ÇEŞİTLİ DEZENFEKTANLARIN MİNİMUM BAKTERİSİDAL KONSANTRASYONLARININ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*'NIN BİYOFİLM KÜLTÜRLERİNE KARŞI ARAŞTIRILMASI*,**

Emel MATARACI, A.Alev GERÇEKER

İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Pseudomonas aeruginosa su sistemlerinde, kaynaklarında veya suyla ilgili her ortamda genellikle biyofilmler içerisinde gömülü mikrokoloniler halinde üreme eğilimindedir. Biyofilmler planktonik hücrelere göre dezenfektanlara karşı çok daha dirençli olduğundan, başarılı bir dezenfeksiyon işleminin gerçekleştirilmesi için dezenfektanların biyofilmlere karşı bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, *P.aeruginosa* ATCC 15442 standart suşunun planktonik ve biyofilm hücre kültürlerine karşı sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün minimum bakterisidal konsantrasyonları (MBK) temiz ve kirli olmak üzere iki farklı deney koşulu altında mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Temas sürelerinin 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat uygulandığı deneylerde temiz koşullarda sodyum hipoklorit ve benzalkonyum klorürün planktonik hücrelere karşı MBK değerleri sırasıyla 0.06 mg/ml ve 0.016 mg/ml olarak saptanırken, kirli koşullarda bu değerler, sırasıyla dört ve iki kat artış göstermiştir. Sodyum hipokloritin biyofilmdeki bakteriye karşı MBK değerinin ise, 10 dakikalık temas süresinin sonunda 6 mg/ml olduğu, bu sürenin 30, 60 dakika ve 24 saate uzatıldığında sırasıyla 4, 2 ve 0.5 mg/ml'ye indiği tespit edilmiştir. Benzalkonyum klorürün ise biyofilmdeki bakteriye karşı belirgin bir bakterisidal aktivite gösteremediği saptanmıştır.

Sonuç olarak, bulgularımız biyofilm şüphesi bulunan bir su sisteminde dezenfeksiyon işlemi yapılırken kullanılacak dezenfektan maddenin tipini, miktarını ve temas süresini seçerken dezenfektanın biyofilm üzerinde oluşturduğu bakterisidal aktivitenin göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: benzalkonyum klorür, biyofilm, minimum bakterisidal konsantrasyon, *Pseudomonas aeruginosa*, sodyum hipoklorit

SUMMARY

Evaluation of the Minimum Bactericidal Concentrations of Various Disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilm Cultures

In water systems, sources or any aqueous environment *Pseudomonas aeruginosa* tend to grow as microcolonies embeded in biofilms. Since biofilms are much more resistant to disinfectants than planktonic cells, it is necessary to determine the bactericidal activity of disinfectants against biofilms, in order to achieve a successful procedure of disinfection. For this purpose, under two different experimental conditions, clean and dirty, the minimum bactericidal concentrations (MBC) of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride were assessed against planktonic and biofilm cell cultures of *P.aeruginosa* ATCC 15442 standard strain using microdilution method. By applying 5, 10, 15, 30, 60 minutes and 24 hours contact time, under clean conditions the MBC values of sodium hypochlorite and benzalkonium chloride against planktonic cells were obtained as 0.06 mg/ml and 0.016 mg/ml, respectively, whereas under dirty conditons these values were increased four and two fold, respectively. The MBC values of sodium hypochlorite against cells in biofilms was 6 mg/ml after an exposure time of 10 minutes and decreased to 4, 2 and 0.5 mg/ml after contact time of 30, 60 minutes and 24 hours, respectively. Benzalkonium chloride didn't show any significant bactericidal activity against biofilms.

Consequently, the findings of our study show that when a disinfection procedure is carried out in a water system where biofilms are expected, it is necessary to take the bactericidal activity of the disinfectant into consideration while the type and amount of the disinfectant and exposure time have been choosen.

Keywords: benzalkonium chloride, biofilm, minimum bactericidal concentration, *Pseudomonas aeruginosa*, sodium hypochlorite

İletişim adresi: A.Alev Gerçeker. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beyazıt/İSTANBUL

Tel: (0212) 440 00 00/13521, GSM: (0532) 562 02 19

e- posta: alev@bnet.net.tr

Alındığı tarih: 22.09.2011, yayına kabul: 03.11.2011

*26.ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi'nde sunulmuştur. Bildiri No.S-7 (18-22 Mayıs 2011, Kızılağaç-Manavgat)

**İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No.2812

GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa çevre kaynaklı bir mikroorganizma olup suda, toprakta ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Doğada yaygın bir şekilde bulunabilen bu bakteriye potansiyel patojen özelliğini veren başlıca niteliklerinden biri ise üreme şeklidir. *P.aeruginosa* sulu ortamlarda planktonik bir şekilde üreyebildiği gibi biyofilm denilen, bulunduğu sisteme yapışık bir ekzopolisakkarit matriksin içinde mikrokoloniler halinde de üreyebilmekte, uygun laboratuvar koşulları altında ise birkaç yüz mikrometre kalınlığına kadar ulaşabilen karakteristik biyofilmler oluşturabilmektedir⁽¹⁵⁾.

P.aeruginosa'nın dezenfektanlar dahil olmak üzere sulu ortamlarda sahip olduğu bu kolay üreme yeteneği, hastanelerde tıbbi girişimler için kullanılan gereçlerin kontamine olmasına ve bunun sonucunda ciddi hastane infeksiyonlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır⁽¹¹⁾. Ancak sadece hastane infeksiyonlarına değil, hastane dışındaki sağlıklı kişilerde yüzme havuzu, jakuzi ve kontakt lens kullanımına bağlı infeksiyonların ortaya çıkmasına da neden olabilmektedir⁽¹⁶⁾. Kontaminasyon kaynağı olmasının dışında, biyofilmlerin neden olduğu biyolojik kirlilikler mühendislik sistemlerine de zarar verebilmekte; endüstrinin her alanında, suyun girdiği her sistemdeki varlığı paslanmayı hızlandırmakta, borulardaki basıncı arttırmakta veya sıcaklığın gerektiği şekilde iletilmesini önleyerek sistemin verimini düşürebilmektedir. Ayrıca binaların soğutma kulelerinde veya içme suyunu besleyen borularda biyofilmlerin bulunması, suyun kontamine olmasına ve halk sağlığı açısından ciddi risk teşkil etmesine neden olabilmektedir⁽⁸⁾.

Kontaminasyonu kontrol etmenin başlıca yollarından biri etkili bir dezenfeksiyon işleminin yapılmasıdır. Bu amaçla en çok kullanılan dezenfektanlar arasında klorlu bileşikler, özellikle sodyum hipoklorit (NaOCl) yer alır. Genellikle % 1-5 konsantrasyonlarda kullanılan NaOCl birçok bakterinin vejetatif şeklini kolaylıkla öldürebilmektedir⁽¹⁰⁾. Oksidasyon yoluyla öldürücü etkisini gösteren bu dezenfektan, hücre membranında hasarlar oluşturup, hücre içeriğinin dışarıya akmasına neden olabildiği

gibi, deoksiribonükleik asite (DNA) de hasar verebilmektedir⁽⁷⁾. Çalışmada kullanılan diğer dezenfektan olan benzalkonyum klorür (BAK) ise katyonik yüzey aktif bir deterjan olup, bakterinin hücre membranına hasar vererek etkisini göstermektedir⁽¹⁰⁾.

Dezenfektanların minimum bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesinde kullanılan standart yöntemler genellikle dezenfektanların süspansiyon halindeki planktonik mikroorganizmalara karşı olan etkisini araştırmaktadır. Ancak bu deneylerle elde edilen sonuçlar dezenfektanların bakterinin biyofilm içinde bulunan şekline olan etkisi konusunda bilgi verememektedir. Oysa ki, sağlık veya endüstri alanında önem taşıyan bakteriler genellikle biyofilmlerin içinde bulunmakta ve geleneksel dezenfektan aktivite testleri ile bunlara karşı olan etkinlik belirlenememektedir.

Bu nedenle hastane ve endüstrinin çeşitli alanlarında yüzey ve ekipman dezenfeksiyonunda sık kullanılan dezenfektanlar olan NaOCl ve BAK'ın *P.aeruginosa*'nın süspansiyon içinde serbest halde bulunan planktonik kültürünün yanı sıra, katı yüzey üzerinde oluşturduğu statik biyofilm kültürüne karşı minimum bakterisidal konsantrasyonlarının belirlenmesi, çalışmamızın amacını oluşturmaktadır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteri: *P.aeruginosa* ATCC 15442 standart suşu kullanılmıştır.

Nötralizan çözeltiler: Çalışmada araştırılan dezenfektanların nötralize edilmesinde kullanılan nötralizanların seçiminde CEN'in (European Committee for Standardisation) EN 1276 standardında bildirilen validasyon testleri uygulanmış, sonuçlar standardın kriterleri doğrultusunda değerlendirilerek, etkili olan ancak toksik olmayan nötralizanlar kullanılmıştır⁽⁶⁾. Bu amaçla çalışmalarda NaOCl için % 12.5 sodyum tiyosülfat, % 0.7 lesitin, % 0.5 polisorbata 80; BAK için ise % 0.6 sodyum tiyosülfat, % 0.7 lesitin, % 3 polisorbata 80, % 3 saponin içeren Dey/Engley (D/E) buyyonu kullanılmıştır.

Bakteri biyofilminin hazırlanması: Bakterinin glukoz içeren triptik soya buyyonun-

daki (TSB) 24 saatlik kültüründen 10^8 kob/ml'lik süspansiyonu hazırlanmış, bu süspansiyondan 500'er µl alınarak 24 kuyuluk mikrop-laklara dağıtılmış, 4 saat 37°C'de inkübe edil-dikten sonra üst sıvı alınarak fizyolojik tuzlu su (FTS) ile yıkanmış, kuyulara 500'er µl TSB ilave edildikten sonra inkübasyona 20 saat daha devam edilmiştir. İnkübasyonun ardından üst sıvının alınıp, kuyuların FTS ile yıkanmasıyla temiz koşullardaki bakteri biyofilmleri elde edilmiştir. Organik madde varlığının dezenfektanın aktivitesine olan etkisinin araştırıldığı deneyler-de ise, biyofilm oluşturulurken kullanılan besi-yerine % 0.3 oranında sığır albümini ilave edil-miştir.

Dezenfektanların minimum bakterisidal kon-santrasyonlarının (MBK) saptanması

Süspansiyon halindeki bakteriye karşı MBK değerinin saptanması: Çalışmada Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafın-dan bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alı-narak *P.aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı NaOCl ve BAK'ın MBK değerleri yöntemde uygulanan bazı modifikasyonlarla araştırılmış-tır⁽³⁾. Deneylerde besiyeri olarak TSB veya orga-nik madde içeriği düşük olan triptonlu sodyum klorür (TSK) çözeltisi kullanılmıştır. Kirli yüzey koşullarının dezenfektanın aktivitesine olan etkisinin araştırıldığı deneylerde ise, organik madde olarak % 0.3 oranında sığır albümini içe-ren TSK çözeltisinde hazırlanmış inokulumlar kullanılmıştır⁽⁶⁾. Her temas süresi ve deney koşu-lu için deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

Biyofilmdaki bakteriye karşı MBK değe-rinin saptanması: Hazırlanmış olan bakteri biyofilminde MBK değerleri, CEN'in önermiş olduğu kriterler doğrultusunda CLSI tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak araştırılmıştır^(3,6,13). Bu amaçla, bakteri biyofilmi-nin bulunduğu 24 kuyuluk mikrop-lağın kuyula-rına dezenfektanların sert suda hazırlanan azala-n konsantrasyonlardaki çözeltileri 550'şer µl olacak şekilde tatbik edilmiş, mikrop-laklar 5, 10, 15, 30, 60 dakika ve 24 saat oda sıcaklığında bek-letildikten sonra üst sıvı alınarak kuyulara yapı-lan nötralizan ilavesiyle reaksiyon durdurul-muştur. Biyofilmi parçalamak amacıyla hücre kazıyıcısının yardımıyla biyofilm yüzeyden

ayrılmış, ardından sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Her kuyudan içeriğinin % 10'u alı-narak % 0.1 L-histidin, % 0.3 lesitin, % 3 polisori-bat 80 içeren nötralizantlı triptik soya agarın yüzeyine tatbik edilmiştir. 37°C'de bir gece inkü-be edildikten sonra oluşan koloniler sayılmış ve rejeksiyon değeri esas alınarak biyofilmdaki bakterinin % 99.9'unu öldüren en düşük dezen-fektan konsantrasyonu MBK değeri olarak kabul edilmiştir. Her temas süresi ve deney koşulu için deneyler üç kez tekrar edilmiştir.

BULGULAR

Besiyeri olarak TSB'nin kullanıldığı deney-lerde süspansiyon halindeki *P.aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı elde edilen MBK değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Bu deneylerde muhtemelen besiyerinin bileşiminde bulunan yüksek orandaki organik madde varlığından dolayı NaOCl ile yüksek konsantrasyonlarda MBK değerleri elde edilmiştir. Ortamda bulunan maddelerin sonuçları etkileyebileceğini dikkate almamız sonucunda CEN'in EN 1276 standardı-nın ön gördüğü şartlar doğrultusunda temiz yüzey koşullardaki dezenfektanların etkinliğini saptamak amacıyla TSK çözeltisinin, kirli yüzey koşullarının oluşturulması amacıyla % 0.3 oranında sığır albüminin ilave edilmesiyle uygula-

Tablo 1. Dezenfektanların triptik soya buyyonunda hazırlanan süspansiyon halindeki *P. aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı saptanan MBK değerleri (mg/ml).

Dezenfektan	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
NaOCl	4	3.5	3	2	1.5	0.5
BAK	0.032	0.032	0.032	0.016	0.016	0.016

Tablo 2. Sodyum hipokloritin süspansiyon halinde ve biyofilmdaki *P.aeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli (% 0.3 sığır albümini) yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (mg/ml).

Koşul	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
Bakteri süspansiyonu						
Temiz koşul	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
Kirli koşul	0.25	0.25	0.25	0.125	0.125	0.125
Bakteri biyofilmi						
Temiz koşul	> 12	6	6	4	2	0.5
Kirli koşul	> 12	10	10	8	4	2

Tablo 3. Benzalkonyum klorürün süspansiyon halinde ve biyofilmdeki *Paeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz ve kirli (% 0.3 sığır albümini) yüzey koşullarında saptanan MBK değerleri (mg/ml).

Koşul	Temas süresi (dakika)					
	5	10	15	30	60	24 saat
Bakteri süspansiyonu						
Temiz koşul	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016	0.016
Kirli koşul	0.064	0.032	0.032	0.032	0.032	0.032
Bakteri biyofilmi						
Temiz koşul	> 20	> 20	> 20	> 20	20	20
Kirli koşul	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20	20

nan deneylerde elde edilen NaOCl'e ait bulgular Tablo 2'de, BAK'a ait bulgular ise Tablo 3'te verilmiştir.

TARTIŞMA

Amerika Birleşik Devletleri'nde (A.B.D.) ve Avrupa'da dezenfektanların antimikrobiyal aktivitelerinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemler kantitatif süspansiyon testi esaslıdır^(1,6). Dezenfektanların bakterisidal aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılan bu standart yöntemler genellikle dezenfektanların süspansiyon halindeki planktonik mikroorganizmalara karşı olan etkisini araştırmaktadır. Ancak bu deneylerle elde edilen sonuçlar dezenfektanların, bakterinin biyofilm içinde bulunan şekline olan etkisi konusunda bilgi verememektedir. Oysa ki, gerek sağlık gerekse endüstri alanındaki bakteriler serbest yaşayan şekilden ziyade genellikle yüzeye yapışık bir halde bulunurlar. Bu durumu dikkate alarak, A.B.D.'de ve Avrupa'da yer alan komiteler temelde aynı olup, küçük detaylarda farklılık gösteren ve sert yüzeylerde dezenfektanın aktivitesini değerlendiren "taşıyıcı testi"ni geliştirmişlerdir⁽²⁾. Bu testlerde bakterinin sadece yüzeye yapışabileceği kadar bir inkübasyon süresi uygulanmaktadır. Oysa ki, biyofilmin içerisindeki bakterinin çoğalıp, biyofilmin olgun şeklini alabilmesi için çok daha uzun bir sürenin geçmesi gerekmektedir⁽¹⁵⁾. Bakterilerin biyofilm içerisinde gömülü bulunan şekilleri, serbest planktonik şekilleriyle kıyaslandığında dezenfektanlara karşı çok daha yüksek direnç gösterirler ve inaktive edilmeleri için bazen 1000 katı konsantrasyondaki çözeltilerin kullanılması gerekmektedir^(4,14). Bunun

başlıca nedenleri arasında biyofilmi oluşturan polimerik matriksin bir bariyer olarak işlev görmesi, biyofilme gömülü bakterilerin genetik değişikliğe uğramış olması ve çok düşük seviyede metabolik aktivite ve bölünme hızı göstermeleri yer almaktadır. Özellikle suyu taşıyan sistemlerin bağlantı parçalarında yerleşme eğilimi gösteren *Paeruginosa* biyofilmi, rezervuar olarak işlev görerek, biyofilm içerisinde gelişen dirençli bakterinin aralıksız bir şekilde su sistemine yayılmasına ve yeni kontaminasyon kaynaklarını oluşturmaya neden olmaktadır^(8,15). Bu nedenle, dezenfektanların biyofilmlere karşı olan aktivitesinin değerlendirilmesine yönelik standart bir test prosedürüne gereksinim duyulmaktadır.

Başta antibiyotikler olmak üzere antimikrobik etkili maddelerin biyofilmler üzerine etkilerinin araştırılması için çeşitli yöntemler tarif edilmiştir. Bunların başında araştırmacılar tarafından farklı koşullarda hazırlanan biyofilmdeki bakterinin % 99.9'unu öldüren en düşük konsantrasyon olan MBK değerinin tespit edilmesine yönelik testler gelmektedir^(9,13).

Çalışmamızda CLSI tarafından bildirilen mikrodilüsyon yöntemi esas alınarak, sodyum hipokloritin süspansiyon halindeki *Paeruginosa* ATCC 15442 suşuna karşı temiz yüzey koşullarında saptanan MBK değerlerinin uygulanan her temas süresi için 0.06 mg/ml, ortama sığır albümininin ilavesiyle oluşturulan kirli koşullarda ise 5-15 dakika için 0.25 mg/ml, 30, 60 dakika ve 24 saat için ise 0.125 mg/ml olduğu belirlenmiştir. Aynı deney daha yüksek oranda organik madde içeren TSB ile uygulandığında ise MBK değerlerinin 5 dakikalık temas süresi için 4 mg/ml'ye kadar yükselebildiği tespit edilmiştir. Elde edilen bu bulgular, sodyum hipo-

kloritinin ortamdaki organik madde varlığından olumsuz bir şekilde etkilendiğini, bu organik maddelere bağlanması sonucunda çözeltideki aktif klor miktarının azalmasına bağlı olarak bakterisidal aktivitesinin ortamda bulunan organik maddenin yoğunluğuna bağlı olarak 4-60 kat azalabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda sodyum hipokloritin aynı suşun biyofilmdeki şekline karşı temiz yüzey koşullarında oluşturduğu MBK değerleri araştırıldığında ise 12 mg/ml konsantrasyondaki çözeltinin 5 dakikada herhangi bir bakterisidal aktivite oluşturmadığı, 10 dakikalık temas süresinin sonunda elde edilen MBK değerinin 6 mg/ml olduğu, temas süresinin 30, 60 dakika ve 24 saate kadar uzamasıyla bu değerlerin sırasıyla 4, 2 ve 0.5 mg/ml'ye kadar düşebildiği, temas süresinin sodyum hipokloritin biyofilme nüfuz edebilmesi için etkili bir faktör olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde de Beer ve ark.⁽⁵⁾ mikroelettrotlar kullanarak yapmış oldukları araştırmalarında, ortamdaki klor konsantrasyonunun arttığı ve temas süresinin uzadığı ölçüde dezenfektanın biyofilme nüfuz etme oranında da artış olduğunu gözlemişlerdir. Öte yandan ortama organik maddenin ilave edilmesi MBK değerinin 10 dakikalık temas süresinde 10 mg/ml'ye yükselmesine neden olmuştur. Elde edilen bu bulgular, sodyum hipokloritin biyofilmdeki bakteriyi öldürebilmesi için gereken en düşük konsantrasyonunun planktonik bakteriyi öldürmek için gerekenden 100 kat daha fazla olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda araştırılan diğer dezenfektan olan benzalkonyum klorürün temiz yüzey koşullarında bakterinin süspansiyon halindeki şekline karşı sodyum hipoklorite oranla daha düşük konsantrasyonlarda etkili olduğu gözlenmiş, uygulanan her temas süresinde MBK değeri 0.016 mg/ml olarak saptanmıştır. Elde ettiğimiz bu bulgu, Ohta ve ark.⁽¹²⁾'nin çeşitli bakterilere karşı katyonik dezenfektanların etkinliklerini araştırdıkları çalışmalarında benzalkonyum klorürün 3 dakikalık temas süresinin sonunda klinik materyalden izole edilen *P.aeruginosa* suşuna karşı elde etmiş oldukları 16 µg/ml konsantrasyondaki MBK değeri ile uygunluk göstermektedir. Ortama sığır albümininin ilavesiyle kirli koşul oluşturulduğunda ise uygulanan

temas süresine bağlı olarak MBK değerlerinin en fazla iki kat artış gösterdiği, deneylerde TSB'nin kullanılmasıyla bu sonucun değişmediği gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular benzalkonyum klorürün sodyum hipokloritin aksine organik maddelerin varlığından fazla etkilenmediğini göstermektedir. Öte yandan, benzalkonyum klorürün bakterinin biyofilmdeki şekline karşı sodyum hipoklorit kadar etkili olmadığı, temiz yüzey koşullarında ancak 60 dakikalık temas süresinin sonunda 20 mg/ml gibi yüksek bir konsantrasyonda minimum bakterisidal etki gösterebildiği belirlenmiştir.

Çalışmamızdaki bulgular ve diğer araştırmacılar tarafından elde edilen bulgular şunu göstermektedir ki, dezenfektanların bakterisidal etkilerinin değerlendirilmesinde CLSI'in önermiş olduğu mikrodilüsyon yöntemi ile MBK değerinin saptanmasına yönelik bir yöntem veya AOAC, ANFOR (Association Française de Normalisation) veya CEN'in önermiş oldukları standart kantitatif süspansiyon testleri yetersiz kalmaktadır. Çünkü bu yöntemlerin hiçbirisi biyofilm içerisindeki bakteri üzerinde dezenfektanların bakterisidal etkileri hakkında fikir vermemektedir. Oysa ki, *P.aeruginosa* su sistemlerinde, kaynaklarında veya suyla ilgili her ortamda genellikle biyofilm içerisinde gömülü mikrokoloniler halinde üreme eğilimi göstermektedir. Sonuç olarak, bulgularımız biyofilm şüphesi olan hastane veya endüstriyel ortamdaki bir su sisteminde dezenfeksiyon işlemi yapılırken kullanılacak dezenfektan maddenin tipini, miktarını ve temas süresini seçerken dezenfektanın biyofilm üzerinde oluşturduğu bakterisidal aktivitenin göz önünde bulundurulması gerektiğini göstermektedir. Yapmış olduğumuz araştırma göstermektedir ki, dezenfeksiyon işlemlerinde yaygın kullanılan sodyum hipokloritin biyofilmin bulunduğu ortamda bakterisidal aktivite oluşturabilmesi için bakterinin planktonik şeklinin inaktive edilmesinde gereken konsantrasyona oranla, temas süresine bağlı olarak, 100 katına varabilen konsantrasyonlarda kullanılması gerekmektedir; benzalkonyum klorür ise yüksek konsantrasyonlarda dahi biyofilme karşı yetersiz kalmaktadır.

KAYNAKLAR

1. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International, AOAC International, Arlington, Va (1995).
2. Bloomfield SF, Arthur M, Van Klinger B, Pullen W, Holah JT, Elton R. An evaluation of the repeatability and reproducibility of a surface test for the activity of disinfectants, *J Appl Bacteriol* 1994; 76(1):86-94.
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04420.x>
3. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A7, Wayne, PA (2006).
4. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol* 1995;49:711-45.
<http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
PMid:8561477
5. de Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection, *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(12):4339-44.
PMid:7811074 PMCID:201990
6. European Committee for Standardization. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – Test method and requirements, European Standard EN 1276, Brussels (1997).
7. Haas CN, Engelbrecht RS. Physiological alterations of vegetative microorganisms resulting from aqueous chlorination, *J Water Pollut Control Fed* 1980;52(7):1976-89.
PMid:6995623
8. Hallam NB, West JR, Forster CF, Simms J. The potential for biofilm growth in water distribution systems, *Water Res* 2001;35(17):4063-71.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00248-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00248-2)
9. Harrison JJ, Turner RJ, Joo DA et al. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(8):2870-81.
<http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00203-08>
PMid:18519726 PMCID:2493123
10. Marsik FJ, Denys GA. Sterilization, decontamination, and disinfection procedures for the microbiology laboratory, "Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds): Manual of Clinical Microbiology, 6. baskı" kitabında s.86-71, ASM Press, Washington (1995).
11. Moore NM, Flaws ML. Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections, *Clin Lab Sci* 2011;24(1):43-6.
PMid:21404964
12. Ohta S, Misawa Y, Miyamoto H et al. A comparative study of characteristics of current-type and conventional-type cationic bactericides, *Biol Pharm Bull* 2001;24(9):1093-6.
<http://dx.doi.org/10.1248/bpb.24.1093>
13. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. In vitro activity of ceftazidime, ciprofloxacin, meropenem, minocycline, tobramycin and trimethoprim/sulfamethoxazole against planktonic and sessile *Burkholderia cepacia* complex bacteria, *J Antimicrob Chemother* 2009;64(4):801-9.
<http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp253>
PMid:19633000
14. Russell AD. Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents, "Fraise AP, Lambert PA, Maillard JY (eds): Principles and Practice of Disinfection Preservation Sterilization, 4. baskı" kitabında s.98-128, Blackwell Publishing, New York (2004).
15. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm, *J Bacteriol* 2002;184(4):1140-54.
<http://dx.doi.org/10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002>
PMid:11807075 PMCID:134825
16. Yoder JS, Hlavsa MC, Craun GF et al. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for waterborne disease and outbreaks associated with recreational water use and other aquatic facility-associated health events-United States, 2005-2006, *MMWR Surveill Summ* 2008;57(9):1-29.