T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SUDA DAĞILABİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Ayşe KAYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ LABORATUVAR ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr.Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ

KONYA – 2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SUDA DAĞILABİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Ayşe KAYAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ LABORATUVAR ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr.Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19202072 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA – 2021

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Laboratuvar Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Öncelikle lisansüstü eğitimimin başlangıcından bu yana değerli bilgi, tecrübe ve öngörülerini benimle paylaşan, tez çalışmam sürecinde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, çalışma boyunca kendisine ne zaman danışsam değerli vaktini ayırarak sabırla bana yol gösteren çok kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatih SEVGİ'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim sürecinde değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak destek ve yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Mustafa Onur ALADAĞ hocama ve sayın Doç. Dr. Ahmet UYSAL hocama saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda kullanmış olduğum nanomalzemelerin sentezi ve karakterizasyonu konusunda destek olan sayın Prof. Dr. Mustafa ÖZMEN hocama, sayın Doç. Dr. Salih Zeki BAŞ hocama ve yüksek lisans öğrencisi değerli Gizem TÜRKKAN'a teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan zevk aldığım ve yardımlarını esirgemeyip çok büyük destek sağlayarak varlıklarını hissettiren laboratuvar arkadaşlarım Şeyma ERGİN, Enxhi PEQİNİ ve Abdullah MASOOD KAMAL'a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda dostluğu ile her zaman yanımda olan ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli Arş. Gör. İlknur AKSOY ÇEKCEOĞLU'na teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne (BAP: 19202072 nolu proje) katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ve son olarak, benim bu günlere gelmemde büyük emek harcayan, varlıklarıyla bana güç veren, maddi ve manevi desteklerini benden eksik etmeyen, canım babam Rahim KAYAN; canım annem Şerife KAYAN; biricik ablam Şerife Nur TURSUN ve desteklerini her zaman üzerimde hissettiğim ailemin geri kalanına sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayşe KAYAN
KONYA-2021

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ..... **iii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vi**

ÖZET ..... **vii**

SUMMARY ..... **viii**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Nanoteknoloji 4

1.2. Nanomalzemelerin Sınıflandırılması 6

1.2.1. Nanomalzemelerin Boyutlarına Göre Sınıflandırılması 6

1.2.2. Nanomalzemelerin Kökenlerine Göre Sınıflandırılması 7

1.2.3. Nanomalzemelerin Morfolojilerine Göre Sınıflandırılması 8

1.2.4. Nanomalzemelerin Kimyasal ve Fiziksel Özelliklerine Göre Sınıflandırılması 8

1.3. Nanomalzemelerin Türleri 9

1.3.1. Metal Nanopartiküller 11

1.3.2. Grafen Oksit Nanotabakaları 22

1.4. Nanomalzemelerin Antibakteriyel Aktivitesi ve Etki Mekanizmaları 25

1.4.1. Demir Oksit Nanopartiküllerin Antibakteriyel Özellikleri ve Mekanizması 28

1.4.2. Grafen Oksit Nanotabakaların Antibakteriyel Özellikleri ve Mekanizması 29

1.5. Biyofilm 29

1.5.1. Biyofilmlerin Oluşum Basamakları 30

1.5.2. Nanomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitesi ve Etki Mekanizmaları 32

1.6. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Özellikleri 35

1.6.1. *Staphylococcus aureus* 35

1.6.2. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) 35

1.6.3. *Staphylococcus epidermidis* 36

1.6.4. *Escherichia coli* 37

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER **38**

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 38

2.2. Kullanılan Cihazlar 39
2.3. Biyolojik Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar 39
2.4. Analiz Metotları 40
2.4.1. Spektrofotometri 40
2.4.2. Kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) 40
2.4.3. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM) 40
2.4.4. Floresan Mikroskopisi 40
2.4.5. Işık Mikroskopisi 40
2.5. Nanomalzemelerin Sentezlenmesi 41
2.5.1. Fe_3O_4 Nanopartikülünün Sentezi 41
2.5.2. Fe_3O_4 -APTES Nanopartikülünün Sentezi 41
2.5.3. Grafen Oksit Nanotabakalarının Sentezi 41
2.5.4. Fe_3O_4-APTES-GO Nanokompozitinin Sentezi 42
2.5.5. Fe_3O_4@GO Nanokompozitinin Sentezi 43
2.6. Antibakteriyel Aktivite Analizleri 43
2.6.1. Bakteri Kültürü Hazırlama 43
2.6.2. Sentezlenen Nanomalzemelerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Tayini 43
2.7. Antibiyofilm Aktivite Analizleri 45
2.7.1. Kristal Viyole Boyama Yöntemi ile Antibiyofilm Aktivite Tayini 45
2.7.2. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun Kristal Viyole Boyama ile Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi 46
2.7.3. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun LIVE/DEAD Boyama ile Floresan Mikroskobunda Görüntülenmesi 47

3. BULGULAR 49

3.1. Sentezlenen Nanomalzemelerin Karakterizasyonu 49
3.1.1. FT-IR Analiz Sonuçları 49
3.1.2. TEM Analiz Sonuçları 52
3.2. Sentezlenen Nanomalzemelerinin Antibakteriyel Aktivitesi 54
3.2.1. Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Nanomalzemelerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Sonuçları 54
3.3. Sentezlenen Nanomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitesi 63
3.3.1. Kristal Viyole Boyama Yöntemi ile Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi 63

3.3.2. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun Işık Mikroskopisi Sonuçları 75

3.3.3. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun Floresan Mikroskopisi Sonuçları 77

4. TARTIŞMA 79

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 97

6. KAYNAKÇA 99

7. TURNİTİN RAPORU 107

8. ÖZGEÇMİŞ 109

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat Derece
AcOH	: Asetik Asit
APTES	: (3-Aminopropyl)triethoxysilane
ATCC	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
CV	: Kristal Viyole
EDC	: N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride
EDS	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
Fe_3O_4	: Demir (II, III) Oksit
FT-IR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GO	: Grafen Oksit
M	: Molar
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
mL	: Mililitre
µL	: Mikrolitre
MRSA	: Metisilene Dirençli *Staphylococcus aureus*
NaCl	: Sodyum Klorür
nm	: Nanometre
OD	: Optik Yoğunluk
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
SI	: Uluslararası Birimler Sistemi
TEM	: Geçirimli Elektron Mikroskobu
TSB	: Triptik Soy Broth

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Suda Dağılabilen Metal Nanopartiküllerin Antibakteriyel ve Antibiyofilm Aktivitelerinin İncelenmesi

Ayşe KAYAN

Tıbbi Laboratuvar Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA-2021

Bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu hastalıklar ve özellikle ilaca dirençli bakterilerin geliştirdiği antibiyotik direnci geleneksel antibiyotikleri yetersiz kılmış ve insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmuştur. Mikroorganizmaların çoğunluğu yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturmaktadır. Tıbbi uygulamalar için kullanılan yüzeylerde antibiyotik direncine bağlı biyofilmle ilişkili enfeksiyonlar artmaktadır. Biyofilmleri yüzeyden uzaklaştırmak ve oluşumlarını engellemek için alternatif stratejiler aranmaktadır. Nanomalzemeler bu açıdan bakterilerin hedeflenen tedavisinde ve biyofilmleri inhibe edebilme özellikleriyle gelişen ve gelecek vaat eden bir çalışma alanı olarak umut vermektedir.

Demir oksit nanopartikülleri, olağanüstü fiziksel ve kimyasal özellikleriyle araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Yüksek yüzey alanı-hacim oranına sahip olması, mükemmel manyetik karakteri, geri dönüştürülebilir kullanımı, biyouyumlu olması ve toksik etkisinin olmamasıyla bilim ve teknolojinin birçok alanında tercih edilmektedir. Fakat Fe_3O_4 nanopartikülünün çözünürlük problemi engel yaratmaktadır. Demir oksit nanopartiküllerine suda dağılabilirlik ve aynı zamanda antibakteriyel ve antibiyofilm özellik kazandırmak için hidrofilik yapıda eşsiz bir nanomalzeme olan grafen oksit ile konjigasyonu planlanmıştır. İnsan sağlığı için tehdit oluşturan biyofilmle ilişkili enfeksiyonların azaltılmasında olarak sentezlenen nanomalzemelerin alternatif olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında sentezlenen demir oksit nanopartikülleri APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) organik çapraz bağlayıcı ile modifiye edildikten sonra grafen oksit ile konjuge edilmiş ve ayrıca hidrotermal metotla Fe_3O_4 ve GO nanomalzemeleri ara bağlayıcı olmadan da direkt birleştirilmiştir. Elde edilen Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin yapıları kızılötesi spektrokopisi (FT-IR) ve geçirimli elektron mikroskopisi (TEM) teknikleriyle aydınlatılmış ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109 suşları üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır.

Nanomalzemelerin bakteriler üzerindeki antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek için ilk olarak mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılarak 96'lık mikro plakalarda antibakteriyel etkileri tespit edilmiştir. Ardından biyofilmi inhibe etme etkileri kristal viyole mikro plaka boyama tekniğiyle spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Son olarak biyofilm inhibisyon çalışmasını desteklemek için *S. aureus* ve *E. coli* bakteri suşları üzerinde, cam yüzeyde oluşturulan biyofilmlerin farklı boyama teknikleriyle ışık ve floresan mikroskobu altında görüntüleri elde edilmiştir. GO ile konjuge edilmiş demir oksitlerin 512 µg/mL konsantrasyonunda %51,76 - %99,97 biyofilm oluşumunu inhibe etme potansiyelleri olduğu bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: Antibiyofilm aktivite; APTES; demir oksit; grafen oksit; nanomalzeme.

SUMMARY

REPUBLIC OF TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Investigation of Antibacterial and Antibiofilm Activities of Water-dispersible Metal Nanoparticles

Ayşe KAYAN

Department of Medical Laboratory

MASTER THESIS / KONYA-2021

Diseases caused by bacterial infections and especially antibiotic resistance developed by drug-resistant bacteria have rendered conventional antibiotics inadequate and threatened health. The majority of microorganisms attach to surfaces and form biofilms. Biofilm-associated infections due to antibiotic resistance are increasing on surfaces used for medical applications. Alternative strategies are sought to remove biofilms from the surface and prevent their formation.Nanomaterials show promise as a developing field of study for the targeted treatment of bacteria and their ability to inhibit biofilms.

Iron oxide nanoparticles have attracted the attention of researchers with their extraordinary physical and chemical properties. It is preferred in many fields of science and technology due to its high surface area-to-volume ratio, excellent magnetic character, recyclable use, biocompatibility and non-toxicity. However, the solubility problem of Fe_3O_4 nanoparticles creates an obstacle. Conjugation of iron oxide nanoparticles with graphene oxide, which is a unique nanomaterial in hydrophilic structure, is planned to impart water dispersibility as well as antibacterial and antibiofilm properties. It is thought that the synthesized nanomaterials can be an alternative for the solution of biofilm-associated infections that pose a threat to human health.

In this thesis, the synthesized iron oxide nanoparticles were modified with APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) linkage molecule, then conjugated with graphene oxide and also Fe_3O_4 and GO nanomaterials were directly combined by hydrothermal method. The structures of the synthesized Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO and Fe_3O_4@ GO nanomaterials were characterized by infrared spectroscopy (FT-IR) and transmission electron microscopy (TEM) techniques and the antibacterial and antibiofilm activity of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and Escherichia coli JM109) strains was investigated.

In order to evaluate the antibacterial activities of nanomaterials on bacteria, their antibacterial effects were determined in 96 well-plate by using microdilution broth method. The biofilm inhibition effects were then evaluated spectrophotometrically by crystal violet microplate staining technique. Finally, to support the biofilm inhibition study, images of *S. aureus* and *E. coli* biofilms on the glass surface were obtained under light and fluorescence microscopy with different staining techniques. Iron oxides conjugated with GO have been found to have a potential to inhibit biofilm formation of 51,76% to 99.97% at a concentration of 512 µg/mL.

Key Words: Antibiofilm activity; APTES; iron oxide; graphene oxide; nanomaterial.

1. GİRİŞ

21. yüzyılın en umut verici teknolojilerinden biri nanoteknolojidir. Bilim ve teknolojinin neredeyse her alanında nanoteknolojik atılımlar yapılarak yenilikçi gelişmelerin önü açılmıştır (Bayda ve ark 2019). Hızlı ve yenilikçi gelişmeler ile birlikte ilgi odağı olan nanoteknoloji alanının öncüsü nanomalzemelerdir. Nanomalzemeler yüksek yüzey alanları ve nano ölçekli boyutları nedeniyle benzersiz kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Nanomalzemeler sahip oldukları olağanüstü özelliklerinden dolayı fizik, kimya, biyoloji, biyomedikal, tıp, mühendislik gibi çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Khan ve ark 2019). Nanomalzemelerin antimikrobiyal uygulamalar, ilaç taşınması, biyogörüntüleme, biyosensör, kanser terapisi gibi birçok alanda kullanılması insan sağlığı için umut verici olup yeni nanomalzemelerin keşfedilmesine yol açmıştır (Onbaşlı 2018, Bayda ve ark 2019).

Metal oksitler en çok araştırılan ve üzerinde çalışılan nanopartiküllerdir. Metal oksit nanopartikülleri yeni bir teknoloji değildir. Bununla birlikte son 10 yılda bu teknolojinin çok yönlü oluşunun fark edilmesi, yeni kompozisyonları, geliştirilen çeşitli sentez yöntemleri ve çok sayıda karakterizasyon teknikleri ile arayışta olan bilim dünyası için çalışmalarda ilgi uyandırmıştır (Sánchez-López ve ark 2020). Metal oksit nanopartikülleri maliyetlerinin düşük olması, yüksek hacim/yüzey oranlarının kazandırdığı küçük boyutları, gelişmiş optik özellikleri, lokalize yüzey plazmon rezonansı özellikleri, fotokatalitik aktivitesi ve yüzyıllardır bakteri yok edici ajan olarak kullanılması nedeniyle dikkat çekmektedirler (Govindaraju ve ark 2015, Baptista ve ark 2018, Khan ve ark 2019, Liu ve ark 2019).

Son zamanlarda araştırmalarda daha az yaygın olan metallere doğru yönelim olsa da, metal oksit nanopartiküller için en çok tercih edilen malzemeler demir, altın, gümüş, çinko ve bakırdır (Sánchez-López ve ark 2020). Yaygın olarak kullanılan bu metallerin nano boyuttaki suda dağılabilir oksitleri antibakteriyel aktiviteye sahip olup klinik bakımdan uygulanabilir özelliktedir (Govindaraju ve ark 2015).

Demir oksit nanopartiküller, biyouyumlu olmaları ve manyetik özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Demir oksit nanopartiküllerinin biyomedikal alanlarda uygulanması daha çok tercih edilmekle birlikte antibakteriyel özelliği de vardır.

Demir, insan vücuduna yabancı değildir. Çünkü bir iz element olan demirin biyolojik olarak çok önemli olduğu bilinmektedir. Bu da diğer metal oksit nanopartiküllerden demir oksit nanopartikülünü daha önemli kılmaktadır. Demir hemoglobinin hayati bileşenidir ve biyouyumlu olması sayesinde demir oksitlerin tıbbi uygulamalarda kullanılmasını sağlamaktadır. Fakat demir oksitlerin çözünürlük problemleri ilaç olarak kullanımında engel yaratabilmektedir. Demir oksitlere suda çözünür özellik kazandırabilmek için farklı malzemeler ile kaplama yapılarak antibakteriyel ajan olarak kullanımı sağlanabilmektedir (Philip ve Kuriakose 2018).

Doğada bol miktarda bulunan grafen yenilikçi nanomalzemeler içerisinde çevre dostu olarak kabul edilmektedir. Karbon allotropu olan grafen, iki boyutlu olması ve atomlarının birbirine bağlanarak altıgen oluşturup bal peteği görüntüsündeki benzersiz kafes yapısı ile çok geniş bir yüzey alanına sahiptir (Singh ve ark 2011, Di Giulio ve ark 2018, Valentini ve ark 2019). Grafen, olağanüstü yük taşıma, optik geçirgenlik, ısı iletkenliği ve mükemmel mekanik özellikleriyle dikkatleri üzerine toplayarak birçok farklı alanda tercih edilmektedir (Singh ve ark 2011). Fakat grafenin en büyük dezavantajı hidrofobik olmasından dolayı düşük çözünürlüğüdür. Bu sebeple biyomedikal uygulamalar için grafenin hidrofilik bir türevi olan grafen oksit avantajlı bir alternatif olmuştur. Grafen oksitin üretim kolaylığı, biyouyumluluğu ve suda kısmen çözünürlüğü biyomoleküller ve ilaçlar tarafından kolay işlevselleştirilmesini sağlar (Di Giulio ve ark 2018, Gonzalez-Rodriguez ve ark 2019, Liu ve ark 2019).

Antibiyotikler, bakterilere karşı insanoğlunun kullandığı en önemli silah olmuştur, ancak antibiyotiklerin keşfedilmesiyle birlikte bakteriler de antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir (Petchiappan ve Chatterji 2017). Antibiyotik direnci, dünyanın şu anda karşı karşıya olduğu en önemli sorunlardan biridir. Günümüzde hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerin neden olduğu ilaç direncinden dolayı enfeksiyon hastalıkları artmakta ve buna bağlı olarak da insan sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Huh ve Kwon 2011, Petchiappan ve Chatterji 2017).

Bakteriler, hemen hemen her yüzeye yapışarak büyüyebilen ve biyofilm adı verilen hücre dışı polimerik maddelerle çevrili çok hücreli karmaşık topluluklar oluşturmaktadır (López ve ark 2010). Biyofilm yapılarının antibiyotik tedavisine karşı artan bir direnç oluşturduğu ve önemli patojenlerin neden olduğu tekrarlayan

ve kalıcı enfeksiyonların dünya çapında başlıca nedenidir (Verderosa ve ark 2019). Biyofilmlerin neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların tedavisindeki zorluklar insan sağlığı için ciddi tehdit olarak kabul edildiğinden son zamanlarda bu problemin üzerine gidilerek yeni stratejilerin geliştirilmesine odaklanılmıştır (Zhang ve ark 2020).

Bakteriyel hastalıkları tedavi etmek için geleneksel antibiyotiklerin yetersiz kalışı alternatif stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır. Nanoteknolojideki son gelişmeler, yüksek yüzey/hacim oranları, farklı boyut ve şekilleri, mekanik, kimyasal, elektriksel, optik, manyetik ve antibakteriyel özelliklere sahip yeni metal oksit nanopartiküllerin geliştirilmesi antibakteriyel ilaç direnci için yeni umutlar sunmaktadır (Huh ve Kwon 2011, Hajipour ve ark 2012, Pelgrift ve Friedman 2013, Baptista ve ark 2018). Nanopartiküller, vücutta küçük moleküllü antibiyotiklere göre çok daha uzun süre tutulmaktadır ve kalıcı terapötik etkiler için daha faydalı olabileceği düşünülmektedir. Antibiyotiklere göre nanopartiküllerin güvenlik profilleri özellikle uzun süreli maruziyette baskın bir güvenlik faktörü olabilmektedir (Huh ve Kwon 2011).

Bu tez çalışmasında, sentezlenen demir oksit nanopartikülleri grafen oksit ile konjuge edilerek suda dağılma özelliği arttırılmış ve sentezlenen nanopartiküllerin insan sağlığı için ciddi tehditler oluşturan bazı gram pozitif ve gram negatif bakteriler (*Staphylococcus aureus*, MRSA (Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*), *Staphylococcus epidermidis* ve *E.coli*) üzerinde antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır.

1.1. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, 1-100 nanometre boyutundaki kontrol edilebilir şekilde sentezlenen malzemeler ile yeni özelliklere ve işlevlere sahip sistemleri içermesiyle genişleyen bir araştırma alanıdır (Buzea ve ark 2007, Bayda ve ark 2019). Uluslararası birimler sistemine (SI) göre bir nanometre (nm) metrenin milyarda birini temsil etmektedir yani 1 nanometre = 10^{-9} metreye karşılık gelmektedir. "Nano" ön eki yunanca bir kelime olup cüce, ufak veya çok küçük anlamına gelen "nanos" kelimesinden türetilmiştir (Bayda ve ark 2019).

Nanoteknoloji kavramının ilk ortaya çıkışı, Amerikalı fizikçi ve Nobel ödülü sahibi Richard Feynman' ın 1959 yılında Amerikan Fizik Derneği toplantısında yapmış olduğu o meşhur "There's Plenty of Room at the Bottom" konuşmasında olmuştur (Bayda ve ark 2019, Khan ve ark 2019). Bu toplantı da Feynman, Britannica Ansiklopedisi'nin tamamının iğne başına yazılabileceği hipotezini öne sürerek bunun fiziksel bir sınırının olmadığını ortaya atmasından beri nanoteknoloji alanındaki gelişmeler hala devam etmektedir (Akar 2013, Bayda ve ark 2019).

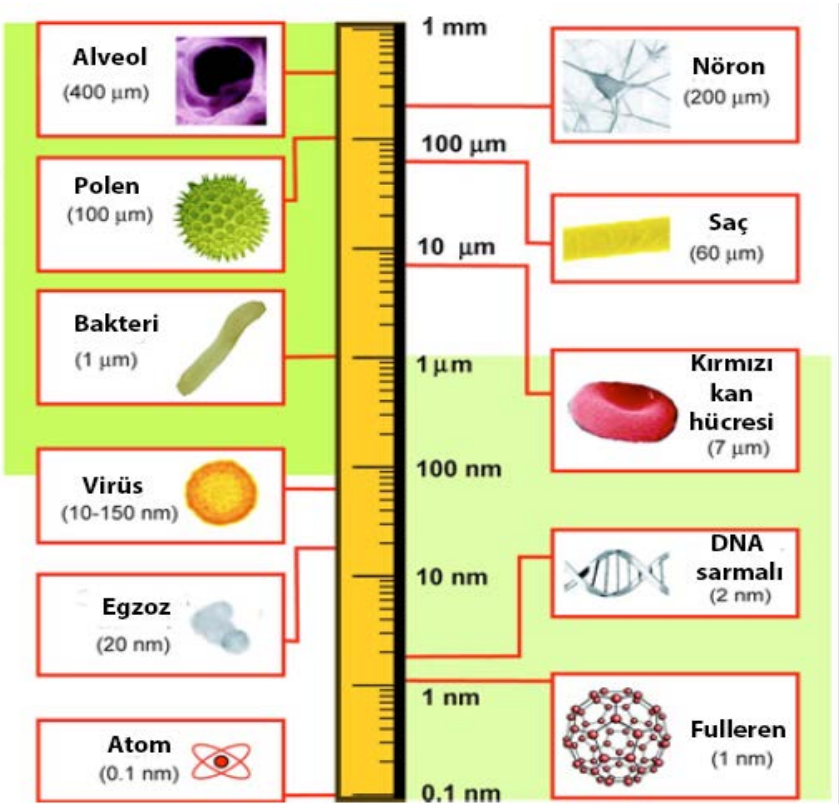
Nanoteknoloji ve nanoyapılı malzemeler günümüzde aktif bir araştırma alanıdır ve keşfedilmemiş yeni özellikleri ile birçok uygulama alanının ilgisini uyandırmaktadır (Jeevanandam ve ark 2018). Nanomalzemeler, yüksek yüzey alanları ve nano boyutları nedeniyle eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Buna bağlı olarak benzersiz morfolojisi, optik özellikleri, yüksek reaktivite ve ayarlanabilir gözenek boyutu yeni çalışmaların önünü açmaktadır (Erci 2018, Khan ve ark 2019). Nanoteknoloji neredeyse tüm bilim dallarıyla ilişkilidir ve multidisipliner bir teknolojidir. Fizik, kimya, biyoloji, tıp, biyomedikal, mühendislik, savunma sanayi, elektronik, tekstil gibi birçok bilim dalındaki uygulamalar için nanomalzemeler kullanılmaktadır (Akar 2013).

Nanomalzemelerin bu kadar ilginç ve üstün kabul edilmesinin sebebi yapılarının yığın (bulk) halden nano boyutlara dönüştürülmesi ile fiziksel, kimyasal, mekanik, iletkenlik, optik ve manyetik özelliklerinde meydana gelen değişikliklerdir.

Nanomalzemelerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip olması, kullanım ömrünün uzaması, yüzey özelliklerinin nano boyutta değişmesi, metal bir malzeme ise sert ve daha güçlü bir yapıda olması, yalıtkan bir malzemenin nano yapıda elektrik ve ısıyı iyi iletebilmesi, demir oksit nanopartiküllerinin yığın haldeyken ferromanyetik, nano boyutta ise süperparamanyetik etki göstermesi gibi özellikler nanomalzemelere olan ilgiyi arttırmaktadır (Köse 2013, Tüylek 2016).

Nanoteknoloji, birçok alanda kullanılması ile birlikte biyotıp alanında da tercih edilmiştir ve insan sağlığı açısından önemli bir yer edinmiştir (Kim ve ark 2013). İnsan vücudunda bulunan birçok yapı nanometre boyutundadır. Hücre içerisindeki DNA ve RNA yapısının çapı, hücre zarının kalınlığı, organeller ve hücre içerisindeki diğer organizmalar nanometre boyutunda canlı yapılara (Şekil 1.1) örnek verilebilir (Tüylek 2016, Aksoy 2020). Canlı hücreler, geniş bir ağ aracılığıyla birbirine bağlanan farklı kimyasal türlerden (DNA, RNA, proteinler, lipidler ve metabolitler vb) oluşan oldukça karmaşık yapılardır (Salehi-Reyhani ve ark 2017). Canlı hücrelerin içerisinde doğal olarak bulunan nanoyapılar karmaşık yapısına rağmen sorunsuz bir şekilde çalışırken, günümüz nanoteknolojisi ile üretilen canlı hücre benzeri yapılara sahip yapay hücreler verimli bir çalışma gösteremeyebilir (Tüylek 2016, Xu ve ark 2016, Aksoy 2020).

Neticede en basit tek hücreli organizmalar bile son derece karmaşık bir yapıya sahiptir. Nanoteknoloji ve malzeme bilimlerinin geliştirilmesi ve çeşitli yöntemlerin uygulanması ile yapay hücrelerin şekilleri, morfolojisi, yüzey özellikleri ve kararsız yapılarının değiştirilebilmesi sağlanabilir. Bu değişim, yapay hücrelerin canlı hücrelere benzer özellik göstermesi ve onları taklit edebilme yeteneğini geliştirmesi ile uygulama alanlarındaki kullanımını arttırabileceği düşünülmektedir (Xu ve ark 2016, Aksoy 2020).



Şekil 1.1. Doğada bulunan biyomoleküllerin ve nanopartikül yapıların büyüklüklerinin karşılaştırılması (Buzea ve ark 2007).

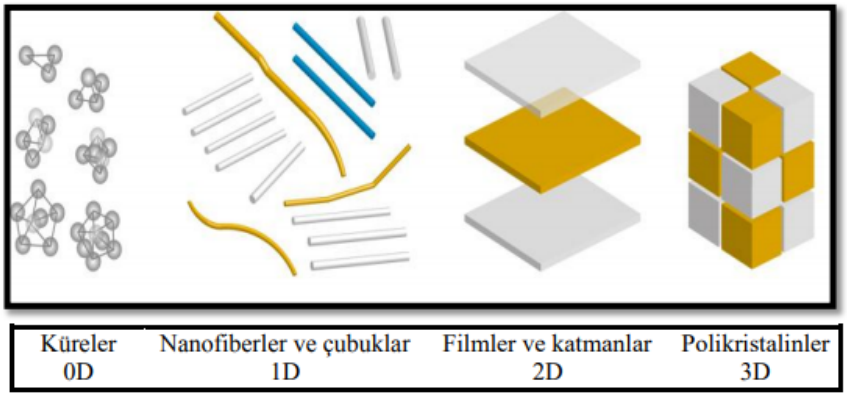
1.2. Nanomalzemelerin Sınıflandırılması

Nanomalzemeler morfolojilerine, boyutlarına, kökenlerine, bileşimlerine, sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılmaktadır.

1.2.1. Nanomalzemelerin Boyutlarına Göre Sınıflandırılması

Nanomalzemeler boyutlarına göre kendi içerisinde 4 gruba ayrılır ve bu sınıflandırma nanomalzemelerin elektron hareketlerine bağlıdır (Şekil 1.2). Sıfır boyutlu nanomalzemeler, elektron hareketleri eksenel olarak sınırlandırılmış boyutsuz nanoyapılardır. Kuantum noktalar, metal nanopartiküller, fullerenler, nanoküreler vb. nanoyapılar sıfır boyutlu (0D) nanoyapılara örnek verilebilir. Bir boyutlu nanomalzemeler, tek eksen boyunca hareket edebilen elektronlara sahip nanoyapılardır. Nanotüpler, nanoteller ve nanolifler bir boyutlu (1D) nanomalzemelerin örnekleridir.

İki boyutlu nanomalzemeler iki eksen yönünde de hareket edebilen elektronlara sahip nanoyapılardır. Grafen, grafen oksit, nanofilmler iki boyutlu (2D) nanomalzemelere örnektir ve üç boyutlu nanomalzemeler ise üç eksen yönünde de hareket edebilen elektronlara sahip nanoyapılardır. Üç boyutlu malzemeler, yığın halde ve 100 nm'den daha büyük ölçekte yapılar olabilmektedir. Elmas, grafit ve polikristalin vb. yapılar üç boyutlu (3D) nanomalzemelere örnek verilebilir (Jeevanandam ve ark 2018, Malhotra ve Ali 2018, Betancourt ve ark 2021).



Şekil 1.2. Nanomalzemelerin boyutlarına göre sınıflandırılması (Gusev ve Rempel′ 2004).

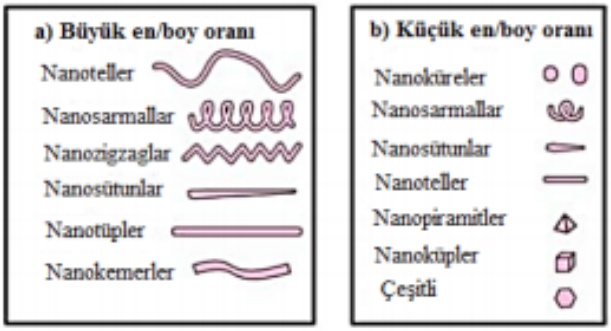
1.2.2. Nanomalzemelerin Kökenlerine Göre Sınıflandırılması

Nanomalzemeler kökenlerine göre genel olarak iki formda bulunmaktadır. Doğal nanomalzemeler, doğada bulunan biyolojik türler tarafından, fiziksel ve kimyasal yer küre olaylarından veya doğada kendiliğinden oluşan bazı proseslerin birleşimiyle oluşmaktadır.

Mühendislik ürünü olarak tasarlanmış sentetik nanomalzemelere; kuantum noktalar, metal nanopartiküller, kozmetik malzemeler, tekstil ürünleri vb. birçok sentetik olarak üretilen nanomalzeme örnek verilebilir. Fakat sentetik nanomalzemelerin üretimi ile birlikte istenmeyen yan ürünler de oluşmaktadır (Ünver 2016, Jeevanandam ve ark 2018).

1.2.3. Nanomalzemelerin Morfolojilerine Göre Sınıflandırılması

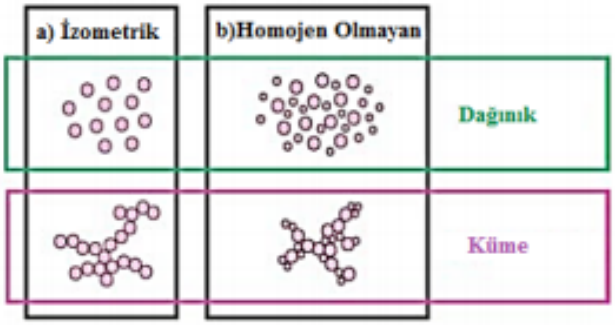
Morfolojik özellikleri incellendiğinde düz, küresel, yuvarlak, çubuk gibi şekil bakımından değerlendirilmesi yapılmaktadır (Şekil 1.3). Ayrıca morfolojik özelliklerinde en boy oranı çok önemlidir. Düşük en boy oranına sahip nanomalzemeler; küresel, oval iken yüksek en boy oranına sahip nanomalzemeler; düz, çubuk şeklindeki yapılardır (Buzea ve ark 2007, Ünver 2016).



Şekil 1.3. Nanomalzemelerin morfolojilerine göre sınıflandırılması (Buzea ve ark 2007, Çalhan 2012).

1.2.4. Nanomalzemelerin Kimyasal ve Fiziksel Özelliklerine Göre Sınıflandırılması

Nanomalzemeler, kimyasal, fiziksel ve elektromanyetik özelliklerine göre homojen ve homojen olmayan dağılımlara sahiptir. Nanomalzemeler kümelenmiş, kolloid, aerosol ve süspansiyon gibi gruplara ayrılmaktadır (Şekil 1.4). Dağılmış veya kümelenmiş nanopartiküllerin yüzey yükleri ve manyetik özellikleri aglemerasyon derecesini belirlemektedir. Nanopartiküllerin farklı çözücü türlerinde denemeleri yapılarak homojen dağılımın artması hedeflenmektedir. Ultrasonikasyon yöntemi de nanopartiküllerin homojen dağılımı için kullanılmaktadır (Buzea ve ark 2007, Kumar ve Ray 2018).



Şekil 1.4. Nanomalzemelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre sınıflandırılması (Buzea ve ark 2007, Çalhan 2012).

1.3. Nanomalzemelerin Türleri

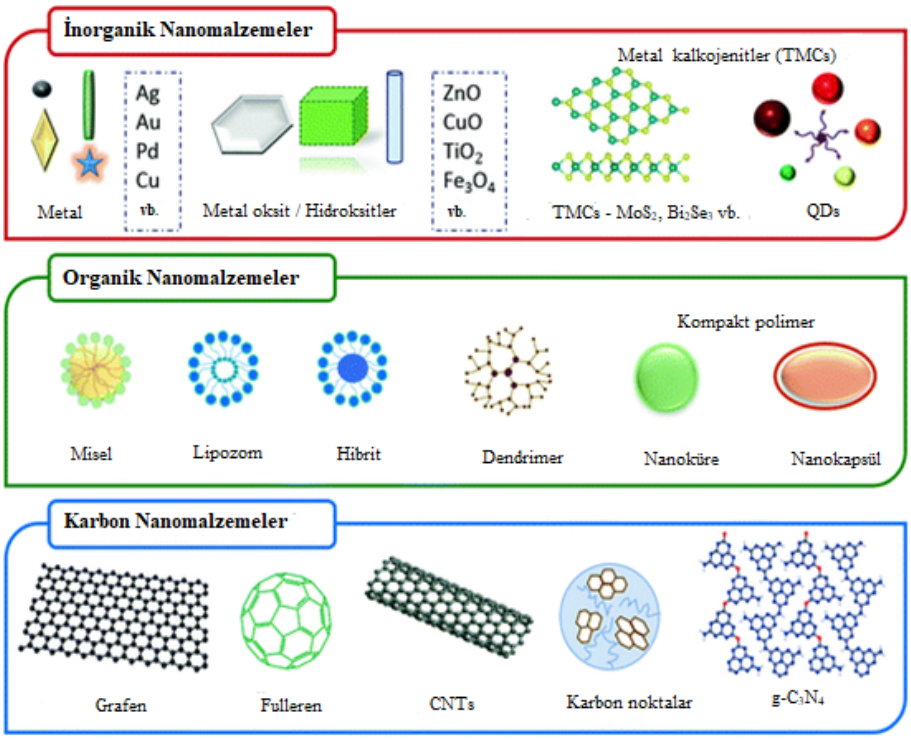
Nanomalzemeler, fiziksel ve kimyasal özellikleri, sentezlendikleri malzemelerden kaynaklı organik ve inorganik (karbon olmayan) nanomalzemeler olarak iki kategoriye ayrılmaktadır. Fakat karbon bazlı nanomalzemeler çok yönlü olmaları ve çalışmalarda çok fazla tercih edilmeleri nedeniyle geniş bir yelpazede incelenmiştir ve karbon nanomalzemeler de ayrı bir sınıf olarak kabul edilmektedir (Şekil 1.5) (Kumar ve Ray 2018).

Organik nanomalzemeler, doğada bulunup birçok endüstriyel ürünün bir parçasını oluşturmaktadır. Doğal veya sentetik olup biyouyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir, çok yönlü olmaları, toksik etkilerinin olmaması ve çevre dostu olarak kabul edilmeleri ile uygulamalar için ilgi çekici hale gelmişlerdir. Lipozomlar, miseller, dendrimerler, nanoemülsiyonlar, hibrit nanopartiküller ve lipit bazlı nanopartiküller organik nanomalzemeler olarak katagorize edilmektedir. Organik nanomalzemeler ilaç taşıma kapasiteleri, görüntüleme verimlilikleri açısından çeşitli alanlarda tercih edilmektedir (Romero ve Moya 2012, Poon ve Patel 2020).

İnorganik nanomalzemeler, organik nanomalzemelerle karşılaştırıldığında küçük boyut özelliği, gelişmiş stabilite, kontrollü ayarlanabilirlik, biyouyumlu olmaları ve benzersiz malzeme yapısına bağlı yüzey modifikasyonları ile optik, manyetik, elektronik, katalitik ve fizikokimyasal özellikleri araştırmacıların dikkatini çekmiş ve biyonanoteknoloji alanında üstün özellikler göstermiştir (Özkan 2018, Khalid ve ark 2020, Poon ve Patel 2020). Metal bazlı nanopartiküller (demir, altın, gümüş vb.), metal oksit nanopartiküller, silika ve kuantum noktalar inorganik nanomalzemelere örnek verilebilir. Son yıllarda inorganik nanomalzemeler;

biyomedikal uygulamalar, biyogörüntüleme ve fototermal terapi gibi birçok alanda kullanım imkanı bulmuştur (Özkan 2018, Khan ve ark 2019, Poon ve Patel 2020).

Karbon doğada bol miktarda bulunan, canlı organizmaların temelini oluşturan eşsiz bir maddedir. Karbon elementinin olağanüstü kimyasal, mekanik, elektriksel ve termal özellikleri dikkat çekmiştir. Doğada doğal olarak bulunan karbonun üç allotropu (elmas, amorf karbon ve grafit) ve sentezlenmiş karbon nanomalzemeleri (karbon nanotüpler, karbon noktalar, fullerenler ve grafen) üzerinde araştırmaların artmasına neden olmuştur (Jeevanandam ve ark 2018, Ananikov 2019, Rauti ve ark 2019). Karbon nanomalzemeler yüksek yüzey alanı / hacim oranı, yüksek reaktivite, yüksek termal ve kimyasal stabilite, küçük boyut özelliği nedeniyle benzersiz kabul edilmiştir ve ilaç dağıtımı, elektronik, kompozit malzemeler, sensörler, alan emisyon cihazları, enerji depolama ve dönüştürme vb birçok farklı uygulama alanında kullanılmaktadır (Nasir ve ark 2018, Madima ve ark 2020).



Şekil 1.5. Nanomalzeme türlerinin sınıflandırılması (Kumar ve Ray 2018).

1.3.1. Metal Nanopartiküller

Metal nanopartiküller sahip oldukları yüzey, boyut, şekil, kuantum büyüklüğü gibi kimyasal ve fiziksel özellikleriyle bilim insanlarının ilgisini üzerine çekmiş ve en çok araştırılan nanopartiküllerden biri olmuştur (Akın 2019, Khan ve ark 2019). Metal nanopartiküller, lokalize yüzey plazmon rezonans sisteminden dolayı benzersiz optoelektrik özelliklere sahiptir (Khan ve ark 2019). Yığın halde bulunan metal yapılar ile metal nanopartiküller kıyaslandığında boyutun nano ölçekte olması ve gelişmiş optik özellikleri gibi sahip oldukları bu üstün özellikler metal nanopartiküllerin biyolojik, elektronik, manyetik ve katalitik gibi birçok çalışma alanında kullanılmasını sağlamıştır (Akın 2019). Metal nanopartiküller kozmetik, tekstil, mühendislik, biyomedikal, tıbbi ve farmasötik (antibakteriyel, antifungal, antiviral, anti-kanser) uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. En çok tercih edilen metal nanopartiküller; demir (Fe), altın (Au), gümüş (Ag), bakır (Cu), çinko (Zn), kobalt (Co), kurşun (Pb), kadmiyum (Cd) ve alüminyum (Al) nanopartikülleridir (Mody ve ark 2010, Bankier ve ark 2019, Sánchez-López ve ark 2020).

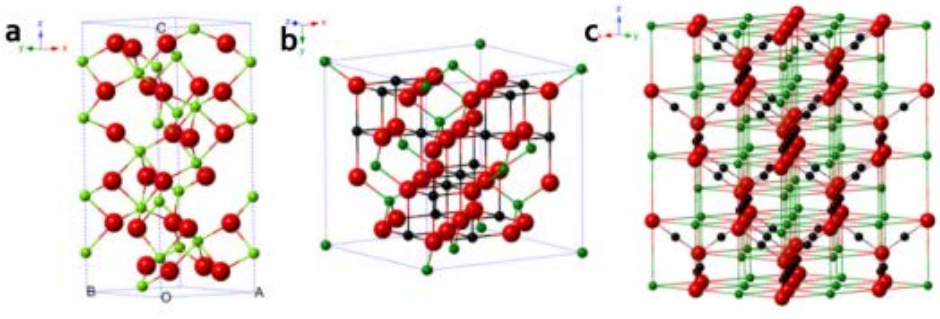
Demir Oksit Nanopartiküller

Demir, yeryüzünde en çok bulunan dördüncü element olarak bilinmektedir. Demir ve oksijenin kimyasal olarak birleşmesiyle demir oksitler oluşmaktadır. Demir oksitler, doğada çokça bulunabilen ve laboratuvar şartlarında sentezlenmesi kolay olan bileşiklerdir. 16 farklı formda demir oksit bulunmaktadır (Wu ve ark 2015, Ali ve ark 2016, Tanaka ve ark 2019). Bu demir oksitler içerisinden hematit (α-Fe_2O_3), maghemit (γ- Fe_2O_3) ve manyetit (Fe_3O_4) en yaygın formlarıdır (Şekil 1.6) (Wu ve ark 2015). Bilinen en eski demir oksit hematitdir. Doğada volkanik hareketler sonucunda oluşmuş kayalarda, toprak ve kaplıca sularında bol miktarda bulunmaktadır. Yumuşak bir manyetik malzeme olan hematit; mineralleri parçalanmış ise kırmızı renkte, kristallenmiş ise gri veya siyah renktedir. Ortam koşullarında demir oksitin en kararlı halidir ve 2,3 eV bant boşluğuna sahip n- tipi yarı iletkendir. Genellikle diğer demir oksitlerin dönüşümünde oluşan son üründür ve antiferromanyetik özellik göstermektedir (Tuncelli 2012, Özel 2015). Hematit, +3 değerlikli demir atomlarından oluşur ve altıgen şeklinde kapalı kafes yapısına sahiptir (Wu ve ark 2015). Kristal yapısında ki Fe^{+3} iyonları oktohedraldir (Teja ve

Koh 2009). Hematit demir oksitler, düşük maliyetli olması, yüksek duyarlılıkları, korozyona karşı yüksek dirençli olması nedeniyle katalizörlerde ve gaz sensörlerinde kullanılmaktadır (Wu ve ark 2015, Tanaka ve ark 2019).

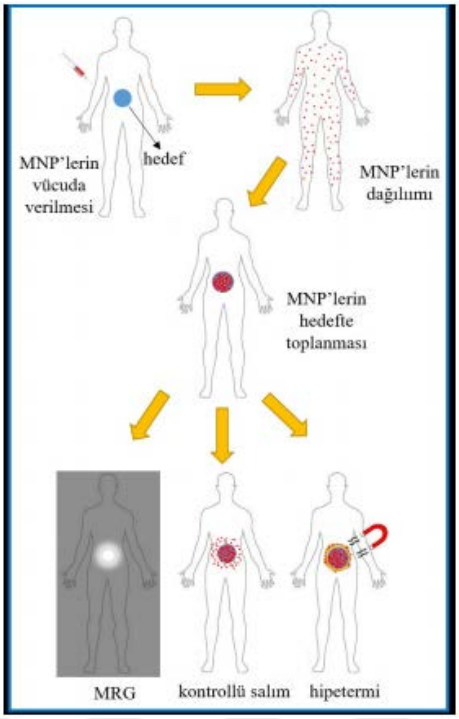
Maghemit, toprakta manyetitin hava ile temas etmesi sonucunda oluşmaktadır. Kırmızı-kahverengi renkte olup, kübik formunda bir yapıya sahiptir. Maghemit hematite göre yarı kararlıdır ve ferrimanyetik özellik göstermektedir (Teja ve Koh 2009, Özel 2015). Maghemit, +3 değerlikli demir atomlarından oluşmaktadır. Kristal yapısında Fe^{+3} iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı da oktahedral yapıdadır (Ercan 2019). Maghemit, manyetit ile aynı fiziksel özelliklere sahiptir. Ancak maghemitin mıknatıslık etkisi manyetite göre daha azdır (Sarpaşar 2019). Maghemit biyouyumludur ve sağlık alanında kullanılan biyomalzemelerin başında gelmektedir. Kanser terapisi, hücre ayırma, Manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı (MRI), immünomagnetik ayırma (IMC), manyetik kaynaklı hipertermi ve benzeri birçok uygulamada yaygın olarak kullanılmaktadır (Tutun 2019).

Manyetit, siyah demir oksit, manyetik demir cevheri veya herkül taşı olarak bilinmektedir ve en güçlü manyetik etkiyi sergilemektedir (Teja ve Koh 2009). Siyah renkte olup kübik spinel yapıya sahiptir. Manyetiti diğer demir oksitlerden ayıran bir diğer özelliği 2:1 molar oranında Fe^{+3} ve Fe^{+2} demir iyonlarının ikisine birden sahip olmasıdır (Özel 2015, Alp 2017, Ercan 2019). Fe^{+3} demir iyonlarının yarısı tetrahedral yapıda diğer yarısı oktahedral yapıda ve Fe^{+2} demir iyonlarının ise hepsi oktahedral yapıdadır (Ercan 2019). Manyetit hem n- tipi hem de p- tipi yarı iletkendir ve ferrimanyetik özellik göstermektedir (Özel 2015, Wu ve ark 2015).



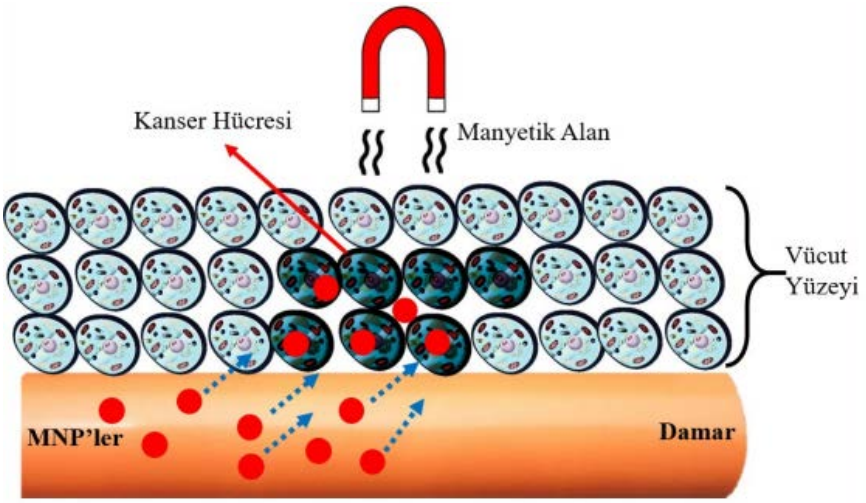
Şekil 1.6. (a) Hematit (b) manyetit (c) maghemitin kristal yapıları (kırmızı küreler O^{-2}, siyah küreler Fe^{+2} ve yeşil küreler Fe^{+3}'ü temsil etmektedir) (Wu ve ark 2015, Alp 2017).

Demir oksit nanopartiküllerin kullanımı genel olarak çok yaygındır. Birçok biyolojik ve jeolojik süreçte önemli rol oynamaları, ucuz olmaları ve boyuta bağlı seçkin özellikleri bu malzemeleri insanoğlu için vazgeçilmez ve üstün kılmıştır (Ali ve ark 2016). Manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit (γ-Fe_2O_3) gibi oksitler yığın (bulk) halde ferrimanyetizma özelliği gösterirken boyutları 20 nanometreden daha az olduğunda oda sıcaklığında süpermanyetizma özelliği gösterir (Wu ve ark 2015, Alp 2017, Ercan 2019). Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller, benzersiz manyetik özelliklere ve mükemmel biyouyumluluğa sahip, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı özel bir metal oksit sınıfıdır (Correa ve ark 2020). Düşük toksisiteleri, yüksek yüzey alanı ve hacim oranına sahip olmaları, küçültülmüş boyutları, şekilleri ve manyetik yapıları ile biyo uygulamalar ve biyomedikal alanı için umut verici olmaktadır (Ali ve ark 2016, Correa ve ark 2020). Demir oksit nanopartiküller, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), hedefli ilaç dağıtımı, hipertermi, termal terapi, biyo ayırma, biyo algılama, belirli biyomoleküllerle reaksiyona girme ve vücutta enzimleri taklit etme yetenekleri ile benzersiz kabul edilmiştir, sentezlerine olan ilgi artmış ve çeşitli uygulamalar için önemli rol oynadığı görülmüştür (Wu ve ark 2015, Tanaka ve ark 2019, Correa ve ark 2020). Kanser tedavisinde manyetik nanopartiküller, dış manyetik alanı kullanarak antikanser ilaçlarının tümörlü bölgeye ilaç taşıyıcı sistemler aracılığı ile ulaşmasını hedef almaktadır (Şekil 1.7). Manyetik rezonans görüntülemede sağlıklı ve tümörlü dokuları ayırt edebilmek için genel olarak hedefleme mekanizması kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküller tümörlü dokulara daha fazla tutunabilmektedir çünkü hasar görmüş tümörlü dokulardaki sızma yapan damarlardan kaynaklı geçirgenlik etkisi fazladır. Hipertermi yöntemi ile tedavide manyetik nanopartiküller tümörlü hücreleri hedef almaktadır. Kolloidal halde dağılmış manyetik nanopartikül süspansiyonu tümörlü dokuda birikir ve dış bir manyetik alan yardımıyla tümörlü dokuda lokal sıcaklığı arttırma temeline dayanmaktadır. Bu yöntemle tümörlü hücre bulunmayan dokularda sıcaklık artışı önlenmektedir (Erdoğan 2018).



Şekil 1.7. Manyetik nanopartiküllerin çeşitli alanlarda uygulama yöntemleri (Erdoğan 2018).

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller, mikroorganizmaları dış bir manyetik alan yoluyla öldürmelerine olanak tanır, ilaç salınım sistemleri hedef bölgede yeterli konsantrasyonda sağlıklı dokuya zarar vermeden etki edebilmektedir (Şekil 1.8). Geleneksel antimikrobiyal bileşiklerin yetersiz oluşuna bir çözüm yolu olarak süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller düşünülmektedir (Erdoğan 2018, Correa ve ark 2020).



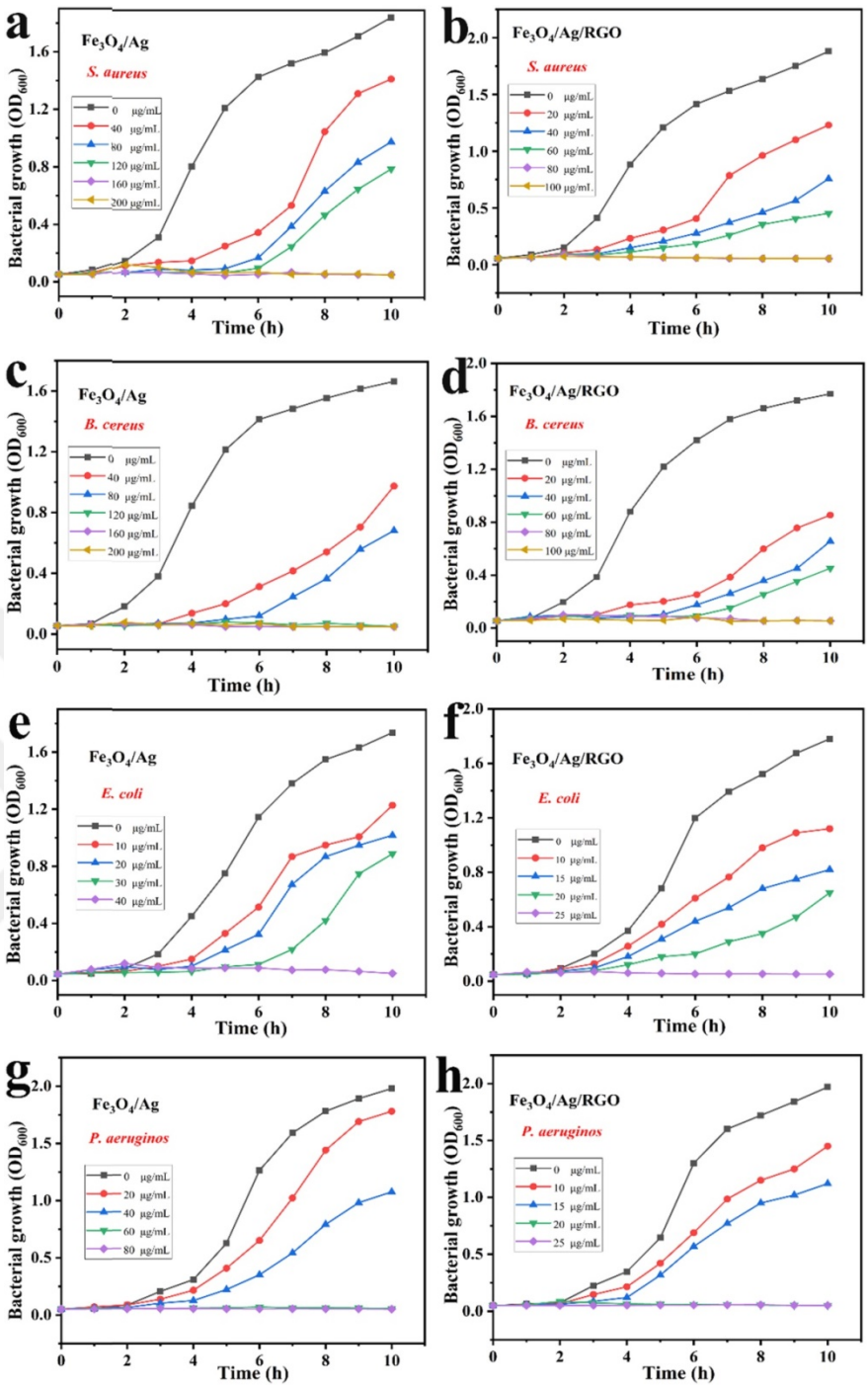
Şekil 1.8. Manyetik ilaç salınım sisteminin gösterimi (Erdoğan 2018).

Demir oksit nanopartiküller *in vivo* uygulamalar için kullanıldığında, insan vücudu bu nanopartikülleri demir iyonlarına metabolize edebilir ve salınan demir, kırmızı kan hücreleri gibi biyolojik işlemlerde kullanılmaktadır. Fakat insan vücudunda hali hazırda kan dolaşımında bulunan demir miktarına demir oksit nanopartiküllerinin de katılmasıyla mevcut miktarda artışa sebep olup aşırı demir yüklenmesine bağlı beklenmedik demir salınımına neden olunabilir. Yüksek konsantrasyona bağlı sitotoksisiteler ortaya çıkabilir ve DNA, mitokondri gibi insan biyolojik sisteminde hafif ve kısa süreli yan etkiler (bulantı, ishal, ürtiker) oluşabilir. Süperparamanyetik nanopartiküller oldukça güvenli görünseler de *in vivo* uygulamalar da insan vücudu için uygun şartların belirlenmesi, konsantrasyon miktarına karar verilmesi ve onların ayarlanması çok önemlidir (Wallyn ve ark 2019).

Son olarak süperparamanyetik nanopartiküller arasında bir araya toplanma yaygın bir olgudur. Bunun ortaya çıkması iki nedene bağlanabilir. Birincisi küçük nanopartiküllerin yüzey enerjilerini azaltmak için bir araya gelme ve büyük parçacıklar oluşturma eğilimlerinin olmasıdır. İkincisi ise çıplak demir oksit nanopartiküllerin yüksek kimyasal aktiviteleri ile özellikle manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit (γ-Fe_2O_3) havada kolayca oksitlenebilmesi ve manyetik etkisini kaybetmesidir. Çıplak demir oksit nanapartiküllerini çalışmalarda hasara karşı koruma ve stabilize edebilmek için uygun stratejiler geliştirmek çok önemlidir. Bir araya toplanmaya karşı korumak için Au, Ag ve Co_3O_4 gibi kaplama malzemeleri kullanılabilir. Biyomedikal uygulamalar için ise suda dağılabilen nanopartiküller elde etmek gerekmektedir (Wu ve ark 2015, Alp 2017).

Cai ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan çalışmada Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yara sargısı olarak kitosan / jelatin kompozit nanofiber membranların antibakteriyel özellikleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ağırlıkça % Fe_3O_4 içeriği 0, 0.5, 1, 2 ve 4 Fe_3O_4 / kitosan / jelatin nanofiber membranların *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel aktivitesi disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. İnhibisyon bölgesinin zon çapları gözlemlendiğinde Fe_3O_4 içeriğinin artışına bağlı olarak antibakteriyel etkinin arttığı belirtilmiştir (Cai ve ark 2016).

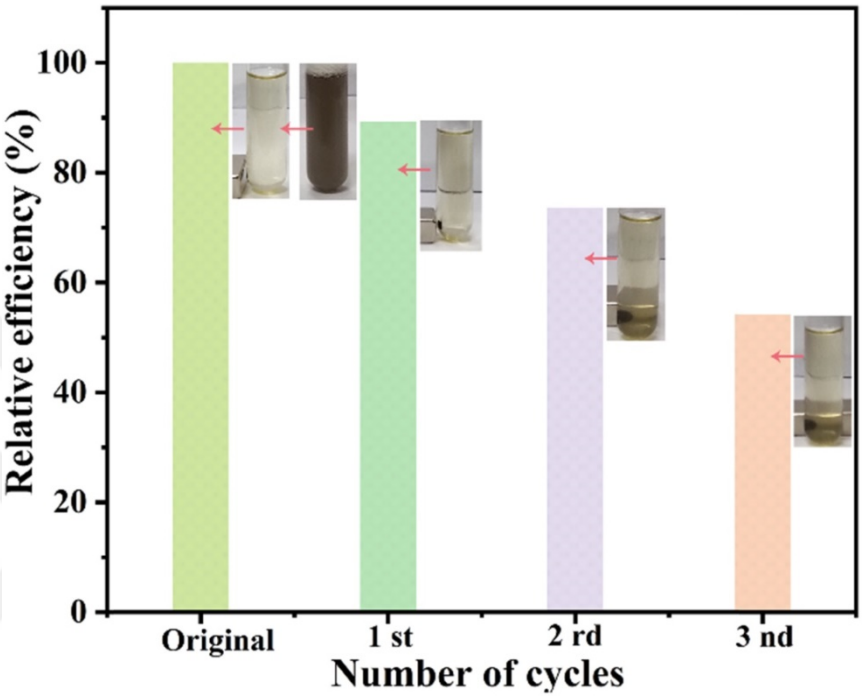
Chen ve ark. tarafından 2021 yılında yapılan çalışmada Fe_3O_4 / Ag / RGO üçlü nanokompozitlerinin antibakteriyel aktivitesini değerlendirebilmek için *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşları kullanılmıştır. Fe_3O_4 / Ag / RGO üçlü nanokompozitlerin antibakteriyel aktivitesi üç farklı yöntemle test edilmiştir. İlk yöntem olarak disk difüzyon metodu uygulanmıştır. Antibakteriyel aktiviteyi değerlendirmek için Fe_3O_4 / Ag ve Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompozitleri bakteri suşları üzerinde karşılaştırılmıştır. Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompozitinin 4 bakteri suşunda da daha yüksek inhibisyon çapının olduğu görülmüştür. İkinci yöntem olarak antibakteriyel aktivitesini daha iyi araştırmak için dört bakteri suşuna karşı Fe_3O_4 / Ag ve Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompozitler için minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) araştırılmıştır. 600 nm dalga boyunda 0-10 saaat aralığında saat başı absorbans değerleri ölçülerek bakteriyel inhibisyon büyüme eğrileri oluşturulmuştur. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Bacillus cereus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında nanokompozit maddenin artan konsantrasyonu ile antibakteriyel aktivitelerinin arttığı gözlemlenmiştir. Fe_3O_4 / Ag için MİK değerleri sırasıyla 160 µg/mL, 40 µg/mL, 120 µg/mL ve 60 µg/mL olduğu ve Fe_3O_4 / Ag / RGO için ise MİK değerlerinin sırasıyla 80 µg/mL, 25 µg/mL, 80 µg/mL ve 20 µg/mL olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1.9). Patojenik bakterilere karşı Fe_3O_4 / Ag / RGO daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Ag nanopartikülleri iyonlarını salarak bakteri içerisinde bulunan kükürt içerikli proteinler ile temas etmektedir, böylece membran proteinlerine ve DNA moleküllerine zarar vererek bakteri hücrelerinin üremesini engellemektedir. RGO, ROS seviyesini arttırarak hücre ölümüne neden olmaktadır. Ag ve RGO ile Fe_3O_4'ün sinerjik etkisi ile antibakteriyel etki artmıştır (Chen ve ark 2021).



Şekil 1.9. Fe_3O_4 / Ag ve Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompozitlerinin bakteri üreme eğrileri (Chen ve ark 2021).

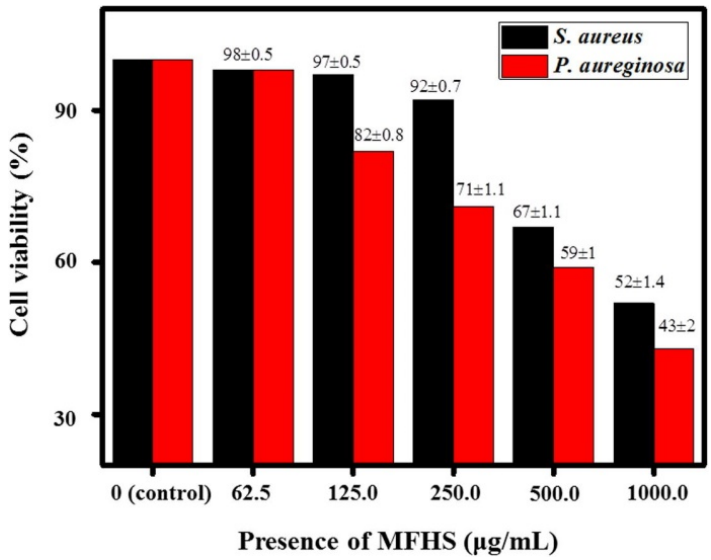
Çalışmanın son aşamasında ise Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompoziti *Staphylococcus aureus* bakteri suşu üzerinde manyetik özelliği ile döngüsel bakteri verimliliği üç geri dönüşüm süresi boyunca yeniden alınarak ve yeniden kullanılarak test edilmiştir. Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompoziti MİK değerine göre 80 µg/mL konsantrasyonunda *Staphylococcus aureus* bakteri suşu ile 4 saat süreyle inkübe edilmiştir. 600 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülmüş mıknatıs uygulanarak

nanokompozit tekrar alınıp üç kez steril suyla yıkanmıştır ve bir sonraki deney turu için tekrar kullanılmıştır. Şekil 1.10'da gösterildiği üzere üç geri dönüşümlü kullanımdan sonra antibakteriyel aktivitesi %50'nin üzerinde olmuştur. Bu sonuç sürdürülebilir ve geri dönüştürülebilir antibakteriyel aktivitenin varlığını göstermiştir (Chen ve ark 2021).



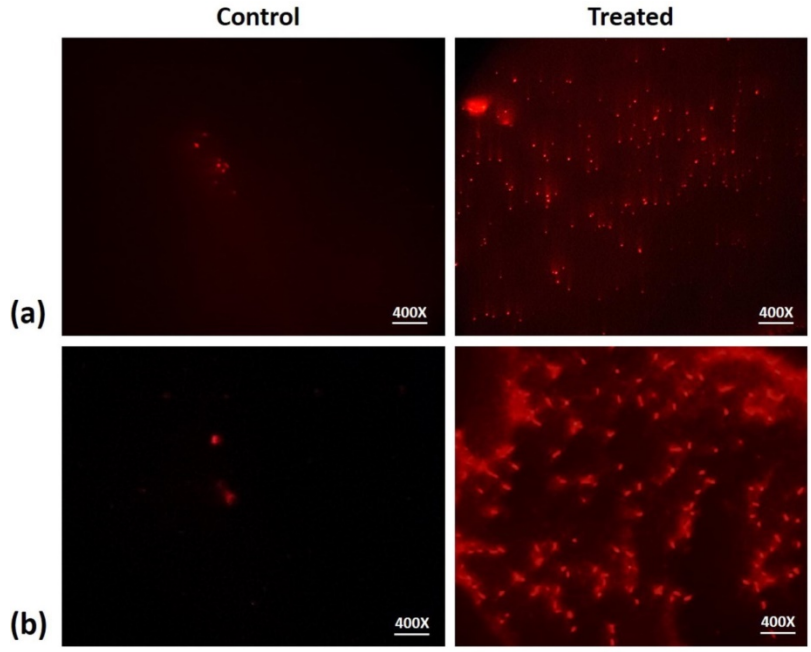
Şekil 1.10. Fe_3O_4 / Ag / RGO nanokompozitlerinin *S. aureus'a* karşı geri dönüştürülebilirliği (Chen ve ark 2021).

Karuppuraja ve Murugesan tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada manyetik Fe_3O_4 içi boş küreler (MFHS) sentezlenmiştir. Sentezlenen MFHS nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi koloni sayım yöntemine göre incelenmiştir. *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakteri suşları kullanılmıştır. Bakteri suşları farklı konsantrasyonlardaki (62.5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL) MFHS nanopartikülleri ile muamele edilmiştir ve bakterilerin büyümesini önemli derece de inhibe ettiği gözlenmiştir. Şekil 1.11 farklı MFHS konsantrasyonlarının *S.aureus* ve *P.aureginosa* büyümesi üzerindeki etkisini göstermektedir (Karuppuraja ve Murugesan 2018).



Şekil 1.11. MFHS'nin farklı konsantrasyonlardaki antibakteriyel aktivitesi(Karuppuraja ve Murugesan 2018).

MFHS ile mualeme edilen *S.aureus* ve *P. areginosa'nın* floresan mikroskobu görüntüleri Şekil 1.12'de gösterilmektedir. Propidyum iyodür boyası ile bakteri suşları boyanmıştır. Propidyum iyodür, ölü hücrelerin membranına nüfuz ederek floresan mikroskopta kırmızı renk vermektedir. Kontrol grubunda hücre zarında herhangi bir hasarın olmadığı fakat MFHS ile muamele edilen bakteri suşlarının hücre zarlarında bozulmaların olduğu ve propidyum iyodüre geçirgen hale gelerek kırmızı renkte görüntü verdiği görülmektedir. MFHS'nin hücre zarı hasarı yoluyla bakterisidal antibakteriyel aktivite sergilediği bulunmuştur (Karuppuraja ve Murugesan 2018).

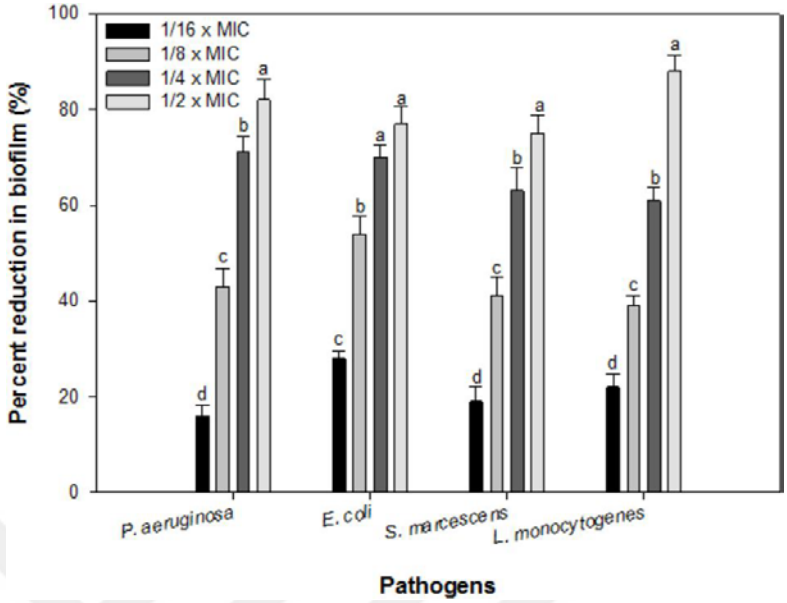


Şekil 1.12. MFHS ile muamele edilen *S.aureus* (a) ve *P.aureginosa'nın* (b) floresan mikroskobu görüntüleri (Karuppuraja ve Murugesan 2018).

Al-Shabib ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada sentezlenmiş olan süperparamanyetik demir oksit (Fe_3O_4) nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens* ve *Listeria monocytogenes* bakteri suşları üzerinde test edilmiştir. Demir oksit nanopartikülü için dört bakteri suşunun minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Bakteri suşları 0,125–1024 µg/mL konsantrasyonunda demir oksit nanopartikülü ile muamele edilmiştir ve 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek MİK sonuçları bulunmuştur. *Escherichia coli için* MİK değeri 64 µg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* için MİK değeri 128 µg/mL *Serratia marcescens* ve *Listeria monocytogenes* için MİK değeri 32 µg/mL olarak kaydedilmiştir.

Biyofilm çalışması için 96 kuyucuklu mikro plakalarda MİK altı konsantrasyonların kristal viyole deneyi yapılmıştır. Bu çalışmada demir oksit nanopartiküllerinin alt inhibitör konsantrasyonları (1/16 × MİK - 1/2 × MİK) dört bakteri türü için ayrı ayrı biyofilm oluşumuna karşı test edilmiş ve 470 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Şekil 1.13'de demir oksit nanopartiküllerin konsantrasyona bağlı biyofilm oluşumunu engellediği gözükmektedir. Kontrol grubuna kıyasla *Escherichia coli*'de %28, 54, 70 ve 77, *Pseudomonas aeruginosa*'da %16, 43, 71 ve 82, *Serratia marcescens*'de %19, 39, 63

ve 75 ve *Listeria monocytogenes*'de %22, 45, 61 ve 88 biyofilm oluşumda azalma görülmektedir (Al-Shabib ve ark 2018).



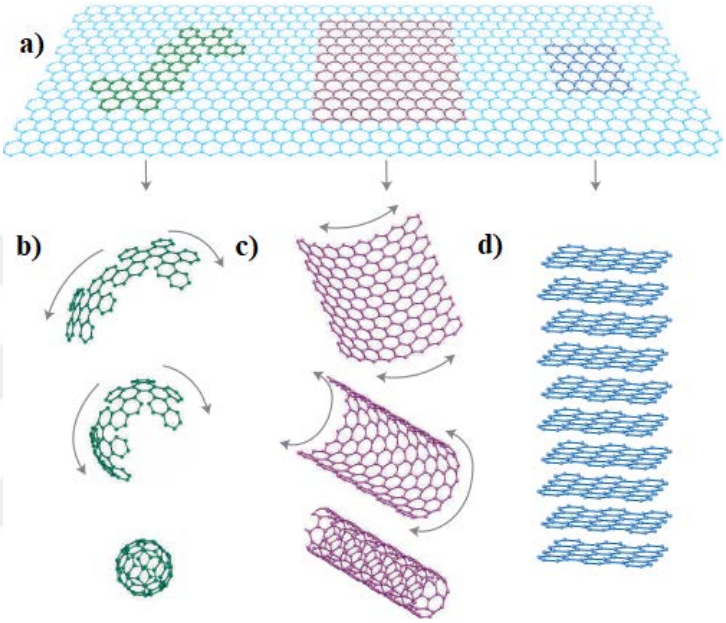
Şekil 1.13. Fe_3O_4 ile muamele edilen bakteri suşlarının biyofilm % inhibisyon grafiği (Al-Shabib ve ark 2018).

Demir oksit nanopartikülleri amin fonksiyonel grupları ile işlevselleştirildiği zaman biyouyumlulukları, yüzey aktiviteleri, stabiliteleri ve kimyasal özellikleri nedeniyle çıplak formdaki partiküllerden daha fazla biyolojik aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Nanopartiküllere bağlanan L- lizin, L- arjinin ve 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) gibi bileşikler, negatif yüklü nanopartikülleri kaplamak için kullanılmıştır ve böylece nanopartiküllerin anyonik hücre membranına bağlanma şanslarını arttırmıştır. Ayrıca APTES ile kaplanan nanopartiküllerin oksidasyonu önlediği ve nanopartiküllerin kristal yapısı için mükemmel koruma sağladığı bildirilmiştir (Ranmadugala ve ark 2017).

3-aminopropiltrietoksisilan (APTES), bağlayıcı ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Berktas ve ark 2020). Amin grupları karbon-karbon çift bağı ile kimyasal bağlar oluşturarak yüksek aktivite göstermektedir (Li ve ark 2018). APTES ile modifiye edilmiş grafen oksit nanopartikülleri mükemmel arayüz etkileşimi ile korozyondan korunabilmekte ve aglomerasyon önlenmektedir (Berktas ve ark 2020, Liu ve ark 2021).

1.3.2. Grafen Oksit Nanotabakaları

Yeryüzünde en çok bulunan malzemelerden birisi de karbondur. Yaşamın vazgeçilmez bir parçası olan karbonun doğada birçok allotropu bulunur. Elmas, grafit, amorf karbon, fulleren, nanotüp ve grafen karbon allotroplarına örnek olarak verilebilir (Eroğul 2015, Doğan 2020). Bir karbon allotropu olan grafen, doğada var olan bazı karbon allotroplarının da temel yapı taşını oluşturmaktadır (Şekil 1.14) (Getiren 2020).

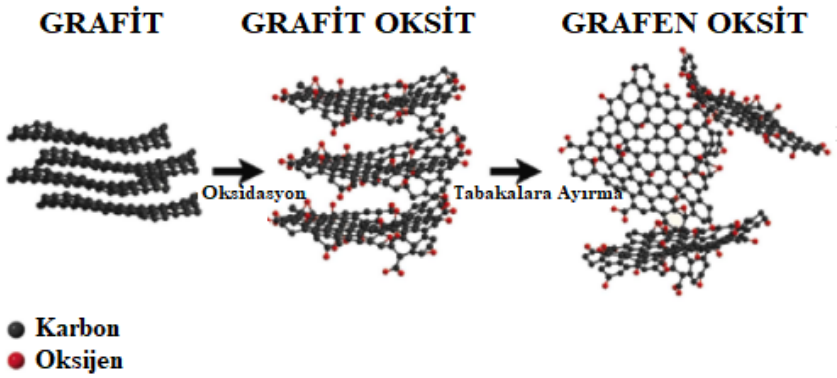


Şekil 1.14. Karbonun allotropları; (a) grafen 2D, (b) fulleren 0D, (c) karbon nanotüp 1D, (d) grafit 3D (Geim ve Novoselov 2007).

Grafen 21. Yüzyılın mucize malzemesi olarak ortaya çıkmıştır ve malzeme bilimleri araştırmalarında yeni bir malzeme çağının başlangıcı olmuştur. Bilinen ilk iki boyutlu malzeme olarak grafen bilime yeni bir çığır açmıştır (Singh ve ark 2011, Ahmad ve ark 2018). Grafitin tek katmanlı hali olan grafen, karbon atomlarının yoğun şekilde paketlenmiş altıgen bal peteği kristal yapısına sahip sp^2 bağları ile bağlanmış iki boyutlu bir nano malzeme olarak bilinmektedir (Eroğul 2015, Turgut 2019, Bozkurt 2020). Grafendeki her karbon atomu, sigma (σ) bağı aracılığıyla üç komşu karbon atomuna bağlanmaktadır. Boşta kalan orbitaller ise pi (π) bağlarını oluşturur ve bu bağların bağlanma yönleri grafen düzlemine diktir. Karbon atomları arasındaki sigma (σ) bağlarının güçlü olması grafenin sağlam bir malzeme olmasını sağlamıştır ve grafen düzlemine dik olan pi (π) bağları ise oldukça zayıftır (Eroğul

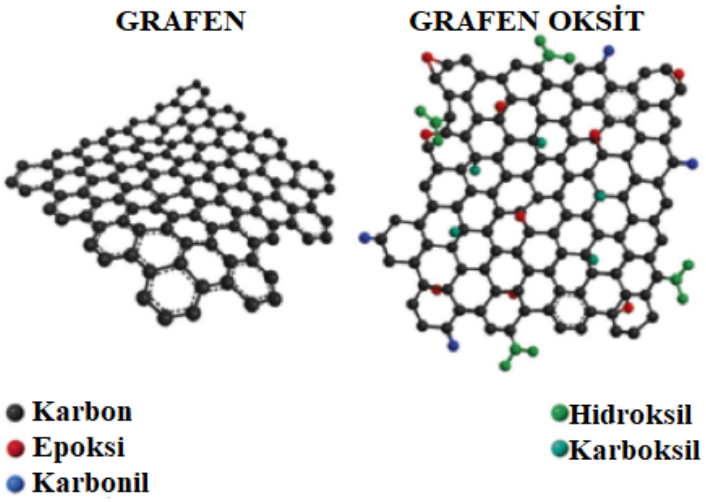
2015, Bozkurt 2020, Getiren 2020, Yu ve ark 2020). Grafenin yapısı çok kararlıdır ve bunun yüzeye dik termal dalgalanmalardan dolayı olduğu düşünülmektedir (Eroğul 2015).

Grafen, çok geniş yüzey alanı, iyi optik geçirgenliği, en ince malzeme olarak bilinmesinin yanında yüksek mekanik dayanıklılığı, termal iletkenliği, ayarlanabilir bant aralığı, olağanüstü esnek yapısı ve yüksek elektriksel özellikleri nedeniyle dünya çapında ilgi uyandırmış ve bilim camiasının dikkatini üzerine çekmiştir (Singh ve ark 2011, Kaçar 2016, Akın 2019). Grafen tüm bu benzersiz özellikleri nedeniyle birçok sektörde çalışılmaktadır ve gelecek vaat eden bir malzemedir. Sensörler, bataryalar, süperkapasitörler, nanokompozitler ve biyomedikal uygulamalar gibi birçok alanda tercih edilmektedir (Bozkurt 2020). Yüksek derecede biyouyumlu olan grafen biyolojik çalışmalar için yeni bir alternatiftir (Kaçar 2016). Ancak grafenin hidrofobik yapısından dolayı hem organik hem de sulu çözücülerde düşük çözünürlüğü çalışmalar için bir dezavantajdır (Di Giulio ve ark 2018). Grafenin suda çözünür hidrofilik bir türevi olan grafen oksit ise biyolojik çalışmalar için oldukça değerlidir ve dünyanın dört bir yanındaki bilim adamları tarafından yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Wu ve ark 2015, Di Giulio ve ark 2018). İki boyutlu bal peteği yapısına sahip grafen oksit, grafit tabakalarının kimyasal yöntemlerle oksitlenmesi sonucu grafen türevi olarak elde edilmektedir (Şekil 1.15) (Jayakaran ve ark 2019, Doğan 2020).



Şekil 1.15. Grafitten grafen oksite dönüşüm basamakları (Jayakaran ve ark 2019).

Grafen oksit yapısında bol miktarda hidroksil, karbonil, epoksi ve karboksil gibi oksijen içeren fonksiyonel grupları bulundurmaktadır (Şekil 1.16) (Akın 2019).



Şekil 1.16. Grafen ve grafen türevi olan grafen oksidin fonksiyonel gruplarının gösterimi (Jayakaran ve ark 2019).

Bu fonksiyonel grupların varlığı grafen oksite benzersiz fiziksel, kimyasal, elektronik ve mekanik özellikler kazandırmaktadır (Doğru 2016). Yüzeye bağlı olan fonksiyonel gruplar organik çözücü ve suda grafen oksitlerin dağılmasına imkân vermektedir. Grafenin aksine grafen oksit hidrofilik yapıdadır (Akın 2019, Doğan 2020). Tüm bu eşsiz özellikleri grafen oksit için oldukça geniş bir uygulama alanı oluşturmaktadır. İlaç taşıyıcı sistemler, optik uygulamalar, hastalıkların teşhisleri ve tedavi uygulamaları, hücre görüntüleme, biyoaygıtlar, mikrobiyal saptama ve hücre içi çalışmalardaki biyolojik süreçler için grafen oksitlerin kullanımı önemli kabul edilmektedir (Doğru 2016, Dörtoğul 2018). Grafen oksitteki fonksiyonel gruplar, biyomoleküllerle etkileşimi kolaylaştırır biyolojik ajan olarak kullanılmasını sağlar ve antibakteriyel etkinliğinden dolayı da bakterilerin zarar görmesine sebep olmaktadır (Kumar ve ark 2019). Grafenin yüksek iletkenlik özelliği bu grupların bağlanması sonucunda grafen oksitte de yalıtkan olma özelliğine dönüşmektedir (Akın 2019).

Grafen oksit, düşük maliyeti, yüksek verimde üretimi, bol bulunabilmesi, su ve bazı organik çözücülerde dağılabilmesi ve biyouyumlu olması nedeniyle birçok çalışma için umut vermektedir (Turgut 2019, Şahin 2020, Yu ve ark 2020).

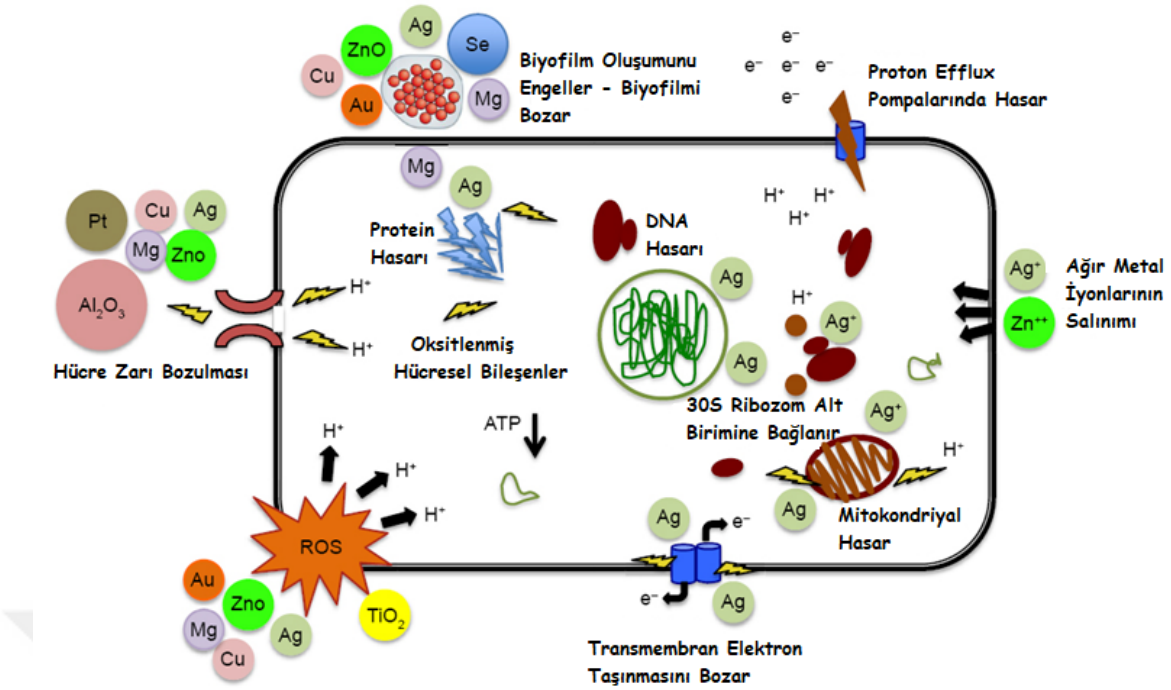
1.4. Nanomalzemelerin Antibakteriyel Aktivitesi ve Etki Mekanizmaları

20. yüzyılda antibiyotiklerin keşfedilmesi ile bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotikler sıklıkla kullanılmıştır. Bununla birlikte, antibiyotiklerin uygunsuz ve kötü kullanımı bakterilerin zaman içerisinde antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine neden olmuştur. Antibiyotiklerin etkinliği büyük ölçüde azalmış ve direnç problemi giderek büyüyen bir sorun haline gelmiştir (Pelgrift ve Friedman 2013). Bakteriler, antibiyotiklere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Tek bir mekanizmayla direnç meydana gelebilirken birden fazla mekanizmayla da bakteriler antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaktadır. Bu direnç mekanizmaları doğal direnç ve kazanılmış direnç olarak iki ana başlık altında incelenmektedir (Ciftci ve Aksoy 2015). Genel olarak, bakteriler üç ana mekanizma yoluyla antibiyotiklere direnç göstermektedir. (1) İlaç alımının azalması, (2) hedef modifikasyonu ve (3) ilacın inaktivasyonudur (Cag ve ark 2016). Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yapılarındaki farklılıklar nedeniyle direnç mekanizmalarının etki türleri de değişiklik göstermektedir. Gram negatif bakteriler üç mekanizma yolundan da yararlanırken, gram pozitif bakteriler daha az yaygın olarak ilaç alımının azalmasını kullanmaktadır (Reygaert 2018). Antibiyotiklere karşı en çok direnç gösteren bakteriler; *Enterobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterococcus faecium* ESKAPE kısaltması ile çoklu ilaç direnci ve virülans sergileyen bakteriler olarak belirtilmiştir (Mulani ve ark 2019).

Bakteriyel enfeksiyonların neden olduğu hastalıklar dünya çapında endişeleri arttırmıştır. Bakteriyel direncin sürekli ortaya çıkışı, enfeksiyon sürelerinin uzamasına, tedavilerinin zorlaşmasına ve ölüm oranlarının artmasına sebep olmuştur (Sánchez-López ve ark 2020). Antibiyotik direncini engelleyebilmek için araştırmacılar geleneksel antibiyotiklere alternatif stratejiler aramaktadır (Slavin ve ark 2017). Yeni antibakteriyel özelliklere sahip maddelere acil ihtiyaç duyulmaktadır. Bakteriyel direncin üstesinden gelebilmek için en umut verici yollardan biri benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanomalzemelerin kullanılmasıdır (Pelgrift ve Friedman 2013). Son zamanlarda antibakteriyel dirençle mücadele de yenilikçi araçlar olarak nanomalzemeler sıklıkla tercih edilmiş ve mikrobiyal direnç için önemli kabul edilmiştir. Nanomalzemelerin yüksek yüzey

alanı / hacim oranına sahip olmaları bakteriyel membranlarla yakın etkileşimlerinin yanı sıra antibakteriyel ajanların geliştirilmesine yardımcı olan yüzey işlevselleştirmesine olanak tanımaktadır. Nanomalzemeler antibakteriyel özellikleriyle düşük dozlarda kullanılabilmekte dolayısıyla direnç problemine bir çözüm olabilmektedir ve yüksek konsantrasyonların neden olduğu istenmeyen yan etkileri de ortadan kaldırabilir (Hemeg 2017). Bakterileri inhibe edebilmek için antibiyotik ilaçlar, bakteri hücre duvarı sentezi, DNA replikasyonu ve translasyon mekanizmasına etki ederken; nanomalzemeler hücrelere nüfuz etmeden teması sadece hücre membranı ile kurduğu ve hiçbir mekanizma ile direkt etkileşimi olmadığı için bakterilerin, nanomalzemelere direnç oluşturabileceği bir ortam olmamaktadır (Aksoy 2020). Ayrıca antibiyotiklerin etki mekanizmaları daha sınırlıdır ve buna bağlı olarak da bakteriyel direnç ortaya çıkmaktadır. Ancak nanomalzemeler, aynı anda aktif olan birden fazla mekanizma aracılığıyla bakteriler ile savaşmaktadır ve bu eş zamanlı mekanizmalar nanomalzemeler için avantaj yaratmaktadır. Bir bakterinin birden fazla mutasyona uğramış gene sahip olma olasılığı düşüktür bu yüzden de bakterilerin nanomalzemelere karşı direnç geliştirme ihtimali çok zordur (Wang ve ark 2017).

Antibakteriyel özelliğe sahip nanomalzemelerin fiziksel ve kimyasal yapılarına bağlı olarak etki mekanizmaları birbirinden farklılık göstermektedir (Aksoy 2020). Şekil 1.17'de görüldüğü üzere nanomalzemeler antibakteriyel aktivitelerini birçok farklı etki mekanizma yoluyla uygulayabilmektedir (Hemeg 2017).



Şekil 1.17. Nanomalzemelerin antibakteriyel etki mekanizmaları (Hemeg 2017).

Nanomalzemeler bakterinin hücre membranına temas ederek elektrostatik çekim, reseptör-ligand ve hidrofobik etkileşimlerle temas oluştuktan sonra ise metabolik yollara müdahale ederek işlevinde değişikliklere ve membran hasarına neden olmaktadır (Shaikh ve ark 2019). Bakteriler üzerinde nanomalzemelerin bir diğer etkisi serbest oksijen radikallerini (ROS) oluşturmasıdır. Süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri ve hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres bakterilere karşı önemli bir silahtır (Shaikh ve ark 2019, Aksoy 2020). Oksidatif stres aracılığıyla hücre membranı geçirgenliği değiştirilir ve bakteri hücresinin makromoleküllerine zarar verilmektedir. Bu nedenle lipid peroksidasyonuna, proteinlerin değişmesine, enzimlerin inhibisyonuna ve RNA ve DNA hasarına yol açmakta ve hücre metabolizmasını bozarak membranlara zarar vermektedir (Beyth ve ark 2015, Shaikh ve ark 2019). Hücre duvarı yapılarına göre bakteriler gram pozitif ve gram negatif olmak üzere iki sınıfa ayrılmaktadır. Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakası kalın bir yapıya sahip iken; gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakası ince bir yapıda olup ayrıca gram negatif bakteriler lipopolisakkaritten oluşan ek bir dış zara sahiptir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarları negatif yüklüdür ve pozitif yüklü metal nanopartiküller ile etkileşimleri daha kolay olmakta böylece etkileri artmaktadır. Bakteri hücreleri ile

karşılaşan metal nanopartiküller ROS oluşturarak bakterilere zarar vermektedir (Slavin ve ark 2017, Aksoy 2020). Metal nanomalzemeler, enzimlerin sahip olduğu tiyol gruplarına bağlanma ve sonunda enzimlerin işlevini devre dışı bırakma eğilimindedir. Ayrıca, metal iyonları pirimidin ve purin baz çiftleri arasına bağlanarak iki antiparalel iplik arasındaki hidrojen bağlarını bozduğu ve DNA molekülüne hasar verdiği bilinmektedir. Bakteri hücrelerine girebilen nanomalzemelerin DNA'ya bağlanma eğilimi bulunmaktadır (Shahzadi ve ark 2018). Sonuç olarak nanomalzemeler antibakteriyel aktivitelerini; elektrostatik etkileşimin bir sonucu olarak hücre duvarı ve zar bütünlüğünün bozulması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun bir sonucu olarak oksidatif stres, metal katyonları salınmasının bir sonucu olarak protein fonksiyonlarının işlevsizleştirilmesi, DNA ve hücre yapılarının bozulması ve biyofilm oluşumunun engellenmesi gibi yollarla ortaya koymaktadır (Hemeg 2017, Shkodenko ve ark 2020).

1.4.1. Demir Oksit Nanopartiküllerin Antibakteriyel Özellikleri ve Mekanizması

Demir oksit nanopartiküllerin antibakteriyel aktivitesi çok araştırılmış ve üzerinde çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bakteriyel direnç için umut verici aday olarak demir oksit nanopartikülleri ortaya çıkmış, hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerin büyümesini etkili bir şekilde engellediği bulunmuştur. Antibakteriyel mekanizması çözünmüş metal iyonlarına ve esas olarak ROS oluşumuna bağlıdır. Demir oksit nanopartikülleri ROS oluşumuna bağlı olarak DNA ve proteinler dâhil olmak üzere makromoleküllere zarar verebileceği açıklanmıştır (Baptista ve ark 2018). Pozitif yüklü nanopartiküller, negatif yüklü bakterilerin yüzeyine bağlanarak elektrostatik ve Van der Waals etkileşimleri yoluyla hücre duvarına özellikle de bakteri işlevlerini bozan hücre zarı proteinlerine bağlanır (Shkodenko ve ark 2020).

Demir oksit nanopartiküllerin biyofilmlere karşı düşük konsantrasyonlarda önemli bir etkisinin olmadığı ancak yüksek konsantrasyonlar da etkili olduğu ve biyofilm hücrelerini yok edebildiği görülmüştür. Demir oksit nanopartiküllerinin *S.aureus, E.coli, P.aeruginosa, S.epidermidis* ve *S.hirae* bakteri suşlarının biyofilm büyümesini azaltabildiği gösterilmiştir (Shkodenko ve ark 2020).

Biyofilm üzerindeki elektrostatik etkiye ek olarak, demiroksit nanopartiküllerin manyetik yapıları biyofilmlerin derinliklerine etkili bir şekilde nüfuz edebileceğini göstermiştir. Demir oksit nanopartikülleri manyetik özellikleri ile biyofilm yapılarının içine farklı antibakteriyel ilaçların verilmesini kolaylaştırarak önemli bir antibiyofilm aktivite potansiyeline sahip olduğu bulunmuştur (Shkodenko ve ark 2020).

1.4.2. Grafen Oksit Nanotabakaların Antibakteriyel Özellikleri ve Mekanizması

Grafen oksit nanotabakaları zengin fiziksel, kimyasal ve termal özellikleri ve fonksiyonel grupları ile antibakteriyel uygulamalar için ümit verici bir yaklaşım olmuştur. 2 boyutlu grafen oksit (GO) nanotabakaları, hem fiziksel hem de kimyasal mekanizmalar yoluyla bakterileri yok etme potansiyeline sahip nanomalzemelerdir (Zheng ve ark 2019). Grafen oksit nano yapraklarının keskin kenarları bakteriyel zarlara doğrudan temas ederek fiziksel hasar oluşturmakta ve bakteri hücrelerinin içeriklerinin sızmasına neden olmaktadır (Zheng ve ark 2019). Ayrıca oksidatif stres, grafen oksitin antibakteriyel etkisinin ana nedenidir. Grafen oksit, ROS oluşturarak bakterilerin protein ve lipid gibi temel metabolizmalarını bozarak onların ölümüne yol açmaktadır (Kumar ve ark 2019). Grafen oksit elektron alıcısı olarak hareket edebildiğinden ve zar bütünlüğünü tehlikeye atabilecek bakteriyel membrandan elektronları ayırabildiğinden elektron transferiyle antibakteriyel aktivite sergileyebilmektedir. Grafen oksit ayrıca lazer enerjisi ile fototermal terapi aracılığıyla etkili bir antibakteriyel aktivite göstermektedir. Grafen oksit fonksiyonel gruplarının varlığı ile biyomoleküllerle etkileşimi kolaylaştırır ve hücre içi bir süreç olmaksızın bakteri ölümüne neden olmaktadır (Kumar ve ark 2019).

1.5. Biyofilm

Biyofilmler, canlı veya cansız bir yüzeye bağlanan ve kendileri tarafından üretilen hücre dışı polimerik maddeden (EPS) oluşan bir matrisle çevrili mikroorganizma topluluklarıdır (Zhang ve ark 2020). Biyofilm yapıları genel olarak lipid, protein, glikopeptit, polisakkarit, nükleik asit, su ve DNA gibi bir veya birden fazla karmaşık biyokimyasal yapıdan oluşan bakteriler için geniş bir yaşam formudur (Shkodenko ve ark 2020).

Bakterilerin biyofilm oluşturabilme yeteneği evrensel bir özelliğidir. Biyofilm oluşturabilmek için bakterilerin kullandığı mekanizmalar, çevresel koşullara ve spesifik suş özelliklerine bağlı olarak değişmektedir (López ve ark 2010). Biyofilm içindeki, sesil bakteri olarak adlandırılan bakteriler, durağan veya hareketsiz bir büyüme fazında bulunur ve planktonik bakterilerden farklı fenotipler sergilemektedir (Crouzet ve ark 2014). Bu sesil bakteri toplulukları zorlu çevre koşullarına dayanabilmek için metabolik aktivitesini, genetik adaptasyonu ve iletişimini değiştirmiştir (Zhang ve ark 2020). Biyofilm içerisinde gömülü olan bakteriler, planktonik bakterilere göre daha dayanıklıdır bu da onları çevresel streslere ve özellikle antibiyotiklere karşı olağanüstü dirençli kılmaktadır (Aksoy 2020).

Planktonik bakterileri öldüren antibiyotik ve antiseptik ilaç konsantrasyonlarının yüzlerce kat daha yüksek konsantrasyonlarında bile biyofilm yapısı içerisinde ki bakteriler hayatta kalabilmektedir (Çolakel 2019).

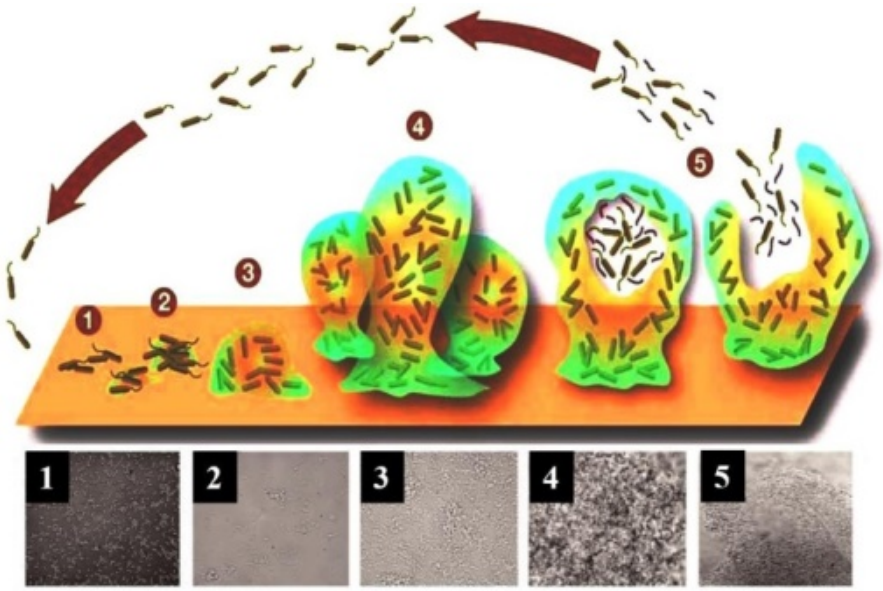
Planktonik bakterilerin büyüme hızlarına kıyasla biyofilm yapı içerindeki bakterilerin büyeme hızları daha yavaştır. Ancak biyofilmi oluşturan bakteriler antibakteriyel ajanlara karşı daha dirençlidir. Biyofilm yapı içerisindeki bakterilerin arasındaki gen transferi çok hızlıdır ve bu sayede direnç genlerini bakteriler birbirlerine rahatlıkla aktarabilmektedir (Aksoy 2020).

İnsan vücudunda ki bakteriyel enfeksiyonların %60-80'i biyofilm olarak büyüyen bakterilerden kaynaklanmaktadır bu da biyofilmleri önemli bir halk sağlığı sorunu haline getirmektedir (Crouzet ve ark 2014).

1.5.1. Biyofilmlerin Oluşum Basamakları

Biyofilmin oluşumu ve olgunlaşması, birbirini takip eden fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreçlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmıştır (Çolakel 2019). Biyofilm oluşum süreci genel olarak 5 aşamaya bölünmüştür. Biyofilmlerin oluşum basamakları Şekil 1.18'de görüldüğü üzere, birinci aşamada, planktonik bakteriler fiziksel kuvvetler ve pilli veya flagella gibi bakteri yapıları ile bir yüzeye yapışmaktadır. Doğru koşulların mevcut olması ile birlikte bu yapışkan hücreler yüzeyde biyofilm üretimini başlatır ve küçük miktarlarda ekzopolimerik malzemeye sahiptir (Verderosa ve ark 2019). Biyofilm oluşumu için hazırlanan mikroorganizmaların morfolojik değişimleri henüz başlamadığı için çoğu planktonik

bakteri formuna dönmektedir o yüzden de yapışma geri dönüşümlüdür (Çolakel 2019). İkinci aşamada, dönüşümlü yapışkan bakteri hücrelerinin bazıları hareketsiz kalır ve çekim kuvvetleri itici kuvvetlerden daha büyük olduğunda geri döndürülemez şekilde bağlanır (Erci 2018). Hücre dışı bir polimerik madde olan EPS yardımıyla canlı ya da cansız yüzeylere bakteri hücreleri yapışarak geri çevrilemez dönüşümsüz tutunma gerçekleşir (Verderosa ve ark 2019). Üçüncü aşamada, biyofilmin mikro kolonileri oluşmaya, su ve besin kanalları olgunlaşmaya başlar ve aynı zamanda önemli ölçüde daha çok katmanlı hale gelmektedir (Verderosa ve ark 2019). Biyofilm içerisindeki bakteri hücreleri Quorum Sensing aracılığıyla komşu bakterilerin hücre yoğunluğu, tür bileşimi ve gen ekspresyon profillerini ayarlayarak sinyal molekülleri aracılığıyla hücre-hücre arası iletişim sağlanmaktadır. Quorum Sensing sayesinde bakteriler, profil değişikliklerine yanıt olarak toplu davranışlarını düzenlemektedir (Papenfort ve Bassler 2016). Quorum Sensing sayesinde herhangi bir yüzeyde bakteriler koloni oluşturmaya başlar ve ardından biyofilmin EPS matriksi içerisinde bakteriler çoğalır (Çolakel 2019). Dördüncü aşamada, tamamen olgunlaşmış biyofilm maksimum hücre yoğunluğuna ulaşır ve üç boyutlu biyofilm topluluğu olarak kabul edilmektedir (Verderosa ve ark 2019). Bu aşamada biyofilm yapısı dış koşullara kendisini adapte etmektedir (Erci 2018). Beşinci ve son aşamada, olgun biyofilm yapıdaki mikro kolonilerin planktonik hale dönmeleri yani dağılma sağlanmaktadır (Verderosa ve ark 2019). Biyofilm yapısının dağılmasının asıl nedenleri artan akış gücü, hücre içi enzimatik degradasyon gibi dâhili biyofilm işlemleri veya EPS yüzey bağlayıcı proteinin salınımı gibi dış bozulmalardır. Biyofilm yapıdan ayrılan bakteriler besin açısından zengin bir ortam bularak yeni yüzeylere yapışmaktadır (Çolakel 2019).



Şekil 1.18. Biyofilm oluşum basamakları (Verderosa ve ark 2019).

1.5.2. Nanomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitesi ve Etki Mekanizmaları

Biyofilmler doğal, tıbbi ve endüstriyel ortamlarda oluşabildikleri için insanları birçok yönden etkilemektedir. Biyofilm enfeksiyonlarının neden olduğu hastalıklar çok fazladır. Kateterler veya implantlar gibi tıbbi cihazlarda oluşan biyofilmler tedavisi zor kronik enfeksiyonlara neden olmaktadır (López ve ark 2010). Biyofilmler genellikle kronik hastalıklardan ve hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonların sonucunda oluşmaktadır. Bakteriler, yara ve yanık enfeksiyonları, orta kulak iltihabı, idrar yolu enfeksiyonları gibi diş, deri, akciğer dokusu, idrar sondaları ve implantlar gibi farklı yüzey ve organlara yapışarak biyofilm oluşturmaktadır (Sadekuzzaman ve ark 2015, Gebreyohannes ve ark 2019). Aslında tüm bakteriyel enfeksiyonların %80'inin doğrudan biyofilmlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Verderosa ve ark 2019). Biyofilm, içerisindeki mikroorganizmayı ortamdaki sıcaklık, kurutma, UV radyasyon, biyositler ve hücresel bağışıklık faktörleri gibi olumsuz fiziksel, kimyasal ve biyolojik faktörlerden korumaktadır. Bu nedenle biyofilmler, yok edilmesi zor olan strese dayanıklı yapılardır. Çeşitli alanlarda birçok soruna neden olmaktadır (Shkodenko ve ark 2020).

Biyofilmler, hücre dışı bir matriks içine yerleştiren ekzopolimerik maddelerin sağladığı koruma nedeniyle ilaçlara karşı fiziksel bir bariyer görevi görür. Biyofilmler antibiyotik tedavisine karşı yüksek direnç göstererek ilaçları etkisiz kılmaya zorlamaktadır (Thukkaram ve ark 2014). Planktonik bakterilere göre biyofilm içindeki sesil bakteriler antibakteriyel tedaviye 1000 kata kadar daha dirençli olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark 2020).

Antibiyotiklere karşı yüksek biyofilm direncinin altında yatan mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır. Benzersiz bir biyofilm yapısının antibiyotiklerin içe doğru nüfuz etmesine fiziksel bir engel olabileceği öne sürülmüştür (Shkodenko ve ark 2020). Bununla birlikte antibiyotiklerin difüzyonunu geciktirerek emilimlerinin EPS yapısı ile azaldığı düşünülmektedir (Aksoy 2020). Diğer bir hipotez antibiyotiklerin, biyofilmde bulunan polisakkaritlere, proteinlere ve DNA'ya bağlandıktan sonra işlevlerini kaybedebileceği ve bakteriyel yıkım için gerekli konsantrasyona ulaşamayacağıdır (Shkodenko ve ark 2020). Üçüncü öne sürülen hipotez, biyofilm yapı içerisindeki belirli bir bakteri grubunun ilaç direncinin oluşmasıyla spor yapısına benzer bir koruyucu fenotip oluşturmasıdır fakat bu hipotez hala tartışılmaktadır (Aksoy 2020).

Biyofilmi oluşturan bakterilerin planktonik bakterilere göre antimikrobiyal ajanlara karşı oldukça fazla dirençli olması ve geleneksel antibiyotiklerle tedavi edilmelerinin çok zor olması sağlık alanında ciddi bir endişe oluşturmaktadır (Gebreyohannes ve ark 2019). Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar için yeni stratejilerin geliştirilmesi acil bir ihtiyaçtır. Enfeksiyonların tedavisinde umut verici stratejilerden biri de nanomalzemelerin geliştirilmesi ve yüksek teknolojili yöntemler ile ilaç direnci için yeni bir çözüm yolu olmasıdır (Shkodenko ve ark 2020).

Nanomalzemeler benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleri, boyutları, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları ve antibakteriyel özellikleri nedeniyle çok çeşitli yüzeylerde kaplama yoluyla veya biyofilm büyümesini kesintiye uğratarak biyofilm oluşumunu önleyebilecek bir antibiyofilm etkisinin varlığından sözedilmektedir (Wang ve ark 2016). Nanomalzemelerin başlıca antibiyofilm mekanizmaları; bakteri hücre duvarı ile doğrudan temas eden nanopartiküller hücre duvarı ve hücre zarının bütünlüğünü bozmaktadır. Nanopartiküller bakterilerin yüzeye yapışmasına engel olarak biyofilm oluşumunu önlemektedir. Gümüş

nanopartikülleri gibi nanomalzemeler bakteri hücreleri ile etkileşime girerek ROS oluşturmaktadır (Zhang ve ark 2020). Demir oksit nanopartiküller, benzersiz manyetik özelliklere ve üstün biyouyumluluğa sahip özel bir metal oksit nanopartikül sınıfıdır. Metal nanopartiküllerinin antibakteriyel aktivitesi değerlendirilirken metal iyonları ve nanopartiküllerin bakteri hücrelerine rahatlıkla girebildiği, DNA, protein ve enzimlerle etkileşime girerek hücreye zarar vermesi ve yüksek yüzey-hacim oranına bağlı reaktif oksijen türlerinin artan üretimin olması antibakteriyel ajan olarak demir oksit nanopartiküllerinin üzerindeki ilgiyi arttırmış ve antibiyofilm özellikleri araştırılmıştır (Thukkaram ve ark 2014).

Demir oksit nanopartiküllerin antibiyofilm mekanizması; bir substrat üzerinde büyütülen biyofilmler demir oksit nanopartiküller ile mualeme edildikten sonra substratın alt kısmına mıknatıs yerleştirilip manyetik bir alan oluşturmak ve ardından demir oksit nanopartiküllerin biyofilm yapısının içine girmesi ile mikroorganizmaları öldürdüğü bulunmuştur. Ayrıca demir oksit nanopartiküllerin gümüş nanopartiküllerin penetrasyonunu teşvik ettiğini ve daha sonra bakterilere zarar verdiği gözlemlenmiştir (Tran ve ark 2020).

Grafen oksit nanotabakaların antibiyofilm aktivitesi araştırıldığında biyofilm matrisine nüfuz ederek yapışmasını engellediği belirtilmiştir. Grafen oksit nanotabakaları geniş yüzey alanı ve fonksiyonel grupları sayesinde hidrofilik yapısı ile güçlü çözünme kapasitesine sahiptir. Fonksiyonel gruplarında bol miktarda bulunan hidrojen bağı etkileşimleri bakterilerin toplanmasını ve yüzeylere yapışmasını olumsuz etkilemekte ve böylece yüksek antibiyofilm özelliği sergilemektedir (Di Giulio ve ark 2018).

Quorum sensıng biyofilm oluşumunda çok önemli bir rol oynamaktadır ve quorum sensıng inhibitörleri biyofilm gelişimini engelleyebildiği ve antibiyofilm ajanları olabileceği düşünülmektedir. Metal ve karbon bazlı nanomalzemelerin, mikroorganizmalara karşı antibakteriyel ve antibiyofilm özellikleri ile enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek için bir basamak olduğu ayrıca direnç sorununa yeni bir çözüm yolu olabileceği kanıtlamıştır (Zhang ve ark 2020).

1.6. Çalışmada Kullanılan Bakteriler ve Özellikleri

1.6.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcaceae familyasının bir üyesi olan *Staphylococcus aureus*, üzüm salkımını andıran fakültatif anaerobik gram pozitif bir kok olan ve boyutları 0.5-1.5 µm aralığında bakteri türüdür. Bu bakterilerin oluşturduğu koloniler genellikle altın veya sarı renktedir (Myles ve Datta 2012). *Staphylococcus aureus*, çok çeşitli klinik enfeksiyonlara neden olan önemli bir insan patojenidir. Üst solunum yolları, normal cilt florası ayrıca burun içerisindeki mukozada yaşayan bir bakteridir. *Staphylococcus aureus* bakterisinin sebep olduğu hastalıklara bakteriyemi, menenjit, akciğer enfeksiyonları, endokarditin, osteoartiküler, protez ve cihazla ilişkili enfeksiyonlar örnek verilebilir (Missiakas ve Schneewind 2013, Tong ve ark 2015). Hem toplumdan edinilen hem de hastaneden edinilen enfeksiyonlarda *Staphylococcus aureus* yaygındır. Bu patojenin en büyük başarısı kendi geliştirdiği makanizmalar ile ilaca dirençli suşlarının ortaya çıkmasıdır (Missiakas ve Schneewind 2013). *Staphylococcus aureus* bakterisinin penisilin antibiyotiğine karşı direnç problemi ortaya çıkmış ve çoklu ilaç dirençleri meydana gelmiştir. *Staphylococcus aureus* suşu dirençli olup olmamasına göre göre Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) şeklinde iki gruba ayrılmıştır (Aksoy 2020). *Staphylococcus aureus*, bir glikokaliks veya mukoza tabakası içine gömülü çok katmanlı bir biyofilm tabakaları üretebilmektedir ve iç dokularda veya kan dolaşımında enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zor ve insan sağlığı için tehlikelidir (Archer ve ark 2011).

1.6.2. Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına bağlı enfeksiyonlar tedavisi zor küresel bir sağlık sorunudur. Yüksek düzeyde morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Green ve ark 2012). Metisiline direnç gösteren *Staphylococcus aureus* suşları penisilinin kullanılmaya başlanmasından hemen sonra direnç sorunu ile karşılaşmıştır (Algammal ve ark 2020). Beta-laktam antibiyotiklere karşı *S. aureus* tarafından β-laktamaz enziminin salınması MRSA direncinin temel nedenidir. Kromozomla kodlanmış bir protein olan penisilin bağlayıcı bir proteinin

mutasyonu sonucu oluşmuştur (Algammal ve ark 2020). Kromozomlarında bulunan *mec*A gen bölgesi tarafından çoğu yarı sentetik penisilin için azalmış afinite ile ilişkili değiştirilmiş bir penisilin bağlayıcı proteinin (PBP) sentezinden sorumludur. Bu nedenle, metisiline dirençli Staphylococcus suşlarının ortaya çıkışı, bu hareketli genetik elementlerin alınması ve duyarlı suşların kromozomlarına eklenmesinden kaynaklanmaktadır (Lakhundi ve Zhang 2018). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları tarafından biyofilm oluşumu, hem çevrede hem de konakçı organizmada önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. Biyofilm oluşturma yeteneği olarak ica operon tarafından kodlanan polisakkarit hücre içi adhezin (PIA) sentezi ile ilişkilidir (Piechota ve ark 2018). Enfeksiyon hastalıklarında biyofilm oluşumu, kateterleri ve tıbbi implantları içeren tedavileri karmaşık hale getirebilir ve bunun sonucunda enfeksiyon hastalıkları ciddi bir sorun oluşturmaktadır (Dakheel ve ark 2016).

1.6.3. *Staphylococcus epidermidis*

Micrococcaceae bakteriyel familyasının bir üyesi olan *Staphylococcus epidermidis* insan derisinde ve mukoza zarlarında yaygın olarak bulunmaktadır (Raue ve ark 2020). *Staphylococcus epidermidis* koagülaz negatif, gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, 0.8-1.0 μm çapında fakültatif anaerobik koklardır. (Namvar ve ark 2014). *Staphylococcus epidermidis* oluşturduğu koloniler gri veya grimsi beyaz renkte ve sümüksü yapıdadır (Çolakel 2019). *Staphylococcus epidermidis* hastane enfeksiyonlarına neden olan nozokomiyal patojen olarak kabul edilmektedir. *S. epidermidis* enfeksiyonları tipik olarak kataterler, protezler, yapay kalp kapakçığı gibi tıbbi malzemelerle ilişkili ameliyat sonrası enfeksiyonların temel nedenlerindendir (Schommer ve ark 2011). Bu enfeksiyonların asıl nedeni tıbbi malzemelerin üzerinde yapışkan biyofilm yapıların oluşmasıdır (Raue ve ark 2020). Biyofilm oluşturan *Staphylococcus epidermidis*, antibakteriyel ajanlara karşı duyarlılığı ciddi ölçüde azalmış ve direnç gelişmiştir (Schommer ve ark 2011).

1.6.4. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae bakteriyel familyasının bir üyesi olan *Escherichia coli*, insanların ve memeli hayvanların gastrointestinal yollarında yaygın bulunan ve en önemli patojenlerden birisidir (Allocati ve ark 2013). *Escherichia coli*, 0.35 μm genişliğinde ve yaklaşık 2 μm uzunluğunda basil bakteri suşudur (Blount 2015). Gram negatif, çubuk şeklinde, endospor oluşturmayan fakültatif anaerob bir bakteridir (Lim ve ark 2010). *Escherichia coli*, insanlarda ve hayvanlarda birçok yaygın enfeksiyonun en sık görülen nedenlerinden birisidir. Geniş bir hastalık yelpazesinden sorumlu olan *E.coli* enterit, idrar yolu enfeksiyonu, septisemi ve neonatal menenjit gibi klinik enfeksiyonların önde gelen nedenidir. Farklı etki mekanizmalarına sahip bazı antibiyotik sınıflarına karşı *E.coli* dirençlidir. İlk β-laktam olan penisilin G antibiyotiğine dış zar bariyeri nedeniyle doğal olarak dirençlidir. Çoklu ilaca dirençli *E. coli* suşları birkaç ciddi enfeksiyonun tedavisini zorlaştırmakta ve hastane, toplum kaynaklı enfeksiyonların en sık sebebidir (Allocati ve ark 2013).

2. GEREÇ VE YÖNTEMLER

2.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

(3-aminopropil)trietoksisilan(APTES) – Sigma-Aldrich

Amonyak (NH_3) – Merck

BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti (LIVE/DEAD) – Thermo Fisher

Demir (II) klorür ($FeCl_2$) – Merck

Demir (III) klorür ($FeCl_3$) – Merck

D-Glukoz – Merck

Dietil Eter ((C2H5)2O) – Merck

Etanol – Sigma-Aldrich

Fosfat Tamponu (PBS) – Sigma-Aldrich

Fosforik asit (H_3PO_4) – Merck

Glasiyel Asetik Asit – Merck

Grafit tozu – Merck

Hidrojen peroksit (H_2O_2) – Merck

Hidroklorik asit (HCl) – Merck

Kristal Viole – Merck

Mueller-Hinton Agar (MHA) – Merck

N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) – Sigma-Aldrich

Potasyum permanganat ($KMnO_4$) – Merck

Sodyum Klorür (NaCl) – Merck

Sülfürik asit (H_2SO_4) – Merck

Tryptic Soy Broth (TSB) – Sigma-Aldrich

2.2. Kullanılan Cihazlar

Vortex cihazı (Jeio Tech)

Mc Farland cihazı (Biosan Den-1)

Mikroplaka okuyucu (BioTek μQuant)

Otomatik dispenser (BioTek MicroFill)

Otoklav (Nüve OT 4060)

Analitik Terazi (Precisa XB 220 A)

İnkübatör (Nüve EN 055)

Biyogüvenlik Kabini (Nüve MN 120)

Floresan Mikroskobu (Olympus BX51, DP70 CCD Kamera)

Ultrasonik Banyo (Çalışkan)

8 kanallı mikropipet (Socorex)

Geçirimli Elektron Mikroskobu (Jeol Jem-2100)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi (Bruker Vertex)

2.3. Biyolojik Çalışmalarda Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109 bakterileri standart kültür koleksiyon suşudur. Bu suşlar sırasıyla 5, 22, 38 ve 40 kod numaralı suşlar olarak Selçuk Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

2.4. Analiz Metotları

2.4.1. Spektrofotometri

Spektrofotometri yöntemi, bakteri hücrelerinin veya maddelerin renginin ve yoğunluğunun dalga boylarına bağlı olarak ölçülmesiyle konsantrasyonlarının bulunmasını sağlayan tekniktir.

2.4.2. Kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, malzemelerin yapısındaki kimyasal bağların titreşim ve dönme hareketleri ile üzerine düşürülen kızılötesi ışınlarının yoğunluğuna karşı dalga sayısının ölçülmesine dayalı yöntemdir.

2.4.3. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), yüksek enerjili elektronların çok ince olan malzemelerle etkileşimi sonucunda malzemelerin atomik yapısı, şekli ve büyüklüklerinin belirlenmesi ile morfolojik özellikleri hakkında bilgi elde edilmesini sağlamaktadır.

2.4.4. Floresan Mikroskopisi

Floresan mikroskop ile inceleme yapabilmek için hücreler veya maddeler floresan boyalar ile boyanmaktadır. Bu boyalar, floresan ışık ile uyarılarak numunenin oluşturduğu floresan parlamalar görüntülenmektedir.

2.4.5. Işık Mikroskopisi

Canlı veya cansız materyallerin görüntülerini ve doğal ya da boyanmış renklerini en basit şekilde görüntüleyebilmek için kullanılan tekniktir.

2.5. Nanomalzemelerin Sentezlenmesi

2.5.1. Fe_3O_4 Nanopartikülünün Sentezi

Demir oksit nanopartikülleri literatürdeki metotda bazı değişiklikler yapılarak sentezlenmiştir (Fakhrullin ve ark 2009). 2,0 mL 1 M $FeCl_3$ ve 0,5 mL 2 M $FeCl_2$ ultra saf su içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan sulu çözeltiler 3 boyunlu balona ilave edilerek 80 °C'de yağ banyosu içerisinde geri soğutucu ve N_2 gazı altında 1 saat karıştırılmıştır. Elde edilen çözelti içerisine 25 mL 1 M NH_3 damla damla ilave edilerek çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. 5 dakika daha karıştırılarak homojenize olması sağlanmıştır. Son olarak tekrardan oluşan kahverengimsi çökelti, bir mıknatıs yardımıyla alt kısma toplanmış ve saf su ile çok kez yıkanmıştır. Elde edilen Fe_3O_4 nanopartikülleri inkübatörde kurutularak hazır hale getirilmiştir.

2.5.2. Fe_3O_4 -APTES Nanopartikülünün Sentezi

1 g Fe_3O_4 nanopartikülü, 400 mL etanol ve 2 mL ultra saf su beher içerisine eklenmiş ve ultrasonik su banyosu içerisinde 30 dakika homojenize edilmiştir. Çözelti, karıştırıcı üzerine alınmış içerisine 1 mL APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) damla damla eklenmiş ve 12 saat karıştırılmıştır. Mıknatıs kullanılarak APTES ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartikülleri toplanmış ve saf su ile iyice yıkadıktan sonra inkübatörde kurutulmuştur (Sundar ve ark 2014).

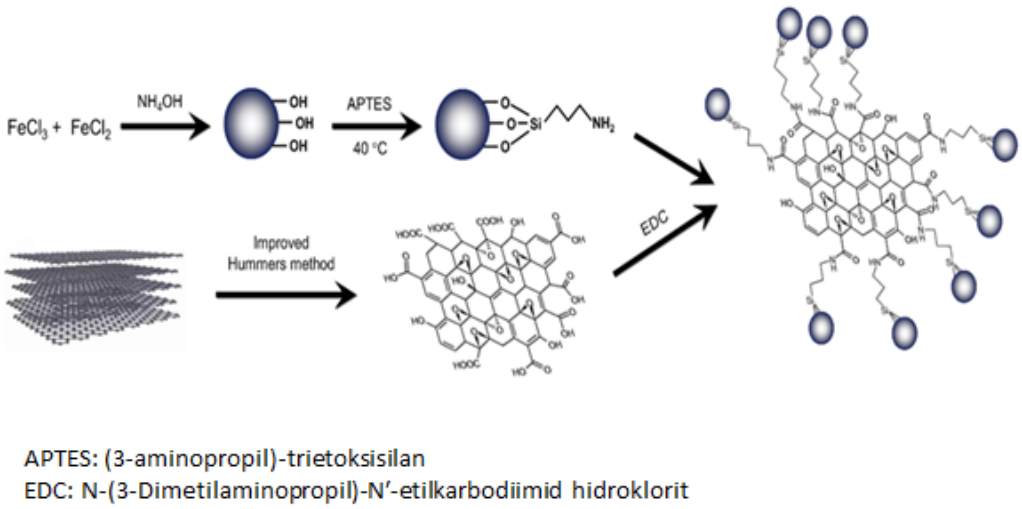
2.5.3. Grafen Oksit Nanotabakalarının Sentezi

Grafen oksit nanotabakaları literatürdeki metoda göre sentezlenmiştir (Marcano ve ark 2010). 3 g grafit tozu ve 9:1 oranında konsantre H_2SO_4 / H_3P0_4(360 mL : 40 mL) çözeltisi cam balon içerisine eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı üzerine alınan çözeltinin sıcaklığı 35 °C'de sabit tutularak içerisine 18 g $KMnO_4$ azar azar eklenmiştir ve her eklemeden sonra ekzotermik reaksiyon gerçekleştiğinden sıcaklık kontrol edilmiştir. Çözeltinin rengi siyah renkten koyu yeşil renge dönüşmüştür. Çözelti geri soğutucu altında 55 °C'de 18 saat karıştırılmış ve daha sonra oda sıcaklığına soğutulmuştur. 400 mL ultra saf sudan hazırlanmış buz tartılarak beher içerisine konulmuştur. Reaksiyon çözeltisi buzun üzerine yavaş bir şekilde eklenmiş ve 20 dakika karıştırılmıştır. Buz eritildikten sonra %30'luk 3 mL H_2O_2 damla damla ilave edilmiş ve 30 dakika daha karıştırılmıştır. Çözelti mor renge dönüşmüştür. 8000

rpm de 25 dakika santrifüj yapılmıştır. Üstte kalan süpernatant kısmı atılmıştır. Çöken pellet kısmı sütlü kahverengindedir. Elde edilen pellet üzerine 200 mL ultra saf su eklenerek gece boyunca bekletilmiştir. Pellet kısmı daha sonra arka arkaya 200 mL ultra saf su, 200 mL %30'luk HCl ve 200 mL etanol ile 2'şer kere yıkanmıştır. Bu uzatılmış çoklu yıkama işleminden sonra kalan materyal, 200 mL eter ile santrifüj edilmiştir, pellet kısmı inkübatörde kurutulmuş ve grafen oksit nanotabakaları elde edilmiştir.

2.5.4. Fe_3O_4-APTES-GO Nanokompozitinin Sentezi

GO içindeki karboksilik asit gruplarının aktivasyonu, bir aktifleştirici madde olarak N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için GO 3 mg/mL'lik bir konsantrasyonda etanolde 1 saat boyunca sonikasyona tabi tutulmuştur. Bu homojen süspansiyon 3 mg/mL konsantrasyonunda EDC ile deiyonize suda 18 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra aktifleştirilmiş GO (0,2 mg/mL) ve Fe_3O_4-APTES nanopartiküllerinin (1 mg/mL) karışımı, 1:1 hacim oranında 30 dakika boyunca sonikasyonla süspanse edilmiş ve karışım 18 saat oda sıcaklığında tutulmuştur. Ardından manyetik ayırma ile partiküller sıvı kısımdan ayrılmıştır ve etanolde birkaç defa yıkandıktan sonra yine manyetik ayırma ile nanopartiküller ayrılarak 70 °C'de etüvde kurutulmuştur. Bu işlem sonunda EDC ile modifiye edilmiş GO ve Fe_3O_4-APTES birleştirilmiştir (Erogul ve ark 2015). Fe_3O_4-APTES-GO hazırlanması Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Fe_3O_4-APTES-GO hazırlanmasının şematik gösterimi.

2.5.5. Fe_3O_4@GO Nanokompozitinin Sentezi

Fe_3O_4@GO nanokompoziti hidrotermal metotla literatürden faydalanılarak sentezlenmiştir (Zhang ve ark 2015). 0,1 g Fe_3O_4 ve 0,16 g GO 80 mL deiyonize su içeren bir beher içerisinde 20 dakikalık ultrasonikasyon işlemiyle süspanse hale getirilmiştir. Süspansiyon çözeltisi 100 mL teflon kaplı paslanmaz çelik otoklava aktarılmıştır. Kap kapatıldıktan ve iyice çalkalandıktan sonra, statik koşullar altında bir fırında 100 °C'de 24 saat hidrotermal olarak işleme tabi tutulmuştur. Oda sıcaklığına soğutulan otoklav içindeki siyah çökeltiler bir mıknatıs yardımıyla ayrılmış ve saf su ile yıkanarak 60 °C'de kurutulmuştur.

2.6. Antibakteriyel Aktivite Analizleri

2.6.1. Bakteri Kültürü Hazırlama

Bakteri çalışmalarında kullanılan tüm malzemeler otoklav cihazı ile her deneyden önce steril edilmiştir. Bakteri suşları (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109) inkübatörde TSB besiyeriyle 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Saf bakteri kolonileri elde etmek için inkübasyondan sonra MHA katı besiyerine öze yardımıyla tek koloni ekimi yapılarak 37 °C 'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tek koloni yöntemiyle ekim yapılan bakteriler % 1 glukozlu TSB besiyerine Mc. Farland 0,5 (10^8 cfu/mL) yoğunluğuna ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteriler 1/100 oranında %1 glukozlu TSB ile seyreltilerek yaklaşık olarak 10^6 cfu/mL son konsantrasyonlu bakteri kültürleri hazırlanmıştır.

2.6.2. Sentezlenen Nanomalzemelerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Tayini

Mikrodilüsyon broth yöntemine göre 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plaklarında çalışma için kullanılacak olan maddeleri bir mikroorganizma ile sıvı kültür ortamına aktarılıp seyreltilerek uygun bir inkübasyon döneminden sonra büyümenin belirlenmesi, doğrudan görsel okuma veya spektrofotometrik yöntemler ile MİK değerleri belirlenmektedir (Jorgensen ve Turnidge 2015, Veiga ve ark 2019).

Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK), bir bakteri kültürünün görünür büyümesini inhibe edebilen en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonudur (Lallemand ve ark 2016).

Çalışma için sentezlenen Fe_3O_4, Fe_3O_4 –APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri 8192 µg/mL konsantrasyonunda distile saf su içerisinde ultrasonik banyoda sonike edilerek stok çözeltileri hazırlanmıştır. Steril 96 kuyucuklu mikroplakalarının her bir kuyucuğuna 100 µL %1 glukozlu TSB besiyeri otomatik dispenser cihazı (BioTek, MicroFill) ile eklenmiştir. Mikroplakaların 1. kuyucuklarına hazırlanan nanomalzemelerin stok çözeltilerinden 100 µL eklenmiştir. Çoklu mikropipet yardımıyla 1. kuyucuktan 10. kuyucuğa kadar ½ seri dilüsyon yapılmıştır. Daha sonra ilk 11 kuyucuğa otomatik dispenser yardımıyla bakteri stokları 100 µL eklenmiştir. Son olarak 12. kuyucuğa 100 µL %1 glukozlu TSB besiyeri eklenmiştir. 11. kuyucuk pozitif 12. kuyucuk negatif kontrol kuyucukları olarak seçilmiştir. Bakterilerin kuyucuklardaki yoğunlukları $\approx 5x10^5$ cfu/mL olmuştur ve sentezlenen nanomalzemelerin ilk kuyucuktaki son konsantrasyonu 2048 µg/mL olmak üzere kuyucuklardaki konsantrasyon ½ azalarak devam etmiştir. Her nanomalzeme için deney üç tekrarlı yapılmıştır. 37 ° C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

24 saat inkübasyon süresinden sonra mikroplaka okuyucu (BioTek, µQuant) ile 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek kuyucukların absorbanslarının kuyucuktaki nanomalzeme konsantrasyonuna karşı grafiğe çevrildiğinde oluşan eğrilerden MİK değerleri, hesaplanmıştır. Grafiklerde kuyucuklarda üreme oldu ise absorbans değerleri yüksek kuyucuklarda üreme engellenmiş ise absorbans değerleri negatif kontrol ile kıyaslanabilecek kadar düşüktür. Absorbans değerinin grafikte en belirgin düşüşle sabitlenen ilk kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir (Kang ve ark 2008).

2.7. Antibiyofilm Aktivite Analizleri

2.7.1. Kristal Viyole Boyama Yöntemi ile Antibiyofilm Aktivite Tayini

Kristal viyole ile mikroplaka boyama yöntemi ilk olarak Christensen tarafından tanımlanmış ve daha sonra biyofilm çalışmaları için uygun olacak şekilde sürekli olarak geliştirilmiştir. Christensen yöntemi biyofilm oluşumunun tespiti için standart test olarak kabul edilmektedir (Christensen ve ark 1985, Xu ve ark 2016). Biyofilm çalışmalarında CV negatif yüklü yüzey moleküllerini ve polisakkaritlerin hücre dışı matrisini boyar ve fazla boya ortamdan uzaklaştırılır. Biyofilm yapı üzerinde kalan boya çözdürülür ve spektrofotometrik yöntemler aracılığıyla biyofilm inhibisyon değerleri hesaplanır (Ozturk ve ark 2014, Xu ve ark 2016).

Fe_3O_4, Fe_3O_4–APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO, Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109 suşları üzerinde biyofilm inhibisyon çalışması için antibakteriyel aktivite çalışmasında kullanılan mikroplaklar değerlendirildikten sonra antibiyofilm aktivitesi için kuyucukların içleri nazikçe ters çevrilerek boşaltılmıştır. Otomatik dispenser cihazı (BioTek Microfill) ile mikroplakalar üçer kez 250 µL steril PBS ile yıkanıp kurutulmuştur. Kurutulduktan sonra mikroplakaların her kuyucuğuna %0,1'lik 225 µL kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve 15 dakika bekletilmiştir. Daha sonra kristal viyole çözeltisi dökülmüştür. Otomatik dispenser cihazı yardımıyla mikroplakalar ikişer kez 250 µL distile su ile yıkanıp kurutulmuştur. %33'lük 250 µL glasiyel asetik asit çözeltisi her kuyucuğa dispenser cihazı ile eklenerek kristal viyole ile boyanmış biyofilm içeriği çözündürülmüştür. Antibiyofilm aktivitesini belirlemek için son olarak mikroplaka okuyucusu (BioTek, µQuant) ile 570 nm dalga boyundaki absorbanslar ölçülmüş ve biyofilm inhibisyon (%) değerleri bulunmuştur. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır.

Biyofilm inhibisyon (%) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (Aksoy ve ark 2020).

$$\text{Biyofilm inhibisyon oranı (\%)} = \left(\left((C - B) - (T - B) \right) / (C - B) \right) \times 100.$$

B, sadece besiyeri içeren kuyulardaki ortalama absorbans değeri (negatif kontrol)

C, bakteri ve besiyeri içeren kuyulardaki ortalama absorbans değeri (pozitif kontrol)

T, nanomalzeme içeren kuyulardaki ortalama absorbans değeridir.

2.7.2. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun Kristal Viyole Boyama ile Işık Mikroskobunda Görüntülenmesi

Bakteri suşları etüvde TSB besiyeriyle 37 °C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Saf bakteri kolonileri elde etmek için inkübasyondan sonra MHA katı besiyerine öze yardımıyla tek koloni ekimi yapılarak 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tek koloni yöntemiyle ekim yapılan bakteriler %1 glukozlu TSB besiyerine Mc. Farland 0,5 (10^8 cfu/mL) yoğunluğuna ayarlanmıştır.

Hazırlanan bakteriler 1/100 oranında % 1 glukozlu TSB ile seyreltilerek yaklaşık olarak 10^6 cfu /mL son konsantrasyonlu bakteri kültürleri hazırlanmıştır.

Deney 4 gruba ayrılmıştır: 1. grup pozitif kontrol (sadece bakteri); 2. grup Fe_3O_4-APTES-GO; 3. grup GO; 4. grup Fe_3O_4@GO olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* JM109 bakteri suşlarında çalışılmıştır. Cam tüplerin içerisine, hazırlanan bakteri kültürlerinden 2 mL ilave edilmiştir. Tüplerin içerisine sentezlenmiş olan nanomalzemelerden son konsantrasyonları 256 ve 512 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan iki ayrı konsantrasyondaki tüplerin içerisine uygun boyutlarda kesilip steril edilen lamlardan yerleştirilip tüplerin ağzı steril bir şekilde kapatılmıştır. Cam tüpler 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Deney çift tekrarlı yapılmıştır. İnkübasyondan sonra lamlar 2 kez steril PBS ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Kurutulan lamlar %0,1'lik kristal viyole çözeltisi içerisinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 2 kez steril distile su ile yıkanıp kurutulmuştur. Kurutulan lamların bir yüzü asetik asit ile temizlenmiştir. Lamların üzerine immersiyon yağı eklenerek örnekler ışık mikroskobunda görüntülenmiştir.

2.7.3. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun LIVE/DEAD Boyama ile Floresan Mikroskobunda Görüntülenmesi

LIVE/DEAD BacLight boyama kiti hücre membran bütünlüğünün bir fonksiyonu olarak bakterilerin canlılığını değerlendirmek için kullanılır. Kitin içerisinde iki farklı nükleik asit boyası bulunmaktadır. SYTO 9, tüm bakteriyel membranlara nüfuz eder ve hücreleri floresan ışık altında yeşil renge boyamaktadır. Propidyum iyodür ise hücre membranı bozulmuş yalnızca hasar görmüş hücrelere nüfuz eder ve ölmüş bakteri hücrelerini floresan ışık altında kırmızı renge boyamaktadır (Boulos ve ark 1999, Stiefel ve ark 2015, Aksoy 2020).

Bakteriler, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri ile muamele edilmiştir. Bakterilerin hücre membran bütünlüğüne bağlı olarak canlılığının izlenmesi zarar görmüş veya ölmekte olduğu düşünülen hücreleri incelemek için LIVE/DEAD BacLight boyama kiti protokolüne göre floresan mikroskopta görüntüleri incelenmiştir.

Bakteri suşları etüvde TSB besiyeriyle 37 °C' de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Saf bakteri kolonileri elde etmek için inkübasyondan sonra MHA katı besiyerine öze yardımıyla tek koloni ekimi yapılarak 37 °C ' de 24 saat inkübe edilmiştir. Tek koloni yöntemiyle ekim yapılan bakteriler % 1 glukozlu TSB besiyerine Mc. Farland 0,5 (10^8 cfu/mL) yoğunluğuna ayarlanmıştır.

Hazırlanan bakteriler 1/100 oranında %1 glukozlu TSB ile seyreltilerek yaklaşık olarak 10^6 cfu/mL son konsantrasyonlu bakteri kültürleri hazırlanmıştır.

Deney 4 gruba ayrılmıştır: 1. grup pozitif kontrol(sadece bakteri); 2. grup Fe_3O_4-APTES-GO; 3. grup GO; 4. grup Fe_3O_4@GO olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* JM109 bakteri suşlarında çalışılmıştır. Cam tüplerin içerisine, hazırlanan bakteri kültürlerinden 2 mL ilave edilmiştir. Tüplerin içerisine sentezlenmiş olan nanomalzemeler de son konsantrasyonları 256 ve 512 µg/mL olacak şekilde eklenmiştir. Hazırlanan iki ayrı konsantrasyondaki tüplerin içerisine uygun boyutlarda kesilip steril edilen lamlardan yerleştirilip tüplerin ağzı steril bir şekilde kapatılmıştır. Cam tüpler 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Deney çift tekrarlı yapılmıştır. İnkübasyondan sonra lamlar 2 kez steril PBS ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Kurutulan lamların bir yüzü asetik asit ile temizlenmiştir.

–20 °C’de saklanan LIVE/DEAD BacLight boyama kitleri dışarı çıkartılarak oda sıcaklığında eritilmiştir. İki ayrı boyadan ependorf tüpüne eşit miktarda alınarak boyaların karışması sağlanmıştır. Lamların üzerine hazırlanan boya karışımından 10 µL eklenip 45°’lik açıyla lamel kapatılmıştır. Ardından karanlık bir ortamda 15 dakika bekletilmiştir. Lamellerin üzerine görüntüleme için mounting oil bir damla damlatılmıştır. Hazırlanan örnekler floresan mikroskobunda görüntülenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Sentezlenen Nanomalzemelerin Karakterizasyonu

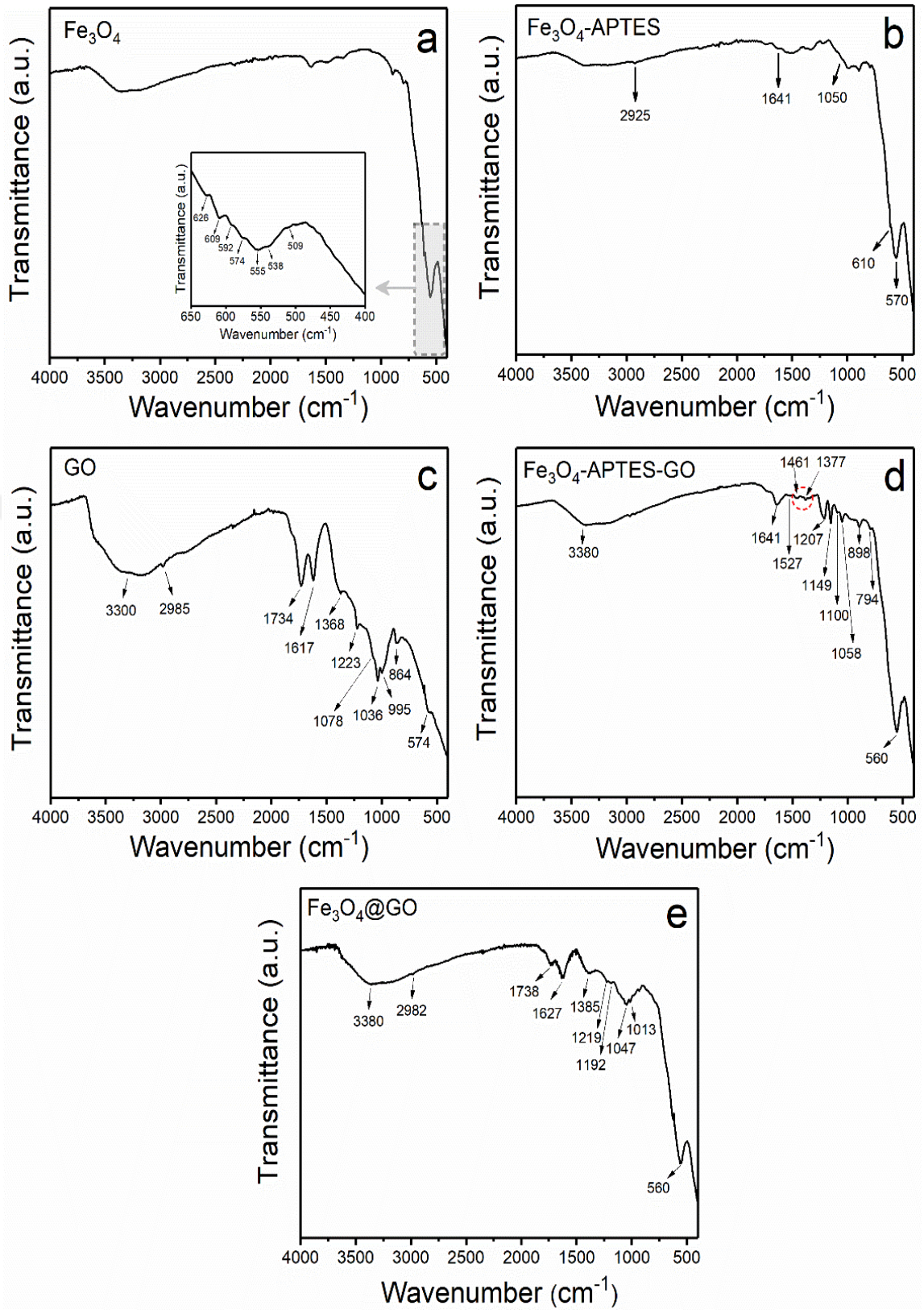
3.1.1. FT-IR Analiz Sonuçları

Sentezlenen nanomalzemelerin yapısındaki ana fonksiyonel grupların varlığını kanıtlamak için FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.1'de Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, GO, Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO'nun FT-IR spektrumları gösterilmiştir. Fe_3O_4 nanopartikülünün varlığı düşük dalga sayılarında (<700 cm^{-1}) görülen kuvvetli absorbsiyon bantlarının varlığıyla kanıtlanmıştır. Şekil 3.1a 'da 626-538 cm^{-1} aralığında görülen bu pikler, manyetik nanoparçacıklardaki karakteristik Fe-O gerilme titreşimlerinden kaynaklanmaktadır. APTES'in manyetik NP'lerin yüzeyine kovalent immobilizasyonu (Şekil 3.1b), Si–O gruplarının 1050 cm^{-1} 'deki absorbsiyon piki ile doğrulanmıştır. Yaklaşık 3500 ve 1600 cm^{-1}'deki iki geniş bant, sırasıyla serbest NH_2 gruplarının N-H gerilme ve NH_2 eğilme titreşimlerini göstermektedir. APTES yapısında sabitlenmiş propil grubunun varlığı, 2925 cm^{-1}'de ortaya çıkan C-H gerilme titreşimleri ile doğrulanmıştır (Can ve ark 2009).

Grafen oksite ait pikler (Şekil 3.1c)'de gösterilmektedir. Yapının içerisinde bulun OH gruplarını yaklaşık 3300 cm^{-1} 'deki yayvan pikler temsil etmektedir. 2985 cm^{-1}'de görülen pik ise C-H gerilme titreşimlerine aittir. 1734 ve 1617 cm^{-1}'de görülen pikler sırasıyla karbonil grubunu (C=O) ve aromatik (C=C) titreşimlerini temsil eder. Ayrıca, 1223 cm^{-1} ve 1036 cm^{-1} pikleri sırasıyla epoksi (CO-C) fonksiyonel gruplarına ve C-O gerilme titreşimine aittir ve grafitin oksidasyonunu doğrulamaktadır (Marcano ve ark 2010, Erogul ve ark 2015).

Grafen oksitin EDC ile aktifleştirilmiş karboksilik gruplarıyla Fe_3O_4-APTES'in amin grupları arasında meydana gelen amitleşme reaksiyonu sonucunda oluşan Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitinin FTIR spektrumunda (Şekil 3.1d) 1641 cm^{-1} (-CONH amit bandı) ve 1461 cm^{-1}'de (C-N amit gerilme bandı) görülen pikler yapının oluştuğunu doğrulamaktadır (Erogul ve ark 2015, Sahoo ve ark 2020).

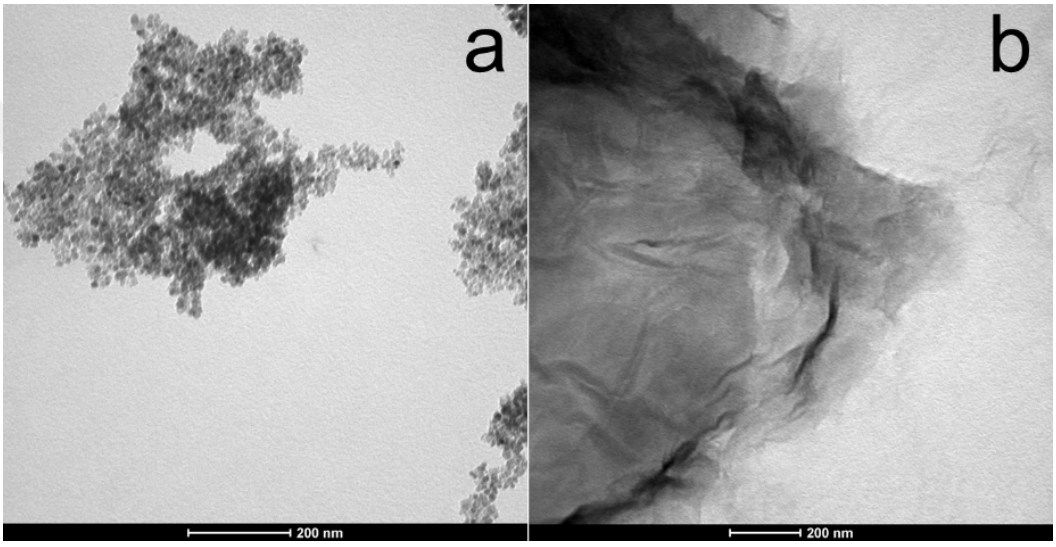
Hidrotermal yöntemle elde edilen Fe_3O_4@GO nanokompozitinin FT-IR spektrumu (Şekil3.1e)'de gösterilmiştir. Spektrumda GO nanotabakaları ve Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait –OH piki, 3380 cm^{-1} dalga sayısı civarında görülmektedir. 560 cm^{-1}'de görülen keskin pik Fe-O gerilme titreşimlerine ait piklerdir. Ayrıca zayıfta olsa 1738 cm^{-1}'de C=O piki, 1627 cm^{-1}'de C=C, 1385 cm^{-1}'de C-H titreşimleri görülmektedir. GO nanotabakalarına ait karakteristik piklerin zayıflama ya da kaybolmasının nedeni GO yüzeyinin Fe_3O_4 tanecikleri tarafından kaplandığının göstergesidir.



Şekil 3.1. (a) Fe_3O_4, (b) Fe_3O_4-APTES, (c) GO, (d) Fe_3O_4-APTES-GO ve (e) Fe_3O_4@GO'nun FT-IR spektrumları.

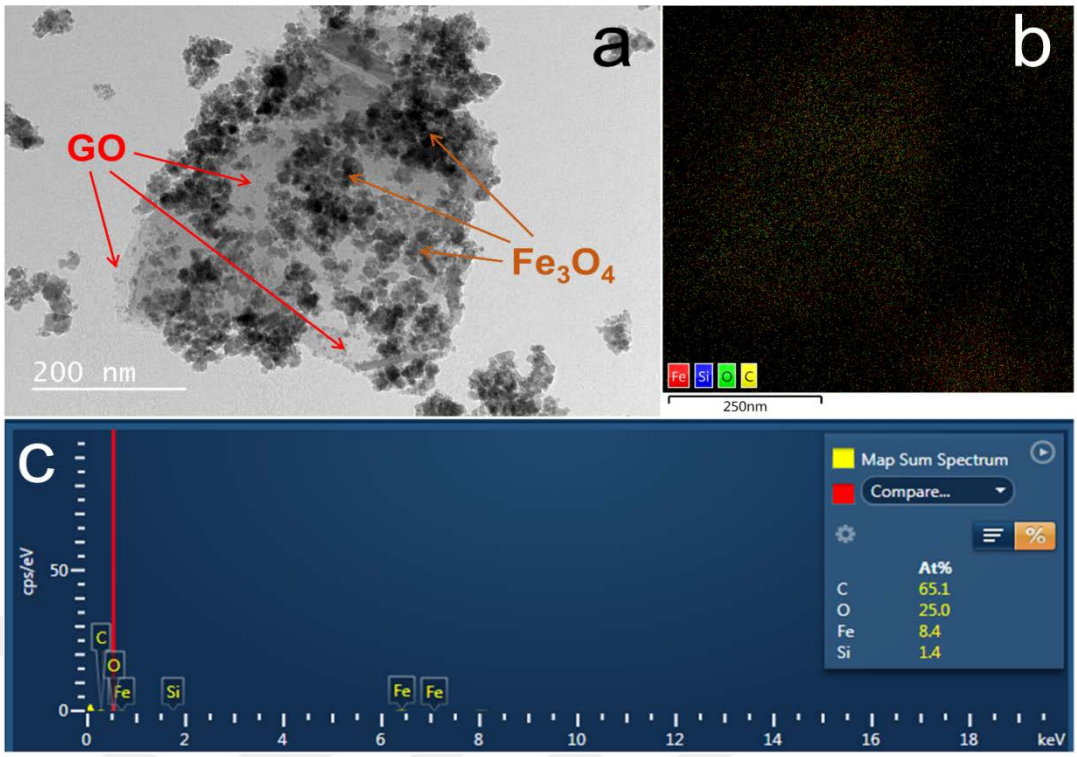
3.1.2. TEM Analiz Sonuçları

Sentezlenen Fe_3O_4, GO, Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO' nun morfolojik özellikleri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile incelenmiştir. Şekil 3.2'de Fe_3O_4 ve GO'nun TEM görüntüleri verilmiştir. Fe_3O_4 nanopartiküller (a)'da gösterilmiş, manyetik nanopartiküllerin arasında nano boyutta herhangi bir itme kuvvetinin olmamasından dolayı yoğun agregalar olarak görülmektedir. Grafen oksit nanopartikülün TEM görüntüsü (b) grafen oksitin pul benzeri tabakalı ve kıvrımlı yapısını göstermektedir.



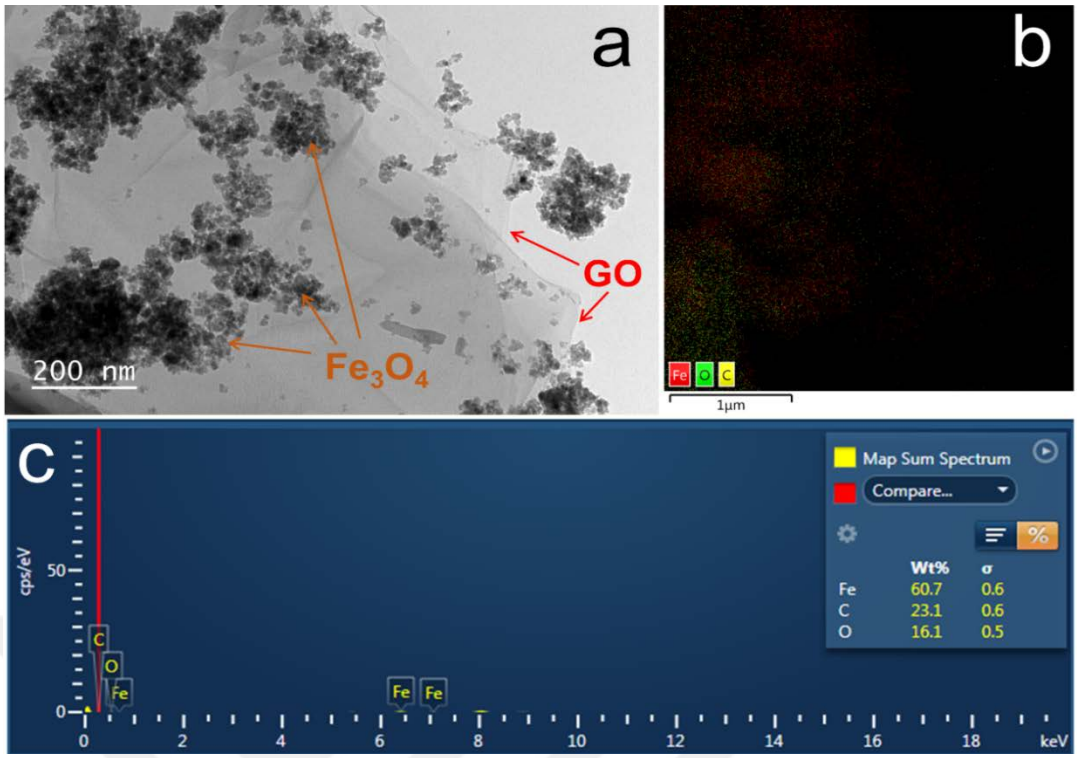
Şekil 3.2. (a) Fe_3O_4 ve (b) GO 200 nm boyutunda TEM görüntüleri.

APTES ile modifiye edilmiş Fe_3O_4'ün Grafen oksit ile kovalent bağlanmasından sonra, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin Grafen oksit yüzeyinde iyi dağıldığı, bazı alanlarda ise kümelenmiş manyetik nanopartiküllerin bulunduğu Şekil 3.3a'daki TEM görüntüsü ile gösterilmiştir. Enerji dağılımlı X-Işını spektroskopisi (EDS) haritalaması, C, Fe, O ve Si elementlerinin varlığını ve dağılımını göstermiştir (Şekil 3.3b). Ayrıca, Fe_3O_4-APTES-GO yapısındaki bu temel elementlerin yüzdesi Şekil 3.3c'de verilmiştir.



Şekil 3.3. (a) Fe_3O_4-APTES-GO TEM görüntüsü, (b) EDS haritalaması ve (c) Fe_3O_4-APTES-GO kompozisyon yüzdesi (%).

Hidrotermal yöntemle elde edilen Fe_3O_4@GO nanokompozitinin TEM görüntüsü Şekil 3.4a'da verilmiştir. Ortalama çapı yaklaşık 10-15 nm olan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin GO tabakalarının yüzeyinde dağıldığı açıkça görülebilmektedir. Ayrıca, bu nanokompozitin bileşimi TEM-EDS spektroskopisi ile doğrulanmıştır. Enerji dağılımlı X-Işını spektroskopisi (EDS) haritalaması, C, Fe ve O elementlerinin varlığı ve dağılımı Şekil 3.4b'de gösterilmiştir. Ayrıca, Fe_3O_4@GO'nun temel bileşimi Şekil 3.4c'de verilmiştir.



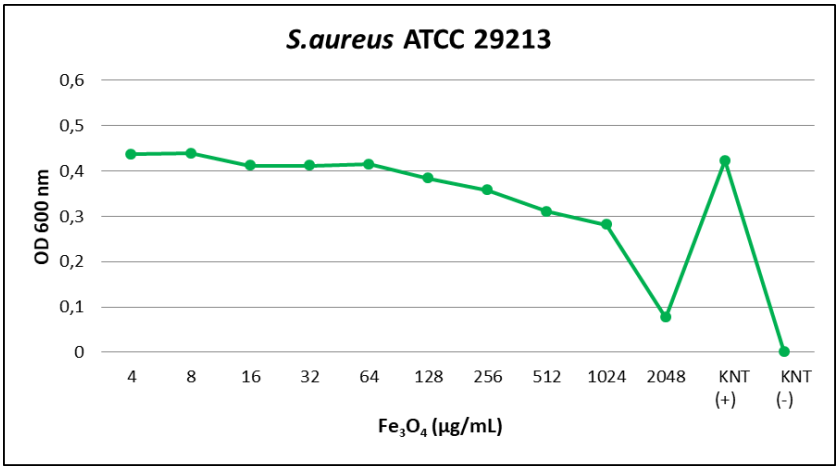
Şekil 3.4. (a) Fe_3O_4@ GO TEM görüntüsü, (b) EDS haritalaması ve (c) Fe_3O_4@GO kompozisyon yüzdesi (%).

3.2. Sentezlenen Nanomalzemelerinin Antibakteriyel Aktivitesi

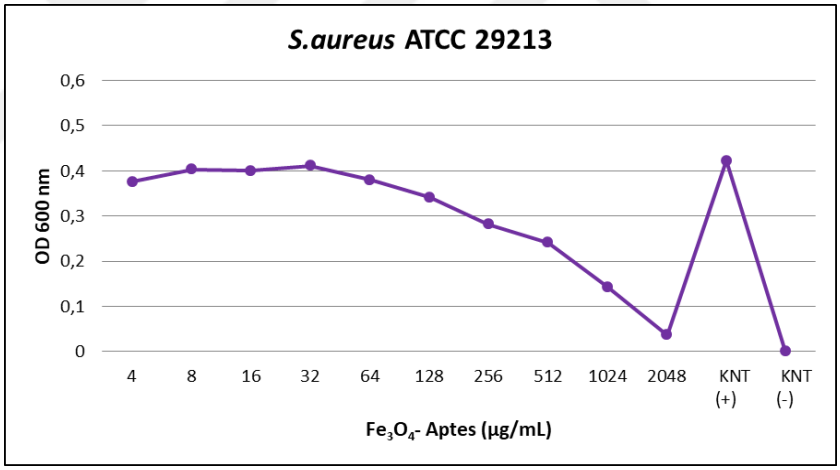
3.2.1. Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Nanomalzemelerin Antibakteriyel Aktivitelerinin Sonuçları

Çalışmada farklı konsantrasyonlarda hazırlanan Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO, Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109 bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel aktivitesi 24 saat inkübasyon süresinden sonra mikroplaka okuyucu (BioTek, µQuant) ile 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek kuyucukların absorbanslarının kuyucuktaki nanomalzeme konsantrasyonuna karşı grafiğe çevrilmiştir. Kuyucuklarda üreme oldu ise absorbans değerleri yüksek, kuyucuklarda üreme engellenmiş ise absorbans değerleri negatif kontrol ile kıyaslanabilecek kadar düşük değerler elde edilmiş ve aşağıda grafiklerde gösterilmiştir.

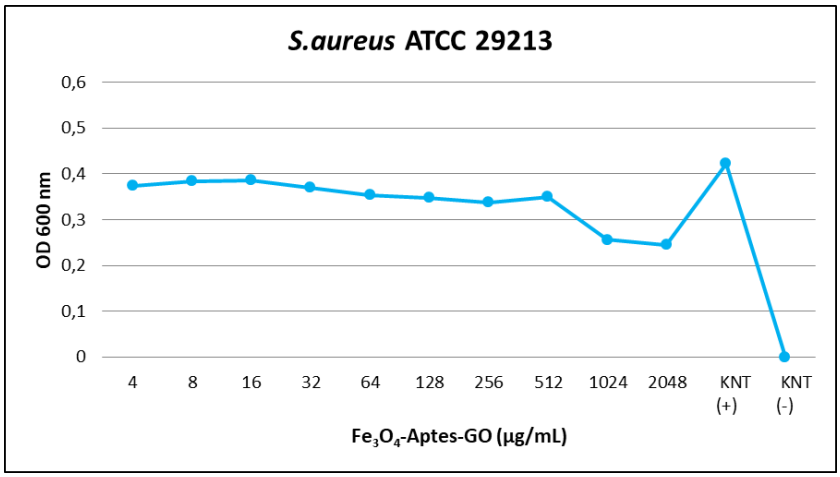
Staphylococcus aureus



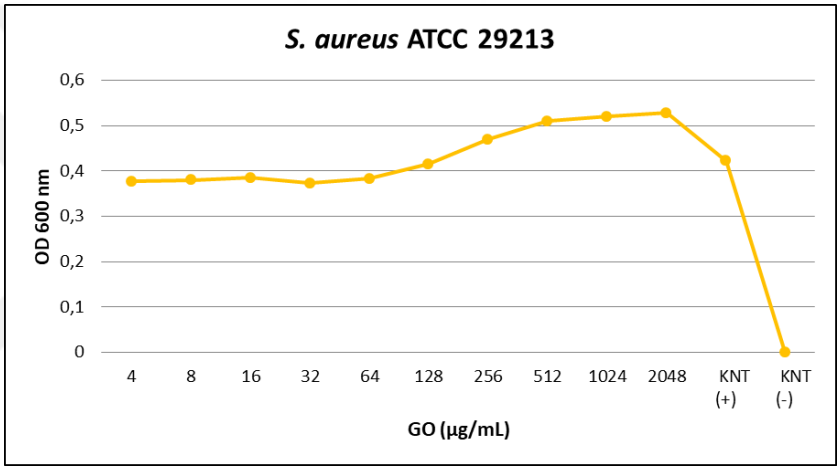
Şekil 3.5. Fe_3O_4 ile muamele edilen *S.aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



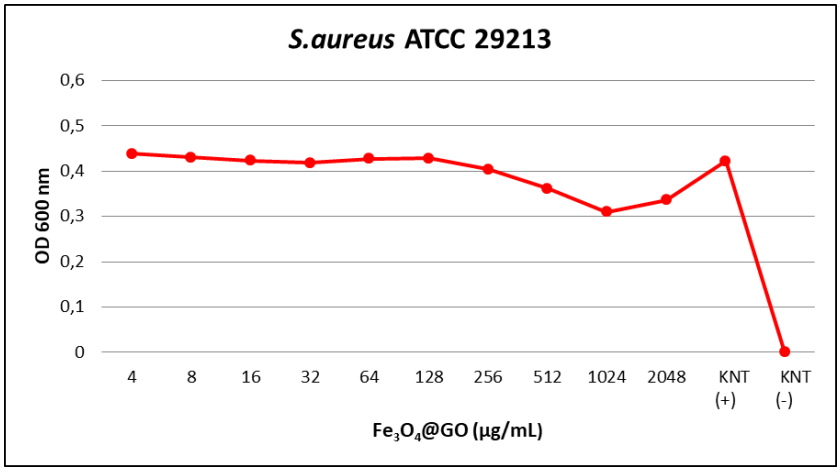
Şekil 3.6. Fe_3O_4-APTES ile muamele edilen *S.aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



Şekil 3.7. Fe_3O_4-APTES-GO ile muamele edilen *S.aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

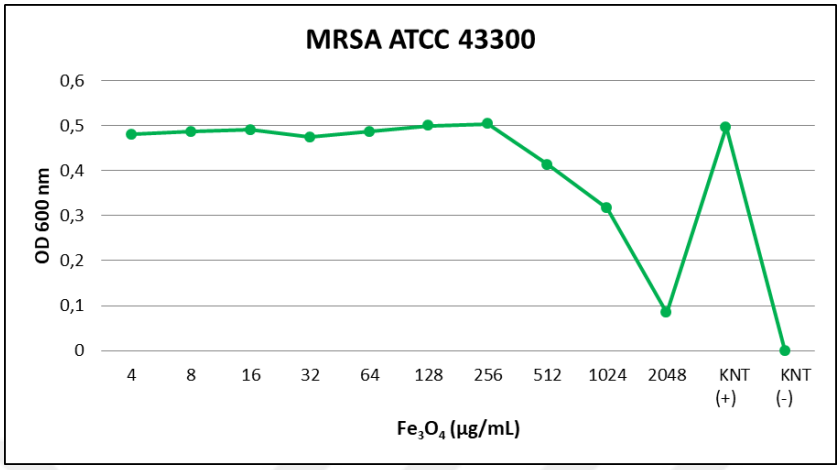


Şekil 3.8. GO ile muamele edilen *S.aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

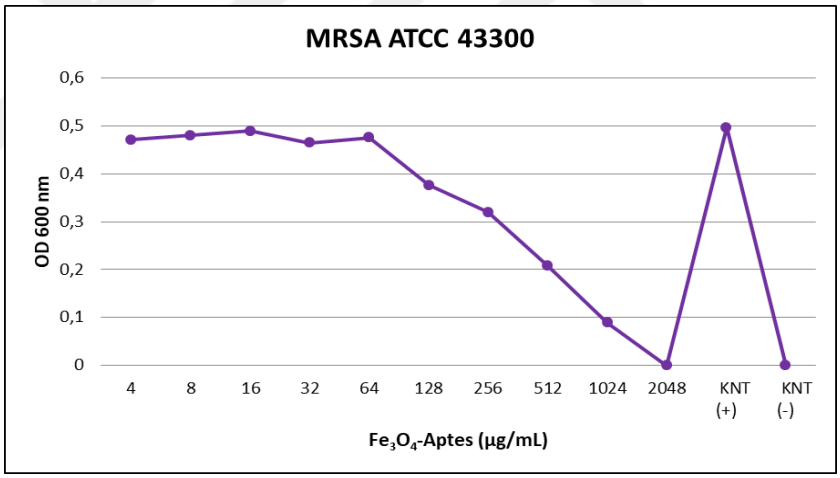


Şekil 3.9. Fe_3O_4@GO ile muamele edilen *S.aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

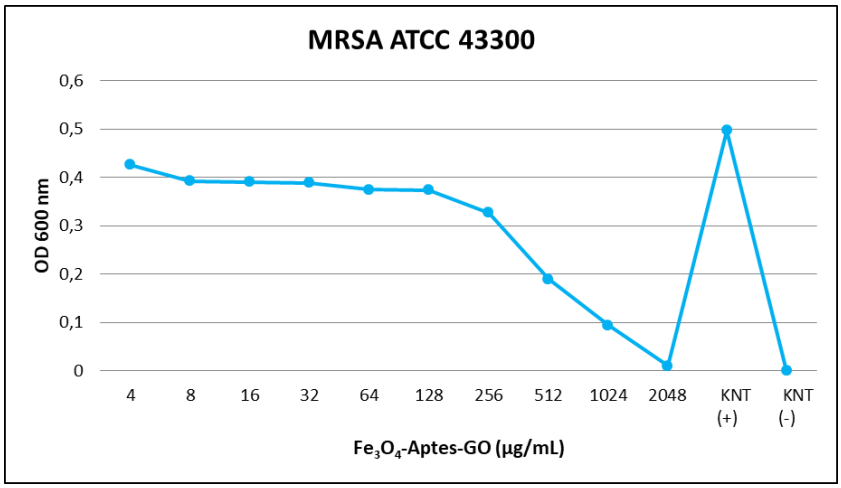
Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)



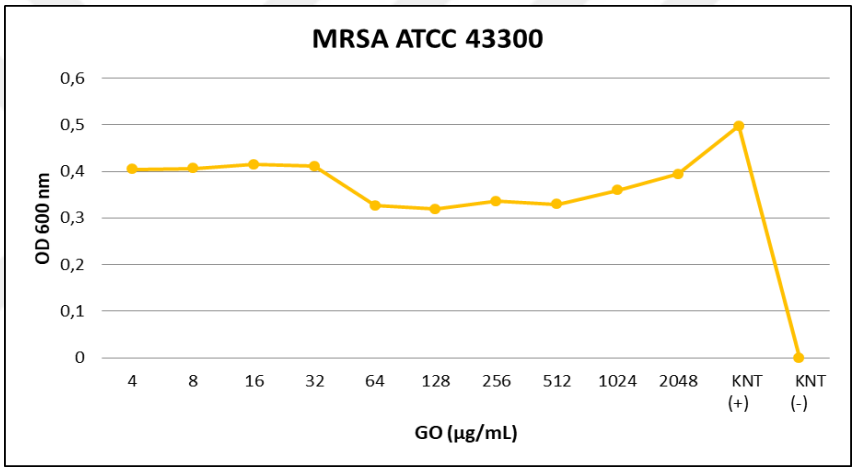
Şekil 3.10. Fe_3O_4 ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



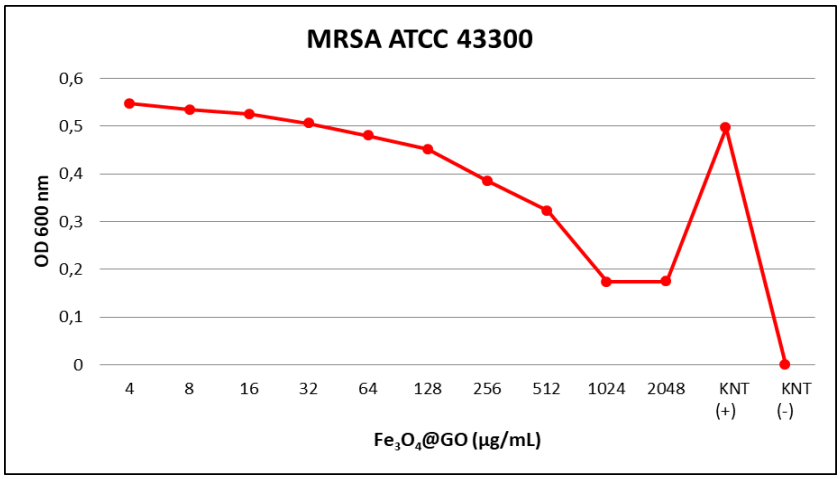
Şekil 3.11. Fe_3O_4-APTES ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



Şekil 3.12. Fe_3O_4-APTES-GO ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

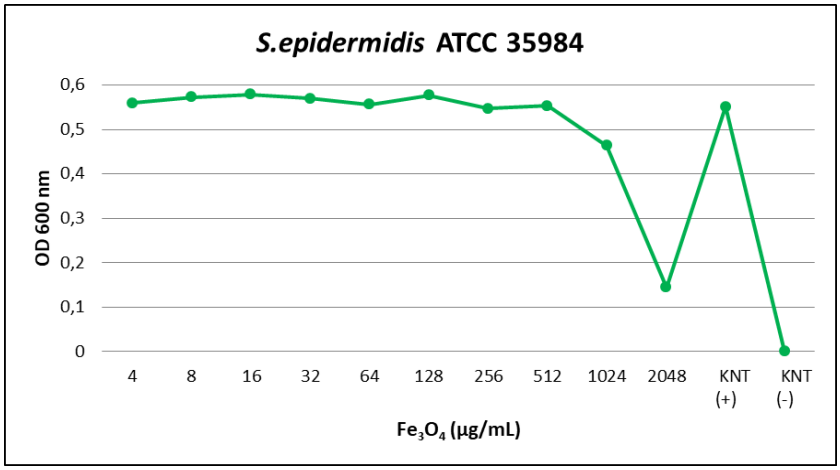


Şekil 3.13. GO ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

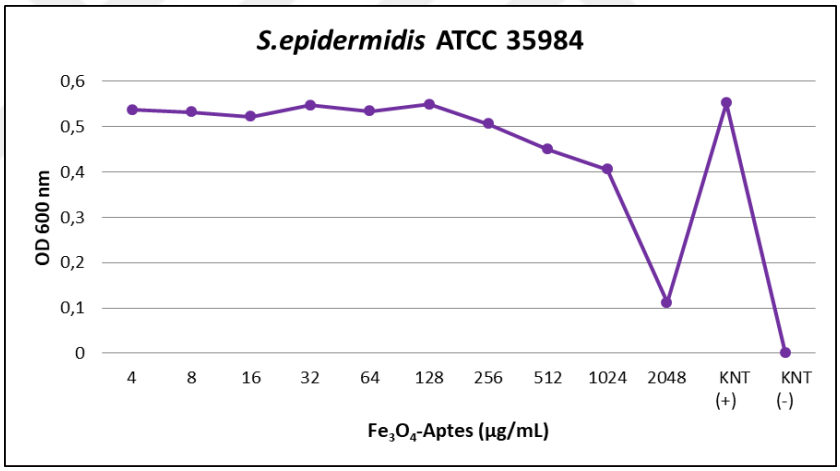


Şekil 3.14. Fe_3O_4@GO ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

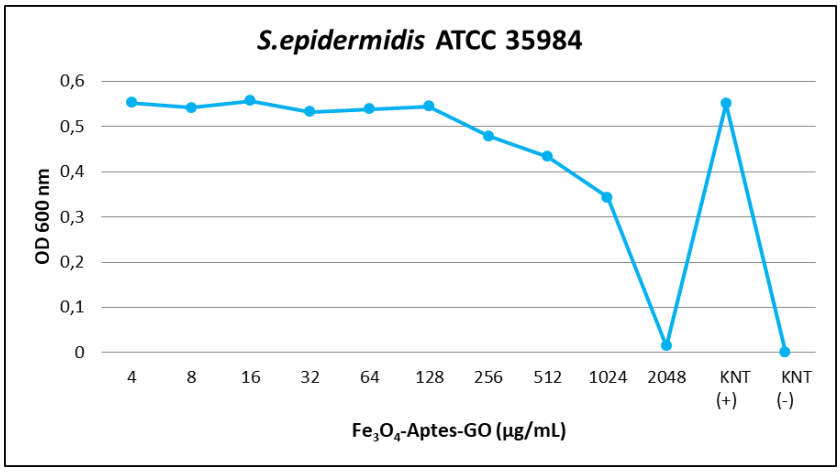
Staphylococcus epidermidis



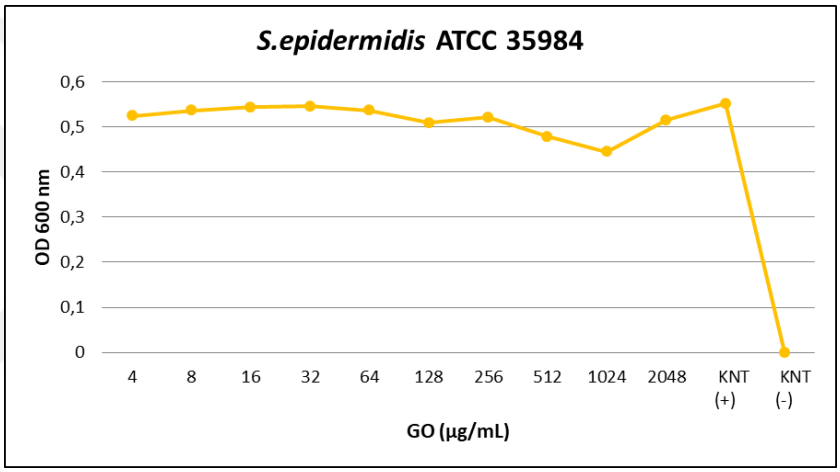
Şekil 3.15. Fe_3O_4 ile muamele edilen *S. epidermidis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



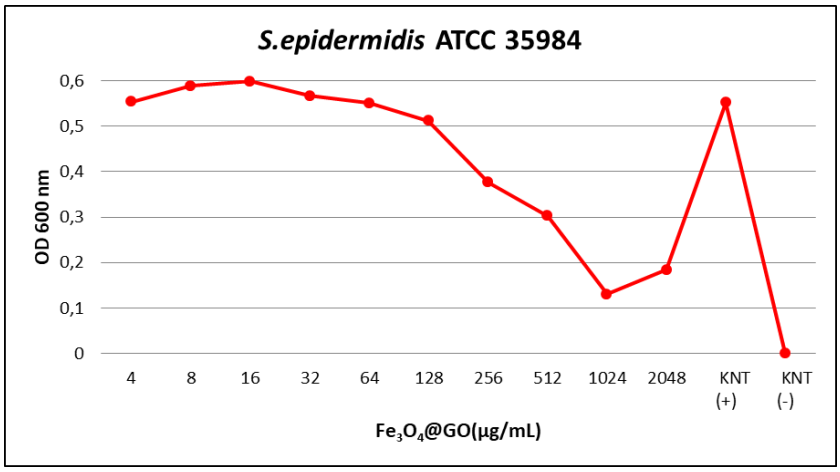
Şekil 3.16. Fe_3O_4-APTES ile muamele edilen *S. epidermidis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



Şekil 3.17. Fe_3O_4-APTES-GO ile muamele edilen *S. epidermidis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

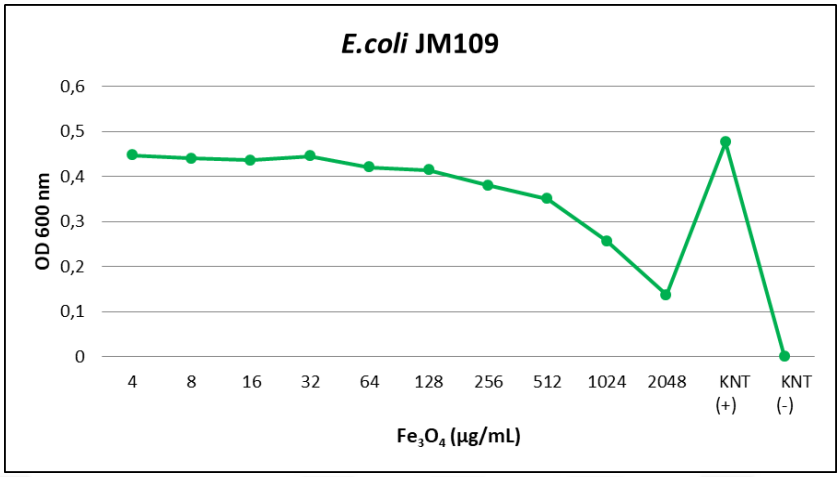


Şekil 3.18. GO ile muamele edilen *S. epidermidis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

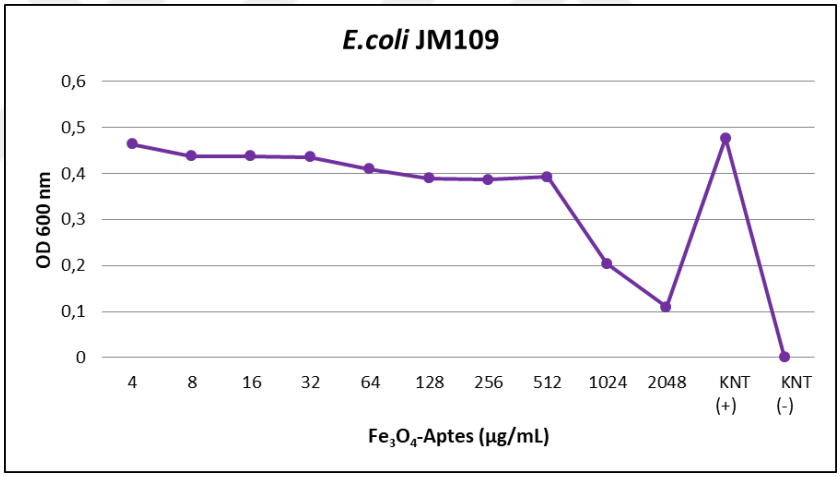


Şekil 3.19. Fe_3O_4@GO ile muamele edilen *S. epidermidis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

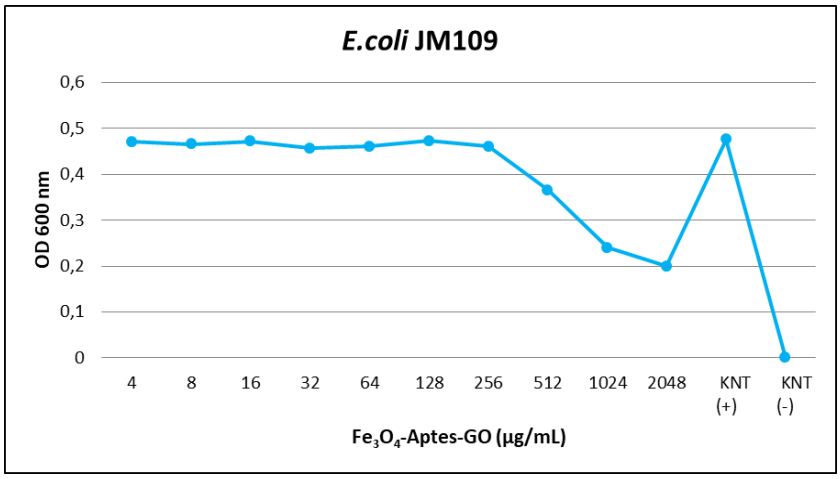
Escherichia coli



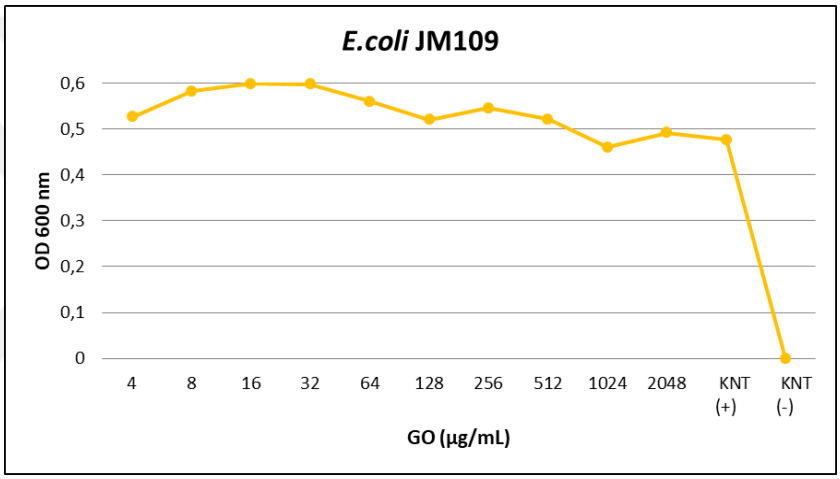
Şekil 3.20. Fe3O4 ile muamele edilen *E. coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



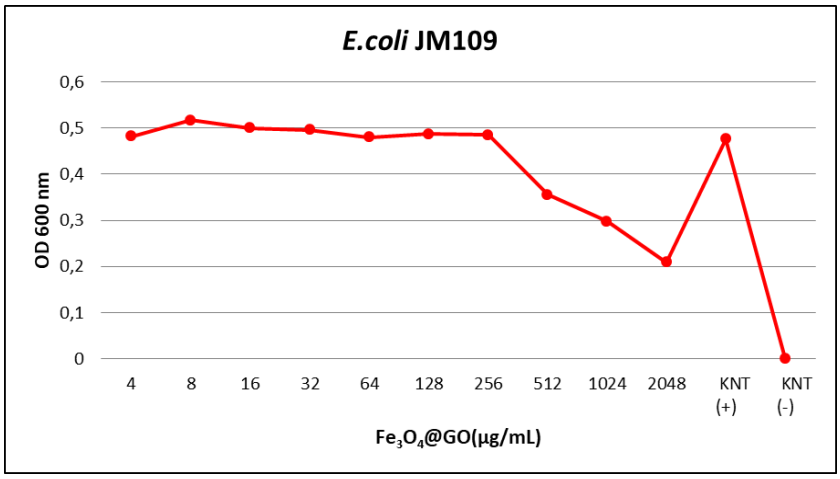
Şekil 3.21. Fe_3O_4-APTES ile muamele edilen *E. coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



Şekil 3.22. Fe_3O_4-APTES-GO ile muamele edilen *E. coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



Şekil 3.23. GO ile muamele edilen *E. coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.



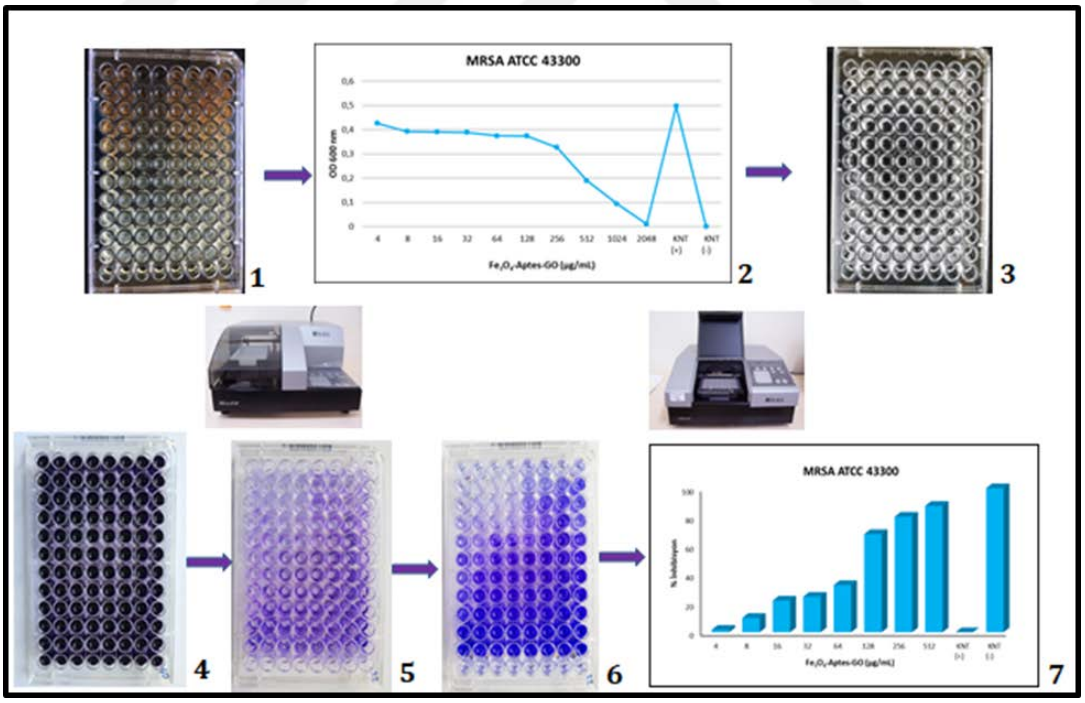
Şekil 3.24. Fe_3O_4@GO ile muamele edilen *E. coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} Spektrofotometrik değerleri.

3.3. Sentezlenen Nanomalzemelerin Antibiyofilm Aktivitesi

3.3.1. Kristal Viyole Boyama Yöntemi ile Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

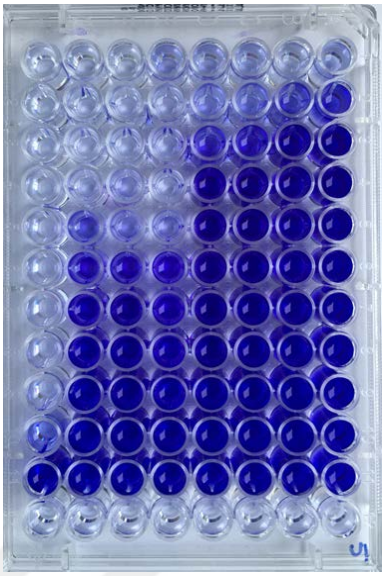
Çalışmanın ilk aşamasında bakteri suşlarına karşı nanomalzemelerin antibakteriyel aktiviteleri tespit edilmiştir. Bu aşamada ise sentezlemiş olduğumuz nanomalzemelerin sub-MİK dozlarda biyofilm üretimine karşı inhibisyon potansiyelleri araştırılmış ve değerlendirilmiştir. Çalışmanın basamakları Şekil 3.25' de şematik olarak gösterilmiştir.

Mikro plaka kristal viyole boyama yöntemi ile yapılan çalışmalarda % inhibisyon değerleri hesaplanmış ve grafiğe dönüştürülmüştür. Tablo 3.1'de *S.aureus* bakterisinin % inhibisyon değerleri, Tablo 3.2'de MRSA bakterisinin % inhibisyon değerleri, Tablo 3.3'de *S.epidermidis* bakterisinin % inhibisyon değerleri, Tablo 3.4'de *E.coli* bakterisinin % inhibisyon değerleri verilmiştir. Elde edilen % inhibisyon değerleri grafiklere dönüştürülmüştür.



Şekil 3.25. Biyofilm İnhibisyon çalışmasının aşamaları. 1- 24 saatlik inkübasyon sonu mikroplakalar, 2- Spektrofotometrik antibakteriyel aktivite sonuçları, 3- Spektrofotometrik antibakteriyel aktivite sonuçları bulunmasından sonra plakanın boşaltılıp yıkanması, 4,5- Planktonik bakterilerin uzaklaştırılmasından sonra CV boyaması, 6- Bağlı CV boyasının çözündürülmesi, 7- Spektrofotometrik (%) inhibisyon değerlerinin bulunması.

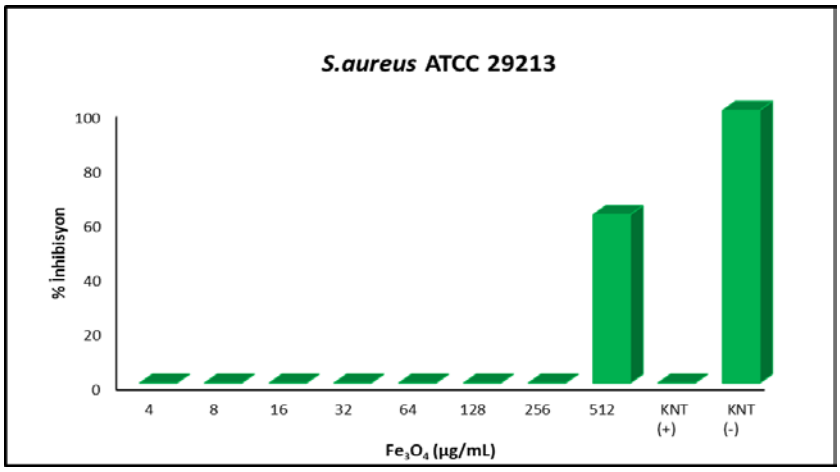
Staphylococcus aureus

a)  b) 

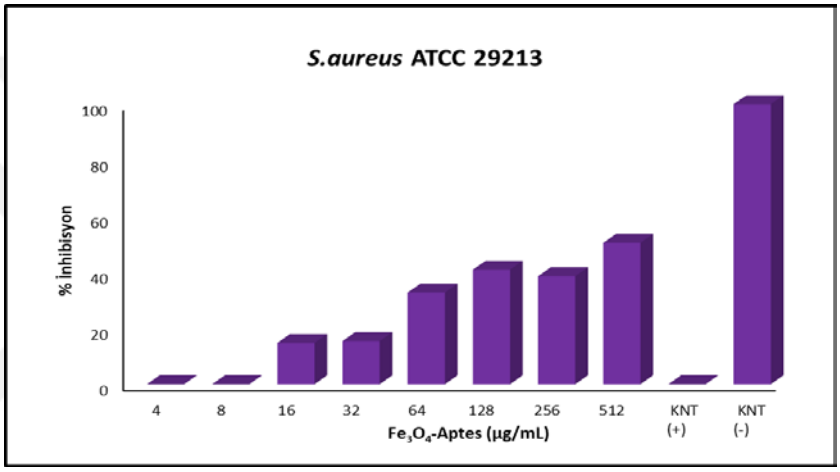
Şekil 3.26. a) *S.aureus* bakterisinin biyofilmlerine tutunmuş CV boyanma görüntüleri. b) *S.aureus* bakterisinin biyofilmlere bağlı CV boyasının çözündürülmesi. (A sırası: Fe_3O_4, B sırası: Fe_3O_4-APTES, C ve D sırası: Fe_3O_4-APTES-GO, E ve F sırası: GO, G sırası: Fe_3O_4@GO, H sırası: Klaritromisin).

Tablo 3.1. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon değerleri.

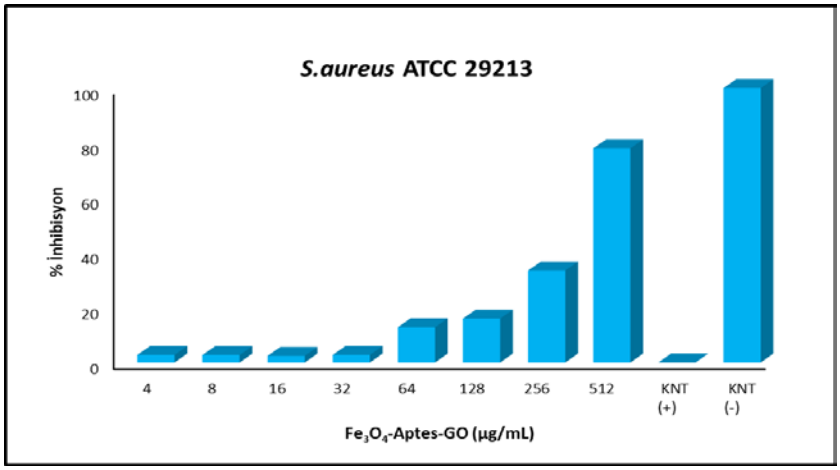
Konsantrasyon / Nanomalzemeler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
Fe_3O_4	61,68	-	-	-	-	-	-	-
Fe_3O_4-APTES	50,46	38,57	40,9	32,72	15,4	14,73	-	-
Fe_3O_4-APTES-GO	78,02	33,49	15,99	12,86	2,72	2,38	2,69	2,72
GO	99,66	98,83	96,67	74,08	55,14	54	45,82	18,16
Fe_3O_4@GO	99,63	99,18	87,54	77,56	51,36	29,01	18,13	-



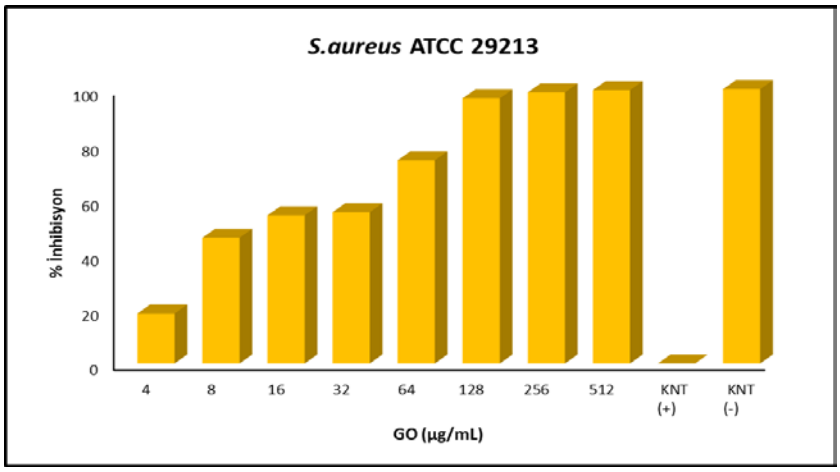
Şekil 3.27. Fe_3O_4 'ün *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



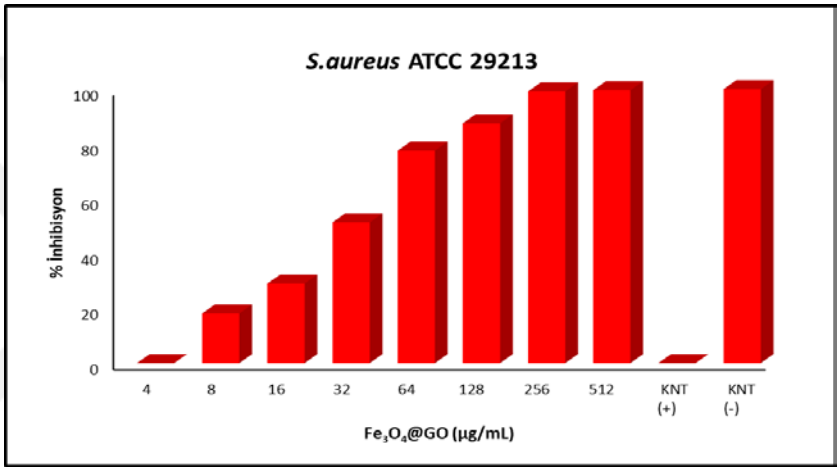
Şekil 3.28. Fe_3O_4 – APTES' in *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.29. Fe_3O_4-APTES-GO'nun *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

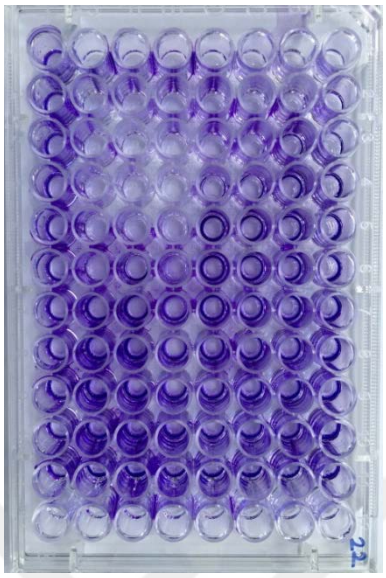
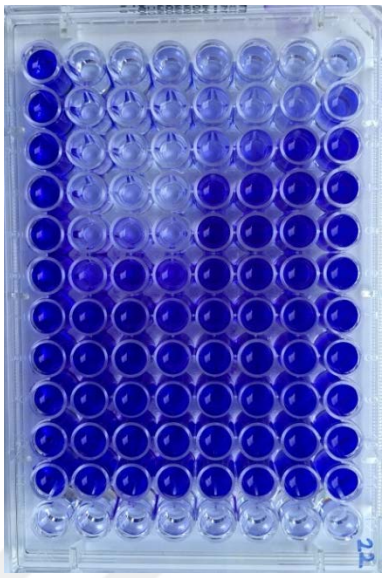


Şekil 3.30. GO'nun *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.31. Fe_3O_4@GO'nun *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

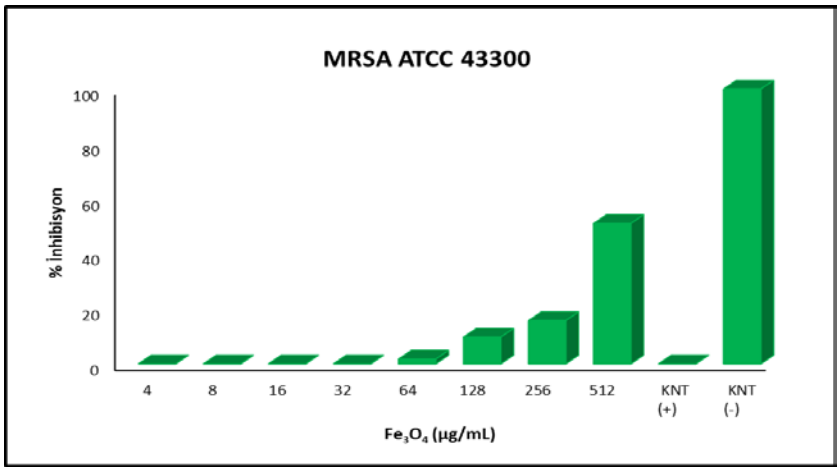
Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)

a)  b) 

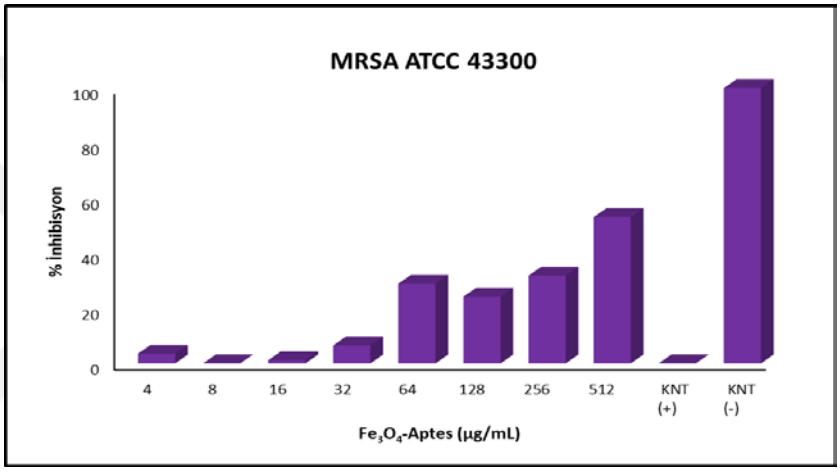
Şekil 3.32. a) MRSA bakterisinin biyofilmlerine tutunmuş CV boyanma görüntüleri. b) MRSA bakterisinin biyofilmlere bağlı CV boyasının çözündürülmesi. (A sırası: Fe_3O_4, B sırası: Fe_3O_4-APTES, C ve D sırası: Fe_3O_4-APTES-GO, E ve F sırası: GO, G sırası: Fe_3O_4@GO, H sırası: Klaritromisin).

Tablo 3.2. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon değerleri.

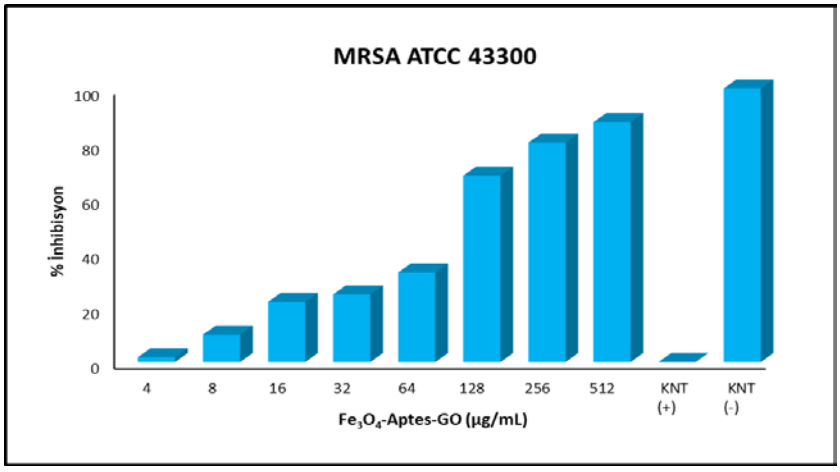
Konsantrasyon / Nanomalzemeler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
Fe_3O_4	51,08	15,77	9,75	1,749	-	-	-	-
Fe_3O_4-APTES	53,11	31,85	24,24	28,96	6,505	1,135	-	3,528
Fe_3O_4-APTES-GO	87,71	80,20	68,12	32,76	24,67	22	10	1,75
GO	99,97	96,09	79,15	62,66	41,14	38,57	26,3	18,77
Fe_3O_4@GO	98,58	94,71	88,99	73,75	61,34	43,12	25,87	13,26



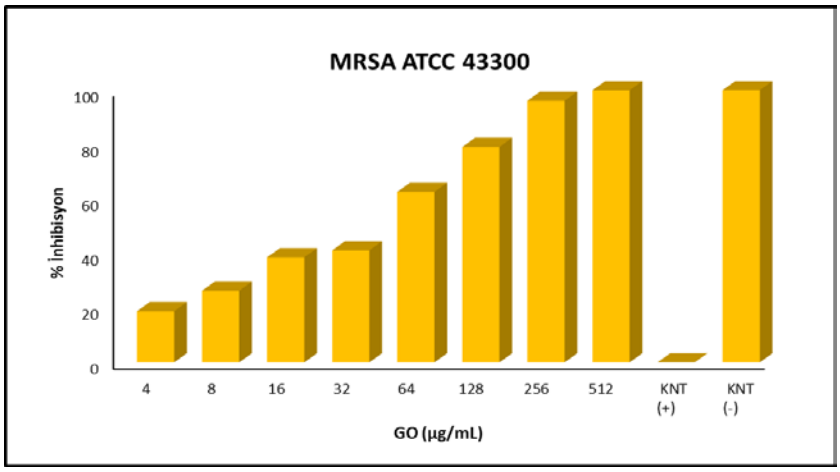
Şekil 3.33. Fe_3O_4 'ün MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



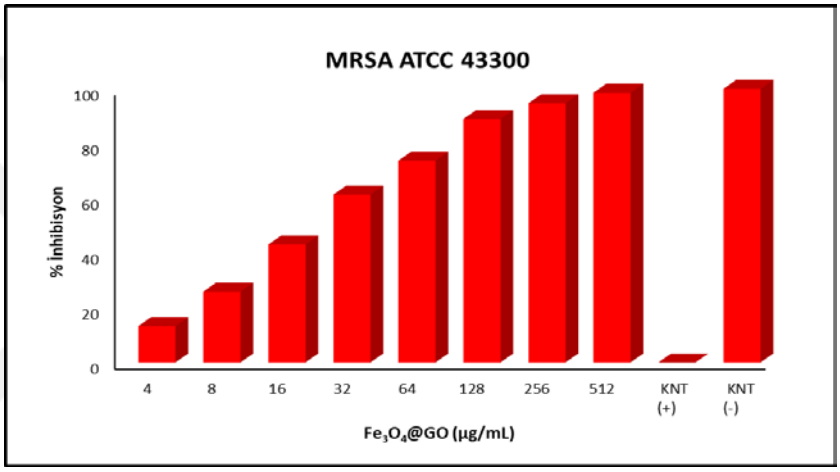
Şekil 3.34. Fe_3O_4 – APTES' in MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.35. Fe_3O_4-APTES-GO'nun MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

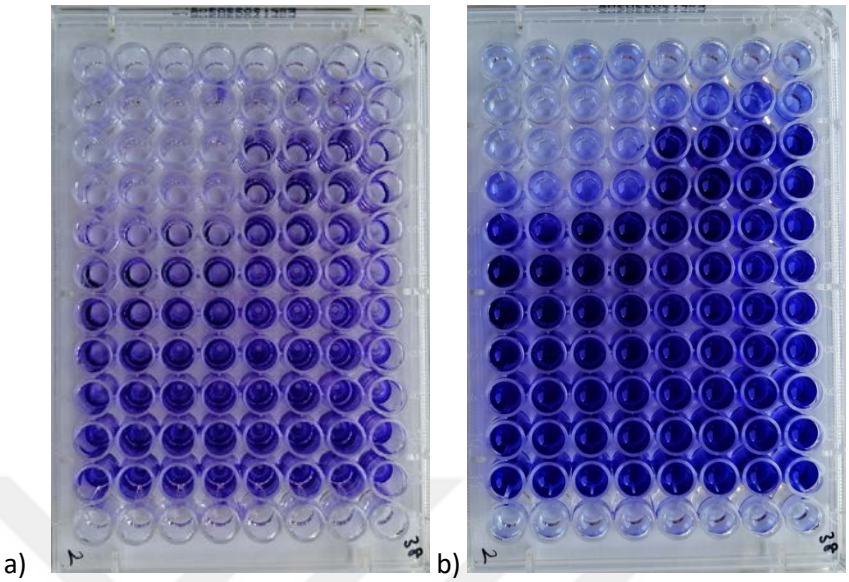


Şekil 3.36. GO'nun MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.37. Fe_3O_4@GO'nun MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

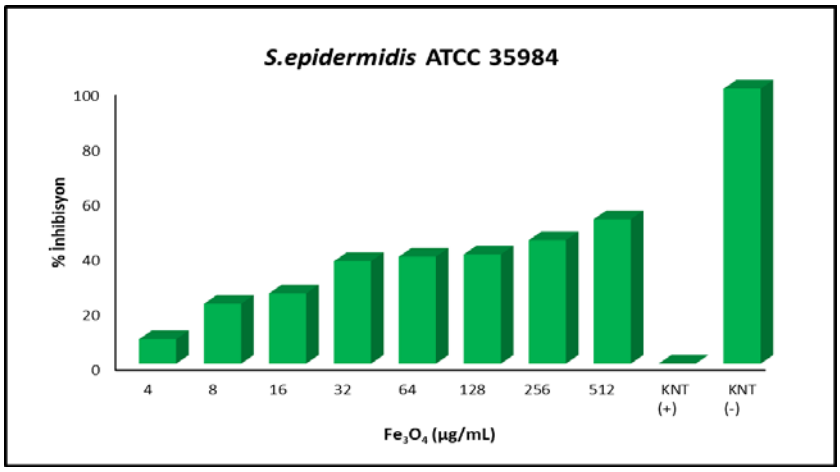
Staphylococcus epidermidis



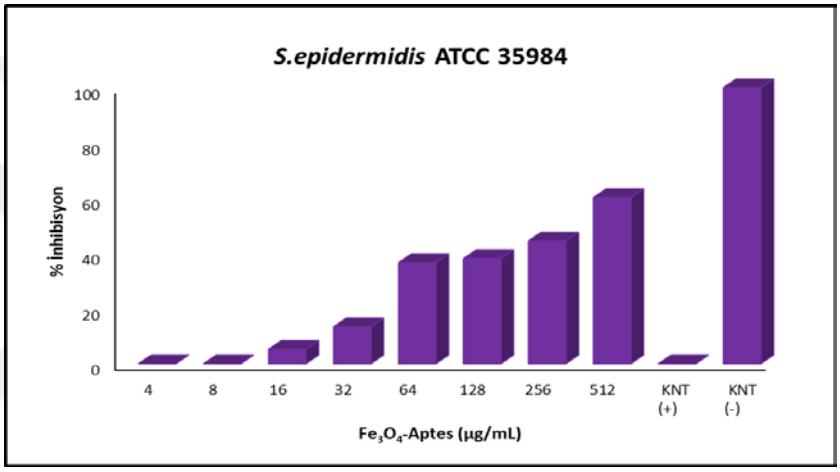
Şekil 3.38. a) *S.epidermidis* bakterisinin biyofilmlerine tutunmuş CV boyanma görüntüleri, b) *S.epidermidis* bakterisinin biyofilmlere bağlı CV boyasının çözündürülmesi. (A sırası: Fe_3O_4, B sırası: Fe_3O_4-APTES, C ve D sırası: Fe_3O_4-APTES-GO, E ve F sırası: GO, G ve H sırası: Fe_3O_4@GO).

Tablo 3.3. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon değerleri.

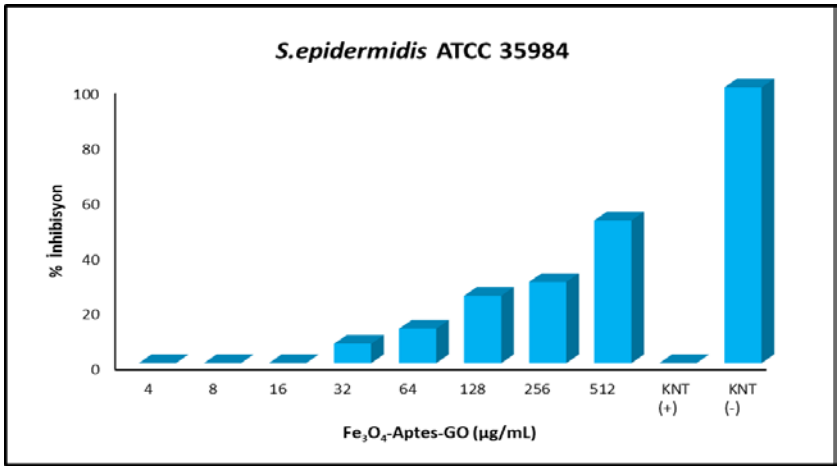
Konsantrasyon / Nanomalzemeler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
Fe_3O_4	52,52	44,87	39,74	38,90	37,24	25,56	21,76	8,87
Fe_3O_4-APTES	60,19	44,48	38,09	36,62	13,35	5,19	-	-
Fe_3O_4-APTES-GO	51,76	29,45	24,45	12,47	6,98	-	-	-
GO	96,62	84,73	23,94	19,52	4,66	2,13	1,75	0,56
Fe_3O_4@GO	99,54	94,14	65,78	17,49	17,98	12,06	11,59	13,02



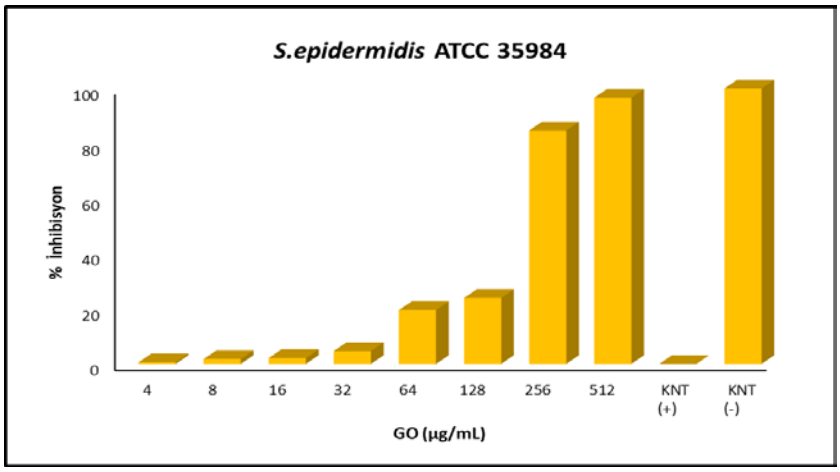
Şekil 3.39. Fe_3O_4 'ün *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



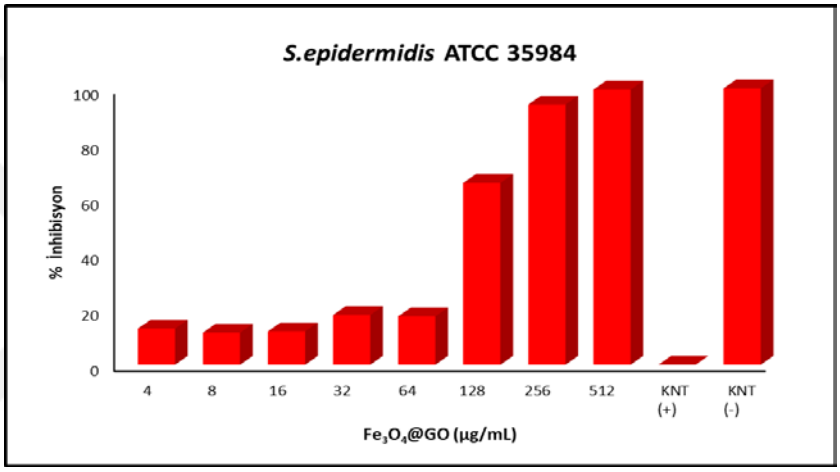
Şekil 3.40. Fe_3O_4 -APTES 'in *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.41. Fe_3O_4-APTES-GO 'nun *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.42. GO 'nun *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.43. Fe_3O_4@GO 'nun *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

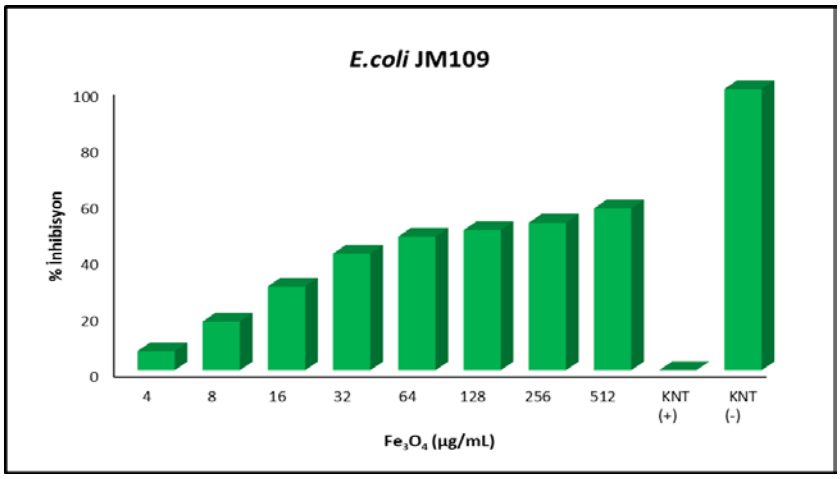
Escherichia coli

a)  b) 

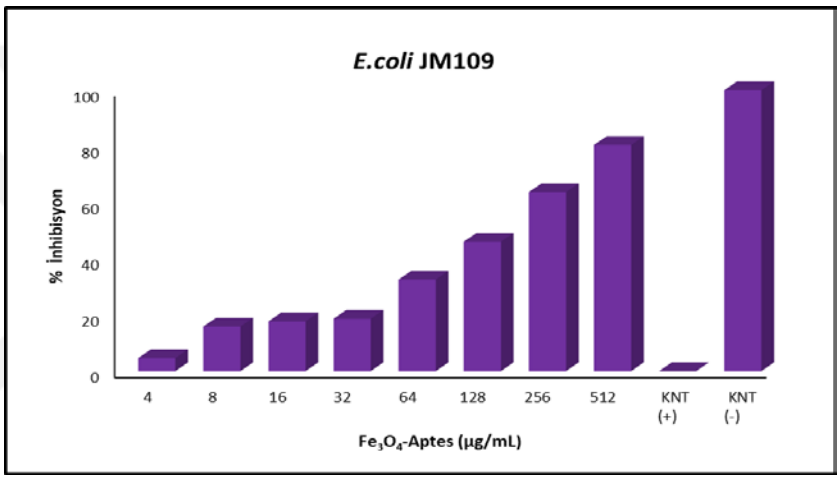
Şekil 3.44. a) *E.coli* bakterisinin biyofilmlerine tutunmuş CV boyanma görüntüleri, b) *E.coli* bakterisinin biyofilmlere bağlı CV boyasının çözündürülmesi. (A sırası: Fe_3O_4, B sırası: Fe_3O_4-APTES, C ve D sırası: Fe_3O_4-APTES-GO, E ve F sırası: GO, G ve H sırası: Fe_3O_4@GO).

Tablo 3.4. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon değerleri.

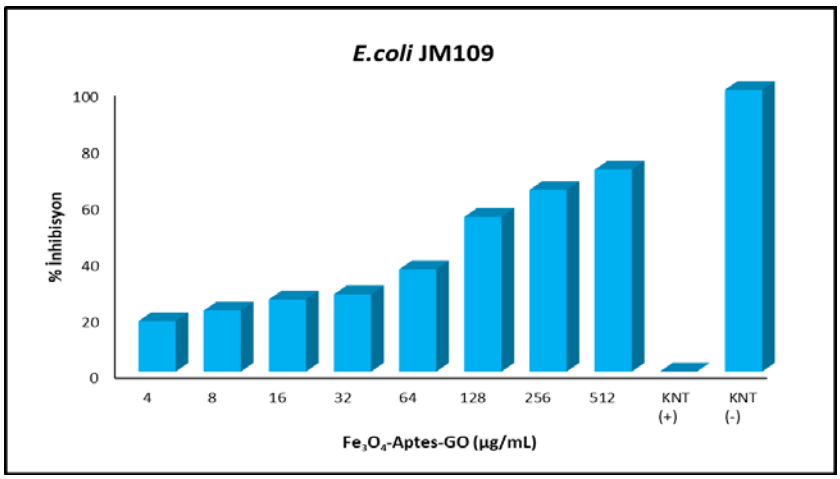
Konsantrasyon / Nanomalzemeler	512 µg/mL	256 µg/mL	128 µg/mL	64 µg/mL	32 µg/mL	16 µg/mL	8 µg/mL	4 µg/mL
Fe_3O_4	57,54	52,45	49,79	47,54	41,50	29,81	17,35	6,79
Fe_3O_4-APTES	80,46	63,72	46,04	32,55	18,60	17,67	15,81	4,65
Fe_3O_4-APTES-GO	71,62	64,41	54,88	36,27	27,44	25,58	21,62	17,90
GO	79,55	69,02	64,15	63,25	53,02	45,11	34,88	28,37
Fe_3O_4@GO	92,09	84,18	66,04	54,41	40	29,30	25,11	17,20



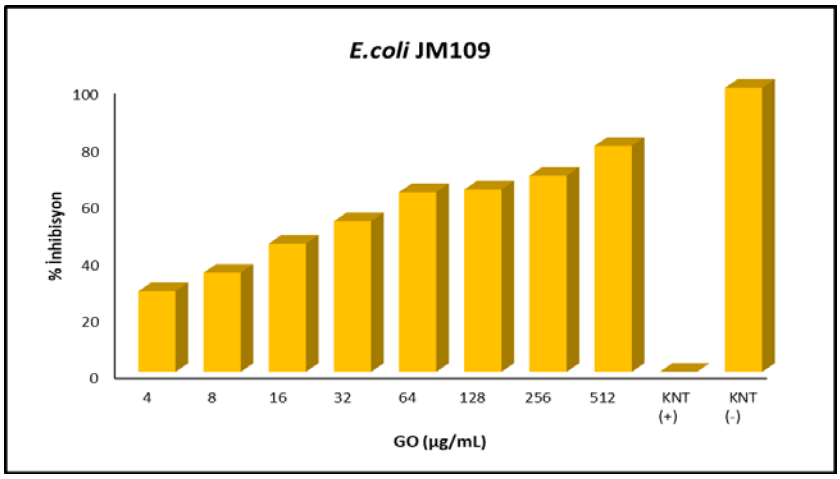
Şekil 3.45. Fe_3O_4 'ün *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



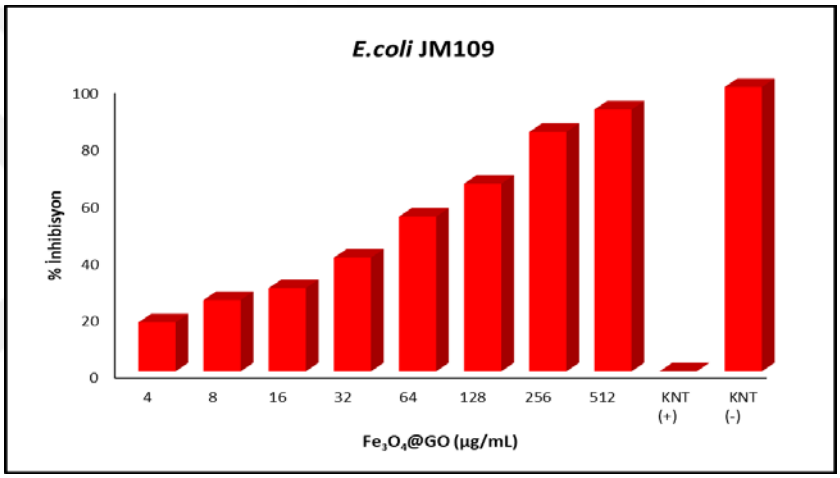
Şekil 3.46. Fe_3O_4-APTES 'in *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.47. Fe_3O_4-APTES-GO'nun *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 3.48. GO'nun *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

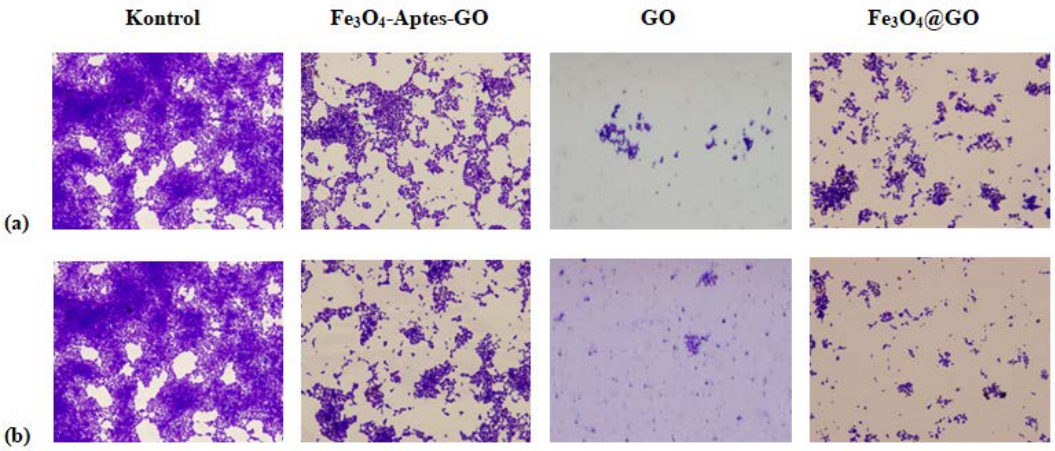


Şekil 3.49. Fe_3O_4 @GO'nun *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

3.3.2. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun Işık Mikroskopisi Sonuçları

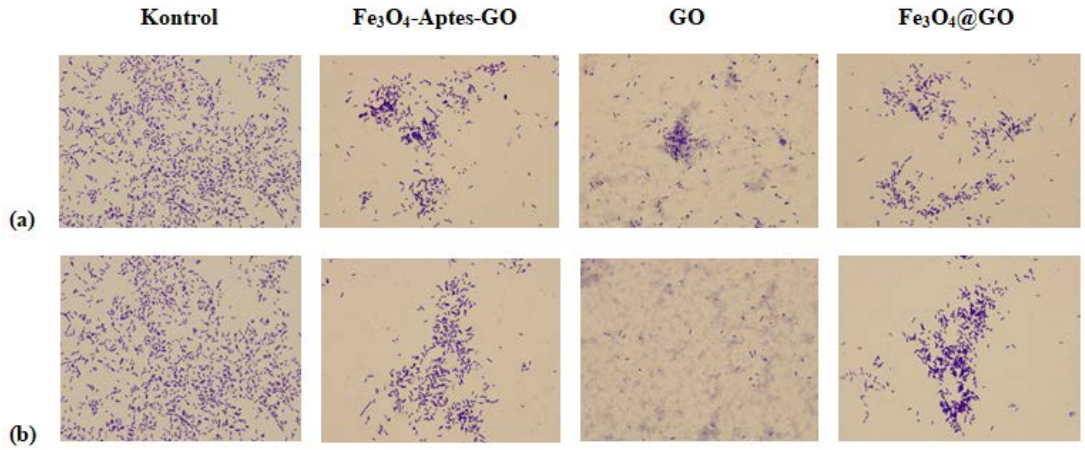
Sentezlenmiş olan Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin farklı konsantrasyonları (256 ve 512 µg/mL) çalışılarak antibiyofilm aktivitelerini aydınlatabilmek için *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* JM109 bakteri suşları ile cam yüzeylerde biyofilm inhibisyon çalışması yapılmış ve CV ile boyanan biyofilmlerin ışık mikroskobunda görüntüleri elde edilmiştir.

Staphylococcus aureus



Şekil 3.50. Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO (a) 256 µg/mL konsantrasyonu ve (b) 512 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen *S. aureus* suşunun biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının ışık mikroskobundaki görüntüleri.

Escherichia coli

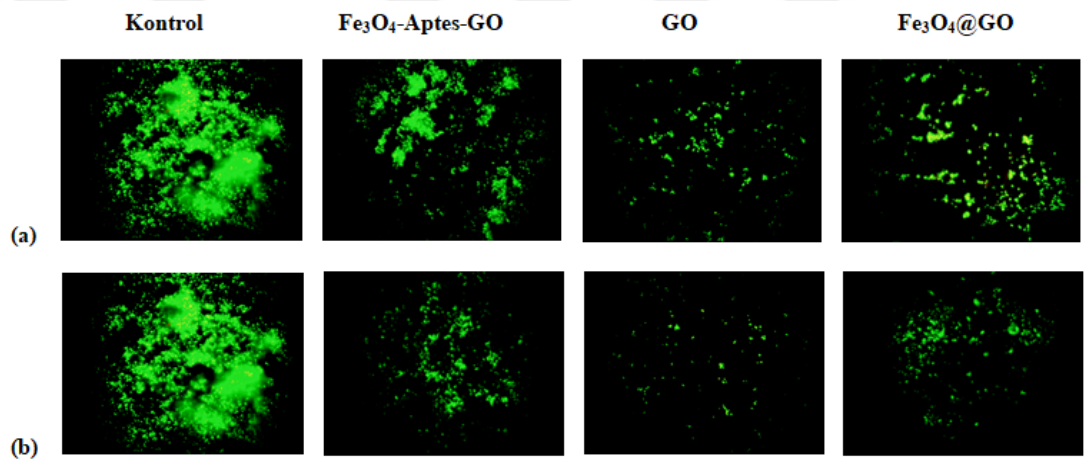


Şekil 3.51. Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO (a) 256 µg/mL konsantrasyonu ve (b) 512 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen *E.coli* suşunun biyofilmlerine tutunmuş CV boyasının ışık mikroskobundaki görüntüleri.

3.3.3. Cam Yüzeylerde Biyofilm İnhibisyonunun Floresan Mikroskopisi Sonuçları

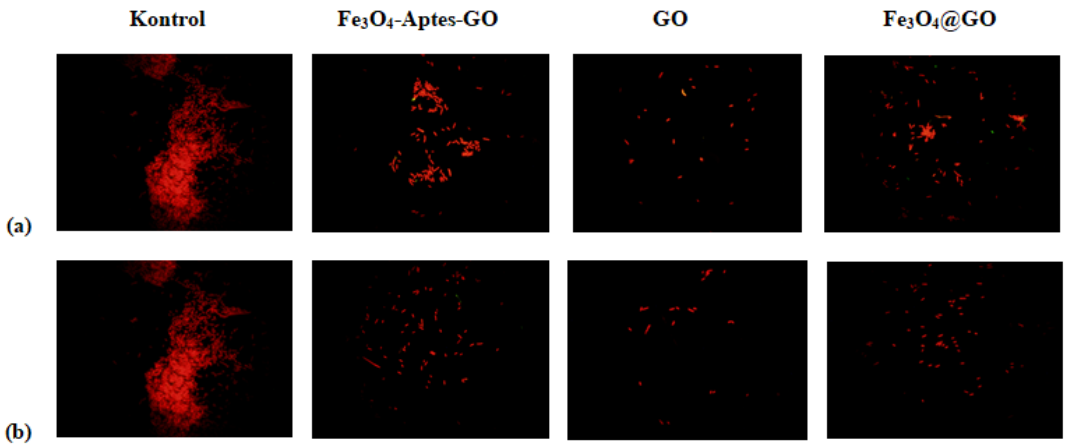
Tez çalışmasında Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin antibiyofilm etkilerini belirlemek için Live-Dead boyama kitiyle floresan mikroskobunda görüntüleri incelenmiştir. Her bir nanomalzeme için 256 ve 512 µg/mL' konsantrasyon da *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Escherichia coli* JM109 bakteri suşları ile cam yüzeylerde biyofilm inhibisyon çalışması yapılmış ve floresan mikroskobunda görüntüler elde edilmiştir.

Staphylococcus aureus



Şekil 3.52. Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO (a) 256 µg/mL konsantrasyonu ve (b) 512 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen *S. aureus* biyofilmlerinin floresan görüntüleri.

Escherichia coli



Şekil 3.53. Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO (a) 256 µg/mL konsantrasyonu ve (b) 512 µg/mL konsantrasyonu ile muamele edilen *E. coli* biyofilmlerinin floresan görüntüleri.

4. TARTIŞMA

Geleneksel antibiyotiklere karşı artan bakteri direnci, çağımızın önemli bir sağlık sorunudur. Bazı bakteri suşları, herhangi bir yapay yüzey veya implante edilebilir cihaz üzerinde biyofilmlerin yapışmasını ve oluşumunu kolaylaştıran slime üretme potansiyeline sahiptir. Biyofilm yapılarının oluşumu antibiyotiklerin etkisini önleyerek bakteri direncini daha da arttırmaktadır. Elektrostatik, dipol-dipol, H-bağı, hidrofobik ve van der Waals etkileşimleri gibi spesifik olmayan farklı etkileşimler, bakterilerin herhangi bir malzeme yüzeyine yapışmasından ve biyofilm yapının oluşmasından sorumludur (Arakha ve ark 2015). Bakterilerilere karşı antibiyotiklerin yetersiz kalışı araştırmacıları yeni ve yenilikçi stratejiler geliştirmeye teşvik etmiştir. Antibakteriyel özelliğe sahip, mikrobiyal yapışmayı kontrol edebilecek, ilaç hedefleme verimliliği yüksek, fizikokimyasal özelliklere sahip ve biyouyumlu olan nanomalzemeler umut verici bir araç olarak tercih edilmektedir (Arakha ve ark 2015, Eleraky ve ark 2020).

Antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin üstesinden gelmenin yollarından biri metal nanopartiküller ve bunların oksitlerinin kullanılmasıdır. Günümüzde geniş bir metal yelpazesinin antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Gudkov ve ark 2021).

Demir oksit nanopartiküller, manyetik özellikleri, fiziksel ve kimyasal olarak kararlı yapıları, biyouyumlu olmaları ve geri dönüştürülebilir kullanımı nedeniyle benzersiz özellikler sunmaktadır. Bununla birlikte demir oksit nanopartiküller daha küçük boyutlara ulaştığında süperparamanyetik özellikleri belirginleşir ve daha iyi bir performans göstermektedir (Arias ve ark 2018).

Demir oksit nanopartiküllerinin çözünürlük problemi etkili antibakteriyel özellik göstermesini ve ilaç olarak kullanımını engellemektedir. Demir oksit nanopartiküllere suda dağılabilme özelliği kazandırabilmek için farklı malzemeler ile konjuge edilerek antibakteriyel ajan olarak kullanılması düşünülmektedir (Philip ve Kuriakose 2018).

Grafen, keşfedildiğinden beri umut verici bir nano malzeme olmuştur. Sadece bir atom kalınlığında iki boyutlu (2D) bir nanoyapı olduğu için bugüne kadarki en güçlü malzemelerin içinde kabul edilmektedir. Ayrıca, grafen yenilenebilir, ucuz ve

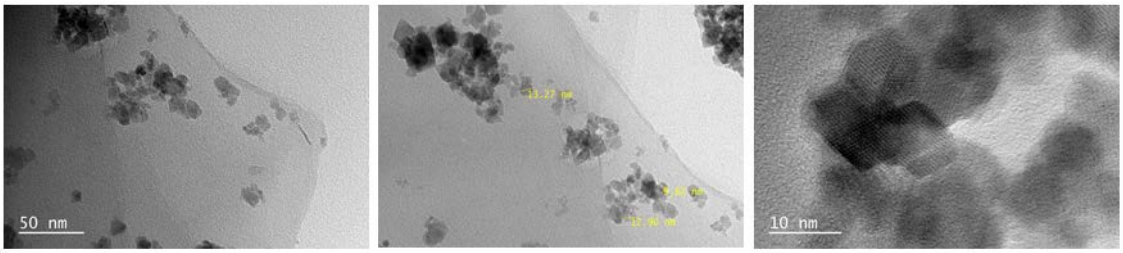
diğer nano malzemelerden daha kolay temin edilebilen bir malzemedir (Cao ve ark 2021). Fakat saf grafenin suda az dağılması en büyük problemdir. Çünkü güçlü hidrofobik karakteri nedeniyle önemli bir zorluk teşkil etmektedir (Georgakilas ve ark 2015). Bu sebeple biyomedikal uygulamalar için grafenin hidrofilik bir türevi olan grafen oksit avantajlı bir alternatif oluşturmuştur. Grafen oksit stabil olan kolloidal süspansiyonlar oluşturmak üzere suda kolayca dağılmaktadır (Ye ve ark 2014).

Çalışmamızda kullanılan Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerin antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109 standart bakteri suşları üzerinde araştırılmıştır.

Antibakteriyel ve antibiyofilm aktivite çalışmaları için sentezlenen nanomalzemelerin yapıları FT-IR ve TEM gibi tekniklerle karakterize edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin yapıları hakkında bilgi edinebilmek için FT-IR spektroskopisi ölçümü yapılmıştır. Elde edilen spektrumlar Şekil 3.1'de verilmiştir. Fe_3O_4 ve APTES ile kaplanmış manyetik Fe_3O_4 nanopartiküllerinin pik değerleri ölçülmüş ve Fe-O bağlarının titreşimlerinden meydana gelen ve bulgular kısmında verilen piklerin literatür değerleri ile uyumlu olduğu görülmüştür (Can ve ark 2009). Grafen oksit nanotabakasına ait pikler ve Fe_3O_4-APTES ile konjuge edilmiş GO'nun içerisindeki fonksiyonel grupların varlığını kanıtlayan değerler ve gerilme titreşimlerine ait pikler literatür değerleri ile karşılaştırılarak uyumlu olduğu bulunmuştur (Erogul ve ark 2015). Hidrotermal yöntemle sentezlenen Fe_3O_4@GO nanokompozitinin FT-IR pik değerleri ölçülmüş literatürle uyumlu bulunmuştur (Zhang ve ark 2015).

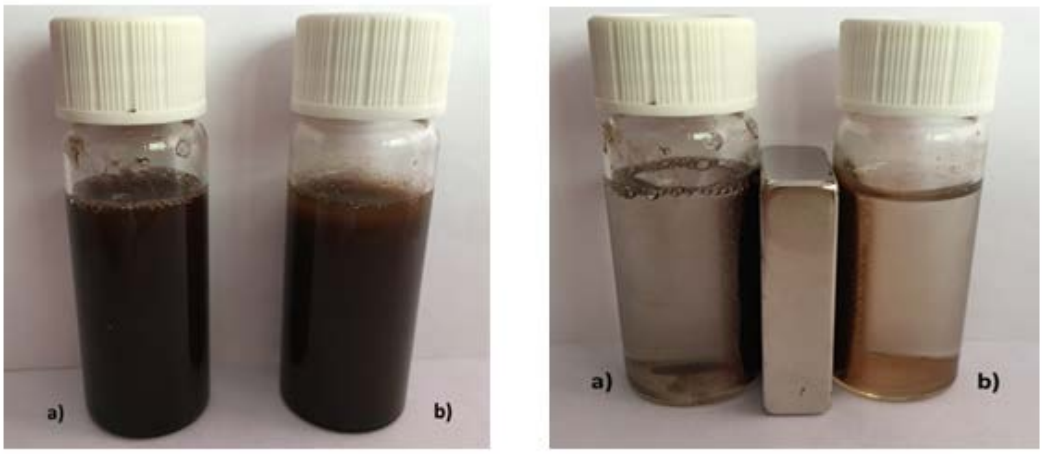
Sentezlenen Fe_3O_4, GO, Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin morfolojik özelliklerini inceleyebilmek için TEM görüntüleri alınmıştır. TEM görüntüleri Şekil 3.2, Şekil 3.3 ve Şekil 3.4'de verilmiştir. Şekil 3.2'de ki TEM görüntüleri incelendiğinde Fe_3O_4 nanopartikülünün küresel şekilde olduğu ve GO nanopartikülünün ise yaprak şeklinde pulsu tabaka halinde olduğu görülmektedir. Şekil 3.3'de APTES ile modifiye edilmiş Fe_3O_4'ün Grafen oksit ile kovalent bağlanmasından sonra, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin Grafen oksit yüzeyinde

iyi dağıldığı, bazı alanlarda ise kümelenmiş manyetit nanopartiküllerinin bulunduğu görülmektedir. Şekil 3.4'de hidrotermal yöntemle elde edilen Fe_3O_4@GO nanokompozitinin TEM görüntüsü verilmiştir. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin GO tabakalarının yüzeyinde dağıldığı açıkça görülebilmektedir. Aşağıda verilen Şekil 4.1'deki ayrıntılı TEM görüntülerinde ise GO yüzeyinde dağılmış olan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yaklaşık boyutunun 10-15 nm civarında olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.1. Fe_3O_4@GO nanokompozitinin farklı büyütmelerdeki TEM görüntüleri.

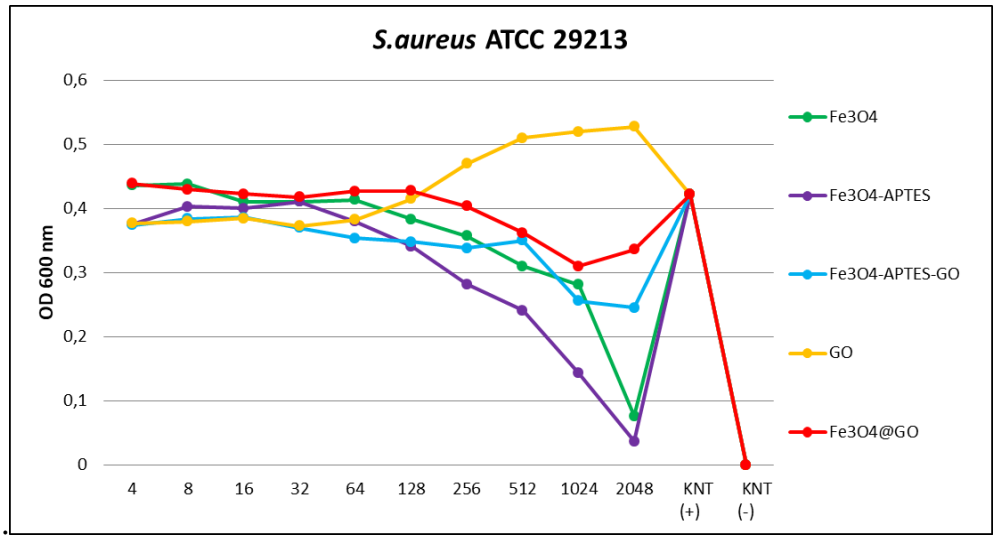
Fe_3O_4@GO ve Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitlerinin distile su içerindeki görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir. İlk görüntüde distile su içerisinde homojen olarak dağılmış a) Fe_3O_4@GO ve b) Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitleri gösterilmektedir. İkinci görüntüde ise dışarıdan harici bir manyetik alan oluşturularak mıknatıs yardımıyla süspansiyon haldeki a) Fe_3O_4@GO ve b) Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitleri kısa sürede şişe duvarına toplanmış ve berrak bir çözelti elde edilerek manyetik ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Fe_3O_4@GO ve Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitleri sulu çözelti içerisinde iyi bir dağılım göstermesi ve manyetik ayırma özelliğiyle biyolojik uygulamalar için umut verici bir aday olarak düşünülmektedir.



Şekil 4.2. a) Fe_3O_4@GO ve b) Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitlerinin mıknatıs yardımıyla ayrılmasının görüntüsü.

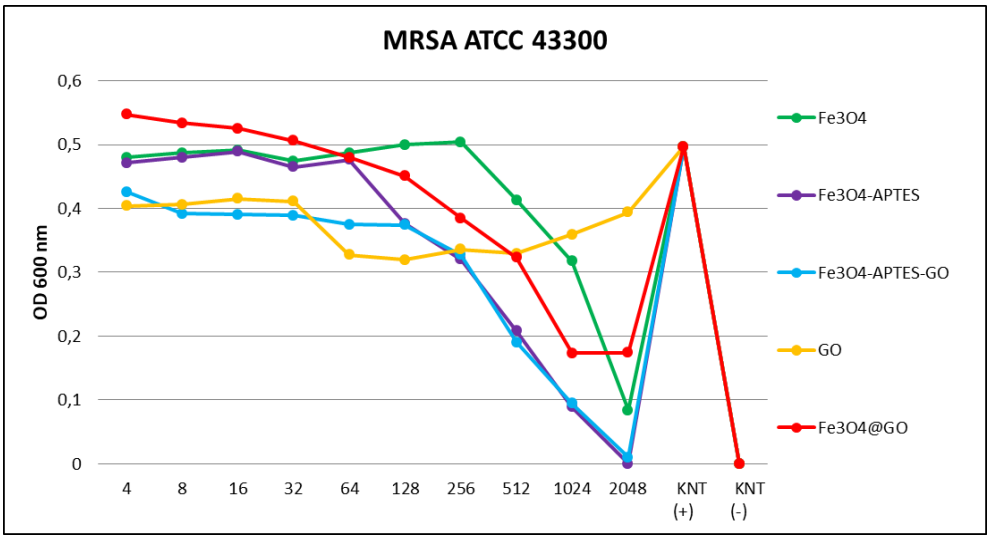
Sentezlenen nanomalzemelerin antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek için ilk olarak mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılarak 96'lık mikro plakalarda Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin antibakteriyel etkileri karşılaştırılmış ve tespit edilmiştir.

S.aureus bakteri suşu ile muamele edilmiş nanomalzemelerin Şekil 4. 3'de 24 saat inkübasyon sonundaki OD_{600nm} absorbans değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Grafik incelendiğinde *S.aureus* bakteri suşuna karşı en fazla antibakteriyel etkiyi Fe_3O_4-APTES'in gösterdiği ve GO nanotabakasının ise antibakteriyel etki göstermediği bulunmuştur. 2048 µg/mL konsantrasyonunda Fe_3O_4 ve Fe_3O_4-APTES nanopartiküllerinin yüksek bir antibakteriyel aktivite sergilediği fakat etkinin konsantrasyon düştükçe azaldığı görülmektedir. Antibiyofilm çalışmaları için seçilen 512 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda genel olarak nanomalzemelerin etkili bir antibakteriyel aktivitesinin olmadığı görülmüştür.



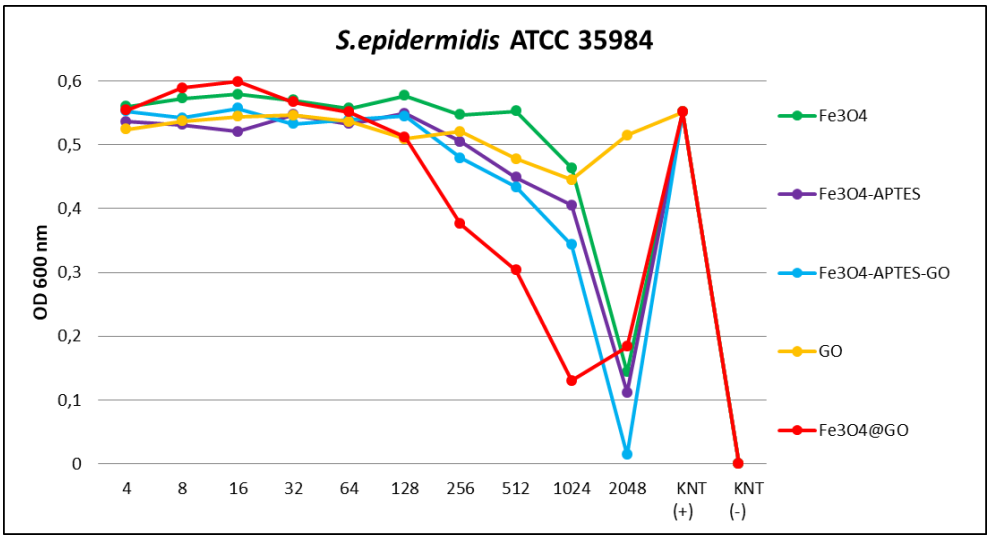
Şekil 4.3. Farklı konsantrasyonlardaki Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri ile muamele edilen *S.aureus* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri.

MRSA bakteri suşu ile muamele edilmiş nanomalzemelerin Şekil 4. 4'de 24 saat inkübasyon sonundaki OD_{600nm} absorbans değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Grafik incelendiğinde MRSA bakteri suşuna karşı en fazla antibakteriyel etkiyi Fe_3O_4-APTES ve Fe_3O_4-APTES-GO göstermektedir. 2048 µg/mL konsantrasyonunda Fe_3O_4-APTES ve Fe_3O_4-APTES-GO nanomalzemelerinin yüksek bir antibakteriyel aktivite sergilediği fakat etkinin konsantrasyon düştükçe azaldığı görülmektedir. Antibiyofilm çalışmaları için seçilen 512 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda genel olarak nanomalzemelerin etkili bir antibakteriyel aktivitesinin olmadığı görülmüştür.



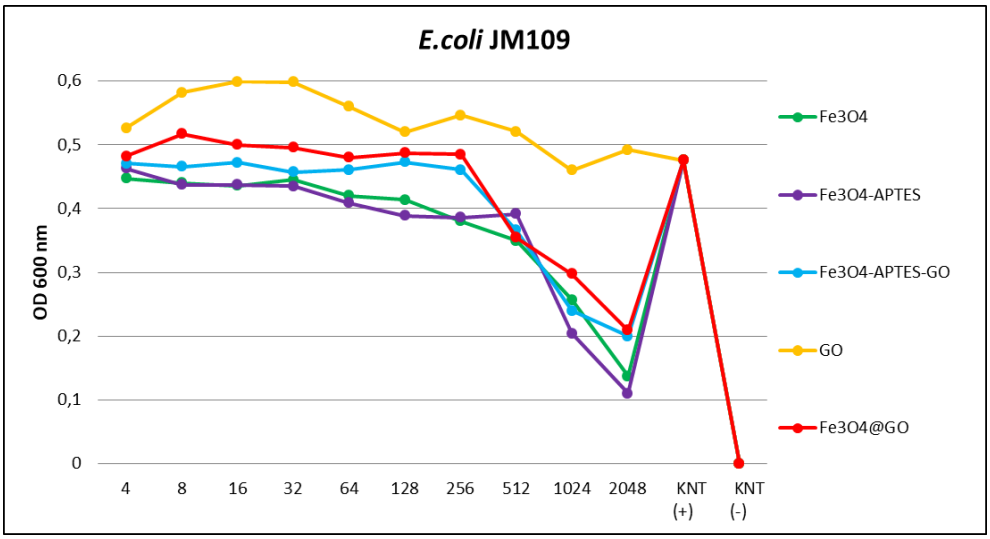
Şekil 4.4. Farklı konsantrasyonlardaki Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri ile muamele edilen MRSA örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri.

S. epidermidis bakteri suşu ile muamele edilmiş nanomalzemelerin Şekil 4.5'de 24 saat inkübasyon sonundaki OD_{600nm} absorbans değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Grafik incelendiğinde *S. epidermidis* bakteri suşuna karşı en fazla antibakteriyel etkiyi Fe_3O_4-APTES-GO'nun gösterdiği görülmüştür. 2048 µg/mL konsantrasyonunda Fe_3O_4-APTES-GO nanokompozitinin yüksek bir antibakteriyel aktivite sergilediği ve 1024 µg/mL konsantrasyonunda ise Fe_3O_4@GO nanokompoziti daha yüksek aktivite göstermektedir. Antibakteriyel etkinin konsantrasyon düştükçe azaldığı da görülmektedir Antibiyofilm çalışmaları için seçilen 512 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda genel olarak nanomalzemelerin etkili bir antibakteriyel aktivitesinin olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.5. Farklı konsantrasyonlardaki Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri ile muamele edilen *S.epidermidis* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri.

E.coli bakteri suşu ile muamele edilmiş nanomalzemelerin Şekil 4.6'da 24 saat inkübasyon sonundaki OD_{600nm} absorbans değerleri karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Grafik incelendiğinde *E.coli* bakteri suşuna karşı en fazla antibakteriyel etkiyi 2048 µg/mL konsantrasyonunda Fe_3O_4-APTES'in gösterdiği görülmüştür. Diğer nanomalzemelerin de yakın etki gösterdiği çalışmada, GO herhangi bir antibakteriyel aktivite sergilememiştir. Antibakteriyel etkinin konsantrasyon düştükçe azaldığı ve antibiyofilm çalışmaları için seçilen 512 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlarda genel olarak nanomalzemelerin etkili bir antibakteriyel aktivitesinin olmadığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.6. Farklı konsantrasyonlardaki Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri ile muamele edilen *E.coli* örneklerinin 24 saat sonundaki OD_{600nm} değerleri.

Sonuçlar incelendiğinde nanomalzemelerin 2048 µg/mL konsantrasyonunda antibakteriyel etki gösterdiği ve bu etkinin doza bağımlı olarak azaldığı görülmektedir. Bu yüzden bakteriyel büyümenin genel olarak inhibe edilmediği doz olan 512 µg/mL ve altındaki konsantrasyonlar antibiyofilm çalışmalar için tercih edilmiştir. Çalışılan bakteriler üzerinde GO'nun antibakteriyel aktivitesi beklenilen etkiyi göstermemiştir ve yüksek konsantrasyonlarda bakteriyel büyümeyi arttırdığı gözlemlenmiştir. Literatürler incelendiğinde GO nanopartikülünün antibakteriyel aktivitesi için çelişkili sonuçlar ile karşılaşılmıştır. Bazı çalışmalarda GO nanotabakasının antibakteriyel aktivitesinin olduğu ifade edilirken, diğer çalışmalarda ise GO nanotabakanın antibakteriyel aktivitesinin olmadığı ve bakteriyel büyümeyi arttırdığı ile ilgili yayınlar mevcuttur. Wu ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada GO'nun bakteriyel çoğalmayı engellemediği ve genel bir büyüme arttırıcı olduğu gözlemlenmiştir. Bakterilerin besin ortamına aktarılmasıyla birlikte hızlı bir çoğalma gösterdiği bulunmuştur. (Wu ve ark 2018).

Barbolina ve ark. tarafından 2016 yılında yapılan bir çalışmada GO'nun antibakteriyel aktivitesi ile ilgili rapor edilen verilerdeki tutarsızlıkların olası bir açıklaması için yüksek oranda saflaştırılmış ve iyice yıkanmış GO'nun standart bakteri suşları üzerindeki antibakteriyel etkileri çalışılmıştır. Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı GO'nun bakteriyel büyümeyi inhibe etmediği hatta arttırdığı gözlemlenmiştir. Buna karşılık, yetersiz derecede saflaştırılmış GO

süspansiyonlarının içerdiği asidik safsızlıklardan dolayı bir antibakteriyel malzeme gibi davrandığı sonucuna varılmıştır. Temiz GO üretimi için standartlaştırılmış bir protokol önerilerek biyolojik çalışmalarda GO saflaştırma durumunun önemi vurgulanmıştır (Barbolina ve ark 2016).

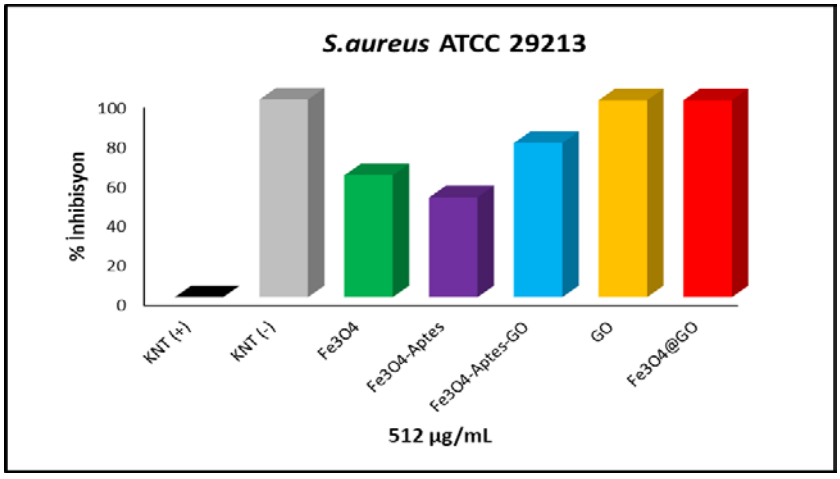
Di Giulio ve ark. tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı GO'nun güçlü bir antibakteriyel etki gösterdiği bulunmuştur. Antibakteriyel etkisi muhtemelen tek bakteri hücrelerinin GO tarafından tamamen sarılması ve bunun sonucunda metabolik aktivitesinin kesilmesinden kaynaklanmaktadır. GO'nun peptidoglikan tabakası ile etkileşerek hücreleri sarması çok olasıdır (Di Giulio ve ark 2018).

Zhang ve Tremblay tarafından 2020 yılında yapılan derlemede fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, araştırma grupları tarafından grafen malzemelerinin çok sayıda biyoteknolojik potansiyeli araştırılmıştır. Grafen malzemelerin canlı hücrelerle ve daha spesifik olarak bakterilerle etkileşimlerinin incelenmesi, çelişkili görünen keşiflere yol açmıştır. Bir yandan, çok sayıda rapor, bakteri üremesini ve biyofilm oluşumunu teşvik eden grafen malzemeleri tanımlamaktadır. Öte yandan, geniş bir çalışma grubu, bakteri hücrelerine zarar veren ve büyümeyi engelleyen grafen malzemeleri tanımlamaktadır. Grafen malzemelerin ayrıca prokaryotik hücrelere doğrudan zarar verebildiği ve bu zararın membran stresi, oksidatif stres ve sarma izolasyonunu içeren üç ana mekanizma yoluyla olduğu düşünülmektedir. Bu derlemedeki sonuçlar özetlendiğinde; ayarlanabilir fizikokimyasal özellikler ve çevresel faktörler, grafen ve GO'nun bakteri metabolizmasını ve büyümesini teşvik edip etmeyeceğini veya antibakteriyel materyaller olarak hareket edip etmeyeceğini belirlemektedir (Zhang ve Tremblay 2020).

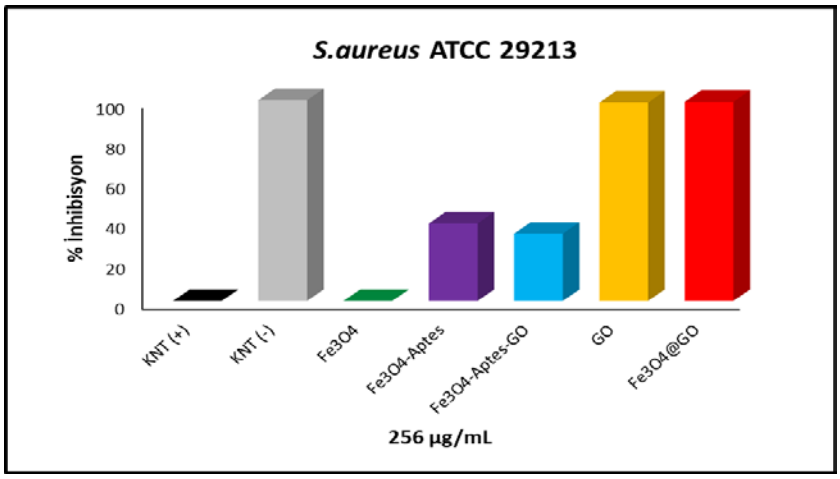
Antibakteriyel aktiviteleri çalışıldıktan sonra dört bakteri suşu (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109) üzerinde biyofilm inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Biyofilm çalışmaları için en çok tercih edilen yöntem Christensen ve arkadaşları tarafından bulunan kristal viyole mikroplaka boyama yöntemidir ve bu yöntem biyofilm oluşumunun tespiti için standart kabul edilmektedir (Christensen ve ark 1985).

Çalışmada biyofilm yüzeyindeki planktonik bakterileri uzaklaştırmak için standart bir yıkama basamağı oluşturulmuştur. Otomatik dispenser (BioTek microFill) cihazı ile her bir kuyucuğa eşit ve aynı şartlarda dağıtım yapılarak optimum sonuçlar elde edilmiştir.

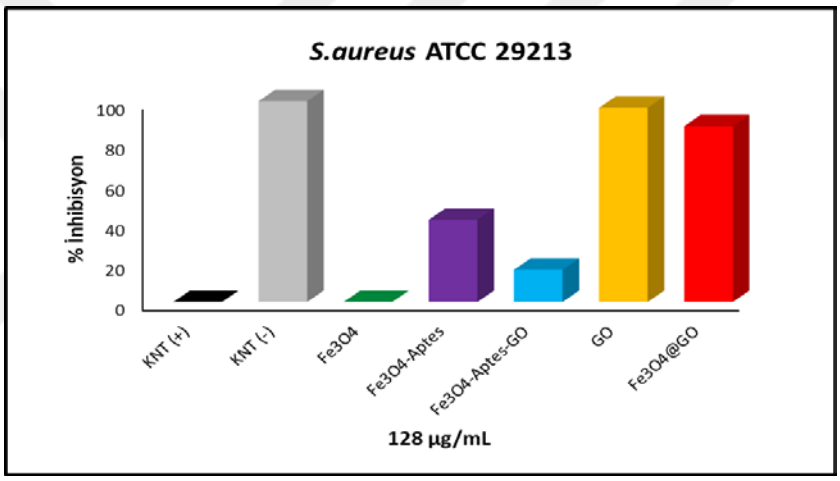
Biyofilm inhibisyon sonuçları *S.aureus* için Tablo 3.1'de, MRSA için 3.2'de, *S.epidermidis* için 3.3'de ve *E.coli* için 3.4'de verilmiştir. *S.aureus* biyofilmleri üzerinde nanomalzemelerin % inhibisyon değerleri incelendiğinde en yüksek inhibe edici etkiyi GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.7'de 512 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Grafik incelendiğinde GO'nun %99,66 değeriyle en yüksek biyofilm inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. Fe_3O_4@GO'nun %99,63 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %78,02 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.8'de 256 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. GO'nun % 98,83, Fe_3O_4@GO'nun %99,18 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %33,49 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.9'da 128 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. GO'nun % 96,67, Fe_3O_4@GO'nun %87,54 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %15,99 inhibisyon değerleri vardır.



Şekil 4.7. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 512 µg/mL konsantrasyonunda *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



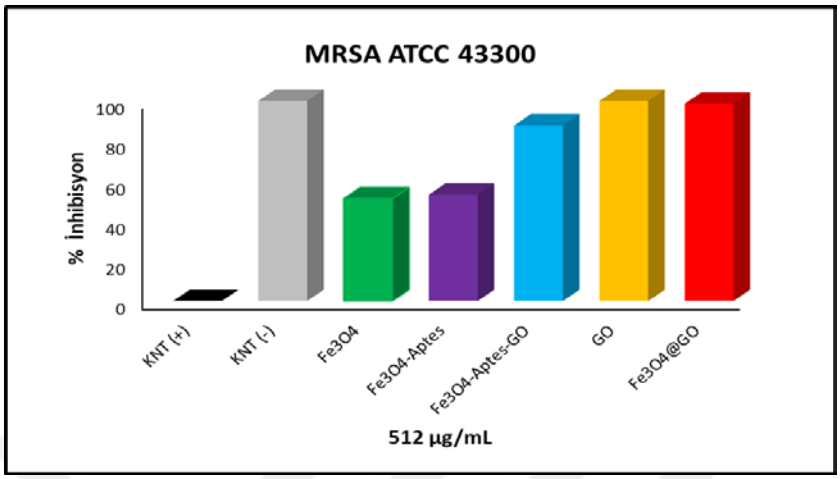
Şekil 4.8. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 256 µg/mL konsantrasyonunda *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



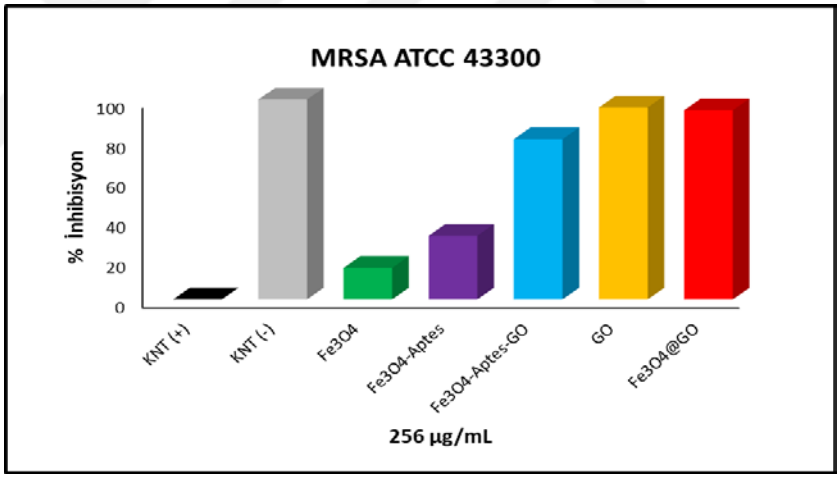
Şekil 4.9. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 128 µg/mL konsantrasyonunda *S.aureus* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

MRSA biyofilmleri üzerinde nanomalzemelerin % inhibisyon değerleri incelendiğinde en yüksek inhibe edici etkiyi Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.10'da 512 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Grafik incelendiğinde GO'nun %99,97 değeriyle en yüksek biyofilm inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. Fe_3O_4@GO'nun %98,58 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %87,71 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.11'de 256 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. GO'nun %96,09, Fe_3O_4@GO'nun %94,71 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %80,20 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.12'de 128 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin

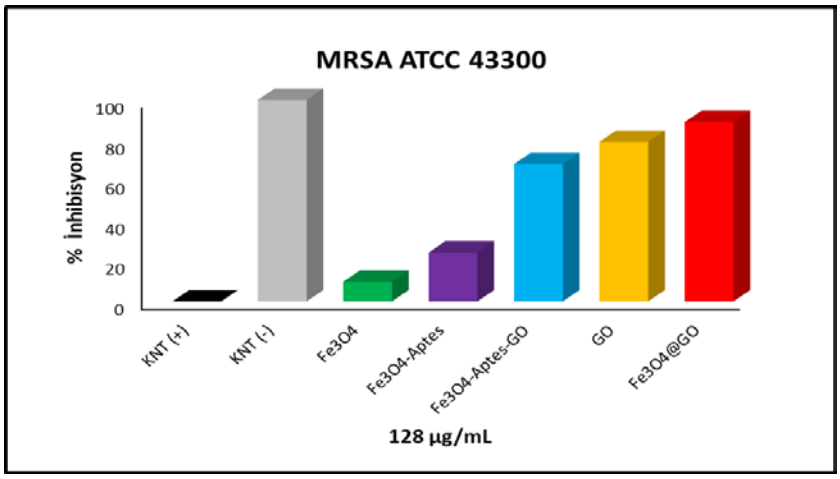
karşılaştırılması verilmiştir. GO'nun %79,15, Fe_3O_4@GO'nun %88,99 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %68,12 inhibisyon değerleri vardır.



Şekil 4.10. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 512 µg/mL konsantrasyonunda MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

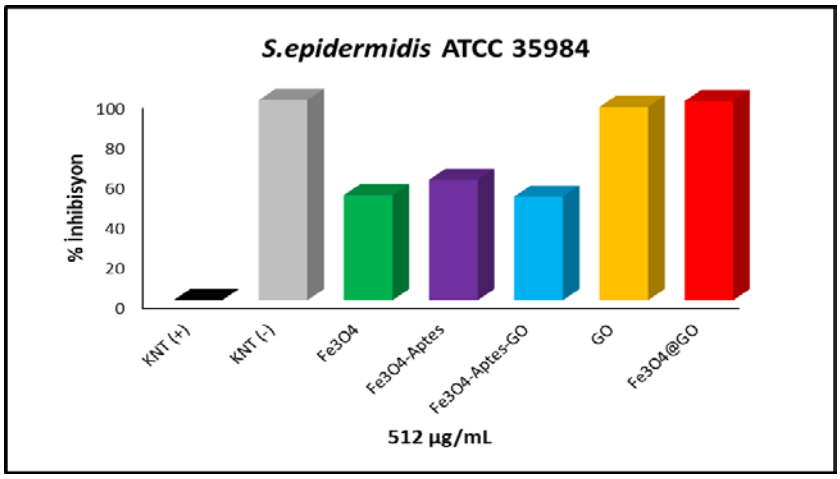


Şekil 4.11. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 256 µg/mL konsantrasyonunda MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

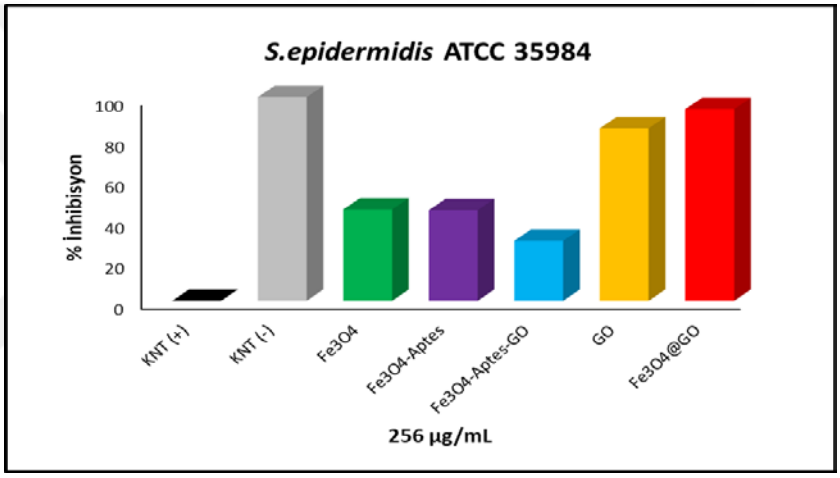


Şekil 4.12. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 128 µg/mL konsantrasyonunda MRSA biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

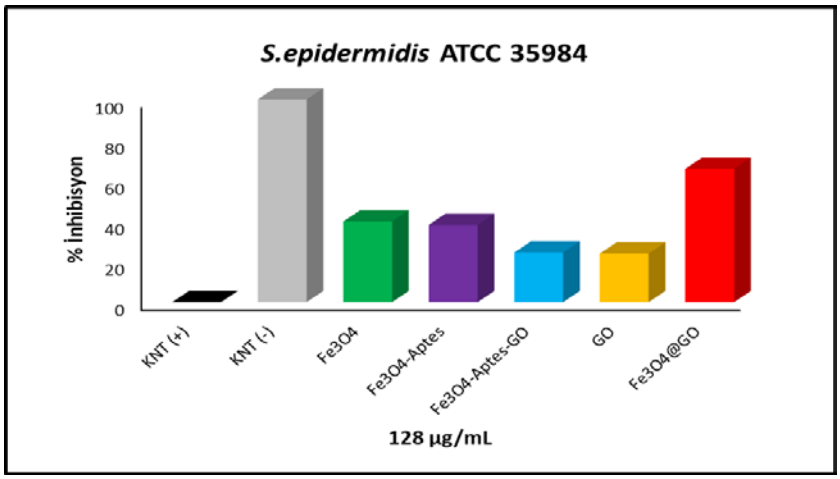
S. epidermidis biyofilmleri üzerinde nanomalzemelerin % inhibisyon değerleri incelendiğinde en yüksek inhibe edici etkiyi GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemelerinin gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.13'de 512 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Grafik incelendiğinde Fe_3O_4@GO'nun %99,54 değeriyle en yüksek biyofilm inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. GO'nun %96,62 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %51,76 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.14'de 256 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Fe_3O_4@GO'nun %94,14, GO'nun %84,73 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %29,45 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.15'de 128 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Fe_3O_4@GO'nun %65,78, GO'nun % 23,94 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %24,45 inhibisyon değerleri vardır.



Şekil 4.13. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 512 µg/mL konsantrasyonunda *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

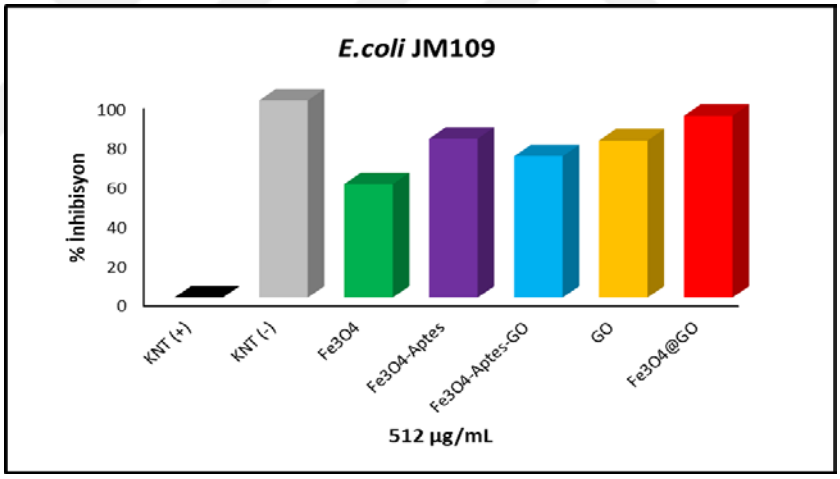


Şekil 4.14. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 256 µg/mL konsantrasyonunda *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

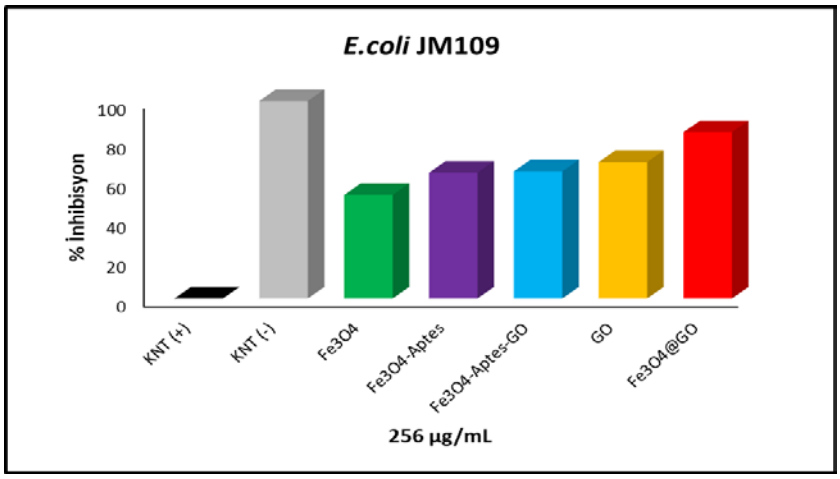


Şekil 4.15. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 128 µg/mL konsantrasyonunda *S.epidermidis* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

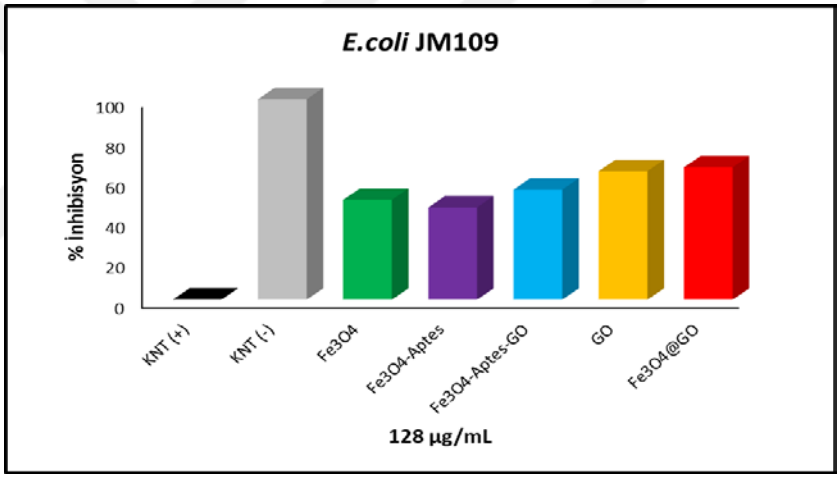
E.coli biyofilmleri üzerinde nanomalzemelerin % inhibisyon değerleri incelendiğinde en yüksek inhibe edici etkiyi Fe_3O_4@GO nanomalzemesinin gösterdiği bulunmuştur. Şekil 4.16'da 512 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Grafik incelendiğinde Fe_3O_4@GO'nun %92,09 değeriyle en yüksek biyofilm inhibisyon etkisinin olduğu görülmektedir. GO'nun %79,55 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %71,62 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.17'de 256 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Fe_3O_4@GO'nun %84,18, GO'nun %69,02 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %64,41 inhibisyon değerleri vardır. Şekil 4.18'de 128 µg/mL konsantrasyonda nanomalzemelerin % biyofilm inhibisyon etkilerinin karşılaştırılması verilmiştir. Fe_3O_4@GO'nun %66,04, GO'nun %64,15 ve Fe_3O_4-APTES-GO'nun ise %54,88 inhibisyon değerleri vardır.



Şekil 4.16. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 512 µg/mL konsantrasyonunda *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.17. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 256 µg/mL konsantrasyonunda *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.



Şekil 4.18. Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO malzemelerinin 128 µg/mL konsantrasyonunda *E.coli* biyofilmi üzerine % inhibisyon grafiği.

Kristal viyole mikro plaka boyama yöntemi ile yapılan biyofilm çalışmasını desteklemek amacıyla seçtiğimiz *S. aureus* ve *E. coli* bakteri suşları üzerinde cam yüzeyde oluşturulan biyofilmlerin farklı boyama teknikleriyle ışık ve floresan mikroskobu altında görüntüleri elde edilmiştir. Kristal viyole boyası ile boyanan *S. aureus* biyofilmlerinin ışık mikroskobu görüntüleri Şekil 3.50'de, *E. coli* biyofilmlerinin görüntüsü ise Şekil 3.51'de verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde 512 µg/mL ve 256 µg/mL konsantrasyonlarında kontrole göre doza bağımlı biyofilm inhibisyonu açıkca görülmektedir. Kristal viyole mikro plaka boyama yöntemi ile elde edilen sonuçlarla uyumlu olarak cam yüzeyde biyofilm oluşumunu engelleme

özelliği en yüksek malzemenin GO olduğu, Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO'nun da önemli derecede biyofilm oluşumunu azalttığı bulunmuştur. Aynı şekilde SYTO 9 ve propidyum iyodür boyalarıyla boyanan cam yüzeylerinin floresan mikroskobu görüntüleri *S. aureus* için Şekil 3.52'de, *E. coli* için Şekil 3.53'de verilmiştir. Bu görüntüler de incelendiğinde ışık mikroskobu görüntüleri ile uyumlu olarak 512 µg/mL ve 256 µg/mL konsantrasyonlarında kontrole göre doza bağımlı biyofilm inhibisyonu görülmektedir.

Genel olarak biyofilm inhibisyon sonuçları incelendiğinde bakteriyel büyümenin engellenmediği dozlar olan 512 µg/mL ve alt dozlarda GO'nun ve GO ile konjuge edilmiş nanomalzemeler olan Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO'nun biyofilm oluşumunu engelleme etkilerinin oldukça yüksek olduğu dikkat çekmektedir. Literatürler incelendiğinde GO'nun antibiyofilm aktivitesinin yüksek olduğu bulunmuştur. Di Giulio ve ark. Tarafından 2018 yılında yapılan çalışmada GO'nun mikrobiyal yapışmayı engelleme ve biyofilm matrisine nüfuz etme özellikleri incelenmiş ve GO'nun mikroorganizmaların birbirine ve yüzeylere yapışmasını engelleyerek biyofilm oluşumunu inhibe ettiği bulunmuştur. Bu etki büyük olasılıkla GO'nun geniş, karbon bakımından zengin ve hidrofilik yüzeyinin polimerlerle ve proteinlerle spesifik etkileşim kapasitesinden kaynaklanmaktadır; yani polisakkarit ve GO'da bol miktarda bulunan karbonil ve hidroksil grupları arasındaki hidrojen bağı ve grafenik alanlar arasındaki π-π etkileşimleri ayrıca DNA ve RNA bazları ile olan etkileşimler mikroorganizmaların kümelenmesini ve yüzeylere yapışmasını olumsuz etkilemektedir (Di Giulio ve ark 2018). Yapılan bir başka çalışmada iki farklı yöntemle hazırlanan GO kaplı yüzeylerin bakteriyel biyofilm oluşumuna karşı yüksek antibiyofilm aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir. Hücreden hücreye ve hücreden yüzeye etkileşimler biyofilm oluşumunda önemli bir rol oynar. Bakteriler, biyofilm oluşumu sırasında fimbria veya pili gibi fibriler bir yapı ile yüzeye yapışır. GO varlığında, bu karmaşık süreçlerin herhangi birinin veya daha fazlasının bozularak biyofilm oluşumunda bir azalmaya yol açması muhtemel olduğu ifade edilmektedir (Yadav ve ark 2017).

Grafenin suda çözünür hidrofilik bir türevi olan GO'nun benzersiz özelliklerinin yanı sıra yüksek antibiyofilm aktivite göstermesi oldukça ilgi çekicidir. Manyetik doğası nedeniyle kolayca geri kazanılabilen ve biyouyumlu Fe_3O_4

nanopartiküllerinin GO ile birleştirilip suda dağılabilir ve antibiyofilm özellikte nanomalzeme sentezlenmesi düşünülmüştür. Bu doğrultuda sentezlenen GO ile konjuge edilmiş Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO nanokompozitlerinin yalnız başına Fe_3O_4 nanopartikülüne göre yüksek potansiyelde biyofilm oluşumunu inhibe etme özelliği kazandığı görülmüştür.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Antibiyotik direnç problemi çözülmesi gereken en önemli sorunların başında gelmektedir. Bakteriyel hastalıkları tedavi etmek için geleneksel antibiyotiklerin yetersiz kalışı hastane enfeksiyonlarını artırmakta ve tedavileri zorlaştırmaktadır. Mikroorganizmaların çoğunluğu yüzeylere tutunarak biyofilm oluşturmaktadır. Tıbbi uygulamalarda protez, kontakt lens ve kateter gibi tıbbi araçların kullanımı biyofilme bağlı enfeksiyonları arttırmaktadır. Dirençli mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak ilaçları etkisiz kılmakta ve insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu nedenlerden dolayı biyofilm oluşumuna karşı yüzeyleri korumak ve oluşan biyofilmleri yüzeylerden uzaklaştırmak için farklı stratejik yollar aranmaktadır.

Olağanüstü fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip nanomalzemeler, bilim ve teknolojinin birçok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Biyouyumlu ve manyetik özelliklere sahip Fe_3O_4 nanopartikülü, suda dağılabilir GO nanotabakası ile konjuge edilerek insan sağlığı için tehdit oluşturan biyofilmle ilişkili enfeksiyonların çözümü için alternatif olabileceği düşünülmektedir. Yaptığımız literatür araştırmalarında GO nanotabakasının yüksek antibiyofilm aktivite sergilemesi dikkat çekmektedir.

Bu amaçlar doğrultusunda antibakteriyel özelliklerini incelemek ve biyofilmleri inhibe etme özelliklerini araştırmak için literatürdeki metodlara uygun olarak sentezlenen Fe_3O_4, Fe_3O_4-APTES, Fe_3O_4-APTES-GO, GO ve Fe_3O_4@GO nanomalzemeleri dört ayrı standart bakteri suşu (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, MRSA ATCC 43300, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve *Escherichia coli* JM109) üzerinde çalışılmış, antibakteriyel ve antibiyofilm aktiviteleri araştırılmıştır.

Sentezlenen nanomalzemelerin ilk olarak antibakteriyel etkinlikleri mikrodilüsyon broth yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda genel olarak nanomalzemelerin 2048 µg/mL konsantrasyonunda antibakteriyel aktivite sergilediği, antibiyofilm çalışmaları için seçilen 512 µg/mL ve altındaki konsantrasyonların bakteriyel büyüme üzerine etkilerinin düşük olduğu ve antibakteriyel etkinin konsantrasyona bağlı azaldığı görülmüştür.

Antibakteriyel aktivite çalışmalarından sonra biyofilm inhibisyon çalışmaları yapılmıştır. Beklenildiği gibi GO ile konjuge edilmiş nanomalzemeler olan Fe_3O_4-APTES-GO ve Fe_3O_4@GO yalnız başına GO ile karşılaştırılabilir derecede yüksek antibiyofilm özellik göstermiştir. Genel olarak çalışılan bakteri suşları üzerinde 512 µg/mL konsantrasyonundaki GO ile konjuge edilmiş nanomalzemeler en yüksek biyofilm inhibisyon etkisi (%51,76-%99,97) gösterirken diğer alt konsantrasyonlarda da biyofilm inhibisyon etkisi benzer şekilde doza bağımlı azalarak devam etmektedir.

Yapılan bu çalışmada karakteristik manyetik özelliği olan Fe_3O_4 nanopartikülleri, yüksek antibiyofilm aktivitesi olan ve hidrofilik özellik gösteren GO ile konjuge edilerek sentez metodu farklı iki ayrı nanokompozit sentezlenmiştir. Sonuç olarak suda dağılabilen, biyofilmleri inhibe etme yeteneği olan ve manyetik özelliğiyle yeniden kullanılabilir biyouyumlu nanomalzemeler sentezlenmiştir. Kalıcı tıbbi cihazlara ihtiyaç duyan kişiler için mikrobiyal biyofilmler, ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Biyofilm ve tıbbi cihazlarla ilişkili hastane enfeksiyonlarının insidansı da giderek artmaktadır. O yüzden sentezlenen bu nanomalzemelerin tıbbi uygulamalar da sıklıkla kullanılan ortopedik protezler, intravasküler kateterler, kalp kapakçığı gibi implante edilebilir tıbbi cihazlarla ilişkili biyofilm enfeksiyonlarının önlenmesinde kullanılabilirliği araştırılmalıdır. Sentezlenen nanomalzemelerin biyofilm inhibisyon sonuçları umut verici olup daha ileri biyofilm çalışmaları için teşvik edicidir. Özellikle mekanizma aydınlatmaya yönelik çalışmalar ile birlikte nanomalzemelerin toksik etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

6. KAYNAKÇA

Ahmad H, Fan M, Hui D, 2018. Graphene oxide incorporated functional materials: A review. Composites Part B: Engineering, 145, 270-80.

Akar N, 2013. Selenyum Nanoparçacıkları İçeren Membranların Sentezi ve Atıksu Arıtımında Kullanım Potansiyelinin İncelenmesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

Akın S, 2019. Grafen/metal-metal oksit nanokompozitlerinin sentezi ve karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Aksoy İ, 2020. Yeni nesil nanohibrit malzemelerin antibakteriyel aktivitelerinin incelenmesi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Aksoy İ, Küçükkeçeci H, Sevgi F, Metin Ö, Hatay Patir I, 2020. Photothermal Antibacterial and Antibiofilm Activity of Black Phosphorus/Gold Nanocomposites against Pathogenic Bacteria. ACS Applied Materials & Interfaces, 12, 24, 26822-31.

Al-Shabib NA, Husain FM, Ahmed F, Khan RA, Khan MS, Ansari FA, Alam MZ, Ahmed MA, Khan MS, Baig MH, Khan JM, Shahzad SA, Arshad M, Alyousef A, Ahmad I, 2018. Low Temperature Synthesis of Superparamagnetic Iron Oxide (Fe3O4) Nanoparticles and Their ROS Mediated Inhibition of Biofilm Formed by Food-Associated Bacteria. Front Microbiol, 9, 2567.

Algammal AM, Hetta HF, Elkelish A, Alkhalifah DHH, Hozzein WN, Batiha GE-S, El Nahhas N, Mabrok MA, 2020. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. Infect Drug Resist, 13, 3255-65.

Ali A, Zafar H, Zia M, Ul Haq I, Phull AR, Ali JS, Hussain A, 2016. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. Nanotechnol Sci Appl, 9, 49-67.

Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C, 2013. Escherichia coli in Europe: an overview. Int J Environ Res Public Health, 10, 12, 6235-54.

Alp E, 2017. Manyetit-Altın Hibrit Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Mikroyapıların Eldesinde Kullanımı.

Ananikov VP, 2019. Organic-Inorganic Hybrid Nanomaterials. Nanomaterials (Basel), 9, 9, 1197.

Arakha M, Pal S, Samantarrai D, Panigrahi TK, Mallick BC, Pramanik K, Mallick B, Jha S, 2015. Antimicrobial activity of iron oxide nanoparticle upon modulation of nanoparticle-bacteria interface. Scientific reports, 5, 14813.

Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME, 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2, 5, 445-59.

Arias LS, Pessan JP, Vieira APM, Lima TMTd, Delbem ACB, Monteiro DR, 2018. Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. Antibiotics (Basel), 7, 2, 46.

Bankier C, Matharu RK, Cheong YK, Ren GG, Cloutman-Green E, Ciric L, 2019. Synergistic Antibacterial Effects of Metallic Nanoparticle Combinations. Scientific Reports, 9, 1, 16074.

Baptista PV, McCusker MP, Carvalho A, Ferreira DA, Mohan NM, Martins M, Fernandes AR, 2018. Nano-Strategies to Fight Multidrug Resistant Bacteria-"A Battle of the Titans". Front Microbiol, 9, 1441-.

Barbolina I, Woods CR, Lozano N, Kostarelos K, Novoselov KS, Roberts IS, 2016. Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. 2D Materials, 3, 2, 025025.

Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F, 2019. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical-Physical Applications to Nanomedicine. Molecules (Basel, Switzerland), 25, 1, 112.

Berktas I, Ghafar AN, Fontana P, Caputcu A, Menceloglu Y, Okan BS, 2020. Facile Synthesis of Graphene from Waste Tire/Silica Hybrid Additives and Optimization Study for the Fabrication of Thermally Enhanced Cement Grouts. Molecules, 25, 4, 886.

Betancourt MLG, Ramirez-Jimenez S, Gonzalez-Hodges AN, Nunez-Salazar Z, Garcia ILE, Aparicio JR, 2021. Low Dimensional Nanostructures: Measurement and Remediation Technologies Applied to Trace Heavy Metals in Water. Chapters.

Beyth N, Houri-Haddad Y, Domb A, Khan W, Hazan R, 2015. Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 246012.

Blount ZD, 2015. The unexhausted potential of E. coli. Elife, 4, e05826.

Boulos L, Prévost M, Barbeau B, Coallier J, Desjardins R, 1999. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J Microbiol Methods, 37, 1, 77-86.

Bozkurt A, 2020. Grafen oksit destekli Co-B ve Co-Cu-B katalizörleri kullanılarak sodyum borhidrürden hidrojen üretimi, Siirt Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Buzea C, Pacheco II, Robbie K, 2007. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases, 2, 4, MR17-MR71.

Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H, 2016. Resistance mechanisms. Ann Transl Med, 4, 17, 326-.

Cai N, Li C, Han C, Luo X, Shen L, Xue Y, Yu F, 2016. Tailoring mechanical and antibacterial properties of chitosan/gelatin nanofiber membranes with Fe3O4 nanoparticles for potential wound dressing application. Applied Surface Science, 369, 492-500.

Can K, Ozmen M, Ersoz M, 2009. Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 71, 1, 154-9.

Cao G, Yan J, Ning X, Zhang Q, Wu Q, Bi L, Zhang Y, Han Y, Guo J, 2021. Antibacterial and antibiofilm properties of graphene and its derivatives. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 200, 111588.

Chen T, Geng Y, Wan H, Xu Y, Zhou Y, Kong X, Wang J, Qi Y, Yao B, Gao Z, 2021. Facile preparation of Fe3O4/Ag/RGO reusable ternary nanocomposite and its versatile application as catalyst and antibacterial agent. Journal of Alloys and Compounds, 876, 160153.

Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH, 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol, 22, 6, 996-1006.

Ciftci A, Aksoy A, 2015. Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları Turkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics, 1, 1-10.

Correa MG, Martínez FB, Vidal CP, Streitt C, Escrig J, de Dicastillo CL, 2020. Antimicrobial metal-based nanoparticles: a review on their synthesis, types and antimicrobial action. Beilstein J Nanotechnol, 11, 1, 1450-69.

Crouzet M, Le Senechal C, Brözel VS, Costaglioli P, Barthe C, Bonneu M, Garbay B, Vilain S, 2014. Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental system for molecular studies. BMC microbiology, 14, 253-.

Çalhan R, 2012. Tekstil nano partiküllerinin biyolojik arıtma sisteminde davranışı ve etkileri, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Çolakel N, 2019. Bazı dioksimlerin biyofilm oluşumu üzerine inhibisyon etkilerinin araştırılması, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

Dakheel KH, Abdul Rahim R, Neela VK, Al-Obaidi JR, Hun TG, Yusoff K, 2016. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Biofilms and Their Influence on Bacterial Adhesion and Cohesion. Biomed Res Int, 2016, 4708425-.

Di Giulio M, Zappacosta R, Di Lodovico S, Di Campli E, Siani G, Fontana A, Cellini L, 2018. Antimicrobial and Antibiofilm Efficacy of Graphene Oxide against Chronic Wound Microorganisms. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62, 7, e00547-18.

Doğan B, 2020. Grafen oksit esaslı multifonksiyonel polyester tekstil ürünlerinin geliştirilmesi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Doğru E, 2016. Boyut kontrollü Ag nanopartiküllerinin ve Ag@GO nanokompozitin papatya (matrıcarıa chamomılla) bitki ekstresi kullanılarak biyojenik sentezi ve antibakteriyel aktivitelerinin araştırılması, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Dörtoğul C, 2018. Grafen oksitin sentezlenmesi ve karakterizasyonu, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Eleraky NE, Allam A, Hassan SB, Omar MM, 2020. Nanomedicine Fight against Antibacterial Resistance: An Overview of the Recent Pharmaceutical Innovations. Pharmaceutics, 12, 2, 142.

Ercan İÇ, 2019. Demir oksit nanoparçacıklarının ağır metal adsorpsiyonunda kullanımı, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Erci F, 2018. Yeşil sentez ile elde edilen metal nanopartiküllerin antimikrobiyal ve antibiyofilm etkinliklerinin değerlendirilmesi Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Erdoğan A, 2018. Kanser Tanı ve Tedavisinde Manyetik Nanopartikülker. Natural and Applied Sciences Journal, 1, 1, 23-30.

Erogul S, Bas SZ, Ozmen M, Yildiz S, 2015. A new electrochemical sensor based on Fe3O4 functionalized graphene oxide-gold nanoparticle composite film for simultaneous determination of catechol and hydroquinone. Electrochimica Acta, 186, 302-13.

Eroğul Ş, 2015. Hidrokinon ve katekol tayini için Fe3O4 nanopartikül-grafen oksite dayanan elektrokimyasal sensör hazırlanması, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Fakhrullin RF, Bikmullin AG, Nurgaliev DK, 2009. Magnetically Responsive Calcium Carbonate Microcrystals. ACS Applied Materials & Interfaces, 1, 9, 1847-51.

Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhatu DB, 2019. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. Heliyon, 5, 8, e02192-e.

Geim AK, Novoselov KS, 2007. The rise of graphene. Nature Materials, 6, 3, 183-91.

Georgakilas V, Demeslis A, Ntararas E, Kouloumpis A, Dimos K, Gournis D, Kocman M, Otyepka M, Zbořil R, 2015. Hydrophilic Nanotube Supported Graphene–Water Dispersible Carbon Superstructure with Excellent Conductivity. Advanced Functional Materials, 25, 10, 1481-7.

Getiren B, 2020. Grafen oksit temelli nanokompozitlerin sentezi, karakterizasyonu ve fototermal etkinliklerinin incelenmesi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Gonzalez-Rodriguez R, Campbell E, Naumov A, 2019. Multifunctional graphene oxide/iron oxide nanoparticles for magnetic targeted drug delivery dual magnetic resonance/fluorescence imaging and cancer sensing. PLOS ONE, 14, 6, e0217072.

Govindaraju S, Ramasamy M, Baskaran R, Ahn SJ, Yun K, 2015. Ultraviolet light and laser irradiation enhances the antibacterial activity of glucosamine-functionalized gold nanoparticles. International journal of nanomedicine, 10, Spec Iss, 67.

Green BN, Johnson CD, Egan JT, Rosenthal M, Griffith EA, Evans MW, 2012. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview for manual therapists(). J Chiropr Med, 11, 1, 64-76.

Gudkov SV, Burmistrov DE, Serov DA, Rebezov MB, Semenova AA, Lisitsyn AB, 2021. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. Frontiers in Physics, 9, 49.

Gusev AI, Rempel′ AA, 2004. Nanocrystalline materials, Cambridge Int Science Publishing, p.

Hajipour MJ, Fromm KM, Akbar Ashkarran A, Jimenez de Aberasturi D, Larramendi IRd, Rojo T, Serpooshan V, Parak WJ, Mahmoudi M, 2012. Antibacterial properties of nanoparticles. Trends in Biotechnology, 30, 10, 499-511.

Hemeg HA, 2017. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. International journal of nanomedicine, 12, 8211.

Huh AJ, Kwon YJ, 2011. "Nanoantibiotics": A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. Journal of Controlled Release, 156, 2, 128-45.

Jayakaran P, Nirmala GS, Govindarajan L, 2019. Qualitative and Quantitative Analysis of Graphene-Based Adsorbents in Wastewater Treatment. International Journal of Chemical Engineering, 2019, 9872502.

Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK, 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. Beilstein J Nanotechnol, 9, 1050-74.

Jorgensen JH, Turnidge JD, 2015. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition. Eds: American Society of Microbiology, p.

Kaçar C, 2016. L-lizin tayini için karbon nanomalzemelere dayalı amperometrik enzim elektrotlar hazırlanması, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kang M-S, Choi E-K, Choi D-H, Ryu S-Y, Lee H-H, Kang H-C, Koh J-T, Kim O-S, Hwang Y-C, Yoon S-J, 2008. Antibacterial activity of pyrrolidine dithiocarbamate. FEMS microbiology letters, 280, 2, 250-4.

Karuppuraja M, Murugesan S, 2018. Template free solvothermal synthesis of single crystal magnetic Fe3O4 hollow spheres, their interaction with bovine serum albumin and antibacterial activities. Journal of Saudi Chemical Society, 22, 5, 569-80.

Khalid K, Tan X, Mohd Zaid HF, Tao Y, Lye Chew C, Chu D-T, Lam MK, Ho Y-C, Lim JW, Chin Wei L, 2020. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. Bioengineered, 11, 1, 328-55.

Khan I, Saeed K, Khan I, 2019. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. Arabian Journal of Chemistry, 12, 7, 908-31.

Kim E-S, Ahn EH, Chung E, Kim D-H, 2013. Recent advances in nanobiotechnology and high-throughput molecular techniques for systems biomedicine. Mol Cells, 36, 6, 477-84.

Köse D, 2013. Manyetik nanopartikül destekli katalizör sentezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Kumar N, Ray SS, 2018. Synthesis and functionalization of nanomaterials. In: Processing of Polymer-based Nanocomposites. Eds: Springer, p. 15-55.

Kumar P, Huo P, Zhang R, Liu B, 2019. Antibacterial Properties of Graphene-Based Nanomaterials. Nanomaterials (Basel), 9, 5, 737.

Lakhundi S, Zhang K, 2018. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. Clin Microbiol Rev, 31, 4, e00020-18.

Lallemand EA, Lacroix MZ, Toutain P-L, Boullier S, Ferran AA, Bousquet-Melou A, 2016. In vitro Degradation of Antimicrobials during Use of Broth Microdilution Method Can Increase the Measured Minimal Inhibitory and Minimal Bactericidal Concentrations. Front Microbiol, 7, 2051.

Li W, Xue F, Li Q, 2018. Modification of bismaleimide resin by using γ-aminopropyl triethoxysilane functionalised graphene oxide. Plastics, Rubber and Composites, 47, 5, 187-91.

Lim JY, Yoon J, Hovde CJ, 2010. A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. J Microbiol Biotechnol, 20, 1, 5-14.

Liu Y, Shi L, Su L, van der Mei HC, Jutte PC, Ren Y, Busscher HJJCSR, 2019. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control. 48, 2, 428-46.

Liu Y, Zhang S, He Y, Chen C, Zhang C, Xie P, Zhong F, Li H, Chen J, Li Z, 2021. APTES Modification of Molybdenum Disulfide to Improve the Corrosion Resistance of Waterborne Epoxy Coating. Coatings, 11, 2, 178.

López D, Vlamakis H, Kolter R, 2010. Biofilms. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2, 7, a000398-a.

Madima N, Mishra SB, Inamuddin I, Mishra AK, 2020. Carbon-based nanomaterials for remediation of organic and inorganic pollutants from wastewater. A review. Environmental Chemistry Letters, 18, 4, 1169-91.

Malhotra BD, Ali MA, 2018. Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. Nanomaterials for Biosensors, 1-74.

Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, Alemany LB, Lu W, Tour JM, 2010. Improved Synthesis of Graphene Oxide. ACS Nano, 4, 8, 4806-14.

Missiakas DM, Schneewind O, 2013. Growth and laboratory maintenance of Staphylococcus aureus. Curr Protoc Microbiol, Chapter 9, Unit-9C.1.

Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR, 2010. Introduction to metallic nanoparticles. J Pharm Bioallied Sci, 2, 4, 282-9.

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR, 2019. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Front Microbiol, 10, 539-.

Myles IA, Datta SK, 2012. Staphylococcus aureus: an introduction. Semin Immunopathol, 34, 2, 181-4.

Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, Hosseini M, Baravati SZ, Jokar Z, Chermahin SG, 2014. Clinical characteristics of Staphylococcus epidermidis: a systematic review. GMS Hyg Infect Control, 9, 3, Doc23-Doc.

Nasir S, Hussein MZ, Zainal Z, Yusof NA, 2018. Carbon-Based Nanomaterials/Allotropes: A Glimpse of Their Synthesis, Properties and Some Applications. Materials (Basel), 11, 2, 295.

Onbaşlı D, 2018. Kitosan-Gümüş Nanopartikülü ve Kitosan-Gümüş-Grafen Oksit Nanokompozitinin Sentezi, Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Belirlenmesi. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15, 3, 208-15.

Ozturk I, Yurtman A, Erac B, Gul-Yurtsever S, Ermertcan S, Hosgor-Limoncu M, 2014. In Vitro Effect of Moxifloxacin and Rifampicin on Biofilm Formation by Clinical MRSA Isolates. Bratislavske Lekarske Listy, 115, 8, 483.

Özel F, 2015. Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar: Sentezi, yüzey modifikasyonu, yapısal ve manyetik karakterizasyonu ile toksik etkinin incelenmesi.

Özkan M, 2018. Lipit Bazlı Organik Nanoyapıların Hidrojellerin Adezyonunda Kullanılma Potansiyelinin İncelenmesi.

Papenfort K, Bassler BL, 2016. Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. Nature Reviews Microbiology, 14, 9, 576-88.

Pelgrift RY, Friedman AJ, 2013. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. Advanced Drug Delivery Reviews, 65, 13, 1803-15.

Petchiappan A, Chatterji D, 2017. Antibiotic Resistance: Current Perspectives. ACS Omega, 2, 10, 7400-9.

Philip S, Kuriakose S, 2018. Studies on the antibacterial activity of water-soluble iron oxide nanoparticle- β-cyclodextrin aggregates against selected human pathogenic bacteria. Nano-Structures & Nano-Objects, 16, 347-53.

Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Grużewska A, Woźniak-Kosek A, 2018. Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive Staphylococcus aureus Strains from Hospitalized Patients in Poland. Biomed Res Int, 2018, 4657396-.

Poon C, Patel AA, 2020. Organic and inorganic nanoparticle vaccines for prevention of infectious diseases. Nano Express, 1, 1, 012001.

Ranmadugala D, Ebrahiminezhad A, Manley-Harris M, Ghasemi Y, Berenjian A, 2017. Impact of 3-Aminopropyltriethoxysilane-Coated Iron Oxide Nanoparticles on Menaquinone-7 Production Using B. subtilis. Nanomaterials (Basel), 7, 11, 350.

Raue S, Fan S-H, Rosenstein R, Zabel S, Luqman A, Nieselt K, Götz F, 2020. The Genome of Staphylococcus epidermidis O47. Front Microbiol, 11, 2061-.

Rauti R, Musto M, Bosi S, Prato M, Ballerini L, 2019. Properties and behavior of carbon nanomaterials when interfacing neuronal cells: How far have we come? Carbon, 143, 430-46.

Reygaert WC, 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS Microbiol, 4, 3, 482-501.

Romero G, Moya SE, 2012. Chapter 4 - Synthesis of Organic Nanoparticles. In: Frontiers of Nanoscience. Eds: de la Fuente JM, Grazu V: Elsevier, p. 115-41.

Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan M, Ha S, 2015. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14, 4, 491-509.

Sahoo JK, Paikra SK, Baliarsingh A, Panda D, Rath S, Mishra M, Sahoo H, 2020. Surface functionalization of graphene oxide using amino silane magnetic nanocomposite for Chromium (VI) removal and bacterial treatment. Nano Express, 1, 1, 010062.

Salehi-Reyhani A, Ces O, Elani Y, 2017. Artificial cell mimics as simplified models for the study of cell biology. Experimental Biology and Medicine, 242, 13, 1309-17.

Sánchez-López E, Gomes D, Esteruelas G, Bonilla L, Lopez-Machado AL, Galindo R, Cano A, Espina M, Ettcheto M, Camins A, Silva AM, Durazzo A, Santini A, Garcia ML, Souto EB, 2020. Metal-Based Nanoparticles as Antimicrobial Agents: An Overview. Nanomaterials (Basel), 10, 2, 292.

Sarpaşar Z, 2019. Zeolitin manyetik FE3O4 nanoparçacıklar ile modifikasyonu ve boyarmadde adsorpsiyonunun incelenmesi, Kütahya Dumlupınar Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü.

Schommer NN, Christner M, Hentschke M, Ruckdeschel K, Aepfelbacher M, Rohde H, 2011. Staphylococcus epidermidis uses distinct mechanisms of biofilm formation to interfere with phagocytosis and activation of mouse macrophage-like cells 774A.1. Infect Immun, 79, 6, 2267-76.

Shahzadi S, Zafar N, Sharif R, 2018. Antibacterial activity of metallic nanoparticles. Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control, 51.

Shaikh S, Nazam N, Rizvi SMD, Ahmad K, Baig MH, Lee EJ, Choi I, 2019. Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. Int J Mol Sci, 20, 10, 2468.

Shkodenko L, Kassirov I, Koshel E, 2020. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. Microorganisms, 8, 10, 1545.

Singh V, Joung D, Zhai L, Das S, Khondaker SI, Seal S, 2011. Graphene based materials: Past, present and future. Progress in Materials Science, 56, 8, 1178-271.

Slavin YN, Asnis J, Häfeli UO, Bach H, 2017. Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. Journal of Nanobiotechnology, 15, 1, 65.

Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q, 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. BMC Microbiology, 15, 1, 36.

Sundar S, Mariappan R, Piraman S, 2014. Synthesis and characterization of amine modified magnetite nanoparticles as carriers of curcumin-anticancer drug. Powder Technology, 266, 321-8.

Şahin DT, 2020. Grafen tabanlı malzemelerin insan mezenkimal kök hücreleri nöronlara farklılaştırma potansiyeli, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü.

Tanaka S, Kaneti YV, Septiani NLW, Dou SX, Bando Y, Hossain MSA, Kim J, Yamauchi Y, 2019. A Review on Iron Oxide-Based Nanoarchitectures for Biomedical, Energy Storage, and Environmental Applications. Small Methods, 3, 5, 1800512.

Teja AS, Koh P-Y, 2009. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials, 55, 1, 22-45.

Thukkaram M, Sitaram S, Kannaiyan Sk, Subbiahdoss G, 2014. Antibacterial Efficacy of Iron-Oxide Nanoparticles against Biofilms on Different Biomaterial Surfaces. International Journal of Biomaterials, 2014, 716080.

Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr., 2015. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev, 28, 3, 603-61.

Tran HM, Tran H, Booth MA, Fox KE, Nguyen TH, Tran N, Tran PA, 2020. Nanomaterials for Treating Bacterial Biofilms on Implantable Medical Devices. Nanomaterials (Basel), 10, 11, 2253.

Tuncelli G, 2012. Demir Oksit Nanoparçacıkları Üzerine Desteklenmiş Tabakalı Çift Hidroksitlere Anti-Kanser Ilaç Tutuklanması ve Tanecik Şekline Bağlı Salınım Davranışları.

Turgut F, 2019. Grafen oksit nanotabakaların plazma yüzey modifikasyonları ve yağ-su ayrımı için ultrafiltrasyon membran üretiminde kullanılması, Konya Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü.

Tutun E, 2019. Fe3O4@TiO2 nanoparçacıkların sentezi ve Tc-99m ile işaretlenmesi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü.

Tüylek Z, 2016. Küçük şeylerin hikâyesi: Nanomalzeme. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5, 2, 130-41.

Ünver H, 2016. Nanomalzeme üretiminde iş sağlığı ve güvenliği risklerinin değerlendirilmesi, Çalışma Ve Sosyal Güvenlik Bakanlığı İş Sağlığı Ve Güvenliği Genel Müdürlüğü.

Valentini F, Calcaterra A, Ruggiero V, Pichichero E, Martino A, Iosi F, Bertuccini L, Antonaroli S, Mardente S, Zicari A, Mari E, Iovenitti G, Leone G, Botta M, Talamo M, 2019. Functionalized Graphene Derivatives: Antibacterial Properties and Cytotoxicity. Journal of Nanomaterials, 2019, 2752539.

Veiga A, Toledo MdGT, Rossa LS, Mengarda M, Stofella NCF, Oliveira LJ, Gonçalves AG, Murakami FS, 2019. Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. Journal of Microbiological Methods, 162, 50-61.

Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE, 2019. Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. Front Chem, 7, 824-.

Wallyn J, Anton N, Vandamme TF, 2019. Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications-A Review. Pharmaceutics, 11, 11, 601.

Wang L-S, Gupta A, Rotello VM, 2016. Nanomaterials for the Treatment of Bacterial Biofilms. ACS Infect Dis, 2, 1, 3-4.

Wang L, Hu C, Shao L, 2017. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. International journal of nanomedicine, 12, 1227.

Wu P-C, Chen H-H, Chen S-Y, Wang W-L, Yang K-L, Huang C-H, Kao H-F, Chang J-C, Hsu C-LL, Wang J-Y, Chou T-M, Kuo W-S, 2018. Graphene oxide conjugated with polymers: a study of culture condition to determine whether a bacterial growth stimulant or an antimicrobial agent? Journal of Nanobiotechnology, 16, 1, 1.

Wu S-Y, An SSA, Hulme J, 2015. Current applications of graphene oxide in nanomedicine. International journal of nanomedicine, 10 Spec Iss, Spec Iss, 9-24.

Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W-S, 2015. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. Sci Technol Adv Mater, 16, 2, 023501-.

Wu W, Wu Z, Yu T, Jiang C, Kim W-S, 2015. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. Sci Technol Adv Mater, 16, 2, 023501.

Xu C, Hu S, Chen X, 2016. Artificial cells: from basic science to applications. Mater Today (Kidlington), 19, 9, 516-32.

Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L, Deng Y, 2016. Crystal violet and XTT assays on Staphylococcus aureus biofilm quantification. Current microbiology, 73, 4, 474-82.

Yadav N, Dubey A, Shukla S, Saini CP, Gupta G, Priyadarshini R, Lochab B, 2017. Graphene Oxide-Coated Surface: Inhibition of Bacterial Biofilm Formation due to Specific Surface-Interface Interactions. ACS Omega, 2, 7, 3070-82.

Ye Z-B, Xu Y, Chen H, Cheng C, Han L-J, Xiao L, 2014. A Novel Micro-Nano Structure Profile Control Agent: Graphene Oxide Dispersion. Journal of Nanomaterials, 2014, 582089.

Yu W, Sisi L, Haiyan Y, Jie L, 2020. Progress in the functional modification of graphene/graphene oxide: a review. RSC Advances, 10, 26, 15328-45.

Zhang F, Song Y, Song S, Zhang R, Hou W, 2015. Synthesis of Magnetite–Graphene Oxide-Layered Double Hydroxide Composites and Applications for the Removal of Pb(II) and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid from Aqueous Solutions. ACS Applied Materials & Interfaces, 7, 13, 7251-63.

Zhang K, Li X, Yu C, Wang Y, 2020. Promising Therapeutic Strategies Against Microbial Biofilm Challenges. Front Cell Infect Microbiol, 10, 359-.

Zhang T, Tremblay P-L, 2020. Graphene: An Antibacterial Agent or a Promoter of Bacterial Proliferation? iScience, 23, 12, 101787.

Zheng K, Li K, Chang T-H, Xie J, Chen P-Y, 2019. Synergistic Antimicrobial Capability of Magnetically Oriented Graphene Oxide Conjugated with Gold Nanoclusters. Advanced Functional Materials, 0, 0, 1904603.

7. TURNİTİN RAPORU

SUDA DAĞILABİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Yazar Ayşe Kayan

Gönderim Tarihi: 10-Ağu-2021 02:26PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1629902050
Dosya adı: tez_10.08.21_1.docx (10.88M)
Kelime sayısı: 16645
Karakter sayısı: 119638

SUDA DAĞILABİLEN METAL NANOPARTİKÜLLERİN ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%4	%2	%1	%3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%2
2	www.scielo.br İnternet Kaynağı	<%1
3	dspace.marmara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	real.mtak.hu İnternet Kaynağı	<%1
5	Emel Bakay, Melike Cagan, Aziz Kolkiran, Nermin Topaloglu. "The Positive Effect Of Adjuvant Therapy On Laser Energy Dose And Photosensitizer Concentration Of Antibacterial Photodynamic Therapy", 2018 Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO), 2018 Yayın	<%1
6	Submitted to Beykent Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1