴	10 ⁴	
	±3.60	±0.82	9.86	±4.76	±0.57	1.06
	(log 5.55)	(log 4.54)		(log 5.97)	(log 4)	
% 3 NaCl	183.5x10 ⁴	8x10 ⁴		52.5x10 ⁴	0.5x10 ⁴	
	±16.63	±0.84	4.35	±5.96	±0.50	0.95
	(log 6.26)	(log 4.90)		(log 5.72)	(log 3.69)	
% 3 çamaşır suyu	48x10 ⁴	0.5x10 ⁴		74x10 ⁴	0.5x10 ⁴	
	±5.76	±0.44	1.04	±7.04	±0.31	0.67
	(log 5.68)	(log 3.69)		(log 5.86)	(log 3.69)	
Kontrol (dezenfektan bulunmayan)	119.5x10 ⁴	109.5x10 ⁴		190.5x10 ⁴	175.5x10 ⁴	
	±11.54	±10.45	91.63	±26.29	±25.45	92.12
	(log 6.07)	(log 6.03)		(log 6.27)	(log 6.24)	

4.4.4. Alamar Blue Boyama Yöntemi Test Sonuçları

Farklı koşullara maruz kalan benzalkonyum klorürün uygulandığı biyofilm örneklerinin alamar blue boyası ile boyanmasının ardından 570 nm’de ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimleri Şekil 4.24 – 4.27’de verilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri, kontrol grubu olan dezenfektana maruz kalmayan biyofilm örneği ile kıyaslanmıştır. Dezenfektanın hangi koşullarda etkinliğinin değiştiğini saptamak için ise ikinci kontrol grubu olarak, pH7 koşuluna maruz kalan dezenfektanın uygulandığı bakteri biyofilm örneği seçilmiştir.

S. aureus biyofilmindeki en fazla değer her iki süre için % 3 çamaşır suyu, pH9, pH7, en az değer ise -20 °C ve pH4’e maruz kalan örneklerde görülmektedir (Şekil 4.24).

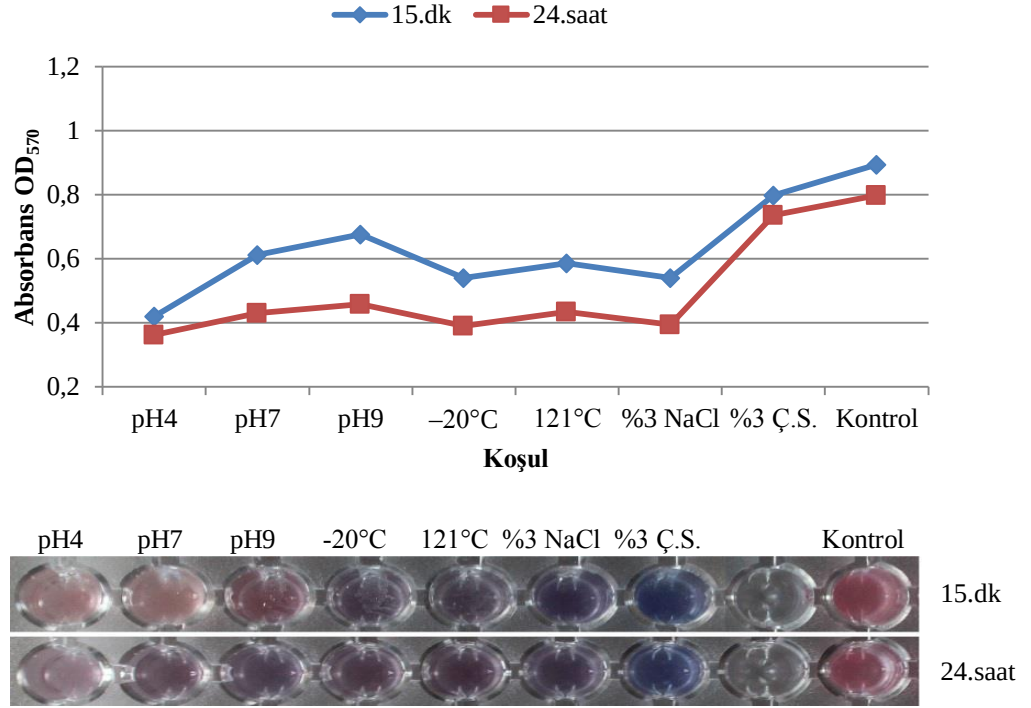
P. aeruginosa biyofilminde en fazla değer 15. dakika ve 24. saatte pH9, pH7, 121 °C ve % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde, en az ise -20 °C ve pH4’e maruz kalan örneklerde olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.25).

Ölçülen absorbans değerleri her iki süre için *E. coli* biyofilmindeki en fazla üreme pH9, 121 °C ve pH7, en az üreme ise % 3 NaCl ve pH4’e maruz kalan örneklerdedir (Şekil 4.26).

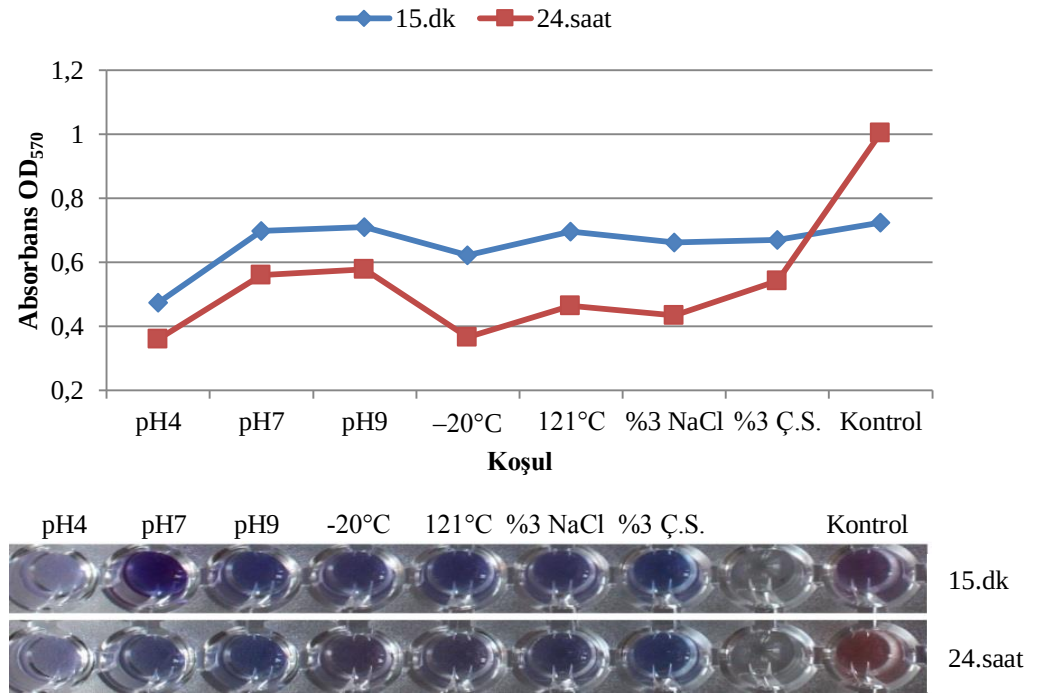
K. pneumoniae biyofilmine baktığımızda absorbans değerinin iki süre için de en fazla pH9, 121 °C ve pH7, en az ise 15. dakikada % 3 çamaşır suyu ve pH4, 24. saatte % 3 NaCl ve pH4’e maruz kalan örnekler olduğu görülmektedir (Şekil 4.27).

Tüm bakterilerin üremesinde absorbans değerlerine baktığımızda genel olarak her iki süre için de pH9, 121 °C ve pH7’nin uygulandığı örneklerde üremenin fazla, % 3 NaCl, -20 °C ve pH4’de bekletilen benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerde az olduğu ortaya çıkmıştır.

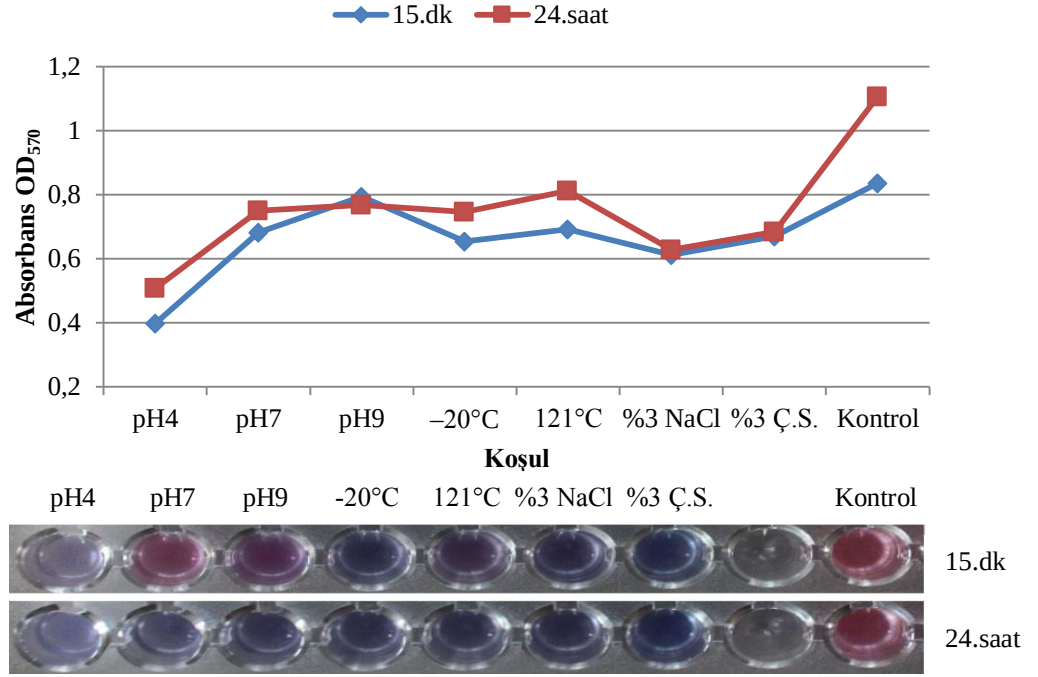
Benzalkonyum klorürün ölçülen absorbans değerlerine göre yapılan istatistiksel analizler her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı pH9 hariç diğer tüm koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşturduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Ayrıca tüm koşullar ile bakterinin bulunmadığı blank grubu arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).



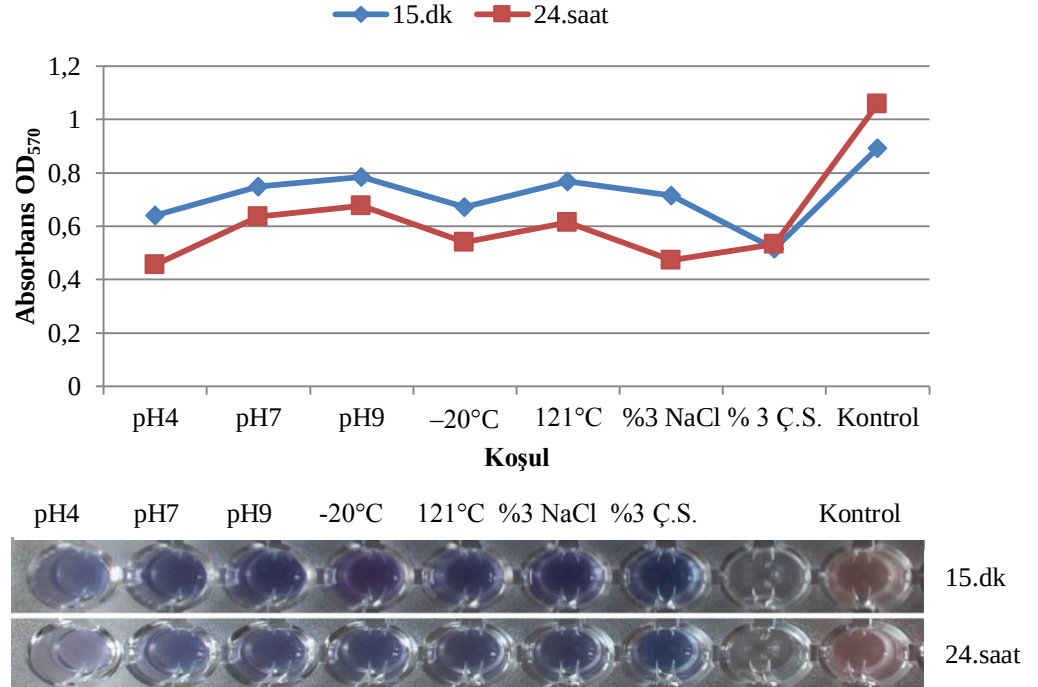
Şekil 4.24: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *S. aureus* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.



Şekil 4.25: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *P. aeruginosa* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.



Şekil 4.26: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *E. coli* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.



Şekil 4.27: Farklı koşullara maruz bırakılan benzalkonyum klorürün uygulandığı *K. pneumoniae* biyofilminde alamar blue boyama yöntemi sonucunda ölçülen absorbans değerleri ve renk değişimi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Staphylococcus aureus, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bakteriler klinik ve endüstriyel açıdan önemli, ekonomik kayıplara sebep olan bakterilerdir. Özellikle endüstride yüzeylerde oluşturdıkları biyofilmler, verimlilikte önemli düşüslere, süreçlerin aksamasına, ekipmanda zararlara neden olmakla beraber sistemin suyunda bulanıklığa, koku, tat ve renk değişimlerine, borularda ve ekipmanda biyolojik açıdan bozulmalara da yol açmaktadır. Tüm bunlarla birlikte sistemden sıvı geçişine karşı direnç gelişimine, biyofiltrelerin tıkanmasına ve metal yüzeylerde korozyona da neden olmaktadır. Gıda üretim işlemlerinde meydana gelen kontaminasyon, gıdanın temas ettiği yüzeyde biyofilm oluşumu gibi sonuçlara sebebiyet vermektedir. Gemi gövdelerinde oluşan biyofilmden dolayı, deniz taşımacılığında önemli enerji kayıpları meydana gelmektedir. Ekonomik olarak, biyofilm kaynaklı kayıplar dünya çapında yıllık milyar dolarlara ulaşmaktadır (Hallam ve diğ., 2001; Gilbert ve diğ., 2003; Zhang ve Bishop, 2003; Vatansever, 2011).

Biyofilm oluştuğu zaman onu yüzeyden ayırmak son derece güçtür ve içinde barınan bakteriler antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir (Ataol, 2011). Biyofilmi oluşturan her mikroorganizma tek başına bulunduğu, herhangi bir antimikrobiyal ajanla kolayca inhibe olmasına rağmen biyofilm mimarisi içinde yer aldığı zaman aynı mikrobiyal ajanla inhibe etmek oldukça zordur (Durack ve Beeson, 1972). Biyofilmin doğal yapısı ve biyofilm içindeki mikroorganizmalar antibiyotik, dezenfektan ve germisid gibi ajanlara karşı direnç göstermektedir. Ayrıca Laboratuvar koşullarında (*in vitro*) yapılan testlerde biyofilm bakterilerinin, planktonik bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIK) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri saptanmıştır (Stewart ve Consterton, 2001).

Antibakteriyel madde üreten firmalar, endüstriyel sistemlerin dekontaminasyonu için çeşitli biyositler ve konsantrasyonlar önermektedir. Fakat üreticiler tarafından önerilen bu konsantrasyonlar her sistem ve hedef mikroorganizma için her zaman uygun

olmayabilir (Kimiran-Erdem ve diğ., 2007; Şanlı-Yürüdü ve diğ., 2007). Ayrıca uygulanan geleneksel dezenfektan aktivite testleri ile planktonik bakterilere karşı minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) belirlenirken, biyofilmlere karşı olan belirlenememektedir. Örneğin; klinik ve endüstriyel alanlarda istenmeyen bu bakterilerin ortadan kaldırılması için iyot, iodyopolivinil-pirollidon kompleksi, klor, monokloramin, peroksijenler ve glutaraldehit gibi birçok antimikrobiyal maddeler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu biyositler planktonik hücreler üzerine güçlü bir etki gösterirken biyofilm tabakalarına ulaşamamakta ve bakteriler bunlara karşı direnç oluşturmaktadır. Bu nedenle kullanılan dezenfektan maddelerin biyofilm tabakası içerisine girişi önemlidir (Marsik ve Denys, 1995, Mataracı ve Gerçekler, 2011). Gümüş iyonlarından oluşan gümüş sülfadiazin ve kuaterner amonyum bileşiği olan benzalkonyum klorürün biyofilm tabakasına ulaşabildiği yapılan çalışmalarla belirlenmiştir ve bu dezenfektanlar ile yapılan araştırmalar artmaktadır.

Dezenfektan ve antiseptiklerin etkisinin araştırılmasında kullanılan bakteri türlerinin ve suşlarının farklılığı, denenen antiseptik ve dezenfektan maddelerin sayısının çokluğu, farklı yöntemlerin, farklı yoğunluk ve sürelerin denenmiş olması diğer çalışmalarla karşılaştırma yapılmasını kısıtlamaktadır (İrikli ve Otkun, 2007). Testlerde belli başlı standart mikroorganizmaların kullanılması genel bir avantajdır; çok fazla sayıda bakteriyi test etmek mümkün değildir; çok patojenik olanları test etmek pratik değildir. Ancak model suşlar dikkatli seçilmelidir ve seçilen test suşları grupları yansıtmalıdır. Virüs testleri bakterilere göre daha kompleks olup daha fazla laboratuvar ekipmanına ihtiyaç duyulur. Yapılan işlemler daha zahmetli, inkübasyon periyodu daha uzundur ve değerlendirme işlemi daha zordur (Çağlar, 2003). Ayrıca endüstriyel sistemlerde biyosit uygulanmadan önce, antibakteriyel ajanın laboratuvar koşullarında hem planktonik hem de biyofilm halindeki bakterilere karşı aktivitesinin belirlenmesi gereklidir (Yamamoto ve diğ., 1991; Elsmore, 1993). Bu amaçla hastane ve endüstrinin çeşitli alanlarında yüzey ve ekipman dezenfeksiyonunda sık kullanılan dezenfektan olan benzalkonyum klorür ve başta yanık enfeksiyonlarında olmak üzere çeşitli ilaçlarda kullanılan gümüş sülfadiazinin, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin, süspansiyon içinde serbest halde bulunan planktonik kültürünün yanı sıra, biyofilm kültürüne karşı minimum bakterisidal konsantrasyonlarının (MBK) belirlenmesi önemlidir (Marsik ve Denys, 1995, Mataracı ve Gerçekler, 2011). Bu nedenlerle bu

çalışmada benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazinin standart suşlar ve hastane enfeksiyonu etkeni olarak sık izole edilen *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* 'nın planktonik ve biyofilm kültürüne karşı farklı sürelerde MBK değerleri tespit edilmiştir.

Yeni geliştirilen dezenfektan ürünler farklı koşullarda test edilmelidir, fakat bu yeni ürünün maliyetini arttırmaktadır. Dezenfektanların etkinliği büyük ölçüde test metoduna göre değişmektedir. Farklı test metodları farklı etkinlik sonuçları verebilmektedir. Deneylerdeki canlı bakterilerin sayımındaki yöntem farklılıkları dahi test sonuçlarını etkilemektedir. İyi bir test, dezenfektanın uygulamadaki değerini ölçebilmeli veya tahmin edebilmelidir. Dezenfektanlar; yüzey, alet, su, atık dezenfeksiyonu, antisepsi (el, deri, mukozalar, yaralar), tıp, veterinerlik, tarım, besin endüstrisi gibi çok farklı alanlarda kullanılmaktadır. Bütün bu alanları karşılayabilecek olan tek bir test yoktur. Bu nedenle dezenfektanın belirli bir alandaki kullanımına yönelik spesifik testler geliştirilmiştir. Dezenfektan etkinliğini ölçen MİK, kapasite, süspansiyon, uygulama testleri gibi testler kullanılabilir. Bu testlerde bakterisidal, sporisidal, mikobakterisidal, fungusidal etki belirlenebilir. Fakat testlerin çeşitli avantajları, kolaylıkları ve dezavantajları vardır (Çağlar, 2003).

Kantitatif süspansiyon testleri dezenfektanların etkinliğinin değerlendirilmesinde standart olarak kullanılan testlerden biridir. Süspansiyon testlerinin çok sayıda avantajı vardır. Bu testler kapasite ve uygulama testlerine göre daha kolaydır, laboratuvarında çok rahat uygulanabilmektedir. Pahalı değildir ve laboratuvarında özel uygulama ve maliyet gerektirmezler. İyi tanımlanmış olup (defalarca) tekrarlanabilir (aynı koşullarda yeniden yapılabilir) testlerdir. Test metodolojisi içinde birçok değişken aynı anda incelenebilir (temas süresi, ısı, mikroorganizma türü, engelleyici maddeler). Potansiyel inhibitör maddeler (organik maddeler, sabun, suyun sertliği vs.) deneye eklenerek bunların etkisi de ortaya çıkarılabilmektedir. Kantitatif süspansiyon testleri günümüzde yapılan dezenfektan test şemaları içerisinde yer alan temel testlerdir. Bu testler genellikle iyi standardize edilmiştir. Süspansiyon testleri ile dezenfektan ürünün hangi kullanım konsantrasyonunda uygulanabileceği ve ne kadar sürede etki göstereceği belirlenmiş olur. Kantitatif süspansiyon testleri ile dezenfektan ürünün bakterisidal, fungusidal etkisi olup olmadığı rahatlıkla öğrenilebilir. Süspansiyon testleri hem ürün

geliştirilirken tarama testi olarak kullanılabilir hem de bu test ile hastane suşlarının dezenfektanlara dirençli olup olmadığı kolaylıkla öğrenilebilir. Son yıllarda hastanelerde MRSA, VRE (vankomisine dirençli enterokok) ve multi-dirençli Gram (-) bakterilerin arttığı göz önüne alındığında, bu dirençli suşların dezenfektanlara direncinin artıp artmadığı kantitatif olarak tespit edilmiş olur (Çağlar, 2003).

Çalışmada farklı konsantrasyondaki % 4'lük gümüş sülfadiazinin *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* bakteri suşlarının süspansiyon ve mikropalakalarda oluşturulmuş 24 saatlik biyofilmine karşı, 0, 15, 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas süreleri sonucunda bakteri üremesindeki düşüşün $> \log 3$ olduğu değer bulunarak gümüş sülfadiazinin MBK değerleri saptanmıştır. Dezenfektan testlerinde mikrobiyosidal aktivite log redüksiyon faktörü ile ifade edilmektedir. Log redüksiyon faktörü (RF) veya mikrobisidal etki (ME), dezenfektan maruziyeti öncesindeki mikroorganizma sayısının logaritması ile dezenfektanla muamele sonrasında canlı kalmış olan mikroorganizma sayısının logaritması arasındaki farktır (Çağlar, 2003).

Luppens ve diğ. (2002), Gram (+) bakterilerin antibakteriyel ajanlara karşı Gram (-) bakterilere göre daha duyarlı olmasına rağmen, *S. aureus* biyofilminin dezenfektanların oluşturduğu stres koşullarında daha dirençli olduğunu göstermiştir. Oysa çalışmamızda tüm bakteri türlerini karşılaştırdığımızda Gram (+) olan *S. aureus* suşunun diğer Gram (-) bakterilerin hem planktonik hem de biyofilmine göre gümüş sülfadiazine karşı daha dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bakterilerin planktonik ile biyofilm halleri tür içinde karşılaştırıldığında ise tüm bakterilerin biyofilm oluşturdıklarında planktonik hücrelere kıyasla MBK değerlerinin artış gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Planktonik formdan biyofilm haline geçerken MBK değerindeki en fazla artış *P. aeruginosa* suşunda meydana geldiği saptanmıştır. *P. aeruginosa* biyofilminin süspansiyon haline göre diğer bakteriler arasında en fazla direnç mekanizmasını geliştirdiği görülmektedir. Buradan bakteriler biyofilm oluşturdıklarında dezenfektanların uygulanacak konsantrasyon değerlerinin arttığı ortaya çıkmaktadır. *E. coli* ve *K. pneumoniae* için sonuçlar aynıdır. Planktonik halleri için 24. saatteki MBK değeri % 0.5, biyofilm halleri için % 1 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda gümüş sülfadiazinin 24 saatlik temas sürelerine bakıldığında süspansiyon halindeki bakteriler için en yüksek değer

olan 256 µl/ml (% 1.024), biyofilm için ise 512 µl/ml (% 2.048) gümüş sülfadiazin içeren dezenfektan karışımları kullanılması uygun görülmüştür.

Gümüş sülfadiazin su bazlı kremlerin içinde %1 oranında bulunmaktadır. Yanık ve yara enfeksiyonlarının tedavisi için ve bu enfeksiyonları önlemek için geniş spektrumlu antimikrobiyal madde olarak kullanılmaktadır (Atiyeh ve diğ., 2007). Fakat herhangi bir enfeksiyona karşı yanık kremlerinde genel olarak kullanılan % 1 gümüş sülfadiazin oranı tek başına dezenfektan üretimi için yeterli olmayacaktır. Dezenfektanın hem süspansiyon hem de biyofilm tabakasına etkili olabilmesi için % 1 gümüş sülfadiazinin bakterisidal etkisi olan başka bir kimyasal ile kullanılması ya da gümüş sülfadiazin oranının > % 2 olması gerekmektedir.

Charles ve diğ. (1974), gümüş sülfadiazinin *S. aureus* ve *P. aeruginosa* için kısmen inhibisyon konsantrasyonu 5 µmol/ml (% 0.15) ve en etkili olduğu inhibisyon konsantrasyonu 15 µmol/ml (% 0.44) olduğu belirtmiştir. Ancak çalışma sonuçlarımıza göre *S. aureus* için 24. saatte en etkili bakterisidal etkinin % 1 ve *P. aeruginosa* için % 0.5 olduğu tespit edilmiştir.

Sandri ve diğ. (2014), yapmış olduklarında çalışmada nanopartikül gümüş sülfadiazinin MIK değerlerini *S. aureus* için 150 µg/ml (% 0.015), *E. coli* ve *P. aeruginosa* için 37.5 µg/ml (%0.00375), MBK değerlerini > 150 µg/ml (> % 0.015) olarak saptamıştır. Oysa çalışmamızda gümüş sülfadiazinin 24. saatte MBK değerinin *S. aureus* için % 1, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterileri için MBK değerinin % 0.5 olduğu görülmektedir. Her iki çalışmadaki sonuçları karşılaştırdığımızda *S. aureus* bakterisinin bizim çalışmamızda olduğu gibi gümüş sülfadiazine karşı en fazla direnci gösteren bakteri olduğu görülmektedir.

Çalışmada farklı konsantrasyondaki % 0.5'lik benzalkonyum klorürün *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* bakteri suşlarının süspansiyon ve mikropalakalarda oluşturulmuş 24 saatlik biyofilmine karşı 0, 15, 30, 60 dakika ve 24 saatlik temas süreleri sonucunda bakteri üremesindeki düşüşün > log3 olduğu değer bulunarak benzalkonyum klorürün MBK değerleri tespit edilmiştir.

Benzalkonyum klorür ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda benzalkonyum klorürün, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Dinç, 2012).

Çalışmamızın sonuçlarına göre bakterilerin planktonik halleri için *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı, MBK değerinin tüm sürelerde 16 µl/ml (% 0.008), *P. aeruginosa*’ya karşı 0. dakikada 32 µl/ml (% 0.016), diğer tüm sürelerde 16 µl/ml (% 0.008) olduğu ve *K. pneumoniae*’ya karşı MBK değerinin tüm sürelerde 64 µl/ml (% 0.032) olduğu görülmüştür. Oysa Fazlara ve Ekhtelat (2012) yapmış oldukları çalışmada *S. aureus* ve *E. coli* için benzalkonyum klorürün minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBK) 45 mg/L (% 0.045), *P. aeruginosa* için MBK değerinin 80 mg/L (% 0.08) olduğu belirtmişlerdir. Yapmış olduğumuz deney sonuçlarına göre tespit edilen konsantrasyonlar Fazlara ve Ekhtelat (2012)’un yapmış oldukları çalışmaya göre daha azdır.

Berker (1989)’in yaptığı bir çalışmaya göre, % 0.05’lik konsantrasyondaki kuarterner amonyum bileşiğinin 2.5 dakika içinde serbest haldeki *E. coli*, *P. mirabilis*, *S. aureus*, *S. faecalis* ve *B. subtilis*’e karşı etkili olduğu tespit edilmiştir (Yüksek ve diğ., 2001). Oysa çalışmamızın sonuçlarına göre 0. dakikada serbest haldeki *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine % 0.008, *P. aeruginosa*’ya % 0.016, *K. pneumoniae*’ya % 0.032’lik benzalkonyum klorür konsantrasyonu bakteri sayısında > log 3’den azalma göstererek etkili olmuştur.

Kuda ve diğ. (2008), paslanmaz çelik yüzeye yapıştırılmış *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus* hücrelerinin benzalkonyum klorüre karşı direncini incelemiş ve *E. coli* ve *S. aureus*’un 10 dakikada 0.5 mg/ml konsantrasyonla 2 ile 6 log KOB/plak düştüğünü, *P. aeruginosa*’nın 2.0 mg/ml konsantrasyonda inaktive olduğunu göstermiştir. Oysa çalışmamızda benzalkonyum klorürün 15. dakikada *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* biyofilminde bakteri sayısında 3 log azalma sağlayan MBK değerlerinin 128 µl/ml (% 0.064), *K. pneumoniae* biyofilmi için 64 µl/ml (% 0.032) sonucuna varılmıştır. Kuda ve diğ. (2008) yapmış oldukları çalışma sonucunda 10. dakikada *P. aeruginosa* biyofilmine etki eden konsantrasyonun, *S. aureus* ve *E. coli* benzalkonyum klorüre göre daha fazla

olduğunu saptamışken, sonuçlarımıza göre 15. dakikada etkili olan konsantrasyon aynıdır.

Erbay ve diğ. (2002), benzalkonyum klorürün %1'lik solüsyonu, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarına karşı 5 ve 20. dakikalarda %100 , *P. aeruginosa* suşlarına karşı 1. dakikada %40, 5. dakikada %80 etkin olduğunu gözlemiştir (Özsoy ve diğ., 2001). Çalışmamızda *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinin planktonik hallerine benzalkonyum klorürün % 0.06 konsantrasyonu, biyofilm tabakalarına % 0.1 konsantrasyonu 15. dakikada % 100 etkili olmuştur.

Çalışmamızın sonucuna göre planktonik haldeki *P. aeruginosa*'ya karşı MBK değeri 0. dakikada 32 µl/ml (% 0.016), diğer tüm sürelerde 16 µl/ml (% 0.008), *E. coli*'ye karşı tüm sürelerde 16 µl/ml (% 0.008) olarak tespit edilmiştir. Benzer sonuçlar yapılan bazı çalışmalarda da görülmektedir. Mataracı (2010), benzalkonyum klorürün süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında saptanan MBK değerinin uygulanan her temas süresi için 16 µg/ml olduğunu belirlemiştir. Ayrıca Ohta ve diğ. (2001), katyonik dezenfektanların çeşitli bakteriler üzerinde MBK değerlerini araştırmış oldukları çalışmalarında, klinik materyalden izole etmiş oldukları *P. aeruginosa* ve *E.coli* suşlarına karşı benzalkonyum klorürün MBK değerlerini 3, 5, 10, 30, 60 ve 120 dakikalık temas süresinin sonunda 16 µg/ml olarak belirlemişlerdir.

Ortiz ve diğ. (2014) yapmış oldukları çalışmada benzalkonyum klorürün *Listeria monocytogenes* türünün alttürlerine karşı MIK değerlerini tespit etmiştir. 11 alttürün sekiz tanesine etki eden MIK değeri 2.5 mg/l, iki tanesine etki eden değer 10 mg/l ve bir tanesine etki eden değer 20 mg/l olduğu tespit edilmiştir. MIK değerleri sadece bakteri türleri arasında değil alt türler arasında da farklılık göstermektedir.

Yapılan tüm çalışmaları karşılaştırdığımızda, bakterilerin planktonik hallerine karşı etkili olan değerler genel olarak % 0.01 ve % 2 arasında bakteri ve temas süreleri bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Oysa çalışmamızın sonuçlarına göre MBK değerleri bakterilerin planktonik hallerine karşı 64 µl/ml (% 0.032), biyofilm hallerine karşı 128 µl/ml (% 0.064) olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar kullandığımız benzalkonyum klorür dezenfektanının diğer çalışmalardaki sonuçlara göre daha az konsantrasyonda daha etkili olduğunu göstermektedir.

Benzalkonyum klorüre karşı bakterilerin süspansiyon hallerinden en fazla direnci *K. pneumoniae* göstermiştir. Biyofilm durumunda ise en az direnç *K. pneumoniae* suşuna ait olup, MBK değeri değişmemektedir. Bu durum *K. pneumoniae*'nin 24 saatlik sürede biyofilm yapısına dönüşmediğini veya biyofilmin benzalkonyum klorüre karşı direnç oluşturmadığını ya da dezenfektanın biyofilme girişinin olmadığını düşündürebilir. Gümüş sülfadiazinde olduğu gibi biyofilm oluşturdıklarında bakterilere etki eden MBK değerleri artmış ve süspansiyon haline göre biyofilimde en fazla direnç mekanizması oluşturan bakteri *P. aeruginosa* olmuştur. *S. aureus* ve *E. coli* için MBK sonuçları benzerdir. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde benzalkonyum klorürün 24 saatlik temas sürelerinde süspansiyon halindeki bakteriler için 64 µl/ml (% 0.032), biyofilm için ise 128 µl/ml (% 0.064) değerlerinin etkili olduğu görülmektedir. Bu dezenfektanın üretimindeki benzalkonyum klorür oranı $\geq$ % 0,1 olması yeterli olacaktır.

Kültür yönteminin en önemli avantajı duyarlı olmasıdır. Ayrıca sayılan organizmaların kontrolü ve tanımlanmasını sağlar. Fakat bununla birlikte bazı dezavantajları da vardır (Todar, 2015). Standart kültür yöntemlerinde, mikroorganizmalarda türlere, kullanılan besiyeri bileşimine ve inkübasyon koşullarına göre değişen generasyon süresi farklılıkları, sayımın bazı koşullarda identifikasyon ile desteklenme zorunluğu gibi faktörlerle beraber sayım işlemi 10 güne kadar uzayabilmektedir. Bu uzun analiz süresine alternatif olarak getirilen hızlı yöntemler ise yüksek analiz maliyeti ve/veya hatalı sonuç alınabilme olasılıkları ve/veya analizin zorluğu gibi dezavantajları getirebilmektedir (Halkman ve Ayhan, 2000). Kültür yöntemlerinin diğer dezavantajları ise sadece canlı hücreler koloni oluşturur, birleşmiş ve zincir şeklindeki hücreler tek bir koloni içinde ürerler ve koloniler sadece uygun kültürel ortamlarda gelişirler. Ortam koşulları uygun değilse sayılan koloniler gerçekliği yansıtmamaktadır. Ayrıca toprak ya da gastrontestinal sistem gibi karışık mikrobiyal ekosistemlerde toplam bakteri sayısını saymak oldukça zordur. Bu nedenle çevredeki prokaryotların çeşitliliğini saptamak için genetik probler geliştirilmiştir (Todar, 2015). Bununla birlikte moleküler yöntemler tanı için tüm gereksinimleri henüz karşılamamaktadır. Genetik değişikliklerin her zaman fenotipik olarak ilaç direncini tam olarak göstermemesi, ilaçlara duyarlılık belirlemede her zaman kültür yöntemlerine gereksinim olacağını düşündürmektedir. Son yıllarda kültür besiyerlerinde yaşanan gelişmeler, klasik yöntemleri hala avantajlı kılmaya devam etmektedir. Örneğin bakteriyel infeksiyonların ise büyük bir çoğunluğu

A grubu beta hemolitik streptokoklar (AGBHS) ile ortaya çıkar ve tedavi edilmesi çok önemlidir. AGBHS infeksiyonlarının tanısı hızlı antijen testleri ile konabilse de bunların duyarlılığı kültür ile tanı kadar yüksek değildir (Kocagöz, 2013). Her ne kadar standart kültürel yöntemlerle yapılan mikrobiyolojik analizlerde birçok olumsuzluk varsa da bugün için gerek yasal kontrol kuruluşları tarafından yapılan analizlerde, gerek işletmelerdeki otokontrol amaçlı analizlerde yaygın olarak kullanılan ve kabul edilen sayım yöntemleri standart kültürel analizlerdir (Halkman ve Ayhan, 2000). Mikrobiyoloji laboratuvarında klasik testlerdeki gelişmeler, moleküler testlerdeki gelişmelere rağmen, klasik testlerin kullanılmaya devam etmesini sağlamaktadır. Mikroorganizmalardaki hızlı genetik değişikliklerin saptanmasına henüz moleküler testlerdeki hızlı değişim ayak uyduramamaktadır. İnfeksiyon etkenlerini saptamada hala en duyarlı yöntem mikrobiyolojik kültürdür (Kocagöz, 2013).

Mikroorganizmaların dezenfeksiyon testi sonrası yüzeyden zorla alınarak sayım işleminin yapılması aslında ideal bir durum değildir. Bu nedenle mikroorganizmaları bulunduğu yerden kaldırmayıp canlılığı ölçmek gerekmektedir. Kültür yöntemine ek olarak canlılığı tespit etmek için kolay, düşük maliyetli ve tekrarlanması mümkün olan ve biyofilm duyarlılığını ölçen bir yöntem ihtiyacı vardır. Alamar blue boyama yöntemi, metabolik aktivite tespitine dayanan kolorimetrik / florometrik büyüme indikatörü içerir. Üremenin artmasıyla sahip olduğu oksidasyon-redüksiyon (redoks) indikatörünün redüklenerek floresan yayma ve renk değiştirme özelliğine bağlı olarak ortamda canlı hücrelerin varlığını tespit etmek için kullanılmaktadır. Eğer ortamda bir üreme gerçekleşiyorsa mavi renk olan boya redüksiyon ile pembe renge dönüşür. Renk değişimi ile veriler gözle görülebilir ya da duyarlılık artışı absorbans bazlı veya floresan bazlı araçlarla ölçülebilir (Pettit ve diğ., 2005). Alamar blue boyama yöntemi ile yapılan araştırmalarda dezavantajlarından söz edilmemiştir. Yapılan bir araştırmada Markari (2009), alamar blue yönteminin dezavantajı olarak kan hücreleri sayımında kullanılan hemositometre gibi direk hücre sayan bir teknik olmadığını öne sürmüştür. Çünkü bu yöntemdeki floresan ve absorbans sinyalleri hücre sayısı ve hücre metabolizması gibi değişikliklerden etkilenebilir. Alamar blue boyama yöntemini öne çıkaran çok önemli avantajları vardır. Bunlar kolay, güvenilir, tekrarlanabilir, stabil, ekonomik ve duyarlı olması, bakteriye ve kullanıldığı aletlere toksik olmamasıdır. Ayrıca bu yöntemle ekstraksiyona ve santrifüje ihtiyaç duyulmadan kısa sürede sonuca ulaşılır.

Dezenfektanların bakterilere etki eden MBK değerlerini saptamak için klasik kültür yönteminin yanında alamar blue boyama yöntemi de uygulanmıştır. Ölçülen absorbans değerleri, bakterinin olmadığı (blank) ve dezenfektanın olmadığı (kontrol) gruplarıyla karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar kültür sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir.

Sonuçlara göre gümüş sülfadiazinin nötralizan ile etkileşiminin sonucunda ortaya çıkan kahverengi durum alamar blue testinde renk değişiminin net olmadığını göstermektedir. Üremenin olmadığı ya da az olduğu ortam mavi ve açık mor yerine siyah ve yeşile yakın, üremenin olduğu ortam ise kırmızıya yakın bir renk almıştır. Ayrıca gümüş sülfadiazin dibe çöken bir dezenfektan olduğu için örneklerin absorbans değerleri ölçüldüğünde dezenfektanın dibe çöken kısmının da ölçüldüğü ortaya çıkmaktadır. Normalde üremenin fazla olduğu, yani dezenfektan konsantrasyonunun az olduğu örneklerde absorbans değerinin en fazla, üremenin az olduğu dezenfektan konsantrasyonunun fazla olduğu örneklerde absorbans değerinin daha az çıkması gerekmektedir. Yani bu durumda absorbans değerinin benzalkonyum klorürde ölçüldüğü gibi kontrol örneklerinde daha fazla olması beklenmektedir. Ancak gümüş sülfadiazin dibe çöken bir dezenfektan olduğu için ölçülen değerler bunun tam tersini göstermektedir. Ortamın gümüş sülfadiazin konsantrasyonu ne kadar fazlaysa absorbans değeri o kadar fazla çıkmıştır. Bu nedenle alamar blue boyama yönteminin gümüş sülfadiazin gibi nötralizanla birleştiğinde renk değiştiren ve dibe çökelti yapan dezenfektanlar için sağlıklı sonuç vermediği tespit edilmiştir.

Benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerdeki alamar blue boyama yönteminden elde edilen sonuçlara göre planktonik durumdaki *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinin absorbans-konsantrasyon grafiklerindeki absorbans değerlerinin tüm sürelerde genel olarak 16 µl/ml'den düşük konsantrasyonlarda artış gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bakterilerin biyofilm halinde ise kuyucuklardaki renk değişimleri MBK değerlerinin ≥ 64 µl/ml olduğunu göstermektedir. Benzalkonyum klorür için elde edilen absorbans değerleri, alamar blue boyama yönteminin klasik kültür yöntemindeki sonuçlara yakın olduğunu göstermektedir.

Elde edilen tüm sonuçlara göre dezenfektanları kıyaslırsak benzalkonyum klorürün gümüş sülfadiazine göre bakterilerin planktonik ve biyofilm hallerine çok az konsantrasyonda kısa zamanda etki ettiğini görmekteyiz. Planktonik hücrelerde gümüş sülfadiazine en fazla direnci *S. aureus* suşu, benzalkonyum klorüre en fazla direnci *K. pneumoniae* suşu göstermiştir. Gümüş sülfadiazinde tüm bakteriler planktonik durumdan biyofilm durumuna geçtiklerinde dezenfektanın etki ettiği MBK değeri artmıştır. Benzalkonyum klorürde bu durum *K. pneumoniae* için geçerli değildir. Bakteriler planktonik halinden biyofilm haline geçtiğinde her iki dezenfektana karşı en fazla direnci *P. aeruginosa* göstermiştir. Yapılan bazı araştırmalara göre özellikle *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus* spp. ve *Providencia stuartii* birçok dezenfektanlara en fazla dirençli olan bakterilerdir. *Pseudomonas* cinsi bakterilerin klorheksidin ve fenol türü dezenfektanlarda hayatlarını devam ettirdikleri saptanmıştır (Alıcı, 2007). Ayrıca biyofilm tabakası içindeki mikroorganizmalar da fizyolojik olarak değişime uğrayıp daha dirençli hale gelmektedirler (Saraç, 2009; Alıcı, 2007; Bayrakçı-Karel, 2011).

Deneyin MBK değerlerinin saptanması kısmı için aşağıdaki çıkarımlar öne sürülebilir;

- Biyofilm bakterileri planktonik bakterilere göre çalışmada kullanılan dezenfektanlara karşı daha dirençlidir.
- Bakteriler biyofilm oluşturdıklarında her iki dezenfektana karşı en fazla direnci *P. aeruginosa* oluşturmaktadır.
- Yanık kremlerinde kullanılan % 1 gümüş sülfadiazin oranı planktonik bakterilere etkili olmasına rağmen, biyofilm bakterilerine yeterli olmamaktadır. Bu nedenle dezenfektanlarda gümüş sülfadiazin oranı $\geq$ % 2 olmalıdır.
- Benzalkonyum klorür ile yapılan tüm çalışmalarla kıyasladığımızda, bulduğumuz MBK değerlerinin diğer çalışmalarla uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir. Firmanın üreteceği dezenfektan içerisindeki benzalkonyum klorür oranının $\geq$ % 0,1 olması gerekmektedir.
- Gümüş sülfadiazin gibi nötralizan ile birleştğinde renk değiştiren ve dibe çökelti yapan dezenfektanlar için alamar blue boyama yöntemi uygun değildir.
- Benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerle uygulanan alamar blue boyama yöntemi klasik kültür yöntemi ile yakın sonuçlar vermiştir.

Bakterilerin planktonik ve biyofilm haline etki eden minimum bakterisidal konsantrasyonun bilinmesi, dezenfeksiyonun tam olarak yapıldığını göstermemektedir. Konsantrasyonun yanında enfeksiyon riskini azaltmak için ve dezenfektan uygulamasının doğru yapılabilmesi için dezenfeksiyonu etkileyen faktörlerin iyi bilinmesi gerekir. Bunlar; temas süresi, ortamın pH'sı, sıcaklığı, ortamda organik maddelerin varlığı ve miktarı, nesnenin yapısı, nisbi nem ve suyun sertliği ile mikroorganizmanın yapısı, miktarı, üreme periyodu gibi mikroorganizmaya bağlı faktörlerdir. Bakterilerin dezenfektanlara direncini etkileyen faktörler *in vitro* testlerle daha iyi belirlenirler. Fakat standardize edilmedikleri takdirde uygulamalı testlerde bu zordur. Bakterilerin taşıyıcıda, el ve alet yüzeyinde kuruması hem bakteri sayısını azaltır hem de ölümlerine neden olur. Değişiklik, kurutma zamanı, aletin sıcaklığı, ortamın nisbi nemi ayrıca sulandırıcı besiyeri, organizmanın üreme fazı gibi faktörlerden etkilenir. Değişik laboratuvarlar arasında alınan farklı sonuçlar test verimliliğini azaltır (Abbasoğlu, 2005). Ayrıca süspansiyon testlerinin temel problemi gerçek yaşamdaki uygulama sonuçlarını tam olarak yansıtmamasıdır. Gerçek yaşamda mikroorganizmalar genellikle organik maddelerin biriktiği, kuruduğu yüzeye yapışmış bir şekilde bulunmaktadır. Yani dezenfektanın gerçek yaşamdaki uygulanması sırasında bu mikroorganizmalar süspansiyon durumuna gelmemektedir. Yüzeylere tutunmuş bakterinin süspansiyon durumunda bulunmasına göre dezenfektanlara daha dayanıklı olduğu görülmüştür (Çağlar, 2003). Bu nedenle laboratuvarda alınan deney sonuçları her zaman gerçek sonuçları yansıtamamaktadır. Süspansiyon testleri bu nedenlerden dolayı en iyi olarak dezenfektanların farklı çevresel koşullarda etkili olup olmadığını değerlendiren tarama testleri şeklinde kullanılır. Bu nedenle dezenfektan etkinliği gerçek kullanım alanında da test edilmelidir (Çağlar, 2003).

Gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür ile ilgili yapılan çalışmalara bakıldığında bu dezenfektanların farklı fiziksel ve kimyasal koşullarda etkinliğine dair bir araştırma olmadığı görülmektedir. Bu nedenle çalışmada amaç, nanoteknolojik dezenfektan olan gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorürün, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerin biyofilm tabakasına ve planktonik formlarına etki ettiği minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri tespit ettikten sonra dezenfektanların farklı koşullar altında etkinliğini tespit etmektir. Bu nedenle de nanoteknolojik dezenfektanlar, farklı pH (pH4, pH7, pH9), sıcaklık (-20 °C, 121 °C),

osmotik basınç (% 3 NaCl) ve % 3 çamaşır suyu koşulları altında maruz bırakılmış ve etkinliği klasik kültür yöntemi, DAPI-CTC epifloresan boyama yöntemi ve alamar blue boyama yöntemi ile belirlenmiştir.

Gümüş sülfadiazin farklı pH, sıcaklık, osmotik ortam ve çamaşır suyuna 24 saat maruz bırakıldıktan sonra kontrol grubu olan pH7 koşulu ile karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda pH4, pH9 ve -20 °C’de bekletilmiş olan gümüş sülfadiazinde hiçbir değişimin olmadığı, 121 °C , % 3 NaCl çözeltisinde ve % 3 çamaşır suyunda bekletilen gümüş sülfadiazinde fiziksel olarak renk değişimi gerçekleşmiştir. Fakat benzalkonyum klorürün farklı koşullara maruz bırakılmasında fiziksel olarak herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Bu durum gümüş sülfadiazinin yüksek sıcaklıkta ve kimyasal çözeltilerle birleştiğinde bozulma riskini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda klasik kültür yöntemi ve alamar blue boyama yöntemine ek olarak DAPI-CTC boyama yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan DAPI ölü-canlı tüm hücrelerdeki DNA’yı hedef alan toplam bakteri sayımları için uygun bir boyadır. CTC ise aktif hücresel solunum esnasında okside formdan (renksiz) indirgenmiş hale geçtiğinde floresan ışıma yapar ve bu sayede sadece canlı bakterilerin görüntülenmesine olanak sağlar. Böylece biyosit uygulaması öncesi ve sonrası canlı fakat klasik plak sayımında kültürü yapılamayan (VBNC) formların belirlenmesi ve daha doğru sonuçların elde edilmesi mümkündür (Keevil ve Rogers 1992; de Beer ve diğ., 1994; Johansen ve diğ., 1997; Wolf, 2002; Schwartz ve diğ., 2003; Türetgen, 2008). Kültür yönteminin dezavantajı olan sürenin uzun olması ve sadece canlı bakterilerinin sayılması DAPI-CTC boyama yönteminde ortadan kalkmaktadır. Ayrıca kültür yönteminde birleşik ve zincirlenmiş bakteriler tek bir koloni şeklinde ürerken, DAPI-CTC boyama yönteminde tüm bakteriler tek tek görünmektedir. DAPI-CTC boyası DNA ve mukopolisakkaritlere yüksek afinite ve spesifite gösterir. Böylece ölü ve canlı tek bir bakteri hücresinin belirlenmesini kolaylaştırır (Grossgebauer ve Pohle, 2009).

Lechevallier (1998) yapmış olduğu çalışmadaki deney, klorlu reaktörlerle olduğunda etkinlik değerlendirilmesi CTC boyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Fakat sonuçlarda kültür hücre sayılarının solunum yapan hücre sayılarından daha fazla olduğu örnekler vardır. Bu sonuç CTC’nin klorlu reaktörlerle birleştiğinde duyarlılık eksikliği

olduğunu öne sürmüştür. Çalışmamızın DAPI-CTC boyama yöntemindeki canlı bakteri sinyalleri ile kültür yönteminde sayılan bakteri sayıları logaritmik olarak karşılaştırıldığında % 3 çamaşır suyuna maruz kalan koşul hariç diğer tüm koşullarda bu durumun geçerli olduğu görülmektedir. Yani kültür yöntemindeki canlı bakteri sayısı epifloresan mikroskopta sayılan canlı sinyal sayısından fazladır. Bu durum kırmızı ışığa yapan CTC boyasının floresan altında ve ışık gördüğü zaman hızlıca sönmesinden kaynaklanabilir. % 3 çamaşır suyuna maruz kalan koşulda sinyal sayısının kültür yöntemindeki bakteri sayısından fazla olması bakterilerin VBNC durumuna geçtiklerini düşündürülebilir.

Farklı koşullara maruz bırakılan gümüş sülfadiazin dezenfektanının uygulandığı her bir bakteri için, kültür, alamar blue ve DAPI-CTC boyama yöntemi sonuçları bir arada değerlendirilmiştir. Bakteri sayısındaki azalma dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubu ve etkinliğinin hangi koşullarda değiştiğini anlamak için dezenfektanların genel olarak kullanıldığı koşul olan pH7 kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Testlerde standart suşların kullanılması genel bir avantajdır, çok fazla sayıda bakteriyi test etmek mümkün değildir, çok patojenik olanları test etmek pratik değildir. Fakat doğada bakteriler tek tür olarak değil karışık kültür olarak bulunurlar. Bu nedenle deneyde standart suşların kullanılması dezenfektanın etki eden konsantrasyonu saptamak için doğru değildir. Standart suşlar laboratuvar ortamında pasajları alındıkça hasta suşlar haline gelir ve dezenfektanlara olan duyarlılıkları artar. Oysa doğada bulunan yabani ırklar dezenfektanlara karşı daha dirençlidir ve dezenfektanların gerçek uygulama alanlarında etki ettiği konsantrasyon daha fazladır. Dezenfektanların hastanelerde yoğun bir şekilde kullanılmasına bağlı olarak hastane patojenlerinin bu ürünlere direnç geliştirmesi son yıllarda ilgi çeken bir konudur. Dezenfektanlara azalmış duyarlılık hem uygulamadaki gözlemlere hem de laboratuvar sonuçlarına dayanmaktadır (Çağlar, 2003).

S. aureus biyofilmi için tüm sonuçlar kontrol grubu olan pH7 ile karşılaştırıldığında, uygulanan gümüş sülfadiazinin etkinliğinin en az 121 °C ve % 3 NaCl, en fazla -20 °C'de bekletilen örneklerde olduğunu göstermektedir. *S. aureus* bakteri sayısının % 3 NaCl bulunan ortamda daha fazla olması bu bakterinin tuz konsantrasyonlarında daha

iyi yaşayabildiğini göstermektedir. Kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyundaki örneklerde üreme olmazken, DAPI-CTC boyama sonuçlarında üreme oldukça fazladır ve dezenfektanın 15. dakika ile 24. saat uygulama süreleri arasında bakteri sayısında azalma görülmemiştir. Bu da *S. aureus* bakterisinin çamaşır suyunda VBNC fazına girdiğini düşündürmektedir.

P. aeruginosa ve *E.coli* biyofilmi için tüm sonuçlar kontrol grubu olan pH7 ile karşılaştırıldığında, gümüş sülfadiazinin etkinliğinin en az pH4 ve 121 °C 'de, en fazla - 20 °C'de olduğunu göstermektedir. % 3 NaCl'ye maruz kalan örneklerde de, gümüş sülfadiazinin etkinliği fazladır. Kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde üreme görülmezken, DAPI-CTC sonuçlarında üremenin en yüksek olduğu örnektir. Bu durum *P. aeruginosa*'nın % 3 çamaşır suyunda VBNC fazına girdiğini gösterebilir.

K. pneumoniae biyofilmi için tüm sonuçlar kontrol grubu olan pH7 ile karşılaştırıldığında, gümüş sülfadiazinin etkinliğinin en az 121 °C ve pH4, en fazla ise - 20 °C ve % 3 çamaşır suyunda olduğunu göstermektedir. % 3 çamaşır suyu bulunan örneklerde *K. pneumoniae* biyofilmi için VBNC fazı söz konusu değildir.

Gümüş sülfadiazinin etkinliğini araştırmak için uygulanan yöntemlerin tüm sonuçlarını incelediğimizde, tüm bakteriler için etkinliğin en az 121 °C ve pH4, en fazla -20 °C'ye maruz kalmış durumda olduğu tespit edilmiştir. Gümüş sülfadiazinin % 3 NaCl uygulanmasının ardından etkinliği değişkenlik göstermektedir. *S. aureus* bakterisi tuzlu ortamlarda daha iyi üreme gösterdiği için osmotik koşullarda bulunan gümüş sülfadiazinde canlı bakteri sayısı daha fazla çıkmış, diğer bakterilerde etkinlik artarak bakteri sayısında azalma olmuştur. Bu durum bakterilerin tuz konsantrasyonlarına olan duyarlılıklarıyla açıklanabilir. *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* bakterilerinin kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde üreme olmazken, DAPI-CTC sonuçlarında canlı bakteri oranları oldukça fazladır. Bu durum bakterilerin VBNC fazına girdiklerini düşündürmektedir. Gümüş sülfadiazinin kültür sonuçlarıyla yapılan istatistiksel karşılaştırma analizleri ile her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı tüm koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubuna göre anlamlı fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu durum dezenfektanın bulunmadığı biyofilm tabakasındaki bakteri sayısına göre dezenfektanın bulunduğu tüm koşullardaki bakteri

sayısında anlamlı olarak azalma olduğunu göstermektedir. Dezenfektan etkinliğini test etmek için karşılaştırdığımız ikinci kontrol grubu olan pH7 koşuluna göre ise her iki sürede anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Tüm bakteriler için gümüş sülfadiazinin maruz kaldığı koşullardaki bakteri sayıları kontrol grubu olan pH7 koşulu ile karşılaştırıldığında, sayısal olarak fark olmasına ve etkinlik sıralamasının benzerlik göstermesine rağmen koşullar arasındaki bakteri sayı farkları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca gümüş sülfadiazinin alamar blue boyama yönteminde ölçülen absorbans değerlerine göre yapılan istatistiksel analizler her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubu ve bakterinin bulunmadığı blank grubu ile anlamlı bir fark oluşturmadığı belirlenmiştir ($p > 0.05$). Bu durum MBK sonuçlarında olduğu gibi, alamar blue boyama yönteminin gümüş sülfadiazin gibi nötralizanla birleştğinde renk değiştiren ve dibe çökelti yapan dezenfektanlar için sağlıklı sonuç vermediğini göstermektedir.

Çalışmada kullanılan bir diğer nanoteknolojik dezenfektan olan benzalkonyum klorür, farklı koşullara maruz bırakıldıktan sonra 15. dakika ve 24. saatteki etkinliğini incelemek için uygulanan klasik kültür yöntemi, alamar blue boyama yöntemi ve DAPI-CTC boyama yöntemi sonuçları her bakteri için birlikte değerlendirilmiştir.

Kültür sonuçlarına göre çamaşır suyuna maruz bırakılan benzalkonyum klorürün tüm bakteri biyofilmleri ile 15 dakika ve 24 saat temas süresinin ardından Petri kutularında herhangi bir üreme görülmemiştir. Ancak diğer koşullarda üreme olmuştur. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* için en fazla üreme pH9, pH7 ve 121 °C'ye, en az %3 çamaşır suyu, pH4 ve -20 °C'ye maruz kalan örneklerde olmuştur. Alamar blue ve DAPI-CTC boyama yöntemine göre de sonuçlar benzerdir. Tüm bakteriler için en fazla absorbans değeri ve canlı sinyal sayısı pH9, pH7 ve 121 °C'ye maruz kalan örneklerde, en az ise pH4 ve -20 °C'ye maruz kalan örneklerde görülmüştür. Benzalkonyum klorüre ait sonuçlarda pH9, 121 °C ve kontrol grubu olan pH7 koşulu arasında çok fark olmamasına rağmen, etkinlik en az pH9 koşulundadır. Diğer koşullar kontrol grubuna göre daha fazla etkinlik göstermiştir. Kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyunda üreme olmazken, alamar blue ve DAPI-CTC boyama yönteminde canlı bakterilerin olduğu saptanmıştır. Hatta *S. aureus* için en fazla canlı bakteriye % 3 çamaşır suyunda rastlanmıştır. Bu durum bakterilerin VBNC fazına girdiklerini

düşündürebilir. Ancak *K. pneumoniae* için bu durum geçerli değildir. Uygulanan tüm yöntemlerde % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örnekte sonuçlar benzerdir.

Sonuç olarak benzalkonyum klorürün etkinliğini araştırmak için tüm sonuçları incelediğimizde tüm bakteriler için benzer sonuçlar çıkmıştır. Etkinlik en az pH9, 121 °C ve pH7, en fazla pH4 ve -20 °C'ye maruz kalmış durumda olduğu tespit edilmiştir. Benzalkonyum klorürün kültür sonuçlarıyla yapılan istatistiksel karşılaştırma analizleri ile her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı tüm koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubuna göre anlamlı fark oluşturduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Bu durum dezenfektanın bulunmadığı biyofilm tabakasındaki bakteri sayısına göre dezenfektanın bulunduğu tüm koşullardaki bakteri sayısında anlamlı olarak azalma olduğunu göstermektedir. Yani % 0.05'lik benzalkonyum klorür maruz kaldığı her koşulda uygulanan bakterilere etkili olmuştur. Dezenfektanın etkinliğini anlamak için karşılaştırdığımız ikinci kontrol grubu olan pH7 koşuluna göre ise her iki sürede anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0.05$). Tüm bakteriler için benzalkonyum klorürün maruz kaldığı koşullardaki bakteri sayıları kontrol grubu olan pH7 koşulu ile karşılaştırıldığında, sayısal olarak fark olmasına ve etkinlik sıralamasının benzerlik göstermesine rağmen koşullar arasındaki bakteri sayı farkları istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca benzalkonyum klorürün ölçülen absorbans değerlerine göre yapılan istatistiksel analizler her iki deney süresince, dezenfektanın maruz kaldığı pH9 hariç diğer tüm koşulların dezenfektanın bulunmadığı kontrol grubu ile anlamlı bir fark oluşturduğu saptanmıştır ($p < 0.05$). Bu durum pH9 koşulundaki bakteri sayısında dezenfektanın uygulanmadığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalma görülmediğini öne sürmektedir. Diğer tüm koşullarda bakteri sayısı anlamlı olarak azalmıştır. Ayrıca tüm koşullar ile bakterinin bulunmadığı blank grubu arasında anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Yani her durumda bakteri biyofilmi oluşmuştur.

Gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorürün farklı koşullar altında etkinliği gösteren araştırma olmaması rağmen, bazı araştırmalar, kuaterner amonyum bileşiklerinin en iyi dezenfektan etkisini pH 6 üzerinde gösterdiğini ve alkalilik arttıkça aktivitesi arttığını göstermektedir. Ayrıca emülsiyonlarda düşük aktivite gösterdiği ve pH 3,5'da inaktive olduğu belirtilmiştir (Haliki ve diğ., 2004; Steinberg, 2006; Watanabe ve diğ., 1998).

Oysa çalışmamızdaki sonuç bu durumun tersini ortaya koymuştur. En az aktivitenin pH 9 yani alkalik ortamda, en fazla aktivitenin pH 4 yani asidik ortamda olduğunu göstermektedir.

Nanoteknolojik dezenfektanların farklı koşullar altında etkinliği incelemek için yaptığımız deney sonuçlarına göre aşağıdaki çıkarımlar öne sürülebilir;

- Dezenfektanların farklı koşullar altında fiziksel değişimine göre gümüş sülfadiazinin yüksek sıcaklık ve kimyasal çözeltilerde birleştiğinde bozulma riski ortaya konulmuştur.
- Benzalkonyum klorür farklı koşullar altında herhangi bir fiziksel değişime uğramamış olsa da kültür, alamar blue ve DAPI-CTC boyama yöntemi sonuçları, benzalkonyum klorürün yüksek sıcaklıkta etkinliğinin azalabileceğini göstermektedir.
- Gümüş sülfadiazin sonuçlarına göre, etkinliğin en az 121 °C ve pH4, en fazla -20 °C'ye maruz kalmış durumda olduğu tespit edilmiştir.
- Benzalkonyum klorür sonuçlarına göre, etkinliğin en az pH9 ve 121 °C, en fazla pH4 ve -20 °C'ye maruz kalmış durumda olduğu tespit edilmiştir.
- Her iki dezenfektan için sıcaklık uygulamasındaki sonuçlar ortaktır. Yüksek sıcaklık dezenfektanın etkinliğini olumsuz etkilerken, düşük sıcaklık etkinliği arttırmaktadır. Yani dezenfektanlar buzdolabı gibi soğuk ortamlarda muhafaza edilmelidir.
- Her iki dezenfektana % 3 NaCl koşulu uygulamasının ardından, bakteri sayısındaki azalma diğer koşullarda olduğu gibi benzerlik göstermemektedir. Bu durum bakterilerin tuz konsantrasyonlarına olan duyarlılıklarına göre dezenfektanların etkinliğinin farklılaşması ile açıklanabilir.
- Çalışma sonucunda sadece klasik kültür metodu ile elde edilen canlılık durumunun gerçeği yansıtmadığı ortaya konmuştur. Hem gümüş sülfadiazin hem de benzalkonyum klorür için *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K.pneumoniae* bakterilerinin kültür sonuçlarında % 3 çamaşır suyuna maruz kalan örneklerde üreme olmazken, DAPI-CTC sonuçlarında canlı bakteri oranları oldukça fazladır. Bu durum bakterilerin canlı fakat kültür edilemeyen (VBNC) durumda olduklarını göstermektedir.

- İstatistiksel sonuçlar alamar blue boyama yönteminin gümüş sülfadiazin için anlamlı fark oluşturmadığını ($p > 0.05$), benzalkonyum klorür için anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Sonuç olarak gümüş sülfadiazin gibi nötralizan ile birleştğinde renk değiştiren ve dibe çökelti yapan dezenfektanlar için alamar blue boyama yöntemi uygun değildir.

Deney sürecinde elde edilen tüm sonuçlar doğrultusunda firmanın dezenfektanı piyasaya sunacağı hazır hali, kullanılan aktif maddelere göre karşılaştırılmıştır. Bir dezenfektanın ideal bir dezenfektan olabilmesi için bazı özelliklere sahip olması gerekir. Bunlar; minimum yoğunlukta maksimum etkili olması, renksiz ve kokusuz olması, suda çözünbilmesi, uygulanan yüzeyde kalıntı bırakmaması, ışık, ısı ve diğer çevresel faktörlerin varlığında bile stabil kalabilmesi gibi özelliklerdir. Bu özelliklere göre iki dezenfektanı karşılaştırdığımızda;

- Benzalkonyum klorür daha düşük konsantrasyonlarda ve daha kısa sürede etkilidir. Kullanılan % 0.5 benzalkonyum konsantrasyonları test edilen bakterilerin hem planktonik hem de biyofilm tabakalarına karşı bakterisidal etki göstermiştir.
- Benzalkonyum klorür farklı fiziksel ve kimyasal koşullardan gümüş sülfadiazine göre daha az etkilenmiştir.
- Gümüş sülfadiazin renginden dolayı uygulandığı yüzeyde beyaz bir tabaka oluştururken, benzalkonyum klorür oluşturmamaktadır. Benzalkonyum klorür renksizdir.
- Dezenfektanların üretimi yapılacak hazır halinde benzalkonyum klorürün bulunduğu karışım kokusuzken, diğer kimyasalların olması nedeniyle gümüş sülfadiazinin bulunduğu karışım ağır bir kokuya sahiptir. Bu durum dezenfektanların kokusuz ve zararsız olma özelliği ile uyuşmamaktadır.
- Bu nedenlerden dolayı benzalkonyum klorür aktif maddesinin bulunduğu nanoteknolojik dezenfektan gümüş sülfadiazinin bulunduğu dezenfektandan daha avantajlıdır.

Çalışmada dezenfektanların içerisinde bulunan iki ayrı aktif madde test edilmiştir. Fakat dezenfektanların üretime sunulacak halinde farklı kimyasallarda vardır. Bu

kimyasalların bakterilerin üzerinde etkisi tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca % 96 etanolün uçuculuk özelliğinden dolayı ortamdaki etkisi bir süre sonra kalmayabilir. Bu nedenle karışımdaki diğer kimyasallar birbirlerinin etkisini inhibe eden antagonist etki oluşturabilir. Yapılacak diğer çalışmalarda dezenfektanların üretim halinde bulunan diğer kimyasalların etkisi ve birbirleriyle olan etkileşimi ayrı ayrı ve birlikte incelenmelidir.

Dezenfeksiyonun etkili bir şekilde yapılması için sadece laboratuvar ortamında uygulanan ve tek tür mikroorganizmaya ait sonuçlar yeterli değildir. Mikroorganizmalar doğada karışık organizma grupları şeklinde bulunur ve bulunduğu ortamlara göre dezenfektanlara karşı direnç kazanarak yeni suşlar ortaya çıkabilmektedir. Çalışmada standart suşların kullanılması gerçek hayatı yansıtamamaktadır. Bu nedenle kombine dezenfektan etkinlik uygulamaları da yapılabilir ve birçok bakteri suşu aynı anda kullanılarak dezenfektanın bu bakteri karışımına etkisi incelenebilir, böylece gerçek yaşam koşulları yansıtılmış olur. Ancak kombine testin yapılması kolay değildir. Tek bir mikroorganizmayı test etmeye göre daha komplekstir ve daha fazla farklı besiyeri, ekipman, donanım gerektirir, ancak daha realistiktir. Dezenfektanların kullanılması sırasında sadece vejetatif bakteriler değil, virüs, mantar ve sporlu bakterilere karşı olan aktivitelerinin de dikkate alınması yararlı olacaktır (İrikli ve Otkun, 2007). Bu çalışmada dezenfektan maddeler bu etkileri açısından değerlendirilmemiştir.

MBK testi bakterilerin dezenfektanlara duyarlılığının gösterilmesinde, bu duyarlılıkta değişiklik olup olmadığının kantitatif olarak belirlenmesinde kullanılabilir. Dezenfektanların hastanelerde yoğun bir şekilde kullanılmasına bağlı olarak hastane patojenlerinin bu ürünlere direnç geliştirmesi son yıllarda ilgi çeken bir konudur. Dezenfektanlara azalmış duyarlılık hem uygulamadaki gözlemlere hem de laboratuvar sonuçlarına dayanmaktadır. Deneysel olarak klorhekzidinin subinhibitör konsantrasyonuna maruz bırakılan *P. aeruginosa*'ya karşı klorhekzidinin MBK değerlerinde giderek artan bir yükseliş olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle MBK sonuçlarına bakarak dezenfektanın kullanılacağı konsantrasyon kesin olarak belirlenemez. Süspansiyon testleri, dezenfektanın antimikrobiyal özelliği olduğunu gösterir, gerçek uygulamadaki aktivitesini yansıtmaz. Ancak buradan elde edilen sonuçlar bir rehber görevi görür ve sahadaki uygulama çalışmalarıyla teyit edilmelidir.

Süspansiyon testlerinin temel problemi gerçek yaşamdaki uygulama sonuçlarını tam olarak yansıtmamasıdır. Gerçek yaşamda mikroorganizmalar genellikle organik maddelerin biriktiği, kuruduğu yüzeye yapışmış bir şekilde bulunmaktadır. Mikroorganizmaların süspansiyon içindeyken dezenfektan tarafından öldürülmesi, onların herhangi bir yüzeydeyken de aynı dezenfektan tarafından öldürüleceği anlamına gelmez. Süspansiyondayken dezenfeksiyon daha kolay olur ancak yüzeyde bu iş zorlaşır. Süspansiyon testleri bu nedenle gerçek yaşam koşullarını yansıtmamaktadır ve genellikle dezenfektanın bakterisidal potansiyelini olduğundan fazla göstermektedir. Dezenfektanın kullandığı etkinliğinin nasıl olacağı tahmin edilemez, uygulama testleri ile uygunluk göstermeyebilir. Bu nedenle gerçek hayattaki şartları simüle etmek için ve belli bir alandaki kullanımına yönelik daha spesifik bilgi elde etmek için uygulama testlerinin yapılması gerekir. Uygulama testleri ile bakterisidal, fungisidal, mikobakterisidal, virusidal ve sporisidal etki ölçülebilmektedir. Bu testler gerçek uygulama ortamında yapılır. Böylece uygulama ortamındaki değişkenlerin etkisi de hesaba katılmış olur. Gerçek yaşam koşullarındaki uygulama testleri, süspansiyon testlerinde dezenfektanın zaman/konsantrasyon ilişkisinin hesaplanmasından sonra yapılır. Uygulama testlerinde bir lam, bir kiremit, bir PVC parçası, bir paslanmaz çelik disk, deri, parmak uçları, kumaş gibi canlı ve cansız yüzeyler kullanılabilir. Yüzey testlerinde de farklı değişkenlerin etkisi (temas süresi, mikroorganizma tipi, organik yük) aynı anda ölçülebilmektedir (Çağlar, 2003).

Çalışmada biyofilm tabakası oluşturmak için uygulanan 24 saat süre yeterli olmayabilir. Doğadaki biyofilm tabakaları 30 günden fazla sürede oluşan karışık mikroorganizma türlerinden oluşan tabakalardır. Bu tarz biyofilm tabakalarına dezenfektanların ulaşımı oldukça zordur. Dezenfektanın her mikroorganizma türüne etki mekanizması ve etki ettiği şartlar farklı olabilir. Bu nedenle dezenfektanların etkinliğini araştırmak için gerçek doğa koşulları altında ya da doğaya en yakın koşullar altında incelenmesi gerekmektedir. Dezenfektanların farklı fiziksel ve kimyasal koşullar altında etkinliğini inceleyen araştırmalar oldukça azdır ve bu çalışmalar arttırılmalıdır. Yapılacak araştırmalarda, çalışmada uygulanmış olan klasik kültür yöntemi, alamar blue ve DAPI-CTC boyama yöntemlerine ek olarak canlılığı tespit etmek için moleküler yöntemlerin kullanılması ile sonuçlar desteklenebilir.

KAYNAKLAR

- Açık, Z., Güven, S., 2012, *Nanoteknoloji, çevre ve aile*, Tüketici Yazıları III, In: Babaoğlu M., Şener A., Buğday, E.B. (ed.), Elma Teknik Basım, Matbaacılık, Ankara, ISBN: 978-605-88778-2-5, 142-164.
- Adam, B., Baillie G. S., Douglas, L. J., 2002, Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*, *Journal of Medical Microbiology*, 51, 344–349.
- Alcamo, I.E., 1983, *Fundamentals of Microbiology*, In: Colligan, L. (ed.), Addison-Wesley Publishing Company, USA, ISBN: 978-1-4496-3597-8, 641-666.
- Alıcı, Ö., 2007, Dezenfeksiyonu etkileyen faktörler, 5. *Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi*, 4-8 Nisan 2007, Antalya, Türkiye, 35-40. (<http://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2007/yazi/ozlem.alici-das-2007-yazi.pdf>)
- Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C., Pijnenborg, R., 2007, The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells, *Human Reproduction*, 22(5), 1304–1309.
- Amorena, B., Gracia, E., Monzo'n, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pe'rez, M., Alabart, J.L., Herna'ndez-Yago, J., 1999, Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed *in vitro*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44, 43–55.
- Anğ-Küçüker, M., Küçükbasmacı, Ö., Tekin, M., Akbulut, D., Büyükbaba-Boral, Ö., Anğ, Ö., 2006, Üropatojen Klebsiella Suşlarının Serotiplendirilmesi, Siderofor Sentezi, Serum Direnci ve Genişlemiş Spektrum Beta-Laktamaz Tayini, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 33, 265-269.
- Arda, M., Aydın, N., Ilgaz, A., Minbay, A., Kahraman, M., İzgür, M., Leloğlu, N., Akay, Ö., Diker, K.S., 1997, *Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyoloji ve Mikotik Enfeksiyonlar*, A.Ü. Vet. Fak. Ders kitabı, Medisan Yayın Serisi, Ankara, 26(4), 115-140.
- Asharani, P.V., Mun, G.L.K., Hande, M.P., Valiyaveetil, S., 2009, Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells, *Acs Nano*, 3(2), 279-290.
- Ataol, Ö., 2011, *Gıda örneklerinden izole edilen Staphylococcus'larda biyofilm oluşumu ve antibiyotik dirençliliğinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Athirah, N.A., Navindra, K.P., Zaini M.Z., Liew, J.P., Durairaj, R., 2012, Antibacterial effect of silver nanoparticles on multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*, *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 6(7), 208-211.
- Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N., Dibo, S.A., 2007, Effect of silver on burn wound infection control healing: review of the literature, *Burns*, 33(2), 139-148.
- Back, S.A., Khan, R., Gan, X., Rosenberg, P.A., Volpe, J. J., 1999, A new alamar blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death, *Journal of Neuroscience Methods*, 91, 47-54.
- Bagge Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C., Gram, L., 2003, The microbial ecology of processing equipment in different fish industries-analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection, *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 239-250.
- Baillie, G.S., Douglas, L.J., 1999, *Candida* biofilms and their susceptibility to antifungal agents, *Methods in Enzymology*, 310, 644-657.
- Baker, C.N., Tenover, F.C., 1996, Evaluation of alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci, *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 2654-2659.
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D.J., Shah, S.I., 2005, Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 5(2), 244-249.
- Balaban, N., Giacometti, A., Cirioni, O., Gov, Y., Ghiselli, R., Mocchegiani, F., Viticchi, C., Del Prete, M.S., Saba, V., Scalise, G., Del'Acqua, G., 2003, Use of the quorum-sensing inhibitor RNAIII-inhibiting peptide to prevent biofilm formation in vivo by drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 187, 625-630.
- Balcı, H., 2006, *Akıllı (fonksiyonel) tekstiller, seçilmiş kumaşlarda antibakteriyel apre ve performans özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Banerjee, M., Mallick, S., Paul, A., Chattopadhyay, A., Ghosh, S.S., 2010, heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of a three component iodinated chitosan-silver nanoparticle composite, *Langmuir* 26(8), 5901-5908.
- Baştürk, S., 2005, *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması*, Uzmanlık tezi, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Bayhün, S., 2008, *Klinik ve gıda kaynaklı örneklerden izole edilen staphylococcus aureus'un antibiyotik dirençliliklerinin karşılaştırılması ve beta-laktamaz*

aktivitelerinin değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Bayrakçı-Karel, F., 2011, *Ultrasonik sistemler ile suda Staphylococcus aureus dezenfeksiyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Belousova, N.I., Shkidchenko, A.N., 2004, Low-temperature microbial degradation of oil products differing in the extent of condensation. *Applied Biochemistry Microbiology*, 40, 262-265.

Berg, H.C., 2003, *E. coli in Motion*, Springer New York, ISBN: 0-387-00888-8, 134.

Berker, A., 1989, *P3 Triquart'ın et işletmelerinde dezenfektan olarak kullanılabilme olanakları üzerine çalışmalar*, U.Ü. Basımevi Özel Basım, Bursa, 1-8.

Bhupendra, C., Vala, A.K., Andhariya, N., Metha, R.V., Upadhyay, R.V., 2010, Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities, *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1677-1685.

Bilgehan, H., 1989, *Temel Mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi*, Barış Yayınları, Fakülteler Kitapevi, İzmir.

Bilgehan H., 2000, *Klinik Mikrobiyoloji-Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları*, Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 10, 3-17.

Bilgin, M., 2011, *Çeşitli dezenfektan maddelerin atık sulardan izole edilen mikroorganizmalar tarafından parçalanmasının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Boone, D.R., Castenholz, R.W., 2001, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* – 2nd Ed. – New York, Springer, ISBN: 978-0-387-95042-6.

Bower, C.K., McGuire, J., Daeschel, M.A., 1996, The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces, *Trends in Food Science and Technology*, 7(5), 152-157.

Bozkaya, Y., 2006, *Nanoteknoloji ve uygulamaları*, Anadolu Üniversitesi İleri Teknolojiler Araştırma Birimi, <http://home.anadolu.edu.tr/~esuvaci/egitim/NANOTEKNOLOJIVEUYGULAMALAR/LARI.pdf>, [Ziyaret tarihi: 15 Aralık 2014].

Brock, T.D., Madigan, M.T., 2006, *Biology of Microorganisms*, 11. Edition, Pearsen Prentice Hall, New Jersey, A.B.D.

Bulut, E., 2007, *Gümüş nanopartiküllerin polifenollerle sentezi ve karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Cabo, M.L., Herrera, J.J., Crespo, M.D., Pastoriza, L., 2009, Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene, *Food Control*, 20, 521-525.
- Carr, H.S., Rosenkranz, H.S., 1972, Silver sulfadiazine: effect on the growth and metabolism of bacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2(5), 367-372.
- European Committee for Standardization (CEN), 1997, Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test method and requirements, *European Standard EN 1276*, Brussels.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A., 1999, The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms, *Journal of Clinical Microbiology*, 37(6), 1771-1776.
- Characklis, W.G., Marshall, K. C., 1990, *Physiological ecology in biofilm systems*, Biofilms, In: Characklis, W.G. & Marshall K.C.,(ed), John Wiley & Sons, Inc, New York, 341-394.
- Charles, L., Fox J.R., Shanta M.M., 1974, Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5(6), 582-588.
- Chopra, I., 2007, The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: A useful development or a cause for concern?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 587-590.
- Cinel, M., 2011, *Hacettepe üniversitesi hastanelerinde yatan karbapenem dirençli Escherichia coli veya Klebsiella pneumoniae ile enfekte veya kolonize olan hastaların tanımlayıcı özellikleri*, Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Clement, J.L., Jarrett, P.S., 1994, Antibacterial silver, *Metal Based Drugs*, 1(5-6), 467-482.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006, *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*: 7. ed. Approved Standard M7-A7. Wayne, PA, USA.
- Collins, L. A., Franzblau, S. G., 1997, Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41, 1004-1009.
- Consterton, J.W., Lewondowski, Z., Coldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scoott, H.M., 1995, Microbial biofilms, *Annual Review of Microbiology*, 49, 711-745.

- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 5427–5433.
- Çağlar, K., 2003, Dezenfektanların etkinliğini ölçen testlerin birbirlerine avantajları ve dezavantajları, In: Günaydın, M., Sünbül, M. (ed), 3. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi Kongre Kitabı*, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 334–343.
- Çakır, P., 2007, *Gıda ve insan kaynaklı Staphylococcus aureus strainlerinin karakterizasyonu*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çakmak, S., 2009, Türkiye’de nanoteknoloji alanında son durum, *Nanobülten(09) E-Dergisi*, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji Ve Nanotıp Anabilim Dalı Yayını, 8-11.
- Çalık, Z., 1998, *Koagülaz olumlu ve olumsuz stafilocok suşlarında metisilin direnci ve çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Çavdar, A., 2009, *Tekstil sektöründe kullanılacak gümüş içerikli nano boyutlu biyo antimikrobiyal malzemelerin geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çelebi, N., Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Doğanay, T., Değim, T., Takka, S., Değim, Z., ve Tırnaksız, F., 2007, *Modern Farmasötik Teknoloji*, Fatsa Matbaacılık Ltd.Şti, Ankara, 31.
- Çelik B., 2009, *Doğadan ve klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas bakterilerinin değişik fenotipik özelliklerinin farklı yöntemlerle araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Çetin, E.T., 1982, *Dezenfeksiyon, antisepsi, sterilizasyon işlemleri ve hastanede uygulamaları*, İstanbul Tıp Fakültesi Yayını, İstanbul.
- Çıracı, S., 2006, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (Unam): Nanobilim ve nanoteknolojide Türkiye’nin bir mükemmeliyet merkezi, *Bilim ve Teknik, Yeni Ufuklara* (Aralık sayısı), 2-4.
- Coşkun, E., 2007, *Akıllı tekstiller ve genel özellikleri*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Dağ, O., 2006, Çok fonksiyonlu nanomalzemeler, nanoteknoloji tabanlı tekstiller, *Bilim ve Teknik* (Aralık sayısı), 36 - 39.
- Dağlı, G., Özyurt, M., Pala, D., 2000, *Hastane ortamında sterilizasyon uygulamaları*, GATA Enfeksiyon Kontrol Komitesi Eğitim Dizisi-4, GATA Basımevi, Ankara, 3-21.

- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B., Constertan, J.W., Greenberg, E.P., 1998, The involvement of cell to cell signals in the development of a bacterial biofilm, *Science*, 280, 295-298.
- De Beer, D., Srinivasan, R., Stewart, P.S., 1994, Direct Measurement of Chlorine Penetration into Biofilms during Disinfection, *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4339-434.
- Demirhisar, A. M., 2010, *Bazı patojenik bakterilerin su ürünleri işletmelerinde kullanılan yüzeylerde biyofilm oluşturmaya dezenfektanların etkisi*, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Denning, G.M., Wollenweber, L.A., Railsback, M.A., Cox, C.D., Stoll, L.L., Britigan, B.E., 1998, *Pseudomonas* pyocyanin increases Interleukin-8 expression by human airway epithelial cell, *Infection and Immunity*, 66, 5777-5784.
- Dinç G., 2012, Antibacterial properties of cavity disinfectants, effects on bond strength and microleakage (review), *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Dergisi*, 66-75.
- U.S. Department of Energy, Office of Science (DOE), 2002, *Theory and modeling in nanoscience*, <http://www.science.doe.gov/nano/Publications.htm>, [Ziyaret tarihi: 10 Kasım 2013].
- Donlan, R.M., Costerton, J.W., 2002, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
- Donlan, R.M., 2002, Biofilms: microbial life on surfaces, *Emerging Infectious Diseases*, 8, 881-890.
- Douglas, L.J., 2003, *Candida* biofilms and their role in infection, *Trends in Microbiology*, 11, 30-36.
- Drenkard, E., Ausubel, F.M., 2002, *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation, *Nature*, 416,740-743.
- Drenkard, E., 2003, Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes and Infection*, 5, 1213-1219.
- Driscoll, J., Brody, S., Kollef, M., 2007, The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Drugs*, 67 (3):351-368.
- Durack, D.T., Beeson. P.B., 1972. Experimental bacterial endocarditis, II. Survival of bacteria in endocardial vegetations, *British Journal of Experimental Pathology*, 53,50-53.
- Düzgün, D., 2009, *Değişik kaynaklardan izole edilen Pseudomonas aeruginosa suşlarının virülans faktörleri, biyofilm formasyonu ve quorum sensing yönünden değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Elkins, J.G., Hassett, D.J., Stewart, P.S., Schweizer, H.P., McDermatt, T.R., 1990, Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide, *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 4594-4600.
- Elsmore, R., 1993, Microbiocides and the control of *Legionella*, p. 250-253, *Legionella Current Status and Emerging Perspectives*, ASM 1325 Massachusetts Ave, N. W. Washington D.C., 1-55581-055-1.
- Erbay, A., Ergönül, Ö., Esener, H., Çolpan, A., Dokuzoğuz, B., 2002, Hastane kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli dezenfektanlara karşı direnci, *Hastane infeksiyonları Dergisi*, 6, 191-194.
- Erdem, B., 1999, *Temel ve klinik mikrobiyoloji*, In: Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö. (ed.), Güneş Kitabevi, Ankara, 551-558.
- Erk, H., Doğanelli, M.Z., Akkajen, C., Öcal, H., 1994, *Veteriner doğum bilgisi ve jinekoloji*, A.Ü. Vet. Fak. Yayını, Ankara, 35-46.
- Ersoy, Y., Fırat, M., Kuzucu, Ç., Bayındır, Y., Karaaslan, Ş., Bilişik, G., But, A.D., 2003, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Hastane İnfeksiyonları, *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 10(3), 133-137.
- Fabrage, J., Renshaw, J., Lead, J., 2009, Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms, *Environmental Science Technology*, 43, 9004-9009.
- Fazlara, A. ve Ekhtelat, M., 2012, The disinfectant effects of benzalkonium chloride on some important foodborne pathogens, *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science*, 12 (1), 23-29.
- Fox, C.L., Modak, S.M., 1974, Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5(6), 582-588.
- Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., Hirsch, A.M., 2006, A feeling for the microorganism: structure on a small scale. Biofilms on plant roots, *Botanical Journal Linnean Society*, 150 (1), 79- 88.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., Stoodley, P., 2005, Survival strategies of infectious biofilms, *Trends in Microbiology*, 13, 34-40.
- Gilbert, P., Das, J., Foley, I., 1997, Biofilm susceptibility to antimicrobials, *Advances in Dental Research*, 11, 160-167.
- Gilbert, P., Mcbain, A.J., Rickard, A.H., 2003, Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control, *Int Biodet Biodeg*, 51, 245-248.
- Gökmen, N., 2014, Cerrahide nanoteknolojilerin kullanımı, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (http://www.uludaganestezi.org/resimler/2014/sunumlar/a_n_gokmen.pdf).

- Göktürk, I., 2009, Haberler, *Nanobülten (09) E-Dergisi*, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji Ve Nanotıp Anabilim Dalı Yayını, 21.
- Grossgebauer, K., Pohle, H.D., 2009, *Cryptococcus neoformans*: Rapid Detection in the Spleen of an AIDS Patient Using DAPI-Fluorochrome/*Cryptococcus neoformans*: Schnelldiagnostik in der Milz eines AIDS-Patienten mittels DAPI-Fluorochrom, *Mycoses*, 29 (4), 155-158.
- Gün, İ., Ekinci, F.Y., 2009, Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam, *Gıda Dergisi*, 34 (3), 165-173.
- Güneşoğlu, C., 2006, Spor giysiler kumaşların performans özelliklerinin nanoteknolojik ürünler kullanılarak geliştirilmesi ve aplikasyon tekniklerinin karşılaştırılması, Doktora Tezi, Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Gürler, B., 2003, Dezenfektan seçimi ve dezenfektanların kullanımı konusunda güncel rehberler, 3. *Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı*, In: Günaydın, M.; Sümbül, M. (ed.), Simad Yayınları, Samsun, 159-168.
- Haliki, A., Özdemir, G., Uzel, A., 2004, Aktif çamur sistemlerinde sorun yaratan filamentli mikroorganizmaların izolasyonu ve kontrol stratejileri üzerine bir araştırma, *E.Ü. Su Ürünleri Dergisi*, 21, 275-277.
- Halkman, A. K., Ayhan, K., 2000, *Gıda Mikrobiyolojisi ve Uygulamaları*, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Yayını, Sim Matbaası, Ankara, 522.
- Hallam, N.B., West, J.R., Forster, C.F., Simms, J., 2001, The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Research*, 35, 4063-4071.
- Harris, L.J., 2005, *Escherichia coli*, *Class Notes PHR150*, Department of Food Science on Technology University of California Davis.
- Harrison, J. J., Turner, R.J., Joo, D.A., Stan, M.A., Chan, C.S., Allan, N. D., Vrionis, H.A., Olson, M. E., and Ceri, H., 2008, Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, 52(8), 2870–2881.
- Hilbi, H., Weber, S., Ragaz, C., Nyfeler, Y., Urwyler, S., 2007, Environmental predators as models for bacterial pathogenesis, *Environmental Microbiology*, 9(3), 563-575.
- Hodson, A.E., Nelson, S.M., Brown M.R.M., Gilbert, P., 1995, A simple in vitro model for growth control of bacterial biofilms, *Journal of Applied Bacteriology*, 79, 87–93.
- Hoyle, B.D., Costerton, J.W., 1991, Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms, *Progress in Drug Research*, 37, 91-110.

- Hwang, E.T., Lee, J.H., Chae, Y.J., Kim, Y.S., Kim, B.C., Sang, B.I., 2008, Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria, *Small*, 4(6), 746-750.
- Inoue, Y., Hoshino, M., Takahashi, H., Noguchi, T., Murata, T., Kanzaki, Y., 2002, Bactericidal activity of Ag-zeolite mediated by reactive oxygen species under aerated conditions, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 92(1), 37-42.
- Ip, M., Lui, S.L., Poon, V.K.M., Lung, I., Burd, A., 2006, Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison, *Journal of Medical Microbiology*, 55(1), 59-63.
- İrikli, S., Otkun-Tatman, M., 2007, Bazı antiseptik ve dezenfektanların *in vitro* antimikrobik aktivitelerinin araştırılması, *İnfeksiyon Dergisi*, 21 (1), 7-13.
- Jawest, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., 1976, *Tıbbi Mikrobiyoloji*, In: Akman, M., ve Gülmezoğlu, E. (çeviri ed.), Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 277-284.
- Jayaraman, A., Cheng, E.T., Earthman, J.C., Wood, T.K., 1997, Importance of biofilm formation for corrosion inhibition of SAE 1018 steel by axenic aerobic biofilms, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 18, 396-401.
- Jefferson, K.K., What drives bacteria to produce a biofilm, 2004, *FEMS Microbial Letters*; 236, 163-173.
- Jefferson, K.K., Pier, D.P., Goldman, D.A., Pier, G.B., 2004, The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (Ica R) are transcriptional inhibitors of the ica locus in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Bacteriology*, 186, 2449-2456.
- Johansen, C., Falholt, P., Gram, L., 1997, Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms, *Applied And Environmental Microbiology*, 63(9), 3724-3728.
- Jones, H.C., Roth, I.L., Saunders, W.M., 1969, Electron microscopic study of a slime layer, *Journal of Bacteriology*, 99, 316-325.
- Kangra, G., Ceyhun, M., 1985, Hastane infeksiyonlarının önlenmesinde temel ilkeler, *Katkı*, 6 (6), 421-432.
- Kaplan, Ş.Ş., Karanfil, T., Kitiş, M., 2007, Nano-Materyallerin Potansiyel Çevresel Etkileri, *Yaşam-Çevre-Teknoloji*, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, 24-27 Ekim 2007, İzmir, TMMOB-Çevre Mühendisleri Odası, 845-847.
- Keevil, C.W., Rogers, J., 1992, Immunogold and fluorescein immunolabelling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy, *Applied and Environmental Microbiology*, 58(7), 2326-2330.

- Keiper, A., 2003, The nanotechnology revolution, *A Journal Of Technology and Society*, (<http://www.emory.edu/BUSINESS/mote/NanotechnologyRevolution.pdf>)
- Keskin, A. S., 2011, *Nano boyutta gümüş sentezi ve tetra pirollerle etkileşimlerinin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kharazmi, A., Giwerzman, B., Holby, N., 1999, Robbins device in biofilm research, *Methods in Enzymology*, 310, 207–215.
- Kılıçturgay, K., Gökırmak, F., Töre, O., Gedikoğlu, S., 1993, *Klinik Mikrobiyoloji*, Onur Yayıncılık, Bursa, 45-52.
- Kırca, M.B., Menceloğlu, Y.Z., 2008, *Uluslararası Rekabet Stratejileri : Nanoteknoloji ve Türkiye*, TÜSİAD Rekabet Stratejileri Dizisi 11, Graphis Matbaa, ISBN : 978-9944-405-47-4, 1-202.
- Kim, J.S., Kuk, E., Yu, K.N., Kim, J.H., Park, S.J., Lee, H.J., 2008, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- Kim, J.S., Kuk, E., 2007, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- Kim, J., Betsey, P., Philip, S.S., Camper, A., Jeyong, Y., 2008, Comparison of the antimicrobial effects of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1446–1453.
- Kimiran-Erdem, A., Şanlı-Yürüdü, N.O., Çotuk, A., 2007, Efficacy of a quaternary ammonium compound against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains, *Annals of Microbiology*, 57 (1), 121-126.
- Ki-Young, Y., Jeong, H.B., Jae-Hong, P., Jungho, H., 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles, *Science of the Total Environment*, 373, 572–575.
- Kocagöz, T., 2013, Mikrobiyolojik tanıda klasik yöntemlerde yeni yaklaşımlar, *Ankem Dergisi*, 27(2), 150-153.
- Koch, C.C., 2000, *Nanostructured materials processing, properties and potential applications*. Noyes Publications William Andrew Publishing, New York, ISBN: 0-8155-1534-0.
- Kuba, M., 2012, *İçme suyu pompalarında Escherichia coli'nin oluşturduğu biyofilm yapısının incelenmesi ve oluşmasının önlenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Kuda, T., Yano, T., Kuda, M.T., 2008, Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface, *Learning with Texts*, 41, 988-993.
- Kumar, C.G., Anand, S.K., 1998, Significance of microbial biofilms in food industry: a review, *International Journal of Food Microbiology*, 42, 9–27.
- Kumar, R., Munstedt, H., 2005, Silver ion release from antimicrobial polyamide/silver composites, *Biomaterials*, 26(14), 2081-2088.
- Lechevallier, M.W., 1998, *Microbial impact of biological filtration*, AWWA Printed, USA, ISBN: 0-89867-939-7.
- Leid, J.G., Shirtliff, M., Consterton, J.W., Stoodley, A.P., 2002, Human leukocytes adhere to and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms, *Infection and Immunity*, 70, 6339-6345.
- Lindsay, D., Von-Holy, A., 2006, Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know, *Journal of Hospital Infection*, 64, 313-325.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., He, Q., Yu, W., Sun, H., 2006, Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles, *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916-924.
- Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H., Tam, P.K.H., Chiu, J.F., Che, C.M., 2007, Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 12, 527-534.
- Luppens, B.I.S., Reij, W.M., Van der Heijden, W.L.R., Rombouts, M.F., Abee, T., 2002, Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants, *Application of Environmental Microbiology*, 68, 4194-4200.
- Mah, T.F., Pitts, B., Pellock, B., Walke, G.C., Stewart, P.S., O'Toole, G.A., 2003, A genes basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance, *Nature*, 426, 306-310.
- Mah, T.F.C., O'Toole, G.A., 2001, Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents, *Trends in Microbiology*, 9, 34-39.
- Marambio-Jone, C., Hoek, E.M.V., 2010, A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment, *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551.
- Markari, A.E., 2009, Alamar blue assay for assessment of cell proliferation using the fluostar optima, *BMG LabTech*.
- Marshall, K.C., Stout, R., Mitchell, R., 1971, Mechanisms of the initial events in the sorption and control at surfaces, *American Society for Microbiology News*, 58, 202-207.

- Nanoteknoloji Strateji Grubu, 2004, *Nanobilim Ve Nanoteknoloji Stratejileri*, Vizyon 2023 Projesi.
- Niyogi, S., Haldon, R.C., 2004, Nanotechnology: Why is this special length scale?, *Nanoscience and Nanotechnology: Opportunities and challenges in California: California Council on Science and Technology*, Sacramento, California.
- U.S. National Nanotechnology Initiative (NNI), 2004, *The National Nanotechnology Initiative Strategic Plan*, (Adres: <http://www.nano.gov>).
- Norwood, D.E., Gilmours, A., 2000, The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilms, *Journal of Applied Microbiology*, 88, 512-520.
- Ohta S., Misawa Y., Miyamoto H., Makino M., Nagai K., Shiraishi T., Nakagawa Y., Yamato S., Tachikawa E., Zenda H., 2001, A comparative study of characteristics of current-type and conventional-type cationic bactericides, *Biol Pharm Bull*, 24(9): 1093-1096.
- ÖİK (Özel İhtisas Komisyonu), 2001, Tekstil ve giyim sanayii özel ihtisas komisyonu raporu, Sekizinci Beş Yıllık Kalkınma Planı, Ankara.
- Oklahoma Nanotechnology Initiative, *Nano Products*, (<http://www.oknano.com/products.html>).
- Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J.V., 2014, Control of *Listeria monocytogenes* contamination in an Iberian pork processing plant and selection of benzalkonium chloride resistant strains, *Food Microbiology*, 39, 81–88.
- Özaslan, V., 2009, *Yeni tür antimikrobiyallerin sentezi ve aktivitelerinin tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Özbakkaloğlu, B., 2003, Hastane Ortamında Kullanılacak Yüzey Dezenfektanları, 3. *Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresi*, 2003, Samsun, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 131-8.
- Özdemir, D., 2002, Dezenfektanlara direnç, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*; 4 (3), 39-44.
- Özdoğan, E., Demir, A., Seventekin, N., 2006, Nanoteknoloji ve tekstil uygulamaları, *Tekstil ve Konfeksiyon Dergisi*, 3, 159-168.
- Özsoy, M.F., Öncül, O., Pahsa, A., Erdem, H., Emekdaş, G., 2001, Etil alkol, povidon iyod ve benzalkonyum klorürün *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı etkinliği, *Klinik Dergisi*, 14(11), 30-32.
- Öztürk, R., 2002, Antiseptik ve dezenfektan maddelere karşı direnç sorunu, In: Günaydın, M., Esen, Ş., Saniç, A., Leblebicioğlu, H. (Ed), *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*, Kaya Basım, İstanbul, 43-62.

- Özyurt, M., 2000, Dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemleri, *Klinik Dergisi*, 13, 41-48.
- Page', B., Page', M., Noel, C., 1993, A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*, *International Journal of Oncology*, 3, 473-476.
- Panaček, A., Kvitek, L., Pucek R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V.K., Nevecna, T., Zboril, R., 2006, Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization and their antibacterial activity, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110, 16248-16253.
- Patti, J.M., Allen, B.L., McGravin, M.J., Hook, M., 1994, MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue, *Annual Review of Microbiology*, 48, 585-617.
- Peabody, C., Chung, Y., Yen, M., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A., Deretic, V., Schurr, M., Yu, H., 1995, *Pseudomonas aeruginosa*, mucoidy and the chronic infection phenotype in cystic fibrosis, *Trends in Microbiology*, 3 (9), 351-356.
- Pettit, R.K., Weber, C.A., Kean, J.M., Hoffmann, H., Pettit, G.R., Tan, R., Franks, S.K. and Horton, M.L., 2005, Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7), 2612-2617.
- Pfaller, M.A., Barry, A.L., 1994, Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1992-1996.
- Polonio, R.E., Mermel, L.A., Paquette, G.E., Sperry, J.F., 2001, Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 3262-3266.
- Popa, M., Pradell, T., Crespo, D., Moreno, J., 2007, Stable silver colloidal dispersions using short chain polyethylene glycol, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 303(3), 184-190.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D., 2004, The role of biofilms in otolaryngologic infections, *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 12, 185-190.
- Potera, C., 1999, Forging a link between biofilms and disease, *Science*, 283, 1837-1839.
- Poulsen, L.V., 1999, Microbial biofilm in food processing, *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 32 (6), 321-326.
- Quintana, J.B., Weiss, S., Reemtsma, T., 2005, Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membran bioreactor, *Water Research*, 39, 2654-2664.

- Ramage, G., Walle, K.V., Wickes, B.L., Lo'pez-Ribot, J.L., 2001, Standardized method for in vitro antifungal susceptibility testing of *Candida albicans* biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2475–2479.
- Reilly, W.J., 2000, *Pharmaceutical necessities*, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 20th ed., In: Gennaro, A.R.(ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore Maryland USA, 1507-1508.
- Rijnarts, H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.B., 1993, Bacterial adhesion under static and dynamic conditions, *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3255-3265.
- Rupp, M.E., Archer, G.L., 1994, Coagulase-negative Staphylococci: pathogens associated with medical progress, *Clinical Infectious Diseases*, 19, 231–243.
- Sağlam, D., 2012, *Kan kültürlerinden izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae suşlarında genişlemiş spektrumlu Beta- Laktamaz sıklığı*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Sakuragi, Y., Kolter, R., 2007, Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Bacteriology*, 189 (14), 5383-5386.
- Samasti, M., Ulusoy, M., Bağdatlı, Y., 1987, Hastane infeksiyonlarında el temizliğinin önemi, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 17 (3-4): 213-222.
- Sandri, G., Bonferoni, M.C., Ferrari, F., Rossi, S., Aguzzib, C., Moria, M., Grisolia, P., Cerezob, P., Tencia, M., Viserasb, C., Caramella, C., 2014, Montmorillonite–chitosan–silver sulfadiazine nanocomposites fortropical treatment of chronic skin lesions: In vitro biocompatibility,antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties, *Carbohydrate Polymers*, 102, 970– 977.
- Saniç, A., 2002, Tıbbi cihaz ve aletlerin sterilizasyon ve dezenfeksiyonunda genel prensipler, *Sterilizasyon, Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları Kitabı*, In: Günaydın, M., Esen, Ş., Saniç, A., Leblebicioğlu, H. (ed.), Simad Yayınları, Samsun, 13-22.
- Saraç, S., 2009, *Sanayide kullanılan dezenfektan ve antiseptik maddelerin antimikrobiyal etkinliğinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Sauer, K., Camper, A.K., Ehrlich, G.D., Costerton, J.W., Davies, D.G., 2002, *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *Journal of Bacteriology*, 184, 1140-1154.
- Schwartz, T., Hoffmann, S., Obst, U., 2003, Formation of natural biofilms during chlorine dioxide and u.v. disinfection in a public drinking water distribution system, *Journal of Applied Microbiology*, 95, 591–601.

- Shahverdi, A.R., Fakhimi, A., 2007, Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(2),168-171.
- Sharifzadeh, M., 2006, *nanotechnology sector report*, Cronus Capital Markets, 1st Quarter.
- Shen, D., Winohur, P., Jones, R.N., 2001, Characterization of extended SpectrumB-Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Beijing China, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18,185-188.
- Smetana, A., Klabunde, K., Marchin, G., Sorensen, C., 2008, Biocidal activity of nanocrystalline silver powders and particles, *Langmuir*, 24(14), 7457-7464.
- Sobana, N., Muruganadham, M., Swaminathan, M., 2006, Nano Ag particles doped TiO₂ for efficient photodegradation of direct azo dyes, *Journal of Molecular Catalysis*, 258 (1-2), 124-132.
- Sondi, I., Salopek-Sondi, B., 2007, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E.coli* as a model for gram-negative bacteria, *Journal of Colloid Interface*, 275, 177–182.
- Soumitra, M., Saswati, M., Prajna, J., Biju, J., Biplab, S., Avinash, S., 2012, An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, Medicine*, 8, 916–924.
- Spoering, A.L., Lewis, K., 2001, Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials, *Journal of Bacteriology*, 183, 6746–6751.
- Stein, G., 2005, Antimicrobial resistance in the hospital setting: impact, trends and infection control measures, *Pharmacotherapy*, 25 (10(2)), 44-54.
- Steinberg, D.C., 2006, *Preservatives for Cosmetics: Common Preservatives*. 2nd ed. Carol Stream,: Allured Publishing Corporation, USA, 11-55.
- Stewart, P.S., 2002, Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms, *International Journal of Medical Microbiology*, 292, 107-113.
- Stewart, P.S., Costerton, J.W., 2001, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *Lancet*, 358, 135-138.
- Stone, G., Wood, P., Dixon, L., Keyhan, M., Matin, A., 2002, Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic *Escherichia coli* biofilms, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, 2458–2461.

- Sutherland, I., 2001, Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework, *Journal of Microbiology*, 147, 3-9.
- Şahin, R., 2007, *Staphylococcus aureus* suşlarında biyofilm üretimi, biyofilm pozitif ve negatif suşların genotipik ve fenotipik karakterlerinin karşılaştırılması, Uzmanlık Tezi, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Şahin, H., Erkal, S., 2008, Elektrikli süpürge alırken ve kullanırken dikkat edilmesi gereken hususlar, *Gazi Üniversitesi Endüstriyel Sanatlar Eğitim Fakültesi Dergisi*, 22, 70-75.
- Şam, M., Denkbaş, B., 2010, Temizlik konusunda nanoteknolojik yaklaşımlar, *Standart Dergisi*, 49(580), 53-57.
- Şanlı-Yürüdü, N.O., Kimiran-Erdem, A., Çotuk A., 2007, Studies on the efficacy of Chloramine T trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210, 147-153.
- Tanyel, E., Taşdelen-Fışgın, N., Sarıkaya-Genç, H., Tülek, N., 2008, *Escherichia coli* bakteriyemisi olan olguların değerlendirilmesi, *Klinik Dergisi*, 21(3), 109-111.
- To, W., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., 1995, Comparative evaluation of macrodilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates, *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 2660-2664.
- Todar, K., 2015, *Todar's Online Textbook of Bacteriology* (<http://textbookofbacteriology.net>) Ziyaret tarihi: 23.04.2015.
- Torun, Ö., 2011, *Gıda örneklerinde ve sularda Escherichia coli tayinine yönelik biyosensör geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Tosyalı, M., 2009, Beyaz eşyalar artık hem akıllı hem de şık, (http://www.takvim.com.tr/ekonomi/2009/07/29/beyaz_esyalar_artik_hem_akilli_hem_de_sik).
- Töreci, K., 1990, Dezenfeksiyon yöntemleri ve seçimi, *Ankem Dergisi*, 4(3), 364-371.
- Troller, J.A., 1993, *Sanitation in Food Processing*, 2nd ed, Academic Pres, Inc., San Diego, 487.
- Tükel, Ç., Doğan, H.B., 2000, *Staphylococcus aureus*, gıda mikrobiyolojisi ve uygulamaları, In: Tunail, N.(ed.), Ankara Üniv. Ziraat Fak. Gıda Müh Bölümü Yayını, Sim Matbaacılık, Ankara, 357-365.
- Türetgen, I., 2008, Induction of viable but nonculturable (VBNC) state and the effect of multiple subculturing on the survival of *Legionella pneumophila* strains in the presence of monochloramine, *Annals of Microbiology*, 58 (1), 153-156.

- Uludağ-Altun, H., Şener, B., 2008, Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.
- Ulusoy, S., Çetin, B., Arda, B., Özkan, F., Tünger, A., Tokbaş, A., 1995, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinin antibiyotik direnci, *İnfeksiyon Dergisi*, 4(3), 363-367.
- Ulutepe, Ç., 2010, *Üretim işletmelerinde nanoteknoloji kullanımı ve üretim maliyetleri üzerine etkileri*, Yüksek Lisan Tezi, Marmara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü.
- Ustaçelebi, Ş., 1999, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, Güneş Kitabevi, ISBN: 975-7467-77-4, 25-46.
- Ünal, D., 2011, *Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Pseudomonas, Klebsiella, Staphylococcus ve Candida cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vatansever, C., 2011, *Mikrobiyal biyofilm tabakası üzerine farklı fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Vuong, C., Otto, M., 2002, *Staphylococcus epidermidis* infections, *Microbes and Infection*, 4, 481-489.
- Walters, M.C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M.J., Stewart, P.S., 2003, Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, 317-323.
- Warriner, R., Burrell, R., 2005, Infection and the chronic wound: a focus on silver, *Advances in Skin & Wound Care*, 18, 2-12.
- Watanabe, K., Teramoto, M., Futamata, H., Harayama, S., 1998, Molecular detection, isolation, and physiological characterization of functionally dominant phenol-degrading bacteria in activated sludge, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 4396-4402.
- Watnick, P., Kolter, R., 2000, Biofilm city of microbes, *Journal of Bacteriology*, 182, 2675-2679.
- Wells, T.N., Scully, P., Paravicini, G., Poudfoot, A.E.I., Payton, M.A., 1995, Mechanism of irreversible inactivation of phosphomannose isomerases by silver ions and flomazine, *Biochemistry*, 34(24), 7896-7903.

- Williams, I., Venables, W.A., Lloyd, D., Paul, F., Critchley, I., 1997, The effects of adherence to silicone surfaces on antibiotic susceptibility in *Staphylococcus aureus*, *Journal of Microbiology*, 143 (7), 2407-2413.
- Wolf, G., 2002, Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring, João G. Crespo & Maria A.M. Reis, *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology* 1, 227–251.
- Wong, A.C.L., 1998, Biofilms in food processing environments, *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2765-2770.
- Woodford, N., Ellington, M.J., 2007, The emergence of antibiotic resistance by mutation, *Clinical Microbiology and Infection*, 13 (1), 5-18.
- Www.belgeler.com;nanopartiklerin-polifenollerle-sentezi-ve-karakterizasyonusynthesis-and-characterization-of-silver-nanoparticles-by-using-polyphenols
- Yamamoto, H., Ezaki, T., Ikedo, M., Yabuuchi, E., 1991, Effects of Biocidal Treatments to Inhibit the Growth of Legionellae and Other Microorganisms in Cooling Towers, *Microbiology and Immunology*, 35(9), 795–802.
- Yamanaka, M., Hara, K., Kudo, J., 2005, Bactericidal actions of a silver ion solution on escherichiacoli, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 7589–7593.
- Yasuda, H., Ajiki, Y., Aoyama, J., Yolota, I., 1994, Interaction between human polymorphonuclear leucocytes and bacteria released from in vitro bacteriol biofilms models, *Journal of Medical Microbiology*, 41, 359-67.
- Yıldız, F.H., Dolgonov, N.A., Schoolnic, G.K., 2001, VPsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPS (Etr) – associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 E1 Tor, *Journal of Bacteriology*, 183, 1716-1726.
- Yılmaz, M., Çelik, G.Y., 2007, Bakteriyel ekstraselüler polisakkarit (EPS), *Orlab on-line Mikrobiyoloji Dergisi*, 5(2), 7-13.
- Yoder, J.S., Hlavsa, M.C., Craun, G.F., 2008, Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events, *MMWR Surveillance Summaries*, 57(9), 1-29.
- Yüksek, N., Yemni, E., Güneş, E., 2001, Gıda sanayiinde kullanılan End-Bac'ın bakterisidal ve fungusidal aktivite tayini üzerine bir araştırma, *J. Fac. Vet. Med.*, 20(1), 99-102.
- Zhang, X. ve Bishop, P.L., 2003, Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances, *Chemosphere*, 50, 63–69.

- Zhao, G., Stevens, S. E., 1998, Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptible of *Escherichia coli* to the silver ion, *Biometals*, 11(1), 27-32.
- Zincidi, A., 2010, *Ortodontide sterilizasyon ve dezenfeksiyonun önemi*, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi.
- Zottola, A., Sasahara, K.C., 1994, Microbial biofilms in the food industry should they be a concern, *International Journal of Food Microbiology*, 23, 125-148.

EKLER

EK 1. BAKTERİYOLOJİK ANALİZ SONUÇLARININ İSTATİKSEL ANALİZLERİ

EK 1.1. Farklı Koşullara Maruz Bırakılan Gümüş Sülfadiazinin Analizleri

Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre canlı mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Ek 1.1.a'da verilmiştir.

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları, dezenfektanın 15 dakika ve 24 saat uygulanmasının ardından tüm bakterilerin mikroorganizma sayılarının, koşullar arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. *S. aureus* için 15. dakikada $F = 502.307$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 16.996$, $p < 0.05$, *P. aeruginosa* için 15. dakikada $F = 40.695$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 4.741$, $p < 0.05$, *E.coli* için 15. dakikada $F = 75.229$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 24.096$, $p < 0.05$, *K.pneumoniae* için 15. dakikada $F = 119.663$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 52.396$, $p < 0.05$ 'dir.

Ek 1.1.a: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre mikroorganizma sayılarına yönelik tanımlayıcı istatistikler.

Bakteri türü	Koşullar	15. dakika		24. saat	
		Mikroorganizma sayısı		Mikroorganizma sayısı	
		Ortalama	Std.sapma	Ortalama	Std.sapma
<i>S. aureus</i>	pH4	50900000.00	3252691.19	1800000.00	282842.71
	pH7	52100000.00	3252691.19	14600000.00	1131370.85
	pH9	43700000.00	2969848.48	1000000.00	282842.71
	-20°C	33150000.00	4737615.43	550000.00	212132.03
	121°C	58750000.00	1767766.95	19150000.00	919238.82
	%3 NaCl	87800000.00	5374011.54	1300000.00	424264.07
	%3 Ç.S.	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	556000000.00	31112698.37	2850000000.00	975807358.04
	Toplam	110300000.00	175805851.25	361050000.00	1003748344.96
<i>P. aeruginosa</i>	pH4	24550000.00	4171930.01	35300000.00	5232590.18
	pH7	10900000.00	1555634.92	7150000.00	353553.39
	pH9	8150000.00	636396.10	2000000.00	424264.07
	-20°C	5750000.00	1484924.24	1350000.00	212132.03
	121°C	20300000.00	3676955.26	8900000.00	141421.36
	%3 NaCl	550000.00	353553.39	350000.00	70710.68
	%3 Ç.S.	400000.00	0.00	300000.00	141421.36
	Kontrol	170000000.00	35355339.06	1510000000.00	975807358.04
	Toplam	30075000.00	56024452.99	195668750.00	571699952.44
<i>E. coli</i>	pH4	79250000.00	10535891.04	275000.00	25455.84
	pH7	19750000.00	3181980.52	32500.00	4949.75
	pH9	15950000.00	212132.03	26500.00	3535.53
	-20°C	11500000.00	1555634.92	19500.00	2121.32
	121°C	31300000.00	2121320.34	157500.00	12020.82
	%3 NaCl	10550000.00	777817.46	0.00	0.00
	%3 Ç.S.	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	666000000.00	104651803.62	1080000000.00	311126983.72
	Toplam	104287500.00	222182375.16	135063875.00	377511518.65
<i>K. pneumoniae</i>	pH4	4750000.00	70710.68	581500.00	96873.63
	pH7	2500000.00	424264.07	325000.00	56568.54
	pH9	650000.00	70710.68	184000.00	8485.28
	-20°C	500000.00	141421.36	171000.00	11313.71
	121°C	39750000.00	2474873.73	493500.00	23334.52
	%3 NaCl	4150000.00	494974.75	359000.00	57982.76
	%3 Ç.S.	100000.00	141421.36	328500.00	98287.84
	Kontrol	400000000.00	50911688.25	536000000.00	104651803.62
	Toplam	56550000.00	135323247.57	67305312.50	184944301.40

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi koşullardaki mikroorganizma sayılarının kontrol grubundan anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

EK 1.1.b: Kontrol grubu ile anlamlı olarak farklılaşan koşullar ve mikroorganizma sayı dağılımları.

Bakteri türü		LSD					
		15. dakika			24. saat		
		Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri	Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri
<i>S. aureus</i>	Kontrol	pH4	505100000.00	0.00	pH4	2848200000.00	0.00
		pH7	503900000.00	0.00	pH7	2835400000.00	0.00
		pH9	512300000.00	0.00	pH9	2849000000.00	0.00
		-20°C	522850000.00	0.00	-20°C	2849450000.00	0.00
		121°C	497250000.00	0.00	121°C	2830850000.00	0.00
		%3 NaCl	468200000.00	0.00	%3 NaCl	2848700000.00	0.00
		%3 Ç.S.	556000000.00	0.00	%3 Ç.S.	2850000000.00	0.00
<i>P. aeruginosa</i>	Kontrol	pH4	145450000.00	0.00	pH4	1474700000.00	0.00
		pH7	159100000.00	0.00	pH7	1502850000.00	0.00
		pH9	161850000.00	0.00	pH9	1508000000.00	0.00
		-20°C	164250000.00	0.00	-20°C	1508650000.00	0.00
		121°C	149700000.00	0.00	121°C	1501100000.00	0.00
		%3 NaCl	169450000.00	0.00	%3 NaCl	1509650000.00	0.00
		%3 Ç.S.	169600000.00	0.00	%3 Ç.S.	1509700000.00	0.00
<i>E. coli</i>	Kontrol	pH4	586750000.00	0.00	pH4	1079725000.00	0.00
		pH7	646250000.00	0.00	pH7	1079967500.00	0.00
		pH9	650050000.00	0.00	pH9	1079973500.00	0.00
		-20°C	654500000.00	0.00	-20°C	1079980500.00	0.00
		121°C	634700000.00	0.00	121°C	1079842500.00	0.00
		%3 NaCl	655450000.00	0.00	%3 NaCl	1080000000.00	0.00
		%3 Ç.S.	666000000.00	0.00	%3 Ç.S.	1080000000.00	0.00
<i>K. pneumoniae</i>	Kontrol	pH4	395250000.00	0.00	pH4	535418500.00	0.00
		pH7	397500000.00	0.00	pH7	535675000.00	0.00
		pH9	399350000.00	0.00	pH9	535816000.00	0.00
		-20°C	399500000.00	0.00	-20°C	535829000.00	0.00
		121°C	360250000.00	0.00	121°C	535506500.00	0.00
		%3 NaCl	395850000.00	0.00	%3 NaCl	535641000.00	0.00
		%3 Ç.S.	399900000.00	0.00	%3 Ç.S.	535671500.00	0.00

EK 1.2. Farklı Koşullara Maruz Bırakılan Benzalkonyum Klorürün Sonuçları

Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre canlı mikroorganizma sayılarına dair dağılımlar Ek 1.2.a'da verilmiştir.

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları, dezenfektanın 15 dakika ve 24 saat uygulanmasının ardından tüm bakterilerin mikroorganizma sayılarının, koşullar arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. *S. aureus* için 15. dakikada $F = 80.031$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 35.212$, $p < 0.05$, *P. aeruginosa* için 15. dakikada $F = 247.723$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 91.916$, $p < 0.05$, *E.coli* için 15. dakikada $F = 415.852$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 75.048$, $p < 0.05$, *K.pneumoniae* için 15. dakikada $F = 212.055$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 182.620$, $p < 0.05$ 'dir.

EK 1.2.a: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre mikroorganizma sayılarına yönelik tanımlayıcı istatistikler.

Bakteri türü	Koşullar	15. dakika		24. saat	
		Mikroorganizma sayısı		Mikroorganizma sayısı	
		Ortalama	Std.sapma	Ortalama	Std.sapma
<i>S. aureus</i>	pH4	750000.00	325269.12	112000.00	5656.85
	pH7	6010000.00	240416.31	221000.00	145664.00
	pH9	7690000.00	777817.46	334500.00	118086.83
	-20°C	1100000.00	537401.15	151500.00	23334.52
	121°C	5480000.00	452548.34	291500.00	129400.54
	%3 NaCl	960000.00	395979.80	211500.00	48790.37
	%3 Ç.S.	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	522000000.00	82024386.62	736000000.00	175362481.73
	Toplam	67998750.00	178507161.46	92165250.00	255373422.50
<i>P. aeruginosa</i>	pH4	1520000.00	579827.56	330000.00	141421.36
	pH7	4675000.00	728319.98	2355000.00	473761.54
	pH9	6575000.00	629325.04	3300000.00	650538.24
	-20°C	2500000.00	650538.24	520000.00	212132.03
	121°C	2915000.00	374766.59	1865000.00	106066.02
	%3 NaCl	1640000.00	622253.97	460000.00	169705.63
	%3 Ç.S.	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	318000000.00	28284271.25	960000000.00	141421356.24
	Toplam	42228125.00	107916155.06	121103750.00	329503047.11
<i>E. coli</i>	pH4	730000.00	438406.20	9450.00	4454.77
	pH7	10285000.00	1407142.49	35550.00	8838.83
	pH9	13430000.00	3634528.86	43450.00	12657.21
	-20°C	1020000.00	367695.53	15200.00	8485.28
	121°C	3475000.00	1011162.70	28900.00	10606.60
	%3 NaCl	1665000.00	700035.71	20100.00	13010.76
	%3 Ç.S.	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	558000000.00	38183766.18	52000000.00	8485281.37
	Toplam	73575625.00	189419147.71	6519081.25	17888609.61
<i>K. pneumoniae</i>	pH4	770000.00	353553.39	7700.00	4101.22
	pH7	4760000.00	608111.83	82000.00	13576.45
	pH9	6020000.00	537401.15	102400.00	24890.16
	-20°C	1305000.00	784888.53	47600.00	5232.59
	121°C	4260000.00	254558.44	68050.00	4313.35
	%3 NaCl	1920000.00	367695.53	24000.00	3959.80
	%3 Ç.S.	0.00	0.00	0.00	0.00
	Kontrol	236000000.00	22627417.00	446000000.00	46669047.56
	Toplam	31879375.00	79921187.30	55791468.75	152797696.89

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi koşullardaki mikroorganizma sayılarının kontrol grubundan anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

EK 1.2.b: Kontrol grubu ile anlamlı olarak farklılaşan koşullar ve mikroorganizma sayı dağılımları.

Bakteri türü		LSD					
		15. dakika			24. saat		
		Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri	Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri
S. aureus	Kontrol	pH4	521250000.00	0.00	pH4	735888000.00	0.00
		pH7	515990000.00	0.00	pH7	735779000.00	0.00
		pH9	514310000.00	0.00	pH9	735665500.00	0.00
		-20°C	520900000.00	0.00	-20°C	735848500.00	0.00
		121°C	516520000.00	0.00	121°C	735708500.00	0.00
		%3 NaCl	521040000.00	0.00	%3 NaCl	735788500.00	0.00
		%3 Ç.S.	522000000.00	0.00	%3 Ç.S.	736000000.00	0.00
P. aeruginosa	Kontrol	pH4	316480000.00	0.00	pH4	959670000.00	0.00
		pH7	313325000.00	0.00	pH7	957645000.00	0.00
		pH9	311425000.00	0.00	pH9	956700000.00	0.00
		-20°C	315500000.00	0.00	-20°C	959480000.00	0.00
		121°C	315085000.00	0.00	121°C	958135000.00	0.00
		%3 NaCl	316360000.00	0.00	%3 NaCl	959540000.00	0.00
		%3 Ç.S.	318000000.00	0.00	%3 Ç.S.	960000000.00	0.00
E. coli	Kontrol	pH4	557270000.00	0.00	pH4	51990550.00	0.00
		pH7	547715000.00	0.00	pH7	51964450.00	0.00
		pH9	544570000.00	0.00	pH9	51956550.00	0.00
		-20°C	556980000.00	0.00	-20°C	51984800.00	0.00
		121°C	554525000.00	0.00	121°C	51971100.00	0.00
		%3 NaCl	556335000.00	0.00	%3 NaCl	51979900.00	0.00
		%3 Ç.S.	558000000.00	0.00	%3 Ç.S.	52000000.00	0.00
K. pneumoniae	Kontrol	pH4	235230000.00	0.00	pH4	445992300.00	0.00
		pH7	231240000.00	0.00	pH7	445918000.00	0.00
		pH9	229980000.00	0.00	pH9	445897600.00	0.00
		-20°C	234695000.00	0.00	-20°C	445952400.00	0.00
		121°C	231740000.00	0.00	121°C	445931950.00	0.00
		%3 NaCl	234080000.00	0.00	%3 NaCl	445976000.00	0.00
		%3 Ç.S.	236000000.00	0.00	%3 Ç.S.	446000000.00	0.00

EK 2. ALAMAR BLUE BOYAMA YÖNTEMİ SONUÇLARININ İSTATİKSEL ANALİZLERİ

EK 2.1. Farklı Koşullara Maruz Bırakılan Gümüş Sülfadiazinin Sonuçları

Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre absorbans değerlerine dair dağılımlar Ek 2.1.a'da verilmiştir.

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları, dezenfektanın 15 dakika ve 24 saat uygulanmasının ardından alamar blue boyasının absorbans değerleri, koşullar arasında p

değerlerinin > 0.05 olduğunu ve anlamlı olarak farklılaşma olmadığını göstermektedir. Farklılaşma olmadığı için Post-Hoc analizi uygulanmamıştır.

Ek 2.1.a: Farklı koşullara maruz kalmış gümüş sülfadiazinin uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre absorbens değerine yönelik tanımlayıcı istatistikler.

Bakteri türü	Koşullar	15. dakika		24. saat	
		Absorbans değeri		Absorbans değeri	
		Ortalama	Std.sapma	Ortalama	Std.sapma
<i>S. aureus</i>	pH4	2.9603	0.74152	2.0750	1.01613
	pH7	2.9130	0.95488	2.3360	1.14005
	pH9	2.8807	0.79962	1.6250	0.67580
	-20°C	2.6540	1.23963	1.6990	0.36991
	121°C	3.6010	2.11913	2.2583	0.84693
	%3 NaCl	3.0033	0.46754	2.0430	0.98655
	%3 Ç.S.	1.8617	0.34264	1.5237	0.13440
	Kontrol	1.3418	0.37547	1.4128	0.34578
	Blank	1.4004	0.00057	1.4004	0.00057
	Toplam	2.6043	1.10249	1.8523	0.71260
<i>P. aeruginosa</i>	pH4	2.2957	0.82113	1.4973	0.54349
	pH7	1.9263	0.46681	1.4273	0.48554
	pH9	1.7203	0.48956	1.4697	0.08410
	-20°C	1.5363	0.46385	1.4287	0.45525
	121°C	2.2927	0.29338	1.7780	0.44988
	%3 NaCl	1.5010	0.39967	1.3853	0.43073
	%3 Ç.S.	2.6237	0.42620	1.3207	0.30289
	Kontrol	1.4939	0.49374	1.6901	0.47641
	Blank	1.4004	0.00057	1.4004	0.00057
	Toplam	1.8991	0.58089	1.4841	0.36313
<i>E. coli</i>	pH4	2.3880	0.95646	1.7190	0.73593
	pH7	2.1093	0.52552	1.6620	0.79148
	pH9	2.0903	1.13155	1.6410	0.76188
	-20°C	1.7440	0.37211	1.2957	0.42493
	121°C	2.2190	0.99490	1.7703	0.84335
	%3 NaCl	2.0253	1.18878	1.6950	0.35491
	%3 Ç.S.	1.2697	0.66297	1.6373	0.41209
	Kontrol	1.4220	0.30193	1.2604	0.08255
	Blank	1.4004	0.00057	1.4004	0.00057
	Toplam	1.8873	0.77782	1.5833	0.52590
<i>K. pneumoniae</i>	pH4	1.6787	0.27873	1.6430	0.67264
	pH7	1.6563	0.48027	1.3047	0.41194
	pH9	1.6063	0.56411	1.2300	0.56733
	-20°C	1.5150	0.53945	1.1873	0.43102
	121°C	1.8853	0.68486	1.3657	0.28615
	%3 NaCl	1.6473	0.56322	1.1770	0.42695
	%3 Ç.S.	1.3897	0.32101	1.1253	0.27232
	Kontrol	0.8326	0.05957	0.9456	0.30635
	Blank	1.4004	0.00057	1.4004	0.00057
	Toplam	1.5441	0.46682	1.2716	0.39984

EK 2.2. Farklı Koşullara Maruz Bırakılan Benzalkonyum Klorürün Sonuçları

Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre absorbans değerlerine dair dağılımlar Ek 2.2.a'da verilmiştir.

Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonuçları, dezenfektanın 15 dakika ve 24 saat uygulanmasının ardından alamar blue boyasının absorbans değerleri, koşullar arasında anlamlı olarak farklılaştığını göstermektedir. *S. aureus* için 15. dakikada $F = 6.281$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 1141.329$, $p < 0.05$, *P. aeruginosa* için 15. dakikada $F = 411.619$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 179.952$, $p < 0.05$, *E.coli* için 15. dakikada $F = 20.899$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 189.342$, $p < 0.05$, *K.pneumoniae* için 15. dakikada $F = 186.910$, $p < 0.05$, 24. saatte $F = 353.492$, $p < 0.05$ 'dir.

Ek 2.2.a: Farklı koşullara maruz kalmış benzalkonyum klorürün uygulandığı örneklerdeki koşul değişkenine göre absorbens değerine yönelik tanımlayıcı istatistikler.

Bakteri türü	Koşullar	15. dakika		24. saat	
		Absorbans değeri		Absorbans değeri	
		Ortalama	Std.sapma	Ortalama	Std.sapma
<i>S. aureus</i>	pH4	0.4217	0.04839	0.3620	0.00400
	pH7	0.6137	0.04285	0.4300	0.01000
	pH9	0.6777	0.17978	0.4580	0.00400
	-20°C	0.5410	0.13685	0.3910	0.00600
	121°C	0.5870	0.15268	0.4350	0.00700
	%3 NaCl	0.5413	0.03729	0.3940	0.00800
	%3 Ç.S.	0.7990	0.16553	0.7360	0.00800
	Kontrol	0.8950	0.00990	0.7980	0.00283
	Blank	0.2475	0.01909	0.2475	0.01909
	Toplam	0.5932	0.19264	0.4684	0.15909
<i>P. aeruginosa</i>	pH4	0.4745	0.01202	0.3605	0.00212
	pH7	0.6980	0.00283	0.5605	0.00212
	pH9	0.7100	0.00283	0.5785	0.00071
	-20°C	0.6225	0.01768	0.3655	0.00354
	121°C	0.6960	0.00566	0.4650	0.00000
	%3 NaCl	0.6630	0.01273	0.4345	0.00071
	%3 Ç.S.	0.6710	0.00000	0.5420	0.05657
	Kontrol	0.7240	0.00566	1.0044	0.03270
	Blank	0.2475	0.01909	0.2475	0.01909
	Toplam	0.6118	0.15150	0.5065	0.20997
<i>E. coli</i>	pH4	0.3990	0.06338	0.5090	0.01200
	pH7	0.6820	0.09934	0.7500	0.00900
	pH9	0.7940	0.00400	0.7680	0.01200
	-20°C	0.6553	0.00929	0.7460	0.00200
	121°C	0.6923	0.04206	0.8130	0.01700
	%3 NaCl	0.6120	0.08362	0.6280	0.01000
	%3 Ç.S.	0.6700	0.08924	0.6850	0.02100
	Kontrol	0.8368	0.00672	1.0580	0.07920
	Blank	0.2475	0.01909	0.2475	0.01909
	Toplam	0.6273	0.17175	0.6923	0.18986
<i>K. pneumoniae</i>	pH4	0.6410	0.02970	0.4565	0.00071
	pH7	0.7495	0.01626	0.6355	0.02758
	pH9	0.7850	0.01273	0.6775	0.02192
	-20°C	0.6720	0.02546	0.5410	0.02546
	121°C	0.7695	0.02899	0.6150	0.00849
	%3 NaCl	0.7150	0.01273	0.4720	0.00141
	%3 Ç.S.	0.5155	0.00919	0.5335	0.00636
	Kontrol	0.8920	0.00283	1.0580	0.00849
	Blank	0.2475	0.01909	0.2475	0.01909
	Toplam	0.6652	0.18326	0.5818	0.21272

Ayrıca Post-Hoc analiziyle hangi koşullardaki mikroorganizma sayılarının kontrol ve mikroorganizmanın bulunmadığı steril dezenfektan içeren blank grubundan anlamlı olarak farklılaştığı incelenmiş ve bunun için LSD testi kullanılmıştır.

Ek 2.2.b: Kontrol grubu ve blank ile anlamlı olarak farklılaşan koşullar ve absorbands değeri dağılımları.

LSD							
Bakteri türü	15. dakika			24. saat			
	Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri	Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri	
S. aureus	Kontrol	pH4	0.47333	0.000	pH4	0.43600	0.000
		pH7	0.28133	0.017	pH7	0.36800	0.000
					pH9	0.34000	0.000
		-20°C	0.35400	0.004	-20°C	0.40700	0.000
		121°C	0.30800	0.010	121°C	0.36300	0.000
		%3 NaCl	0.35367	0.004	%3 NaCl	0.40400	0.000
					%3 Ç.S.	0.06200	0.000
	Blank	0.64750	0.000	Blank	0.55050	0.000	
	Blank				pH4	-0.11450	0.000
		pH7	-0.36617	0.003	pH7	-0.18250	0.000
		pH9	-0.43017	0.001	pH9	-0.21050	0.000
		-20°C	-0.29350	0.014	-20°C	-0.14350	0.000
		121°C	-0.33950	0.005	121°C	-0.18750	0.000
		%3 NaCl	-0.29383	0.013	%3 NaCl	-0.14650	0.000
		%3 Ç.S.	-0.55150	0.000	%3 Ç.S.	-0.48850	0.000
	Kontrol	-0.64750	0.000	Kontrol	-0.55050	0.000	
	P. aeruginosa	Kontrol	pH4	0.24950	0.000	pH4	0.64388
pH7			0.02600	0.040	pH7	0.44388	0.000
					pH9	0.42588	0.000
-20°C			0.10150	0.000	-20°C	0.63888	0.000
121°C			0.02800	0.030	121°C	0.53937	0.000
%3 NaCl			0.06100	0.000	%3 NaCl	0.56988	0.000
%3 Ç.S.			0.05300	0.001	%3 Ç.S.	0.46238	0.000
Blank		0.47650	0.000	Blank	0.75688	0.000	
Blank		pH4	-0.22700	0.000	pH4	-0.11300	0.001
		pH7	-0.45050	0.000	pH7	-0.31300	0.000
		pH9	-0.46250	0.000	pH9	-0.33100	0.000
		-20°C	-0.37500	0.000	-20°C	-0.11800	0.001
		121°C	-0.44850	0.000	121°C	-0.21750	0.000
		%3 NaCl	-0.41550	0.000	%3 NaCl	-0.18700	0.000
		%3 Ç.S.	-0.42350	0.000	%3 Ç.S.	-0.29450	0.000
Kontrol		-0.47650	0.000	Kontrol	-0.75688	0.000	

Ek 2.2.b (devam): Kontrol grubu ve blank ile anlamlı olarak farklılaşan koşullar ve absorbanans değeri dağılımları.

Bakteri türü		15. dakika			24. saat		
		Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri	Farklılaştığı koşullar	Ortalama farkları	Anlamlılık değerleri
<i>E. coli</i>	Kontrol	pH4	0.43775	0.000	pH4	0.54900	0.000
		pH7	0.15475	0.015	pH7	0.30800	0.000
					pH9	0.29000	0.000
		-20°C	0.18142	0.006	-20°C	0.31200	0.000
		121°C	0.14442	0.022	121°C	0.24500	0.000
		%3 NaCl	0.22475	0.001	%3 NaCl	0.43000	0.000
		%3 Ç.S.	0.16675	0.010	%3 Ç.S.	0.37300	0.000
		Blank	0.58925	0.000	Blank	0.81050	0.000
	Blank	pH4	-0.15150	0.017	pH4	-0.26150	0.000
		pH7	-0.43450	0.000	pH7	-0.50250	0.000
		pH9	-0.54650	0.000	pH9	-0.52050	0.000
		-20°C	-0.40783	0.000	-20°C	-0.49850	0.000
		121°C	-0.44483	0.000	121°C	-0.56550	0.000
		%3 NaCl	-0.36450	0.000	%3 NaCl	-0.38050	0.000
		%3 Ç.S.	-0.42250	0.000	%3 Ç.S.	-0.43750	0.000
		Kontrol	-0.58925	0.000	Kontrol	-0.81050	0.000
<i>K. pneumoniae</i>	Kontrol	pH4	0.25100	0.000	pH4	0.60150	0.000
		pH7	0.14250	0.000	pH7	0.42250	0.000
		pH9	0.10700	0.000	pH9	0.38050	0.000
		-20°C	0.22000	0.000	-20°C	0.51700	0.000
		121°C	0.12250	0.000	121°C	0.44300	0.000
		%3 NaCl	0.17700	0.000	%3 NaCl	0.58600	0.000
		%3 Ç.S.	0.37650	0.000	%3 Ç.S.	0.52450	0.000
		Blank	0.64450	0.000	Blank	0.81050	0.000
	Blank	pH4	-0.39350	0.000	pH4	-0.20900	0.000
		pH7	-0.50200	0.000	pH7	-0.38800	0.000
		pH9	-0.53750	0.000	pH9	-0.43000	0.000
		-20°C	-0.42450	0.000	-20°C	-0.29350	0.000
		121°C	-0.52200	0.000	121°C	-0.36750	0.000
		%3 NaCl	-0.46750	0.000	%3 NaCl	-0.22450	0.000
		%3 Ç.S.	-0.26800	0.000	%3 Ç.S.	-0.28600	0.000
		Kontrol	-0.64450	0.000	Kontrol	-0.81050	0.000

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Beyza Nur BAY
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	30.11.1990, ÜSKÜDAR
Telefon	0531 712 0086
E-mail	beyzanurbay@gmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyoloji Anabilim Dalı / Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı	2015
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi / Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Kocaeli Gölcük İhsaniye Anadolu Lisesi	2008