



SELÇUK
ÜNİVERSİTESİ

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ORAL ORTAMDA OLUŞAN BİYOFİLM
DİRENCİNİN BROKOLİ BİTKİSİYLE
ÖNLENMESİ**

Ayşegül YAMAN

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

Haziran-2017
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşegül YAMAN tarafından hazırlanan “Oral Ortamda Oluşan Biyofilm Direncinin Brokoli Bitkisiyle Önlenmesi” adlı tez çalışması 02/05/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan

Doç.Dr. Aysel ÇİMEN

Danışman

Doç.Dr. Gülşin ARSLAN

Üye

Doç.Dr. Mustafa ÖZMEN

İmza



Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof.Dr. Mustafa YILMAZ
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) tarafından 15201103 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ayşegül YAMAN
Haziran 2017



ÖZET

YÜKSEK LİSANS

ORAL ORTAMDA OLUŞAN BİYOFİLM DİRENCİNİN BROKOLİ BİTKİSİYLE ÖNLENMESİ

Ayşegül YAMAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. Gülşin ARSLAN

2017, 81 Sayfa

Jüri

Danışman: Doç.Dr. Gülşin ARSLAN
Doç.Dr. Aysel ÇİMEN
Doç.Dr. Mustafa ÖZMEN

Bitkilerin; biyolojik ve yan etkileri, kimyasal içerik ve özellikle oral ortamda biyofilm oluşumutam olarak bilinmeden tüketimi söz konusudur. Günümüzde sıklıkla tüketilen sebzelerden biri olan; Brokoli (*Brassica oleracea Italica*), turpgiller (*Brassicaceae*) familyasında bulunan, glukosinolatları, fenoller, antioksidantları ve temel besin minerallerini de içeren oldukça zengin besin kaynağı olan bir sebzedir. Bu çalışmada; ağız sağlığında biyofilm oluşumunu engelleyebilecek; daha ucuz, kaliteli ve sağlıklı yaşamı sürdürülebilirliği, ağız hastalıklarının tedavisinde, belirtilerin azaltılmasında veya hastalıkların engellenmesinde brokoli ekstraktlarının kullanılabilirliğini araştırmayı hedeflemiştir. Bu amaçla; brokoli ekstraktlarının, sentezlenen hidroksiapatit biyomateryali ile hazırlanan diskler üzerinde *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı oral ortamda biyofilm oluşumundaki etkileşimi incelenecektir. Hidroksiapatit diskler üzerine *Staphylococcus aureus* suşları 4 hafta boyunca inkübe edilmiş ve biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri bakteri kültür yöntemiyle gözlemlenmiş ve disk yüzeyleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) yardımıyla değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Brokoli, Biyofilm, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

MS THESIS

PREVENTION of BIOFILM RESISTANCE by BROCCOLI PLANTS in The ORAL ENVIRONMENT

Ayşegül YAMAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

Advisor: Assoc.Prof.Dr. Gülşin ARSLAN

2017, 81 Pages

Jury

Advisor Assoc.Prof.Dr. Gülşin ARSLAN

Assoc.Prof.Dr. Aysel ÇİMEN

Assoc.Prof.Dr. Mustafa ÖZMEN

The plants of biological and side effects, chemical content, and especially consumption of the biofilm formation in the oral environment is not fully known. Today, one of the most frequently consumed vegetables; Broccoli (*Brassica oleracea Italica*) is a very rich source of nutrients, including glucosinolates, phenols, antioxidants and basic food minerals found in the family radishes (*Brassicaceae*). In this study; Prevent biofilm formation in oral health; the aim of investigated the availability of broccoli extract in order to maintain cheaper, better quality and healthy life, to treat oral diseases, to reduce symptoms or to prevent diseases. For this purpose; The broccoli extract was examined for biofilm formation *invitro* against *Staphylococcus aureus* bacteria on discs prepared from the synthesized hydroxyapatite biomaterial. *Staphylococcus aureus* strains on hydroxyapatite disks were incubated for 4 weeks and antimicrobial activities on biofilm were observed by bacterial culture method and disk surfaces were evaluated by scanning electron microscopy (SEM).

Keywords: Broccoli, Biofilm, *Staphylococcus aureus*

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca, danışmanlığımı üstlenen, çalışmamın her aşamasında yol gösterici ve destekleyici olan, emeğini hiçbir şekilde esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Gülşin ARSLAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans tez çalışmamda bakteri çalışmalarımı izleyip bana destek olan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Uğur ARSLAN'a ve Araş.Gör. Nurullah ÇİFTÇİ'ye teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca 114Y163 nolu TÜBİTAK projesinden burs almamı sağlayan, yol gösterici ve destekleyici olan Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Mustafa ERSÖZ'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmam boyunca desteğini ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Ayşe HUZUR, Mehmet OĞUZ, Samet ÇADIRLAR'a teşekkür ederim.

Bu çalışmaya desteklerinden dolayı Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP); 15201103 nolu proje ile desteklediğinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren, her kararında beni sorgusuz destekleyen aileme, saygı ve şükranlarımı sunmayı bir borç bilirim.

Ayşegül YAMAN
KONYA-2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	2
1.2 Tezin Önemi.....	2
2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1 Biyofilm Nedir?	3
2.1.1 Biyofilm Oluşturma Nedenleri?.....	5
2.1.2 Biyofilm Yapısı.....	6
2.1.3 Biyofilmin Gelişim Evreleri	10
2.1.4 Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Engellenmesi	14
2.1.5 Oral Biyofilm	16
2.1.6 <i>Staphylococcus Aureus</i>	20
2.2. Hidroksiapatit.....	21
2.2.1 Genel Özellikleri ve Yapısı.....	21
2.2.2 HA'tin Üretim Yöntemleri.....	23
2.3. Brokoli (<i>Brassica Oleracea</i>).....	24
2.3.1 Brokolinin İnsan Sağlığına Etkisi	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	27
3.2 Biyofilm Oluşumu Aşaması için Yüzey Hazırlama	28
3.2.1 Kalsiyum Hidroksiapatit (CaHA) Sentezi	28
3.2.2 CaHA Tozlarının Disk Haline Getirilmesi	29
3.2.3 CaHA Tozlarının Karakterizasyonu	30
3.3 Brokoli Ekstresinin Hazırlanması	30
3.3.1 Brokoli Ekstresinin Karakterizasyonu	31
3.4 Antimikrobiyal Çalışmalar	31
3.4.1 Koyun Kanlı Agar.....	31
3.4.2 %0,25 glukoz içeren Triptik Soy Broth (TSB).....	31
3.4.3 Oral Ortam Şartlarını Sağlamak İçin Yapay Tükürük Hazırlanması.....	32
3.4.4. Brokoli Ekstraktının Duyarlılığının Mikrodilüsyon Yöntemi ile Belirlenmesi	33
3.5 Biyofilm Çalışmaları.....	33
3.5.1 Tüp Yöntemi	33

3.5.2 CaHA Diskler Üzerinde Biyofilm Oluşturma Çalışması.....	34
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI.....	38
4.1 CaHA Tozlarının Karakterizasyonu	38
4.1.1 CaHA Tozlarının XRD Analiz Sonucu	38
4.1.2 CaHA Tozlarının EDX Analiz Sonucu.....	39
4.1.3 CaHA Tozlarının FT-IR Analiz Sonucu	40
4.1.4 CaHA Tozlarının SEM Analiz Sonucu.....	42
4.1.5 Parçacık Boyut Analizi	42
4.2 Brokoli Ekstresinin Karakterizasyonu.....	45
4.2.1 Brokoli Ekstresinin HPLC Analiz Sonucu	45
4.2.2 Brokoli Ekstresinin SEM Analiz Sonucu	49
4.3 Biyofilm Çalışma Sonuçları.....	50
4.3.1 Tüp Yöntemiyle Yapılan Çalışma Sonuçları	50
4.3.2 Farklı Ortamlarda Kurutulan Brokoli Kaplı CaHA Disklerin Değerlendirilmesi.....	52
4.3.3 CaHA Diskler Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntülenmesi...	53
4.3.4 CaHA Disklerinin Koyun Kanlı Agar Üzerindeki Çalışma Sonuçları	62
4. TARTIŞMA.....	63
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ	72

KISALTMALAR

Kısaltmalar

ACP: Amorf kalsiyum fosfat

ATCC: American Type Culture Collection

BAP: Birleşmiş Protein Yapısı

DNA: Deoksiribo Nükleik asit

EPM: Ekstrasellüler Polimerik Matriks

EPS: Ekzopolisakarit

GTF: Glikoziltransferaz

HA(CaHA): Hidroksiapatit (Kalsiyum hidroksiapatit)

RSHM: Refik Saydam National Public Health

QS: Quorum sensing (Yoğunluk hissetme)

TCP: Trikalsiyum fosfat

TSB: Triptik Soy Broth

1. GİRİŞ

Ağız; sindirim sisteminin başlangıcı olup, dişlerle mekanik, tükürükteki amilaz ile kimyasal olarak ilk sindirimini başlatıldığı dış ortam ile etkileşim halinde olan bir yapıdır. Ağız ortamı; ekolojik olarak farklı mikroçevrelerden oluşmasından dolayı çeşitli mikrofloralar içermektedir (Aas ve ark., 2005). Ağız içerisi; yanak epiteli, dil sırtı, supragingival ve subgingival çevrelerden oluşmaktadır. Diş etinin üstünde kalan supragingival çevre tükürük ve yiyecekler ile yıkanmakta ve aynı zamanda mekanik etkilere maruz kalmaktadır. Diş etinin altında kalan subgingival çevre ise diş eti oluk sıvısıyla yıkanmaktadır.

Oral ortamda bulunan mikroorganizmaların canlı kalabilmesi için yapışarak tutunmaları önemli bir ekolojik faktördür. Ağız ortamı diş gibi tutunabilmesi kolay yüzeyler içermesinden dolayı biyofilm oluşumuna oldukça yatkın bir yapıdadır (Avila ve ark., 2009). Biyofilm diş yüzeyinde, dental plak olarak adlandırılan, konağın polimer matriksinin içerisine yerleşen mikroorganizma topluluklarıdır. Mikroorganizmalar ortam şartları uygun ise tüm yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir.

İn vitro çalışmalarda biyomalzemelerin kullanılması sıklıkla görülmektedir. Biyomalzemeler, insan vücudundaki organ veya dokuların işlevlerini yerine getirmek ya da desteklemek amacıyla kullanılan malzemelerdir (Gümüşderelioğlu, 2002). Biyomalzemelerin en önemli özellikleri, vücuda uyumlu (biyouyumluluk) olmaları, çevresindeki dokuların normal işlevlerine engel olmamaları ve dokuda yan etki oluşturmamalarıdır. Klinik olarak kemik, diş ve diş minesi dokusunun inorganik yapısına benzer biyoseramik malzeme olan hidroksiapatit kullanılmaktadır (Mostafa, 2005; Pasinli ve Aksoy, 2010).

Mikroorganizma kaynaklı çeşitli hastalıkların tedavisi amacıyla farklı yöntemler denenmiştir. Bu yöntemlerden biri doğal olarak yetişen ve halk arasında şifalı otlar olarak adlandırılan birçok bitkisel kaynaklı ilaçların kullanılmasıdır. Son yıllarda antimikrobiyal etki gösteren bitki türlerinin mikroorganizmalar üzerindeki etkileri büyük ilgi oluşturmuştur. Bu ilginin başlıca sebebi ise sağlığa zararlı sentetik maddelerin özellikle yiyeceklere eklenmesidir (Reische ve ark., 1998). Bitkisel ilaçlar; hastalıkların tedavisinde, engellenmesinde ve belirtilerin azaltılmasında kullanılabilir (Goldman, 2001). Yapılan çalışmalarda, doğada tabii olarak yetişen bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağların bakterilere olduğu kadar, mantarlara karşı da antifungal aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Tanker ve Tanker, 1990).

1.1 Tezin Amacı

Günümüzde sıklıkla tüketilen sebzelerden biri olan; Brokoli (*Brassica oleracea* Italica), turpgiller (Brassicaceae) familyasında bulunan, glukosinolatları, fenoller, antioksidantları ve temel besin minerallerini de içeren oldukça zengin besin kaynağı olan bir sebzedir. Ancak bitkilerle ilgili olarak biyolojik ve yan etkiler, kimyasal içerik ve özellikle oral ortamda biyofilm oluşumu tam olarak bilinmeden bir tüketim söz konusudur. Bu amaçla tez çalışmasında brokoli ekstralarının, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bakterisine etkisi incelenmiştir. Yapılan bu çalışmalar doğrultusunda brokoli ekstralarının oral ortamda biyofilm oluşumundaki etkisi değerlendirilmiştir.

1.2 Tezin Önemi

Ağız hastalıkları gibi dişte enfeksiyonel hastalıklara sebep olan bakterilerin büyük bir kısmı biyofilm olarak bilinen kompleks bakteri kolonileri halinde bulunmaktadır. Planktonik bakteriler antimikrobiyal maddelerle kolayca ortadan kaldırılabilirken, biyofilm hücreleri bu maddelerden etkilenmezler ve kontaminasyonun tekrar oluşmasına sebep olurlar. Bu yüzden biyofilm oluşumunu engelleyebilecek yeni çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Bir kısım çalışmalar ağız sağlığı alanında doğal ürünler üzerine odaklanmıştır. Doğada tabii olarak yetişen bazı bitki ekstraktlarının ve uçucu yağlarının bakterilere olduğu kadar, mantarlara karşı da antifungal aktivite gösterdiği yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bitkiler böylece hastalık tedavisinde, belirtilerinin azaltılmasında ya da hastalıkların engellenmesinde kullanılabilir. Bundan dolayı ağız hastalıkları bu yöntemle azaltılabilir ya da engellenebilir. Bu sayede daha ucuz, kaliteli ve sağlıklı yaşam sürdürülebilir.

2. GENEL BİLGİLER ve KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Biyofilm Nedir?

Mikroorganizmalar, tek başına serbestçe dolaşarak hızla çoğalabilen canlılar olarak görülmekteydi. Çalışmalar, planktonik olarak da adlandırılan, diğer bakterilerden bağımsız mikrobiyal hücrelerin davranışlarını inceleyerek bu yönde gelişmiştir. Fakat bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdikleri birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (Çiftçi, 2005).

Biyofilm, günümüze kadar birçok bilim adamı tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. İlk olarak 17. yüzyılda Anton von Leewenhoek kendi dışından almış olduğu örnekteki birikintiler içerisinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmesinden sonra 1978 yılına kadar biyofilm varlığından söz edilmemiştir (Rosan ve Lamont, 2000; Donlan ve Costerton, 2002; Sakarya, 2005). 1970'li yılların başında Costerton dağlardaki akarsuların içerisinde yaşayan bakterileri incelerken bakterilerin %99,99'unun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuştur. 1978 yılında ise, bakterilerin, yeterli besin bulunan yüzeylere yapışan bir matriks ile çevrili biyofilm içinde ürettiği tezi ortaya atılmış ve ilk defa "*biyofilm*" terimi Costerton tarafından kullanılmıştır (Donlan ve Costerton, 2002).

Yapılan çalışmalarda, bakterinin büyük bir kısmının biyofilm adı verilen besleyici bir oluşum içerisinde olduğu ve bakterinin yapışmış şekli ile serbest bulunan şekli arasında farklılık olduğu gösterilmiştir. Mikroskopik incelemelerde bakterilerin, derin yer altı suları ve okyanusların derinlikleri hariç, doğadaki su ekosistemi başta olmak üzere, tüm tabii ekosistemde oluşabildiği ve farklı yüzeylere yapışarak çoğalmasının %99,9 oranında biyofilm aracılığıyla olduğunu göstermiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Çiftçi, 2005; Sakarya, 2005; Yüksel, 2006).

Zamanla biyofilmin tanımı, yapılan çalışmalar ve elde edilen bilgiler kapsamında geliştirilmiştir. Marshall 1976 yılında, biyofilmin çok ince bir ekstrasellüler polimer fibril olduğunu ve bakterinin yüzeye tutunmasında önemli olduğunu bildirmiştir (Donlan ve Costerton, 2002; Davey ve O'toole, 2000).

Costerton ve arkadaşları, bakterilerin polisakkarit yapıda bir glikokaliks matriks içerisinde bulunduğunu ve bu yapının canlı veya cansız yüzeylere adezyonu kolaylaştırdığını gözlemlemişlerdir. 1987'de Costerton, biyofilmin yüksek oranda sulu

(hidrate) anyonik ekzopolimer matriks içinde bulunan mikrokoloniler olduğunu belirtmiştir (Donlan ve Costerton, 2002).

Bunların yanında Elder ve arkadaşları, biyofilmi, mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığıyla oluşturdukları yapısal birlik olarak tanımlarken, Carpentier ve Cerf de çok basitçe biyofilmin, bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olduğunu belirtmişlerdir (Carpentier ve Cerf, 1993; Elder ve ark., 1995).

Biyofilmin en genel tanımı ise; “Mikroorganizmaların canlı yada cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekstrasellüler polisakkarit matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirleriyle, bir katı yüzeye ya da bir ara yüzeye, geri dönüşümsüz olarak tutunmuş olduğu karmaşık topluluk” olarak tanımlanmaktadır. Genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen farklı fenotip gösterebilen yapıda bulunmaktadırlar (Davey ve O'toole, 2000; Rudney, 2000; Donlan ve Costerton, 2002; Jacob, 2006; Rolland ve ark., 2006; Thomas ve Nakaishi, 2006; Thurnheer ve ark., 2006; Altun ve Şener, 2008; Jayaraman ve Wood, 2008).

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Yapılan araştırmalar ve fosil kayıtlarından edinilen bilgiler 3 milyar yıldan daha uzun bir süreden beri prokaryotların biyofilmler içerisinde yaşadıklarını ortaya çıkarmışlardır (Post ve ark., 2004)

Biyofilmler canlı veya inert yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, doğal akuatik sistemler, su ile temas eden tüm yüzeyler, örneğin; endüstriyel ya da evsel su sistemleri, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, soğutma kulelerinde, kağıt makinelerinde, tıbbi cihazlarda ve diş ünitelerinde rastlanabilmektedir (Thomas ve Nakaishi, 2006; Altun ve Şener, 2008). Biyofilm tabakası bu gibi ortamlarda, bakterileri başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, besinsizlikten, kuraklıktan, pH değişikliklerinden ve toksinlerden korumaktadır. Biyofilmlerin bir kısmı organizmayı koruyucu bir rol amaçlarken, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ve kalıcı tıbbi araç ya da kateteri kullanan hastalarda ciddi infeksiyonlara yol açabilmektedir. Biyofilm yapısı insan vücudunda kontak lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, kateterler, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı, cansız birçok yüzeyde bulunabilmektedir (Altun ve Şener, 2008; Nadell ve ark., 2009).

2.1.1 Biyofilm Oluşturma Nedenleri?

Bakteriler *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda biyofilm oluşturmak suretiyle bazı avantajlara sahip olurlar. Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel faktörlerden, ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan ve antibiyotik gibi toksik maddelerden korumaktadır. Bu biyofilm içerisindeki bakterilerin en büyük avantajı olarak görölmektedir (Socransky ve Haffajee, 2002; Petersen ve ark., 2005). Biyofilm; bir türün diğeri için yararlı besini üretmesi anlamına gelen çapraz beslenmeyi, yine bir türün diğeri için zararlı olan metabolik ürünü ortamdaki uzaklaştırması avantajları arasındadır (Socransky ve Haffajee, 2002). Bakterilerin grup halinde ve ekzopolisakkarid (EPS) matriks içerisinde bulunmaları sonucu yok edilmeleri güçleşir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olur (Post ve ark., 2004).

Mikroorganizmaların planktonik formda yaşamak yerine daha çok biyofilm oluşturarak yaşamlarını sürdürmelerinin genel sebeplerini sıralarsak;

- 1) **Çevrenin zararlı etkilerinden korunmak:** Farklı biyofilm topluluklarının kendi ürettiği EPS matriks yapısının farklı rolleri olduğu bilinmektedir. EPS matriksinin aynı zamanda çeşitli ajanların biyofilm içerisine girişlerini engellediği de bilinmektedir. Ayrıca UV ışımaya, pH dalgalanmaları, osmotik çok ve kuruma gibi çevresel faktörlerin zararlı etkilerinden korumada rol oynar.
- 2) **Besin elde etme ve metabolik işbirliği:** Biyofilm içerisindeki mikrokolonileri çevreleyen alanlardan geçen yüksek geçirgenliğe sahip su kanalları bulunmaktadır. Bu kanallar primitif bir dolaşım sistemine benzemektedir. Bu kanal sistemi hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılmasını, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini yapmaktadır.
- 3) **Yeni genetik özelliklerin kazanılması:** Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle birçok ilaca karşı direnç gösteren bakterilerin ortaya çıkmasında önemlidir. Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam konjügasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkân tanır (Davey ve O'toole, 2000).

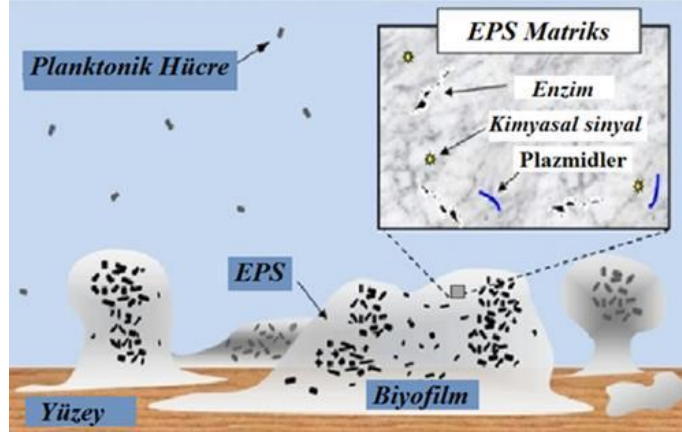
Yüzeyde, mikroorganizmaların oluşturduğu koloni şeklindeki her tabakaya biyofilm denilmemelidir. Buldukları ortam içerisinde biyofilm olmayan topluluklar, yüzeylerde planktonik hücre davranışı gösterebilirler. Bunlarda biyofilm içerisinde gözlenen geri dönüşümsüz yapışma ve direnç gibi biyofilme ait özellikler görülmemektedir. Fakat bunların yanında biyofilm içerisindeki bakterilerin zamanla matriks yapısından koparak planktonik forma geçtikleri unutulmaması gereken bir konudur. Planktonik formdaki bu hücreler dolaşıma geçtikleri halde ayrıldıkları topluluğun direnç özelliğini taşımaktadırlar (Donlan ve Costerton, 2002; Çiftçi, 2005). Biyofilm yapısı, çevresel faktörlere karşı planktonik bakteri formuna göre daha dirençli davranış sergiler (Marsh, 1995; Davey ve O'toole, 2000; Nagayoshi ve ark., 2004; Rolland ve ark., 2006; Müller ve ark., 2007; Nadell ve ark., 2009).

2.1.2 Biyofilm Yapısı

Yapılan araştırmalar; biyofilmlerin, sadece bir yüzeye yapışarak homojen bir tabakadan oluşmadığı, içerisinde bulunan mikroorganizmaların belirli bir yapıya sahip toplu halde yaşayan ve haberleşerek varlıklarını sürdürebilmek için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan karmaşık bir biyolojik sistemdir (Davey ve O'toole, 2000). Bakteriler, ekstrasellüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarit, protein ve nükleik asit içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (Çiftçi, 2005).

Biyofilmin oluşabilmesi için gerekli olan ana bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden herhangi biri olmadığı takdirde biyofilm oluşmamaktadır. Yapı içerisindeki mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaritler, biyofilmin ana ekstrasellüler ögesini oluşturmaktadır (Nadell ve ark., 2009).

Biyofilm yapısının yaklaşık %97'si gibi büyük bir kısmını su oluşturur. Matriks içindeki diğer bileşenler ise; %1-2 EPS, %1-2 glikoproteinler, globuler ve diğer proteinler, %1-2 lipit, fosfolipit ve nükleik asitlerdir. Fakat bu oranlar mevcut organizmaların çeşidine, fizyolojik özelliklerine, gelişme ortamının doğasına, akışkanın tipine, genel fiziksel özelliklere göre değişebilmektedir (Şekil 2.1) (Allison, 2003).



Şekil 2.1. Biyofilmin genel yapısı.

Polisakkaritler, DNA, protein ve sudan oluşan ekstrasellüler matriks biyofilmin mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını sağlar. Yüzeye sıkı bir şekilde tutunmuş olan bakteriler burada çoğalarak önce mikrokolonileri, onlarda büyüyerek ve genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturmaktadırlar. EPS salınımı, organizmaların yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir ve üretimi biyofilm oluşumunun bir göstergesidir. Olgunluğa ulaşmış bir biyofilm tabakasının %75-90'ını EPS oluşturmaktadır (Padera, 2006).

Bakteriyel tutunma için, proteinler gibi organik moleküllerin de varlığı çok önemlidir. Yüzey proteinleri, biyofilm matriksinin içerisinde düzenli bir şekilde oluşurlar (Lasa ve Penadés, 2006). Bu proteinlerin bazıları, EPS varlığında biyofilm oluşumuna teşvik olabilmektedir. Biyofilm açısından Birleşmiş Protein Yapısı (BAP-Biofilm Associated Protein), organizmaların yüzeye kolonize olması ve burada sürekli kalmasının sağlanması açısından önemlidir (Tormo ve ark., 2005).

Tablo 2.1'de biyofilm oluşturan mikroorganizmaların yüzey proteini ve fonksiyonları verilmiştir.

Kives ve arkadaşlarının *Pseudomonas fluorescens* B52 suşundan planktonik ve biyofilm içerisindeki EPS üretimini karşılaştırdığı çalışmalarında, biyofilm içinde polisakkaritlerin glukoz, glukozamin ve ramnoz dışında glukoronik ve guluronik asitlerin de temel bileşikler olduğunu, miktarlarının paslanmaz çelik yüzeyde cam malzemeye kıyasla daha fazla olduğunu belirlemişlerdir (Kives ve ark., 2006). EPS jel ya da viskoelastik davranış biçimi sergileyebilmektedir. Biyofilmin yapısının sağlamlaşması protein, Ca^{+2} iyonları ve polisakkaritler sayesinde (Hussain ve ark., 1993). Bununla birlikte biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine; liyaz, hidrolaz, glikozidaz, esteraz ve diğer enzimler de etki edebilmektedirler. Yapıdaki bu enzimlerin

birçoğu düşük molekül ağırlıklı parçalanma ürünlerinin oluşumuna neden olmakta, bunlar da biyofilmde tutunan bakterilerin metabolizmasında karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılabilir (Allison, 2003).

Tablo 2.1. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ve yüzey proteinlerinin fonksiyonları (Latasa ve ark., 2006).

Mikroorganizma	Yüzey proteini	BAP'la hemoloji	Fonksiyon
<i>Staphylococcus aureus</i>	BAP	-	Başlangıç tutunması ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LapA	8e-59 %25 tanımlanmış	Biyofilm oluşumunda dönüşümsüz tutunma aşamasında destekleme
<i>Pseudomonas putida</i>	Mus 20	8e-136 %29 tanımlanmış	Başlangıç çekirdek kolonizasyonu
<i>Salmonella enteritidis</i>	BAPA	3e-114 %28 tanımlanmış	Biyofilm oluşumu ve konukçu kolonizasyonu
<i>Escherichia coli</i>	YeeJ	5e-18 %21 tanımlanmış	Yapışma
<i>Enterococcus faecalis</i>	Esp	2e-118 %26 tanımlanmış	Başlangıç tutunması ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumu
<i>Enterococcus faecium</i>	Espfm	1e-125 %27 tanımlanmış	Ökaryotik hücrelerde yapışma
<i>Burkholderia cepacia</i>	BAP	8e-135 %33 tanımlanmış	Son aşamada biyofilm oluşumu
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	VP1443	3e-05 %20 tanımlanmış	Biyofilm olgunlaşması

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşabildiği gibi birden fazla türü de yapısında bulundurabilmektedir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluştururken, bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmıştır. Bu su kanalları, içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlayan, kılcal damarlı gözenekli bir yapıdır (Davey ve O'toole, 2000; Altun ve Şener, 2008). Su kanalları mikrokolonilerin hem altında hem de arasında bulunmaktadır. Biyofilm tabakasını tabanına besinlerin taşınması bu özel kanallar aracılığıyla olmaktadır. Hücrel atık sistemi de biyofilmin yüzey alanında gizlenir. Taşıma işlemi, su kanalları içerisinde bulunan su yardımıyla ya da pasif difüzyonla daha kolay gerçekleşmektedir. Bunlarla birlikte su kanallarının içteki alanlara oksijen taşıdığı ve molekül taşınmasına da yardımcı olduğu bilinmektedir (Costerton ve ark., 1995).

Biyofilmin yapısı, saf kültürler için türe, çoklu kültürler için substrata özgüdür. Heterojenik biyofilmlerde yapı çoğunlukla düzensizdir. Biyofilmin yapısı, etrafındaki akış oranı, farklı türlerin sayısı ve tipine bağlı olarak değişmektedir. Biyofilm kalınlığı

laminer ve türbülant akış arasında maksimum seviyededir. Laminer alandaki kalınlık substrata ulaşabilirliğine, türbülant akışta ise aşınmaya bağlı olarak değişmektedir (Poulsen, 1999).

EPM (Ekstrasellüler Polimerik Matriks) üç boyutlu biyofilm yapısının iskeletini oluşturur ve biyofilmin yüzeylere adezyonu ve kohezyonundan sorumludur (Flemming ve Wingender, 2010). Tam hidrate ve canlı biyofilmin %15 hücre, % 85 matriks materyali tarafından oluşturduğu ve hücrelerin matrikslerinin çevrelediği farklı yüksekliklerdeki “kuleler” veya “mantarlar” içerisinde buldukları anlaşılmıştır (Donlan ve Costerton, 2002).

Biyofilm matriksi, içerisinde yaşayan organizmaya bağlı olarak farklı özellikler taşıyabilir. Gram pozitif bakterilerin katyonik matriksler oluşturduğu, gram negatif bakterilerin ise nötral veya polianyonik biyofilmler oluşturduğu bilinmektedir.

2.1.2.1 Quorum¹– Sensing

Biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmalar ve mikrokoloniler, birbirleriyle iletişim kurabilme özelliğine sahiptirler. Çeşitli kimyasal mekanizmalarını iletişim sinyali olarak kullanmaktadırlar (Rudney, 2000; Saraçlı, 2006; Jayaraman ve Wood, 2008). Kimyasal sinyalin lokal ekstrasellüler konsantrasyonu belirli bir seviyeye ulaşması, çevrede bulunan bakteriler için o bölgede belirli yoğunlukta bir hücresel kümelenmenin başladığı anlamına gelir. Yani mikroorganizmaların hücre yoğunluğu belli bir seviyeyi aşınca bakteriler *autoinducer* adı verilen sinyal molekülleri salgılar, böylece çevredeki bakterilerde gen ekspresyonu aktive olur (Marsh, 2005; Petersen ve ark., 2005). Bakteriler ürettikleri sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, böylece çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların popülasyon yoğunluğunu hissedebilmektedir. **Quorum sensing** olarak adlandırılan bu iletişim yöntemi, hücre yoğunluğuna bağlıdır. Az miktarda hücre ile sinyaller düşük seviyede kalırken, hücre miktarı arttıkça da iletişim için ideal bir ortam sağlanmış olur (Marsh, 2005).

"Quorum: yoğunluk, çoğunluk" ve "sense: hissetme, algılama" kelimelerinin birleşmesiyle oluşturulmuştur (Baskın, 2005). QS çalışmaları ilk olarak 1960'larda, serbest yaşayan iki deniz vibriosu olan *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* üzerinde gerçekleştirilmiştir (Kempner ve Hanson, 1968; Jayaraman ve Wood, 2008). Hastings

¹ Quorum: Yoğunluk

ve Neelson'un bu çalışmalarında, bazı gram negatif bakterilerin belirli bir yoğunluğa ulaştıktan sonra floresans ışık yaydıklarını fark etmişlerdir.

QS mekanizmasını gram pozitif bakterileri de kullanırlar ancak bu mekanizmada üç farklı bileşen bulunur. Bunlar salgılanan bir peptid, membrana bağlı bir histidin kinaz reseptörü ve bir intrasellüler yanıt regülatörüdür. Buna ek olarak hem gram negatif bakterileri hem de gram pozitif bakterilerin otoindükleyici 2 (autoinducer 2: AI-2) adında üçüncü bir sistemde kullandıkları belirlenmiştir (Cloak ve ark., 2002).

QS iletişim yöntemiyle bakterilerin fizyolojik özellikleri bile değiştirilebilir. Yani bakteri bir başka bakteri ile karşılaştığında iletişim kurabilme ve davranışını değiştirebilme yeteneği kazanırken, bununla birlikte bireylerden oluşan topluluğun birlikte hareket etmelerine ve çok hücreli birim olarak davranmalarına izin vermektedir. Aynı zamanda topluluğa yararlı türlerin gelişimi de bu iletişim yöntemi sayesinde uyarılabilir. Bu sistemin bakteriye pek çok avantajı bulunmaktadır. QS sayesinde bakteri davranışlarını koordine eder ve besin kaynaklarına adaptasyon geliştirerek besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilmektedir. Sistemin sağladığı en önemli avantaj ise, infeksiyon sırasında virülans faktörlerinin düzenlenmesi sonucu konakta immün yanıtı kaçabilmektedir (Saraçlı, 2006). Bunlarla birlikte biyofilm içerisinde bilgi taşınması için tek yol sinyal iletimi değildir. Bakteriyel hücrelerin yoğunluğu yüksek olduğunda, aynı tür veya farklı türler arasında genetik bilgi transferi olabilmektedir (Marsh, 2005).

2.1.3 Biyofilmin Gelişim Evreleri

Biyofilm, farklı çevre ve ortamlarda oluşabilir fakat en basit bir biyofilm tabakası bile karmaşık bir yapıya, dinamikliğe sahiptir. Biyofilmlerin sabit bir noktada biyolojik dönüşümlerini tamamladıkları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (O'Toole ve ark., 2000). Biyofilm gelişim aşamalarının başlayabilmesi, besin durumu gibi spesifik çevresel faktörler gibi etmenlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Gelişim aşaması ortama taze besiyer sağlandığı sürece devam eder. Ancak ortam içerisindeki besin tükenince yüzeyle olan bağlantıları zayıflayarak planktonik formuna geri döner. Bu ayrılımla, hücreler yeni besin kaynakları aramaya başlar ve ortama daha iyi adapte olarak yayılmaya başlarlar (Kolter ve ark., 1993). Bundan dolayı biyofilmin gelişim aşamalarının hepsinde besin ihtiyacını giderme durumunun etkili olacağı yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir (O'Toole ve ark., 2000).

Biyofilm oluşum aşamasında sadece besin değil bununla birlikte yzey koşullarının da önemli olduğu unutulmaması gereken bir konudur. Bakteriler, farklı yapıdaki yzeylere tutunabilirler. Buna bağlı olarak biyofilm oluşma ve gelişme aşaması yzey koşullarına göre değişebilmektedir (Mafu ve ark., 1990). Örneğin; Rogers ve ark. *Legionella pneumophila* bakterisinin kauçuk bir yzeye tutunmasının daha kolay iken, polivinil klorür, polipropilen, etilen-propilen, paslanmaz elik ve cam yzeylere tutunmasının daha az ve zor olduğunu belirlemişlerdir (Rogers ve ark., 1994). Yzeyin organik veya inorganik yapıda olması da biyofilmin yzeye tutunmasını etkilemektedir (Kumar ve Anand, 1998).

Gelişim evrelerine göre mikroorganizmalar planktonik ve sessile (yerleşik) olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Planktonik hücreler serbest halde tek başlarına yaşarlarken, yerleşik hücreler ise bir yzeye tutunur ve toplu halde yaşayarak fonksiyonlarını gerçekleştirirler. Yzeye tutunma aşaması zamana bağlı bir oluşumdur. Dönüşümlü ve dönüşümsüz olmak üzere bu durum iki aşamaya ayrılır. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir. Biyofilm oluşumu temel olarak mikroorganizma çeşitine, ortam koşullarına, yzeye ve zamana bağlıdır (Lundberg, 1998).

Biyofilm oluşturacak bakteriler, yaşadıkları ekosistem ne kadar farklı da olsa, aynı döngüsel biçimde biyofilm oluşurmaktadırlar (Danhorn ve Fuqua, 2007). Biyofilm gelişimi 5 evrede (şekil 2.2) gerçekleşmektedir:

1. Dönüşümlü tutunma (tutunma)
2. Dönüşümsüz tutunma (yapışma)
3. Koloni gelişimi (kolonizasyon)
4. Biyofilm olgunlaşması
5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması

1. Dönüşümlü Tutunma

Biyofilm oluşum evresinin ilk aşaması, bakterilerin bir yzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir (ifti, 2005; Fraud ve ark., 2007). Bakterilerin tutunma aşamasını yapabilmeleri için yzey ile etkileşimlerinin farkında olmaları gerekmektedir. Bakteriler bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir ve bu sistem çevresel uyarıları fenotopik değişikliklere çevirmektedir. İlk tutunma aşamasının gerçekleşmesinden sonra biyofilm oluşturmak için ‘Quorum Sensing’ sisteminden gelen yanıtlara bağlı olarak hareket edilmektedir. Bu sistem sayesinde bakteriler, etrafındaki

bakteri varlığının yoğunluğunu belirler ve yüzeye tutunan her bir bakteri 'ben buradayım' mesajını veren bir molekül salgılayarak bakterileri bulunduğu kısma çekmektedir. Gönderilen sinyalin lokal konsantrasyonun artması için yüzeye tutunan bakterilerin sayısının artması gerekmektedir. Bu şekilde biyofilm oluşması için bir dizi işlem başlatılmış olur (Çiftçi, 2005; Fraud ve ark., 2007).

Dönüşümlü basamakta, bakteri hücresi yüzey ile tam olarak temas etmemekte, aralarında uzun mesafeli etkileşimler meydana gelmektedir. Bu etkileşimler; hidrofobik etkileşimler, Van der Waals güçleri ve elektrostatik güçler olup zayıf etkileşimlerdir. Elektrostatik etkileşimler daha çok itici güçlerdir, çünkü bakteriler ve katı yüzeyler negatif yüklüdür (Costerton ve ark., 1995; Poulsen, 1999).

Yüzey ile bakterinin ilk temasının gerçekleşmesinde hidrofobik güçlerin etkisi büyüktür (Costerton ve ark., 1995). Bu aşamada bakteriler durulama gibi basit yıkama işlemleri ile kolayca uzaklaştırılabilirler. Dönüşümlü tutunma aşaması, bakterilerin durgun ve yapışmış haldeki dengeli dağılımın bir sonucu olabilir. Bu kısımda mikroorganizmalar yüzeye yakındır fakat henüz yüzey ile temas etmemiştir (Lindsay ve Von Holy, 2006).

2. Dönüşümsüz Tutunma (Yapışma)

Dönüşümsüz tutunma, bakterilerin yüzeye yapışma ya da kuvvetli bir şekilde tutunmasıdır. Yüzeye tutunan bakteriler, hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekstrasellüler polisakkarit sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Bu madde zamanla, olumsuz olan çevre koşullarına karşı koruma sağlar (Davey ve O'toole, 2000; Çiftçi, 2005; Lindsay ve Von Holy, 2006; Fraud ve ark., 2007; Altun ve Şener, 2008; Nadell ve ark., 2009).

Dönüşümsüz tutunma aşamasının ilk aşamadan farkı yüzeye kısa mesafeli etkileşimlerin oluşmasıdır. Bu etkileşimler dipol-dipol ve iyon-dipol etkileşimleri, hidrofobik etkileşimler, iyonik ve kovalent bağlar ve hidrojen bağı etkileşimleridir. Mikroorganizmalar yapışma esnasında hayatlarını sürdürebilmek için yüzey alanında yeterli besin olup olmadığı araştırmasını yapmaktadırlar. Bakteriler yüzeye dönüşümsüz tutunabilmeleri için, flegella ve pili organelleri ile EPS oluşturarak yüzeye bağlanabilirler (Poulsen, 1999). Ancak EPS oluşturmayan bazı bakteri türleri de bulunmaktadır ve bu türlerinde yüzeylere bağlanabildiği belirtilmiştir.

Bu basamakta, bakterilerin yüzeylerden uzaklaştırılması fırçalama ve kazıma gibi güçlü işlemler vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir.

3. Koloni Oluşumu (Kolonizasyon)

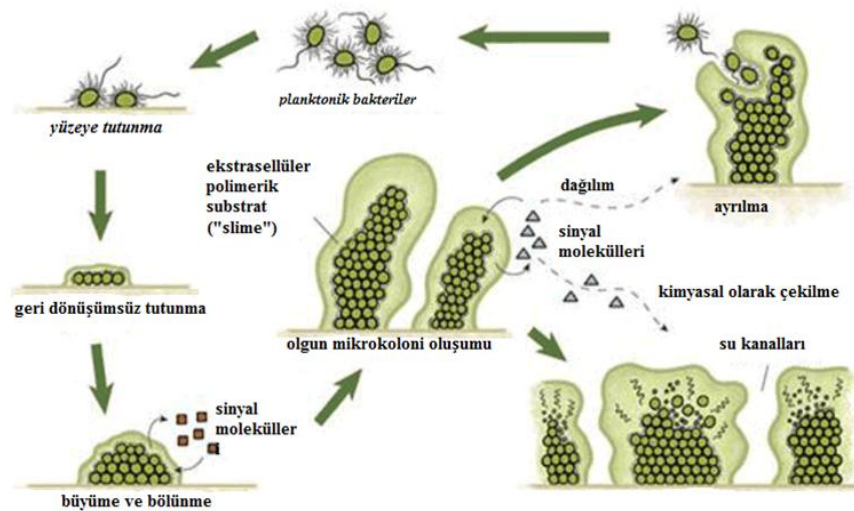
Biyofilm oluşum aşamasının son evresi yüzey kolonizasyonudur. Tutunan bakteriler bu aşamada gelişir ve daha sonra bölünüp çoğalarak biyofilm yapısının en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur (Çiftçi, 2005). Bir bakteri hücresi yüzeyde koloni oluşturduktan sonra (ilk koloni), aynı yüzeyde diğer bakteri grupları da koloni oluşturmaktadır (ikincil koloni). Biyofilm yapısı büyümesiyle, matriksde kapsül oluşturmuş bakterilerde de artış görülür (Poulsen, 1999). EPS ile aynı zamanda diğer planktonik formdaki bakterilerin yakalanması sağlanır.

4. Biyofilm Olgunlaşma

Olgunlaşma evresinde, mikrokoloniler büyüyerek kompleks, mantar ya da kule şeklindeki yapılara dönüşmektedir. Bakteriler, EPS matriksinin çevrelediği mikrokoloniler içerisinde yaşamaktadırlar. Farklı yükseklik ve boyutlarda olan mikrokoloniler arasındaki besin alışverişi ve atıkların uzaklaştırılması su kanalları ile yapılmaktadır (Kumar ve Anand, 1998; Poulsen, 1999).

5. Kopma ya da Ayrılma

Bu aşamada mikrokolonilerin olgunlaşmasıyla, biyofilm tabakasından tek bir bakteri ya da bakteri kümeleri halinde kopmalar meydana gelerek ortama yayılırlar. Bu kısım biyofilm oluşum evresinin bir aşaması olabileceği gibi dış kuvvetlerin etkisiyle de kopmalar meydana gelmektedir (Poulsen, 1999). Koloniden ayrılan bakteri ve bakteri kümeleri başka bir yüzeyde tekrar biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptirler.



Şekil 2.2. Biyofilm oluşum aşamaları (Harrison ve ark., 2005).

2.1.4 Biyofilm Oluşumunun Kontrolü ve Engellenmesi

Biyofilm oluşumunun kontrolü ve engellenmesinde ilk aşama biyofilm oluşmadan gerekli önlemlerin alınmasıdır. Biyofilm oluşturacak yüzeylerde belirli aralıklarla uygun ve etkili bir temizlik işlemiyle mikroorganizmaların tutunabileceği organik maddeler uzaklaştırılmalı ve bunu etkili bir dezenfeksiyon uygulaması izlemelidir (Midelet ve Carpentier, 2004; Simões ve ark., 2006). Bu temizlik aşamasındaki amaç EPS tabakasının parçalanmasıdır. Biyofilmin uzaklaştırılması için temizlik esnasında yüzeye mekanik kuvvet uygulamakta gerekebilmektedir. Biyofilmin oluşacağı ortam şartlarına göre; mekanik işlemler, otomatik fırça veya yüksek basınçla temizlik yapılması, jel temizleyiciler veya düşük basınçla yapılan temizlikten daha etkilidir. Amonyak, formaldehit, deterjan maddeleri, katalize modifiye yüzeyler, elektriksel alanlar, enzimler, ultrason ve yüksek basınçlı temizleme sistemlerinin kullanımı biyofilm oluşumunu engelleme yöntemleri arasında yer almaktadır. Yöntem çeşitlerinin her biri biyofilm oluşumunu sağlayan bakteri türüne, uygulama şekline ve biyofilm oluşacak yüzeye göre değişim göstermektedir (Meyer, 2003).

Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar ile planktonik haldekiler karşılaştırıldığı zaman biyofilm yapısı; antibakteriyel maddelere, gluteraldehit, klorin, monokloramin, peroksijenler, iodin, iodinpolivinil-pirollidon gibi biositlere ve ısıya karşı daha dayanıklı yapıdadırlar (Cloete, 2003).

2.1.4.1 Kimyasal Madde Kullanımı

Biyofilm oluşumunda mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan kimyasal maddelerin EPS matriksine nüfus etmeleri gerekmektedir (Meyer, 2003). Kimyasal uzaklaştırma yönteminde en ucuz yöntem klor ile biyofilm organizmalarını uzaklaştırmaktır. Fakat EPS matriksi klorun mikroorganizmalara ulaşmasını engellemesinden kaynaklı olarak yüksek konsantrasyonda kullanılması gerekmektedir. Planktonik organizmaya göre biyofilm organizmaları kloru karşı 150-3000 kez daha dirençlidir. Ozon, kloru karşı iki kat daha etkili olmasının yanında sistemin ozona dayanıklı bir maddeden yapılması gerekmektedir. Biyofilmin uzaklaştırılmasında kullanılan diğer bir kimyasal dördürlü amonyumlardır. Bu maddeler uzaklaştırmada etkili olurken kopan parçacıkları yüzeyden uzaklaştırmak için yüzeyin basınçlı su ile durulanması gerekmektedir.

2.1.4.2 Enzimler

Spesifik kimyasal moleküller üzerinde katalitik bir aktiviteye sahip olan enzimler, özellikle gıda endüstrisinde biyofilm uzaklaştırılmasında önemli bir yöntemdir. EPS matriksi, heterojenik kompleks yapıya sahip bir moleküldür ve bu kompleks yapıyı bozabilmek için enzimlerin yardımına ihtiyaç vardır (Simoes ve ark., 2010). Biyofilm uzaklaştırılmasında, bakterinin türüne göre enzim etkisinin değişebildiği ve yüzey aktif maddelerle kombinasyon sağlanarak daha kolay uzaklaştırılabildiği gösterilmiştir (Lequette ve ark., 2010). *P. Fluorescens*'in oluşturduğu biyofilm EPS yapısının üzerine amilaz enziminin etkisi az olurken, proteaz enzimiyle kolaylıkla parçalandığı yapılan çalışmalarda gözlenmiştir (Molobela ve ark., 2010). Biyofilm uzaklaştırmasında, polisakkarit hidrolize eden enzimler ile oksidoredüktazların kombinasyonu da önerilmektedir. Biyofilm matriksini polisakkarit hidrolize eden enzimler parçalarken (Johansen ve ark., 1997), oksidoredüktazlar ise bakteriyi öldüren etkiye sahip olduğu için gelişimi engellemektedir.

2.1.4.3 Ultrason

Özellikle gıda endüstrisinde kullanılan ultrason yöntemi, kesme, dondurma, tavlama, sterilizasyon, beyazlatma ve ekstraksiyon aşamalarında kullanılmaktadır (Chemat ve Khan, 2011). Ancak gıda endüstrisinde bu bakteriler sadece ultrasonik yöntemle yok edilemeyebilir. Bundan dolayı diğer yöntemlerle beraber uygulanması tavsiye edilir (Qian ve ark., 1997; Piyasena ve ark., 2003).

Yapılan araştırmalar sonucu ultrasonun antibiyotiklerin biyofilme olan etkisini arttırdığı görülmüştür ve matrikse oksijen difüzyonu sağlayarak biyofilm hücrelerini aktif hale getirerek antibiyotik kullanımı sağlamaktadır (Peterson ve Pitt, 2000).

2.1.4.4 Elektrik Alan

Biyofilm oluşumunu engelleyebilmek için yapılan çalışmalar içerisinde biyoelektrik alan son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalarda; gümüş, karbon ve platin gibi elektrotları kullanarak 200-400 μ A gibi düşük akımla oluşturulan elektriksel alanda, gram negatif ve gram pozitif bakterilerinin planktonik hücreleriyle

birlikte *Candida albicans* gibi biyofilm oluşturan organizmaların hücrelerini de yok ettiği görülmüştür (Davis ve ark., 1991).

2.1.5 Oral Biyofilm

Diş minesini, kök yüzeyleri, dental implantlar ve materyaller gibi katı yüzeyler üzerine yapışarak EPS matriksi içerisinde yaşayan bakteriyel topluluğu oral biyofilm olarak adlandırılmaktadır (Zijng ve ark., 2010). Diş yüzeyinde oral biyofilm olarak oluşan, matriks içerisinde yerleşmiş mikrobiyal orijinli mikroorganizma toplulukları ise 'dental plak' olarak bilinmektedir (Sakaguchi ve Powers, 2012; Şimşek ve Bulut, 2012).

Oral biyofilm, çürüklerinin ve periodontal hastalıkların oluşmasında önemli derece rol oynayan mikrobiyal bir ekosistemdir. Biyofilm sistemlerinden araştırma konusu olarak en çok çalışılan ve önemli dereceye sahip olan bir konu olduğu bilinmektedir. Bu çalışmalar; tıp, endüstri ya da doğa gibi alanlarla ortak kesişim noktaları olup, biyofilmin yapısı, içeriği, mekanizması gibi konular araştırılmıştır (Bowden ve Li, 1997).

Oral biyofilm sisteminin bakteri içeriğinin fazla olmasından dolayı kısmen karışık bir yapıdadır (Davey ve O'toole, 2000; Overman, 2000). Bu sistemdeki mikroorganizmaların EPS leri hem sentez yapabilmeleri hem de yıkabilmeleri ayırt edici özelliği olarak gösterilmektedir. Mikroorganizmalar için bazı önemli besinlerin bağlanması, zararlı ajanlara karşı mikrobiyal hücrelerin korunması ve adezyonun etkili bir şekilde yapılması için EPS nin kimyasal içeriği ve yapısı önemlidir (Socransky ve Haffajee, 2002; Marsh, 2005).

Oral ortamdaki biyofilm sürecinde bakterinin yapışması, gelişimi, uzaklaşması ve tekrar yapışması olayları aynı anda meydana gelir (Marsh, 1995). Ağız içerisinde ve tükürükteki bakteri fazlalığının sebebi diş ve yumuşak dokularda oluşan biyofilmlerden kaynaklandığı söylenmektedir (Socransky ve Haffajee, 2002).

Oral ortamda biyofilm oluşum aşamaları belli bir düzendedir (Marsh ve Nyvad, 2008). Bunlar;

1. Pelikül oluşumu
2. Bakterilerin yapışması (0-4 saat)
3. Yapışmış olan bakterilerin gelişmesi ve farklı mikrokolonilerin oluşumu(4-24 saat)
4. Mikrokolonilerin gelişimi (1-14 saat)

5. Olgun biyofilm oluşumu (2 hafta)

1. Pelikül oluşumu:

Mikroorganizmalar, diş yüzeyine direkt olarak tutunup kolonize olamamaktadır. Diş yüzeyleri tamamen temizlenmişse olsa, kısa sürede glikoproteinler, musinler, alfa amilaz gibi egzo ürünler, bakteri hücre debrisleri, asidik proteinden zengin proteinler ve sialik asitten zengin bir karışım olan aselüler proteinöz yapıda bir madde ile kaplanır. Ve pelikül adını alır. İlk 24 saat içerisinde kolonizasyonun gerçekleşmediği alanlarda pelikül kalınlığı 0,01-1 µm'ye ulaşır (Marsh ve Nyvad, 2008) ve bu yapıya 'kazanılmış pelikül' adı verilir (Onisei ve ark., 2008). Pelikül, çoğunlukla tükürük bileşenlerinden oluşan bir mine örtüsüdür ve asitlere karşı mineyi korumaktadır. Bunun yanında dişler arasındaki sürtünmeyi azaltabilmek, remineralizasyon için matriks sağlamak, mikroorganizmaların yüzeye tutunmasını kolaylaştırmak ve kolonize olmuş bu organizmalar için besin kaynağı durumunda olması pelikülün diğer fonksiyonları arasında yer almaktadır.

2. Bakterilerin yapışması:

Oral bakterinin diş yüzeyine pasif taşınması kısmıdır. Ancak ağız ortamında 700 den fazla bakteri çeşidi bulunmakta fakat her mikroorganizma oral biyofilm oluşturamamaktadır. Bazıları belirli özel şartlarla oral biyofilm oluşturamaktadır. Biyofilmin oluşumu, fiziksel ve hücrel etkileşimler ile başlamaktadır. Mikrobiyal hücre yüzeyi ve pelikül kaplı diş arasında, zayıf uzun vadeli fizikokimyasal etkileşimler oluşur ve bu etkileşim ile geri dönüşümlü tutunmayı sağlayan net çekimin zayıf olduğu bir bölge oluştururlar (Şimşek ve Bulut, 2012). Bu etkileşim çeşitleri; fiziksel yakınlık, metabolik alışveriş, işaret molekülü aracılı iletişim, genetik materyal alışverişi, koagregasyon (genetik olarak farklı hücre tipleri arasındaki özel hücre-hücre tanımları: adezin-reseptör ilişkisi) şeklinde sıralanabilmektedir (Sakaguchi ve Powers, 2012). Kolonizasyon aşamasının temeli adezin-reseptör mekanizmasına dayanmaktadır (Lamont ve Jenkinson, 2010). Oral ortamda mine veya kök fark etmeksizin, çoğunlukla ilk kolonize olan mikroorganizmaları *S. Sanguis*, *S. Oralis* ve *S. Mitisolan Streptococcus* türleridir (Marsh ve Nyvad, 2008). Yanak ve mukoza yüzeyinde biyofilm oluşuyorsa ilk önce *Leptothrichia buccalis* ve *Streptococcus salivarius* türleri tutunur. Bundan sonra sayı ve bakteri çeşitliliği artmaktadır.

Birincil(erken) kolonizasyon olarak adlandırılan bu aşamada yüzeye tutunan bakteriler mikrokoloniler oluşturmaya başlarlar. Bu safhada oluşan mikrokoloniler saf bakteri kümeleridir. Biyofilmler burada aralıklı olarak oluşan bakteri kolonileri şeklindedir (Marsh, 2005).

3.Yapışan bakterilerin gelişimi ve farklı mikrokolonilerin oluşumuna öncülük etmesi:

Oral biyofilmler içerisindeki mikroorganizmalar adezin ve reseptörler ile moleküler ilişki kurarak güçlü ve türe özgü bir bağlantı kurarlar. Kolonize olan bakteriler gelişirler ve ortam şartlarını diğer bakteriler için uygun hale getirirler(Erdem, 2006).

İkincil (geç) kolonizasyon olarak geçen bu aşama içerisinde adezin-reseptör sistemine benzer bağlanma oluşmaktadır. Bu aşamada olan bağlanma şekli; genetik olarak farklı olan bakterilerin birbirini tanımamasını, hücreler arası iletişimi ve yapışmasını sağlamaktadır ve ‘koagregasyon’ olarak adlandırılmaktadır (Hajishengallis ve Michalek, 1999; Davey ve O’toole, 2000; Donlan ve Costerton, 2002; Marsh, 2005).

4. Mikrobiyal yığılım ve koagregasyonla farklı mikrokoloni türlerinin gelişimine öncülük etmesi ve olgun biyofilm oluşumu:

Oral biyofilmin gelişmesi ve olgunlaşması koagregasyon iletişim yöntemine dayanmaktadır. Bakteri kümeleri kalınlaşan adezin tabakasının içerisine girer ve adezin tabakası örtü gibi bakterileri kuşatır. Bu aşama, bakteriyel bölünmenin en fazla olduğu kısımdır (Donlan ve Costerton, 2002).

Hücreler bölünerek dış yüzeyinde dikey uzanan koloniler meydana getirirler. Oral biyofilm tabakasının genişleme aşamasında, tükürükten adsorbe edilen serbest haldeki mikroorganizmalar bakteriyel atıkların çoğalmasına katkıda bulunmaktadırlar. Mikroorganizmalar yüzey tabakada diğer türlerle koagre olur. Bundan dolayı küresel mikroorganizmalar flamantöz bakterilerin üzerinde birikerek mısır koçanı ‘corn-cob’ şeklinde bir görüntü kümesi oluştururlar (Marsh ve Nyvad, 2008).

Kolonizasyon oluşumu devam ettikçe bakteriler saldıkları ekzoenzim ve aracı maddeler ile birbirlerinin bölünmesini sağlarlar. Aynı zamanda da yeni adezin sentezleyerek etraflarını matriks ile sararlar. Bütün bakteri kümelerinin orta kısmında ve içerisindeki bakterileri besleyebilmek için adezin matriks üzerinde su kanalları oluşur. Bu kanallar, bakteri kümeleri arasında su ve besin sirkülasyonu yapmak için gereklidir (Donlan ve Costerton, 2002). Kanallar biyofilmin önemli bir parçası olup yapıya katkısı

oldukça büyüktür. Oral biyofilm yapısına sürekli dışarıdan yeni bakteriler eklenirken, ölen bakteriler ise diğer bakteriler tarafından besin kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bakteri eklenmesiyle ve çoğalmasıyla biyofilm tabakası zamanla kalınlaşır. Biyofilm yapısı aslında; simbiyotik, kendiliğinden organize olmuş bir bakteri dokusudur (Davey ve O'toole, 2000). Olgunlaşma evresi, zarara uğramazsa 2-3 hafta içerisinde meydana gelmektedir. Kalınlığı 50-100 µm' ye ulaşmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002).

2.1.5.1 Oral Biyofilmin Oluşumuna Etki Eden Faktörler

➤ Yüzey alanının durumu:

Araştırmalar sonucu, oral biyofilmin oluşması sırasında mikroorganizmalar ilk olarak diş minesi üzerindeki çatlak, oyuk vb. alanlara tutunduğu görülmüştür. Görülen bu özellikten dolayı da biyofilm oluşumunda yüzey yapısının önemi büyüktür. Bunun yanında yüzey alanının enerjisi de oluşumda önemli rol oynar. Yüzeyin pürüzlü olduğu noktalarda enerjinin fazla olmasından dolayı biyofilm oluşumu daha kolaydır (Shahal ve ark., 1998; Carlen ve ark., 2001; Auschill ve ark., 2002).

➤ Besin faktörleri:

Biyofilm oluşumu için sakkaroz gerekli besin kaynağıdır. Bu madde farklı bakteri türleri için farklı görevler yerine getirmektedir. Örneğin; substrat oluşturarak *Streptococcal* glikoziltransferaz (GTF) için çözünebilen ve çözünemeyen glukozların oluşumu sağlanırken, *Veillonella* türü için sentezlenmesiyle birlikte laktik asit kaynağı olmaktadır. Bunların yanında ortamda fazla miktarda bulunmasıyla ortam pH'sını düşürmekte ve sınırlı oranda bulunduğu zaman da enerji kaynağı olarak bulunmaktadır (Bowden ve Li, 1997). Besin olarak diğer mono-di-polisakkaritler de gelişim için besin kaynağı olabilmektedir (Marsh ve Nyvad, 2008).

Sakkaroz, matrik yapısını daha pürüzlü hale getirdiğinden dolayı çürüğe neden karbonhidratların başında yer almaktadır. Bunlarla birlikte sakkaroz yüksek konsantrasyonda bulunduğu ortamlarda, oral biyofilm yapısının kalsiyum, fosfor ve florid gibi iyonların konsantrasyonlarının az olduğu belirlenmiştir. Oral ortam pH'sını değiştirebilen sakkaroz, *S. Mutans* türünün çoğalmasına sebep olmaktadır (Leme ve ark., 2006).

➤ Tükürük:

Oral biyofilmin oluşumda en önemli faktörlerden biride tükürüktür (Rudney, 2000; Al-Ahmad ve ark., 2007). Tükürük, içerisinde bulunan proteinlerden kaynaklı

olarak ağız içerisindeki tüm alanlarda biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu sayede oluşan pelikül üzerinde, mikroorganizmaların tutunabilmesi için pozitif bir seleksiyon oluşmaktadır. Planktonik durumda olan farklı türler arasında ise koagregasyon oluşturmaktadır (Rudney, 2000).

Yapılan çalışmalarda; bakterinin cinsine göre tükürük, proteinleri sayesinde bakterinin yüzeye tutunmasını kolaylaştırabildiği gibi engellendiği de görülmüştür (Steinberg ve ark., 1999). Tükürük içerisinde bakteri oranının kritik noktaya geldiğinin iletimini yapan kimyasal haberciler bulunmaktadır. Bu haberi alan bakteriler üremeye başlayarak biyofilm kalınlaşmasını sağlamaktadır. Biyofilm kalınlaşarak antimikrobiyal etkilere karşı direnç kazanmaktadır (Rudney, 2000). Ayrıca tükürük; bakteri yoğunluğunun kritik noktaya geldiğinin anlaşılmasını sağlayan kimyasal haberciler taşımaktadır. Kritik noktaya geldiği anlaşıldıktan sonra üreme başlamakta ve biyofilm kalınlaşarak antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli bir hal almaktadır (Rudney, 2000).

2.1.6 *Staphylococcus Aureus*

Staphylococcus aureus mikroskop altında incelendiğinde kısa zincirli, çift ve üzüm gibi salkım halinde olduğu gözlenmiştir. Bu hücreler 0,7-1,2 µm boyunda, hareketsiz ve sporsuz kok şeklinde gram pozitif bakterisidir (Mutlu ve ark., 1999). Üremeleri esnasında birbirlerinden ayrılmayarak düzensiz kümeler meydana getirmelerinden dolayı bakterilere *aureus* şekilde isim verilerek adlandırılmıştır (Bilgehan, 1995). Patojenler arasında yer alan stafilokoklar insan için; deri, yumuşak doku ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır (Mahon ve ark., 2014). Bu enfeksiyonlarda en çok karşımıza çıkan tür *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)'dur ve bakterinin sınıflandırılması Tablo 1'de gösterilmiştir (Torun ve Kiraz, 2011).

Tablo 1. *Staphylococcus aureus* sınıflandırılması.

Sınıflandırma	Bakteri
Alem	<i>Eubacteria</i>
Bölüm	<i>Firmicutes</i>
Sınıf	<i>Bacilli</i>
Takım	<i>Bacilliales</i>
Aile	<i>Staphylococcaceae</i>
Cins	<i>Staphylococcus</i>

Staphylococcus aureus kapsülleri polisakkarit yapıdadır. Bu yapı bakterileri fagositoz gibi etkenlerden korurken, dokulara, katetelere ve diğer sentetik materyallere

karşıda tutunma özelliklerini attırır. Bakterinin bütünlüğünü koruyan çoklu tabakalardan oluşan hücre duvarı bulunmaktadır. Hücre duvarlarının yapısı; peptidoglikan, reseptörler ve yüzey proteinlerinden oluşmaktadır. Peptidoglikan (mukopeptid, mürein) tabakası; gözyaşı, tükürük, insan monosit ve makrofajlarında bulunan lizozime (muramidaz) karşı direnç sağlamaktadır (Bilgehan, 1995). Bakteri yüzeyinde bulunan proteinler, bakterinin konak hücrelerine tutunmasını sağlarlar. Bu yüzey proteinleri; protein A, koagülaz, elastin, kümelenme faktörü, kollajen bağlayan proteinler ve fibronektin bağlayan proteinlerdir (Novick, 2000).

Ekstrasellüler patojenik bir bakteri olan *S.aureus*, biyofilm oluşum aşaması iki basamakta gerçekleşmektedir. İlk basamak yüzeye tutunmadır. Bu aşamada; ekzopolisakkarit yapılar ile bakteriler birbirine ve hücre dışı yüzeylere kuvvetli bir şekilde tutunur. İkinci aşamada; oluşan polisakkarit yapısı içerisinde mikrokoloni oluşumu ile kolonizasyon meydana gelmektedir. Biyofilmin üst tabakasından kopan hücreler, yeni mikroorganizmalarda biyofilm oluşturabilir (Vancreaynest ve ark., 2004;Patti ve ark., 1994; Foster ve Höök, 1998; Cramton ve ark., 1999; Jefferson, 2004).

2.2. Hidroksiapatit

2.2.1 Genel Özellikleri ve Yapısı

Biyomalzemeler; doğal ya da sentetik malzemeler olup vücuttaki canlı dokuların fonksiyonlarını yerine getirmek ve desteklemek amacıyla kullanılan malzemelerdir. Bunlar sürekli veya belli aralıklarla vücut akışkanlarıyla temas etmektedirler (Pasinli, 2004). En önemli özellikleri yapısal ve yüzey biyouyumluluklarıdır. Yapısal uyumluluk, biyomalzemelerin vücut dokularının mekanik davranışına sağladığı optimum uyumdur. Yüzey uyumluluk ise, malzemenin vücut dokularıyla fiziksel, kimyasal ve biyolojik olarak uygun olmasıdır (Wintermantel ve ark., 1996).

Hidroksiapatit (HA), biyouyumluluğu çok yüksek olup biyoseramik malzemeler arasında önemli bir yeri vardır. Yapısı kalsiyum fosfat içeren, formüle edilmiş hali $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ olan hidroksiapatitler kemik dokusunun inorganik yapısına benzer yapısıyla sert dokularla doğrudan kimyasal bağ kurabilmektedir. Kimyasal açıdan benzerliklerinden dolayı kemik ve diş gibi sert dokuların içerisinde toz haliyle dolgu maddesi olarak kullanılırken, sinterleşmiş haliyle de vücuda yerleştirilen

metal implantların kaplanmasında kullanılabilir (Mostafa, 2005; Pasinli ve Aksoy, 2010).

Yapısından dolayı tıp ve dişçilik gibi sağlık alanlarında sıklıkla kullanılan biyoseramik bir malzemedir. Kemik görevini alabilmek amacıyla protez yapımında, çatlak ve kırık kemiklerin onarım aşamasında ve metalik biyomalzemelerin kaplanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Pasinli ve Aksoy, 2010).

Saflık oranı yüzde yüzü bulan HA'in vücut içerisinde, diğer kalsiyum fosfat türevlerine göre en az çözünürlüğe, en yüksek dayanıma ve en kararlı yapıya sahip olan madde olduğu belirlenmiştir (37°C, pH >4,2). Kalsiyum fosfat seramikleri vücutta belli oranda emilime uğramaktadırlar. Bu emilim 3 faktöre bağlı olarak değişmektedir.

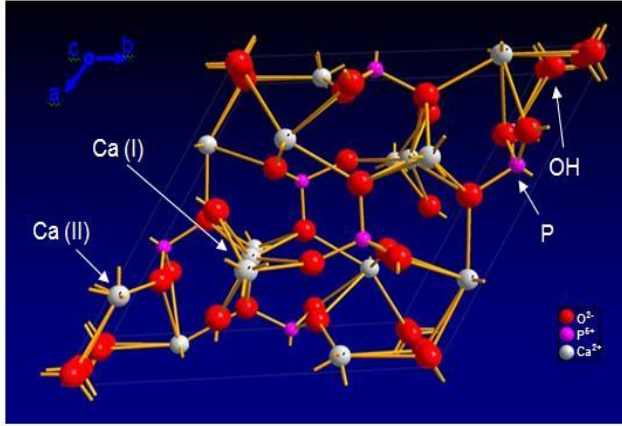
1. Çözünürlük katsayısı ve pH (fizikokimyasal çözünürlük): Bu durum yeni kalsiyum fosfat türevlerinin oluşumuna neden olabilmektedir.
2. Biyolojik faktörler: Vücudun kendini savunma mekanizması tarafından yabancı parçacıkların etkisiz hale getirilmek amacıyla partikülün bozulmasıdır.
3. Dış etkiler: Sınır noktasına ulaşan malzeme dış etkilere dolayı fiziksel parçalanma yaşar (Hasret, 2010).

Hidroksiapatit yılda %5-10 emilim hızıyla düşük bozunmaya sahiptir. Kalsiyum fosfat türevleriyle karşılaştıracak olursak; Amorf kalsiyum fosfat(ACP, $Ca_3(PO_4)_2 \cdot xH_2O$) > Trikalsiyum fosfat(TCP) > α -trikalsiyum fosfat > β -trikalsiyum fosfat >> hidroksiapatit (\rightarrow Artan bozunma hızı) şeklinde sıralanmaktadır (Corbridge, 1990; Hench ve Wilson, 1993; Park ve Bronzino, 2002).

HA yüksek sıcaklığa (900-1200°C) maruz bırakıldığı zaman yapısındaki Ca/P mol oranına bozunmaya uğramaktadır. Sinterleşme sıcaklığının üzerinde; Ca/P oranı 1,67 olan HA'in stokiyometrisinde hafif sapmalarda olsa başka kalsiyum fosfat türevlerinin (alfa, beta, trikalsiyum fosfat, tetrakalsiyum fosfat) oluşmasına neden olabilmektedir. Malzemenin çözünürlüğü, stokiyometrisi ve asitliği arasındaki ilişkiler değişebilmektedir. HA'in çözünürlüğünün artması, Ca/P mol oranının düşmesinden ve HA'in bulunduğu ortamın asitliğinin artmasından kaynaklanmaktadır. Mol oranının 1,67'ye yaklaşmasıyla HA'in çözünürlüğünün azaldığı tespit edilmiştir (Orlovskii ve ark., 2002; Safronova ve ark., 2007).

HA, genel olarak hegzagonal kristal yapısı ve mekanik özellikleri Şekil 2.3'de gösterilmiştir (Bronzino, 2000). İdeal Ca/P oranı 10/6 ve hesaplanan yoğunluğu 3,16 g/cm³ olarak verilmektedir (Park, 1992). Mekanik dayanım, parçacık boyutuna (Mostafa,

2005) ve büyük oranda sinterleşme sıcaklığına (Yang ve ark., 2004) bağlıdır. HA yapısının bozulmasıyla mekanik dayanım büyük ölçüde azaldığı görülmüştür (Yang ve ark., 2004).



Elastisite modülü (GPa)	4,0–117
Bası mukavemeti (MPa)	294
Eğilme mukavemeti (MPa)	147
Sertlik (Vickers, GPa)	3,43
Poisson oranı	0,27
Yoğunluk (teorik, g/cm³)	3,16

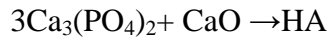
Şekil 2.3. Hidroksiapatitin kristal yapısı ve mekanik özellikleri.

HA gözenekli bir yapıya sahiptir. Bu gözenek yapısı sayesinde hücrelerin, gözeneklerin içerisine doğru nüfus edip büyümesiyle dokuların biyomalzemeye tutunması sağlanır. Aynı zamanda bu gözenekler sayesinde önemli vücut sıvılarının ve kanın kemik yapıya ulaşımı sağlanır (Pasinli ve Aksoy, 2010). Bundan dolayı içinde kemik büyümesi istenilen durumlarda HA tercih edilmektedir.

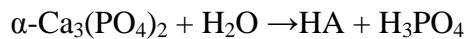
2.2.2 HA'tin Üretim Yöntemleri

HA sentezi ilk olarak kimyasal çöktürme yöntemiyle yapılmıştır (Hayek ve Newsly, 1963). HA sentezinde çöktürme yönteminin yanında katı hal, sol-jel, emülsiyon, sprej-piroliz, hidrotermal sentez ve mekano kimyasal yöntem gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Bazı HA sentez reaksiyonları aşağıda verilmiştir (Evcin ve ark., 2009).

Katı hal sentez reaksiyonu;



Hidroliz sentez reaksiyonu;



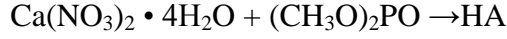
Çökeltme sentez reaksiyonu;



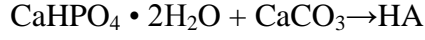
Hidrotermal sentez reaksiyonu;



Sol-jel sentez reaksiyonu;



Mekano kimyasal sentez reaksiyonu;



Her sentez yönteminin kendine göre avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Bunların arasından kimyasal çöktürme yöntemi; işlem kolaylığı, düşük sıcaklık, basit ekipmanla ve istenilen stokiyometrik oranda saf ürün eldesi gibi avantajlarından dolayı en önde yer almaktadır (Kong ve ark., 2002; Kumta ve ark., 2005).

HA üretim yöntemi; biyomalzemenin kullanım alanına göre yani, malzemenin sert doku değişimi veya doku ve protezlerin birleştirilmesinde kullanılacak olmasına göre farklılık göstermektedir.

2.3. Brokoli (*Brassica Oleracea*)

Brokoli (*Brassica oleracea*) bitkisi, turpgiller (*Brassicaceae*) familyasından gelen bir bitkidir. Olgunlaşmamış yeşil renkli çiçek taslakları için yetiştirilmektedir. Tüketilen kısımları çiçek taslakları ve kalın, etli çiçek saplarıdır. Morfolojik yapısı karnabahara benzemektedir (Vural ve ark., 2000). *Brassicaceae* familyasından gelen sebze türleri dünya çapında tüketimi fazla olup, insanların beslenmesinde önemli bir yere sahiptirler (Ferrerres ve ark., 2005). Brokoli bitkisinin ana vatanı tam olarak bilinmemekle birlikte, Akdeniz bölgesi olarak kaynaklar arasında yer almaktadır. Brokoli ismi Latince’de “kol” anlamına gelen brachium kelimesinden (İtalyancası braccio) türetilmiştir. Brokoli çeşitlerinde, yeşil renkli olgunlaşmamış çiçek taslaklarına “calabrese” adı verilmektedir. İtalya’da yer alan bir bölgenin adı olmasından dolayı, anavatanının İtalya olduğunu düşünülmektedir (Vural ve ark., 2000). Ülkemizde üretimi çok az yapılmaktadır.

Brassicaceae familya grubunda yaygın olarak yetiştirilen sebze çeşitleri; brokoli, karnabahar, lahanası, brüksel lahanası, kanola, hardal, turp bu grup içerisinde yer almaktadır. Bu familya grubundaki sebze çeşitleri zengin fitokimyasal besin kaynaklarıdır. Fenoller, antioksidanları, glukosinolatları ve temel besin mineralleri açısından oldukça zengin yapıya sahiptirler (Moreno ve ark., 2006). Çiğ veya haşlanmış tüketilen brokoli bitkisinin, haşlanmasıyla suya geçen vitaminlerinden dolayı suyu dökülmeyip değerlendirilmelidir. Düşük kaloriye sahip besleyici grup olan brokoli,

diyet menülerinde yerini almaktadır. Çiğ brokoli(*Brassica oleracea*) bitkisinin içerdiği besin değerleri Tablo2.2'deki gibidir (USDA: United States Department of Agriculture). Araştırmalar sonucunda brokoli bitkisinin yüksek miktarda selenyum içerdiği de bulunmuştur (Abdulah ve ark., 2009).

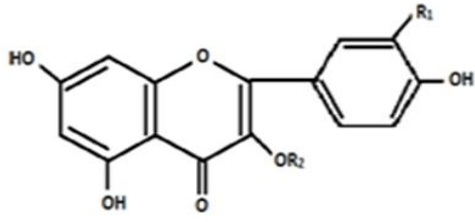
Tablo 2.2. Çiğ brokoli bitkisinin besin değerleri(USDA).

Karbonhidrat	6,64 g	B6 vitamini	0,175 mg (%13)
Şeker	1,7 g	Folik asit (Vit. B9)	63 µg (%16)
Lif	2,6 g	C vitamini	89,2 mg (%149)
Yağ	0,37 g	E vitamini	0,78 mg (%5)
Protein	2,82 g	K vitamini	101,6 µg (%97)
Su	89,30 g	Kalsiyum	47 mg (%5)
A vitamini	31 µg (%3)	Demir	0,73 mg (%6)
Karoten	361 µg (%3)	Magnezyum	21 mg (%6)
Tiyamin (Vit. B1)	0,071 mg (%5)	Fosfor	66 mg (%9)
Riboflavin (Vit. B2)	0,117 mg (%8)	Potasyum	316 mg (%7)
Niyasin (Vit. B3)	0,639 mg (%4)	Çinko	0,41 mg (%4)
Pantotenik asit (Vit. B5)	0,573 mg (%11)		

2.3.1 Brokolinin İnsan Sağlığına Etkisi

Brassicaceae familyasında bulunan sebzelerin; insan sağlığında kansere karşı koruduğu, özellikle kardiyovasküler ve gastrointestinal sistemde mevcut kanser riskini azaltıcı yönde etkili olduğu bilinmektedir (Lin ve ark., 2009). Brokoli (*Brassica oleracea*) bitkisi yapısında sülforafen maddesini de içerdiği, bundan dolayı kansere karşı koruyucu etkisinin var olduğu bulunmuştur. Taze brokoli içerisinde 0,8-1,6 mg/kg kadar sülforafen olduğu bildirilmiştir (Hanlon ve ark., 2008). Brokoli bitkisinin tüketilmesi ile akciğer, kolon(kalın bağırsak) ve prostat kanserine yakalanma riskinin azaldığı görülmüştür. Kanserin yanında kalp hastalıklarına, kalp krizi geçirme ve katarakt gibi problemleri en aza indirgemede yardımcı olmuştur. Ayrıca yüksek oranda demir ve folik asit içerdiğinden kansızlığa karşıda etkisi bulunmaktadır. Brokolinin, iyot emilimini azaltmasından dolayı tüketen kişilerin iyotlu tuz almayı ihmal etmemeleri gerekmektedir (Bekki, 2010). Yapılan biyolojik çalışmalar sonucunda; *Brassicaceae* familyasına ait sebze gruplarının içerisinde bulunan flavonoidler, glukosinolatlar ve bazı fenolik bileşiklerin antioksidan ve serbest radikalleri yok edici özellikleri olduğu gözlemlenmiştir (Vallejo ve ark., 2002; Ambrosone ve ark., 2004; Lin ve Harnly, 2009; López-Berenguer ve ark., 2009). Brokoli çiçeklerinde iki ana flavonol glikosidin olan kuarsetin 3-O-soforizid ve kaempferol 3-O-soforozid içerdiği bulunmuştur (Price ve

ark., 1998). Brokoli (*Brassica oleracea*) bitkisinde bulunan flavonol glikosidlerin moleküler yapıları Şekil 2.4'teki gibidir.



Bileşik	R ₁	R ₂
Kuarsetin 3-O-soforozid	-OH	-soforoz
Kaempferol 3-O- soforozid	-H	-sophorose
Isokuarsetin	-OH	-glukoz
Kaempferol 3-O-glukozid	-H	-glukoz

Şekil 2.4.Flavonol glikosidlerin moleküler yapıları.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar ve kullanım amaçları.

Cihazlar	Kullanım amaçları
Analitik terazi / ANT marka	Tartımlar 0,0001 g duyarlıdaki analitik terazide yapılmıştır.
pH Metre / Thermo Scientific Orion 2 Star	HA sentezi için gerekli olan çözeltilerin pH ayarlanması yapılmıştır.
Manyetik Karıştırıcı/ Wisester MHS-200	HA elde edilmesi için hazırlanan çözeltilerin homojen halde karıştırılması için kullanılmıştır.
Etüv / Binder	HA maddesinin kurutulması için kullanılmıştır.
Mantolu Isıtıcı /Trade Raypa	Brokoli ekstralarının hazırlanması için kullanılmıştır.
Rotarevaporatör/ Heidolph Laborato 4001	Brokoli ekstralarından çözücü uzaklaştırılması için kullanılmıştır.
Liyofilizatör / Labronco	Brokoli ekstralarını kurutmak amacıyla kullanılmıştır.
HPLC / Shimadzu	Brokoli ekstralarının karakterizasyonunda kullanılmıştır.
Buzdolabı / Beko	İlgili çözelti vs. saklamak için kullanılmıştır.
Deiyonize ultra-saf su cihazı / Elga	Saf su elde etmek için kullanılmıştır.
Kül Fırın / Lenton	Elde edilen CaHA disklerini sinterleştirmek amacıyla kullanılmıştır.
Schuett Phoenix	Triptikaz soy broth içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında ayarlama için kullanılır.
Sonikatör / WiseClean	Disk üzerindeki bakterileri çözmek amacıyla kullanılmıştır.
Steril Kabin/ Class II Safety Cabinet	Mikrobiyolojik çalışmalar için gerekli olan steril ortamı sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
İnkübatör /Sanyo	Bakterilerin büyüme ortamını sağlamak için kullanılmıştır.

Çalışma esnasında kullanılan kimyasallar Tablo 3.2’de verilmiştir.

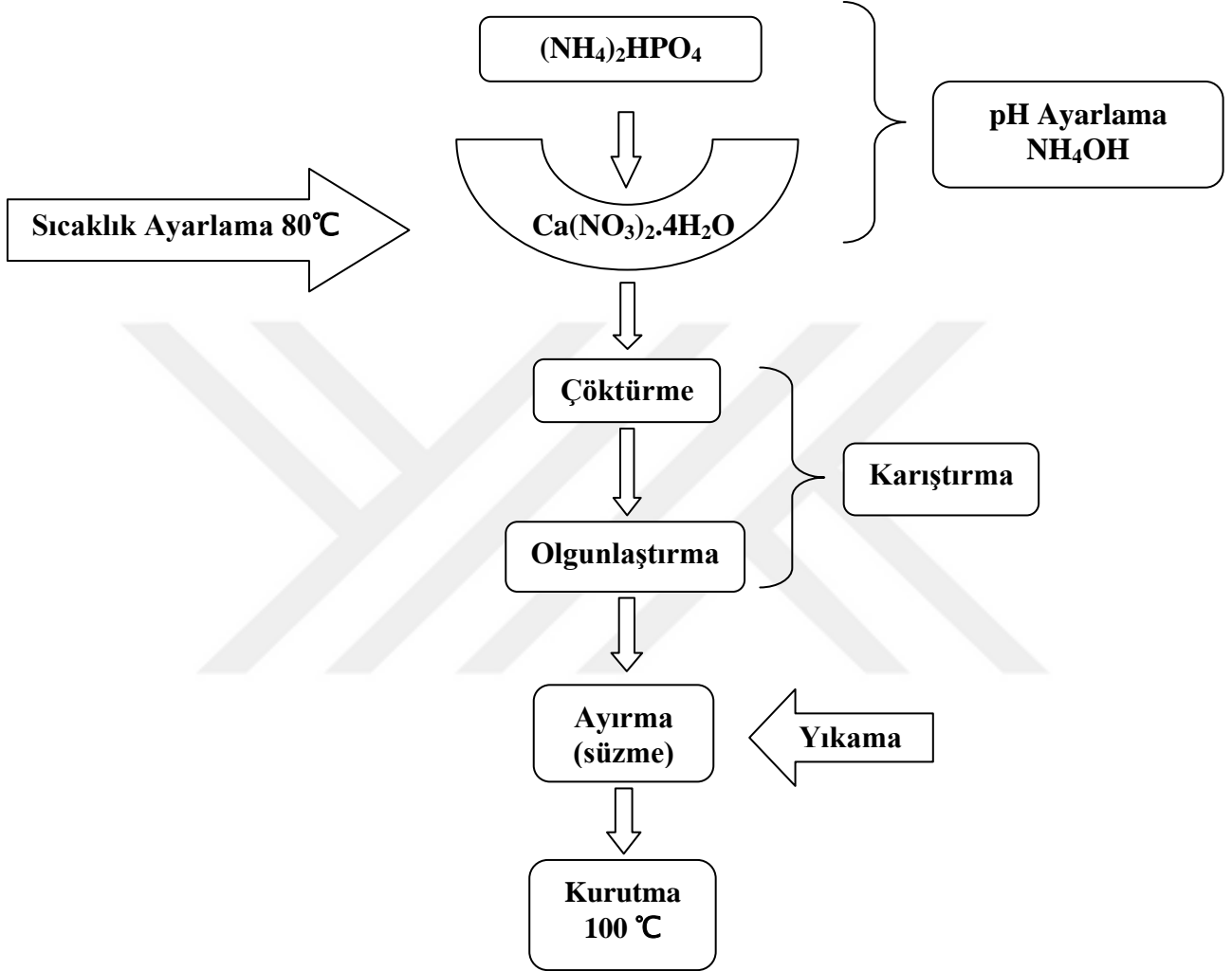
Tablo 3.2. Kullanılan kimyasal maddeler ve temin edildiği yer.

Formül	Temin edilen yer
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	Analar Normapur-VWR-Chemicals
(NH ₄) ₂ HPO ₄	Alfa Aesar
NH ₄ OH	Merck
CH ₃ OH	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
MgCl ₂ .6H ₂ O	Analar Normapur-VWR-Chemicals
CH ₃ COOK	VWR-Chemicals
KCl	Merck
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma-Aldrich
K ₃ PO ₄	Sigma-Aldrich
NaF	Flasher-Chemical
H ₃ PO ₄	Merck

3.2 Biyofilm Oluşumu Aşaması için Yüzey Hazırlama

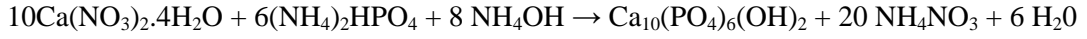
3.2.1 Kalsiyum Hidroksiapatit (CaHA) Sentezi

Kalsiyum hidroksiapatit sentezi için akım şeması Şekil 3.1’de verilmiştir.



Şekil 3.1. CaHA sentezinin akım şeması.

CaHA sentezi için çalışmamızda çöktürme yöntemi kullanılmıştır (Takarroumt ve ark., 2013). Yapılan CaHA sentezi için Ca/P oranı 1,67 olacak şekilde hesaplanarak $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ miktarları belirlenmiş ve çözeltileri hazırlanmıştır. Aynı kaplarda hazırlanan çözeltilerin pH'ı 9 olacak şekilde NH_4OH ile ayarlanır. pH 9'un altında kalsiyum monofosfat, 7'in altında olması halinde kalsiyum dihidrat oluşmaktadır; pH'nın 9 olması bu yüzden önemlidir (Afshar ve ark., 2003). 100 mL $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ çözeltisi, 100 mL $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisine damla damla ilave edilmelidir.



Elde edilen yeni çözelti 24 saat karıştırılarak 80°C altında yaşlandırma aşaması tamamlanır. Olgunlaşma evresini tamamlayan çözelti Buncher huni yardımıyla süzülüp deiyonize su ile yıkanır. Safsızlıkları giderilen CaHA düzenli karıştırma işlemiyle 100°C’de kurutulur. Kurutulan tozlar 700-800°C’de 3-4 saat kalsine edilerek karakterizasyon testleri için hazır hale getirilir.

3.2.2 CaHA Tozlarının Disk Haline Getirilmesi

Bu aşama için 10 mm çapında 1,6 mm kalınlığında CaHA diski oluşturabilecek düzenek Şekil 3.2’deki gibi özel hazırlanmış; iç kısmı çelik diskler ve dışı silindir şeklindeki teflondan yapılmış düzendir. 100°C’de kurutulan CaHA tozundan 0,4 g tartılarak iki çelik disk arasına konularak teflon düzenek üzerine 2500 kg basınç ile sıkıştırılmış ve istenilen boyuttaki CaHA diskler hazırlanmıştır. Hazırlanan diskler 700-800°C’de sinterleştirilmiştir (Kürkçüoğlu ve Sammons, 2010). Sinterleştirilen diskler biyofilm oluşumunda kullanılmak amacıyla petri kabında saklanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2. Disk hazırlamada kullanılan teflon düzenek.



Şekil 3.3. Sinterleştirilmiş CaHA diskleri.

3.2.3 CaHA Tozlarının Karakterizasyonu

Çöktürme yöntemiyle elde edilen CaHA tozlarının XRD, SEM, EDX analizleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezinde yapılmıştır. FT-IR ve partikül boyut analizleri Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde yapılmıştır.

3.3 Brokoli Ekstresinin Hazırlanması

Brokoli ekstralarının eldesi için Soxhlet yöntemi kullanılmıştır. Marketten alınmış brokoli örnekleri önce oda sıcaklığında kurutulup, daha sonra blender ile öğütülerek küçük parçalara ayrılmıştır. Tanecik boyutu küçültülen brokoli parçaları 50 g tartılarak, selüloz kartuş içerisinde Soxhlet aparatına yerleştirilir. Soxhlet ekstraktörü üzerine soğutucu eklenerek hazır hale getirilir. Bitki içerisindeki fenolik ve flavonoid bileşiklerin alınabilmesi için; yuvarlak tabanlı balon içerisine 250 mL metanol konularak balon, Soxhlet aparatı ile birleştirilir. Mantolu ısıtıcıyla uygun sıcaklık ayarlanarak reaksiyon başlatılır ve selüloz kartuş içerisindeki brokoli renksiz oluncaya kadar reaksiyon devam ettirilir (Şekil 3.4). Ekstraksiyon aşamasının bitmesiyle elde edilen madde, rotary evaporatör ile çözücüsü uzaklaştırılarak saf hale getirilir.

Brokoli



22 °C kurutma



Soxhlet yöntemi



Şekil 3.4. Brokoli ekstraksiyon aşamaları.

3.3.1 Brokoli Ekstresinin Karakterizasyonu

Brokoli ekstresinin HPLC ve SEM analizleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezinde yapılmıştır.

3.4 Antimikrobiyal Çalışmalar

Antimikrobiyal ve biyofilm çalışmaları, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus casei* RSHM 900, *Streptococcus mutans* RSHM 676 suşları kullanılmıştır.

3.4.1 Koyun Kanlı Agar

Bu besiyeri hazır olarak Biomerieux (Fransa) firmasından alınmıştır.

İçeriği: 1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül

Kazeinin Pankreatik Dijesti	12,0 g
Hayvan Dokularının Peptik Dijesti	5,0 g
Maya Ekstraktı	3,0 g
Sıvır Eti Ekstraktı	3,0 g
Mısır Nişastası	1,0 g
Sodyum Klorür	5,0 g
Agar	13,5 g
Defibrinleştirilmiş Koyun Kanı	5 %
pH	7,3 ± 0,2

3.4.2 %0,25 glukoz içeren Triptik Soy Broth (TSB)

Toz halinde alınmış olan besiyerine ihtiyaç duyulduğu kadar aşağıda belirtilen oranlarda hazırlanmıştır. Besiyeri hazırlanırken %0,25 glukoz ilave edilerek istenilen besiyeri elde edilmiştir.

İçeriği: 1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül

Kazeinin Pankreatik Dijesti	17,0 g
Soya Fasulyesi Yemeşi Papaik Dijesti	3,0 g
Sodyum Klorür	5,0 g
Dipotasyum Fosfat	2,5 g
Dekstroz	2,5 g

Toz halinde temin edilen TSB besiyeri 36 g/L olacak şekilde distile su içerisinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildi ve 45-50 °C'ye soğuduğunda steril Petri kutularına yaklaşık 12,5'er mL döküldü. Hazırlanmış besiyerinin 25 °C'de pH'ı 7±0,2 olarak ayarlandı.

3.4.3 Oral Ortam Şartlarını Sağlamak İçin Yapay Tükürük Hazırlanması

Çalışma ortamının ağız ortamını yansıtmaları için yapay tükürük hazırlanmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan yapay tükürük formülü (Özkan, 2011).

Kimyasal	Miktar/Litre
NaCl	1,2800 g
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,125 g
KCl	0,095 g
CH ₃ COOK	1,508 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,167 g
K ₃ PO ₄	0,386 g
H ₃ PO ₄	0,05mL
NaF	0,42 g – 4,2 g – 21 g

Tablo 3.5'de verilen kimyasal maddeler, 1 L deiyonize su içerisine sırasıyla katılarak çözdürülür. Ancak CaCl₂.2H₂O ilavesinden önce hazırlanan H₃PO₄ ilave edilerek olası bulanıklık engellenir. Son madde ilavesiyle ortam sıcaklığı 37 °C'ye ve pH 7,4'e ayarlanır (Özkan, 2011).

3.4.4. Brokoli Ekstraktının Duyarlılığının Mikrodilüsyon Yöntemi ile

Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan brokoli ekstresi, bozunma sıcaklığının altındaki uygun şartlarda sterilizasyonu yapıldıktan sonra 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek katı partiküllerden arındırılmıştır.

Mikrodilüsyon yöntemi için U tabanlı 96 kuyucuklu plaklar kullanılmıştır. Brokoli ekstresinin Serum fizyolojik (SF) ile 1/10'dan başlayarak 1/100.000'e kadar dilüsyonları hazırlanmıştır. Plak içerisine sıvı buyyonda 0,5 McFarland değerinde hazırlanan 150 µL bakteri süspansiyonu ilave edilmiş ve bunun üzerine 150 µL TSB besiyeri, 150 µL yapay tükürük sıvısı ve 150 µL brokoli ekstresi eklenmiştir. Plaklar 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra 540 nanometre dalga boyunda optik okuyucuda okunarak değerlendirilmiştir. Her bakteri için bir pozitif ve bir negatif kontrol kullanılmıştır (Tré-Hardy ve ark., 2008).

3.5 Biyofilm Çalışmaları

3.5.1 Tüp Yöntemi

Çalışmada kullanılan bakteriler: *Streptococcus mutans* RSHM 676, *Lactobacillus casei* RSHM 900, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica subsp. Enterica* ATCC 13076'dır.

Bakterilerin, % 0,25 glukoz içeren triptik soy broth besiyesi içerisinde 0,5 McFarland bulanıklık değerinde bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Daha sonra steril haldeki boş tüplere numaralandırma yapılarak içerisine, 500 µL % 25 glikozlu TSB besiyeri, %100'lük 1000 µL brokoli bitki ekstresi ve 500 µL hazırlanan bakteri süspansiyonu ilave edilmiş ve etüv içerisinde 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında tüplerin içeriği boşaltılıp 1 mL % 25'lik safranin ilave edilmiştir. Tüpler kurutma kağıdı üzerine ters çevrilip bekletilmiştir. Tüp yüzeyinde hava ile temas eden kısımda halka şeklinde yapıların oluşması biyofilm oluşturma çalışması için negatif sonuç olarak belirlenirken, tüp yüzeyinde biyofilm yapısının oluşması pozitif sonuç olarak belirlenmiştir (Christensen ve ark., 1985). Tüpün iç çeperinde oluşan rengin koyuluk ve yoğunluğuna göre biyofilm oluşumu zayıf (+) orta (++), kuvvetli

(+++)) olarak pozitif sonuçları verirken, tüp çeperinde herhangi bir tabaka, renk oluşmaması ise negatif (-) olarak değerlendirilir (Demir ve Inanc, 2015).

3.5.2 CaHA Diskler Üzerinde Biyofilm Oluşturma Çalışması

Yapılan tüp deneyi sonuçları kontrol edilerek *Staphylococcus aureus* 25923 bakteri türünün ağız ortamında bulunmasından dolayı CaHA diskler üzerinde biyofilm oluşturup oluşturmaması incelenmeye karar verilmiştir.

Çalışmada Soxhlet yöntemiyle elde edilen brokoli ekstresi önce 0,45 µm'lik filtrelerden geçirilerek içerisindeki partiküllerden arındırılmıştır. Pozitif kontrol, negatif kontrol ve %100, %90, %80 ve %70'lik dilüsyonlar serum fizyolojik ile seyreltilerek hazırlanmıştır. CaHA diskleri steril haldeki 24 kuyucuklu düz tabanlı plaklara yerleştirilmiştir. Daha sonra CaHA diskler üzerine 150 µL brokoli ekstresi ilave edilir. 1 gün boyunca disklerin brokoli çözeltilerini absorplaması için bekletilir (Brokoli ekstresi ile kaplanan disklerde ise 2 saat UV ışığı altında bekletildikten sonra bir sonraki işlemler aynı şekilde devam ettirilir). Sonraki aşamada brokoli emdirilmiş diskler üzerine sırasıyla 150 µL yapay tükürük, TSB besiyeri ve bakteri süspansiyonu ilave edilir (*Staphylococcus aureus* 25923 standart suşu) ve 37°C'de 4 hafta boyunca CaHA diskler üzerinde bakteri tarafından biyofilm oluşup oluşmadığı gözlemlenmiştir (Tablo 3.6) (Şekil 3.5). Bu aşama da kuyucuklar içerisindeki besiyerler 2 günde bir yenilenmektedir. İnkübasyon saati biten diskler üzerindeki biyofilmleri sökebilmek için ultrasonik banyoda 1 dk bekletilmiştir. Bakteri varlığını belirlemek için hazırlanan dilüsyonlardan 0,05 mL alınarak koyun kanlı ağara ekimler yapılmıştır ve 37 °C'lik etüv içerisinde 2 gün boyunca inkübe edilmiştir.

Her haftanın sonunda ilk parti diskler koyun kanlı besiyerine alınarak bakteri üremesini saptamak için, ikinci parti diskler Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezinde yüzey morfolojisindeki değişimleri görebilmek adına SEM analizi için muhafaza edilmiştir (Şekil 3.7).

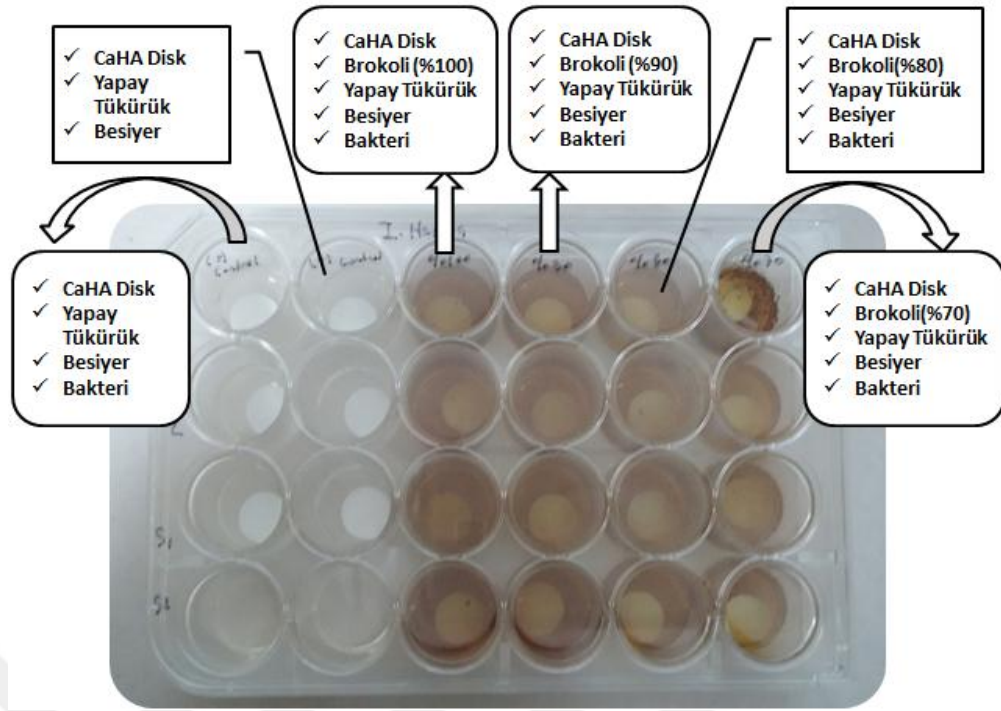
Yapılan konsantrasyon çalışmamız sonucunda brokoli ekstrelerinin konsantrasyona bağlı bir etkisinin olmadığı görülmüştür. CaHA disklerin brokoli ekstresi ile kaplama aşamasında farklı kurutma yöntemleri kullanılarak, CaHA disk üzerinde ekstrenin homojen dağılımını sağlayacak şartlar belirlenmiştir (Şekil 4.17). Bundan sonraki çalışmamızda CaHA disklerin %100'lük brokoli ekstresi ile kaplanarak çalışmamız tekrar edilmiştir (Tablo 3.7) (Şekil 3.6).

3.5.2.1 CaHA Diskler Üzerine Brokoli Ekstresinin Kaplanması

Disklerin homojen bir şekilde brokoli ekstresi ile kaplanabilmesi için oda sıcaklığında emdirerek kurutma, oda sıcaklığında emdirerek liyofizatörde kurutma ve oda sıcaklığında döndürerek kaplama yapılarak (spin coating) farklı kurutma ortamlarında kurutma şeklinde farklı yöntemler denenmiştir. Diske emdirme işlemlerinde 150 µL brokoli ekstresi kullanılmıştır.

Tablo 3.6. Antimikrobiyal konsantrasyon çalışması.

	(+) kontrol	(-) kontrol	%100	%90	%80	%70
1.hafta	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri
2.hafta	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri
3.hafta	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri
4.hafta	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükrük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükrük Besiyer Bakteri



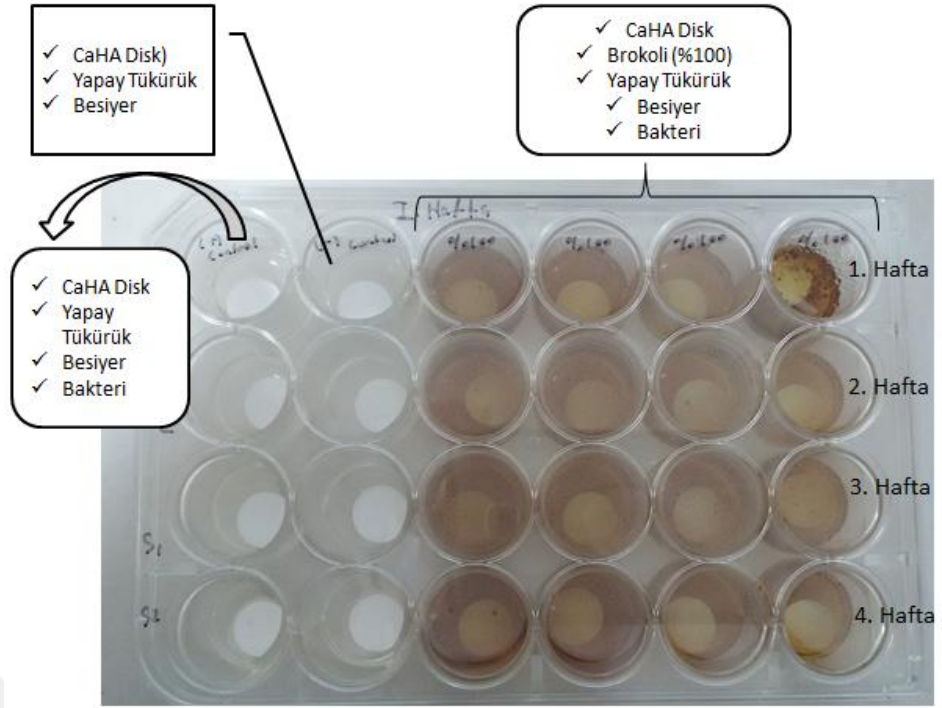
Şekil 3.5. Antimikrobiyal konsantrasyon çalışmasının fotoğraf görüntüsü.

Tablo 3.7. Antimikrobiyal etkinlik çalışmaları.

	(+) kontrol	(-) kontrol	%100	(+) kontrol	(-) kontrol	%100
1.hafta	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	+	-	% 100
2.hafta	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	+	-	% 100
3.hafta	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	+	-	% 100
4.hafta	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	CaHA Disk Yapay Tükürük Besiyer	CaHA Disk Brokoli Ekstresi Yapay Tükürük Besiyer Bakteri	+	-	% 100

Mikrobiyolojik Test

SEM Analizi



Şekil 3.6. Antimikrobiyal etkinlik çalışmasının fotoğraf görüntüsü.

Mikrobiyal test için ayrılan diskler koyun kanlı agar üzerine yerleştirilerek 37 °C’de 2 gün inkübe edilir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Disklerin koyun kanlı agar çalışmasının fotoğraf görüntüsü.

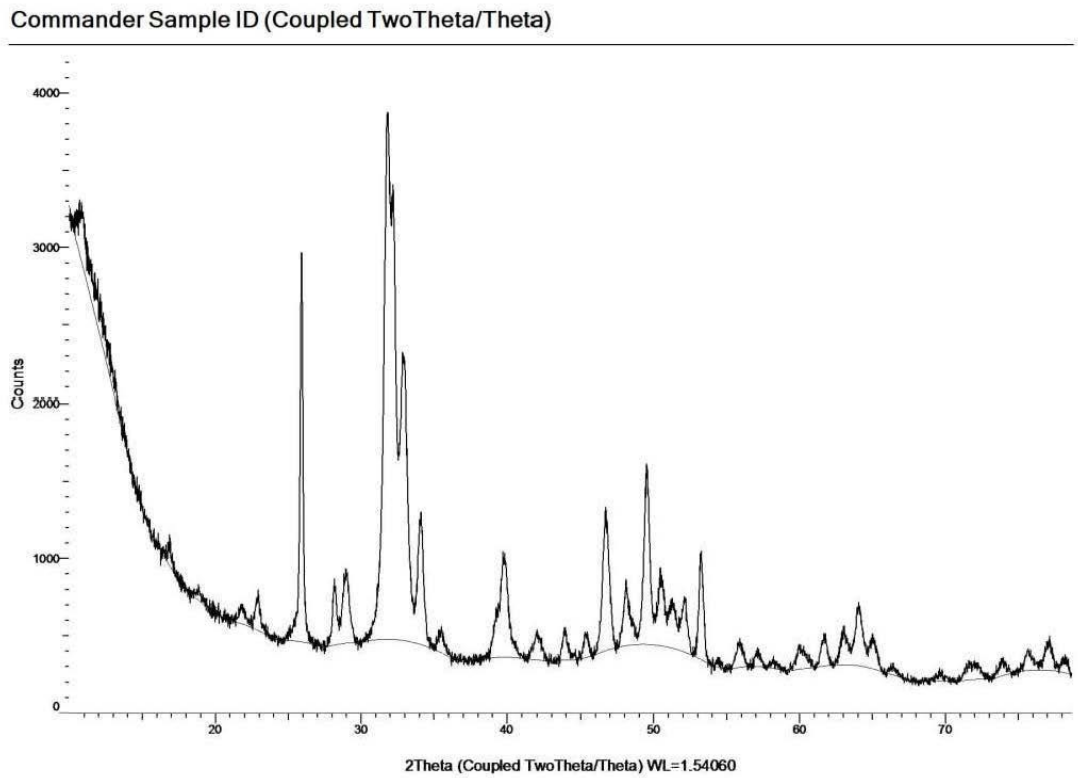
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1 CaHA Tozlarının Karakterizasyonu

4.1.1 CaHA Tozlarının XRD Analiz Sonucu

XRD analizi Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezinde Bruker D8 Advance X-Işını Kırınım Cihazı ile yapılmıştır.

Şekil 3.1'deki akım şemasına göre optimum koşullarda sentezlenen ve 800°C'de sinterleştirilen (Kalsine) CaHA, daha sonra XRD analizine tabii tutularak oluşan fazlar belirlenmiştir. CaHA'nın kristal yapısını gösteren XRD analiz sonucu Şekil 4.1'de verilmiştir.



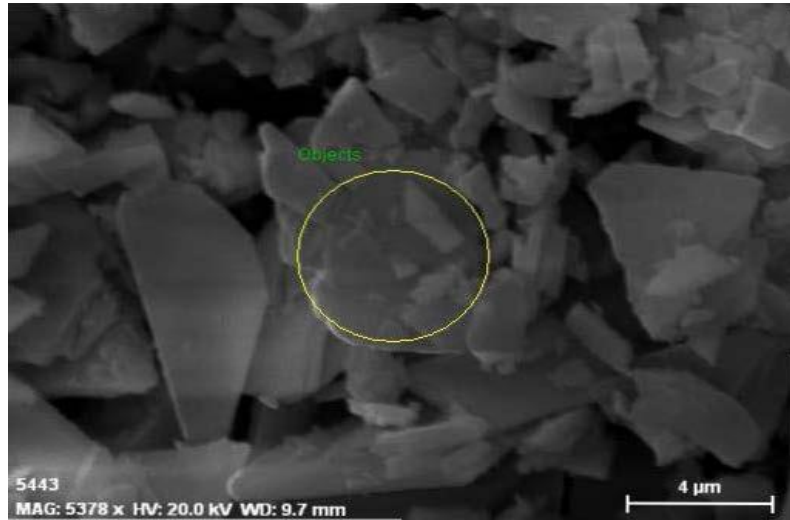
Şekil 4.1. Çöktürme yöntemiyle elde edilmiş CaHA'nın XRD sonucu.

Kalsinasyon sıcaklığı ve kullanılan kimyasal maddeler CaHA tozlarının oluşumunda büyük önem taşımaktadırlar. CaHA tozlarının pik genişliğinin dar olması kristalize derecesinin artmış olduğunu, spektrumların yüksekliğinin düşük ve çok geniş bir tepe halinde olması maddenin tane boyutlarının çok ufak olduğunu göstermektedir

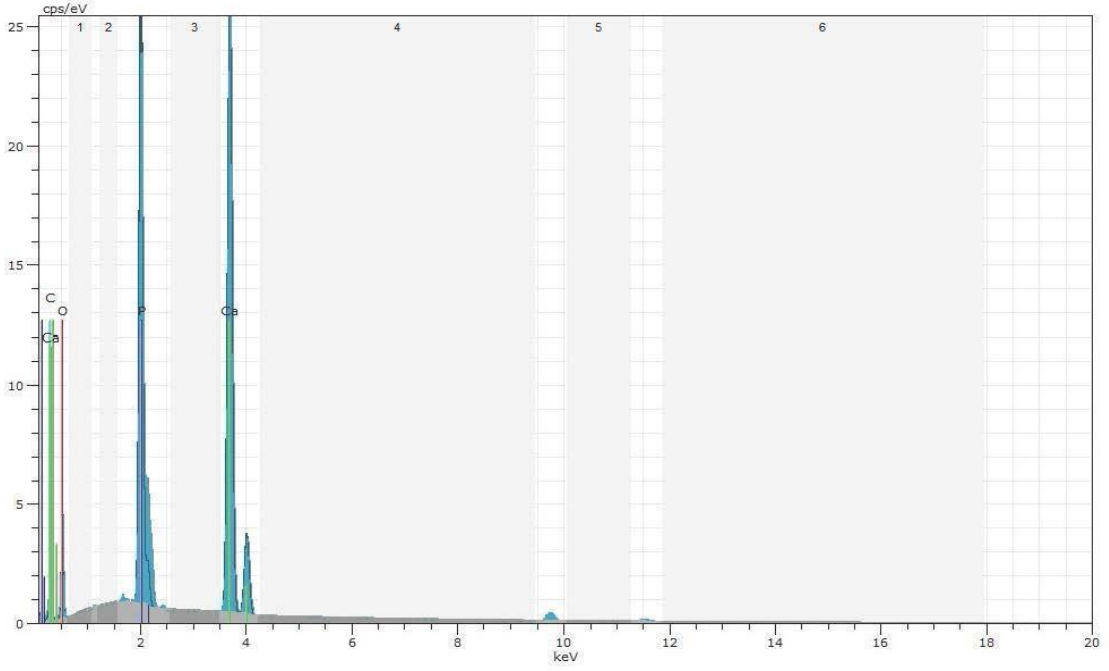
(Şekil 4.1) (İpekoğlu, 2004). Ergün ve arkadaşlarının (Ergün ve ark., 2015) 2015 yılında 800 °C’de yaptığı çalışmada istenmeyen CaO oluşumu meydana gelirken, bizim çalışmamızda bu olumsuz sonuçla karşılaşılmamıştır. Sinterleşen CaHA’ in XRD analizinde; 20° ile 80° arasında alınan ölçümler sonucunda 32’ de alınan pikin (112) yönelimine sahip olduğu görülmüştür. Sinterleşen CaHA kristal yapısının hegzagonal yapıya sahip olduğunun ispatıdır. Analizlerde hidrate olmamış kalsiyum fosfat fazı gözlemlenmemiştir. Analizdeki tüm pikler stokiometrik CaHA’i işaret etmektedir. Kimyasal çöktürme yöntemi ile elde edilen CaHA tozların pik yükseklikleri nispeten yüksek olması kristalinitenin yüksek olduğunu göstermektedir. Sentezlenen CaHA’ in kristalinite değerinin yüksek olması Ca kaynağı olarak kullanılan başlangıç malzemelerinin su içerisinde daha kolay çözünmesi PO_4^{-3} iyonları ile kolayca reaksiyona girerek HA kristallerini oluşturmasıdır. CaHA tozlarının pik genişliğinin geniş olması CaHA toz kristalize derecesinin azaldığını göstermektedir. Piklerin geniş olması tozların aglomera halde olduğunu göstermektedir (Çakmak S., 2015).

4.1.2 CaHA Tozlarının EDX Analiz Sonucu

Çöktürme yöntemiyle elde edilmiş CaHA tozlarına ait EDX spektrumu Şekil 4.3 de verilmiştir. Kalsiyum, fosfor ve oksijen elementlerinin istenildiği gibi malzeme içerisinde homojen bir şekilde dağılarak CaHA maddesini meydana getirmiştir (Şekil 4.2). EDX spektrumlarına bakıldığında Ca, P ve O oranının yüksek olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4.2.Çöktürme yöntemiyle elde edilmiş CaHA tozunun SEM görüntüsü.



Şekil 4.3. CaHA tozunun EDX spekturumu.

Malzeme içerisinde çok fazla miktarda safsızlık olmadığı da Şekil 4.3 verilen spektrumda ve Tablo 4.1’de verilen sonuçlarda görülmektedir. Buna göre EDX analiz sonuçlarının XRD analiz sonucuyla uyumlu olduğu görülmektedir.

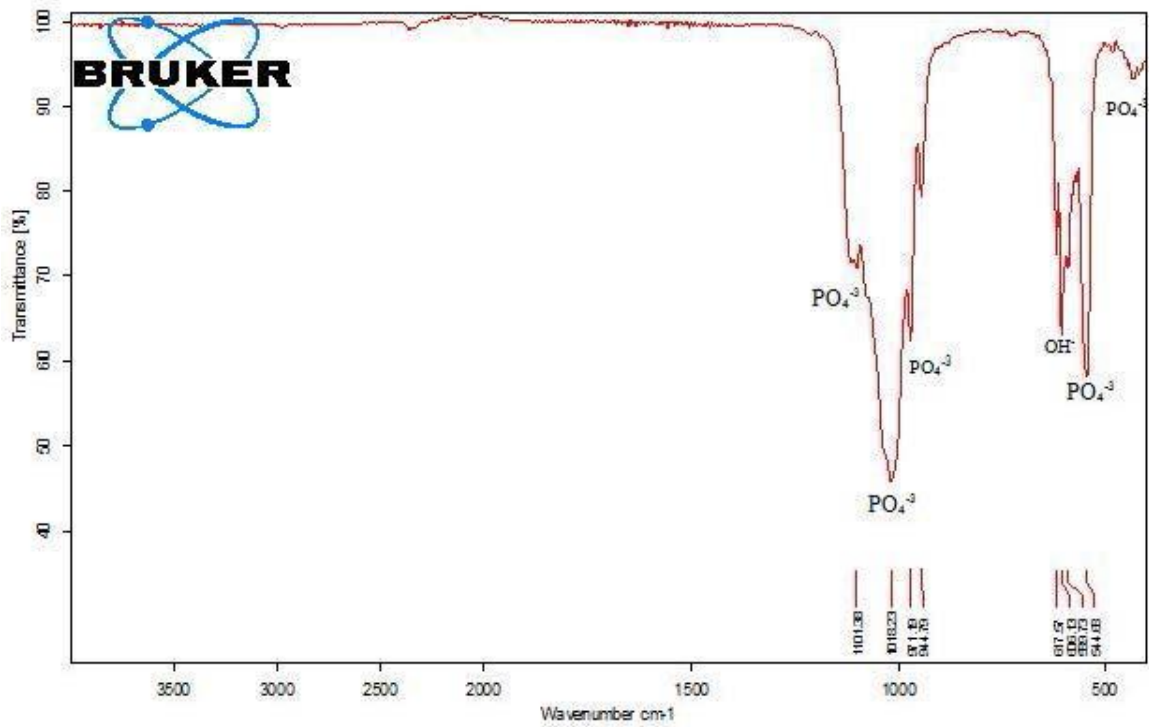
Tablo 4. 1. CaHA tozlarının EDX analiz sonucu.

Element	Seri	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Hata [%]
Oksijen	K-serisi	31,98	38,23	56,00	4,7
Kalsiyum	K-serisi	31,26	37,38	21,85	0,9
Fosfor	K-serisi	17,81	21,29	16,11	0,7
Karbon	K-serisi	2,59	3,10	6,04	0,6
Toplam:		83,64	100,00	100,00	

4.1.3 CaHA Tozlarının FT-IR Analiz Sonucu

Optimum şartlarda sentezlenen CaHA tozlarının FT-IR analizi Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde yapılmıştır. FT-IR analizinde PO_4^{-3} , OH^- iyonlarına ait piklerin CaHA yapısını karakterize etmektedir. Bazı durumlarda başlangıç malzemelerine göre bu fonksiyonel gruplara ilave başka gruplara ait piklere

rastlanmaktadır. CaHA tozunun FT-IR analiz sonucuna bakıldığında 1101.3, 1018.23, 971.19, 511.68 ve 589.73 cm^{-1} dalga boyundaki pikler PO_4^{3-} varlığını gösterir iken, 606.13 ve 617.57 cm^{-1} dalga boyundaki pikler OH^- varlığını göstermektedir (İpekoğlu, 2004). Şekil 4.4'te yaklaşık 500-610 cm^{-1} ve 1000- 1100 cm^{-1} dalga boyu aralığında görülen fosfat iyonlarına ait zayıf absorpsiyon pikleri ise az miktarda da olsa sentez sonrası bir miktar apatit yapının oluştuğunu göstermektedir. 800°C'de sinterleme işlemi sonrası, 500-610 cm^{-1} ve 1000- 1100 cm^{-1} dalda boyunda görülen HA için karakteristik titreşim modları, elde edilen CaHA partiküllerin yüksek kristalinitesine bağlı olarak daha keskin bir şekilde gözükmektedir. Detaylı olarak incelendiğinde, 564 ve 605 cm^{-1} dalga boyundaki keskin pikler O-P-O eğilme titreşimine ait iken, 911 ve 1101 cm^{-1} dalga boyunda görülen pikler ise P-O bağının simetrik ve asimetric gerilim titreşimine aittir. CaHA'ye ait hidroksil gruplarına ait pikler ise 617 cm^{-1} ve 3570 cm^{-1} dalga boyunda görülmektedir (Şekil 4.4). Sonuçta; CaHA sentez reaksiyon süresi ve sinterleştirme sıcaklığı bakımından tek fazlı HA nanopartiküllerin üretiminde etkin bir yöntem olduğu görülmüştür.



Şekil 4.4. CaHA FT-IR analizi sonucu.

4.1.4 CaHA Tozlarının SEM Analiz Sonucu

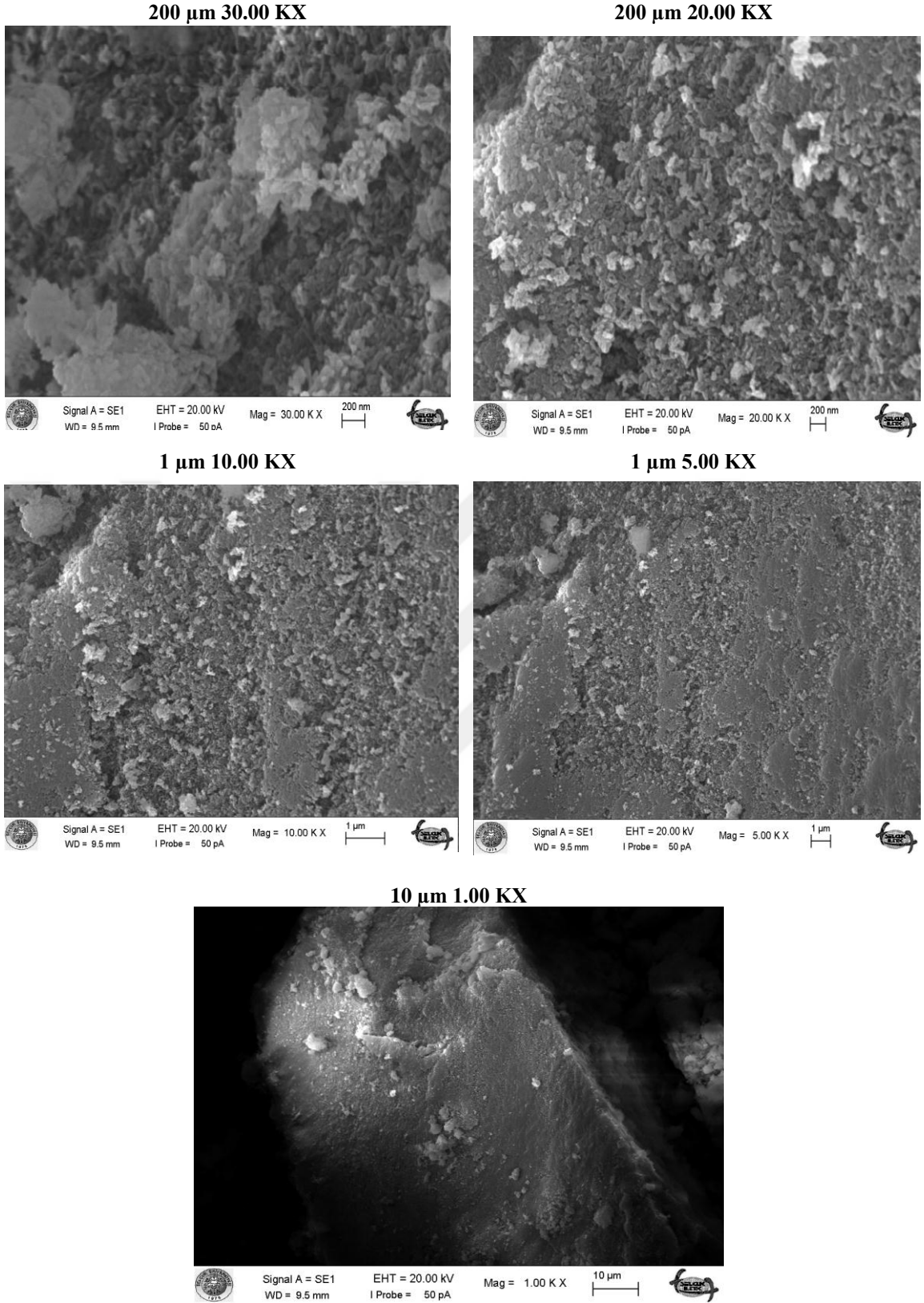
Çalışmanın bütün SEM analizleri Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezinde yapılmıştır.

Çöktürme yöntemiyle elde edilmiş ve 800 °C’de sinterleştirilmiş CaHA tozlarının farklı boyutlardaki SEM görüntüleri incelendiğinde küresel yapıya yakın taneciklerin olduğu görülmektedir (Şekil 4.5). 200 µm’lik SEM görüntülerinde görüldüğü gibi CaHA tozları açık gözenekler, gözenekler arası bağlantılar görülmektedir. CaHA’in yapısının morfolojik olarak çok pürüzlü ve gözenekli olması yapay diş hazırlamada kullanılması açısından oldukça önemlidir. Birebir diş yüzeyini karşılamak üzere; sinterleştirilmiş CaHA disklerinin kullanılması, pürüzlü ve gözenekli bir yüzey sağlaması SEM görüntüleriyle de desteklenmiştir (Çakmak S., 2015). Hazırlanan CaHA disklerin brokoli ekstreleri ile kaplamasında yüzeye tutunmasında kolaylık sağlayacağı ve biyofilm oluşumu için ideal yüzeyin oluşturacağı düşünülmektedir. Böylece, disk yüzeyindeki kaplama ile bakteriyel taşınmayı da azaltacağı düşünülmektedir.

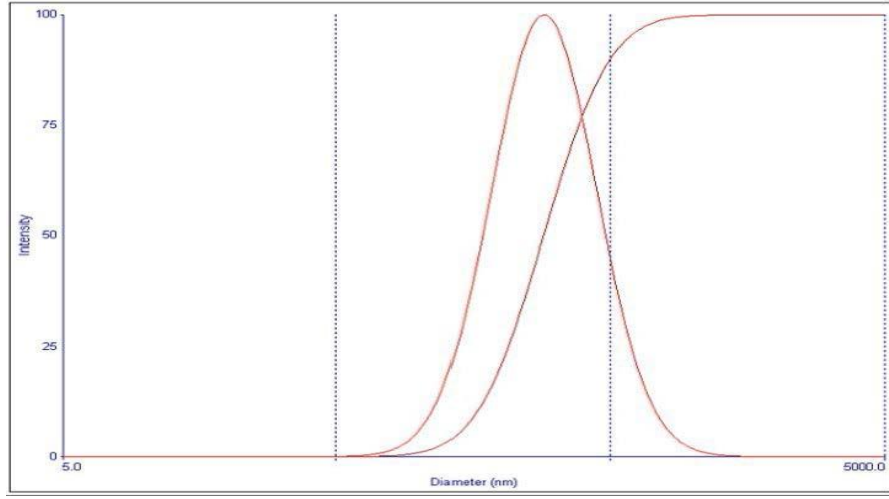
4.1.5 Parçacık Boyut Analizi

Parçacık boyut analizi, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde Brookhaven Instruments Corporation 90 Plus marka cihazında yapılmıştır.

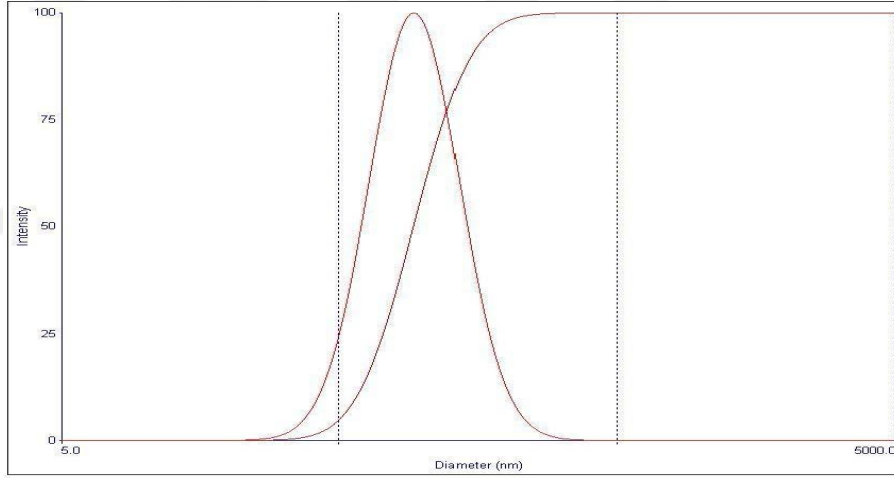
Çöktürme yöntemiyle sentezlenen CaHA tozlarının 800 °C’de sinterleştirildikten sonraki analiz sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.6-4.7). Analiz esnasında su ile yapılan dağılımda maddenin su içerisinde çözünmemesinden kaynaklı olarak analiz esnasında zamanla topaklanma meydana gelerek aglomerasyona neden olmuştur. Tanecik boyutu ortalama 302.9 nm dir. Alkol çözeltisiyle yapılan çalışmada ise, dağılım daha yüksek olmasından dolayı tanecik boyutu 94.3 nm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.5. Sentezlenmiş CaHA tozunun farklı boyutlarda büyütülmüş SEM görüntüleri.



Şekil 4.6. Su içerisinde dağıtılmış CaHA tozunun parçacık boyut analizi.



Şekil 4. 7. Alkol içerisinde dağıtılmış CaHA tozunun parçacık boyut analizi.

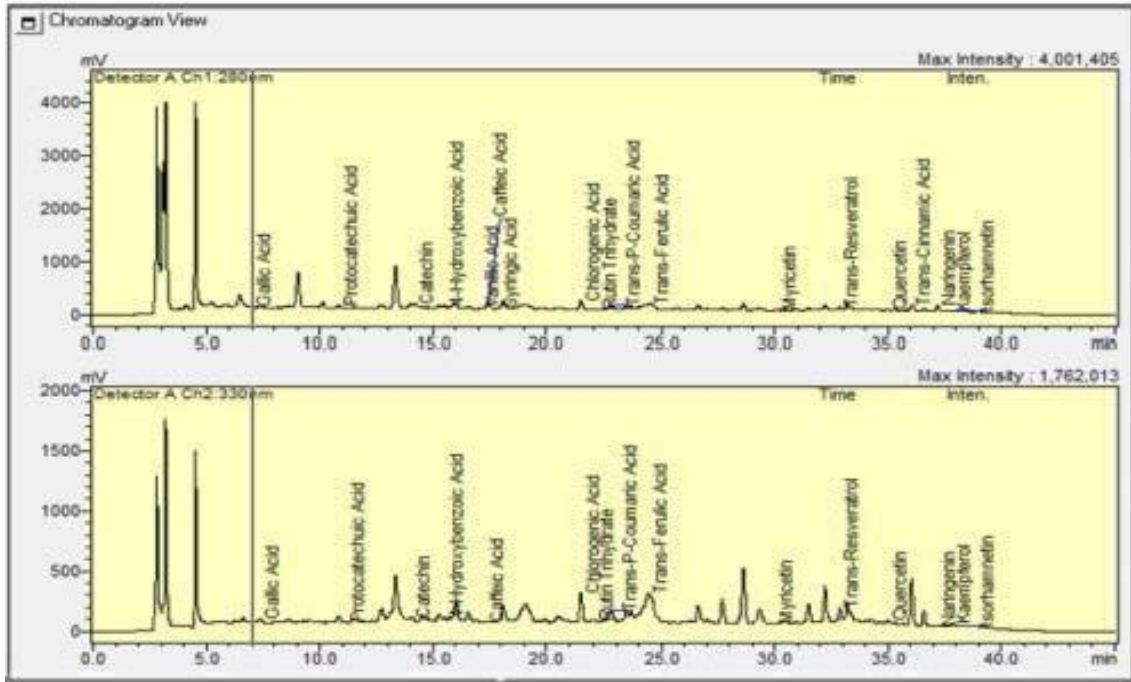
4.2 Brokoli Ekstresinin Karakterizasyonu

4.2.1 Brokoli Ekstresinin HPLC Analiz Sonucu

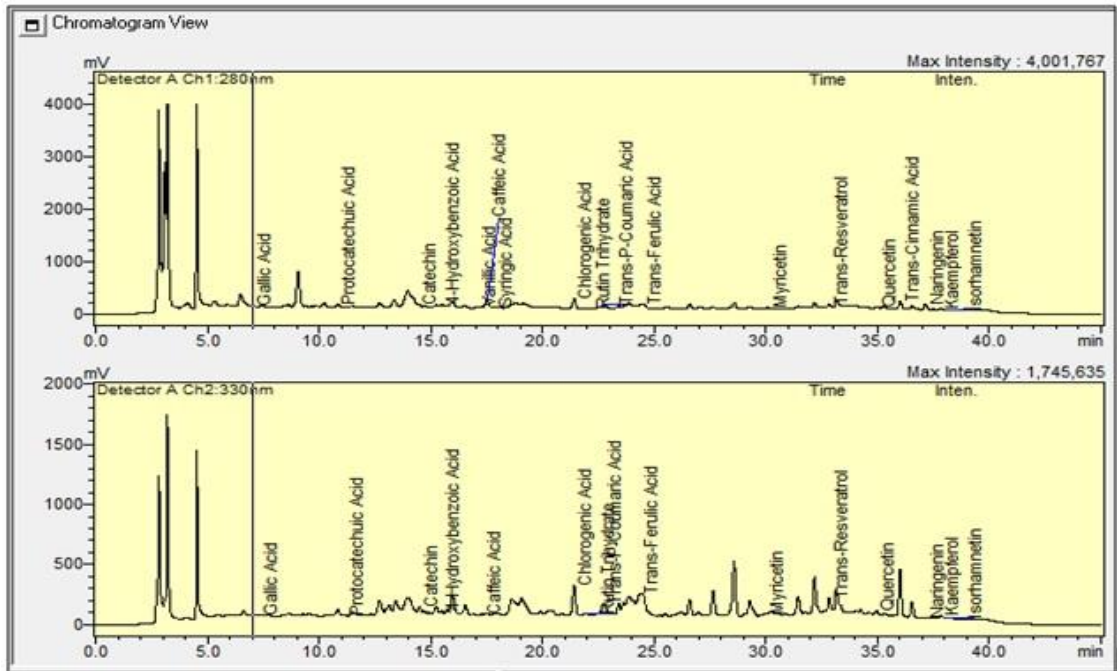
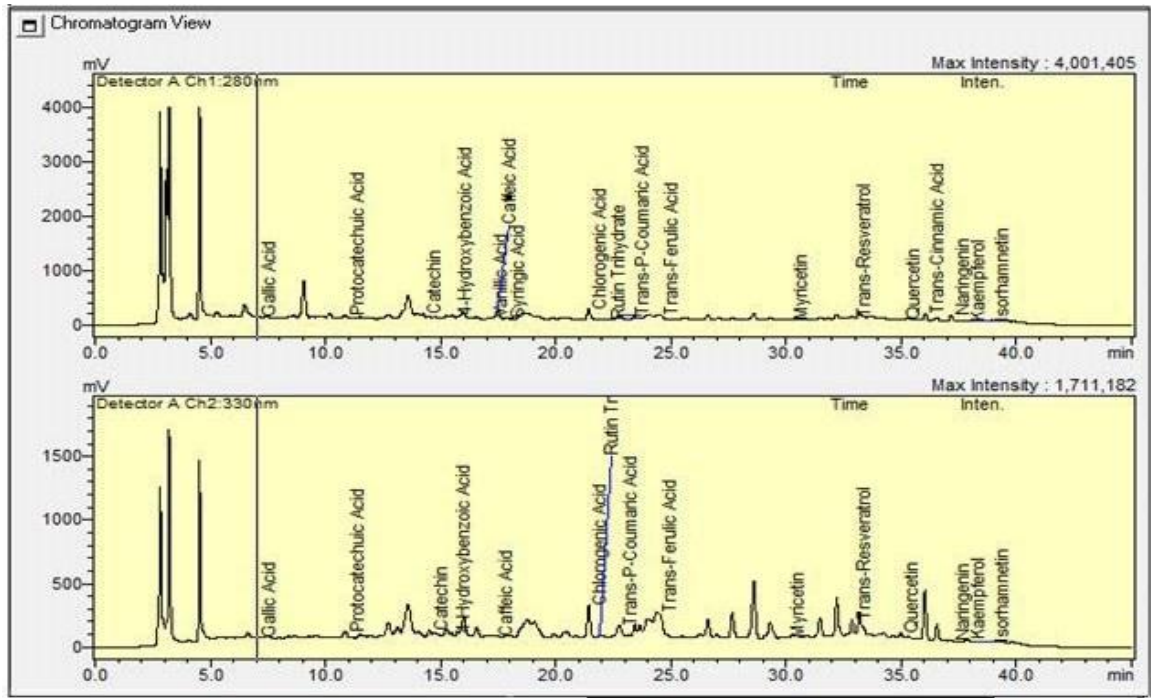
Brokoli ekstresinden 0,5 g alınıp 3 mL metanol içinde çözülerek, filtreleme işleminden sonra HPLC sisteminde üç tekrarlı analizi yapılmıştır. Brokoli ekstresi için uygulanan analiz koşulları Tablo 4.3’de verilmiştir. Analiz sonuçları Şekil 4.8 ve Tablo 4.4’de verilmiştir.

Tablo 4.3. Brokoli ekstresi için uygulanan HPLC koşulları.

Cihaz	Shimadzu-HPLC
Kolon	Inertsıl Ods-3 (5µm; 4,6 ×250 mm)
Akış Hızı	1,0 ml/min
İnjesiyon Miktarı	20 µl
Dalga Boyu	280-330 nm
Mobil Faz	A (dH ₂ O-gAc _{100-0,05}) B (ACN)
Toplam Süre	45,10 Min
Sıcaklık	30 °C



Şekil 4.8. Brokoli ekstresinin HPLC kromatogramı



Şekil 4.8 devamı. Brokoli ekstresinin HPLC kromatoğramı.

Brokoli Ekstresinin HPLC kromatoğramında sırasıyla; gallik, protakatekhuik, kateşin, 4-hidrobenzoik, vanilik, kafeik, siringirik, klorojenik, rutin trihidrat, trans-P-kumarik, trans-ferulik, mirisetin, trans-resveratrol, kuarsetin, trans-sinnamik, narenferin, kaempferol, isohamnetin, gallik, prokatekhuik asitler görülmüştür.

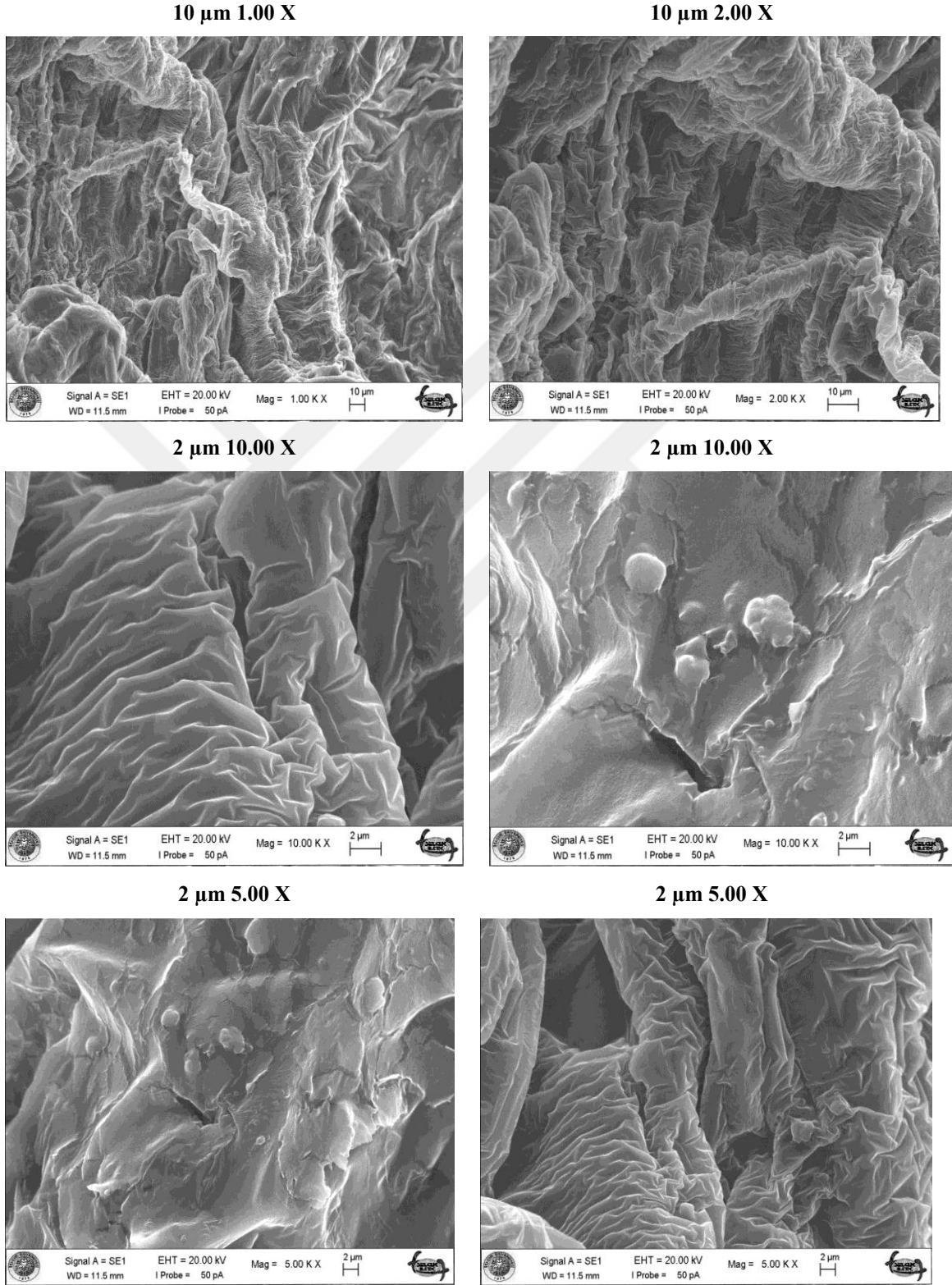
Şekil 4.8'deki HPLC kromatoğramına göre hesaplanan fenolik ve flovanoidlerin mg/g miktarı Tablo 4.4'te verilmiştir. Kateşin, rutin trihidrat, kuarsetin, trans sinnamik asit, kaempferol miktarlarındaki fazlalık brokoli ekstresinin glukosinolatlar, flavonoidler ve bazı fenolik bileşiklerin antioksidan ve serbest radikalleri yok edici özelliği bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda iki ana flavonol glikosidin (quercetin 3-O-sophoroside ve kaempferol 3-O-sophoroside) brokoli çiçeklerinde bulunduğu rapor edilmiştir. Glukosinolatlar genellikle Brassica (Cruciferae) familyasındaki bitkilerde yer alan, sülfür ve azot içeren ikincil bitki metabolitleridir. Diğer biyolojik aktif bileşik grupları ise dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu etki gösteren kafeik ve sinapik asitler gibi hidroksisinnamik asitlerdir.

Tablo 4.4. HPLC kromatoğramına göre hesaplanan fenolik ve flavonoidlerin mg/g miktarı.

Brokoli Ekstresi				
No	Bileşik Adı	I. Konsantrasyon	II. Konsantrasyon	III. Konsantrasyon.
1	Gallik Asit	6.246	5.601	5.601
2	Protakatekhuik Asit	185.684	185.458	152.026
3	Kateşin	387.350	385.756	330.559
4	4-Hidroksibenzoik Asit	73.568	69.434	68.152
5	Vanillik Asit	118.940	146.705	156.192
6	Kafeik Asit	93.123	88.580	95.332
7	Siringik Asit	24.177	34.328	31.367
8	Klorojenik Asit	137.453	138.661	142.975
9	Rutin Trihidrat	77.135	69.517	74.621
10	Trans-P-Kumarik Asit	54.263	55.310	55.003
11	Trans-Ferulik Asit	122.208	114.259	108.678
12	Mirisetin	66.330	77.155	170.894
13	Trans-Resveratrol	44.831	49.191	55.730
14	Kuarsetin	65.519	75.579	83.665
15	Trans-Sinamik Asit	15.689	16.764	18.261
16	Narenferin	17.564	18.945	21.695
17	Kaempferol	40.535	45.291	52.029
18	İsorhamnetin	32.982	25.187	31.749
19	Gallik Asit	131.365	54.690	74.641
20	Protakatekhuik Asit	17.069	315.961	6.619
21	Kateşin	9500.978	6977.202	6513.039
22	4-Hidroksibenzoik Asit	3080.781	2889.270	2947.367
23	Kafeik Asit	9.397	9.859	11.169
24	Klorojenik Asit	75.619	75.876	75.933
25	Rutin Trihidrat	68.371	103.534	106.932
26	Trans-P-Kumarik Asit	55.214	60.197	41.541
27	Trans-Ferulik Asit	107.859	80.149	61.178
28	Mirisetin	31.247	31.859	37.005
29	Trans-Resveratrol	26.943	27.419	33.045
30	Kuarsetin	44.334	50.229	54.034
31	Narenferin	26.374	32.178	36.249
32	Kaempferol	25.428	26.900	31.941

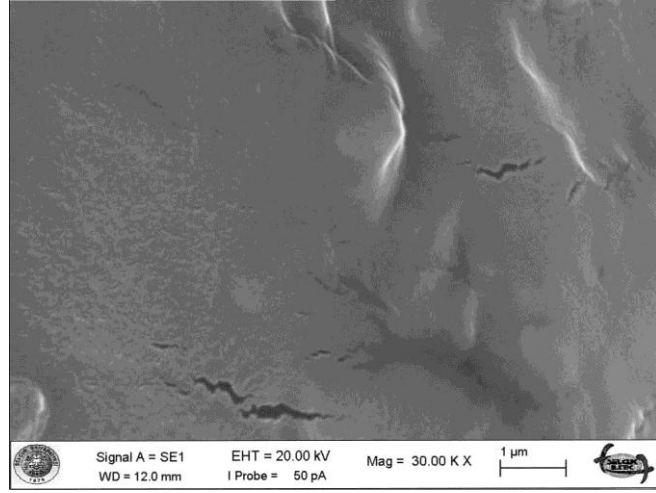
4.2.2 Brokoli Ektresinin SEM Analiz Sonucu

Brokoli ekstresinin farklı büyüklükteki SEM görüntüleri Şekil 4.9’da verilmiştir.



Şekil 4.9. Brokoli ekstresinin SEM görüntüleri.

1 µm 30.00 X



Şekil 4.9. Devamı. Brokoli ekstresinin SEM görüntüleri.

Şekil 4.9’da da görüldüğü gibi brokoli ekstrelerinin SEM görüntüsü kumaş görünümündedir.

4.3 Biyofilm Çalışma Sonuçları

4.3.1 Tüp Yöntemiyle Yapılan Çalışma Sonuçları

İncelenen sekiz farklı bakteri suşları üzerinde yapılan çalışmada suşların farklı derecelerde biyofilm oluşumu meydana getirdiği görülmüştür (Tablo 4.5). Tüplerin iç çeperinde gözle görülebilen ince, renkli bir film tabakasının varlığı pozitif slime olarak kabul edilir (Şekil 4.10). Oluşan rengin koyuluk ve yoğunluğuna göre slime oluşumu zayıf (+), orta (++) , kuvvetli (+++) olarak pozitif sonuçları verirken, tüp duvarında herhangi bir tabaka, renk oluşmaması ise negatif (-) olarak değerlendirilir. Sonuçlar literatürlerle uyum halindedir (Demir ve Inanc, 2015).

Tablo 4.5. Tüp çalışması sonuçları.

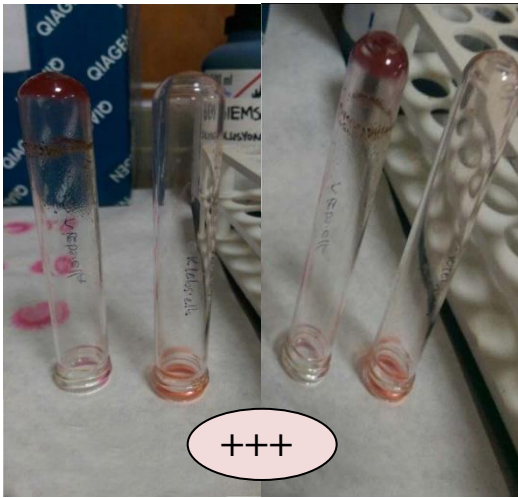
Bakteri Türleri	Biyofilm Oluşturma Yoğunluğu
<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	(+) Zayıf
<i>Escherichia coli</i> 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> 25923	(++) Orta
<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Streptococcus mutans</i> <i>Lactobacillus casei</i>	(+++) Kuvvetli



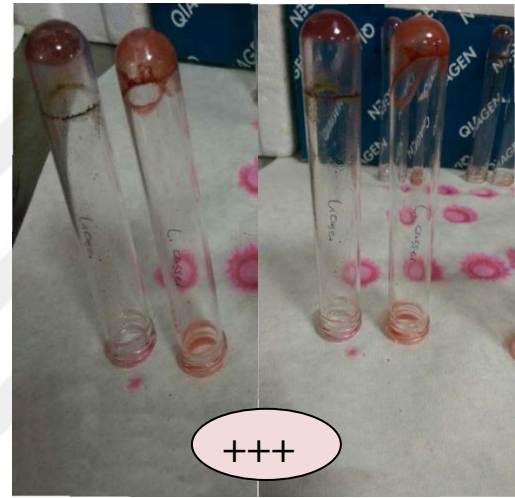
Escherichia coli 25922



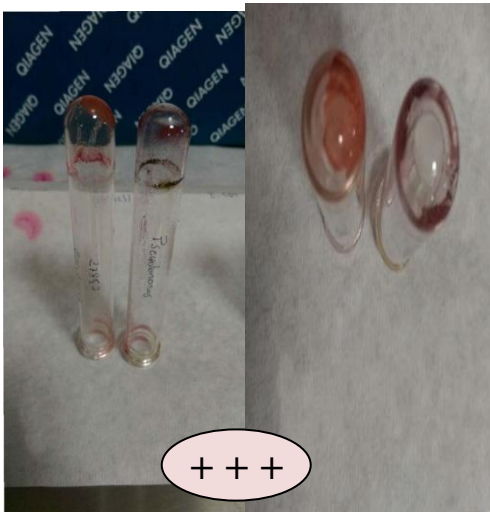
Enterococcus faecalis



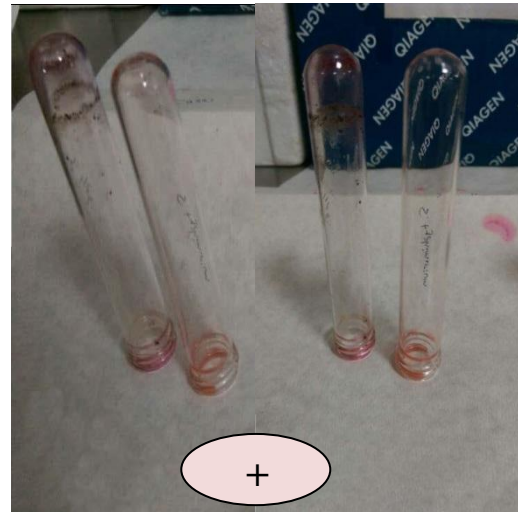
Klebsiella pneumoniae



Lactobacillus casei

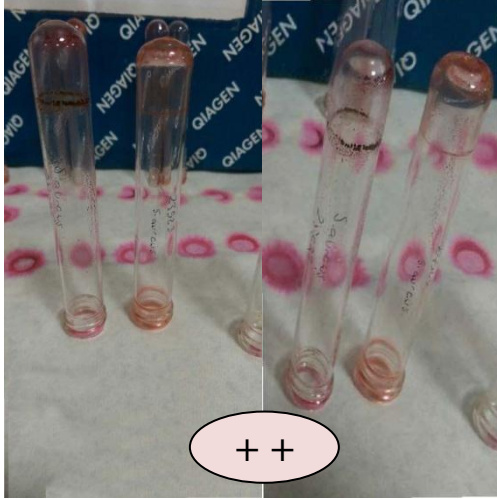


Pseudomonas



Salmonella enterica subsp. enterica

Şekil 4.10. Tüp çalışması sonuçları.



Staphylococcus aureus 25923

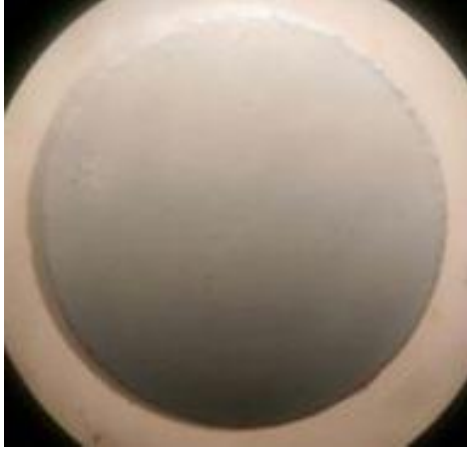


Streptococcus mutans

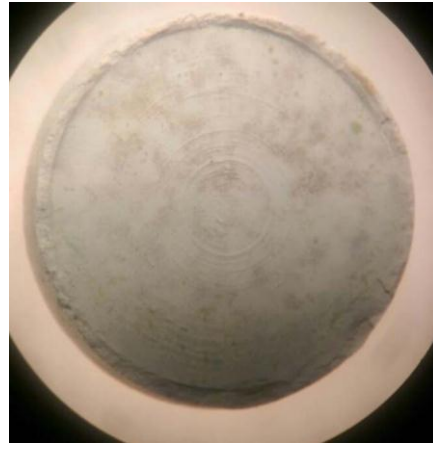
Şekil 4.10.devamı Tüp çalışması sonuçları.

4.3.2 Farklı Ortamlarda Kurutulan Brokoli Kaplı CaHA Disklerin Değerlendirilmesi

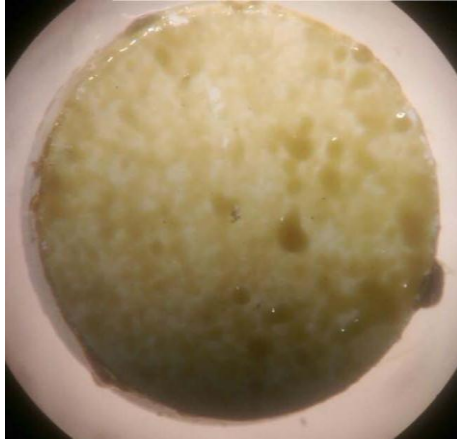
CaHA diskleri brokoli ekstresi ile kaplandıktan sonra farklı sıcaklıklarda kurutulmuşlardır. Disklerin homojen bir şekilde brokoli ekstresi ile kaplanabilmesi için oda sıcaklığında emdirerek kurutma, oda sıcaklığında emdirerek liyofilizatörde kurutma ve oda sıcaklığında döndürerek kaplama yapılarak (spin coating) farklı kurutma yöntemleri denenmiştir. Disklerin homojen bir şekilde kaplandığı yapı -50°C’de liyofilizatör ile kurutma yöntemidir. Yapılacak antimikrobiyal çalışmalarda bu yöntemle kaplanan diskler kullanılmıştır (Şekil 4.11).



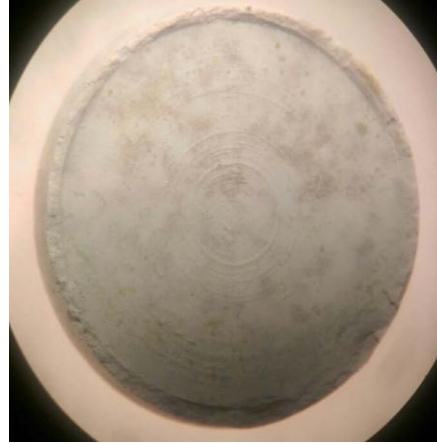
Boş Haldeki CaHA Disk



Oda Koşullarında (25 °C) Kurutulan CaHA Disk



Liyofilizatör (-50 °C) ile Kurutulan CaHA Disk



Etüv İçerisinde (60 °C) Kurutulan CaHA Disk

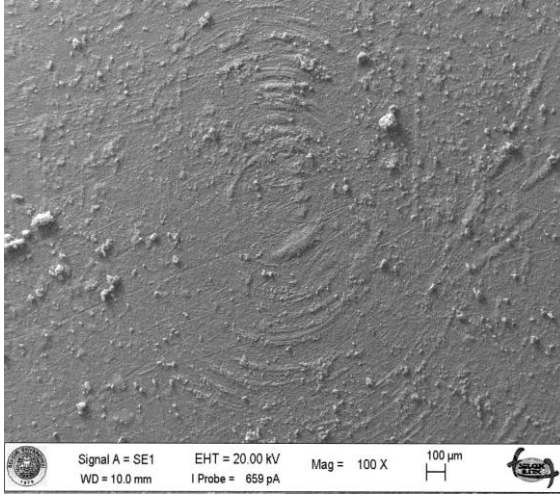
Şekil 4.11. Farklı ortamlarda kurutulan brokoli kaplı CaHA diskler.

4.3.3 CaHA Diskler Üzerinde Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntülenmesi

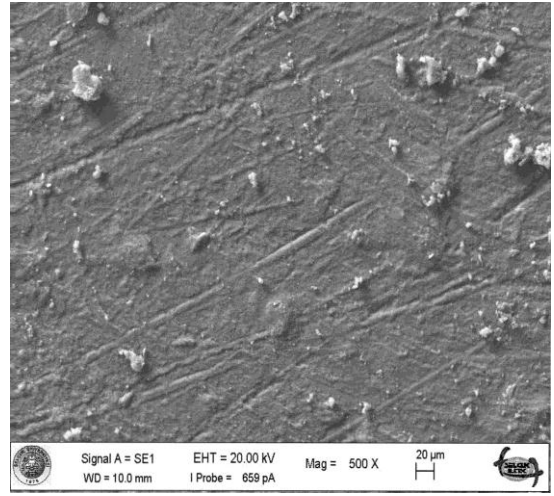
CaHA diskler üzerine kaplanmış Brokoli ekstresinin biyofilm oluşumu üzerine etkilerini gözlemlemek için *Staphylococcus aureus* bakteri türünün bakteri plağında 37°C'de 4 hafta boyunca CaHA diskler üzerinde bakteri tarafından biyofilm oluşup oluşmadığı SEM görüntüleri ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Görüntüler incelendiği zaman toz halde bulunan CaHA kristallerine nazaran disk halindeki maddenin küresel forma daha yakın homojen taneciklerden oluştuğu görülmüştür. Şekil 4.12'deki görüntüler incelendiği zaman CaHA disk üzerinde pürüzlü yapının meydana geldiği görülmektedir. Pürüzlü yapının brokoli ekstresini ve bakterinin yüzeye tutunmasını sağlayacağı düşünülmektedir.

Boş Haldeki CaHA

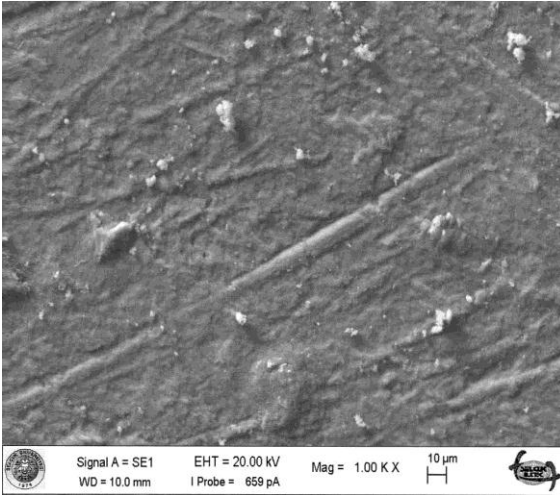
100 μm Mag: 100 X



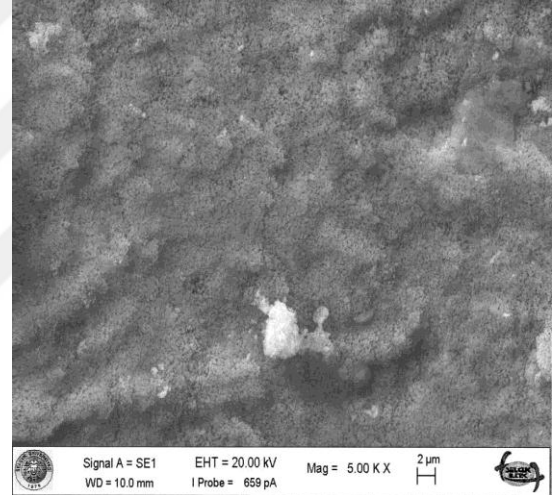
20 μm Mag: 500 X



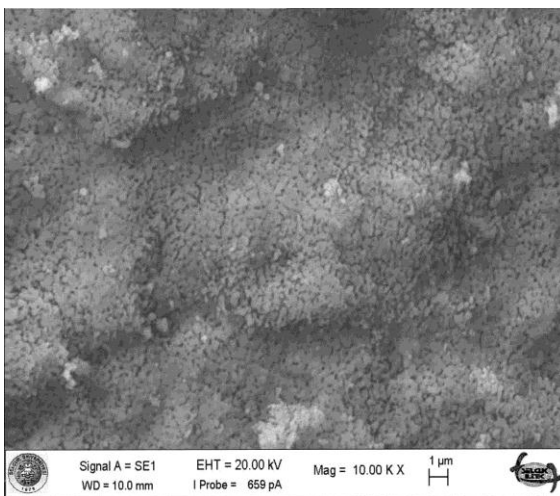
10 μm Mag: 1.00 K X



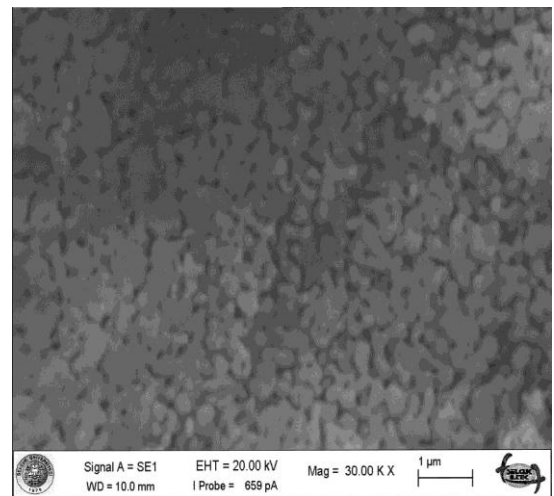
2 μm Mag: 5.00 K X



1 μm Mag: 10.00 K X



1 μm Mag: 30.00 K X



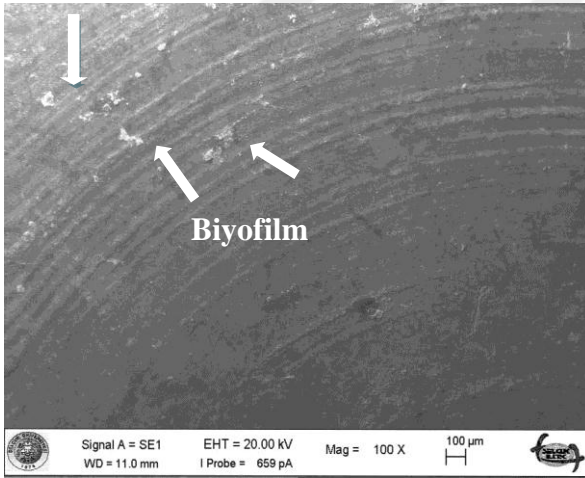
Şekil 4.12. Boş haldeki CaHA diskinin SEM analiz görüntüleri.

CaHA disk üzerinde Biyofilm büyümesini takip edebilmek için, ekstre içermeyen pozitif kontrol ve bakteri bulundurmeyen negatif kontrol grubu çalışma içerisine dahil edilmiştir (Şekil 4.13-Şekil 4.14).

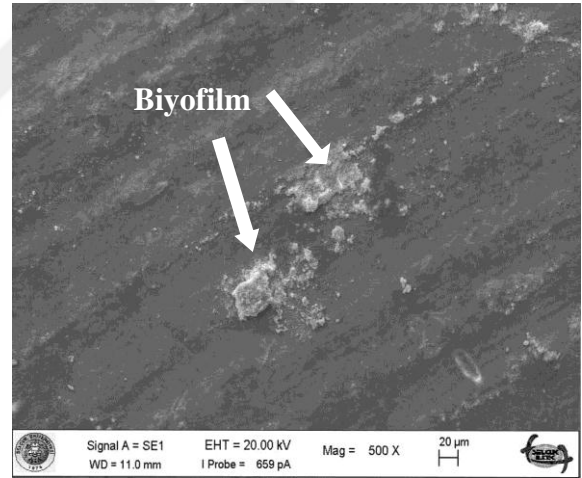
Pozitif kontrol grubu olarak, brokoli ekstresi ile kaplanmamış CaHA diskler üzerinde *Staphylococcus aureus* bakteri türünün oluşturduğu biyofilm yapılarına ait SEM görüntülerinde Şekil 4.13'te görülmektedir. 100 µm Mag: 100 KX ve 20 µm Mag: 500 KX farklı büyüme boyutlarında *Staphylococcus aureus* bakterinin meydana getirdiği koloni grupları görülmektedir. Disk görüntüsü büyütüldüğünde *Staphylococcus aureus* bakterisinin oluşturduğu biyofilm yapıyı meydana getiren; EPS matrisini ve besin alışverişiyle atıkların giderimi için kullanılan su kanalları da görülmektedir. Pozitif kontrol grubunu SEM görüntülerinde de bakterilerin uyumlu bir şekilde koloni grupları oluşturarak biyofilm yapısını meydana getirdiği görülmüştür (Şekil 4.13).

Pozitif Kontrol Grubu

100 µm Mag: 100 K X

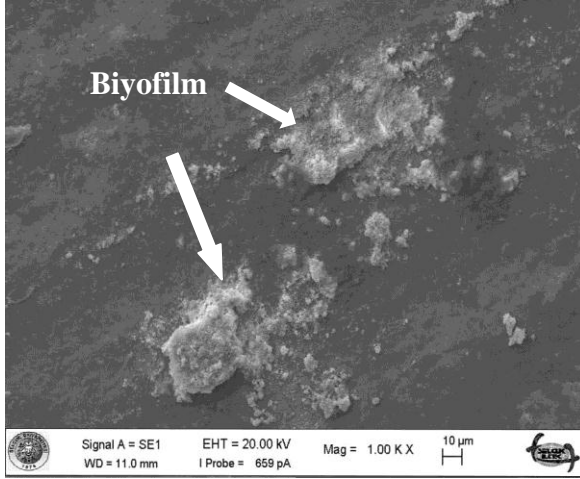


20 µm Mag: 500 K X

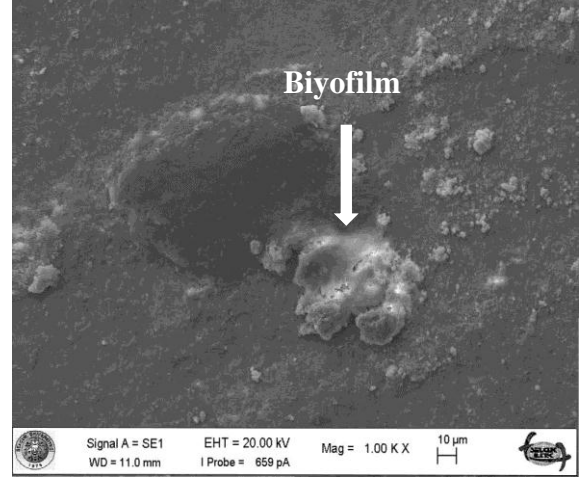


Şekil 4.13. Pozitif kontrol grubu.

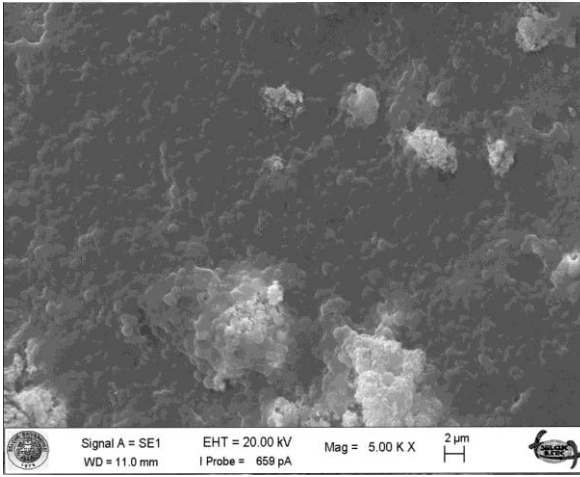
10 µm Mag: 1.00 K X



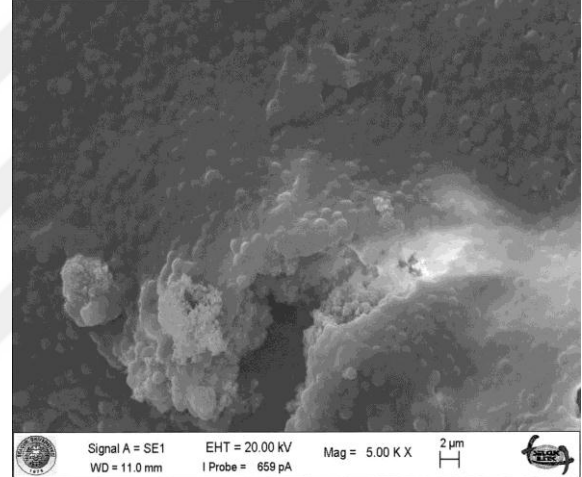
10 µm Mag: 1.00 K X



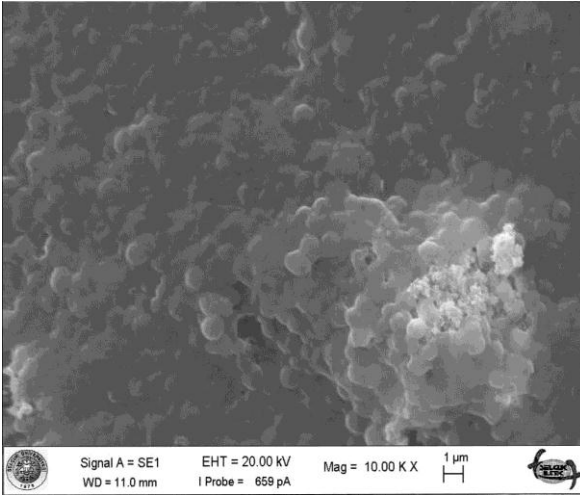
2 µm Mag: 5.00 K X



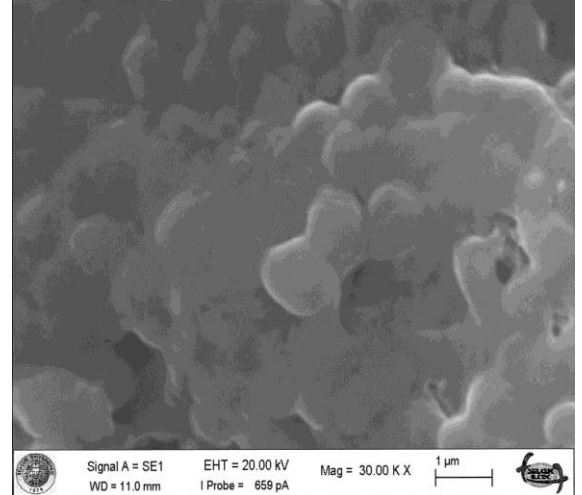
2 µm Mag: 5.00 K X



1 µm Mag: 10.00 K X



1 µm Mag: 30.00 K X

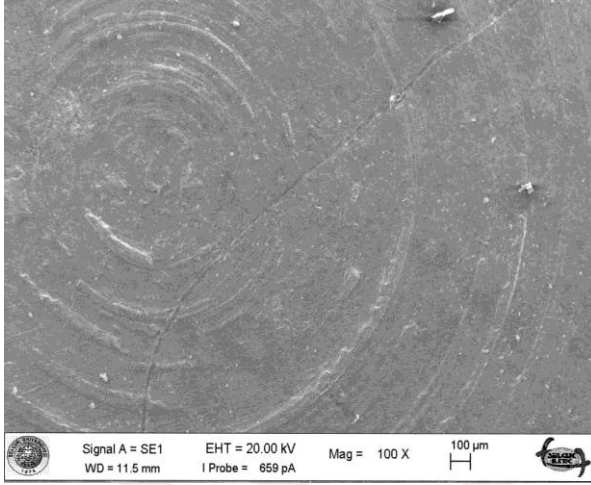


Şekil 4.13. Devamı. Pozitif kontrol grubu.

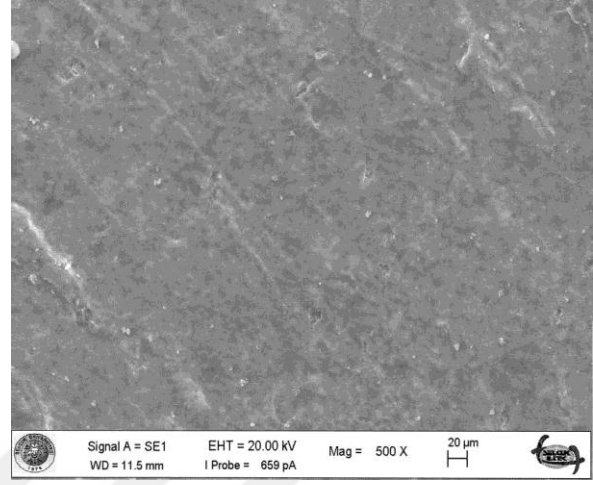
Negatif kontrol grubu olarak yapılan çalışmada üreme meydana gelmediği, CaHA yapısının SEM görüntüsünden anlaşılmaktadır (Şekil 4.14).

Negatif Kontrol

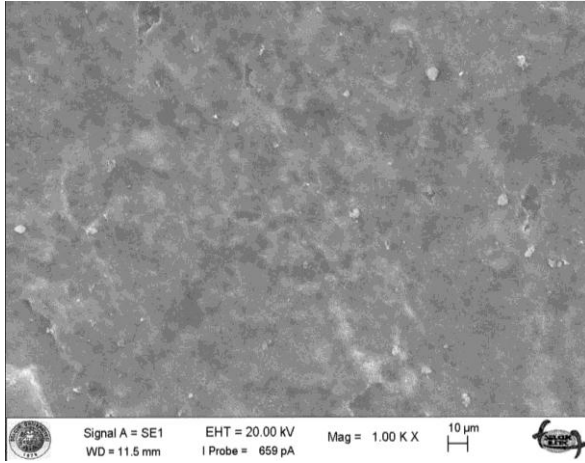
100 µm Mag: 100 X



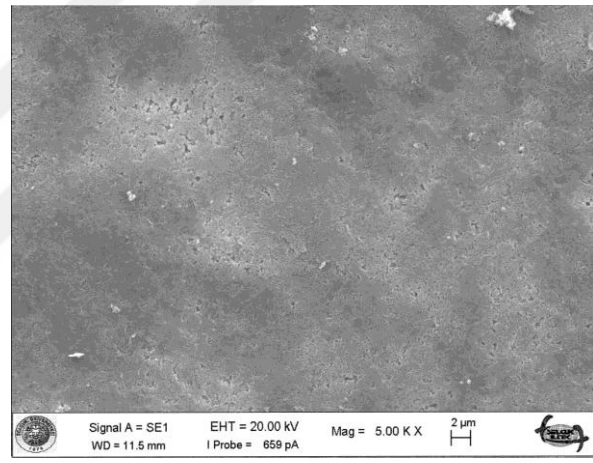
20 µm Mag: 500 X



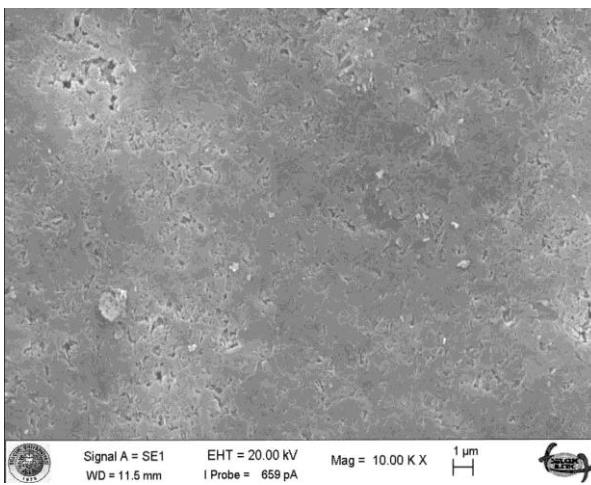
10 µm Mag: 1.00 K X



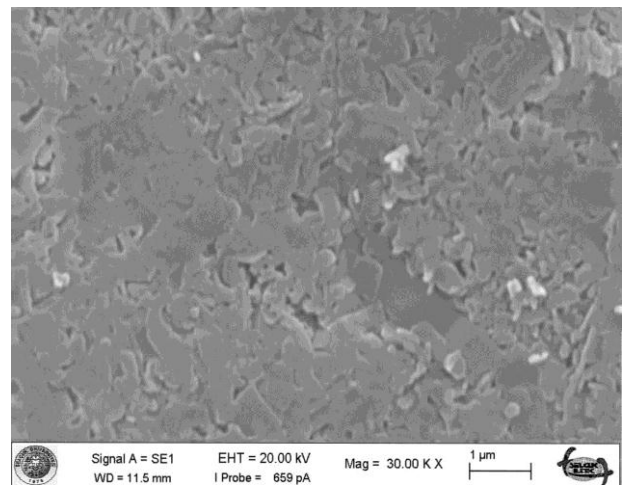
2 µm Mag: 5.00 K X



1 µm Mag: 10.00 K X



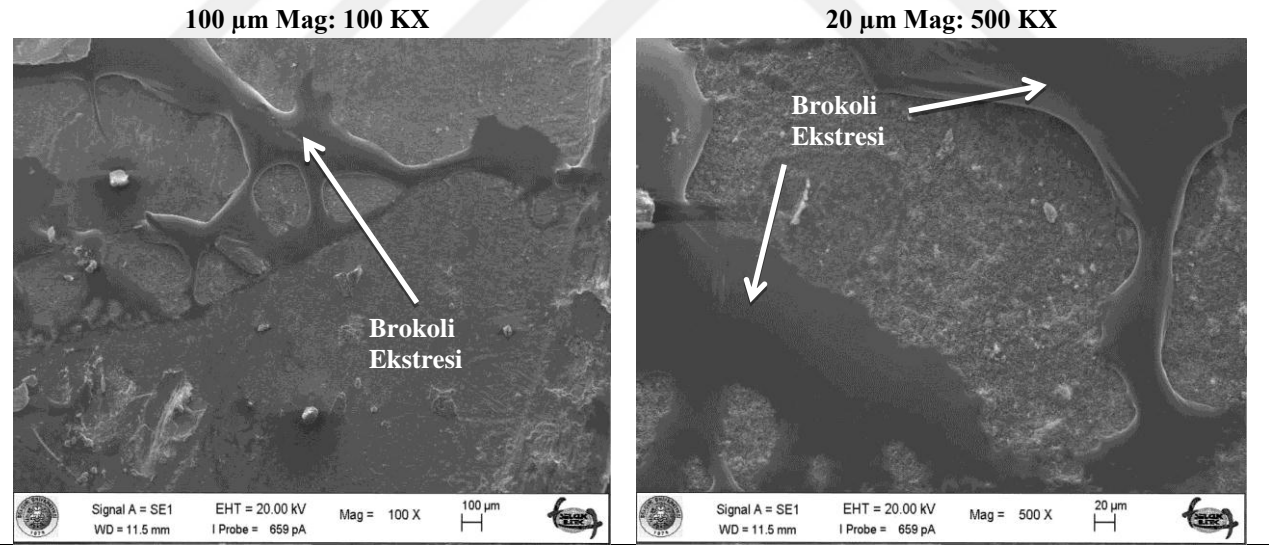
1 µm Mag: 30.00 K X



Şekil 4.14. Negatif kontrol grubu.

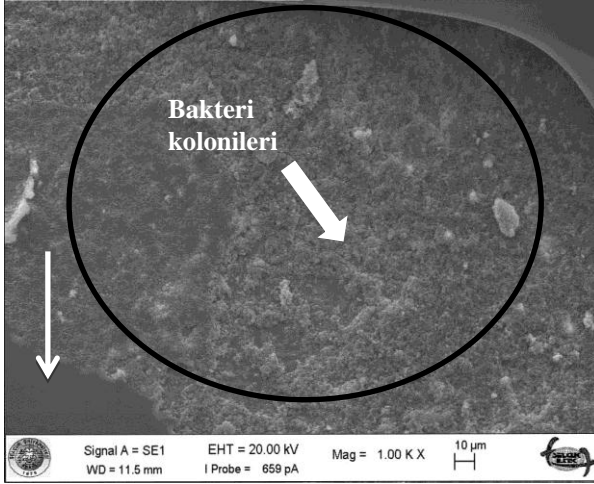
Brokoli ekstresi ile kaplanmış CaHA diskleri *Staphylococcus aureus* bakterisi ile uygun üreme ortamı sağlanarak çalışmalar 4 hafta süresince incelenmiştir. 1 hafta sonunda 37°C’de inkübe edilen disklerin SEM görüntüleri Şekil 4.14 verilmiştir. 100 µm Mag: 100 KX büyüklükteki SEM görüntüsüne bakıldığı zaman CaHA diskinin üzerinde brokoli parçacıklarının kaldığı görülmektedir. Diskin görüntüsü büyütüldüğünde (20 µm Mag: 500 KX -10 µm Mag: 1.00 KX) brokoli ekstresi ile kaplanmış yüzeyde bakteri üremesi meydana gelmediği, fakat disk üzerinde brokoli ekstresinin olmadığı bölgelerde bakterinin tutunmasıyla birlikte koloni oluşumu meydana gelmiştir. Sonuçta; bakterinin biyofilm oluşturması için yüzey koşullarının uygun olmasıyla birlikte maddenin yapısının organik veya inorganik yapıda olması da büyük önem taşımaktadır. 20 µm Mag: 500 KX, 10 µm Mag: 1.00 KX, 10 µm Mag: 1.00 KX ve 2 µm Mag: 5.00 KX boyutundaki büyütmelelerdeki SEM görüntüleri incelendiğinde, inorganik yapıda olan CaHA diskler üzerinde üremenin meydana geldiği ancak organik yapıda olan brokoli ekstresinin üzerinde bakterinin tutunamayıp biyofilm yapısının meydana getirmediği görülmektedir.

1. Hafta

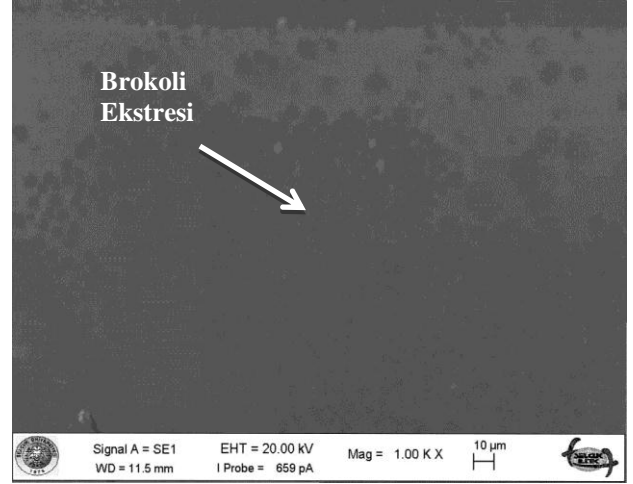


Şekil 4.15. Brokoli kaplı CaHA disklerinin 1. hafta sonunda çekilmiş SEM görüntüleri

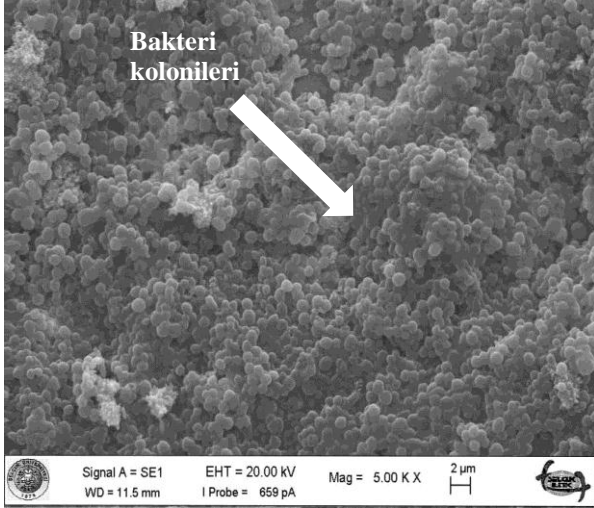
10 µm Mag: 1.00 KX



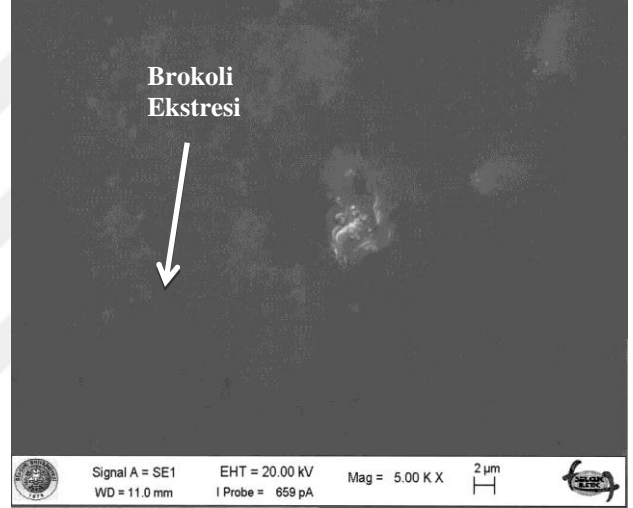
10 µm Mag: 1.00 KX



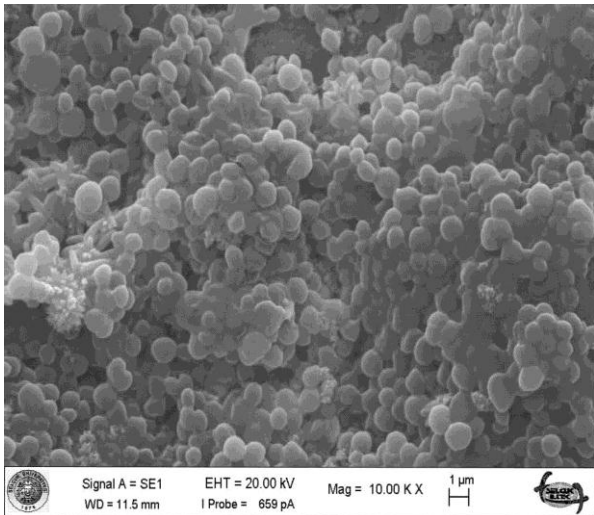
2 µm Mag: 5.00 KX



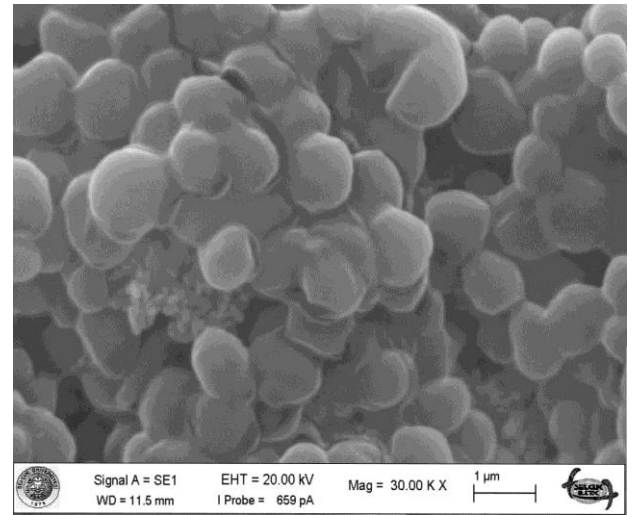
2 µm Mag: 5.00 KX



1 µm Mag: 10.00 KX



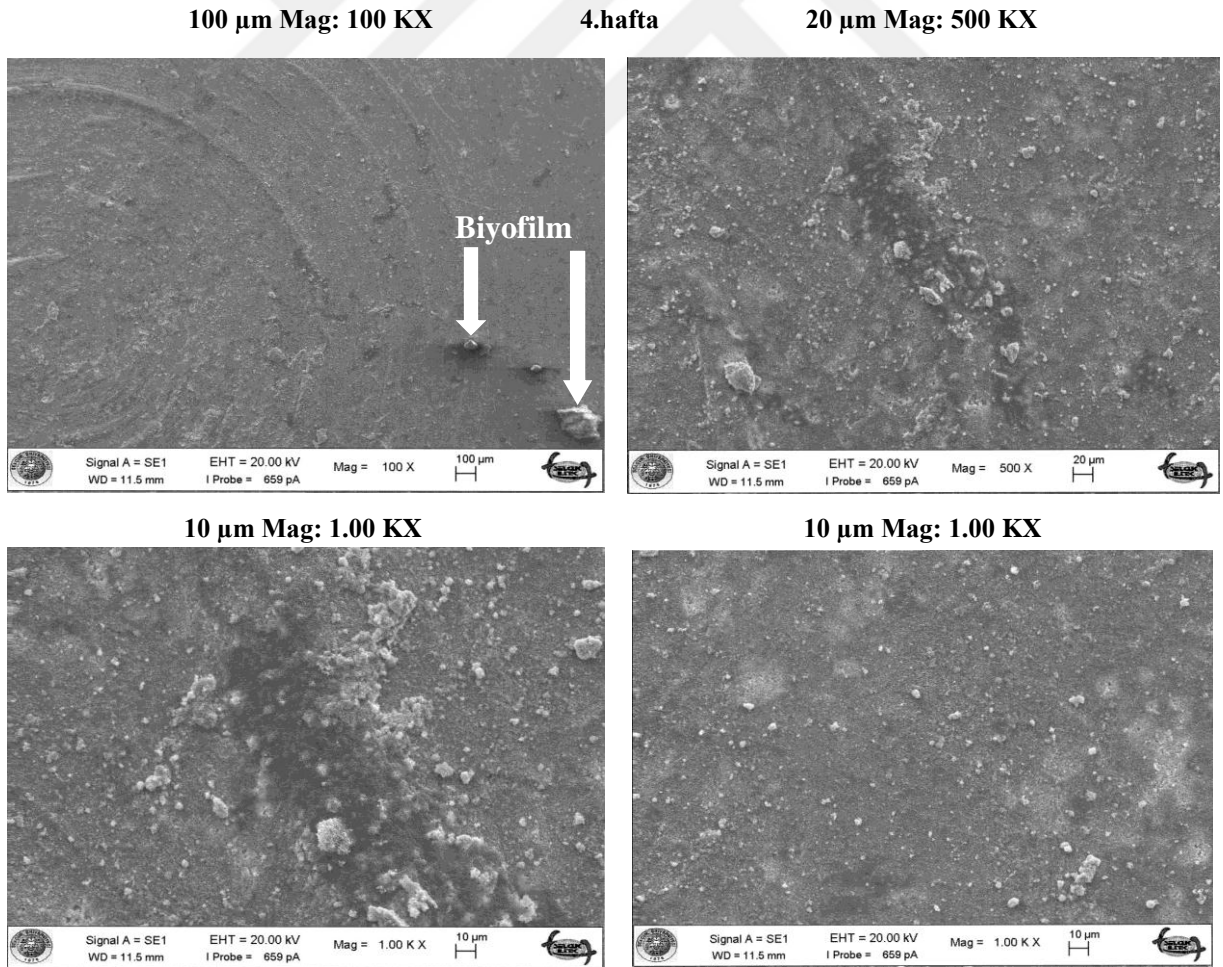
1 µm Mag: 30.00 KX



Şekil 4.15. Devamı. Brokoli kaplı CaHA disklerinin 1. hafta sonunda çekilmiş SEM görüntüleri.

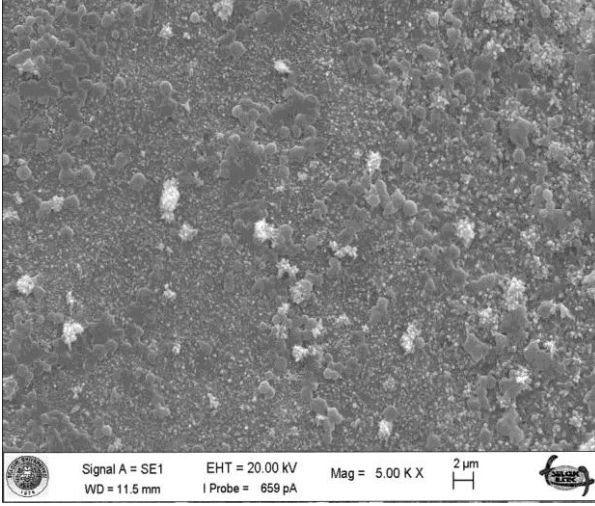
4 haftanın sonunda brokoli kaplı CaHA diskleri üzerinde brokoli ekstresinin kalmadığı SEM görüntülerinden tespit edilmiştir. 1. haftanın sonuçlarıyla kıyaslandığı zaman bakterilerin besin bulabildiği her ortamda üreme meydana getirdiği Şekil 4.16'daki SEM görüntülerinde görülmektedir. 100 µm Mag: 100 KX SEM görüntüsünde görüldüğü gibi CaHA diskinin brokoli ekstresinin kaplanmadığı yerlerde bakteri üremesi meydana geldiği tespit edilmiştir. Diskin görüntüsü büyütüldüğü zaman bakterilerin üreme oranlarının ilk haftadaki üreme oranlarına göre biraz daha düşük olduğu görülebilmektedir. Sonuçta bakteri besiyer bulamadığı için ölmekte ve yaşamını sürdürmeye çalışan bakteriler ise ölü olan bakterileri besiyer olarak kullanabilmektedir. 4. haftanın sonunda yapılan çalışma neticesinde yaşayan bakteri sayısının ölü bakteri sayısından daha az olduğu görülmüştür (Şekil 4.16).

Yapılan 4 haftalık çalışma süresince, bakterilerin fimbrialar sayesinde yüzeye tutunarak koloni oluşturdıkları görülmektedir. CaHA diskin brokoli ekstresi ile kaplanmasıyla, ekstrenin bakteri üzerine herhangi bir morfolojik etkisi yaratmadığı gözlemlenmiştir.

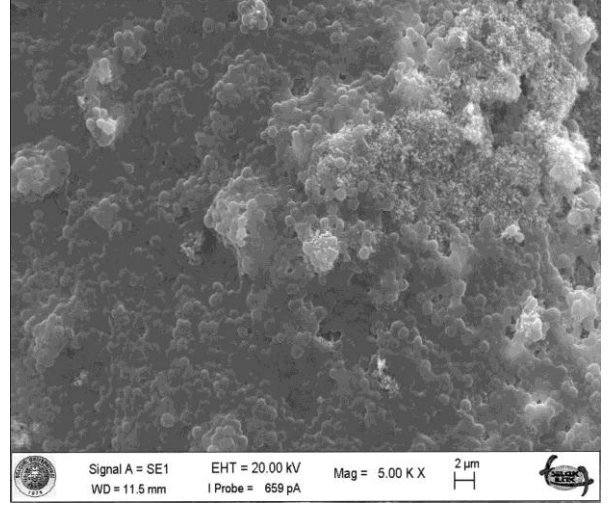


Şekil 4.16. Brokoli kaplı CaHA disklerinin 4. Hafta sonunda çekilmiş SEM görüntüleri.

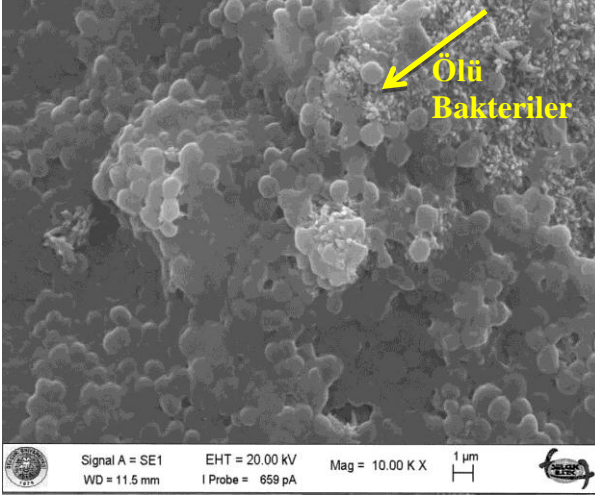
2 µm Mag: 5.00 KX



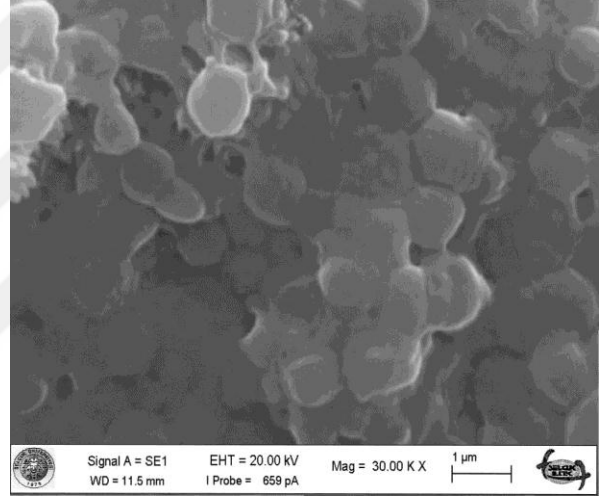
2 µm Mag: 5.00 KX



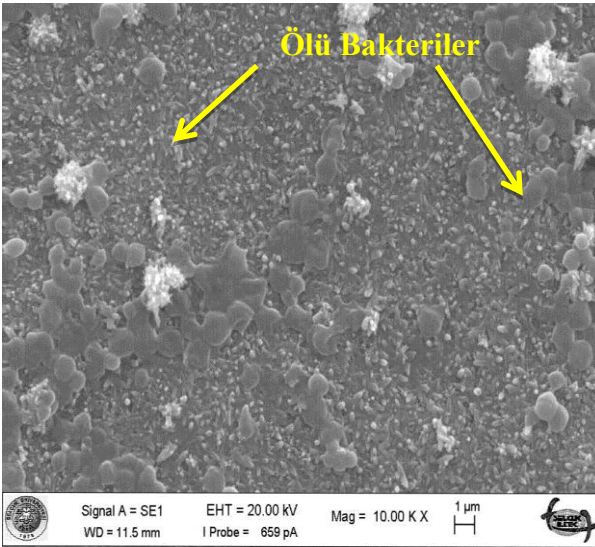
1 µm Mag: 10.00 KX



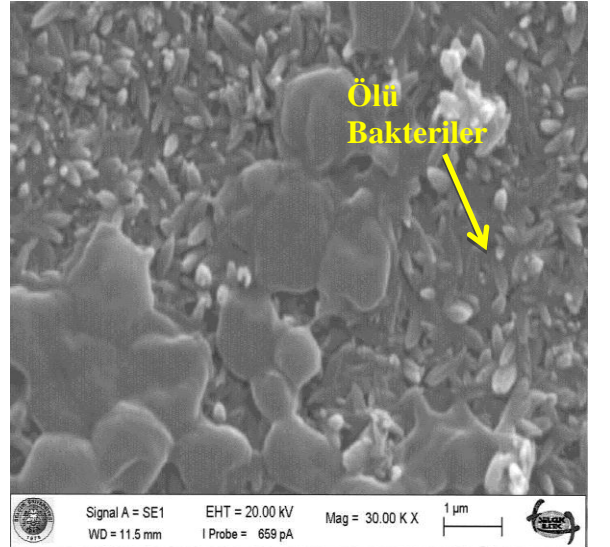
1 µm Mag: 30.00 KX



1 µm Mag: 10.00 KX



1 µm Mag: 30.00 KX



Şekil 4.16. Devamı. Brokoli kaplı CaHA disklerinin 4. hafta sonunda çekilmiş SEM görüntüleri.

4.3.4 CaHA Disklerinin Koyun Kanlı Agar Üzerindeki Çalışma Sonuçları

CaHA diskler üzerinde yapılan antimikrobiyal çalışma sonunda kanlı agar testi uygulandığında sonuçlar Şekil 4.17’de verilmiştir.

Sonuçlardan da görüldüğü üzere brokoli ekstresinin bakteri üremesini engelleyici yönde olumlu bir etkisi olmadığı görülmektedir.



Şekil 4.17. Koyun kanlı agar üzerinde yapılan çalışma sonuçları.

4. TARTIŞMA

Günümüzde sıklıkla kullanılan besinlerden biri olan brokolinin oral ortamda oluşan biyofilm üzerine etkilerinin incelenmeye çalışıldığı bu çalışmada, brokoli üzerine yapılan biyofilm çalışmalarıyla birlikte antimikrobiyal testlerde takip edilmiştir. Literatürlere bakıldığında ağız içerisinde meydana gelen bakteriyel rahatsızlıkların çeşitli kimyasal ve bitkiler ile önlenebileceği görülmüştür. Bu çalışmada da bunlara benzer olarak brokoli ekstresinin etkileri incelenmiş, fakat biyofilm oluşumunun etkilemediği görülmüştür.

Antimikrobiyal duyarlılık testi için mikrodilüsyon yöntemi kullanılır iken, biyofilm oluşumunun incelenmesi için tüp yöntemi ve disk üzerinde biyofilm oluşturma yöntemleri üzerinde çalışılmıştır. Çalışmada kullanılan bakteriler: *Streptococcus mutans* RSHM 676, *Lactobacillus casei* RSHM 900, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica subsp. Enterica* ATCC 13076'dır.

Çalışmada, brokoli ekstresinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Lactobacillus casei* RSHM 900, *Streptococcus mutans* RSHM 676 suşları üzerine antimikrobiyal aktivite tespit edilmemiştir. *Streptococcus mutans* RSHM 676, *Lactobacillus casei* RSHM 900, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica subsp. Enterica* ATCC 13076 suşları üzerinde yapılan tüp deneyi ile biyofilm oluşturma çalışmaları pozitif sonuç vererek bakterilerin hepsi biyofilm yapısını oluşturmuşlardır. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde yapılan disk çalışmalarında ise, brokoli ekstresinin uygulandığı gruplar ile pozitif kontrol gruplarındaki üremeler ile farklılıklara rastlanmamıştır. Farklı bakteriler üzerine yapılan çalışmalarda brokoli ekstresinin biyofilm oluşumuna karşı anti etki göstermediği sonucu görülmüştür.

Yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde brokoli ekstresinin içerisinde bulunan fenolik ve flavonoid bileşiklerinin daha aktif hale geçebilmesi için ekstraksiyon işlemlerinde mikrodalga yöntemi kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. ve Dewhirst, F. E., 2005, Defining the normal bacterial flora of the oral cavity, *Journal of clinical microbiology*, 43 (11), 5721-5732.
- Abdulah, R., Faried, A., Kobayashi, K., Yamazaki, C., Suradji, E. W., Ito, K., Suzuki, K., Murakami, M., Kuwano, H. ve Koyama, H., 2009, Selenium enrichment of broccoli sprout extract increases chemosensitivity and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells, *BMC cancer*, 9 (1), 1.
- Afshar, A., Ghorbani, M., Ehsani, N., Saeri, M. ve Sorrell, C., 2003, Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite, *Materials & Design*, 24 (3), 197-202.
- Al-Ahmad, A., Wunder, A., Auschill, T. M., Follo, M., Braun, G., Hellwig, E. ve Arweiler, N. B., 2007, The in vivo dynamics of Streptococcus spp., Actinomyces naeslundii, Fusobacterium nucleatum and Veillonella spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization, *Journal of medical microbiology*, 56 (5), 681-687.
- Allison, D. G., 2003, The biofilm matrix, *Biofouling*, 19 (2), 139-150.
- Altun, H. U. ve Şener, B., 2008, Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.
- Ambrosone, C. B., McCann, S. E., Freudenheim, J. L., Marshall, J. R., Zhang, Y. ve Shields, P. G., 2004, Breast cancer risk in premenopausal women is inversely associated with consumption of broccoli, a source of isothiocyanates, but is not modified by GST genotype, *The Journal of nutrition*, 134 (5), 1134-1138.
- Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Brex, M., Reich, E., Sculean, A. ve Netuschil, L., 2002, The effect of dental restorative materials on dental biofilm, *European journal of oral sciences*, 110 (1), 48-53.
- Avila, M., Ojcius, D. M. ve Yilmaz, Ö., 2009, The oral microbiota: living with a permanent guest, *DNA and cell biology*, 28 (8), 405-411.
- Baskın, H., 2005, Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: 'quorum sensing' (çoğunluğu algılama). Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi 9-10.
- Bekki, S., 2010, Kekik Yağı, Yaban Mersini Suyu, Lahana Suyu ve Brokoli Suyunun İn Vitro Koşullarda Antibakteriyel ve Sitotoksik Etkilerinin Araştırılması, *Cumhuriyet Üniversitesi*.
- Bilgehan, H., 1995, Klinik mikrobiyoloji: Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları,(uygulama konuları ile), Fakülteler Kitapevi, Barış yayımları, p.
- Bowden, G. ve Li, Y., 1997, Nutritional influences on biofilm development, *Advances in Dental Research*, 11 (1), 81-99.
- Bronzino, E. J. D., 2000, Billotte, WG "Ceramic Biomaterials." The Biomedical Engineering Handbook: Ed. Joseph D. Bronzino Boca Raton: CRC Press LLC, 2000.
- Carlen, A., Nikdel, K., Wennerberg, A., Holmberg, K. ve Olsson, J., 2001, Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin, *Biomaterials*, 22 (5), 481-487.
- Carpentier, B. ve Cerf, O., 1993, Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *Journal of Applied Bacteriology*, 75 (6), 499-511.

- Chemat, F. ve Khan, M. K., 2011, Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction, *Ultrasonics sonochemistry*, 18 (4), 813-835.
- Christensen, G. D., Simpson, W., Younger, J., Baddour, L., Barrett, F., Melton, D. and Beachey, E., 1985, Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices, *Journal of clinical microbiology*, 22 (6), 996-1006.
- Clarke, J. K., 1924, On the bacterial factor in the aetiology of dental caries, *British journal of experimental pathology*, 5 (3), 141.
- Cloak, O. M., Solow, B. T., Briggs, C. E., Chen, C.-Y. ve Fratamico, P. M., 2002, Quorum sensing and production of autoinducer-2 in *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157: H7, and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in foods, *Applied and environmental microbiology*, 68 (9), 4666-4671.
- Corbridge, D. E., 1990, Phosphorus: an outline of its chemistry, biochemistry and technology, In: Phosphorus: an outline of its chemistry, biochemistry and technology, Eds: Elsevier, p.560.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. ve Lappin-Scott, H. M., 1995, Microbial biofilms—Annu, *Rev. Microbio*, 49, 711-745.
- Cramton, S. E., Gerke, C., Schnell, N. F., Nichols, W. W. ve Götz, F., 1999, The intercellular adhesion (ica) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation, *Infection and immunity*, 67 (10), 5427-5433.
- Çakmak S., 2015, Kemik Doku Onarımı İçin Hidroksiapatit/Peptit Amfifil Bazlı Nanokompozit Doku İskelelerinin Geliştirilmesi, *Hacettepe Üniversitesi Ankara. Çiftçi, Z., 2005, Kronik tonsillitte biyofilmin rolü, Uzmanlık tezi, Taksim Eğitim Araştırma Hastanesi, İstanbul.*
- Danhorn, T. ve Fuqua, C., 2007, Biofilm formation by plant-associated bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 401-422.
- Davey, M. E. ve O'toole, G. A., 2000, Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics, *Microbiology and molecular biology reviews*, 64 (4), 847-867.
- Davis, C., Wagle, N., Anderson, M. ve Warren, M., 1991, Bacterial and fungal killing by iontophoresis with long-lived electrodes, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (10), 2131-2134.
- Demir, C. ve Inanc, B. B., 2015, Investigate Nasal Colonize *Staphylococcus* Species Biofilm Produced, *Journal of Clinical and Analytical Medicine*, 6 (4), 414-418.
- Donlan, R. M. ve Costerton, J. W., 2002, Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms, *Clinical microbiology reviews*, 15 (2), 167-193.
- Elder, M. J., Stapleton, F., Evans, E. ve Dart, J. K. G., 1995, Biofilm-related infections in ophthalmology, *Eye*, 9 (1), 102-109.
- Erdem, A. P., 2006, *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* biyofilmlerinde üç farklı florid verniğinin florid konsantrasyonlarının ve antibakteriyel etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, *İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul.
- Ergün, Y., Başpınar, M. S., Taktak, Ş. ve Evcin, A., 2015, Tıtanium Yüzeyine Sol-Jel Yöntemiyle Hidroksiapatit Kaplanması.
- Evcin, A., Kepekçi, D. B. ve Barut, İ., 2009, Hidroksiapatit tozlarının plazma sprej yöntemiyle paslanmaz çelik üzerine kaplanması, 5. *Uluslararası İleri Teknolojiler Sempozyumu (IATS'09)*, Karabük.
- Ferreres, F., Valentão, P., Llorach, R., Pinheiro, C., Cardoso, L., Pereira, J. A., Sousa, C., Seabra, R. M. ve Andrade, P. B., 2005, Phenolic compounds in external leaves of tronchuda cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *costata* DC), *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (8), 2901-2907.

- Flemming, H.-C. ve Wingender, J., 2010, The biofilm matrix, *Nature Reviews Microbiology*, 8 (9), 623-633.
- Foster, T. J. ve Höök, M., 1998, Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*, *Trends in microbiology*, 6 (12), 484-488.
- Fraud, S., Maillard, J. Y., Denyer, S. P., Kaminski, M. ve Hanlon, G., 2007, A simulated oral hygiene model to determine the efficacy of repeated exposure of amine oxide on the viability of *Streptococcus mutans* biofilms, *European journal of oral sciences*, 115 (1), 71-76.
- Goldman, P., 2001, Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology, *Annals of internal medicine*, 135 (8_Part_1), 594-600.
- Gümüşderelioğlu, M., 2002, Biyomalzemeler, *Bilim ve Teknik Dergisi, TÜBİTAK, Temmuz özel sayısı*.
- Hajishengallis, G. ve Michalek, S., 1999, Current status of a mucosal vaccine against dental caries, *Oral microbiology and immunology*, 14 (1), 1-20.
- Hamada, S. ve Slade, H. D., 1980, Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*, *Microbiological reviews*, 44 (2), 331.
- Hanlon, N., Coldham, N., Gielbert, A., Kuhnert, N., Sauer, M. J., King, L. J. ve Ioannides, C., 2008, Absolute bioavailability and dose-dependent pharmacokinetic behaviour of dietary doses of the chemopreventive isothiocyanate sulforaphane in rat, *British Journal of Nutrition*, 99 (03), 559-564.
- Harrison, J., Turner, R., Marques, L. ve Ceri, H., 2005, A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology, *Am Sci*, 93 (6), 508-515.
- Hasret, E., 2010, Hidroksiapatit sentezi, Karakterizasyonu ve Adsorban Özelliğinin İncelenmesi *İstanbul Teknik Üniversitesi*.
- Hayek, E. ve Newesly, H., 1963, Pentacalciummonohydroxyorthoph, *Inorg. Synth*, 7, 63.
- Hench, L. L. ve Wilson, J., 1993, An introduction to bioceramics, World Scientific, p.
- Hunter, P. B., 1988, Risk factors in dental caries, *International dental journal*, 38 (4), 211-217.
- Hussain, M., Wilcox, M. ve White, P., 1993, The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence, *FEMS microbiology reviews*, 10 (3-4), 191-208.
- İpekoğlu, M., 2004, Effects of particle size and sintering parameters on the mechanical properties of hydroxyapatite, *Boğaziçi Üniversitesi*, İstanbul.
- Jacob, M., 2006, Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque, *Odontology*, 94 (1), 1-9.
- Jayaraman, A. ve Wood, T. K., 2008, Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 10, 145-167.
- Jefferson, K. K., 2004, What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS microbiology letters*, 236 (2), 163-173.
- Johansen, C., Falholt, P. ve Gram, L., 1997, Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilms, *Applied and environmental microbiology*, 63 (9), 3724-3728.
- Kempner, E. ve Hanson, F., 1968, Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*, *Journal of bacteriology*, 95 (3), 975-979.
- Kives, J., Orgaz, B. ve SanJosé, C., 2006, Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 52 (2), 123-127.

- Kolter, R., Siegele, D. A. ve Tormo, A., 1993, The stationary phase of the bacterial life cycle, *Annual Reviews in Microbiology*, 47 (1), 855-874.
- Kong, L., Ma, J. ve Boey, F., 2002, Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process, *Journal of materials science*, 37 (6), 1131-1134.
- Kumar, C. G. ve Anand, S., 1998, Significance of microbial biofilms in food industry: a review, *International journal of food microbiology*, 42 (1), 9-27.
- Kumta, P. N., Sfeir, C., Lee, D.-H., Olton, D. ve Choi, D., 2005, Nanostructured calcium phosphates for biomedical applications: novel synthesis and characterization, *Acta Biomaterialia*, 1 (1), 65-83.
- Kürkçüoğlu, I. ve Sammons, R. L., 2010, Investigation of the influence of phosphatase activity of staphylococcus on the dissolution of a synthetic hydroxyapatite biomaterial.
- Lamont, R. J. ve Jenkinson, H. F., 2010, Oral microbiology at a glance, John Wiley & Sons, p.23.
- Lasa, I. ve Penadés, J. R., 2006, Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation, *Research in microbiology*, 157 (2), 99-107.
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R. ve Lasa, I., 2006, Biofilm-associated proteins, *Comptes Rendus Biologies*, 329 (11), 849-857.
- Leme, A. P., Koo, H., Bellato, C., Bedi, G. ve Cury, J., 2006, The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation—new insight, *Journal of dental research*, 85 (10), 878-887.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M. ve Faille, C., 2010, Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry, *Biofouling*, 26 (4), 421-431.
- Lin, J., Kamat, A., Gu, J., Chen, M., Dinney, C. P., Forman, M. R. ve Wu, X., 2009, Dietary intake of vegetables and fruits and the modification effects of GSTM1 and NAT2 genotypes on bladder cancer risk, *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 18 (7), 2090-2097.
- Lin, L.-Z. ve Harnly, J. M., 2009, Identification of the phenolic components of collard greens, kale, and Chinese broccoli, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (16), 7401-7408.
- Lindsay, D. ve Von Holy, A., 2006, Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know, *Journal of Hospital Infection*, 64 (4), 313-325.
- López-Berenguer, C., Martínez-Ballesta, M. a. d. C., Moreno, D. A., Carvajal, M. ve García-Viguera, C., 2009, Growing hardier crops for better health: salinity tolerance and the nutritional value of broccoli, *Journal of agricultural and food chemistry*, 57 (2), 572-578.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J. ve Magny, P., 1990, Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times, *Journal of Food Protection*®, 53 (9), 742-746.
- Mahon, C. R., Lehman, D. C., Manuselis Jr, G., 2014, Textbook of diagnostic microbiology, Elsevier Health Sciences.
- Marsh, P., 1995, The role of microbiology in models of dental caries, *Advances in Dental Research*, 9 (3), 244-254.
- Marsh, P., 2005, Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style, *Journal of clinical periodontology*, 32 (s6), 7-15.
- Marsh, P. D. ve Nyvad, B., 2008, The oral microflora and biofilms on teeth, In: Dental Caries, Eds: Blackwell Publishing Ltd, p.

- Molobela, I. P., Cloete, T. E. ve Beukes, M., 2010, Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria.
- Moreno, D. A., Carvajal, M., López-Berenguer, C. ve García-Viguera, C., 2006, Chemical and biological characterisation of nutraceutical compounds of broccoli, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41 (5), 1508-1522.
- Mostafa, N. Y., 2005, Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes, *Materials chemistry and physics*, 94 (2), 333-341.
- Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E. ve Mete, Ö., 1999, Temel ve klinik Mikrobiyoloji, *Güneş Kitabevi, Ankara*, 571-577.
- Müller, P., Guggenheim, B. ve Schmidlin, P. R., 2007, Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro, *European journal of oral sciences*, 115 (1), 77-80.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B. ve Foster, K. R., 2009, The sociobiology of biofilms, *FEMS microbiology reviews*, 33 (1), 206-224.
- Nagayoshi, M., Fukuizumi, T., Kitamura, C., Yano, J., Terashita, M. ve Nishihara, T., 2004, Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms, *Oral microbiology and immunology*, 19 (4), 240-246.
- Novick, R. P., 2000, Pathogenicity factors and their regulation, *Gram-positive pathogens. ASM Press, Washington, DC*, 392-407.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. ve Kolter, R., 2000, Biofilm formation as microbial development, *Annual Reviews in Microbiology*, 54 (1), 49-79.
- Onisei, D., Onisei, D., Feier, I., Rusu, D. ve Stratul, S., 2008, The Biofilm: Formation and Removal, *Timisoara Medical Journal.(serie en Internet)*, 1-2.
- Orlovskii, V., Komlev, V. ve Barinov, S., 2002, Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics, *Inorganic Materials*, 38 (10), 973-984.
- Overman, P. R., 2000, Biofilm: a new view of plaque, *The journal of contemporary dental practice*, 1 (3), 1-8.
- Özkan, A., 2011, Plazma polimerizasyon tekniği ile farklı yüzey kararlılığı oluşturulan tıp 4 titanyum implant materyalüne 2 farklı yüzey enerjisine sahip oral streptokokların in vitro adezyonunun incelenmesi, *BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ*.
- Padera, R. F., 2006, Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm, *Cardiovascular Pathology*, 15 (5), 264-270.
- Park, J. B., 1992, Orthopedic prosthesis fixation, *Annals of biomedical engineering*, 20 (6), 583-594.
- Park, J. B. ve Bronzino, J. D., 2002, Biomaterials: principles and applications, crc press.
- Pasinli, A., 2004, Biyomedikal uygulamalarda kullanılan biyomalzemeler, *Makine teknolojileri elektronik dergisi*, 4, 25-34.
- Pasinli, A. ve Aksoy, R. S., 2010, Yapay Kemik Uygulamaları İçin Hidroksiapatit, *Electronic Journal of BioTechnology*, 1 (1), 41-51.
- Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J. ve Hook, M., 1994, MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues, *Annual Reviews in Microbiology*, 48 (1), 585-617.
- Petersen, F. C., Tao, L. ve Scheie, A. A., 2005, DNA binding-uptake system: a link between cell-to-cell communication and biofilm formation, *Journal of bacteriology*, 187 (13), 4392-4400.
- Peterson, R. V. ve Pitt, W. G., 2000, The effect of frequency and power density on the ultrasonically-enhanced killing of biofilm-sequestered *Escherichia coli*, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 17 (4), 219-227.

- Petersson, L. G., Maki, Y., Twetman, S. ve Edwardsson, S., 1991, Mutans streptococci in saliva and interdental spaces after topical applications of an antibacterial varnish in schoolchildren, *Oral microbiology and immunology*, 6 (5), 284-287.
- Piyasena, P., Mohareb, E. ve McKellar, R., 2003, Inactivation of microbes using ultrasound: a review, *International journal of food microbiology*, 87 (3), 207-216.
- Post, J. C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. ve Ehrlich, G. D., 2004, The role of biofilms in otolaryngologic infections, *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*, 12 (3), 185-190.
- Poulsen, L. V., 1999, Microbial biofilm in food processing, *LWT-Food Science and Technology*, 32 (6), 321-326.
- Price, K. R., Casuscelli, F., Colquhoun, I. J. ve Rhodes, M. J., 1998, Composition and content of flavonol glycosides in broccoli florets (*Brassica oleracea*) and their fate during cooking, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77 (4), 468-472.
- Qian, Z., Sagers, R. D. ve Pitt, W. G., 1997, The effect of ultrasonic frequency upon enhanced killing of *P. aeruginosa* biofilms, *Annals of biomedical engineering*, 25 (1), 69-76.
- Reische, D., Lillard, D., Eitenmiller, R., Akoh, C. ve Min, D., 1998, Antioxidants, *Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology.*, 423-448.
- Rogers, J., Dowsett, A., Dennis, P., Lee, J. ve Keevil, C., 1994, Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems, *Applied and environmental microbiology*, 60 (6), 1842-1851.
- Rolland, S. L., McCabe, J. F., Robinson, C. ve Walls, A. W., 2006, In vitro biofilm formation on the surface of resin-based dentine adhesives, *European journal of oral sciences*, 114 (3), 243-249.
- Rosan, B. ve Lamont, R. J., 2000, Dental plaque formation, *Microbes and infection*, 2 (13), 1599-1607.
- Rudney, J., 2000, Saliva and dental plaque, *Advances in Dental Research*, 14 (1), 29-39.
- Safronova, T., Shekhirev, M., Putlyaev, V. ve Tret'yakov, Y. D., 2007, Hydroxyapatite-based ceramic materials prepared using solutions of different concentrations, *Inorganic Materials*, 43 (8), 901-909.
- Sakaguchi, R. L. ve Powers, J. M., 2012, Craig's restorative dental materials, Elsevier Health Sciences, p.
- Sakarya, S., 2005, Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü, *Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve infeksiyon Hastalıkları Kongresi*, 3-8.
- Saraçlı, M. A., 2006, " Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?, *Gülhane Tıp Derg*, 48, 244-250.
- Schachtele, C., 1982, Dental caries: prevention and control, *Stallard RE. A Textbook of Preventive Dentistry, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company*, 241-254.
- Shahal, Y., Steinberg, D., Hirschfeld, Z., Bronshteyn, M. ve Kopolovic, K., 1998, In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials, *Journal of oral rehabilitation*, 25, 52-58.
- Shaw, J., 1982, Etiology of dental caries: Prevention and control, *Stallard RE. A Textbook of Preventive Dentistry, 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders Company*, 32-49.
- Simoes, M., Simões, L. C. ve Vieira, M. J., 2010, A review of current and emergent biofilm control strategies, *LWT-Food Science and Technology*, 43 (4), 573-583.

- Socransky, S. S. ve Haffajee, A. D., 2002, Dental biofilms: difficult therapeutic targets, *Periodontology* 2000, 28 (1), 12-55.
- Steinberg, D., Mor, C., Dogan, H., Zacks, B. ve Rotstein, I., 1999, Effect of salivary biofilm on the adherence of oral bacteria to bleached and non-bleached restorative material, *Dental Materials*, 15 (1), 14-20.
- Şimşek, N. ve Bulut, E. T., 2012, Biyofilm ve Endodonti: Bölüm 1, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* (2), 1-5.
- Takarroumt, N., Kacimi, M., Bozon-Verduraz, F., Liotta, L. F. ve Ziyad, M., 2013, Characterization and performance of the bifunctional platinum-loaded calcium-hydroxyapatite in the one-step synthesis of methyl isobutyl ketone, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 377, 42-50.
- Tanker, M. ve Tanker, N., 1990, Farmakognozi Cilt 2, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları* (65).
- Thomas, J. G. ve Nakaishi, L. A., 2006, Managing the complexity of a dynamic biofilm, *The Journal of the American Dental Association*, 137, S10-S15.
- Thurnheer, T., Van der Ploeg, J., Giertsen, E. ve Guggenheim, B., 2006, Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro, *Caries research*, 40 (2), 163-171.
- Todar, K., 2013, Structure and function of bacterial cells.
- Tormo, M. A., Knecht, E., Götz, F., Lasa, I. ve Penades, J. R., 2005, Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer?, *Microbiology*, 151 (7), 2465-2475.
- Torun M, Kiraz N, 2011, Gram pozitif koklar. İçinde: Samantu M, editörler. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı. 2 baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi yayınları, s. 775-791.
- Tré-Hardy, M., Vanderbist, F., Traore, H. ve Devleeschouwer, M. J., 2008, In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures, *International journal of antimicrobial agents*, 31 (4), 329-336.
- Uyen, M., Busscher, H. J., Weerkamp, A. H. ve Arends, J., 1985, Surface free energies of oral streptococci and their adhesion to solids, *FEMS microbiology letters*, 30 (1-2), 103-106.
- Vallejo, F., Tomás-Barberán, F. A. ve García-Viguera, C., 2002, Potential bioactive compounds in health promotion from broccoli cultivars grown in Spain, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (11), 1293-1297.
- Van Houte, J., 1994, Role of micro-organisms in caries etiology, *Journal of dental research*, 73 (3), 672-681.
- Vancraeynest, D., Hermans, K. ve Haesebrouck, F., 2004, Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs, *Veterinary microbiology*, 103 (3), 241-247.
- Vural, H., Eşiyok, D. ve Duman, İ., 2000, Kültür Sebzeleri (Sebze Yetiştirme) Ege Üniv, *Zir. Fak. Bahçe Bit. Böl., İzmir*.
- Wintermantel, E., Mayer, J., Blum, J., Eckert, K.-L., Lüscher, P. ve Mathey, M., 1996, Tissue engineering scaffolds using superstructures, *Biomaterials*, 17 (2), 83-91.
- Yang, Z., Jiang, Y., Wang, Y., Ma, L. ve Li, F., 2004, Preparation and thermal stability analysis of hydroxyapatite derived from the precipitation process and microwave irradiation method, *Materials Letters*, 58 (27), 3586-3590.
- Yüksel, A., 2006, Yaygın nasal polipozis hastalarında biyofilm oluşumunun araştırılması, Uzmanlık tezi, *Gazi Üniversitesi Ankara*.

Zijngel, V., van Leeuwen, M. B. M., Degener, J. E., Abbas, F., Thurnheer, T., Gmür, R. & van't Hof-Grootenboer, H. J., 2010, Oral biofilm architecture on natural teeth, *PloS one*, 5 (2), e9321.



ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ayşegül YAMAN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : MERAM / 11.03.1991
Telefon : 05547539059
Faks : -
e-mail : aysegul.yaman@hotmail.com.tr

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Muhittin Güzelkılınç Lisesi, Meram, KONYA	2009
Üniversite	: Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü, Selçuklu, KONYA	2014
Yüksek Lisans	: Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Selçuklu, KONYA	Devam Ediyor
Doktora	:	

YABANCI DİLLER İngilizce

YAYINLAR

- A. Yaman, G. Arslan, S. Karakurt, “Investigation of Anticarcinogen Properties of Helianthus Tuberosus on Human Colon Cancer”, 1st International Black Sea Congress on Environmental Sciences (IBCESS), PP28 poster presentation, p.241, 31 August-03 September 2016, Giresun, Turkey.
- A., Yaman, G., Arslan, S., Karakurt, İnsan Kolon Kanseri DLD-1 Hücrelerinin Proliferasyonu Üzerine Primula veris Metanol Ekstrelerinin Etkilerinin İncelenmesi, 23. Ulusal Biyoloji Kongresi, Poster Sunum, PS-77, 05-09 Eylül 2016, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep.
- A., Yaman, G., Arslan, S., Karakurt, Hidroksiapatit Disk Üzerine Uygulanacak Brokoli Ekstraktının Güvenli Kullanımının Belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Poster Sunum, 18-19 Aralık 2015, Konya.
- Brokoli Ekstrelerinin İnsan Ağız Epitel Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkileri, S. Ü. BAP Proje No: 16401119, Yardımcı Araştırmacı, 2016-Devam ediyor.