ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOSENTEZLENEN GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN ANTİBİYOTİK İLE KLİNİK İZOLATLARA KARŞI KOMBİNASYON ETKİSİ

Abdullah Abdulkareem AHMED AL-OBAIDI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Abdullah Abdulkareem AHMED AL-OBAIDI tarafından hazırlanan "Biyosentezlenen Gümüş Nano Partiküllerin Antibiyotik İle Klinik İzolatlara Karşı Kombinasyon Etkisi" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Jüri Üyeleri:

Başkan **:** Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi,
Botanik Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Mine TÜRKTAŞ ERKEN
Gazi Üniversitesi,
Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Biyosentezlenen Gümüş Nano Partiküllerin Antibiyotik İle Klinik İzolatlara Karşı Kombinasyon Etkisi"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.
(07/07/2021).

Abdullah Abdulkareem AHMED AL-OBAIDI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BİYOSENTEZLENEN GÜMÜŞ NANO PARTİKÜLLERİN ANTİBİYOTİK İLE KLİNİK İZOLATLARA KARŞI KOMBİNASYON ETKİSİ

Abdullah Abdulkareem AHMED AL-OBAIDI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Dr. Marwa Hameed ALKHAFAJI

Temmuz 2020'den Eylül 2020'ye kadar, iki çevresel numuneye (toprak) ek olarak, yüz adet numune Bağdat Eğitim Laboratuvarlarındaki hastalarından klinik ve marketlerden gıda numunesi olarak toplandı. Klinik ve çevresel örneklerden elde edilen bakteri izolatı Vitek 2 Sistemi tarafından tanımlanmış ve 100 gıda ve klinik örnekten 50'sinde (%68,8) *Klebsiella pnieumonae* izolatı olduğu görülmüştür ve en yüksek oranda izolat, yanık örneklerinden 26 (%52) elde edilmiştir. *P. aeruginosa* izolatları (n=206) kullanılan 11 antimikrobiyal ajana karşı farklı duyarlılık göstermiştir. Amoksklavulanat'a yaklaşık (%45), Piperasilin'e (%73,12), Aminoglikozidler'e (%75,63), Florokinolonlar'a (%68,87), Seftriakson'a (%80,06), Cefoperazone'e (%53,33), imipenem'e (%13,70), Nitrofurantion'a (%56,13), Co.trimoksazoleye (%100), Tetrasiklin'e (%98,37), levofloksasin'e (%94) ve Seftazidimeye karşı (%76,09) direnç göstermiştir. Çevresel *Klebsiella pnieumonae* izolatı AgNP'lerin üretimi için kullanılmıştır. Gümüş nanopartiküller; UV-Vis Spektroskopisi, Atomik kuvvet mikroskobu (AFM), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Fourier-dönüşüm kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi kullanılarak karakterize edilmiştir. Klinik ve gıda kaynaklı Klebsiella izolatları cam yüzey, tüp yöntemi veya Christensen's üzerinde biyofilm oluşturmak üzere test edilmiştir ve sonuçlar 6 klinik izolatın (%66,66) biyofilm üreticisi olduğunu, on sekiz gıda kökenli izolattan 10 izolatın (%52,38) cam yüzeye yapışık biyofilm ürettiğini göstermiştir. Gıda kaynaklı bir *Klebsiella* izolatı, PH 6 ve 37ºC'de hücre dışı (hücresiz süpernatan) bakteri kültürleri kullanılarak AgNP üretimi için taranmıştır. AgNP oluşumu için birincil görüş, reaksiyon karışımının renginin (soluk sarıdan koyu kaşa) değişmesiydi. Renkteki bu değişiklik, çentikli gözle fark edilebilir. Renk yoğunluğu arttıkça, AgNP'lerin birikimi artmıştır.

2021, 73 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pnieumonae*, *P. aeruginosa*, Gümüş nanopartiküller

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE COMBINATION EFFECT OF BIOSYNTHESIZED SILVER NANOPARTICLES WITH ANTIBIOTIC AGAINST CLINICAL ISOLATES

Abdullah Abdulkareem AHMED AL-OBAIDI

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Supervisor: Dr. Marwa Hameed ALKHAFAJI

From July-September 2020 one hundred Clinical and food specimens, were collected from markets and patients from Baghdad Teaching Laboratories in addition to two environmental samples (soil). The bacterial isolate from clinical and environmental sample were identified by Vitek 2 System that showed out of 100 food and clinical samples 50 (68.8%) of there were Klebsiella pnieumonae isolates and the highest percentage isolates were obtained from burn samples 26 (52%). The isolates of P. aeruginosa (n=206) showed different susceptibility towards 11 antimicrobial agents used, There were about (45%) resist to Amox- clavulanate, (73.12%) to Piperacillin, (75.63%) to Aminoglycosides, (68.87%) to Fluoroquinolones, (80.06%) to Ceftriaxone, (53.33%) to Cefoperazone, (13.70%) to Imipenem, (56.13%) to Nitrofurantion, (100%) to Co.trimoxazole, (98.37%) to Tetracycline, (94%) to levofloxacin and also about (76.09%) resist to Ceftazidime. An environment Klebsiella pnieumonae isolate was used for production of AgNPs. The silver nanoparticles were Characterized using; UV-Vis Spectroscopy, Atomic force microscope (AFM), Scanning electron microscope (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis. Clinical and food origin Klebsiella isolates were tested to form biofilm on glass surface; tube method or Christensen's, and the results showed that 6 clinical isolates (66.66%) were biofilm producers, while among eighteen food origin isolates; 10 isolates (52.38%) produced biofilm adhered to glass surface. A food-borne Klebsiella isolate were screened for production of AgNPs using their extracellular (cell free supernatant) of bacterial cultures in PH 6 and 37ºC. This alteration in color could be noticed by nicked eye. As the color intensity increased, the accumulation of AgNPs increased.

2021, 73 pages

Key words: *Klebsiella pnieumonae*, *P. aeruginosa*, silver nanoparticles.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışma konumun belirlenmesinde, planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren sayın hocam Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN'a, çalışmalarım anında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan anne ve babama, erkek ve kız kardeşlerime saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım anında manevi desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan arkadaşlarıma saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Abdullah Abdulkareem AHMED AL-OBAIDI

Çankırı, Temmuz 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iii**
ABSTRACT ..... **iii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR İNCELEMESİ **4**
2.1 Enterobakteriler **4**
2.1.1 *Klebsiella pneumoniae* **4**
2.1.2 *K. pneumoniae*'nin virülans faktörleri **4**
2.1.3 Nanopartiküller (NPs) **8**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **18**
3.1 Malzameler **18**
3.1.1 Cihaz ve ekipman **18**
3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler **19**
3.1.3 Kültür ortamı **19**
3.1.4 Çözeltilerin, tamponların ve hazırlanmış medyanın hazırlanması **20**
3.2 Yöntem **21**
3.2.1 Örnekler koleksiyonu **21**
3.2.2 Bakteriyel izolasyon **21**
3.2.3 Bakteriyel tanımlama **22**
3.2.4 Bakteriyel koruma **24**
3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi **24**
3.2.6 Biyofilm üretiminin tespiti **26**
3.2.7 Gümüş nanopartiküllerin (Ag NP'ler) *E. coli* kullanılarak sentezlenmesi **28**
3.2.8 Gümüş nanopartiküllerin biyosentezi için parametrelerin optimizasyonu **29**
3.2.9 Gümüş nanopartiküllerin karakterizasyonu **30**
3.2.10 Biyosentezlenmiş AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesi **31**
3.2.11 AgNP ve seftriakson kombinasyonunun anti-biyofilm etkisi **32**
4. BULGULAR **34**
4.1 Bakteriyel İzolasyon ve Tanımlaması **34**
4.2 Altın Nanopartiküllerin Biyosentezi **37**
4.3 Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu **38**
4.3.1 UV–Vis spektral analizi **38**
4.3.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi **39**
4.3.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi. **40**
4.3.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) **41**
4.4 AuNP'lerin Biyosentezinin Gıda Kaynaklı *C. freundii* ile Optimizasyonu **42**
4.4.1 Hücre filtratının konsantrasyonunun optimizasyonu **42**
4.4.2 Sıcaklık optimizasyonu **44**
4.4.3 pH optimizasyonu **45**
4.4.4 Altın iyon konsantrasyonunun optimizasyonu **47**
4.5 Congo Red Agar Tarafından Biyofilm Üretiminin Tespiti **48**

4.6 Mikrotitre Plakası İle Biyofilm Üretiminin Tespiti 49
4.7 Antibiyotik Duyarlılığı..... 50
4.8 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi 52
4.8.1 Altın nanoparçacığın antibakteriyel aktivitesinin değerlendirilmesi..... 52
4.8.2 Amoksisilin/klavulanatın antibakteriyel aktivitesinin değerlendirilmesi 53
4.8.3 Amoksisilin/klavulanat ile altın nanopartiküllerin, klinik bakteri izolatlarına karşı kombinasyon etkisi. 54
4.9 Biyofilm Dekolmanının Miktar Belirtmesi 56
5. SONUÇLAR 65
KAYNAKLAR…… 66
ÖZGEÇMİŞ..... 73

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
cDNA	: KomplementerDeoksiribonükleikasit
CPS	: Kapsüler polisakkarit
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
İYE	: Gözle görülebilen
LPS	: Lipo polisakkarit
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PCR	: Real Time (Eş zamanlı) PCR
ST	: *Escherichia coli*'de enterotoksin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Gümüş nanopartiküller referansı (Graf *et al.* 2003).....12
Şekil 4.1 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, Citrobacter spp ile, kültürlenmiş diferansiyel medya ve farklı seçici . A. S.S. agar üzerinde siyah merkezli soluk koloniler B. MacConkey agar üzerinde küçük pembe (Laktoz fermenter) koloniler C. EMB'de kahverengi koloniler D. XLD agar üzerinde sarı koloniler.....35
Şekil 4.2 16S rRNA geninin (1500 bp) amplifiye edilmiş PCR ürünleri: Agaroz jel elektroforezi, etidyum bromür lekeli, %1,5 agaroz; 75 voltta 2 saat elektroforez uygulanmış ve ultraviyole trans-aydınlatıcı altında fotoğraflanmıştır. M: DNA moleküler ağırlık markörü (100 bp merdiveni) ve 1: C. freundii'nin (M18) 16SrRNA'sının amplifiye PCR ürünüdür. 36
Şekil 4.3 C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenen altın nanoparçacık çözeltisi: A: Altın tuzu çözeltisi. B: Altın nanoparçacıkların biyosentezinden sonra reaksiyon karışımı. 37
Şekil 4.4 C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenen altın nanoparçacıkların UV–Vis spektrofotometrisidir 38
Şekil 4.5 AFM altında C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenen AuNP'ler...40
Şekil 4.6 C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenen altın nanoparçacıklarının FTIR analizi.. 41
Şekil 4.7 C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenmiş AuNP'ler; SEM altında, küresel şekle ve (30-60) arasında değişen çapa sahiptir. 42
Şekil 4.8 C. freundii (M18) tarafından biyolojik olarak indirgendikten sonra AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; Biyo-indirgemede kullanılan hücresiz süzüntünün farklı dilüsyonlarının (%0-60 dilüsyon) etkisi……..…..43
Şekil 4.9 C. freundii (M18) tarafından biyolojik olarak indirgendikten sonra AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; farklı inkübasyon sıcaklıklarının (30°C, 37°C, 60°C, 80°C ve 100°C) biyo-indirgeme üzerindeki etkisini gösterir.....44
Şekil 4.10 Biyolojik indirgeme C. freundii (M18) sonrasında AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; biyo-indirgemede kullanılan reaksiyon karışımının farklı pH değerlerinin (3, 5, 7 ve 9) etkisini gösterir. 46
Şekil 4.11 C. freundii (M18) tarafından biyolojik olarak indirgendikten sonra AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; Biyo-indirgemede kullanılan farklı altın tuzu konsantrasyonlarının (1-4 mM) etkisi. 47
Şekil 4.12 Klinik izolatları ile Kongo kırmızısı agar kültürü (a) P. aeruginosa (P3) (b) E. coli (E1) (c) S. aureus (S2): Balçık tabakası oluşumundan kaynaklanan koloniler (24 saat 37 °C'de inkübasyon. aerobik olarak)....49
Şekil 4.13 P. aeruginosa, E. coli ve S. aureus klinik izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi. 96 kuyucuklu düz tabanlı polistiren plakalar, 24 saat 37◦C'de çalkalanmadan inkübe edildi. Gözlere bağlı hücreler, %0,1 (a/h) kristal menekşe ile boyandı. 630 nm'de absorpsiyon, biyofilm oluşumunu ölçmek için ölçülmüştür. 49
Şekil 4.14 Klinik izolatların antibiyogram sonuçları: E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus, ...50

Şekil 4.15 Klinik Antibiyotik Duyarlılık Modeli a- E. coli (E2), b- P. aeruginosa (P2), c- S. aureus (S2), (Disc- Difüzyon Metodu)'na göre çeşitli antibiyotiklere karşı izole eder. 51
Şekil 4.16 Doku kültürü plakası yöntemiyle kontrol edilen anti-biyofilm yeteneği; artan konsantrasyonlarda altın nanoparçacıklarının eklenmesinin organizmaların biyofilm oluşturma ve kuyuların yüzeyine bağlanma yeteneklerini azalttığını göstermektedir. Neredeyse tamamlanmış 500 µg/mL altın nanopartiküller, P. aeruginosa, S. aureus ve E. coli tarafından ekzopolisakkarit sentezini inhibe etmiştir. 57
Şekil 4.17 Doku kültürü plakası yöntemiyle kontrol edilen anti-biyofilm yeteneği; artan konsantrasyonlarda antibiyotik eklenmesinin P. aeruginosa , S. aureus ve E. coli'nin biyofilm oluşturma ve kuyuların yüzeyine yapışma yeteneğini azalttığını göstermektedir. 59
Şekil 4.18 E. coli klinik izolatlarına karşı (31ug/mL) AuNP'lerin, (250 ug/mL) AMC antibiyotik ile sinerjistik etkisi.....62
Şekil 4.19 Pseudomonas aeruginosa'nın klinik izolatlarına karşı (15 µg/mL) AuNP'lerin, (500 µg/mL) AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi.....63
Şekil 4.20 Staphylococcus aureus'un klinik izolatlarına karşı AuNP'lerin (15 µg/mL), AMC antibiyotik (250µg/mL) ile sinerjistik etkisi.....63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipmanlar 18
Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler 19
Çizelge 3.3 Bu çalışmada kullanılan kültür ortamı.....20
Çizelge 3.4 NCCL'lere göre inhibisyon bölgelerinin çap yorumlayıcı standartlar…….26
Çizelge 3.5 Biyofilm üretiminin yorumlanması. Optik yoğunluk kesme değeri (ODc) = negatif kontrolün ortalama OD'si + negatif kontrolün 3x standart sapması (SD).....28
Çizelge 4.1 Biyokimyasal testlerin sonucu…….……34
Çizelge 4.2 C. freundii (M18) tarafından Altın Nanoparçacık biyosentezinin Kümülasyon boyutu; AFM tekniği ile ölçülmüştür. 39
Çizelge 4.3 Farklı hücre süzüntü konsantrasyonlarında biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanoparçacıkları; AFM tekniği ile ölçülmüştür.....43
Çizelge 4.4 Farklı sıcaklıklarda biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanopartiküller; AFM tekniği ile ölçülmüştür. 45
Çizelge 4.5 Farklı pH değerlerinde (pH 3 ila pH 9) biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanoparçacıkları; AFM tekniği ile ölçülmüştür.....46
Çizelge 4.6 Farklı altın tuzu konsantrasyonlarında biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanoparçacıkları; AFM tekniği ile ölçülmüştür.....48
Çizelge 4.7 E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus'un klinik izolatlarına karşı AuNP'lerin antibakteriyel aktivitesi…… 52
Çizelge 4.8 E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus'un klinik izolatlarına karşı Amoksisilin/klavulanatın antibakteriyel aktivitesi. 54
Çizelge 4.9 E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus'un klinik izolatlarına karşı AuNP'lerin, AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi. 55
Çizelge 4.10 E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus'un klinik izolatlarının biyofilmine karşı AuNP'lerin etkisi. 58
Çizelge 4.11 E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus klinik izolatlarının biyofilmine karşı AMC antibiyotiğinin etkisi. 60

Çizelge 4.12 E. coli'nin klinik izolatlarına karşı, (31ug/mL) AuNP'lerin, (250ug/mL) AMC antibiyotik ile sinerjistik etkisi. 61
Çizelge 4.13 P. aeruginosa'nın klinik izolatlarının biyofilmine karşı (15 µg/mL) AuNP'lerin, (500 µg/mL) AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi.....61
Çizelge 4.14 Staphylococcus aureus klinik izolatlarının biyofilmine karşı (15 µg/mL) AuNP'lerin, (250 µg/mL) AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi. ..62

1. GİRİŞ

Biyofilm, bir yüzeyde büyüyen ve bir ekzopolisakkarit matrisi içine alınmış bir hücre popülasyonudur. Biyofilmlerin ortadan kaldırılması herkesin bildiği gibi zordur ve birçok inatçı enfeksiyonun kaynağıdır. Antimikrobiyallere karşı bakteriyel biyofilm direncinin doğası, mevcut incelemenin konusudur. *Candida albicans* gibi patojenik maya da inatçı biyofilmler oluşturur ve bu konu yakın zamanda önem kazanacaktır (Baillie and Douglas 1999).

Biyofilm oluşumu ve biyofilm üreten bakteriler hakkında bilgi, ilgili enfeksiyonları yönetmek ve tedavi etmek için gereklidir. Ek olarak, baskın türlerin belirlenmesi için genetik çeşitliliğin belirlenmesi, hastanelerde enfeksiyonun yayılmasını önlemek için yararlı olabilir. İzolatların baskın genotipini bilmek, enfeksiyon kaynağının belirlenmesine, önleyici tedbirlerin uygulanmasına ve enfeksiyon kontrolünün uygulanmasına yardımcı olabilir.

Nanoteknoloji, tıbbi ve klinik ortamlarda olağanüstü gelişmeler başlatmanın eşiğindedir. Aynı zamanda, bakteriyel enfeksiyonları ortadan kaldırmak için umut verici bir yaklaşımdır ve biyomedikal alanda antibakteriyel ajanlar olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bunlar arasında gümüş nanopartiküller (AgNP) iletikenlik, kararlılık, katalitik ve antibakteriyel özellikler dâhil olmak üzere benzersiz özelliklerinden dolayı biyolojide yaygın olarak kullanılan düşük toksisiteli biyouyumlu malzemelerdir. AgNP'ler, bakteriyel biyofilmleri ortadan kaldırmak için ümit verici malzemelerdir. Anti-bakteriyel, anti-fungal, antioksidan ve anti-kanser gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklerinden dolayı özel ilgi çekmektedir.

Direnç, bir mikroorganizmanın yüksek düzeyde bir antimikrobiyal varlığında büyüme yeteneğidir. Kısaca, MIC'in arttığı bir suş dirençlidir. Bu geleneksel kritere göre, biyofilm hücreleri mutlaka artan direnç göstermemektedir. Bazı istisnalar dışında, biyofilm hücreleri geniş bir antimikrobiyal aralığı varlığında planktonik hücrelerden daha iyi büyümemektedir. Bu, biyofilm literatüründeki duyarlılık verilerinin incelenmesinden anlaşılmaktadır (Lewis 2000).

Bununla birlikte, çoğu biyofilm duyarlılık çalışmasında, bir biyofilmin büyüme yeteneği yerine sadece önceden oluşturulmuş bir biyofilmdeki hücrelerin hayatta kalması kaydedilmektedir. Buna göre, rapor edilen "direnç", hücrelerin öldürmeye karşı artan direncini ifade eder. Aslında biyofilmlerin iyi olduğu konu, Cidal antimikrobiyaller tarafından kolayca ortadan kaldırılmamalarıdır. Antimikrobiyallerin biyofilm büyümesini engelleme yetenekleri, biyofilm yoluyla yayılabildiklerini ve hedeflerine karşı normal şekilde hareket edebildiklerini göstermektedir. Öyleyse neden biyofilm hücreleri ölmez? Bu sorunun özü ve çözülmesi gereken konudur.

Klebsiella pneumoniae, ilk olarak 1882'de bilim adamı Carl Friedlander tarafından pnömoniden ölen bir hastanın akciğerinden izole edilen bakteriler için tanımlanmıştır. *Klebsiella pneumoniae*, tüm dünyada hastanelerde ilaca dirençli bir patojen olarak kabul edilen halkın dikkatini çekmeye yol açan halk sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biridir. *Klebsiella pneumoniae*, biyofilm oluşturma kabiliyeti ve enfeksiyon sırasında bağışıklık sisteminden kaçmalarına ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunabilecek tip 1 ve tip 3 fimbria, lipopolisakkarit ve dış zar proteinleri gibi çeşitli virülans faktörlerinin varlığıyla bilinmektedir. İlk kez B-laktama direncin geniş spektrumlu ESBL beta-laktamaz enzimlerinin üretiminden kaynaklandığı ve *Klebsiella pneumonia'nın* kinolonlar gibi tedavi başarısızlığına neden olabilecek diğer antibiyotiklere dirençli olduğu bulunmaktadır. Çoklu ilaç direnci olan *Klebsiella pneumoniae*, daha yüksek ölüm oranı ve daha az tedavi seçeneği ile insan sağlığı için küresel bir tehdit haline gelmektedir. Bu koşullar altında, çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* yalnızca son iki antibakteriyel ürün olan tigesiklin ve kolistin ile tedavi edilebşlmektedir.

Biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zordur, bu nedenle şu anda biyofilm inhibitörleri üzerine araştırma yapılması gerekmektedir. Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) patojenik bakterilere ve ayrıca antibiyotiklere direnç gösteren bakterilere karşı antibakteriyel özelliklere sahip olduğu bilinmektedir.

Gümüş nanopartiküllerin (AgNP) antibakteriyel bir ajan olarak kullanımı, geniş yüzey-hacim oranları ve yüksek reaktiviteleri nedeniyle nispeten yenidir. Nanopartiküller, sulu ve katı ortamda bakteri büyümesinin engellenmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

Gümüş içeren malzemeler tekstil kumaşları üzerindeki mikroorganizmalardan kurtulmak için kullanılabilir (Baseus *et al.* 2007), veya su arıtmak için kullanılabilirler (Chu *et al.* 2005).

Yukarıda gördüğümüz gibi, mikroorganizmalar (bakteriler) yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerle deneysel tedaviye direnç geliştirilmiş ve yüksek morbidite ve mortalite oranlarından sorumlu olduğu belgelenmiştir, bu nedenle nanopartiküllerin kullanımı antibiyotiklere etkili bir alternatif olarak çok gereklidir ve gümüş nanopartiküllerin sentezi adımları takip ederek elde edilmektedir. Sonraki:

1- *Aeruginosa* izolasyonu ve biyokimyasal testler ve Vitek 2 sistemi ile klinik ve çevresel örneklerden tanımlaması.
2- İzolatların antibiyotik duyarlılığı (AST) ve çoklu ilaca dirençli (MDR) izolasyon seçimi çalışması.
3- Optimal koşullar altında çevresel izolasyondan gümüş nanopartiküllerin biyosentezi.
4- Aşağıdakileri kullanarak gümüş nanopartiküllerin özelliklerini incelenmesi: Ultraviyole spektroskopi, atomik kuvvet mikroskobu (AFM), taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve spektroskopi kızılötesi (FTIR).
5- Gümüş nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesinin klinik izolasyon üzerine incelenmesi (in vitro).
6- Gümüş nanopartiküllerin biyofilmler üzerindeki etkisinin incelenmesi.
7- Gümüş nanopartiküllerin in vivo antibakteriyel aktivitesinin incelenmesi.

2. LİTERATÜR İNCELEMESİ

2.1 Enterobakteriler

Gram negatif basillerdir; normalde insanın bağırsak yolunda adapte olur. Bazıları normal floranın bir parçası olarak hareket eder ve tesadüfen hastalıklara neden olurken diğerleri ise insanlar için patojeniktir. Karmaşık bir antijenik yapıya sahipler ve diğer virülans faktörleriyle birlikte çeşitli enzimler ve toksinler üretirlerdir (Brenner *et al.* 2005).

2.1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesidir, koloniler büyüktür ve oldukça mukoiddir. Hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının veya yanık yarası enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Otoimmün hastalığın (ankilozan spondilit), *Klebsiella* enfeksiyonunun olası bir devamı olduğu düşünülmektedir (Muneer 2019), ancak *Klebsiella'*nın virülansı tam olarak anlaşılmamış, ancak antifagositik kapsülü, fagositozu önleyerek enfeksiyonlarda rol oynamaktadır. Demir bağlayıcı bir protein olan aerobaktin ve ß-laktamaz enzimi üretiminin bakterilerin patojenite ve antibiyotik direncine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *Klebsiella*'nın bazı suşları hemaglutinin üretmiştir (mannoza duyarlı bir fenotip olabilir) ve bunlar, İYE'deki bakterilerin patojenitesi ile ilişkili olabilmektedir (Paczosa and Mecsas 2016). İYE'den izole edilen *Klebsiella*'nın %35'inin, İYE'nin iltihaplanma sürecinde önemli bir rol oynayan jelatinaz enzimi ürettiğini göstermektedir.

2.1.2 *K. pneumoniae*'nin virülans faktörleri

K. pneumoniae, patojenle ortak olan ve kapsül antijenleri, adezyon faktörleri, lipopolisakkarit gibi enterotoksin üretimi ve ayrıca serum ve sistem için direnç öldürücü etkinin yanı sıra demir üzerindeki kazanımı (Siderophore) ve hastanelerde kazanılmış enfeksiyonların yayılmasında ana neden olarak kabul edilen antibiyotiklere karşı çoklu

direnci içeren bir dizi virülans faktörüne sahiptir. Enfeksiyon yüzdesi olarak alternatif tedaviler bulmaya yol açan %80 enfeksiyondur.

- **Kapsül**

Kapsül, bakteriyi fagositozdan koruduğu ve bakterileri bakterisidal serum faktörleri ile önlediği için *Klebsiella*'nın virülansının temelini oluşturmaktadır (Podschun and Ullmann 1998). *K. pneumoniae*'nin bazı serotipleri veya kapsüler tipleri, invazif insan enfeksiyon hastalığı ile ilişkilendirilmektedir. Friedländers pnömonisine neden olan izolatlar arasında başka serotipler bulunmakta ve son zamanlarda piyojenik karaciğer apseleri ile ilişkilendirilmektedir (Gundestrup *et al.* 2014). K tipi, sekans tipi (ST) ve virülans gen içeriği arasındaki ilişkiyi incelenmiştir. Son yıllarda, virülans faktörlerini kodlayan birkaç gen, *K. pneumoniae* tanımlanmıştır: plazmid kaynaklı rmpA, mukoid fenotipini düzenler (Yu *et al.* 2007), wcaG, fagositozdan güçlendirilmiş bakteriyel uzaklaşma ile ilişkilidir (Wu *et al.* 2008), kfu demir alımında rol oynar, fimH tip 1 fimbriae'yi kodlar, mrkD tip 3fimbriae'yi kodlar ve cf29A, fimbriyal olmayan yapışma faktörünü kodlar (Brisse *et al.* 2009).

- **Lipopolisakkarit**

Lipopolisakkarit, fagositoza direnmesine yardımcı olan yüzeysel bakteri bileşimlerinden biri olduğu ve tamamlayıcı faktörü aktive etme kabiliyeti ile karakterize edildiği için, özellikle *K. pneumoniae* olmak üzere bakteriyel patojenitede önemli ve temel bir faktördür (Podschun and Ullmann 1998). Bakterileri, ev sahibinin Kompleman Sistemine karşı korumaya katılır. LPS üç bölümden oluşur: bunlar Lipid A, Core polisakkarid ve O antijenidir. Bakterinin öldürmeye karşı direncinden sorumlu olan O antijenidir (Evrard *et al.* 2010). *K. pneumoniae*'nin sekiz serotipi vardır ve serotip O1 ve O2 en yaygın olanlarıdır. *K. pneumoniae* O-antijen eksikliği olan suşlar, toplumdan edinilmiş pnömoni (CPS) mikro organizmayı kompleman öldürmeye karşı korumaktadır (March *et al.* 2013). *K. pneumoniae* serotip O1: K1, serum öldürmeye karşı direnç aktararak ve bakteriyeminin başlamasından sonra iç organlara bakteri

yayılmasını ve kolonizasyonunu teşvik ederek virülansta bir çalışma rolü oynamaktadır (Hsieh *et al.* 2012). İki farklı wa gen kümesi grubu tarafından sentezlenen bu bakteriler tarafından üretilen iki tip çekirdek polisakkarit (Tip I ve Tip II) teşhis edilmektedir (Fresno *et al.* 2007).

- **Dış zar proteinleri**

Enterobacteriaceae ile karakterize edilen dış zar OompA'da bulunan gram negatif bakterilerin önemli proteinlerinden biridir. OmpA, NF-kB-p38- ve p44 / 42- bağımlı yolaklara etki ettiği için hava yolundaki epitel hücrelerinin aktivasyonunu önlemede önemli bir role sahip olan *K. pneumoniae'*deki çekirdek polisakkaritten bağımsızdır ve bu nedenle enflamatuar yanıt yoluyla bu hücrelerin zayıflamasına katılmaktadır (March *et al.* 2011). *Klebsiella pneumoniae* tarafından üretilen önemli bir faktör, eylemi sadece laktamlar gibi antibiyotiklerin ihracı ile sınırlı olmayan, aynı zamanda konakçıdan türetilen antimikrobiyal ajanları ihraç etmek için çalışan dışarı akış pompası AcrAB'nin ifadesidir. AcrAB kaybı, pnömoniye neden olma kabiliyetinin kaybına yol açmaktadır (Padilla *et al.* 2013). Rafal *et al.* (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, Irak hastanelerinde birçok antibiyotiğe karşı geniş direnç gösteren *K. pneumoniae*'nin birden fazla ilaca karşı direnci üzerine, medikal kentinden çeşitli kaynaklardan 100 numunenin alarak 16S-23S rDNA geni ile teşhis konulduğu AcrAB, akış pompaları üzerinde çalışılmıştır. *K. pneumoniae* için 60 izolatın olduğu, ardından akış pompası AcrA geni spesifik bir primer kullanılarak tespit edilmiş ve bu geni üreten 26 izolat olduğu ortaya çıkmıştır.

Sonuçlar, q (RT-PCR) kullanılarak AcrAB-Tolc eflux pompasının gen ekspresyonu üzerinde çalışılarak, gen ekspresyonu ile kloramfenikol konsantrasyonu arasında bir ilişki olduğunu ve aynı genin gen ekspresyonunun Imipenem'e maruz kalmadan bazı farklılıklar ile artarken Amikasin ve Siprofloksasin ekspresyonunda bir azalma gösterdi.

- **Hipermukovkoz fenotip**

Hipermukovizöz fenotipidi, HvKP suşlarının ayırt edici bir faktörüdür. Suşların tamamı olmasa da büyük çoğunluğu toplum kökenli piyojenik karaciğer apselerine (CA-PLA) neden olmamakla birlikte bu fenotipe sahiptir (Yu *et al.* 2007). Mhammadet *et al.* 2013 tarafından yapılan bir çalışmada Bu bakterilerin 46 izolatı için mag viskozite geninin incelenmiş ve 21 pozitif izolat olduğu belirtilmiştir. Viskoziteyi ve mukoz maddeyi düzenlemekten sorumlu genler, üç tip genetik gösterge (rmpA1, rmpA rmpA2) kullanılarak incelenmektedir. Sonuçlar, 21 izolatın rmpA geni içerdiğini, ancak 19 izolatın bu göstergeler rmpA1 ve rmpA2 için pozitif sonuç verdiğini göstermektedir.

- **Endotoksin**

K. pneumoniae'nin ve şimdiye kadar incelenen diğer gram-negatif bakterilerin karakteristik bir özelliği, endotoksin üretmeleridir. Endotoksin, çok sayıda ve çeşitli biyolojik aktiviteye sahip bir lipopolisakkarit (LPS) -protein-fosfolipid kompleksidir.

Virülansta endotoksinin rolü belirsizdir. Çalışmalar, *K. pneumoniae* suşlarının üretilen endotoksin miktarında farklılık gösterdiğini ve bu farklılıkların üretilen düşük moleküler ağırlıklı lipid A miktarı ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Highsmith *et al.* 1984). Endotoksin üretimindeki veya lipit A veya LPS yapısındaki farklılıklar, virülanstaki farklılıklarla ilişkilendirilebilir çünkü lipid A yapısındaki küçük farklılıklar bile endotoksin aktivitesini büyük ölçüde değiştirebilir. Gine domuzlarında pulmoner toksisite, farelerde IP tehdidini takiben letalite veya tavşanlarda pirojenite ile ölçülen LPS'nin biyolojik aktivitesi, LPS'nin kimyasal bileşimine bağlı olarak değişmektedir (Helander *et al.* 1982). Sadece birkaç endotoksin aktivitesi toksin olarak kabul edilmekle birlikte, en önemlileri çeşitli metabolik ve immünolojik yolların aktivasyonu ile sonuçlananlardır. Endotoksin, T hücresinden bağımsız bir antijendir, kemik iliğinden türetilen lenfositler için mitojeniktir ve çeşitli mekanizmalar yoluyla bağışıklık yanıtını aktive edebilir (Morrison and Ulevitch 1978). Lenfositler ve/veya makrofajlar, endotoksine karşı bir dizi farklı ve görünüşte ilgisiz konakçı tepkilerine aracılık etmede

birincil bir rol oynamaktadır (Michalek *et al.* 1980). Endotoksinin yan etkilerine, endotoksin reseptörlerine sahip hücreler aracılık ediyor gibi görünmektedir. Endotoksinin öldürücü etkilerine dirençli olan fareler, B lenfositlerinde, makrofajlarında ve fibroblastlarında, onları endotoksine yanıt veremez hale getiren genel bir kusura sahiptir. Endotoksin, B lenfositlerinin bir poliklonal aktivatörüdür; bununla birlikte, çoğu antijene karşı bağışıklık tepkisinin aksine, endotoksine karşı olanlar T lenfositlerin katılımını gerektirmez. Endotoksin ayrıca in vitro olarak alveolar makrofajlar için sitotoksindir ve fagositoz ve yapışmanın önemli ölçüde inhibisyonuna yol açar. Bu, bazı makrofajların zarında LPS için lektin benzeri bir reseptör bulunması ile açıklanabilmektedir (Pruzzo *et al.* 1980). Bu nedenle endotoksin, konağın hücresel bağışıklık sistemini değiştirebilir ve patofizyolojik değişiklikler üretebilir ve ayrıca bakteriyel tehdit gibi diğer antijenlere karşı bağışıklık tepkisine müdahale edebilir.

Endotoksin ayrıca pıhtılaşma ve tamamlayıcı sistemleri de harekete geçirir. Endotoksin, düz kas kasılmasına, artmış kılcal geçirgenliğe (C3 ve C5), trombositlerin yapışmasına ve degranülasyonuna (C3), kanın pıhtılaşmasına (C6) ve kemotaktik faktörlerin (C3a ve C5a) salınmasına neden olan alternatif yol aracılığıyla tamamlayıcıyı aktive eder (Slack and Snyder 1978). Bu farklı etkiler yoluyla endotoksin, bakterilerin nüfuz etme derecesini ve konağın bakteriye tepkisini derinden etkileyebilir. Bu nedenle, bu farklı tamamlayıcı bileşenlerin aktivasyon derecesi, nihayetinde enfeksiyonun sonucuna katkıda bulunabilir. Virülansta endotoksinin kesin rolü tanımlanmamasına rağmen, laboratuvar sonuçları endotoksin üretiminin reseptörleri ve kapsüler özellikleri belirleyen faktörlerden bağımsız olduğunu göstermektedir. Ayrıca, endotoksin üretiminde belirgin türler arası farklılıklar açıkça mevcuttur (Jarvis *et al.* 1984). Tek başına endotoksin, virülansın son belirleyicisi olmayabilir; bununla birlikte, endotoksinin bağışıklık sistemi üzerindeki etkileri, doğrudan veya dolaylı olarak patojeniteye katkıda bulunabilmektedir.

2.1.3 Nanopartiküller (NPs)

Nanoteknoloji, maddeyi 1 milyar metrenin milyarda biri ölçeğinde (yani 10-9 m = 1 nm) ele alan atomik ve moleküler düzeyde maddenin manipüle edilmesi bilimidir.

NP'lerin boyutla ilgili özellikleri, bilim dünyasındaki çeşitli uygulamalara yönelik sayısız fırsat sunar. Bu alan, mikrodan nano ölçeğe partikül boyutuna sahip nanomateryallere yönelik artan bir taleple bilim dünyasında önemli bir küresel ilgi gördü (Manojkumar *et al.* 2016).

Nanopartiküllerin ve nanomateryallerin yeni kullanımları, boyuta, verilişlerine ve morfolojisine dayalı tamamen yeni veya geliştirilmiş özellikleri nedeniyle çeşitli şekillerde hızla artmaktadır. Sağlık hizmetleri, kozmetik, biyomedikal, gıda ve yem, ilaç-gen dağıtımı, çevre, sağlık, mekanik, optik, kimya endüstrisi, elektronik, uzay endüstrisi, enerji bilimi, kataliz, ışık yayıcılar, tek elektron transistörler, doğrusal olmayan optik cihazlar ve foto-elektrokimyasal uygulamalargibi çok sayıda alanda hızla yenilenme kazanıyor. (Moreno and Castaño 2012).

Bu genişleyen teknolojilerdeki muazzam büyüme, uygulamalı sınırları ve yeni temelleri açmıştır. Nano ölçekli malzemelerin üretimini, daha sonra bunların incelenmesinde veya uygulanmasında gizemli fizikokimyasal ve optoelektronik özellikleridir. (Feng *et al.* 2013).

Nanopartiküllerin boyutu, çoğu biyolojik molekül ve yapınınkine benzer. Bu, onları hem in vivo hem de in vitro biyomedikal araştırmalarda uygulama için ilginç bir aday yapar. Tıp alanına entegrasyonlarının sonucu, özellikle hedefli ilaç verme, görüntüleme, algılama ve yapay implantlarda uygulanmalarına yol açmıştır. Tıpta keşifleri için bir başka ilginç yol, yüksek derecede patojenik ve ilaca dirençli mikropları hedef almak için antimikrobiyal olarak kullanılmasıdır (Liang *et al.* 2008).

- **Nanopartiküllerin Özellikleri**

Nanopartiküllerin temel parametreleri; bunların şekli (uygun olduğunda en-boy oranları dâhil), boyutu ve maddenin morfolojik alt yapısıdır. Nanopartiküller aerosol olarak sunulur (çoğunlukla havada katı veya sıvı faz). Bunlar; süspansiyon (çoğunlukla sıvılarda katı) ve emülsiyon (iki sıvı faz) (Kazeme *et al.* 2016). Kimyasal ajanların (yüzey aktif maddeler) varlığında; yüzey ve arayüz özellikleri değiştirilebilir. Dolaylı

olarak bu tür ajanlar, partikül yükünü koruyarak ve partikülün en dış katmanını değiştirerek pıhtılaşmaya veya toplanmaya karşı stabilize olabilir (Tu and Lee 2014). Büyüme geçmişine ve bir nanopartikülün yaşam süresine bağlı olarak, muhtemelen karmaşık adsorban karışımları içeren çok karmaşık bileşimler beklenmelidir (Lawrence and Rees 2012). Nanopartikül sıvı arayüzünde; polielektrolitler, yüzey özelliklerini ve parçacıklar ile çevreleri arasındaki etkileşimleri değiştirmek için kullanılmıştır. Yapışma, yağlama, stabilizasyon ve koloidal dispersiyonların kontrollü flokülasyonu dahil olmak üzere çok çeşitli teknolojilerde kullanılmıştır (Singh *et al.* 2011). Nanopartiküller genel olarak organik ve inorganik nanopartiküller olmak üzere iki gruba ayrılabilir: organik nanopartiküller karbon nanopartiküller (fullerenler) içerebilirken, bazı inorganik nanopartiküller manyetik nanopartiküller, asil metal nanopartiküller (altın ve gümüş gibi) ve yarı iletken nanopartiküller (titanyum dioksit ve çinko oksit gibi) içerebilir. (Manivasagan *et al.* 2016).

- **Nanopartikül sentez yöntemleri**

Nanopartikül sentezinin yaygın olarak kullanılan fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemlerinden bazıları şunları içerir:

Kimyasal indirgeme: bu, indirgeyici maddeler kullanılarak yüzey aktif maddenin varlığında uygun bir ortamda bir iyonik tuzun indirgenmesidir. Yaygın olarak kullanılan indirgeyici ajanlardan bazıları sodyum borohidrit, hidrazin hidrat, potasyum auro klorat ve sodyum sitrattır (Wang and Peng 2010).

Solvotermal sentez: Basınç altında ve üzerindeki sıcaklıklarda kaynama noktalarında polar çözücülerin kullanıldığı çok yönlü bir düşük sıcaklık yolu olan, solvotermal koşullar altında reaktanların çözünürlüğü önemli ölçüde artar ve reaksiyonun daha düşük sıcaklıkta gerçekleşmesini sağlar (Dunne *et al.* 2015).

Jel tekniği: Bu, bir kimyasal çözeltiden metal oksitlerin imalatı için kullanılan, ayrı parçacıkların veya polimerlerin entegre ağı (jel) için bir öncü görevi gören ıslak bir kimyasal tekniktir. Öncü, istenen şekle sahip uygun bir kap içine dökülen bir film

oluşturmak için substrat üzerine bırakılabilir veya tozları sentezlemek için kullanılabilir (Haldorai *et al.* 2012).

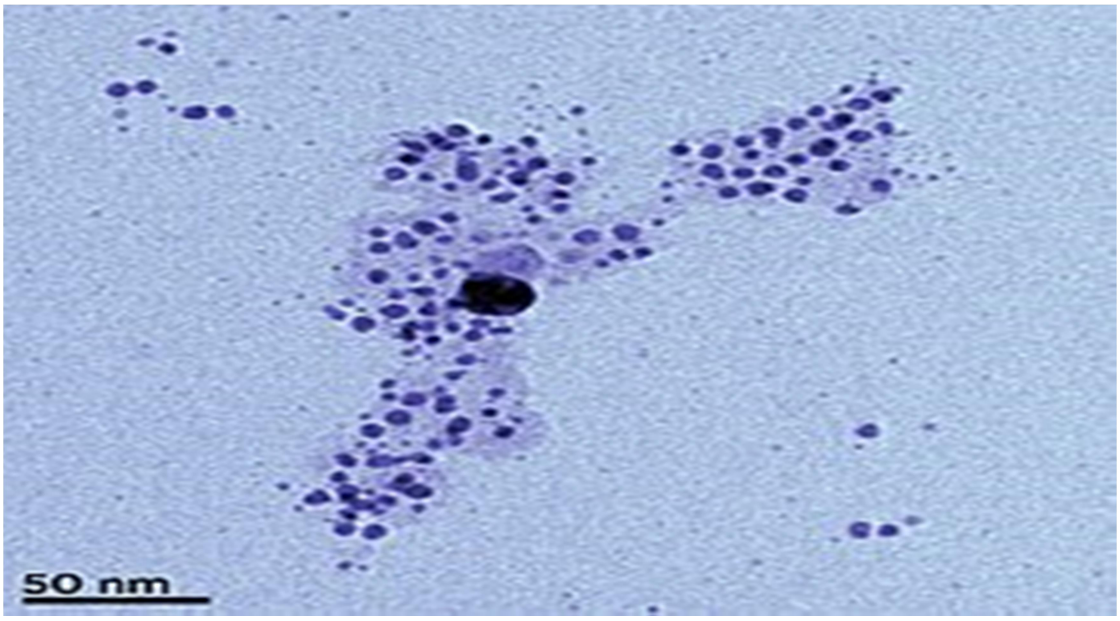
İnert gaz yoğunlaşması: farklı metallerin, tipik birkaç 100 Paskal basınçta helyum veya argon gazı ile doldurulmuş ultra yüksek vakum odası içinde ayrı potalarda buharlaştırıldığı yerler. Bölmedeki gaz atomları ile atomlar arası çarpışmalar sonucunda, buharlaşan metal atomları kinetik enerjilerini kaybederler ve sıvı nitrojen dolu soğuk parmak üzerinde biriken küçük kristaller şeklinde yoğunlaşırlar, örneğin altın nanopartiküller altın tellerden sentezlenmiştir (Heera *et al.* 2015).

Nanopartiküllerin Biyosentezi: Nanopartiküllerin biyosentezine duyulan ihtiyaç, fiziksel ve kimyasal süreçlerin maliyetli olması nedeniyle arttı. Nanomalzemelerin biyosentezine dayanarakdoğa, nispeten yeni ve büyük ölçüde keşfedilmemiş araştırma alanlarının geliştirilmesine katkıda bulunan nano ve mikro uzunlukta ölçekli inorganik malzemelerin sentezi için çeşitli işlemler tasarladı (Kalpana *et al.* 2017). Nanopartiküllerin biyosentezi, meydana gelen ana reaksiyonun indirgeme oksidasyonu olduğu bir tür aşağıdan yukarıya yaklaşımdır. Yeşil kimya perspektifinden değerlendirilmesi gereken nanopartiküllerin hazırlanmasındaki üç ana adım, sentez için kullanılan solvent ortamının seçimi, çevreye zarar vermeyen bir indirgeme ajanı seçimi ve stabilizasyonu için toksik olmayan bir materyalin seçilmesidir (Wu *et al.* 2015). Biyo organizmalar kullanılarak yapılan sentez, yeşil kimya ilkeleri ile uyumludur. Biyo organizma (1) (2) kullanılan indirgeyici ajan ve (3) reaksiyonda kapama ajanı olduğu gibi çevre dostudur (Sankar and Abideen 2015). Genellikle nanopartiküllerin kimyasal sentezi, yüzeyde adsorbe olan ve tıbbi uygulamalarda olumsuz etkilere sahip olabilecek bazı toksik kimyasal türlerin varlığına yol açar (Suman *et al.* 2013). Biyosentezlenmiş nanopartiküller söz konusu olduğunda bu sorun değildir, çünkü bunlar çevre dostu ve farmasötik uygulamalar için biyo uyumludur.

- **Gümüş nanopartiküller**

Gümüş nanopartiküller, 1 nm ile 100 nm arasında değişen gümüş nanopartikülleridir. Sıklıkla 'gümüş' olarak tanımlanırken, bazıları yüzey / kütle gümüş atomlarının büyük

oranlarından dolayı büyük oranda gümüş oksitten oluşur. Eldeki uygulamaya bağlı olarak çok sayıda nanopartikül şekli oluşturulabilir. Yaygın olarak kullanılan gümüş nanopartiküller küreseldir, ancak elmas, sekizgen ve ince tabakalar da yaygındır. Aşırı geniş yüzey alanları, çok sayıda ligandın koordinasyonuna izin verir. İnsan tedavilerine uygulanabilen gümüş nanopartiküllerin özellikleri, potansiyel etkinlik, toksisite ve maliyetleri değerlendiren laboratuvar ve hayvan çalışmalarında araştırılmaktadır (Zhang *et al.* 2016).



Şekil 2.1 Gümüş nanopartiküller referansı (Graf *et al.* 2003)

Gümüş nanopartiküller (AgNP), benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle tıbbi gıda, sağlık hizmetleri, tüketici ve endüstriyel amaçlar dâhil olmak üzere çeşitli alanlarda giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bunlar arasında optik, elektriksel ve termal, yüksek elektriksel iletkenlik ve biyolojik özellikler bulunur (Gurunathan *et al.* 2015).

Kendine özgü özellikleri nedeniyle, antibakteriyel ajanlar olarak endüstriyel evlerde ve sağlıkla ilgili ürünler, tüketici ürünlerinde, tıbbi cihaz kaplamalarında, optik sensörlerde ve kozmetikte, ilaç endüstrisinde ve gıdaendüstrisi, teşhis, ortopedi, ilaç verme, antikanser ajanları olarak çeşitli uygulamalar için kullanılmıştırve nihayetinde antikanser ilaçların tümör öldürücü etkilerini artırmıştır. (Chernousova and Epple 2013).

Son zamanlarda, AgNP'ler birçok tekstil ürününde, klavyede, yara sargısında ve biyomedikal cihazlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Li *et al.* 2014).

Nano-gümüşün benzersiz özelliklerinden ve polimerlerin kolay işlenebilirliğinden kaynaklanan yararlı özelliklerinden ötürü yerine getiriciler ve polimerler olarak gümüş nanopartiküller (AgNP'ler) içeren nanokompozitler (NC'ler). Bu tür malzemelerin geniş bir uygulama yelpazesi arasında, antibakteriyel maddeler olarak kullanım, en yoğun şekilde araştırılanıdır (Dallas *et al.* 2011). Gümüşün biyosidal aktivitesi yüzyıllardır bilinmesine rağmen, nanoteknolojinin mevcut hızlı gelişimi, bu elementi iyi tanımlanmış kompozisyon ve yapıya sahip AgNP formunda içeren biyomedikal materyallerin tasarlanmasında yeni fırsatlar sunmaktadır. Dikkate değer bir şekilde, AgNP'ler yalnızca geniş bir antibakteriyel aktivite göstermekle kalmaz, aynı zamanda antifungal, antiviral, anti-enflamatuar, anti-anjiyojenik ve anti-kanser aktiviteler de sergiler (Zhang *et al.* 2016).

Oysa birçok rapor, insan hücrelerine karşı AgNP'lerin düşük / nispeten düşük sitotoksisitesini ortaya çıkarmıştır. Ancak nanopartiküllerin sitotoksisitesinin birçok faktöre bağlı olduğu vurgulanmalıdır. En önemlileri boyut, şekil, boyut dağılımı, yüzey yükü ve yüzeylerine eklenen ligandların türüdür (Sriram *et al.* 2012).

Bu nedenle, kesin olarak tanımlanmış morfoloji ve yapıya sahip AgNP'leri elde etmemize izin veren tekrarlanan prosedürlerin tasarlanması, biyomedikal uygulamaları için çok önemlidir. Nano boyutta metalik parçacıklar benzersizdir ve yüzey-hacim oranları nedeniyle fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri önemli ölçüde değiştirebilir; bu nedenle, bu nanopartiküller çeşitli amaçlarla kullanılmıştır (Sharma *et al.* 2009). AgNP'lerin gerekliliğini yerine getirmek için sentez için çeşitli yöntemler benimsenmiştir. Genel olarak, geleneksel fiziksel ve kimyasal yöntemler çok pahalı ve tehlikeli görünmektedir. İlginç bir şekilde, biyolojik olarak hazırlanmış AgNP'ler yüksek verim, çözünürlük ve yüksek stabilite göstermektedir (Gurunathan *et al.* 2015). AgNP'ler için çeşitli sentetik yöntemler arasında, biyolojik yöntemler basit, hızlı, toksik olmayan, güvenilir ve çevreci yaklaşımlar gibi görünmektedir; bunlar, çeviri araştırması

için optimize edilmiş koşullar altında iyi tanımlanmış boyut ve morfoloji üretebilir. Sonunda, AgNP'lerin sentezi için yeşil bir kimya yaklaşımı çok şey vaat ediyor (Gurunathan *et al.* 2009). Sentezden sonra, parçacığın fizikokimyasal özelliklerinin biyolojik özellikleri üzerinde önemli bir etkisi olabileceğinden, kesin parçacık karakterizasyonu gereklidir. İnsan refahı, nanotıp veya sağlık hizmetleri endüstrisinde vb. Amaçlarla herhangi bir nano materyalin tam potansiyelini kullanmak için güvenlik konusunu ele almak için, hazırlanan nanopartikülleri uygulamadan önce karakterize etmek gerekir (Lin *et al.* 2014). Son yıllarda, bitki özlerinden nanopartikül ve nanoemülsiyon sistemlerinin kullanımı, antimikrobiyal, antikanser ve antioksidan özellikler sergileyen bileşiklerin üretilmesindeki önemli uygulamaları nedeniyle önemli bir önem kazanmıştır (Govindan *et al.* 2020). Çevre dostu yeşil sentezlenmiş nanopartiküller daha güvenli, düşük maliyetli, toksik değildir ve bu nedenle toplu sentezi kolaylaştıran farmasötik uygulamalar için çok yararlı olarak kabul edilir (Mathur *et al.* 2018).

Ayrıca, düşük konsantrasyonlu gümüş nanopartiküllerin, insanlar da dahil olmak üzere ökaryotik hücrelere toksik olmadığı, ancak bakteriler, virüsler ve mantarlar gibi mikroorganizmaların prokaryotik hücrelerine karşı yüksek toksisite uyguladıkları bilinmektedir (Siddiqi *et al.* 2018).

Ortopedik implantlar kanla temas ettiğinde, plazma proteinleri implant yüzeyinde mikroorganizmaların kolayca yapışabileceği bir koşullandırma filmi oluşturabilir. Mevcut çabalar, antibiyotiklerin kullanımını ve ilgili ilaç direnci sorunlarını azaltmak için biyoaktif malzemelerin yüzeyinin inorganik antibakteriyel elementlerle modifikasyonuna odaklanmıştır. Antibakteriyel özellikler, camlara tipik olarak sulu çözeltilerde veya erimiş tuzlarda iyon değişimi ile sağlanabilir. Çeşitli inorganik antibakteriyel maddeler arasında gümüşün, silikat cam yapısına girme kabiliyetine sahip olması nedeniyle iyon değiştirme yaklaşımı için uygun bir aday olduğu gösterilmiştir. Ayrıca dirençli bakterilere neden olmadan düşük konsantrasyonlarda geniş spektrumlu bir bakterisidal davranış sergiler (Swathy *et al.* 2014).

Son on yılda, metal nano parçacıkların yeşil sentezi, elektronik, kataliz, kimya, enerji ve tıp gibi çeşitli uygulamaları nedeniyle katlanarak artıyor (Raveendran *et al.* 2003). Özellikle gümüş nanopartiküller (AgNP), yüksek hassasiyetli biyo-moleküler algılama ve teşhis antimikrobiyalleri gibi çeşitli alanlarda birçok önemli uygulamaya sahiptir (Panáček *et al.* 2006) Kataliz Optik, biyotıp, ilaç ve gıda ve kozmetik endüstrileri (Kokura *et al.* 2010). Kimyasal indirgeme, elektrokimyasal işlem, foto kimyasal indirgeme, lazer ablasyon, hidrotermal yöntem, mikro emülsiyon yöntemi, radyasyonla uyarılan, radyolitik indirgeme, dolayısıyla kimyasal indirgeme, piroliz ve litografi gibi AgNP'lerin üretimi için geleneksel yöntemler kullanılmaktadır.

Gümüş Nanopartiküller antimikrobiyal olarak

Gümüş bileşikler yanıkları, yaraları ve enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmıştır (Lara *et al.* 2012). Çeşitli gümüş tuzları ve türevleri antimikrobiyal ajan olarak kullanılır (Dallas *et al.* 2011). Birçok çalışma, nano boyutlu gümüş parçacıklarının antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu bildirmiştir (Xiu *et al.* 2012). Gümüş nanopartiküller, antibiyotik iletimi için bir ortam olarak ve dezenfekte edici filtreler ve kaplama malzemeleri olarak kullanılmak üzere kompozitleri sentezlemek için incelenmiştir (Tran and Lee 2013). Gümüş nanopartiküllerin bakteriler üzerindeki önleyici etkisini açıklamak için birkaç mekanizma önerilmiştir; Gümüşün kükürt ve fosfora olan yüksek afinitesinin, bakteri hücre zarı üzerindeki kükürt içeren proteinlerin bolluğundan dolayı antimikrobiyal etkinin temel unsuru olduğu varsayılmaktadır (Ramalingam *et al.* 2016). Gümüş nanopartiküller, hücre zarının içinde veya dışında kükürt içeren amino asitlerle reaksiyona girebilir, bu da bakteriyel hücre canlılığını etkiler. Ayrıca, gümüş nanopartiküllerden (AgNP'ler) salınan gümüş iyonlarının (özellikle Ag +) DNA'daki fosfor parçalarıyla etkileşime girerek DNA replikasyonunun inaktivasyonuna yol açabileceği veya kükürt içeren proteinlerle reaksiyona girerek enzim fonksiyonlarının inhibisyonuna yol açabileceği öne sürüldü. (Mitzel 2016). Bakteriyel hücre duvarına bağlı 10 nm'den daha küçük çaplarda gümüş nanopartiküller hücre duvarının delinmesine neden olarak hücre ölümüne neden olur, bu çalışma, gümüş nanopartiküllerin etki tarzının, AgNP'lerin kükürt içeren bakteri hücre duvarındaki proteinler, son olarak zarın geçirgenliğini arttırır, en sonunda; hücre ölümüne neden olur

(Ivask and Kahru 2014). 10-15 nm boyut aralığındaki gümüş nanopartiküllerin Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmalar üzerindeki doza bağımlı etkisi incelenmiştir (Agnihotri *et al.* 2014).

Mikro molar seviyelerde Ag + iyonlarının, oksidatif fosforilasyondan solunum elektron taşınmasını ayırdığı, solunum zinciri enzimlerini inhibe ettiği ve protonlara ve fosfata zar geçirgenliğine müdahale ettiği bildirilmiştir (Sukhorukova *et al.* 2017). Ek olarak, daha yüksek Ag + iyon konsantrasyonlarının sitoplazmik bileşenler ve nükleik asitlerle etkileşime girdiği gösterilmiştir (Yang and Wang 2011).Gümüş nanopartiküllerin E. coli ve *S. aureus*'un hücre morfolojisi üzerindeki etkisi TEM, SEM ve X-ışını mikroanalizleri kullanılarak incelenmiştir (De Giglio *et al.* 2013). Gümüş iyonları ile muamelenin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde benzer morfolojik değişikliklere neden olduğu ortaya çıktı. Gümüş iyonlarının inhibitör aktivitesi Gram negatif bakterilerde daha yüksektir, bunun nedeni Gram pozitif bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasının kalınlığına bağlı olabilir ve bu da bir dereceye kadar engelleyebilir. Gümüş iyonlarının nükleik asitlerle etkileşimi ve DNA replikasyonunun zayıflığı ile iletişim halindeki güncel araştırma ve teknolojik gelişmeler, hücre canlılığının kaybına ve sonunda hücre ölümüne neden olur (Suresh and Doktycz 2010).

Gümüş nanopartiküllerin aktif yüzeyleri tarafından salınan ag iyonları ve bu nanopartiküllerin yüzeylerinde bulunan gümüş oksit, gerçek biyosidal ajanlar olarak rapor edilmektedir (Le Ouay and Stellacci 2015). Gümüş iyonlar, hücre onları hücrenin içinden çıkarmaya çalışırken indirgendikleri bakteri hücrelerine girer; sonunda hücre tahribatına yol açar. Proteomik çalışmalar, *E. coli* hücrelerinde, zarf proteini işlemede, dış zar geçirgenliğinde, plazma zarı potansiyeli ve enerji kazanmada ilk kez AgNP'lerin birkaç birincil eylemini ortaya çıkardı. Proteomik analizler, *E. coli* hücrelerinin sadece kısa bir süre AgNP'lere maruz kalmasıyla sonuçlandığını ortaya koydu. Genellikle çeşitli stres koşullarında indüklenen çeşitli zarf proteinleri ve ısı şoku proteinlerinin ifadelerindeki değişiklikler (Jacobson *et al.* 2015). AgNP'ler ve Ag + iyonları benzer bir membran hedefleme etki mekanizmasını paylaşır. Ancak AgNP'lerin ve Ag + iyonlarının etkili konsantrasyonları sırasıyla Nano molar ve mikro molar seviyelerdedir

(Wilke *et al.* 2018). AgNP'ler, antimikrobiyal aktivitelerine aracılık etmede Ag + iyonlarından önemli ölçüde daha verimli görünmektedir (Chambers *et al.* 2013). Antibakteriyel aktivite partikül boyutuna bağlıydı, gümüş nanopartiküller ayrıca bakteriyel hücreler ile şekle bağlı etkileşim sergiliyor. Kesik üçgen gümüş Nano plakalar, küresel ve çubuk şeklindeki nanopartiküllere göre E. coli'ye karşı en güçlü biyosidal etkiyi gösterdi (Pal *et al.* 2007). Küçük partiküller, büyük partiküllere göre daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergiledi. Bu sonuç, bu parçacıklar daha küçük boyutlara sahip olduğunda yüksek parçacık penetrasyonundan kaynaklanıyor olabilir. Antibakteriyel özellikler, nanopartiküllerin toplam yüzey alanıyla ilgilidir. Daha büyük yüzey / hacim oranlarına sahip daha küçük partiküller daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahiptir (Ravishankar Rai 2011).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Malzameler

3.1.1 Cihaz ve ekipman

Bu çalışmada kullanılan aparat ve ekipmanlar çizelgede belirtilmektedir.

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipmanlar

Cihazlar	**Üretim / Ülke**
Atomik kuvvet mikroskobu	UNICCO / ABD
Otoklav	Fisher / Japonya
Santrifüj	Almanya
Elektrik dengesi	Sartorius
ELISA okuyucu	Beckman sürgü / Avusturya
Kuluçka makinesi	Nave / türkiye
Işık Mikroskobu	Olympus / Japonya
Mikropipet	Dragon-med / İspanya
Fırın	Memmert / Almanya
pH ölçer	Hanna / Romanya
Buzdolabı	İştar / Irak
Shaker kuluçka makinesi	Memmert / Almanya
Hassas denge	Mettle / İsviçre
Spectrophotometer	Varian / Avustralya
Vitek 2 sistemi	Biomerieux / ABD
girdap	Memmert / Almanya
Su banyosu	Memmert / Almanya
Su Damıtma	Almanya

3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler Çizelge 3.2'de belirtilmektedir.

Çizelge 3.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Kimyasal	**Üretim / Ülke**
AgNo3	Sigma (ABD)
Kristal Menekşe	BDH / İngiltere
Kongo Kırmızısı	Oxoid / İngiltere
Deiyonize Distile su	Bioneer / Kore
Etanol 95%	BDH (İngiltere)
Etil Alkol (Etanol)	GCC / İngiltere
Buzlu Asetik asit	GCC / İngiltere
Gliserol	GCC / İngiltere
Gram stain	Syrbio /S.A.R.
HCl	BDH / İngiltere
NaOH	BDH / İngiltere
Normal salin	SDI/ Irak
Fosfat tamponlu salin	SDI/ Irak
Sakaroz	BDH / İngiltere

3.1.3 Kültür ortamı

Bu çalışmada kullanılan kültür ortamı çizelgede listelenmektedir.

Çizelge 3.3 Bu çalışmada kullanılan kültür ortamı

Kültür ortamı	**Üretim / Ülke**
Beyin-Kalp İnfüzyon suyu	Himedia / Hindistan
Eozin metilen mavisi	
MacConkey agar	
Mueller Hinton agar	
Mueller Hinton suyu	
Besleyici agar	Oxoid / İngiltere
Besin suyu	
Triptik soya suyu	Himedia / Hindistan

Tüm besiyerler Çizelge 3.3'de listelenmektedir ve onları üretici talimatlarına göre hazırlanmış, 121 ºC / 15 pound / inche²'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmektedir.

3.1.4 Çözeltilerin, tamponların ve hazırlanmış medyanın hazırlanması:

I- McFarland standart çözümü (Benson 2001)

Stok çözümü:

- Çözelti (A): 1 g baryum klorür ($BaCl_2$) 100 mL damıtılmış su içinde çözülecek.
- Çözelti (B): 1mL konsantre sülfürik asit (H_2SO_4) eklendi ve hacim distile su ile 100 mL'ye tamamlanacak.

MacFarland No. 0,5 (1,5×108 CFU/mL)

0,05 mL çözelti (A) 9,95 mL çözeltiye (B) ilave edilecek ve 2 dakika vorteks ile karıştırılacak ve kullanılana kadar koyu renkli şişede saklanacak.

II- Kongo kırmızısı leke çözeltisi

Bu çözelti, 0,8 g Congo kırmızısı lekesinin 100 mL D.W. içinde çözülmesiyle hazırlanacak ve ardından süzülerek sterilize edilecektir (Freeman *et al.* 1989).

III- Kristal menekşe leke çözeltisi

Bu çözelti, 0,1 g kristal mor lekenin 100 mL D.W. içinde çözülmesiyle hazırlanacaktır. (Christensen *et al.* 1982).

3.2 Yöntemler

3.2.1 Örnekler Koleksiyonu

Nisan 2020'den Eylül 2020'ye kadar uzatılan dönemde toplam yüz adet Klinik ve gıda numunesi toplanmıştır. Bağdat'taki AlKadhi ana eğitim hastanesinden klinik idrar örnekleri alınmıştır. Ayrıca Bağdat vilayetindeki yerel pazarlardan, Irak Standart Kriteri No. 2/2270'in örnekleme, 2006 talimatına göre rastgele farklı gıda örnekleri (sebzeler, et ve süt ürünleri) toplanmıştır.

3.2.2 Bakteriyel İzolasyon

Toplanan klinik ve gıda numuneleri, *Escherichia coli*'yi izole etmek için seçici ve farklı besiyerinde kültürlenmektedir.

I- Klinik Örneklerden Bakteriyel İzolasyon

Klinik örnekler doğrudan MacConkey agar üzerine inoküle ederek 37˚C'de 24 saat inkübe edilecektir. AgNP'ler tüm antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesi için kullanılan klinik izolatlardır.

II- Gıda Örneklerinden Bakteriyel İzolasyon

Her bir gıda örneğinden bir gram 9 mL DW'de süspanse edilecek, 30 dakika bekletildikten sonra her sıvı besiyeri / numuneden 1 mL steril bir pipet kullanılarak steril petri kabının ortasına yerleştirilmektedir. Ardından MacConkey agar seyreltilmiş numuneyi içeren petri kabına dökülerek iyice karıştırılacaktır. Agarın katılaşmasından sonra, plaka baş aşağı 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilecek, daha sonra büyüyen koloniler daha fazla araştırılacaktır.

3.2.3 Bakteriyel Tanımlama

Bakteriyel İzolatlar, McFaddin'e (2000) göre seçici ve diferansiyel ortamdaki özellikler kullanılarak cins düzeyinde tanımlanmaktadır. Vitek sistemi, tür düzeyinde tanımlamayı doğrulamaktır.

I- Seçici ve Diferansiyel Medyada Kültürel Özellikler

- **MacConkey ve EMB agar**

Organizmalar, MacConkey agar üzerinde kültürlenerek gece boyunca 37 ° C'de inkübe edilecek. Soluk koloniler ihmal edilecek ve pembe koloniler, 37^{o}C'de inkübasyondan sonra *E. coli* (yeşil metalik parlaklık) ve *Klebsiella pneumoniae* (EMB'de mor koloniler) gibi diğer laktoz fermentörlerini ayırt etmek için Eosin Metilen Mavisi (EMB) agar üzerinde alt kültürlenecektir. MacConkey agar üzerinde *E. coli*, küçük kuru, düzleştirilmiş pembe koloniler olarak görünmektedir.

II- Mikroskobik muayene

Bakteriyel morfolojik özellikleri ve Gram boyamasına tepkiyi incelemek için, pozitif kültürden şüphelenilen koloninin bir kısmı aktarılacak ve temiz bir slayta sabitlenerek gram boyama uygulanacaktir. Daha sonra yağa daldırılarak ışık mikroskobu altında incelenecektir.

III- *E. coli* İzolatlarının Vitek sistemi ile tanımlanması

Vitek, bakteri izolatlarının ve kolonilerin sayımını tanımlamak için kullanılmaktadır. İki parçalı kompakt bir sistemdir. Makine beş bölümden oluşmaktadır:

1. Klavye.
2. 70 saniye boyunca transfer tüpü ile numunenin test edilen tüpten kite aktarıldığı kapıyı doldurulacak.
3. Bu bölümdeki yükleme kapağı, transfer tüpü kitten kesilecek ve sonraki, 3-5 dakika boyunca inkübatör içine yüklenecek.
4. Kullanıcı erişim kapısı (Bu bölümde bakteri üremesinin bir sonucu olarak meydana gelen tüm değişiklikler son sonucu vermek için ölçülecektir).
5. Atık Kapı (Bu bölümde işlemin sonunda kitin bir koleksiyonu yapılmacaktır).

Prensip

Vitek, büyüme temel teknolojisini kullanan otomatik bir mikrobiyoloji sistemidir. Sistem, otomatik olarak inkübe edilen ve yorumlanan kolorimetrik reaktif kartlarına sahiptir. Aynı zamanda Vitek kompakt florometrik bir analizdir. Reaktif kartları, her biri ayrı bir test substratı içerebilen 64 kuyucuğa sahiptir. Substratlar, inhibe edici maddelerin varlığında asitleştirme, alkalileştirme, enzim hidrolizi ve büyüme gibi çeşitli metabolik aktiviteleri ölçmektedir. Kartın her iki tarafında bulunan optik olarak saydam bir film, sızdırmaz bir hazne muhafaza edilirken uygun düzeyde oksijen geçişine izin vermektedir. Bu, organizma-substrat katkılarıyla teması önler. Her kart, aşılama için kullanılan önceden yerleştirilmiş bir transfer tüpüne sahiptir. Kartlarda ürün türü, lot numarası, son kullanma tarihi ve kartın sisteme yüklenmesinden önce veya sonra numuneye bağlanabilen benzersiz bir tanımlayıcı hakkında bilgi içeren barkodlar bulunmaktadır.

3.2.4. Bakteriyel Koruma

I- Kısa süreli saklama (Harley and Prescott 2002)

Her bir *E. coli* izolatının tekli saf kolonisi, besleyici agar slantlarına ekilecek, 37°C' de 24 saat inkübe edilerek buzdolabında 4°C 'de bir ay süreyle saklanmaktadır.

II- Uzun süreli depolama (Vandepitte *et al.* 2003).

A- Bıçak kültürü yöntemi: Saf izole edilmiş bir *E. coli* kolonisi (18 saat), besleyici agar içine bıçaklanacak, ardından 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek oda sıcaklığında karanlık bir yerde saklanacaktır.

B- Gliserol yöntemi: Bir besleyici sıvı besiyeri, öze dolusu gece boyunca saf *E. coli* ile inoküle edilecek ve inoküluma % 20-30 son konsantrasyonda 18 saat gliserol ilave edildikten sonra 37 °C'de inkübe edilecek ve (-20 °C)'de 12-18 ay saklanacaktır.

3.2.5 Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tüm klinik *E. coli* izolatlarına, modifiye Kirby-Bauer yöntemi kullanılarak aşağıdaki aşamalara göre antibiyotik duyarlılık testi yapılacaktır: (Benson 2001; Morello *et al.* 2006).

I- Aşı Hazırlama (Bulanıklık Standardı)

E. coli izolatlarının gecelik kültüründen alınan koloniler, madde (3.1.4) 'de olduğu gibi hazırlanan 0,5 McFarland standartlarına ayarlanarak 1,5x108 CFU / mL kültür elde etmek için 5 mL normal salin tüpüne aktarılacaktır.

II- Test Plakasının Aşılanması

A- Plakalar, inoküluma steril bir çubukla daldırılarak inoküle edilecek ve Eküvyonun sıvı seviyesinin üzerinde tüpün kenarına doğru sıkıca bastırılması ve döndürülmesiyle aşılamadan önce fazlalık broth çıkarılacaktır.

B- Çubuk, her uygulamadan sonra plakayı 60 ° C'lik bir açıyla döndürerek ortamın yüzeyine üç kez sürülmekte. Son olarak, çubuk, agar yüzeyinin kenarından geçirilecektir.

C- Aşı, kapağı kapalı olarak birkaç dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakılacak.

D- Steril bir forseps kullanılarak, aşılanmış plakaya antibiyotik diskler yerleştirildi. Diskler oda sıcaklığına kadar ısıtılmalı ve ardından agar yüzeyine dağıtılmalıdır; steril bir forseps ile nazikçe bastırılmalıdır.

E- Plakalar 30 dakika içinde 18-24 saat 37 ° C'de inkübe edilecektir.

III- Sonuçları Okumak

İnkübasyondan sonra, tam inhibisyon bölgesinin çapları not edilerek milimetre cinsinden ölçülecektir. Bireysel antimikrobiyal ajan için inhibisyon bölgesinin çapı, standart inhibisyon bölgesi, Çizelge 3.4 ile karşılaştırılarak duyarlı, orta ve dirençli kategoriler açısından çevrilmektedir.

Çizelge 3.4 NCCL'lere göre inhibisyon bölgelerinin çap yorumlayıcı standartları

ID	Antimikrobiyal Ajan	Disk Gücü	İnhibisyon bölgesinin çapı (mm)		
			Hassas	Orta düzey	Dirençli
1	Amoksisilin-klavulanat (AMC)	30mg	≥20	-	≤19
2	Seftriakson (CTX)	30mg	≥23	20-22	≤19
3	Cephalothin (KF),	30mg	≥18	15-17	≤14
4	Levofloksasin (LEV)	5mg	≥17	14-16	≤13
5	Nitrofurantoin (NIT)	300mg	≥17	15-16	≤14

3.2.6 Biyofilm üretiminin tespiti

E. coli'nin klinik izolatları tarafından biyofilm oluşumu üç test kullanılarak test edilmektedir:

I- Kongo Kırmızı Agar

E. coli'nin klinik izolatları ile biyofilm üretimi, Freeman *et al.* (1989) tarafından tarif edildiği gibi Congo-Red agar yöntemi kullanılarak test edilecektir. Bu besiyeri, 37 gr beyin kalp infüzyon broth'u 50 gr sukroz ve 15 gr agar-agar ile 900 mL distile su içinde çözülerek hazırlanacak ve otoklavlanacaktır ve daha sonra 55-60 °C'ye soğutularak kongo kırmızısı solüsyon (3.1.4 II) ile karıştırılacaktır. Daha sonra ortam, steril bir Petri kaplarına dökülecektir. Daha sonra bu ortam, bakteriyel slime tabakası oluşturma yeteneğini belirlemek için kullanılacak. Plakalar, 24 saat aerobik olarak inkübe edilecektir. Kuru kristal kıvamına sahip siyah koloniler tarafından pozitif bir sonuç belirtilecektir.

II- Tüp yöntemi (Christensen'in yöntemi)

Görünür film oluşumu sonucu biyofilm üretici mikroorganizmanın tespiti için kalitatif bir tahlil olan tüp yöntemi Christensen *et al.* (1985) tarafından anlatılmıştır. İzolatlar,

TSB içeren cam test tüpüne inoküle edilir ve 24 saat 37 °C'de inkübe edilecek. Cam test tüpünün duvarlarında oluşan biyofilm, planktonik hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez durulanarak boşaldıktan sonra 1 saat boyunca safranin solüsyonu ile boyanacak. Daha sonra lekeli test tüpü, lekeyi çıkarmak için iki kez PBS ile durulanacak ve tüp hava ile kurutularak tüpün duvarlarında görünen görünür film oluşumu biyofilm üretimini gösterecektir.

III-Mikrotitre plak yöntemi (Coffey and Anderson 2014)

Mikrotitre plak yöntemi, biyofilmi tespit etmek için altın standart teknik olarak kabul edilecektir. Klinik bakteri izolatları 10 mL triptikaz soya suyu (TSB) içinde %1 glikoz w/v (Triptik soya çorbası (TSB)) içinde aşılanmış ve üretici talimatlarına göre %1 w/v glikoz eklenmiştir, bileşenler 100 mililitre damıtılmış su, besiyeri tamamen çözüldükten sonra otoklavlandı, ardından triptik soya glukoz suyu steril tüplere dağıtıldı ve 37 ºC'de 24 saat inkübe edildi.

Klinik bakteriyel izolatlar, %1 glikoz w/v (Triptik soya suyu (TSB)), üreticinin talimatlarına göre hazırlanarak %1 w/v glikoz ilave edilecektir. Bileşenler 100 mL damıtılmış su içinde çözülecek, tamamen çözüldükten sonra ortam otoklavlanarak triptik soya-glikoz çorbası steril tüplere dağıtılacaktır) ile 10 mL triptikaz soya çorbası içinde aşılanarak 37 ºC'de 24 saat inkübe edilecektir. Kültür daha sonra taze ortam ile 1: 100 oranında seyreltilecek; steril 96 oyuklu düz tabanlı polistiren doku kültürü plakasının tek tek gözlenecek ve negatif kontrol kuyuları sadece steril broth ile doldurulacaktır. Plakalar 37 °C'de 24 saat inkübe edilecek, inkübasyondan sonra her kuyucuğun içeriğini çıkarmak için hafifçe vurulacaktır. Kuyucuklar, serbest yüzen bakterileri yok etmek için bir kez steril damıtılmış su ile yıkanacak. Yapışan bakterilerin oyuklara oluşturduğu biyofilm kristal viyole (% 0,1) w/v ile boyanacak. Fazla leke, damıtılmış su kullanılarak çıkarılarak plaka kurumaya bırakılacaktır. 630 nm dalga boyunda mikro ELISA otomatik okuyucu (model 680, Biorad, İngiltere), lekeli yapışkan biyofilmin optik yoğunluğunu (OD) elde etmek için kullanılacak. Deney üç kez yapılacak ve üç kez tekrarlanacaktır. Suşlar şu şekilde sınıflandırılacak: OD ≤ OD c = biyofilm üreticisi yok; OD c <OD ≤ (2 × ODc) = zayıf biyofilm üreticisi; (2 × OD c)

<OD ≤ (4 × OD c) = orta biyofilm üreticisi ve (4 × OD c) <OD = güçlü biyofilm üreticisi burada OD c, bakteri aşılaması olmayan ortam ile kontrol oyuklarıdır (Çizelge 3.5)

Çizelge 3.5 Biyofilm üretiminin yorumlanması. Optik yoğunluk kesme değeri (ODc) = negatif kontrolün ortalama OD'si + negatif kontrolün 3x standart sapması (SD)

Ortalama OD değeri	Biyofilm üretimi
≤ OD /ODc < ~ ≤ 2x ODc	yok / zayıf
2*OD c < OD t ≤ 4*OD c	orta
4*OD c < OD t	güçlü

3.2.7 Gümüş Nanopartiküllerin (Ag NP) *E. coli* kullanılarak Sentezlenmesi

I- Gıda kaynaklı *E. coli* süspansiyonu hazırlanması

Gıda kaynaklı *E. coli* aşısının izolasyonu ve tanımlanmasından sonra, bir öze ile bir agar plakasından saf bir koloni alınarak hazırlanacak ve aseptik olarak 10 mL'lik bir besiyerine aktarılacaktır. Ortam, bir *E. coli* süspansiyonu hazırlamak için gece boyunca 37 °C'de kültürlenmektedir.

II- Preparation stock solution of ($AgNO_3$)

1,0 g $AgNO_3$'ün 100 mL deiyonize su içinde çözülmesiyle bir gümüş nitrat ($AgNO_3$) stok çözeltisi hazırlandı.

III- Gümüş Nanopartiküllerin biyosentezi (Ag NPs)

Bir öze dolusu gıda kaynaklı *E. coli* kültürü, 100 mL steril besleyici sıvı besiyeri içeren 250 mL'lik erlen içinde aşılanacaktır. Aşılanan ortam, 24 saat boyunca 100 rpm'de bir döner çalkalayıcıda 37 °C'de inkübe edilecek. 24 saat sonra kültür, bakteri hücrelerini ayırmak için santrifüjlenecek. Santrifüj 10 dakika 10000 rpm'de yapılacaktır. Süpernatan ve topak ayrılacak ve santrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatan,

nanopartikül sentezi için kullanılacaktır. Süpernatan kültür ortamına 50 mL 1 Mm sulu $AgNO_3$ çözeltisi ilave edilerek 37 °C'de döner bir çalkalayıcıda 120 rpm'de 24 saat süreyle inkübe edilecektir (yeşil sentez). (Divya *et al.* 2016). Rengin açık sarıdan kahverengiye dönmesi, gümüş nanopartiküllerin oluşumunu gösterecektir. Sentezlenen gümüş nanopartiküller 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek ayrılacak. Elde edilen pelet açık havada kurumaya bırakılacak ardından -4 °C'de saklanacaktır.

3.2.8 Gümüş nanopartiküllerin biyosentezi için parametrelerin optimizasyonu

Stok canlı hücre filtratından pH, sıcaklık, $AgNO_3$ tuzu konsantrasyonları ve hücre filtratının farklı konsantrasyonları gibi nanopartiküllerin kalitesi üzerinde potansiyel etkisi olan çeşitli reaksiyon parametreleri hazırlanmaktadır.

I- pH Optimizasyonu

Gıda kaynaklı E. coli kültür süpernatanı 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlenerek elde edilecek ve pH (5, 7 ve 9) 'a ayarlandıktan sonra $AgNO_3$ eklenerek 24 saat inkübe edilecektir. $AgNO_3$ içermeyen kültür süpernatantının bir kontrolü saklanacak. Oluşan gümüş nanopartiküller karakterize edilecektir.

II- Sıcaklık Optimizasyonu

Farklı sıcaklıklar (4,37 ve 80 °C) seçildi. $AgNO_3$ kültür süpernatanına eklenerek seçilen sıcaklıkta 24 saat inkübe edilecek. $AgNO_3$ içermeyen gıda kaynaklı *E. coli* kültür süpernatanı kontrol olarak tutulacak. Oluşan gümüş nanopartiküller karakterize edilecektir.

III- $AgNO_3$ Optimizasyonu

Kültür süpernatantına farklı $AgNO_3$ (1, 2 ve 3 mM) konsantrasyonları ilave edilerek seçilen konsantrasyonda 24 saat inkübe edilecektir. AgNO3 içermeyen gıda kaynaklı E.

coli kültür süpernatanı kontrol olarak tutularak oluşan gümüş nanopartiküller karakterize edilecektir.

IV- Gümüş nanopartiküllerin saflaştırılması ve gümüş nanopartikül konsantrasyonunun belirlenmesi

AgNP'ler, santrifüjleme ile saflaştırılacak (Roy *et al.* 2016). AgNP'ler, 30 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlenerek izole edilecektir. Peletlenmiş AgNP'ler, fazla iyonları ve bakterilerin kültür süzüntüsünü çıkarmak için 15 dakika boyunca 10.000 rpm'de santrifüjlenerek üç kez steril D.W ile yıkanacaktır. Elde edilen nanopartiküller saf ve oldukça kararlıdır, ardından yaklaşık 40-45 ^{o}C sıcaklıkta kurutulacaktır.

3.2.9 Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

I- Renk değişimi

Gümüş nanopartikül oluşumunun ilk göstergesi, açık sarıdan kahverengiye değişen renktir, gümüş iyonlarının gümüş nanopartiküller oluşturacak şekilde azaldığını göstermektedir.

II- UV-Vis spektrum analizi

AgNP'ler, 1 cm yol uzunluğuna sahip 2 mL kuvars küvet içinde 1 nm'lik bir çözünürlükte UV-Vis spektrumundaki reaksiyon karışımının dalga boyunun ölçülmesiyle doğrulanmaktadır. Numuneler için tarama aralığı, 500 nm / dak. Tarama hızında 300-900 nm dir. Spektrofotometrenin düzeltilmesi için boş bir referans kullanılacak. Tüm numunelerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları kaydedildi ve sayısal veriler grafiklenmektedir.

III- Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

AgNP'leri analiz etmek için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılacak. İnce bir hazırlanmış AgNP filmi, plaka üzerine birkaç damla AgNP damlatılarak bir silika cam plaka üzerine bırakılacaktır. Karanlıkta oda sıcaklığında kurumaya bırakılacak. Biriktirilen film cam levha daha sonra AFM ile taranacaktır.

IV- Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Nanopartikül yüzeyi ile bakteriyelin karışık canlı hücre filtratı arasındaki olası etkileşim FTIR tarafından 4 cm-1 çözünürlükte 4000–450 cm-1 aralığında varsayılmaktadır.

3.2.10 Biyosentezlenmiş AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesi

I- Gümüş nanopartikül aktivitesinin agar kuyu difüzyon testi ile belirlenmesi

Gıda kökenli *E. coli*'den sentezlenen gümüş nanopartiküller, *Klebsiella, E. coli* ve Staphylococcus aureus gibi patojenik mikroorganizmalara karşı agar kuyusu difüzyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri açısından test edilecektir. (Logeswari *et al.* 2012).

II- Minimum inhibitör konsantrasyonun (MIC) belirlenmesi

Gümüş nanopartiküllerin ve Seftriakson antibiyotiğinin antimikrobiyal etkinliği, standart sıvı dilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmaktadır. MIC, klinik izolatların ayarlanmış bakteriyel konsantrasyonu (1 × 108 CFU / mL, 0.5 McFarland standardı) ile 8 µg / mL ile 500 µg / mL arasında değişen konsantrasyonlarda seri iki kat seyreltmeler kullanılarak Muller Hinton çorbasında belirlenmektedir. Bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol, test edilen bakteriyel konsantrasyonlarına sahip Muller Hinton sıvı besiyeri içerirken, negatif kontrol yalnızca inoküle edilmiş sıvı besiyeri içermektedir. inkübasyon süresi ve sıcaklığı sırasıyla 24 saat ve 37 °C dir. MIC, mikroorganizmaların %99 büyümesini görsel olarak inhibe eden en düşük antimikrobiyal ajan

konsantrasyonudur. MİC, inkübasyondan önce ve sonra tüplerin görsel bulanıklığıyla not edilmektedir. (Krishnan *et al.* 2015).

III- Standart sıvı besiyeri Seyreltme Yöntemi (Saxena *et al.* 1995; Krishnan *et al.* 2015)

Her antibiyotiğe dirençli *E. coli* izolatının ilmek dolgusu besleyici broth üzerinde aşılanarak 24 saat 37 ° C'de inkübe edilecektir. Her bir tüp, 1 mL çift kuvvetli Muller Hinton sıvı besiyeri içermektedir. Karışık seftriakson ve gümüş nanopartiküllerin sinerjik aktivitesinin aktivitesini belirlemek için 1 mL (stok seftriakson veya gümüş nanopartiküller) veya 0,5 mL gümüş nanopartiküllerden ile 0,5 mL stok seftriaksondan koymaktadır. Her bir tüp, gece boyunca et suyundan 0,1 mL bakteri ile aşılanacak. Pozitif kontrol, tüpler bakteriler tarafından aşılanmadan yapılacaktır. Negatif kontrol (seftriakson antibiyotik ve biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküller) konmadan yapılmaktadır. Tüpler 37 °C'de 24 saat inkübe edilecek. Pozitif sonuç (büyüme yok), pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında 24 saat sonra görülecektir.

3.2.11 Gümüş nanopartiküller (AgNP) ve Seftriakson kombinasyonunun anti-biyofilm etkisi

AgNP'ler, seftriakson ve seftriakson + gümüş nanopartiküllerin anti-biyofilm oluşum etkinliği, (Al-Khafaji *et al.* 2016; Arcos *et al.* 2017) tarafından açıklanan protokol kullanılarak incelenmektedir. Anti-biyofilm aktivitesi, 8 µg / mL ile 500 µg / mL arasında değişen konsantrasyonlarda seri iki katlı seyreltmeler kullanılarak test edilecek.

Test, 96 oyuklu mikrotitre plakası kullanılarak gerçekleştirilecektir. Triptik soya suyu (TSB), 1: 100'e (TSB +%1 w / v glikoz) seyreltilmiş, gece boyunca antibiyotiğe dirençli *E. coli* kültürü ile aşılanmaktadır. Mikrotitre plakasının her bir oyuğu, 100 µL ortam ve 100 µL AgNP veya 100 µL seftriakson ve 100 µL AgNP + seftriakson kombinasyonu ile yüklenirken. kontrol oyuğu 100 µL orta + 100 µl DW ile yüklenmektedir. Her biri AgNP'ler için konsantrasyon, seftriakson, AgNP'ler + seftriakson üç kez değerlendirilmektedir. Daha sonra plaka 37 °C'de 24 saat inkübe edilecektir.

Oyuklar, planktonik bakterileri uzaklaştırmak için bir kez steril D.W. ile yıkanacak. Daha sonra her oyuğa %0,1 w/v kristal viyole solüsyonu ilave edilerek plaka, oda sıcaklığında 10 dakika boyanmaya bırakılacaktır. Kristal mor çözelti, plakanın bir su tepsisine daldırılmasıyla çıkarılacak. Daha sonra, plakadaki fazla sıvıyı ortadan kaldırmak için kâğıt havlular üzerinde ters çevrilerek havada kurumaya bırakılacak. Boyayı çözündürmek için lekeli oyuklara oda sıcaklığında 15 dakika süreyle %33 h/h Asetik asit ile işlem uygulanacaktır. Her oyuktaki bakteriyel süspansiyon iyice karıştırılarak optik yoğunluğu, 630 nm'de bir mikro ELISA otomatik okuyucuda ölçülecektir. Biyofilm oluşturma yeteneği şu şekilde atfedilmektedir: OD570 <0,120, biyofilm oluşturmaz; 0,120 <OD570 <0,240, zayıf biyofilm oluşturucu; OD570> 0,240, güçlü biyofilm oluşturucu ve OD570> 1,5, çok güçlü biyofilm oluşturucudur.

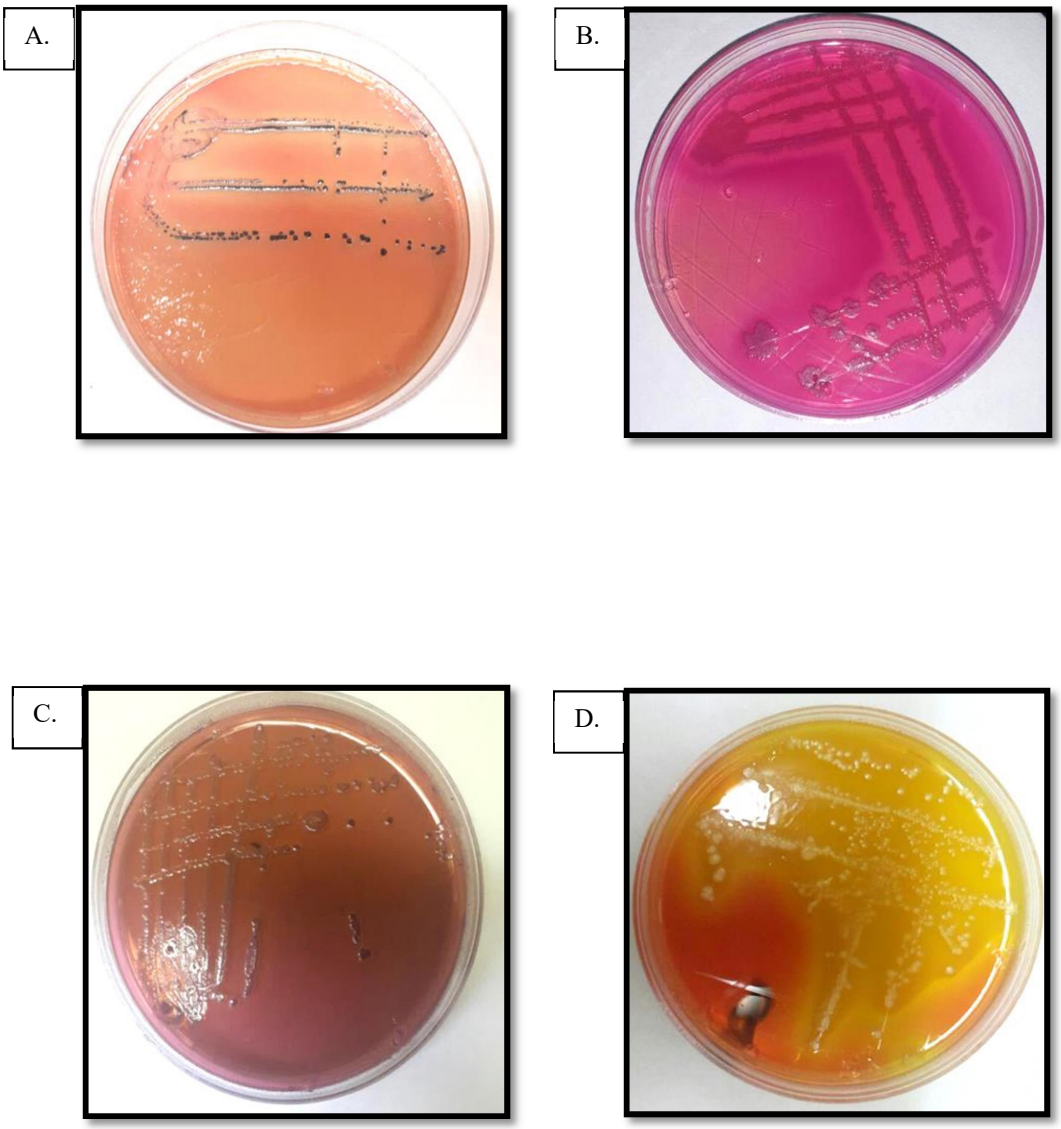
4. BULGULAR

4.1 Bakteriyel İzolasyon ve Tanımlaması

Bağdat şehrindeki yerel pazarlardan 25 adet tavuk eti örneği toplanılmıştır. Tüm numuneler, ilk izolasyon için SS agar üzerinde kültürlenmiştir. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra; S.S agarda farklı bakteri izolatları ortaya çıkmıştır. Bunlardan: S.S agar üzerinde H_2S üretme yetenekleri nedeniyle siyah merkezli küçük soluk yassı kolonilerdir. Daha sonra bu koloniler, Citrobacter'i *Salmonella*'dan ayırt etmek için MacConkey, XLD ve EMB'de alt kültürlendi Citrobacter, pembe koloniler olarak görünen MacConkey agar üzerinde laktoz fermenterdir; Salmonella, XLD Citerobacter üzerinde sarı koloniler olarak görünen soluk kolonilerdir (olmayan laktoz fermenter). Ancak Salmonella arka merkezi olan kırmızı koloniler olarak ortaya çıkmıştır. Kuluçka döneminden sonra; MacConkey'de laktoz fermenter (pembe) ve XLD'de sarı koloniler, EMB'de ise kahverengiydi; bunlar Citrobacter olarak bağlıydı (Brooks, 2007). Birincil tanımlamayı doğrulamak için, Gram negatif basiller olan mikroskobik özellikleri incelemek için Gram boyama yapılmıştır. Böylece kolonyal morfolojiye bağlı olarak, bakteri izolatları Citrobacter olarak tanımlanmıştır (Şekil 4.1 A, B, C, D); ve Çizelge 4.1, Janda *et al.* (1994) ve Gwida *et al.* (2014) tarafından tarif edildiği gibi Citrobacter'i tanımlamak için kullanılan bu biyokimyasal testleri göstermiştir.

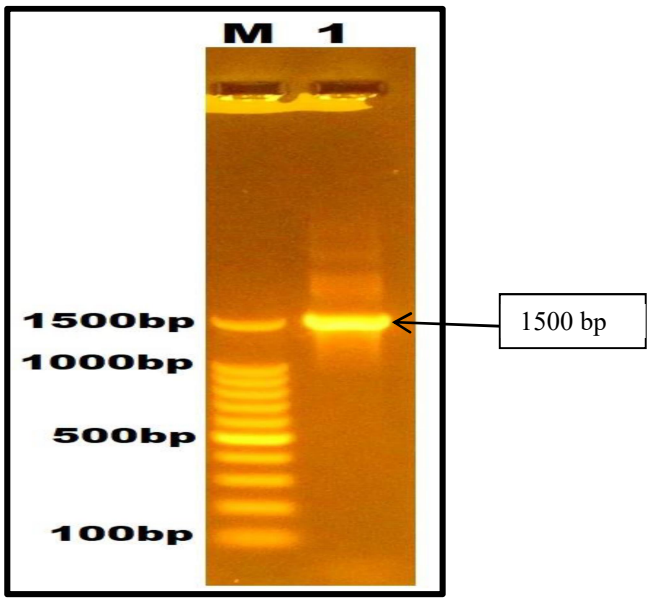
Çizelge 4.1 Biyokimyasal testlerin sonucu

Test	**Sonuç**
MacConkey agarda büyümek	Kuru Pembe koloniler
EMB'de Büyümek	kahverengi koloniler
Gram boyama reaksiyonu	Gram negatif bakteriler
S.S agar	Siyah merkezli soluk koloniler
XLD agar	Sarı koloniler



Şekil 4.1 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, *Citrobacter* spp ile, kültürlenmiş diferansiyel medya ve farklı seçici **A.**S.S. agar üzerinde siyah merkezli soluk koloniler **B.** MacConkey agar üzerinde küçük pembe (Laktoz fermenter) koloniler **C.** EMB'de kahverengi koloniler **D.** XLD agar üzerinde sarı koloniler

Citerobacter spp'nin tanımını doğrulamak için Vitek -2 sistemine güvenildi; ve sonuç, bu çalışmada izole edilen bakterinin *Citerobacter freundii* türünün olduğunu göstermiştir. *Citrobacter*'in tür düzeyinde tanımlanmasını doğrulamak için monoplex PCR tekniği kullanılarak 16S rRNA gen amplifikasyonu yapıldı; Pozitif sonucu saptamak için Şekil 4.2'de gösterildiği gibi %1,5 agaroz jel elektroforezi kullanıldı.

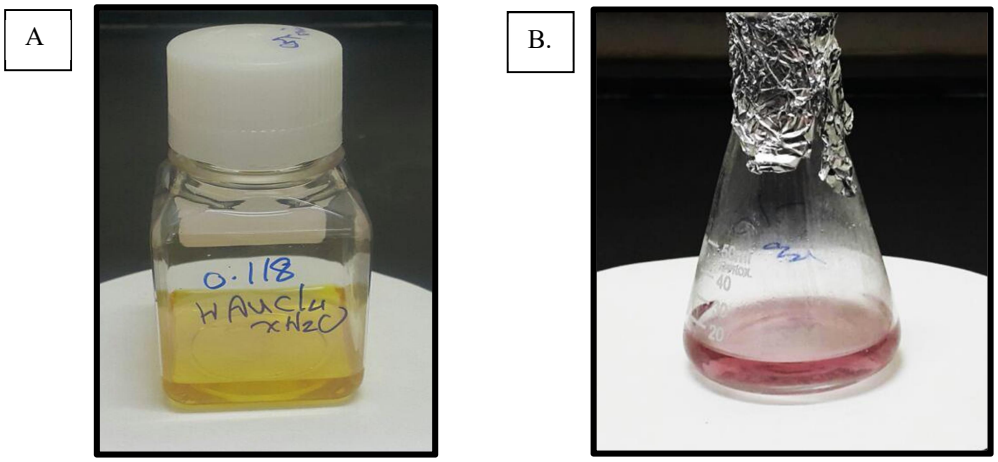


Şekil 4.2 16S rRNA geninin (1500 bp) amplifiye edilmiş PCR ürünleri: Agaroz jel elektroforezi, etidyum bromür lekeli, %1,5 agaroz; 75 voltta 2 saat elektroforez uygulanmış ve ultraviyole trans-aydınlatıcı altında fotoğraflanmıştır. M: DNA moleküler ağırlık markörü (100 bp merdiveni) ve 1: C. freundii'nin (M18) 16SrRNA'sının amplifiye PCR ürünüdür

16S rRNA gen dizisi bilişiminin en çekici potansiyel kullanımlarından biri, izolatlar için cins ve tür veya takson tanımlaması sağlamaktır (Janda and Abbott 2007). 16S rRNA gen dizilimi bakteri sınıflandırması açısından oldukça faydalıdır (Bosshard *et al.* 2006). PCR ürünleri doğrudan dizilemeye tabi tutuldu, her iki PCR ürünü dizisi de bir otomatik dizileyici ile dizilendi. Sekansler, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi'nde (NCBI) Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST) ile analiz edildi. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.2 Altın Nanopartiküllerin Biyosentezi

Altın nanoparçacıklar, dünya çapında ilk kez gıda kaynaklı *C. freundii* kullanılarak biyosentezlendi; çünkü bu çalışmadan önce *Citrobacter'*in AuNP'lerin sentezlenmesi için kullanıldığını doğrulayan bir rapor bulunmamaktadır. AuPN'lerin ilk tespiti, reaksiyon karışımı renginin sarıdan pembeye dönüştürülmesiyle gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).



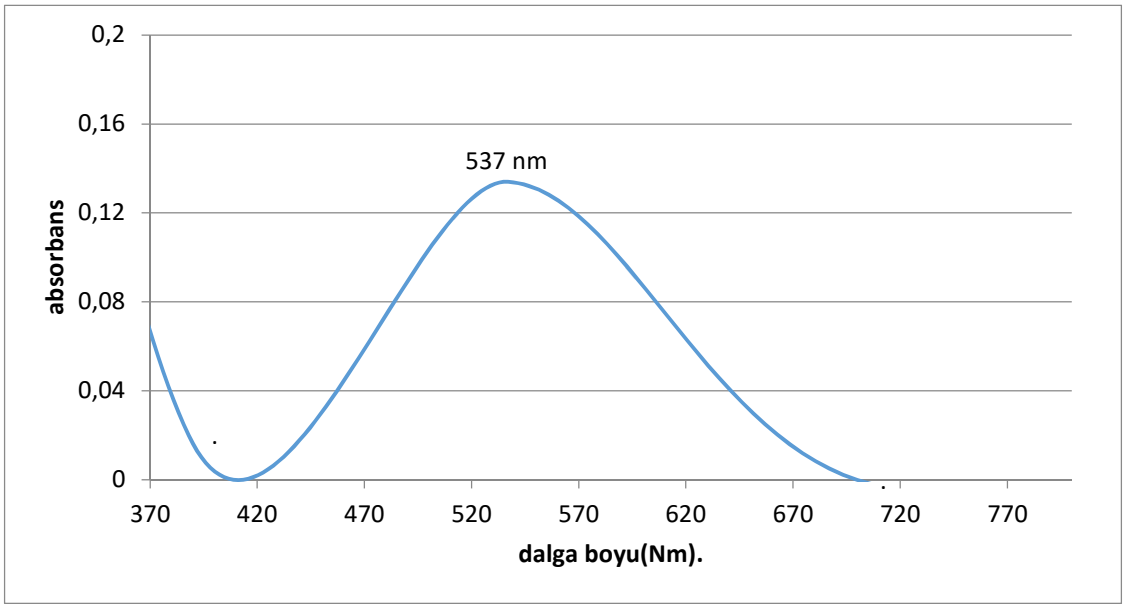
Şekil 4.3 C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenen altın nanoparçacık çözeltisi: **A.** Altın tuzu çözeltisi. **B.** Altın nanoparçacıkların biyosentezinden sonra reaksiyon karışımı

Çözeltinin rengindeki değişiklik, AuNP'lerde yüzey plazmon titreşimlerinin uyarılmasından kaynaklanır; bu nanopartiküllerin karakteristik özelliğidir (Underwood ve Mulvaney 1994). Bununla birlikte, elde edilen altın nanoparçacıklar UV-Vis spektroskopisi, Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi.

4.3 Altın Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

4.3.1 UV–Vis Spektral Analizi

İnkübasyon periyotlarından sonra reaksiyon kabında altın nanopartikül varlığının ilk tespitinin ardından, reaksiyon karışımının sarıdan pembeye dönüşmüştür; Uv-vis spektrofotometre, biyosentezlenmiş AuNP'leri karakterize etmek için bir sonraki adımdı. Bu çalışmada elde edilen sonuç, biyosentezlenen AuNP'lerin Şekil 4.4'te gösterildiği gibi 537 nm'de maksimum pik sergilediğini göstermiştir.



Şekil 4.4 C. freundii (M18) tarafından biyosentezlenen altın nanoparçacıkların UV–Vis spektrofotometrisidir

537 nm'de maksimum bir tepe noktası küresel AuNP'ler için karakteristik olduğundan (Kalathil *et al.* 2011), UV-vis spektroskopisinin metal nanoparçacıkların şeklini ve boyutunu, tepe noktasının konumunu ve şeklini dikkatlice gözlemleyerek incelemek için kullanıldığı yaygın olarak bilinmektedir (Aihara *et al.* 1998; Baker and Satish, 2015). Spektroskopik teknik kullanılarak ortalama parçacık boyutları hesaplanabilir; ancak mevcut çalışmada bu tekniği kullanarak nanoparçacıkların boyutu tahmin edilememiştir.

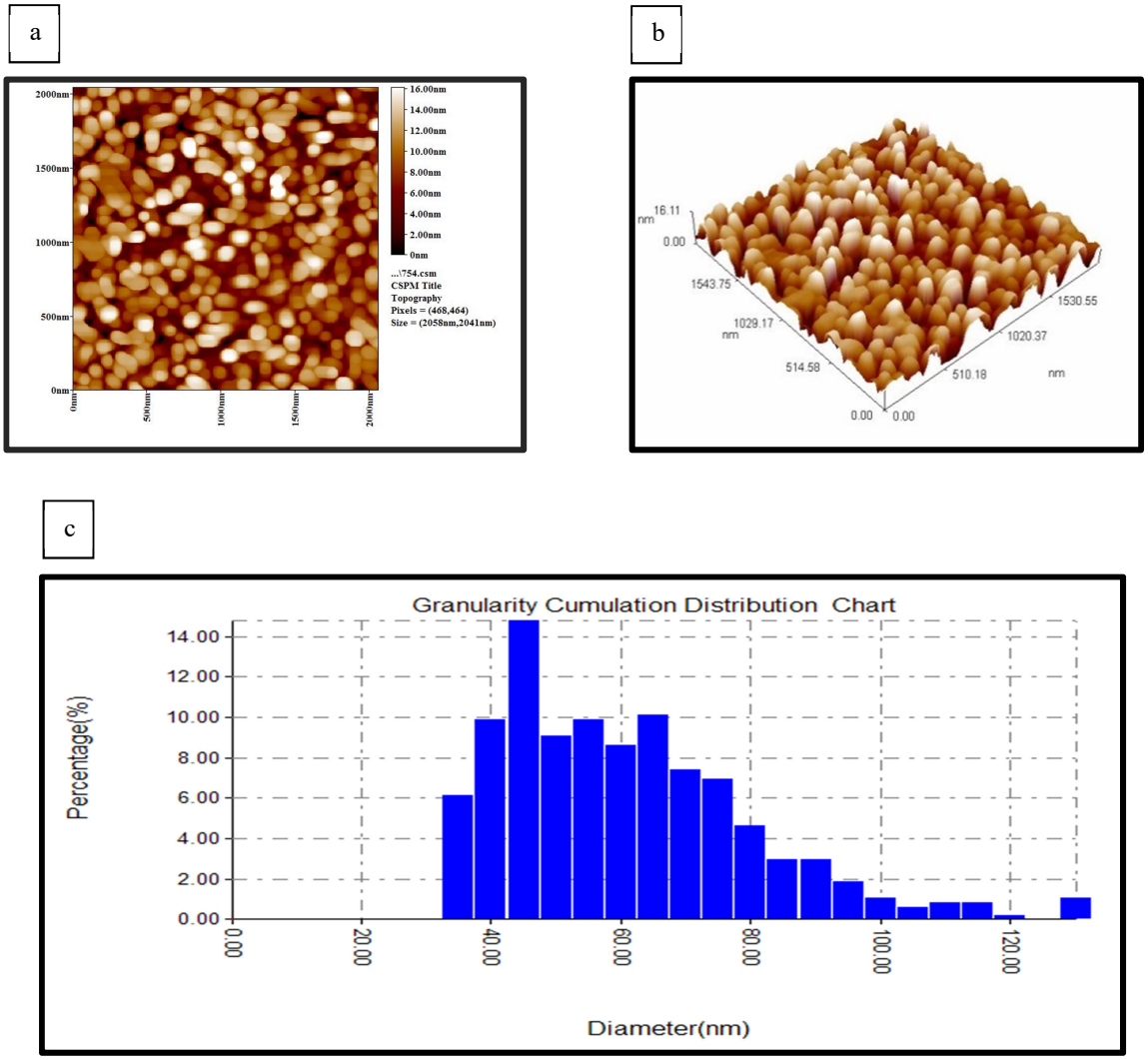
Sonuçlar, renk değişiminin nanoparçacıkların oluşumunun saptanmasında önemli bir rol oynadığını gösterdi ve bu, zaman ilerledikçe absorbans ile birlikte piklerin ortaya çıkmasıyla doğrulanmıştır. Zirveler, altın nanoparçacığın oluşum yüzeyi plazmon rezonansının (SPR) spektroskopik bir imzasını vermiştir (Kumar *et al.* 2015). 2007'de Grace and Pandian, sarıdan şarap kırmızısına (yakut kırmızısı) renk değişiminin altın nanoparçacıkların oluşumunu gösterdiğini kanıtladılar. Son çalışma bu çalışma ile uyumluydu, koyu renk görünümünün nanoparçacıkların oluşumunu doğruladığını ve Au^{3}'ün Au'ya etkili bir şekilde indirgendiğini bildirmektedir.

4.3.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) analizi

Atomik kuvvet mikroskobu, AuNP'lerin biyosentezini karakterize etmek için hem iki boyutlu hem de üç boyutlu morfolojiye ek olarak ortalama çaplarını tespit ederek doğrulayıcı bir teknik olarak kullanıldı. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, *C. freundii* tarafından biyosentezlenen AuNP'lerin Çizelge 4.2 ve Şekil (4.5 a, b ve c)'de gösterildiği gibi ortalama 58,28 nm çapa sahip olduğunu göstermiştir.

Çizelge 4.2 *C. freundii* (M18) tarafından Altın Nanoparçacık biyosentezinin Kümülasyon boyutu; AFM tekniği ile ölçülmüştür

Çap (nm)	Hacim (%)	Kümülasyon (%)	Çap (nm)	Hacim (%)	Kümülasyon (%)	Çap (nm)	Hacim (%)	Kümülasyon (%)
35,00	6,12	6,12	70,00	7,38	75,95			
40,00	9,92	16,03	75,00	6,96	82,91	105,00	0,63	97,05
45,00	14,77	30,80	80,00	4,64	87,55	110,00	0,84	97,89
50,00	9,07	39,87	85,00	2,95	90,51	115,00	0,84	98,73
55,00	9,92	49,79	90,00	2,95	93,46	120,00	0,21	98,95
60,00	8,65	58,44	95,00	1,90	95,36	130,00	1,05	100,00
65,00	10,13	68,57	100,0	1,05	96,41			



Şekil 4.5 AFM altında *C. freundii* (M18) tarafından biyosentezlenen AuNP'ler

(a) Altın Nanopartikül sentezinin 2 boyutlu görüntüsü

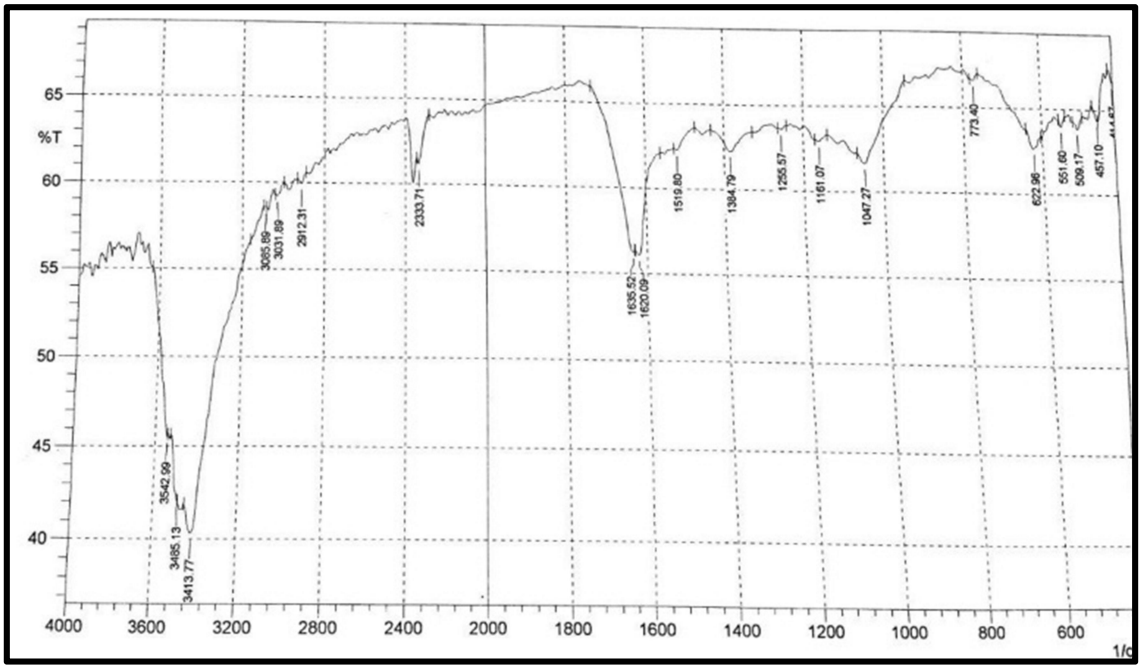
(b) Altın Nanopartikül sentezinin 3 boyutlu görüntüsü

(c) Altın nanoparçacık sentezinin Taneciklik Dağılım Tablosu

4.3.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) analizi

Altın iyonlarının indirgenmesinde ve Au (III) ile inkübe edilmiş *C. freundii*'den biyosentezlenmiş AuNP'lerin stabilizasyonunda yer alan olası fonksiyonel biyomolekül gruplarını belirlemek için FTIR gerçekleştirilmiştir. Biyosentezlenmiş altın

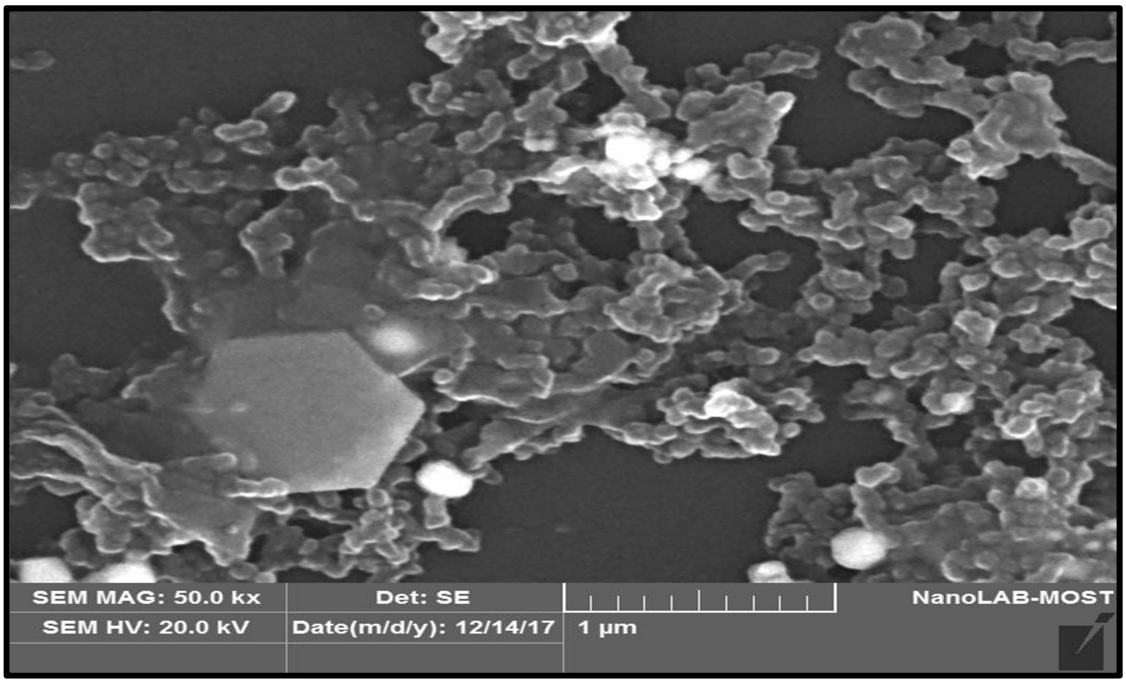
nanopartiküllerin FTIR spektrumu, nanopartiküllerin 450-4000 cm-1 bölgesinde yaklaşık 1047,27, 1620,09, 2333,71 ve 3413,77 cm-1'de yer alan absorpsiyon tepe noktaları gösterdiğini göstermiştir (Şekil 4.6). 3413,77 cm-1'deki pikler O-H gerdirmeye atanmıştır. 2333,71 cm-1'deki bant, proteinin metilen gruplarının C-H gerilmesi ile bağlantılıdır. 1047,27 ve 1620,09 cm-1'deki bant, proteinlerdeki karbonil gerilmesi nedeniyle birincil aminlerin N-H bükülmesine karşılık gelir.



Şekil 4.6 *C. freundii* (M18) tarafından biyosentezlenen altın nanoparçacıklarının FTIR analizi

4.3.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Renk değişimi, UV-vis spektroskopisi, FTIR ve AFM analizleri ile karakterize edildikten sonra; Biyosentezlenen AuNP'ler, tahmin edilen boyut ve morfolojiyi saptamak için SEM altında incelendi ve sonuç AuNP'lerin oluşumunu doğruladı. SEM görüntü çalışması, nano boyutlu AuNP'lerin oluşumunu gösterdi (Şekil 4.7). Nanoparçacıkların morfolojisi kabaca küreseldi, ve 30-60 nm boyut aralığında, bu da AFM sonuçlarını doğruluyor, parçacıkların yığınları küresel şekildeydi.



Şekil 4.7 *C. freundii* (M18) tarafından biyosentezlenmiş AuNP'ler; SEM altında, küresel şekle ve (30-60) arasında değişen çapa sahiptir

4.4 AuNP'lerin Biyosentezinin Gıda Kaynaklı *C. freundii* ile Optimizasyonu

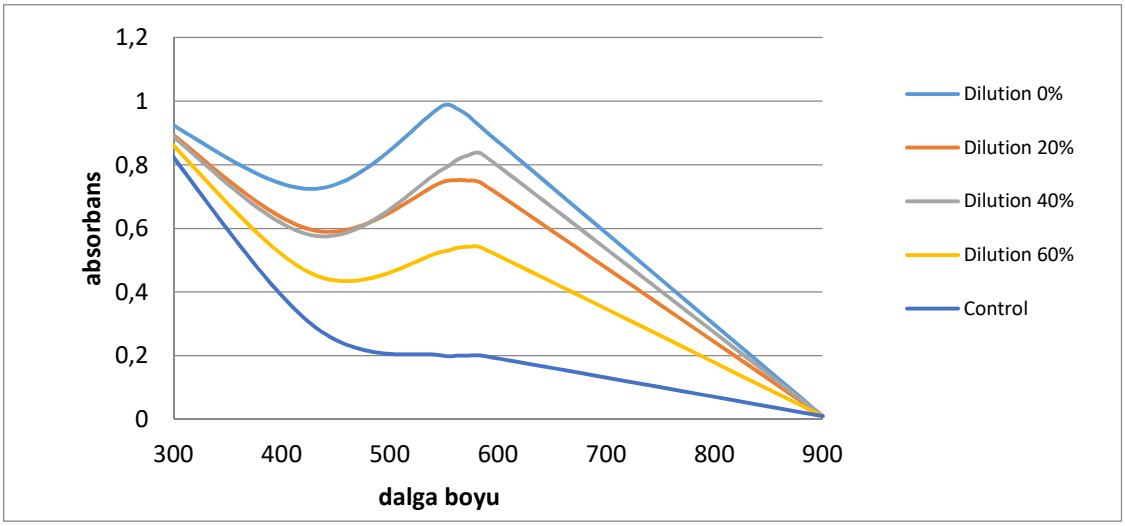
AuNP'leri üretmek için en uygun koşulu değerlendirmek için spektrumda birkaç parametre incelendi; bu çalışmada (hücre filtratının konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve altın tuzu konsantrasyonu) optimize edilmiştir.

4.4.1 Hücre Filtratının Konsantrasyonunun Optimizasyonu

C. freundii'nin canlı hücre filtratının dört dilüsyonu incelendi; ve sonuç, test edilen dört seyreltmede biyosentezlenen AuNP'lerin olduğunu gösterdi; ve AFM ve UV–Vis spektrofotometrisi ile elde edilen sonuç, AuNP'lerin boyutunun konsantrasyonlardan etkilendiğini doğrular. Seyreltilmemiş bakteri ekstraktında gözlemlenen pik, diğer seyreltmelerde elde edilen piklere kıyasla çok keskindir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.8).

Çizelge 4.3 Farklı hücre süzüntü konsantrasyonlarında biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanoparçacıkları; AFM tekniği ile ölçülmüştür

Seyreltme %	AFM kullanılarak ölçülen nm cinsinden ortalama boyut.
0% seyreltme	66,81
20% seyreltme	96,14
40% seyreltme	70,13
60% seyreltme	100,53

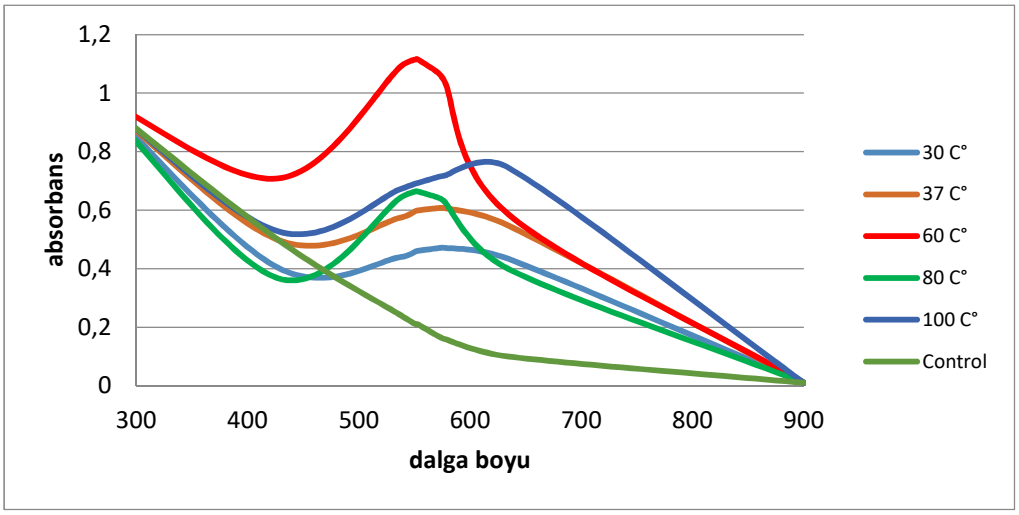


Şekil 4.8 *C. freundii* (M18) tarafından biyolojik olarak indirgendikten sonra AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; Biyo-indirgemede kullanılan hücresiz süzüntünün farklı dilüsyonlarının (%0-60 dilüsyon) etkisi

Nanopartiküllerin biyosentezinde hücre süzüntüsü ve metal tuzu konsantrasyon oranının çok önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Iravani 2011). Önceki rapor, gümüş nanoparçacıkların ve GNP'lerin bitki aracılı sentezi durumunda, ilgili iyonların %100 dönüşümünden %5 yaprak suyunun sorumlu olduğunu ileri sürmektedir. Bununla birlikte, mantar durumunda %100 mantar filtratı maksimum gümüş nanoparçacık sentezi göstermiştir (Roy *et al.* 2016).

4.4.2 Sıcaklık Optimizasyonu

Görsel gözlem, reaksiyon karışımının artan sıcaklığı ile nanoparçacık çözeltisinin renginin yoğunluğunda bir artış olduğunu gösterdi. UV-vis spektroskopisini takiben alınan tüm absorpsiyon spektrumları arasında, 60°C'de tutulan filtratta 551 nm civarında keskin bir tepe elde edildi. 100°C'de absorpsiyon bantları, AuNP'lerin üretimindeki azalmanın göstergesi olan 60°C'ye kıyasla düşük tepe yoğunluğuna sahiptir. Mevcut durumda 60°C sıcaklık, Şekil 4.9'da gösterildiği gibi AuNP sentezi için optimum sıcaklık olarak kabul edilebilir.



Şekil 4.9 C. freundii (M18) tarafından biyolojik olarak indirgendikten sonra AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; farklı inkübasyon sıcaklıklarının (30°C, 37°C, 60°C, 80°C ve 100°C) biyo-indirgeme üzerindeki etkisini gösterir

Öte yandan, AFM analizi, Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi, 80°C'de en küçük altın nanoparçacıklarının biyosentezlendiğini göstermiştir

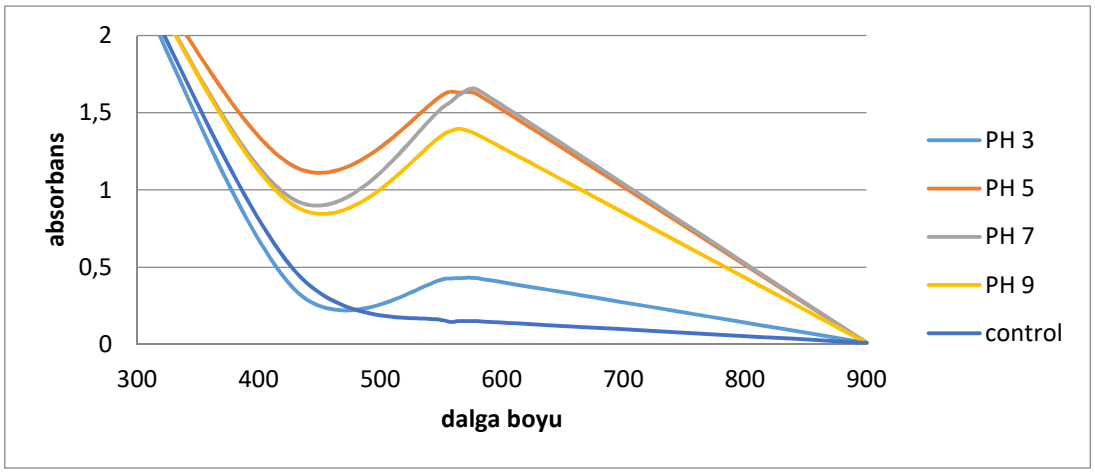
Çizelge 4.4 Farklı sıcaklıklarda biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanopartiküller; AFM tekniği ile ölçülmüştür

Sıcaklıklar	AFM kullanılarak ölçülen nm cinsinden ortalama boyut
4C°	98,24
30C°	117
37C°	96
60C°	110,37
80C°	70,81
100C°	108

Tüm deneysel kurulumlar için tüm reaktiflerin konsantrasyonu sabit olduğundan, farklı sıcaklıklardaki değişken absorbans verileri şüphesiz AuNP'lerin biyosentezinin sıcaklığa bağlı olduğu anlamına gelir. Dolayısıyla, bu sonuçlar sıcaklığın AuNP'lerin sentezinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Reaksiyon karışımının sıcaklığının artmasıyla reaksiyon kinetiğinin arttığı ve bu da çekirdeklenme sürecini kolaylaştırdığı bilinmektedir. Daha düşük sıcaklıkta, indirgeme reaksiyonu uzun süre içinde tam olarak gerçekleştirilememiştir. Daha önceki raporlar ayrıca reaksiyon sıcaklığının artmasının nanoparçacıkların sentezini etkilediğini öne sürmüştür (Roy *et al.* 2016).

4.4.3 pH optimizasyonu

Farklı pH değerleri (pH 3, 5, 7 ve 9) *C. freundii* ile altın nanoparçacık biyosentezi üzerindeki etkileri için araştırıldı; Diğer tüm parametreler sabitken, her reaksiyon kabında pH değerleri değiştirildi ve sonuçlar pH5 ve pH 7'de keskin bir pik olduğunu ve pH 3'te zayıf sentez olduğunu gösterdi. İlginç bir şekilde, pH 3'te, reaksiyon karışımının ilgili pH'ında, Şekil 4.10'da gösterildiği gibi, hemen hemen geniş bir absorbans piki ve açık renklenme gözlemlendi.



Şekil 4.10 Biyolojik indirgeme *C. freundii (*M18) sonrasında AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; biyo-indirgemede kullanılan reaksiyon karışımının farklı pH değerlerinin (3, 5, 7 ve 9) etkisini gösterir

Tespit edildikten sonra; farklı pH değerlerindeki biyosentez AuNP'leri AFM analizine tabi tutulmuştur; ve Çizelge 4.5 elde edilen sonuçları temsil etmektedir.

Çizelge 4.5 Farklı pH değerlerinde (pH 3 ila pH 9) biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanoparçacıkları; AFM tekniği ile ölçülmüştür

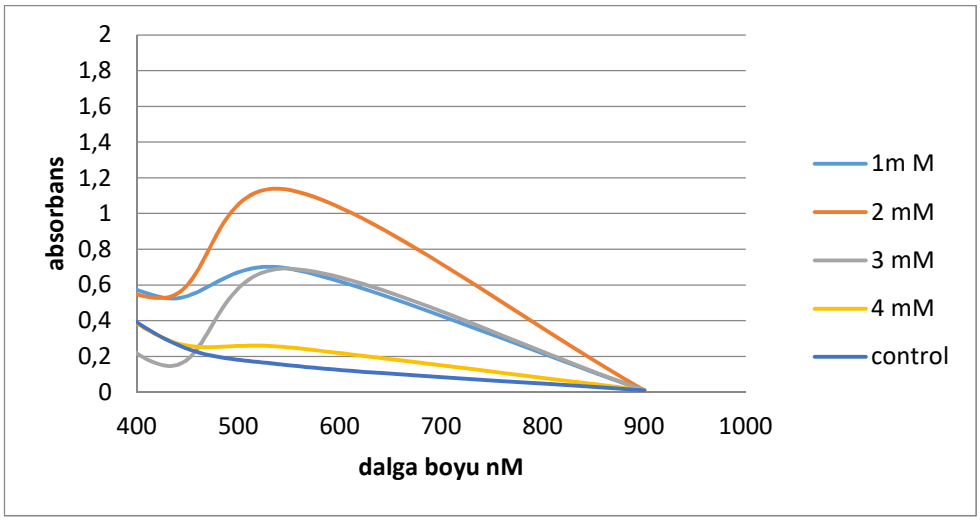
pH	AFM kullanılarak ölçülen nm cinsinden ortalama boyut
pH 3	74,68
pH 5	68,71
pH 7	100,85
pH 9	84,08

Bu sonuçlar, AuNP'lerin etkili biyosentezinin nötr ve alkali pH'ta gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca AFM sonucu, PH 5'te en küçük biyosentezlenmiş altın nanoparçacık boyutunu gösterdi. Bu nedenle, bunun (5 ila 9) pH değeri aralığının AuNP sentezi için uygun olduğu düşünüldü. Böylece, asidik pH ile karşılaştırıldığında, nötr pH sentezi etkilemiştir. Nanoparçacık sentezini etkileyen benzer bir pH raporu daha önce rapor edilmiştir (Mittal *et al.* 2012). Bu aynı zamanda metal iyonlarının indirgeme reaksiyonunu gerçekleştirmek için bir alkali iyon ilavesinin gerekli olduğuna dair

önceki raporlarla da uyumludur (Sanghi and Verma 2009). Hidroksit iyonunun yokluğunda, metal iyonlarının indirgenmesi için geçen sürenin daha uzun olduğu bildirildi, bu da indirgeme reaksiyonu için OH-iyonlarının gerekliliğini gösterir. pH'ın nanoparçacık sentezi üzerindeki etkisi, daha önce üç değerlikli aurumun biyolojik olarak indirgenmesi durumunda açıklanmıştır (Feng *et al.* 2007).

4.4.4 Altın İyon Konsantrasyonunun Optimizasyonu

AuNP'lerin C. freundii tarafından biyosentezi üzerindeki etkilerini saptamak için farklı tuz konsantrasyonları incelenmiştir. Sonuç, 2mM'lik konsantrasyonun, C. freundii tarafından AuNP'lerin biyosentezi için en iyi konsantrasyon olduğunu gösterdi. 2 mM'lik konsantrasyon, UV'ye karşı absorpsiyon spektrumu ile ölçüldüğünde pembe bir renklenme ve keskin bir tepe noktası ile sonuçlandı (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 *C. freundii* (M18) tarafından biyolojik olarak indirgendikten sonra AuNP'lerin UV-vis absorpsiyon spektrumları; Biyo-indirgemede kullanılan farklı altın tuzu konsantrasyonlarının (1-4 mM) etkisi

AFM analizi ise, Çizelge 4.6'da gösterildiği gibi, en küçük boyutlu AuNP'lerin (56 nm) oluşumunu ortaya çıkardı.

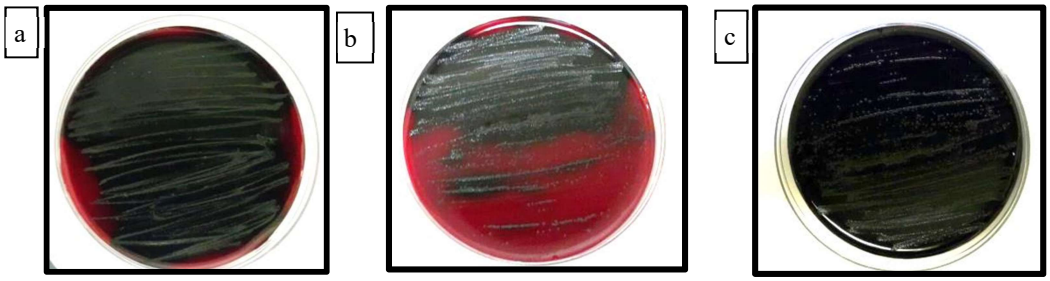
Çizelge 4.6 Farklı altın tuzu konsantrasyonlarında biyosentezlenen ortalama boyuttaki altın nanoparçacıkları; AFM tekniği ile ölçülmüştür

mM cinsinden konsantrasyon	Altın nanoparçacıkların nm cinsinden boyutu.
1	96
2	56
3	85
4	115
mM cinsinden konsantrasyon	Altın nanoparçacıkların nm cinsinden boyutu.
1	96
2	56
3	85
4	115

2 mM'lik konsantrasyonda, parçacık büyümesi süreci artar, bu da saptanabilir AuNP oluşumuyla sonuçlanır. 1 mM 2 mM, 3 mM, 4 mM tuz konsantrasyonundaki artış, poli eşitsizliği olan AuNP'lerin oluşumuna neden olur; geniş bir spektrum olarak açıkça gözlemlenebilmektedir (Kathiresan *et al.* 2009).

4.5 Congo Red Agar tarafından biyofilm üretiminin tespiti

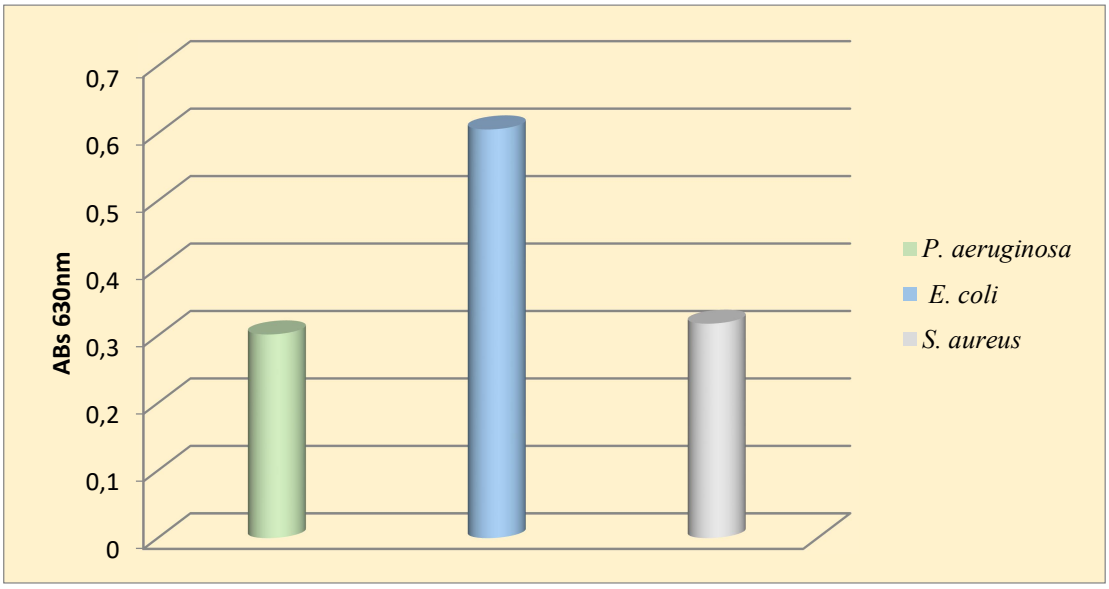
E. coli, P. aeruginosa ve *S. aureus*'un klinik izolatlarının slime tabakası oluşturma yeteneklerinin değerlendirilmesi için; Kongo Red Agar yöntemi uygulanmıştır; ve sonuçlar klinik izolatların balçık tabakası üreticileri olduğunu ortaya koydu; 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra besiyerinde siyah koloniler olarak göründü (Şekil 4.12).



Şekil 4.12 Klinik izolatları ile Kongo kırmızısı agar kültürü (a) *P. aeruginosa* (P3) (b) *E. coli* (E1) (c) *S. aureus* (S2): Balçık tabakası oluşumundan kaynaklanan koloniler (24 saat 37 °C'de inkübasyon. aerobik olarak)

4.6 Mikrotitre plakası ile biyofilm üretiminin tespiti

Klinik *E. coli, P.aeruginosa* ve *S. aureus* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesini saptamak için, (Di Rosa *et al.* 2006) tarafından açıklanan mikrotitre plakası in vitro tahlili kullanıldı. *P. aeruginosa, E. coli* ve *S. aureus*'un test edilen tüm izolatları, Şekil 4.13'de gösterildiği gibi biyofilm oluşturma konusunda güçlü bir yeteneğe sahiptir.

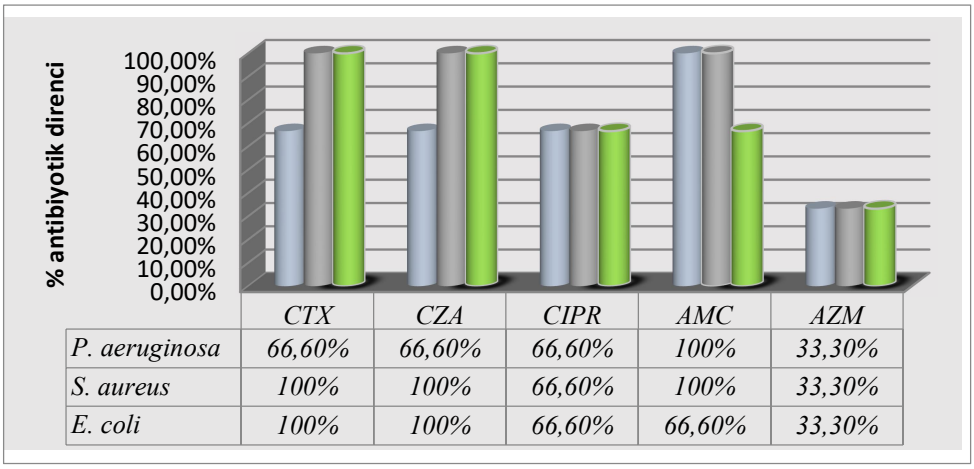


Şekil 4.13 *P. aeruginosa, E. coli* ve *S. aureus* klinik izolatlarının biyofilm oluşturma kapasitesi. 96 kuyucuklu düz tabanlı polistiren plakalar, 24 saat 37◦C'de çalkalanmadan

inkübe edildi. Gözlere bağlı hücreler, % 0,1 (a/h) kristal menekşe ile boyandı. 630 nm'de absorpsiyon, biyofilm oluşumunu ölçmek için ölçülmüştür

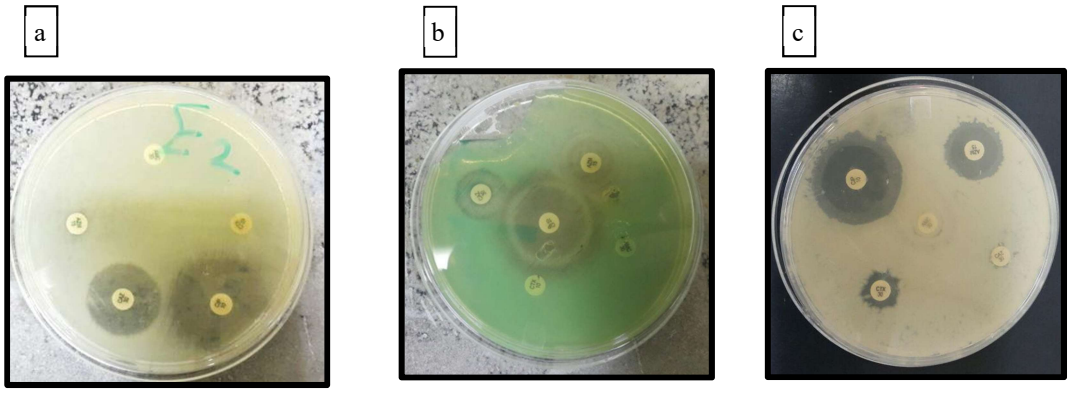
4.7 Antibiyotik Duyarlılığı

Dokuz izolatın (*E. coli, P. aeruginosa* ve *S. aureus*) antibiyotik duyarlılık paterni; beş antibiyotik seftazidim (CAZ), azitromisin (AZM), amoksisilin-klavulanat (AMC), CIPofloksasin (CIP) ve sefoksitin (CTX)'e; Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (NCCL'ler) tarafından önerilen kılavuzlara göre disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Farklı klinik örneklerden izole edilen bu klinik izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Şekil 4.14 ve 4.15'de gösterilmiştir.



	CTX	CZA	CIPR	AMC	AZM
P. aeruginosa	*66,60%*	*66,60%*	*66,60%*	*100%*	*33,30%*
S. aureus	*100%*	*100%*	*66,60%*	*100%*	*33,30%*
E. coli	*100%*	*100%*	*66,60%*	*66,60%*	*33,30%*

Şekil 4.14 Klinik izolatların antibiyogram sonuçları: *E. coli, P. aeruginosa* ve *S. aureus*, beş antibiyotik seftazidim, azitromisin, amoksisilin-klavulanat, CIP ofloksasin, sefoksitin



Şekil 4.15 Klinik Antibiyotik Duyarlılık Modeli a- *E. coli* (E2), b- *P. aeruginosa* (P2), c- *S. aureus* (S2), (Disc- Difüzyon Metodu)'na göre çeşitli antibiyotiklere karşı izole eder

Bu çalışma ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları, *S. aureus* izolatlarının (%100) AMC, CAZ ve CTX antibiyotiklerine dirençli olduğunu göstermiştir (Genişletilmiş spektrumlu β-laktama); *S. aureus* izolatlarının % 66,6'sı ve %3'ü, CIP ve AZM antibiyotiğine karşı sırasıyla direnci göstermiştir. Tüm *E. coli* izolatları (%100) CTX ve CAZ'a dirençliydi; bu sonuçlar, Yaseen ve Al-Mathkhury (2015) tarafından yapılan yerel çalışmanın sonuçlarına oldukça benzerdi; ve (2) *E. coli* izolatlarının %66,6'sı CIP ve AMC'ye dirençliydi. (3) *P. aeruginosa* izolatlarının %100'ü AMC'ye ve (2) %66,6'sı CAZ, CTX, CIP'ye ve (1) %33,3'ü AZM'ye dirençli iken, bu sonuç Asmaa *et al.* (2015) ile biraz benzerlik göstermektedir. GSBL antibiyotiklerinin P. aeruginosa'ya karşı en az etkili olduğu ve direncin CTX ve CAZ için sırasıyla %86,0 ve %88,3'e ulaştığı tespit edilmiştir. *E. coli, P. aeruginosa* ve *S. aureus* suşları arasında β-laktam antibiyotik direnç izolatlarındaki bu artış, çoğu durumda β-laktam halkasını yok eden ve onu inaktive eden β-laktamaz enziminin üretimi ile açıklanabilir; ve bu enzim, suşlar arasında aktarımı kolay olan plazmit tarafından kodlanmıştır (Brooks *et al.* 2007). İlaç inaktivasyonu veya modifikasyonu; ampisilini yok eden beta-laktamaz üreten K. pneumoniae gibidir (intrinsik). İlaç birikiminin veya hücreye erişimin azaltılması; misal; E. coli, değiştirilmiş porinler veya akış pompaları ile, tetrasiklinlerin antibiyotik konsantrasyonunu azaltırır; veya aminoglikozitlerin alımını sağlamak için oksidatif metabolizması olmayan anaerobik bakteriler (Shaikh *et al.* 2015).

4.8 Antibakteriyel Aktivitenin Değerlendirilmesi

4.8.1 Altın Nanoparçacığın Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

AuNP'lerin antibakteriyel aktivitesini saptamak için Standart Et Suyu Seyreltme Yöntemi kullanıldı; AuNP'lerin (500, 250, 125, 62,5, 31,25 ve 15,625) µg/mL seri dilüsyonlarını hazırlandı; ve antibakteriyel aktivite, minimum inhibitör konsantrasyona (MIC) bağlı olarak belirlendi; Çizelge 4.7 bu sonuçları gösterdi.

Çizelge 4.7 *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un klinik izolatlarına karşı AuNP'lerin antibakteriyel aktivitesi

Bakteriyel İzolatlar	Altın nanopartikül konsantrasyonları					
	500µg/mL	250µg/mL	125µg/mL	62,5µg/mL	31,25µg/mL	15,625µg/mL
E1	+	+	+	+	-	-
E2	+	+	+	+	-	-
E3	+	+	+	+	-	-
P1	+	+	+	+	-	-
P2	+	+	+	+	+	-
P3	+	+	+	+	-	-
S1	+	+	+	+	-	-
S2	+	+	+	+	-	-
S3	+	+	+	+	+	-

* Pozitif (+), bakteri üremesinin inhibisyonu anlamına gelir.

* Negatif (-) bakteri üremesi anlamına gelir.

AuNP'lerin MIC'si dokuz klinik *E. coli* (E1, E2 ve E3), *P. aeruginosa* (P1, P2 ve P3) ve *S. aureus* (S1, S2 ve S3) izolatına karşı belirlendi; (E1, E2, E3, P1, P3, S1 ve S2) için 62,5 µg/mL ve (P2 ve S3) için 31,25 µg/mL idi. Bahsedilen sonuca göre, üç bakteri türünün dokuz izolatının tamamının büyümesini engelleyen konsantrasyona (62,5 µg/mL) sahip altın nanopartiküllerin yüksek etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Biyojenik AuNP'ler hakkında önceki araştırmalar, altın nanopartiküllerin *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı aynı antibakteriyel aktivite modelini de saptadı; belirtildiği gibi, MİK değerleri *E. coli* için 75 µg/mL ve 50 µg/mL idi. (Khan *et al.* 2016). Başka bir çalışma,

Al-Nori (2012) tarafından bildirilen, *E.coli* ve *S. aureus'*un altın ve altın nanopartiküller tarafından inhibisyonunu bulnmuştur. Altın nanoparçacıkların bakteriler üzerinde etkili olduğu pek çok çalışma ile açıklanan mekanizmalardir; bu duvarlarda gözenek oluşumuna yol açan bakterilerin hücre duvarı ile etkileşime bağlı olabileceği gibi, nanopartiküllerin çukurlarda birikmesi hücre zarının geçirgenliğine neden olmuştur (Sondi *et al.* 2004; Khan *et al.* 2014). Bakteri hücrelerinin ölümüne neden olan diğer bir neden, nanopartiküllerin hücrelerin sitoplazmasındaki proteinler üzerindeki etkisi olabilir; bu hücre fonksiyonundaki düzenin bozulmasına yol açar; ayrıca nanopartiküller, replikasyon mekanizmasını bozacak olan DNA replikasyonunu etkileyebilir (Pal *et al.* 2007).

Altın nanoparçacıkların etki şekline ilişkin önceki çalışmalarda kaydedilen diğer öneri, altın nanoparçacığın antibakteriyel etkiyi iki adımda uyguladığıdır: ilk olarak, membran potansiyelini değiştirdiler ve adenozin trifosfat sentaz (ATP) aktivitelerini azalttılar, böylece metabolizma sürecini azalttılar; ikincisi, tRNA bağlanması için ribozomun alt birimini reddettiler, böylece biyolojik mekanizmasını çökerttiler. Geliştirilmiş yüzey alanına sahip küçük boyutlu altın nanopartiküller, bakteri yüzeyine çekilen ve mikroorganizma ile doğrudan etkileşime neden olan bazı elektronik etkiler üretmiştir (Cui *et al.* 2012; Shamaila *et al.* 2016).

4.8.2 Amoksisilin/klavulanatın Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

9 E. *coli,* P. *aeruginosa* ve S. *aureus* izolatına karşı Amoksisilin/klavulanatın antibakteriyel aktivitesi, Standart Broth Seyreltme Metodu kullanılarak belirlendi. AMC'nin MIC değerleri, E. *coli* (E1 ve E2) ve S. *aureus* (S1, S2 ve S3) için klinik izolatlara karşı 500 ug/mL olarak belirlendi; ve P. *aeruginosa* (P1, P2 ve P3) ve E. *coli* (E3) için 1000 ug/mL idi; Çizelge 4.8'de açıklanmıştır.

Çizelge 4.8 *E. coli, P. aeruginosa* ve *S. aureus*'un klinik izolatlarına karşı Amoksisilin/klavulanatın antibakteriyel aktivitesi

Bakteriyel izolatlar	Amoksisilin/klavulanat						
	1000µg/mL	500µg/mL	250µg/mL	125µg/mL	62,5µg/mL	31,25µg/mL	15,625µg/mL
E1	+	+	-	-	-	-	-
E2	+	+	-	-	-	-	-
E3	+	-	-	-	-	-	-
P1	+	-	-	-	-	-	-
P2	+	-	-	-	-	-	-
P3	+	-	-	-	-	-	-
S1	+	+	-	-	-	-	-
S2	+	+	-	-	-	-	-
S3	+	+	-	-	-	-	-

* Pozitif (+), bakteri üremesinin inhibisyonu anlamına gelir.

* Negatif (-) bakteri üremesi anlamına gelir.

Yapılan bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (El-Shouny *et al.* 2018). *P. aeruginosa* izolatlarının amoksisilin/klavulanata yüksek dirençliydi. E. coli ve S. aureus izolatları son çalışmalarda Amoksisilin/klavulanata karşı yüksek direnç göstermiştir (Hubbard *et al.* 2018; Othman *et al.* 2018). Artan bu direnç seviyeleri, antibiyotiklerin insan topluluğu, hastaneler, çiftlikler ve evcil hayvanlar gibi farklı sektörlerde beşeri tıpta kullanılmasına bağlı olabilir; Antimikrobiyal ajanların yanlış kullanımı ve aşırı kullanımı, artan antibiyotik direncinin ana nedenini temsil edebilir (Visciano *et al.* 2014; Othman *et al.* 2018).

4.8.3 Amoksisilin/klavulanat ile altın nanopartiküllerin, klinik bakteri izolatlarına karşı kombinasyon etkisi

Bu çalışmada kullanılan üç tedavi (Amoksisilin/klavulanat, altın nanopartiküller ve Amoksisilin/klavulanat + altın nanopartiküller kombinasyonu) arasındaki karşılaştırma, Standart Broth Seyreltme Metodu kullanılarak antibakteriyel aktivite gösteren en iyinin belirlenmesine dayandırılmıştır. *E. coli, P. aeruginosa* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel aktivite testi verileri, (Amoksisilin/klavulanat + altın nanopartiküller)

kombinasyonunun, AuNP'lerin alt inhibitör konsantrasyonları olan çoğu izolatta test edilen üç tedavi arasında en yüksek antibakteriyel aktiviteyi gösterdiğini ortaya koymuştur. Amoksisilin/klavulanatın tüm inhibitör konsantrasyonları ile karıştırıldı ve sonuç, bunların hepsinin bu çalışmada kullanılan izolatların %100'ünün antibakteriyel ajanı olarak etkili olduğunu ortaya koydu. Kombinasyon bağlı olduğunda sinerjik etki ortaya çıkmıştır. Bu veriler Çizelge 4.9'da gösterildi.

Çizelge 4.9 E. *coli,* P. *aeruginosa* ve S. *aureus'*un klinik izolatlarına karşı AuNP'lerin, AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi

Bakteriyel izolatlari	Amoksisilin/klavulanat konsantrasyonu						konsantrasyon AuNPs
	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62,5 µg/mL	31,25 µg/mL	15,625 µg/mL	
E1	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
E2	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
E3	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
P1	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
P2	+	+	+	+	+	+	15,625µg/mL
P3	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
S1	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
S2	+	+	+	+	+	+	31,25µg/mL
S3	+	+	+	+	+	+	15,625µg/mL

* Pozitif (+), bakteri üremesinin inhibisyonu anlamına gelir.

* Negatif (-) bakteri üremesi anlamına gelir.

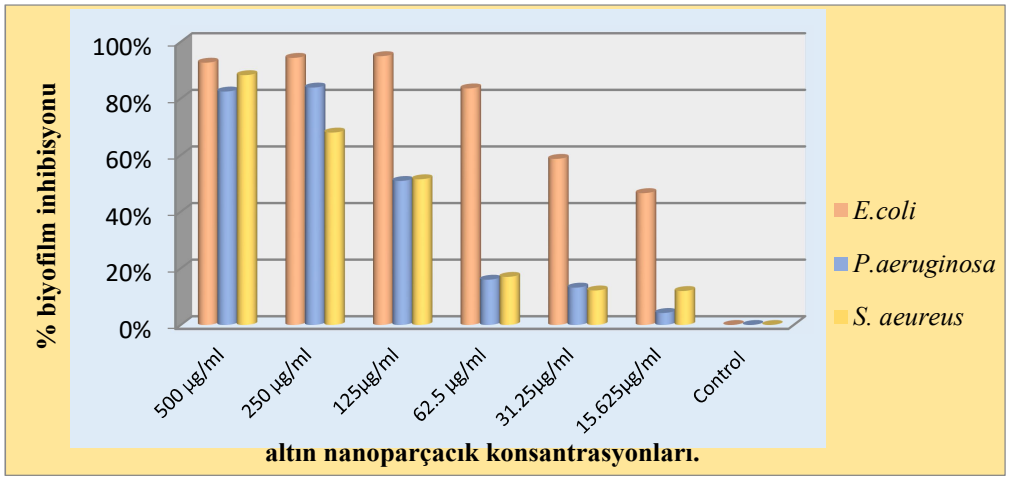
Elde edilen veriler, altın nanopartiküller ve Amoksisilin/klavulanat kombinasyonunun bu çalışmada kullanılan bakterilerin farklı izolatlarına karşı geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Altın nanopartiküllerin birbirleriyle konjugasyon yoluyla Amoksisilin/klavulanat aktivitesini arttırması nedeniyle yakın zamanda yapılan bir çalışmanın kombinasyonunda hedef bakterilere karşı daha yüksek aktivite gözlendi. Polimerik nanopartiküller, yüksek yapısal bütünlükleri, depolama sırasındaki stabiliteleri, hazırlama ve işlevselleştirme kolaylığı ve kontrollü salım yetenekleri nedeniyle ilaç dağıtım araçları olarak oldukça çekicidir

(Cheow and Hadinoto 2014). Altın nanopartiküllerin tek başına veya tek başına antibiyotik kullanılması yerine antibiyotikler, antikorlar ve probiyotiklerle kombinasyonu kullanıldığında antimikrobiyal aktivitenin arttığını kanıtlayan birkaç çalışma vardır (Zharov *et al.* 2006; Pissuwan *et al.* 2007; Huang *et al.* 2007). Altın nanopartiküllerin vankomisin ile kombinasyonu, E. *coli*'nin güçlü inhibitör büyümesini gösterdi (Gu *et al.* 2003). Vankomisin, amoksisilin ve penisilin G'nin antimikrobiyal aktivitesi, nanopartiküllerle birlikte kullanıldığında arttı (Shahverdi *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2012).

4.9 Biyofilm Dekolmanının Miktar Belirtmesi

P. *aeruginosa*, S. *aureus* ve E. *coli,* değişen konsantrasyonlarda (500, 250, 125, 62,5, 31,25 ve 15,625) ug/mL altın nanoparçacıkları ile işlendiğinde 96 oyuklu plakada 24 saat biyofilm oluşturmak üzere test edildi. Organizmaların biyofilm oluşturma yeteneği, CRA üzerinde kuru kristalli kolonilerin oluşumuyla doğrulandı. (Al-Khafaji *et al.* 2016; Arcos *et al.* 2017) tarafından açıklanan TCP testi en yaygın olarak kullanılır ve biyofilm oluşumunun tespiti için standart test olarak kabul edilir. Organizmanın biyofilm oluşturma yeteneği ve altın nanopartiküllerin çeşitli konsantrasyonlarının oluşumu engellemedeki etkisi 96 oyuklu bir plaka üzerinde kontrol edildi; burada altın nanoparçacık konsantrasyonunun artması biyofilm oluşumunu negatif olarak düzenlemiştir. *E. coli'*nin 125 ug/mL altın nanoparçacık konsantrasyonu ile muamele edilmesi, oluşan biyofilmin %95'inde bir azalma ile sonuçlandı; ve 15,625 ug/mL, control ($P \leq 0,05$) ile karşılaştırıldığında önemli bir farkla biyofilmde % 47'lik bir azalma ile sonuçlanmıştır. P. *aeruginosa* büyümesi, 250 ug/mL ile muamele edildiğinde oluşan biyofilmin % 84'ünde azalır; ve ($P \leq 0,05$)'de önemli bir farklılıkla 125 ug/mL ile tedavi edildiğinde % 50,94 azalır. *S. aureus* sonucu, 500ug/mL ile tedavi edildiğinde biyofilmde % 88,29 azalma ve 125ug/mL ile tedavi edildiğinde % 51,6 oranında azalma gösterdi. Bu veriler, altın nanoparçacıklarının *P. aeruginosa, S. aureus ve E. coli* biyofilmlerinin ayrılmasını indüklediğini ve ayrıca klinik olarak ulaşılabilir altın nanoparçacık konsantrasyonlarında meydana geldiğini göstermektedir. Nanopartiküllerin biyofilmlerin ve oluşan biyofilmlerin oluşumunu engelleme yeteneği, yukarıda bahsedilen organizmalara karşı kontrol edildi. Organizmaların büyümesi, üç

bakteri türü (*P.aeruginosa, S. aureus ve E.coli*) için 125 µg/mL konsantrasyonunda altın nanopartiküller tarafından etkili bir şekilde engellenmiştir ($P \leq 0,05$); Bunu Şekil 4.16 ve Çizelge 4.10'da gösterilmiştir



Şekil 4.16 Doku kültürü plakası yöntemiyle kontrol edilen anti-biyofilm yeteneği; artan konsantrasyonlarda altın nanoparçacıklarının eklenmesinin organizmaların biyofilm oluşturma ve kuyuların yüzeyine bağlanma yeteneklerini azalttığını göstermektedir. Neredeyse tamamlanmış 500 µg/mL altın nanopartiküller, *P. aeruginosa, S. aureus ve E. coli* tarafından ekzopolisakkarit sentezini inhibe etmiştir.

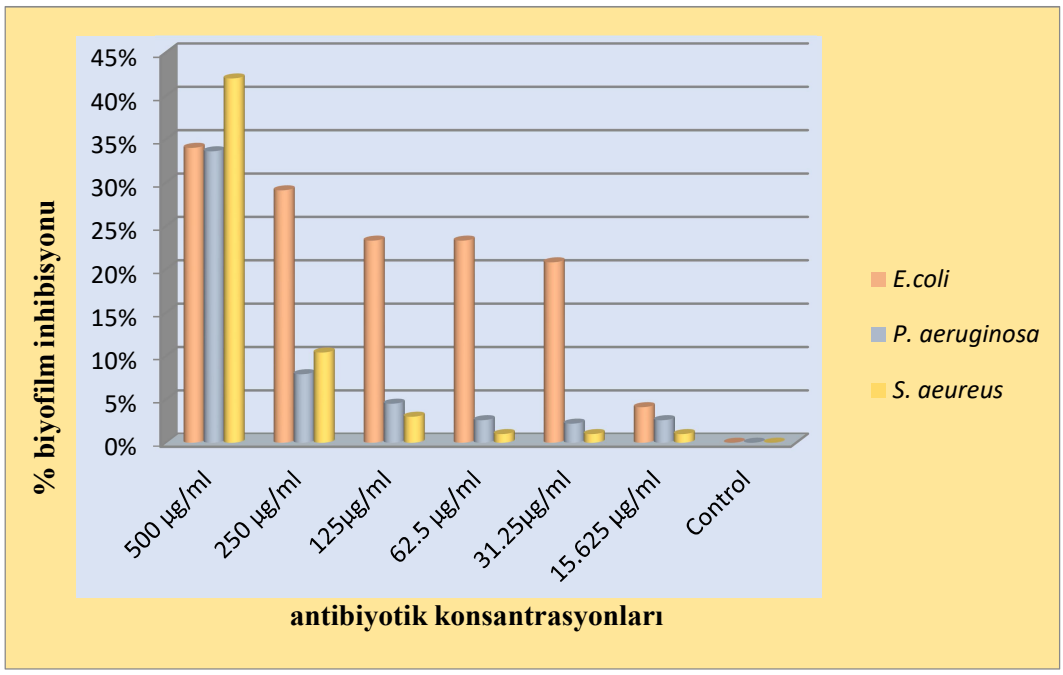
Çizelge 4.10 *E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus'un* klinik izolatlarının biyofilmine karşı AuNP'lerin etkisi

Nanopartikül Konsantrasyonları	**Bakteriyel izolatları**		
	E.coli	***P. aeruginosa***	***S. aeureus***
Kontrol	0,250 a ± 0,009	0,298 a ± 0,002	0,273 a ± 0,002
500 µg/mL	0,097 c ± 0,006	0,122 d ± 0,003	0,107 e ± 0,005
250 µg/mL	0,094 c ± 0,006	0,120 d ± 0,001	0,145 d ± 0,005
125 µg/mL	0,093 c ± 0,006	0,191 c ± 0,008	0,177 c ± 0,003
62,5 µg/mL	0,112 c ± 0,009	0,263 b ± 0,015	0,254 b ± 0,006
31,25 µg/mL	0,154 b ± 0,002	0,269 ab ± 0,010	0,254 b ± 0,005
15,625 µg/mL	0,173 b ± 0,027	0,288 ab ± 0,017	0,260 ab ± 0,006
LSD P ≤ 0,05	**0,035**	**0,030**	**0,014**

- Küçük harfler sütunda karşılaştırmayı gösterir; (LSD testi) Kullanarak, (P ≤ 0,05)'da benzer harfler ortalamaları arasında önemsiz farklardır.

P. aeruginosa, S. aureus ve E. coli'nin Amoksisilin/klavulanat ile tedavisi yüksek direnç gösterdi; biyofilm oluşumunda sadece yüksek konsantrasyonlarla muamele edildiğinde

(P ≤ 0,05) önemli bir düşüş gösterir, *E. coli* biyofilm oluşumunun 500µg/mL ile muamele edildiğinde % 34,5, ve aynı konsantrasyonla muamele edildiğinde *P. aeruginosa ve S. aureus* için sırasıyla % 32,3, % 42 oranında azaldığı görülmüştür; Şekil 4.17' de ve Çizelge 4.11'de gösterilmektedir.



Şekil 4.17 Doku kültürü plakası yöntemiyle kontrol edilen anti-biyofilm yeteneği; artan konsantrasyonlarda antibiyotik eklenmesinin *P. aeruginosa, S. aureus* ve *E. coli*'nin biyofilm oluşturma ve kuyuların yüzeyine yapışma yeteneğini azalttığını göstermektedir

Çizelge 4.11 *E. coli, P. aeruginosa ve S. aureus* klinik izolatlarının biyofilmine karşı AMC antibiyotiğinin etkisi

Antibiyotik Konsantrasyonları	Bakteriyel izolatlar		
	E.coli	***Pseudomonas aeruginosa***	***Staphylococus aeureus***
Kontrol	0,121 a ± 0,009	0,226 a ± 0,003	0,221 a ± 0,007
500 µg/mL	0,079 c ± 0,006	0,154 b ± 0,012	0,126 b ± 0,002
250 µg/mL	0,086 c ± 0,007	0,209 a ± 0,008	0,197 a ± 0,022
125 µg/mL	0,092 bc ± 0,006	0,210 a ± 0,005	0,213 a ± 0,015
62,5 µg/mL	0,094 bc ± 0,011	0,220 a ± 0,005	0,219 a ± 0,029
31,25 µg/mL	0,095 abc ± 0,011	0,221 a ± 0,001	0,216 a ± 0,023
15,625 µg/mL	0,115 ab ± 0,010	0,221 a ± 0,001	0,219 a ± 0,023
LSD P ≤ 0,05	**0,026**	**0,018**	**0,059**

- Küçük harfler sütunda karşılaştırmayı gösterir; (LSD testi) Kullanarak, (P ≤ 0,05)'da benzer harfler ortalamaları arasında önemsiz farklardır.

Antibiyotik sub-MİK değeri ile altın nanoparçacıkların sub-MİK değeri kombinasyonu, tek başına antibiyotik ile (P ≤ 0,05) düşük veya hiç fark göstermez; Şekil 4.18, 4.19, 4.20 'de, ve Çizelge 4.12, 4.13 ve 4.14'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.12 *E. coli'nin* klinik izolatlarına karşı, (31ug/mL) AuNP'lerin, (250ug/mL) AMC antibiyotik ile sinerjistik etkisi

nanopartiküller + antibiyotik	***E.coli***			
	Ortalama	±	SEM	**Sig.**
Kontrol	0,184	±	0,009	A
250+31 µg/mL	0,097	±	0,000	B
250 µg/mL	0,092	±	0,000	B
31 µg/mL	0,178	±	0,003	A
LSD P (≤ 0.05)	**0.015**			

- Küçük harfler sütunda karşılaştırmayı gösterir; (LSD testi) Kullanarak, (p≤ 0,05)'da benzer harfler ortalamaları arasında önemsiz farklardır.

Çizelge 4.13 *P. aeruginosa'nın* klinik izolatlarının biyofilmine karşı (15 µg/mL) AuNP'lerin, (500 µg/mL) AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi

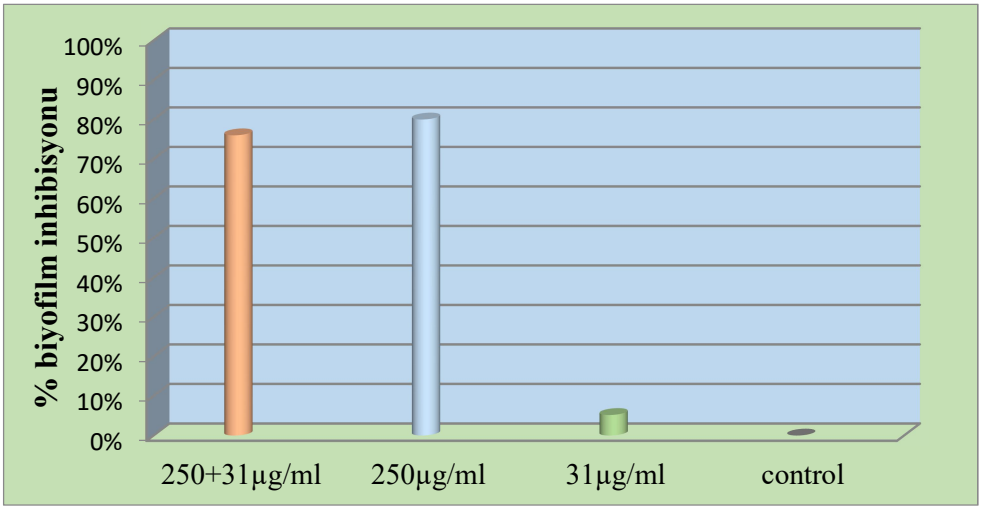
nanopartiküller + antibiyotik	***Pseudomonas aeruginosa***			
	Ortalama	±	SEM	**Sig.**
Kontrol	0,226	±	0,000	A
500+15 µg/mL	0,127	±	0,005	C
500 µg/mL	0,149	±	0,008	B
15 µg/mL	0,227	±	0,000	A
LSD (P ≤ 0,05)	**0,014**			

- Küçük harfler sütunda karşılaştırmayı gösterir; (LSD testi) Kullanarak, (p≤ 0,05)'da benzer harfler ortalamaları arasında önemsiz farklardır.

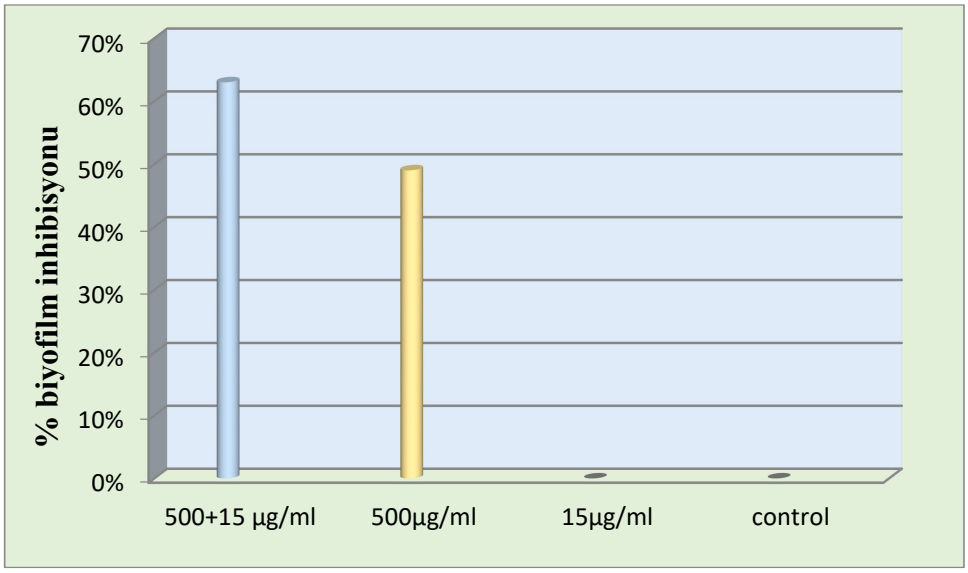
Çizelge 4.14 *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarının biyofilmine karşı (15 µg/mL) AuNP'lerin, (250 µg/mL) AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi

nanopartiküller + antibiyotik	***Staphylococcus aureus***			
	Mean	±	SEM	**Sig.**
Kontrol	0,212	±	0,001	A
250+15 µg/mL	0,140	±	0,004	B
250 µg/mL	0,157	±	0,027	B
15 µg/mL	0,177	±	0,000	Ab
LSD (P ≤ 0,05)	**0,042**			

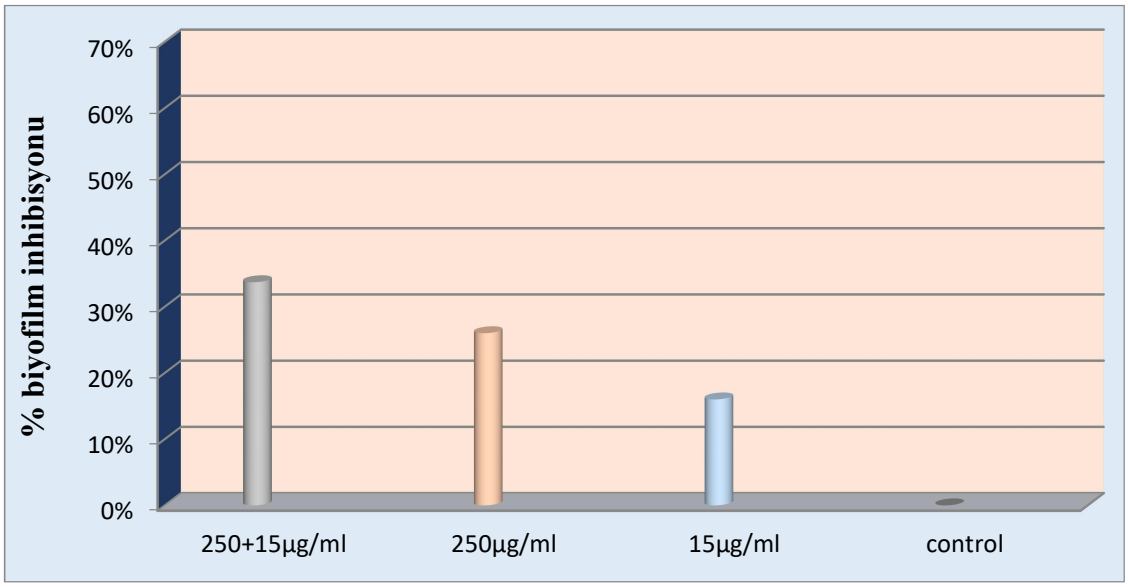
- Küçük harfler sütunda karşılaştırmayı gösterir; (LSD testi) Kullanarak, (p≤ 0,05)'da benzer harfler ortalamaları arasında önemsiz farklardır.



Şekil 4.18 *E. coli* klinik izolatlarına karşı (31ug/mL) AuNP'lerin, (250ug/mL) AMC antibiyotik ile sinerjistik etkisi



Şekil 4.19 *Pseudomonas aeruginosa'nın* klinik izolatlarına karşı (15 µg/mL) AuNP'lerin, (500 µg/mL) AMC antibiyotik ile sinerjik etkisi



Şekil 4.20 *Staphylococcus aureus*'un klinik izolatlarına karşı AuNP'lerin (15 µg/mL), AMC antibiyotik (250µg/mL) ile sinerjistik etkisi

Çeşitli anti-mikrobiyal ajanlarla tedaviye rağmen biyofilmlerin tekrarlaması, biyofilm matrisinin yarattığı empedansa bağlandı. Bakteriler tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritler, bakteriyi konak savunma mekanizmasından korur (Kalishwaralal *et al.* 2010). Bakteriler Biyofilm oluşturduğunda bu, zayıf antibiyotik penetrasyonuna,

besin sınırlamasına ve yavaş büyümeye, uyarlanabilir stres tepkilerine ve kalıcı hücrelerin oluşumuna neden olur, çok katmanlı bir savunma oluşturduğu varsayılır. Bu biyofilm savunmalarının genetik ve biyokimyasal detayları ancak şimdi ortaya çıkmaya başlıyor (Stewart 2002). Biyofilmlerde su kanalları bulunmasına rağmen, matris ilacın difüzyonunu engellediği için derinde yatan organizmalar tedaviden kaçar. Bu nedenle, oluşan ekzopolisakkarit balçık organizmanın uygulanan ilaca duyarlılığını azalttığından, çeşitli bozuklukların önlenmesi durumunda biyofilm oluşumunun inhibisyonu oldukça önemlidir. Antibiyotik tedavileri, bireysel kalan bakterileri etkili bir şekilde öldürür, ancak organizma sümük oluşturduğunda etkinlik oldukça azalır. Bu, semptomların iyileşmesi nedeniyle antibiyotik tedavisi bittiğinde organizmaların hastalığı geri döndürmesini sağlar. Kitle cerrahi olarak çıkarılana kadar antibiyotik tedavisi döngülerinden sonra bile tekrarlayan semptomlar gösteren biyofilm enfeksiyonlarının arkasındaki neden budur (Kalishwaralal *et al.* 2010).

Altın nanopartiküller, organizmanın ekzopolisakkarit sentezini bloke etme yeteneğine sahiptir, aksi takdirde biyofilm, 500 μg/mL altın nanopartikül tedavisinin biyofilm oluşumunu neredeyse tamamen inhibe etti (>%88). Ayrıca veriler, 500 ug/mL'lik bir konsantrasyonda biyolojik olarak sentezlenen altın nanoparçacıklarının sadece bakterilerin büyümesini etkili bir şekilde inhibe etmekle kalmayıp, aynı zamanda oluşan biyofilmin baskılanmasıyla da ilişkili olduğunu göstermiştir. AuNP'lerin mevcut biyofilm üzerindeki bu inhibitör etkisi, biyofilm dışında su kanallarının varlığından kaynaklanabilir. Çünkü tüm biyofilmlerde besin taşınması için su kanalları (gözenekler) mevcuttur (Gill *et al.* 2005). AuNP'ler, gözenekler yoluyla ekzopolisakkarit tabakasından doğrudan yayılabilir ve anti-mikrobiyal işlev verebilir. 96 oyuklu plaka ile yapılan deney, AuNP'lerin mevcut bakterilerde biyofilm oluşumunu engellemenin yanı sıra daha önce oluşan biyofilmi ortadan kaldırdığını göstermektedir (Ramasamy *et al.* 2017).

5. SONUÇLAR

• *Klebsiella pneumoniae* tarafından biyosentezlenen gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahiptir.

• Biyosentezlenmiş gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), biyofilm üreticisi olan bakteriyel patojenlere karşı bir anti-biyofilm aktivitesine sahiptir.

• Biyosentezlenen AgNP'ler enfekte yaraları tedavi etme yeteneğine sahiptir.

• Biyosentezlenmiş AgNP'ler çoğu yaygın antibiyotikten daha etkilidir.

KAYNAKLAR

Agnihotri, S., Mukherji, S. and Mukherji, S. 2014. Size-controlled silvernanoparticles synthesized over the range 5–100 nm using the same protocoland the ir antibacterial efficacy. RscAdvances, 4(8), 3974-3983.

Baillie, G.S. and L.J. Douglas. 1999. Candida biofilms and their susceptibility to antifungal agents. Methods Enzymol. 310, 644–656.

Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. (Eds.). 2005. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Bergey's Manual Trust.

Brisse S., Fevre C. and Passet, C. 2009. Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. PLOS One; 4, 4982.

Chambers, B. A., Afrooz, A. N., Bae, S., Aich, N., Katz, L., Saleh, N. B. and Kirisits, M.J. 2013. Effects of chloride and ionic strength on physical morphology, dissolution, and bacterial toxicity of silver nanoparticles. Environmental science & technology, 48(1), 761-769.

Chernousova, S. and Epple, M. 2013. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. Angew. Chem. Int. Ed, 52:1636–1653.

Dallas, P., Sharma,V.K., and Zboril, R. 2011. Silver poly mericnano composites as advanced antimicrobial agents: classification, syntheticpaths, applications, and perspectives. Advances in colloid and interface science, 166(1-2), 119-135.

De Giglio, E., Cafagna, D., Cometa, S., Allegretta, A., Pedico, A., Giannossa, L.C. and Iatta, R. 2013. An innovative, easily fabricated, silvernanoparticle-based titanium implant coating: development and analytical characterization. Analytical and bioanalytical chemistry, 405(2-3), 805-816.

Dunne, P. W., Munn, A. S., Starkey, C. L., Huddle, T. A. and Lester, E. H. 2015. Continuous-flow hydrothermal synthesis for the production of inorganic nanomaterials. Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 373(2057), 20150015.

Evrard, B., Balestrino, D., Dosgilbert, J.L., Gachancard, J.B., Charbonnel, N., Forestier, C. and Tridon, A. 2010. Roles of Capsule and Lipopolysaccharide O Antigen

in Interactions of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells and Klebsiella pneumoniae. Infection And Immunity, 78, 210-219.

Feng, L., Wu, L. and Qu, X. 2013. New horizonsfor diagnostics and therapeutic applications of graphene and grapheneoxide. Advanced Materials, 25(2), 168-186.

Fresno S., Jimenez N. and Canals R. 2007. A second galacturonic acid transferase is required for core lipopolysaccharide biosynthesis and complete capsule association with the cell surface in Klebsiella pneumoniae. J. Bacteriol, 189(3), 1128-1137.

Govindan, L., Anbazhagan, S., Altemimi, A. B., Lakshminarayanan, K., Kuppan, S., Pratap-Singh, A. and Kandasamy, M. 2020. Efficacy of Antimicrobial and Larvicidal Activities of Green Synthesized Silver Nanoparticles Using Leaf Extract of Plumbago auriculata Lam. Plants, 9(11), 1577.

Graf, C., Vossen, D. L., Imhof, A. and van Blaaderen, A. 2003. A general method to coat colloidal particles with silica. Langmuir, 19(17), 6693-6700.

Gundestrup S, Struve C. and Stahlhut, S.G. 2014. First Case of Liver Abscess in Scandinavia Due to the International Hypervirulent Klebsiella pneumoniae Clone ST23. Open Microbiol, 8, 22-24.

Gurunathan S., Kalishwaralal, K., and Vaidyanathan, R. 2009. Biosynthesis,purification and characterization of silver nanoparticles using Escherichiacoli. Colloids Surf BBiointerfaces,74(1), 328–335.

Gurunathan, S., Park, J.H., Han, J.W. and Kim, J.H. 2015. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by Bacillus tequilensis and Calocybe indica in MDA-MB-231 human breast cancer cells: Targeting p53 for anticancer therapy. Int. J. Nanomed, 10, 4203–4222.

Haldorai, Y., Shim,J.J. and Lim, K.T. 2012. Synthesis of polymer–inorganic filler nano compositesin süper critical CO2. The Journal of Super critical Fluids,71,45-63.

Heera, P. and Shanmugam, S. 2015. Nanoparticle characterization and application: an overview. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 4(8), 379-386.

Helander, I., Saxen H. and Salkinoja-Salonen, M. 1982. Pulmonary toxicity of endotoxins: Comparison of lipopolysaccharices from various bacterial species. Infect Immun, 35, 528-532.

Highsmith, A. K. and Jarvis, W. R. 1985. Klebsiella pneumoniae: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. Infection Control & Hospital Epidemiology, 6(2), 75-77.

Hsieh, P. F., Lin, T. L., Yang, F. L., Wu, M. C., Pan, Y. J., Wu, S. H. And Wang, J. T. 2012. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in Klebsiella pneumoniae causing pyogenic liver abscess. PloS one, 7(3), e33155.

Ivask, A., Juganson, K., Bondarenko, O., Mortimer, M., Aruoja, V., Kasemets, K. and Kahru, A. 2014. Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms andmammalian cells in vitro: a comparative review. Nanotoxicology, 8 (sup1), 57-71.

Jacobson, K. H., Gunsolus, I. L., Kuech, T. R., Troiano, J. M., Melby, E. S., Lohse, S. E. and Geiger, F. M. 2015. Lipopolysaccharide density andstructure govern the extent and distance of nanoparticle interaction with actual and model bacterial outer membranes. Environmental science & technology, 49(17), 10642-10650

Jarvis W.R. and Highsmith A.K. 1984. Bacterial growth and endotoxin production in lipid emulsion. J Clin Microbiol, 19,17-20.

Kalpana, V. N. and Rajeswari, V. D. 2017. Biosynthesis of metal and metal oxide nanoparticles for food packaging and preservation: a green expertise. In Food Biosynthesis, 293-316.

Lara, H.H., Garza-Treviño, E.N., Ixtepan-Turrent, L., Singh, D. Lawrence, M. J. and Rees, G. D. 2012. Microemulsion-based media asnoveldrug delivery systems. Advanced drug delivery reviews, 64, 175-193.

Le Ouay, B. and Stellacci, F. 2015. Antibacterial activity of silver nanoparticles: a surface science insight. Nano today, 10(3), 339-354.

Lewis, K. 2000. Programmed death in bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(3), 503-514.

Li C.Y., Zhang Y.J., Wang M., Zhang Y., Chen G., Li L., Wu D. and Wang Q. 2014. In vivo real-time visualization of tissue blood flow and angiogenesis using Ag_2S quantum dots in the NIR-II window. Biomaterials, 35,393–400.

Liang, X.J., Chen, C., Zhao, Y., Jia, L. and Wang, P. C. 2008. Biopharmaceutics and therapeutic potential of engineered nanomaterials. Currentdrugmetabolism, 9(8), 697-709.

Lin, P. C., Lin, S., Wang, P. C. and Sridhar, R. 2014. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. Biotechnology advances, 32(4), 711-726.

Manivasagan, P., Venkatesan, J., Sivakumar, K. and Kim, S. K. 2016. Actinobacteria mediated synthesis of nanoparticles and their biological properties: A review. Criticalreviews in microbiology, 42(2), 209-221.

Manojkumar, K., Sivaramakrishna, A. and Vijayakrishna, K. 2016. Ashort review on stable metal nanoparticles using ionic liquids, supportedionic liquids, and poly (ionic liquids). Journal of Nanoparticle Research, 18(4), 103.

March, C., Moranta, D., Regueiro, V., Llobet, E., Tomás, A., Garmendia, J. and Bengoechea, J. A. 2011. Klebsiella pneumoniae outer membrane protein A is required to prevent the activation of airway epithelial cells. Journal of Biological Chemistry, 286(12), 9956-9967.

March, C., Cano, V., Moranta, D., Llobet, E., Pérez-Gutiérrez, C., Tomás, J. M. and Bengoechea, J. A. 2013. Role of bacterial surface structures on the interaction of Klebsiella pneumoniae with phagocytes. PloS one, 8(2), e56847.

Mathur, P., Jha, S., Ramteke, S. and Jain, N.K. 2018. Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol, 46, 115–126.

Mhammad S. Abdul Razzaq, Jawad Kadhim Trad and Esraa H. Ker-Alla Al-Maamory. 2013. Genotyping and Detection of Some Virulence Genes of Klebsiella pneumonia Isolated from Clinical Cases, Medical Journal of Babylon-Vol. 10-No. 2.

Michalek, S. M., Moore, R. N., McGhee, J. R., Rosenstreich, D. L. and Mergenhagen, S. E. 1980. The Primary Role of Lymphoreticnlar Cells in the Mediation of Host Responses to Bacterial Endotoxim. Journal of Infectious Diseases, 141(1), 55-63.

Mitzel, M.R. 2016. Interactions of Engineered Nano particles with Biofilms and Selected Microorganisms in Model Saturated Environments. Doktora Tezi, McGill Üniversitesi, 186 s., Montreal.

Morrison, D. C. and Ulevitch, R. J. 1978. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. The American journal of pathology, 93(2), 526.

Muneer Al Tuama. 2019. A Study of Urınary Tract Infectıon in Chıldrens Under Five Years in Karbla. Int. J. of Adv. Res. **7** (Jul). 722-741] (ISSN 2320-5407)

Paczosa, M. K. and Mecsas, J. 2016. Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiology and molecular biology reviews: Microbiology and Molecular Biology Reviews, 80(3), 629–661.

Padilla E., Llobet E., Domenech-Sanchez A., Martinez-Martinez L., Bengoechea J.A. and Alberti S. 2010. Klebsiella pneumoniae AcrAB efflux pumpcontributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob. Agents Chemother, 54(1), 177-183.

Podschun, R. and Ullmann, U. 1998. Klebsiella spp.as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods And Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews, 11(4), 589-603.

Pruzzo C, Debbia, E.A. and Satta, G. 1980. Identification of the major adherence ligand of Klebsiella pneumoniae in the receptor for coliphage T7 and alteration of Klebsiella adherence properties by lysogenic conversion. Infect Immun, 30, 562-571.

Ramalingam, B., Parandhaman, T. and Das, S. K. 2016. Antibacterialeffects of biosynthesized silver nanoparticles on surface ultrastructure andnanomechanical properties of gram-negative bacteria viz. Escherichia coliand Pseudomonas aeruginosa. ACS applied materials & interfaces, 8(7), 4963-4976.

Ravishankar Rai, V. 2011. Nanoparticles and their potential application as antimicrobials. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, 197-209.

Sankar, M.V. and Abideen, S. 2015. Pesticidal effect of green synthesized silver and lead nanoparticles using Avicennia marina againstgrain storage pest Sitophilus oryzae. International Journal of Nanomaterials and Biostructures, 5(3), 32-39.

Sharma, V. K., Yngard, R. A. and Lin, Y. 2009. Silver nanoparticles: green synthesis and their antimicrobial activities. Advances in colloid and interface science, 145(1-2), 83-96.

Siddiqi, K.S., Rifaqat, A.H. and Rao, A.K. 2018. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. J. Nanobiotechnol, 16, 1–28.

Singh, M., Manikandan, S. and Kumaraguru, A. K. 2011. Nanoparticles: A new technology with wide applications. Research Journal of Nanoscienceand Nanotechnology, 1(1), 1-11.

Slack, J.M. and Snyder, I.S. 1978. Bacteria and Human Disease. Chicago, Year Book Medical Publishers, Inc.

Sriram M.I., Kalishwaralal K., Barathmanikanth, S. and Gurunathani, S. 2012. Size-based cytotoxicity of silver nanoparticles in bovine retinal endothelial cells. Nanosci. Methods, 1, 567.

Sukhorukova, I. V., Sheveyko, A. N., Shvindina, N. V., Denisenko, E. A., Ignatov, S. G. and Shtansky, D. V. 2017. Approaches for controlled Ag+ion release: influenceof surface topography, roughness, and bactericidecontent. AC Sapplied materials & interfaces, 9(4), 4259-4271.

Suman, T.Y., Rajasree, S.R., Kanchana, A. and Elizabeth, S.B. 2013. Biosynthesis, characterization and cytotoxic effect of plant mediated silvernanoparticles using Morinda citrifolia root extract. Colloids and surfaces B: Biointerfaces, 106, 74-78.

Suresh, A. K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.W., Gu, B., Mortensen, N.P. and Doktycz, M.J. 2010. Silver nanocrystallites: biofabrication using Shewanella oneidensis, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. Environmental science & technology, 44(13), 5210-5215.

Swathy, J.R., Sankar, M.U., Chaudhary, A., Aigal, S. and Pradeep, T. 2014. Antimicrobial silver: an unprecedented anion effect. Scientific reports, 4(1), 1-5.

Tran, Q.H. and Le, A.T. 2013. Silvernanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. Advances in Natural Sciences: Nanoscienceand Nanotechnology, 4(3), 033001.

Tu, F. and Lee, D. 2014. Shape-changing and amphiphilicity-reversing Janusparticles with pH-responsive surfactant properties. Journal of the American Chemical Society, 136(28), 9999-10006.

Wang, S. and Peng, Y. 2010. Natural zeolites as effective adsorbents inwater and wastewater treatment. Chemical Engineering Journal, 156(1), 11-24

Wilke, C.M., Wunderlich, B., Gaillard, J.F. and Gray, K.A. 2018. Synergistic Bacterial Stress Results from Exposure to Nano-Ag and Nano-TiO2 Mixtures under Light in Environmental Media. Environmental science&technology, 52(5), 3185-3194.

Wu J.H., Wu A.M. and Tsai C. 2008. Contribution of fucose-containing capsules in Klebsiella pneumoniae to bacterial virulence in mice. Exp Biol Med, 233, 6470.

Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C. and Kim, W. S. 2015. Recent progress on magnetici ronoxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. Science and technology of advancedmaterials, 16(2).

Xiu, Z.M., Zhang, Q.B., Puppala, H.L., Colvin, V.L. and Alvarez, P.J. 2012. Negligible particle specificanti bacterial activity of silver nanoparticles. Nanoletters, 12(8), 4271-4275.

Yang, X. and Wang, E. 2011. A nanoparticle autocatalytic sensorfor Ag+ and Cu2+ ions in aqueous solution with high sensitivity and selectivity and its application in test paper. Analyticalchemistry, 83(12), 5005-5011.

Yu V.L., Hansen D.S. and Ko W.C. 2007. Virulence characteristics of Klebsiella and clinical manifestations of K. pneumoniae bloodstream infections. Emerging infectious diseases, 13(7), 986.

Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W. and Gurunathan, S. 2016. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. International journal of molecular sciences, 17(9), 1534. r

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı:	Abdullah Abdulkareem Ahmed AL-OBAIDI
Doğum Yeri:	Irak
Doğum Tarihi:	1995
Yabancı Dili:	Arapça, İngilizce

Eğitim Durumu

Üniversite:	Thi-Quar Üniversitesi Biyoloji Bölümü, 2008