

Nano Gümüş Sülfadiazin ve Nano Benzalkonyum Klorür Dezenfektanlarının Planktonik Bakterilere ve Biyofilm Tabakasına Etkinliğinin İncelenmesi

Bezanur ÇETİROL¹, İrfan TÜRETGEN¹

ÖZET: Hızla gelişen nanoteknoloji alanı, bilim ve teknoloji uygulamalarının birlikte kullanılması ile nano düzeyde yeni ürünler oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Nanopartiküller farklı endüstriyel ürünlerin üretimlerinde kullanılmalarının yanı sıra, bilimsel alanlarda da çeşitli faydalar sağlamaktadırlar. Özellikle antimikrobiyal özellikteki nanopartiküller endüstriyel ve klinik önem taşıyan mikroorganizmalara karşı kullanılan dezenfektanlarda etkinliği artırmaktadır. Uzun zamandır dezenfektan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşiklerinden olan benzalkonyum klorür ve gümüş sülfadiazinin bakterilere, bazı virüslere, mantarlara ve protozoonlara karşı bakteriyostatik ve bakterisidal etki gösterdiği bilinmektedir. Bu dezenfektanlar endüstri ve sağlık alanlarında mikroorganizma ile kontamine olmuş tüm yüzeylerde kullanılmaktadır. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bakteriler klinik ve endüstriyel açıdan önemli olup ciddi kayıplara sebep olmaktadır. Planktonik hücreler dezenfektanlardan kolay etkilenebilmelerine rağmen, biyofilm içindeki bakteriler bu dezenfektanlara karşı dirençli olabilmektedirler. Mikroorganizmaya bağlı faktörler dezenfeksiyona etki ettiği gibi, dezenfektan tipi, konsantrasyonu, temas süresi, pH değeri, sıcaklık, organik madde varlığı gibi faktörler de etki etmektedir. Bu çalışmanın amacı nano gümüş sülfadiazin ve nano benzalkonyum klorür dezenfektanlarının planktonik ve biyofilm halindeki bakterilere etki ettiği minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerini tespit etmektir. Biyofilme etkili en düşük dozun nano gümüş sülfadiazin için 512 µl ml⁻¹, nano benzalkonyum klorür için 128 µl ml⁻¹ olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar üretici firma tarafından nano gümüş sülfadiazin ve nano benzalkonyum klorür dezenfektanlarının final konsantrasyonlarını belirlemek için değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Benzalkonyum klorür, biyofilm, dezenfeksiyon, gümüş nanoteknoloji, sülfadiazin

Investigation the Efficacy of Nano Silver Sulfadiazine and Benzalkonium Chloride Disinfectants on Planktonic Bacteria and Biofilm Layer

ABSTRACT: Rapid developing nanotechnology has provided creation of new products in nano size finding usage in science and technology applications. Nanoparticles provide benefits on different scientific fields as well as using them in production of industrial products. Especially, production of disinfectants using antimicrobial properties of nanoparticles increases against microorganisms that are industrially and clinically important. Silver sulfadiazine and the benzalkonium which are examples of the quaternary ammonium compounds, has been used for a long time as a disinfectant, have been known that they show bacteriostatic and bacteriocidal effect on bacteria, some viruses, fungus and protozoa according to the concentration. Some bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are clinically and industrially harmful. In addition, these bacteria can cause economic problems with their biofilm structure. Indefensible planktonic cells are affected by this circumstance very easily. The protected biofilm bacteria continue to resist against the disinfectant. The aim of the recent study is to examine minimum bactericidal concentration (MBC) values of nano silver sulfadiazine and nano benzalkonium chloride against planktonic and biofilm forms of these bacteria to determine time and concentration. The minimal effective dose in biofilms were determined as 512 µl ml⁻¹ for nano silver sulfadiazine and 128 µl ml⁻¹ for nano benzalkonium chloride, respectively. Results of this study were evaluated by the producer to determine the final concentration of nano silver sulfadiazine and nano benzalkonium chloride.

Keywords: Biofilm, benzalkonium chloride, disinfections, nanotechnology, silver sulfadiazine

¹ İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji, İstanbul, Türkiye
Sorumlu yazar/Corresponding Author: İrfan TÜRETGEN, turetgen@istanbul.edu.tr

GİRİŞ

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

Bakteri kontaminasyonunu kontrol etmenin başlıca yollarından biri etkin bir dezenfeksiyon işleminin yapılmasıdır. Antibakteriyel madde üreten firmaların endüstriyel sistemlerin dekontaminasyonu için çeşitli biyositler ve konsantrasyonlar önermektedir. Fakat üreticiler tarafından önerilen bu konsantrasyonlar her sistem ve hedef mikroorganizma için her zaman uygun olmayabilir (Kimiran-Erdem ve ark., 2007; Şanlı-Yürüdü ve ark., 2007). Ayrıca uygulanan geleneksel dezenfektan aktivite testleri ile sadece planktonik bakterilere karşı minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) belirlenirken, biyofilmlere etkili olacak konsantrasyon belirlenmemektedir. Bu biyositler planktonik hücreler üzerine güçlü bir etki gösterirken biyofilm tabakası içine güç ulaşmakta ve biyofilm bakterileri bunlara karşı direnç oluşturabilmektedir. Bu nedenle bakterilerin planktonik formları yanında, düşük konsantrasyonlarda bile biyofilm tabakasına bakterisidal etki gösteren dezenfektanların üretimi oldukça önemlidir (Marsik and Denys, 1995). *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* çevremizde bulunan, enfeksiyona neden olan, klinik ve endüstriyel önemi bulunan bakterilerdir (Erdem,1999; Baştürk, 2005; Bayhün, 2008; Çelik, 2009; Ünal, 2011; Kuba, 2012).

Gelişmekte olan yeni teknolojiler, hayatımıza “nano” özellikli ürünler kazandırmıştır. Hızlı gelişim gösteren bir alan olarak ortaya çıkan nanoteknoloji, bilim ve teknoloji uygulamalarının birlikte kullanılması ile nano düzeyde yeni ürünler oluşturulmasını sağlamıştır. Boyut olarak 10-100 nanometre aralığında yer alan bu ürünler “nanoteknolojik ürün” olarak isimlendirilmektedirler. Nanoteknolojide kullanılan nano yapıları materyallerin kimyasal sentezlerinin ve süreçlerinin kapsamı çok geniş olup optik, elektronik,

manyetik, biyolojik ve biyomedikal gibi birçok uygulama alanına sahiptir (Koch, 2000).

Mevcut çalışmanın amacı, nanoteknolojik özellikli dezenfektan olan nano gümüş sülfadiazin ve nano benzalkonyum klorürün *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinin biyofilm ve planktonik formlarına etki ettiği minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerini tespit etmektir. Ayrıca Alamar mavisi boyama yönteminden alınacak sonuçların klasik mikrobiyolojik kültür sonuçlarıyla kıyaslanması hedeflenmiştir. Dezenfektanların biyofilm içindeki bakterilere karşı etkili olduğu minimum bakterisidal konsantrasyonları ve etkinliğine dair elde edilen sonuçlar doğrultusunda üretici firmanın piyasaya sunacağı dezenfektan konsantrasyonlarını doğru olarak pazara arz edebilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE YÖNTEM

Çalışmada ATCC kültür koleksiyonlarından temin edilen *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 43816 suşları kullanılmıştır. Nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazin dezenfektanlarının MBK değerleri, Clinical Laboratory Standards Institution (CLSI) tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak araştırılmıştır (CLSI, 2006). Ayrıca, deneyde kullanılan dezenfektanlar için nötralizan etkinliği ve toksisite testleri de yapılmıştır. Suşların çoğaltılması için nutrient agar plaklarına ekim yapılmış, 37°C’lik etüvde bir gece bekletildikten sonra oluşan kolonilerden 10 ml nutrient broth bulunan tüpte süspansiyonları hazırlanmıştır. Ticari olarak temin edilmiş olan Mc Farland serisinin 0.5 tüpünün bulanıklığı, spektrofotometre cihazında 600 nm dalga boyunda 0.132 absorbansa denk gelmektedir. Kültürden uygun sulandırım yapıp, aynı absorbansa denk gelmesi sağlanarak bakteri yoğunluğunun yaklaşık olarak 10^8 kob ml⁻¹ bulanıklığına denk gelmesi sağlanmıştır. Bakteri suşlarının nutrient agar plağında üremiş 24 saatlik kolonilerinden 10^8 kob ml⁻¹lik süspansiyon, 100 kat seyreltilerek 10^6 kob ml⁻¹ bakteri içeren tüpler hazırlanmıştır. Eppendorf marka 96 gözlü kuyu zeminli, polipropilen mikropleyt kuyucuklarına 50 µl gümüş sülfadiazin ve benzalkonyum klorür dezenfektanlarının ikişer kat azalan konsantrasyonları ek-

lenmiş ve daha sonra bu kuyucuklara hazırlanan bakteri süspansiyonundan 50'şer μl ilave edilmiştir. Böylece dezenfektanların son konsantrasyonları steril distile su kullanılarak, seri dilüsyonla % 4'lük gümüş sülfadiazin için 256 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 1.024), 128 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.512), 64 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.256), 32 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.128), 16 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.064) olacak şekilde ayarlanmıştır. % 0.5'lik benzalkonyum klorür için 256 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.128), 128 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.064), 64 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.032), 32 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.016), 16 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.008), 8 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.004), 4 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.002) konsantrasyonları hazırlanmıştır. Biyosit-bakteri karışımına 0, 15, 30, 60. dakika ve 24. saat temas süreleri sonunda 100 μl nötralize edici karışım (gümüş sülfadiazin için % 2.5 sodyum tiyosülfat, % 1 sodyum tiyoglikolat benzalkonyum klorür için % 3 Tween 80, % 0.3 lesitin) eklenmiştir. 5 dakika bekleme süresinin ardından bu karışım 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltilmiş ve nutrient agar plaklarına ikişer tekrarlı 100'er μl yayılmıştır. Ekim yapılan nutrient agar plakları 37°C sıcaklıktaki etüvde 24 saat bekletildikten sonra minimal bakterisidal konsantrasyon tayini için üremenin görülmediği minimum doz tespit edilmiştir.

Biyofilm deneyi için, bakteri suşlarının nutrient agarda bulunan 24 saatlik kolonilerinden, yukarıda Mc Farland serisi kullanılarak anlatıldığı şekilde 10^6 kob ml^{-1} süspansiyonları hazırlanmış ve 200'er μl alınarak 96 kuyucuklu mikroplytlere dağıtılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılarak yüzeylere yapışması beklenmiştir. İnkübasyon süresi sonunda üst sıvı uzaklaştırılmış ve yapışmamış bakterilerin yüzeyden uzaklaştırılması için steril fosfat tamponu ile ek bir yıkama yapılmıştır. Böylece planktonik fazda bulunan bakteri hücreleri ortadan kaldırılarak 24 saatlik biyofilm tabakası deneylerde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir. Biyofilm tabakası bulunan kuyulara, % 4'lük gümüş sülfadiazin için 512 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 2.048), 256 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 1.024), 128 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.512), 64 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.256), 32 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.128) ve % 0.5'lik benzalkonyum klorür için 512 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.256), 256 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.128), 128 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.064), 64 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.032), 32 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.016), 16 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.008), 8 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.004) konsantrasyonlardan 100'er μl eklenmiştir. 0, 15, 30, 60. dakika ve 24. saat temas süreleri sonunda biyosit-biyofilm karışımına 100'er μl nötralize edici karışım (gümüş sülfadiazin için % 2.5 sodyum tiyosülfat, %1 sodyum tiyoglikolat benzalkonyum klorür için

% 3 Tween 80, % 0.3 lesitin) eklenmiştir. Beş dakika bekleme süresinin ardından bu karışıma yavaşça pipetaj yapılarak yüzeydeki biyofilm tabakası kaldırılıp homojen bir karışım elde edilmiştir. Daha sonra bu karışım 10^{-3} ve 10^{-4} oranında seyreltilmiş ve nutrient agar plaklarına ikişer tekrarlı 100'er μl yayılmıştır. Ekim yapılan nutrient agar plakları 37°C sıcaklıktaki etüvde 24 saat bekletildikten sonra minimal bakterisidal konsantrasyon tayini için üremenin görülmediği minimum doz tespit edilmiştir. Süspansiyon testleri için yönerge ve standartlar varken, biyofilm tabakasındaki bakterilerin dezenfektan testleri için kabul görmüş standartlar bulunmamaktadır. O nedenle biyofilm deneyinde daha önceki çalışmalarda edinilen sonuçlar doğrultusunda ideal olduğunu düşünülen miktar, süre, konsantrasyon gibi parametreler kullanılmıştır. Ayrıca biyofilm deneyinde kuyuların tüm cidarına bakterinin yapışması için miktarda daha fazla inokulum konması şart olmaktadır. Oranlar kuyu hacmine göre final konsantrasyonu karşılaması için özenle hesaplanmıştır.

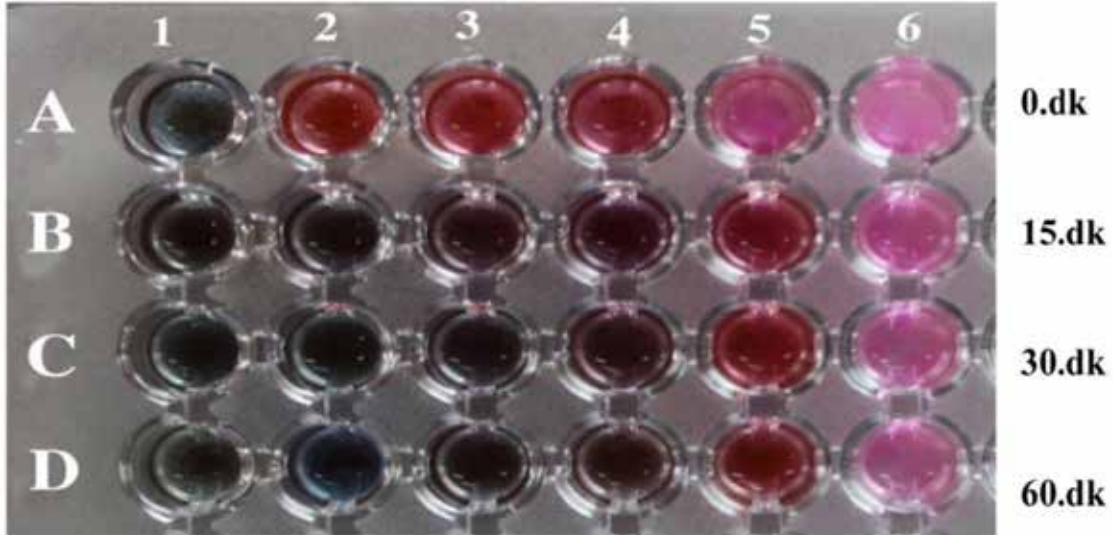
Sonuçlar klasik mikrobiyolojik kültür ve Alamar mavisi ile boyama yöntemiyle kayıt edilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri, bakterinin olmadığı (blank) ve dezenfektanın olmadığı (kontrol) gruplarıyla karşılaştırılarak elde edilen sonuçlar kültür sonuçları ile birlikte değerlendirilmiştir. Canlılığı tespit etmek için kolay, düşük maliyetli, tekrarlanması mümkün olan ve biyofilm duyarlılığını ölçen ek bir yöntem daha ihtiyaç duyulmaktadır. Alamar mavisi boyama yöntemi, metabolik aktivite tespitine dayanan kolorimetrik bir indikatör içerir. Redoks indikatörü olan Alamar mavisi adlı boya yaygın olarak planktonik bakteri ve mantar duyarlılık testlerinde, hücre kültürü sitotoksite testlerinde kullanılmaktadır (Page et al., 1993; Pfaller and Barry, 1994; To et al., 1995; Baker and Tenover, 1996; Collins and Franzblan, 1997; Back et al., 1999). Alamar mavisi boyama yöntemi kolay, tek adımdan oluşan prosedüre sahip ve yüksek verimlilik sağlayan bir testtir. Alamar mavisi suda çözünebilir olduğundan diğer yaygın yöntemlerde ihtiyaç duyulan yıkama, fiksasyon ve ekstraksiyon gibi işlemlere gerek duyulmaz. Alamar mavisi araştırıcı ve uygulanan hücreler için toksik değildir. Bu nedenle çalışılması güvenlidir ve test hücrelerinin metabolizmalarına müdahale etmez. Alamar mavisi, çok uzun inkübasyonun mümkün olduğu kinetik çalışmalarda bile stabildir (Pettit et al., 2005).

Hücrelerin bulunduğu örneğe Alamar mavisi boyası eklendiğinde, boyanın okside formu sitosole girer ve FMNH₂, FADH₂, NADH, NADPH ve sitokromlardan gelen elektronlarca redüklenerek indirgenmiş forma dönüştürülür (Al-Nasiry, 2007). İndirgenme ile Alamar mavisi renk değişimine uğrar. Değişimin oranı hücre canlılığının oranını belirtir.

Üremenin devam etmesi indirgenmiş bir ortam oluştururken, üremenin azalması oksidatif bir ortam oluşturur. Oksitlenmiş ortam mavi renkliken, redüklenmiş ortam ise floresan özellik içerir ve pembe renklidir. Eğer ortamda bir üreme gerçekleşiyorsa mavi renk olan boya redüklenerek pembe renge dönüşmeye

başlar. Renk değişimi ile veriler gözle görülebilir, ancak absorbans veya floresan bazlı cihazlarla ölçülebilir (Pettit et al., 2005). Deneyde spektrofotometrik ölçümlerin tümü mikroplyet okuyucu spektrofotometre cihazı yardımıyla yapılmıştır (ThermoScientific™ Multiskan™ GO Microplate Reader). 570 nm dalga boyunda redüksiyon absorbans değerleri ölçülerek sonuçlar kaydedilmiştir.

Renk değişiminden önceki kuyucuklara karşılık gelen dezenfektan dozlarına sahip kuyucuklardan alınan inokulumlar uygun besiyeri içeren Petri kutularına ekilmiş, üremenin görülmediği en düşük doz MBK değeri olarak kaydedilmiştir.



Şekil 1. Alamar mavisi ile muamele sonrasında mikroplyette gözlenen renk değişimleri. Kantitatif tayin cihaz tarafından yapılmaktadır. Görsel sadece renk değişimini göstermek için verilmiştir (koyu mavi renk okside form iken pembe renk boyanın redüklenmiş formudur).

Kullanılan bakterilerin nötralizandan ve test prosedüründen olumsuz yönde etkilenmediğini doğrulamak ve çalışmada kullanılan dezenfektanları etkin bir şekilde nötralize eden ajanın seçimini sağlamak amacıyla CEN'in (European Committee for Standardisation) dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin tayin edilmesinde önerdiği EN 1276 standardında bildirilen validasyon testleri uygulanmış, sonuçlar bu standardın önerdiği kriterler doğrultusunda değerlendirilmiştir (Mataracı, 2010). Deneylerde elde edilen sayıların ortalamaları baz alınarak, tek yönlü varyans analizi ve Post-Hoc (çoklu karşılaştırma) analizi gerçekleştirilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < .05$ olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Çalışmada farklı konsantrasyondaki nano gümüş sülfadiazinin ile nano benzalkonyum klorürün *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* bakteri suşlarının süspansiyon ve mikroplyetlerde oluşturulmuş 24 saatlik biyofilmine karşı 0, 15, 30, 60. dakika ve 24 saatlik temas süreleri sonucunda bakteri sayısının minimum 3 log (%99.9) düşüş gösterdiği konsantrasyon bulunarak MBK değerleri saptanmıştır. Besiyeri olarak nutrient agarın kullanıldığı deneylerde elde edilen MBK değerleri Çizelge 1 ve 2'de gösterilmiştir.

Çizelge 1'deki sonuçlara göre *S. aureus* suşunun diğer Gram (-) bakterilere göre nano gümüş sülfadiazine

daha dirençli olduğu, süspansiyon halindeki bakterilerin biyofilm oluşturdıkları zaman MBK değerlerinin artış gösterdiği ve en fazla artışın *P. aeruginosa* suşunda meydana geldiği saptanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, gümüş sülfadiazinin 24 saatlik

temas sürelerine bakıldığında süspansiyon halindeki bakteriler için 256 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 1.024), biyofilm için ise 512 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 2.048) gümüş sülfadiazin içeren final konsantrasyonun bakteriler üzerinde bakterisidal etki oluşturduğu görülmüştür.

Çizelge 1. Nano gümüş sülfadiazinin farklı temas sürelerinde planktonik ve biyofilm halindeki bakteri suşlarına karşı saptanan MBK değerleri ($\mu\text{l ml}^{-1}$)

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

Çizelge 2’deki sonuçlara göre nano benzalkonyum klorüre karşı bakterilerin süspansiyon hallerinden en fazla direnci *K. pneumoniae* göstermiştir. Biyofilm fenotipinde ise en az direnç *K. pneumoniae* suşuna aittir. Gümüş sülfadiazinde olduğu gibi biyofilm oluşturdıklarında bakterilere etki eden MBK değerleri artmış ve süspansiyon haline göre biyofilmde en fazla direnç oluşturan bakteri 24. saat sonucuna göre *P. aeruginosa* olmuştur. Sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde benzalkonyum klorürün 24 saatlik temas sürelerinde planktonik bakteriler için 64 $\mu\text{l ml}^{-1}$

(% 0.032), biyofilmdekiler içinse 128 $\mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.064) değerlerinin final konsantrasyon olarak etkili olduğu tespit edilmiştir.

Alamar mavisi boyama yöntemi ile 24 saatlik biyofilm deneyinde alınan sonuçlar 24 saatlik biyofilm bakterilerinin klasik mikrobiyolojik kültür sonuçları ile uyumlu çıkmıştır (Çizelge 3). Ölçülen absorbans değerleri, dezenfektanın olmadığı kontrol gruplarının dezenfektan içerenlerle kıyaslanarak elde edilmiş olup, sonuçlar kültür sonuçlarıyla birlikte değerlendirilmiştir (Back et al., 1999).

Çizelge 2. Nano benzalkonyum klorürün farklı temas sürelerinde planktonik ve biyofilm halindeki bakteri suşlarına karşı saptanan MBK değerleri ($\mu\text{l ml}^{-1}$)

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

Çizelge 3. Nano benzalkonyum klorür ve nano gümüş sülfadiazinin ($\mu\text{l ml}^{-1}$) 24 saatlik biyofilmlere karşı alamar mavisi boyama yöntemi ile spektrofotometrede saptanan absorpsiyon değerleri

	Nano Benzalkonyum Klorür					Nano Gümüş Sülfadiazin				
	Kontrol	64 μl	128 μl	256 μl	512 μl	Kontrol	64 μl	128 μl	256 μl	512 μl
<i>S. aureus</i>	0.689	0.598	0.226	0.219	0.219	0.689	0.645	0.656	0.612	0.298
<i>P. aeruginosa</i>	0.661	0.613	0.186	0.189	0.191	0.661	0.603	0.603	0.599	0.303
<i>E. coli</i>	0.701	0.644	0.213	0.201	0.188	0.701	0.685	0.666	0.648	0.245
<i>K.pneumoniae</i>	0.669	0.632	0.244	0.239	0.203	0.669	0.614	0.602	0.590	0.271

Kuda et al. (2008), paslanmaz çelik yüzeydeki *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus* hücrelerinin benzalkonyum klorüre karşı direncini incelemiş, *E. coli* ve *S. aureus* 'un 10 dakikada 0.5 mg ml^{-1} konsantrasyonda 2 ila 6 log düşüş gösterdiğini, *P. aeruginosa* 'nın 2.0 mg ml^{-1} konsantrasyonda inaktive olduğunu tespit etmiştir. Çalışmamızda benzalkonyum klorürün 15. dakikada *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *E. coli* biyofilminde bakteri sayısında 3 log azalma sağlayan MBK değerlerinin $128 \mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.064), *K. pneumoniae* biyofilmi için $64 \mu\text{l ml}^{-1}$ (% 0.032) olduğu sonucuna varılmıştır. Kuda et al. (2008) yapmış oldukları çalışma sonucunda 10. dakikada *P. aeruginosa* biyofilmine etki eden konsantrasyonun, *S. aureus* ve *E. coli* benzalkonyum klorüre göre daha fazla olduğunu saptamışken, sonuçlarımıza göre 15. dakikada etkili olan konsantrasyon aynıdır. Öte yandan, bu bakteriler biyofilm oluşturdıklarında her iki dezenfektana karşı en fazla direnci *P. aeruginosa* oluşturmaktadır. Benzer birçok çalışmada olduğu gibi, biyofilm bakterilerinin planktonik formdaki bakterilere göre beklendiği üzere daha dirençli oldukları gösterilmiştir. Benzalkonyum klorür ile yapılan çalışmalarla kıyasladığımızda, bulduğumuz MBK değerlerinin diğer çalışmalarla uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir (Koch, 2000; Gürler, 2003).

SONUÇ

Bu veriler ışığında, firmanın üreteceği dezenfektan içerisindeki nano benzalkonyum klorür final konsantrasyonunun $\geq \% 0.1$, nano gümüş sülfadiazin oranının ise $\geq \% 2$ olması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu değerler deneylerde kullanılan bakterilerin türden bağımsız olarak tümünü öldürebilecek, deneyde elde edilen en yüksek MBK değerlerinin yüzde olarak fi-

nal konsantrasyonudur. Dezenfektanların bakterilere etki eden MBK değerlerini saptamak için klasik kültür yönteminin yanında Alamar mavisi boyama yöntemi de uygulanmıştır. Alamar mavisi boyama yöntemi 24 saatlik biyofilm deneyinde yine aynı saate denk gelen klasik kültür yöntemi ile yakın sonuçlar vermiş olup istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu çalışma ile Alamar mavisi boyama yönteminin biyosit etkinlik testlerinde de sağlıklı şekilde kullanılabilmesi gösterilmiştir. Ancak kendisine uygun nötralizan ile birleştiğinde dibe çökelti yapan dezenfektanlar için Alamar mavisi boyama yöntemi uygun değildir. Zira spektrofotometre cihazında yanlış okumalara yol açabilmektedir. Türkiye'de üretilen ve piyasaya sürülmüş dezenfektanlar içinde final konsantrasyonu akselik biyofilme karşı hem klasik mikrobiyolojik kültür hem de ek bir alternatif metotla sağlaması yapılarak test edilmiş dezenfektanla ilgili başka bir çalışmaya rastlanmamıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36725 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Al-Nasiry S, Geusens N, Hanssens M, Luyten C, Pijnenborg R, 2007. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Human Reproduction*, 22(5): 1304–1309.
- Back SA, Khan R, Gan, X Rosenberg PA, Volpe JJ, 1999. A new alamar blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *Journal of Neuroscience Methods*, 91: 47–54.
- Baker CN, Tenover FC, 1996. Evaluation of alamar colorimetric broth microdilution susceptibility testing method for staphylococci and enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 34: 2654–2659.
- Bayhün S, 2008. Klinik ve gıda kaynaklı örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik dirençliliklerinin karşılaştırılması ve beta-laktamaz aktivitesinin değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Basılmamış) Yüksek Lisans Tezi, 102 s.
- Baştürk S, 2005. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi, 88s.
- Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. http://simpleshovoflove.weebly.com/uploads/1/4/0/7/14073276/agar_dilution_assay.pdf (Erişim tarihi: 07 Aralık, 2016).
- Collins LA, Franzblau S G, 1997. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 1004–1009.
- Çelik B, 2009. Doğadan ve klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas* bakterilerinin değişik fenotipik özelliklerinin farklı yöntemlerle araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 79 s.
- Erdem B, 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, Ankara, 551-558.
- Gürler B, 2003. Dezenfektan seçimi ve dezenfektanların kullanımı konusunda güncel rehberler, 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı, Simad Yayınları, Samsun, 159-168.
- Koch CC, 2000. Nanostructured materials processing, properties and potential applications. Noyes Publications William Andrew Publishing, New York, USA. 569 p.
- Kuba M, 2012. İçme suyu pompalarında *Escherichia coli*'nin oluşturduğu biyofilm yapısının incelenmesi ve oluşmasının önlenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 114s.
- Kuda T, Yano T, Kuda MT, 2008. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *Learning with Texts*, 41: 988-993.
- Marsik FJ, Denys GA, 1995. Sterilization, decontamination and disinfection procedures for the microbiology laboratory, ASM Press, Washington, 86-71.
- Mataracı E, 2010. *Pseudomonas aeruginosa*'nın planktonik ve biyofilm kültürlerine karşı çeşitli dezenfektanların antimikrobik etkilerinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 88s.
- Kimiran-Erdem A, Şanlı-Yürüdü NO, Çotuk A, 2007. Efficacy of a quaternary ammonium compound against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *Annals of Microbiology*, 57 (1): 121-126.
- Page B, Page M, Noel C, 1993. A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*. *International Journal of Oncology*, 3: 473–476.
- Pettit RK, Weber CA, Kean JM, Hoffmann H, Pettit GR, Tan R, Franks SK, Horton ML, 2005. Microplate alamar blue assay for *Staphylococcus epidermidis* biofilm susceptibility testing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7): 2612-2617.
- Pfaller MA, Barry AL, 1994. Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 1992–1996.
- Şanlı-Yürüdü NO, Kimiran-Erdem A, Çotuk A, 2007. Studies on the efficacy of chloramine t trihydrate (N-chloro-p-toluene sulfonamide) against planktonic and sessile populations of different *Legionella pneumophila* strains. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210: 147–153.
- To W, Fothergill AW, Rinaldi MG, 1995. Comparative evaluation of macrodilution broth methods for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 2660–2664.
- Ünal D, 2011. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Staphylococcus* ve *Candida* cinsi mikroorganizmalarda biyofilm varlığının araştırılması. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 145s.