

**KİTOSAN-BAZLI BİYOMALZEMELERDE BİYOFİLM  
OLUŞUM MEKANİZMASININ VE ENZİMATİK BOZUNMA  
KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION MECHANISM  
AND THE KINETICS OF ENZYMATIC DEGRADATION ON  
CHITOSAN-BASED BIOMATERIALS**

**MÜGE DAŞTAN**

Hacettepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliği'nin

BİYOMÜHENDİSLİK Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak hazırlanmıştır

2006

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan : .....  
Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Üye (DANIŞMAN) : .....  
Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Üye : .....  
Prof. Dr. Nevin KESKİN

Üye : .....

ONAY

Bu tez .... / .... / ..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukardaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

.... / .... / .....

Prof. Dr. Ahmet ÖZDURAL  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

# KİTOSAN-BAZLI BİYOMALZEMELERDE BİYOFİLM OLUŞUM MEKANİZMASININ VE ENZİMATİK BOZUNMA KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

Müge Daştan

## ÖZ

Sunulan çalışmanın amacı, doğal bir polimer olan kitosandan hazırlanan membran yüzeylerinde biyofilm oluşum mekanizmasının ve kitosan membranların bakteriyal enzim ile bozunma kinetiğinin incelenerek, kitosanın biyomalzeme olarak kullanımının araştırılmasıdır.

Yapılan araştırmanın ilk kısmında, gözeneklilik ve çapraz bağlanma açısından farklılık gösteren kitosan membranlar üretilmiştir. Gözenekli membranlar, kitosan çözeltisinin silika partikülleri ile homojen olarak karıştırılması ve sonrasında bu partiküllerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla hazırlanmıştır. Zayıf asitlerde çözünen kitosan membranlarda, çözünmeyi engellemek amacıyla, epiklorohidrin kullanılarak çapraz bağlanma sağlanmıştır. Böylelikle, farklı özelliklere sahip kitosan membranlarda, bakteriyal yapışma ve biyofilm oluşumunun incelenmesi mümkün olmuştur. Kitosan, bakteriler tarafından üretilen kitosanaz ile degrade edilebilmektedir. Çalışmada kullanılan *B.subtilis* ve *P.aeruginosa* kitosanaz enzimine sahiptirler. Çalışma sırasında, degradasyon kinetiği, *Streptomyces griseus*'den izole edilmiş kitosanaz ile asetat tamponunda gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan kitosan membranlarda bakteriyal yapışma kinetiği incelenmiştir. Bu çalışmada, biyomalzeme enfeksiyonlarında önemli rol oynayan *Escherischia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus epidermidis* ve *Bacillus subtilis* kullanılmıştır. Bakteriyal yapışma kinetiği, karşılaştırmalı olarak, UV-Spektrofotometre, Koloni oluşturma birimi ve ATP (Adenozin trifosfat) Biyoluminesans yöntemleri ile incelenmiştir. *P.aeruginosa*, en fazla yapışma gösteren tür olmuştur. Bunu sırasıyla *B.subtilis*, *S.epidermidis* ve *E.coli* izlemiştir.

Biyomalzemelerde biyofilm oluşumu, yukarıda belirtilen mikroorganizmalar ile yürütülmüştür. Yapışma sonuçları ile uyumlu olarak, kitosan membranlarda en çok

*P.aeruginosa* üremiştir, daha sonra sırasıyla *B.subtilis*, *S.epidermidis* ve *E.coli* gelmiştir. Üreyen mikroorganizma sayısı, ATP biyoluminesan, biyofilm oluşumu ise SEM ve konfokal mikroskopu ile incelenmiştir. Üreyen mikroorganizmaların biyofilm oluşturmadıkları görülmüştür.

Kitosan membranlar gözeneksiz ve iki farklı gözenek çapına sahip olarak hazırlanmıştır. Yapılan incelemelerde gözenekli membranlarda bakteriyel yapışma ve üremenin artış gösterdiği görülmüştür. Gözenek çapı büyük olan membranda bu değerlerin en yüksek olduğu görülmüştür. Kitosan membranlar, çapraz bağırsız ve epiklorohidrin çapraz bağırlı olarak hazırlanmıştır. Kitosanaz üreten *B.subtilis* ve *P.aeruginosa*, kitosan membranı degrade ettiğinden dolayı, kitosanaz üretmeyen *E.coli* ve *S.epidermidis*'den daha fazla ürettiği görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Mikrobiyal yapışma, Kitosan, Biyofilm, ATP Biyoluminesans, Degradasyon

Danışman: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliğı / Biyomühendislik Anabilim Dalı

# INVESTIGATION OF BIOFILM FORMATION MECHANISM AND THE KINETICS OF ENZYMATIC DEGRADATION ON CHITOSAN

Müge Daştan

## Abstract

The purpose of this study is to investigate the usage of chitosan as a biomaterial by biofilm formation mechanism on the prepared natural polymer chitosan membranes and also by bacterial enzymatic degradation of them.

In the first part of the study, chitosan membranes were produced. They differ by porosity and cross-linker. Porous chitosan membranes were prepared by stirring silica particulars homogenously and after that, remove them from the membranes. To avoid chitosan membrane solution, which occurs in weak acids, cross-linkage with Epichlorohydrine was performed. In this way, it was possible to investigate bacterial attachment and biofilm formation on different chitosan membranes. Chitosan, can be degraded by bacteria which produce chitosanase. *B.subtilis* and *P.aeruginosa* produce chitosanase. The degradation kinetics was done in acetate tampon by the chitosanase isolated from *Streptomyces griseus*.

Bacterial attachment kinetics was studied on the prepared chitosan membranes. *Escherischia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus epidermidis* and *Bacillus subtilis*, that takes important role in biomaterial infections, were used for this study. *P.aeruginosa* showed the most attachment. This was followed by *B.subtilis*, *S.epidermidis* and *E.coli*. Bacterial attachment kinetics was investigated comparatively by UV-Spectrophotometer, colony forming unit and ATP (adenosine triphosphate) Bioluminescence.

Biofilm formation on biomaterials was carried out with the above microorganism. *P.aeruginosa* showed the most proliferation. *B.subtilis*, *S.epidermidis* and *E.coli* followed in order that was harmonious with the attachment study results. The proliferated cell count was investigated with ATP Bioluminescence; biofilm formation was investigated with scanning electron microscope (SEM) and confocal

microscopy. It was observed that no biofilm was formed by these proliferated microorganisms.

Chitosan membranes were prepared as non-porous and porous with two different pore diameters. It was observed that bacterial attachment and proliferation increased at porous membranes. The highest quantity was at the membranes with the larger pore diameter. Chitosan membranes were prepared without cross-linking and cross-linked with Epichlorohydrine. It was observed that *B.subtilis* and *P.aeruginosa* proliferated more than *E.coli* and *S.epidermidis*, because they produce chitosanase and degraded chitosanase membranes.

**Keywords:** Microbial attachment, Chitosan, Biofilm, ATP bioluminescence, Degradation

Adviser: Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu, Hacettepe University, Chemical Engineering / Bioengineering Department

## TEŞEKKÜR

*Tez çalışmam boyunca bana bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren, ayrıca her konuda desteğini esirgemeyen değerli danışmanım ve hocam Sayın Prof. Dr. Menemşe GümüřdereLIOđLU'na,*

*DeneySEL çalışmamlarımDA hiçbir zaman yardımını esirgemeyen sevgili Ayşe Ablaya ve Pelin'e,*

*Her gün dostlukları ve yardımlarıyla yanımda olan, günlerimi paylaştığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma,*

*Hayatımın en büyük desteği ile her zaman yanımda olan ve olacağını bildiğim sevgili müstakbel eşim Dođutan'a,*

*Her zaman yanımda olan ve bilim zevkini bana gösteren sevgili aileme,*

*Sonsuz teşekkürlerimle....*

*Müge DAŞTAN*

## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZ .....	i
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
EKLER DİZİNİ .....	x
1. GİRİŞ ve ARAŞTIRMANIN AMACI .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Biyofilm.....	3
2.1.1. Canlı dokularda oluşan biyofilmler .....	5
2.1.2. Vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşan biyofilmler .....	6
2.1.3. Vücut ile doğrudan ilişkisi olmayan biyofilmler .....	8
Hastane enfeksiyonları.....	8
2.2. Biyofilm Oluşum Mekanizması.....	10
2.2.1. Biyofilm oluşumunda etkili parametreler .....	10
2.2.1.1. Mikroorganizmanın film oluşumu üzerine etkileri .....	10
2.2.1.1.i. Mikroorganizmanın yüzey yapısal bileşimi.....	11
2.2.1.1.ii. Mikroorganizma hidrofobisitesi .....	12
2.2.1.1.iii. Mikroorganizma yüzey yükü.....	13
2.2.1.2. Çevrenin film oluşumu üzerine etkileri .....	14
2.2.2. Bakterilerin yüzeylere yapışma mekanizması ve biyofilm oluşumu .....	14
2.3. Biyofilm Analiz Yöntemleri .....	17
2.3.1. Direkt analiz yöntemleri .....	17
2.3.1.1. Işık mikroskobu ile inceleme .....	17
2.3.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	18
2.3.1.3. Epifloresan mikroskobu (IAEFM).....	18
2.3.1.4. Konfokal mikroskopi .....	18
2.3.2. İndirekt analiz yöntemleri .....	19
2.3.2.1. CFU (Colony forming unit, koloni oluşturma birimi) .....	19
2.3.2.2. Radyoaktif işaretleme .....	19
2.3.2.3. CTC ile işaretleme .....	19
2.3.2.4. Spektrofotometre.....	19
2.3.2.5. Hücre sayacı ile tayin.....	20
2.3.2.6. Biyokimyasal işaretleyiciler.....	20
2.3.2.6.1. Biyoluminesan ile ATP analizi .....	20
2.4. Kitosan.....	21
2.4.1. Kitosanın üretimi .....	24
2.4.2. Kitosanın özellikleri.....	24
2.4.2.1. Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon .....	25
2.4.2.1.i. N-Asetilasyon derecesi .....	25
2.4.2.1.ii. Molekül ağırlığı .....	25
2.4.2.1.iii. Çözücü ve çözelti özellikleri .....	25
2.4.2.1.iv. Biyotıp ve biyoteknoloji uygulamaları açısından avantajları .....	26
2.4.2.2. Kitosanın enzimatik degradasyonu .....	26
2.4.2.2.1. Degradasyon inceleme yöntemleri.....	27
3. DENEYSEL ÇALIŞMA.....	28
3.1. Kitosan Membranların Hazırlanması.....	28
3.1.1. Gözeneksiz kitosan membranların hazırlanması .....	28
3.1.2. Makrogözenekli kitosan membranların hazırlanması .....	28



3.1.3. Makrogözenekli kitosan membranların çapraz bağlanması.....	30
3.2. Membran Karakterizasyonu.....	31
3.2.1. FTIR analizleri.....	31
3.2.2. SEM ile membran yüzey analizi.....	31
3.2.4. Şişme deneyleri.....	32
3.3. Kitosan Membranların Enzimatik Degradasyonu.....	32
3.3.1. Stok çözeltilerin hazırlanması.....	33
3.3.2. Biyobozunmanın oligosakkarit salımı ile incelenmesi.....	33
3.4. Biyofilm Oluşumu.....	33
3.4.1. Mikrobiyal çalışmalar.....	34
3.4.1.1. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması.....	34
3.4.1.2. Mikroorganizma üreme eğrilerinin hazırlanması.....	34
3.4.1.3. Mikroorganizma yapışma kinetiğinin incelenmesi.....	35
3.4.1.4. Mikroorganizma biyofilm oluşumunun incelenmesi.....	38
3.4.2. İstatistiksel çalışmalar.....	39
4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI.....	40
4.1.Kitosan Biyomalzeme: Seçimi, Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	40
4.1.1. Kitosan membranların üretimi.....	41
4.1.1.1. Gözeneksiz kitosan membran üretimi.....	41
4.1.1.2. Makrogözenekli kitosan membran üretimi.....	41
4.1.1.3. Kitosan membranların çapraz bağlanması.....	43
4.1.2. Membran karakterizasyonu.....	44
4.1.2.1. SEM analiz sonuçları.....	44
4.1.2.2. Şişme deneyleri.....	46
4.1.3. Kitosan membran degradasyonu.....	48
4.2. Bakteriyal Yapışma ve Biyofilm Oluşumu.....	49
4.2.1. Mikrobiyal kültür çalışmaları.....	51
4.2.1.1. Mikroorganizma seçimi.....	51
4.2.1.2. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması.....	52
4.2.1.3. Mikroorganizma üreme eğrileri.....	53
4.2.2. Mikroorganizma-yüzey etkileşimi ve biyofilm oluşumunun incelenmesi için kullanılan yöntemler.....	54
4.2.3. Mikroorganizma-yüzey etkileşimi.....	56
4.2.3.1. Substrat yüzey özelliklerine göre mikroorganizma-yüzey etkileşimi.....	57
4.2.3.1.i. Yüzey hidrofobisitesi.....	57
4.2.3.1.ii. Membran gözenekliliği.....	58
4.2.3.1.iii. Yüzey pürüzlülüğü.....	58
4.2.3.2. Mikroorganizma yüzey özelliklerine göre mikroorganizma-yüzey etkileşimi.....	59
4.2.3.3. Mikroorganizma yapışma kinetiği sonuçları.....	60
4.2.4. Biyofilm oluşumu.....	65
4.2.3.1. Substrat yüzey özelliklerine göre biyofilm oluşumu.....	66
4.2.3.1.i. Malzeme çeşidi.....	66
4.2.3.1.ii. Yüzey gözenekliliği.....	66
4.2.3.1.iii. Yüzey pürüzlülüğü.....	67
4.2.3.2. Mikroorganizma özelliklerine göre biyofilm oluşumu.....	67
4.2.5. Mikroorganizma yapışması ve biyofilm oluşumunun istatistiksel değerlendirilmesi.....	73
5. GENEL SONUÇLAR.....	76
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	79
EKLER.....	89

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Mikrokoloni yapısı ( <i>P.aeruginosa</i> mikrokolonileri) .....	4
Şekil 2.2. Biyofilmdeki oksijen dağılımı .....	4
Şekil 2.3. Biyofilm Oluşumu .....	10
Şekil 2.4. Biyofilm Dinamiği .....	16
Şekil 2.5 ATP Biyoluminesans ile Işık Üretme Reaksiyonu .....	21
Şekil 2.6. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı .....	24
Şekil 3.1. Kitosan membranların hazırlanması .....	29
Şekil 3.2. Kitosan membranın Epiklorohidrin çapraz bağlanma reaksiyonu .....	31
Şekil 3.3. Mikroorganizma Üreme Eğrileri .....	35
Şekil 4.1. Kitosanda bulunan katyonik amin gruplarının serbest amin gruplarına dönüşme reaksiyonu .....	43
Şekil 4.2. Gözeneksiz kitosan membrana ait SEM fotoğrafları .....	45
Şekil 4.3. Silika (15-40 µm) kullanılarak hazırlanan gözenekli kitosan membranların kesitine ait SEM fotoğrafları .....	45
Şekil 4.4. 15-40 µm silika varlığında hazırlanan gözenekli membran yüzey SEM fotoğrafı (Büyütme × 250) .....	45
Şekil 4.5. 16:1 silika oranına sahip çapraz-bağlı membranın yüzeyinden farklı büyütme alınmış SEM fotoğrafları .....	46
Şekil 4.6 Kitosan membranlara ait şişme sonuçları .....	48
Şekil 4.7. Kitosan membran degradasyon kinetiği .....	50
Şekil 4.8. Mikroorganizma üreme eğrileri .....	54
Şekil 4.9. % olarak mikroorganizma yapışma kinetiği .....	62
Şekil 4.10. Çapraz bağlamanın mikroorganizma yapışma kinetiğine etkisi .....	63
Şekil 4.11. Gözenekliliğin mikroorganizma yapışma kinetiğine etkisi .....	64
Şekil 4.12. Gözeneksiz kitosan membran üzerinde, yüzey geriliminin mikroorganizma yapışma değerlerine etkisi .....	65
Şekil 4.13. 15 günlük üreme kinetikleri .....	70
Şekil 4.14. Konfokal mikroskopi .....	73

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Biyofilm oluşumu ile ilgili örnekler (Greenberg 1999).....	8
Çizelge 3.1. Mikroorganizma özellikleri .....	34
Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında kullanılan membranların bileşimleri ve temel özellikleri.....	42
Çizelge 4.2 Membranların denge şişme değerleri (EWC).....	48
Çizelge 4.3. Mikroorganizma üstel üreme hızları ve ikilenme süreleri.....	53
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara ait su değme açıları ( $\theta_w$ ) ve yüzey gerilimi (.....)	60
Çizelge 4.5. İstatistiksel sonuçlar.....	74

## **EKLER DİZİNİ**

<b>EK 1</b> .....	89
<b>EK 2</b> .....	94
<b>EK 3</b> .....	98

## 1. GİRİŞ ve ARAŞTIRMANIN AMACI

Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler (glukozaminoglikanlar, GAG), çevreden absorplanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır (Poulsen 1999).

Vücut içerisinde biyofilm oluşumu önem taşımaktadır. Oluşan biyofilmler yüksek ateş, ciddi organ hasarları ve hatta ölümlere bile neden olabilirler. Birçok biyomalzeme üzerinde tutunan bakteriler, biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olurlar. Bu tip üreme kronik enfeksiyonları da beraberinde getirir, çünkü biyofilmlerden doğal olarak zaman zaman kopan mikroorganizmalar vücutta başka yerlerde de bir enfeksiyona neden olabilirler.

Bakterilerin biyofilm oluşturmaları için öncelikle bir yüzeye tutunmaları gerekmektedir. Bu tutunma temelde üç aşamada gerçekleşir; hazırlayıcı film oluşumu, yüzeye taşınım, yüzeye bağlanma ve polisakkarit üretimi (Rijnaarts et al 1995).

Mikroorganizma yapışması ve biyofilm yapısını incelemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bazıları, optik yoğunluk, koloni oluşturma birimi, ATP biyoluminesan, konfokal mikroskopi ve taramalı elektron mikroskobudur. ATP analizi için biyoluminesan reaksiyonundan faydalanılmaktadır. Yöntem, bakteri hücresinin önceden belirlenmiş olan ATP mol sayısından faydalanarak bakteri sayısını dolaylı olarak tespit etmeyi hedeflemektedir. ATP biyoluminesan yöntemi klasik olarak kullanılan optik yoğunluk ve koloni oluşturma yöntemlerinden çok daha hassastır. Aynı zamanda bu yöntemde deneysel hatalara bağlı yanlış ölçümler de daha az indirgenebilmektedir (Squirrell et al 2002). Konfokal mikroskopi, üç boyutlu inceleme açısından biyofilm incelemesinde, taramalı elektron mikroskobu ayrıntılı görüntüleme açısından kullanılmıştır (Lewandowski 2000)

Kitosan, kitinin N-deasetillenmiş türevidir. Kitosan bir doğal polimer olup, biyoyuşabilirlik, biyobozunabilirlik, toksik olmama, adsorpsiyon gibi mükemmel

özellikleri nedeniyle birçok alanda yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu kullanım alanlarının başında kontrollü ilaç salımı, biyosensör uygulamaları, hücre kültürü, gıda ve su arıtım sistemleri yer almaktadır. Kitosanın diğer biyomalzemelere nazaran en üstün özelliklerinden biri de antibakteriyal ve antifungal etkilere sahip oluşudur. Literatürde bu etkinin, hücre membranlarının kitosan ile zarar gördüğü (Du et al 2004) ve kitosanın katyonik karakteri nedeniyle hücre DNA ve RNA'sına bağlanıp üreme ve yaşamını etkilediği (Chou et al 2005) ifade edilmektedir. Ancak, çok net bulguların ve tartışmaların olduğu yeterli sayıda çalışma yoktur.

Doğal polimerler, genelde doğal ortamda mikroorganizmaların ürettikleri bazı enzimlerle daha küçük birimlere parçalanmaktadırlar. Kitosan, kitosanaz, lizozim, kitinaz gibi enzimlerle degrade edilebilmektedir. Bu enzimler kitosani hidrolize eder ve kitosan, degradasyon sonucu oligosakkaritlere parçalanır. Degradasyon sonucu ortaya çıkan oligosakkaritler organizmalar için bir besin kaynağı oluşturmaktadır (Joseph ve Somashekar 1996).

Sunulan çalışmada, bu bilgiler ışığında, kitosan membranlarının biyomalzeme olarak kullanılabilirliğinin bakteriyal yapışma ve biyofilm oluşumu açısından incelenmesi hedeflenmiştir. Tezin ilk kısmında, bakteriyal yapışma ve biyofilm oluşumunu etkileyen parametreler olan gözeneklilik ve çapraz bağlanma bakımından farklı kitosan membranlar üretilmiş, analiz edilmiş ve membranların enzimatik degradasyonu incelenmiştir. Üretilen membranlarda, ikinci aşamada, bakteriyal yapışma ve biyofilm oluşumu *Escherischia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus epidermidis* ile incelenmiş ve bu incelemede optik yoğunluk, koloni oluşturma birimi, ATP biyoluminesan, SEM ve konfokal mikroskopi kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde tez konusunu oluşturulan konular hakkında temel bilgiler verilmiştir. Öncelikle, biyofilm konusu ele alınmış ve biyofilm oluşumunda etkili olan parametreler, biyofilm oluşum mekanizması ve biyofilm analiz yöntemleri ile ilgili bilgiler sunulmuştur. Sonraki bölümde ise çalışma kapsamında biyomalzeme olarak kullanılan kitosan hakkında genel bilgi, kitosanın üretimi ve degradasyonu yer almıştır.

### 2.1. Biyofilm

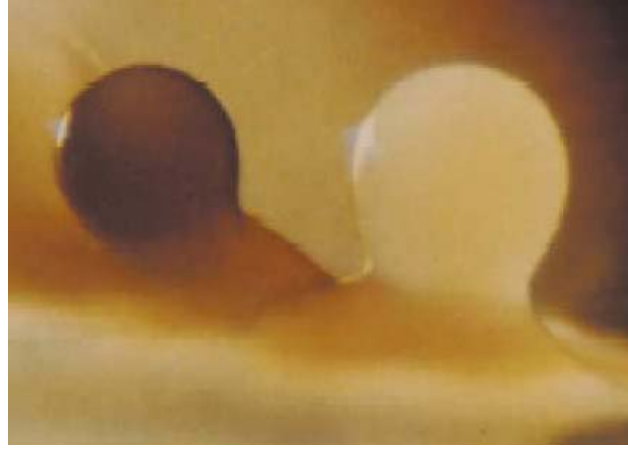
Biyofilm, bir yüzey üzerinde mikroorganizma kolonileri ve onların ürettikleri hücre dışı polisakkaritler (EPS), proteinler (glukozaminoglikanlar, GAG), çevreden absorplanan organik ve inorganik maddelerden oluşan bir tabakadır (Poulsen 1999).

Biyofilm kavramı yaklaşık olarak 40 yıl öncesinde Gibbons (Gibbons 1978) tarafından ortaya konulmuştur. O zamandan beri biyofilm yapısı, oluşum nedeni ve mekanizması ile ilgili çalışmalar hızla ilerlemiştir.

Biyofilmin temel birimi “mikrokoloniler”dir. Mikrokoloniler bir veya birkaç türden bakteri hücresinden oluşurlar. Mikrokolonilerin %10-25'i hücrelerden, %75-90'ı ise EPS matrisinden oluşmaktadır. Mikrokoloniler çoğunlukla “mantar benzeri şekil”e sahip yapı olarak tanımlanırlar (Şekil 2.1).

Mikroorganizmaların serbest formdan biyofilme geçişlerinin dört temel nedeni olduğu düşünülmektedir (Jefferson 2004). Birinci neden, mikroorganizmaların kendilerine daha korunaklı bir ortam yaratma gereksinimidir ve bu durum “koruma” olarak tanımlanmaktadır. İkinci neden; mikroorganizmalar kendilerine besin miktarı bakımından bol bir çevre oluşturmaktadırlar ve bu da “kolonizasyon” olarak tanımlanmaktadır. Üçüncü olarak mikroorganizmalar ortak yaşamın yararlarından faydalanmaktadırlar ve bu “birliktelik (symbiosis)” olarak tanımlanmıştır. Dördüncü olarak ise mikroorganizmalar biyofilm şeklinde üremektedirler, serbest koloniler belirli bir değerden sonra üreme sürecini durdurmaktadırlar.

Mikrokolonilerin oluşumu sırasında mikroorganizmalar başlangıçta katı bir yüzeyde rastgele bölgelere yapışırlar. Kolonizasyon başladığında bu bölgeler bakteriyal aktivite nedeniyle değişirler. Yüzey büyümesi, replikasyon, EPS üretimi ve sonunda mikrokoloni oluşumu ile biyofilm oluşumu tamamlanır.



Şekil 2.1. Mikrokoloni yapısı (*P.aeruginosa* mikrokolonileri)

Biyofilm büyüdüğünde, polimer matris içerisinde enkapsüle edilen mikroorganizma sayısı artar. Biyofilm yapısının şekillenmesinde, difüzyon baskın faktör haline gelir. İç tarafta kalan mikroorganizmalar oksijen, besin ve üreme ortamı açısından yüzeydekilere nazaran dezavantajlı konumdadırlar. Bu nedenle film yapısında başlangıçta aerobik mikroorganizmalar çoğunluktadır. Aerobik mikroorganizma üremesi sonucunda ortamdaki oksijen miktarı hızlı bir biçimde düşer ve oksijen noksanlığında anoksik bölge oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.2) (Greenberg et al 1999).



Şekil 2.2. Biyofilmdeki oksijen dağılımı

Biyofilmlerde dinamik bir denge söz konusudur. Film içerisinde bulunan bakteriler zaman zaman filmde ayrılabılır ve böylece serbest olarak yaşamlarını



sürdürebilirler ya da serbest mikroorganizmalar film yapısına katılabilir. Bundan dolayı enfeksiyonlar yayılabilir ve filmlerde karışık enfeksiyonlar oluşabilir.

Biyofilmler insan sağlığını tehdit edebilmektedir. Vücut içerisi ve içme suları gibi birçok yerde biyofilm oluşabilir. Bunun yanısıra mikroorganizmaların biyofilm oluşturma özelliğinden yararlanılarak atık su arıtımı, fermantasyon ile laktik asit veya etanol üretimi gibi biyoteknolojik açıdan önemli işlemler de gerçekleştirilmektedir. Ayrıca vücut içerisinde sindirim sisteminde bulunan laktik asit bakterilerinin oluşturduğu biyofilm, vücudumuzun normal florasını oluşturmakta olup, sağlığımız açısından gereklidir. Buna benzer olarak vücudumuzun normal florasını oluşturan çok sayıda biyofilmden de söz edilebilir ve buna en çarpıcı örnek olarak barsak yüzeyini kaplayan *E.coli* biyofilmi verilebilir (Greenberg et al 1999).

Aşağıda, buldukları yere göre canlı doku, vücuda implante edilen biyomalzeme yüzeyi ve vücut ile ilişkisiz yerde oluşum gösteren biyofilm çeşitleri sınıflandırılmıştır (Parker et al 2000).

### **2.1.1. Canlı dokularda oluşan biyofilmler**

Patojen mikroorganizmalar yaşamlarını sürdürebilmek ve çoğalabilmek için genellikle canlı dokulara tutunurlar. Mikroorganizmaların tutunması için uygun proteinlere sahip olan canlı doku, aynı zamanda mikroorganizmaların beslenebilmesi için önemli olan besinleri de elde etmelerini sağlar. Dokulara tutunan bakteriler uygun yaşam şartları nedeniyle çok hızlı bir biçimde çoğalmaya başlar ve kısa süre içerisinde biyofilm oluşturabilirler. Normal bir bakteriyal floranın patojenik hale geçmesi de söz konusu olabilir. Bu geçiş, doku yüzey kimyasındaki değişimlerle, antibiyotik tedavisiyle veya yaşlanma sonucu ortaya çıkabilir. Patojen olmayan (saprofit) mikroorganizmalar normalde buldukları ortamdan farklı bir bölgeye yerleştiklerinde patojen hale geçebilirler. Yer değişikliği sonucunda aşırı üreme ve buna bağlı olarak zehirli atık üretiminin artması zararsız mikroorganizmaları zararlı hale getirmektedir. Mikroorganizmalar yapışkan polimerler üretilip, fimbria gibi yüzey bileşenlerini kullandıklarından kuvvetli bir yapışma özelliğine sahiptir.

Böylece buldukları ortamdaki sıvı akışı (örneğin kan) ve mekanik hareket gibi onlar için olumsuz fiziksel şartlardan korunurlar (Jefferson 2004).

### **2.1.2. Vücuda implante edilen biyomalzemeler üzerinde oluşan biyofilmler**

Biyomalzeme olarak metaller, seramikler, kompozitler ve polimerler kullanılmaktadır. Yapay deri, damar, kalp, eklem gibi birçok protez bu malzemelerden üretilmektedir. Biyomalzemelerin vücut tarafından kabul edilmesi için biyouyumlu olmaları gerekmektedir. Biyouyumlu malzemeler, doku yapısına benzer yapıda olup vücudun bağışıklık sistemi tarafından reddedilmeyen malzemelerdir. Fakat vücudun kabul ettiği malzemeler aynı zamanda bakteriler için de elverişli olabilir. Örneğin vücut hücrelerinin malzemeyi kaplaması için fibronektin gibi bağlayıcı (yapıştırıcı) proteinler kullanılır. Bu proteinler sadece vücut hücreleri için değil, bakteriler için de bağlayıcı bir fonksiyon göstermektedir. Fakat bazı durumlarda bu fonksiyon farklılaşabilmektedir. Örneğin fibronektin yüksek derişimlerde vücut hücreleri için bağlayıcı özelliğini korumakta, ancak bakteri hücreleri için bu fonksiyonunu kaybetmektedir (Greenberg et al 1999).

Mikroorganizmaların sentetik malzemelere tutunarak sağladıkları en önemli avantaj, canlı dokudaki bağışıklık sistemi ile karşı karşıya gelmemeleridir. Bunun dışında, malzemede bulunan bazı metaller ( $Al^{3+}$ ,  $Mg^{2+}$ ), mikroorganizmaların oluşturduğu hücre dışı polisakkarit matris için destek malzeme oluşturur. Böylece mikroorganizmalar olumsuz dış koşullara karşı daha dayanıklı hale gelir (Greenberg et al 1999).

Biyomalzemeye patojen bakteriler iki şekilde ulaşabilir. Birinci yol, üretim veya implantasyon sırasında malzemenin bakterilerle temas ederek enfekte olması ve vücuda bu şekilde yerleşmesidir. İkinci yol ise vücut içerisinde bulunan veya vücudun dış ortama açık kısımlarından (ağız, burun, vb.) vücuda ulaşan mikroorganizmaların vücut sıvıları yoluyla malzemeye ulaşması şeklindedir. İmplantların reddedilmesini önlemek amacıyla implant yerleştirildikten sonra bağışıklık sistemi baskılanır, ancak bu durum enfeksiyon riskini de artırır. Çizelge 2.1'de vücut içerisinde enfeksiyona neden olan bakteri türleri ve neden oldukları hastalıklar listelenmiştir (Greenberg et al 1999).

Vücut içerisinde biyofilm oluşumu önem taşımaktadır. Oluşan biyofilmler yüksek ateş, ciddi organ hasarları ve hatta ölümlere bile neden olabilirler. Birçok biyomalzeme üzerinde tutunan bakteriler, biyofilm oluşturarak enfeksiyona neden olurlar (Çizelge 2.1). Bu tip üreme kronik enfeksiyonları da beraberinde getirir, çünkü biyofilmlerden doğal olarak zaman zaman kopan mikroorganizmalar vücutta başka yerlerde de bir enfeksiyona neden olabilirler (Greenberg et al 1999).

Biyofilm içerisindeki bakterilerin en önemli özelliği, konak cevabından kurtulup antibiyotik kemoterapisine direnç göstermeleridir. Laboratuvar koşullarında (in vitro) yapılan testlerde biyofilm bakterilerinin, serbest bakteriler için belirlenen minimum inhibisyon konsantrasyonundan (MIC) birkaç yüz veya bin kez fazla antibiyotik konsantrasyonuna bile direnç gösterdikleri bulunmuştur (Stewart et al 2001). Vücut içinde (in vivo) antibiyotikler serbest bakterileri öldürerek enfeksiyon riskini azaltabilir, fakat antibiyotik tedavisi kesildiği anda biyofilm oluşumu yeniden gözlenir (Greenberg et al 1999).

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntem, hastaya sürekli antibiyotik tedavisi uygulayarak biyofilm oluşumunu kontrol altında tutmaktır. Yapılan bazı çalışmalarda biyomalzeme içerisine antibiyotik yerleştirilerek biyofilm oluşumunun önlenmesi amaçlanmaktadır. Biyofilm oluştuysa ve kronik enfeksiyon tespit ediliyorsa biyomalzeme ameliyat ile vücuttan uzaklaştırılmalıdır (Greenberg et al 1999).

Potansiyel tedavi yöntemi olarak biyofilmdeki matris proteinleri çözen enzim kullanmak, biyofilm matris sentezini bloke eden kimyasal reaksiyonlardan yararlanmak ve hücre-hücre haberleşmesini sağlayan sinyal moleküllerinin benzerlerini kullanmak önerilmektedir. Biyofilm oluşumunun ve film içerisindeki bakteriyel ilişkilerin moleküler mekanizması açıklandıkça, genetik ürünlerle daha başarılı tedavi veya koruma yöntemlerinin ortaya çıkacağı şüphesizdir (Greenberg et al 1999).

### 2.1.3. Vücut ile doğrudan ilişkisi olmayan biyofilmler

Biyofilmler, su ve petrol dağıtım sistemlerinde, soğutma sistemlerinde, filtrasyon sistemlerinde, gemilerin yüzeyinde ve doğada bulunan birçok yüzeyde de oluşabilirler. Vücut içerisinde oluşan biyofilmler zengin besin kaynaklarına

Çizelge 2.1. Biyofilm oluşumu ile ilgili örnekler (Greenberg et al 1999)

Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyon türleri veya hastalıklar	Biyofilmi oluşturan mikroorganizma türleri
Diş taşı	Gram pozitif asidogenik koklar ( <i>Streptococcus sp.</i> )
Peridontitis (diş destek doku iltihabı)	Gram negatif anaerobik oral bakteriler
İskelet kas enfeksiyonu	Gram pozitif koklar ( <i>Staphylococcus</i> )
Orta kulak iltihabı	<i>Haemophilus influenzae</i>
Safra kanalı iltihabı	Enterik bakteriler ( <i>E.coli</i> )
Osteomyelit (kemik iliği iltihabı)	Çok sayıda bakteri ve mantar türlerinin karışık enfeksiyonu
Bakteriyel prostat	<i>E.coli</i> ve başka gram negatif bakteriler
Damar endokarditis	Virisdans grubu <i>Streptococci</i>
Sistik fibrosis	<i>P.aeruginosa</i> ve <i>Burkolderia cepacia</i>
<b>Hastane enfeksiyonları</b>	
Ameliyat iplikleri	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ve <i>S.aureus</i>
Kontakt lensler	<i>P.aeruginosa</i> ve Gram pozitif koklar
İdrar yolları kateterleri	<i>E.coli</i> ve başka Gram negatif çubuklar
Peritonit (Periton iltihabı)	Birçok bakteri ve mantar türü
Spiraller (IUDs)	<i>Actinomyces israelii</i> ve birçok tür
Nefes borusu tüpleri	Birçok bakteri ve mantar türü
Hickman kateterleri	<i>S.epidermidis</i> ve <i>C.albicans</i>
Merkezi damar kateterleri	<i>S.epidermidis</i> ve birçok tür
Damar yamaları	Gram pozitif koklar
Mekanik kalp kapakları	<i>S.epidermidis</i> ve <i>S.aureus</i>

Safra kanalı blokajları	Enterik bakteriler ve mantarlar
Ortopedik malzemeler	<i>S.epidermidis</i> ve <i>S.aureus</i>
Penis protezleri	<i>S.epidermidis</i> ve <i>S.aureus</i>

sahiptirler fakat dış ortamda gelişen filmler genelde besin değeri bakımından fakir koşullar ile karşı karşıya kalırlar. Bu gibi ortamlarda gelişen filmlerin mikroorganizmaları, çevredeki su ve mineraller yardımıyla oluşturdukları hücre dışı polisakkaritler ile beslenerek yaşamlarını sürdürürler (Lehtola et al 2004).

Su dağıtım sistemlerindeki biyofilmler koliform bakterilerden oluşur ve bu oluşumlar boru aşınımına, suda tat ve koku değişimine yol açarlar. Boru sistemlerinde oluşan biyofilmler bu sistemlerdeki suyun kullanımı sonucunda ciddi sağlık sorunlarını beraberinde getirebilmektedir.

Boru içinde oluşan filmler daha çok borunun alt kısmında seyrek ve rastgele yerleşmiştir. Borunun üst kısımlarında hava akımı ve besinsizlik nedeniyle film oluşumu görülmemektedir (Lehtola et al 2004).

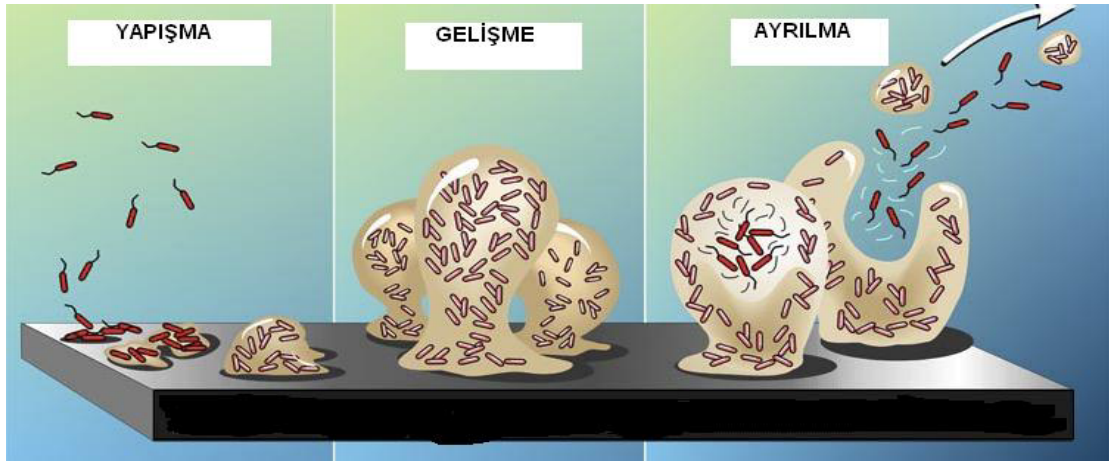
Gıda teknolojisinde biyofilm oluşumu insan sağlığı açısından önemlidir. Süt, et ve birçok besin maddesinin üretimi sırasında, üretilen besinin proteinleri (kazein, jelatin), üretimde kullanılan teçhizat (reaktör, kazan, tepsi, vb.) üzerinde hazırlayıcı bir film oluşturarak mikroorganizma yapışmasını kolaylaştırırlar. Böylece mikroorganizmalar paslanmaz çelik, cam, alüminyum, teflon, naylon gibi gıda teknolojisinde kullanılan birçok malzeme üzerinde film oluşturarak insan sağlığını tehdit edebilir (Poulsen 1999).

*Bacillus cereus* sporları sütte bulunmaktadır. Süt pastörizasyonu sırasında sporlar ölmekte, sadece vejetatif mikroorganizmalar yok edilebilmektedir. Sporlar hidrofobik karakterde olup boru yüzeyine tutunmaktadırlar. *Streptococcus thermophilus* de süt üretimi sırasında biyofilm oluşturabilmektedir. *Listeria monocytogenes* ise et, süt ve başka gıdalarda film oluşturabilmektedir. Gıda üretiminde film oluşmasını engellemenin en etkin yolu üretim şartlarını mikroorganizmanın yaşaması için elverişsiz halde tutmaktır (örneğin, uygun olmayan sıcaklık). Film oluştuysa hücre dışı polisakkarit matrisi parçalamak

amacıyla çeşitli deterjanlar (EDTA) ve enzimler ( $\alpha$ -amilaz,  $\beta$ -glukanaz) kullanılmaktadır. Bunun yanısıra yüksek manyetik alanlar ve elektrik alanları ile de biyofilmler yok edilebilmektedir. Gıda paketlenme malzemelerinde bulunan antimikrobiyal bileşikler ile film oluşumu engellenebilmektedir (Poulsen, 1999).

## 2.2. Biyofilm Oluşum Mekanizması

Mikroorganizmaların biyofilm oluşturması çeşitli aşamalardan meydana gelmektedir (Şekil 2.3). Biyofilm oluşumu temel olarak mikroorganizma çeşidine, ortam koşullarına, yüzeye ve zamana bağlıdır (Lundberg 1998).



Şekil 2.3. Biyofilm Oluşumu

### 2.2.1. Biyofilm oluşumunda etkili parametreler

Biyofilm oluşumunu etkileyen birçok parametre bulunmaktadır. Bunların bir kısmı mikroorganizmadan, bazıları mikroorganizmaların bağlandığı ve ürediği yüzeyden, bazıları ise ortamdaki kaynaklanan parametrelerdir.

#### 2.2.1.1. Mikroorganizmanın film oluşumu üzerine etkileri

Her mikroorganizma aynı oranda ve yapıda biyofilm oluşturmamaktadır. Film oluşumu türden türe, hatta suştan suşa değişmektedir. Bu çeşitlilik mikroorganizmaların bazı özelliklerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu

farklılıkların başında bakterilerin yüzey yapısı, yüzey hidrofobisitesi ve yüzey yükü gelmektedir.

### **2.2.1.1.i. Mikroorganizmanın yüzey yapısal bileşimi**

Bakteriler hücre membranlarının bileşimleri bakımından iki gruba ayrılır. Bu iki grup, **gram negatif** ve **gram pozitif** olarak adlandırılır. Gram pozitif bakterilerin hücre duvarları kompleks ve çoklu tabakadan oluşurken, gram negatif bakteriler ise tek tip molekülden, fakat daha kalın bir yapıdan oluşan membrana sahiptir (Parker et al 2000).

Bakteri duvarında temel yapıtaşı peptidoglikan (murein) gram pozitif bakterilerde %90, gram negatif bakterilerde %10 oranında olup 100'den fazla peptidoglikan tipi tanımlanmıştır. Çeşitli aminoasitler de membran yapısında bulunmaktadır. Bunların yanısıra teikoik asit gram pozitif bakterilerde bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerde pozitif bakterilere ek olarak lipopolisakkaritler membran yapısında yer almaktadır. Bu lipidler membranın dışında bir tabaka halinde bulunmaktadır (Parker et al 2000).

Bakterilerin bir kısmı 'flagella' denen ve hücre duvarı dışında yer alan uzantılara sahiptirler. Bakteriyal flagella, flagellin adlı protein yapısından oluşmaktadır. Flagella, bakterilerin yüzme ve yüzeyde hareket edebilme yeteneğini sağlamaktadır (Houdt and Michaels 2005).

Fimbria, flagelladan daha kısa olup bakterinin hareket edebilmesinde etkili değildir. Fimbria, bakterilerin yüzeylere yapışmasında etkilidir. Yüzeye yapışma biyofilm oluşumunda önemli bir faktördür (Houdt and Michaels 2005).

Pili, fimbriaya benzer, fakat daha uzun ve seyrek. Daha çok prokaryot konjugasyonunda görev alsa da yüzeye yapışma mekanizmasında da önemlidirler(Houdt and Michaels 2005).

Glikokaliks, bakterilerin salgıladığı polisakkaritlerden oluşan bir kapsüldür ve yapısında protein, polialkoller ve aminoşekerler de bulunmaktadır. Glikokaliksin hücrelerin yüzeylere yapışmasında önemli bir görevi vardır. Özellikle patojen bakterilerde, glikokaliksin dokularla etkileşime girdiği ve bünyesindeki su miktarı nedeniyle, bakterileri organizmanın bağışıklık sistemine karşı dirençli hale getirdiği bilinmektedir (Houdt and Michaels 2005).

#### **2.2.1.1.ii. Mikroorganizma hidrofobisitesi**

Hidrofobisite ya da tam karşıtı olarak hidrofilsite bir yüzeyin hava ortamında su ile ıslanabilirliğini tanımlar. Bakteri yüzeyinin hidrofobisitesi yapışmayı etkileyen faktörlerden biridir. Kısa mesafede yapışmayı desteklemek amacıyla yüzeyler arası su tabakasının ortadan kalkması hidrofobisite sayesinde gerçekleşmektedir. Su tabakasının iki yüzey arasında kaybolmasıyla birlikte yakın mesafe hücre-yüzey etkileşimi ortaya çıkmaktadır (Ukuku et al 2002).

Hidrofobisite, bakteri hücrelerinde değme açısı ölçümleri ve yüzey serbest enerjilerin belirlenmesi, hidrokarbonlara adsorpsiyon testi, iki fazlı sistemlerde hidrofobik ayrılma, hidrofobik etkileşim kromatografisi, tuzda kümeleşme testi ve yüzey yükü ölçümü ile incelenebilmektedir (Rijgnaarts et al 1995). Aşağıda bu testler hakkında özet bilgi sunulmuştur.

#### **Mikroorganizma tabakalarında değme açısı ölçümleri ve yüzey serbest enerjilerinin belirlenmesi**

Mikrobiyal hücre yüzeyi değme açısı ölçümleri, hücre tabakası üzerinde yapılır. Bu hücre tabakası katı besiyeri üzerinde veya membran filtreden süzülen sıvı kültürlerde filtre üzerinde kalan hücrelerden elde edilir. Değme açısı ( $\theta$ ), su damlasının yüksekliği ve taban genişliği ölçülerek hesaplanır. Su damlası yüzeyler üzerinde ganyometre ile gözlemlenir. Hesaplanan değme açıları ile yüzey serbest enerjileri saptanabilmektedir (Schneider 1996).



### **Hidrokarbonlara adsorpsiyon testi**

Hidrofobik karakterli hücrelerin iki fazlı hidrokarbon-su sisteminin arayüzeyinde ayrılması ile hidrokarbonlara bakteriyal yapışma testi uygulanabilmektedir. Sıvı hidrokarbon ve mikroorganizma hücrelerinden oluşan süspansiyon hazırlanıp fazların ayrılması için beklenir. Hidrofobik karakterdeki mikroorganizmalar hidrokarbon damlacıklarına bağlanarak üst tabakalarına geçip yağ damlacıkları oluştururlar. Hidrokarbon fazında yapışan hücre yüzdesi, hücre yüzey hidrofobitesinin bir ölçütü olarak değerlendirilir (Rosenberg 1981).

### **İki fazlı sistemde hidrofobik olarak ayrılma**

Mikroorganizmaların birbirine karışmayan iki sıvı olan dekstran ve polietilenglikol içinde ayrılması iki fazlı sistemde hidrofobik ayrılma olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde hidrofobik karakter taşıyan mikroorganizmalar polietilenglikol, hidrofilik karakter taşıyan mikroorganizmalar ise dekstran fazında toplanmaktadır (Mei et al 1998).

### **Hidrofobik etkileşim kromatografisi**

Mikroorganizmaların hidrofobik karakterli bir jele yapışma miktarını ölçen kromatografik bir yöntemdir. Süspansiyon haldeki hücreler jel dolgulu kolonlardan geçirilerek kolona tutunan hücre yüzdesi, hücre konsantrasyonu ölçülerek hesaplanır ve sonuçlar hidrofobite indeksi olarak tanımlanır (Mei et al 1998).

### **Tuzda kümeleşme testi**

Hidrofobik mikroorganizmalar düşük tuz konsantrasyonunda, hidrofilik mikroorganizmalara göre daha fazla kümeleşmektedir (Mei et al 1998).

#### **2.2.1.1.iii. Mikroorganizma yüzey yükü**

Mikroorganizma hücre duvarında bulunan makromoleküllerin çoğu polielektrolit karakterde olup karboksil, fosfat veya amino grupları taşımaktadırlar. Bulunan bu

anyonik ve katyonik gruplar hücre duvarına amfoterik özellikler vermektedir. Hücre duvarının net yükü pH'a bağlı negatif veya pozitif olabilmektedir (Rouxhet et al 2001).

Mikroorganizmaların yüzey yükü elektroforetik mobilite ölçümleri ile karakterize edilir ve mobiliteye karşı pH eğrisi ile ifade edilir. Elektroforetik mobilite, U Smoluchowski denkleminde (Eşitlik 2.1) göre zeta potansiyeline ( $\zeta$ ) bağlıdır (Rouxhet et al 2001).

$$U = \frac{\epsilon \zeta}{\eta} \quad (2.1)$$

Burada  $\eta$  viskozite,  $\epsilon$  ise geçirgenliği tanımlamaktadır.

#### **2.2.1.2. Çevrenin film oluşumu üzerine etkileri**

Mikroorganizmalar uygun olmayan çevre koşullarında korunma amaçlı olarak biyofilm oluşumunu hızlandırır ve artırırlar. Besin miktarı, pH, iz elementlerin konsantrasyonu, ortamın iyonik gücü, kalsiyum ve/veya magnezyum gibi iyonların ortamda bulunuşu ve sıcaklık bu kritik koşullardan bazıları olarak sayılabilir.

Uygun koşullarda bulunan bakteri, yaşamını kendine koruyucu bir ortam yaratmadan sürdürebilmektedir. Fakat, ideal koşullardan uzaklaştıkça film oluşumu önem ve hız kazanmaktadır. Yapılan çalışmalarda besin yokluğunda bakterilerin biyofilm oluşumunun, uygun besin miktarına sahip olanlardan daha fazla olduğu görülmüştür (Mueller 1996).

#### **2.2.2. Bakterilerin yüzeylere yapışma mekanizması ve biyofilm oluşumu**

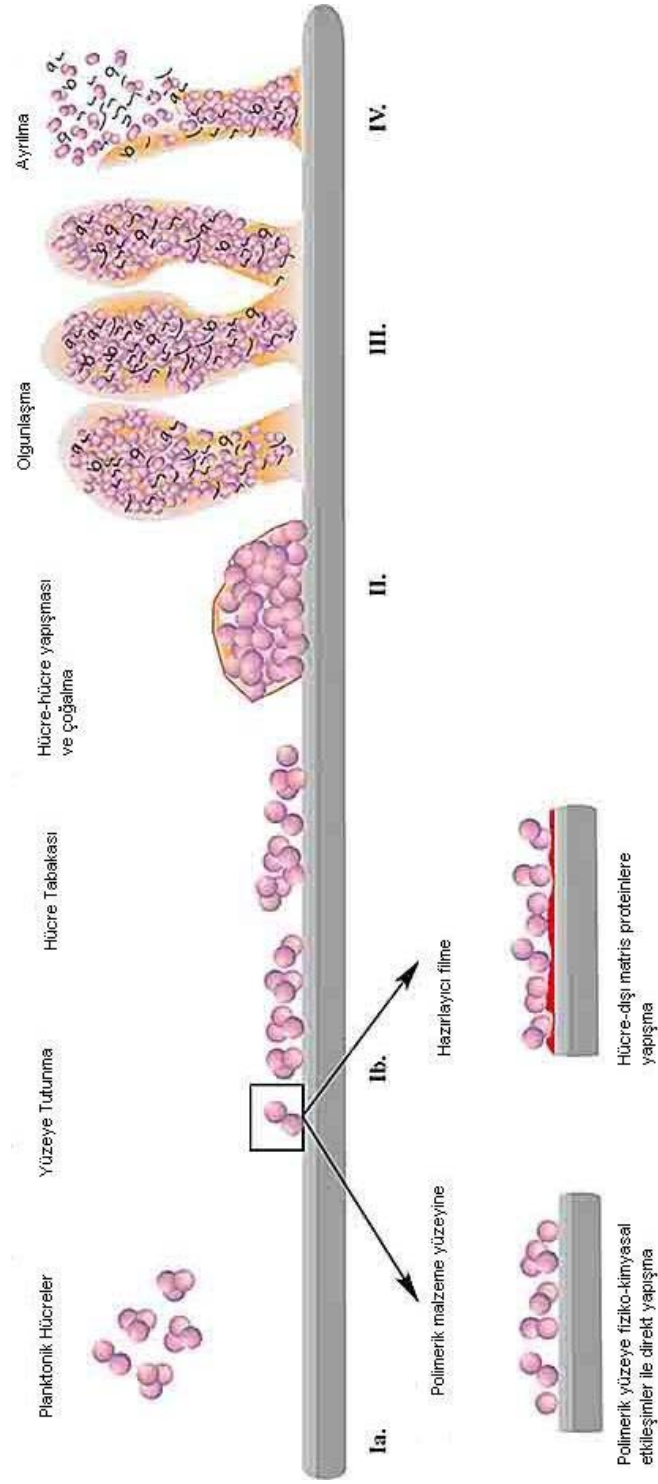
Bakterilerin biyofilm oluşturmaları için öncelikle bir yüzeye tutunmaları gerekmektedir. Bu tutunma temelde üç aşamada gerçekleşir; hazırlayıcı film oluşumu, yüzeye taşınım, yüzeye bağlanma ve polisakkarit üretimi (Bos et al 1999).

Bakteriler bir yüzey üzerine direkt olarak tutunmazlar. Öncelikli olarak malzeme yüzeyinde “hazırlayıcı film” olarak nitelendirilen organik tabaka oluşur. Tutunmayı sağlayan organik maddelerin başında fibronektin, kolojen, albumin gibi proteinler yer almaktadır. Maddeler yüzeye sıvı veya hava yoluyla ulaşırlar. Yüzeye adsorplanan bu maddeler malzeme yüzeyine serbest bakterilerin tutunmasını kolaylaştırırlar (Bos et al 1999).

Mikroorganizmalar, yapışacakları doku veya malzemeye sıvı veya hava içerisinde pasif olarak taşınırlar. Bunun dışında bakteriyel flajel bakteri hareketini, pili ise bakteri hücreleri arasındaki genetik alışverişi yani aynı zamanda haberleşmeyi sağlar. Bu hücre uzantıları ile veya bazı amipsi hareketlerle mikroorganizmalar bölgeye aktif olarak ulaşabilir. Yüzeye gelen mikroorganizmalar negatif yüklüdür ve yapışma yüzeyindeki yüklü bölgeler ile olan elektrostatik etkileşimler ya da hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler ile yüzeye tutunma gerçekleşir. Bunun yanı sıra, yüzey ile aynı yüke sahip mikroorganizmalar ikincil minimumda (yüzeyden yaklaşık 10 nm uzaklıkta) van der Waals çekici kuvvetleri sayesinde yüzeye yakın bir pozisyon alır. Yüzeye yaklaştıkça bu çekici kuvvetler artar ve böylece mikroorganizmalar yüzeyde birincil minimuma (yüzeyden yaklaşık 2-3 nm uzaklıkta) ulaşırlar. Bu tutunmalar geri dönüşümlüdür. Bağlar ne spesifik, ne de kuvvetlidir. Bakteri ile yüzey arasında bu aşamada bir miktar boşluk bulunmaktadır ve çeşitli etkilerle bu bağlar tekrar bozulabilmektedir (yüzeyden kopma) (Bos et al 1999).

Bakteriler yüzeye 1 nm veya daha az uzakta olup tutunduktan sonra, fimbria, pili ve yüzey tutunma proteinleri, hazırlayıcı film tabakasındaki fibronektin, protein gibi makromoleküller ile etkileşime girerler. Bu şekilde bağlantı, geri dönüşümsüz bir şekilde girmektedir. Bağlantılar sıkı kimyasal bağlantılardır (iyonik, hidrojen ve kovalent bağlanma) ve spesifiktirler (Bos et al 1999).

Bakterilerin ürettiği polisakkaritler de yüzeye bağlanarak hücre kümeleşmesine ve mikrokolonilerin oluşmasına yardımcı olurlar. Sıcaklık, besi ortamı, katyon dengesi gibi çevresel koşullar uygunsa bakteri üremesi gerçekleşir. Ayrıca organik maddeler, ölü hücreler (nötrofil, fagositik, epitel hücreler vb.) ve minerallerin de



Şekil 2.4. Biyofilm Dinamiği

katılımıyla biyofilm yapısı oluşur. Biyofilm oluşumunda birçok gen, hücreler arası sinyalleşme ve polisakkaritlerin üretiminde rol almaktadır (Camper et al 2002).

Kümeleşme ve koloni oluşumundan sonra, biyokütlenin dış yüzeyinden ayrılmalar görülür. Bu ayrılmalar koloninin yaşı ve çeşitli fiziksel kuvvetler nedeniyle gerçekleşir. Ayrılan biyofilm parçaları tekrardan başka yüzeylerde biyofilm oluşturabilme kabiliyetindedirler (Poulsen et al 1999) (Şekil 2.4).

### **2.3. Biyofilm Analiz Yöntemleri**

Biyofilm yapısını incelemek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Biyofilmler safranin veya tripan mavisiyle boyanabilir. Kalınlık, ışık mikroskobu, yüzey özellikleri ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile tespit edilebilir. Biyofilm içeren malzeme 60°C, 103°C veya 105°C'de kurutulur ve tartılır. Daha sonra biyofilm uzaklaştırılıp malzeme tekrar kurutulur ve tartılır. Bu iki tartım arasındaki fark, kuru film ağırlığı olarak ifade edilir. Bu değer; kalınlık, yüzey alanı ve daha sonra yoğunluk hesaplaması için kullanılır. Ayrıca biyofilm parafilm içine gömülüp histolojik inceleme yapılabilir. Biyofilm içeriğinin tespiti için çeşitli işaretli probalar kullanılır (An ve Friedman, 1997).

#### **2.3.1. Direkt analiz yöntemleri**

Bakteri sayısı ve/veya biyofilm yapısı, ışık mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu ve epifloresan mikroskobu ile direkt olarak incelenebilir (An ve Friedman, 1997).

##### **2.3.1.1. Işık mikroskobu ile inceleme**

Bu yöntem bakteriyal gözlem ve sayım için temel bir metoddur. Işık mikroskobu kullanmak için yüzeyin üst katmanı saydam olmalıdır. Bunun için örnek olabildiğince ince olmalıdır. Genelde bakteriler "kristal viyole" veya "karbol fuksin" gibi boyalar yardımı ile gözlemlenir. Biyofilmde bulunan hücreler, yoğunluklarına bağlı olarak çok etkin bir şekilde incelenemezler.

### 2.3.1.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

“Scanning Electron Microscopy” yöntemi ile çok detaylı gözlem yapılabilen, fakat büyütme derecesinden dolayı sadece çok küçük alanlar incelenebilmektedir. Pahalı ve zahmetli olan bu teknik aynı zamanda çok zaman almaktadır. Biyofilm incelemelerinde, hücreler ve hücre dışı matris detaylı olarak incelenebilmektedir.

### 2.3.1.3. Epifloresan mikroskobu (IAEFM)

Opak ve pürüzsüz yüzeyler (metal, plastik, seramik) epifloresan mikroskop kullanılan floresana dayanmaktadır. Güvenli olan bu yöntem opak yüzeylerde doğrudan analiz imkanı sağlar ve kısa zamanda çok sayıda örnek incelenebilir.

### 2.3.1.4. Konfokal mikroskopi

Hücreler, floresan esasına dayanan bir analiz tekniği olan konfokal lazer taramalı mikroskopi ile buldukları yüzeylerden ayrılmadan incelenebilmektedir. Bu yöntem ile biyofilmin üç boyutlu yapısının incelenmesi mümkündür (Netuschilf 1997). Konfokal mikroskopide amaç üç boyutlu inceleme olup, hücre sayısı eşitlik 2.2'ye göre ortalama olarak verilebilmektedir

$$\text{Hücre sayısı} = \frac{\text{Ölçülen yüzeyde toplam floresan şiddeti}}{\text{Tek bakteri hücresi için ortalama floresan şiddeti}} \quad (2.2)$$

İncelenmek istenen yüzey, çeşitli floresan özelliğine sahip boyalar kullanılarak boyanmaktadır (SYTO 60, GFP, Etidiyum Bromür, Oksoneller, CTC (Hausner, 2004)). Daha sonra Argon (514/488 nm), HeNe (543 nm), Argon Kripton (568 nm) lazerlerle ve objektif lensler (su, yağ) (Wingender 2004) ile incelenmektedir. Konfokal mikroskopi x,y,z yönlerinde tabakalar halinde tarama yapmakta ve görüntü bilgisayar ortamında istenen üç boyutlu hale getirilmektedir (Lewandowski 2004).

## **2.3.2. İndirekt analiz yöntemleri**

Direkt analiz yöntemlerine alternatif olarak bakteri sayısı ve/veya biyofilm yapısı çeşitli indirekt yöntemler ile de incelenebilir (An ve Friedman, 1997).

### **2.3.2.1. CFU (Colony forming unit, koloni oluşturma birimi)**

Çok klasik bir yöntem olup, “bir bakteriden bir koloni oluşur” ana kavramından yola çıkmaktadır. İnkübasyon süresi nedeniyle çok yavaş bir yöntemdir, ayrıca çok kesin sonuca ulaşmak mümkün değildir. Çünkü seyreltme faktörü çok kritik olup, her zaman bir bakteriden bir koloni oluşmayabilir. Biyofilm oluşumunda hücre sayısının hesaplanması için etkin bir yöntem değildir, ortamdaki serbest mikroorganizmaların sayımı için daha etkin olarak kullanılabilir.

### **2.3.2.2. Radyoaktif işaretleme**

<sup>14</sup>C leusin, <sup>14</sup>C glukoz, <sup>3</sup>H timidin veya <sup>3</sup>H palmitik asit ile bakteri hücreleri işaretlenir. Çok hassas, doğru ve hızlı sonuç veren bu yöntem radyoaktif malzeme, özel laboratuvar koşulları ve teknikleri gerektirmektedir. Bu nedenle insan sağlığı açısından risk taşımaktadır.

### **2.3.2.3. CTC ile işaretleme**

Epifloresan mikroskopunun kullanıldığı bir yöntemdir. Floresan redoks boyası olan 5-siyano-2,3-ditolil tetrazolyum klorür (CTC), elektron transport aktivitesinin belirteci olarak kullanılır. Oksitlenmiş CTC renksizdir fakat indirgenmiş hali epifloresan mikroskop ile görüntülenebilmektedir.

### **2.3.2.4. Spektrofotometre**

Bakterilerin bulunduğu sıvının ışığı absorplaması ve geçirmesi ölçülerek bulanıklık derecesine göre bakteri sayısı tespit edilir. Doğrudan katı yüzey üzerinde ölçüm yapılamaması deney sonuçlarını olumsuz etkileyebilmektedir. Çünkü bakteriler katı yüzeyden sıvı ortama alınırken mutlaka bir kayıp söz konusu olur.

### 2.3.2.5. Hücre sayacı ile tayin

Bu yöntemde hücre büyüklüğü tespiti ve sayım yapılabilir. Orjinal olarak kan hücreleri sayımı için kullanılan bir yöntemdir. Çözelti sayaçtan geçerken, partiküllerin gösterdiği direnç ölçülmektedir. Bu şekilde her partikülün hacmi belirlenmektedir. Özellikle safsızlık söz konusu olduğunda avantajlı bir yöntemdir. Çok büyük partiküller filtre edilir, küçükler ise tespit edilebilir. Yöntem, koloni yöntemi ile birlikte kullanılır çünkü canlı hücreler sadece bu şekilde tespit edilebilir.

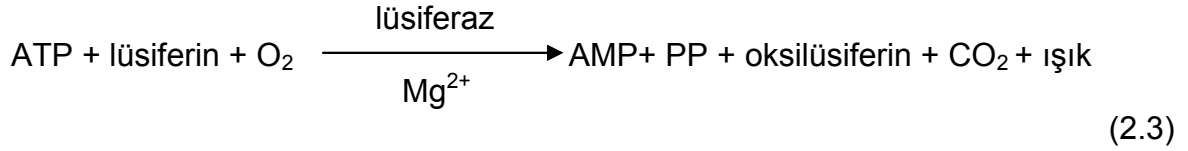
### 2.3.2.6. Biyokimyasal işaretleyiciler

ATP, DNA, üreaz ve lipopolisakkarit gibi moleküller biyokimyasal olarak işaretlenir ve floresan ile tespit edilir. Bu yöntemler içerisinde en çok kullanılanı ATP analizidir.

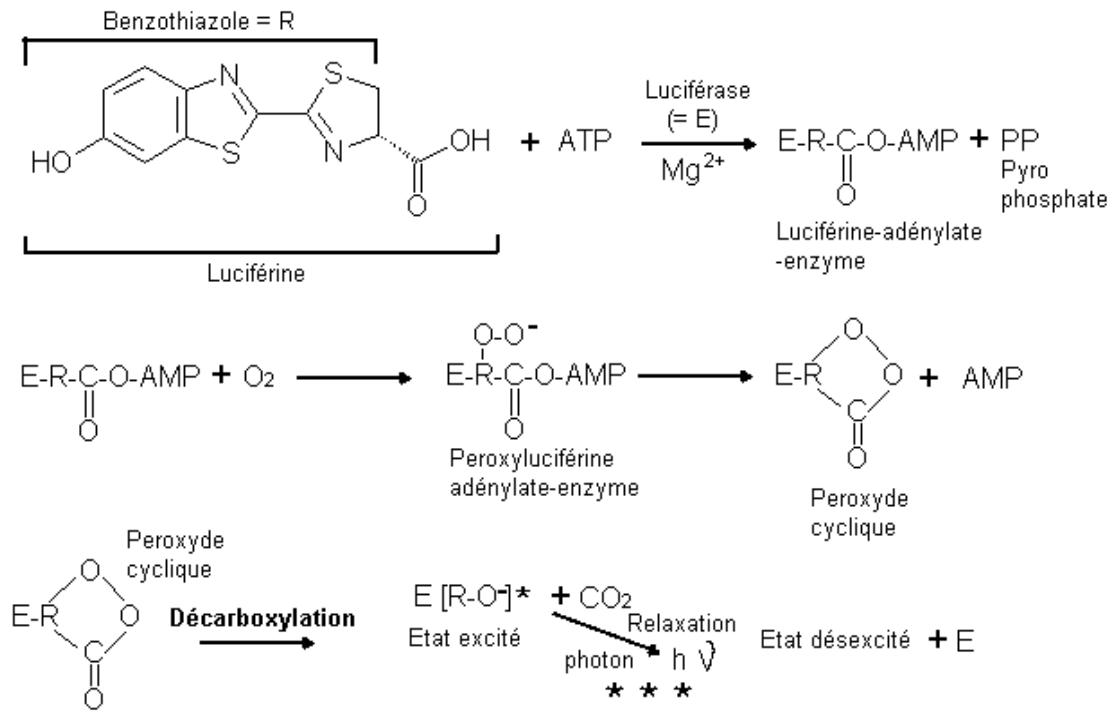
#### 2.3.2.6.1. Biyoluminesan ile ATP analizi

ATP analizi için bioluminesan reaksiyonundan faydalanılmaktadır (Eşitlik 2.3). Bioluminesan, canlı organizmaların organik bir madde olan lüsiferini, lüsiferaz enzimi yardımıyla oksitlemesi sonucu görülebilir ışık üretmesi reaksiyonudur. Bakteri, mantar, balık, böcek ve alg gibi çeşitli canlı grupları bioluminesan yapabilmektedir. En yaygın bioluminesan kullanımı dip okyanus canlılarında bulunmaktadır (canlıların %90'ından daha fazla). Bunun temel nedeni ortamda ışığın çok eser miktarda bulunmasıdır. Bunun yanısıra hayvanlar aleminin yarısı bioluminesans organizmalar içermektedir. Canlılar bu reaksiyon sonucu açığa çıkan ışığı besin bulma, eş seçimi, haberleşme gibi çeşitli işlevler için kullanırlar. Lüsiferaz yapısı her canlı grubu için değişmektedir ve böylece üretilen ışığın dalga boyu da farklılık göstermektedir [örneğin ateş böceği (*Photinus pyralis*) lüsiferaz enzimi için 562 nm, bakteriyal lüsiferaz için 495 nm]. Enzimin bu farklı yapıları, sentezlendiği *lux* genlerin her canlı grubu için farklı olduğundan kaynaklanmaktadır. Bu farklı enzim yapıları da sonuç olarak farklı tipte substratlarla tepkimeye girecek, farklı bir reaksiyon gerçekleştirecektir (örneğin ateşböceği reaksiyonda ATP molekülünü kullanırken, bakteriler FMN'yi kullanmaktadır) (Squirrell et al 2002).





Yöntem, bakteri hücrelerinin önceden belirlenmiş olan ATP mol sayısından faydalanarak bakteri sayısını dolaylı olarak tespit etmeyi hedeflemektedir. Hücre içi metabolik ATP'yi hücre dışına, bakteri hücre duvarına zarar vererek çıkartıp, lüminometre veya Floresan Spektrofotometre ile ATP'den lüsiferaz ve lüsiferin ile açığa çıkan ışık miktarı ölçülmektedir ve rölatif ışık birimi (RLU) olarak ifade edilmektedir (Squirrell et al 2002). Ayrıntılı reaksiyon şeması şekil 2.5'de verilmiştir.



Şekil 2.5 ATP Biyoluminesans ile Işık Üretme Reaksiyonu

## 2.4. Kitosan

Kitosan, kitinin N-deasetillenmiş türevidir. Ancak bu asetilasyon neredeyse hiçbir zaman tamamlanamamaktadır. Kitin, selülozdan sonra dünyada en çok bulunan ikinci doğal biyopolimerdir. Aynı zamanda doğal olarak en çok "amino şeker" içeren polisakkarittir. Doğada bol bulunuşu, kitin ve onun bir türevi olan kitosanın kendilerine özgü kimyaları ile birleştiğinde pek çok potansiyel uygulamaları ortaya

çıkılmaktadır. Kitin, kabukluların, böcek dış iskeletlerinin, mantar hücre duvarlarının, mikrofauna ve planktonun bir bileşeni olarak bulunmaktadır. Kimyasal olarak  $\beta(1-4)2$ -acetamido-2-deoxy-D-glucose (veya N-acetyl glucosamine) tekrarlanan birimlerinden oluşan bir polimerdir (Kumar ve Majeti 2000).

Kitosan, kitine göre daha reaktiftir ve toz, film, lif ve bunun gibi pek çok formda üretilebilmektedir. Bu yüzden pek çok ticari uygulamada, kitine nazaran, N-deasetillenmiş türevi olan kitosan kullanılmaktadır. Kitosan  $\beta(1-4)2$ -amino-2-deoksi-D-glukoz (veya D-glukosamin) tekrarlanan gruplarından oluşmuş bir polisakkarittir (Kumar ve Majeti 2000).

Şekil 2.6'da kitin ve kitosanın kimyasal yapıları karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Kitin ve kitosanın ticari olarak ilgi görmeleri yüksek oranda (% 6.89) azot içermelerindedir (sentetik selüloz için bu oran % 1.25'dir.). Bu yüksek azot oranı kitini yararlı bir şelat ajanı yapar. Günümüzde kullanılan polimerlerin pek çoğu sentetik malzemelerdir. Fakat bunların biyouyushabilirlikleri ve biyobozunabilirlikleri, selüloz, kitin, kitosan gibi doğal polimerlere nazaran oldukça sınırlıdır. Bu doğal polimerlerin de reaktiviteleri ve işlenebilirlikleri sınırlıdır. Bu konuda kitin ve kitosan uygun fonksiyonel malzemeler olarak tavsiye edilmektedirler. Çünkü bu doğal polimerler, biyouyushabilirlik, biyobozunabilirlik, toksik olmama, adsorpsiyon gibi mükemmel özelliklere sahiptirler (Kumar ve Majeti 2000).

Kitosan; biyouyushabilirlik, antibakteriyal, antifungal ve antitumoral etki, hemostatik, ağır metal, protein ve yağ absorpsiyonu, biyodegradasyon gibi özellikler nedeniyle birçok alanda yaygın kullanım alanına sahiptir. Bu kullanım alanlarının başında kontrollü ilaç salımı, biyosensör uygulamaları, hücre kültürü, gıda ve su arıtım sistemleri yer almaktadır (Kumar ve Majeti 2000).

Kontrollü salım teknolojisinde kitosan kapsül, jel, film veya boncuklar şeklinde kullanılmaktadır. DNA salımlı gen terapilerine kadar birçok çalışma yapılmıştır. Klasik salım dışında, kitosanın makrofaj aktive edici ve hemostatik özelliği nedeniyle yara iyileştirmede olumlu rol oynadığı gösterilmiştir. Kitosanın yüksek  $O_2/CO_2$  geçirgenliği nedeniyle kontakt lenslerde ve yapay deri kullanımında da avantajlı olabileceği göstermiştir. Tarım teknolojisinde, yaprak ve gövdeyi kitosan

filmle kaplamanın hem mikrobiyal enfeksiyonların engellenmesi, hem de bitkilerin daha dirençli olması için gen transferini de sağlamaktadır (Kumar ve Majeti 2000).

Kitosanın proteinlere yüksek afinitesi, enzim immobilize edilen biyosensörlerde kullanımını uygun hale getirmektedir. Günümüze kadar kitosana birçok enzim immobilize edilmiştir. Bu enzimler incelenmek üzere hazırlanan örneklerdeki substratla tepkimeye girmekte ve bunun sonucunda yorumlanabilen data elde edilmektedir (Kumar ve Majeti 2000).

Hücre kültürü teknolojisinde yüzey kimyası çok önemli bir yere sahiptir. Kitosan doğal bir polimer olması nedeniyle birçok üstün özelliğe sahiptir. Memeli hücreleri üremek ve canlılıklarını devam ettirebilmek için tutunabildikleri inert, biyoyoumlu bir yüzeye ihtiyaç duyarlar. Hücre kültüründe malzemenin yeterince sert ve rijit olması gerekmektedir ve kitosan genelde diğer doğal polimerlerden daha iyi bir mekanik özelliğe sahiptir. Hücrelerin bir yüzeye tutunabilmesi için yüzey üzerinde uygun tutunma bölgeleri ve reseptörler bulunması gerekmektedir. Kitosan kolay bir şekilde modifiye edilebilmekte ve protein afinitesi yüksek olduğundan uygun peptid veya proteinler kitosan yüzeyine immobilize edilebilmektedir. Hücre kültüründen daha ileri olan doku mühendisliğinde genelde üç boyutlu hücre iskeleleri kullanılmaktadır. Hücre iskelelerinin biyobozunur olması istenebilmektedir. Kitosan biyobozunur bir malzeme olup bozduğunda toksik olmayan CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O gibi ürünler oluşmaktadır. Kitosan hücre iskeleleri porojen varlığı veya dondurma yöntemi ile homojen olarak hazırlanabilmektedir. Kitosan bunun haricinde enjekte edilebilen ve vücut sıcaklığında jelleşen formda da üretilebilmektedir. Bu tip jeller özellikle dolgu malzemesi ve ilaç salım sistemlerinde kullanılmaktadır (Ray ve Singh 2000)

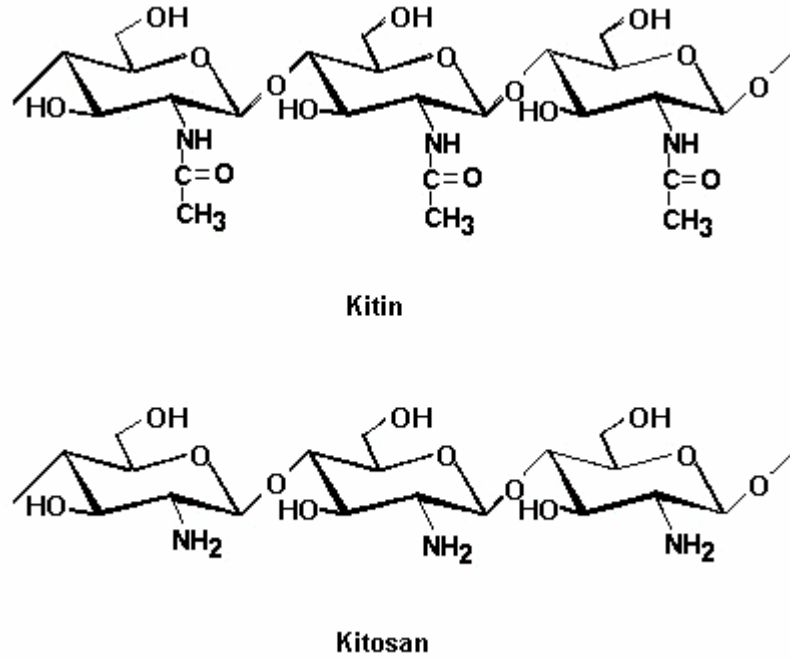
Gıda teknolojisinde kitosanın antibakteriyal etkisi, renk ve yapı stabilizatörü olarak sentetik kimyasallara alternatif olarak kullanılabilir. Kitosan membranların mekanik dayanıklılıkları ve antimikrobiyal etkileri, kaplama ve paketleme malzemeleri olarak kullanılmalarına olanak sağlamaktadır (Kumar ve Majeti 2000).

Su arıtım sistemlerinde en çok kitosanın ağır metal bağlama özelliğinden yararlanılmaktadır. Kitosan sırasıyla Pd>Au>Hg>Pt>Cu>Ni>Zn>Mn>Pb>Co>Cr

>Cd>Ag bağlamaktadır. Kitosanın jel boncuklar, çözelti ve membran formunda bu metalleri kendine bağladığı gözlemlenmiştir (Kumar ve Majeti 2000).

#### 2.4.1. Kitosanın üretimi

Kitin, yengeç veya karides kabuklarından ve fungus hiflerinden (*fungus mycelia*) kolaylıkla elde edilmektedir. Kabukluların kabuklarının işlenmesi; proteinlerin ayrılması ve yengeç kabuklarında yüksek miktarda bulunan kalsiyum karbonatın çözülmesini içermektedir. Sonuçta elde edilen kitin %40'lık (w/v) sodyum hidroksitte 120°C'da 1-3 saat boyunca deasetile edilir. Bu işlem sonucunda %70 deasetillenmiş kitosan elde edilir.



Şekil 2.6. Kitin ve kitosanın kimyasal yapısı.

#### 2.4.2. Kitosanın özellikleri

Selüloz, dekstran, pektin, aljinik asit, agar, agaroz ve karragenan gibi pek çok doğal polisakkarit nötr veya asidiktirler. Yalnız kitin ve kitosan son derece bazik polisakkaritlerdendir (Kumar ve Majeti 2000).

Nötr veya bazik pH'da, kitosan serbest amino grupları içerir ve suda çözünmez. Oysaki asidik pH'da, kitosan amino fonksiyonlarının protonlaşmasından dolayı

suda çözüdür. Çözünürlük, serbest amino ve N-asetil gruplarının dağılımına bağlıdır. Kitosan asidik pH'da doğrusal bir elektrolitdir. Sonuç olarak kitosan asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözüdür (Kumar ve Majeti 2000).

Kitinin azot içeriği deasetillenme derecesine bağlı olarak %5 ile %8 arasında değişmektedir. Doğal olarak kitinin tüm birimleri tamamen asetillenmiş halde değildir; yaklaşık %16'sı deasetillenmiş haldedir. Kitosandaki azot da çoğunlukla birincil alifatik amino grupları şeklinde bulunmaktadır. Bu yüzden kitosan aminlerin tipik reaksiyonlarına maruz kalırlar; ki en önemlileri N-asetilasyon ve Schiff reaksiyonudur (Kumar ve Majeti 2000).

#### **2.4.2.1. Fiziksel ve kimyasal karakterizasyon**

Bu bölümde kitosanın fiziksel ve kimyasal karakterizasyonu hakkında bilgi verilmiştir.

##### **2.4.2.1.i. N-Asetilasyon derecesi**

Kitosan genellikle bir homopolimer olarak ifade edilir. Bununla birlikte deasetilasyon prosesi nadiren tamamlandığı için pek çok ticari ve laboratuvar ürünleri, N-asetilglukozamin ve N-glukozamin tekrarlanan birimlerinin bir kopolimeri olma eğilimindedirler. Bu iki tekrarlanan birimin oranı, kitosanın hazırlanmasına ve kaynağına bağlıdır, ancak glukozamin birimleri daha ağır basmaktadırlar (Kumar ve Majeti 2000).

##### **2.4.2.1.ii. Molekül ağırlığı**

Kitinin kitosana dönüştürülmesi molekül ağırlığını düşürmekte, deasetilasyon derecesini değiştirmekte, ve böylelikle yük dağılımını farklılaştırmaktadır. Bu da aglomerasyonu etkilemektedir. Kitinin molekül ağırlığı  $1.03 \times 10^6$ -  $2.5 \times 10^6$  iken, N-asetilasyon reaksiyonu bu değerleri  $1 \times 10^5$ -  $5 \times 10^5$  mertebesine indirmektedir (Kumar ve Majeti 2000).

##### **2.4.2.1.iii. Çözücü ve çözelti özellikleri**

Kitosan erimeden önce bozunur. Bu özellik geniş hidrojen bağı bulunan polisakkaritler için tipik bir davranıştır. İşlevselliklerini korumak için kitin ve

kitosanın uygun bir çözücü sisteminde çözülmesi gerekmektedir. Her çözücü sistemi için, polimer konsantrasyonu, pH, karşı-iyon konsantrasyonu ve sıcaklığın vizkozite üzerindeki etkileri bilinmelidir (Kumar ve Majeti 2000).

#### **2.4.2.1.iv. Biyotıp ve biyoteknoloji uygulamaları açısından avantajları**

Kitosan düşük bir toksisiteye sahiptirler. Kitosanın laboratuvar farelerinde LD<sub>50</sub> değeri 16g/kg vücut ağırlığı'dır. Bu değer şeker ve tuzun değerlerine yakındır. Kitosan vücutta tamamen absorbe olan zararsız ürünlere (amino şekerleri) yavaş bir şekilde parçalanabilen biyoyumlu bir malzemedir (Kumar ve Majeti 2000).

Klinik uygulamalarda kullanılan biyomateryaller için uygulanacak sterilizasyon yönteminin seçimi önemlidir. Çünkü bu yöntemler ile biyomateryalin özellikleri etkilenebilmektedir. Kitosan membranlar ile yapılan çalışmalarda sterilizasyon amacıyla otoklav, etil alkol, yük boşalımı ve  $\gamma$ -radyasyonu uygulanmıştır, ve bu yöntemlerin malzemenin fiziksel özellikleri üzerindeki etkisinin önemsiz olduğu görülmüştür (Kumar ve Majeti 2000).

#### **2.4.2.2. Kitosanın enzimatik degradasyonu**

Doğal polimerler genelde doğal ortamda mikroorganizmaların ürettikleri bazı enzimlerle daha küçük birimlere parçalanmaktadır. Bu olay degradasyon olarak tanımlanır ve geri dönüşümsüzdür. Kitosan, kitosanaz, lizozim, kitinaz gibi enzimlerle degrade edilebilmektedir. Kitosanaz yaygın olarak toprak mikroorganizmaları (bakteri ve fungus) ve bazı bitkiler tarafından üretilir. Bu enzimler kitosani hidrolize eder ve kitosan degradasyon sonucu oligosakkaritlere ayrılır. Degradasyon sonucu ortaya çıkan oligosakkaritler organizmalar için bir besin kaynağı oluşturmaktadır. Kitosanaz genelde 10-50 kDa aralığındaki bir moleküler ağırlığa sahiptir. Enzimin optimum çalışma aralığı kaynağına göre değişmekte ve pH 4.0-8.0, 30-70°C'dir. Kitosanazın aktivitesi kitosanın moleküler ağırlığına ve asetilasyon derecesine bağlıdır. Tamamen asetile olmuş kitosan degrade edilememektedir %80 civarında asetile olmuş kitosan genel olarak en çok degrade edilebilmektedir (Ikada ve Tomihata 1997).

#### **2.4.2.2.1. Degradasyon inceleme yöntemleri**

i) Degrade olan kitosan zaman içerisinde yapısından fiziksel olarak ayrılan oligosakkaritler nedeniyle kütsel olarak azalacaktır. Zamana bağılı olarak ağırlık ölçümleri degradasyon miktarını göstermektedir (Ikada ve Tomihata 1997).

ii) Kitosan yapısındaki bozulma ve yapısal kayıp incelemeleri için SEM analizi yapılmaktadır. Böylece görsel olarak degradasyon incelenebilmektedir (Ikada ve Tomihata 1997).

iii) Degradasyon sırasında ortamda artan oligosakkarit miktarı ölçülerek degradasyon miktarı dolaylı olarak incelenebilmektedir. Oligosakkaritler Sumner reaktifi ile tepkimeye sokularak ortaya çıkan renk değışiminden oligosakkarit miktarı ölçülmektedir (Ikada ve Tomihata 1997).

### **3. DENEYSEL ÇALIŞMA**

Sunulan çalışmada, kitosan bazlı makrogözenekli membranlar hazırlanmış ve farklı türlerde bakterilerin membranlar üzerindeki yapışma kinetiği ve biyofilm oluşturma kapasitesi incelenmiştir. Bu bölümde ilk olarak kitosan bazlı membranların hazırlanması, hazırlanan membranların karakterizasyon ve degradasyon çalışmaları anlatılmıştır. Daha sonraki bölümlerde hazırlanan membranlar ile gerçekleştirilen durgun sistem deneyleri ile membranların yüzeyinde bakteri yapışma kinetiği ve biyofilm oluşumu incelenmesine yönelik çalışmalar hakkında bilgi verilmiştir.

#### **3.1. Kitosan Membranların Hazırlanması**

Bu çalışmada kullanılan kitosan membranlar, “çözücü buharlaştırma” (solvent evaporation) yöntemi ile hazırlanmışlardır. Bu yöntem aşağıda detaylı olarak açıklanmış ve Şekil 3.1’de de şematize edilmiştir.

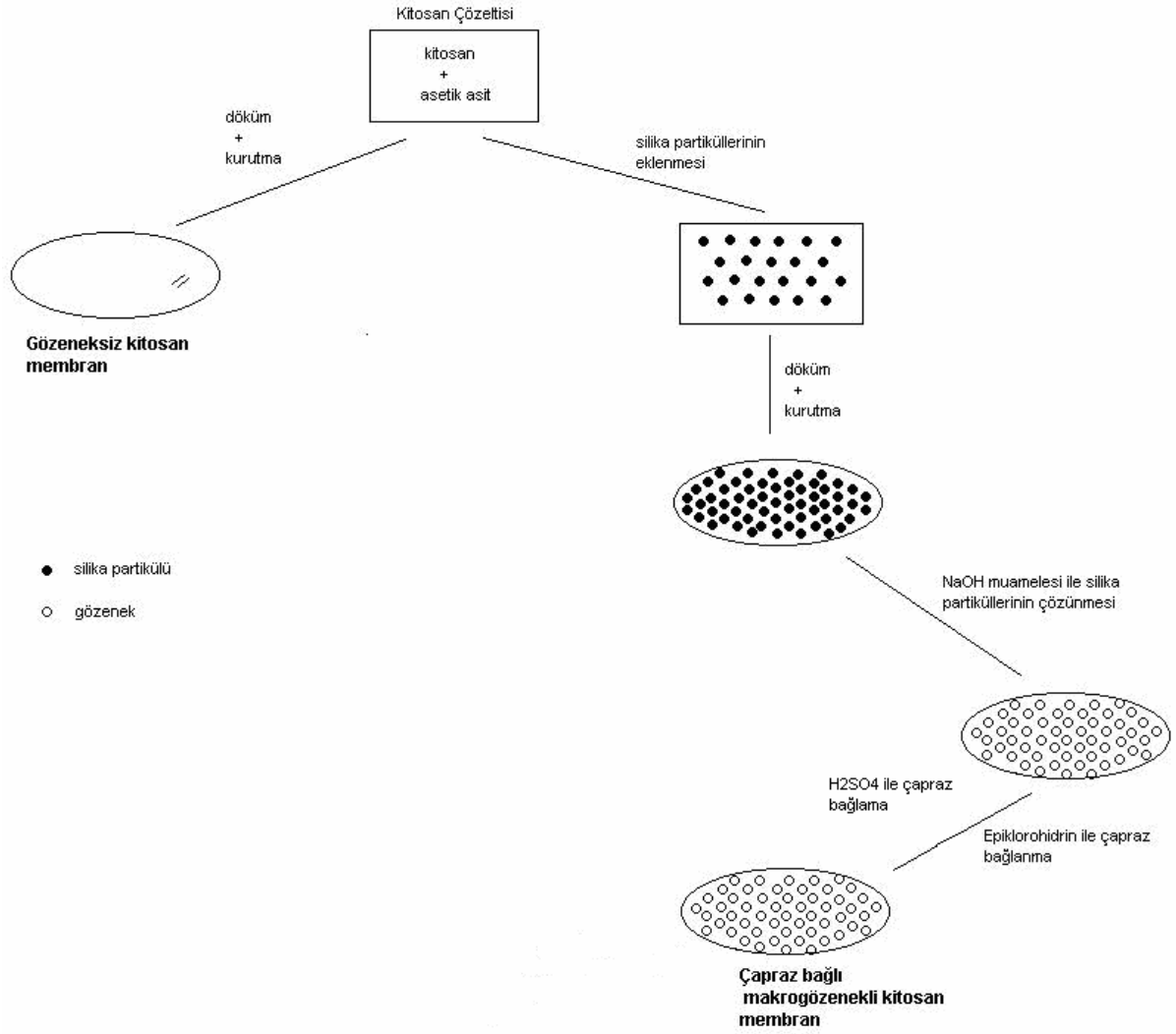
##### **3.1.1. Gözeneksiz kitosan membranların hazırlanması**

Çözücü-buharlaştırma yöntemi, membran hazırlamada kullanılacak polimerin uygun çözücü içerisindeki çözeltisinin hazırlanması ve bu çözeltinin istenilen formda şekillendirilerek kurutulması esasına dayanmaktadır. Kitosan; asetik asit, formik asit gibi seyreltik asitlerde çözünmektedir. Bu çalışmada kitosan çözeltisi, kitosanın (% 85 deasetillenmiş, Sigma, Almanya) % 1’lik (hacim/hacim) asetik asit içerisinde 3 saat boyunca karıştırılmasıyla hazırlanmıştır. 0.35 g  $\pm$  0.0001 g kitosanın, 30 ml asetik asit içerisinde çözünmesi sonucu elde edilen çözelti 6 cm çapındaki cam Petri kaplarına dökülmüş ve oda sıcaklığında ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) kurumaya bırakılmışlardır.

##### **3.1.2. Makrogözenekli kitosan membranların hazırlanması**

Makrogözenekli kitosan membranların hazırlanmasındaki ilk aşama bir önceki kısımda anlatıldığı şekilde kitosan çözeltisinin hazırlanmasıdır. Hazırlanan bu





Şekil 3.1. Kitosan membranların hazırlanması.

çözeltiye gözenek oluşturucu olarak kullanılan iki farklı boyuttaki silika jel (15-40  $\mu\text{m}$   $\text{çap}$ , Sigma, Almanya ve 80-120  $\mu\text{m}$   $\text{çap}$ , Sigma) 1:16 (w/w) oranında eklenmiş ve karıştırma hızı artırılarak 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Böylece silika partiküllerin çözelti içerisinde homojen dağılımı sağlanmıştır. Bu, gözenekliliğin homojen olması açısından önemli bir faktördür.

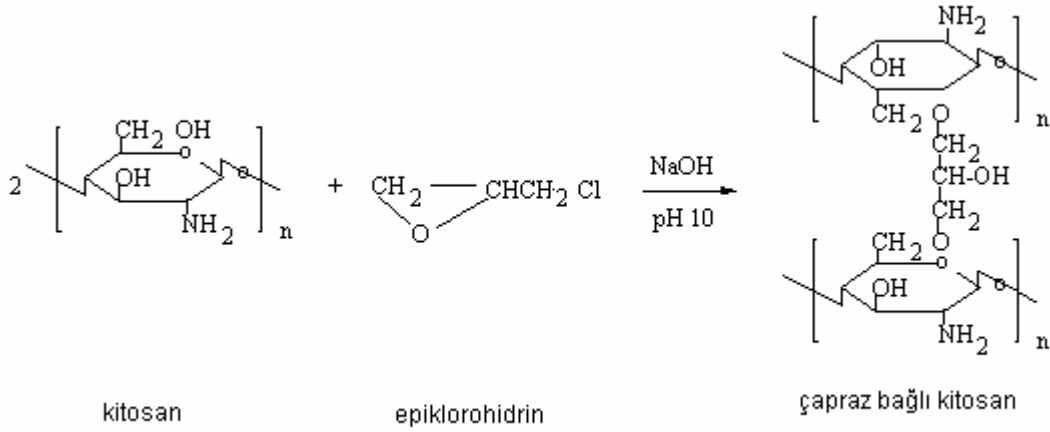
Hazırlanan çözelti 6 cm çapında cam Petri kaplarına dökülmüştür. Cam Petri kaplar, daha önceden membranın yapışmasını önlemek amacıyla Sigmacote (Sigma, Almanya) ile kaplanmıştır.

Kuruyan membranlar, Petri kaplarından çıkartılarak 2 saat (15-40 µm çap için) ve 10 saat (80-120 µm çap için) süresince 80°C'lik etüvde (EN 500, Nüve), %5'lik (ağırlık/hacim) NaOH çözeltisinde bekletilmişlerdir. Bu işlem, membranın içerisinde homojen olarak dağılmış bulunan silika partiküllerinin çözünmesini ve böylece homojen gözenek oluşumunu sağlamıştır. Ayrıca, membranın mekanik dayanımı da sıcaklık etkisi ile arttırılmıştır.

NaOH çözeltisinden çıkartılan membranlar yıkama suyu nötr olana kadar oda sıcaklığında distile su ile yıkanmışlardır. Oda sıcaklığında kurumaya bırakılmadan önce, kururken deforme olmalarını engellemek amacıyla, 30 dakika %20'lik (hacim/hacim) gliserin çözeltisinde bekletilmişlerdir.

### **3.1.3. Makrogözenekli kitosan membranların çapraz bağlanması**

Hazırlanan membranların, seyreltik asit çözeltilerinde çözünmelerini ve enzimatik degradasyonu engellemek amacıyla, çapraz bağlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kitosan membranlar, 0.067 M NaOH (pH 10) içeren,  $1 \times 10^{-2}$  M epiklorohidrin (Sigma, Almanya) çözeltisi içerisinde 2 saat boyunca 50°C sıcaklığındaki etüvde (ES 500, Nüve) bekletilmişlerdir. Çapraz bağlanma reaksiyonu Şekil 3.2'de gösterilmektedir. Bu işlemden sonra çözeltiden çıkartılan membranlar oda sıcaklığında distile su ile nötr yıkama çözeltisi elde edilene kadar yıkanmışlardır. Kurumaya bırakılmadan önce bir önceki bölümde anlatıldığı gibi gliserin çözeltisinde bekletilmişlerdir.



Şekil 3.2. Kitosan membranının Epiklorohidrin çapraz bağlanma reaksiyonu.

### 3.2. Membran Karakterizasyonu

Hazırlanan membranların karakterizasyonu için kullanılan yöntemler, bu bölümde açıklanmıştır.

#### 3.2.1. FTIR analizleri

Membranların kimyasal yapılarının belirlenmesi amacıyla FTIR (Fourier Transform Infrared) spektrofotometresi (Schimadzu 8100) ile çalışılmıştır. Analizler iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak ticari olarak satın alınan kitosan, bir gece vakum etüvünde kurutulmuş, toz haline getirilmiş ve potasyum bromür (KBr) ile karıştırılarak hazırlanan disklerin spektrumları alınmıştır. İkinci aşamada ise FTIR spektrofotometresinin ATR ünitesi kullanılarak, hazırlanan membranların FTIR spektrumları alınmıştır. FTIR spektrumları 400-4000  $\text{cm}^{-1}$  dalgaboyu aralığında değerlendirilmiştir.

#### 3.2.2. SEM ile membran yüzey analizi

Kitosan membranlar, yüzey ve kesit yapıları, taramalı elektron mikroskobu (SEM, Scanning Electron Microscopy, JEOL JSM-840A) kullanılarak incelenmiştir. İncelemeler, vakum ortamında, yüzeyi altınla kaplanarak iletken hale getirilmiş

örneklerle yapılmıştır. SEM incelemeleri, Türkiye Çimento Müstahsilleri Birliği (Ankara) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.2.4. Şişme deneyleri

Membranların şişme davranışlarının incelenmesi amacıyla, oda sıcaklığında (25±2°C) fosfat tampon çözeltisi (PBS) içerisinde şişme deneyleri gerçekleştirilmiştir. Örneklerin su içeriği (water content, wc) % olarak aşağıdaki eşitlik ile hesaplanmıştır (Eşitlik 3.1);

$$\% \text{ su içeriği} = \frac{\text{Yaş ağırlık} - \text{Kuru ağırlık}}{\text{Kuru ağırlık}} \times 100 \quad (3.1)$$

Herbir membran için su içeriğinin zamana karşı değişimi grafiksel olarak ifade edilmiş, ve sonuçlar % şişme ve denge şişmesi EWC (equilibrium water content) olarak değerlendirilmiştir.

#### 3.3. Kitosan Membranların Enzimatik Degradasyonu

Yapılan deneysel çalışmada kitosan membranlarda degradasyon miktarı zamana bağlı olarak incelenmiştir. Degradasyon bakteriyal bir enzim olan kitosanaz ile asidik ortamda gerçekleştirilmiştir. Biyomalzeme olarak tasarlanan kitosan membranlar bakteriler tarafından enfekte olduklarında bu bakteriler tarafından üretilen kitosanaz enzimleri nedeniyle degrade olup yapısal bozunma gerçekleşebilmektedir. Bu yapısal bozunma biyomalzemenin fonksiyonunu etkilemekte ve kullanım açısından dezavantaj yaratabilmektedir.

Bu nedenden dolayı hazırlanan kitosan membranların degradasyon kinetiği incelenmiştir. Kullanılan kitosanaz enzimi zayıf asidik ortamda maksimum aktiviteye sahip olduğundan deneysel çalışma zayıf asidik ortamda gerçekleştirilmiştir. Kitosan membranlar zayıf asitte çözündüğünden ve yöntem yeterli derecede hassas olmadığından dolayı membran ağırlık ölçümü yöntemi kullanılmamıştır. Bunun yerine degradasyon ile ortaya çıkan oligosakkaritlerin ölçümü tercih edilmiştir.

### 3.3.1. Stok çözeltilerin hazırlanması

Hazırlanan membranlar *Streptomyces griseus*'den izole edilmiş kitosanaz (Chitosan N-acetylglucosaminohydrolase from *Streptomyces griseus*, Sigma) ile degrade edilmiştir.

Kitosanaz derin dondurucuda (Ariston, İtalya) -20°C'de saklanmıştır ve çalışma öncesinde çözülmek üzere oda sıcaklığına alınmıştır. Çalışma sırasında kullanılacak olan asetat tamponu pH 5.5 olarak hazırlanmış ve hazırlanan asetat tamponu uygun koşullar altında buzdolabında muhafaza edilmiştir. Kontrol amaçlı olarak saf kitosan pelletleri ile gerçekleştirilen degradasyon çalışmaları sonucunda etkin kitosanaz konsantrasyonu belirlenmiştir.

### 3.3.2. Biyobozunmanın oligosakkarit salımı ile incelenmesi

Membranlar asetat tamponu (pH 5.5, 10 ml) içerisinde 0.125 U/ml kitosanaz varlığında 37°C'de inkübatörde (Nüve) 60 saat inkübe edilmiştir. Farklı zamanlarda alınan örneklerde Sumner reaktifi (0,2 mg/ml Sodyum potasyum tartarat, 10 mg/ml dinitrosalisilik asit (DNSA), 10 mg/ml NaOH, 2 mg/ml fenol) ile oligosakkarit miktarı incelenmiştir (Arnold 1965) 1 ml örnek 1.5 ml Sumner reaktifi ve 100 µl Sodyum sülfid ile 95 °C'de 15 dakika süresince hava almayacak şekilde streç film ile kapatılarak inkübe edilmiş ve örneklerin oda sıcaklığına soğumaları beklenmiştir. Hazırlanan örneklerin absorban değerleri 520 nm dalgaboyunda UV-Spektrofotometrede (Labomed UV Spektrofotometre) ölçülmüştür. Daha önce hazırlanmış glukoz kalibrasyon grafiğinden (Ek 3) elde edilen değerlere göre ortamdaki oligosakkarit miktarı hesaplanmıştır.

### 3.4. Biyofilm Oluşumu

Yapılan deneysel çalışmada membran üzerinde durgun ortamda biyofilm oluşumu incelenmiştir. Çalışmalar, mikroorganizma yapışma ve üremesi incelenerek sürdürülmüştür. Ayrıntılar aşağıda açıklanmıştır.

### 3.4.1. Mikrobiyal çalışmalar

Mikrobiyal çalışmalarda kullanılan mikroorganizmalar Refik Saydam Hıfzısıhha Merkez Enstitüsü Hücre Kültüründen sağlanmıştır. Bunlar; *Escherichia coli* Pasteur Ens. 2001 01008, *Bacillus subtilis* İngiltere 1988 389, *Pseudomonas aeruginosa* Kopenhag 1995 95104 ve *Staphylococcus epidermidis* 01015'dir. Bu mikroorganizmaların karakteristik özellikleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Mikroorganizma özellikleri

Mikroorganizma ismi	Gram boyama	Patojenitesi	Hareket Organeli	Flora	Boyut ve Şekil
<i>Escherichia coli</i>	Gr (-)	Saprofit/Patojen	Flagella	Barsak	Kokkobasil, 0.5-2 µm
<i>Bacillus subtilis</i>	Gr (+)	Bitki patojeni	Yok	Toprak	Basil, 0.5 x 0.7 µm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gr (-)	Patojen	Polar Flagella	Üriner ve solunum yolları, hastane enfeksiyonları	Basil, 0,5-1,0 µm/1,5-4,0 µm
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Gr (+)	Saprofit	Yok	Deri Üzerinde	Kok, 0,8 µm

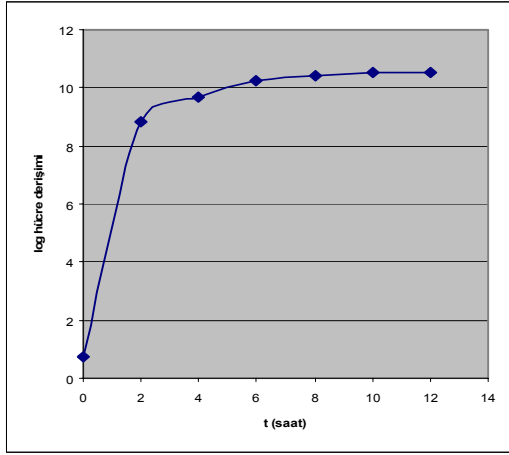
#### 3.4.1.1. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması

Mikrobiyal çalışmalarda kullanılan *E.coli* için "Laktose broth" (Sigma, Almanya), *B.subtilis*, *P.aeruginosa* ve *S.epidermidis* için ise "Tryptic Soya Broth" (Sigma, Almanya) besi ortamı kullanılmıştır. Mikroorganizmalar, sıvı besiyerinde, 37°C'de çalkalamalı etüvde (GFL, Hollanda) 18 saat boyu üretilmiştir.

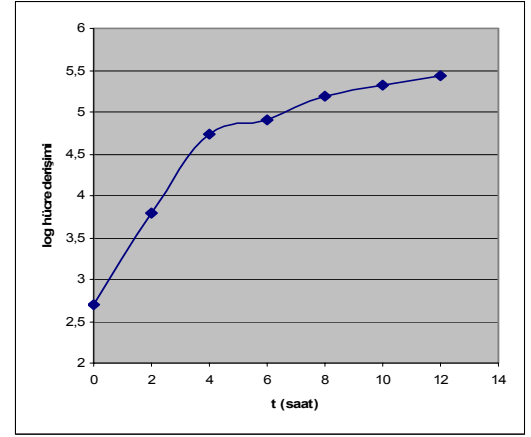
#### 3.4.1.2. Mikroorganizma üreme eğrilerinin hazırlanması

Gece boyu üretilmiş sıvı mikroorganizma kültürlerinden 1'er ml taze sıvı besiyerine alınmıştır. Pasaj edilen bu taze besiyerleri tekrar yaklaşık olarak 5 saat 37°C'de çalkalamalı etüvde (50 rpm) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucu sıvı kültürlerden

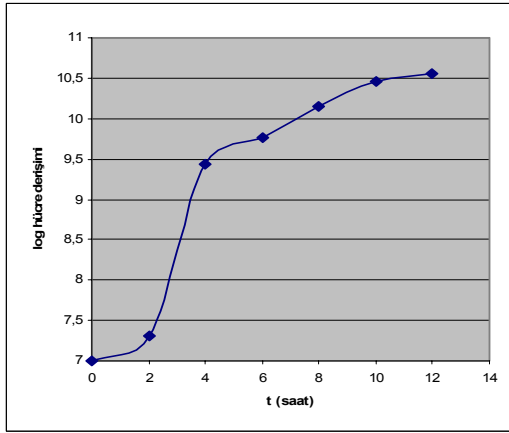
1'er ml 50 ml uygun sıvı besiyeri bulunan 100 ml'lik erlene ekim yapılmıştır. Tekrar 37°C'de çalkalamalı etüvde (50 rpm) inkübasyona bırakılan kültürlerden 1, 2, 4, 6, 8, 10 ve 12. saatlerde hücre sayısı optik yoğunluk (Labomed UV Spektrofotometre) ve koloni oluşturma birimi (CFU) ile karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Oluşturulan üreme grafiklerinden mikroorganizmaların ikilenme süreleri hesaplanmıştır.



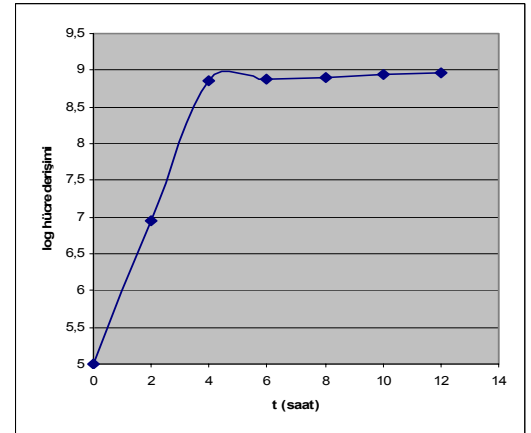
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 3.3. Mikroorganizma Üreme Eğrileri

a) *P.aeruginosa* b) *E.coli* c) *S.epidermidis* d) *B.subtilis*

### 3.4.1.3. Mikroorganizma yapışma kinetiğinin incelenmesi

Bakerilerin membran yüzeyine yapışmasının incelenmesi, koloni oluşturma birimi, optik yoğunluk ve ATP biyoluminesan ile gerçekleştirilmiştir.

Yaklaşık 5 saatlik inkübasyon süresi ile logaritmik üreme fazında bulunan mikroorganizmalar steril serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) ile santrifüj (4 dakika, 13.000 rpm) edilerek besiyerinden ayrılmıştır. Besiyerlerinden tamamen ayrılmış olan mikroorganizmalar hücre konsantrasyonu  $\sim 1 \times 10^8$  olacak şekilde steril PBS (Sigma, Almanya) ile seyreltilmiştir.

Kitosan membranlar 24 gözlü Petri kaplarına uygun büyüklükte hazırlanmış ve steril edilmiştir. Çapraz bağlanmamış gözeneksiz membranlar UV (300 W Osrom Ultralux UV lamba) ile 2 saat süresince, diğer membranlar ise otoklavda 121°C ve 15 dakika süre ile sterillenmiştir.

Membranlar steril haldeki Petri kaplarına yerleştirilmiş ve üzerlerine 1'er ml yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış hücre süspansiyonu pipetlenmiştir. Hazırlanan Petri kapları 37°C ve 50 rpm çalkalamalı etüve inkübasyon için bırakılmıştır. İnkübasyondaki kültürlerden 0.5, 1, 2, 4, 7 ve 24. saatlerde örnek alınmıştır. Petri gözlerinden örnek alındıktan sonra membranlar 2 ml steril PBS ile yıkanmıştır.

Alınan örneklerin optik yoğunluğu UV-Spektrofotometre ile belirlenmiştir. İnkübasyon ortamından alınan sıvı örneği yıkama sıvısı ile homojen olacak şekilde vortekslenmiştir. Alınan örnekler UV-Spektrofotometre ile 600 nm'de ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerleri ile hazırlanan kalibrasyon grafiğinden ortamdaki hücre sayısı hesaplanmış ve başlangıç hücresinden farkı alınıp membrana yapışan bakteri sayısı belirlenmiştir (Ek 1).

İkinci yöntem olarak ortamdaki bakteri sayısı koloni oluşturma birimi ile de incelenmiştir. Ortamdan daha önce alınan 1 ml örnek % 0,9'luk NaCl'li suda seyreltilmiştir. Seyreltilen örnekler katı besiyerine tek koloni yöntemi ile ekilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonucunda Petri kaplarında üreyen koloni sayısı tespit edilmiştir ve ilgili seyreltme faktörü ile ortamda bulunan bakteri sayısı hesaplanmıştır. Başlangıç bakteri sayısından farkı alınıp membranlara yapışan bakteri sayısı hesaplanmıştır.



Üçüncü yöntem olarak ortamdaki bakteri sayısı, Floresan Spektrofotometre (Carry Eclipse) kullanılarak ATP-biyoluminesan yöntemi ile ışık oluşturma birimi ölçülerek incelenmiştir. Ölçümler Floresan Spektrofotometre'de 520 nm'de yapılmıştır. İncelenen literatürlere yakın olan absorbanlarda maksimum ışık birimi bulunması için saf ATP ile gerekli absorban taraması yapılmıştır (Ek1) Ortamdan alınan örnekler öncelikle 13.000 rpm'de santrifüj edilerek bakteriler besiyerinden tamamen ayrılmıştır. Bakteri pelletleri üzerine öncelikle 0,002 M EDTA (Sigma, Almanya) eklenmiştir ve bakteri membranları parçalamak amacıyla 13.000 rpm'de +4°C'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Daha sonra tüplerin dibine çöken pelletin üzerine %1'lik SDS (Sigma, Almanya) eklenmiş ve tekrar 13.000 rpm'de +4°C'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra ortamdaki bakterilerin membranları parçalanmış ve hücreleri içerisinde bulunan ATP ortamda serbest hale gelmiştir. Hazırlanan örnekler +4°C'de analize kadar bekletilmiştir, böylece sıcakta degrade olan ATP'nin korunması sağlanmıştır.

ATP biyoluminesan ölçümü için örnekler reaksiyon için gerekli substrat ve enzim katılmıştır. Substrat için Lüsiferin (Sigma, Almanya) ve enzim için lüsiferaz (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. Reaksiyonu katalize eden  $Mg^{+2}$  iyonları 0.1 ml % 1 MgCl (Sigma, Almanya) halinde ortama katılmıştır.

Reaksiyon için Lüsiferaz miktarı literatürden referans alınmış (Squirrell et al 2002), etkin lüsiferaz konsantrasyonunu belirlemek amacıyla saf ATP'nin (Sigma, Almanya) artan lüsiferaz konsantrasyonları ile kalibrasyonu yapılmıştır (Ek1).

Biyoluminesans reaksiyonu yaklaşık 5-15 saniye içerisinde gerçekleşmektedir (Squirrell et al 2002). Bu nedenle reaksiyonu gerçekleştirmek için reaksiyon ortamına lüsiferaz en son katılmış ve ölçüm 10'uncu saniyede gerçekleştirilmiştir.

Tüm ölçümler en az 3'er kez tekrarlanmış ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

#### 3.4.1.4. Mikroorganizma biyofilm oluşumunun incelenmesi

Yaklaşık olarak 5 saatlik inübasyon sonucu logaritmik üreme fazında bulunan mikroorganizma kültürleri sıvı besiyerleri ile birlikte önceki bölümde açıklandığı şekilde hazırlanmış membranlar üzerine 2'şer ml hacimlerde eklenmiştir. Hazırlanan Petri kapları inkübasyon için 37°C ve 50 rpm çalkalamalı etüve bırakılmıştır.

Biyofilm oluşumunun incelenmesi için 3, 5, 7, 10, 15. günlerde örnek alınmıştır.

Örnekler biyoluminesan, SEM ve konfokal mikroskopisi ile incelenmiştir.

Biyoluminesan ölçümü için membran, üzerindeki hücre tabakası ayrılmadan besiyerinden ayırmak için 4 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Besiyeri süspansiyonundan ayrılan hücre tabakası, üzerine önce 0,002 M EDTA ilave edilerek 2 dakika 13.000 rpm'de, daha sonra %1'lik SDS çözeltisi ile tekrar 2 dakika 13.000 rpm'de +4°C'de santrifüj edilmiştir. Mekanik olarak parçalanan hücrelerdeki ATP mol miktarı Floresan Spektrofotometre'de 520 nm'de ölçülerek kalibrasyon grafiğinden ortamdaki mikroorganizma sayısı bulunmuştur. ATP biyoluminesans reaksiyonu ortama lüsiferin, lüsiferaz ve MgCl eklenerek gerçekleştirilmiştir.

Hücre tabakasının yapısal özelliklerinin görsel olarak incelenmesi için örnekler SEM ve konfokal mikroskopisi ile incelenmiştir.

SEM için örnekler kurutulmuş ve daha sonra taramalı elektron mikroskobu (SEM, Scanning Electron Microscopy, JEOL JSM-840A) kullanılarak incelenmiştir. İncelemeler, vakum ortamında, yüzeyi altınla kaplanarak iletken hale getirilmiş örneklerle yapılmıştır. SEM incelemeleri, Türkiye Çimento Müstahsilleri Birliği (Ankara) laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Konfokal mikroskopisi incelemeleri için örnekler besiyerinden olabildiğince uzaklaştırmak amacıyla önce PBS'de yıkanmış ve 1,25 mg/ml'lik stok Ethidium Bromür (Sigma, Almanya) çözeltisinden 5 µl/ml serum fizyolojikte kullanılarak 15 dakika boyunca boyanmıştır. Örnekler, bağlanmamış boyanın uzaklaşması

amacıyla PBS'de yıkanmıştır. Boyanan örnekler Konfokal Mikroskopi ile (Leica, Almanya) incelenmesinden önce 2 dakika boyunca 37°C'de kurutulmuştur. İnceleme sırasında HeNe (543 nm) lazer kullanılmıştır. Ve çalışma yağ lensi ile gerçekleştirilmiştir. Ölü hücrelerde, ethidiyum bromür, hücrenin membranını geçip DNA ve RNA'ya bağlanmakta. Bu şekilde, hücre kırmızı olarak görünmektedir. Canlı hücreler ise yeşil renkte görünmektedir (Auschill et al 2001).

### **3.4.2. İstatistiksel çalışmalar**

Çalışma kapsamında, elde edilen tüm veriler, istatistiksel yöntem ile analiz edilmiştir. Veri çeşidi ve karşılaştırılacak grup sayısı incelendiğinde, analiz için ANOVA analizi yapılması kararlaştırılmıştır (<http://www.physics.csbsju.edu/>). ANOVA analizini daha hassas konuma getirmek amacıyla Bonferroni yöntemi de kullanılmıştır. Bu şekilde  $\alpha$  değeri daha hassas olarak belirlenmiştir.

Yapılan analizde, kullanılan bakteri türleri ve yöntemler karşılaştırılmış ve bu gruplar arasında anlamlı farklılık incelenmiştir.

#### **4. DENEYSEL SONUÇLAR VE TARTIŞILMASI**

Bu bölümde biyomalzeme olarak tasarlanan kitosan membranların biyolojik ve yapısal karakterizasyonu amacıyla yapılan deneysel çalışmalara ait sonuçlar sunulmuş ve bu bulgular üzerinde gerekli tartışmalar yapılmıştır.

Deneysel sonuçlar; öncelikle biyomalzeme olarak üretilen kitosan membranların yapısal özelliklerinin ve bozunma miktarının saptanması ile ilgili olarak yürütülen analiz sonuçları, daha sonra ise çalışmada kullanılan 4 çeşit bakterinin yapışma ve biyofilm oluşumunun incelenmesi olmak üzere iki alt başlık halinde sunulmuştur.

##### **4.1.Kitosan Biyomalzeme: Seçimi, Hazırlanması ve Karakterizasyonu**

Rejeneratif tıp alanında, işlevini bir miktar veya tamamiyle kaybetmiş doku ve organların yerine kullanılan malzemeler seramik, metal, polimer veya kompozitlerinden üretilmektedir. Polimerik biyomalzemeler, özellikle yumuşak dokulara benzerliği ve kolay işlenebilirliği nedeniyle yaygın olarak kullanılmaya çalışılmaktadır. Günümüzde yapay kıkırdak gibi basit dokulardan, yapay deri gibi kompleks dokulara kadar birçok uygulamada çeşitli polimerik biyomalzemeler kullanılmaktadır. Biyomalzeme olarak kullanılan polimerler biyouyumlu olarak seçilmekte ve üretilmektedir. Vücut hücreleri ile uyumlu olan bu malzemeler aynı zamanda bakterilerle de uyumlu hale gelmekte ve bakteriler, malzemenin yüzeyi ile fiziksel ve kimyasal etkileşime girmektedir. Biyomalzemeleri vücut hücreleriyle uyumlu fakat bakteriler için uyumsuz olarak üretmek, geliştirilen implantlarda hedeflenmektedir. Bu şekilde, uzun süre enfekte olmadan kullanılabilen biyomalzemeler hazırlanabilecektir.

Sunulan çalışmada doğal bir polimer olan kitosanın, biyomalzeme olarak kullanılabilirliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Biyomalzeme olarak kitosanın seçilmesinin nedeni, biyoteknolojik uygulamalarda ve biyomalzeme üretiminde birçok avantaja sahip olmasıdır. Bunların arasında kitosanın, [poli(2-amino-2-deoksi-D-glukoz)], kolay steril edilebilmesi, yüksek biyouyumluluğu ve memeli hücreleri için toksik olmama özellikleri sayılabilir. Kitosan, anyonik karakterinden dolayı, bakteriyel DNA'ya bağlanıp antibakteriyel etkide bulunduğu tespit edilmiştir

(Yang et al 2005). Kitosan, seyreltik organik asitlerde (formik asit, asetik asit) çözünür, ancak bazik ortamlarda çözünmez. Ayrıca kitosanın, hidrofilik özelliği, film haline getirilme kolaylığı, iyi mekanik özelliği ve yüksek kimyasal reaktivitesi nedeniyle membran olarak hazırlanmasının uygun olacağına işaret etmektedir. Sunulan çalışmada biyomalzeme olarak tasarlanan membran formunda kitosan yüzeylerde bakteriyel yapışma kinetiği ve biyofilm oluşum potansiyellerinin incelenmesi amaçlanmıştır. İlerleyen bölümlerde makrogözenekli ve gözeneksiz kitosan membranların hazırlanmasına dair sonuçlar verilmiştir.

#### **4.1.1. Kitosan membranların üretimi**

Membran üretimi “çözücü-buharlaştırma” yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kitosan için iyi bir çözücü olan asetik asit’in seyreltik çözeltisi kullanılmıştır. Gözenek yapıcı ajan olarak silika partiküller seçilmiştir. Çalışma kapsamında hazırlanan ve ilerideki aşamalarda kullanılan tüm membranların bileşimleri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

##### **4.1.1.1. Gözeneksiz kitosan membran üretimi**

Bölüm 3.1.1’de anlatıldığı gibi öncelikle kitosanın % 1’lik asetik asit içerisinde çözeltisi hazırlanmış ve Petri kaplarına dökülmüştür. 6 cm çapında ve 0.2 mm kalınlığında elde edilen membrana ait Şekil 4.2’deki SEM fotoğraflarından da gözeneksiz yapı açıkça görülmektedir.

##### **4.1.1.2. Makrogözenekli kitosan membran üretimi**

Yüzeye-bağımlı (AD) karakterdeki vücut hücrelerinin yüzeye tutunma ve üremesi için yüzey alanının mümkün olduğunca geniş olması gerekmektedir. Bu nedenle doku iskeleleri (tissue scaffold) gözenekli yapılar şeklinde üretilmektedir. Makrogözenekli yapıların eldesinde gözenek yapıcı ajan (porojen) seçimi dikkat edilmesi gereken bir noktadır. Porojenin inert olması ve yapıya zarar vermeden kolayca uzaklaştırılabilmesi gerekmektedir. Yaygın olarak kullanılan bir porojen olan polietilen glikol ile yürütülen pek çok çalışmada yüksek geçirgenliğe sahip

Çizelge 4.1. Çalışma kapsamında kullanılan membranların bileşimleri ve temel özellikleri.

Membran No	Gözeneksiz	Makrogözenekli	15-45 µm Gözenekli	80-120 µm Gözenekli	ECH Çapraz Bağlı
1	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	+
3	-	+	+	-	-
4	-	+	+	-	+
5	-	+	-	+	-
6	-	+	-	+	+

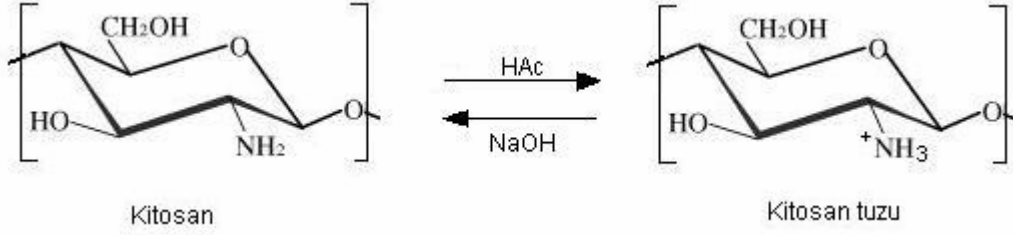
membranlar elde edilmiştir. Ancak mekanik özellikler açısından tatmin edici bulunmamıştır (Ruckenstein ve Zeng 1996).

Ruckenstein ve grubu porojen olarak silika partikülleri kullanmışlardır. Silika, asidik ortamda çözünmez iken, bazik ortamda çözünmektedir. Başka bir deyişle kitosan ile çözünürlük açısından birbirlerine zıttırlar. Bu özellikten faydalanılarak gözenek oluşumu sağlanmaktadır (Ruckenstein ve Zeng 1996).

Bu çalışmada 15-40 µm ve 80-120 µm aralığında boy dağılımına sahip silika partikülleri kullanılmıştır. Kitosan çözeltisi içerisinde homojen bir şekilde dağıtılan partiküller, daha sonra NaOH muamelesi ile yapıdan uzaklaştırılmışlardır. Böylelikle tüm yapı boyunca homojen gözeneklilik elde edilmiştir. Ayrıca NaOH muamelesi yapıya mekanik dayanım sağlamıştır. Geniş bir boy dağılımına sahip partiküllerin kullanılması, gözenek çap dağılımını olumsuz yönde etkilemektedir. Ancak diğer yandan bu partiküller, tek çeşit boy dağılımına sahip partiküllerden daha ucuzdurlar. Diğer bir önemli nokta da NaOH muamelesinin fonksiyonel amin gruplarına etkisidir. Şekil 4.1’de verildiği gibi NaOH muamelesi ile katyonik amin grupları (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) serbest amin gruplarına (-NH<sub>2</sub>) dönüşmektedir (Won et al 2003).

Silika oranının değiştirilmesi ile yapıda meydana gelen değişikliklerin incelenerek optimum oranın belirlenmesi amacıyla 16:1, 8:1, 4:1 şeklinde üç farklı silika/kitosan

(ağırlıkça) oranı seçilmiştir. Öncelikle bu üç tür membran çıplak gözle incelendiğinde, 4:1 silika oranına sahip membranın oldukça ince ve kolayca parçalanabilen bir yapıda olduğu görülmüştür. Bununla birlikte 16:1 silika oranına sahip membranın daha kalın ve sağlam bir yapısı olduğu gözlenmiştir. Silika oranının gözenek boy dağılımına etkisi de SEM analizleri ile incelenmiştir. Sonuçlar ayrıntılı olarak Bölüm 4.1.2.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Kitosanda bulunan katyonik amin gruplarının serbest amin gruplarına dönüşme reaksiyonu.

Tüm bu sonuçlar ele alındığında optimum özellikleri sağlaması açısından 16:1 silika/kitosan oranına sahip membranların çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılması uygun görülmüştür. Bu oran kullanılarak yaklaşık 4 cm çapında ve 0.2 mm kalınlığında makrogözenekli kitosan membranlar hazırlanmıştır.

#### 4.1.1.3. Kitosan membranların çapraz bağlanması

Mikroorganizmalar üredikleri ortamda asidik ürünler oluşturabilmektedir (örn. laktik asit). Ayrıca kitosanaz, lipaz gibi enzimler salgılayarak polisakkarit yapısındaki biyomalzemeleri oligosakkaritlere degrade edilebilmektedirler. Kitosan asidik çözeltilerde çözünmektedir. Kitosanın bakteriyel enfeksiyonlardan etkilenmemesi amacıyla çözünmesini engellemek için çapraz bağlanması gerekmektedir. Bu noktada çapraz bağlayıcı ajan seçimi önem kazanmaktadır. Vücut içerisinde kullanılacak biyomalzemelerde toksisite önemli bir parametredir. Çapraz bağlayıcıların toksisitesi yüksektir. Epiklorohidrin (ECH), -OH fonksiyonel grupları üzerinden çapraz bağlanmayı sağlar ve toksisite açısından bağlı olarak uygun bir ajandır. Bu nedenle çalışma kapsamında hazırlanan membranlar ECH ile reaksiyona sokulmuş ve reaksiyon sonrası elde edilen membranların asetik asit

çözeltilerinde çözünmediği görülmüştür. Böylelikle çapraz-bağlı yapının hazırlanabildiği gösterilmiştir.

#### **4.1.2. Membran karakterizasyonu**

Çalışma için hazırlanan membranlar SEM analizi ve şişme deneyleri ile incelenmiştir.

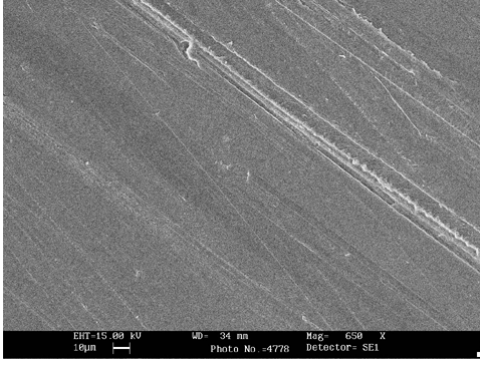
##### **4.1.2.1. SEM analiz sonuçları**

Membranların yüzey ve kesit yapılarının morfolojik olarak incelenmesi ve gözenek boy ve boy dağılımının belirlenmesi amacıyla SEM fotoğrafları çekilmiştir. Fotoğraflardan elde edilen ölçümler sonucu ortalama gözenek çapı hesaplanmıştır. Herbir fotoğraftan yaklaşık 50 adet gözenek çapı hesaplanarak ortalama değer bulunmuştur. Şekil 4.2'de gözeneksiz membranlara ait SEM fotoğrafları verilmiştir.

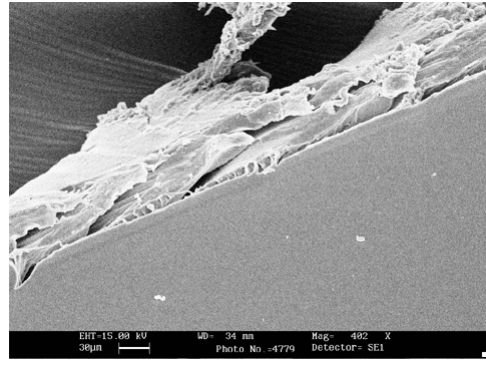
Şekil 4.3'de 15-40 µm ve silika oranı 16:1 olan makrogözenekli kitosan membranlara ait kesit fotoğrafları incelendiğinde silika ilavesiyle son derece gözenekli ve homojen sayılabilecek gözenek dağılımına sahip membranların elde edildiği görülmektedir. Gözenek oluşturucu madde olarak kullanılan silika partiküllerin 15-40 µm aralığında bir boy dağılımına sahip olduğu da düşünüldüğünde elde edilen gözenek boy dağılımının oldukça iyi bir sonuç olduğu söylenebilir. Şekil 4.4'de aynı membrana ait yüzey SEM fotoğrafı yer almıştır. Gözenekler, hem yüzeyde hem de kesitte oldukça homojen bir biçimde dağılmıştır

Şekil 4.5'de ise çapraz bağlı makrogözenekli membrana ait farklı büyütme oranlarında çekilen yüzey SEM fotoğrafları görülmektedir. Yapıya katılan çapraz bağlayıcının gözenek dağılımında elde edilen homojeniteyi etkilemediği tespit edilmiştir. Ancak Şekil 4.4 ile karşılaştırıldığında, çapraz bağlanma sonucu gözeneklerin bir miktar kapandığı dikkat çekmektedir.





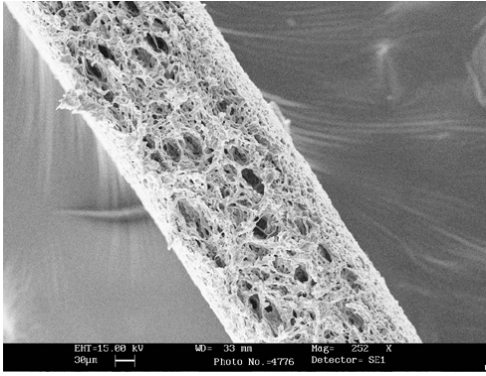
(a)



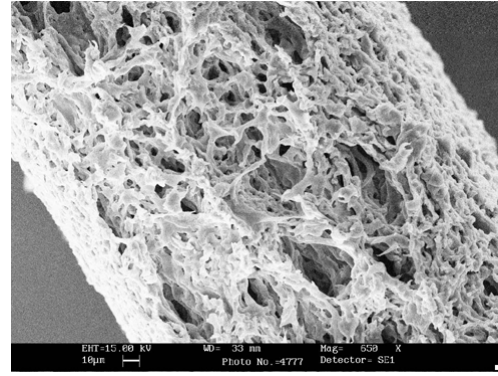
(b)

Şekil 4.2. Gözeneksiz kitosan membrana ait SEM fotoğrafları.

a) Membran yüzeyi (Büyütme  $\times 650$ ) b) Membran kesiti (Büyütme  $\times 400$ )



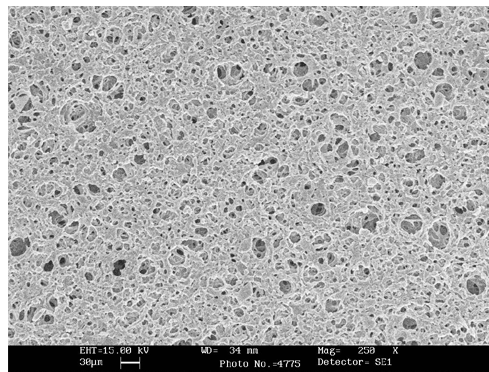
(a)



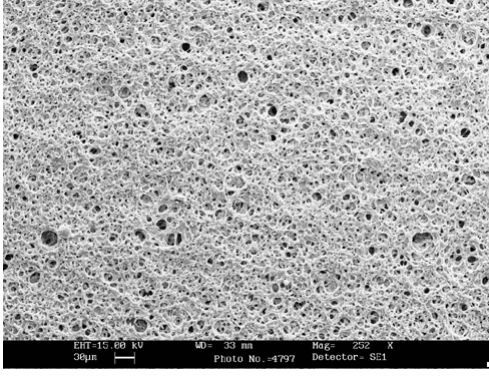
(b)

Şekil 4.3. Silika (15-40  $\mu\text{m}$ ) kullanılarak hazırlanan gözenekli kitosan membranların kesitine ait SEM fotoğrafları.

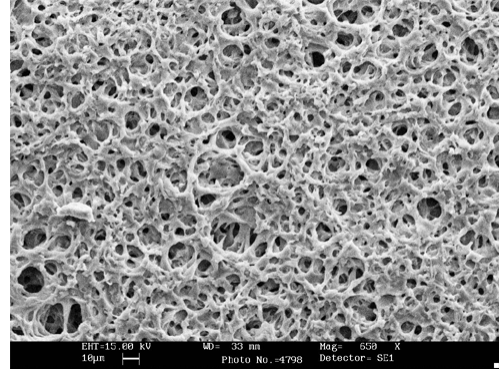
a) ( $\times 250$ ) (Membran No:3) b) ( $\times 650$ ) (Membran No:3)



Şekil 4.4. 15-40  $\mu\text{m}$  silika varlığında hazırlanan gözenekli membran yüzey SEM fotoğrafı (Büyütme  $\times 250$ )



(a)



(b)

Şekil 4.5. 16:1 silika oranına sahip çapraz-bağlı membranın yüzeyinden farklı büyütme oranlarında alınan SEM fotoğrafları

a) Büyütme  $\times 250$

b) Büyütme  $\times 650$

Çalışma kapsamında aynı bileşimlerde olup, farklı zamanlarda hazırlanmış membranlarla yürütülen SEM incelemeleri, hazırlama yönteminin tekrarlanabilir sonuçlara (membran özellikleri açısından) götürdüğünü belirtmiştir.

#### 4.1.2.2. Şişme deneyleri

Sunulan çalışma, membranların şişme davranışlarının incelenmesi amacıyla hazırlanan 6 farklı tip membran (Gözeneksiz kitosan membran, ECH çapraz bağlı gözeneksiz kitosan membran, 15-40  $\mu\text{m}$  gözenekli ve 80-120  $\mu\text{m}$  gözenekli çapraz bağırsız ve ECH çapraz bağlı gözenekli kitosan membranlar) ile yürütülmüştür. Şişme deneyleri, oda sıcaklığında ( $25\pm 2^\circ\text{C}$ ), fosfat tampon çözeltisinde (PBS, pH=7.4) gerçekleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında ortamdan uzaklaştırılan örneklerin ağırlık ölçümleri ile şişme değerleri (% su içeriği) kuru temelde hesaplanmıştır. Elde edilen veriler zamana karşı grafiğe geçirilerek membranlara ait şişme eğrileri elde edilmiştir. Şekil 4.6'da verilen bu şişme eğrileri ile tüm membranların 60'nci dakikaya kadar olan şişme kinetikleri karşılaştırılmaktadır.

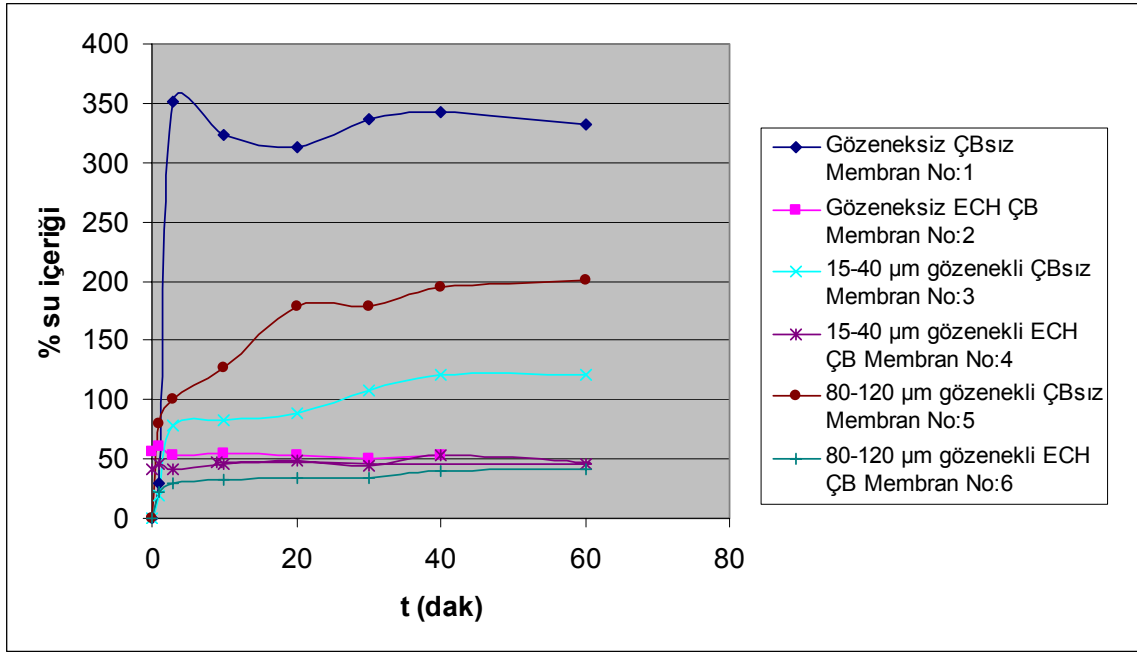
Gözeneksiz kitosan ve ECH ile çapraz bağlı gözeneksiz kitosan membranlara ait zamana bağlı şişme eğrileri incelendiğinde ilk 5 dakikada her iki membranda da ani bir şişmenin gerçekleştiği görülmektedir. Her iki membran da 20'nci dakikanın

sonunda denge şişmesine ulaşmışlardır. Fakat denge şişme değerleri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.2) görülmektedir ki gözeneksiz kitosan membran çapraz bağlı gözeneksiz kitosan membrana göre çok daha yüksek bir şişme değerine ulaşmıştır. Çapraz-bağlanmamış membran kuru temelde % 342 denge su içeriğine sahipken, çapraz-bağlı membranda bu değer % 53,70'dir. İki membranın şişme değerlerinde mevcut bu fark, çapraz bağlanma ile açıklanabilir. Bilindiği gibi hidrofilitate yapıdaki -OH gruplarının miktarı ile orantılıdır. Bu çalışmada epiklorohidrin ile gerçekleştirilen çapraz bağlanma reaksiyonu da -OH grupları üzerinden yürümektedir. Ayrıca çapraz-bağların varlığı çözünmeyi engelleyip yapıya su difüzyonunu da zorlaştırmaktadır. Bu nedenle çapraz bağlı gözeneksiz kitosan membranın düşük şişme değeri beklenen bir sonuçtur.

Şekil 4.6'da, gözeneksiz, 15-40 µm gözenekli ve 80-120 µm gözenekli çapraz bağımsız ve ECH çapraz bağlı gözenekli kitosan membranlara ait şişme eğrileri de verilmiştir. Şişme eğrileri incelendiğinde, ilk 5 dakikada her dört membran için de şişmenin hızlı olduğu görülmektedir. Tüm membranlar yaklaşık olarak 20'nci dakikadan itibaren denge şişme değerlerine ulaşmışlardır (Şekil 4.6). Şişme değerleri karşılaştırıldığında, 80-120 µm gözenekli çapraz bağlı membranın en düşük miktarda şiştiği ve çapraz bağlı olmayan membranların şişme değerlerinin arttığı görülmektedir.

Tüm bu sonuçlar SEM için yapılan yorumlarla da uyumlu olup yapıdaki gözenekliliğe uygun olarak açıklanabilir.

Grafiklerde ve çizelgede yer alan tüm değerler en az üç ölçümün ortalamasıdır.



Şekil 4.6 Kitosan membranlara ait şişme sonuçları.

Çizelge 4.2 Membranların denge şişme değerleri (EWC)

(pH=7.4; PBS; t=40 ncı dakika)

Membran No	EWC (%)
1	342,00
2	53,70
3	121,76
4	46,21
5	194,44
6	39,52

#### 4.1.3. Kitosan membran degradasyonu

Kitosan, bakteriler tarafından kitosanaz enzimi ile degrade edilebilmektedir. Bunun yanısıra lipaz, kitinaz gibi enzimler de kitosani degrade edebilmektedir. Biyomalzeme olarak kullanılan malzemenin bakteriler için elverişli olması istenmemektedir, ancak degradasyon sonucunda ortaya çıkan oligosakkaritler bakteri için önemli bir besin kaynağı oluşturur. Aynı zamanda degrade olan biyomalzeme yapısal olarak bozunduğu için zaman içerisinde kullanılmaz duruma gelmektedir.

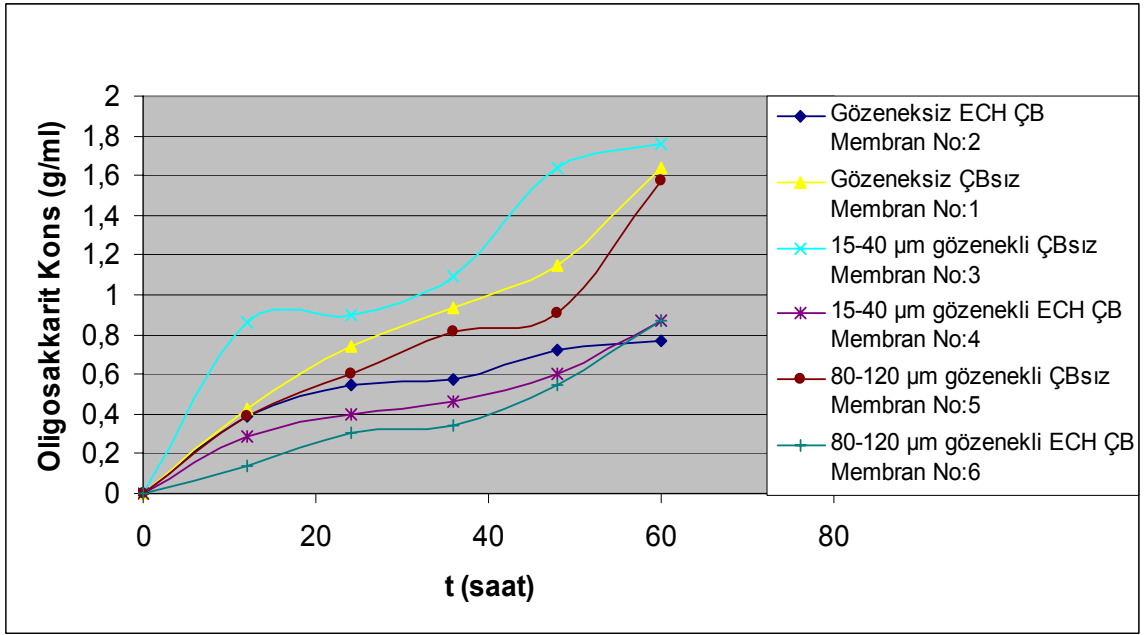
Yapılan deneysel çalışmalarda, kitosanaz miktarının kontrolü amacıyla *Streptomyces griseus*'tan elde edilmiş kitosanaz (Sigma, Almanya) kullanılmıştır. 60 dakika süresince 37°C'de degrade olan kitosan ortamda bulunan oligosakkarit konsantrasyonu ile ölçülmüştür.

Kitosanazın degradasyon mekanizması, enzimin üretildiği türe göre değişmektedir. Kitosanın kitosanaz tarafından hidroliz edilme miktarı, asetilasyon seviyesi ile ilişkilidir. Kitosanaz, genel olarak, aktivite olabilmek için, üç ve daha fazla glukozamin veya N-asetilglukozamin gruplarına ihtiyaç duyar. Deneysel çalışmalar sırasında da kullanılan *Streptomyces* ve *Bacillus* türleri tarafından üretilen kitosanaz, çok miktarda asetil grubuna sahip olan kitosani degrade edebilmektedir. *Bacillus* türleri tarafından üretilen enzim, kitosani N-asetilglukozamin ve N-asetilglukozamin (GlcN-GlcN) birimleri arasından bölmektedir (Joseph ve Somashekar 1996). *Pseudomonas* ve *Streptomyces* türleri için bu değerlendirme yapılmamıştır.

Yapılan çalışmalar sonucu, çapraz-bağlama yapılmayan membranlarda degradasyon miktarının çapraz-bağlanma yapılan membranara göre daha fazla olduğu görülmüştür (Şekil 4.7). Bu sonuç doğrultusunda, biyomalzeme olarak tasarlanan kitosan membranların çapraz-bağlayıcı ile degradasyondan daha az etkilenip kullanım açısından daha elverişli olduğu görülmüştür. Gözenekliliğin, degradasyon üzerinde bir etkide bulunmadığı görülmüştür.

## **4.2. Bakteriyal Yapışma ve Biyofilm Oluşumu**

İşlevini kaybetmiş organ ve dokular yerine yapay malzemelerin vücuda yerleştirilmesi için polimer, metal, seramik ve çeşitli alaşımlar kullanılmaktadır. Kullanılan bu malzemelerin vücut ile uyumlu, yani biyouyumlu olması gerekmektedir. Biyomalzeme olarak tanımlanan bu malzemeler kalp, damar, göğüs, penis, kemik, kıkırdak, lens, diş gibi birçok organ ve sistemde kullanılmaktadır.



Şekil 4.7. Kitosan membran degradasyon kinetiği

İnsan vücudu, çok kompleks bir bağışıklık sistemine sahiptir. Vücuda yabancı olan her yapıyı tanıyıp tepki oluşturarak bu yapıyı reddetmektedir. Bu nedenden dolayı, biyomalzemeler vücut bağışıklık sistemi tarafından en az şekilde etkileyecek şekilde tasarlanmalıdır. Vücuda yerleştirilen malzemenin, kabul edilmesinin kolaylaşması amacıyla, hastaya ayrıca bağışıklık sistemini inhibe edici çeşitli ajanlar verilmektedir.

Biyomalzeme kullanımında ikinci büyük problem ise malzemenin enfekte olabilmesidir. Vücut yüzeyine yapışan patojen organizmalar, bağışıklık sistemi nedeniyle kısa sürede bir direnç ile karşılaşılır ve genelde çok fazla çoğalmadan yok edilirler. Fakat, biyomalzemeler üzerine yapışan patojen organizmalara karşı böyle bir direnç çabuk oluşmamaktadır çünkü yapıştıkları yüzey, vücudun bir parçası değildir. Aynı zamanda, malzemenin vücut tarafından tolere edilebilmesi için bağışıklık sistemi inhibe edilmiştir ve bu nedenlerden dolayı mikroorganizmalar üremek ve biyofilm oluşturmak için gerekli ortama sahiptirler.

Biyomalzeme enfeksiyonlarında oluşan biyofilmdeki mikroorganizmalar dış ortama karşı dayanıklıdır. Serbest mikroorganizmalara etki eden antiseptik ajanların yaklaşık 40 katına bile dirençli hale gelen biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar, insan sağlığı için ciddi, hatta ölümcül bir tehlike oluşturmaktadırlar. Üzerinde

biyofilm oluşmuş biyomalzemeyi vücuttan uzaklaştırmak, tek tedavi yolu olarak düşünülebilir (Stewart ve Costerson 2001).

Bu nedenden dolayı biyomalzemelerin mikrobiyal yapışma ve biyofilm oluşturma açısından incelenmesi son derece önemlidir.

Yapılan çalışmada kullanılan polimerik malzeme, tıp alanında kullanımı avantajlı olarak düşünülen, doğal bir polimer olan kitosandır. Yüzey karakterizasyonu yapılan bu malzemenin, mikroorganizmalar ile etkileşimi incelenmiştir. Oluşan biyofilmler ile mücadele zorluğundan dolayı, araştırmalar, biyofilm oluşumunu en aza indirgeyecek veya engelleyebilecek malzeme alanında devam etmektedir. Kitosan, anyonik karakteri nedeniyle sıvı ve pelet formlarında yapılan çalışmalarda, mikroorganizma DNA'sına bağlanarak üremesini inhibe etmektedir (Wu et al 2005).

Çalışma kapsamında, kitosan membranlar, biyomalzeme enfeksiyonlarında yaygın olarak ortamdaki izole edilen *E.coli*, *S.epidermidis*, *P.aeruginosa* ve *B.subtilis* suşları ile etkileştirilmiş ve yüzeyler üzerindeki yapışma kinetiği ve biyofilm oluşumu incelenmiştir.

#### **4.2.1. Mikrobiyal kültür çalışmaları**

Bu bölümde, çalışmada kullanılan mikroorganizma seçimi tartışılarak, mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması, üreme eğrilerinin oluşturulması, mikroorganizma yüzey özelliklerinin saptanması ve mikroorganizma-polimerik etkileşimi konularında yapılan çalışmaların sonuçları sunulmuştur.

##### **4.2.1.1. Mikroorganizma seçimi**

Çalışmada kullanılan bakterilerle, biyomalzeme enfeksiyonlarında sıkça karşılaşılmaktadır.

*E.coli* gastrointestinal sistemde bulunan saprofit bir bakteri olmasının yanısıra, birçok enfeksiyonda rol almaktadır. Üriner kateterlerde ve kontakt lenslerde karşılaşılan enfeksiyonlarda *E.coli* sıkça görülmüştür.

*E.coli*, reseptör benzeri bir protein üretmektedir (SdiA). Bu sinyal proteini *E.coli*'nin biyofilm oluşumunda rol almaktadır (Houldt ve Michiels 2005). Birçok *E.coli* suşu, otoindükleyici-2 (AI-2) üretmektedir. AI-2, *E.coli*'de flagella oluşumu ve onun hareketi gibi birçok fonksiyona sahiptir (Houldt ve Michiels 2005).

*S.epidermidis*, insan deri saprofiti olmasına karşın, biyomalzemelerde ciddi enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Ameliyat iplikleri, dolaşım sistemi implantları, penis protezleri ve ortopedik malzemelerde sıkça *S.epidermidis* enfeksiyonları görülmektedir (Mack et al, 2004).

*P.aeruginosa* idrar ve solunum yolu patojeni olup, son derece tehlikeli bir insan patojenidir. Ciddi yanıklar ve cilt yaralarında, kistik fibröz hastalarında *P.aeruginosa* enfeksiyonları özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Antiseptik ve antibiyotiklere karşı güçlü dirençleri nedeniyle bağışıklık sistemi zayıf olan insanlarda tedavisi zor yapılabilmektedir. İmplantların yerleştirilmesinden kısa bir süre sonra ortaya çıkan enfeksiyonlarda *P.aeruginosa* enfeksiyonları sık görülmektedir (Greenberg et al 1999).

*B.subtilis* bitki patojeni olmasına rağmen birçok biyomalzeme enfeksiyonunda görülmektedir (Mogilnaya et al 2003).

Yukarıda yapılan açıklamalar, sunulan çalışmanın adı geçen dört mikroorganizma suşuyla yürütülmesi sonucuna götürmüştür.

#### **4.2.1.2. Mikroorganizma kültürlerinin hazırlanması**

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar, Laktoz Broth ve Tryptic Soy Broth besiyerlerinde üretilmiştir. Yapılan bütün çalışmalarda, mikroorganizmalar üreme periyotları süresince üreme bakımından en aktif oldukları “üstel üreme evresinde” kullanılmıştır. Bu şekilde, mikrobiyal yapışma ve biyofilm oluşturma potansiyeli açısından önemli bir faktör olan mikroorganizma (veya kültür) yaşının etkisi ihmal edilmiştir.



#### 4.2.1.3. Mikroorganizma üreme eğrileri

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara ait üreme eğrileri “bulanıklık ölçümü” (OD) ve “koloni oluşturma” (CFU) yöntemleriyle saptanmış olup, *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.epidermidis* ve *B.subtilis* için Şekil 4.8’de grafiksel olarak verilmiştir. Çizelge 4.3’de ise grafiksel olarak hesaplanan üstel üreme hızları ve ikilenme süreleri ( $t_d$ ) verilmiştir. Bu değerler Eşitlik 4.1 ve 4.2 ile hesaplanmıştır.

$$\mu = \frac{\log X_t - \log X_0}{\log e (t - t_0)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{(t - t_0)} \quad (4.1)$$

İkilenme süresi ise;

$$t_d = \ln 2 / \mu \quad (4.2)$$

Eşitliklerde kullanılan simgeler şu şekilde ifade edilebilir;

$\mu$ : bakteri üreme sabiti

$X_t$ : t zamanındaki hücre sayısı

$X_0$ :  $t_0$  zamanındaki hücre sayısı

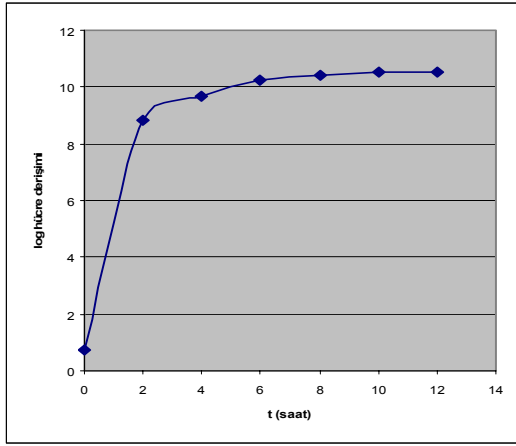
$t_d$ : ikilenme süresi

t: üstel üremenin başladığı zaman

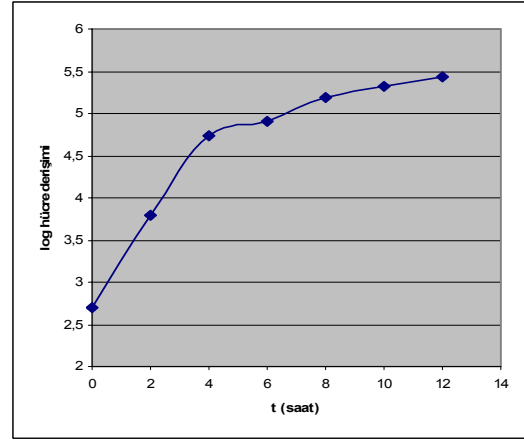
$t_0$ : üstel üremenin bittiği zaman

Çizelge 4.3. Mikroorganizma üstel üreme hızları ve ikilenme süreleri

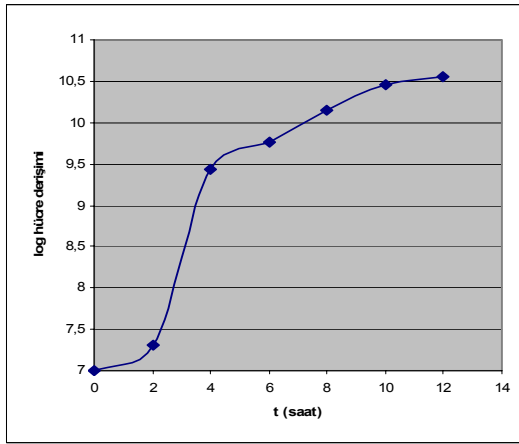
Mikroorganizma Türü	$\mu$ (saat <sup>-1</sup> )	$t_d$ (saat)
<i>E.coli</i>	1,23	0,56
<i>S.epidermidis</i>	0,13	5,33
<i>P.aeruginosa</i>	0,14	4,95
<i>B.subtilis</i>	0,12	5,77



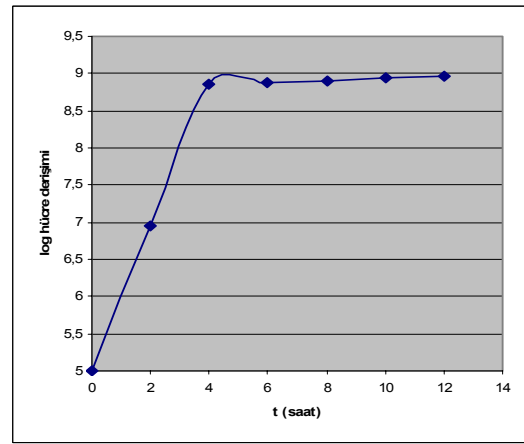
(a)



(b)



(c)



(d)

Şekil 4.8. Mikroorganizma üreme eğrileri:

a) *E.coli* b) *P.aeruginosa* c) *S.epidermidis* d) *B.subtilis*

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, çalışmada kullanılan mikroorganizmaların üreme eğrileri ilk 4 saatte logaritmik olarak artmış ve daha sonra üreme yavaşlayıp durgun faza girmişlerdir. Çalışmalarda kültür yaşını ihmal edebilmek amacıyla logaritmik fazı belirleyip kullanmak önemlidir.

#### 4.2.2. Mikroorganizma-yüzey etkileşimi ve biyofilm oluşumunun incelenmesi için kullanılan yöntemler

Yapılan deneysel çalışmalarda mikroorganizma-yüzey etkileşiminde yüzeye yapışan mikroorganizma sayısının hesaplanması için optik yoğunluk ölçümü, koloni oluşturma birimi, biyoluminesan ile ışık oluşturma birimi ve biyofilm

oluşumunun incelenmesi amacıyla biyoluminesan ile ışık oluşturma yöntemi, SEM ve konfokal mikroskopi yöntemleri kullanılmıştır.

Optik yoğunluk UV-spektrofotometrede bakteri için maksimum adsorbsiyon gösterdiği dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümlerde yüzeye yapışmayan mikroorganizma sayısı daha önce hazırlanan kalibrasyon grafiğinden (EK1) elde edilmiş, daha sonra başlangıç konsantrasyonundan farkı alınarak yüzey üzerine yapışan mikroorganizma sayısı hesaplanmıştır.

Koloni oluşturma birimi, yapışmayan mikroorganizma süspansiyonundan alınan örneğin agar plaklarına tek koloni ekme yöntemi ile kültüre edilmesi ve inkübasyon süreci sonucunda üreyen her koloninin bir mikroorganizma olarak değerlendirilmesiyle saptanmıştır. Daha sonra başlangıç konsantrasyonundan tespit edilen mikroorganizma farkı alınarak yüzey üzerine yapışan mikroorganizma sayısı hesaplanmıştır.

ATP bioluminesan yöntemi hücre içerisindeki ATP moleküllerinin lüsiferin substratı ile olan kimyasal reaksiyonu sonucunda ortaya çıkan ışık miktarının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Her hücre kendine özgü belli bir miktarda ATP'ye sahiptir. Ortamda bulunan ATP miktarını ölçerek mikroorganizma sayısı daha öncesinde oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden hesaplanmıştır.

Bu üç yöntem ile kitosan membranlara yapışan mikroorganizma sayısı karşılaştırmalı olarak incelenmiştir ve sonuçlar EK 2'de gösterilmiştir.

Özellikle mikroorganizmalar tarafından üretilen proteinler ortamda çok olduğunda ışık kırılmalarından dolayı optik yoğunluk ölçümleri çok sağlıklı yapılamamaktadır. *P.aeruginosa* ve *B.subtilis* yoğun olarak protein üretmektedirler ve bu yüzden bu iki mikroorganizmaya ait optik yoğunluk ölçümleri *E.coli* ve *S.epidermidis*'e göre daha tutarsız olarak elde edilmiştir.

Koloni oluşturma biriminde, yapışma ortamından alınan örnekler seyreltilerek agar plaklarına ekilmiştir ve sayılan kolonilere tek bir bakterinin düştüğü varsayılmıştır. Ekilen mikroorganizmalar çok yakın olarak yan yana düşerse tek koloni olarak

üreyebilir ve bu da sonucu yanıltabilir. Yöntemde inkübasyon süreci 24 saat sürdüğünden dolayı sonuç uzun zamanda alınmaktadır.

ATP biyoluminesans yönteminde ise ölçüm çok hassas olarak gerçekleşmekte ve çok düşük konsantrasyondaki mikroorganizmalar belirlenebilmektedir. ATP yüksek ısılarda bozduğundan dolayı örnekler +4°C'de hazırlanmıştır ve ölçüme kadar yine +4°C'de bekletilmiştir. Biyoluminesan reaksiyonu 5-15 sn içerisinde gerçekleşmektedir. Bu nedenle ATP miktarı 10. sn'de ölçülmüştür. Hücre sayısı, elde edilen ışık şiddetlerinden hesaplanmıştır. Hesaplar daha öncesinden hazırlanan ATP kalibrasyon grafiğinden (EK1) yapılmıştır.

SEM analizinde malzeme üzerinde biyofilm oluşumunun gözlenmesi hedeflenmiştir. Biyofilm tabakası SEM analizlerinde ayrıntılı olarak görülebilmekte ve tabaka kalınlığı ölçülebilmektedir. Bu nedenle 15 günlük üreme sürecinde uygun besiyeri ortamında tutulan membranlar kurutulmuş ve SEM analizi yapılmıştır.

Biyofilmde canlı ve cansız hücre dağılımının incelenebilmesi ve yaklaşık olarak hücre sayısının hesaplanabilmesi nedeniyle biyofilm oluşumu konfokal mikroskopi ile incelenmiştir. Ethidiyum bromür cansız hücrelerde hücre membranından girerek bakteri DNA ve RNA'sını boyamaktadır. Bu nedenden dolayı film yapısında cansız hücreler kırmızı, canlı hücreler ise yeşil görünmektedir. Kitosan membranlar katyonik özellikleri nedeniyle kırmızı görünmektedir. 15 gün üreme için uygun besiyeri ortamında tutulan membranlar ethidium bromür ile boyanarak konfokal mikroskobide HeNe filtresi ile üç boyutlu olarak incelenmiştir.

#### **4.2.3. Mikroorganizma-yüzey etkileşimi**

Mikroorganizmalar, genel olarak, bir yüzeye tutunma eğiliminde olurlar. Yüzeye tutunma miktarı, mikroorganizma ve tutunulan yüzeyin özelliklerine göre farklılık göstermektedir. Bu bölümde, durgun ortamda yürütülen çalışmalara ait mikroorganizma-yüzey etkileşimi ve biyofilm oluşumu sonuçları değerlendirilmiştir. Yapışma değerleri ve biyofilm oluşumu, zamana karşı birim alana (mm<sup>2</sup>) yapışan mikroorganizma sayısı olarak grafiğe geçirilmiş, kullanılan yüzeylerin ve

mikroorganizma yüzey özelliklerinin yapışmaya olan etkisi incelenmiştir (Şekil 4.9 ve 4.12).

Hücre yapışmasının incelendiği tüm deneyler için mikroorganizmalar üstel üreme evresinde kullanılmıştır ve başlangıç konsantrasyonları yaklaşık olarak  $1 \times 10^8$  hücre/ml tutulmuştur. Bu şekilde hücre derişimi ve kültür yaşı yapılan çalışmalarda ihmal edilebilmiştir. Yapışma deneyleri sırasında mikroorganizma üremesini engellemek için çalışmalar PBS ortamında yürütülmüştür.

#### **4.2.3.1. Substrat yüzey özelliklerine göre mikroorganizma-yüzey etkileşimi**

Biyomalzeme yüzeyine mikroorganizmaların tutunup yapışmasında yüzeyin hidrofobisitesi, gözenekliliği, yükü ve pürüzlülüğü etkili olmaktadır (Speranza et al, 2004).

##### **4.2.3.1.i. Yüzey hidrofobisitesi**

Mikroorganizma ile malzeme yüzey etkileşiminde, hidrofobik etkileşimler önem taşımaktadır. İki yüzey arası etkileşim, uzaklık ile değişmekte ve önem kazanmaktadır.

Hücreler yüzeye fiziksel güçler ile yaklaşır. Bu yaklaşma için, termodinamik olarak kararlı iki pozisyonun bulunduğunu belirten DLVO teorisine göre, uzun mesafede spesifik olmayan zayıf kuvvetler-yer çekimi, yüzey gerilimi gibi-hücreleri yüzeye çeker. Yüzeyle hücre arasındaki mesafe kısaldıkça, London-van der Waals kuvvetleri ve sterik konfigürasyonların etkisiyle hücreler yüzeyden uzaklaşırken, hidrofobik, kovalent ve iyonik bağlanma kuvvetlerinin etkisi sonunda, hücre yüzeyden 10 nm uzaklıkta "ikincil minimum" denilen pozisyona ulaşır ve tersinir adsorpsiyon gerçekleşir. Hidrofobik kuvvetler yüzeyden 15 nm kadar uzaklıkta etkili olur ve 8-10 nm arasında van der Waals kuvvetlerinden 10-100 kez daha fazladır. Çekici hidrofobik etkileşimler, itme kuvvetlerini yenerek bakterileri "birincil minimum" konumuna getirir. Bakteri yüzeyden 1 nm kadar uzaklıkta olduğunda, kısa mesafedeki kimyasal etkileşimler (iyonik bağlar ve hidrojen

bağları) meydana gelerek yapışma sağlanır. Tutunmadan sonra, fimbriyal yollarla ya da substrat reseptörleri ile etkileşimler olmaktadır (Bos et al 1999).

Sunulan çalışmada kullanılan kitosan hidrofilik bir karaktere sahiptir. Tüm deneysel çalışmalarda, aynı malzeme kullanıldığı için alınan sonuçlar malzeme hidrofobitesinden bağımsız olarak değerlendirilmiştir.

#### **4.2.3.1.ii. Membran gözenekliliği**

Substrat gözenekliliği, mikroorganizmalar için uygun, korunaklı tutunma yüzeyi oluşturmaktadır. Yüzey alanı artan malzemede tutunan mikroorganizma sayısı toplamda artmaktadır, fakat birim alana tutunan mikroorganizma sayısına bakıldığında durum farklıdır. Yüzeye yakın olan gözeneklerde, yeterli oksijen girişi ve atık çıkışı gerçekleşeceğinden dolayı tutunma oranı yüksek, fakat iç taraflarda bulunan gözeneklerde yetersiz oksijen girişi ve atık çıkışı gerçekleştiğinden tutunma oranı düşük olmaktadır. Bu nedenden dolayı, tüm malzemeye bakıldığında, birim alana tutunan mikroorganizma sayısı artışı, malzemenin gaz geçirgenliği, gözenek oranı ve gözeneklerin boyutlarına göre değişmektedir (Madhally ve Matthew 1999).

#### **4.2.3.1.iii. Yüzey pürüzlülüğü**

Pürüzlü olan yüzeylerde mikroorganizma yapışma oranı düz yüzeylere göre daha yüksektir (Lewandowski et al, 2001). Sunulan çalışmada yüzeyler, SEM ile incelenmiştir ve gözenekli olmayan kitosan membranların gözenekli olarak hazırlanan membranlara nazaran daha pürüzsüz olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmada pürüzlülüğü birbirinden farklı 3 tip membran kullanılmıştır. Pürüzlülük, silika partikülleri ile elde edilmiş ve çalışmada iki farklı boyuta sahip silika partikülü kullanılmıştır. Alınan sonuçlarda pürüzlülük artışı ile yapışma yüzdesinin mikroorganizma çeşidinden bağımsız olarak arttığı görülmüştür. Yüzey pürüzlülüğü arttıkça mikroorganizmanın tutunma alanı artmaktadır (Madhally ve Matthew 1999).

#### 4.2.3.2. Mikroorganizma yüzey özelliklerine göre mikroorganizma-yüzey etkileşimi

Mikroorganizmaların bir yüzey üzerine tutunup yapışmasını etkileyen en önemli faktörlerden biri hücrelerin yüzey özellikleridir. Bu yüzey özellikleri arasında, öncelikle olarak, yüzey hidrofobisitesi ve yüzey yük dağılımı sayılabilir. Genel olarak, tüm canlı hücreler, negatif yüzey yüküne sahiptirler. Bunun yanısıra yapışma potansiyeline etkide bulunan yüzey hidrofobisiteyi de değişkenlik göstermektedir. Mikroorganizma ile yüzeyler arası hidrofobik etkileşimler yapışma sırasında hücrelerin yüzeye yaklaşması açısından önemli rol oynamaktadırlar (Speranza et al, 2004). Mikroorganizma yüzey hidrofobisitesi tayini için “değme açısı ölçümü” etkin olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmalarda, mikroorganizma ve bu organizmaların oluşturdukları biyofilmlerdeki hidrofobisite “değme açısı ölçümü” ile incelenmektedir ve çalışmada etkisini görebilmek amacıyla bu değerler ilgili literatürlerden alınmıştır.

Bakteri hücre yüzeylerinin değme açısı ölçümü membran filtre üzerinde oluşan hücre tabakası, agar plakları üzerinde üreyen koloniler veya biyofilm üzerinden yapılır. Değme açısı, damlacığın yüksekliği ve taban genişliği ölçülerek hesaplanır (Dickinson et al 2003).

Mikroorganizmaların yüzey özelliklerinden hidrofobisite daha önceki bölümde de açıklandığı gibi, hücreleri birincil minimuma yakınlaştırıp yapışmayı büyük ölçüde etkilemektedir. Çalışılan mikroorganizmalar için yüzey gerilimleri, su, yağ ve 1 N'lik NaCl'li su ile ölçülmektedir. (Dickinson et al 2003). Literatür taramaları sonucunda saptanan değme açıları ( $\theta_w$ ) ve “Equation of State” yaklaşımı ile hesaplanan yüzey gerilimleri ( $\gamma_{sv}$ ) Çizelge 4.4.'de verilmiştir.

Sunulan çalışmada, farklı yüzey hidrofobisitesine sahip mikroorganizmalar (Çizelge 4.4) kullanılmıştır.

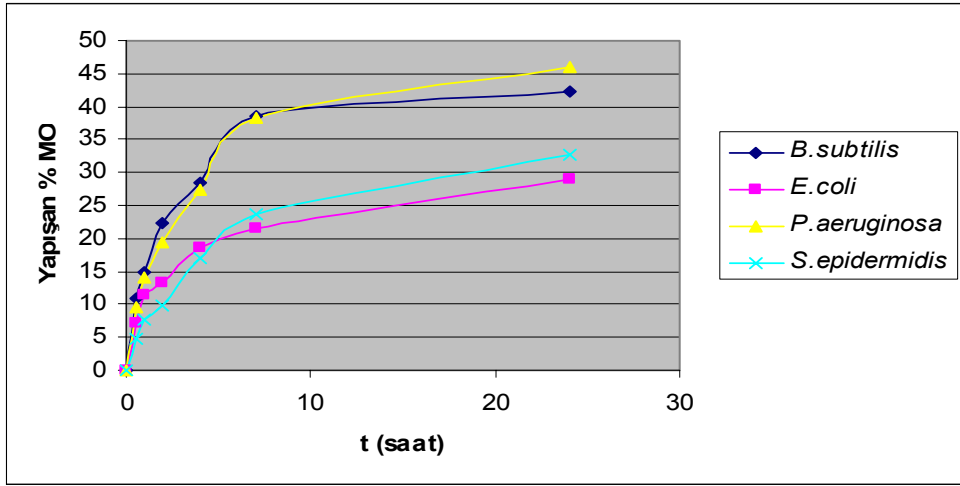
Çizelge 4.4. Çalışmada kullanılan mikroorganizmalara ait su değme açıları ( $\theta_w$ ) ve yüzey gerilimi ( $\gamma_{sv}$ ) değerleri (Bruinsma et al, 2001, Ahimou et al, 2000, Karakeçilli, 1995).

Mikroorganizma türü	$\theta_w$ (derece)	$\gamma_{sv}$ (erg/cm <sup>2</sup> )
<i>E.coli</i>	12,00	71,40
<i>S.epidermidis</i>	18,50	69,10
<i>P.aeruginosa</i>	129,00	80,00
<i>B.subtilis</i>	48,50	70,00

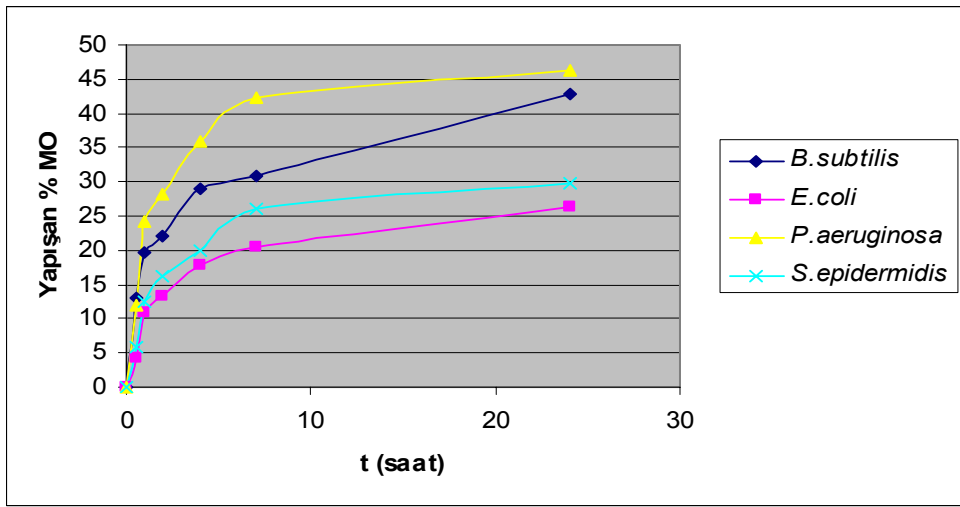
#### 4.2.3.3. Mikroorganizma yapışma kinetiği sonuçları

Çalışma sırasında 24 saat süresince yapışma davranışı zamana bağımlı olarak incelenmiştir. Birim alana zamana bağlı yapışan bakteri sayısı Ek 2'de verilmiştir. Her bir yüzey için 4 bakteri suşunun yapışma kinetiğini gösteren grafikler hazırlanmış ve Şekil 4.9'da sırasıyla saf çapraz bağımsız kitosan, ECH ile çapraz bağlı kitosan, 15-40  $\mu\text{m}$  silika katkılı makrogözenekli çapraz bağımsız kitosan, 15-40  $\mu\text{m}$  silika katkılı makrogözenekli ECH ile çapraz bağlı kitosan, 80 -120  $\mu\text{m}$  silika katkılı makrogözenekli çapraz bağımsız kitosan, 80-120  $\mu\text{m}$  silika katkılı makrogözenekli ECH ile çapraz bağlı kitosan yüzeyler için verilmiştir. Grafiklerde yer alan değerler üç ölçüme ait değerlerin ortalamasıdır. Bu değerler incelendiğinde, tüm yüzeyler ve mikroorganizmalarda yapışmanın ilk 7 saat içerisinde denge değerine ulaştığı görülmektedir.

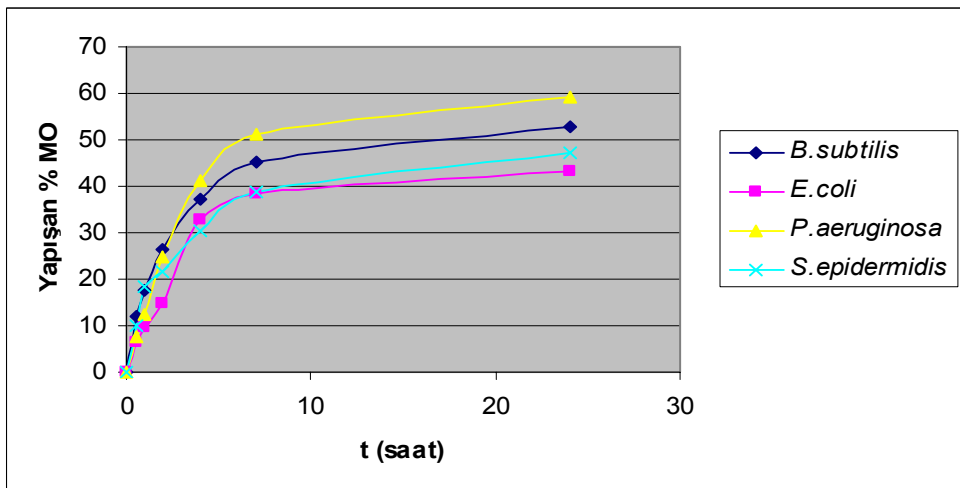




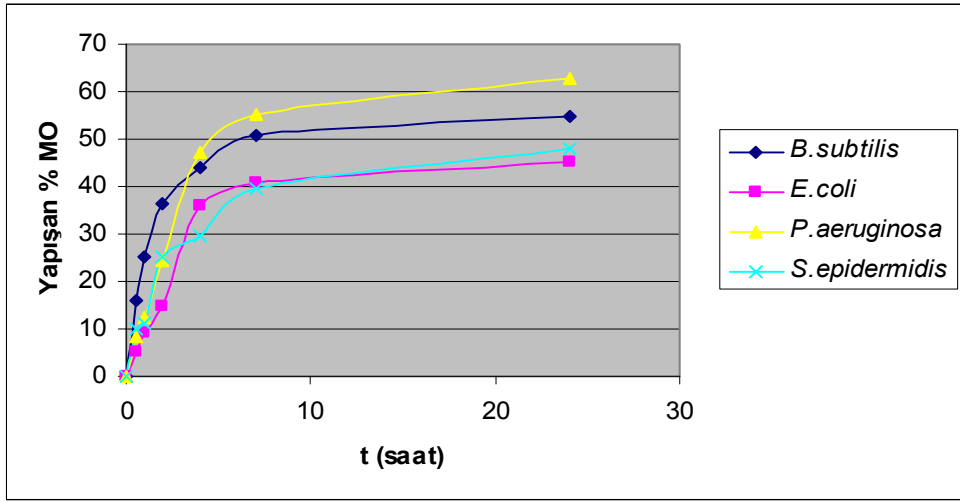
(a)



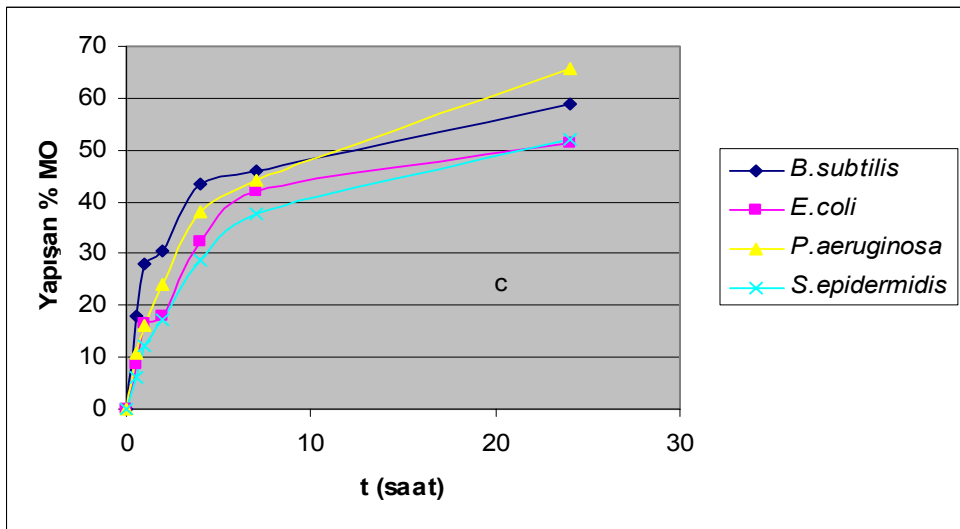
(b)



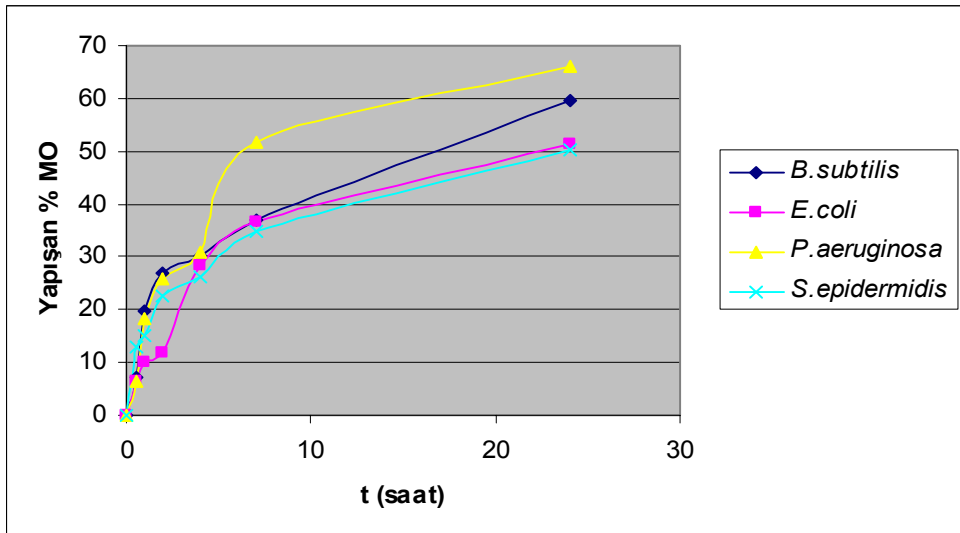
(c)



(d)



(e)



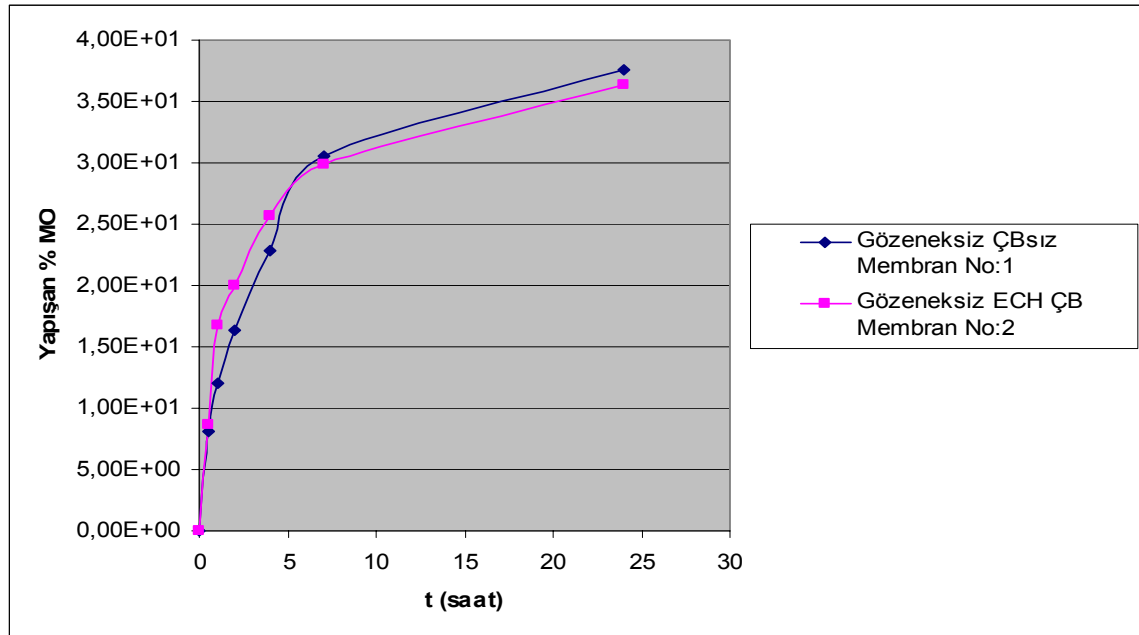
(f)

Şekil 4.9. % olarak mikroorganizma yapışma kinetiği

a) Gözeneksiz kitosan membrana mikroorganizma yapışması (Membran No:1)

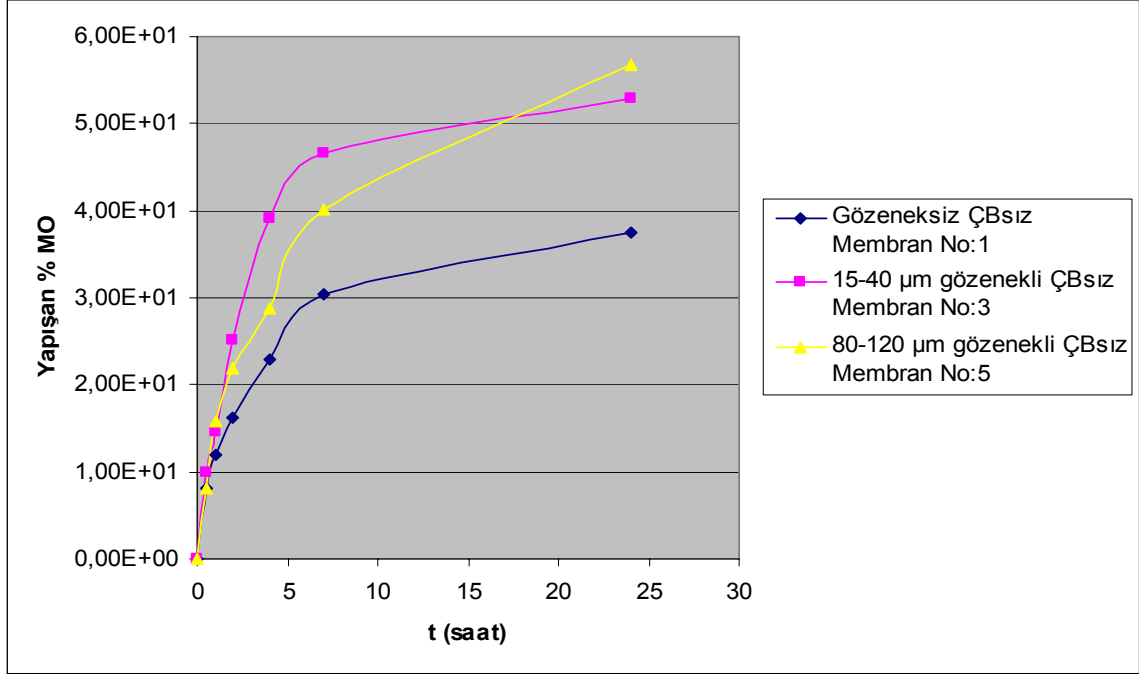
- b) Gözeneksiz ve ECH çapraz bağlı kitosan membrana mikroorganizma yapışması (Membran No:2)
- c) 15-40 µm gözenekli ve ECH çapraz bağlı kitosan membrana mikroorganizma yapışması (Membran No:4)
- d) 15-40 µm gözenekli kitosan membrana mikroorganizma yapışması (Membran No:3)
- e) 80-120 µm gözenekli kitosan membrana mikroorganizma yapışması (Membran No:6)
- f) 80-120 µm gözenekli ve ECH çapraz bağlı kitosan membrana mikroorganizma yapışması (Membran No:5)

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi, kitosan membranlara 24 saatlik yapışma değerleri, bakteri türü ve membran çeşidine göre farklılık göstermektedir. Kitosan membran gözenekliliğinin bakteriyal yapışmayı arttırdığı, çapraz bağlanmanın ise etkisiz olduğu gözlemlenmiştir. Bakteri türlerinden *P.aeruginosa* ve *B.subtilis*, *S.epidermidis* ve *E.coli*'ye göre, membran çeşitinden bağımsız, daha fazla yapışma göstermiştir. 24 saatin sonunda, 80-120 µm gözenekli membranlara *P.aeruginosa* yaklaşık %65 oranı ile en yüksek miktarda yapışma göstermiştir.



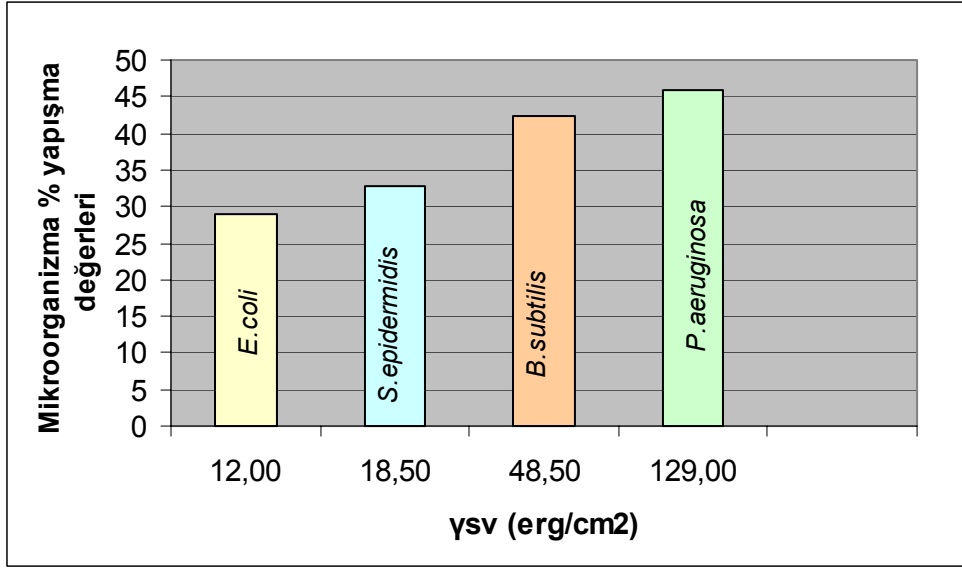
Şekil 4.10. Çapraz bağlamanın mikroorganizma yapışma kinetiğine etkisi

Çapraz bağlanmanın, mikroorganizma yapışma miktarına anlamlı bir etkide bulunmadığı Şekil 4.10'da görülmektedir. Şekildeki karşılaştırma, kullanılan tüm 4 farklı bakteri kültürünün ortalaması alınarak yapılmıştır.



Şekil 4.11. Gözenekliliğin mikroorganizma yapışma kinetiğine etkisi

Gözenekliliğin, bakteriyal yapışma üzerindeki etkisi Şekil 4.11'de görülmektedir. Gözeneklilik arttıkça, bakteri yapışmasında artış gözlenmiştir. Bu artışın sebebi olarak tutunma yüzeyinin ve difüzyonun artışı verilebilir. Gözeneksiz membranlarda yapışma en düşük düzeyde kalmıştır. Şekildeki karşılaştırma, kullanılan tüm 4 farklı bakteri kültürünün ortalaması alınarak yapılmıştır.



Şekil 4.12. Gözeneksiz kitosan membran üzerinde, yüzey gerilimin mikroorganizma yapışma değerlerine etkisi

Mikroorganizma % yapışma değerleri, sahip oldukları yüzey gerilimlerine göre gözeneksiz kitosan membran üzerinde karşılaştırılmıştır (Şekil 4.12). Grafikte de görüldüğü gibi, yüzey gerilimlerinin artışı ile yapışma miktarı da artmıştır.

#### 4.2.4. Biyofilm oluşumu

Mikroorganizmalar, bir yüzeye tutunduktan sonra üreyip biyofilm oluşturabilirler. Biyofilm oluşumu, yüzey özellikleri ve mikroorganizmanın çeşidine göre farklılık göstermektedir. Bu bölümde, durgun ortamda yürütülen çalışmalara ait mikroorganizma-yüzey etkileşimi ve biyofilm oluşumu sonuçları değerlendirilmiştir. 15 gün süresince besiyeri ortamında üremeye bırakılan mikroorganizmaların kitosan membranlar üzerindeki yapışma değerleri zamana karşı birim alan (mm<sup>2</sup>) yapışan mikroorganizma sayısı olarak tablo haline gösterilmiş ve biyofilm oluşumu, SEM analizi ve konfokal mikroskopisi ile görsel olarak incelenmiştir.

Biyofilm oluşumu incelendiği tüm deneyler için mikroorganizmalar üstel üreme evresinde kullanılmıştır ve başlangıç konsantrasyonları yaklaşık olarak  $1 \times 10^8$  hücre/ml tutulmuştur. Bu şekilde hücre derişimi ve kültür yaşı, yapılan çalışmalarda

ihmal edilebilmiştir. Biyofilm oluşumu için tasarlanan deneyler besiyeri ortamında yürütülmüştür.

#### **4.2.3.1. Substrat yüzey özelliklerine göre biyofilm oluşumu**

Biyomalzeme yüzeyinde biyofilm oluşumunda malzeme çeşidi, yüzey gözenekliliği ve pürüzlülüğü etkili olmaktadır.

##### **4.2.3.1.i. Malzeme çeşidi**

Biyofilm oluşumunda mikroorganizmaların yapıştığı malzeme çeşidi, etkin rol oynamaktadır. Biyoyumlu malzemeler, genellikle bakterilerin öncelikle tutunması ve aynı zamanda da üremesi için elverişli özelliklere sahiptirler. Özellikle malzemenin sahip olduğu yük, yük yoğunluğu, sertlik gibi konular, elverişliliği belirler. Genellikle memeli hücreleri ile aynı özellikler, bakteri yapışma ve üremesini etkilese de bazı özelliklerde farklılık göstermektedir. Malzemeye tutunma, malzeme üzerinde üreme olabileceğini gösterebildiği gibi uzun vadede malzeme, hücreler için uygun bir ortam olmak zorunda değildir.

Biyofilm oluşumu çok karmaşık bir proses olmaktadır. Biyofilm oluşumunda moleküler, membran faktörleri ve malzeme dahil olmak üzere birçok faktör etkilidir. Biyomalzeme olarak kullanılan kitosan, katyonik özelliktedir. Katyonik özellik nedeniyle, bakteri membran ve DNA replikasyonu olumsuz etkilenmekte, ve kitosan bakterinin yaşamsal döngüsü üzerinde baskılayıcı etkide bulunduğu görülmüştür.

##### **4.2.3.1.ii. Yüzey gözenekliliği**

Yüzeyin gözenekliliği mikroorganizma üremesi için korunaklı bir ortam oluşturmanın yanı sıra, üreme için yüzey alanını da arttırmaktadır.

Genel olarak doğada bulunan heterojen biyofilmlerde, malzemenin daha iç taraflarında, anaerob mikroorganizmalar bulunurken dış kısımlarda aerob mikroorganizmalar bulunmaktadır. Diğer taraftan, biyofilimde gözenek içerisindeki

bakterilerde canlılık oranı dış kısımda bulunanlara göre daha düşük olmaktadır. Gözeneklilik ve gözenek büyüklüğü arttıkça gaz ve sıvı geçirgenliği artacağından dolayı mikroorganizma sayısı artmaktadır.

Yapılan deneysel çalışmada gözenekliliği birbirinden farklı üç tip membran kullanılmıştır: Gözeneksiz, 15-40 µm silika partikülleri ve 80-120 µm silika partikülleri kullanılarak oluşturulan makrogözenekli membranlar. 80-120 µm gözenekli membranlarda yapışan mikroorganizma sayısı ve 15 günlük üreme süreci sonunda mikroorganizma sayısının en yüksek olduğu, gözeneksiz membranlarda ise en düşük olduğu görülmüştür (Şekil 4.13).

#### **4.2.3.1.iii. Yüzey pürüzlülüğü**

Yüzey pürüzlülüğü, mikroorganizma tutunmasını arttırmanın yanı sıra, tutunmayı daha sıkı hale getirmektedir ve bu nedenle biyofilm oluşumuna olumlu etkide bulunmaktadır.

Çalışmada kullanılan membranlar pürüzlülüğü birbirinden farklı 3 tipte üretilmiştir. Gözeneksiz membranlar SEM analizlerinde de görüldüğü gibi pürüzsüzdür. 15-40 µm silika partikülleri ve 80-120 µm silika partikülleri kullanılarak oluşturulan makrogözenekli membranlar ise pürüzlüdür. Yapılan biyofilm analizlerinde pürüzlü yüzeylerde, mikroorganizma çeşidinden bağımsız olarak, mikroorganizma üremesinin arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).

#### **4.2.3.2. Mikroorganizma özelliklerine göre biyofilm oluşumu**

Her mikroorganizma türü, farklı oranda biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir. Bu oran, mikroorganizmanın genetik yapısına, yüzeyindeki organellerin ve salgıladığı hücre dışı polisakarit oranına göre değişmektedir.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar farklı türlerde olup farklı miktarda üreme oranları olduğu görülmüştür (Şekil 4.13). Farklı üreme hızları mikroorganizmanın yaşam alanını da belirlemektedir.

*P.aeruginosa* ve *B.subtilis*, *E.coli* ve *S.epidermidis*'e göre daha fazla üreme oranına sahip olduğu görülmüştür. Bu mikroorganizmaların patojenitesi ile de açıklanabilmektedir.

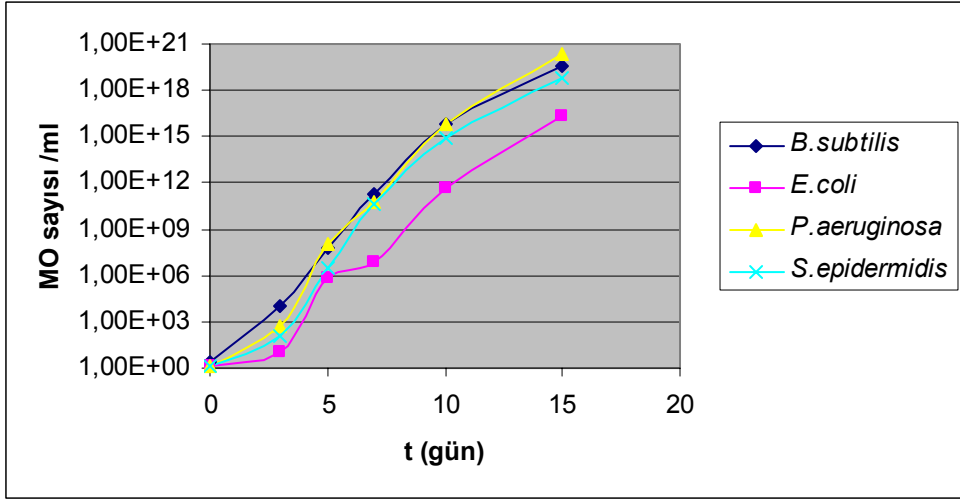
*P.aeruginosa* çok önemli bir insan patojenidir ve oluşturduğu enfeksiyonlar antibiyotikten çok az etkilenmektedir. Bunun nedeni *P.aeruginosa* enfeksiyonlarında biyofilm oluşumudur. Biyomalzeme enfeksiyonların bir çoğunda *P.aeruginosa* etkisi görülmüştür. Biyomalzeme enfeksiyonlarında bu kadar önemli rol oynayan *P.aeruginosa* biyofilmleri yapılan çalışmada görülmemiştir. Yapılan deneysel çalışmalarda yoğun olarak üreyen bakterilerin biyofilm oluşturmadıkları SEM analizi ile gözlemlenmiştir.

*B.subtilis* bitki patojeni olarak tanımlanmasının yanısıra biyomalzeme enfeksiyonlarında da görülmektedir. Yoğun biyofilm üreterek üreyen *B.subtilis*'in üreme miktarı da yüksektir. Yapılan ATP biyoluminesan ölçümlerinde yoğun bir üreme gösteren *B.subtilis*, SEM analizlerinde üreyen mikroorganizmaların biyofilm oluşturmadığı görülmüştür.

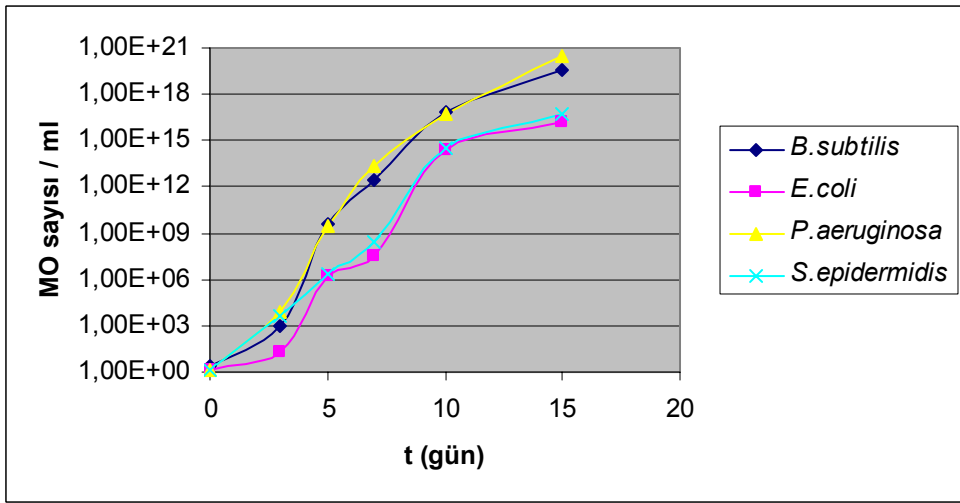
*S.epidermidis* epidermis saprofiti olup biyomalzeme enfeksiyonlarında sık bulunmaktadır. Bunun nedeni, genelde cerrahi girişim sırasında *S.epidermidis*'in bir şekilde malzemeye bulaşmasıdır. *B.subtilis* ve *P.aeruginosa* kadar patojen olmamasına da bağlı olarak üremesi daha az miktarı görülmüştür. Aynı şekilde SEM analizlerinde biyofilm oluşumu gözlemlenmemiştir.

Çalışmada *E.coli*'nin patojen olmayan bir suşu kullanılmıştır. Genel olarak daha çok üriner ve boşaltım sistemi biyomalzeme enfeksiyonlarında *E.coli* izole edilmiştir. Bakteri yapışma değerlerinde de en düşük değerlere sahip olan *E.coli* en düşük değerlerde üreme göstermiş, SEM ve konfokal mikroskopi analizlerinde biyofilm oluşumu göstermemiştir.

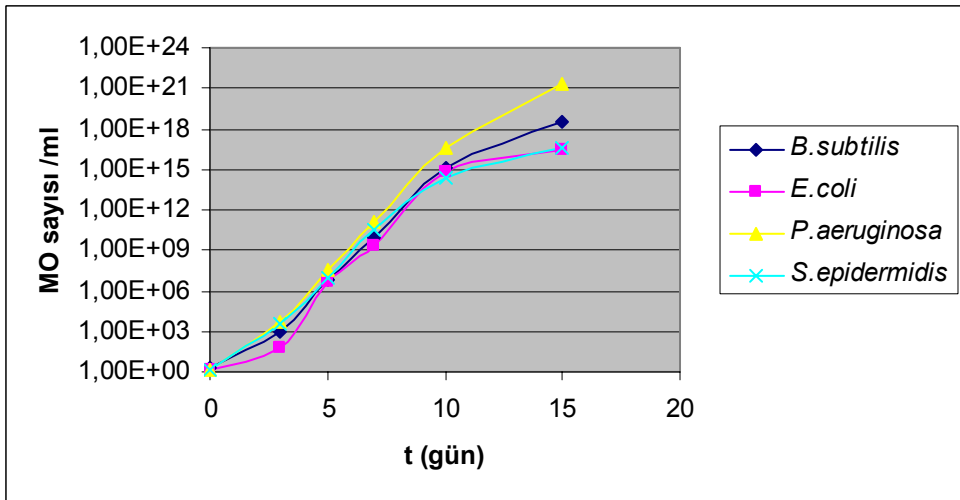




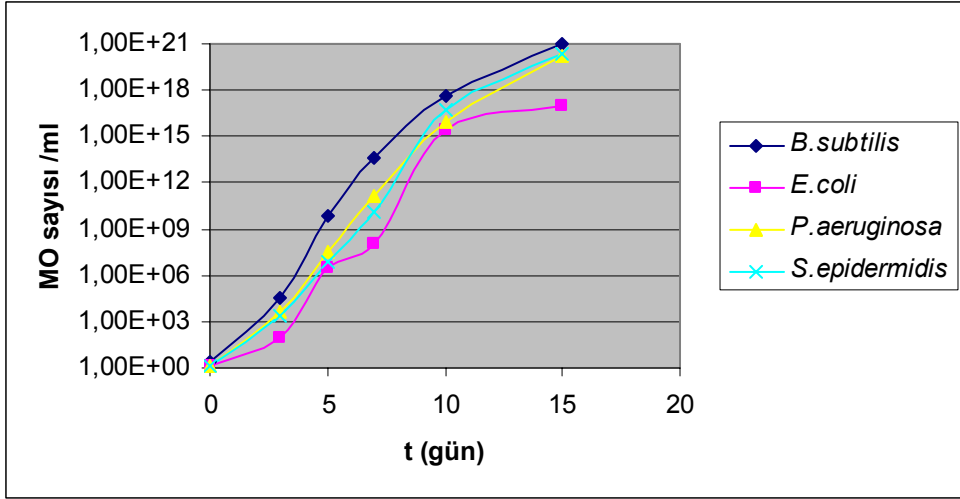
(a)



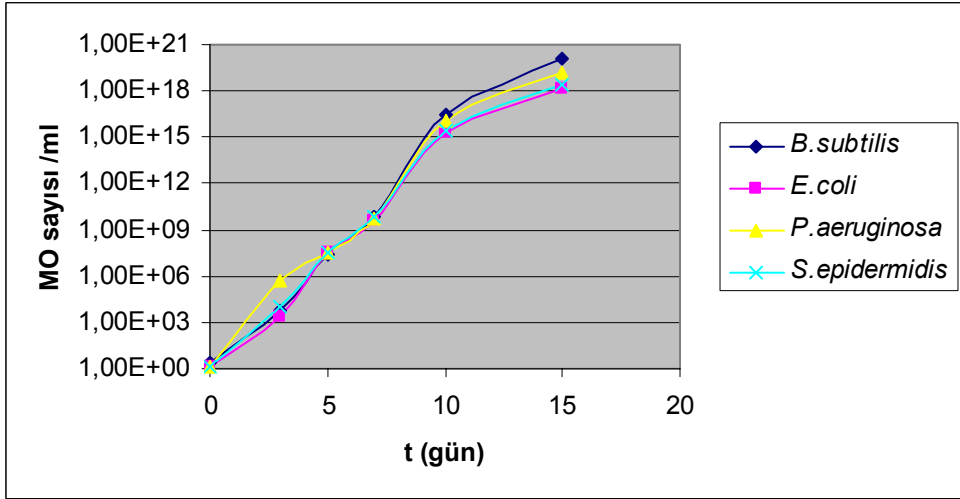
(b)



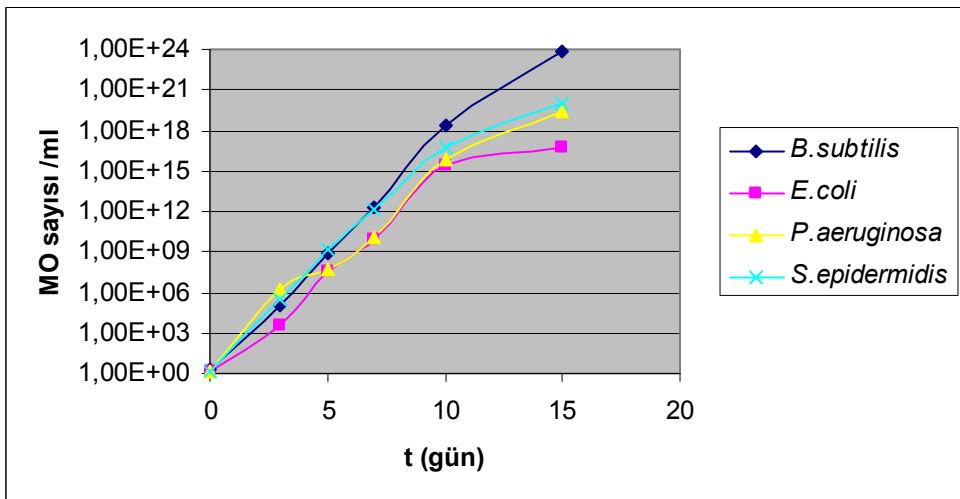
(c)



(d)



(e)

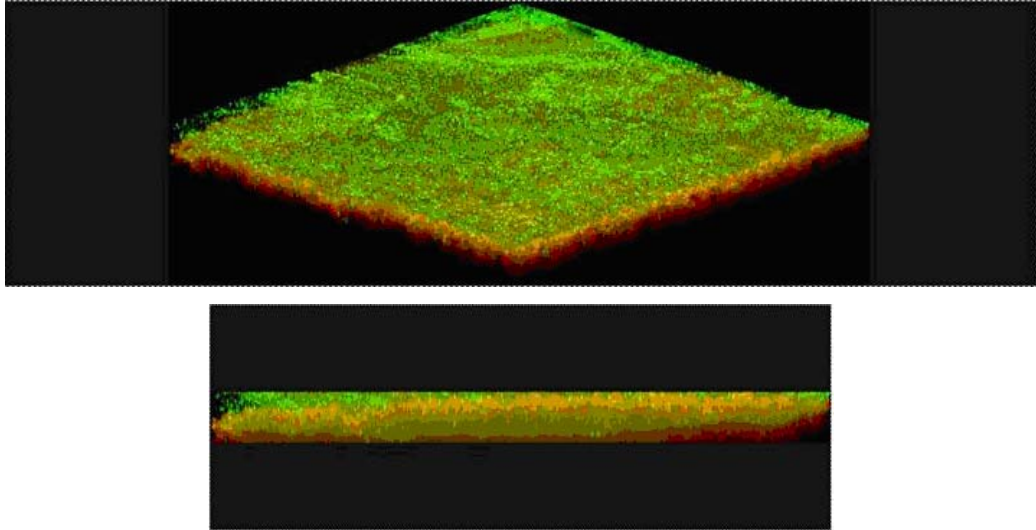


(f)

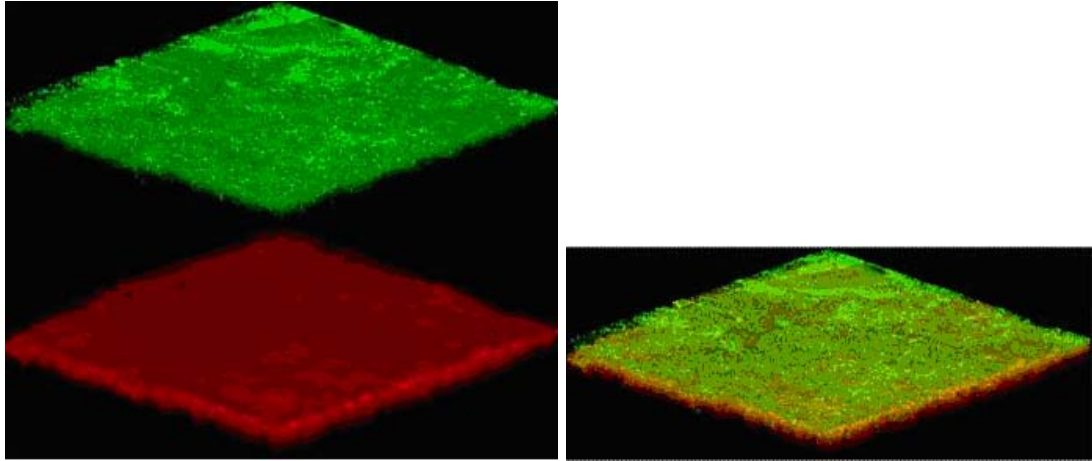
Şekil 4.13. 15 günlük üreme kinetikleri

- a) Gözeneksiz kitosan üzerindeki bakteri üremesi (Membran No:1)
- b) Gözeneksiz ve ECH çapraz bağlı kitosan üzerindeki bakteri üremesi (Membran No:2)
- c) 15-40 µm gözenekli ve ECH çapraz bağlı kitosan üzerindeki bakteri üremesi (Membran No:4)
- d) 15-40 µm gözenekli kitosan üzerindeki bakteri üremesi (Membran No:3)
- e) 80-120 µm gözenekli ve ECH çapraz bağlı kitosan üzerindeki bakteri üremesi (Membran No:6)
- f) 80-120 µm gözenekli kitosan üzerindeki bakteri üremesi (Membran No:5)

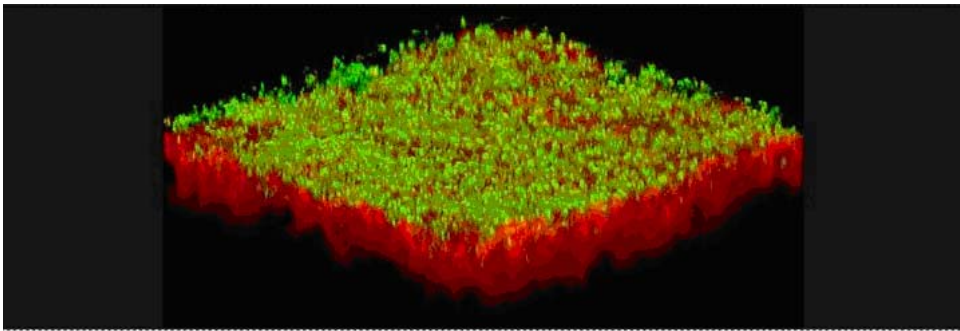
Zengin besiyeri ve uygun sıcaklıkta 15 gün süresince üremeye bırakılan bakterilerde membran üzerindeki biyofilm oluşumunun incelenmesi hedeflenmiştir. ATP biyoluminesans ile malzeme üzerinde bulunan hücre sayısı tespit edilmiştir. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi malzeme üzerinde hücre üremesi gerçekleşmiştir. *B.subtilis* ve *P.aeruginosa* her çeşit membranda en yüksek sayıda üreme göstermiştir. 80-120 µm gözenekli kitosan membranlarda üremenin en fazla olduğu, gözeneksiz membranlarda ise en düşük olduğu görülmüştür. Hücre üremesine çapraz bağlayıcının etkisi olmadığı görülmüştür.



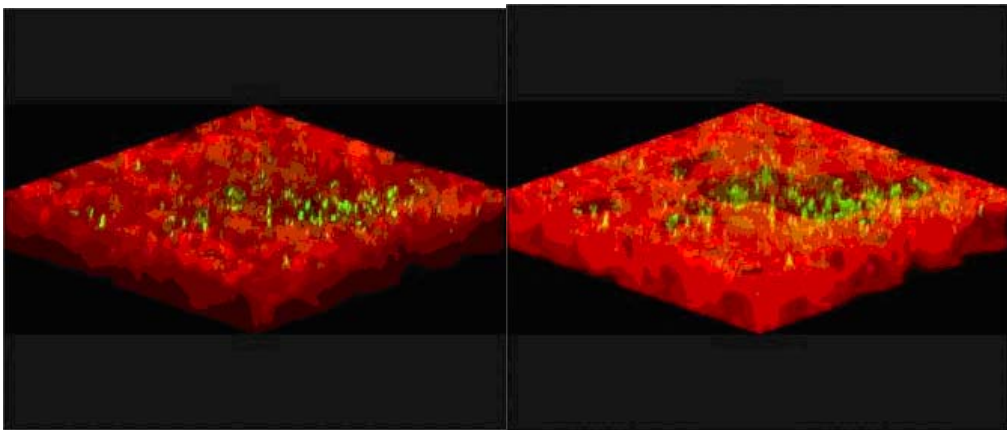
(a)



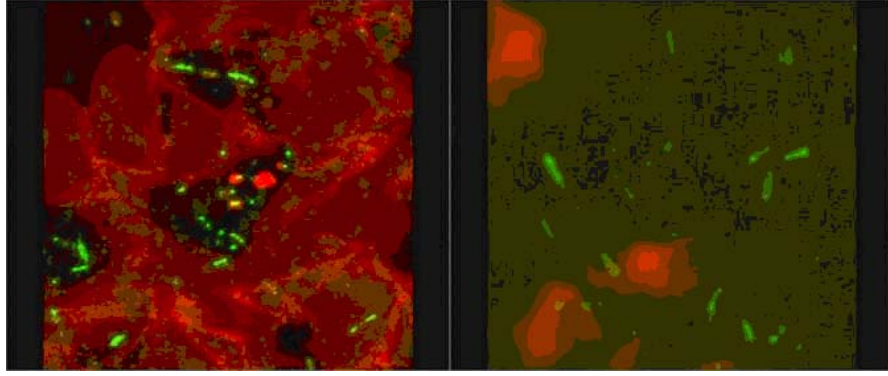
(b)



(c)



(d)



(e)

#### Şekil 4.14. Konfokal mikroskopisi

- a) Gözeneksiz kitosan membran üzerinde üreyen *E.coli* (x40) (Membran No:1)
- b) Gözeneksiz kitosan membran üzerinde üreyen *E.coli*. Yeşil tabaka *E.coli*, kırmızı tabaka gözeneksiz kitosan (x40) (Membran No:1)
- c) 15-40 µm gözenekli kitosan membran üzerinde üreyen *E.coli* (x40) (Membran No:3)
- d) 15-40 µm gözenekli kitosan membran içerisinde üreyen *E.coli* (x40) (Membran No:3)
- e) 15-40 µm gözenekli kitosan membran içerisinde üreyen *E.coli* (Membran No:3)

Konfokal mikroskopisi analizinde örnek olarak seçilen *E.coli* bakterisinde gözeneksiz ve gözenekli membran yüzeyinde üreme olduğu görülmüştür (Şekil 4.14). Canlı bakteri hücreleri yeşil görünmekte, malzeme ve ölü hücreler ise kırmızı görünmektedir. Burada şekilleri yer almayan SEM analizinde de membran üzerinde biyofilm oluşumu gözlemlenmemiş, konfokal mikroskopisi analizinde de üreme görülmüş, fakat biyofilm yapısı gözlenmemiştir.

#### 4.2.5. Mikroorganizma yapışması ve biyofilm oluşumunun istatistiksel değerlendirilmesi

Kitosan membranlarda, mikroorganizma yapışma ve 15 günlük üreme sonuçları ANOVA istatistiksel yöntem ve Bonferroni düzeltmesi (adjustment) kullanılarak yapılmıştır (<http://www.physics.csbsju.edu/>). Sonuçlar Çizelge 4.5'de ifade edilmiştir. ANOVA'da  $\alpha$  değerini belirlemek amacıyla Bonferroni yöntemi

kullanılmıştır. Genel olarak ANOVA yönteminde  $\alpha=0.05$  olarak seçilmektedir, fakat karşılaştırma yöntemini daha hassas olarak uygulamak için,  $\alpha$  grup sayısına göre belirlenmektedir. Yapılan deneysel çalışmada 3'er grup karşılaştırılmıştır. Buna göre "null hipotezi" için  $\alpha$  0.015, p ise 0.15 olarak alınmıştır.

Çizelge 4.5. İstatistiksel sonuçlar

	F	p
Bakteri türünün yapışma üzerine etkisi	1.297	0.027
Kullanılan analiz yönteminin birbirinden anlamlı farklılığı	3.476	0.032

Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi, bakteri türünün yapışma üzerine etkisi olduğu kabul edilmiştir ( $p=0.027$ ). Buna göre, çalışmada kullanılan farklı türdeki bakterilerin, farklı oranlarda yapışma gösterdikleri kanıtlanmıştır. Aynı zamanda, kullanılan ölçüm yöntemlerinin, anlamlı olarak birbirinden farklı sonuç verip/vermediği analiz edilmiş ve yöntemlerden en az bir tanesinin, anlamlı olarak farklı sonuçlar verdiği kabul edilmiştir ( $p=0.032$ ). Buna göre, ATP biyoluminesans yöntemi ile daha hassas ve doğru ölçüm yapıldığı kanıtlanmıştır.

Yapılan deneysel çalışmalarda doğal polimer, kitosandan üretilmiş membranların biyomalzeme olarak uygunluğunun bakteriyal yapışma ve biyofilm oluşumu bakımından incelenmesi hedeflenmiştir. Bölüm 2.4'de de belirtildiği gibi, kitosanın antibakteriyal etkisi olduğu bilinmektedir. Yapılan literatür taramasında, membran formunda kitosanın antibakteriyal özelliğinin çalışılmadığı görülmüştür ve sunulan tez çalışmasında biyomalzeme olarak uygunluğu test edilen kitosan membranlarda bakteriyal yapışma ve biyofilm oluşumu incelenmiştir. Tez çalışmasında, bakterilerin kitosan membranlara yapışma gösterdiği görülmüş, yapışma miktarı OD, CFU ve ATP biyoluminesan ile ölçülmüş ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Kitosan membranlarda gerçekleştirilen 15 günlük üreme sonucunda ATP biyoluminesan ile bakteri üremesinin gerçekleştiği görülmüş fakat SEM ve konfokal mikroskopi incelemelerinde biyofilm oluşumunun gerçekleşmediği görülmüştür. Kitosan, katyonik özelliği nedeniyle bakteriyal DNA ve RNA'ya bağlanmaktadır. Biyofilm oluşumunun inhibisyonunu, film oluşumunun karmaşık ve

tam açıklanamamış olan moleküler mekanizmasının etkilemiş olabileceği düşünülmüştür.

## 5. GENEL SONUÇLAR

Sunulan tez çalışmasında, kitosan-bazlı membranlar hazırlanmış ve karakterize edilmişlerdir. Bu membranlar ile bakteri yapışma kinetiği ve biyofilm oluşumu çeşitli analiz yöntemleri ile incelenmiştir. Çalışma boyunca elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

- Kitinin deasetillenmiş türevi olan kitosanın % 1'lik asetik asit içerisindeki çözeltisinden, çözücü buharlaştırma yöntemi ile gözeneksiz kitosan membranlar hazırlanmıştır.
- Makrogözenekli membran eldesi için kitosan çözeltisine gözenek oluşturucu ajan olarak silika partikülleri 16:1 oranında (silika partikülleri/kitosan) eklenmiştir. NaOH muamelesi ile silika partikülleri yapıdan uzaklaştırıldığında makrogözenekli membranlar elde edilmiştir.
- Hazırlanan membranlar asidik çözeltilerdeki dayanımını arttırmak amacıyla çapraz bağlanmışlardır. Çapraz bağlayıcı ajan olarak, -OH grupları üzerinden bağlanmayı sağlayan ve pek çok biyomateryal için güvenle kullanılan epiklorohidrin seçilmiştir. Epiklorohidrin ile çapraz bağlamada reaksiyon, bazik ortamda  $1 \times 10^{-2}$  M epiklorohidrin çözeltisinde gerçekleştirilmiştir.
- Kitosan bakteriyal bir enzim olan kitosanz ile degrade edilebilmektedir. Çalışmada kullanılan *P.aeruginosa* ve *B.subtilis* kitosanz enzimi üreten bakteri türleridir. Deneysel çalışmalarda kitosanın degradasyonunu incelemek amacıyla *Streptomyces griseus*'tan elde edilmiş kitosanz kullanılmıştır. Degradasyon sonucunda çapraz bağız kitosan membranların ECH ile çapraz bağlı kitosan membranlardan daha fazla degrade edildiği görülmüştür.
- Kitosan malzemenin, biyomalzeme olarak kullanılabilirliğini incelemek amacıyla, malzemeye bakteri yapışması ve malzeme üzerinde biyofilm oluşumu incelenmiştir. Çalışmada kullanılan bakteriler şu şekildedir; *B.subtilis*, *E.coli*, *S.epidermidis* ve *P.aeruginosa*.



- Mikroorganizmalar, kendi özellikleri ve etkileştikleri malzeme yüzey özelliklerine bağlı olarak, malzeme yüzeyine farklı miktarlarda yapışırlar. Sunulan çalışmada, kullanılan malzeme özelliği ve mikroorganizma çeşitlerinin yapışmaya ve biyofilm oluşumuna olan etkisi incelenmiştir.
- Deneysel sonuçlar ile, kitosan membranlar üzerinde mikrobiyal yapışmanın gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bakteriyal yapışmanın makrogözenekli membranlarda, gözeneksiz membranlardan daha fazla olduğu görülmüş, çapraz bağlayıcı varlığının ise yapışma değerlerini etkilemediği sonucuna varılmıştır.
- Mikrobiyal yapışmada, mikroorganizma türüne bağlı olarak farklı değerler elde edilmiştir. Mikrobiyal yapışma miktarı açısından bakterilerin şu şekilde sıralandığı görülmüştür: *P.aeruginosa* > *B.subtilis* > *S.epidermidis* > *E.coli*. Deneysel çalışmalar, durgun ve PBS ortamında, 37°C'de yürütülmüştür. Bakteri türlerinin başlangıç konsantrasyonları aynı tutulup, yaklaşık olarak 10<sup>8</sup> hücre/ml olarak ayarlanmıştır. Hücreler, üstel üreme fazında kullanılmıştır. Eşit olarak tutulan şartlarda, *P.aeruginosa* her tip membranda da en fazla yapışma değerini göstermiştir. Yapışma oranı % 50 civarına ulaşmıştır. *B.subtilis* ikinci çok yapışma gösteren bakteri olmuştur. En az yapışma *E.coli*'de gözlemlenmiştir ve yapışma değeri % 20 civarında olmuştur. Yapışma değerleri malzeme çeşidi aynı olduğundan dolayı hidrofobisiteleri ile ilişkilendirilememiştir fakat literatürden bilinen patojeniteleri ile yorumlanabilmiştir.
- Mikroorganizma yapışması, 3 farklı ölçüm yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntemler koloni oluşturma birimi (CFU), optik yoğunluk (OD) ve ATP biyoluminesans yöntemidir. Koloni oluşturma birimi ve optik yoğunluk ölçümleri klasik yöntemler olup, ATP biyoluminesans yönteminde daha kesin ölçüm yapılabilmektedir. Hücre içerisindeki ATP miktarının ışımalarının ölçüldüğü yöntemde, hücrelere özgü ATP miktarına bağlı olarak, hücre sayımı yapılmıştır. Bu yöntemle her hücrenin kesin olarak ölçüldüğü varsayılabilir.

- Mikroorganizmaların, kitosan membranlar üzerinde biyofilm oluşun potansiyeli incelenmiştir. Bunun için hücreler 15 gün boyunca durgun, çalkalamalı ortamda uygun besiyeri ve sıcaklıkta üretilmiştir. Malzeme üzerindeki hücre sayımı ATP biyoluminesans ölçümü ile, biyofilm oluşumu ise SEM ve CLSM ile incelenmiştir. Yapılan incelemeler sonucu malzeme üzerinde bakteri üremesi görülmüş, fakat SEM ve konfokal mikroskopi görüntülemelerinde biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Kitosan membran üzerindeki üremede *P.aeruginosa* ve *B.subtilis* kendi aralarında anlamlı olarak farklılık göstermezken, üremenin *E.coli* ve *S.epidermidis*'den daha fazla görülmüştür.

Biyomalzeme kullanımında, en ciddi enfeksiyonlara neden olan biyofilm oluşumu, yapılan çalışmalarda gözlemlenmemiştir. Biyofilm oluşumu ile sonuçlanmayan bakteriyal üremenin daha kolay kontrol altına alınabileceği düşünüldüğünde üretilen kitosan membranların biyomalzeme olarak kullanımda antibakteriyal etkileri nedeniyle avantajlı olabileceği sonucuna varılmıştır. Çapraz bağlı membranlar, kitosaz degradasyonuna karşı korunaklıdır. Makrogözenekli membranların da, üreme alanının ve pürüzlülüğün artışı nedeniyle çarpaz bağırsız ve gözeneksiz membranlara göre bakteriler için daha avantajlı olduğu söylenebilir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Ahimou F., Paquot M., Jacques P., Thonart P. Rouxhet P.G., 2001, Influence of electrical properties on the evaluation of the surface hydrophobicity of *Bacillus subtilis*, *Journal of Microbiological Methods*, 45, 2 119-126
- Ahimou F., Jacques P., Deleu M., 2000, Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 10, 749-754
- An Y. H., Friedman R. J., 1997, Laboratory methods for studies of bacterial adhesion, *Journal of Microbiological Methods*, 30, 141-152.
- Auschill T. M., Artweiler N. B., Netuschil L., Brex M., Reich E., Sculean A., 2000, Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms, *Archives of Oral Biology*, 46, 471-476.
- Bardouniotis, E., Huddleston W., Ceri H., Olson M. E., 2001, Characterization of biofilm growth and biocide susceptibility testing of *Mycobacterium phlei* using MBEC<sup>®</sup> assay system, *FEMS Microbiology Letters*, 203, 263-27.
- Borchard G., 2001, Chitosans of gene delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52, 145-150.
- Bos R., van der Mei H. C., Busscher H. J., 1999, Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study, *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 2, 179-229.
- Bruinsma G.M., Rustema-Abbing M., van der Mei H.C., Busscher H.J., 2001, Effects of cell surface damage on surface properties and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Microbiological Methods*, 45, 2, 95-101

- Busscher H. J., Weerkamp A. H., Van Der Mei H. C., Van Steenberghe D., Quirynen M., Pratt I. H., Marechal M., Rouxhet P. G., 1989, Physico-Chemical properties of oral Streptococcal cell surfaces and their relation with adhesion to solid substrata in vitro and in vivo, *Colloids and Surfaces*, 42, 345-353.
- Chatelet C., Damour O., Domard A., 2001, Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films, *Biomaterials*, 22, 261-268.
- Chen S., Wu G., Zeng H., 2005, Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag<sup>+</sup> complex, *Carbohydrate Polymers*, 60, 33-38.
- Cheng, M., deng J., Yang F., Gong Y., Zhao N., Zhang X., 2003, Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions, *Biomaterials*, 24, 2871-2880
- Chou T. C., Fu E., Shen E. C., 2003, Chitosan inhibits prostaglandin E<sub>2</sub> formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308, 403-407.
- Clint J. H., Wicks A. C., 2001, Adhesion under water: surface energy considerations, *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 21, 267-273.
- Costerton J. W., Stewart P. S., Greenberg E. P., 1999, Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 318-322.
- Cunliffe D., Smart C. A., Tsibouklis J., Young S., Alexander C., Vulfson E. N., 2000, Bacterial adsorption to thermoresponsive polymer surfaces, *Biotechnology Letters*, 22, 141-145.

- Denkbas E. B., Seyyal M., Pişkin E., 200, Implantable 5-fluorouracil loaded chitosan scaffolds prepared by wet spinning, *Journal of Membrane Science*, 172, 33-38.
- Du Y., Liu H., wang X., Sun L., 2004, Chitosan kills bacteria through cell membrane damage, *Int. Journ. of Food Microbiology*, 95, 147-155.
- Fallgren M., Lundberg F., Tegenfeldt J. O., Montelius L., Ljungh, A., Quantitation of bacterial adhesion to polymer surfaces by bioluminescence, 1998, *Zentralblatt für Bacteriologie: International Journal of Medical Microbiology*, 287, 1-2, 7-18.
- Franssen O., Stenekes R. J. H., Hennink W. E., 1999, Controlled release of a model protein from enzymatically degrading dextran microspheres, *Journal of Controlled Release*, 59, 219-228.
- Fu J., Ji J., Yuan W., Shen J., Construction of anti-adhesive and antibacterial multilayer films via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan.
- Gibbons R. J., The role of polysaccharide glycocalyx formation on the teeth by *Streptococcus mutans*, *Sci. Am.* 238, 86.
- Gumusderelioglu M. K., Pesmen A., 1996, Microbial adhesion to ionogenic PHEMA, PU and PP implants, *Biomaterials*, 17, 443-449.
- Gusils C., Cuozzo S., Sesma F., Gonzalez S., 2002, Examination of adhesive determinants in three species of *Lactobacillus* isolated from chicken, *Can. J. Microbiol.*, 48, 34-42.
- Hirano, S., Yamaguchi, R., Fukui, N., Iwata, M., 1991, Biological gels: the gelation of chitosan and chitin, In *Biotech. Polym.*, Plenum, New York.
- Hoffman A. S., 2002, Hydrogels of biomedical applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 43, 3-12

- Honda H., Kawabe A., Shinkai M., Kobayashi T., 1999, Recovery of recombinant *Escherichia coli* by chitosan-conjugated magnetite, *Biochemical Engineering Journal*, 3, 157-160.
- Houldt R. V., Michiels C. W., 2005, Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation, *Research in Microbiology*, 156, 626-633.
- Jefferson K. K., 2004, What drives bacteria to produce a biofilm?, *FEMS Microbiology letters*, 236, 163-173.
- Karakeçili A. G., 1995, Polimerik Yüzeylerde Biyofilm Oluşum Mekanizmasının İncelenmesi ve Biyotıp Uygulamaları için Uygun Materyal Dizaynı, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kast C. E., Frick W., Losert U., Bernkop-Schnürch A., 2003, Chitosan-thioglycolic acid conjugate: a new scaffold material for tissue engineering?, *International Journal of Pharmaceutics*, 256, 183-189.
- Khor E., Lim L. Y., 2003, Implantable applications of chitin and chitosan, *Biomaterials*, 24, 2339-2349.
- Klein J. D., Clapp A., R., Dickinson R. B., 2003, Direct measurement of interaction forces between a single bacterium and a flat plate, *Journal of Colloid and Interface Science*, 261, 379-385.
- Krajewska B., 2004, Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials, *Separation and Purification Technology*.
- Kunz R., Determination of the number and detection of viable microorganisms in a sample, *Principles for the reduction of bacterial adhesion*
- Larson E. L., Aiello A. E., Gomez-Duarte C., Lin S. X., Lee L., Della-Latta P., Lindhardt C., 2003, Bioluminescence ATP monitoring as a surrogate

marker for microbial load on hands and surfaces in the home, *Food Microbiology*, 20, 735-739.

Lehtola M. J., Miettinen I. T., Keinänen M. M., Kekki T. K., Laine O., Arja Hirvonen, Vartiainen T., Martikainen P. J., 2004, Microbiology, chemistry and biofilm development in a pilot drinking water distribution system with copper and plastic pipes, *Water Research*, 38, 17, 3769-3779

Lewandowski Z., 2000, Notes on biofilm porosity, *Wat. Res.* 34, 9, 2620-2624.

Li J., McLandsborough L. A., 1999, The effects of the surface charge and hydrophobicity of *Escherichia coli* on its adhesion to beef muscle, *International Journal of Food Microbiology*, 53, 185-193.

Lin A. S. P., Barrows T. H., Guldberg R. E., 2001, Manufacture and Characterization of Novel 3D porous scaffolds for bone tissue engineering, *Bioengineering Conference ASME 2001*, 203-204.

Ljungh A., Lundberg F., 1998, Bacterial Adhesion to Biomaterials, *New Biomaterial Materials*, 105-119.

Ma J., Wang H., Binglin H., Jiatong C., 2001, A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts, *Biomaterials* 22, 331-336.

Mack D., Becker P., Chatterjee I., Dobinsky S., Knobloch J. K. M., Peters G., Rohde H., Heerrmann M., 2004, Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses, *International Journal of Medical Microbiology*, 294, 203-212.

Madhally S. V., Matthew H. W. T., 1999, Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, *Biomaterials*, 20, 1133-1142.

- Majeti N. V., Kumar R., 2000, A review of chitin and chitosan applications, *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Mei H. C., Bos R., Busscher H. J., 1998, A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 11, 4, 213-221
- Mikos A. G., Temenoff J. S., 2000, Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *EJB Electronic Journal of Biotechnology*, 3, 2, 1-6.
- Mogilnaya O. A., Krylova T. Y., Popova L. Y., 2003, Development and morphological features of biofilms formed by transgenic and wild type strains of *Bacillus subtilis*, *Microbiol. Res.*, 158, 327-335.
- Mueller R. F., Bacterial Transport and colonization in low nutrient environments, 1996, *Wat. Res.*, 30, 11, 2681-2690.
- Niza-Riberiro J, Louza A. C., Santos P., Lima M., 2000, Monitoring the microbiological quality of raw milk through the use of an ATP bioluminescence method, *Food Control*, 11, 209-216.
- Orsello C. E., Lauffenburger D. A., Hammer D. A., 2001, Molecular properties in cell adhesion: a physical and engineering perspective, *Trends in Biotechnology*, 19, 8, 310-316.
- Osiro D., Colnago L. A., Otoboni A. M. M. B., Lemos E. G. M., de Souza A. A., Filho H. D. C., Machado M. A., 2004, A kinetic model for *Xylella* fast adhesion, biofilm formation, and virulence, *FEMS Microbiology Letters*, 236, 313-318.
- Parker J., Martinko J. M., Madigan M. T., 2000, *Brock - Biology of Microbiology*, Prentice Hall, p.646-647.



- Poulsen L. V., 1999, Microbial Biofilm in Food Processing, *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 32, 321-326
- Qiu Y., Park K., 2001, Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53, 321-339.
- Rasmussen K., Ostgaard K., 2003, Adhesion of the marine bacterium *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 to different hydrogel surfaces, *water Research*, 37, 519-524.
- Rijnaarts H. H. M., Norde W., Bouwer E. J., Lyklema J., Zehnder A. J. B., 1995, Reversibility and mechanism of bacterial adhesion, *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces*, 4, 5-22.
- Ruckenstein, E., Zeng, X., 1996, Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 35, 4169-4175.
- Sakakibara T., Murakami S., Imai K., 2003, Enumeration of bacterial cell numbers by amplified firefly bioluminescence without cultivation, *Analytica Biochemistry*, 312, 48-56.
- Schneider R. P., 1996, Conditioning Film-Induced Modification of Substratum Physicochemistry-Analysis by contact angles, *Journal of Colloid and Interface science*, 182, 204-213.
- Shirtliff M. E., Mader J. T., Carper A. K., 2002, Molecular Interactions in biofilms, *Chemistry & Biology*, 9, 859-871.
- Singh D. K., Ray A. R., 2000, Biomedical applications of chitin, chitosan and their derivatives, *J.M.S.-Rev.Macromol. Chem. Phys.*, C40(1), 69-83.

- Speranza G., Gottardi G., Lunelli L., Canteri R., Pasquardini L., Carli E., Lui A., Maniglio D., Brugnara M., Anderle M., 2004, Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces, *Biomaterials*, 25, 2029-2037.
- Squirrell D. J., Price R. L., Murphy M. J., 2002, Rapid and specific detection of bacteria using bioluminescence, *Analytica Chimica Acta*, 457, 109-114.
- Stephens C., 2002, Microbiology: Breaking down biofilms, *Current Biology*, 12, 132-134.
- Stewart P. S., 2001, Multicellular resistance: biofilms, *Trends in Microbiology*, 9, 5.
- Stewart P. S., Costerton J. W., 2001, Antibiotic resistance of bacteria in biofilms, *The Lancet*, 358, 135-138.
- Somashekar D., Joseph R., 1996, Chitosanases-Properties and applications: a review, *Biosource Technology*, 55, 35-45.
- Suh J. K. F., Matthew H. W. T., 2000, Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering; a review, *Biomaterials*, 21, 2589-2598.
- Svensater G., Welin J., Wilkints J. C., Beighton D., Hamilton I. R., 2001, Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*, *FEMS Microbiology Letters*, 205, 139-146.
- Tharanathan, R.N., Kittur, F.S., Prashanth, K.V.H., 2002, Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions, *Carboh. Poly.*, 50, 27-33.
- Tsuneda S., Aikawa H., Hayashi H., Yuasa A., Hirata A., 2003, Extracellular polymeric substance responsible for bacterial adhesion onto solid surface, *FEMS Microbiology Letters*, 223, 287-292.

- Tsuno H., Hidaka T., Nishimura F., 2002, A simple biofilm model of bacterial competition for attached surface, *Water Research*, 36, 996-1006.
- Tomihata K., Ikada Y., 1997, In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives, *Biomaterials*, 18, 567-575.
- Ukuku D. O., Fett W. F., 2002, Relationship of cell surface charge and hydrophobicity to strength of attachment of bacteria to cantaloupe rind, *Journal of food protection*, 65, 7, 1093-1099.
- Varum K. M., Myhr M. M., Hjerde R. J. N., Smidsrod O., 1997, In vitro degradation rated of partially N-acetylated chitosans in human serum, *Carbohydrate Research*, 299, 99-101.
- Wei, Y.C., Hudson, S.M., Mayer, J.M., Kaplan, D.L., 1992, The crosslinking of chitosan fibers, *J. Polym. Sci.*, 30, 2187.
- Williams D. F., 1996, Introduction: Implantable materials and infection, *Injury*, 27, 3, 1-4.
- Won W., Feng X., Lawless D., 2003, Separation of dimethyl Carbonate/methanol/water mixtures by pervaporation using crosslinked chitosan membranes, *Separation and Purification Technology*, 31, 2, 1, 129-140
- Xie W., Xu P., Wang W., Liu Q., 2002, Preparation and antibacterial activity of a water-soluble chitosan derivative, *Carbohydrate Polymers*, 50, 35-40.
- Yalpani M., Pantaleone D., 1994, An examination of the unusual susceptibilities of aminoglycans to enzymatic hydrolysis, *Carbohydrate Research*, 256, 159-175.

- Yamaguchi I., Itoh S., Suzuki M., Sakane M., Osaka A., Tanaka J., 2003, The chitosan prepared from cab tendon I: the characterization and the mechanical properties, *Biomaterials*, 24, 2031-2036.
- Yang T. C, Chou C. C., Li C. F., 2005, Antibacterial activity of N-alkylated disaccharide chitosan derivatives, *International Journal of Food Microbiology*, 97, 237-245.
- Zhang H., Neau S. H., 2001, In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation, *Biomaterials* 22, 1653-1658.
- Zhang H., Neau S. H., 2002, In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents, *Biomaterials* 23, 2761-2766.

## EKLER

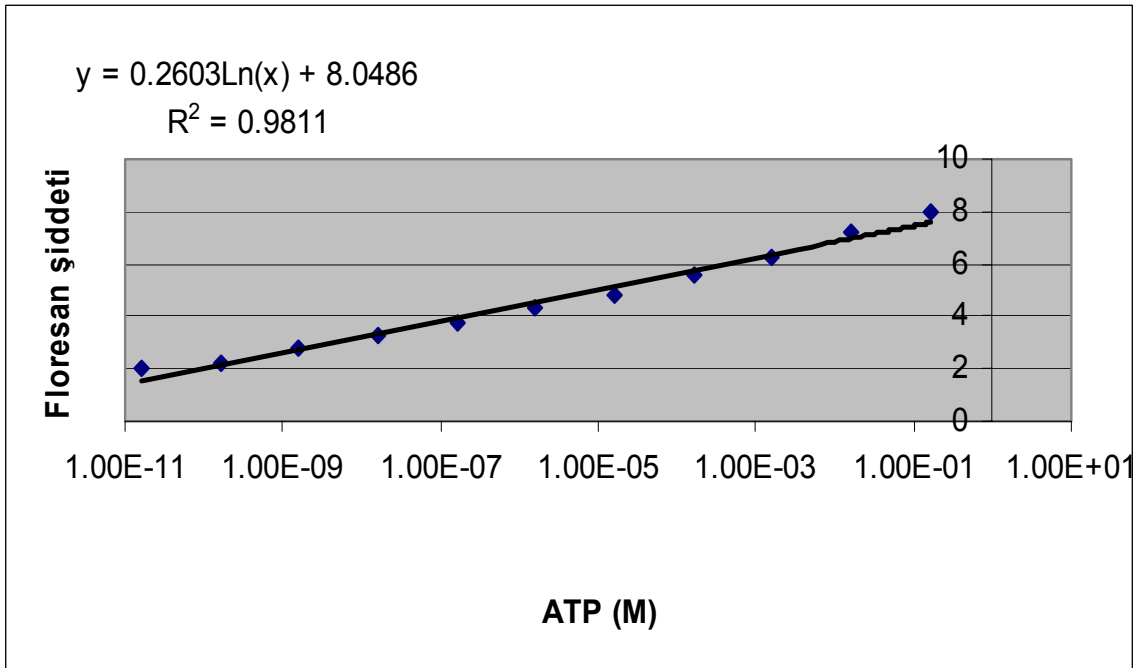
### EK 1

#### KALİBRASYON GRAFİKLERİ

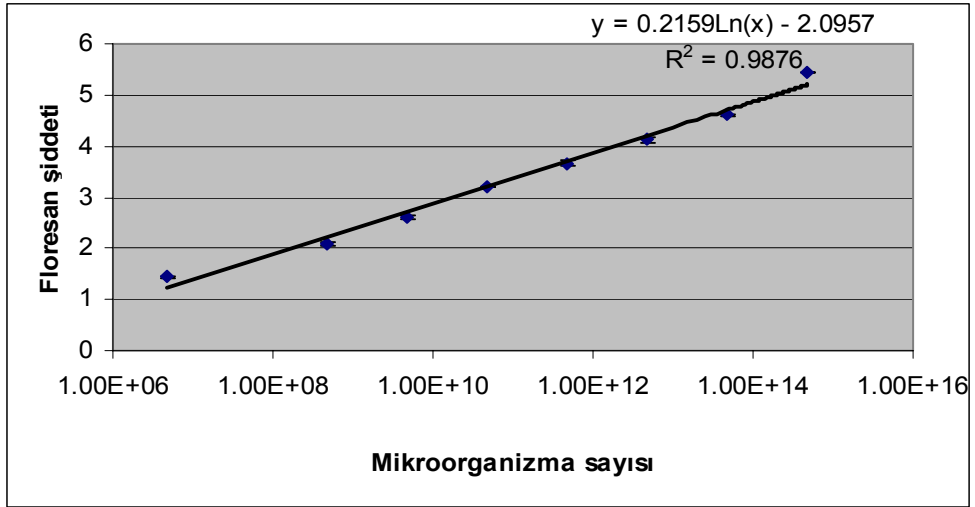
##### ATP Biyoluminesans Kalibrasyonu

Polimerik yüzey-mikroorganizma etkileşimi ve biyofilm oluşumunun incelenmesi amacıyla hazırlanmış kalibrasyon grafikleri, doğru denklemleri ile birlikte aşağıda verilmiştir.

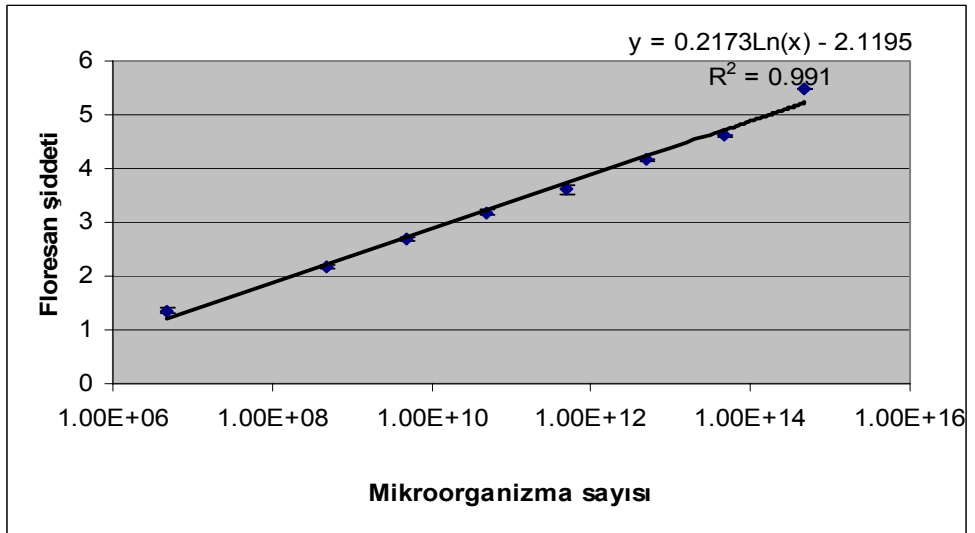
##### ATP kalibrasyonu



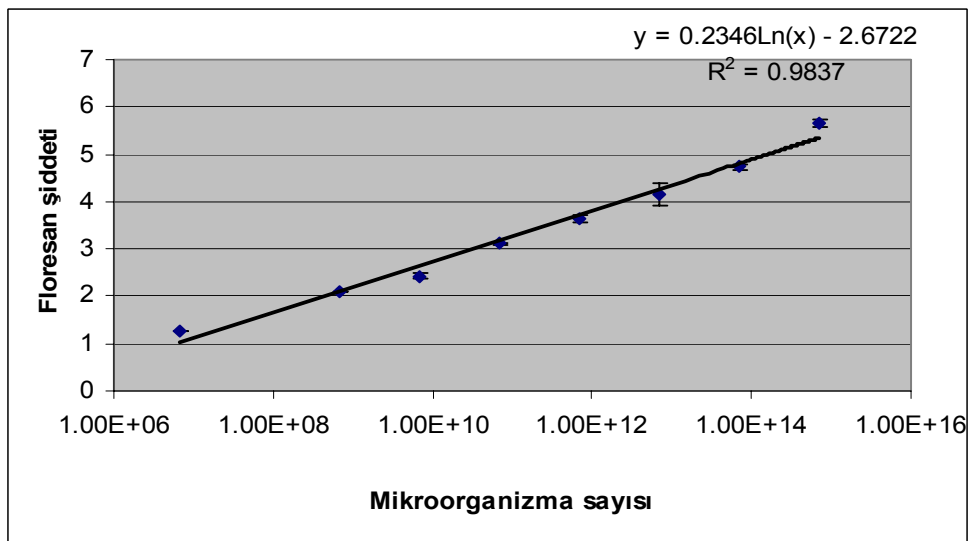
### ***E.coli***



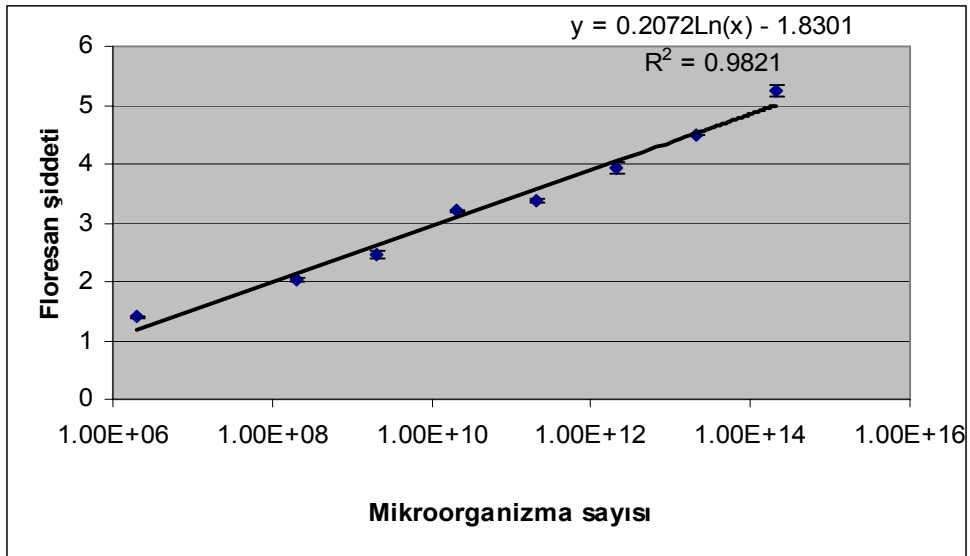
### ***S.epidermidis***



### ***B.subtilis***

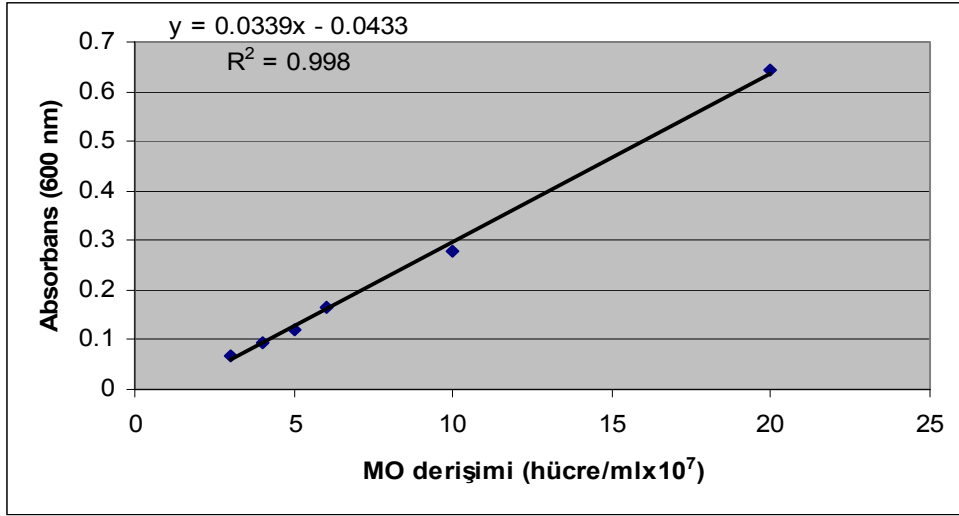


***P.aeruginosa***

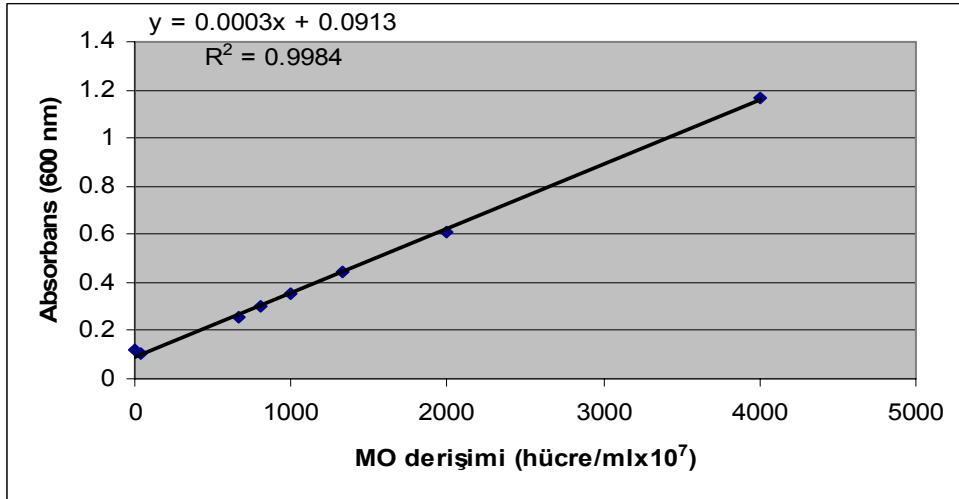


## Optik Yoğunluk için Kalibrasyon Grafikleri

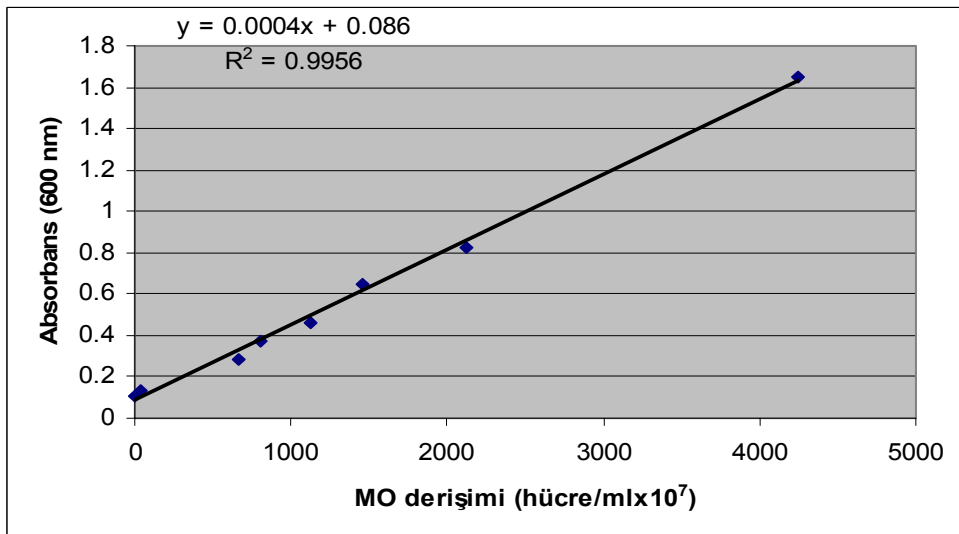
### *P.aeruginosa*



### *E.coli*

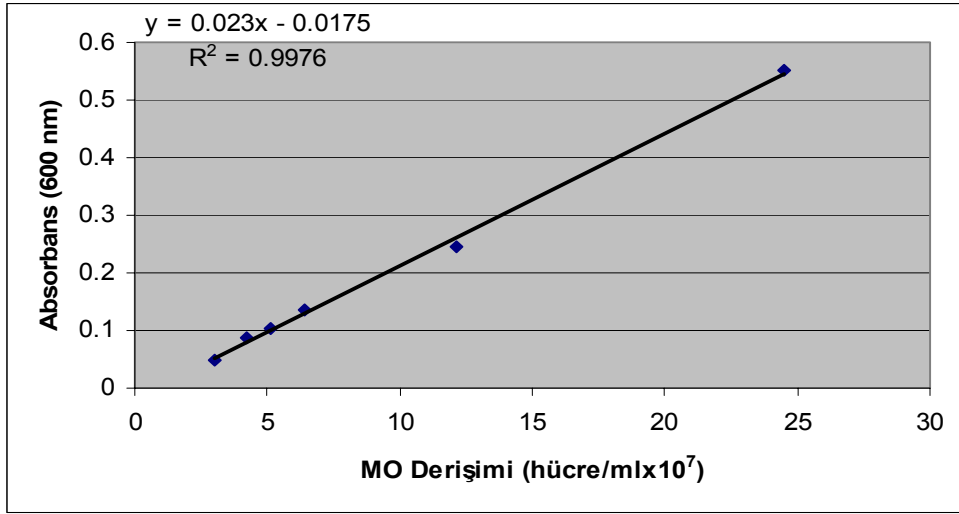


### *S.epidermidis*





## ***B.subtilis***



## EK 2

Kitosan membranlarda 3 farklı yöntem ile saptanan mikroorganizma yapışma kinetiğinin karşılaştırması.

a) Sayısal yapışma değerleri b) Yüzde yapışma değerleri cinsinden karşılaştırma.

<b>Bakteri</b>	<b>Zaman(saat)</b>	<b>OD</b>	<b>CFU</b>	<b>ATP</b>
<b>Çapraz bağımsız, gözeneksiz kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	4.13E+06	5.50E+07	1.08E+07
	7	5.88E+07	7.43E+07	3.30E+07
	24	5.99E+07	7.97E+07	4.44E+07
<i>S.epidermidis</i>	1	9.00E+05	2.67E+06	6.86E+06
	7	3.99E+07	4.93E+07	3.35E+07
	24	5.07E+07	5.73E+07	4.65E+07
<i>B.subtilis</i>	1	5.86E+07	2.40E+07	2.32E+07
	7	9.59E+07	8.27E+07	8.25E+07
	24	1.04E+08	1.09E+08	9.03E+07
<i>P.aeruginosa</i>	1	1.24E+07	2.33E+06	1.16E+07
	7	5.20E+07	5.43E+07	4.64E+07
	24	6.44E+07	5.97E+07	5.57E+07
<b>ECH çapraz bağlı, gözeneksiz kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	1.12E+07	1.97E+07	6.37E+06
	7	3.63E+07	4.87E+07	3.13E+07
	24	4.37E+07	5.50E+07	4.03E+07
<i>S.epidermidis</i>	1	3.21E+06	4.00E+06	8.19E+06
	7	4.54E+07	4.77E+07	3.69E+07
	24	5.37E+07	5.53E+07	4.23E+07
<i>B.subtilis</i>	1	2.69E+07	1.97E+07	2.80E+07
	7	8.13E+07	6.80E+07	6.58E+07
	24	9.09E+07	7.07E+07	9.19E+07
<i>P.aeruginosa</i>	1	4.22E+06	8.33E+06	1.43E+07
	7	4.31E+07	4.83E+07	5.11E+07
	24	4.64E+07	5.17E+07	5.60E+07
<b>15-40 µm gözenekli çapraz bağımsız kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	1.63E+07	2.23E+07	8.14E+06
	7	5.08E+07	4.70E+07	6.24E+07
	24	5.99E+07	5.77E+07	6.94E+07
<i>S.epidermidis</i>	1	7.05E+06	5.10E+07	1.40E+07
	7	5.61E+07	6.83E+07	5.64E+07
	24	7.01E+07	7.67E+07	6.84E+07
<i>B.subtilis</i>	1	1.46E+07	1.33E+07	3.44E+07
	7	5.39E+07	6.97E+07	1.09E+08
	24	7.73E+07	9.70E+07	1.17E+08
<i>P.aeruginosa</i>	1	1.39E+07	4.57E+07	4.13E+05
	7	6.19E+07	7.10E+07	2.43E+06

<b>15-40 µm gözenekli ECH çapraz bağlı kitosan</b>	24	6.68E+07	8.20E+07	1.31E+06
<i>E.coli</i>	1	6.11E+06	7.33E+06	9.88E+06
	7	4.19E+07	4.53E+07	5.86E+07
	24	4.99E+07	5.00E+07	6.61E+07
<i>S.epidermidis</i>	1	3.04E+07	4.70E+07	1.41E+07
	7	5.99E+07	6.87E+07	5.51E+07
	24	7.17E+07	7.53E+07	6.71E+07
<i>B.subtilis</i>	1	3.86E+07	2.40E+07	2.60E+07
	7	1.09E+08	7.23E+07	9.69E+07
	24	1.33E+08	9.67E+07	1.13E+08
<i>P.aeruginosa</i>	1	1.08E+07	1.57E+07	9.39E+06
	7	5.74E+07	5.50E+07	6.20E+07
	24	7.88E+07	6.27E+07	7.19E+07
<b>80-120 µm gözenekli çapraz bağısız kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	0.00E+00	2.73E+07	9.88E+06
	7	6.22E+06	6.30E+07	5.62E+07
	24	5.78E+07	6.87E+07	7.86E+07
<i>S.epidermidis</i>	1	3.21E+06	2.40E+07	1.82E+07
	7	6.73E+07	7.07E+07	4.95E+07
	24	7.40E+07	7.30E+07	7.14E+07
<i>B.subtilis</i>	1	2.36E+07	7.50E+07	1.50E+07
	7	9.69E+07	1.22E+08	7.88E+07
	24	1.32E+08	1.30E+08	1.27E+08
<i>P.aeruginosa</i>	1	1.04E+07	2.03E+07	7.77E+06
	7	5.73E+07	6.70E+07	6.27E+07
	24	7.93E+07	7.53E+07	7.99E+07
<b>80-120 µm gözenekli ECH çapraz bağlı kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	1.78E+06	2.17E+07	1.30E+07
	7	2.44E+07	5.90E+07	6.43E+07
	24	5.53E+07	6.23E+07	7.84E+07
<i>S.epidermidis</i>	1	2.39E+07	2.10E+07	8.46E+06
	7	6.77E+07	5.00E+07	5.33E+07
	24	7.29E+07	5.77E+07	7.37E+07
<i>B.subtilis</i>	1	7.58E+06	7.53E+07	3.82E+07
	7	9.23E+07	1.17E+08	9.85E+07
	24	1.49E+08	1.24E+08	1.26E+08
<i>P.aeruginosa</i>	1	1.27E+07	1.77E+07	1.30E+07
	7	4.73E+07	6.50E+07	5.33E+07
	24	7.71E+07	6.83E+07	7.94E+07

(a)

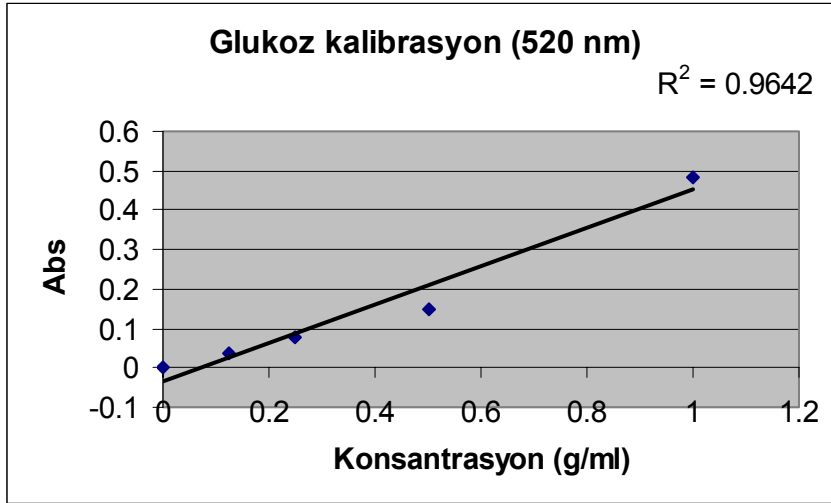
<b>Bakteri</b>	<b>Zaman(saat)</b>	<b>OD %</b>	<b>CFU %</b>	<b>ATP %</b>
<b>Gözeneksiz, çapraz bağımsız kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	2.70	35.95	7.08
	7	38.43	48.58	21.54
	24	39.16	52.07	29.04
<i>S.epidermidis</i>	1	0.64	1.88	4.83
	7	28.20	34.74	23.60
	24	35.79	40.38	32.76
<i>B.subtilis</i>	1	24.96	11.21	10.82
	7	40.86	38.63	38.55
	24	44.41	51.09	42.22
<i>P.aeruginosa</i>	1	10.28	1.63	9.57
	7	42.98	38.00	38.33
	24	53.26	41.72	46.02
<b>ECH çapraz bağı, gözeneksiz kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	7.32	15.73	4.16
	7	23.70	38.93	20.43
	24	28.58	44.00	26.33
<i>S.epidermidis</i>	1	2.26	3.31	5.77
	7	32.04	39.50	26.02
	24	37.91	45.86	29.80
<i>B.subtilis</i>	1	11.47	9.19	13.07
	7	34.61	31.78	30.74
	24	38.73	33.02	42.93
<i>P.aeruginosa</i>	1	3.50	6.89	11.85
	7	35.73	39.94	42.25
	24	38.49	42.70	46.27
<b>15-40 µm gözenekli çapraz bağımsız kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	13.07	17.87	5.32
	7	40.62	37.60	40.76
	24	47.91	46.13	45.33
<i>S.epidermidis</i>	1	4.98	35.92	9.84
	7	39.50	48.12	39.70
	24	49.37	53.99	48.17
<i>B.subtilis</i>	1	6.21	6.23	16.05
	7	22.97	32.55	50.73
	24	32.91	45.33	54.81
<i>P.aeruginosa</i>	1	11.48	37.74	8.24
	7	51.15	58.68	55.12
	24	55.19	67.77	62.90
<b>15-40 µm gözenekli ECH çapraz bağı kitosan</b>				

<i>E.coli</i>	1	4.89	5.87	6.46
	7	33.51	36.27	38.30
	24	39.91	40.00	43.23
<i>S.epidermidis</i>	1	21.46	33.10	9.94
	7	42.29	48.36	38.80
	24	50.66	53.05	47.26
<i>B.subtilis</i>	1	16.44	11.21	12.14
	7	46.25	33.80	45.28
	24	56.76	45.17	52.91
<i>P.aeruginosa</i>	1	8.91	12.95	7.76
	7	47.47	45.45	51.24
	24	65.11	51.79	59.40
<b>80-120 µm gözenekli çapraz bağırsız kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	0.00	22.65	6.46
	7	5.16	52.21	36.72
	24	47.51	56.91	51.38
<i>S.epidermidis</i>	1	5.52	19.89	12.82
	7	47.50	58.56	34.83
	24	52.28	60.50	50.30
<i>B.subtilis</i>	1	9.48	35.05	7.01
	7	41.29	57.01	36.84
	24	56.34	60.59	59.55
<i>P.aeruginosa</i>	1	7.73	16.85	6.42
	7	47.51	55.52	51.83
	24	65.75	62.43	66.05
<b>80-120 µm gözenekli ECH çapraz bağlı kitosan</b>				
<i>E.coli</i>	1	1.10	17.96	8.51
	7	20.26	48.90	42.00
	24	45.86	51.66	51.22
<i>S.epidermidis</i>	1	20.14	17.40	5.96
	7	47.79	41.44	37.53
	24	51.49	47.79	51.93
<i>B.subtilis</i>	1	5.64	35.20	17.83
	7	39.30	54.67	46.03
	24	63.29	57.79	59.04
<i>P.aeruginosa</i>	1	10.50	14.64	10.76
	7	39.23	53.87	44.03
	24	63.90	56.63	65.64

(b)

### EK 3

#### Glukoz Kalibrasyonu



## **ÖZGEÇMİŞ**

**Adı Soyadı** : Müge DAŞTAN

**Doğum Yeri** : Oldenburg / Almanya

**Doğum Tarihi**: 1979

**Medeni Hali** : Bekar

### **Eğitim ve Akademik Durumu:**

**Lise** : 1996-1998, H.Halit Erkut Lisesi

**Lisans** : 1999-2003, Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

**Yabancı Dil** : İngilizce, Almanca

**İş Tecrübesi** : 2003- , Pfizer İlaçları Ltd. Şti. Klinik Araştırmalar Monitörü