

# Nanoteknolojik dezenfektanların heterotrofik biyofilmler üzerine etkisi

## The efficacy of nanotechnological disinfectants on heterotrophic biofilms

Gökçe YAVUZ<sup>1</sup>, İrfan TÜRETGEN<sup>1</sup>

### ÖZET

**Amaç:** Gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür mikroorganizmalara karşı etkin olduğu bilinen biyosidal ajanlardır. Planktonik hücreler bu ajanlardan kolay etkilenmelerine rağmen biyofilm içindeki bakteriler aynı kimyasallara karşı daha dayanıklı olmaktadır. Öte yandan, nano tanecikler üzerine fikse edilmiş ajanların ise biyofilm bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinliğinin yüksek olduğu bildirilmektedir. Fakat nanoteknolojik dezenfektanların doz ve süresinin biyofilm bakterilerine etkileri değişiklik göstermektedir. Bu dezenfektanların püskürtüldüğü yüzeylerin tipi de etkinliklerini değiştirmektedir. Bu çalışmada, piyasaya sürülecek olan nano partiküllere immobilize edilmiş gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum'un yüzeylere tutunma yeteneklerinin ve biyofilm tabakası üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Paslanmaz çelik kuponlar üzerine üretici firmadan temin edilen nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin püskürtülüp 24 saat küreşmesi beklenmiş, ardından kuponlar biyofilm reaktörüne konulmuştur. Birer aylık aralıklarla bu yüzeylerde oluşan biyofilm tabakasındaki bakteri sayıları, dezenfektan ile kaplanmamış kontrol kuponlarıyla kıyaslanarak

### ABSTRACT

**Objective:** Silver sulfadiazine and benzalkonium chloride are biocidal agents known to be effective against microorganisms. Although planktonic cells are easily affected by these agents, bacteria in the biofilm are more resistant to the same chemicals. Agents fixed on nanoparticles are reported to have higher antimicrobial activity against biofilm bacteria. The effects of nanotechnological disinfectants on biofilm bacteria vary with dose and time. The type of surface on which these disinfectants are sprayed also changes their activity. The aim of this study was to investigate the ability of silver sulfadiazine and benzalkonium immobilized on nanoparticles to adhere to surfaces and their effect on biofilm.

**Methods:** Stainless steel coupons were sprayed with nano benzalkonium chloride and nano silver sulfadiazine were air-dried to cure for 24 hours, then the coupons were placed into the biofilm reactor. Bacterial counts in the biofilm layer formed on these surfaces were compared at monthly intervals with control coupons. Bacterial biofilms allowed to form naturally were analyzed by microbiological culture methods and number of live and dead microorganisms were

<sup>1</sup>İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İstanbul



İletişim / Corresponding Author : İrfan TÜRETGEN

İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Fatih, İstanbul - Türkiye  
Tel : +90 535 966 20 77 E-posta / E-mail : turetgen@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi / Received : 19.12.2017  
Kabul Tarihi / Accepted : 16.05.2018

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2018.57778

Yavuz G, Türetgen İ. Nanoteknolojik dezenfektanların heterotrofik biyofilmler üzerine etkisi.  
Turk Hij Den Biyol Derg, 2018; 75(4): 323-332

incelenmiştir. Doğal şekilde oluşumuna imkân verilen biyofilm içinde çoğalan bakteriler mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile sayılmış, ayrıca ölü ve canlı mikroorganizmaların sayıları DAPI - CTC boyama ile epifloresan mikroskopta sayıları tespit edilmiştir.

**Bulgular:** Deneş şartları altında mikrobiyal kültür ve DAPI - CTC (ölü-canlı) boyama sonuçlarına göre deneş kuponlarında anlamlı ölçüde düşük oranda biyofilm tabakası oluştuğu tespit edilmiştir. Ayrıca nano benzalkonyum klorür, nano gümüş sülfadiazine kıyasla biyofilm bakterilerine karşı anlamlı düzeyde daha etkili bulunmuştur.

**Sonuç:** Nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin bileşiklerinin tutunduğu yüzeylerde biyofilm oluşumunu gözlemek ve bu sayede dezenfektanların antimikrobiyal yüzey oluşturmak amacıyla endüstride ve klinik alanlarda yer alması için sonuçlar değerlendirilmiştir. Bu dezenfektanlar endüstriyel veya klinik ortamlarda sıkça kullanılmaktadır. Çalışma sonuçları üretici firmaya odaklanması gereken ürün hakkında önemli katkı sağlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Dezenfeksiyon, nanoteknoloji, benzalkonyum klorür, gümüş sülfadiazin, biyofilm

determined by DAPI - CTC staining on epifluorescence microscope.

**Results:** After the test periods, microbial culture and DAPI - CTC (live / dead) results were found significantly lower on disinfectant covered coupons. Furthermore, nano benzalkonium chloride was found to be significantly more effective against biofilm bacteria than nano silver sulfadiazine.

**Conclusion:** The results were examined in order to observe biofilm formation on the surfaces covered with nano benzalkonium chloride and nano silver sulfadiazine compounds, to evaluate their use in industrial and clinical fields as effective disinfectants. Because these disinfectants are frequently used in industrial or clinical environments, results have made an important contribution to the manufacturer to focus on final version of the product.

**Key Words:** Disinfections, nanotechnology, benzalkonium chloride, silver sulfadiazine, biofilm

## GİRİŞ

Biyofilm, mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, herhangi bir yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan, büyüme oranları ve gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen mikroorganizmaların, hücre dışı polimerik maddeden oluşmuş matriks içinde gömülü olarak bulunduğu tabaka olarak tanımlanmıştır (1).

Ancak bir yüzeye tutunarak koloniler halinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar,

buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler. Bunlar biyofilm içerisindeki bakterilerde gösterilen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özelliklere sahip değildir. Oysa biyofilm içerisindeki bakterilerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları, planktonik formda olmalarına rağmen ayrıldıkları topluluğun direnç karakterlerini taşıdığı bildirilmiştir (2). Biyofilmler canlı veya cansız yüzeyler üzerinde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları ve

doğal akuatik sistemler yer alır. Biyofilm oluşumunda hücrel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri de bulunabilir (3). Biyofilmler endüstriyel su sistemleri ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, artık tıptaki önemi sadece dişteki plaklardan ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere, birçok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (4). Bu sebeplerden dolayı biyofilm ile etkin şekilde mücadele etmek kaçınılmaz olmuştur.

Gümüş içeren preparatların su dezenfeksiyonunda, yanıkların ve kronik ülserlerin tedavisinde kullanımının milattan önce 1000'li yıllara kadar uzandığı bilinmektedir. 1800'lü yıllarda gümüşün göz damlası olarak kullanıldığı, daha sonra penisilin bulunmasıyla beraber kullanımın azaldığı, ancak 1960'lı yıllarda %0.5'lik gümüş nitrat çözeltisinin yanık tedavisinde tekrar yaygın olarak kullanılmaya başlanıldığından bahsedilmektedir. Bu yıllarda gümüşün *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* gibi bakterilere karşı etkinliği kanıtlanmıştır. 1968 yılında gümüş nitrat sülfonamidle kombine edilerek gümüş sülfadiazin krem elde edilmiştir. Bu krem pek çok mikroorganizmaya karşı etkili olması nedeniyle yanık tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Literatürde gümüş sülfadiazinin *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella* ve *Pseudomonas* gibi bakterilere karşı etkin olduğu ayrıca antifungal ve antiviral etkinliklere de sahip olduğundan bahsedilmektedir (5). %1'lik gümüş nitrat çözeltisi halen yeni doğan bebeklerde çeşitli amaçlarla göz antiseptiği olarak kullanılmaktadır (6). Günümüzde antibiyotiğe dirençli bakterilere karşı farklı miktarlarda gümüş içeren yara örtüleri kullanılmaktadır (Rai M. ve ark., 2009). Gümüş sülfadiazin gümüş ve sülfadiazinin kombinasyonundan oluşmaktadır ve geniş spektrumlu bir antimikrobiyal maddedir. Gümüş sülfadiazin DNA yapısına zarar vererek mikroorganizmayı öldürmektedir (5).

Kuaterner amonyum bileşikler ise bir grup sürfaktan olup domestik amaçlı, tarımsal alanlarda, klinik ortamlarda ve endüstriyel ürünler gibi

çok geniş alanlarda kullanılmaktadır. Kumaş yumuşatıcıları, kozmetik malzemeleri, gen transfer ajanları, antimikrobiyal ve antikorozyon ajan olarak kullanılmaktadır (7). Kuaterner amonyum bileşikler ilk defa Domagk tarafından 1935 yılında antimikrobiyal ajan olarak sunulmuştur (8). Günümüzde ise dezenfektan ve antiseptik olarak geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte göz, burun koruyucu ve inhalasyon ilaçlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda benzalkonyum klorürün biyosidal aktivitesinin mikroorganizma suşlarının direncini artırdığı ile ilgili sıklıkla raporlar ortaya çıkmaktadır (9, 10) Benzalkonyum klorür kuaterner amonyum bileşiği olan bir ajandır. Evlerde, çiftliklerde ve hastanelerde kullanılan bu ajanın konsantrasyonu %0.005'den %10'a kadar değişmektedir. Düşük konsantrasyonlarda göz ve burun preparatlarında koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Uygun sulandırma ile cilt, mukoz membran, yara ve yanıkların temizliğinde antiseptik olarak kullanılmaktadır (11). Benzalkonyum klorür, birçok farmasötik formülasyonda, kozmetik ürünlerde, ticari dezenfektanlarda, endüstriyel sanitasyon preparatlarında ve gıda koruyucularında aktif madde olarak kullanılmaktadır (12). Temizleyici maddelerle karıştırılarak hem dezenfeksiyon, hem de temizleme yapmak üzere hastanelerde yerlere, duvarlara, mobilyalara, alet yüzeylerine ve tuvaletlere uygulanırlar. Düşük toksisite ve deterjan özellikleri bu kimyasalları çok iyi sanitasyon ajanı yapar (13).

Benzalkonyum klorür gibi katyonik antiseptik bileşikler uygun dozda kullanıldığında farklı türlerdeki bakteri suşlarının oluşturacağı biyofilmi önleyebilmektedir (14). 10 mg/ml'den daha yüksek konsantrasyonda 30 dk süre ile muamele edilen benzalkonyum klorür, biyofilme bulunan hücreleri öldürmek için yeterli olmaktadır (15). Yapılan bir çalışmada, benzalkonyum klorürün %1'lik solüsyonunun, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına karşı 5. dakikada %100, *P. aeruginosa* suşlarına karşı ise 1. dakikada %40, 5. dakikada %80 etkili olduğu tespit edilmiştir (16).

Başka bir çalışmada benzalkonyum klorürün, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus acidophilus* ve *S. aureus* gibi mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gösterilmiş ve diş tedavisinde restorasyon öncesinde kavitedeki mikroorganizmaların yok edilmesi amacıyla kullanımının uygun olacağı belirtilmiştir (17-19). Ayrıca benzalkonyum klorürün, hem duyarlı hem de dirençli suşlardan oluşan *L. monocytogenes* biyofilm formunu öldürebildiği de gösterilmiştir (20, 21).

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yepyeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir (22). Nanoteknolojinin sağladığı olduğu üstün özelliklerden yararlanılarak çeşitli alanlarda (tıp, elektronik, savunma, tekstil vb.) yeni ürünler elde edilebilmektedir (23). Nanoteknoloji uygulamalarıyla günümüzde kullanılan dezenfektanlar da üretilmektedir. Nanoteknoloji ürünü dezenfektanlarda, nanopartiküllerin kullanılmasıyla klasik malzeme üretiminde kullanılan ve çevreye zarar verebilen kimyasalların kullanımı da engellenmektedir. Nanoteknoloji ürünü sabunlar, temel olarak klasik sabunların fonksiyonlarını yerine getirmekle beraber çeşitli antibakteriyel nanopartiküllerin eklenmesi ile mikrop öldürücü, bazı biyokimyasallarla donatılarak hücre yenileyici, yağ ve kiri daha etkin ve sağlıklı temizleme özelliklerinin artırılması ile ön plana çıkmaktadır (24). Benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının antimikrobiyal etkisi bilinmektedir. Fakat nanoteknolojik benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının biyofilm tabakası içinde bulunan bakterilere karşı etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmada nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının yüzeylere uygulandığında biyofilm oluşumunu nasıl etkiledikleri

gözlenmiştir. Bu bilgiler ışığında, mikrobiyolojik kültür metodu yanında ölü/canlı bakteri boyama ile biyofilm bakterilerinin dezenfektandan ne derece etkilendikleri ölçülerek üretici için ideal dozun doğru tespitine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Biyofilm yoğunluğunun varlığı ve kıyası için EPS (ekstrasellüler polimerik matriks) eldesi yapıp kantitatif olarak miktar da hesaplanmıştır.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyde laminar su akışına ayarlanmış (Reynolds sayısı: 2000) laboratuvar ölçekli biyofilm reaktörü kullanılmıştır. Deney için, hedeflenen sirkülasyonu sağlayacak pompa mevcut olup su sıcaklığını 32°C'de sabit tutacak bir ısıtıcı varlığında dört aylık deney süresince kesintisiz olarak çalıştırılmıştır. Deneyde, biyofilm oluşturulacak yüzey olarak 316 L paslanmaz çelik kuponlar kullanılmıştır. Kuponların sistem içinde herhangi bir yüzeye ve birbirlerine değmeden sabit bir şekilde durabilmeleri için kupon tutucular kullanılmıştır. Deney öncesinde kuponlar %70'lik alkolde 5 dakika bekletilip kurumaya bırakılmıştır. Ardından steril kabin içinde yüzeylere, üreticiden temin edilmiş, piyasaya sürülecek final konsantrasyonlarda nano gümüş sülfadiazin (512 µl/ml) ve nano benzalkonyum klorür (128 µl/ml) püskürtülüp 24 saat bekletilerek dezenfektanların yüzeylerde küreleşmesi sağlanmıştır. Her ay sudan çıkarılan 36 adet kuponda doğal olarak gelişen biyofilm tabakası içindeki bakteri sayıları klasik kültür metodu ve ölü/canlı boyama yöntemi ile kaydedilmiştir. Ayrıca aylık olarak yüzeylerdeki karbonhidrat miktarları, pH, çözünmüş oksijen, toplam çözünmüş madde ve sıcaklık değerleri ölçülmüştür. Su sıcaklığı ölçümleri sabit sıcaklığın kontrolü amacıyla yapılmıştır.

Biyofilm örneklerinin bakteriyolojik açıdan incelenmesi amacıyla aylık olarak sistemden çıkarılan kuponlardan steril eküvyonlar kullanılarak toplanan örnekler, içinde 20 ml fosfat tamponu bulunan steril poşetler içine alınarak stomacher cihazı (UIL Instruments, 200 vuruş/d) ile 90 s süre boyunca

homojenize edilmiştir. Her bir sulandırım için iki adet çelik kupondan alınan sürüntüden üç tekrarlı ekimler yapılmıştır. Aerobik heterotrofik bakterilerin sayısının tespit edilmesi amacıyla selektif olmayan R2A agar besiyerine biyofilm süspansiyonlarından hazırlanan sulandırım serilerinden (direk ekimden  $10^{-2}$ 'ye kadar) 100'er µl ekim yapılmış ve 28°C'de 10 gün inkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılmıştır.

Çalışmada, aktif olarak solunum yapan bakterileri tespit etmek üzere 100 µl CTC boyası ile 20 ml fosfat tamponu ile hazırlanan süspansiyondan alınan 900 ml biyofilm homojenatı steril koşullarda karıştırılmış ve 28°C'de 4 saat süreyle inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda karışıma 110 µl DAPI boyası eklenerek 28°C'de 1 saat daha beklenmiştir. Bekleme işleminin ardından reaksiyonu durdurmak ve homojenizasyonu sağlamak amacı ile filtreden geçirilerek steril edilmiş 3 ml bidistile su eklenip karıştırılmış ve örnek 0.2 mm por çaplı siyah polikarbonat filtreden geçirilmiştir. Filtre havada kurutulmuş ve işlemin ardından lam üzerine yerleştirilerek üzerine immersiyon yağı eklenmiştir. Yağın koyulmasının ardından 100'lük objektifte floresan ışık altında inceleme yapılmıştır (25). Bu yöntem ile canlı bakteriler kırmızı, ölü olanlar mavi renkte görünmektedir.

Polikarbonat membran filtre epifloresan mikroskopta incelenip rastgele 10 farklı alandan fotoğraflar çekilmiştir. Çekilen fotoğraflardan alınan kırmızı (canlı) ve mavi renkli (ölü) sinyaller sayılarak ortalamaları alınmıştır. Daha sonra birim yüzeye ulaşmak amacıyla ortalamalar katsayılarla çarpılarak santimetrekaredeki sinyal sayısı bulunmuştur.

Yüzeylerde oluşan biyofilm tabakasındaki toplam karbonhidrat miktarının tayini fenol-sülfürik asit yöntemine göre yapılmıştır. Fenol sülfürik asit metodu, çok küçük düzeydeki şekerlerin ve ilişkili maddelerin miktarını tanımlayan bir metottur. Oligosakkarit ve polisakkaritler gibi serbest veya kısmen serbest metil grubu içeren şekerler, fenol ve konsantre sülfürik asit içeren çözelti ile muamele edildiğinde sarı portakal

rengi renk vermektedirler. Gerçekleşen bu reaksiyon çok hassastır ve reaksiyon sonucu oluşan renkler kararlıdır (26).

Ölçüm işleminden önce, deney tüplerine 1 ml biyofilm homojenatı konup üzerlerine örnekte bulunan polisakkaritleri monomerlerine ayırmak amacıyla 1 ml %5'lik fenol eklenmiş ve hemen ardından 5 ml konsantre  $H_2SO_4$  ilave edilerek 10 dk süre ile bekletilerek sarı-portakal rengi halinde renk değişimi gözlenmiştir. Süre sonunda tüpler vorteks ile karıştırılmış ve 25-30°C'lik su banyosunda 10-20 dk soğumaya bırakılmıştır. Bu aşamalarda kullanılan tüp ve cam pipetler karbondihidratı arındırılmak amacı ile kullanım öncesi 24 saat süre ile %10'luk HCl içinde bekletilmiştir. Sonuçlar spektrofotometre cihazında (Shimadzu UV 150-02) 490 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Deneylerin tümü yazarların adres gösterdiği kurumda, 2016-2017 yıllarında yapılmıştır.

Dezenfektan uygulanmayan kontrol kuponları ve dezenfektan uygulanan her iki deney kuponları seti istatistiksel analizler sonrasında 4. ay sonuçları baz alınarak değerlendirilmiştir. Kuponlardaki bakteri sayılarının birbirlerinden anlamlı olarak farklı olup olmadığı, parametrik olmayan Kruskal Wallis Testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlı fark bulununca ikili karşılaştırmalar için Mann Whitney U testi yapılmıştır (SPSS 18, IBM). Değerlendirme sonucunda  $p < 0.05$  olduğunda anlamlı bir farktan bahsedilmiştir.

## BULGULAR

Mikrobiyolojik kültür sonuçlarına göre heterotrofik bakteri sayımı yapılarak, kontrol kuponları üzerinde biyofilmin kalınlaşma sürecinde zamanla doğru orantılı bir artış tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Tablo 1). DAPI-CTC boyama ile yapılan ölü/canlı ayırımında da kontrol kuponlarında canlı bakteri sayılarının 4 ay boyunca arttığı görülmüştür (Tablo 2). Biyofilm tabakası yoğunluğundaki düzenli artış, fenol-sülfürik asit deneyi yardımıyla kontrol kuponlarında toplam organik karbon miktarının artışı ile de gösterilmiştir (Şekil 1).

**Tablo 1.** Nano benzalkonyum klorür, nano gümüş sülfadiazin ve kontrol çelik kuponları üzerinde birim alandaki heterotrofik bakteri sayıları.

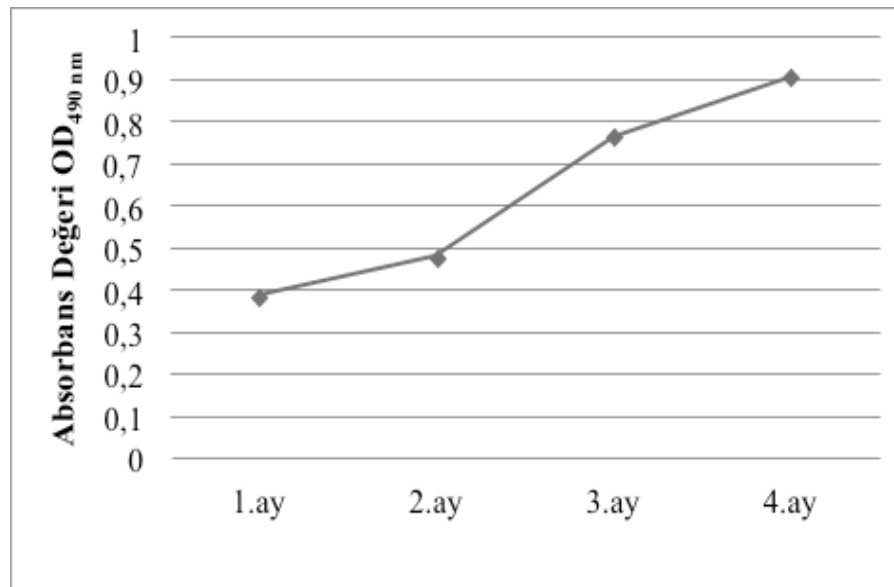
Aylar	Kontrol kuponları	Nano Benzalkonyum Klorür	Nano Gümüş Sülfadiazin
	Heterotrofik Bakteri Sayısı KOB/cm <sup>2</sup>	Heterotrofik Bakteri Sayısı KOB/cm <sup>2</sup>	Heterotrofik Bakteri Sayısı KOB/cm <sup>2</sup>
1	6600 ± 110	2700 ± 90	3900 ± 70
2	14500 ± 240	3000 ± 140	12500 ± 90
3	18900 ± 420	4000 ± 150	16500 ± 140
4	25000 ± 440	6000 ± 180	20500 ± 220

Bakteri sayıları 3 farklı sulandırım serisinden yapılan üçer tekrarlı ekimlerden kaydedilen sayıların ortalaması ve standart sapmasıdır (KOB: Koloni Oluşturan Birim).

**Tablo 2.** Nano benzalkonyum klorür, nano gümüş sülfadiazin ve kontrol çelik kuponları üzerinde birim alandaki toplam ve canlı sayıları.

Aylar	Kontrol kuponları		Nano Benzalkonyum Klorür		Nano Gümüş Sülfadiazin	
	Toplam Sinyal Sayısı/cm <sup>2</sup>	Canlı Sinyal Sayısı/cm <sup>2</sup>	Toplam Sinyal Sayısı/cm <sup>2</sup>	Canlı Sinyal Sayısı/cm <sup>2</sup>	Toplam Sinyal Sayısı/cm <sup>2</sup>	Canlı Sinyal Sayısı/cm <sup>2</sup>
1	2.79x10 <sup>4</sup> ± 399	1.92 x10 <sup>4</sup> ± 675	4.19 x10 <sup>4</sup> ± 315	1.30 x10 <sup>2</sup> ± 123	4.14 x10 <sup>4</sup> ± 168	1.41 x10 <sup>3</sup> ± 691
2	2.80x10 <sup>5</sup> ± 603	2.90x10 <sup>4</sup> ± 183	2.63 x10 <sup>5</sup> ± 476	4.67 x10 <sup>3</sup> ± 136	3.70 x10 <sup>5</sup> ± 122	9.32 x10 <sup>4</sup> ± 399
3	2.10x10 <sup>7</sup> ± 126	2.95 x10 <sup>7</sup> ± 130	2.11 x10 <sup>7</sup> ± 193	1.40 x10 <sup>3</sup> ± 484	3.44 x10 <sup>7</sup> ± 159	1.70 x10 <sup>5</sup> ± 160
4	3.40 x10 <sup>7</sup> ± 230	3.09x10 <sup>7</sup> ± 707	1.93 x10 <sup>7</sup> ± 152	2.04 x10 <sup>3</sup> ± 169	4.24x10 <sup>7</sup> ± 192	1.46 x10 <sup>5</sup> ± 112

Sinyal sayıları rasgele seçilmiş 10 farklı alandan alınan sayıların ortalamasıdır.

**Şekil 1.** Kontrol kuponları üzerinde oluşan biyofilm tabakasından fenol-sülfürik asit yöntemi ile karbonhidrat miktarı ölçümleri.

Mikrobiyolojik kültür sonuçları itibarıyla dört ay sonunda nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin ile kaplanmış kuponlarda kontrol kuponlarına kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük sayılarda heterotrofik bakteri sayısı tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ). Hem kontrol hem de deney kuponlarında aydan aya bakteri sayılarında düzenli artış olsa da, dezenfektan kaplı kuponlarda aktif maddelerden dolayı daha düşük sayıda kolonizasyon gözlenmiştir. İki dezenfektan 4. ayda birbirine karşı kıyaslandığında ise, nano benzalkonyum klorür ile kaplanmış kuponlardaki bakteri sayıları nano gümüş sülfadiazin kaplanmış kuponlardakine oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Ölü/canlı bakteri sayımı baz alınarak elde edilen epifloresan mikroskopi sonuçlarına göre de dezenfektan ile kaplanmış kuponlarda kontrol kuponlarına kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük sayılarda canlı bakteri sinyali tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Tablo 2). Dezenfektan ile kaplanmış kuponların biyofilm tabakasındaki bakteriler üzerinde öldürücü etkisi olduğu açık olarak görülmektedir. Öte yandan, dezenfektan kaplı kuponlardan kaydedilen canlı sinyal sayılarının, toplam sinyal sayısına göre anlamlı ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Oysa kontrol kuponlarındaki ölü/canlı toplam bakteri sinyal sayısı ile canlı bakteri sinyal sayısı aynı üstel büyüklüktedir. 4. ay sonunda nano benzalkonyum klorür kaplı kuponlarda toplam sinyal ile canlı sinyal sayıları arasında 4 log fark tespit edilmiştir. Bu fark dezenfektanın etkinliği lehinedir.

İki dezenfektan dört ay sonunda birbiriyle kıyaslandığında, nano benzalkonyum klorür ile kaplanmış kuponlardaki canlı sinyal sayıları nano gümüş sülfadiazin kaplanmış kuponlardakine oranla anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Kontrol kuponlarının üzerinde oluşan biyofilm tabakasındaki karbonhidrat miktarlarının, deney periyodu boyunca arttığı belirlenmiştir (Şekil 1). Kuponlar üzerinde mikroorganizma sayılarının artışına

paralel olarak, biyofilm fenotipindeki bakterilerce hücre dışına salınan polimerik maddelerin miktarı da artarak içinde buldukları tabakayı kalınlaştırmıştır.

Su sıcaklığının dört ay boyunca  $32^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulduğu deney sürecinde reaktör içindeki suyun analiziyle ortalamaları kaydedilen değerler sırasıyla pH 8.1, çözülmüş oksijen miktarı 6.82 mg/l, toplam çözülmüş madde miktarı ise 440 ppm olarak tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA

Benzalkonyum klorür katyonik sürfaktan olup göz damlası, burun damlası ve spreyi gibi birçok farmasötik formüllerde kullanılmaktadır. Benzalkonyum klorürün dezenfektan olarak çelik yüzeylere iyi tutunduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (27). Aynı çalışmada benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin kaplı kuponlara çamaşır suyu, sıcaklık ve yıkama etkenlerinin uygulanmasına rağmen benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının etkisinin azalmadığı bildirilmiştir. Çetinel (28) yaptığı çalışmada benzalkonyum klorürün gümüş sülfadiazine göre bakterilerin planktonik ve biyofilm hallerine çok düşük konsantrasyonda kısa zamanda etki ettiğini belirtmiştir. Bu açıdan o çalışmadaki verilerle uyumlu sonuçlar alınmıştır. Ülkemizde, hatta dünyada bile dezenfektan etkinlik testleri standardize şekilde planktonik bakterilere karşı süspansiyon testi olarak yapılmaktadır. Oysa bir mikroorganizma biyofilm tabakası içinde bulunabilir ve bu tabakanın ona sağladığı avantajları da kullanıyor olabilir. Bu durumda standart testler dezenfektanların gücünü olduğundan daha yüksek gösteriyor denebilir. Bir de bu testlerin alt pasajları yapılmış olan laboratuvar suşları ile yapıldığı düşünülürse sonuçlar daha da tartışılır hale gelmektedir. Bu sebeple, doğal olarak oluşmasına izin verilmiş heterotrofik biyofilmler ile yapılan testlerin gerçek yaşam ortamlarına daha yakın sonuçlar verdiği düşünülmektedir. O nedenle model sistemler ve reaktörler ile yapılan etkinlik testleri günümüzde sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Ne var ki, bilinen



standartlara (ISO, TSE) göre yapılan testler için bu tip alternatifler henüz hak ettiği yerini bulamamıştır.

Yapılan önceki çalışmalar, biyofilm tabakasının model sistemlerde veya reaktörlerde 120-150 gün sonra yarı durağan faza ulaştığını belirtmektedir. (29-31). Yarı-durağan olarak nitelendirilmesinin nedeni ise biyofilm tabakasının sürekli bir dinamiğe sahip oluşudur. Su fazına erozyon ya da dökülme ile sürekli bakteri geçişi olmaktadır. Aynı zamanda üreme devam eder ve bu denge sayıca korunur. Çalışmanın 4 ay süre ile devam ettirilmesinin amacı sonuçların olgun biyofilm tabakasına göre değerlendirilebilmesi olmuştur. Biyofilm disiplinde yapılan çok kısa süreli tutunma ve dezenfektan etkinliği testleri olgun biyofilm tabakalarının verdiği cevabı karşılamamaktadır.

Bu çalışma ile dezenfektanların yüzeylere tutunabilme etkisi araştırılmış olup sonuçlar,

nanoteknolojik benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının endüstriyel ve klinik ortamlardaki çeşitli yüzeylerde kullanılabilmesi amacıyla değerlendirilmiştir. Özellikle endüstriyel tesisler ve cihazlarda biyofilm birikimine bağlı olarak meydana gelebilecek hijyenik ve endüstriyel sıkıntıların kısa veya uzun vadede çözümünde özellikle nano benzalkonyum klorürün etkin olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Çetinol (28), yaptığı çalışmada nanoteknolojik benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının minimum bakterisidal konsantrasyonlarını belirlemiştir. Bu değerler baz alınarak Türkiye’de üretilen ve piyasaya sürülmüş dezenfektanlar içinde etkinliği heterotrofik biyofilme karşı hem klasik mikrobiyolojik kültür hem de ölü/canlı sayımı metodu ile sağlaması yapılarak test edilmiş dezenfektanla ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

## TEŞEKKÜR

Çalışmayı destekleyen İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğine teşekkür ederiz (Proje No: 36337).



## KAYNAKLAR

1. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002; 15 (2): 167 - 93.
2. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis*, 2001; 33: 1387 - 92.
3. Donlan RM. Biofilm and device associated infections. *Emerg Infect Dis*, 2001; 7(2): 277 - 81.
4. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995; 49: 711- 45.
5. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*, 2009; 27: 76-83.
6. Çetin ET. Dezenfeksiyon, Antisepsi, Sterilizasyon, İstanbul Tıp Fakültesi Yayını, İstanbul, 1982.
7. Brycki B, Matecka I, Koziróg A, Otlewska A. Synthesis, structure and antimicrobial properties of novel benzalkonium chloride analogues with pyridine rings. *Molecules*, 2017; 22(1): doi:10.3390/molecules22010130.
8. Domagk G. Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Dtsch Med Wochenschr*, 1935; 61: 829 - 32.
9. Keen PL, Montforts MM. Antimicrobial resistance in the environment. John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA. 2012.
10. Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: Microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr Opin Biotechnol* 2015; 33: 296 - 304.
11. Hardwicke J, Azad S. Temporary henna tattooing in sibling an unusual chemical burn. *Burns*, 2006; 32:1064 - 65.
12. Bilgin M. Çeşitli dezenfektan maddelerin atık sularından izole edilen mikroorganizmalar tarafından parçalanmasının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2011.
13. Özbakkaloğlu B. Hastane Ortamında Kullanılacak Yüzey Dezenfektanları, 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresi, Samsun. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2003,131-8.
14. Houari A, Di Martino P. Effect of chlorhexidine and benzalkonium chloride on bacterial biofilm formation. *Lett Appl Microbiol*, 2007; 45(6):652-6.
15. Romanova NA, Gawande PV, Brovko LY, Griffiths M W. Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *J Microbiol Meth*, 2007; 71: 231-37.
16. Erbay A, Ergönül Ö, Esener H, Colpan A, Dokuzoğuz B. Hastane kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli dezenfektanlara karşı direnci. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 2002; 6: 191- 4.
17. Gultz J, Do L, Boylan R, Kaim J, Scherer W. Antimicrobial activity of cavity disinfectants. *Gen Dent*, 1999; 47(2): 187-90.
18. Özel E, Yurdağülen H, Say EC, Kocagöz S. Fosforik asit ve dezenfektan solüsyonların *Streptococcus mutans*'a karşı antibakteriyel etkisinin saptanması, *Hacettepe Diş Hek Fak Derg*, 2005; 29(4): 8-14.
19. Türkün M, Türkün LS, Ateş M. Antibacterial activity of cavity disinfectants, *Balk J Stom*, 2004; 8(3): 214-19.
20. Romanova N, Favrin S, Griffiths MW. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to sanitizers used in the meat processing industry, 2002; *Appl Env Microbiol*, 68: 6405-9.
21. Romanova NA, Wolffs PFG, Brovko LY, Griffiths MW. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. 2006; *Appl Env Microbiol*, 72: 3498-3503.
22. Kut D, Güneşoğlu C. Nanoteknoloji ve tekstil sektöründeki uygulamaları. *Tekstil & Teknik*, 2005; 1: 224-30.

23. Ersan I, 2007. Sigorta sektörü nanoteknoloji devrimine hazır mı? 1 Mart 2017. [http://nano.bilkent.edu.tr/docs/Best\\_dergisi.pdf](http://nano.bilkent.edu.tr/docs/Best_dergisi.pdf).
24. Şam M, Denkbaş B. Temizlik konusunda nanoteknolojik yaklaşımlar. Standart Dergisi, 2010; 49(580): 53-57.
25. Lebaron P, Trousselier M. Got Accuracy of epifluorescence microscopy for direct estimates of bacterial numbers. J Microbiol Meth, 1994; 19: 89-94.
26. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem, 1956; 28; 350-6.
27. Gökçe Y. Nanoteknolojik dezenfektanların etkinliği ve biyofilm üzerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2017.
28. Çetinel B, Türetgen İ. Nano gümüş sülfadiazin ve nano benzalkonyum klorür dezenfektanlarının planktonik bakterilere ve biyofilm tabakasına etkinliğinin incelenmesi. Iğdır Üni Fen Bil Enst Der, 2017; 7: 79-85.
29. Boe-Hansen R, Albrechtsen HJ, Arvin E, Jorgensen C. Dynamics of biofilm formation in a model drinking water distribution system. J Wat Supply, 2002; 51: 399-406.
30. Türetgen İ. Reduction of microbial biofilm formation using hydrophobic nano-silica coating on cooling tower fill material. Water SA, 2015; 41, 295-9.
31. Boe-Hansen R, Albrechtsen HJ, Arvin E. Biofilm in medicine, industry and environmental biotechnology. IWA Publishing, USA, 2003.