



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİTOSAN-GÜMÜŞ NANOTANECİKLERİNİN
DEZENFEKTAN OLARAK ÜRETİMİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Kimya Müh. Esra Dilaver Adıgüzel
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Proses ve Reaktör Tasarımı Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Muzaffer Yaşar**

**İkinci Danışman
Yard. Doç. Dr. Solmaz Akmaz**

Eylül, 2011

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KİTOSAN-GÜMÜŞ NANOTANECİKLERİNİN
DEZENFEKTAN OLARAK ÜRETİMİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Kimya Müh. Esra Dilaver Adıgüzel
Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı
Proses ve Reaktör Tasarımı Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Muzaffer Yaşar**

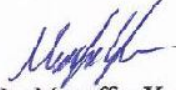
**İkinci Danışman
Yard. Doç. Dr. Solmaz Akmaz**


Eylül, 2011


İSTANBUL


Bu çalışma 30/09/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı Proses ve Reaktör Tasarımı Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Tez Jürisi

Danışman Adı: 
Prof. Dr. Muzaffer Yaşar
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı: 
Prof. Dr. M. Ali Gürkaynak
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı: 
Prof. Dr. Cemil İbiş
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı: 
Prof. Dr. Sandet Kevser Pabuçcuoğlu
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Jüri Adı: 
Prof. Dr. Gülten Gürdağ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürüttücü Sekreterliđinin 5521 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Nanoteknoloji ile kitosan-gümüş nanotanecik üretimi ve antibakteriyel özelliğinin incelenmesini konu alan lisansüstü çalışmalarında bana danışmanlık yapan Sayın Prof. Dr. Muzaffer Yaşar'a,

Deney aşamasında her türlü yardım ve desteği sağlayan ikinci danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Solmaz Akmaz'a,

Biyolojik aktivite incelenmesi konusunda her türlü bilgi paylaşımından dolayı Sayın Oray Ergüven'e,

Lisansüstü eğitimimde bana destek veren çalıştığım Refarm Kimya A.Ş. 'deki yöneticilerim Sayın Şake Yalçın ve Sayın Garo Yalçın ile yokluğumda üzerime düşen sorumluluklarımı üstlenerek yardımını esirgemeyen çalışma arkadaşlarıma,

Her zaman, her konuda yanımda olan sevgili eşime, anneme, babama ve kardeşlerime,

Teşekkürlerimi sunarım.

Esra DİLAVER ADIGÜZEL

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOLLER VE KISALTMALAR	vi
ÖZET	vii
SUMMARY	viii
1 GİRİŞ	1
2 GENEL KISIMLAR	1
2.1 NANOTEKNOLOJİ	1
2.1.1 Dezenfeksiyon ve Sterilizasyonda Nanoteknoloji	2
2.2 KİTİN VE KİTOSAN	2
2.2.1 Genel Bilgi	2
2.2.2 Kitosanın Kullanım Alanları.....	5
2.2.3 Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi.....	5
2.2.3.1 <i>Kitosanın Gram Negatif Bakteriye Etkisi</i>	5
2.2.3.2 <i>Kitosan nanotaneciğinin S. choleraesuis Bakterisini Yok Etmesi</i>	5
2.3 GÜMÜŞ NANOTANECİK	6
2.3.1 Genel Bilgi	6
2.3.2 Gümüş Nanotaneciğın İnsan Sağlığı ve Çevreye Etkileri.....	8
2.3.2.1 <i>Gümüş Nanotaneciğın İnsan Sağlığına Etkisi</i>	8
2.3.2.2 <i>Gümüş Nanotaneciğın Çevreye Etkisi</i>	8
2.3.3 Gümüş Nanotaneciğın Kullanım Alanları	9
2.3.4 Gümüş Nanotaneciğın Antimikrobiyal Etkisi.....	9
2.4 KİTOSAN- GÜMÜŞ NANOTANECİK	12
2.4.1 Kitosan – Gümüş Nanotanecik Bağlanma Mekanizması.....	13
2.4.2 Kitosan - Gümüş Nanotanecik Karakterizasyonu	14
2.4.2.1 <i>Gümüş Nanotaneciğınin X-Işını Kırınım Deseni (X-Ray Diffraction) ile Karakterizasyonu</i>	14
2.4.2.2 <i>Kitosan-Gümüş Nanotaneciğınin XRD ile Karakterizasyonu</i>	14
2.4.2.3 <i>Kitosan-Gümüş Nanotaneciğınin Ultraviyole (UV) Spektrofotometre ile Karakterizasyonu</i>	15
2.4.2.4 <i>Kitosan-Gümüş Nanotaneciğınin Infrared (FTIR) Spektrofotometre ile Karakterizasyonu</i>	15
2.4.2.5 <i>Kitosan-Gümüş Nanotaneciğınin Geçirgenli Elektron Mikroskopisi (TEM) ile Karakterizasyonu</i>	16
2.4.3 Kitosan-Gümüş Nanotaneciğınin Antimikrobiyal Aktivitesi.....	18
2.5 BAKTERİLER	19
2.5.1 Escherichia Coli.....	19
2.5.2 Acinetobacter Baumanni	19
2.5.3 Staphylococcus Aureus	20
2.5.4 Enterococcus Faecalis	20
2.5.5 Pseudomonas Aeruginosa.....	21
2.5.6 Streptococcus Pneumoniae.....	21
2.6 BAKTERİ TESTLERİ	23
2.6.1 Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, MİK (Minimum Inhibitory Concentration, MIC).....	23

3	MALZEME VE YÖNTEM.....	25
3.1	MALZEMELER	25
3.1.1	Kimyasal Malzemeler	25
3.1.2	Bakteri ve Besi Yerleri.....	25
3.1.3	Cihazlar	26
3.2	YÖNTEM.....	26
3.2.1	Kitosan-Ag Nanotanecik Hazırlanışı.....	26
3.2.1.1	<i>Farklı Gümüş Konsantrasyonlarında Kitosan-Ag Nanotanecik Hazırlanışı</i>	26
3.2.1.2	<i>Kitosan- Ag Nanotanecik Oluşumunda Sıcaklık Etkisi</i>	27
3.2.2	Kitosan – Ag Nanotaneciğinin Karakterize Edilmesi.....	27
3.2.2.1	<i>TEM ile Karakterizasyon</i>	27
3.2.2.2	<i>UV ile Karakterizasyon</i>	27
3.2.2.3	<i>XRD ile Karakterizasyon</i>	27
3.2.2.4	<i>FT-IR ile Karakterizasyon</i>	28
3.2.3	Kitosan-Ag Nanotaneciğinin Bakterisit Aktivitesi.....	28
3.2.3.1	<i>Broth Dilüsyon Yöntemi</i>	28
4	BULGULAR	29
4.1	KİTOSAN –AG NANOTANECİK KARAKTERİZASYONU	29
4.1.1	UV ile Karakterizasyonu	29
4.1.2	FT-IR ile Karakterizasyonu	30
4.1.3	XRD ile Karakterizasyonu.....	31
4.1.4	TEM ile Karakterizasyonu.....	32
4.2	KİTOSAN –AG NANOTANECİK OLUŞUMUNA SICAKLIK ETKİSİ.....	34
4.3	KİTOSAN –AG NANOTANECİĞİNİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ.....	36
5	TARTIŞMA VE SONUÇ	41
	KAYNAKLAR.....	43
	ÖZGEÇMİŞ.....	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2-1 Kitinden kitosan elde edilmesi	3
Şekil 2-2 Atomik kuvvet mikroskobu ile kitosan nanotanecek ile muamele edilmiş S.choleraesuis bakterisinin farklı zamanlardaki görüntüsü	6
Şekil 2-3 Ag nanotaneceğin yeast bakterisine karşı büyüme inhibisyon etkisi. ** Pozitif kontrolden önemli derecede farklı.	10
Şekil 2-4 Ag nanotaneceğin E.coli bakterisine karşı büyüme inhibisyon etkisi. *, ** Pozitif kontrolden önemli derecede farklı.	11
Şekil 2-5 Ag nanotaneceğin S.aureus bakterisine karşı büyüme inhibisyon etkisi. * Pozitif kontrolden önemli derecede farklı.	12
Şekil 2-6 Kitosana gümüş iyonlarının bağlanması.....	13
Şekil 2-7 (a ve b) kitosan nanotanecek , (c ve d) gümüş bağlı kitosan nanotaneceğin TEM görüntüleri	16
Şekil 2-8 Gümüş nanotanecek TEM görüntüleri	17
Şekil 2-9 0.2 M AgNO ₃ içeren kitosan gümüş nanotanecek TEM görüntüleri.....	17
Şekil 2-10 Taramalı elektron mikroskopisi ile bakteri üzerine kitosan- Ag nanotanecek etkisi A: 30 dakika B: 60 dakika C: 90 dakika ve D: 90 dakika sonra sadece kitosanın bakteriye etkisi görüntüleri [2].	18
Şekil 4-1 Kitosan ve 0.02 M AgNO ₃ , 0.04 M AgNO ₃ , 0.06 M AgNO ₃ içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin UV grafiği.....	29
Şekil 4-2 Kitosan ve 0.02 M AgNO ₃ , 0.04 M AgNO ₃ , 0.06 M AgNO ₃ içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin FT-IR grafiği.....	30
Şekil 4-3 Kitosan ve 0.02 M AgNO ₃ , 0.04 M AgNO ₃ , 0.06 M AgNO ₃ içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin XRD grafiği	32
Şekil 4-4 0.02 M AgNO ₃ içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin TEM görüntüleri	33
Şekil 4-5 0.04 M AgNO ₃ içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin TEM görüntüleri.....	33
Şekil 4-6 0.06 M AgNO ₃ içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin TEM görüntüleri.....	34
Şekil 4-7 50°C, 75°C, 95°C'de 0.02 M AgNO ₃ içeren kitosan – Ag nanotaneceğinin UV grafiği.....	35
Şekil 4-8 50°C, 75°C, 95°C'de 0.02 M AgNO ₃ içeren kitosan – Ag nanotaneceğinin FT-IR grafiği.....	35
Şekil 4-9 50°C, 75°C, 95°C'de 0.02 M AgNO ₃ içeren kitosan – Ag nanotaneceğinin XRD grafiği	36
Şekil 4-10 0.06 M AgNO ₃ içeren kitosan- gümüş nanotaneceğinin bakteri testi görüntüleri.....	39
Şekil 4-11 0.04 M AgNO ₃ içeren kitosan- gümüş nanotaneceğinin bakteri testi görüntüleri.....	39
Şekil 4-12 0.02 M AgNO ₃ içeren kitosan- gümüş nanotaneceğinin bakteri testi görüntüleri.....	39
Şekil 4-13 Kitosanın bakteri testi görüntüleri.....	40

TABLO LİSTESİ

Tablo 2-1 Kitin ve kitosan türevlerinin kimyasal yapısı [5].....	4
Tablo 2-2 Ag nanotaneciğın MIC sonuçları	11
Tablo 2-3 Kullanılan bakteriler ve özellikleri.....	22
Tablo 4-1 XRD sonuçlarına göre tanecik boyutları	31
Tablo 4-2 TEM sonuçlarına göre tanecik boyutları	32
Tablo 4-3 Crome agara ekilmeden önceki tüplerdeki bakteri ve örnek solusyonlarının görüntüleri.....	37
Tablo 4-4 Bakteri ekimlerinden sonra petrilere gözlenen sonuçlar	38

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

Np	: Nanotanecik
XRD	: X-Ray Diffraction (X-ışını Kırınımı)
UV	: Mor ötesi, Ultraviyole
TEM	: Transmission electron microscopy (Geçirgenli elektron mikroskopisi)
FT-IR	: Fourier transform infrared spectroscopy
MIC	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
°C	: Santigrat derece (sıcaklık birimi)
nm	: Nanometre
nM	: Nanomolar
ATCC	: American Type Culture Collection
IR	: Infrared spectroscopy

ÖZET

KİTOSAN - GÜMÜŞ NANOTANECİKLERİNİN DEZENFEKTAN OLARAK ÜRETİMİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Bu çalışmada kitosan-gümüş nanotaneçik kompozitinin antibakteriyel etkinliği incelenmiştir.

Kitosan-gümüş nanotaneçik kompoziti, 95 °C 'de kitosanın NaOH çözelti ortamında AgNO₃ çözeltisiyle karıştırılmasıyla elde edilmiştir. 0,02 M, 0,04 M ve 0,06 M AgNO₃ kullanılarak farklı gümüş konsantrasyonlarına sahip kitosan-gümüş nanotaneçik sentezi yapılmıştır. Daha sonra Geçirgen Elektron Mikroskobu (Transmission electron microscopy, TEM) , Ultraviyole (UV) Spektrometresi, X-Işını kırınım cihazı (X Ray difraktogramı (XRD)) ve Infrared (IR) Spektrometresi kullanılarak, kitosan-gümüş nanotaneçik kompozitinin yapısı tanımlanmıştır.

Yeni sentezlenmiş kitosan-gümüş nanotaneçik kompozitinin antibakteriyel etkinliğinin testi için Escherichia coli (ATCC 25922), Acinetobacter baumannii (ATCC 19606), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), Enterococcus faecalis (ATCC 29212), Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853), Streptococcus pneumoniae (ATCC 49619) bakterileri kullanılmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyonu (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) ile kompozitin biyolojik aktivitesi belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada, aynı konsantrasyonlardaki bileşenlerin, kompozit oluşturduklarında tek başlarına olduklarından daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip oldukları bulunmuştur. İşlenmemiş kitosana göre, antibakteriyel aktiviteyi önemli ölçüde arttırmak üzere kompozit içindeki metal nanotaneçiklerin küçük bir yüzdesinin varlığının yeterli olduğu saptanmıştır. Ayrıca kompozit içindeki gümüş konsantrasyonu arttıkça taneçik boyutuyla birlikte antibakteriyel aktivitede de artışlar söz konusudur.

SUMMARY

PRODUCTION OF CHITOSAN - SILVER NANOPARTICLES AND DETERMINATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY AS DISINFECTANT

In this study the antibacterial properties of a novel chitosan- Ag-nanoparticle composite was investigated.

Chitosan–AgNp composite was synthesized by adding AgNO₃ and NaOH solution to chitosan solutions, by constant stirring at 95 °C. Different concentration (0,02 M, 0,04 M and 0,06 M) of AgNO₃ had been used for synthesis. Chitosan–AgNp composite was characterized by using TEM (Transmission electron microscopy), Infrared (IR), X-ray Diffraction (XRD) and Ultraviolet (UV).

Escherichia coli (ATCC 25922), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619) were used for test the bactericidal efficiency of a novel synthesized chitosan–Ag-nanoparticle composite. The biological activity was determined as the minimum inhibitory concentration (MIC) of the composite.

The composite was found to have significantly higher antimicrobial activity than its components at their respective concentrations. The presence of a small percentage of metal nanoparticles in the composite was enough to significantly enhance antibacteriyal activite as compared with that of non-processed chitosan. In addition, the concentration of silver in the composite antibacterial activity increases with increasing particle dimension in question.

1 GİRİŞ

Gümüş iyonları güçlü antibakteriyel aktiviteye sahiptirler. Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki çalışmalarda meydana gelen artışa paralel olarak, gümüş miktarını minimum tutarak gümüşün bilinen antibakteriyel özelliğinde maksimum verim elde etme çalışmaları yapılmaktadır. Gümüşün toksik olmaması birçok alanda kullanım kolaylığı sağlamaktadır.

Kitosan ise bilinen birçok uygulamalarda kullanılan geniş spektrumlu antibakteriyel özelliğe sahip kitinden elde edilen polikatyonik bir polimerdir. Kitosanın biyobozunabilirlik özelliğinden dolayı çevreye ve insana zararlı etkileri azdır.

Kitosan-gümüş nanotanecik, antibakteriyel özellik gösteren polimere gümüş iyonlarının nano boyutta eklenmesiyle elde edilir. Kitosan ve gümüşün tek başlarına sahip oldukları antibakteriyel özelliğin kompozit oluştuktan sonra artması söz konusudur.

2 GENEL KISIMLAR

Nanotanecik sentezi çeşitli tiplerdeki kararlı maddelerin bulunduğu çözeltilerdeki metal iyonlarının indirgenmesine dayanmaktadır [1].

Gümüş nanotanecik hazırlanmasında gümüş iyonlarının kaynağı olarak sulu gümüş nitrat çözeltisi kullanılmaktadır. Ayrıca kitosan çözeltisi eklenerek kitosan-Ag nanotanecik elde edilmektedir [2].

2.1 NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji anlamını metrenin milyarda biri olan nano kavramından almaktadır. Yunanca cüce kelimesinden de gelen nanoteknoloji, yapıtaşları olarak atom veya moleküllerin kullanımıyla insan yapımı 1-100 nanometre boyutundaki yapıların işlevsel olarak tasarlanarak imal edilmesi olarak ta tanımlanabilir.

Bu yapıların boyutunu daha iyi anlamak için şu örnekler verilebilir: 1 nanometre insan saç telinin 80.000 de birine denktir, insan tırnağı her saniyede 1 nanometre uzamaktadır. Ayrıca, biyolojik bilgiyi taşıyan ve çeşitli görevleri olan protein DNA gibi biyolojik yapılar da nanoteknolojinin kapsamına girmektedir.

2.1.1 Dezenfeksiyon ve Sterilizasyonda Nanoteknoloji

Bu günlerde sık sık ‘antibakteriyel’ sözü duyulmaktadır. Her gün bir gazete ya da dergi köşesinde antibakteriyel ürünlerle karşılaşmaktadır. Havlu, diş fırçası, klavye, boya, saklama kabı, iç çamaşırı, konfeksiyon ürünleri vs. bu ürünler arasındadır. Hatta bu listeyi daha da uzatmak mümkündür. Özellikle 2-3 yıldır hızla artan bir oranda bu tür ürünlerle karşılaşmaktadır. Çünkü mikroorganizmalara karşı yine onların boyutlarında bir teknoloji gelişmeye başlamıştır.

Mikroorganizmaların en yaygın ve en ciddi enfeksiyonlara neden olanları bakterilerdir. Kullanılan antibiyotiklere, antiseptiklere ve dezenfektanlara karşı dayanıklı mikroorganizmaların sayısının gün geçtikçe artması nedeniyle bilinen bu bakterilere karşı alternatif sistemlerin geliştirilmesi gerekir. Bu alanda gümüş nanodezenfektan olarak geniş bir kullanım alanına sahiptir [3].

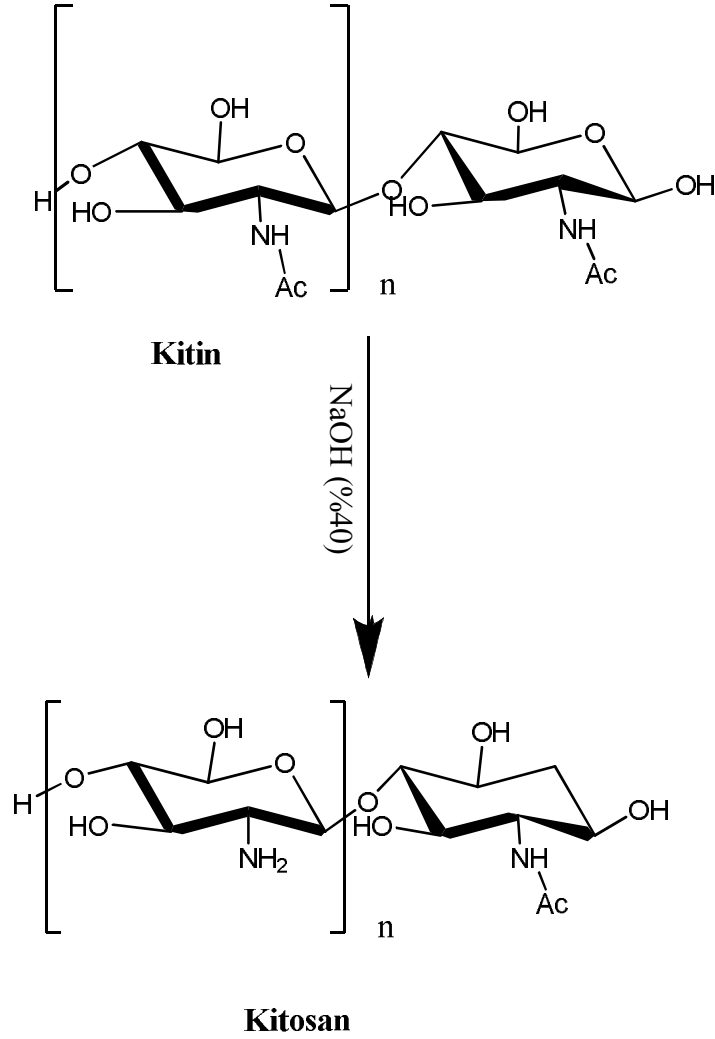
2.2 KİTİN VE KİTOSAN

2.2.1 Genel Bilgi

Kitosan çözücülerin çoğunda çözünmez. Fakat seyreltik organik asitlerde örneğin; asetik asit, formik asit, suksinik asit, laktik asit ve malik asitte çözünebilir. Suda çözünmeyen kitosan yüksek viskoziteye sahiptir. Kitosan yüksek pH’da proteinlerle pıhtılaşma eğilimi gösterdiğinden kullanımı sınırlıdır [4].

Kitosan, kitinin alkali deasetilasyonu ile elde edilen polimerik 1 → 4 bağlı 2-amino-2-deoksi-β-D-glikoz olarak tanımlanır. Kitin ise genellikle kabuklu deniz canlılarının kabuğundan ve fungusların hücre duvarlarından elde edilir [2].

Kitosan ve kitin yapay selüloz ile karşılaştırıldığında yüksek azot içeriklerinden dolayı tercih edilir. Bu da kitosanı kullanışlı bir kenetleme maddesi yapar. Çünkü polimerlerin çoğu yapay malzemelerdir ve biyoyuumluluğu ile biyobozunması doğal polimerlere (selüloz, dekstroz, kitin, kitosan, ve bunların türevleri) göre daha sınırlıdır [4].



Şekil 2-1 Kitinden kitosan elde edilmesi

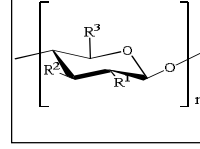
Kitosan özel yapısı ve özellikleriyle polikasyonik bir polimerdir. 5000 den fazla glukozamin birimi içermektedir ve alkalın deasetilasyon ile kitinden elde edilmektedir (Tablo 2-1) [4].

Kitin, N-asetil-d-glukozaminin parçalarıyla tekrarlanan C3 ve C6'da iki adet hidroksil grubuna sahiptir. C6'daki hidroksil grubu C3'tekine göre daha duyarlıdır. Kitosan ise C2 'de bir adet reaktif amino grubuna ve C3 ve C6'da iki hidroksil grubuna sahiptir. Bu gruplar üzerindeki kimyasal reaksiyonlarda meydana gelen yükseltgenme sonucunda birçok türevleri elde edilir (Tablo 2-1) [5].

Kitosanın antibakteriyel etkisinin esas nedeni moleküler ağırlığı ve konsantrasyonudur. Kitosan oligomerden daha etkili bakterisit özelliindedir [6].

Tablo 2-1 Kitin ve kitosan türevlerinin kimyasal yapısı [5]

Kitosan Türevleri	R ¹	R ²	R ³
Amino gruplardaki reaksiyonlar			
1) Açıl	-NHC(=O)-R	-OH	-CH ₂ OH
2) Alkiliden + Ariliden	-N=CH-R	-OH	-CH ₂ OH
3) Alkil + Aril	-NH-CH ₂ -R	-OH	-CH ₂ OH
4) Deaçil	-NH ₂	-OH	-CH ₂ OH
5) İmido	-N(C=O) ₂ =R	-OH	-CH ₂ OH
6) Metal çelate	-NH ₂ Me	-OH	-CH ₂ OH
7) Nitro	-NHNO ₂	-OH	-CH ₂ OH
8) Tuz	-NH ₃ ⁺ R	-OH	-CH ₂ OH
9) Sülfat	-NHS(=O) ₂ ONa	-OH	-CH ₂ OH
10) Sülfonil	-NHS(=O) ₂ R	-OH	-CH ₂ OH
11) tiol thiokarbon	-NH(C=S)SH		
Hidroksil gruplarındaki reaksiyonlar			
1) Açıl	-NHAc	-OC(=O)-R	-CH ₂ O(C=O)-R
2) Alkil + Aril	-NHAc	-O-R	-CH ₂ O-R
3) Metal alkolat	-NHAc	-ONa	-CH ₂ ONa
4) Nitro	-NHAc	-ONO ₂	-CH ₂ ONO ₂
5) Fosfat	-NHAc	-OP(=O)(ONa) ₂	-CH ₂ OP(=O)(ONa) ₂
6) Sülfat	-NHAc	-OS(=O) ₂ ONa	-CH ₂ OS(=O) ₂ ONa
7) Sülfonil	-NHAc	-O-S(=O) ₂ -R	-CH ₂ O-S(=O) ₂ -R
8) Siril	-NHAc	-O-Si ⁿ 9	-CH ₂ -Si(R) 9
9) tiol thiokarbon	-NHAc	-OC(=S)SR	-OC(=S)SR
Karbon zincirlerindeki reaksiyonlar			
1) 3.6 -Anhidro	-NHC(=O)CH ₃		
2) Azido	-NHAc	-OH	-CH ₂ N ₃
3) Halo	-NHAc	-OH	-CH ₂ X
4) Merkaptto	-NHAc	-OH	-CH ₂ SH
5) Oksidasyon	-NHAc	-OH	-COOH
6) Oksidatif- deaminasyon	-O-CS	-OH	-CH ₂ OH
7) İndirgenme	-NHAc veya -NH ₂	-OH	-CH ₃



* Ac: Asetil, R: Alkil veya Aril Grup, X: Halojen

Kitin ve kitosan toksik değildir. Deney hayvanlarına kilogramları başına 0.7 ile 0.8 gr arasında kitosan 8 hafta boyunca her gün oral yolla verilmiş ve hiçbir yan etkiye rastlanmamıştır. Ayrıca 11 gün boyunca her gün vücut ağırlığının her bir kilogramı için 4,5 mg kitosan damardan verildiğinde de hiçbir yan etkiye rastlanmamıştır [7].

Kitin ve kitosandan oligosakkarit üretilerek biyosferde, zirai yağlarda, hidrosferde bozunması sağlanabilir. Ayrışma hızı yağda ve hidrosferde yumuşatılarak değiştirilebilir ve ayrıca kimyasal modifikasyonla kontrol edilebilir [8].

2.2.2 Kitosanın Kullanım Alanları

Kitin ve kitosandan, çeşitli alanlarda ekolojik zararsız malzeme olarak yararlanılmaktadır. Bu alanlar; biyoteknoloji, su arıtma, insan ve hayvan sağlığında, tekstil, kozmetik, tarım ve gıda endüstrisidir.

Kitosan ile ilgili yapılan araştırmalarda kitosanın nanotanecik ilaç olarak sentezlendiği görülmektedir. Kitosan nanotanecik hücre içindeki gen transferinin etkinliğini geliştirmek için de kullanılmıştır. Kitosan mikro fiberler midede ilaç dağılımında da kullanılmıştır. Asetile edilmiş kitosan mikro fiberleri aktif antimikrobiyal etkenlerinin kontrollü yayılması için hazırlanmıştır. Kitosanın küçük ve kuantum boyutları gibi benzersiz karakteri üstün faaliyetlerini sergileyebilmesini sağlamıştır [9].

2.2.3 Kitosanın Antimikrobiyal Aktivitesi

Kitosan pH 6,5 civarında zayıf çözünürlüğe sahip olduğundan antibakteriyel aktivitesini sadece asidik ortamda göstermektedir. Kitosanın antibakteriyel aktivitesi, kitosanın tipi, polimerizasyon derecesi, moleküler ağırlığına ve çözücüsünün cinsi gibi bazı faktörlere bağlıdır. Kitosan gram pozitif bakterilere gram negatif bakterilere kıyasla daha yüksek antibakteriyel aktivite göstermektedir [9].

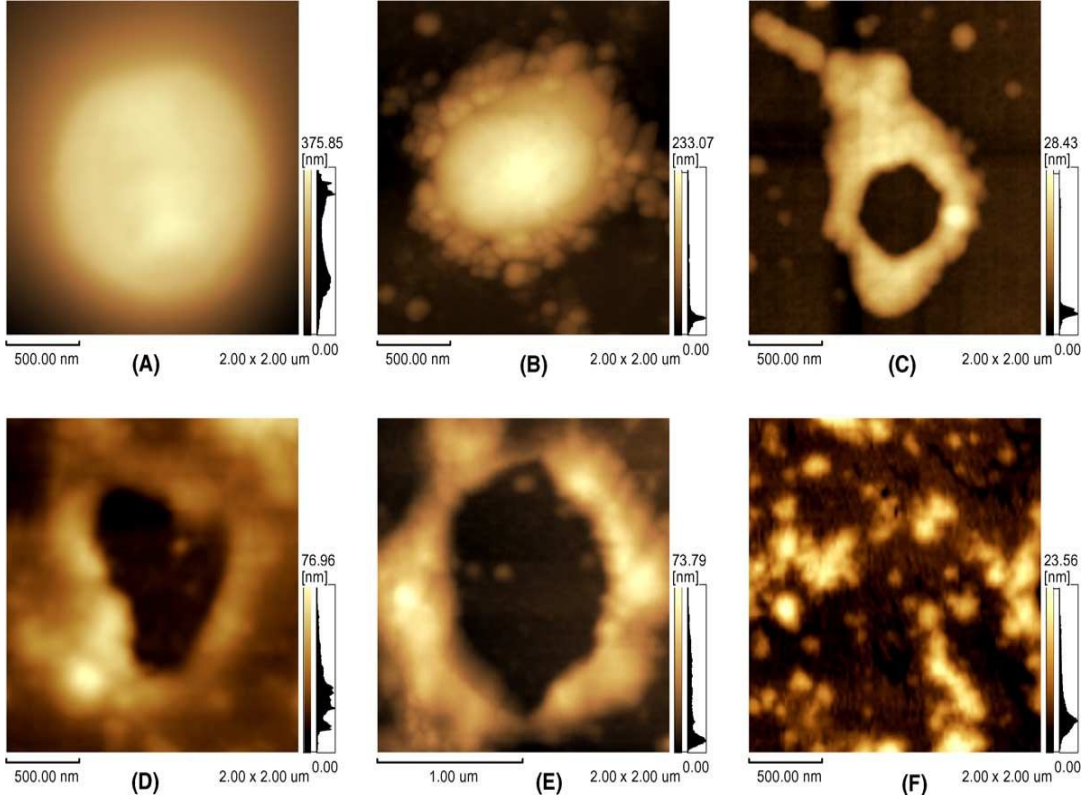
2.2.3.1 *Kitosanın Gram Negatif Bakteriye Etkisi*

Kitosanın antibakteriyel ve antifungal aktivitesinin ortaya çıkmasından bu yana doğal gıda koruyucu olarak kullanımı dikkat çekmiştir. Bozulmuş mayalara karşı çok aktif olmasıyla beraber gram negatif bakterileri kısıtlama özelliği de bulunmaktadır. Bu gram negatif bakterilerin başında escherichia coli ve pseudomonas aeruginosa bulunmaktadır. Bu bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonu 100- 10000 ppm arasındadır.

Kitosanın gram negatif bakterilere etkisi yapısında bulunan pozitif yüklü amino grubundan kaynaklanmaktadır. Kitosanın bu polikatyonik yapısı gram negatif yapıdaki baskın anyonik yapıyla etkileşmesi sonucunda bakteriyi sınırlamaktadır [10].

2.2.3.2 *Kitosan nanotaneciğinin S. choleraesuis Bakterisini Yok Etmesi*

Kitosan nanotaneciğinin S. choleraesuis bakterisine karşı yapısı atomik kuvvet mikroskobu ile incelenmiştir. Bakteri 30 dk 64lg/ml kitosan nanotanecik ile muamele edildiğinde hücrelerin etrafı kitosan nanotanecik tarafından çevrilmiştir. 60 dk muamele edildiğinde küresel şekiller bozularak düzensiz yoğunlaşmış kitlelere dönüşmektedir(Şekil 2-2). Bakterinin parçalanmaya başlaması kitosan nanotanecik ile 3 saat muamele edilmesiyle gerçekleşmektedir.



Şekil 2-2 Atomik kuvvet mikroskobu ile kitosan nanotaneçik ile muamele edilmiş *S.choleraesuis* bakterisinin farklı zamanlardaki görüntüsü

Şekil 1.2’de muamele edilmemiş hücre (A), 30 dakika muamele edilmiş hücre (B), 1 saat muamele edilmiş hücre (C), 1,5 saat muamele edilmiş hücre (D), 2 saat muamele edilmiş hücre (E), 3 saat muamele edilmiş hücre (F) ile gösterilmektedir [9].

2.3 GÜMÜŞ NANOTANECİK

2.3.1 Genel Bilgi

Gümüş doğal olarak oluşan, ‘Ag’ simgesi ile periyodik tabloda 47. sırada bulunan, atomik ağırlığı 107,8 olan değerli bir metaldir. Yüksek elektriksel ve termal iletkenliğe sahip olması sebebiyle yaygın olan çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır.

Eski medeniyetler bu değerli metali, tıp, mutfak eşyaları, tabak, bardak, yiyecek saklama kapları, mücevher, bozuk para, kıyafet, inşaat malzemeleri, su dezenfektanı ve insan hastalıklarında kullanmışlardır [11].

Gümüş beyaz ve parlak metalik bir elementtir. Altın’dan başka nadir bulunan ve değerli bir metal olan gümüş, insanlık tarihinde uzunca yıllar diş dolgusu, fotoğraf ve patlayıcı olarak ta kullanılmıştır.

Mekanizması yeterli miktarda anlaşılmasına rağmen, gümüşün birçok uygulamaları arasında hijyenik ve medikal amaçlı kullanılan dezenfektan özelliği önemli bir yer tutmaktadır.

Eski zamanlarda gümüş aletler, su ve şarap saklamak için kullanılırdı. Ayrıca modern tıbbın babası olan Hipokrat gümüş tozunun şifalı hastalık önleyici özelliğinin olduğuna ve ülsere iyi geldiğine inanmaktaydı. Fakat medikal uygulamalarda gümüşün bileşikleri ilk olarak kullanılmıştır.

1.Dünya Savaşı'nda antibiyotikler ortaya çıkana kadar, yara enfeksiyonu tedavisinde gümüş bileşikler büyük silah olmuştur. 1984'te Alman doğum uzmanı C.S.F. Crede'in % 1'lik gümüş nitratın gonococcal ophtalmia neonatorum (yeni doğan bebeklerde gonokok bakterisinin sebep olduğu gözlerde meydana gelen iltihaplı hastalık) hastalığını önlemek için göz damlası olarak kullanması tarihte tıp alanındaki ilk uygulamadır. Ayrıca ciddi yanıklar sonucunda oluşan yaralarda gümüş sulfadiazin krem antibakteriyel olarak kullanılmaktadır. Fakat uzun süre gümüşe ve gümüş bileşiklerine maruz kalma durumunda deride veya gözde görülen bir cilt hastalığı olan argyrosis ve argyria hastalıkları ortaya çıkmıştır ve bu da gümüşün negatif bir özelliği olmuştur. Bu sebepten ve penisilin ve sefalosparin gibi antibiyotiklerin bulunması ile birlikte, gümüşlerin antienfeksiyon ajanı olarak parıltısı büyük ölçüde sönmüştür. Ancak modern fizikteki gelişmeler gümüşün kaybettiği parıltısını yenilemesine yardım etmiştir. Metalik gümüş, morfolojisi ve karakterinin olağanüstü sonuçları ile yeni mühendislik uygulamalarına konu olmuştur. Mühendislik çalışmalarında büyük parçacıklar yerine nanometre ile ölçülen çok küçük boyutlarla çalışmak öne geçen çalışmalar arasında yer almaktadır. 100 nm'den küçük boyutta bir parça nanotanecik olarak adlandırılır. Nanoboyuta ulaşıldığında, diğer nanotaneciklere ve aynı etkiye sahip başlıca küçük boyutlu malzemelere göre gümüş tanecikler dikkat çekici fizikokimyasal özellikler ve biyolojik aktivite göstermektedir.

Günümüzde nanogümüş ürünlerinin güçlü antimikrobiyal aktivite olarak kullanımı yaygındır. Nanogümüş, malzemelere yerleştirilmiş olarak veya tamamen nanogümüşle kaplanmış olarak, yara bandajlama ekipmanları, doğum kontrol hapları, ameliyat ekipmanları ve kemik protezleri gibi ilaç alanında kullanılır.

Günlük yaşantıda tüketiciler, nanogümüşü oda spreyi, banyo deterjanı, su arıtıcı, duvar boyası, kıyafet, iç çamaşırı ve çorap üretimi gibi tekstil sektörlerinde kullanmaktadırlar. Nanogümüş kullanılan çamaşır makineleri de günümüzde mevcuttur.

Nanogümüş uygulamalarının, nanomalzemenin tıp ve sağlık sektöründeki kullanımında yüksek derecede ticarileştiği görülmektedir. Bu yüzden nanogümüşün insan vücuduyla teması giderek artmaktadır. Sonuç olarak, gümüşün nanotanecik formunun insan vücudundaki hücrelerde, dokularda ve biyolojik moleküllerde kullanımının artması da insan vücudundaki temasın ilerlemesini sağlamıştır. Geleneksel düşünce, gümüşün argyria veya argyrosis hastalıkları ve bazı küçük problemler hariç memeli hücrelere toksik olmadığıdır.

Gümüş nanotanecik sentezi birçok yolla yapılabilmektedir. Tanecik morfolojisi kürelerin, çubukların, küplerin, tellerin ve çokgenlerin 100 nm'den küçük boyutlarını

içerir. Bütün nanomalzemeler içinde gümüş nanotaneciklerin özelliği çok küçük boyutta olabilmesidir.

Çok küçük boyutlu taneciklerin çok büyük yüzey alanına etki eden kütle başına düşen atomlar, kolayca reaksiyona girebilecek ve ortam temasını hemen gerçekleştirilebilecek düzeydedir. Gümüş nanotaneciğin şekli ve boyut aralıkları virüs ve bakterilere etkisini benzersiz yapmaktadır [12].

2.3.2 Gümüş Nanotaneciğin İnsan Sağlığı ve Çevreye Etkileri

Nanogümüş tanecikler genellikle 100 nm'den küçüktür ve 20-15.000 gümüş atomları içerir. Nanodüzeyde gümüş, önemli ölçüde değişik fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler göstermektedir. Gümüş nanotanecik diğer nanotaneciklerden ayırt eden en önemli özelliklerinden birisi çok küçük tanecik boyutuna sahip olabilmesi ve çok küçük tanecik boyutu ile çok büyük alanlara etki edebilmesidir. Çok küçük tanecik boyutunda iyi işlev görmesi insan sağlığı ve çevreye zararlarının da çok fazla olmamasını sağlar.

2.3.2.1 Gümüş Nanotaneciğin İnsan Sağlığına Etkisi

Gümüş metal ve gümüş kaplama makul miktarda kullanıldığında insan vücudunda herhangi bir yan etkiye sebep olmaz. Virüs, bakteri, mantar, maya gibi birçok patojene karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir.

Gümüş tuzları, zihinsel hastalıkların, nikotin bağımlılığının, mide ve bağırsak iltihabının ve frengi, bel soğukluğu gibi bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Gıda zehirlenmelerinden korunmak için gümüş tanecikler kesme tahtalarında, masa üstlerinde, yüzey dezenfektanlarında ve buzdolaplarında kullanılır.

Gümüş, vücut kokularına sebep olan bakterileri öldürmek için kumaşlara dokunarak veya emdirilerek uygulanır.

Gümüş nanotaneciğin, beyin hücrelerine, yaşam hücrelerine ve kök hücrelerine zarar verdiği görülmüştür. Derinin kolloidal metalik gümüş veya gümüş tuzlarına uzun süre ve yüksek oranda maruz kalması sonucunda deri hastalıklarına sebep olur [9].

2.3.2.2 Gümüş Nanotaneciğin Çevreye Etkisi

İnsan ve çevre sağlığında uygulanan prosesler için yapılan çalışmalar özellikle gümüş katkılı antimikrobiyal malzemelere ilgiyi arttırmıştır. Pek çok metalin antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bilinmesine rağmen gümüş diğer metallere tercih edilmektedir. Bunun başlıca nedenleri bakterilere karşı en dirençli metal olması, kontrollü kullanımında vücuda karşı zararlı etkilerinin bulunmadığının eskiden beri bilinmesi,

çoğu malzemeye göre son ürün haline getirilmesinin daha ucuz olması ve kolay üretim işlemidir.

Gümüşün fazla miktarda kullanımı sadece insan vücuduna zararlı değildir. Ayrıca sucul sisteme ve topraktaki mikrobiyal topluluklar için de fazlası toksiktir.

Çevreciler, güçlü antimikrobiyallerin yaygın kullanımında doğa sistemindeki bakteriler için ciddi negatif sonuçlara sebep olabileceği konusunda uyarıyorlar.

Gümüşün toz formu balıklar, bazı bitkiler, mantarlar, kabuklular için toksiktir [30].

2.3.3 Gümüş Nanotaneciğin Kullanım Alanları

Bazı eski uygarlıklar, enfeksiyonları ve gıda bozulmalarını önlemek amacıyla gümüş kap kullanmışlardır. Romalıların yaralanmalarda, kırılmalarda ve deri hastalıklarında gümüş nitrat kullanıldığı bilinmektedir. Milattan önce 69 yılındaki ilaç kitaplarında gümüş nitrat mikrop öldürücü etkisi ile geçmiştir. Modern tıbbın babası sayılan Hipokrat notlarında gümüşün iyileştirici ve enfeksiyon oluşumunu azaltıcı bir madde olduğunu belirtmiştir. 1900'lü yıllarda ise süt şişelerine gümüş parçalar atılarak sütün uzun süre taze kalması sağlanmaya çalışılmıştır. Antibiyotikler geliştirilmeden önce gümüş bileşikleri, enfeksiyona karşı kullanılmıştır.

Antibakteriyel ve antimikrobiyal özellikleri yüksek olan gümüş iyonları nanoboyutta istenilen malzemelerle birleştirilerek yerine göre malzemenin bünyesine katılmakta, yerine göre de malzemenin yüzeyine kaplanabilmektedir. Kullanım açısından bakıldığında faydaları medikal implant gibi alanlarda en fazla olan antibakteriyel malzemeler, evde kullanılan boyalar, gıda ambalaj malzemeleri, tekstil ve insan ile temas eden ya da edecek olan tüm yüzeyler de kullanılabilir hale getirilmiştir [13].

2.3.4 Gümüş Nanotaneciğin Antimikrobiyal Etkisi

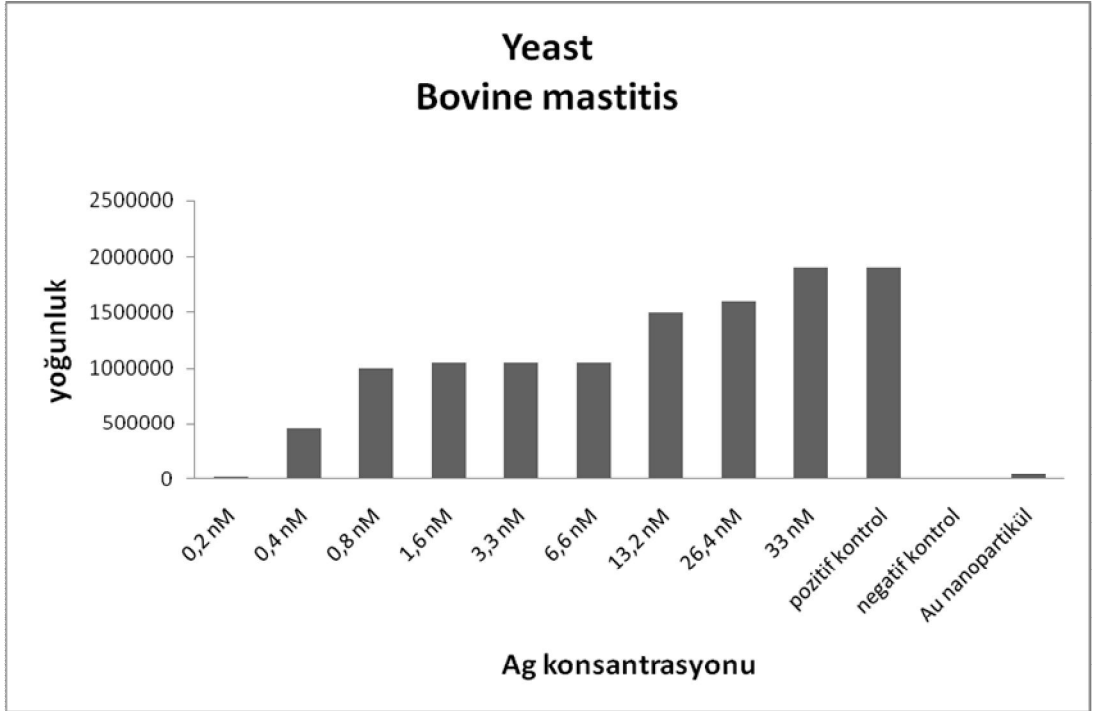
Kim J.S'nin 2006 da yaptığı bir çalışmada, Muller hinton agar kullanılarak S.aureus, E. Coli ve yeast bakterilerine karşı farklı konsantrasyonlarda (0,2 – 33 nM) Ag nanotanecik'nin antimikrobiyal testleri yapılmıştır. Bu testlerde mikroorganizmaların gelişmesini en az düzeyde engelleyecek konsantrasyon yani minimum inhibitör konsantrasyonu (MIC) ölçülür.

Şekil 2-3'e göre Ag-nanotanecik 'nin yeast bakterisine karşı minimum inhibitör konsantrasyonu görülmektedir. Yeast bakterisinin minimum inhibitör konsantrasyonuna göre referans olarak itrakozanol kullanılmıştır ve bu pozitif kontrol olarak değerlendirilmektedir. Buna göre 33 nM deki Ag-nanotanecik'nin pozitif kontrol ile benzer etkiyi yaptığı görülmektedir. Bakterinin büyümesinin 13,2 nM'den sonra önemli ölçüde azaldığı görülmektedir. Buna göre minimum inhibitör konsantrasyonunun 6,6 nM ile 13,2 nM arasında olduğu görülmektedir(Tablo 2-2).

Şekil 2-4'e göre ise E.coli için minimum inhibitör konsantrasyonunun 3,3 nM ile 6,6 nM arasında olduğu görülmektedir. E. Coli ve S. Aureus bakterileri için ise gentamisin referans olarak kullanılmıştır.

Şekil 2-5'e göre S. Aureus için minimum inhibitör konsantrasyonunun yüksek konsantrasyonda olduğu görülmektedir. 33 nM 'den büyük konsantrasyonda MIC göstermektedir (Tablo 2-2).

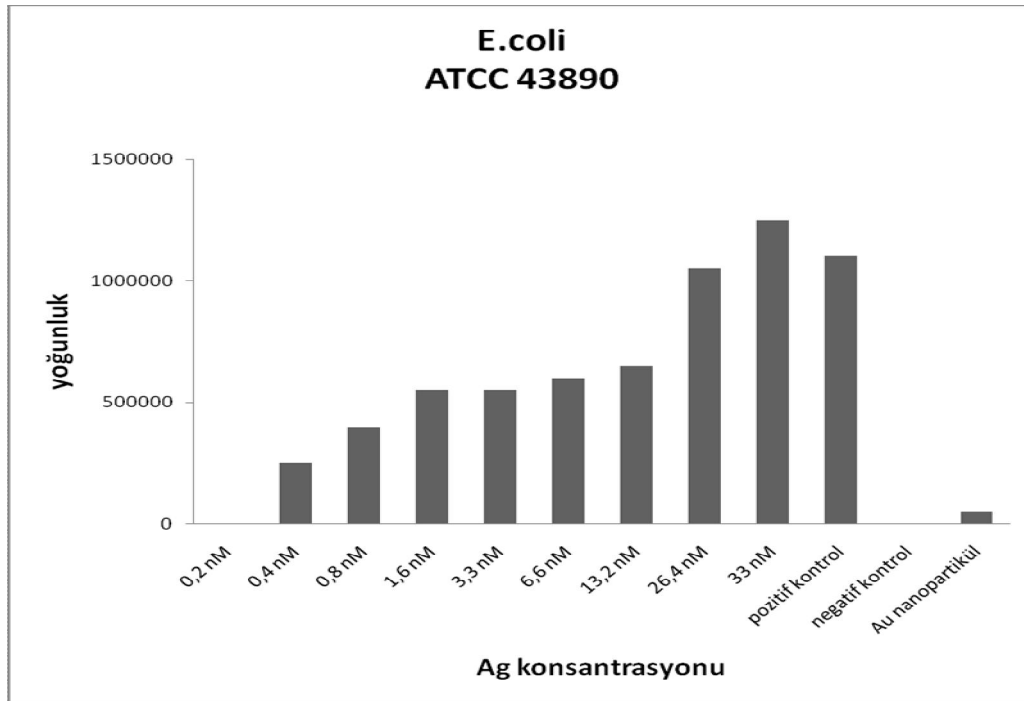
Altın nanotaneğin 30 nM 'de MIC testi yapılarak gümüşle başka metal nanotaneçiklerin bakteri testleri karşılaştırılması gösterilmiştir. Altının gümüşten daha az etki ettiği görülmektedir (Şekil 2-3, Şekil 2-4, Şekil 2-5) [14].

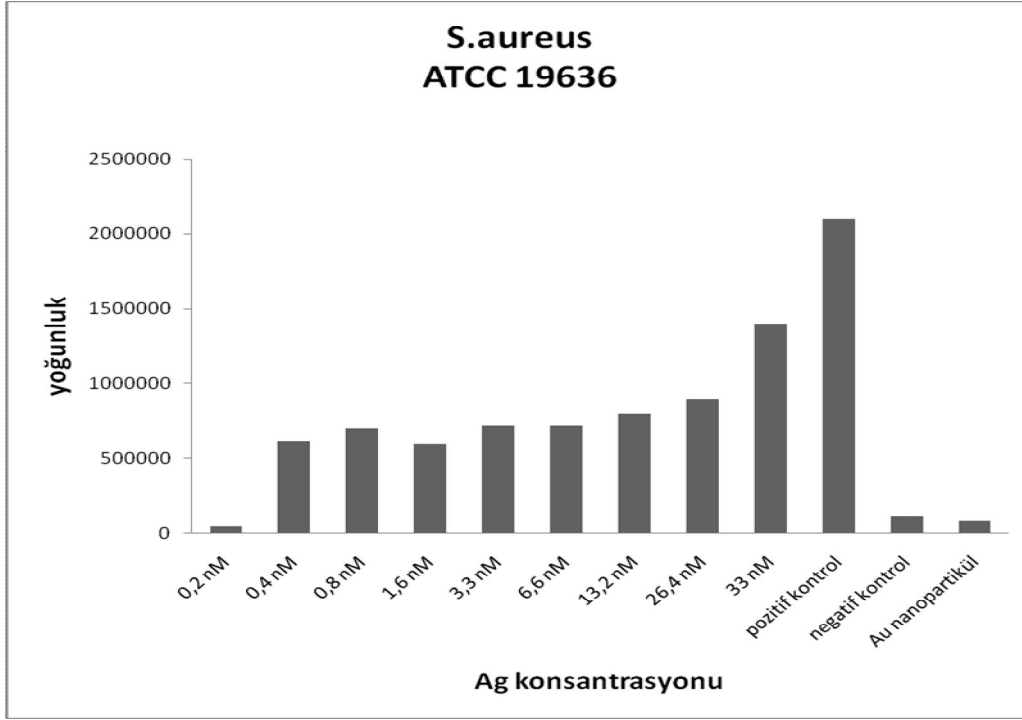


Şekil 2-3 Ag nanotaneğin yeast bakterisine karşı büyüme inhibisyon etkisi. ** Pozitif kontrolden önemli derecede farklı.

Tablo 2-2 Ag nanotaneçin MIC sonuçları

	MIC
Yeast (bovine mastitis)	>6,6 nM
E.coli (ATCC43890)	>3,3 nM
St.aureus (ATCC19636)	>33 nM

**Şekil 2-4** Ag nanotaneçin E.coli bakterisine karşı büyüme inhibisyon etkisi. *, ** Pozitif kontrolden önemli derecede farklı.



Şekil 2-5 Ag nanotaneceğin S.aureus bakterisine karşı büyüme inhibisyon etkisi. * Pozitif kontrolden önemli derecede farklı.

2.4 KİTOSAN- GÜMÜŞ NANOTANECİK

Murugadoss A.'nın 2007 'de yaptığı bir çalışmada metal nanotaneceğe bir polimer bağlanarak katalitik aktivite incelenmesi konu alınmıştır. Buna bağlı olarak gümüş nanotaneceğe çevreye dost bir polimer olan kitosan bağlanarak aktivitesi incelenmiştir. Tanecik boyutu 5nm den az bulunmuştur [15].

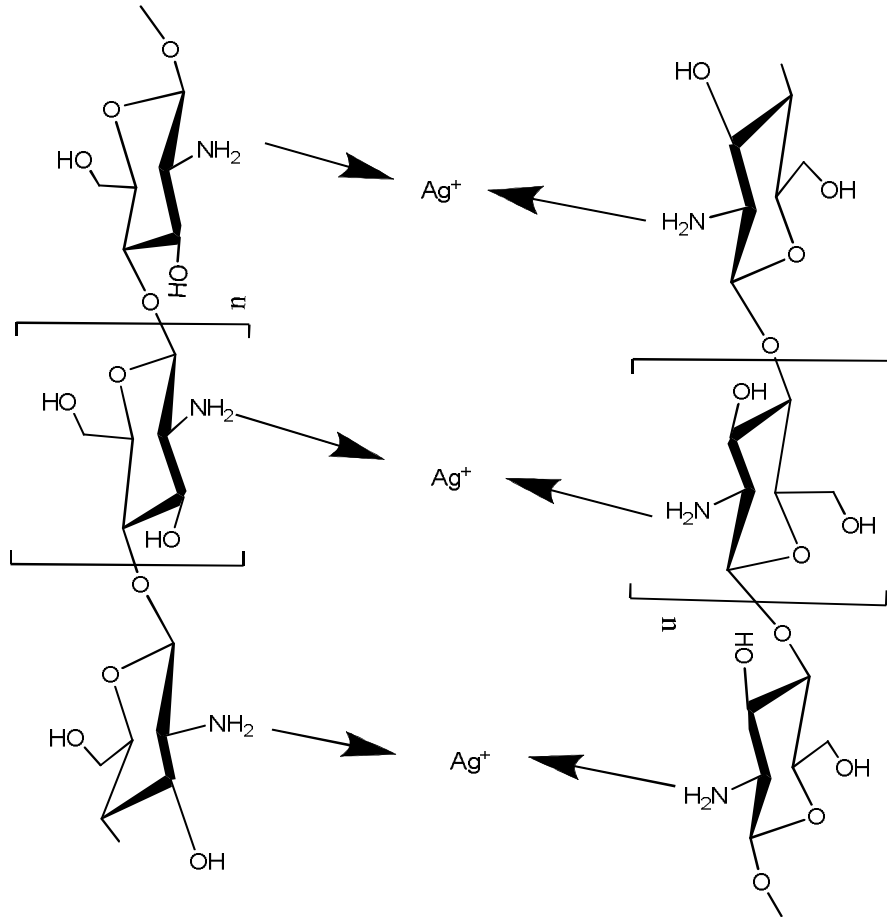
Kuo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre kitosan-gümüş nanotanecek, kitosan süspansiyonu kullanılarak hazırlanmıştır. Ortaya çıkan gümüş nanotaneceğin boyutu ve dağılımı kitosanın konsantrasyonuna bağlı olarak değişmiştir. Tanecik boyutları 10 ve 150 nm aralığında bulunmuştur [16].

Ali ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise sodyum tripolyfosfat ile kitosan nanotanecek ve buna gümüş iyonları eklenerek gümüş yüklü kitosan nanotanecek yapılmıştır. Bu çalışmada tanecik boyutları 115 nm ve 165 nm bulunmuştur. Tanecik boyutlarının büyük olması sebebi nanotanecek olarak kitosanın kullanılması ve gümüşün sonradan kompozite eklenmesidir. Gümüş- kitosan nanotaneceğin S. Aureus bakterisine karşı antibakteriyel aktivitesi incelendiğinde kitosanın tek başına olan antibakteriyel aktivitesinden 500 kez daha fazla etkili olduğu görülmüştür. Ayrıca gümüş bağlanmadan önceki kitosan nanotanecek ile gümüş bağlı kitosan nanotanecek karşılaştırıldığında ise gümüş bağlı kitosan nanotaneceğin kitosan nanotaneceğe göre daha fazla antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [17].

2.4.1 Kitosan – Gümüş Nanotanecik Bağlanma Mekanizması

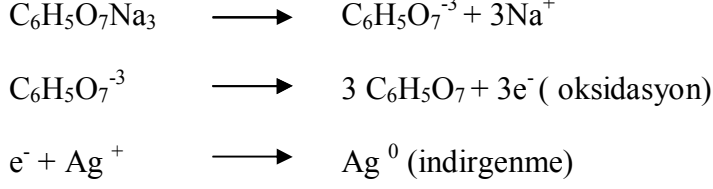
Kitosan yapısındaki NH_2 ve OH gruplarından dolayı metal iyonlarıyla mükemmel bir bağlanma gerçekleşmektedir. Böylece kitosanın önemli özelliklerinden biri ağır metal iyonlarıyla şelatlanabilmesidir. Azot elektronları ile amin grubuna metal iyonları bağlanarak bileşik oluşturur.

Kitosanın gümüş iyonlarıyla şelatlanması reaksiyonu Şekil 2-6'de gösterilmiştir. Aynı şekilde iki kitosan zincirindeki NH_2 gruplarına Ag iyonu bağlanmıştır. Gümüşün, aynı kitosan zincirinde olmayan NH_2 grubuna bağlanmasının sebebi kitosanın yapısal engellemesinden kaynaklanır. Kitosanın yapısal engellemesinin sebebi yarı sert polimer oluşudur. Gümüş iyonlarının sodyum hidroksit ile muamele edilmesi gümüşün indirgenmesine neden olur. Bu da nanotanecik oluşumuna yardımcı olur. Çapraz bağlanma reaksiyonu ile indirgenen gümüş iyonları kitosan zincirine bağlanır.(Şekil 2-6) [18].



Şekil 2-6 Kitosana gümüş iyonlarının bağlanması

İndirgenme reaksiyonu aşağıdaki gibidir:



Ag(I), tiyofosfat içeren ligantlarla koordinasyon kurmaktadır. Çünkü Ag(I) zayıf bir asit ve tiyofosfat içeren ligantlar da zayıf baz olduğu için asit baz reaksiyonu vermektedir [19].

2.4.2 Kitosan - Gümüş Nanotanecik Karakterizasyonu

2.4.2.1 Gümüş Nanotaneciğinin X-Işını Kırınım Deseni (X-Ray Diffraction) ile Karakterizasyonu

Ruparelia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sodyumborohidrat ile gümüş nitrat arasında stokiometrik reaksiyon ile elde edilen gümüş nanotaneciğın antimikrobiyal aktivitesi incelenmiştir. Bu çalışmaya göre gümüş nanotaneciğın karakterizasyonu için XRD kullanılmıştır. XRD 'de bulunan sonuçlar, Kırınım Verileri Uluslararası Merkezinin (ICDD) sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Buna göre gümüş nanotanecik 38.1, 44.3 , 64.4, 77.4, 81.5, 98.7, 110.9, 114.9 'da karakteristik pikler vermektedir. Bu piklere göre kiristal yüzü (111), (200), (220), (311), (222), (400), (331) ve (420) 'dir [20].

2.4.2.2 Kitosan-Gümüş Nanotaneciğinin XRD ile Karakterizasyonu

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre asetik asit içinde γ ışını kullanılarak ışınlama reaksiyonu ile elde edilen kitosan- gümüş nanotaneciğinin sentezi yapılmıştır. Elde edilen malzemenin karakterizasyonu için XRD incelemesi yapılmıştır. Buna göre kitosanın tek başına verdiği XRD deseninde sadece 20° de pik görülmüştür. Kitosan - gümüş nanotaneciği ise toplam 5 pik vermiştir. Buna göre 22,5 ta görülen pik kitosana ait olup diğer 4 pik (38.01, 41.01, 64.51 ve 77.21) gümüş nanotaneciğinin varlığını göstermektedir [21].

2.4.2.3 Kitosan-Gümüş Nanotaneciğinin Ultraviyole (UV) Spektrofotometre ile Karakterizasyonu

Chen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada asetik asit içinde γ ışını kullanılarak ışınlama reaksiyonu ile elde edilen kitosan - gümüş nanotaneciğinin karakterizasyonu için UV incelemesi yapılmıştır. Buna göre gümüş varlığından dolayı 432 nm, 426 nm, 464 nm lere maksimum absorpsiyon gözlemlenmiştir.

Kitosan gümüş nanotaneciğinin içindeki gümüş varlığı için 410 nm ve 420 nm arasında pik vermektedir [21].

Sanpui ve arkadaşları kitosan gümüş nanotanecik sentezlenip antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Bu çalışmada kitosan gümüş nanotaneciğinin karakterizasyonu için UV sonuçları incelenmiştir. Buna göre 410 nm civarında güçlü ve dar tek bir pik verdiği gözlemlenmiştir. Bu da gümüş nanotaneciğinin karakteristik pikidir [2].

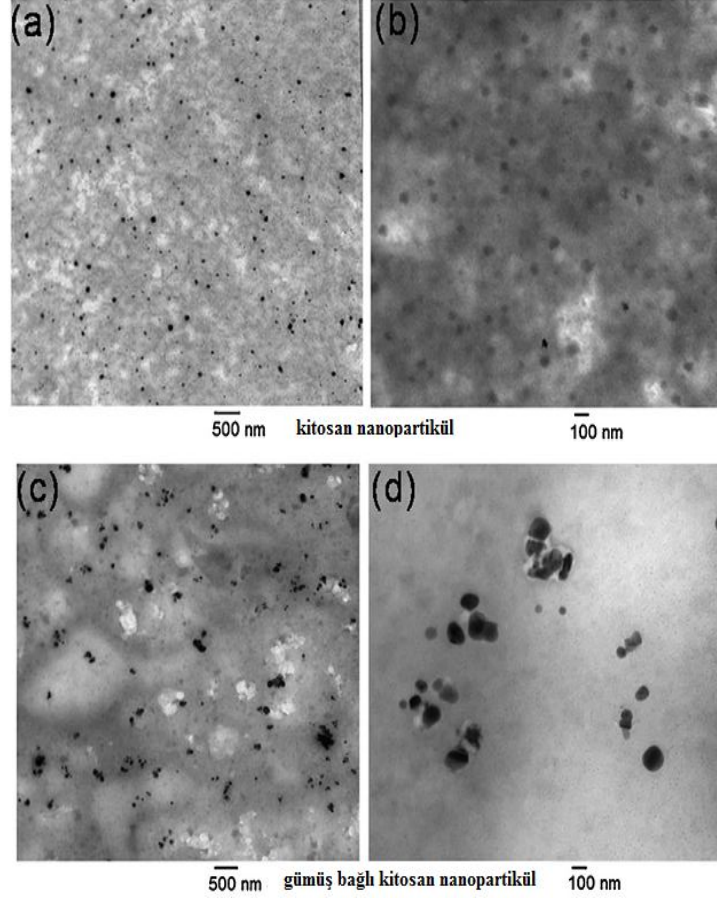
2.4.2.4 Kitosan-Gümüş Nanotaneciğinin Infrared (FTIR) Spektrofotometre ile Karakterizasyonu

İyonik jelleştirme metodu ile kitosana sodyum tripolifosfat eklenerek nanotanecik oluşturulup gümüş eklenerek gümüş- kitosan nanotanecik elde edilmiştir. Bu çalışmada gümüş- kitosan nanotanecik karakterizasyonu için IR grafiği incelenmiştir. Bu grafiğe göre 3424 cm^{-1} 'de görülen pikler kitosandaki NH_2 ve OH gruplarının titreşiminden kaynaklanmaktadır.

Kitosanın tek başına iken bakılan IR sonuçlarına göre amin grubunun karakteristik piki olan $1635,05\text{ cm}^{-1}$ 'de kuvvetli bir pik verdiği gözlemlenmiştir. Buna göre gümüş bağlı kitosanın grafiğinde gümüş iyonunun amin grubuna bağlanmasından dolayı daha erken pik verdiği gözlemlenmiştir ($1633,59\text{ cm}^{-1}$).

Ayrıca gümüşün O ve N gruplarına bağlanmasıyla kitosanın $1635,05\text{ cm}^{-1}$ 'de verdiği pik ikiye bölünerek $1633,59$ ve $1573,94\text{ cm}^{-1}$ 'de olmak üzere iki pik vermektedir. 1000 cm^{-1} ve 1350 cm^{-1} 'de C ve N bağlarını gösteren pikler kitosanda gümüş bağlı kitosan nanotaneciği göre daha çöktür. Buda oluşan kompleksten kaynaklanmaktadır [17].

2.4.2.5 *Kitosan-Gümüş Nanotaneciğinin Geçirgenli Elektron Mikroskopisi (TEM) ile Karakterizasyonu*

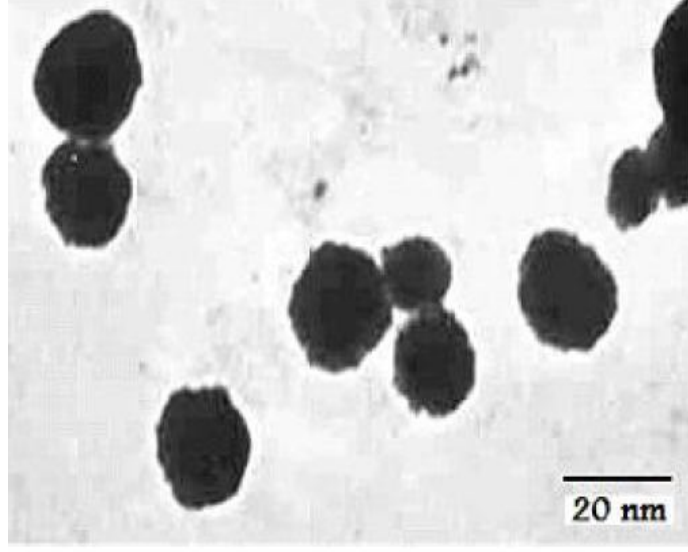


Şekil 2-7 (a ve b) kitosan nanotanecik , (c ve d) gümüş bağı kitosan nanotaneciğın TEM görüntüleri

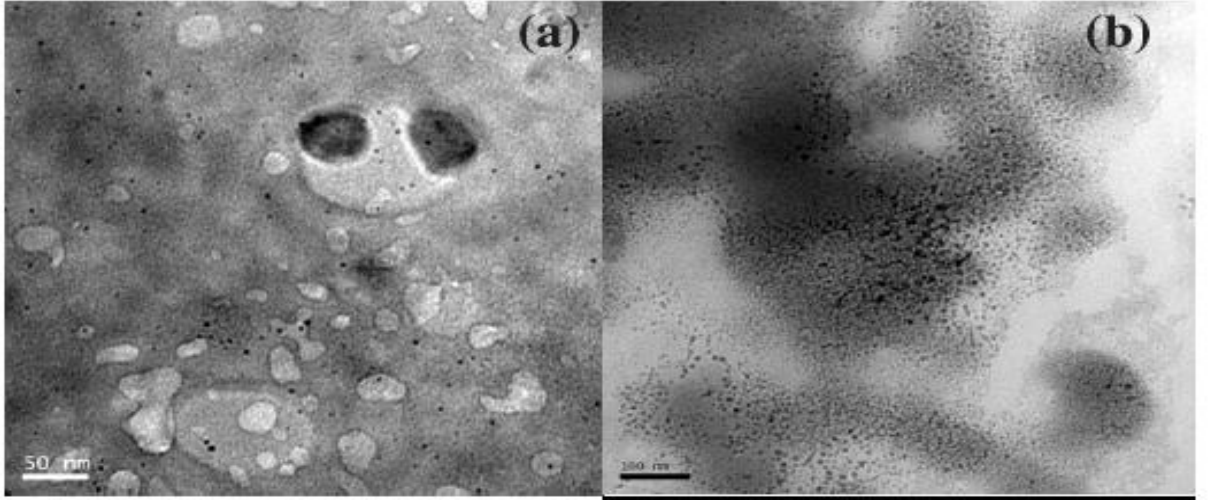
Şekil 2-7(a ve b) de kitosan nanotaneciğinin TEM görüntüleri bulunmaktadır. Buna göre küresel şekilde ve boyutlarının da 50 nm ile 120 nm arasında olduğu görülmektedir. Taneciklerin dağılımı düzenlidir. Diğer yandan gümüş bağı kitosan nanotanecik 100 nm ile 150 nm arasındadır ve belli bölgelere toplanmışlardır [17].

Şekil 2-8 'de gümüş nanotaneciğın TEM görüntüleri bulunmaktadır. Buna göre gümüş nanotanecikler küreseldir ve ortalama 16 nm civarındadır [22].

Şekil 2-9 'de 0.2 M AgNO_3 içeren kitosan gümüş nanotanecik çalışmasında incelenen TEM görüntülerine göre gümüş nanotanecik boyutunun ortalama 5 nm den küçük olduğu görülmektedir [15].



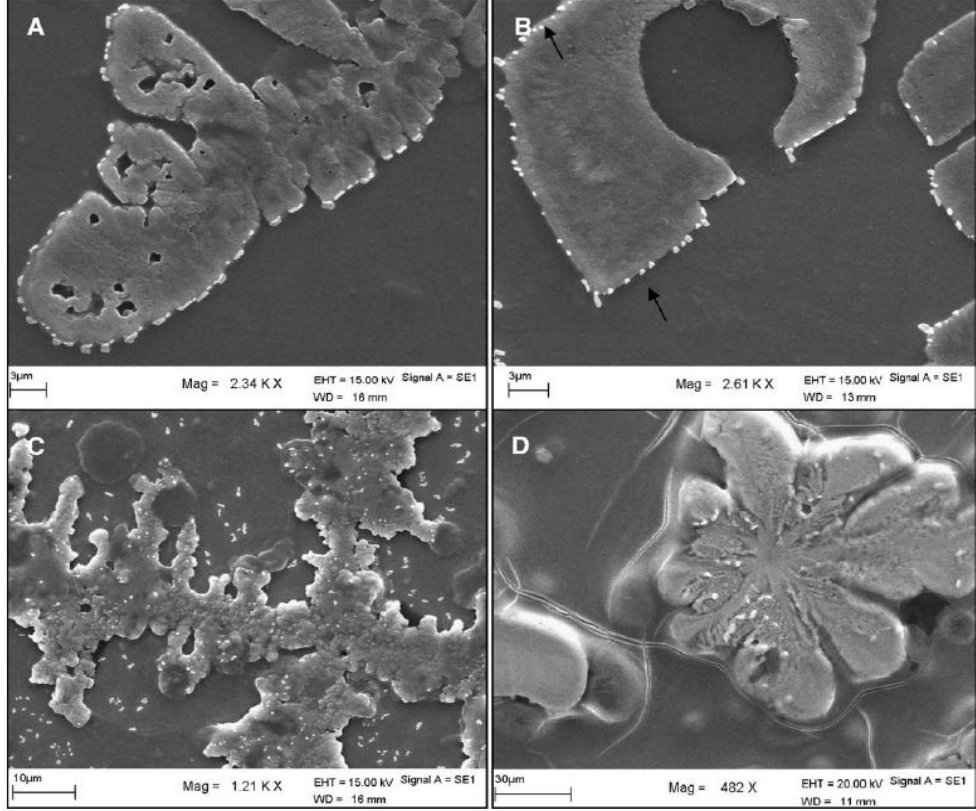
Şekil 2-8 Gümüş nanotanecek TEM görüntüleri



Şekil 2-9 0.2 M AgNO₃ içeren kitosan gümüş nanotanecek TEM görüntüleri

2.4.3 Kitosan-Gümüş Nanotanecığının Antimikrobiyal Aktivitesi

Gümüş nanotaneciklerin antimikrobiyal aktivite mekanizması, nanotanecığın hücre membranı içine dahil olarak hücrenin ölümüne sebep olmasıyla açıklanmaktadır [23,24].



Şekil 2-10 Taramalı elektron mikroskopisi ile bakteri üzerine kitosan- Ag nanotanecik etkisi A: 30 dakika B: 60 dakika C: 90 dakika ve D: 90 dakika sonra sadece kitosanın bakteriyeye etkisi görüntüleri [2].

SEM görüntüsüne göre kompozit ile muamele edilen bakterinin uygulamadan hemen sonra kompozite hemen bağlandığı görülmektedir (Şekil 2-9A). 60 dakika sonra bağlanan bu bakterilerin parçalara ayrıldığı görülüyor (Şekil 2-9B). 90 dakika içinde bakterilerin çoğu parçalara ayrılmaktadır (Şekil 2-9C). Kitosanın tek başına kullanımında polimere bağlanan bakteri sayısının kompozite bağlanan bakteri sayısından az olduğu görülüyor (Şekil 2-9D).

2.5 BAKTERİLER

Çalışmamızda kullanacağımız bakteriler ile ilgili birkaç önemli bilgi Tablo 2.3. te gösterilmiştir. Kullanılacak bakteri seçimlerinde üç adet gram negatif ve üç adet gram pozitif bakteri kullanılacak olup hücre duvarı yapılarından kaynaklanan bu özelliklerini de esas alarak MIC testleri yapılmıştır.

2.5.1 Escherichia Coli

Escherichia coli ilk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından bir çocuğun dışkılarından izole edilmiş ve önce Bacterium coli commune olarak, daha sonra Escherichia coli olarak adlandırılmıştır. Gram negatif bir bakteridir. Bugün üzerinde en çok çalışılan ve genetik yapısı en iyi bilinen canlı türüdür.

E.coli'nin doğada bulunduğu tek yer sıcak kanlı hayvanlar olarak bilinen memeli ve kanatlı hayvanların bağırsak sistemleri ve bunların dışkılarıdır. Dolayısıyla bir gıda maddesinde, içme ya da kullanma suyunda E.coli'ye rastlanması o örneğe doğrudan ya da lağım suyu aracılığı ile dışkı bulaştığının göstergesidir.

E. coli cinslerinin hastalığa neden olabilme özellikleri şunlara bağlıdır;

- Toksin yaratabilme kabiliyetleri.
- Bağırsak duvarlarını işgal ederek geçebilme kabiliyeti ve başka organlarda enfeksiyonlara neden olabilmek.
- Güvercinlerin fiziksel savunma sistemlerine üstünlük sağlayabilme kabiliyeti [26].

2.5.2 Acinetobacter Baumannii

Acinetobacter baumannii, yağ ve suda bulunarak önce Acinetobacter calcoaceticus olarak isimlendirilmiştir. İlk 1911 yılında M.W. Beijerinck tarafından yağda keşfedilmiştir [27].

Doğada yaygın olarak bulunurlar. İnsanda deri florasında yer aldıklarından klinik örneklerden izole edilebilirler. Zaman zaman fırsatçı patojen bakteri olarak enfeksiyon yaparlar. A.baumannii hastanede ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde nozokomiyal hastalıklara sebep olmaktadır. Pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit ve endokarditte etken olarak izole edilmektedirler.

Acinetobacter türleri sağlıklı erişkinlerin %25'inde deride kolonize olan fırsatçı patojenler olup hastane personelinin ciltlerinden en sık izole edilen gram negatif organizmalardır. Bu türler sıklıkla balgam, idrar ve dışkıda ürerler [28].

A.baumannii pek çok antibiyotiğe karşı direnç gösterdiğinden ve yeni antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirebilmesinden ötürü tedavide zorluk çıkarmaktadır [29].

2.5.3 *Staphylococcus Aureus*

S. Aureus mikroskobik olarak incelendiğinde çift, kısa zincirli ve üzüm gibi salkım halinde olduğu gözlenen, kok şeklinde gram pozitif bir bakteridir. Bazı suşları insanlarda hastalığa neden olan yüksek ısıya dayanıklı protein toksinleri üretme eğilimindedir.

S. Aureus başta ısıl işlem olmak üzere mikroorganizmaların indirgenmesine yönelik tüm uygulamalara karşı yüksek duyarlılık gösterir. Dolayısıyla gıdalarda ve proses ekipmanında bu bakteriye rastlanması zayıf bir sanitasyon örneğidir. Son yıllarda tavşan, sığır, domuz etleri, süt, krema ve beyaz peynir başta olmak üzere çeşitli gıdalara ilişkin gıda zehirlenmeleri giderek artmasının sebebi de budur[30].

Bu bakterinin gıda zehirlenmesinden başka enfeksiyonları deri ve mukozada oluşan enfeksiyonlardır. Bunlar; abseler, sivilce, sakal ve kıl kökü iltihabı, kan çıbanı, dolama, ter bezi iltihabı, göz kapağı iltihabı, bademciklerin iltihaplanması ve farenjitler sayılabilir.

Staphylococcus Aureus antibiyotiklere karşı çoğul direnç gösterse de, dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdır. Düşük seviyeli dezenfeksiyon amacıyla kullanılan kuarterner amonyum klorür bileşikleriyle etkin bir şekilde dezenfekte edilebilirler [31].

2.5.4 *Enterococcus Faecalis*

Andrew ve Harder tarafından 1906 yılında yapılan eski sınıflandırmada *Streptococcus faecalis* ve *Streptococcus faecium* türleri, 1984 'den sonra yapılan çalışmalarla yeni sınıflandırmada Lancefield D grubunda yer almakta olup *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium* olarak adlandırılmıştır.

Enterokoklar hemen her zaman, her yerde bulunabilen mikroorganizmalardır. Bir çok gıda türünde, özellikle süt ürünlerinde sık rastlanan bir bakteri grubudur.

E. faecalis bakterilerine insan ve memeli hayvanların dışkı dışında toprak, su, bitki ve böcek gibi bir çok çevrede de rastlanmaktadır. Bu nedenle gıdalarda enterokokların bulunması, gıdanın dışkı ile doğrudan kontamine olduğu anlamına gelmez.

Enterokoklar gram pozitif, birkaç istisna dışında hareketsiz, aerobik veya fakültatif anaerob, katalaz negatif, oval kok formunda, genellikle diplokok veya kısa zincir görünümündedirler. Gram negatif bakterilere kıyasla, beslenme gereksinimleri daha seçicidirler ve bu özellikleriyle bir çok gram pozitif bakteriden ayrılırlar. Örneğin, gelişebilmeleri için B vitaminleri ve bazı temel aminoasitler açısından pek çok gram pozitif bakteriden çok daha fazla oranda besin maddesine ihtiyaç duyarlar.

Enterokoklar insan dışkısında genellikle E. coli 'den daha az sayıda bulunur ve suda iyi üreyemezler. "Klasik enterokok" lar gıda endüstrisinde kullanılan ısıtma, kurutma, dondurma gibi işlemler ile temizlik ve dezenfeksiyon maddelerine karşı nispeten dirençlidirler [32].

2.5.5 Pseudomonas Aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa, sporsuz, kapsülsüz, gram negatif, çiftli veya kısa zincirler halinde görülen bakterilerdir. Genellikle 30 – 37 °C'lerde ürer. Yüzeyde zar yaparak yoğun ve homojen bir üreme gösterir ve zarın hemen altında mavi yeşil pigmenti belirir.

Doğada yaygın olarak bulunabilen bir bakteri olduğu için, organik maddeler içinde, sularda uzun süre canlı kalabilirler. İnsan ve memeli hayvanların bağırsağında flora elemanı olarak bulunur. Yüksek ısı ve kuruluğa dirençsizdirler. Hastane ortamları organik madde (kan, irin, deri döküntüleri) yönünden zengin olduğu için ve direnç gösteren kökenlerin bu ortamlarda daha fazla oluşması nedeniyle sık rastlanılan bir patojen olarak görülür.

Pseudomonas'lar; idrar yolu, göz, dış kulak, orta kulak, yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkopnömoni, septisemi, osteomyelit, psödomembranöz kolit gibi hastalıklardan izole edilebilirler [33], [34], [35] .

2.5.6 Streptococcus Pneumoniae

Pnömokok, vücudun farklı bölgelerinde ciddi enfeksiyon hastalıklarına neden olan bir bakteri türüdür. Latince adı; Streptococcus pneumoniae şeklindedir. Pnömokoklar gram-pozitifler. Oval veya yuvarlak 0.5-1.25 mm boyutlarında tipik olarak ikili bazen tek veya kısa düz zincirler halinde bulunurlar. . Bakteriler 600 °C sıcaklığa 30 dakika dayanırlar .

Dünyada her 30 saniyede bir çocuk, pnömokok mikrobuunun yol açtığı hastalıklar nedeniyle yaşamını yitirmektedir.

Özellikle bebekler ve küçük çocuklarda ölümcül olabilen ya da kalıcı hasarlara yol açan hastalıklara neden olan pnömokok; menenjit, zatürre, orta kulak iltihabı, sinüzit ve kan iltihabı gibi hastalıklara neden olur.

Üst solunum yollarında pnömokok bulunan çocuklar, bu bakteriyi başka çocuklara da bulaştırabilir. Bulaşma genellikle; öksürük, yıkanmamış ellere dokunmak ya da öpüşmek gibi doğrudan temas gibi yollarla olur. Ayrıca yaşlılar ve akciğer, kalp, şeker hastalığı gibi altta yatan hastalıkları olan kişilerde de pnömokok tahribatları görülmektedir.

Pnömonokların en çok neden olduğu hastalık olan zatürrenin dünyada ve Türkiye'de en sık görülen ve en fazla ölüme neden olan hastalıklardan olduğu ve Türkiye'de beşinci sıradaki ölüm nedeni olduğu belirlenmiştir [36].

Tablo 2-3 Kullanılan bakteriler ve özellikleri

BAKTERİLER	HÜCRE DUVARLARINA GÖRE	ÖZELLİKLER
Escherichia Coli	Gram negatif	Toksin yaratır Bağırsak duvarlarından geçer Organlarda enfeksiyon yapar Güvercin bağışıklığını azaltır
Acinetobacter Baumannii	Gram negatif	Deri hastalıklarına neden olur. Balgam, idrar ve dışkıda bulunur. Solunum yolları enfeksiyonu, idrar yolu enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, bakteriyemi, menenjit gibi hastalıklara neden olur.
Staphylococcus Aureus	Gram pozitif	Gıda zehirlenmesine sebep olur. Abseler, sivilce, sakal ve kıl kökü iltihabı, kan çıbanı, dolama, ter bezi iltihabı, göz kapağı iltihabı, bademciklerin iltihaplanması ve farenjitler gibi hastalıklara neden olur.
Enterococcus Faecalis	Gram pozitif	Dışkıda bulunurlar. Toprak, su, bitki ve böcek gibi bir çok çevrede de bulunurlar.
Pseudomonas Aeruginosa	Gram negatif	İdrar yolu, göz, dış kulak, orta kulak, yanık ve yara enfeksiyonları, menenjit, bronşit ve bronkopnömoni, septisemi, osteomyelit, psödomembranoz kolit gibi hastalıklara neden olur.
Streptococcus Pneumoniae	Gram pozitif	Özellikle bebekler ve küçük çocuklarda ölümcül olabilen ya da kalıcı hasarlara yol açan hastalıklara neden olan pnömokok; menenjit, zatürre, orta kulak iltihabı, sinüzit ve kan iltihabı gibi hastalıklara neden olur.

2.6 BAKTERİ TESTLERİ

2.6.1 Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, MİK (Minimum Inhibitory Concentration, MIC)

Antimikrobiyal malzemeye karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir. Genel olarak laboratuvarlarda uygulanan testlerle mazlemelerin inhibitör (bakteriyostatik) aktivitesi değerlendirilir. Bu amaçla uygulanan yöntemler:

1. Katı veya sıvı besiyerlerinde seyreltme (dilüsyon) yöntemleri
2. Disk difüzyon yöntemi
3. Gradyent difüzyon (Etest) yöntemi
4. Antimikrobik ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması olarak sıralanabilir.

Seyreltme yöntemlerinde standart sayıda bakteri topluluğu (inokulum), iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda antimikrobik ajan ile karşılaştırılır. İnkübasyon süresi sonunda gözle görünür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobik malzeme yoğunluğu saptanır. Buna Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) denir ve (mg/L) şeklinde ifade edilir. Seyreltme temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdiği için daha çok tercih edilmektedir. Sıvı besiyerindeki seyreltme yöntemleri, tüpte uygulanıyorsa makro (tüp) dilüsyon, mikrodilüsyon plaklarında uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak adlandırılır.

Disk difüzyon yönteminde belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test mikroorganizmasından hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Böylelikle, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı ölçülerek “duyarlı”, “orta” ve “dirençli” olacak şekilde duyarlılık kategorileri belirlenir. Bu kategoriler ile ilgili sınır değerleri, her antimikrobik ajan için MİK ile korele edilerek ve erişilebilir serum düzeyleri göz önüne alınarak saptanır.

Etest: Difüzyon temeline dayanan ancak diskler yerine belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde antibiyotik içeren plastik striplerin kullanıldığı bir yöntemdir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stripi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir. Bu yöntem özellikle *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakteri türlerinin MİK değerlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Enzim üretiminin saptanması: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *N. gonorrhoeae* gibi türlerde nitrofenin ile b-laktamaz aktivitesinin saptanması ya da *H. influenzae* izolatlarında kloramfenikol asetil transferaz enzimi aktivitesinin biyokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, antibiyotik direncinin klasik yöntemlere kıyasla daha hızlı saptanabilmesini sağlamaktadır.

Bakteriyostatik aktiviteyi gösteren testler dışında bakterisidal aktiviteyi gösteren testler de bulunmaktadır.

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarının tekrarlanabilir olması, yani aynı koşullarda tekrarlandığında sonuçların aynı veya birbirine yakın olması gereklidir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları birçok faktörden etkilenebilmektedir. Bu nedenle testlerin uygun koşullarda yapılıp yapılmadığı kalite kontrol suşları ile denetlenir. Kalite kontrol suşları, sonuçlarının tekrarlanabilirliği %95'in üzerinde olan suşlardır. Bu suşlarla beklenen sonuçlar elde edilemezse antibiyotik duyarlılık testlerinin tekrarlanması gerekir [37].

3 MALZEME VE YÖNTEM

3.1 MALZEMELER

3.1.1 Kimyasal Malzemeler

- Kitosan (C3646.100 Sigma Aldrich) Kitosan iki kere asetat solusyonu ile saflaştırılır. Bu solusyon filtre edilir, kitosan sulu sodyum hidroksit ile çöktürülür ve çökelti oda sıcaklığında vacuumda kurutulur. Elemental analiz ile hesaplanan asetilasyon derecesi %85 olarak bulunur ve kitosanın ortalama moleküler ağırlığı 220 kDa viskozimetrik metodla hesaplanır [9]. Çalışmada kullandığımız deasetile edilmiş olan kitosanı hazır olarak alınmıştır.
- Gümüş nitrat solusyonu (Sigma Aldrich)
- Asetik asit (Sigma Aldrich)
- Sodyum hidroksit (Merck pro analysis)

3.1.2 Bakteri ve Besi Yerleri

- Escherichia coli
(ATCC 25922)
- Acinetobacter baumannii
(ATCC 19606)
- Staphylococcus aureus
(ATCC 25923)
- Enterococcus faecalis
(ATCC 29212)
- Pseudomonas aeruginosa
(ATCC 27853)
- Streptococcus pneumoniae
(ATCC 49619)
- Muller Hinton Broth
(Merck microbiology)
- Crome agar
(Himedia)
- Koyun kanlı agar
(Biopen Blood agar %5 koyun kanlı)

3.1.3 Cihazlar

- Nanotanecik karıştırıcı (Micra D-1, karıştırma hızı: 5000- 35000 rpm, karıştırma hacmi: 0.1’den 500 ml’ye kadar)
- Otoklav (Prior Clave)
- UV Spektrofotometre (Hp Hewlett packard, model: 8453)
- XRD (X-Ray Diffraction, X-ışını Kırınımı)(Rigaku D/Max-2200/PC XRD Cihazı)
- TEM (Transmission electron microscopy, Geçirgenli elektron mikroskopisi) ((Gatan Model 694 Slow Scan CCD Camera, TUBİTAK)
- FT-IR Spektrofotometre (Perkin Elmer Spectrum One FT-IR Spectrometer, ATR Ünitesi kullanıldı)

3.2 YÖNTEM

3.2.1 Kitosan-Ag Nanotanecik Hazırlanışı

3.2.1.1 *Farklı Gümüş Konsantrasyonlarında Kitosan-Ag Nanotanecik Hazırlanışı*

Gümüş nanotanecik oranları değiştirilerek 3 farklı kitosan- Ag nanotanecik hazırlanarak gümüşün farklı konsantrasyonlarındaki varlığının antibakteriyel etkisi incelenmiştir.

Birinci örnek hazırlarken 0.1 gr kitosan 50 ml destile su içinde çözülerek 93- 95 °C de nanotanecik karıştırıcıda 18000 devir /dakika sabit hızla karıştırılırken taze hazırlanmış 1 ml 20 mmol gümüş nitrat çözeltisi ve sonra 100 µl 0.3 M NaOH çözeltisi karışıma eklenir. NaOH eklendikten yaklaşık 1 dakika sonra gümüş nanotanecik varlığından dolayı sarı renk ortaya çıkar. Reaksiyona 10 dakika sonra son verilir. pH 10.4 de ayarlanmalıdır. Çökelti filtre edilir ve suyla yıkanır. Filtre edilen çökelti kurutulur [2], [15].

İkinci örnek için birinci örneğin hazırlanışı ile aynıdır. Fakat gümüş miktarı 1 ml 40 mmol gümüş nitrat çözeltisi olarak değiştirilerek hazırlanır.

Üçüncü örnek ise 1 ml 60 mmol gümüş nitrat çözeltisi kullanılarak hazırlanır.

Süzüntüde Ag iyonlarının var olup olmadığını test etmek için HCl asit ile muamele edilip çökelti oluşumu gözlenir.

20 mmol , 40 mmol ve 60 mmol AgNO₃ ile hazırlanan nanotaneçiklerden destile su ile 800 ppm solusyon hazırlanır. Tüp dilüsyon yöntemi kullanarak yapılacak olan bakteri testi ile örneklerin MIC konsantrasyonları hesaplanır.

Ayrıca kitosanın %0.1 lik asetik asit içinde çözümlenerek hazırlanan 800 ppm solusyonu ile %0,1 lik asetik asit çözeltilisinin de bu üç farklı konsantrasyondaki örneklerle karşılaştırılabilmesi açısından bakteri testi yapılır.

3.2.1.2 Kitosan- Ag Nanotaneçik Oluşumunda Sıcaklık Etkisi

Kitosan- gümüş nanotaneçik oluşumunda sıcaklığın etkisinin incelenmesi amacıyla 0,1 gr kitosan 50 ml destile su içinde solusyon hazırlanır. 50 °C, 75 °C ve 95 °C’de 18000 devir/dk hızla karıştırılır. Taze hazırlanmış 20 mmol AgNO₃’tan 1 ml, ardından 0,3 M NaOH ‘den 100 µL eklenir. 10 dk reaksiyon sürdürülür.

3.2.2 Kitosan – Ag Nanotaneçiğinin Karakterize Edilmesi

TEM, UV, XRD, FT-IR cihazları kullanılarak Kitosan-Ag Nanotaneçiğinin karakterizasyonu yapılmıştır.

3.2.2.1 TEM ile Karakterizasyon

Bakırla kaplanmış karbon yataklı TEM ızgarasına (200 delikli) üzerine etanolde çözülen örnekten küçük bir damla damlatılır. TEM ölçümleri 200 kV da, JEOL JEM 2100 HRTEM de gerçekleştirilmiştir (LaB₆ filaman).(TÜBİTAK)

3.2.2.2 UV ile Karakterizasyon

Kitosan- gümüş nanotaneçik. içerisindeki gümüşün varlığı 190-1100 nm dalga boyu aralığında ölçüm yapılabilen, HP-8473 model UV Spektrofotometresi kullanılarak incelenmiştir. Spektrum sonuçlarına göre maksimum absorbansın 413 nm olduğu görülmüştür.

3.2.2.3 XRD ile Karakterizasyon

İstanbul Üniversitesi İleri Analizler Laboratuvarı (İAL)’nda Rigaku D/Max-2200/PC XRD Cihazı kullanılmaktadır. Cu kaynaklı (Cu / 40 kV, 20 mA) X ışını tüpü ve tüpün ani sıcaklık değişimlerini kontrol eden su soğutucusuna (Thermo NESLAB, M 100)

sahip olan cihazda monokromatize X-Işını elde edilmesini sağlayan Grafit Monokromatör kullanılmaktadır. Örnekler 2θ 10-80 ° arası Cu Kα ışınımı (1.5404 Å) ile çekilmiştir.

3.2.2.4 *FT-IR ile Karakterizasyon*

Örneklerin FTIR analizleri Perkin Elmer Marka spectrum one FTIR Spektrometresi'nin ATR ünitesi kullanılarak 650-4000 cm⁻¹ dalga sayıları arasında yapılmıştır.

3.2.3 **Kitosan-Ag Nanotaneciğinin Bakterisit Aktivitesi**

Bileşiğin bakteri üzerindeki minimal inhibitör konsantrasyonu(MIC) ile bileşiğin uygulandığı bakterinin büyüme ve gelişme hızı takip edilir [2].

Hazırlanan farklı gümüş konsantrasyonlarındaki üç örnek ve yalnız kitosan olmak üzere 4 örnek için ayrı ayrı bakterisit aktivite incelenmiştir. 6 çeşit bakteri için bu deneme yapılmıştır. Bakterisit aktivite incelenmesi için Broth Dilüsyon Yöntemi kullanılmıştır.

3.2.3.1 *Broth Dilüsyon Yöntemi*

Müller hinton broth'u litrede 21 gr broth olacak şekilde destile suda çözülür. Çözüldükten tüplere 1 cc alınır. Tüplerin ağzı kalaycı pamuğu ile kapatılarak metal tüplüğe yerleştirilip 120 °'de 15 dk. otoklavlanır.

% 0.1 lik asetik asit çözeltisinde hazırlanan % 0.2 lik örnek çözeltilerinden müller hinton broth bulunan tüplere her örnek için 4 farklı konsantrasyon olacak şekilde konulur. Bu işlem her bakteri için ayrı olacağından bir örnek için her bir konsantrasyondan 6 adet hazırlanır.

Diğer taraftan 24 saat öncesinde taze bakteri ekilerek 37°C'de çoğalması için 1 gece bekletilir. Önceden sterilize edilmiş cam tüplere yarısına kadar tuzlu su konulur. Ekilen bakterilerden öze ile alınarak bek alevinden geçirilen tüplerin içine özeden bakteri tamamen ayrılana dek sürtülür ve karıştırılır.

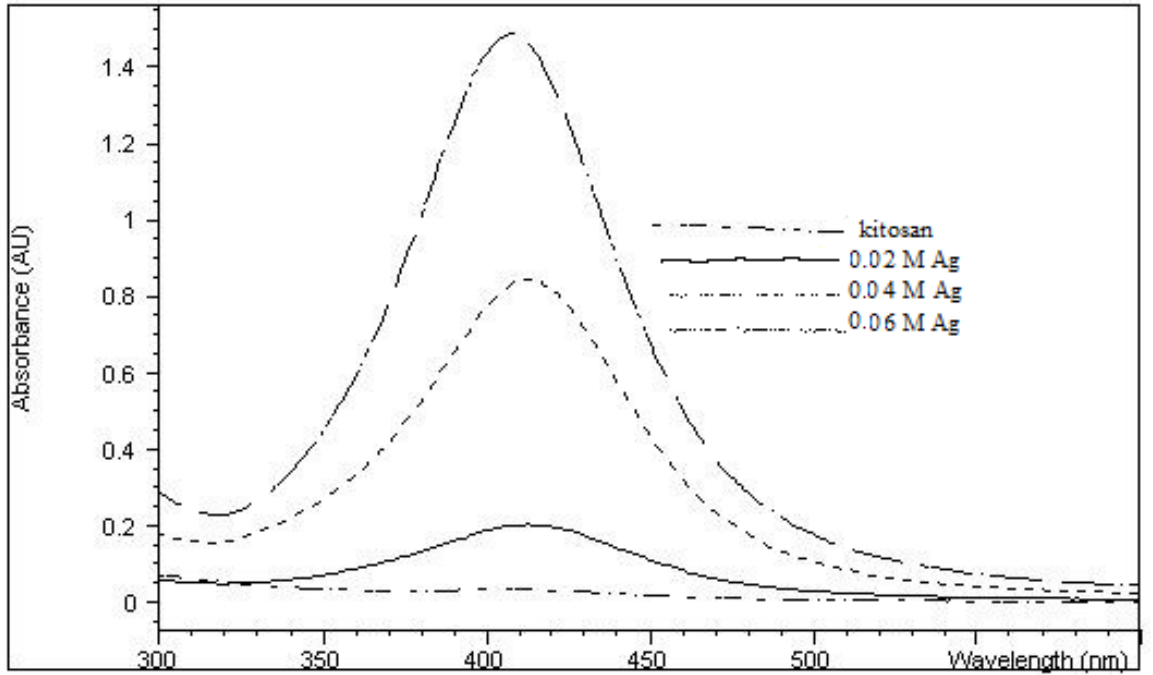
Hazırlanan farklı konsantrasyonlardaki örnekler için her bakteriden 1 cc alınarak örnek tüplerin içine konulur. İyiye karıştırılıp 37°C'de 1 gece bekletilir.

Ertesi gün crome agar petripleri ortadan çizilerek her petriye iki ayrı konsantrasyon olacak şekilde tüplerden öze yardımıyla alınıp ekilir. Bir gün sonra her bir örneğin hangi bakteride hangi konsantrasyonda üreyip üremediği incelenir.

4 BULGULAR

4.1 KİTOSAN –AG NANOTANECİK KARAKTERİZASYONU

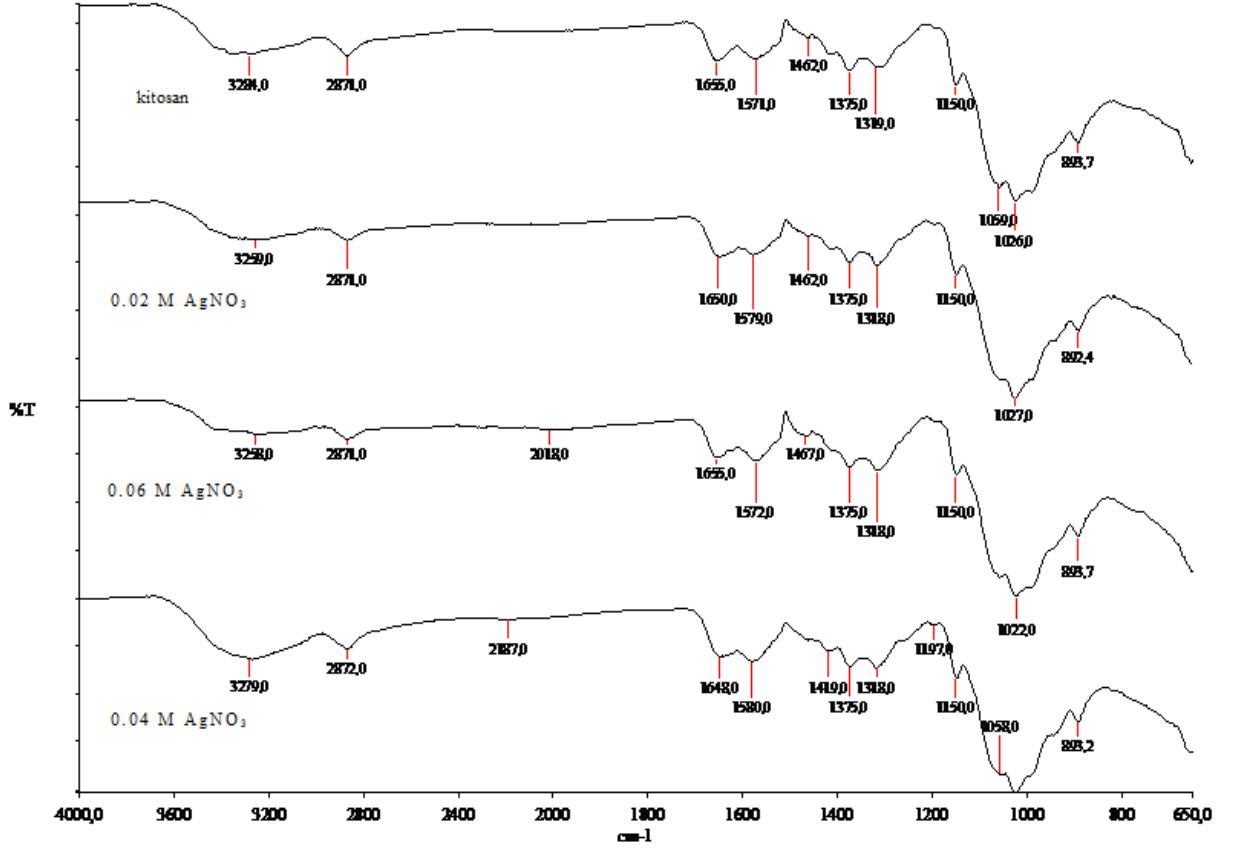
4.1.1 UV ile Karakterizasyonu



Şekil 4-1 Kitosan ve 0.02 M AgNO₃, 0.04 M AgNO₃, 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan– Ag nanotaneciğinin UV grafiği

0.02 M, 0.04 M ve 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan gümüş nanotaneciğinin Şekil 4-1'deki UV grafiğine göre 413 nm maksimum absorbans verdiği görülmektedir. 413 nm 'deki kitosanın UV sonucunda pik vermediği görülmektedir. 410 ve 420 nm arasındaki maksimum absorbanslar gümüş varlığını ispatlamaktadır ve ayrıca gümüş konsantrasyonu arttıkça absorbansının da yükseldiği sonucu görülmektedir.

4.1.2 FT-IR ile Karakterizasyonu



Şekil 4-2 Kitosan ve 0.02 M AgNO₃, 0.04 M AgNO₃, 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan– Ag nanotaneçığının FT-IR grafiğı

Kitosandaki amin grubundan kaynaklanan 1655 cm⁻¹ 'de pik görülmektedir. 0.02 M, 0.04 M ve 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan gümüş nanotaneçiklerde ise gümüş varlığından dolayı 1650 ve 1648 cm⁻¹ 'de erken pikler verdiği görülmektedir.

Ayrıca 1000 cm⁻¹ ve 1350 cm⁻¹ arasında C ve N azot bağlarını gösteren pikler vardır. Bu pikler kitosanda 0.02 M, 0.04 M ve 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan gümüş nanotaneçiğe göre daha çoktur. Bu da oluşan kompleksten kaynaklanmaktadır [17].

4.1.3 XRD ile Karakterizasyonu

Kitosan-gümüş nantanecekün XRD kırınım desenlerinden (Şekil 4-3) elde edilen tam genişlik-yarım yükseklik (fwhm) değerlerinin Debye-Scherrer formülü ile kullanılmasıyla ortalama kristal boyut hesaplanmıştır. Bulunan kristal boyutları Tablo 4-1’te verilmiştir. 0.02 M AgNO₃ ‘e ait kristal boyut değerleri gümüşe ait karakteristik açılarda pik vermediği için hesaplanamamıştır.

$$D = \frac{0.9 \times \lambda_{\text{Kai}}}{B_{(2\theta)} \times \cos \Theta_B}$$

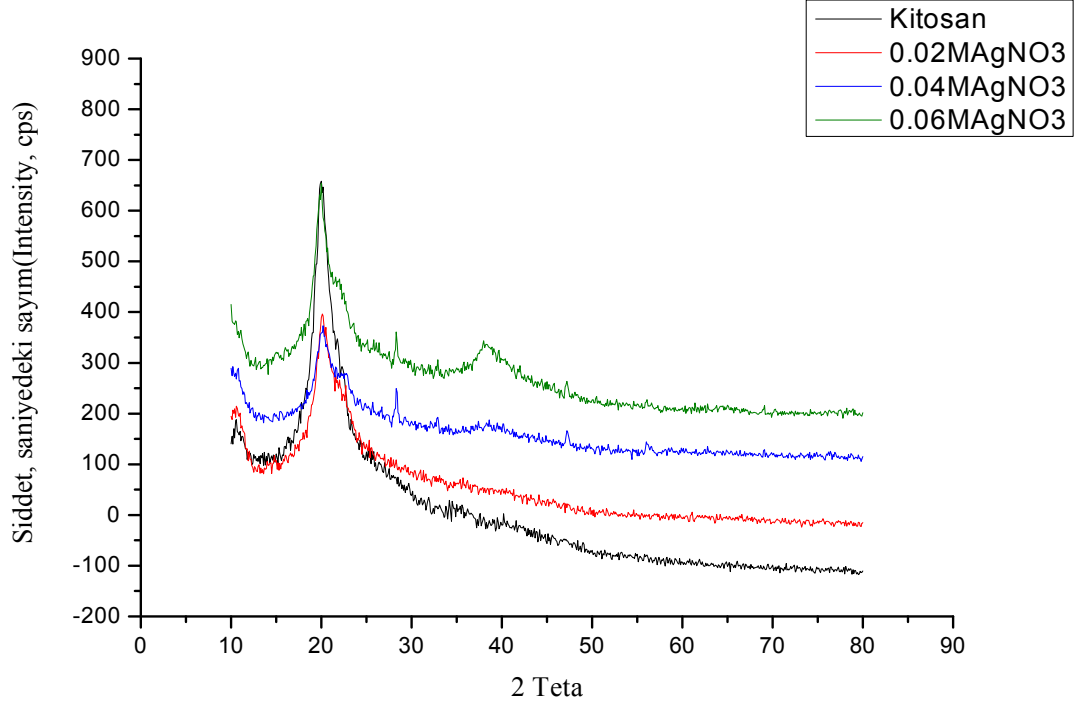
λ_{Kai} = X-ışını dalga boyu (nm) = 0.1541

$B_{(2\theta)}$ = fwhm dalga boyu (radyan)

Θ_B = Tepe noktasındaki aç değeri

Tablo 4-1 XRD sonuçlarına göre tanecik boyutları

Konsantrasyon	2 Θ (derece)	Fwhm (radyan)	Tanecik boyutu (nm)	Kristal yüzü
0.04 M AgNO ₃	38,593	5.969 x 10 ⁻³	24.64	111
0.04 M AgNO ₃	62,832	5.670 x 10 ⁻³	28.65	220
0.04 M AgNO ₃	76,347	5.750 x 10 ⁻³	30.68	311
0.06 M AgNO ₃	38,011	10.035 x 10 ⁻³	30.85	111
0.06 M AgNO ₃	78,179	7.819 x 10 ⁻³	48.24	311



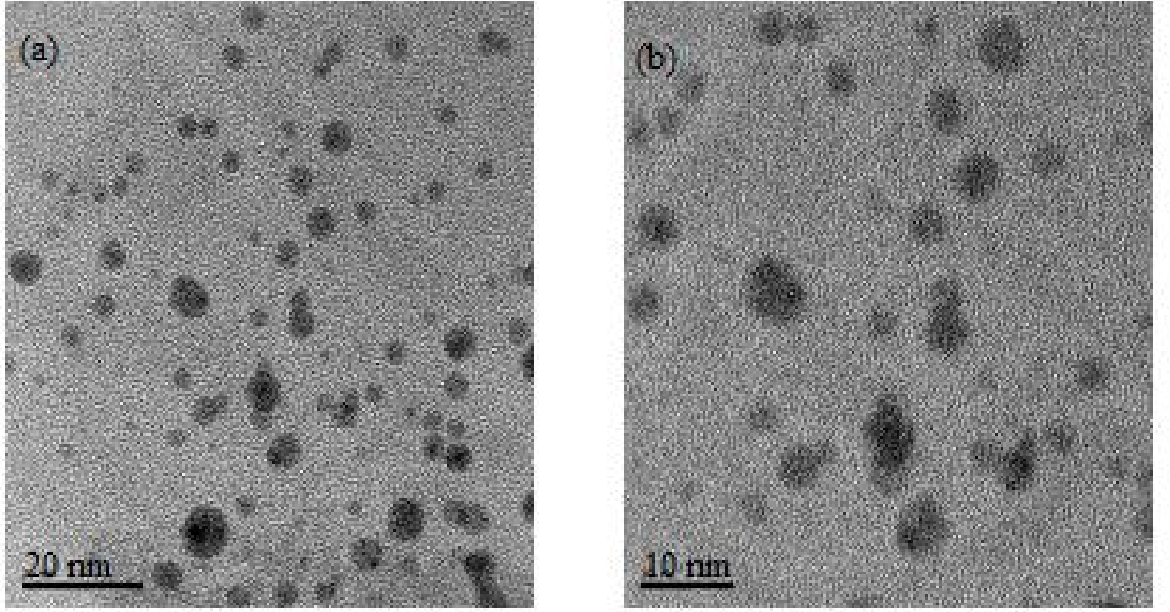
Şekil 4-3 Kitosan ve 0.02 M AgNO₃, 0.04 M AgNO₃, 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan– Ag nanotaneçığının XRD grafiğı

4.1.4 TEM ile Karakterizasyonu

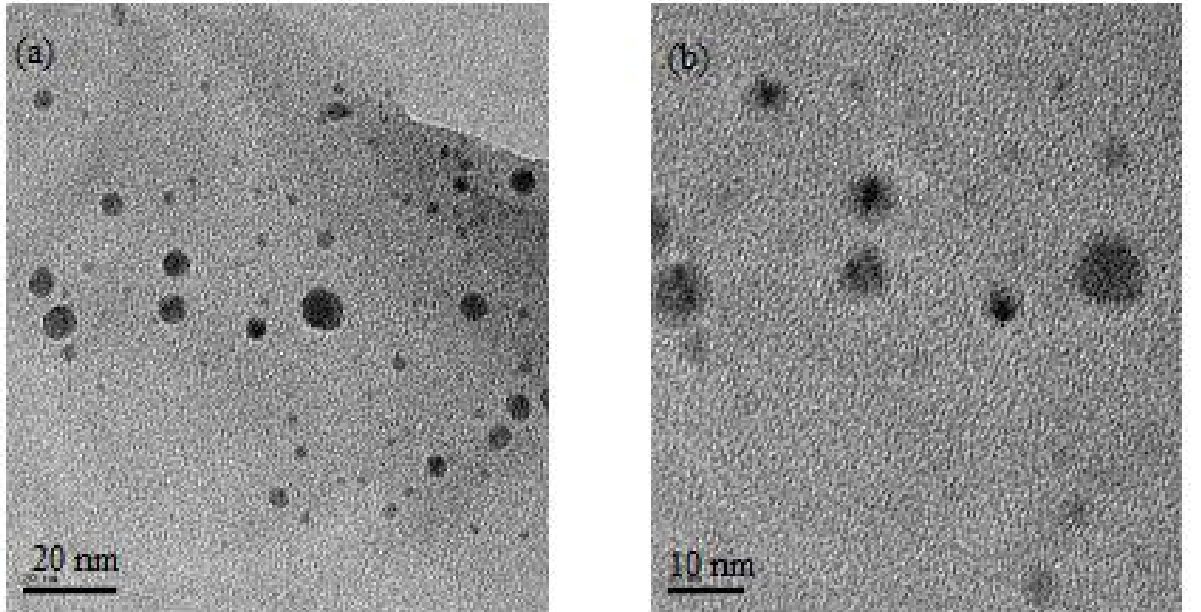
Şekil 4-4, Şekil 4-5, Şekil 4-6’da yer alan TEM sonuçlarına göre kitosan gümüş nanotaneçığının tanecik boyutları Tablo 4-2 ‘te verilmiştir. Buna göre tanecik boyutu gümüşün katılma konsantrasyonuna göre arttığı görülmektedir. Ayrıca 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan– Ag nanotaneçığının TEM görüntülerinde diğerlerine göre daha yoğun tanecik oluşumu görülmektedir. Gümüşün polimer yüzeyine dağılımı daha fazladır.

Tablo 4-2 TEM sonuçlarına göre tanecik boyutları

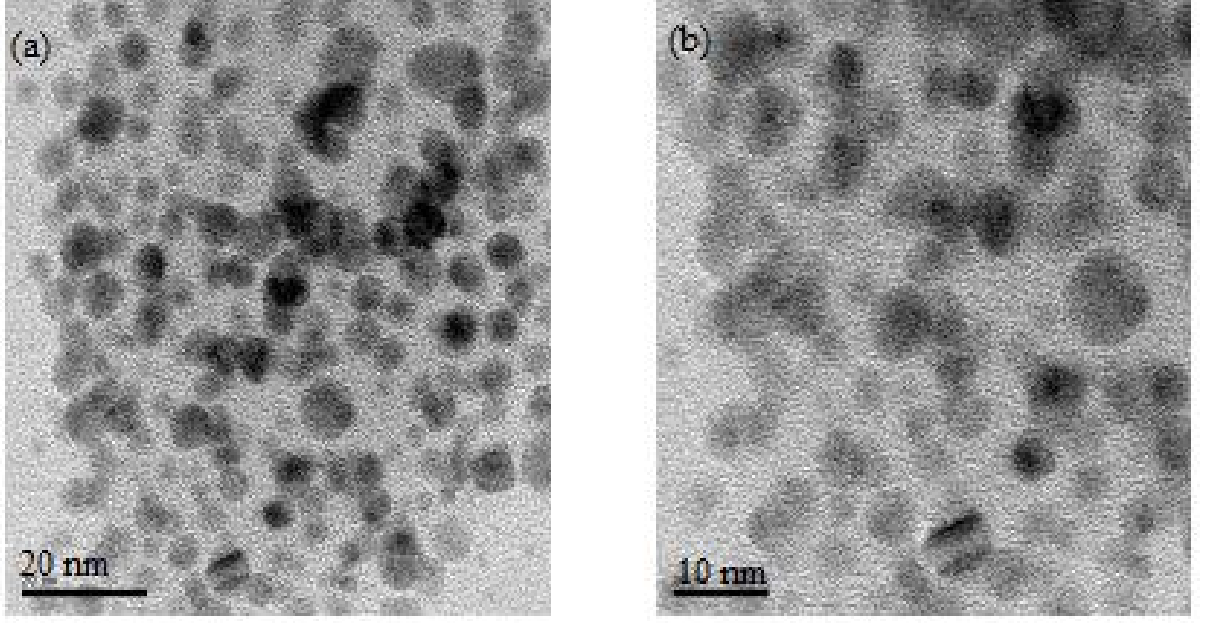
Konsantrasyon	Tanecik boyutu (nm) ort.
0.02 M AgNO ₃	6.7 nm
0.04 M AgNO ₃	9.3 nm
0.06 M AgNO ₃	10.2 nm



Şekil 4-4 0.02 M AgNO_3 içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin TEM görüntüleri



Şekil 4-5 0.04 M AgNO_3 içeren kitosan- Ag nanotaneceğinin TEM görüntüleri



Şekil 4-6 0.06 M AgNO₃ içeren kitosan– Ag nanotaneçığının TEM görüntüleri

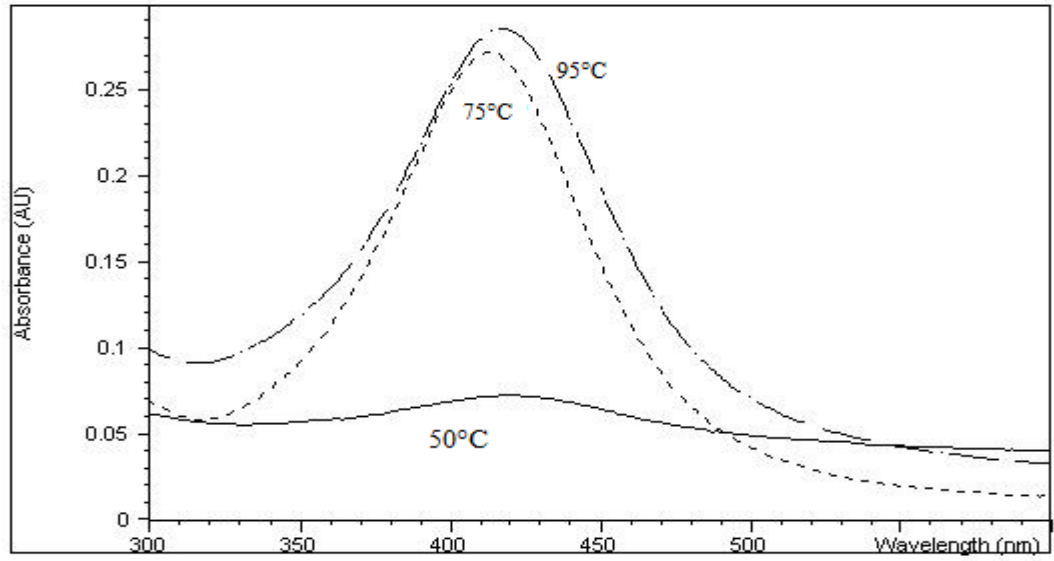
4.2 KITOSAN –AG NANOTANECİK OLUŞUMUNA SICAKLIK ETKİSİ

50°C’de gerçekleştirilen reaksiyonda gümüşün bağlandığını gösteren kahverengi renk elde edilememiştir. Reaksiyonun bitimine yakın ürün üstünde jelleşme gerçekleşmiştir.

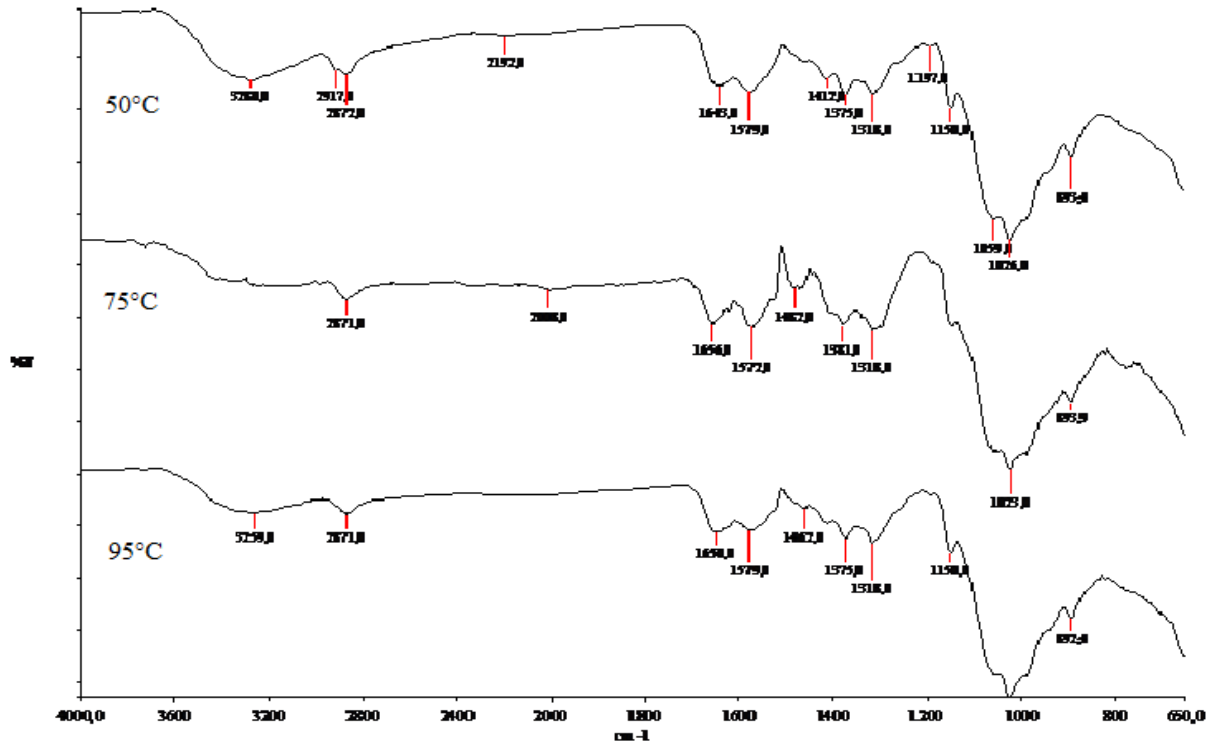
Sıcaklık denemesinde UV grafiğine göre 413 nm 75 ve 95 °C de maksimum absorbanans verdiği görülmektedir. Bununla birlikte 50°C’de ise absorbanansı bulunmamaktadır.

FT-IR grafiğine göre 1000 cm⁻¹ ve 1350 cm⁻¹ arasında C ve N azot bağlarını gösteren pikler vardır. Bu pikler 50 °C’ de yoğun olması kompleks oluşmadığını göstermektedir. C ve N azot bağlarına gümüş bağlanamamasından dolayı fazla pik vermiştir. Ayrıca 75 °C’de de 95 °C’ye göre daha keskin pikler olduğu görülmektedir.

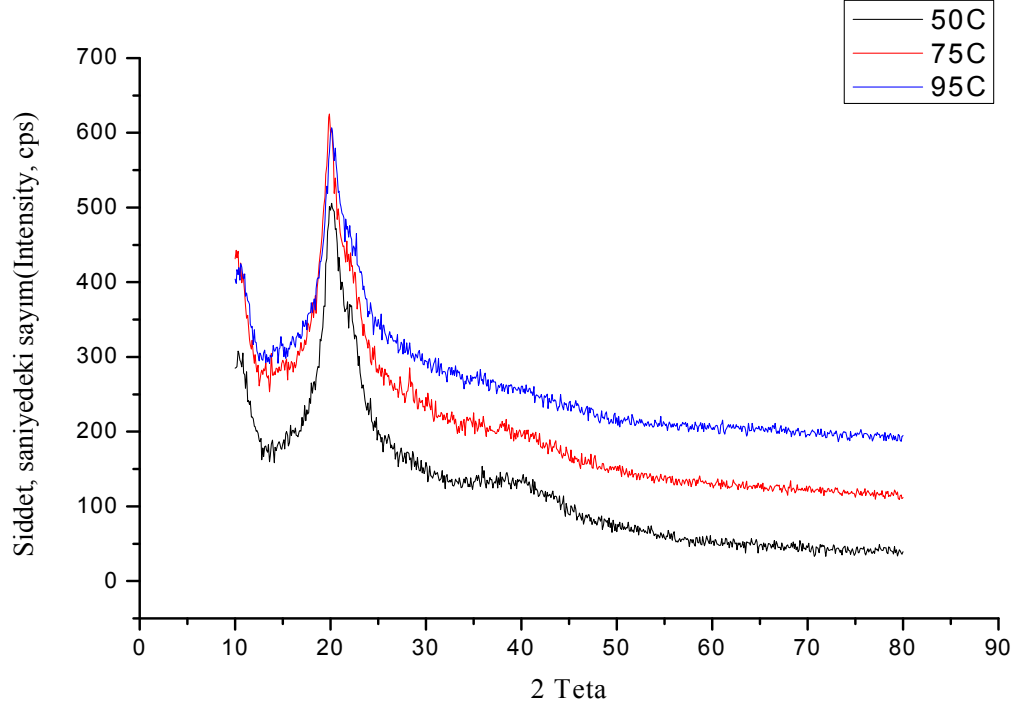
İncelenen XRD grafiğine göre 50 ve 75 °C deki 2 teta açıları 10 ve 20 civarındadır. 10 ve 20 kitosan varlığını gösteren referans değerleridir. Buna göre bu sıcaklıklarda gümüş nanotaneçik oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4-7 50°C, 75°C, 95°C’de 0.02 M AgNO₃ içeren kitosan – Ag nanotaneçığının UV grafiğı



Şekil 4-8 50°C, 75°C, 95°C’de 0.02 M AgNO₃ içeren kitosan – Ag nanotaneçığının FT-IR grafiğı



Şekil 4-9 50°C, 75°C, 95°C’de 0.02 M AgNO₃ içeren kitosan – Ag nanotaneciğinin XRD grafiği

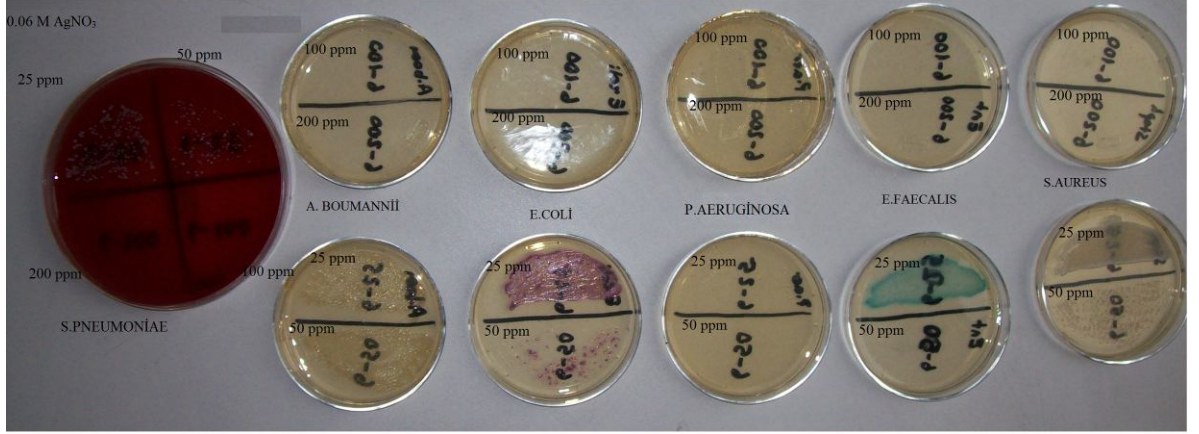
4.3 KİTOSAN –AG NANOTANECİĞİNİN ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTESİ

Tablo 4-3’te antibakteriyel aktivite ölçümü için kullandığımız Broth Dilüsyon yönteminde, Crome agar bulunan petrilere ekilmeden önceki aşamada tüplerdeki bakteri ile örnek solüsyonlarının görüntülerinin sonuçları yer almaktadır. Bu sonuçların kesin sonuçlar olarak değerlendirilmemektedir. Bu bakterilerin kendilerine özgü renkleri olduğundan ve üreme oluştuğunda gösterdikleri renkler değişmeyebileceğinden kaynaklanır. Buna rağmen genel olarak konsantrasyon arttıkça bakteri üremesinin azaldığı sonucu görülmektedir. Ayrıca kitosanın belli konsantrasyondaki bakteri testi sonucuna göre kitosan- gümüş nanotaneciğe oranla daha az bakteriyel etki gösterdiğini sonucuna varılır.

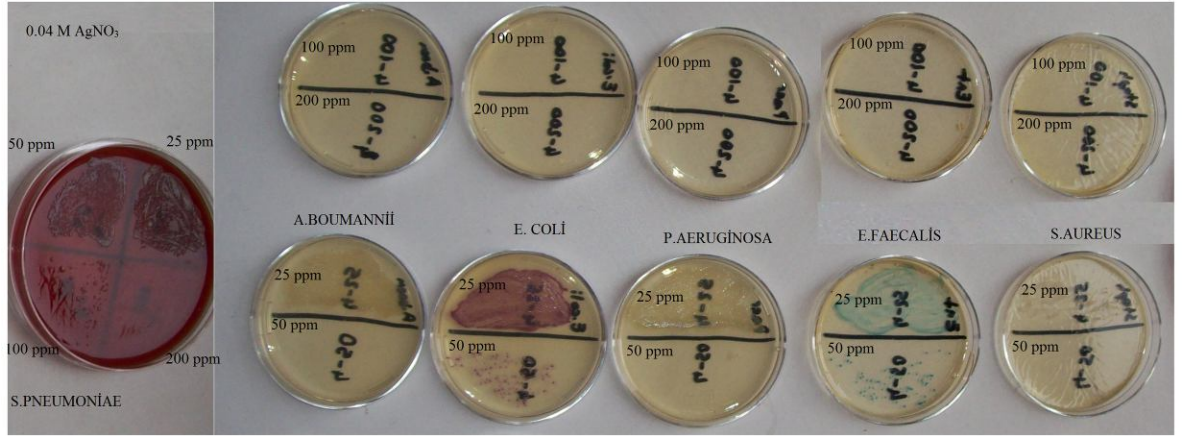
Tablo 4-4’de bakteri ekimlerinden sonra petrilere gözlenen sonuçların daha kesin sonuçlar verdiği görülmektedir. Bakteri testinin son aşaması petrilere bakteri üremesi gözlenmesidir. Şekil 4-10’de 0.06 M AgNO₃, Şekil 4-11 ‘da 0.04 M AgNO₃, Şekil 4-12’de 0.02 M AgNO₃ içeren kitosan gümüş Np. nin bakteri testi sonuçlarını, Şekil 4-13’de ise kitosanın tek başına bakteri testi sonuçlarını görmekteyiz. Buna göre bakterilerin üreme sonuçlarına bakarak kompozitin hangi konsantrasyonlarda etki ettiği görülmektedir

Tablo 4-3 Crome agara ekilmeden önceki tüplerdeki bakteri ve örnek solusyonlarının görüntüleri

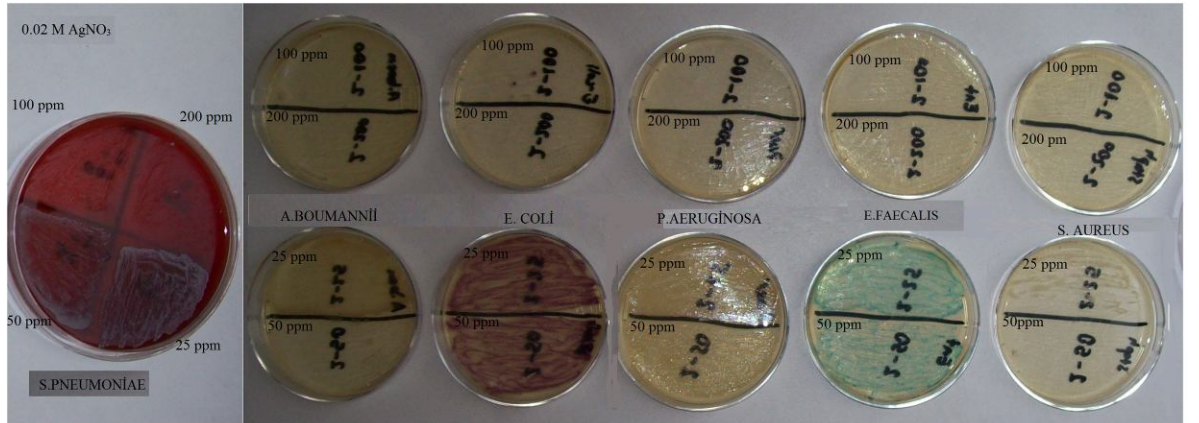
	S. AUREUS	E.FAECALIS	P.AERUGİNOSA	E. COLI	A.BAUMANNII	S.PNEUMONİAE
0,02 M AgNO ₃ - 200 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Az Bulank
0,02 M AgNO ₃ - 100 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Bulank
0,02 M AgNO ₃ - 50 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Bulank	Berrak	Bulank
0,02 M AgNO ₃ - 25 ppm	Bulank	Az Bulank	Bulank	Bulank	Bulank	Bulank
0,04 M AgNO ₃ - 200 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Az Bulank
0,04 M AgNO ₃ - 100 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Az Bulank
0,04 M AgNO ₃ - 50 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Az bulank	Berrak	Az Bulank
0,04 M AgNO ₃ - 25 ppm	Az Bulank	Az Bulank	Çok Az Bulank	Bulank	Berrak	Az Bulank
0,06 M AgNO ₃ - 200 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak
0,06 M AgNO ₃ - 100 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak
0,06 M AgNO ₃ - 50 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak
0,06 M AgNO ₃ - 25 ppm	Az Bulank	Az Bulank	Berrak	Bulank	Berrak	Berrak
kitosan - a.asit (%0,1) - 400 ppm	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak	Berrak
kitosan - a.asit (%0,1) - 200 ppm	Berrak	Berrak	Az bulank	Bulank	Bulank	Berrak
kitosan - a.asit (%0,1) - 100 ppm	Berrak	Berrak	Bulank	Bulank	Bulank	Berrak
kitosan - a.asit (%0,1) - 50 ppm	Bulank	Berrak	Bulank	Bulank	Bulank	Berrak



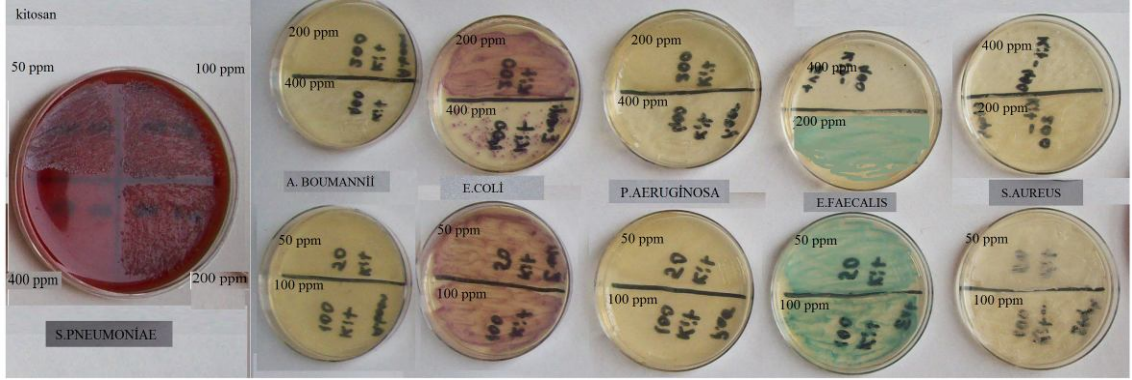
Şekil 4-10 0.06 M AgNO_3 içeren kitosan- gümüş nanotaneçığının bakteri testi görüntüleri



Şekil 4-11 0.04 M AgNO_3 içeren kitosan- gümüş nanotaneçığının bakteri testi görüntüleri



Şekil 4-12 0.02 M AgNO_3 içeren kitosan- gümüş nanotaneçığının bakteri testi görüntüleri



Şekil 4-13 Kitosanın bakteri testi görüntüleri

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, katalitik aktivite mekanizması ile kitosan gümüş nanotanecek kompozitinin oluşumu incelenmiştir. Farklı gümüş konsantrasyonlarında kitosana gümüş nanotanecek ekleyerek antibakteriyel etkisi ve gümüşün nanotanecek oluşumu gözlenmiştir.

Kitosan gümüş nanotanecek eldesi kitosanın suda hazırlanan çözeltisine AgNO_3 eklenerek yapılmıştır. Ortamın pH'ı NaOH ile ayarlanarak Ag iyonlarının indirgenmesi ile kitosana bağlanması sağlanmıştır.

Kitosanın yapısındaki amin ve hidroksil gruplarının fazla olmasından dolayı metal iyonlarına karşı güçlü bir yakınlığı bulunmaktadır. Kitosanın alkali durumundan dolayı Ag^+ iyonlarını AgNp 'ye indirger ve AgNp polimere tutunmasıyla kitosan bağlı gümüş nanotanecek elde edilir. Farklı gümüş konsantrasyonlarıyla farklı tanecik boyutları oluşturulur.

TEM sonuçlarına göre gümüşün konsantrasyonu arttıkça nanotanecek boyutunun arttığı görülmektedir. Bu çalışmada tanecik boyutu 0.02 M AgNO_3 kullanımında 6.7 nm, 0.04 M AgNO_3 kullanımında 9.3 nm ve 0.06 M AgNO_3 kullanımında 10.2 nm olarak bulunmuştur.

Murugados A., Sanpui P. ve Das R. çalışmalarına göre tanecik boyutu 5 nm [15], [2] ve 16 nm [22] olarak bulunmuştur. Murugados'un çalışmasında kullandığımız sentez metodu kullanılmış olup, AgNO_3 0.02 M olarak kullanılmıştır. Das 'ın çalışmasına göre de 0,015 M AgNO_3 kullanılarak farklı sentez metodu ile çalışılmıştır. Çalıştığımız 0.02 M AgNO_3 kullanarak bulduğumuz 6,7 nm, Murugados A. 'nın da aynı konsantrasyon ve sentez metodu ile bulduğu 5 nm tanecik boyutuna yaklaşık bir sonuç bulduğumuzu göstermektedir.

Çalışmamızın 0.02 M AgNO_3 , 0.04 M AgNO_3 , 0.06 M AgNO_3 gümüş nitrat içeren bileşiklerimizin UV sonuçlarına göre 413 nm pik verdiği görülmüştür. Bu pik gümüş varlığının göstergesi olan 410 nm ve 420 nm arasında olduğunu görmekteyiz.

Chen P.'ın kitosan-gümüş nanotanecek elde ederek UV ile incelemesi sonucunda 426 nm de pik verdiğini gözlemlemiştir [21]. Ayrıca Sanpui P. 'nın kitosan gümüş nanotanecek sentezinde incelediği UV grafiği sonuçlarında da 410 nm de güçlü ve dar tek pik verdiğini gözlemlemiştir [2].

AgNP oluşmasında sıcaklık 95 °C ve karıştırma hızında 18000 devir/dk olarak kullanıldı. Sıcaklık faktörünün oluşuma etkisi incelendiğinde 50 ve 75 °C'de gümüş nanotanecek oluşumunu tam olarak görememekteyiz. Gümüşün redoks sıcaklığı 80 ve 100 °C dir [22]. XRD grafiğine göre kitosana ait pikler verdiği görülmüştür. Bu da gümüşün kitosana bağlanmadığını göstermektedir. Chen P. et. al. yaptığı çalışmaya göre 22,5 ta görülen pik kitosana aittir.[21].

Kitosan ve gümüş tek başına da antibakteriyel etkiye sahipken kitosan-gümüş nanotanecek oluşumunda daha fazla antibakteriyel etkiye sahip olduğu görülmüştür.

Ayrıca gümüş konsantrasyonunun artması ile antibakteriyel özellikte de artış olduğu görülmüştür.

Antibakteriyel testlerde farklı türlerdeki üç adet gram pozitif ve üç adet gram negatif bakterilerle çalışılmıştır. *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* olan bakteriler gram negatif, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae* gram pozitif bakterilerdir. Gram pozitif ve negatif bakterilerin farkı hücre duvarlarıdır. Gram pozitif bakterilerin duvarlarının dışında dış zar bulunur, gram negatif bakteride bulunmaz. Bu yüzden gram pozitiflerin hücre duvarları daha kalın olduğundan hücreye sağlamlık kazandırır.

Bu tür bakterilerle çalışma sonucunda elde ettiğimiz verilere göre 0.02 M, 0.04 M ve 0.06 M AgNO_3 içeren kompozitler 25 ile 50 ppm arasında antibakteriyel etki göstermiştir. Aynı antibakteriyel test kitosana uygulanması ile kitosanın aktivitesi 200 ile 400 ppm arasında olduğu görülmüş olup bu da gümüş nanotaneceğin kompozitin içindeki varlığının antibakteriyel etkisini göstermektedir.

0.02 M AgNO_3 içeren kompozitin bakteri sonuçlarında *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için antibakteriyel etki 50 ppm-100 ppm, *Staphylococcus aureus* bakterisi için ise 25 ppm-50 ppm olarak bulunmuştur.

0.04 M AgNO_3 içeren kompozitin bakteri sonuçlarında *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Enterococcus faecalis* bakterileri için antibakteriyel etki 50 ppm-100 ppm, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için ise 25 ppm-50 ppm olarak bulunmuştur.

0.06 M AgNO_3 içeren kompozitin bakteri sonuçlarında *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Streptococcus pneumoniae* bakterileri için antibakteriyel etki 50 ppm ile 100 ppm arasında, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için ise 25 ppm ile 50 ppm arasında olarak bulunmuştur.

Kitosanın ise %0.1 lik sulu asetik asit çözeltisinde hazırlanan solusyonu hazırlanarak antibakteriyel etkinliği incelenmiştir. Sonuçlara göre *Enterococcus faecalis* ve *Streptococcus pneumoniae* bakterilerinde 200 ppm-400 ppm arası, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri için de 400 ppm'den büyük miktarda bakteriyel etki göstermektedir.

Kitosanın gram negatif bakterileri kısıtlama özelliği de bulunmaktadır. Bu bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonu 100 - 10000 ppm arasındadır [10].

KAYNAKLAR

1. Dror-Ehre A. et al. 2009: Silver nanoparticle–E. coli colloidal interaction in water and effect on E. coli survival. *Journal of Colloid and Interface Science* 339 (2009) 521–526
2. Sanpui P. et al. 2008 : The antibacterial properties of a novel chitosan–Ag-nanoparticle composite. *International Journal of Food Microbiology* 124 (2008) 142-146
3. Ayhan, A., Dünden Bugüne Türkiye’de Bilim ve Teknoloji, *Beta Basım Yayım Dağıtım AŞ.*, İstanbul, (2002) 379 – 387
4. Rabea I.E. et al. 2003 : Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. Department of Crop Protection and Department of Organic Chemistry, *Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences*, Ghent University, Coupure Links 653, B-9000 Gent, Belgium Received April 30, 2003; Revised Manuscript Received June 25, 2003
5. Hirano S., Tottori University, Tottori, Japan, 2005 (*ulman*), chitin and chitosan
6. Liu N. Et al. 2007: Effect of MW and concentration of chitosan on antibacterial activity of Escherichia coli. *Carbohydrate Polymers* 64 (2006) 60–65
7. Hirano S. , Y. Yagi , *Carbohydr. Res.* 83 (1980) 103.
8. Hirano S. , Y. Yagi , *Carbohydr. Res.* 92 (1981) 319.
9. Qi L. Et al. 2004: Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research* 339 (2004) 2693-2700
10. Helander I.M. et al. 2001: Chitosan distrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 71 (2001) 235-244
11. Nagender N.P. et al.2008: Silver or silver nanoparticles: a hzardous threat to the environment and human health? *J. Appl. Biomed* 6 (2008) 117-129 (11)
12. Chen X. et al.2007: Nanosilver: A product in medical application, *Toxicology Letters* 176 (2008) 1-12
13. Arpaç, E., Bakterilere karşı nanoteknoloji, *Popüler Bilim Dergisi*, 165 (2007) 44 - 48.
14. Kim J.S. et al. 2006: Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3 (2007) 95-101

15. Murugadoss A. et al. 2007: A 'green' chitosan–silver nanoparticle composite as a heterogeneous as well as micro-heterogeneous catalyst, *Nanotechnology* **19** (2008)
16. Kuo Y. et al. 2006: Preparation of silver nanoparticles using chitosan suspensions, *Powder Technology* **185** (2008) 251–257
17. Ali W.S. et al. 2010: Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester, *Carbohydrate Polymers* **83**(2011) 438-446
18. Tankhiwale R. et al. 2009: Silver-Nanoparticles- Loaded Chitosan Lactate Films with Fair Antibacterial Properties, *Journal of Applied Polymers* **115** (2010) 1894-1900
19. Yoshizuka K. et al. 1999: Silver- complexed chitosan microparticles for pesticide removal, *Reactive & Functional Polymers* **115** (2000) 47-54
20. Ruparelia J. P. et al.2008: Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles, *Acta Biomaterialia* **4** (2008) 707–716
21. Chen P. et al. 2006: Synthesis of silver nanoparticles by γ -ray irradiation in acetic water solution containing chitosan, *Radiation Physics and Chemistry* **76** (2007) 1165-1168
22. Das R. et al. 2009: Preparation of Silver Nanoparticles and Their Characterization, *Journal nanotechnology online*, 2009
23. Choa K.H. et al.2005: The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient, *Electrochimica Acta* **51** (2005) 956–960
24. Sondi I. et al. 2004: Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria, *Journal of Colloid and Interface Science* **275** (2004) 177–182
25. <http://www.microbelibrary.org>, *E. coli* O157:H7. Phase contrast image of cells immobilized on an agar-coated slide. William Ghiorse, Department of Microbiology, Cornell University, Ithaca, New York. Licensed for use by ASM Microbe Library
26. Baron S. 1996: University of Texas Medical Branch at Galveston, *Medical Microbiology*, 4th edition ,ISBN-10: 0-9631172-1-1
27. Kuo L. et al. 2003: Dissemination of a Clone of Unusual Phenotype of Pandrug- Resistant *Acinetobacter baumannii* at a University Hospital in Taiwan, *Journal of Clinical Microbiology* **42** (2004) 1759-1763

28. Salto N. 2007: Acinebacter baumannii enfeksiyonları ve tedavisi, *XIII. Türk klinik mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları kongresi 2007*
29. Balcı M. et al. 2010: Nozokomiyal Acinetobacter Baumannii Suşlarının Antibiyotik Duyarlılığı, *Ankem Derg.* 24(1) (2010) 28-33
30. Boyce, JM. Et al.1994: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a briefing for acute care hospitals and nursing facilities, *Infection Control and Epidemiology.* 15(2) (1994) 105-115.
31. Boyce, P. M. et al. 1994: The importance of postnatal depression, *Medical Journal of Australia*, 161(8), 471-472.
32. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>, (Bad Bug Book: Introduction Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2009)
33. Balcht A. et al.1994: Pseudomonas Aeruginosa: Infections and Treatment, *Informa Health Care.* pp. 83–84.
34. Itah A. Y.2005: Growth Profile and Hydrocarbonoclastic Potential of Microorganisms Isolated from Tarballs in the Bight of Bonny, Nigeria, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Volume 21, Numbers 6-7, October, 2005, 1317-1322
35. Ryan K.J. 2004: Sherris Medical Microbiology (4th ed.). *McGraw Hill*
36. Berk R. et al. 2006: Streptococcus Pneumoniae: Klasik ve moleküler tanıda karşılaşılan sorunlar, *Anken derg.* 20 (3) (2006) 180- 186
37. Gülay Z. , 2002: Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir, *Toraks Dergisi*, 3(1) (2002) 75-88

ÖZGEÇMİŞ

Esra DİLAVER ADIGÜZEL, 10.07.1983 te Trabzon'da doğdu. 2001 yılında Prof. Dr. Faik Somer Süper Lisesinden mezun oldu ve aynı sene İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümünde Lisans eğitimine başladı. Daha sonra İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Proses ve Reaktör Tasarımı Programında Lisansüstü eğitimine başladı. 2008 yılında evlendi. 2007 yılı Şubat ayında özel bir şirkette üretim sorumlusu olarak çalışmaya başladı ve aynı şirkette mesul müdür olarak devam etmektedir.