

Dr. Hikmet Satıcı
Genel Müdür / General Manager
Borkan Yapı Kimyasalları İzolasyon
San. ve Tic. Ltd. Şti.

Sedat Sisnelioğlu
Pazarlama Müdürü
Marketing Manager
Baymel Poliüretan Kimya
San. ve Tic. Ltd. Şti.

Prof. Yusuf Z. Menciloğlu
Malzeme Bilimi ve Nano Mühendislik
Material Science and Nanoengineering
Sabancı Üniversitesi

Prof. Hikmet Budak
Moleküler Biyoloji,
Genetik ve Biyomühendislik
Molecular Biology, Genetics and
Bioengineering
Sabancı Üniversitesi
Sabanci University

Dr. Burcu Saner Okan
Nanoteknoloji Uygulama
Araştırma Laboratuvarı
Nanoteknoloji Application
and Research Laboratory
Sabancı Üniversitesi
Sabanci University

MSc. Reyhan Fatima Bulut
Moleküler Biyoloji, Genetik ve
Biyomühendislik
Molecular Biology, Genetics and
Bioengineering
Sabancı Üniversitesi
Sabanci University

Antimikrobiyal Poliüretan Tabanlık Üretimi

Antimicrobial Polyurethane Shoe Insole Production

Ayakkabı, çorap ve tabanlık gibi malzemeler bakteri, küf ve mantar oluşumunun en yaygın olduğu ve en çok rahatsızlık verdiği alanlardan biridir ve engellemek için sürekli olarak üzerinde çalışmalar yapılmaktadır.

Bu malzemeler insan sağlığını direkt etkileyebildiğinden ve vücutla da temas halinde olduğundan dolayı sınırlı sayıda kullanılacak antimikrobiyal malzeme bulunmaktadır. Antimikrobiyal malzemelerin çoğunun etkileri geçici olup insan sağlığına da zarar verebilecek yan etkileri de bulunmaktadır. Bu tip malzemeler belli sürelerde uygulandığında aktivite göstermektedir.

Ayrıca, gümüş gibi antimikrobiyal malzemeler zamanla aktiviteleri azalmakta ve ağır metal olduklarından dolayı insan vücudunda birikme riski taşımaktadır.

Antimic Guardian reaktif ve hemen hemen her türlü yüzeye tutunabilen ve reaksiyona girerek kovalent bağ ve dolayısıyla kalıcı etki sağlayan bir antimikrobiyal malzemedir.

Bu yazımızda hem geniş bir mikroorganizma çeşidine karşı etkinliği testlerle kanıtlanmış, hem de insan ve çevre sağlığı açısından uygunluğu test edilerek kabul görmüş Antimic Guardian malzemesinin ayakkabı tabanında uygulamasının sonuçlarını sunuyoruz.

Test Edilen Malzeme: Baymel BYM 803 ABS poliüretan sistemiyle hazırlanan Antimic ile muamele edilmiş ve edilmemiş poliüretan ayakkabı tabanı amaçlı sünger örnekleri.

Üretici: Baymel Poliüretan Kimya San. Tic. Ltd. Şti.

Uygulanan Test: Staphylococcus aureus ATCC 43300 patojeni ile Japanese Industrial Standard (JIS) Z 2801: 2000 [1] testine tabi tutulmuştur. Bu standart antimikrobiyal ürünlerin yüzeylerindeki antimikrobiyal etkinliği ölçmek için tasarlanmıştır.

The growth of bacteria, mold and fungus inside footwear or other items such as socks or insoles is the most common problem in daily life. Therefore, there have been several studies about the production of antimicrobial materials to solve this problem.

There is a limited number of antimicrobial materials in use because these products come into the direct contact with the human body and can affect the human health negatively. Most of the antibacterial agents used for this purpose either are temporarily active or have potential health hazards. These materials should be applied on surfaces periodically to provide antimicrobial activity.

In addition, some antibacterial agents such as silver ions have potential risks due to the accumulation of heavy metal in the body.

Antimic Guardian is a reactive and wide spectrum antibacterial agent which can bind to the most of surfaces by forming strong covalent bonds that provide long term protection.

In the present study, the test results of Antimic Guardian applied polyurethane shoe insoles were shown. Antimic® provides the highest level of antimicrobial protection by reducing the risks to human health and the environment.

Test Material: Polyurethane shoe insole sponge samples produced from Baymel BYM 803 ABS polyurethane system.

Producer: Baymel Poliüretan Kimya San. Tic. Ltd. Şti.

Test Method: The antimicrobial tests were conducted by applying Japanese Industrial Standard (JIS) Z 2801: 2000 [1] by using Staphylococcus aureus ATCC 43300 pathogen. This standart is chosen to measure the antibacterial activity on the surface of materials.

Kullanılan Kimyasal ve Materyaller

LB broth: 10 g Tryptone, 5g Yeast extract, 10 g NaCl tartılarak 1000 mL distile suda çözülmüştür.

LB agar: 10 g Tryptone, 5g Yeast extract, 10 g NaCl, 15g Agar tartılarak 1000 mL distile suda çözülmüştür

Nutrient agar: 5 g Beef extract, 10 g Peptone, 5 g NaCl, 15 g Agar tartılarak 1000 mL distile suda çözülmüştür.

Fosfat tampon stok solüsyonu: 34 g KH_2PO_4 500 mL distile suda çözüldükten sonra pH değeri 7,2 olarak ayarlanmış ve hacim distile su ile 1000 mL ye tamamlanmıştır.

Fosfat tampon çözeltisi: 1 mL fosfat tampon stok solüsyonu 800 mL distile suda dilüe edilmiştir.

Diğer materyaller: Metal numune penseleri, bistüri, petri plateler, termometre, stretch film, plastik örnek saklama poşetleri, spektrofotometre.

Hazırlanan solüsyon ve besi yerleri, kullanılacak bistüri ve metal numune penseleri otoklavda 121°C derecede 15 dakika süre ile sterilize edilmiştir.

Metot

Antimic içeren ve içermeyen örnekler bistüri yardımı ile 4x4 cm²'lik kareler halinde kesilmiştir.

(Şekil 1). Sünger örneklerin 1 cm kalınlıkta olmasına dikkat edilmiştir. Poliüretan taban.

örneklerinin ise kendi kalınlıkları muhafaza edilmiştir. Antimic ile muamele gören ve görmeyen her numuneden 3 adet kesit alınmıştır. Alınan kesitlerin yüzeyleri %70 etil alkol içeren pamuklar yardımı ile silinmiş ve örnekler tüm yüzeylerin kuruması sağlanacak şekilde petri kaplarında bekletilmiştir.

-80°C derecede muhafaza edilen stok *S. aureus* hücreleri aşılama ile katı LB besiyeri üzerine (streak plate metodu ile) inokülasyon işlemi yapılmıştır.

24 saat 37°C derecede inkübe edilen plakalar üzerinde oluşan *S. Aureus* kolonilerinden biri seçilerek tekrar 15 mL LB broth kültüründe 18 saat süre ile 37°C derecede inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Sıvı LB besi yeri ile 10-1, 10-2 ve 10-3 seyreltmelerde hazırlanan hücre kültürünün OD (optik densite) değeri spektrofotometrede 600 nm dalgaboyunda ölçüldükten sonra 18 saat inkübe edilmiş kültür, son hücre konsantrasyonu 2,5-10x10⁻⁵ hücre/mL olacak şekilde fosfat tampon çözeltisi ile eklenmiştir [2].

Chemicals and Materials

LB broth: 10 g Tryptone, 5g Yeast extract, 10 g NaCl are weighed and dissolved in 1000 mL distilled water.

LB agar: 10 g Tryptone, 5g Yeast extract, 10 g NaCl, 15g Agar are weighed and dissolved in 1000 mL distilled water.

Nutrient agar: 5 g Beef extract, 10 g Peptone, 5 g NaCl, 15 g Agar are weighed and dissolved in 1000 mL distilled water.

Phosphate buffer stock solution: 34 g KH_2PO_4 is dissolved in 500 mL distilled water. pH is adjusted to 7,2 and volume is increased upto 1000 mL with distilled water.

Phosphate buffer solution: 1 mL phosphate buffer stock solution is diluted in 800 mL distilled water.

Other Materials: Metal sample penses, razor knife, petri plates, thermometer, stretch film, plastic sample bags and spectrophotometer.

All materials were sterilized in autoclave at 121°C for 15 minutes.

Method

Antimic containing and non-containing sponge samples were cut into 4x4 cm² square pieces. Three samples were used for each trial.

Surfaces of these samples were washed with 70% ethanol and wiped by clean cotton pads and dried.

-80°C stored stock *S. aureus* cells were inoculated by inoculating loop on solid LB feeder (streak plate method). After the formation of *S. Aureus* colonies on the incubated plate at 37°C for 24 hours, was chosen and put in 15 ml LB broth culture for 18 hours at 37°C incubation.

LB liquid medium was diluted were prepared at 0,1; 0,01 and 0,001 concentrations. The OD (optical density) of the cell culture dilutions were measured and 18 hours incubated and the final cell concentrations were adjusted in phosphate buffer at 2,5-10 x 10⁻⁵ cell/mL level.

60 uL of Cell dilution solution was applied on all samples by a micropipette. The plates were covered by stretch film and incubated for 24 hours at 37°C.

After washing proces, cell culture samples at 0,1 and 0,01 concentrations were prepared by dilution process. 1 ml of the diluted cell cultures was transferred into sterile petri plates.



Kare şeklinde kesilen örneklerin üst yüzeyine mikropipet yardımı ile hazırlana hücre çözeltileri 60 uL ilave edildikten sonra sıvı kültür 2,5x2,5 cm² alanında kesilen stretch filmler ile kapatılmıştır. Bu işlem sırasında hücre kültürünün filmin kapladığı yüzeye tamamen yayılması sağlanmıştır. Ayrıca, kenarlarından taşmamasına da özen gösterilmiştir. Bu şekilde bakteri ile inoküle edilmiş test örneklerinin bulunduğu steril petri kaplar 37°C derecede 24 saat süre ile inkübe edilmiştir.

İnkübasyonun ardından inoküle edilen bakterinin yıkanması aşamasına geçilmiştir.

Bakteri ile inoküle edilmiş örnekler üzerlerindeki stretch film ile beraber steril bir metal numune penseleri yardımı ile steril örnek toplama poşetlerine yerleştirilmiştir. Poşetlerin içine 10 mL sıvı LB besiyeri aktarılmış ve numuneler üzerindeki bakterinin tamamen sıvı besi yerine aktarılabilmesi için el yardımı ile 2 dakika süre ile masaj uygulanmıştır.

Örnek poşetlerde bulunan sıvı kültürün, fosfat tampon çözeltisi ile 10-1 ve 10-2 oranlarda seyreltilerek hazırlanan sıvı kültürden 1 mL'lik hacimler, steril petri kaplara aktarılmıştır.

Petri kapların üzerlerine sıcaklığı daha önceden 46-48°C derece olarak ayarlanmış Nutrient Agar besiyerinden 15'er mL ilave edilmiştir. Petri kaplarda bulunan besiyerlerinin katılaşması beklendikten sonra kapların sıcaklığı 37°C dereceye ayarlanmış inkübatöre transfer edilerek 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından petri kaplardaki koloni oluşumları incelenmiştir.

Sonuçlar

48 saatlik inkübasyonun ardından 100 kat seyreltik yıkama kültürü içeren petri kaplardaki koloni oluşumları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Antimic ile muamele görmemiş poliüretan taban örnekleri inokülasyonun ardından yapılan yıkama solüsyonunun 10-2 katlık seyreltmede ortalama olarak 23,33 koloni oluşumu göstermiştir. Seyreltme faktörünü göz önüne alındığında 2333 koloni demektir.

Sonuç olarak elde edilen test sonuçları Antimic Guardian ile muamele edilmiş örneklerin kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Testler Sabancı Üniversitesi Laboratuvarları'nda yapılmış olup Antimic Guardian malzemesinin çeşitli mikroorganizmalarda, bakteri, virüs ve mayalardaki aktivite test raporları, insan sağlığı ve çevre üzerindeki kullanılabilirlik raporları ve bakanlık izinleriyle ilgili detaylı bilgiler web adresinde verilmiştir.

Bu çalışma Antimic-ürün içi uygulama örneklerinden sadece biridir. Çok çeşitli ürün ve malzemelerde benzeri uygulamalar yapmak mümkündür.

15 ml of Nutrient agar was added into the petri plates and the plates were kept in the incubator at 37°C.

Then, the number of colonies in the plates are counted after 48 hour incubation at 37°C.

Koloni Sayısı (100 kat seyreltme)
Number of Colonies (100 times diluted)

Süngerdeki Antimic Miktarı (Poliol içindeki % miktar)	Sünger Numune 1	Sünger Numune 2	Sünger Numune 3
% 0 Antimic Yok/ No Antimic	20	27	23
% 1	0	0	0
% 3	0	0	0

Tablo 1. The number of colonies in 0%, 1% and 3% Antimic containing polyurethane samples.

Tablo 1. %0, %1 ve %3 Antimic konsantrasyonları ile yapılmış poliüretan sünger örnekleri ile yapılan test sonuçları

Results

The number of colonies that were counted after 48 hour incubation at 37°C are given in the Table 1. The average number of colonies in 100 times diluted samples is 23,33. On the other hand, there is no bacterial growth on 1% and 3% Antimic added polyurethane shoe insole samples. Therefore, the strong antibacterial effect of Antimic Guardian in polyurethane samples was observed.

Experiments were conducted in Sabancı University's Laboratories. Antimic shows highest protection against different bacteria, viruses, molds and fungi. Skin irritation tests and the licence of Antimic and other related information are given in the website.

In this article, we demonstrated the integration of Antimic during the production process. It is possible to utilize Antimic inside different materials during in-line production.

Kaynaklar/References

- [1] J.I. Standard, Jis z 2801: 2000, 2000 (2000).
- [2] Bioware TM Microorganism – Staphylococcus aureus Xen29 In vitro Characteristics, 10 (2008) 12600.