



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

POLYHEXAMETHYLENE BİGUANİDE HYDROCHLORİDE
MADDESİNİN ANTİMİKROBİYAL VE İNSEKTİSİDAL
AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FIRAT KARAYİĞİT

BİYOMÜHENDİSLİK ANA BİLİM DALI

PROF.DR. İSA KARAMAN

Tokat, 2022

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

FIRAT KARAYİĞİT

29 Ağustos 2022

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca, ilgi ve alakasını asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana çok şey katan, tüm laboratuvar denemelerimde desteğini her zaman hissettiğim sayın danışman hocam Prof. Dr. İsa KARAMAN' a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Hayatım boyunca maddi ve manevi her zaman yanımda olan, beni bu günlere gelmemdeki en büyük emeği sarf eden ve hakkını asla ödeyemeyeceğim babam Nuri KARAYİĞİT ve annem Hafiye KARAYİĞİT'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

FIRAT KARAYİĞİT

29 Ağustos 2022

ÖZET

POLYHEXAMETHYLENE BIGUANİDE HYDROCHLORİDE MADDESİNİN ANTİMİKROBİYAL VE İNSEKTİSİDAL AKTİVİTESİNİN ARAŞTIRILMASI

Fırat Karayığit

Yüksek Lisans Tezi, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim
Enstitüsü Biyomühendislik Ana Bilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsa KARAMAN

Ağustos 2022, 89 sayfa

Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür (PHMB), çok çeşitli antimikrobiyal uygulamalarda kullanılan bir polimer olan kimyasal bir biyosittir. Hücre özelliği gösteren bütün organizmaların yanında oluşan etkinlik durumu, bir heksametilen olgusu bulunan esnek bir aralayıcı uzantıya bağlı kalınan en temel biguanid grubunu oluşturmaktadır. PHMB, hücre zarında bulunan bütünlüğü bozularak hücre ölümlerine sebep olan çok geniş bir spektrumu elinde bulunduran dezenfektandır. Pek çok alanda aktif olarak kullanılmaktadır.

Poliheksanid/poliheksametilen biguanid, yüksek doku uyumluluğu ve düşük sitotoksitesi ile en çok kullanılan yara antiseptiklerinden biridir. Bu çalışmada, kliniğimiz için bakteriyel merkezli yapılan araştırmalarda kullanılmakta olan bakteri suşlarında, laboratuvarında yetiştirilmiş olan kültürden elde edilmiştir. Bu çalışma proseslerinde kullanılan bakteri türlerinin çalışma proseslerinde isimlendirilmesi kolay olması açısından Human Pathogen Bacteria (HPB) şeklinde işaretlemeler yapılmıştır.

Tüm klinik vakalarda tedavi sürecinde herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmadı. Poliheksanid/Poliheksametilen Biguanid ile ilgili klinik çalışmalar umut vericidir. Bu çalışmada kısa sürede olumlu yanıt alınmıştır. Ancak kronik tedavilerinde % 0,1 PHMB uygulamalarını iyileştirmek için daha fazla deneysel kontrollü klinik ve laboratuvar çalışmalarına ihtiyaç vardır. Bu tez çalışmasında, sentez yöntemleri, etki

şekli, antimikrobiyal etkiler ve insanların yanında aynı zamanda çevre varlıklara yönelik de güvenliklerinden çok daha kapsamlı bir PHMB özellikleri literatürü sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür, Antimikrobiyal Aktivite, İnsektesidal Aktivite



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE ANTIMICROBIAL AND INSECTICIDAL ACTIVITY OF POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE HYDROCHLORIDE

Fırat Karayığıt

Master Thesis, Tokat Gaziosmanpaşa University Institute Of Graduate
Studies

Department of Bioengineering

Advisor: Assoc. Prof. Dr. İsa KARAMAN

August 2022, 89 pages

Polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) is a chemical biocide, a polymer used in a wide variety of antimicrobial applications. The activity state, which occurs in all organisms with cellular characteristics, constitutes the most basic biguanide group that adheres to a flexible spacer extension with a hexamethylene phenomenon. PHMB is a disinfectant with a wide spectrum that causes cell death by disrupting the integrity of the cell membrane. It is actively used in many fields.

Polyhexanide/polyhexamethylene biguanide is one of the most widely used wound antiseptics with its high tissue compatibility and low cytotoxicity. In this study, bacterial strains used in bacterial-centered studies for our clinic were obtained from the culture grown in the laboratory. In order to make it easy to name the bacterial species used in these working processes in the working processes, markings were made as Human Pathogen Bacteria (HPB).

No complications were encountered during the treatment process in all clinical cases. Clinical studies of polyhexanide/polyhexamethylene biguanide are promising. In this study, positive response was received in a short time. However, more experimental

controlled clinical and laboratory studies are needed to improve the applications of 0.1% PHMB in chronic treatments. This thesis presents a much more extensive literature on PHMB properties than methods of synthesis, mode of action, antimicrobial effects, and safety for humans as well as for the environment.

Keywords: Polyhexamethylene Biguanide Hydrochloride, Antimicrobial Activity, Insectecidal Activity



İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	III
ÖZET	IV
ABSTRACT.....	V
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
ÇİZELGELER LİSTESİ	xvi
BİRİNCİ BÖLÜM.....	1
1. GİRİŞ.....	1
İKİNCİ BÖLÜM	3
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE	4
2.1 Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür (PHMB) Kavramsal Tanımı	4
2.1.1 Dezenfektan Madde Kavramsal Tanımı	4
2.2 PHMB Sentezi ve Hazırlanma Süreci	5
2.3 PHMB Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	5
2.4 PHMB Eylem Modu	6
2.5 Antimikrobiyal Aktivite Kavramına Genel Bakış.....	7
2.5.1 Kantitatif Duyarlılık Testleri	7

2.5.1.1. MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) Yöntemi.....	7
2.5.1.2 MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) Yöntemi	7
2.5.1.3 Makrodilüsyon	8
2.5.1.4 Mikrodilüsyon.....	9
2.5.1.5 Disk Difüzyon Tekniği	9
2.5.1.6 Çalkalamalı Agar Tekniği (18+2) Kuralı.....	10
2.5.1.7. İnsektesidal Aktivite.	10
2.6 Literatür Taraması.....	11
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	19
3.1 Materyal.....	19
3.1.1 Çalışmada kullanılan bakteri suşları	19
3.1.2 Çalışmada kullanılan fungus türleri	19
3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	20
3.1.4 Çalışmada kullanılan aletler ve sarf malzemeleri	20
3.2 Yöntem.....	21
3.2.2 Besiyeri Hazırlama	21
3.2.2.1 Nutrient Agar (NA).....	21
3.2.2.2 Potato Dextrose Agar (PDA)	21
3.2.2.3 Nutrient Broth (NB).....	21
3.2.3 Saf Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması	22
3.3 McFarland Ayarlama	23

3.4 Antibakteriyel Agar Disk Difüzyon Testi	24
3.5 Antifungal Agar Disk Difüzyon Testi	25
3.6 Fungus Mikroorganizmaların Çalkalamalı Agar Tekniği (18+2) ile MIC Belirlenmesi	25
3.7 Bakteri Mikroorganizmaların Broth Makro Dilüsyon Yöntemiylen MIC ve MBC Değerlerinin Tespiti.....	27
3.8 Polihexametilen Biguanidin Etken Maddesinin <i>Dermanyssus gallinae</i> (Kırmızı Tavuk Biti) Üzerindeki Insektesidal Aktivitesinin Denenmesi- Uygulanması	29
4. BULGULAR.....	31
SONUÇ ve TARTIŞMA.....	61
KAYNAKLAR	64
ÖZGEÇMİŞ.....	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
µL	Mikrolitre
Ag	Gümüş
°C	Santigrat Derece
CaCo-2	Kolon Adeno Karsinom
CEP	Cefoperazone
CFU	Koloni Oluşturan Birim
CHX	Klor Heksidin
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CN	Gentamycin
Da	Dalton
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E	Erythromycin
EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
FLK	Fluconazole
g	Gram
HCL	Hidroklorik Asit
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HPB	Human Pathogen Bacteria
INCI	Uluslararası Kozmetik İçerik İsimlendirme/Terminolojisi

IUPAC	Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
K	Kontrol
L	Litre
MBC	Minimum Bakterisidal Konsantrasyon
MHA	Mueller Hinton Agar
MHB	Mueller Hinton Broth
MİC	Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
n	Ağırlıklı Ortalama Sayısı
N2-A	Neuro-2A Fare Nöral Hücreleri
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
NE	No Effect- Etki Yok
NK	Negatif Kontrol
OXOİD	Blank Boş Disk
PDA	Potato Dextrose Agar Besiyeri
PHMB	Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür
PHMBs	Polihekzametilen Biguanitler
PK	Pozitif Kontrol
PLA	Poliaktid
Ppm	Milyonda Bir Birim
S	Streptomycin

TC	Tetracylin
TM	Test Madde
VOR	Voriconazole
WUWHS	Dünya Birliği Yara İyileřtirme Dernekleri



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1 : Poliheksametilen Biguanidin (PHMB)	1
Şekil 2.1 : PHMB ve terminal gruplarının kimyasal yapısı.	6
Şekil 2.12 : Disk difüzyon	10
Şekil 3.1 : Saf Kültürden yetiştirilen bakteriler	22
Şekil 3.12 : Saf Kültürden Yetiştirilen Funguslar	23
Şekil 3.13 : 1.Tüp: <i>L. monocytogenes</i> 2.Tüp: <i>B. subtilis</i> 3.Tüp: <i>K. aeruginosa</i> 4.Tüp: <i>P. aeruginosa</i> 5.Tüp: <i>S. aureus</i> 6.Tüp: <i>E. coli</i> 7.Tüp: <i>E. faecium</i> 8.Tüp: <i>P. fluorescens</i> 9.Tüp: <i>E. faecalis</i> 10.Tüp: <i>S. mutans</i>	24
Şekil 3.4 : Ana stok	30
Şekil 4.1 : Antibakteriyeller üzerinde oluşan disk difüzyon zon çapları (mm)	33
Şekil 4.2 : Antifungallar üzerinde oluşan disk difüzyon zon çapları (mm).....	35
Şekil 4.3 : Funguslar üzerinde oluşan minimum inhibisyon konsantrasyonları	37
Şekil 4.4 : Funguslar üzerinde oluşan minimum inhibisyon konsantrasyonları	37
Şekil 4.5 : <i>B. subtilis</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	39
Şekil 4.6 : <i>K. aerogenes</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	39
Şekil 4.7 : <i>E. faecalis</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	40
Şekil 4.8 : <i>E. faecium</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	40
Şekil 4.9 : <i>S. aureus</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	41
Şekil 4.10 : <i>S. mutans</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	41
Şekil 4.11 : <i>E. coli</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	42
Şekil 4.12 : <i>P. aeruginosa</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	43
Şekil 4.13 : <i>L. monocytogenes</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	44
Şekil 4.14 : <i>P. fluorescens</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	44
Şekil 4.15 : %10' luk etken madde için Minimum Bakterisidal Konsantrasyonuna Ait Görüntüsü.....	46
Şekil 4.16 : <i>B. subtilis</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	47

Şekil 4.17 : <i>E. faecalis</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	47
Şekil 4.18 : <i>K. aerogenes</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	48
Şekil 4.19 : <i>E. faecium</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	48
Şekil 4.20 : <i>S. aureus</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.....	49
Şekil 4.21 : <i>S. mutans</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	49
Şekil 4.22 : <i>E. coli</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	50
Şekil 4.23 : <i>P. aeruginosa</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	50
Şekil 4.24 : <i>L. monocytogenes</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	51
Şekil 4.25 : <i>P. fluorescens</i> ait broth makro dilüsyon görüntüsü.	51
Şekil 4.26 : %20' lik etken madde için Minimum Bakterisidal Konsantrasyonuna Ait görüntüsü.....	52
Şekil 4.27 : Birinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	53
Şekil 4.29 : İkinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	54
Şekil 4.30 : Üçüncü uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	55
Şekil 4.31 : %10' luk etken maddesinin Binoküler mikroskobiye ait <i>Dermanyssus gallinae</i> (kırmızı tavuk biti) cansız görüntüsü.	56
Şekil 4.32 : Birinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	57
Şekil 4.33 : İkinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	58
Şekil 4.34 : Üçüncü uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	59
Şekil 4.35 : Yakın çekime ait insektesidal aktivite görüntüsü.....	59
Şekil 4.36 : %20' lik etken maddenin Binoküler mikroskobun altında <i>Dermanyssus gallinae</i> ' ya (kırmızı tavuk biti) ait cansız görüntüsü.....	60

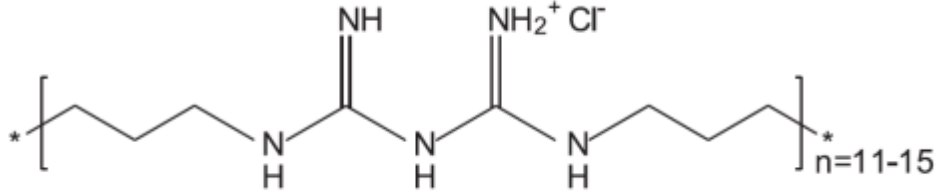
ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1 : Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları	Error! Bookmark not defined.
Çizelge 4.2 : Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları...	32
Çizelge 4.3 : Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları...	33
Çizelge 4.4 : Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları...	34
Çizelge 4.5 : Çalışmada Agar Tekniği (18+2 Kuralı) Fungus Mikroorganizmaların MIC Değer Tablosu	36
Çizelge 4.6 : Bakterilerin %10' luk etken madde için MIC belirleme Değer Tablosu...	38
Çizelge 4.7 : Bakterilerin %20' lik etken madde için MIC belirleme Değer Tablosu ...	45
Çizelge 4.8 : Birinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri	53
Çizelge 4.9 : İkinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri	54
Çizelge 4.10 : Üçüncü uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri	55
Çizelge 4.11 : Birinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri	56
Çizelge 4.12 : İkinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri	57
Çizelge 4.13 : Üçüncü uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri	58

BİRİNCİ BÖLÜM

1. GİRİŞ

Polibiguanidlerin tanımına bakıldığında, aynı ya da farklı uzunlukta olan hidrokarbon zincir bağlayıcılar açısından ayrılmış tekrarlı katyonik biguanid birimler içermekte olan polimerik polikasyonik aminler olarak karşımıza çıkmaktadır. Yapılan tüm bu çalışmalar içerisindeki en önemli antimikrobiyal madde olarak, ortalama olarak 11 biguanid birimi içermekte olan ve molekül ağırlığı ortalama olarak 2500 Da olan Poliheksametilen Biguanid karşımıza çıkmaktadır. PHMB'nin antimikrobiyal etkinliğine bakıldığında, benzer monomerik ya da dimerik biguanidlerden çok farklı olduğu da görülmektedir. PHMB, zehirlilik durumlarının düşük seyreltmesi (MIC = 0,5-10 µl/ml), güçlü ve geniş spektrumlu bir bakteriyosidal madde olmasından kaynaklı, tıp alanlarında antiseptik madde olarak, bilhassa da antibiyotik dirençli bakterilerin sebep olmuş oldukları yara enfeksiyonlarının önlenme durumlarında, gıda endüstrilerinde dezenfektan olarak ve yüzme havuzlarının sterilize edilmesi amacıyla kullanıldığı görülmektedir. Ağız gargaralarında ve yara pansuman malzemelerinde biyosit olarak kullanıldığına dair araştırmalar mevcuttur. Tüm bunların yanında da tekstillerin antimikrobiyal aktivitelerinin süreçlerinde ve genellikle selüloz liflerinin muhafaza edilmesi sürecinde, ilgi odağı olmuştur.



Şekil 1.1 : Poliheksametilen Biguanidin (PHMB)

Poliheksametilen Biguanidin (PHMB) 1997'de selülozik liflere PHMB ile yaptığı bir çalışmanın patentini alan Payne, bu çalışma ile elde edilen son ürünün dayanıklılığını arttırmanın yanı sıra kumaş sararmasını da ortadan kaldırmak için, 949 kumaşa güçlü bir organik asit ile işlem yapmıştır. Daha sonra Payne ve Yates, kendi kendine çapraz bağlanabilen bir reçine ve katalizör kullanarak, sentetik liflerde PHMB uygulaması gerçekleştirmişlerdir. PHMB, aynı zamanda pamuğa oda sıcaklığında ve nötral pH'da

doğrudan emdirme-kurutma-fiksaj işlemiyle uygulanabilmektedir. Katyonik doğası nedeniyle, PHMB'nin pamuğa bağlanmasında, hidrojen bağlarının yanı sıra iyonik bağların da rolü olduğu düşünülmektedir. Pamuklu kumaşlardaki kimyasal süreçler işleminden gelen karboksil grupları, bu etkileşimlerden bazılarına dahil olmaktadır. Düşük konsantrasyonlarda, PHMB ve selülozdaki karboksil grupları arasındaki elektrostatik etkileşim ağır basmaktadır. Konsantrasyon arttıkça, PHMB' nin selülozla yaptığı ve çok katmanlı adsorpsiyon sağlayan hidrojen bağı giderek baskın hale gelmektedir (Roth B. ve ark. 2010).

Bu çalışmamızın ana konusu olan, hücresel organizmalara karşı etkinlik, bir heksametilen grubu olan esnek bir yapıya bağlanan çok temel biguanid grubundan kaynaklanmaktadır (Kaehn, K., 2010). Biguanid grupları arasında aralayıcı olarak altı metilen grubu kullanıldığında maksimum biyosidal verim elde edilir (Rose, F.L., 1954). Yakın tarihli bir makalede, Koburger ve ark. (2010) triklosan, oktenidin, phmb, pvp-iyot ve kloreksidin diglukonat'ın antiseptik etkinliği karşılaştırmışlardır; uzun süreli kullanım gerektiğinde veya uzun süreli temasın mümkün olduğu durumlarda PHMB'nin en yaygın kullanılan antiseptik olduğu sonucuna varmışlardır.

Kaehn, biyosit olarak PHMB' nin eylem metodunu ve yerleşik uygulamalarını gözden geçirilmiştir (Lebel, O.; Maris, T.; Wuest, J.D., 2006). PHMB, bakteri hücre duvarındaki fosfolipidlerin negatif yüklü fosfat baş gruplarına bağlanır, sertliğin artmasına neden olur, polar olmayan segmentleri hidrofobik alanlara yayılır, hücre ölümü ile sonuçlanıp zar yapısını bozmaktadır.

PHMB, tarım ve gıda işleme tesislerinde, lojistikte, mutfaklarda, ulaşım araçlarında geniş uygulama alanına sahip yeni nesil bir dezenfektandır (Ikeda ve diğerleri, 1983; Ikeda ve diğerleri, 1984; Moore ve Gray, 2007). (Koffinevry ve diğerleri, 2011; Kabara, 1984; Dugard ve Mawdsley, 1982). PHMB, ozona alternatif olarak antimikrobiyal el yıkamada ve hava filtresi alanlarında kullanılmaktadır. Kliniksel çalışmalara baktığımızda ise, kişinin immün yetmezliklerinin virüslere özellikle de HIV' de dahil olmak üzere çok geniş bir aktivite spektrumuna sahip olduklarını da göstermektedir (Wérthen ve diğerleri, 2004; Krebs ve Diğerleri, 2005). PHMB pek çok yerde;

oftalmolojide (Kramer, 2002), ağız yıkamada (Rosin, 2002), perioperatif temizlik maddesi olarak (Kramer, 1997) kullanılmaktadır (Petrrou-Binder, 2003). Ayrıca PHMB, havuzların dezenfektanlarında, kozmetik ürünlerinde, deri koruyucularda, lenslerin dezenfektanlarında, temizleyicilerde, ve yapıştırıcılar benzeri teknik sıvıların tedavisinde de kullanılmaktadır (Kaehn, 2010).

Bununla birlikte, bilimsel literatürde PHMB' nin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ilişkin yeterli bilgi bulunmamaktadır. Kimyasal ve fiziksel özellikleriyle ilgili sınırlı sayıda makale bulunmaktadır, bu sınırlı sayıdaki makalelerden bir tanesinde sentezlenen malzemenin karakterizasyonundan bahsedilmiştir (East, G.C.; McIntyre, J.E.; Shao, J., 1997). Mevcutta bulunan literatürler, ticari PHMB' nin bazı özelliklerini içermektedir; ancak, verilerin nasıl elde edildiğine ilişkin ayrıntılardan yoksundur. Moleküler ağırlık gibi temel özelliklerine bile net olarak ulaşamamakta ve buda birçok yanlışlığa yol açmaktadır (Britz, J.; Meyer, W.H.; Wegner, G., 200).

İKİNCİ BÖLÜM

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1 Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür (PHMB) Kavramsal Tanımı

Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür (PHMB), çok çeşitli antimikrobiyal uygulamalarda kullanılan bir polimer olan kimyasal bir biyosittir. Kozmetikte ilgili bütün ürünlerde, vücut bakım ürünlerinin içerisinde, çamaşırların yumuşatıcı kısımlarında, kontakt lenslerin solüsyon kısımlarında ve daha birçok yerde aktif şekilde kullanılmaktadır.

Kozmetiksel ürünler içerisinde, meyvelerin ve sebzelerin korunma durumlarında kullanımları yine çok sık karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca ıslak mendillerin etkisini uzun sürede korumak için de kullanılır; tekstillerde kokuyu kontrol etmek; yara irrigasyonu ve steril pansumanlarda mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için kullanımları görülmektedir. Bu çalışmamız genel manada, sentez yöntemlerinden, etki biçiminden, antimikrobiyal etkilerden ve hem insanlara hem de çevreye yönelik güvenlik hususlarından kapsamlı bir PHMB'nin antimikrobiyal ve insektisidal aktivitesinin araştırılması literatürünü sunmaktadır.

2.1.1 Dezenfektan Madde Kavramsal Tanımı

Dezenfektan madde, cansız nesneler ve yüzeyler üzerindeki zararlı mikroorganizmaları (yani bakteri, virüs veya mantar) kontrol etmek, önlemek veya yok etmek için kullanılan bir maddedir. Patojenik mikroorganizmaların çoğunu yok eder veya geri dönüşümsüz olarak etkisiz hale getirir (Ewart, 2001; EPA, 2004; Quinn ve Markey, 2001; Kennedy ve diğerleri, 2000). Kimyasal dezenfektanlar yaklaşık 150 yıl önce bilimsel olarak kullanıldı, ancak daha eski zamanlarda da ampirik uygulamalarda kullanılmıştır. O zamandan beri birkaç yeni biyosit piyasaya sürülmüştür ve bunların mikroorganizmalara karşı aktiviteleri hakkında önemli miktarda araştırma yapılmıştır.

Yaygın olarak kullanılan bu biyosit, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından gözden geçirilmiş ve mesleki kullanıcılar dışında, halk veya çevre üzerinde çok düşük seviyede olumsuz sağlık etkileri riskine sahip olduğu belirtilmiştir (EPA, 2005). PHMB, bakteri hücre duvarındaki fosfolipidlerin negatif yüklü fosfat baş gruplarına bağlanır, sertliğin artmasına neden olur, polar olmayan segmentleri hidrofobik alanlara yayılarak, zar yapısını bozar ve ardından hücre ölümüyle sonuçlanmıştır (Kaehn, 2010). Bunun neticesinde PHMB' ye direnç kazanan bakteri vakası bildirilmemiştir.

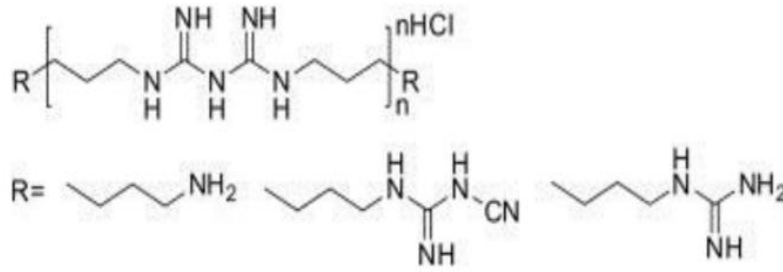
2.2 PHMB Sentezi ve Hazırlanma Süreci

PHMB ilk olarak Rose ve Swain (1954) tarafından sentezlenmiştir. Çok çeşitli antibakteriyel uygulamalarda kullanılan katyonik bir biguanid polimeridir (O'Malley ve diğerleri, 2007). PHMB hazırlamak için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Örneğin, mevcut yöntemlerden biri, sodyum disiyanamid ve heksametilen diaminin iki aşamada polikondenzasyonu ile PHMB elde etmektir (de Paula ve diğerleri, 2011). PHMB' nin preparasyonları, ağırlıklı ortalama sayısı (n) 12 tekrar eden heksametilen biguanid birimi olan polimerik biguanidlerin polidispers karışımlarıdır. Molekülün heterojenliği, her zincirin terminal pozisyonlarında herhangi bir kombinasyonda ya amin ya da siyanoguanidin ya da guanidin uç gruplarının mevcudiyeti ile daha da artar (Wei ve diğerleri, 2009).

2.3 PHMB Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür, INCI ile kimyasal adı: Poliaminopropil Biguanid ve IUPAC Adı: N-(3-Aminopropil)-İmidodikarbonimidik Diamid'in Homopolimeri. PHMB, saf formda > %94,2 saflıkta, renksiz, kokusuz, aşındırıcı olmayan ve tahriş edici olmayan antimikrobiyal biyosit katı/tozunu temsil eden bir polimerdir. % 40 civarında iyi bir suda çözünürlüğe sahiptir. Ayrıca alkolde çözünür ve boyalar ve cilalar için yaygın çözücüler olarak kullanılır (ECA, 2010). 2670 ile 4216 Da

arasındaki ortalama moleküler ağırlıklar (SCCS, 2015). PHMB, yapısının $[-(\text{CH}_2)_6\text{NH.C(=NH)}]$ omurgasında polimerik biguanid birimlerine sahip pozitif yüklü bir polimerdir. $\text{NH.C(=NH).NH-}]_n$, (Şekil 1), burada n, 2 ila 40 arasında olup, ortalama 11 değerindedir [Dugard ve Mawdsley, 1982]. Bu özellikler onu teknolojik uygulamalar için ilginç bir molekül haline getirir: Ana molekülü biguanid kadar iyi bir metal şelatördür (de Paula, 2011); beş konjuge amin, çoklu hidrojen bağlarıyla komşu moleküllere bağlandığında, moleküler üstü kimya için çekici olacaktır (Lebel ve diğerleri, 2006)(Britz ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.1 : PHMB ve terminal gruplarının kimyasal yapısı.

2.4 PHMB Eylem Modu

Mükemmel antimikrobiyal aktiviteleri, kimyasal olarak stabilite olma durumu, düşük toksisite hali ve makul maliyetlerinden kaynaklı dünya genelinde pazarlanmış bulunan katyonik bir biyosit olarak karşımıza çıkmaktadır (Vantocil, 2005; Roth ve Brill, 2010). Birincil etki bölgesi sitoplazmik membrandır ve bunun sonucunda membran geçirgenliğinin modifikasyonu meydana gelir. PHMB, bakteri hücre duvarındaki fosfolipidlerin negatif yüklü fosfat baş gruplarına bağlanır, sertliğin artmasına neden olur, polar olmayan bölümleri hidrofobik alanlara yayılır, hücre ölümü ile sonuçlanan sitoplazmik zar yapısını bozmaktadır. Bu etkinin, PHMB' nin sitoplazmik membrandaki asit fosfolipidlerle elektrostatik etkileşiminden kaynaklandığı gözlemlenmiştir. Hücresel organizmalara karşı etkinlik, bir heksametilen grubu olan esnek bir aralayıcıya bağlanan çok temel biguanid grubundan kaynaklanmaktadır. Maksimum biyosidal verim,

biguanid grupları arasında aralayıcı olarak altı metilen grubu kullanıldığında elde edilir (Kaehn, 2010). Belirli antibiyotiklerde (penisilinler, basitrasin ve novobiyosin) tam tersine, bakteri duvarları öncüllerinden çok birikimi olmamaktadır; tahribatları, hücre duvarlarının parçalanmadan zarların yırtılıyor olma halleri ve geçirgenlik kayıplarından kaynaklanmaktadır (Butcher, 2012).

2.5 Antimikrobiyal Aktivite Kavramına Genel Bakış

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı in-vitro etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir.

2.5.1 Kantitatif Duyarlılık Testleri

2.5.1.1. MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) Yöntemi

Farklı konsantrasyonlarda denenen ve antimikrobiyal bileşenin mikrobiyal gelişimi tamamen durdurduğu en düşük konsantrasyon Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MIC) olarak tanımlanmaktadır. MIC belirlemek için katı agar ya da sıvı besi ortamında antimikrobiyal aktivitelerinin hazırlanması çok sık kullanılan yöntemler arasındadır (Kim ve ark.,1995; Lambert ve ark., 2000). İnkübasyon sıcaklığı ve inokulum miktarı bir antimikrobiyalin MIC değerinin belirlenmesinde en önemli etkenlerdir. Son yıllarda geliştirilen Bioscreen Microbiological Growth Analyzer cihazı ile aynı anda çok sayıda mikroorganizmanın ve antimikrobiyalin araştırma olanağına erişilmiştir (Tassaou ve ark., 2004).

2.5.1.2 MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon) Yöntemi

Minimum Bakteri Öldürücü Konsantrasyon (MBC) genellikle antibiyotiklerle ilgilidir. Bakterileri öldürmek için belirli bir antibiyotiğin ne kadarının gerekli olduğunun bir

ölçüsüdür. Laboratuvar analizleri, bir doktora hastanın tedavisinde yardımcı olmak için bakteriyel enfeksiyondaki bir ilacın MBC'sini değerlendirebilir.

Antibiyotikler bakterileri olumsuz etkileyen ilaçlardır. Bazı bakteriyel türler bazı antibiyotiklere karşı hassastır, ancak doktor hangi antibiyotiğin hangi dozunun uygun olduğunu bilmiyor olabilir veya enfeksiyonun antibiyotik tarafından tedavi edilip edilemeyeceğini bilemeyebilir. İlacın düşük bir dozu bakterilerin büyümesini engelleyebilir ve bu nedenle enfeksiyonun daha da kötüleşmesini önleyebilir. Bu doz konsantrasyonuna minimum inhibisyon konsantrasyon (MIC) denir. MIC konsantrasyonunda bir antibiyotik dozu, mevcut bakterileri öldürmez.

Öte yandan, Minimum Bakteri Öldürücü Konsantrasyon antibiyotiğin bakterileri öldürdüğü konsantrasyondur. Bu bilgiler, yan etkileri durumunda hastasını gereksiz ilaç seviyelerine maruz bırakmak istemeyebilecek bir doktor için faydalıdır. Bilinen bir Minimum Bakteri Öldürücü Konsantrasyon aynı zamanda daha kısa bir antibiyotik rotası oluşturabilir.

2.5.1.3 Makrodilüsyon

Bu yöntem deney tüplerinde gerçekleştirilir ve seri dilüsyona ihtiyaç duyar. Mikrodilüsyon testinden farkı denenen antibiyotiklerin büyük hacimde gerçekleştirilmesidir. İki kat seri sulandırma sonucunda antibiyotiklerin belirli mikroorganizmalara karşı MIC değerleri belirlenebildiğinden kantitatif sonuç alınabilir. Disk difüzyon testine göre daha hassas bir test olmasına karşın daha çok iş gücü gerektiren bir yöntemdir.

Mikroorganizmalar mikropipetler ile deney tüplerine ekilir. Deney tüpleri 37 °C'de 18-24 saat boyunca inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında, deney tüplerindeki gelişim gözle gözlemlenere ölçümleri yapılır. Ölçülen değer CLSI ya da EUCAST gibi kurumların bildirmiş olduğu standart değerlere göre karşılaştırılarak mikroorganizmanın o antibiyotiğe karşı duyarlı ya da dirençli olduğu belirlenir.

Bu deneyde hiç antibiyotik içermeyen fakat mikroorganizma ve besiyeri içeren tüpler pozitif kontrol olarak kullanılır. Benzer şekilde antibiyotik ve besiyeri içeren fakat

mikroorganizma içermeyen tüpler negatif kontrol olarak kullanılır. Pozitif kontrolde üreme olmaması ya da negatif kontrolde üreme olması durumunda deney tekrar edilir.

2.5.1.4 Mikrodilüsyon

Sıvı dilüsyon yönteminin en fazla 500 µL kapasiteli mikrotitrasyon kuyucuklarında yapılmasıdır. Genelde 100 µl hacimde kuyucuk başına düşen yaklaşık bakteri sayısı 5×10^4 CFU'dur. Yukarıda belirtilen yöntemler standart yöntemlerdir. MIC belirlemek için bunların dışında antibiyotik gradyent yöntemleri (spiral gradient endpoint), Flow Cytometer, E test (Epsilometer, AB Biodisk, Sweden) gibi yöntemlerle MIC belirlenebilir. 1980 yılında ABD'de laboratuvarların %80'i kalitatif testler kullanırken 1991'e gelindiğinde %73'ü kantitatif test kullanır hale gelmiştir.

2.5.1.5 Disk Difüzyon Tekniği

Kirby-Bauer yöntemi olarak da bilinen bu teknikte, test mikroorganizmanın 6-8 saatlik kültüründen Mueller-Hinton 31 besiyerine 0,1-0,2 ml miktarında ekilmekte ve yüzeye iyice yayılmaktadır (steril swab bu amaçla kullanılabilir). Agarın yüzeyi oda sıcaklığında 5-10 dakika kuruduktan sonra yüzeye çeşitli konsantrasyonlarda değişik antibiyotikleri içeren diskler yerleştirilir ve 24-48 saat inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülür ve Standard zone tablosu ile karşılaştırılarak duyarlı/orta duyarlı/duyarsız olarak değerlendirme yapılmaktadır. Belirlenen zone çapına göre MIC değerini de bulmak mümkündür (Andrews 2002, Lalitha 2004). Bu yöntemde en önemli nokta, ilk 24 saat içinde inhibisyon zonu içinde hiçbir koloni görülmezken, inhibisyon 48 saate çıkarıldığında, bu zone içinde koloniler oluşmaya başlamaktadır. Bu durumda MIC ve MBC değerlerini kesin belirlemede acele edilmemesi gerekmektedir (Arda 2000).



Şekil 2.2 : Disk difüzyon

2.5.1.6 Çalkalamalı Agar Tekniği (18+2) Kuralı

Kasyon eklenmiş MHA besiyeri kullanılır. Test için 96-kuyucuklu U-tabanlı mikroplak Antibiyotik konsantrasyonları dilüe edilir. İnkübasyon 35°C de 16-20 saat MIC, mikroorganizmanın kuyucuklardaki üremesini tamamen inhibe eden ve gözle gözlemlenerek belirlenen en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonudur.

Pek çok katı besi yeri ortamı, besin maddeleri içeren solüsyonların agar ile katılaştırılması sonucu jel gibi (jelly-like) yapısal özellik kazanır. Agar mikrobiyologlar için ideal bir katılaştırıcıdır. Agar *Gelidium* adlı kırmızı deniz alginden elde edilen kompleks bir polisakkarittir. Bakteriler ve funguslar agarı kompleks yapısından dolayı parçalayamazlar, böylece agar sadece besi ortamlarını katılaştırma görevi görür. Agar ayrıca taşıdığı özel erime özelliğinden dolayı da katılaştırıcı olarak kullanılır. Çünkü katı agar 90-100°C’de erir, sıvı agar da 42°C civarında katılaşır ve 37°C’de erimez.

Sıvı besi ortamı gerekli besin bileşenlerinin sadece suda eritilmesi ile elde edilir. Sıvı besi ortamına agar ilavesi ile katı besi ortamı elde edilir.

2.5.1.7. İnsektisidal Aktivite

Doğal insektisitlerle alakalı gerçekleşen bilimsel araştırmalara olan ilgi durumu ülkemizde de her geçtiğimiz gün ciddi artış yaşanmaktadır. Bitkisel merkezli pestisit kaynaklarını net şekilde araştırmak üzere son 30 senedir ciddi araştırmalar yapılmıştır. Bu konjektörde ülkemizde yayılım göstermekte olan pek çok bitki türlerinden elde

edilmiş olan ekstre ve sekonder metabolitlerin değişik böcek çeşitlerine karşı insektisidal etkilerine sahip olduğu gözlemlenmiştir (Cetin H, Yanikoglu A. 2006). Örneğin ülkemizde yetişmekte olan *Inula viscosa* L., *Pimpinella anisum* L., *Ononisnatrix* L., *Melissa officinalis* L., *Origanum onites* L. ve *Teucrium divaricatum sieber* bitki çeşitlerinin mantar sineğine karşı toksik özellikleri gözlemlenmiştir (Erler F, Polat E, Demir H, Cetin H, Erdemir T. 2009).

Tüm bunlar arasından ekolojik tarım kapsamında kullanımları serbest olanlardan *Chrysanthemum cineraria* bitkilerinden elde edilmekte olan, muhtemelen bir sinerjistik ihtiva etmekte olan pyrethrin esaslı preparatlar senelerdir ısırıcı veemici böceklerle karşı kullanılmaktadır ve dahası arılara karşıda zehirsiz olduğu bilinmektedir. (Schoonhoven LM. 1982). Nane, çam, kimyon yağları insektisit ve akarisit, olarak kullanılmaktadır.

Çağımızda ticari preparatları olan *Azadirachtin*, Neem ağacı (*Azadirachta indica*, *Meliaceae*) tohumlarından elde edilmekte olan bir limonoid olup, bir çok böceğe karşı etkin bir beslenmeyi engelleyici ve büyüme engelleyici olarak kullanılmaktadır (Isman M.,1997) (Kısmalı Ş, 1988).

2.6 Literatür Taraması

Polihekzametilen Biguanitler (PHMBs) çok geniş kullanım alanları bulunan biyositlerin başında gelmektedir. Ristic ve diğ, (2014) tarafından yapılan çalışma da, yüzme havuzlarında dezenfekte etmek amacıyla, beraberinde de gıda endüstrisi bağlamında, hastanelerde antiseptik şekilde, kozmetik ürünler içerisinde koruyucu madde olarak, kişisel bakım ürünleri kapsamında, kumaş işlemlerinin işlenmesi sırasında yumuşatıcı şeklinde ve bilhassa da kontak lens solüsyonlarında antibakteriyel/antifungal malzeme olarak kullanıldığı bilinmektedir.

Chindera, K., Mahato, M., Kumar Sharma, A., Horsley, H., Kloc-Muniak, K., Kamaruzzaman, N. F., ... & Good, L. (2016) tarafından yapılan çalışmada, enfeksiyonla ve antimikrobiyal dirençle mücadele etmek için, ilaç etki mekanizmalarını aydınlatması için yararlanılmıştır. Burada yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal Polihekzametilen Biguanid'in (PHMB) bakterileri konak hücreler üzerinde seçici olarak nasıl öldürdüğü ortaya konulmuştur. PHMB tarafından kabul edilen mikrobiyal membran bozulması

modelinin aksine, bir dizi bakteri türüne hücre girişleri gözlemlenmiştir ve tedavi edilen bakteriler, alternatif bir antimikrobiyal mekanizma olarak DNA bağlanmasını sağlayan, hücre bölünmesi durması ve kromozom yoğunlaşması sergilemiştir. DNA düzeyinde bir mekanizma, PHMB' nin izole edilmiş bakteri kromozomal DNA'sı ile karıştırıldığında nanopartiküller oluşturduğu ve bunun büyüme üzerindeki etkilerinin, DNA bağlama ligandı Hoechst 33258 ile ikili kombinasyon ile baskılandığı gözlemleriyle doğrulanmıştır. PHMB ayrıca memeli hücrelerine girmiş ancak endozomlar içinde sıkışıp kalmıştır ve çekirdeklerden hariç tutulmuştur. Bu nedenle PHMB, bakteri ve memeli hücresel DNA' sına farklı erişim göstermektedir ve bakteri kromozomlarını seçici olarak bağlamaktadır ve yoğunlaştırmaktadır. PHMB' ye karşı kazanılmış direnç bildirilmediği için, seçici kromozom yoğunlaşması, dirence yenik düşmeyebilecek antimikrobiyal etki için beklenmeyen bir paradigma sağlamaktadır.

Ranganath, (2011) tarafından yapılan çalışmada, PHMB'nin tekstil ürünlerinin işlemlerinde selülozik liflerle hidrojen bağlarını oluşturmuş olduğu ve selülozik lifler üzerinde çok iyi çalıştığı bulunmuştur. PMHB ile işlem görmüş kumaşların bakterilerle temasları oluştuğunda, biyosit bakteri yüzeyleriyle etkileşimler oluşturarak sitoplazma ve bakteri zarındaki sitoplazmik fosfolipidlere transferleri olduğu gözlemlenmiştir. Biyosit pozitif yüklüdür ve bundan kaynaklı da temelde negatif yüklü birimle reaksiyon oluşturarak organizmanın ölümlerine neden olmaktadır.

Ristic ve diğ., (2014) tarafından yapılan çalışmada da, bilhassa da selülozik kumaşların yapımlarında ve kullanımlarında antimikrobiyal sentez işlemlerinde dikkatleri üzerine çekmiştir. Katyonik yapılarından kaynaklı poliheksametilen biguanit, iyonik bağın yanı sıra selüloz malzemeleriyle hidrojen bağlarını oluşturmaktadır. Daha düşük seyreden konsantrasyonlardada, selüloz içerisindeki PHMB ve karboksilik asit grupları içerisindeki elektrostatik etkileşimin daha baskın olduğu ortaya konulmuştur. Fakat bu durumun tam tersi olarak, PHMB'nin konsantrasyonunda artışlar görüldükçe de, selüloz ile hidrojen bağları giderek baskınlaştığı ortaya konulmuştur.

Llorens, E., Calderón, S., Del Valle, L. J., & Puiggalí, J. (2015) tarafından yapılan çalışmada, klorheksidin (CHX) ile ilgili düşük moleküler ağırlıklı bir polimer olan Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür (PHMB), iyi bilinen bir antibakteriyel maddedir. Bu çalışmada, antibakteriyel özelliklere sahip 3 boyutlu biyolojik olarak

parçalanabilen yapı iskeleleri elde etmek için elektro-eğirme ile PHMB yüklü polilaktid (PLA) nanolifleri üretilmiştir. CHX yüklü PLA lifleri kontrol olarak kullanılmıştır. Elektropsun fiberler, SEM, FTIR, DSC ve temas açısı ölçümleri ile incelenmiş ve analiz edilmiştir. Yüklü iskelelerden PHMB ve CHX salınımları, ayrıca antibakteriyel aktiviteleri ve biyouyumlulukları değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, yüklenen PHMB miktarının artmasıyla nanoliflerin daha düzgün hale geldiğini ve çaplarının küçüldüğünü göstermiştir. Bu özellik, iskelenin hem yüzey pürüzlülüğünün hem de hidrofobikliğin artmasına neden olmuştur. PHMB salımı, ortamın hidrofilikliğine büyük ölçüde bağlıdır ve CHX için belirlenenden farklıdır. Son olarak, PHMB yüklü PLA iskeleleri, yapışmayı ve bakteri üremesini engelledikleri ve hem fibroblast hem de epitel hücre hatlarının yapışması ve çoğalması için biyouyumlu özellikler sergiledikleri için antibakteriyel özellikler göstermiştir.

Eberlein, T., Haemmerle, G., Signer, M., Gruber-Moesenbacher, U., Traber, J., Mittlboeck, M., ... & Strohal, R. (2012) tarafından yapılan çalışmada ise; ağırlı, kritik derecede kolonize (risk altındaki yaralar) veya lokal olarak enfekte yaralarda poliheksanid içeren biyoselüloz yara örtüsü (BWD+PHMB) ile en iyi yerel standart gümüş yara örtüsü (Ag) ile tedaviyi karşılaştırılmıştır. Çeşitli etiyojilere sahip yaraları olan, başlangıç VAS ağrı skoru ≥ 4 olan ve yarı kantitatif bakteri yükü ++ veya daha yüksek olan hastalar, BWD+PHMB veya Ag ile tedavi görmek üzere rastgele ayrılmıştır ve sistemik enfeksiyonu olan ve/veya sistemik antibiyotik kullanan hastalar çalışma dışı bırakılmıştır. Birincil son nokta, hasta tarafından bildirilen ağrı (gece, gün içinde, pansuman değişikliklerinden önce ve 15 dakika sonra alt skorlar dahil olmak üzere VAS toplam ağrı), tedavi grupları arasında karşılaştırılmıştır ve 0, 1, 3, 7, 14, 21 ve 28. bakteri yükü, yara yatağı ve yara çevresindeki cilt durumu, yaşam kalitesi ve pansuman kullanımına ilişkin ikincil sonuçlar aynı ziyaretlerde değerlendirilmiştir. Otuz sekiz hasta (BWD+PHMB, n=21 [24 yara]; Ag, n=17 [18 yara]) analizlere dahil edilmiştir. Temel değişkenler önemli bir farklılık göstermemiştir. Pansuman değişikliklerinden önce BWD+ PHMB ($p < 0.001$) için daha iyi bir ağrı azalması ile birlikte her iki grupta da yara ağrısı önemli ölçüde azalmıştır. Ag ile karşılaştırıldığında, BWD+PHMB grubunda kritik kolonizasyon ve lokal yara enfeksiyonu 28 günlük çalışma süresi boyunca önemli ölçüde daha hızlı ve daha iyi azalmıştır ($p < 0,001$).

İyileştirilmiş yaşam kalitesi, iyi tolere edilebilirlik ve her iki grup için de herhangi bir yan etki gösterilmemiştir.

Hem BWD+PHMB hem de AG, ağrıyı ve bakteri yükünü azaltmada etkili olduğu ortaya konulmuştur. Bununla birlikte, BWD+PHMB'nin kritik bakteri yükünü gidermede önemli ölçüde daha hızlı ve daha iyi olması, bu sargıyı kritik olarak kolonize ve lokal olarak enfekte yaraları tedavi etmek için çekici bir terapötik seçenek haline getirmektedir.

Moore, K., & Gray, D. (2007) tarafından yapılan çalışma da, ameliyat sonrası yara enfeksiyonları iyileşmenin gecikmesine, hastanede kalış süresinin uzamasına ve maliyetlerin artmasına neden olabileceği aktarılmıştır. Antibiyotiğe dirençli bakterilerdeki artış, antibiyotiklerin profilaktik kullanımını azalttığı ortaya konulmuştur. Etkili bir alternatif, direnç oluşturma olasılığı daha düşük olan antiseptiklerin kullanılması durumudur. AMD yara örtüleri, yara hücreleri için düşük toksisiteye sahip olan ve antibiyotiğe dirençli bakterileri öldürmede etkili olan Poliheksametilen Biguanid (PHMB) kullanır. Bu makalede, standart yara bakım protokollerinde rutin olarak kullanıldığında cerrahi alan enfeksiyonlarının önlenmesinde AMD pansumanlarının etkinliği ve maliyet etkinliğine ilişkin kanıtları gözden geçirilmiştir.

Messick, C. R., Pendland, S. L., Moshirfar, M., Fiscella, R. G., Losnedahl, K. J., Schrieffer, C. A., & Schreckenberger, P. C. (1999) tarafından yapılan çalışmada da, fungal keratit, hem teşhis edilmesi hem de tedavisi zor olan bir enfeksiyon olduğu aktararak, *Candida albicans*, diğer mayalar ve bölmeli küfler, *Fusarium spp.* ve *Aspergillus spp.*, bu hastalığın yaygın nedenleri olarak gösterilmiştir. Tedavi seçenekleri sınırlıdır ve natamisin (%5), amfoterisin B (%0,15) ve flukonazolün (%1) topikal formülasyonlarını içermektedir. Bununla birlikte, bu ajanların etkinlikleri, zayıf oküler penetrasyon, zayıf tolere edilebilirlik ve/veya zayıf in vitro aktivite nedeniyle tehlikeye girdiği açıktır. Halihazırda çevresel biyosit ve kontakt lens dezenfektanı olarak kullanılan Poliheksametilen Biguanid'in (PHMB), çok çeşitli mantar patojenlerine karşı mükemmel in vitro aktiviteye sahip olduğu ve 200 mg'lık konsantrasyonlarda etkili ve iyi tolere edildiği gösterilmiştir. Bu çalışma, enfektif keratit ile ilişkili mantar izolatlarına karşı PHMB' nin in vitro aktivitesini değerlendirmek için yapılmıştır.

Çalışmada kullanılan organizmalar, Illinois Üniversitesi Hastanesi, Chicago, IL, ABD (n= 10), Columbia Wesley Tıp Merkezi, Wichita, KS, ABD'deki (n= 10) hastalardan izole edilen 25 *Candida albicans* izolatını içermiştir.) ve St Vincent's Mercy Medical Center, Toledo, OH, ABD (n= 5), Illinois Üniversitesi Hastanesi'ndeki bir hastadan elde edilen tek bir *Aspergillus niger* izolatı ve American Type tarafından sağlanan aşağıdaki dört suş Kültür Koleksiyonu, Rockville, MD, ABD: *Candida albicans* 24433; *Candida parapsilosis* 22019; *Candida krusei* 6258 ve *Fusarium solani* 44366. PHMB %20 Zeneca Biocides, Wilmington, DE, ABD' den elde edilmiştir.

Butcher, M. (2012) tarafından yapılan çalışmada, Yara enfeksiyonu, bireyin bağışıklık sistemi, yaranın durumu ve mevcut bakterilerin sayısı ve virülansı arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklandığı aktarılmıştır. Zayıf kan temini, hipoksi ve metabolik bozukluklar gibi altta yatan tıbbi problemler de katkıda bulunan faktörlerdir. Bakteri türlerinin gelişmesine izin verilirse, yara enfeksiyonu sürekliliğinde ana hatlarıyla belirtildiği gibi kolonizasyon, kritik kolonizasyon veya yara enfeksiyonu durumları meydana gelecektir. Bu sadece hastaya pahalıya mal olmakla kalmaz, aynı zamanda sağlık hizmeti sağlayıcıları için ciddi mali ve yasal sonuçlar doğurmaktadır. Yara biyolojik yükünün etkin yönetimi yoluyla enfeksiyon riskini azaltmak bu nedenle yara bakımının önemli bir yönüdür. Bakteriyel biyolojik yükün etkin yönetimi, yara bakımının önemli bir unsuru olduğu aktararak, son yıllarda kolonizasyon ve enfeksiyonu kontrol etmek için topikal antimikrobiyal sargıların kullanımının arttığı görülmüştür, ancak bazılarının yara iyileşmesini engelleyebileceği ve sistemik sekellere sahip olabileceği endişesi vardır (World Union of Wound Healing Societies (WUWHS), 2008). Bu makale, Birleşik Krallık'ta nispeten az kullanılan bir antimikrobiyal bileşik olan PHMB'nin güvenliği ve etkinliğine odaklanmakta ve bakteri kolonizasyonu ve enfeksiyonunun yönetimi için etkili bir seçenek olduğunu iddia etmektedir.

Creppy, E. E., Diallo, A., Moukha, S., Ekl-Gadegbeku, C., & Cros, D. (2014) tarafından yapılmış olan; Poli(HeksaMetilen Biguanid) Hidroklorür (PHMB) CAS No., biguanidlerin antiseptik kimyasal grubunun özellikle etkili bir üyesidir ve ellili yılların başından beri sayısız uygulamada kullanılmaktadır. PHMB genotoksik olmasa da, PHMB'nin kategori 3 kanserojen olarak sınıflandırılması önerilmiştir. PHMB'nin, DNA bazlarının genotoksik olmayan modifikasyonları, DNA metilasyonu ve mitojenik sitokin üretimi dahil olmak üzere epigenetik özelliklere sahip olabileceği varsayılmıştır.

Bu özellikler, 3 hücre tipi kullanılarak in vitro olarak değerlendirilmiştir: İşlevsel olmayan bir p53 genine sahip Caco-2 hücreleri (bir insan kolon adenokarsinomundan), N2-A (Neuro-2A hücreleri, fare nöral hücreleri), beyin kemirgenlerde olası bir hedef organdır ve fonksiyonel p53 geni ile HepG2 hücrelerinde (insan hepatoselüler karsinomu) bulunmaktadır. 1 µg/mL konsantrasyonundan 20 µg/mL PHMB'ye kadar, ne büyüme uyarımı ne de inhibisyon etkisi gözlenmemiştir. Nötr kırmızı kullanılarak canlılık testi, 3 saat boyunca PHMB ile tedaviden sonra 20-25 µg/mL'lik bir IC50'ye yol açarken, MTT testi, HepG2 hücreleri, Neuro-2A hücreleri ve Caco-2 hücreleri. PHMB, önemli oksidatif stres (MDA üretimi veya lipoperoksidasyon) indüklemeyen veya DNA'nın (8-OH-dG) hidroksilasyonunu ve/veya hipermetilasyonunu (m5dC) indüklemeyen; ikincisi, DNA replikasyonu ve düzenlenmesi ve hücre bölünmesi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. PHMB, TNF-α (tümör nekroz faktörü), interleokinler (IL-1 α) ve transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF-κB) gibi apoptoza neden olabilen veya transforme hücrelerin veya tümörlerin büyümesi 20 ila 100 µg/mL konsantrasyonları yerine, PHMB 3 saatten daha kısa bir sürede her türden hücreyi öldürür. Proapoptotik gen bax ve diğerleri, anti-apoptotik bcl-2 ve kaspaz-3, RT-PCR ile değerlendirilmiştir. Son olarak, PHMB varlığında GAP-bağlantılarının (GJIC) durumu belirlenmiştir ve olmadığı görülmüştür. Ayrıca önemli ölçüde de etkilenmiştir. Elde edilen veriler, in vitro PHMB'nin, hücre lizisinin hızla meydana geldiği daha yüksek konsantrasyonlarda bazı sitokinlerde ve transkripsiyon faktöründe hafif bir artış dışında net ve dikkate değer epigenetik özellikler sergilemediğini göstermektedir.

Zamirbekova ve ark. (2020) tarafından yapılmış olan çalışmada, yara ile ilgili PMBH'nin antiseptik bir ilaç olarak kullanımı üzerinde durulmuştur. Yara, cilt bütünlüğü bozulmuş canlı dokunun anatomik ve fonksiyonel devamlılığının kaybıdır. Veteriner hekimlikte yara genellikle trafik kazaları, düşmeler, kesici ve delici aletler, silah yaralanmaları ve ısırma nedeniyle oluşur (Murphree, 2017). Normal yara iyileşmesi genellikle iyi yönetilen bir dizi onarım sürecini takip eder.

Karmaşık biyokimyasal yollar ve hücreler arası etkileşimler, hemostaz, inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon fazının sırayla ilerlemesini sağlar (Bayındır, 2007). Yara iyileşmesini etkileyen birçok lokal ve sistemik faktör vardır. Lokal faktörler, yara bölgesinde enfeksiyon, yetersiz kan dolaşımı, hipoksi, doku nekrozu, yabancı partiküllerin varlığı, tekrarlayan travmalar ve yara bölgesinin hareketliliğidir. Sistemik

faktörler; beslenme yetersizliği, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, immün yetmezlik ve kortikosteroid kullanımı gibi hastalıklar, hastanın yaşı ve genetik yapısıdır (Hanna ve Giacomelli 1997, Robson ve ark. 2001). Birçok yara sorunsuz iyileşirken, doku onarım süresinin uzamasıyla birlikte birçok kronik yarada iyileşme sorunları oluşmakta ve açık yaralar gözlenmektedir. Kronik bir yaranın iyileşme yeteneğinin kaybı, yara onarımının doğal aşamalarında bir yerde bir bozulma olduğunu gösterir (Moore ve ark., 2006). Açık yaraların iyileşmesi genellikle inflamatuvar fazda veya proliferatif aşamada durur. Uzun süre iyileşmeyen yara bölgesi, mikroorganizmalar için mükemmel bir kültür ortamı oluşturur (Woo ve ark., 2007).

Yara enfeksiyonunun yara iyileşmesinin inflamatuvar fazını uzatarak hastada ağrı ve rahatsızlığa neden olabileceği ve uygun şekilde tedavi edilmediği takdirde ciddi ve potansiyel olarak ölümcül sistemik sepsise yol açabileceği görülmektedir (Consensus Panel, 2010). Yara tedavisinde sadece sistemik antibiyotiklerin kullanılması yara iyileşmesi için çoğu zaman yetersiz kalmaktadır. Topikal antimikrobiyal ajanlar genellikle alkol bazlı, iyot bazlı, biguanidlerdir: klorheksidin glukonat ve Poliheksanid/Poliheksametilen Biguanid (PHMB), halofenoller (kloroksilenol), bisfenoller (triklosan), gümüş bileşikler ve oksijenli su. Yara enfeksiyonlarının tedavisinde topikal antimikrobiyallerin kullanımı, parenteral antibiyotik kullanımını en aza indirmek için sistemik antibiyotiklere bir alternatif olarak değerlendirilmiştir (O'Dwyer ve Demetriou, 2016). PHMB, 60 yılı aşkın süredir çeşitli endüstrilerde kullanılan ve veteriner hekimlikte nispeten yeni olan bir antiseptiktir. PHMB, bakterilerin dış ve sitoplazmik zarlarını yok ederek antimikrobiyal olarak oldukça etkilidir (O'Dwyer ve Demetriou, 2016). PHMB, yüksek doku uyumluluğu ve düşük sitotoksitesi ile en çok kullanılan yara antiseptiklerinden biridir (Wehner ve ark., 2009). PHMB bakteri, virüs ve mantarlara karşı geniş bir aktivite spektrumuna sahiptir (Moore ve Gray, 2007) ve antibiyotiklere terapötik alternatifler olarak önerilmektedir (Hancock ve Sahl, 2006).

Bu çalışmada, farklı nedenlerle kronik enfeksiyonlu yara oluşumu ile kliniğe getirilen hastaların tedavisinde % 0,1 PHMB içeren antimikrobiyal jel ve spreyin yara iyileşmesi üzerindeki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Müller, G., Koburger, T., & Kramer, A. (2013) tarafından yapılan çalışmada, Yumurta sarısı fosfatidilkolin (EPC) içeren su içinde yağ (y/a) emülsiyonları, sulu Poliheksametilen Biguanid Hidroklorür (PHMB) ile birleştirilmiştir. Sulu fazdaki PHMB konsantrasyonu, süzme santrifüjleme deneyleriyle tahmin edilmiştir. Paralel olarak, PHMB konsantrasyonu, kültürlenmiş murin fibroblastları (L929 hücreleri) üzerinde sitotoksikite deneyleri (nötr kırmızı) ve *Pseudomonas aeruginosa* veya *Staphylococcus aureus* üzerinde bakterisidal etkinlik testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Biyolojik testler hücre kültürü ortamında gerçekleştirilmiştir. Filtrasyon santrifüjleme deneyleri, biyolojik olarak etkili PHMB için yapılan deneylerden çok daha yüksek sulu PHMB konsantrasyonları göstermiştir. Bu nedenle, etkili PHMB konsantrasyonlarını doğrulamak için tercihen biyolojik test sistemleri kullanılmalıdır. Aynı % 0.05 PHMB o/w emülsiyonunun 8 kez yeniden kullanıldığı mikrobisidal etkinlik testleri, test bakterilerinin mevcudiyeti ile aktive edilen bir ilaç dağıtım sistemini ortaya çıkarılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Çalışmada kullanılan bakteri suşları

Antibakteriyel çalışılmalarda kullanılan bakteri suşları Prof. Dr. İsa KARAMAN stok kültüründen yetiştirilmiştir. Çalışmada kullanılan bakteriler çalışma proseslerinde isimlendirilmesi kolay olması açısından Human Pathogen Bacteria (HPB) olarak isimlendirilmiştir. Çalışma esnasında kullanılmakta olan bakteri türleri ise;

- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC:29133728)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC:6538)
- *Escherichia coli* (ATCC:25922)
- *Bacillus subtilis* (ATCC:6633)
- *Enterococcus faecalis* (ATCC:19433)
- *Streptococcus mutans* (ATCC:35668)
- *Listeria monocytogenes* (ATCC:51774)
- *Enterococcus faecium* (ATCC:8459)
- *Klebsiella aerogenes* (ATCC:13048)
- *Pseudomonas fluorescens* (ATCC:13525)

3.1.2 Çalışmada kullanılan fungus türleri

- *Candida albicans* (ATCC:10231)
- *Aspergillus flavus* (ATCC:9643)
- *Aspergillus niger* (ATCC:16404)
- *Alternaria alternata* (ATCC:6663)
- *Fusarium oxysporium* (ATCC:62506)
- *Didymella lycopersici* (ATCC:12263)

3.1.3 Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

- Nutrient Agar Besiyeri (NA)
- Nutrient Broth Besiyeri (NB)
- Potato Dextrose Agar Besiyeri (PDA)
- OXOID (Blank boş disk)
- Cefoperozne, Erythromycin, Gentamycin, Tetracycline
- Streptomycin, Flukonazole, Variconazole antibiyotik diskleri
- Polihexametilen Biguanidin Hydrochloride etken maddesi (PHMB)

3.1.4 Çalışmada kullanılan cihazlar ve sarf malzemeleri

- Hassas terazi
- İnkübatör
- Vorteks
- +4 °C Buzdolabı
- Steril kabin
- Pipetler
- Distile su
- Pens
- Falcon tüpleri
- Mezur
- Steril boş antibiyotik diskleri (OXOID)
- Cam plastik petri kapları
- Manyetik karıştırıcı
- Cam beher
- Otoklav cihazı
- Etüv
- Drigalski spatülü

3.2 Yöntem

3.2.2 Besiyeri Hazırlama

3.2.2.1 Nutrient Agar (NA)

Bakterilerin uygun koşullarda çoğalması ve üremesi için, 1 litre destile suda 20 gr Nutrient Agar (NA) besiyeri ilave edilip hazırlanmıştır. Daha sonra da manyetik karıştırıcıda ısıtılarak tümüyle eriyip bitene dek, 121 °C ısı da 15dk otoklova konularak sterilize edilmiştir.

3.2.2.2 Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato Dekstroz Agar ("PDA" olarak kısaltılır), mantar ve bakteri yetiştirmek için en yaygın kullanılan besiyeridir.

Fungusların çoğalması için 1 lt distile su içinde 39,0 gr Patato Dextrose Agar (PDA) çözünmesi sağlamıştır. Daha sonrasında da manyetik karıştırıcı kısmında ısıtılarak tümüyle eriyip yok olana kadar, 121 °C'de 15 dk otoklava konularak sterilize edilmiştir.

Fungusların çoğalıyor olması adına 1 lt distile su içinde 39,0 gr Patato Dextrose Agar (PDA) çözülme durumunu sağlamıştır. Daha sonrasında da manyetik karıştırıcı kısmında ısıtılarak tümüyle eriyip yok olana kadar, 121 °C'de 15 dk otoklava konularak sterilize edilmiştir.

3.2.2.3 Nutrient Broth (NB)

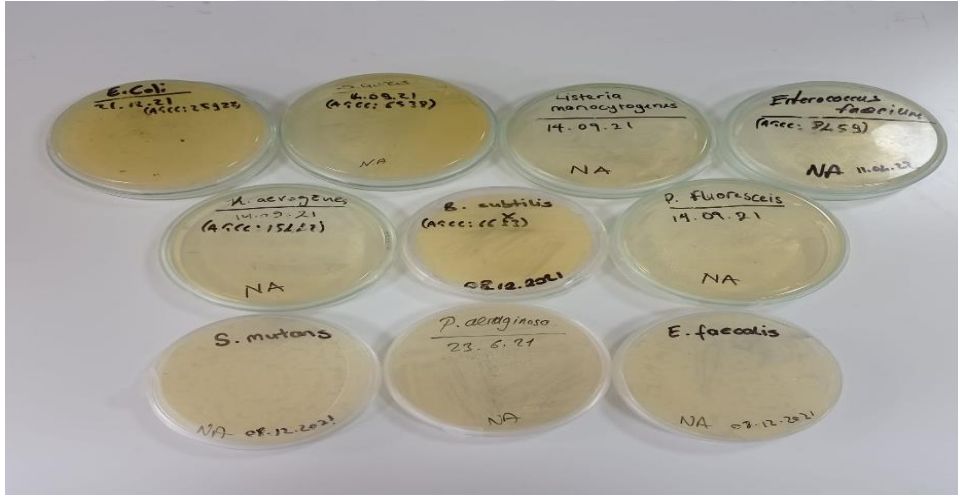
Nutrient Broth, klinik örneklerden ve diğer materyallerden çok çeşitli organizmaların kùltivasyonu için kullanılan sıvı bir besiyeridir.

1 lt distile su içerisinde 8 gr çözülerek, manyetik karıştırıcı da karıştırılıp, 121 °C de 15 dk otoklavda steril hale getirilmiştir.

Bu ortam, özel amaçlar için kan, serum, şekerler vb. gibi diğer bileşenlerle zenginleştirilebilir.

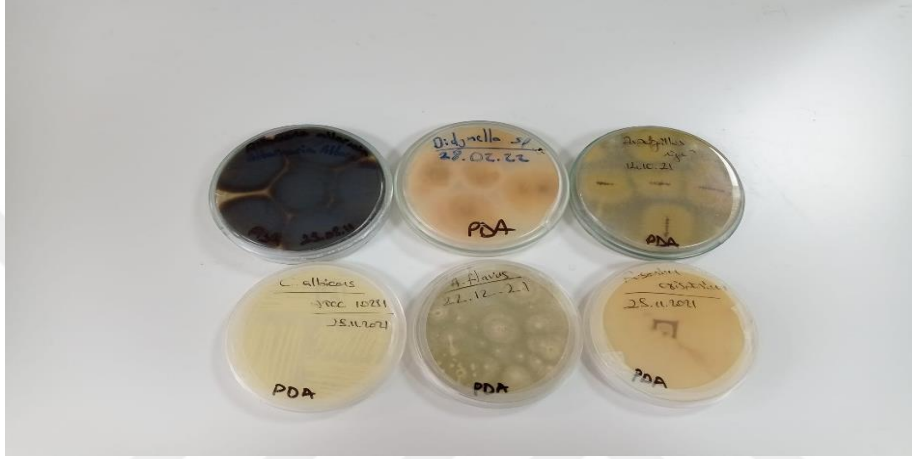
3.2.3 Saf Mikroorganizma Kültürlerinin Hazırlanması

Daha öncesinde hazırlanmış bulunan Nutrient Agar (NA) eser ölçüde steril petri kaplarına dökülüp, bakterilerin agar plaka ekimi için 18-24 saatlik sıvı besiyerinde yetiştirilen saf kültürlerden 0,5 Mc Farland standardına ayarlanarak aşı kütürü oluşturuldu. Her bakteri suşu için ayrı ayrı oluşturulacak olan inokülasyon için 100 ml bakteri suşu alınıp NA içeren petri kaplarına, drigalski spatülü ile yayma ekim tekniği uygulanmıştır.



Şekil 3.1 :Saf Kültürden Yetiştirilen Bakteriler

Funguslar için çok daha öncesinden hazırlanmış olan Potato Dextrose Agar (PDA), steril petri kaplarına dökülmüştür. Fungusların petri kaplarına ekimi için, stok saf fungus kültürden steril swaplarla fungus sporları alındığı ortaya konulmuştur. Alınan fungal sporlar besiyeri içeren boş petri kaplarına, agar plakların bütün yüzeyini kapsayacak biçimde ekimi yapılmıştır.



Şekil 3.2 :Saf Kültürden Yetiştirilen Funguslar

3.3 McFarland Ayarlama

Mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılan bakteri suşlarının (saf kültür) katı besiyerine pasajı yapıp, etüvde 24 saatlik inkübasyonundan sonra, gelişmekte olan kolonilerden sıvı besiyerine inokule edilmiştir. İnkübasyondan sonra bakterilerin çoğalması ile besiyerinde bulanıklık oluşmuştur. Bulanıklığı anlamak için McF standartları da kullanılmıştır.

Bakteriler için 0,5 Mcf, funguslar için 0,5 Mcf, mayalar için 1 Mcf standartı kullanılmıştır.



Şekil 3.3 : 1.Tüp: *L. monocytogenes* 2.Tüp: *B. subtilis* 3.Tüp: *K. aerogenes* 4.Tüp: *P. aeruginosa* 5.Tüp: *S. aureus* 6.Tüp: *E. coli* 7.Tüp: *E. faecium* 8.Tüp: *P. fluorescens* 9.Tüp: *E. faecalis* 10.Tüp: *S. mutans*

3.4 Antibakteriyel Agar Disk Difüzyon Testi

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesinde kullanılacak olan testler arasında Disk Difüzyon yöntemi bulunmaktadır. Disk Difüzyon yöntemi aynı zamanda Kirby-Bauer Metodu olarak da bilinmektedir. Bu metoda göre, daha önceden hazır olan Polihexametilen Biguanidin etken maddesinden 20 µl alınıp, 6 mm çapındaki boş antibiyotik disklere (oxid, blank disc) doğrudan emdirilmiştir.

Bakteriler üzerinde disk difüzyon tekniği uygulanırken öncelikli olarak 0,5 Mc farland standardına göre ayarlanan bakteriler NA besiyerine, drigalski spatülü ile yayma ekim tekniği ile ekilmiştir. Ekim yapıldıktan hemen sonra antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Besiyerine aynı zamanda pozitif kontrol olarak Cefoperazone (105 µg/disk) ve Erythromycin (15 µg/disk) ve Gentamycin (10µg/disk) ve Tetracycline (30µg/disk) ve Streptomycin (10 µg/disk) kullanılmıştır.

Negatif kontrol olarak, boş disklere 1 ml etken madde (PHMB) 1 ml destile suda karıştırılıp, daha sonra 20' şer µl alınıp doğrudan emdirilmiştir. Bakteriler 36,5°C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında oluşan inhibisyon çapları milimetrik cetvel kullanılarak ölçümler yapılmıştır.

3.5 Antifungal Agar Disk Difüzyon Testi

Antifungal denemelerinde, antibakteriyel disk difüzyon yönteminde kullanılan Kirby-Bauer testi olarak da adlandırılan test yöntemini uyarlayarak funguslar üzerinde test edilmiştir.

Antifungal denemelerinde, antibakteriyel disk difüzyonda olduğu gibi önceden hazırlanan steril petri kaplarına yani PDA besiyerine, fungusların petri kaplarına ekimi için, stok saf fungus kültüründen steril swaplar ile fungus sporları alındı. Alınan fungal sporlar besiyeri içeren boş petri kaplarına agar plakanın bütün yüzeyini kapsayacak şekilde ekimi yapılmıştır. Antifungal diskleri ve boş disklerimizi yerleştirilerek, 20 µl' lik hacim 6 mm çapındaki (OXoid, blank disc) boş disklere etken madde (PHMB) doğrudan emdirilmiştir.

Pozitif kontrol olarak Fluconazole ve Voriconazole antifungalları kullanılmıştır.

Negatif kontrol olarak, boş disklere 1 ml etken madde (PHMB) 1 ml destile suda karıştırılıp, daha sonra 20' şer µl alınarak doğrudan emdirilmiştir. Funguslar daha sonra oda sıcaklığına bırakılarak İnkübasyon için, inhibizasyon zonları belirlenmesi için 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon çapları milimetrik cetvel yardımıyla ölçülmüştür.

3.6 Fungus Mikroorganizmaların Çalkalamalı Agar Tekniği (18+2) ile MIC Belirlenmesi

Öncelikle funguslar için Potato Dextrose Agar (PDA) hazırlanmıştır. Bunun için 1 litrede 39.0 gr besiyeri hazırlanarak, manyetik karıştırıcıda iyice karıştırıldıktan sonra otoklava atılıp 48°-50°C' de steril hale getirildikten sonra deney için hazır hale getirilmiştir.

Çalkalamalı Agar Tekniği yönteminde 6 fungus üzerinde çalışma yapılmıştır. Daha sonra her bir fungus için 10⁻¹⁰' a kadar seri dilüsyon seyreltmeler hazırlanmıştır.

Çalkalamalı Agar Tekniği yönteminde seri seyreltmeler yapılırken başlangıçta 2' şer ml Nutrient Broth (NB) alınarak 10 farklı vida kapaklı deney tüplerine aktarılmıştır. Daha sonra 2 ml etken madde (PHMB) ilk tüpe konularak (10^{-1})' den, 10^{-10} a kadar seri seyreltmeler yapılarak her bir fungus için tekrar edilmiştir.

10^{-1} tüp için, 2 ml seyreltmenin tamamını steril petri kabına dökerek daha sonra 48°-50°C' daki besiyerini 18 ml mezur ile ölçerek aynı şekilde steril petri kabına uygulanmıştır. Sonuç olarak 18+2 total hacimde kural uygulanmıştır.

Daha sonra steril petri kaplarının kuruduktan sonra üç eşit parçaya çizilerek her bir fungus için zımba aletiyle daha önceden hazırlanmış olan, stok saf fungus kültüründen alınarak ekim uygulanmıştır. Ekim yapıldıktan sonra tüm steril petri kaplarının kontaminasyondan korunmak amacıyla etrafları parafilm ile sarılıp, oda sıcaklığına bırakılıp 72 saat boyunca bekletilmiştir.

Her bir petri kabı içerisindeki fungusların MIC değerlerinin sonuçları listelendi. Bu sayede sırasıyla 50 µl/ml, 25 µl/ml, 12,5 µl/ml, 6,25 µl/ml, 3,125 µl/ml, 1,56 µl/ml, 0,781 µl/ml, 0,39 µl/ml, 0,19 µl/ml, 0,09 µl/ml konsantrasyon aralığına kadar etken madde test edilmiştir. Mikroorganizmaların üremelerinin olmadığı en düşük etken madde konsantrasyonu MIC değeri olarak değerlendirilmiştir. Negatif kontrol olarak, etken maddenin Nutrient Broth ile seyreltilerek seri dilüsyonlar yapılmıştır.

3.7 Bakteri Mikroorganizmaların Broth Makro Dilüsyon Yöntemiyle MIC ve MBC Değerlerinin Tespiti

MIC (Minimum İnhibisyon Konsantrasyon)

Bakteri mikroorganizmaların etken maddenin etkisi MIC ve MBC değerleri broth makro dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Öncelikle deney çalışmasında %20' lik (20 ml etken madde - PHMB, 80 ml distile su) ile hazırlanarak uygulanmıştır. Daha sonra aynı şekilde %10' luk (10 ml etken madde - PHMB, 90 ml distile su) ile hazırlanarak deney iki yönlü olarak tekrar edilmiştir.

%20' lik etken madde için; Broth makro dilüsyon yönteminde %20' lik etken madde için 2' şer ml broth alınarak 15 farklı vida kapaklı deney tüplerine aktarıldı. %20' lik etken maddeden 2 ml alınarak, ilk deney tüpünden 14. deney tüpüne kadar seri dilüsyonlar yapılmıştır. Bu sayede sırası ile 0.4 µl/ml, 0.2 µl/ml, 0.1 µl/ml, 0.5 µl/ml, 0.25 µl/ml, 0.125 µl/ml, 0.625 µl/ml, 0.3125 µl/ml, 0.0156 µl/ml, 0.0078 µl/ml, 0.039 µl/ml, 0.0019 µl/ml, 0.00097 µl/ml, 0.00048 µl/ml konsantrasyon aralığına kadar etken madde (PHMB) test edilmiştir. Negatif kontrol olarak Nutrient Broth ile seyreltilerek seri dilüsyonlar yapılmıştır. Mikroorganizmaların saf kültürlerinden 0,5 Mc farland oranında alınarak sıvı besiyerinde aşî kültürü oluşturulmuştur. Bu aşî kültüründen 100 µl alınarak bütün tüplere inoküle edildi. Deneyde kullanılan 15. Tüp ise kontrol olarak etiketlenerek sadece 2 ml broth içerisine 100 µl bakteri inokule edilmiştir.

Mikroorganizmaları içeren deney tüpleri alınarak 36,5°C' de 1 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların üremelerinin olmadığı en düşük etken madde konsantrasyonu MIC değeri olarak değerlendirilmiştir.

%10' luk etken madde için; deney aynı şekilde tekrarlanarak 2' şer ml broth alınarak 12 farklı vida kapaklı deney tüplerine aktarılmıştır. Etken maddenin %10' luktan 2 ml alınıp 11. deney tüpüne kadar aktarılmıştır. Seri dilüsyonlar yapılarak bu sayede sırası ile 0.2 µl/ml, 0.1µl/ml, 0.5 µl/ml, 0.125 µl/ml, 0.625 µl/ml, 0.3125 µl/ml, 0.0156 µl/ml, 0.0078 µl/ml, 0.039 µl/ml, 0.0019 µl/ml 0.000 97 µl/ml konsantrasyon aralığına kadar

etken madde (PHMB) test edilmiştir. Negatif kontrol olarak Nutrient Broth ile seyreltilerek seri dilüsyonlar yapılmıştır.

Aynı şekilde mikroorganizmaların saf kültürlerinden alınarak 0,5 Mcfarland oranında alınarak sıvı besiyerinde aşı kültürü oluşturulmuştur. Bu aşı kültüründe 100 µl bakteri alınarak bütün tüplere inoküle edilmiştir. Deneyde kullanılan 12. tüp ise kontrol olarak etiketlenerek sadece 2 ml içerisine 100 µl bakteri inokule inoküle edilmiştir. Mikroorganizmaları içeren deney tüpleri alınarak 36,5°C' de 48 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mikroorganizmaların üremelerinin en düşük etken madde konsantrasyonu MIC değeri olarak değerlendirilmiştir.

MBC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon)

%20' lik ve %10' luk test mikroorganizmaların MIC değerleri belirlendikten sonra değerlendirilmiştir.

%10' luk etken madde için;

Her test Mikroorganizma için steril petri kaplarına yani Nutrient Agar (NA) besiyerine 5 µl her bir dilüsyondan alınarak aktarılmıştır.

L. monocytogenes için 10^{-6} µl/ml' ye kadar yani (MİK değerine kadar) olan 6 eşit parçaya çizilerek bölünen petri kabına her bir konsantrasyondan 5 µl alınarak aktarılmıştır.

B. subtilis için 10^{-7} µl/ml, *K. aerogenes* 10^{-5} µl/ml, *P. aeruginosa* 10^{-6} µl/ml, *S. aureus* 10^{-8} µl/ml, *E. faecium* 10^{-6} µl/ml, *P. fluorescens* 10^{-10} µl/ml, *E. coli* 10^{-10} µl/ml, *E. faecalis* 10^{-6} µl/ml, *S. mutans* 10^{-5} µl/ml' ye kadar Nutrient Agar (NA) besiyerine her bir konsantrasyondan 5 µl alınıp aktarılmıştır.

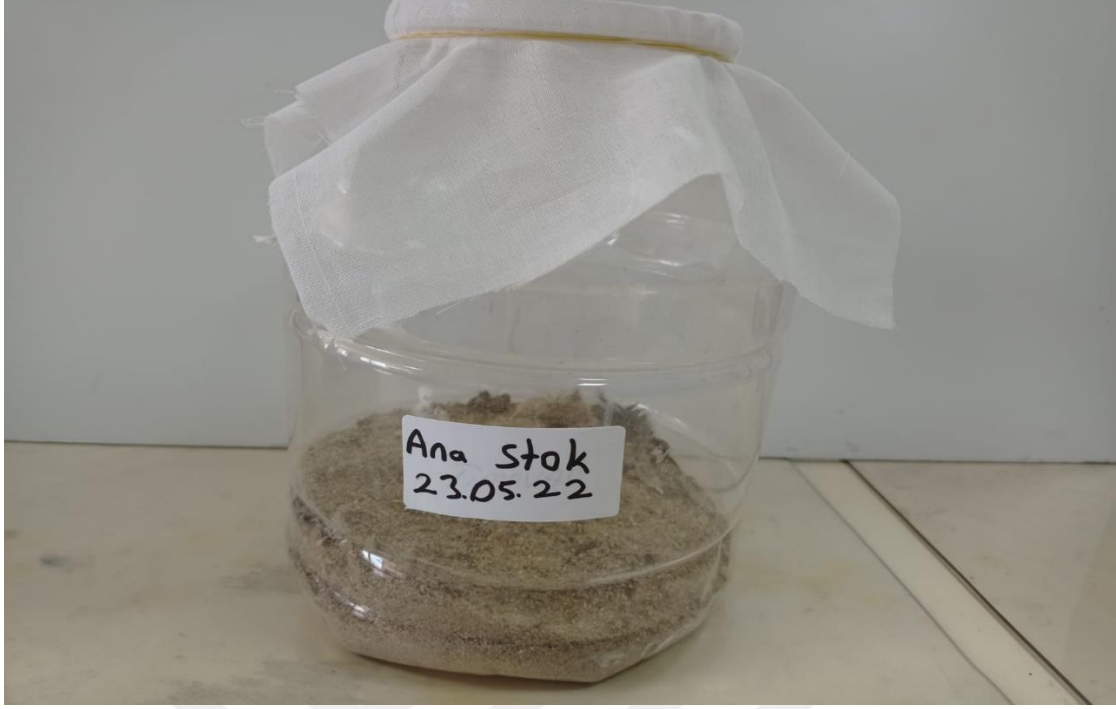
% 20' lik etken madde için,

Aynı şekilde, *L. monocytogenes* 10^{-7} µl/ml, *B. subtilis* 10^{-9} µl/ml, *K. aerogenes* 10^{-6} µl/ml, *E. coli* 10^{-1} µl/ml, *E. faecium* 10^{-11} µl/ml, *P. aeruginosa* 10^{-7} µl/ml, *S. aureus* 10^{-6}

¹¹ µl/ml, *P. fluorescens* 10⁻¹² µl/ml, *S. mutans* 10⁻¹³ µl/ml, *E. faecalis* 10⁻⁴ µl/ml' ye kadar, Nutrient Agar (NA) besiyerine her bir konsantrasyondan 5 µl alınıp aktarılmıştır.

3.8 Polihexametilen Biguanidin Etken Maddesinin *Dermanyssus gallinae* (Kırmızı Tavuk Biti) Üzerindeki Insektesidal Aktivitesinin Denenmesi- Uygulanması

PHMB (etken madde) insektesidal aktivitesi için *Dermanyssus gallinae* (kırmızı tavuk biti) üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bunun için ilk olarak Tokat-Zile ilçe bölgesinde 17.05.22 tarihinde Tavuk Kümesçiliği Çiftliğinde Kırmızı Tavuk Bitleri toplandı. Daha sonra Tokat Gaziosmonpaşa Üniversitesi Biyomühendislik Mikrobiyoloji Laboratuvarında çalışmalara başlanarak insektesidal aktivitelerinin belirlenmesi üzere PHMB, etken maddesinden çalışmanın iki yönlü analizlerini yürütme açısından %10' luk (10 ml PHMB, 90ml destile su o.ü) ve %20' lik (20 ml PHMB, 80 ml destile su o.ü) deney için aktivitenin belirlenmesinde konsantrasyonlar hazırlanmıştır. Daha sonra her bir konsantrasyon için, deney üç tekrardan oluşacak şekilde boş şişe düzenekleri hazırlanmıştır. %10' luk ve %20' lik her birinde 10' ar ml mezur ile ölçerek püskürtme yöntemi ile boş şişe düzeneklerine aktarılıp, üçer gün aralıklarla kontrol analizleri sağlanmıştır. Birinci uygulama için 17.05.22 tarihinde numuneler aktarıldı. İkinci uygulama için 20.05.22 tarihinde numuneler tekrar düzeneklere aktarılmıştır. Bu arada her bir uygulama için üçer gün aralıklarla kontroller analizleri sağlanmıştır. 23.05.22 tarihinde tekrardan tavuk kümesi çiftliğine gidilip yeni stok numuneler alınıp, önceden hazırlanmış olan %10' luk ve %20' lik etken maddelerin 10'ar ml' lik püskürtmüş olduğumuz düzeneklere aynı şekilde yani ana stok bitlerden alınıp aktarılmıştır. Aynı şekilde üçer gün aralıklarla kontrol analizleri sağlanmıştır.



Şekil 3.4 : Ana Stok

4. BULGULAR

ANTİBAKTERİYEL DİSK DİFÜZYON ZONE ÖLÇÜM SONUÇ TABLOSU

Çizelge 4.1 : Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları

Çalışmada Kullanılan Bakteriler	İnhibasyon zonları (mm)					
	TM	PK-1	PK-2	PK-3	PK-4	PK-5
<i>B. subtilis</i> (ATCC: 6633)	16	16	18	12	14	14
<i>E. faecalis</i> (ATCC: 19433)	28	24	22	14	28	18
<i>K. aerogenes</i> (ATCC: 13048)	16	26	30	20	32	18
<i>E. faecium</i> (ATCC: 8459)	18	18	32	18	12	26
<i>S. aureus</i> (ATCC:6538)	20	36	34	18	34	18
<i>S. mutans</i> (ATCC:35668)	26	24	28	14	30	16
<i>E. coli</i> (ATCC:25922)	20	18	26	16	16	16
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC:29133728)	16	14	24	16	12	16
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC:51774)	20	16	22	14	8	16
<i>P. fluorescens</i> (ATCC: 13525)	18	10	28	16	8	20

TM: Test madde, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol su, NE: no effect – Etki yok,
PK-1: Cefoperazone, PK-2: Erythromycin, PK-3: Gentamycin, PK-4: Tetracylin, PK-5:
Streptomycin, TM: Boş Blank Disk (Test madde)

ANTİBAKTERİYEL DİSK DİFÜZYON ZON ÖLÇÜM SONUÇ TABLOSU

2 hafta aralıkla tekrardan milimetrik cetvel ile zon çap değerlerine bakılmıştır.

Çizelge 4.2: Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları

Çalışmada Kullanılan Bakteriler	İnhibasyon zonları (mm)					
	TM	PK-1	PK-2	PK-3	PK-4	PK-5
<i>B. subtilis</i> (ATCC: 6633)	26	20	18	15	16	16
<i>E. faecalis</i> (ATCC: 19433)	30	25	24	18	30	20
<i>K.aerogenes</i> (ATCC: 13048)	30	28	32	24	33	21
<i>E.faecium</i> (ATCC: 8459)	26	20	33	20	14	28
<i>E.coli</i> (ATCC: 25922)	30	18	26	30	18	20
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC:29133728)	24	14	26	18	16	20
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC:51774)	26	18	26	18	12	20
<i>P.fluorescens</i> (ATCC: 13525)	30	13	28	18	10	24
<i>S.aureus</i> (ATCC:6538)	22	40	36	21	38	20
<i>S.mutans</i> (ATCC:35668)	32	28	30	16	34	16

- TM: Test madde, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol suNE: no effect – Etki, PK-1: Cefoperazone, PK-2: Erythromycin, PK-3: Gentamycin, PK-4: Tetracycline, PK-5: Strept, omycin, TM: Boş Blank Disk (Test madde)



Şekil 4.1 : Antibakteriyeller üzerinde oluşan disk difüzyon zone çapları (mm)

ANTİFUNGAL DİSK DİFÜZYON ZONE ÖLÇÜM SONUÇ TABLOSU

Çizelge 4.3: Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları

Çalışmada Kullanılan Funguslar	İnhibasyon zonları (mm)		
	TM	PK-1	PK-2
<i>Didymella sp.</i> (ATCC:12263)	20	NE	NE
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC: 9643)	26	NE	20
<i>Candida albicans</i> (ATCC:10231)	24	NE	NE
<i>Alternaria alternata</i> (ATCC:6663)	24	NE	NE
<i>Fusarium oxysporium</i> (ATCC:62506)	20	NE	NE
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC:16404)	26	NE	18

- TM: Test madde, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol (su), PK-1: Fluconazole, PK-2: Voriconazole, TM: Boş Blank Disk (Test madde)

ANTİFUNGAL DİSK DİFÜZYON ZONE ÖLÇÜM SONUÇ TABLOSU

1 gün aralıkla milimetrik cetvel ile zon çap değerlerine bakılmıştır.

Çizelge 4.4: Çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çapları

Çalışmada Kullanılan Funguslar	İnhibasyon zonları (mm)		
	TM	PK-1	PK-2
<i>Didymella sp.</i> (ATCC:12263)	22	NE	NE
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC:9643)	28	NE	22
<i>Candida albicans</i> (ATCC:10231)	24	NE	NE
<i>Alternaria alternata</i> (ATCC:6663)	32	NE	NE
<i>Fusarium oxysporium</i> (ATCC:62506)	30	NE	NE
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC:16404)	28	NE	18

- TM: Test madde, PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol (su), NE: no effect – Etki yok, PK-1: Fluconazole, PK-2: Voriconazole, TM: Boş Blank Disk (Test madde)

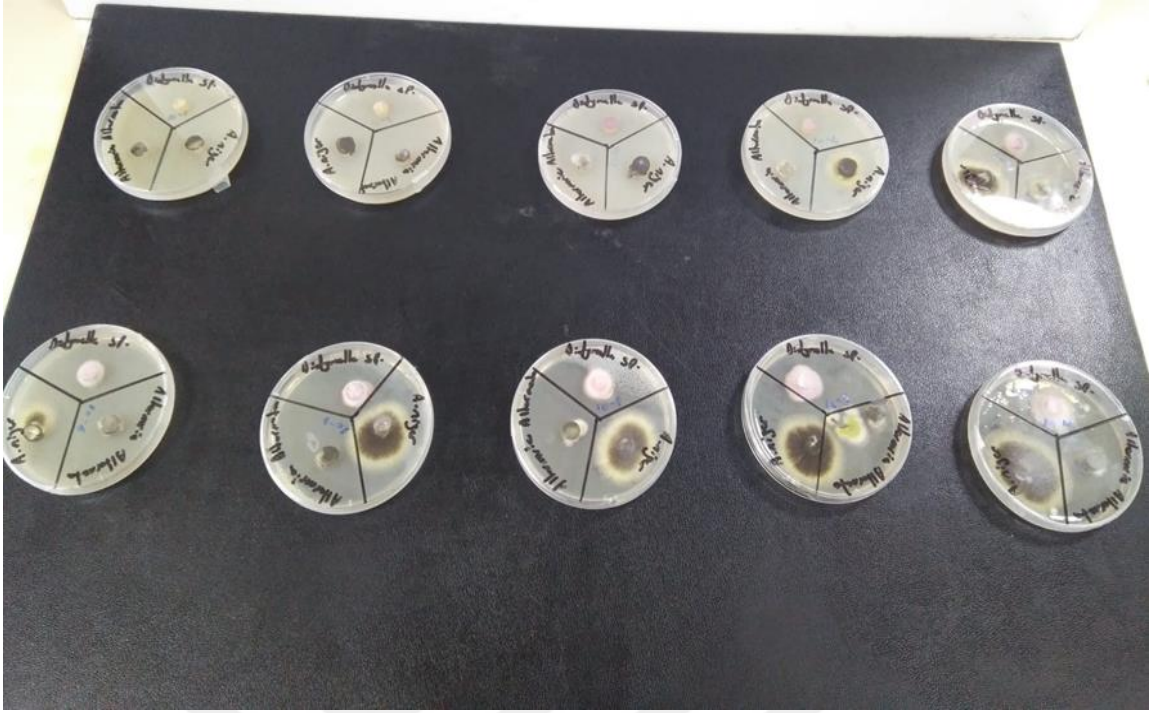


Şekil 4.2 : Antifungallar üzerinde oluşan disk difüzyon zone çapları (mm)

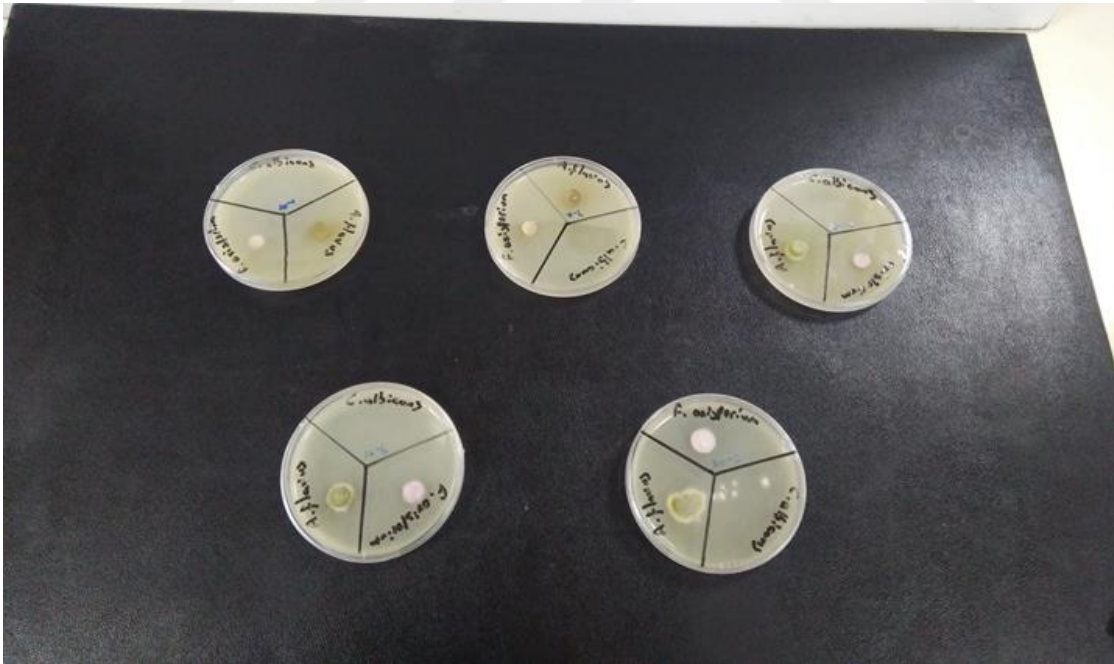
Çizelge 4.5: Çalışmada Agar Tekniği (18+2 Kuralı) Fungus Mikroorganizmaların MIC Değer Tablosu

Çalışmada Kullanılan Funguslar	Seyreltme Konsantrasyon	10 ⁻¹ 50 µl/ml	10 ⁻² 25 µl/ml	10 ⁻³ 12,5 µl/ml	10 ⁻⁴ 6,25 µl/ml	10 ⁻⁵ 3,12 µl/ml	10 ⁻⁶ 1,56 µl/ml	10 ⁻⁷ 0,78 µl/ml	10 ⁻⁸ 0,39 µl/ml	10 ⁻⁹ 0,19 µl/ml	10 ⁻¹⁰ 0,09 µl/ml
<i>Aspergillus niger</i> (ATCC:16404)		-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+
<i>Didymella sp.</i> (ATCC:12263)		-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria alternata</i> (ATCC:6663)		-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC:9643)		-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i> (ATCC:10231)		-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+
<i>Fusarium oxysporium</i> (ATCC:62506)		-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+

- NK: Negatif kontrol, (-) Üreme gözlemlenmedi, (+) Üreme gözlemlendi, NK: Nutrient Borth, MIC: Minimum İnibisyon Konsantrasyon (üremenin başlangıç konsantrasyon değeri)



Şekil 4.3 : Funguslar üzerinde oluşan minimum inhibisyon konsantrasyonları



Şekil 4.4 : Funguslar üzerinde oluşan minimum inhibisyon konsantrasyonları

Çizelge 4.6 : Bakterilerin %10' luk etken madde için MIC belirleme Değer Tablosu

Çalışmada Bakteriler	Kullanılan	MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratin (µl/ml) %10											K
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC: 6633)		-	-	-	-	-	- MIC	-	-	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> (ATCC: 19433)		-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>K.aerogenes</i> (ATCC: 13048)		-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.faecium</i> (ATCC: 8459)		-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus</i> (ATCC: 6538)		-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+
<i>S.mutans</i> (ATCC:35668)		-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i> (ATCC: 25922)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC:29133728)		-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC:51774)		-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>P.fluorescens</i> (ATCC: 13525)		-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+

- NK: Negatif kontrol, (-) Üreme gözlemlenmedi, (+) Üreme gözlemlendi, NK: Nutrient Borth, MİK: Minimum İnibisyon Konsantrasyon (üremenin başlangıç konsantrasyon değeri)



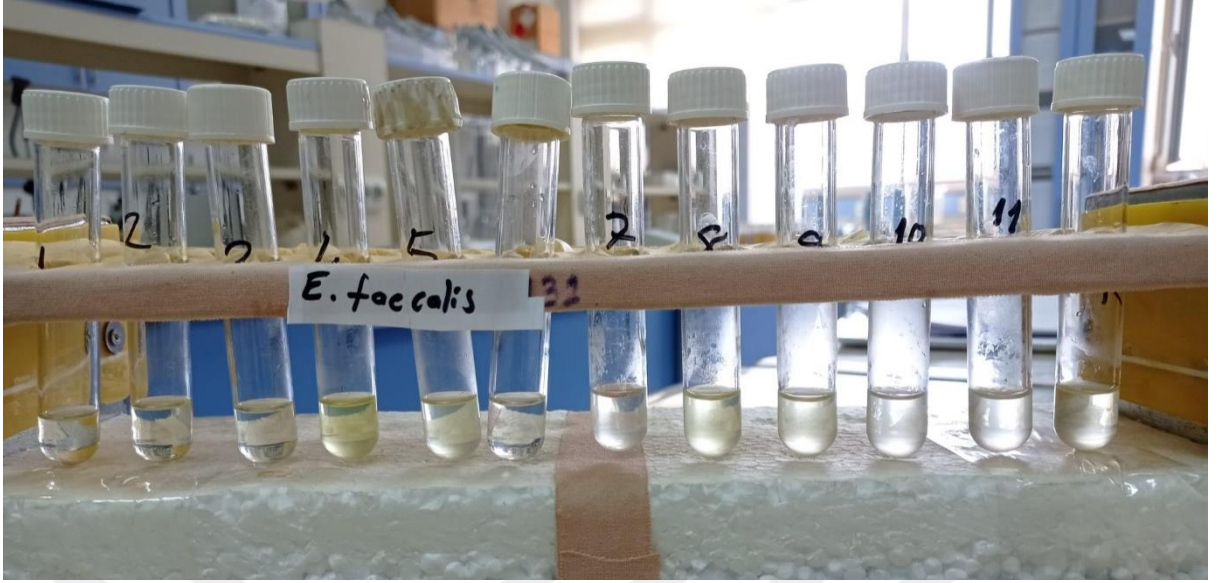
Şekil 4.5 : *Bacillus subtilis* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif Kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).



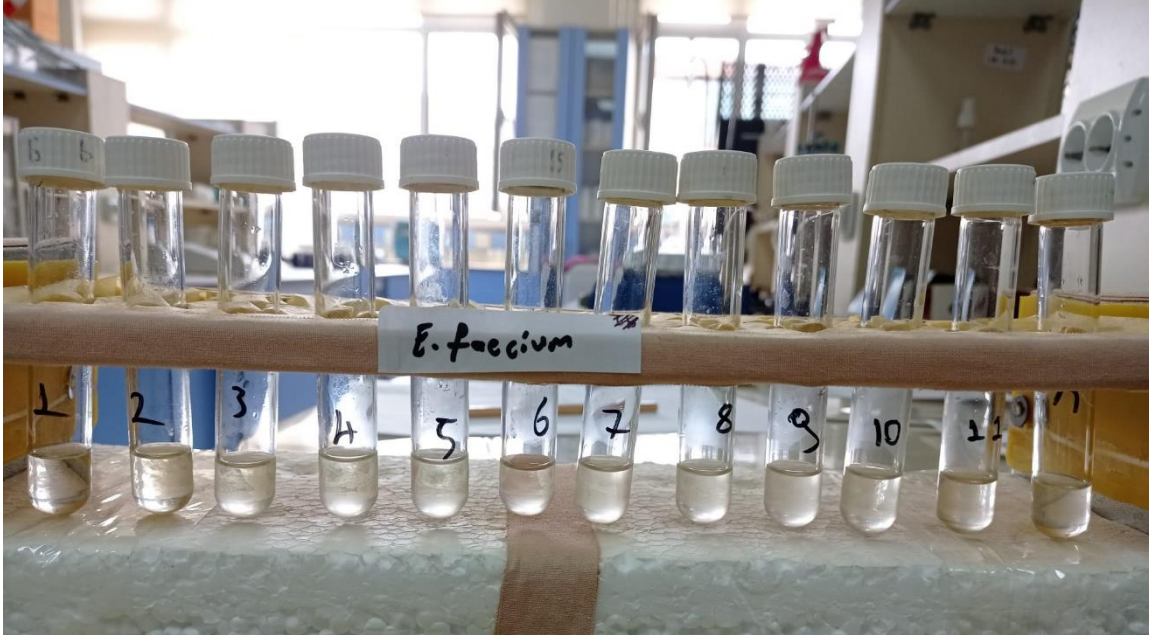
Şekil 4.6: *Klebsiella aerogenes* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif Kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (5.tüptür).



Şekil 4.7 : *Enterococcus faecalis* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).



Şekil 4.8 : *Enterococcus faecium* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).



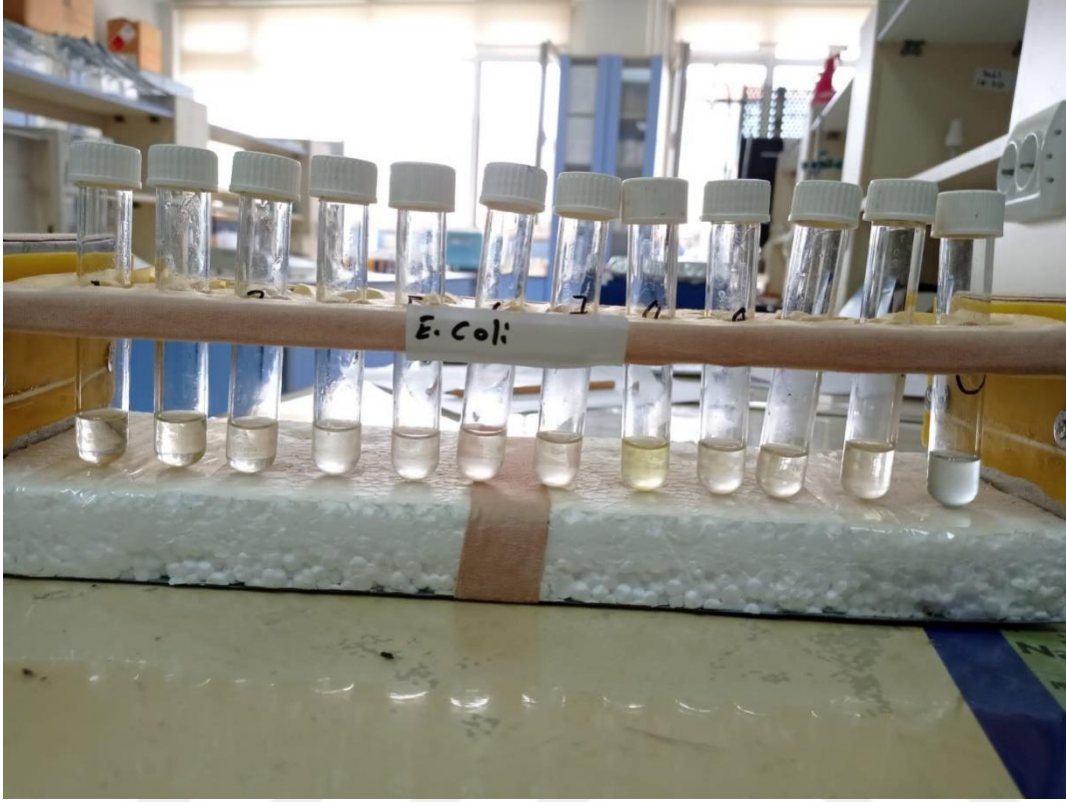
Şekil 4.9 : *Saphylococcus aureus* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrsayondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (8.tüptür).



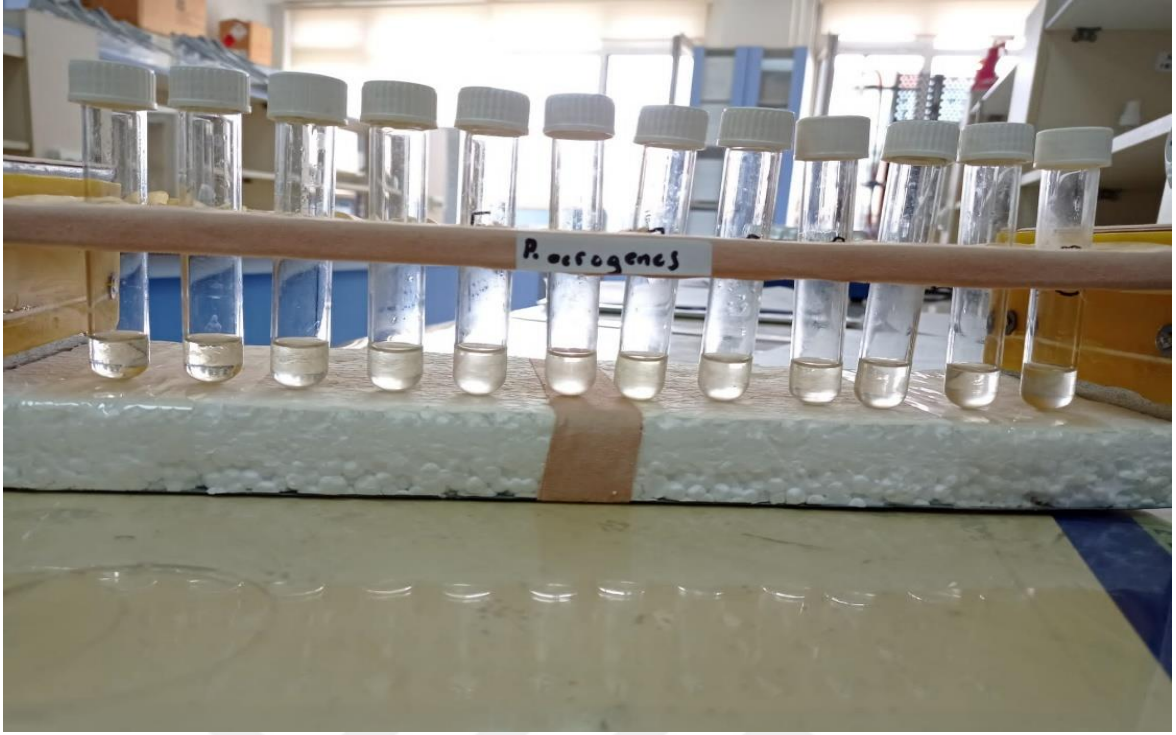
Şekil 4.10 : *Streptococcus mutans* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (5.tüptür).



Şekil 4.11 : *Escherichia coli* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (10.tüptür).



Şekil 4.12 : *Pseudomonas aeruginosa* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).



Şekil 4.13 : *Listeria monocytogenes* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).



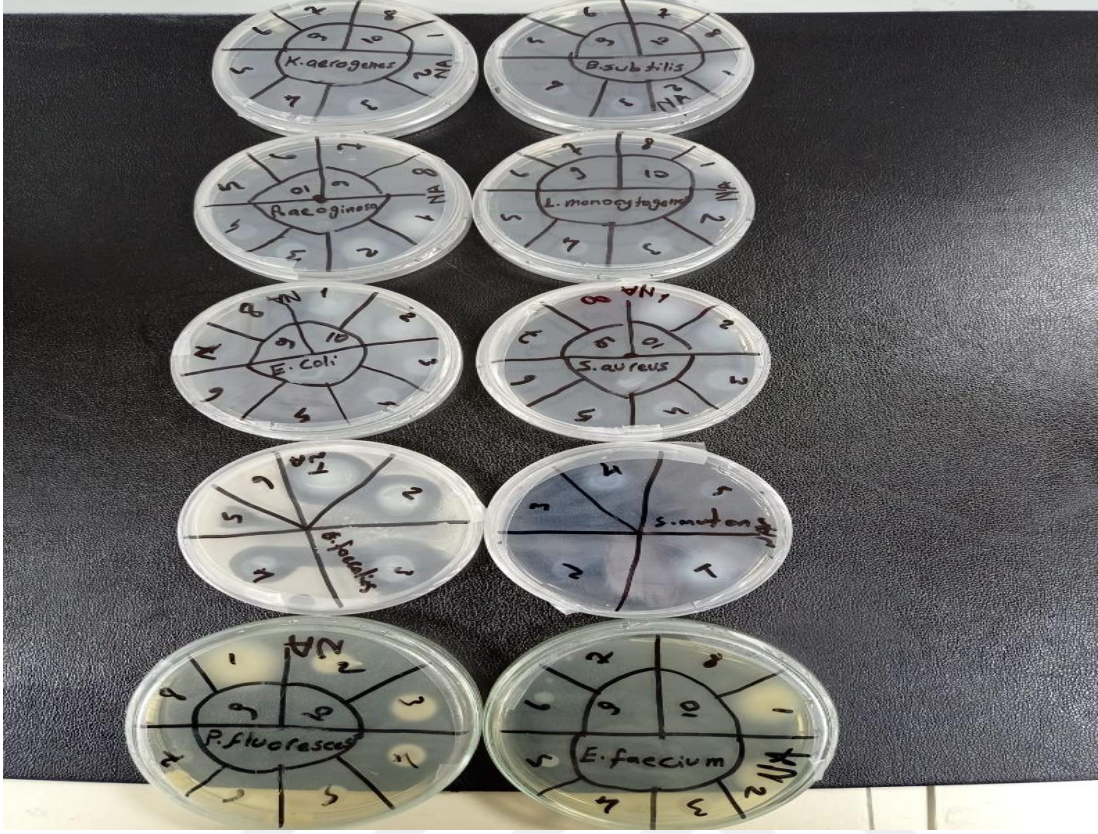
Şekil 4.14 : *Pseudomonas fluorescens* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).

Çizelge 4.7 : Bakterilerin %20' lik etken madde için MIC belirleme Değer Tablosu

Çalışmada Kullanılan Bakteriler	MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratin (µl/ml) %20														
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	10 ⁻¹⁴	K
<i>B.subtilis</i> (ATCC: 6633)	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i> (ATCC: 19433)	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>K.aerogenes</i> (ATCC: 13048)	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E.faecium</i> (ATCC: 8459)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
<i>S.aureus</i> (ATCC: 6538)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
<i>S.mutans</i> (ATCC:35668)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
<i>E.coli</i> (ATCC: 25922)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+
<i>P.aeruginosa</i> (ATCC:2913372 8)	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC:51774)	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P.fluorescens</i> (ATCC: 13525)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	- MIC	+	+	+

- NK: Negatif kontrol, (-) Üreme gözlemlenmedi, (+) Üreme gözlemlendi, NK: Nutrient Borth, MIC: Minimum İnibisyon Konsantrasyon (üremenin başlangıç konsantrasyon değeri)



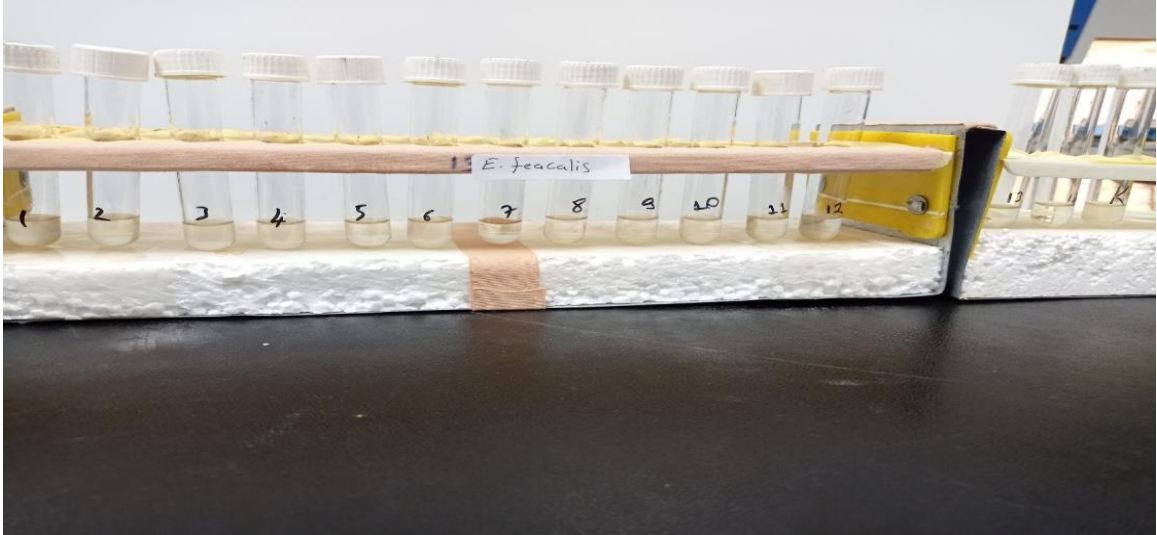
Şekil 4.15 : %10' luk etken madde için Minimum Bakterisidal Konsantrasyonuna Ait Görüntüsü

Açıklama: Her bir numaralandırma MIC değerine kadar alınan seyreltmeleri ifade etmektedir ve her birine 5 µl seyreltme emdirilmiştir.



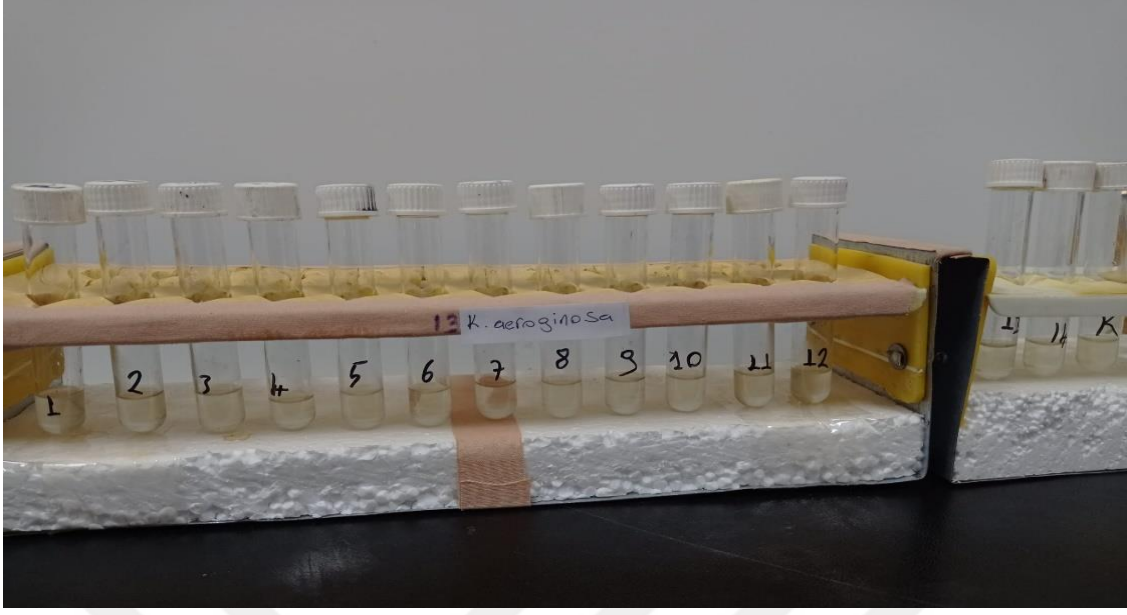
Şekil 4.16 : *Bacillus subtilis* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (9.tüptür).



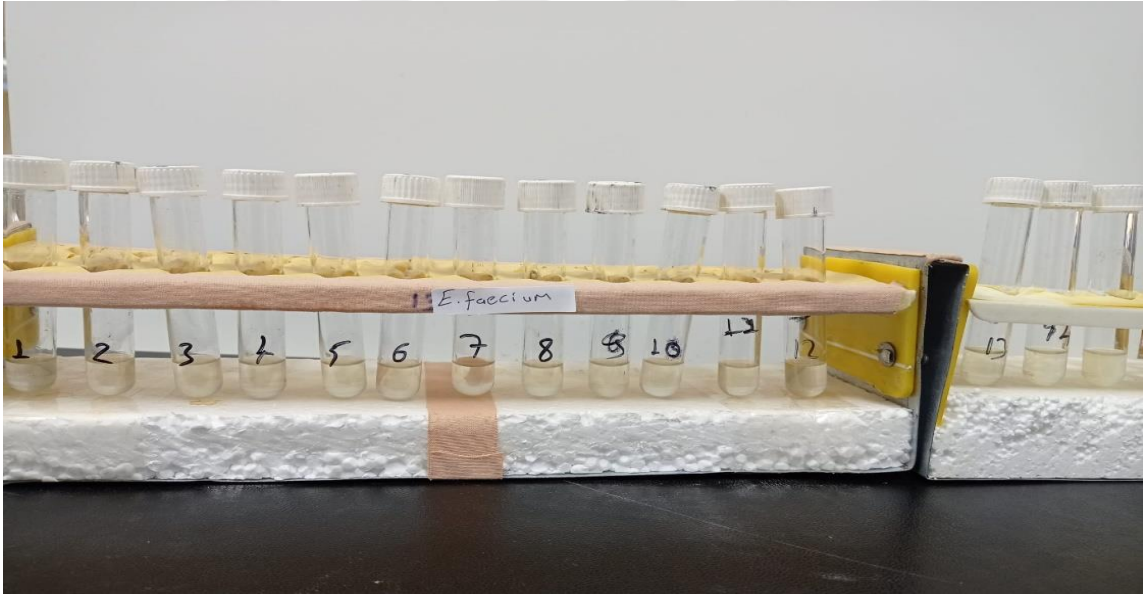
Şekil 4.17 : *Enterococcus faecalis* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (4.tüptür).



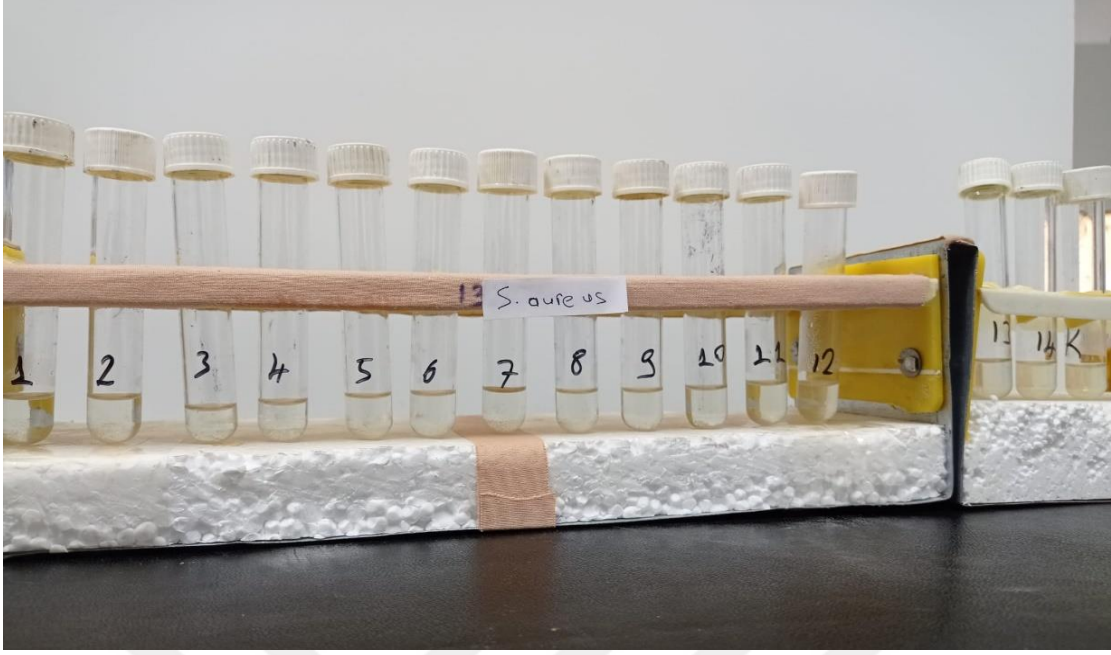
Şekil 4.18 : *Klebsiella aerogenosa* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (6.tüptür).



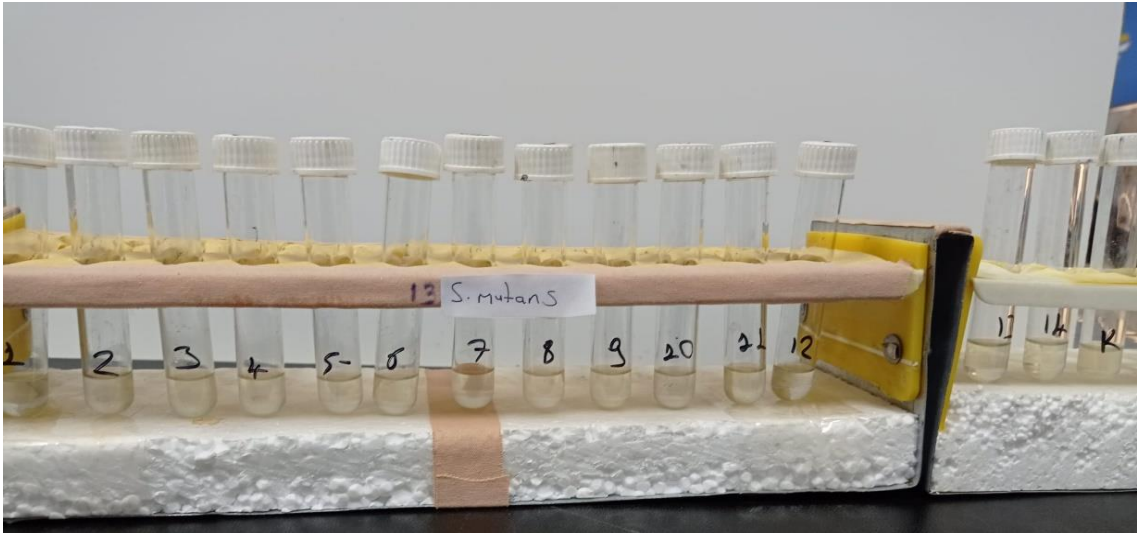
Şekil 4.19 : *Enterococcus faecium* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (11.tüptür).



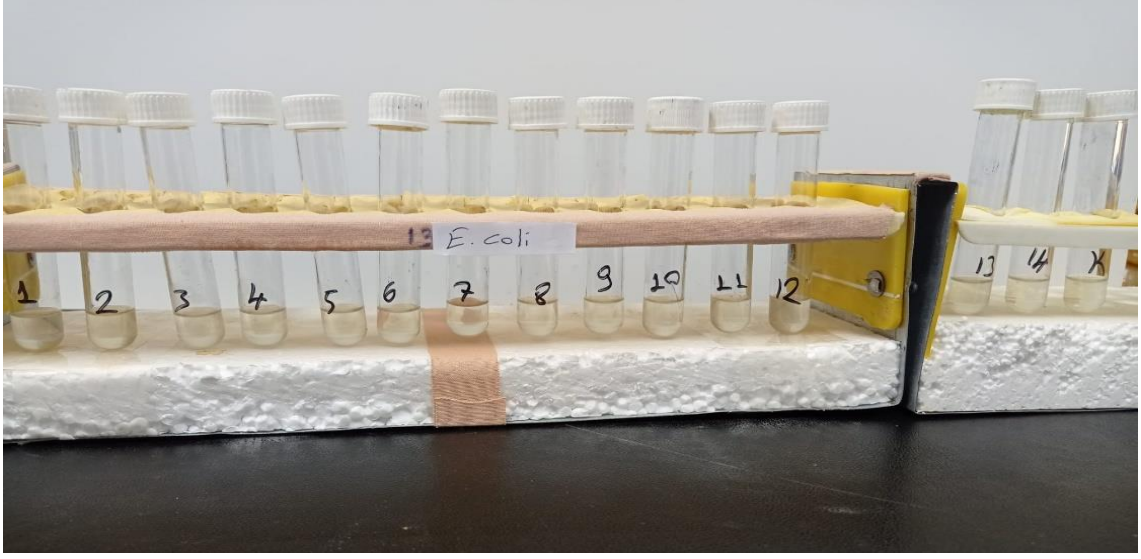
Şekil 4.20 : *Staphylococcus aureus* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (11.tüptür).



Şekil 4.21 : *Streptococcus mutans* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (11.tüptür).



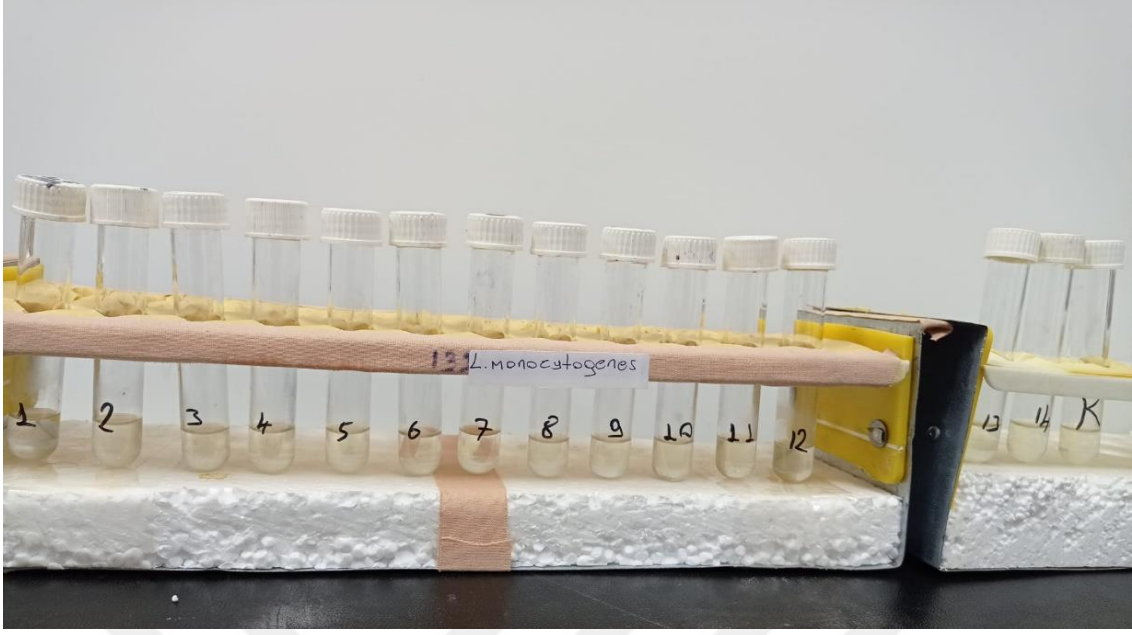
Şekil 4.22 : *Escherichia coli* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (11.tüptür).



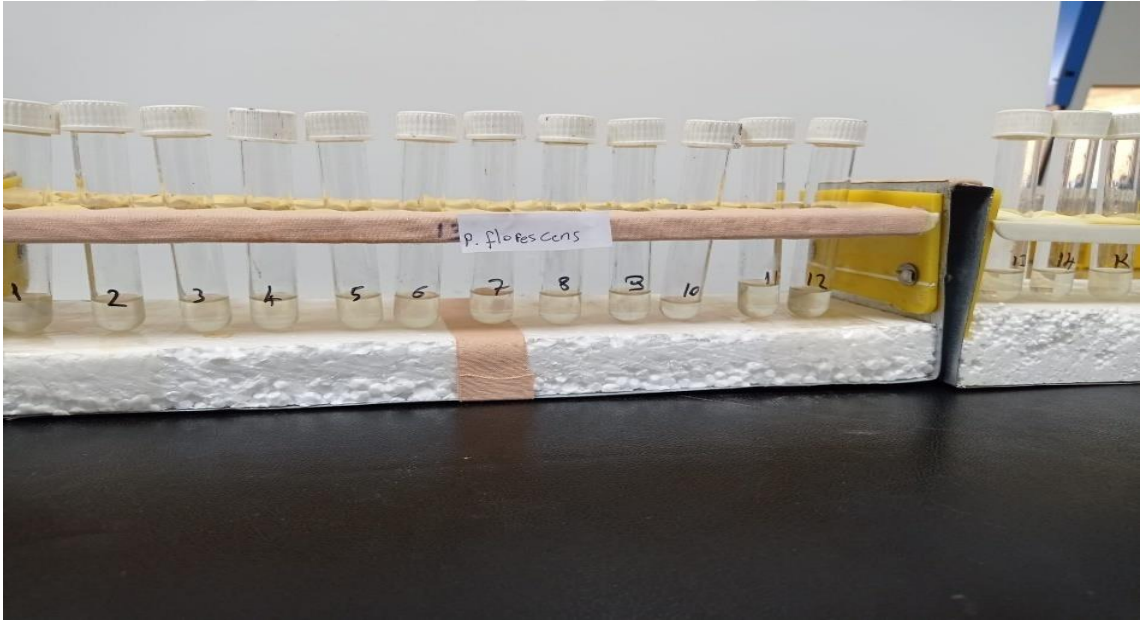
Şekil 4.23 : *Pseudomonas aeruginosa* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (7.tüptür).



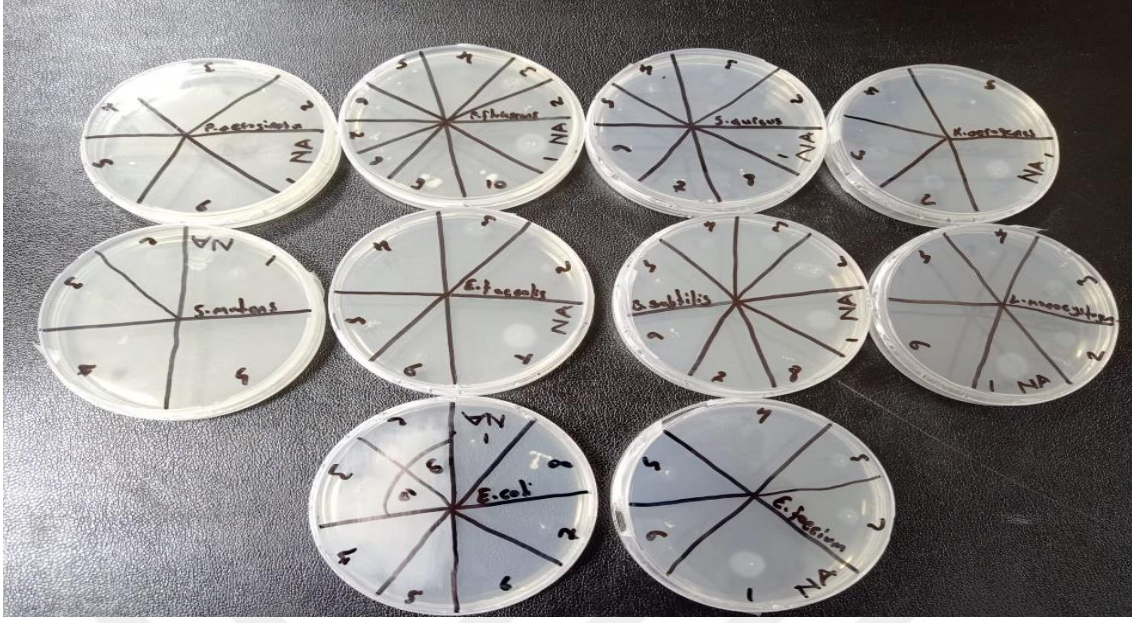
Şekil 4.24 : *Listeria monocytogenes* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif Kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (7.tüptür).



Şekil 4.25 : *Pseudomonas fluorescens* ait broth makro dilüsyon görüntüsü.

Açıklama: Tüpler en büyük konsantrasyondan en düşük numune konsantrasyonuna göre (Soldan sağa) sıralanmıştır. Negatif kontrol Nutrient Brothun MIC değeri (12.tüptür).



Şekil 4.26 : %20' lik etken madde için Minimum Bakterisidal Konsantrasyonuna Ait görüntüsü.

Açıklama: Her bir numaralandırma MIC değerine kadar olan seyrletmeleri ifade etmektedir. Her birine 5 µl seyrletme emdirilmiştir.

İNSEKTESİDAL AKTİVİTE

%10' luk Etken Madde Uygulama Tablosuna Elde Edilen Uygulama Dozları

Çizelge 4.8 : Birinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri

Uygulama Tarihleri	Uygulama Dozları		
	1. Tekrar	2.Tekrar	3. Tekrar
Uygulama-1 17.05.22			
Kontrol-1 18.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-2 19.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-3 20.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü



Şekil 4.27 : Birinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü

Çizelge 4.9 : İkinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri

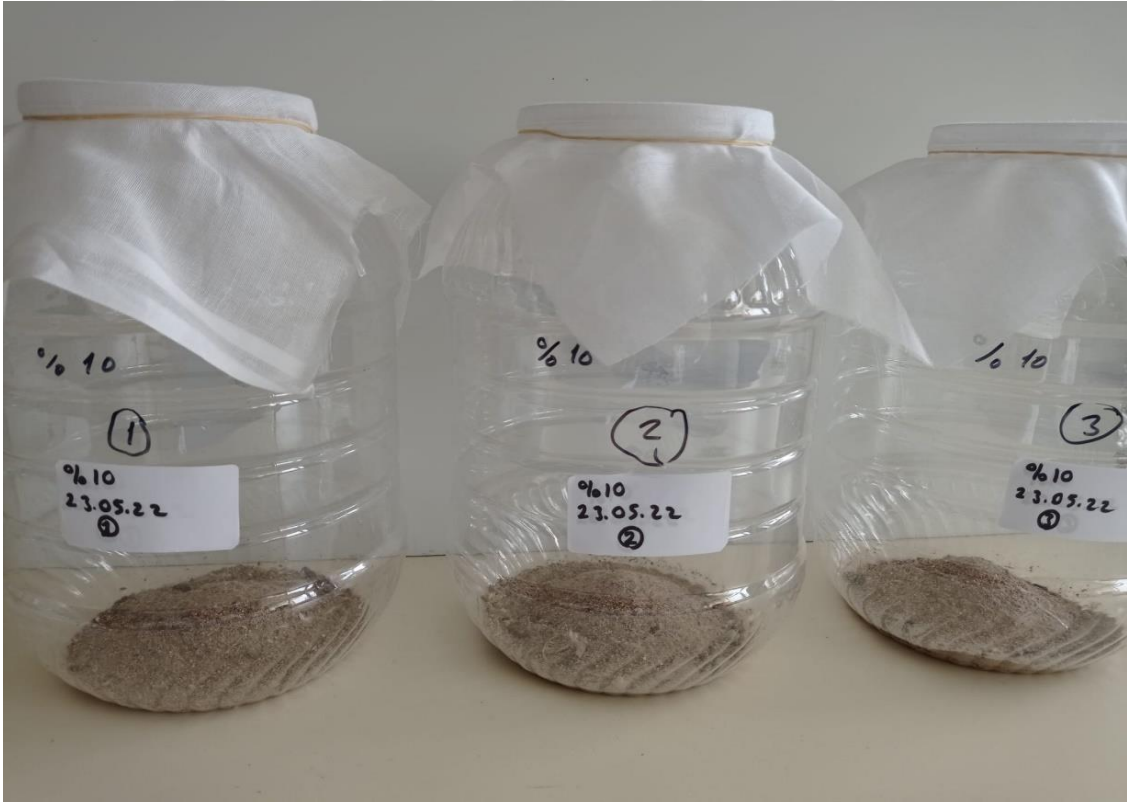
Uygulama Tarihleri	Uygulama Dozları		
	1. Tekrar	2.Tekrar	3. Tekrar
Uygulama-2 20.05.22			
Kontrol-1 21.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-2 22.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-3 23.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü



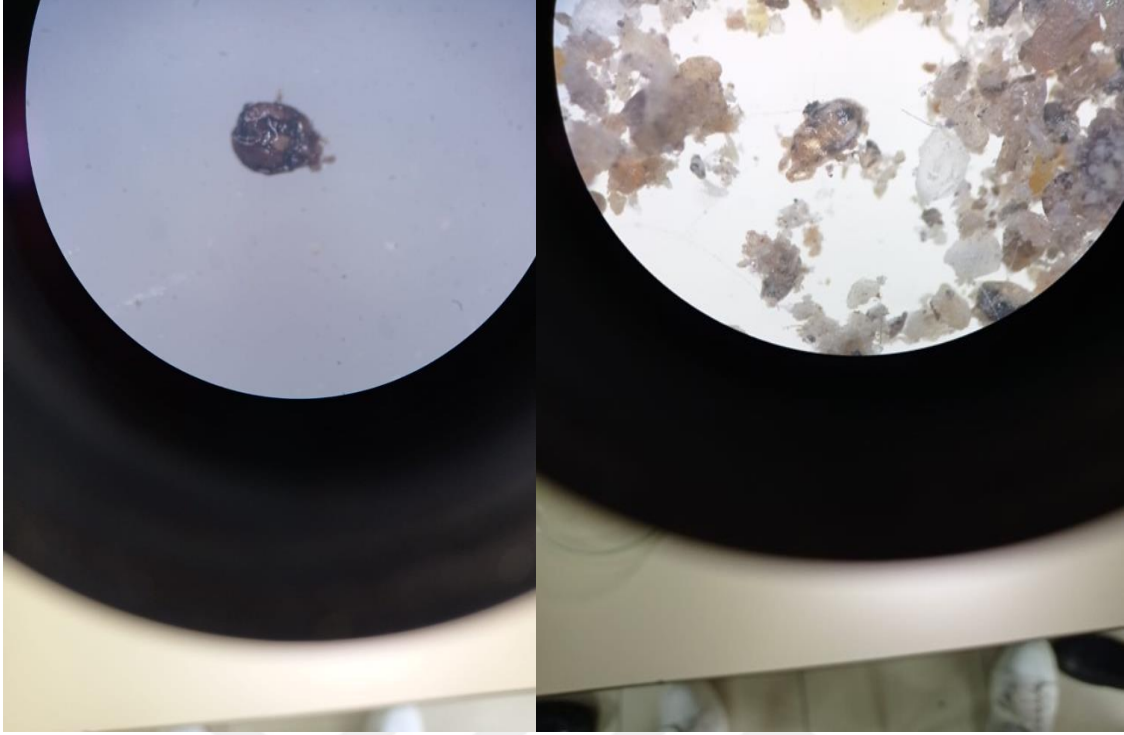
Şekil 4.29 : İkinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü

Çizelge 4.10 : Üçüncü uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri

Uygulama Tarihleri	Uygulama Dozları		
	1. Tekrar	2.Tekrar	3. Tekrar
Uygulama-3 23.05.22			
Kontrol-1 24.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-2 25.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-3 26.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü



Şekil 4.30 :Üçüncü uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü

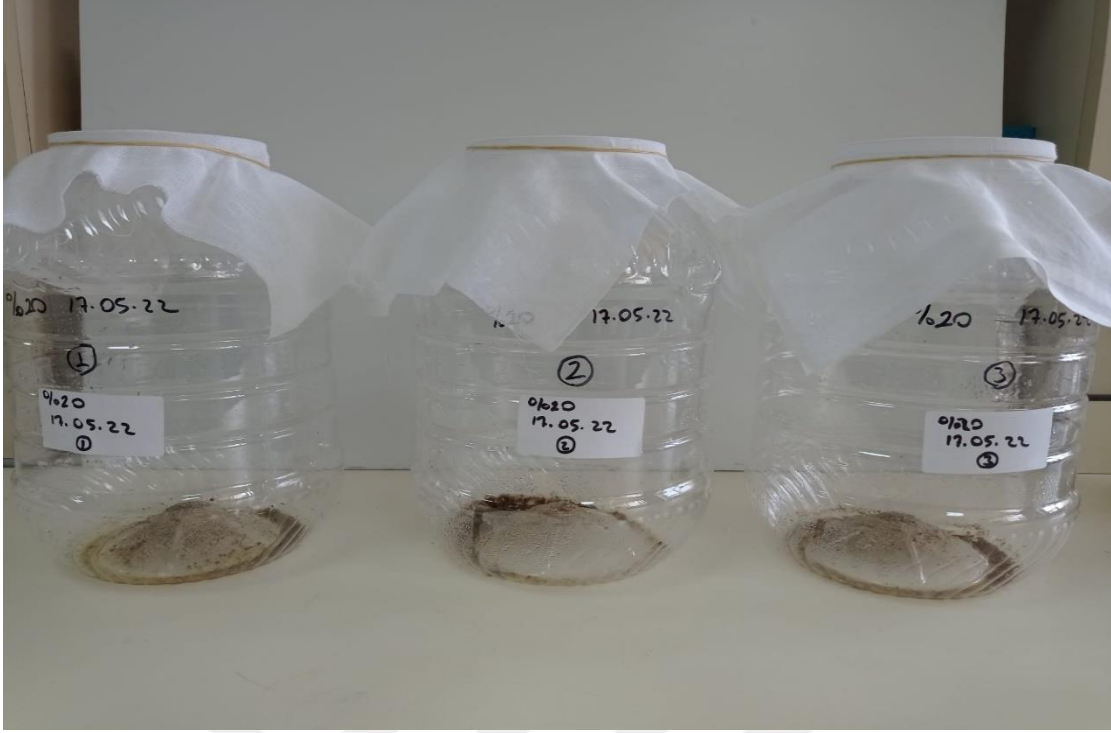


Şekil 4.31 : %10' luk etken maddesinin Binoküler mikroskobiye ait *Dermanyssus gallinae* (kırmızı tavuk biti) cansız görüntüsü.

%20' lik Etken Madde Uygulama Tablosuna Elde Edilen Uygulama Dozları

Çizelge 4.11 : Birinci uygulama dozlarının insektesidal aktiviteleri

Uygulama Tarihleri	Uygulama Dozları		
	1. Tekrar	2.Tekrar	3. Tekrar
Uygulama-1 17.05.22			
Kontrol-1 18.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-2 19.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-3 20.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü



Şekil 4.32 : Birinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü

%20' lik Etken Madde Uygulama Tablosuna Elde Edilen Uygulama Dozları

Çizelge 4.12 : İkinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri

Uygulama Tarihleri	Uygulama Dozları		
	1. Tekrar	2. Tekrar	3. Tekrar
Uygulama-2 20.05.22			
Kontrol-1 20.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-2 21.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-3 21.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü



Şekil 4.33: İkinci uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü

%20' lik Etken Madde Uygulama Tablosuna Elde Edilen Uygulama Dozları

Çizelge 4.13 : Üçüncü uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri

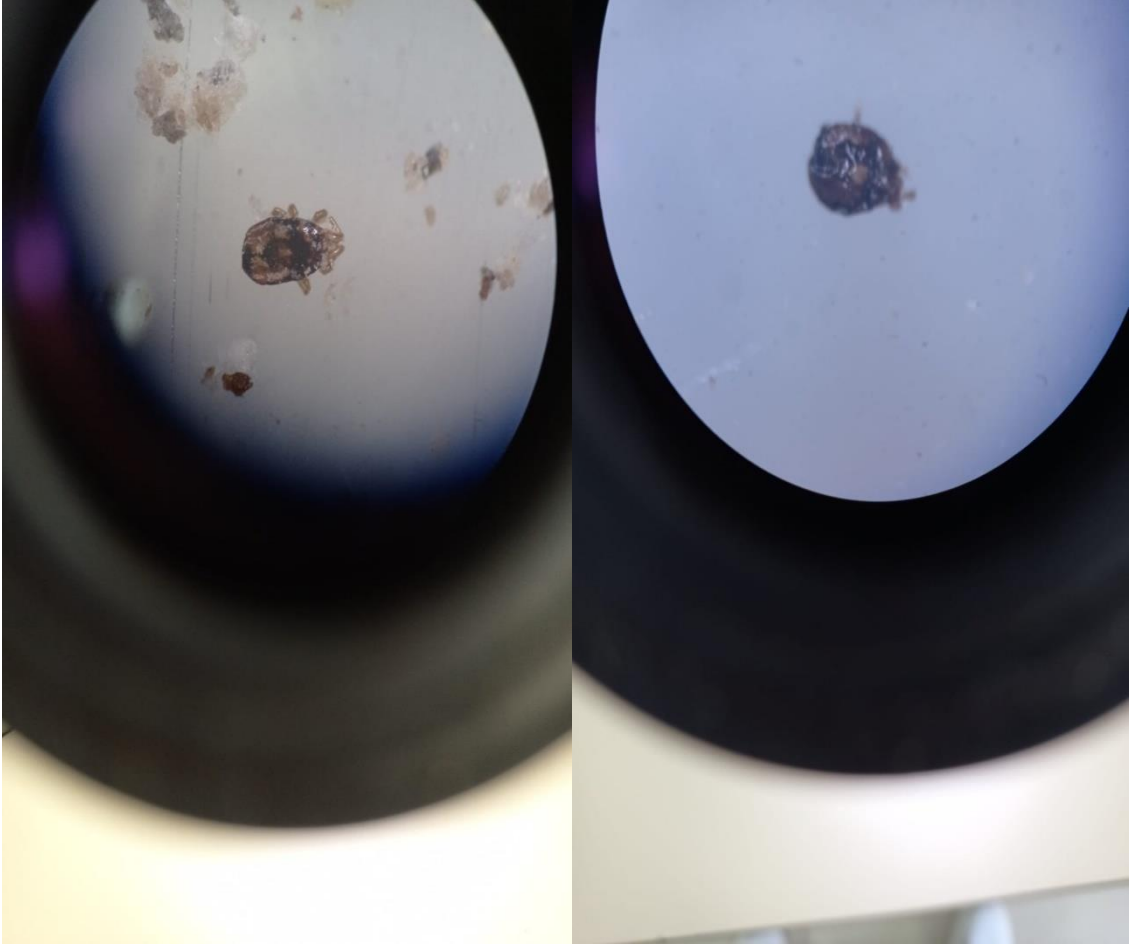
Uygulama Tarihleri	Uygulama Dozları		
	1. Tekrar	2.Tekrar	3. Tekrar
Uygulama-3 23.05.22			
Kontrol-1 24.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-2 25.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü
Kontrol-3 26.05.22	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü	Etkili / Öldürücü



Şekil 4.34: Üçüncü uygulamaya ait insektesidal aktivite görüntüsü



Şekil 4.35: Yakın çekime ait insektesidal aktivite görüntüsü



Şekil 4.36: %20' lik etken maddenin Binoküler mikroskobun altında *Dermanyssus gallinae* (kırmızı tavuk biti) ait cansız görüntüsü

SONUÇ ve TARTIŞMA

Çalışmamız kapsamında Tablo 1’ de elde edilen veriler nezdinde, antibakteriyel disk difüzyon yönteminden başlayarak, çalışmada kullanılan pozitif ve negatif kontrollerin inhibasyon çaplarında tüm bakteri mikroorganizmaların Polihexametilen Biguanidin etken maddesi üzerine denenmesi önemli zone değerleri verdiği görülmüştür.

İki hafta aralıkla tekrardan milimetrik cetvel ile zone çap değerlerine bakıldığı Tablo 2 içinde elde edilen ölçümler de aynı şekilde önemli ve daha fazla sayısal zone değerleri göstermiştir. Kıcasası ilgili test maddesinin etki alanının kuvvetli olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızın devamında Tablo 3’ de ise, antifungal mikroorganizmaların burdaki zone değer inhibisyonları ele alınmış ve belirli ölçülerde test maddesi eklenmiştir. Bu işlem sonrasında PK-1’de NE (yani etki yok) şeklinde çıkarken, PK-2’ de ise *Didymella sp.*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium* NE (yani etki yok) ve *Aspergillus flavus* ile *Aspergillus niger* bu madde üzerinde etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Yine aynı şekilde antifungallar üzerinde bir gün aralıkla Tablo 4’de ifade edildiği gibi ölçüm yapılmış olup ve yine aynı şekilde PK-1’ de NE (yani etki yok) şeklinde çıkarken, PK-2’ de ise *Didymella sp.*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporium* NE (yani etki yok) ve *Aspergillus flavus* ile *Aspergillus niger* bu madde üzerinde etkili olduğu ortaya konulmuştur.

Fungus mikroorganizmaların Tablo 5’ de ise, Çalkalamalı Agar Tekniği (18+2 Kuralı) Fungus Mikroorganizmaların MIC değerleri gösterildi. *Aspergillus niger* için üremenin MIC değeri, 12,5 µl/ml konsantrasyon ve 10^{-3} seyreltme ile gerçekleştirilmiştir. *Didymella sp.* için üremenin MIC değeri, 6,25 µl/ml konsantrasyon ve 10^{-4} seyreltme ile gerçekleşmiştir. *Alternaria alternata* için üremenin MIC değeri, 12,5 µl/ml konsantrasyon ve 10^{-3} seyreltme ile gerçekleştirilmiştir. *Aspergillus flavus* için üremenin MIC değeri, 25 µl/ml konsantrasyon ve 10^{-2} seyreltme ile gerçekleşmiştir. *Candida albicans* için üremenin MIC değeri, 0,39 µl/ml konsantrasyon ve 10^{-8} seyreltme ile

gerçekleştirilmiştir. *Fusarium oxysporium* için üremenin MİK değeri, 12,5 µl/ml konsantrasyon ve 10^{-3} seyreltme ile gerçekleştirilmiştir.

Bakterilerin Broth Makro Dilüsyon Yöntemiyle MIC Değer Tablosu olan Tablo 6' ya bakıldığında ise %10' luk etken madde için;

B.subtilis 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

E.faecalis 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

K.aerogenes 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

E.faecium 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

S.aureus 10^{-7} de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

S.mutans 10^{-5} de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

E.coli 10^{-10} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-11} için pozitif,

P.aeruginosa 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

L.monocytogenes 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} için pozitif,

P.fluorescens 10^{-10} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) (µl/ml) olduğu ve 10^{-11} için pozitif,

Bakterilerin Broth Makro Dilüsyon Yöntemi ile MIC Değer Tablosu olan Tablo 7' ye bakıldığında ise %20' lik etken madde için;

B.subtilis 10^{-9} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

E.faecalis 10^{-5} de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

K.aerogenes 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

E.faecium 10^{-11} de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

S.aureus 10^{-11} de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

S.mutans 10^{-11} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

E.coli 10^{-11} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

P.aeroginosea 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

L.monocytagones 10^{-6} da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif,

P.fluorescens 10^{-12} de MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l/ml}$) olduğu ve 10^{-13} , 10^{-14} için pozitif sonuçlanmıştır.

Broth makro dilüsyon yönteminde MIC değerleri %10 ve %20 oranlarına göre karşılaştırıldığında; *B.subtilis*, *E. faecium*, *S.aureus*, *S.mutans*, *E.coli*, *P.fluorescens* da MIC (Minimum İnhibisyon Konsantratın) ($\mu\text{l /ml}$) değerlerinin %20 oranında daha az konsantrasyonda olduğu gözlemlenmiştir. Diğerlerinde olan *E.Faecalis*, *K.aerogenes*, *P.aeroginosea*, *L.monocytagones* %10 ve %20 oranlarına göre konsantrasyonlarında bir değişme olmadığı görülmüştür.

Antimikrobiyal maddeler, bakteri ve mantarları öldürücü (letal) veya bunların üremesini baskılayıcı etki gösterirler. Uygulanacak disk difüzyon testi, letal ve üremeyi baskılayıcı

dozu söylemek için tek başına yeterli değildir. Etkinin cinsini belirlemek amacıyla disk difüzyon testine ek olarak, MIC ve MBC/MFC testlerinin uygulanması gerekir. Letal etki gösteren ajanların MBC/MFC değerleri MIC değerlerine yakındır. Üremeyi baskılayıcı etki gösteren özütlerde MIC değerleri MBC/MFC değerlerinden çok düşüktür.

%10' luk etken madde için Minimum Bakterisidal Konsantrasyonuna ait görüntünün yer aldığı şekil 15' de ise, her bir numaralandırma MIC değerine kadar alınan seyreltmeleri ifade etmektedir ve her birine 5 µl emdirilmiştir. Bu sebeple de bu mikroorganizmaların bu etken madde üzerinde bakteriyostatik özellik gösterdiği belirlenmiştir.

%20' lik etken madde için Minimum Bakterisidal Konsantrasyonuna ait görüntünün yer aldığı şekil 16'de ise, her bir numaralandırma MIC değerine kadar alınan seyreltmeleri ifade etmektedir ve her birine 5 µl emdirilmiştir. Genel itibariyle de %20 düzeyine kullanılan etken madde için de %10' a benzer şekilde, MBC değeri bulunamamış olup ve bakteriyostatik özellik gösterdiği belirlenmiştir.

Tablo 8 ve Tablo 11' de sunulmuş olan %10' luk ve %20' lik etken madde uygulama tablolarında elde edilen uygulama dozlarına bakıldığında, birinci uygulama dozlarının insektedidal aktiviteleri üç farklı tarihte ve üç farklı tekrar ile yapılan kontrol sonucunda, “Etkili / Öldürücü” olduğu gözlemlenmiştir. Bu deney üç farklı uygulama dozları için gerçekleşmiş olup hepsinin sonucunda “Etkili / Öldürücü” olduğu gözlemlenmiştir.

Genel itibariyle insektesidal aktivite üzerine yapılan denemelerde; bu maddenin *Dermanyssus gallinae* (kırmızı tavuk biti) üzerinde çok etkili olduğu ve direk öldürücü etkisinin olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Allen MJ, Morby AP, White GF (2004) Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. *Biochem Biophys Res Commun* 318(2): 397–404
- Abad-Villar, E.M.; Etter, S.F.; Thiel, M.A.; Hauser, P.C. Determination Of Chlorhexidine Digluconate And Polyhexamethylene Biguanide İn Eye Drops By Capillary Electrophoresis With Contactless Conductivity Detection. *Anal. Chim. Acta* 2006, 561, 133–137.
- Andrews, J.M. 2002. The British Society For Antimicrobial Chemotherapy (Bsoc) Disc Diffusion Method For Antimicrobial Susceptibility Testing. 46s. Version 2.1.1.
- Arda, M. 2000. Temel Mikrobiyoloji. 2. Baskı. Medisan Yayınevi. Ankara, 80-92.
- Arıcan, M., Erdal, F. Ç., & Zamirbekova, N. (2020). Investigation of the Clinical Effectiveness of Polyhexanid/Polyhexamethylene Biguanide Wound Dressing in Chronic Cases. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 9(2), 194-199.
- Britz, J.; Meyer, W.H.; Wegner, G (2010). Poly(alkylene biguanides) as proton conductors for high-temperature PEMFCs. *Adv. Mater.* 22:E72–E76.
- Butcher, M. (2012). PHMB: an effective antimicrobial in wound bioburden management. *British journal of nursing*, 21(Sup12), S16-S21.
- Chindera, K., Mahato, M., Kumar Sharma, A., Horsley, H., Kloc-Muniak, K., Kamaruzzaman, N. F., ... & Good, L. (2016). The antimicrobial polymer PHMB enters cells and selectively condenses bacterial chromosomes. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Creppy, E. E., Diallo, A., Moukha, S., Eklu-Gadegbeku, C., & Cros, D. (2014). Study of epigenetic properties of Poly (HexaMethylene Biguanide) hydrochloride (PHMB). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), 8069-8092.

- de Paula, G F.; Netto, G I.; Mattoso, L H C (2011). Physical and Chemical Characterization of Poly(hexamethylene biguanide) Hydrochloride. *Polymers*. 3:928-941;
- Dugard PH, Mawdsley SJ (1982) [14C]-Polyaminopropyl biguanide (PHMB): Absorption through human epidermis and rat skin in vitro, Imperical Chemical Industries, Central Toxicology Laboratory, Alderley Park, Macclesfield, Cheshire, UK. Report No.: CTL/R/579, unpublished data, CBI, 15 October 1982.
- Duke OS. Natural pesticides from plants. 1990, pp 511-517.
- Eberlein, T., Haemmerle, G., Signer, M., Gruber-Moesenbacher, U., Traber, J., Mittlboeck, M., ... & Strohal, R. (2012). Comparison of PHMB-containing dressing and silver dressings in patients with critically colonised or locally infected wounds. *Journal of wound care*, 21(1), 12-20.
- EPA (2005), UnitedStatesEnvironmentalProtectionAgency, Washington, D.C. /http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/phmb_red.pdf, 2005 (accessed 14.12.12).
- EPA, (2004). UnitedStatesEnvironmental Protection Agency. Disinfectants for use on hard surfaces–Efficacy data requirements. Accessed at www.epa.gov/oppad001/dis_tss_docs/dis-01.htm on October 28, 2004.
- Ewart SL (2001). Disinfectants and control of environmental contamination. In: Smith BL. editor. Large Animal Internal Medicine: diseases of horses cattle, sheep and goats. 3rd edition.. St. Louis: Mosby. pp. 1371- 1380.
- Grotnitzky JA, Coats JR. 2002. QSAR Evaluation of monoterpenoids insecticidal Activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 4576-80.
- Hansen, C.M. Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook, 2nd Ed.; Crc Press: Boca Raton, Fl, Usa, 2007; P. 38.
- Heidari, A. (2016). Graph theoretical analysis of zigzag polyhexamethylene biguanide, polyhexamethylene adipamide, polyhexamethylene biguanide gauze and polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) boron nitride nanotubes

(BNNTs), amorphous boron nitride nanotubes (a-BNNTs) and hexagonal boron nitride nanotubes (h-BNNTs). *J Appl Computat Math*, 5(5), e143.

Isman MB. Neem and Other Botanical Insecticides: Barriers To Commercialization. *Phytoparasitica* 1997; 25: 339- 44.

Johnson Cc. In Vitro Testing: Correlations Of Bacterial Susceptibility, Body Fluid Levels And Effectiveness Of Antibacterial Therapy. In: Lorian V (Ed). *Antibiotics In Laboratory Medicine*. Fourth Edition, Baltimore: Williams Wilkins, 1996:813-34.

Kabara Jj (1984). *Cosmetic And Drug Preservation: Orinciples And Practise* (Cosmetic Scienceand Technology Series, Dekker M Inc., New York, Ny Usa (1984) Pp 631.

Kaehn, K (2010). Polihexanide: A safe and highly effective biocide. *Skin Pharmacol. Physiol.* 23 1: 7–16.

Kaehn, K. Polihexanide: A Safe And Highly Effective Biocide. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2010, 23 (Suppl. 1), 7–16.

Kennedy J, Bek J, Griffin D. Selection And Use Of Disinfectants. University Of Nebraskacooperative Extension G00-1410-A. November 2000.

Kim SI, Roh JY, Kim DH, Lee HS, Ahn YJ. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *J Stored Prod Res* 2003; 39: 293-303.

Kim, J. Marshall, M.R. And Wei, Ç. 1995. Antibacterial Activity Of Some EssentiaOil Components Against Five Foodborne Pathogens. *Journal Of Agriculture And Food Chemistry*, 43:2839-2845.

Koburger, T.; Hübner, N.-O.; Braun, M.; Siebert, J.; Kramer, A. Standardized Comparison Of Antiseptic Efficacy Of Triclosan, Pvp-Iodine, Octenidine Dihydrochloride, Polyhexanide And Chlorhexidine Digluconate. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010, 65, 1712–1719.

- Koffi-Nevry R, Manizan A L , Tano K , Clément Y B Y , Oulé M K, Koussémon M (2011).Assessment Of The Antifungal Activities Of Polyhexamethylene-Guanidine Hydrochloride(Phmgh)- Based Disinfectant Against Fungi Isolated From Papaya (*Carica Papaya* L.)Fruit. *Afr. J. Microbiol. Res.*5(24);4162-4169.
- Kramer A, Behrens-Baumann W(1997). Prophylactic use of topical anti-infectives in ophthalmology. *Ophthalmologica.* 211(Suppl 1):68-76.
- Kramer, A., Daeschlein, G., Kammerlander, G. et al (2004). Consensus paper on wound antisepsis. *Zentralbl für Wundheilung* 9(3):110–120.
- Kramer, A., Roth, B. Polihexanid (2008). In: Kramer, A., Assadian, O. (eds). *Wallhüßlers Praxis der Sterilisation.* Stuttarg: Thieme, 2008: 789-93
- Krebs Fc, Miller Sr, Ferguson Ml, Labib M, Rando Rf, Wigdahl B (2005). Polybiguanides,Particularly Amethylene Biguanide, Have Activity Against Human Immunodeficiency Virustype 1. *Biomed. Pharmacol.* 59: 438–445.
- Lalitha, M.K. 2004. Manual On Antimicrobial Susceptibility Testing [Http://Www.ijmm. Org/Documents/Antimicrobial.Doc](http://www.ijmm.org/Documents/Antimicrobial.Doc) Erişim Tarihi: 23.03.2006.
- Lambert, R. J. W. And Pearson, J. 2000. Susceptibility Testing, Accurate And Reproducible Minimum İnhibitory Concentration Mic. *Journal Of Applied Microbiology*, 88(5):784-90.
- Lebel, O.; Maris, T.; Wuest, J.D (2006). Hydrogen-Bonded Networks İn Crystals Built Frombis(Biguanides) And Their Salts. *Can. J. Chem.* 84:1426–1433.
- Llorens, E., Calderón, S., Del Valle, L. J., & Puiggalí, J. (2015). Polybiguanide (PHMB) loaded in PLA scaffolds displaying high hydrophobic, biocompatibility and antibacterial properties. *Materials Science and Engineering: C*, 50, 74-84.
- Maris P (1995). Modes of action of disinfectants *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 14 (1), 47-55.

- Messick, C. R., Pendland, S. L., Moshirfar, M., Fiscella, R. G., Losnedahl, K. J., Schriever, C. A., & Schreckenberger, P. C. (1999). In-vitro activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(2), 297-298.
- Moore K, Gray D (2007) Using Phmb Antimicrobial To Prevent Wound İnfection. *Wounds Uk*3(2): 96–102.
- Müller G, Kramer A (2005). Effect Of Selected Wound Antiseptics On Adult Articular Cartilage(Bovine Sesamoid Bone) İn The Presence Of Escherichia Coli And Staphylococcus Aureus.J. Orthopathol. Res., 23: 127-133.
- Müller, G., Koburger, T., & Kramer, A. (2013). Interaction of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) with phosphatidylcholine containing o/w emulsion and consequences for microbicidal efficacy and cytotoxicity. *Chemico-biological interactions*, 201(1-3), 58-64.
- Nandi, S.D. Spectrophotometric (Uv) İnvestigation On Biguanide And Substituted Biguanides. *Tetrahedron* 1972, 28, 845–853.
- O'Malley L.P., Shaw C.H., Collins A.N (2007). Microbial degradation of the biocide polyhexamethylene biguanide: isolation and characterization of enrichment consortia and determination of degradation by measurement of stable isotope incorporation into DNA. *Journal of Applied Microbiology*. 103 (2007): 1158–1169
- Oulé MK, Richard A, Anne-Marie B, Tano K, Anne-Marie M, Stephanie M, Rose KN, Korami D, Lorraine F, Lamine D (2008). Polyhexamethylene guanidine hydrochloride-based disinfectant: a novel tool to fight meticillin-resistant Staphylococcus aureus and nosocomial infections. *J. Med. Microbiol.*, 57: 1523-1528
- Öncüer C. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçlar. Ege Üniversitesi Basım Evi. 1995, pp 333.

- Öztekin E. Bitkisel Kökenli Bazı Yağların ve Bileşenlerin Patates Böceği, *Leptinotarsa decemlineata* L., (Col.: Chrysomelidae)’nin Bazı Biyolojik Dönemlerine Karşı Toksik Etkisi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 2009
- Para, G.; Hamerska-Dudrab, A.; Wilkb, K.A.; Warszyńska, P. Surface Activity Of Cationic Surfactants, Influence Of Molecular Structure. *Colloid. Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.* 2009, 365, 215–221.
- Quinn PJ, Markey BK (2001). Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. In: Block SS, editor. Disinfection, sterilization and preservation. 5th edition. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. pp1069-1103.
- Ranganath, A. S. (2011). A Comparative Evaluation of Antimicrobial Properties And Durability to Laundering of Selected Antimicrobial Agents on A Hospital Textile. (Master thesis). Colorado State University, FortCollins.
- Ranganath, A. S., Sarkar, A. K. (2014). Evaluation of Durability to Laundering of Triclosan and Chitosan on a TextileSubstrate, *Journal of Textiles*, 5, 1-5.
- Ray, P. Complex Compounds of Biguanides And Guanylureas With Metallic Elements. *Chem. Rev.* 1961, 61, 313–359.
- Ristić, T., Zemljič, L. F., Novak, M., Kunčič, M., Sonjak, S., Cimerman, N. G., Strnad, S. (2011). Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances, (A. Mendez-Vilas), 1, 36-51, Spain
- Rose, F.L.; Swain, G. Polymeric Diguanydes. Great Britain Patent 702,268, 13 January 1954.
- Roth, B.; Brill, F.H.H. Polihexanide For Wound Treatment—How It Began. *Skin Pharmacol. Physiol.* (2010), 23 (Suppl. 1), 4–6.
- Schnuch A, Geier J, Brasch J, Fuchs T, Pirker C Et Al (2000). Polyhexamethylene Biguanide: Arelevant Contact Allergen? *Contact Dermatitis* 42(5): 302–303

- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) (2015). Opinion of the scientific committee on consumer safety (SCCS) – 2nd Revision of the safety of the use of poly(hexamethylene) biguanide hydrochloride or polyaminopropyl biguanide (PHMB) in cosmetic products. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 73(3): 885–886.
- Tilton Rc, Howard Bj. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Howard Bj (Ed). *Clinical And Pathogenic Microbiology*. First Edition, St. Louis: The C.V. Mosby Company, 1987:121-56.
- Vantocil (2005) IB Antimicrobial-Technical Information Bulletin; Arch Chemicals, Inc.: Cheshire, CT, USA, 2005
- Walczak M., Richert A. & Burkowska-But A. (2014). The Effect Of Polyhexamethyleneguanidine Hydrochloride (Phmg) Derivatives Introduced Into Polylactide (Pla) On Theactivity Of Bacterial Enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol.*; 41:1719–1724.
- Wei, D; Ma, Q; Guan, Y; Hu, F; Zheng, A; Zhang, X; Teng, Z and Jiang, H. (2009). Structural characterization and antibacterial activity of oligoguanidine (polyhexamethylene guanidine hydrochloride). *Materials Science and Engineering C* 29 (2009) 1776–1780.
- Werthén M, Davoudi M, Sonesson A, Nitsche DP, Mörgelin Metal (2004). *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection and degradation of human wound fluid and skin proteins ex vivo are eradicated by a synthetic cationic polymer. *J Antimicrob Chemother* 54(4): 772– 779.
- Schoonhoven LM. 1982. Biological aspects of antifeedants. *Entomol Exp Appl*; 31:57-69.
- Isman MB. 1995. Leads and prospects for the development of new botanical insecticides. *Rev Pestic Toxicol*; 3:1-20.
- Isman MB. 1997. Neem and Other Botanical Insecticides: Barriers to Commercialization. *Phytoparasitica*; 25: 339-44.

- Cetin H, Yanikoglu A. 2006. A study of the larvicidal activity of *Origanum* (Labiatae) species from southwest Turkey. *J Vector Ecol*; 31: 118-22.
- Erler F, Polat E, Demir H, Cetin H, Erdemir T. 2009. Control of the mushroom phorid fly, *Megaselia halterata* (Wood), with plant extracts. *Pest Manag Sci*; 65:144-9.
- Kısmalı Ş, 1988. Madanlar N. *Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)'nın böceklere etkileri üzerinde bir inceleme. *Türk Entomol Derg*;12: 239-49.
- Workman, J., Jr.; Weyer, L. *Practical Guide To Interpretative Near-Infrared Spectroscopy*; Crc Press: Boca Raton, Fl, Usa, 2008; Pp. 240–262.
- Woźniak, B.; Dera, J. *Light Absorption In Sea Water*; Springer: New York, Ny, Usa, 2007; Pp. 124–126.

ÖZGEÇMİŞ

