

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEGATİF İYON VE OZON UYGULAMASININ
ÇEŞİTLİ BAKTERİLER ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ, SOĞUTMA
KULESİ VE HASTANE ATIK SULARININ
DEZENFEKSİYONUNDA KULLANIMININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

DOKTORA TEZİ

Nafia Canan GÜRSOY
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL

MALATYA – 2009

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NEGATİF İYON VE OZON UYGULAMASININ
ÇEŞİTLİ BAKTERİLER ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ, SOĞUTMA
KULESİ VE HASTANE ATIK SULARININ
DEZENFEKSİYONUNDA KULLANIMININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Nafia Canan GÜRSOY

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL

MALATYA – 2009

Rahmetli babacığım Nusret ATEŞ' e

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

J¼ri Başkanı: Prof. Dr. İ.Halil ÖZEROL
Danışman: İnön¼ Üniversitesi

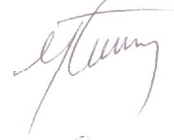
İmza



¼ye: Doç. Dr. Hatice ÖZBİLGE
Erciyes Üniversitesi



¼ye: Doç. Dr. Yasemin ERSOY
İnön¼ Üniversitesi



¼ye: Doç. Dr. Çiğdem KUZUCU
İnön¼ Üniversitesi



¼ye: Yrd. Doç. Dr. Barış OTLU
İnön¼ Üniversitesi



ONAY :

Bu tez, İnön¼ Üniversitesi Lisans¼st¼ Eğitim-Öğretim Y¼netmelięi'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu...../...../...../ tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali OTLU
Enstit¼ M¼d¼r¼

ÖZET

Negatif iyon ve ozon uygulamasının çeşitli bakteriler üzerine etkilerinin incelenmesi, soğutma kulesi ve hastane atık sularının dezenfeksiyonunda kullanımının değerlendirilmesi

Son yıllarda antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların neden olduğu hastane kaynaklı veya toplum kaynaklı infeksiyonlarda artış görülmektedir. Bu infeksiyonların önlenmesi veya azaltılmasında hastane sularının, atık sularının ve soğutma kulelerinin dezenfeksiyonunda kullanılabilecek güvenilir, etkili dezenfeksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda; hastane infeksiyon etkeni olarak sıklıkla karşılaşılan *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerinin ozon gazı ve/veya negatif iyon duyarlılıkları araştırılmış ve bu dezenfeksiyon yöntemlerinin hastanemiz atık su sisteminde kullanımını değerlendirilmiştir. Çalışmaya alınan tüm bakteri türlerinin ozon gazına son derece duyarlı olduğu ve kısa maruziyet sürelerinde üremelerinin inhibe olduğu belirlenmiştir. Fakat özellikle yüksek bakteri konsantrasyonlarında ozon gazının yüksek konsantrasyonlarına ve/veya sürekli olarak ozon uygulamasına ihtiyaç duyulabileceği düşünülmüştür. Ozon uygulamasıyla bazı bakteri türlerinin hücre duvar yapılarının tamamen parçalandığı, fakat bakteri DNA yapılarının hasara uğramadığı görülmüştür. Negatif iyonun yüksek bakteri konsantrasyonlarında etkili olmadığı, dolayısıyla patojen yükü yüksek olan atık su sistemlerinin dezenfeksiyonunda kullanımının yararlı olmayacağı görülmüştür. Hastanemiz atık su sistemleri ve soğutma kulesi tanklarının dezenfeksiyonunda ozon gazı kullanımının etkili ve güvenilir olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ozon, Negatif iyon, Hastane Atık Suları, Soğutma Kulesi

SUMMARY

The effects of negative ions and ozone on miscellaneous bacteria and evaluation of these effects on disinfection of hospital wastewater, and cooling towers

In recent years there has been an increase in the hospital acquired or community acquired infections due to antibiotics resistant organisms. To prevent or to reduce these infections, it has been needed reliable, effective disinfection methods which to use in the disinfections of hospital wastewater and cooling towers.

In this study; the sensitivity of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* bacteria often encountered as hospital infection agent to ozone gas and/or negative ions is investigated and the use of these disinfection methods in our hospital's waste water, and air conditioning systems are evaluated. It is determined that all types of bacteria included in the study are extremely sensitive to ozone gas and their growth is being inhibited in the short exposure time. But particularly in the high concentration of bacteria, it is seen that the use of high concentration of ozone gas and/or continuously ozonization is needed. It is observed that cell wall structure of some bacteria species are completely destroyed by using ozon gas, but their DNA structures have not been harmed under this process. It is viewed that negative ions are ineffective in the high concentrations of bacteria, therefore they are not useful for disinfection of waste water systems loaded with high pathogenes. It is concluded that the use of ozone gas in disinfection of our hospital wastewater system, and cooling tower tank will be effective and reliable.

Key Words: Ozone, Negative ions, Hospital Water, Cooling tower

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim Halil ÖZEROL'a, tezimin moleküler tiplemesi aşamasında 106S211 No'lu TÜBİTAK projesinden yararlanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a, zaman zaman karşılaştığım problemleri tartışmak için bana değerli zamanlarını ayıran tüm bölüm hocalarıma ve Dr. Selami GÜNAL'a, akademik çalışmalarım sırasında desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili eşim M. Habil GÜRSOY'a ve canım aileme ve hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım babama

Teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İç kapak.....	i
İthaf.....	ii
Onay.....	iii
Özet.....	iv
Abstract.....	v
Teşekkür.....	vi
İçindekiler.....	vii
Şekiller Dizini.....	ix
Tablolar Dizini.....	xii
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. Ozon Gazı (O ₃)	5
2.1.1. Ozon Gazının Yapısal Özellikleri	5
2.1.2. Ozon Üretimi	8
2.1.3. Ozon Gazının Tespiti	9
2.1.4. Ozonun Etki Mekanizması	9
2.1.5. Ozonun Kullanım Alanları	18
2.2. Negatif İyon.....	22
2.3. PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)	28
3. Gereç ve Yöntem.....	31
3.1. Test Edilen Mikroorganizmalar	31
3.2. Bakteri Dilüsyonlarının Hazırlanması.....	31
3.3. Ozon Jeneratörü.....	31
3.4. Negatif İyonizer	32
3.5. Bakterilere Ozon Gazı ve/veya Negatif İyon Uygulama Deneyleri	32
3.5.1. Agar Plaklarına Ekimi Yapılan Bakterilere Ozon Gazı ve/veya Negatif İyon Uygulama Deneyleri.....	32
3.5.2. Fosfat Tamponu İçerisinde Hazırlanan Bakteri Süspansiyonlarına Ozon Gazı Uygulama Deneyleri	32

3.5.3. Hastane Atık Suyu ve Soğutma Kulesinden Alınan Numunelere Ozon Gazı Uygulama Deneyleeri.....	33
3.6. Moleküler Tiplendirme (PFGE =Pulsed Field Gel Electrophoresis).....	33
3.7. Sonuçların İstatistiksel Analizi	34
4. Bulgular.....	35
4.1. Bakterilere Ozon Gazı Uygulanmasının Sonuçları.....	35
4.1.1. Agar Plaklarına Ekimi Yapılan Bakterilere 6.6 mg/saat Ozon Gazı Uygulanmasının Sonuçları.....	35
4.1.2. Fosfat Tamponu İçerisinde Hazırlanmış Bakteri Süspansiyonlarına Ozon Gazı Uygulanmasının Sonuçları.....	42
4.1.3. Agar Plaklarına Ekimi Yapılan Bakterilere 10.5 mg/saat Ozon Gazı Uygulanmasının Sonuçları	49
4.2. Agar plaklarına Ekimi Yapılan Bakterilere Negatif İyon Uygulanmasının Sonuçları	52
4.3. Agar Plaklarına Ekimi Yapılan Bakterilere Eş Zamanlı Olarak Ozon Gazı ve Negatif İyon Uygulanmasının Sonuçları	58
4.4. Hastane Atık Suyuna Ozon Gazı Uygulanmasının Sonuçları	64
4.5. Ozon Gazı Uygulanmış Bakteri Süspansiyonlarının Gram Boyama ve PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) Moleküler Tiplendirme Sonuçları	65
5. Tartışma.....	72
6. Sonuç ve Öneriler.....	80
Kaynaklar.....	81
Ekler.....	94
Özgeçmiş.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1	Ozona maruz bırakılan <i>Escherichia coli</i> 'nin SEM (Scanning Electron Micrograph) görüntüsü	11
Şekil 1.2	Ozona maruz bırakılan <i>Salmonella sp.</i> 'nin SEM (Scanning Electron Micrograph) görüntüsü	12
Şekil 1.3	Ozona maruz bırakılan <i>Staphylococcus aureus</i> 'un SEM (Scanning Electron Micrograph) görüntüsü	13
Şekil 2	<i>B. subtilis</i> OSU494 sporlarının EM (Electron Micrograph) görünümü	15
Şekil 3.1	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>E. coli</i> 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	37
Şekil 3.2	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>K. pneumoniae</i> 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	38
Şekil 3.3	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>P. aeruginosa</i> 'nın 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	39
Şekil 3.4	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>A. baumannii</i> 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	40
Şekil 3.5	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>S. aureus</i> 'un 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	41
Şekil 4.1	Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan <i>E. coli</i> 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	44
Şekil 4.2	Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan <i>K. pneumoniae</i> 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	45
Şekil 4.3	Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan <i>P. aeruginosa</i> 'nın 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	46
Şekil 4.4	Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan <i>A. baumannii</i> 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	47
Şekil 4.5	Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan <i>S. aureus</i> 'un 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	48
Şekil 5	Agar plak yüzeyine ekimi yapılan <i>E. coli</i> 'nin 10.5 mg/saat ozon gazı	49

	maruziyeti ile farklı sürelerdeki bakteri sayısı	
Şekil 6.1	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>E. coli</i> 'nin 10.5 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	50
Şekil 6.2	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>S. aureus</i> 'un 10.5 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	51
Şekil 7.1	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>E. coli</i> 'nin negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	53
Şekil 7.2	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>K. pneumoniae</i> 'nin negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	54
Şekil 7.3	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>P. aeruginosa</i> 'nın negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	55
Şekil 7.4	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>A. baumannii</i> 'nin negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	56
Şekil 7.5	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>S. aureus</i> 'un negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	57
Şekil 8.1	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>E. coli</i> 'nin eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	59
Şekil 8.2	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>K. pneumoniae</i> 'nin eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	60
Şekil 8.3	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>P. aeruginosa</i> 'nın eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	61
Şekil 8.4	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>A. baumannii</i> 'nin eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	62
Şekil 8.5	Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan <i>S. aureus</i> 'un eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyona maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim	63
Şekil 9	Atık su arıtım sistemi su numunelerinin ozon gazı ile muamelesi	64
Şekil 10.1	<i>E. coli</i> ozonlama öncesi ve sonrası Gram boyama resimleri	65
Şekil 10.2	<i>K. pneumoniae</i> ozonlama öncesi ve sonrası Gram boyama resimleri	66
Şekil 10.3	<i>P. aeruginosa</i> ozonlama öncesi ve sonrası Gram boyama resimleri	66
Şekil 10.4	<i>A. baumannii</i> ozonlama öncesi ve sonrası Gram boyama resimleri	67
Şekil 10.5	<i>S. aureus</i> ozonlama öncesi ve sonrası Gram boyama resimleri	67
Şekil 11.1	<i>E. coli</i> izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri	69
Şekil 11.2	<i>K. pneumoniae</i> izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri	70

Şekil 11.3	<i>P. aeruginosa</i> izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri	70
Şekil 11.4	<i>A. baumannii</i> izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri	71
Şekil 11.5	<i>S. aureus</i> izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri	71

TABLolar DİZİNİ

Tablo.1.	Ozon gazı ile tahrip edilen bakteri ve viruslar	16
Tablo.2.	Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>E. coli</i> koloni sayısındaki değişim	37
Tablo.3.	Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>K. pneumoniae</i> koloni sayısındaki değişim	38
Tablo.4.	Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>P. aeruginosa</i> koloni sayısındaki değişim	39
Tablo.5.	Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>A. baumannii</i> koloni sayısındaki değişim	40
Tablo.6.	Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>S. aureus</i> koloni sayısındaki değişim	41
Tablo.7.	Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>E. coli</i> koloni sayısındaki değişim	44
Tablo.8.	Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>K. pneumoniae</i> koloni sayısındaki değişim	45
Tablo.9.	Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>P. aeruginosa</i> koloni sayısındaki değişim	46
Tablo.10.	Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>A. baumannii</i> koloni sayısındaki değişim	47
Tablo.11.	Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>S. aureus</i> koloni sayısındaki değişim	48
Tablo.12.	Agar yüzeyine 10.5 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>E. coli</i> koloni sayısındaki değişim	50
Tablo.13.	Agar yüzeyine 10.5 mg/saat ozon gazı uygulaması ile <i>S. aureus</i> koloni sayısındaki değişim	51
Tablo.14.	Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile <i>E. coli</i> koloni sayısındaki değişim	53
Tablo.15.	Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile <i>K. pneumoniae</i> koloni sayısındaki değişim	54
Tablo.16.	Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile <i>P. aeruginosa</i> koloni sayısındaki değişim	55
Tablo.17.	Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile <i>A. baumannii</i> koloni sayısındaki değişim	56
Tablo.18.	Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile <i>S. aureus</i> koloni sayısındaki değişim	57
Tablo.19.	Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile <i>E. coli</i> koloni sayısındaki değişim	59

Tablo.20.	Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile <i>K. pneumoniae</i> koloni sayısındaki değişim	60
Tablo.21.	Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile <i>P. aeruginosa</i> koloni sayısındaki değişim	61
Tablo.22.	Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile <i>A. baumannii</i> koloni sayısındaki değişim	62
Tablo.23.	Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile <i>S. aureus</i> koloni sayısındaki değişim	63

1. GİRİŞ

Günümüzde yoğun çabalara rağmen hastane infeksiyonları önlenememekte, bu infeksiyonların sıklığı giderek artmakta ve tıbbi bakım masrafları yanında insan ve iş gücü kayıplarına neden olmaktadır. Hastanelerde, özellikle yoğun bakım ünitelerinde çoğul antibiyotiklere ve dezenfektanlara dirençli mikroorganizma infeksiyonları artmaktadır (1). Kimyasal ajanlarla çevresel dezenfeksiyon, tek başına fiziksel temizlemeye oranla kontaminantların büyük bir bölümünü ortadan kaldırmaktadır (2). Hastanelerdeki infeksiyon geçişinin azalmasına hangi yöntemin ne oranda katkıda bulunduğu bilinmemesine rağmen, dezenfektan kullanımı standart olarak kabul edilmektedir. Örneğin, olası bir çevresel kontaminasyonda metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'un yayılımını kontrol için genel olarak fenolik bir dezenfektan kullanımı önerilmekteydi (3). Kolonize hastaların tahliyesinin ardından, dekontaminasyon için klorlu dezenfektanlar kullanılmaktadır. Ancak bu tür metotların yüksek maliyet ve iş gücü gerektirmesi ve çevresel sorunlar oluşturması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Klorlu dezenfektanlar potansiyel toksisiteyi artırmakta ve temizlenmiş alanların kullanımı, en azından klor kokusu geçene kadar ertelenmektedir. Bu tür uygulamalar sonunda temizlenen bölgelerin birkaç saat boş tutulması gerekebilmektedir. Bu nedenlerden ötürü yeni geliştirilen teknolojilerin bu amaçla kullanılabilirliği araştırılmaktadır. Bir dekontaminant ajan olarak, bu tür avantajlarından dolayı ozon gazı kullanımı, klor-salıcı ajanlara ve diğer dezenfektanlara tercih edilmektedir (4).

Ozon, atmosferde eser gaz olarak bulunan ve son yıllarda insan vücudunda da üretildiği bildirilen, oksijenin 3 atomlu reaktif formudur (5, 6). Renksiz veya mavimsi renkte ve keskin kokulu bir gazdır. Ozon, floridan sonra, bilinen en güçlü oksidizan-dezenfektan ajanlardan biridir. Klora göre, oksidan etkisi %50 daha fazla ve mikroorganizmaları öldürme hızı 3150 kat daha hızlıdır. İçme suyu ve atık su dezenfeksiyonunda, gıdaların bozulmadan saklanması güçlü oksidan etkisinden yararlanır (7, 8). Çeşitli araştırmalarda; hastanelerde kateter, mekanik ventilasyon ve damar içi araç uygulamalarıyla paralel olarak artan nozokomiyal üriner infeksiyon, pnömoni ve sepsis gibi infeksiyonların etiyolojik etkenlerinin (MRSA dahil koagülaz pozitif ve negatif stafilokoklar, enterokoklar, Gram negatif aerop bakteriler, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Candida*

albicans ve diğ er funguslar) ozon ve/veya negatif iyon uygulamasıyla kontrol altına alınabileceği gösterilmiştir (9, 10, 11). Ozon; sağlıklı insan hücrelerini etkilemeden, bakteri, virus, fungus ve virüsle infekte hücre membranlarını seçici ve hızlı olarak oksitlemektedir. Negatif iyon teknolojisinde üretilen negatif iyonlar, havadaki pozitif iyonları bağlayarak, negatif iyonları ise iterek havayı mikroorganizmalar, toz partikülleri ve alerjenlerden temizleyip infeksiyonları azaltmaktadır (9).

Hastane ortamı, kullanılan araçlar ve atıklardaki bakteri yoğunluğunun azaltılması veya yok edilmesi, infeksiyonların kontrol altına alınmasını sağlayan en ekonomik yoldur. Bu amaçları gerçekleştirebilmek için ozon ve/veya negatif iyon teknolojisinin kullanım alanlarının belirlenmesi gerekmektedir. Ozon ve negatif iyonların bakteriler üzerine inhibitör etkileri saptanmasına rağmen, hastane infeksiyonlarını önlemeye yönelik bu metotların kullanımı ile ilgili yurt içi çalışmalar henüz yapılmamıştır. Bu amaçla ozon ve negatif hava iyonlarının bakterisit etkileri incelenerek, hastane atık su sistemleri ve soğutma kulesi tanklarının dezenfeksiyonunda kullanımı değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Hastanelerdeki su sistemleri, infeksiyon açısından risk taşıyan hastalardaki vaka veya salgınların en sık karşılaşılan kaynağıdır. Soğutma kulesi havuzları ve doğal su kaynaklarından da izole edilebilen çeşitli su kaynaklı fırsatçı patojenler ve özellikle bu patojenlerdeki artan antibiyotik direnci gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sağlık problemidir (12, 13). İçme suyu ve klima sistemleri dağıtım şebekesinin mikrobiyal kontaminasyonu sonucu adeziv bakterilerin üremesi ve biyofilm oluşumu ile hijyenik problemler, koku ve kötü tadın verdiği rahatsızlık ve hatta tesisatta kullanılan malzemenin bozulması gibi durumlar ortaya çıkabilmektedir. Bakteriler canlılıklarını devam ettirebilmek için biyofilm gibi spesifik maddeler geliştirmekte, metabolik aktivitelerini arttırmakta ve bu yolla fırsatçı infeksiyon oluşturma özelliklerini koruyabilmektedir. Giriş suyunun kaynağı ve kalitesi biyofilm aktivitesini ve mikroorganizma populasyon çeşitliliğini etkilemektedir. Enterokoklar, mikobakteriler ve *Legionellae* gibi oportunistik patojenler biyofilmler içerisinde kolaylıkla korunabilmekte ve bazen persistan olarak kalabilmektedir. Biyofilmlerin özellikleri dezenfeksiyon işlemlerine toleransı arttırmakta ve mikrobiyal stresi başlatmaktadır. Ayrıca biyofilm oluşumu, bakteriler arasında horizontal gen transferi ihtimalini de artırarak infeksiyon için potansiyel risk oluşturmaktadır (14).

Hastane atıkları; ekolojik denge ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturmaktadır. Patolojik, radyoaktif, kimyasal, infeksiyöz ve farmasötik atıklar herhangi bir işleme tabi tutulmazsa; su kontaminasyonuna, bulaşıcı hastalık salgınlarına, diyare epidemilerine ve radyoaktif kirliliğe neden olabilmektedir (15). Günlük kişi başına ortalama 100 L evsel su tüketimi ile karşılaştırıldığında, hastanelerde her gün 400-1.200 L/yatak/gün gibi önemli oranda bir su tüketimi görülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde su tüketimi yaklaşık 500L/yatak/gün olarak tahmin edilmektedir. Su tüketiminin bu denli fazla olmasının bir sonucu olarak da, geniş ölçüde bir atık su üretimi söz konusudur (16). Suların klorlanması; su kaynaklı infeksiyonların oluşumunu azaltmada oldukça etkili ve yaygın kullanıma sahip bir yöntem olup, 20. yüzyılın başlarında en başarılı halk sağlığı önlemlerinden biri haline gelmiştir (17). Hastane atık suları, patojenlerin inaktivasyonunu engelleyecek düzeyde organik ve inorganik maddeler içerir. Bu nedenle, hastane atık sularında tam bir dezenfeksiyon sağlayabilmek için kullanılan klor oranı arttırılmakta ve bununla paralel olarak klorun hastane atık sularındaki organik bileşiklerle reaksiyonu sonucu,

su ekosistemi ve içme suyu kaynakları açısından tehlike oluşturan, bir takım mutajenik/kanserojen dezenfeksiyon yan ürünlerin oluşumu söz konusudur (16). Bu yan ürünlerin başında, içme sularında bulunan ve laboratuvar hayvan denemelerinde kanserojenik etkileri ispatlanan trihalometanlar (THM) gelmektedir. En yaygın trihalometan türleri genelde su kaynaklarında oluşan kloroform (CHCl_3), bromodiklorometan (CHBrCl_2) ve bromoformdur (CHBr_3) (18) ve bunların en çok klorlama, kloraminasyon, klorin dioksit ve hipoklorit gibi dezenfeksiyon yöntemleri sırasında oluştuğu gösterilmiştir (17). Son zamanlara kadar çığ ve işlenmiş sularda THM varlığı üzerinde araştırmalar yapılırken (19, 20, 21), şimdilerde klorlanmış atık su akıntılarında da THM varlığı önem kazanmıştır (22). İkinci ve üçüncü derecede işlenmiş atık sularda, konvansiyonel içme su kaynaklarındakinden daha düşük konsantrasyonda THM bulunduğu gösterilmiştir (23). Klorlama ile oluşan dezenfeksiyon yan ürünlerinin, özellikle nöral tüp, üriner yol ve kardiyak defektler başta olmak üzere bir takım konjenital defektlere neden olduğu gösterilmiştir (24, 25, 26).

Bu yüzden de gerek klima sistemleri gerekse hastane atık sularının dezenfeksiyonunda kullanılabilecek güvenilir alternatif dezenfeksiyon yöntemlerinin tanımlanması arzu edilmektedir.

2.1. Ozon Gazı (O₃)

Ozon (O₃) gazının varlığından, ilk kez 1785 yılında Van Marum bahsetmiştir. 1840 yılında ise C. F. Schonbein bu maddenin suyun elektrolizi sırasında da oluştuğunu göstermiş ve ozon adını vermiştir (27). Yeryüzünden 25–30 mil uzaklıkta bulunan stratosfer tabakasındaki ozon, güneşten gelen tehlikeli UV ışınlarının önünü kesmektedir (28). Stratosferik ozon tabakası bu tip radyasyona karşı koruyucu bir filtre görevi gördüğünden “iyi ozon” olarak adlandırılır. İyi ozon, kloroflorokarbonlar ve diğer ozon-tüketici maddelerce tüketilmekte ve böylece yeryüzüne ultraviyole (UV)-B ışınlarının (280–320 nm) yansımada artış görülmektedir (29, 30). Kötü ozon olarak adlandırılan troposferik ozon da atmosferde bulunmaktadır. Atmosferde endüstriyel veya taşıtlarla ilişkili olarak, kimyasal ve çeşitli tüketici ürünlerin (hidrokarbonlar ve nitrojen oksitleri) etkisiyle ve güneşten kaynaklanan UV radyasyonun karmaşık reaksiyonları sonucu oluşur (27). Ozonun zemin seviyesindeki konsantrasyonu genellikle 0.02–0.03 ppm ile sınırlıdır. Deniz seviyesindeki atmosfer yaklaşık 0.05 ppm’lik bir ozon konsantrasyonuna sahiptir. Hava kirliliği olan şehirlerde ise ozon konsantrasyonu 0.5 ppm ya da bazen daha yüksek düzeylere ulaşabilir (30).

Ozon doğal olarak bulunan klor, brom ve iyot ile oksitlenerek tahrip olmaktadır (27). Yine UV ışınları ile de kolaylıkla ayrışmaktadır. İnsan kaynaklı temel kirlenici olan kloroflorokarbon (CFC)'lar da yine ozon seviyesinin düşmesinde etkilidir. CFC'lar dondurucu ve köpürtücü ajan olarak kullanılmakta olup tüm dünyada yaygın olarak üretilmektedir. Stratosferde, güneş kaynaklı UV radyasyonu katalitik olarak ozonun tahribine neden olan klor türlerinin salınımına neden olmaktadır (31). Tüm bunlara bağlı olarak ozon seviyesindeki düşüşle birlikte, deri kanserleri ve UV ile indüklenen diğer hastalıklarda da artış gözlenmektedir (32).

2.1.1. Ozon Gazının Yapısal Özellikleri

Ozon veya diğer adıyla triatomik oksijen (O₃); mavimsi, patlayıcı bir gaz ya da mavi bir sıvıdır. Elemental oksijenin bir formu olup, molekül ağırlığı 47,9982 Dalton'dur. Ozon molekülü 3 oksijen atomu içerir (O₃) ve son derece kararsızdır. Kararsızdır, çünkü ozon gazı kolayca serbest oksijen atomları ya da serbest radikaller oluşturarak daha kararlı formu olan diatomik oksijen (O₂) haline dönüşür. Serbest oksijen atomları ya da radikaller son derece reaktiftir ve temasta olduğu

hemen her şeyi (virüs, bakteri, organik ve inorganik bileşikler) oksitleyebilmekte, çok güçlü bir dezenfektan ve oksidan olarak etki göstermektedir. Son derece reaktif bir gaz olan ozon, 0.02–0.05 ppm'e kadar düşük konsantrasyonlarında bile fark edilebilir karakteristik, keskin bir kokuya sahiptir. Daha yüksek konsantrasyonlarda (> 0.1 ppm) göz ve solunum yolunu tahriş edebilmekte ve hatta yüksek konsantrasyonları ölümcül olabilmektedir (33).

Ozon, suda kendiliğinden ayrışarak çözülmüş halde oksijen ve oksitleyici radikaller oluşur. Reaksiyon sonucu son derece reaktif oksitleyici ajanlar olan serbest hidroksil radikalleri oluşur, fakat bu radikaller mikro saniyelerle ifade edilen bir yarı ömre sahiptir. Bu yüzden ozon gazı çevreye dost bir dezenfektan olarak düşünülmektedir. Suda çözülmüş formda; bileşiklerin direkt oksidasyonu yoluyla reaksiyona girebilir ya da ozonun ayrışması sırasında açığa çıkan serbest hidroksil radikalleri yoluyla çeşitli bileşikleri oksitleyebilir (34). Ozonun ayrışması sırasında, suda bulunan maddelere bağlı olarak çeşitli yan ürünlerin oluşması söz konusu olabilmektedir. Eğer suda bromür iyonları varsa, son ürün olarak bromlanmış yan ürünler ortaya çıkabilmektedir. Yine ozon dezenfeksiyonunun bir sonucu olarak aldehit ve formik asit oluşumu da görülebilmektedir (35). İyodür içeren suların ozonlanması sırasında oluşan temel yan ürün ise sindiriminin ardından hızla metabolize edilerek endojen yolla tekrar iyodüre dönüştüğünden zararsız olduğu düşünülen iyodattır. Bromat; potansiyel karsinojen etkisi ve çoğu diğer organik yan ürünlerden farklı olarak ozonlama basamağını takiben biyolojik filtrelerden geçirilme işleminde ayrıştırılmadığından dolayı halen en çok ilgilenilen, endişe uyandıran yan üründür ve ozonlama işleminin optimizasyonunda bromat oluşumunun minimize edilmesi gerekmektedir. Oluştuktan sonra ortadan kaldırılması ekonomik bulunmamakta ve en iyi bromat minimizasyon stratejisinin pH'nın düşürülmesi ya da amonyak ilavesi olduğu bildirilmektedir (36). Dezenfektan yan ürünlerinden bazıları toksik ya da karsinojenik olabilir, ancak biyolojik deneysel tarama çalışmaları, ozonlanmış suların klorlanmış sulara göre çok daha düşük mutajenik özellikte olduğunu göstermiştir (37). Dezenfektan olarak ozon, klordan en az 10 kez daha güçlü olup, klorla dezenfeksiyon sırasında son derece toksik ve karsinojen olan trihalometan (THM) olarak adlandırılan ve böbrek, mesane, kolon kanseri gelişiminde rol oynayan maddelerin oluşumu ozonla dezenfeksiyonda gözlenmemektedir. Klorlama işlemi; THM yanında kloroform, karbon tetraklorit, klormetan üretimine de

neden olur. Ozonlama işleminde ise; işlenmemiş suda bromür iyonları olmadığı sürece, sudaki doğal organik maddelerle tepkimeye girdiğinde trihalometanlar (THM) gibi halojenlenmiş yan ürünler oluşturmaz (34).

Yer seviyesindeki ozon US EPA (United States Environmental Protection Agency) tarafından önemli bir hava kirletici olarak düşünülmüş ve ortalama 8 saatlik bir periyotta havadaki ozon konsantrasyonu 0.08 ppm olarak belirlenmiştir. NIOSH (The National Institute of Occupational Safety and Health) üst sınır olarak 0.1 ppm (0.1 mg/L=0.2 mg/m³)'i tavsiye etmiş ve hiçbir zaman bu sınırın aşılması gerektiğini vurgulamıştır. FDA (The Food and Drug Administration) kapalı tıbbi cihazların 0.05 ppm'den daha yüksek ozon çıkışına müsaade etmemektedir. OSHA (The Occupational Safety and Health Administration)'nın ozon için müsaade ettiği maksimum maruziyet seviyesi ortalama 8 saatlik bir periyotta 0.1 mg/L (ppm)'dir (34, 38).

Ozon; güçlü bir oksidan ve doğal olarak biyoreaktiftir (39). Ozon gazı insanlar için toksiktir ve 0.2 ppm üstündeki seviyelerinin geçici respiratuvar semptomlar, solunum fonksiyonlarında zayıflama ve inflamatuvar değişikliklere neden olduğu kontrollü deneylerle gösterilmiştir (40). Özellikle ağır işlerde çalışanlarda olmak üzere derin nefes alındığında ağrı ve öksürük gibi az sayıda vaka yanında, insanların çoğunun semptomatik olarak ozonlamadan etkilenmediği deneysel olarak kanıtlanmıştır. Ancak uzun süreli ozon maruziyetinin özellikle potansiyel genotoksik etkisi üzerinde durulmaktadır (37). Ozon gazına inhalasyon yoluyla maruziyet sonucu ve deri, göz ve müköz membranlarla teması durumunda, doku tahrişine neden olabileceği belirlenmiştir. Genel olarak 15 dk'lık maruziyet sınırı 0.3 ppm olarak önerilmektedir. Daha yüksek maruziyet ile baş ağrısı, mide bulantısı, kusma ve göğüs ağrısı ve nefes darlığı gibi etkiler görülebilmektedir. Ayrıca akciğerleri tahriş edebilmekte, öksürük ve/veya solunum güçlüğüne neden olabilmekte ve pulmoner ödeme yol açabilmektedir. Erimiş haldeki ozonun, deri ya da gözle teması yanıklara neden olabilmektedir. Hayvanlarda ise kansere neden olduğuna dair sınırlı bulgular vardır. Akciğer kanserine neden olabildiği ve fetüs gelişimini hasara uğratabildiği bildirilmiştir (33). Aynı zamanda merkezi sinir sistemini etkileyip, mutasyonlara neden olabileceği belirtilmiştir (41).

Akut Toksikite: Ortalama 8 saatlik bir periyotta 0.1 mg/L'nin üzerindeki konsantrasyonlarının mide bulantısı, göğüs ağrısı, görme keskinliğinde azalma ve pulmoner ödeme yol açtığı bildirilmiştir. En az 1 saat 20 ppm'in üzerindeki konsantrasyonlarının inhalasyonu sonucu ölümcül olabileceği belirtilmiştir (34).

Kronik Etkileri: Akciğerler üzerine toksik etkilidir ve solunum hastalıklarına neden olabilmektedir (34).

Uzun süreli maruziyet çalışmaları primer hedef dokuların nazal epitelyum ve akciğerin sentriasiner bölgesi olduğunu göstermiştir (42). Akciğerin mukus tabakasının ince olduğu daha aşağı bölgelerinde, hücreler direkt olarak ozonla hasara uğramaktadır. Daha yukarı bölgelerde ise, mukus tabakasının lipid katmanındaki ozon reaksiyonları sonucu oluşan aldehit ve peroksitler doku hasarını tetikleyebilmektedir (41).

Ozon kararsız bir gaz olduğundan, su arıtım sistemlerinde kullanılan ozonun suyun çıkış yerinde üretilmesi gerekir. Ozon depolanmadığından ve toksik etkili olabileceğinden, üretim sırasında sistemin ozon sızdırması önlenmelidir. Su muamelesi sırasında ozon gazı suya aktarılır. Fakat devri-daimli sulama sularının muamelesinde, ozon gazı suya verilmez, suyun çıkış yerinde konsantrasyonu artırılır. Bu sistemlerde suyun çıkış yerindeki ozon konsantrasyonu insanlar için fatal konsantrasyonun üzerindedir ve 3.000 ppm'e kadar yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Suyun çıkış yerindeki bu denli yüksek konsantrasyonda üretilen ozon gazı, yakalanmalı ve atmosfere salınmadan önce oksijene dönüştürülmelidir (34).

2.1.2. Ozon Üretimi

Ozon; atmosferin üst katmanlarında (stratosferde) güneş kaynaklı UV ışınlarının oksijenle fotoreaksiyonu sonucu doğal olarak ve belki atmosferin alt katmanlarında da kirleticilerin fotokimyasal oksidasyonu aracılığıyla oluşmaktadır. Genellikle endotermik bir reaksiyonda; bir oksijen atomuyla bir oksijen molekülünün birleştirilmesi ile oluşturulur (27, 30, 34). Fotokimyasal sislerde nitrojen oksidin (NO_x) ve endüstriyel işlemler, taşıtlar ve diğer kaynaklardan yayılan uçucu organik bileşiklerin fotoreaksiyonu da oluşabilmektedir (31).

Laboratuvar ortamında oksijen içeren gazlara UV radyasyon ya da elektrik akımı uygulanarak ozon gazı üretilmektedir. Fakat stoklanma ve transportuna imkân vermeyecek derecedeki aşırı oksidatif reaktivitesinden dolayı genellikle kullanılacağı sırada üretilmektedir (30). Fakat temel endüstriyel yöntem “corona discharge” (elektrik boşalması) yöntemidir. Bu yöntemde oksijen içeren gaz; bir yalıtkan ve bir boşalma aralığı ile ayrılmış iki elektrot arasından geçmektedir. Elektrotlara voltaj gönderildiğinde, elektronlar aralıktan geçmekte ve ozon oluşumuna öncülük eden olay için yani, oksijen moleküllerinin birleşmesi için gerekli enerjiyi sağlamaktadır (34).

Ozon üreten bir sistem genellikle dört bileşenden oluşur: bir güç kaynağı ya da ozon jeneratörü, bir gaz kaynağı, bir ozon dağıtım sistemi ve bir de istenmeyen gazları yok eden bir sistem. Gaz kaynağı; hava ya da yüksek saflıkta oksijen veya ikisinin kombinasyonu şeklinde olabilir. Hava besleme sistemleri, sıvı oksijen besleme sistemlerinden daha komplikedir. Çünkü bu sistemlerde kullanılacak hava temiz ve kuru olmalı, kontaminantlardan uzak olmalı ve jeneratörün hasarını önlemek için -60°C'lik maksimum bir yoğunlaşma noktasına sahip olmalıdır (34).

2.1.3. Ozon Gazının Tespiti

Ozon konsantrasyonu, 259 nm'de direkt UV absorpsiyonu ile tespit edilebilen rezidüel sulu ozonla orantılıdır (43). Ozon konsantrasyonunun tespitinde kullanılabilen bir başka yöntem; bir raportör belirteç olarak çivit ya da demir terpidin kullanımınıdır (44). Ozonla reaksiyona girdiğinde oluşan renk değişikliği (rengin solması) ozon konsantrasyonu ile orantılıdır.

2.1.4. Ozonun Etki Mekanizması

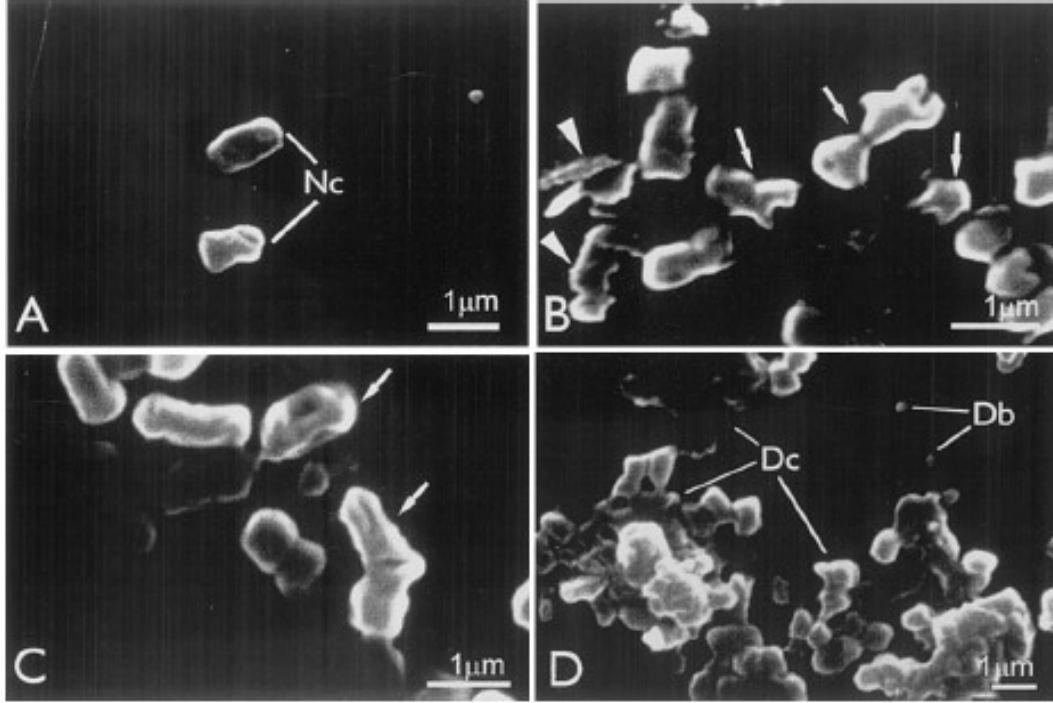
Ozon gazı, bitkilerde membran bütünlüğünün bozulmasına (lisis) ve nekrotik lezyonlara neden olabilmektedir. Fotosentezi etkileyebilmekte ve genellikle çeşitli genleri baskılayabilmektedir (45).

Bakteri, virüs ve protozoonları da içeren geniş bir mikroorganizma grubuna karşı germisit etkili olan ozon, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (46). Hücre membranları ve sitoplazmik bileşenlerin hasarına yol açarak, bakteri ve mantarların inaktivasyonunu sağlar (47, 48, 49, 50). Ozonun

germisit etkisi muhtemelen, hücre duvarı bileşenlerinden yağ asitleri ve peptidlerin oksidasyonu sonucu ortaya çıkmaktadır. Organik maddeleri oksitler, bakteriyel membranların bütünlüğünü bozar, enzimatik aktiviteyi etkiler, viral kapsiti parçalar ve RNA'ya saldırır (51). Ozonun; proteinleri lipidlerden daha kolay, daha hızlı etkilediği gösterilmiş (52) ve bu nedenle de Gram pozitif bakterilerin Gram negatiflere kıyasla ozona daha duyarlı olduğu gösterilmiştir. Ancak ozona maruziyetinin ardından, bu hücrelerde ultrayapısal değişikliklerin varlığına dair bir veri bulunmamaktadır (53).

Yapılan bir çalışmada (53); SEM (Scanning Electron Micrography) morfolojik paternlerine göre ozona maruz kalan bakterilerde meydana gelen değişikliklerin şiddeti 3 gruba ayrılmıştır. Birinci grup değişiklikler; 30 dk ozona maruz kalan bakterilerde gözlenen değişiklikler olarak tanımlanmıştır. Bu aşamada; hem Gram (-) hem de Gram (+) grupta ozonla muamele edilen bakterilerin yüzey yapılarında hasar ve deformasyon gözlenirken, kontrol gruptaki bakteri yüzey yapılarının sağlam olarak korunduğu gözlenmiştir (Şekil 1.1. (A–B), 1.2. (A–B), 1.3. (A–B)). Osmotik basınç altında ozonun neden olduğu hasar, hücre bütünlüğünü geniş ölçüde etkilemekte ve böylece düşük konsantrasyonlarda bakteriyel hücreler canlılıklarını tamamen yitirmektedir. İkinci grup değişiklikler; ozon maruziyetinden 60 dakika sonrasında gözlenen değişikliklerdir. Bu aşama bakteriyel canlılığın kritik noktası olarak tanımlanmıştır. Çünkü çoğu bakteri hücresi benzer şekilde düzensiz hasar ve deformasyon paterni göstermiş olup, SEM fotoğraflarında da hücre tahribatı sonucu oluşan hücre kalıntıları açıkça görülmektedir (Şekil 1.1. (C), 1.2. (C), 1.3. (C)). Bu süreçte hücresel sitoplazmanın patlayarak ortama dağıldığı ve bakteri hücresi etrafında pürüzlü partiküller şeklinde belirdiği görülmektedir. Ozonla muamele edilen bakterilerin hücre duvarı yıkılır ve büzülür. Bu gözlemler bakteriyel hücre lizisi ve bakteriyel ölümü tarif etmektedir. Üçüncü grup değişiklikler ise; ozon maruziyetinin 90-120. dakikaları sonunda gözlenen değişiklikler olarak tanımlanmıştır. Bu aşamada bakteri hücre yüzeyinin şiddetli bir şekilde tahribatı sonucu, Gram (+) ve Gram (-) bakterilerin her ikisinde de hemen hemen tüm bakteri yapılarının parçalandığı ve bakteri hücre kalıntılarının kümeleşmiş bir şekilde ortama dağıldığı gözlenmiştir (Şekil 1.1. (D), 1.2. (D), 1.3. (D–F)). Ancak yüksek konsantrasyonlardaki bakterilerin, 150 dakikalık maruziyet sonrasında bile hala canlılıklarını sürdürebildiği gözlenmiştir. Bunun nedeni bol miktardaki hücre kalıntıları ve intraselüler bileşenlerin ozonun bakteriler üzerine nüfuz etmesini engellemesi ve böylece yeterli oranda inaktivasyon sağlamasını engellemesi olabilir.

Bakterilerin ozona duyarlılığı; çevresel faktörler ya da bakteriyel süspansiyon ortamı, laboratuvar koşulları, mikroorganizmanın tipi, hücresel üreme basamağı, maruziyet süresi, ozon konsantrasyonu, bakteriyel konsantrasyon gibi birçok faktöre bağlı olarak değişebilmektedir (53).

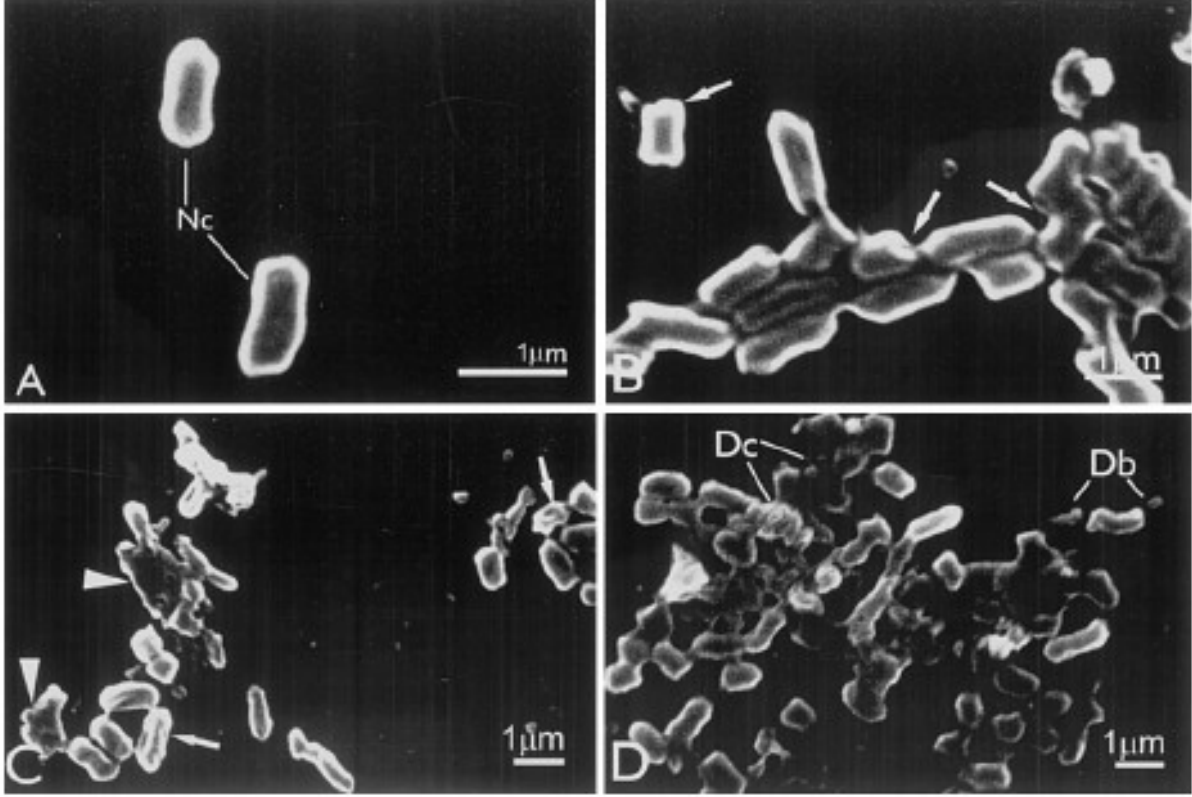


Şekil 1.1. Ozona maruz bırakılan *Escherichia coli* nin SEM (Scanning Electron Micrograph) görüntüsü. Ozona maruziyetinden 30-90 dk sonra, ultrayapısal değişiklikler ve yüzey morfolojisinin hasarı gözlenmektedir.

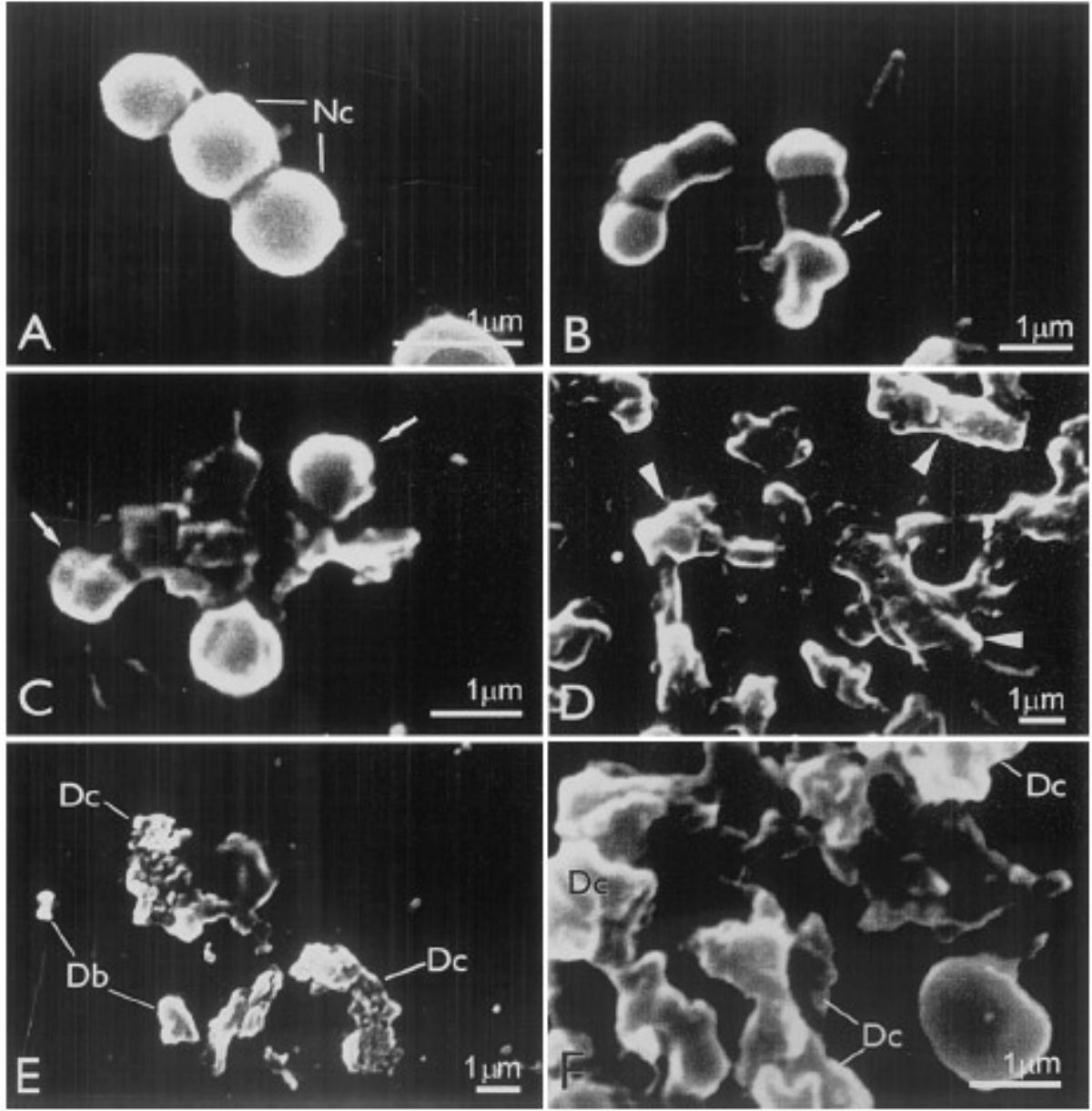
A: Kontrol grubu oluşturan normal hücreler (Nc)

B, C: Ozona maruz bırakılan bakterilerin sırasıyla 30 ve 60. dk'daki görünümü (oklar hücrelerdeki deformasyonları ve ok başları ise tahrip olmuş hücreleri göstermektedir).

D: 90 dk boyunca ozona maruz bırakılan bakteri hücrelerinin görünümü (Dc; tahrip olan hücreler ve Db; hücre kalıntıları) (53).



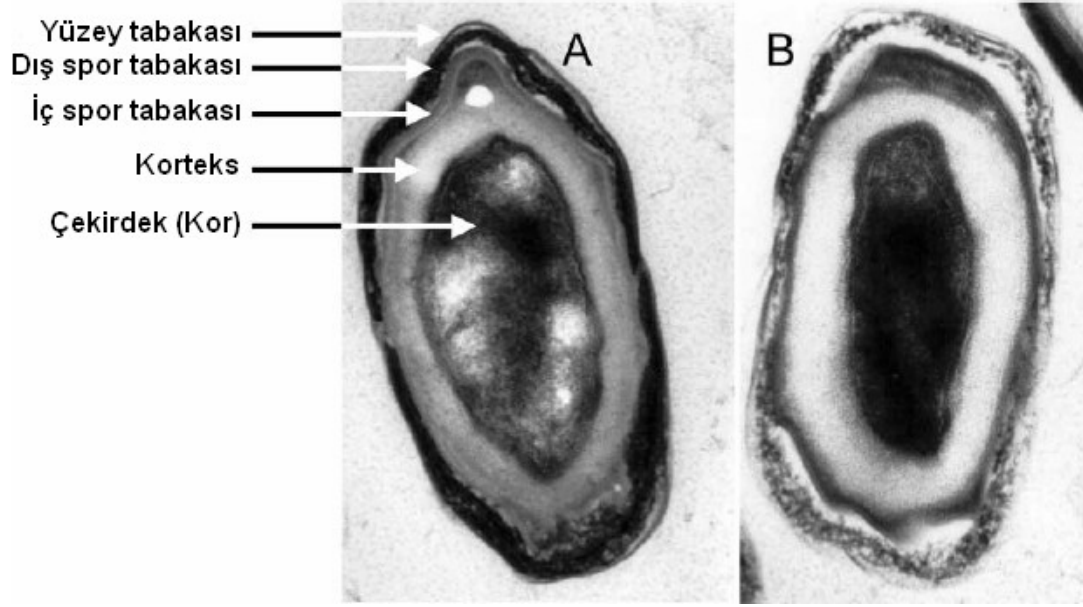
Şekil 1.2. Ozona maruz bırakılan *Salmonella sp.*' nin SEM (Scanning Electron Micrograph) görüntüsü. Maruziyetten 30-90 dk sonra, ultrayapısal değişiklikler ve yüzey morfolojisinin hasarı gözlenmiştir. A: Kontrol grubu oluşturan normal hücreler (Nc); B, C: Bakterilerin ozona maruziyetlerinin sırasıyla 30 ve 60. dk'larındaki görünümü (oklar hücrelerdeki deformasyonları ve ok başları ise tahrip olmuş hücreleri göstermektedir); D: 90 dk boyunca ozona maruz bırakılan bakteri hücrelerinin görünümü (Dc; tahrip olan hücreler ve Db; hücre kalıntıları) (53).



Şekil 1.3. Ozona maruz bırakılan *Staphylococcus aureus*' un SEM (Scanning Electron micrograph) görüntüsü. Maruziyetten 30-120 dk sonra, ultrayapısal değişiklikler ve yüzey morfolojisinin hasarı gözlenmiştir. A: Kontrol grubu oluşturan normal hücreler (Nc); B-D: Ozona maruz bırakılan bakterilerin sırasıyla 30, 60 ve 90. dk'lardaki görünümü (oklar hücrelerdeki deformasyonları ve ok başları ise tahrip olmuş hücreleri göstermektedir); E, F: 120 dk boyunca ozona maruz bırakılan bakteri hücrelerinin görünümü (Dc; tahrip olan hücreler ve Db; hücre kalıntıları) (53).

Ozona maruz bırakılan virüslerde; viral kapsit hasara uğratılarak, peroksidasyonla virüs-hücre teması engellenmekte ve reproduktif döngü bozulmaktadır. Virüsler tarafından invazyona uğrayan hücrelerin yüzeyinde bulunan zayıf enzim örtüsü, oksidasyona duyarlı hale gelir ve oksitlendikten sonra vücuttan atılarak, yerlerini sağlıklı hücrelere bırakırlar. Ozon ayrıca metionin, sistein ve glutatyonun sülfür atomlarını bozar ve yapısal bazı olefinlerle reaksiyona girerek tek atomlu "singlet" oksijen oluşur (54). Sadece yağ asidi ve proteinler değil, aynı zamanda nükleik asitler de ozonun hedefidir. Örneğin, tRNA ozon tarafından degrade edilebilir. Aminoasitlerle reaksiyona girer ve purin ve pirimidin bazlarını değiştirir (55, 56).

Ozon gazının gıda endüstrisinde kullanımını araştırmak amacıyla; ozon ve hidrojen peroksitin besin kaynaklı *Bacillus* türleri üzerindeki sporisit etkileri karşılaştırılmış ve yaklaşık 10.000 kat daha yüksek konsantrasyondaki hidrojen peroksitin, *Bacillus* sporlarına ozondan daha az etki ettiği görülmüştür. Ozona karşı spor direnci *B. stearothermophilus*'ta en yüksek ve *B. cereus*'ta ise en düşük seviyede bulunmuştur. Bu nedenle *B. stearothermophilus* sporları, ozon sanitizasyon testlerinde indikatör olarak kullanılabilir (57). Ozon ile dezenfeksiyon ve kimyasal oksidasyon hızı, nispeten sıcaklık derecesinden bağımsızdır (36). Ayrıca çevre ısısının altındaki sıcaklıklarda ozonun antimikrobiyal gücü artarken (58), hidrojen peroksitin antimikrobiyal gücünün ancak sıcaklık artışıyla birlikte arttığı görülmüştür (59). Dolayısıyla hidrojen peroksitin sporisit etki gösterebilmesi için sıcak hava uygulaması gerekirken, ozonla muamelede bu işleme gerek yoktur. Ozonla muamelede daha çok dış spor tabakası hasara uğratılmakta, iç tabakalar daha az etkilenmekte ve korteks korunmaktadır ve sonuçta da sporların büyük çoğunluğu canlılığını yitirmektedir. Ozon uygulanmış *B. subtilis* sporlarının elektron mikroskopisi (EM) incelemelerinde ozonun sporun üst katmanlarında muhtemel bir bölgeye etki ettiği ve iç tabakaların daha az etkilendiğine işaret edilmiştir (Şekil 2) (57).



Şekil 2: *B. subtilis* OSU494 sporlarının EM (Electron Micrograph) görüntüsü (A: ozonlanmamış, B: ozonlanmış). Ozonlanmış sporlar, sodyum tiyosülfat ile nötralizasyonu takiben 1dk 22°C'de sulu ozona (10 µg/ml) maruz bırakılmıştır. Ozonlama süreci sonunda, bakteri yüzeyi ve dış spor katmanı yapılarının hasarı bariz şekilde görülmektedir (57).

Tablo 1. Ozon gazı ile tahrip edilen bakteri ve viruslar (1mg/l=1ppm) (60).

Patojen	Ozona Duyarlılık
Streptokok türleri	0.2 ppm'de 30 sn'de tahrip olmakta
Stafilokok türleri	1.5–2 ppm'de tahrip olmakta
<i>Staph. epidermidis</i>	0.1 ppm'de 1.7 dk'da %90 oranında azalmakta
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	Sudaki 0.25 ppm konsantrasyonda 1.6 dk'da %90'ı tahrip olmakta
<i>Legionella pneumophilia</i>	Distile suda 0.32 ppm'de 20 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
<i>Bacillus</i> türleri	30 sn içinde 0.2 ppm ile tahrip olmakta
<i>Bacillus anthracis</i>	Ozona duyarlı
<i>Bacillus cereus</i>	Sudaki 0.12 ppm ozon konsantrasyonunda 5 dk sonra %99'u tahrip olmakta
<i>Bacillus cereus</i> sporları	Sudaki 2.3 ppm ozon konsantrasyonunda 5 dk sonra %99'u tahrip olmakta
<i>Bacillus subtilis</i>	0.1 ppm' de 33 dk'da %90 oranında azalmakta
<i>Proteus</i> türleri	Çok duyarlı
<i>Pseudomonas</i> türleri	Çok duyarlı
<i>Salmonella</i> türleri	Çok duyarlı
<i>Salmonella typhi</i> (Eberth bacillus, Typhus abdominalis)	1.5–2 ppm ile tahrip olmakta
<i>Salmonella typhimurium</i>	Sudaki 0.25 ppm konsantrasyonda 1.67 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
<i>Clavibacter michiganense</i>	1.1 ppm'de 5 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
<i>Clostridium</i> türleri	Ozona duyarlı
<i>Clostridium botulinum</i> sporları	Eşik değer 0.4–0.5 ppm
<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (Klebs-Löffler Bacillus)	1.5–2 ppm ile tahrip olmakta
Dışkıdaki <i>E. coli</i>	Havadaki 0.2 ppm konsantrasyonda 30 sn'de tahrip olmakta
Temiz sulardaki <i>E. coli</i>	0.25 ppm'de 1.6 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
Atık sulardaki <i>E. coli</i>	2.2 ppm'de 19 dk'da %99.9'u tahrip olmakta
Hepatit A virusu	Bir fosfat tamponunda 0.25 ppm konsantrasyonda 2 sn'de %99.5'i tahrip olmakta
Poliovirus tip 1	Sudaki 0.25 ppm konsantrasyonda 1.6 dk'da %99.5'i tahrip olmakta
Poliomyelitis virus	0.3-0.4 ppm'de 3-4 dk'da %99.99'u ölmekte

Tablo 1 "Devam": Ozon gazı ile tahrip edilen bakteri ve viruslar (1mg/l=1ppm) (60).

Coxsackie virus A9	Sudaki 0.035 ppm ozon konsantrasyonunda 10 sn' de %95'i tahrip olmakta
Coxsackie virus B5	0.04 ppm ozon konsantrasyonunda 2.5 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
Echo virus 29 (ozona en duyarlı virus)	1 ppm ozonla 1 dk teması sonrası %99.99'u ölmekte
Enterik viruslar	İşlenmemiş atık sularda 4.1 ppm'de 29 dk'da %95'i tahrip olmakta
Encephalomyocarditis virus	0.1–0.8 ppm'de 30 sn'den daha kısa sürede tamamen tahrip olmakta
Enterovirus	0.1–0.8 ppm'de 30 sn'den daha kısa sürede tamamen tahrip olmakta
Herpes virus	0.1–0.8 ppm'de 30 sn'den daha kısa sürede tamamen tahrip olmakta
İnfluenza virusu	Eşik değer 0.4–0.5 ppm
Rhabdovirus	0.1–0.8 ppm'de 30 sn'den daha kısa sürede tamamen tahrip olmakta
Vesicular stomatitis virus	0.1–0.8 ppm'de 30 sn'den daha kısa sürede tamamen tahrip olmakta
f2 bakteriyofajı	Sudaki 0.41 ppm ozon konsantrasyonunda 10 sn' de %99.99'u tahrip olmakta
<i>Candida</i> türleri	Ozona duyarlı
<i>Cladosporium</i>	0.1 ppm'de 12.1 dk'da %90 oranında azalmakta
<i>Fusarium oxysporum lycopersici</i>	1.1 ppm'de 10 dk
<i>Fusarium oxysporum melonogea</i>	1.1 ppm'de 20 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
<i>Aspergillus niger</i>	1.5–2 ppm ile tahrip olmakta
<i>Penicillium</i> türleri	Ozona duyarlı
<i>Mucor piriformis</i>	3.8 ppm'de 2 dk
<i>Botrytis cinerea</i>	3.8 ppm' de 2 dk
Luminesan Basidiomycete'ler	1ppm'de 10 dk'da tahrip olmakta
<i>Verticillium dahliae</i>	1.1 ppm'de 20 dk'da %99.99'u tahrip olmakta
<i>Phytophthora parasitica</i>	3.8 ppm'de 2 dk
<i>Schistosoma</i> türleri	Çok duyarlı

2.1.5. Ozonun Kullanım Alanları

Ozon gazının antipatojenik etkisi uzun süredir bilinmektedir. Ozonun antibakteriyel etkisi ile ilgili çalışmaların çoğu, su içindeki vejetatif bakteriler üzerine, 0.1–0.2 ppm konsantrasyonda ozon uygulanması şeklinde yapılmıştır (61). Aynı zamanda bakteriyel sporlara (62), kriptospor ookistlerine (63) ve virüslere (64) karşı etkinliği de ispatlanmıştır.

Geçmişte ozon, doğal su kaynaklarından küçük hayvan ve böcekleri uzaklaştırmak ve diğer patojen kontaminantları oksitlemek amacıyla kullanılmıştır. Ozon gazı ilk olarak 1893'te Hollanda'da kullanılmaya başlanmıştır. Los Angeles ve California'da içme sularının ozonla muamelesine 1987'de başlanmış ve 1998'e kadar Amerika'da 264 su muamele tesisinde ozon kullanılmıştır. Kaynak sularının muamele kurallarının belirlenmesinden sonra, suların primer dezenfeksiyonunda ozon kullanımı artmıştır (34). Ayrıca beyazlatıcı ve koku giderici olarak ve hava ve içme suyu dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır (60). Toprak muamelesinde canlı mikroorganizmaları öldürmek amacıyla ozonun kullanımı nispeten yeni bir buluştur (65).

Dışkıda bulunan birçok patojenin su kaynaklı infeksiyonlara neden olabilme potansiyeli vardır. Bu patojenler içerisinde; suda yaşayan enterik bakteriler, enterik virüsler ve su ortamına ve çoğu dezenfektana son derece dirençli olan enterik protozoonlar yer almaktadır. Viral ve protozoon ajanların infeksiyon dozu bakterilerden daha düşük olup, 1–10 infeksiyöz ünite ya da oosit olarak belirlenmiştir (66). Ozon mükemmel bir dezenfektandır ve konvansiyonel dezenfektanların (klorür, klorür dioksit) etkisiz kaldığı protozoonları ve diğer dirençli patojen mikroorganizmaları (*Cryptosporidium parvum* ookistleri gibi) uygun doz ve temas süresinde inaktive edebilmektedir (36). Uygun doz ve sürede artırılmış sulardaki mikrobiyal kontaminasyonu ve biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azalttığından (67), tüm dünyada şehir suyu kaynaklarının dezenfeksiyonundaki kullanımı artmaktadır. Ozon, 100 yılı aşkın süredir Avrupa'da içme sularının muamelesinde kullanılmaktadır. Amerika'da, suların dezenfeksiyonu ve suyun tat ve koku gideriminde kullanılmaktadır (34). Ozon gazı ayrıca, hastane ve diğer tesislerin sıcak su sistemlerinde ve soğutma kulelerinde biyofilm oluşturarak önemli bir nozokomiyal infeksiyon etkeni olan ve aynı zamanda toplum kaynaklı salgınlarla da ilişkilendirilen

Legionella türlerinin etkili dezenfeksiyonundaki yaygın kullanımını da kapsayan geniş endüstriyel kullanıma sahiptir (68, 69, 70):

Hastane suyu en sık gözden kaçırılan ve imkân dâhilinde en kolay kontrol edilebilecek nozokomiyal infeksiyon kaynaklarından biridir (71). Araştırmacılar, *Legionella* türleri dışındaki mikroorganizmaları da içeren 43 su kaynaklı nozokomiyal infeksiyon salgını tespit etmişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa* bu tür su kaynaklı infeksiyonlardan en sık sorumlu tutulan mikroorganizma olup, ayrıca *Stenotrophomonas maltophilia*, çeşitli mikobakteriyel türler ve *Fusarium* ve *Aspergillus* türleri gibi küf mantarları gibi diğer patojenler de etken olarak görülebilmektedir (72, 73, 74). HIV hastalarındaki *Mycobacterium avium* complex (MAC)'ine bağlı infeksiyonlar hastane su dağıtım sistemleriyle ilişkilendirilmiş, hastalardan ve hastane suyundan elde edilen izolatların moleküler alttıpleme sonuçlarına göre eş izolatlar olduğu görülmüştür. Yine immün sistemi baskılanmış hastalardaki *Fusarium* infeksiyonları da hastane su dağıtım sistemiyle ilişkilendirilmiş ve moleküler alttıpleme sonuçları kullanılarak hasta izolatlarıyla su kaynaklarından elde edilen izolatların eş olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *Cryptosporidium* gibi parazitler ve çeşitli virüslerin de nozokomiyal infeksiyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (75). Hastane ve şehir atık sularının dezenfeksiyonunda; UV radyasyon gibi yöntemlere kıyasla, devamlı ozonlama işleminin *P. aeruginosa* ve koliform bakterilerini yok etmede son derece etkili olduğu gösterilmiştir (76, 77, 78). Etkili bir atık su arıtım işlemi halk sağlığı açısından oldukça önemlidir. Özellikle de atık su dezenfeksiyonunun çoğunlukla yetersiz olduğu gelişmiş ülkelerde, atık suların etkili, hızlı ve düşük maliyetle dezenfeksiyonunda ozon kullanımı avantajlı olabileceği vurgulanmıştır (76).

Gıda işlenmesinde ozon, antimikrobiyal bir ajan olarak kullanılmaktadır (79, 80). Siyah pul biberden izole edilen *Salmonella* ve *E. coli*'nin ozonlanmış hava ile 60 dk muamelesi sonrasında 3-4 log/g'lık bir azalma gösterdiği bildirilmiştir (81). Yine *Salmonella* Typhimurium, *Y. enterocolitica*, *S. aureus* ve *L. monocytogenes* gibi patojenlerin sudaki 20 ppm ozon ile muameleye duyarlı olduğu gösterilmiştir (82). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ile kontamine yumurtaların yeterli doz ve süreyle ozona maruz bırakılması ile 5.9 log bir azalma gözlenmiş ve bu azalma UV radyasyonuna kıyasla çok daha etkili bulunmuştur (83). Finch ve Fairbairn (84) enterik virüslerin, Korich ve ark. (85) *Cryptosporidium parvum* gibi protozoonların

ozon gazı ile kolaylıkla inaktive olduğunu bildirmişlerdir. *C. parvum* ookistlerinin 1 ppm konsantrasyonundaki ozon gazı ile 5 dk'lık muamele sonrasında 1 log'lık azalma gösterdiği ve aynı çalışmada *Giardia spp.* kistlerinin ozon gazına *C. parvum*'dan daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Peeters ve ark. (63) 2.27 ppm ozonla 8 dk'lık muamele sonucu sudaki 5×10^5 *C. parvum* ookistlerinin infektivitesinin elimine edildiğini bildirmişlerdir. Bakteriyel sporları öldürmede de ozonun hidrojen peroksitten daha üstün olduğu görülmüştür. Oda ısısında, kısa sürede ve nispeten düşük konsantrasyonlarında sporların büyük bir bölümünü ortadan kaldırması nedeniyle ozon, gıda endüstrisinde en uygun endüstriyel dezenfektan olarak kabul edilmiştir (86). Ayrıca tarımsal alanlarda yabancı otların kontrolünde ve toprak kaynaklı patojenlerin kontrolünde antimikrobiyal ajan olarak da kullanılabileceği bildirilmiştir (65).

Sağlık bakımıyla ilişkili infeksiyonlar hastanede yatan hastaların yaklaşık %10'unu etkilemekte ve morbidite ve mortalite oranını önemli oranda arttırmaktadır. Bu da önemli bir finansal yük demektir. Ekzojen olarak kazanılan ve sağlık bakımı ile ilişkilendirilen infeksiyonları önlemeye yönelik gösterilen çabalar çoğunlukla, uygun el hijyeni sağlama gibi mikroorganizmaların temasla geçişini önleyici tedbirlerde yoğunlaşmıştır. Dolayısıyla sağlık bakımıyla ilgili infeksiyonların epidemiyolojisinde hava yoluyla geçişe gerekli önem verilmemiştir. Ancak, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp* gibi önemli Gram negatif bakteriyel patojenlerin bu yolla geçebileceğine dair bulgular artmaktadır (87). Penetrasyon kapasitesi ve kuvvetli oksitleme gücü sayesinde, UV radyasyon ve HEPA (high-efficiency particulate arrestance) filtrelemeye kıyasla ozonun daha etkili hava dezenfeksiyonu sağladığına dair çalışmalar mevcuttur. UV radyasyon ve HEPA filtrenin aksine ozon, uygulandığı odanın her köşesine penetre olabilecek bir gazdır. Böylece, tüm odanın etkili bir şekilde dezenfeksiyonu sağlanabilir. Bu yüzden de boşaltılmış alanlarda SARS ile kontamine çevrelerin dezenfeksiyonunda da ozon kullanımı önerilmektedir (88). Ozonun nem oranıyla birlikte aktivitesinde artış olduğu ispatlanmış olmasına rağmen, gaz halindeki ozonun bakterisit etkisine ilişkin daha az bilgi bulunmaktadır (62). Ozon; su arıtımında geniş ölçüde kullanılmaktadır, fakat sudaki ozon kimyası ile havadaki ozon kimyası aynı değildir. İnsan ya da hayvanların bulunmadığı boş alanlarda, havaya uygulanan yüksek konsantrasyondaki ozon gazının bazı kimyasal ya da biyolojik kontaminantları ya da kokuları uzaklaştırmada yararlı olabileceği belirtilmiştir. Ancak bu süreçten sonra geride kalabilecek kimyasal yan ürünlerle ilgili

yeterli yayın bulunmamaktadır (89). Bu yüzden de havaya yüksek konsantrasyonda ozon uygulanmadan önce, ortamdaki insan ve hayvanların uzaklaştırıldığından emin olunmalıdır (90).

Son yıllarda, diş hekimliğinde ozonun terapötik ajan olarak önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Ozonun oral sanitasyon prosedürlerindeki ya da birden fazla türün oluşturduğu oral biyofilm tedavisindeki etkinliği in vitro koşullarda test edilmiş ve ümit verici sonuçlar elde edilmiştir. Birçok bakteriyel türün, çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşumundan sorumlu olabileceği ve ozonun biyofilm yapısını parçalayabildiği bilinmektedir (91). Ozon, oral mikroorganizmaların deaktivasyonu ve dental plak tedavileri için düzenlenen in vitro çalışmalarda yaygın olarak kullanılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak tam bir bakterisit etki elde edebilmek için gerekli uygulama süresi açısından; uygulanan ozon konsantrasyonlarına, kullanılan vasatlara, mikrobiyal konsantrasyona ve çeşitli çevresel koşullara bağlı olarak yapılan çalışma sonuçları farklılık göstermektedir. Ozonun anaerob bakteriler üzerindeki direkt oksidatif etkisi açıktır. Ancak, kısa süreli ozon maruziyetleri sonrasında, aerob ve fakültatif anaeroplara için ozonun bir oksijen donörü olarak rol oynayabildiği ve böylece bakterilerin tekrar çoğalabildiği gözlenmiştir. Sıvı ortamlarda ozon uygulaması sırasında, ozon gazı hızla suya nüfuz etmekte ve mikroorganizma membranlarını parçalayarak bakterisidal etkisini göstermektedir (92). Diş hekimliğinde; mikrobiyal kontaminasyonun muhtemel bir kaynağı olan diş fırçaları ve çeşitli ağız içi aletlerin sanitasyonunda, ozonlanmış suların sterilizan bir etki gösterdiği rapor edilmiştir. Ayrıca ozon uygulanmış su ya da fosfat tamponu gibi sıvılarda, 8 saat sonunda bile hala bir miktar ozon bulunduğu tespit edilmiştir (91). Ozonlanmış suyun; bakterisidal etkisinin yanında, hemostatik etkisiyle ilişkili olarak diş çekimi işlemi ya da cerrahi müdahaleler sonrasında oral mukozanın hızla iyileşmesinde rol oynadığı bildirilmiştir. Böylece dental ünitelerdeki su hatlarında ve takma diş ve protez damak gibi diş takımlarını temizleme solusyonlarında da ozon kullanımının yararlı olacağı belirtilmiştir. Özellikle *S. mutans*, *Lactobacillus spp.* gibi çürük oluşumuna sebep olan bakteriyel türler üzerinde ozonun antimikrobiyal etkinliği gösterilmiş ve bu nedenle primer dental kök çürüklerinin kontrolünde önemli rol oynayacağı bildirilmiştir (92, 93). Ayrıca bazı araştırmacılar, ozon gazının uçucu sülfür bileşikleri ve diğer aminoasit prekürsörleri üzerindeki direkt oksidatif etkisinden dolayı, ağız kokusunu klinik olarak azalttığını belirtmişlerdir (94).

Ozonun spesifik terapötik tedavi uygulamaları ise; inme, obstruktif arteriopati, venöz yetmezlik gibi vasküler hastalıklar, kanser, akut ve kronik viral hastalıklar, ülserler, infekte yaralar, gangrenler, yanıklar, Crohn's hastalığı gibi inflamatuvar barsak hastalıkları, ülseratif kolit ve spinal disk problemlerini içermektedir. Ozon aynı zamanda bakteriyel, fungal ve viral infeksiyonlar, yaralar, dekübit ülserleri, lenfatik hastalıklar, tırnak hastalıkları, radyodermatitler, donmaya bağlı ciltte oluşan lezyonların ve iyileşmesi güç yanıkların tedavisinde son derece etkili tedavi sağlayabileceği bildirilmiştir (95).

2.2. Negatif İyon

İyonizasyon; bir atom ya da molekülün elektron ya da diğer iyonlar gibi yüklü partiküllerin eklenmesi ya da uzaklaştırılması ile bir iyonla dönüştürülmesini sağlayan fiziksel bir süreçtir. Etrafımızı saran havada her zaman iyonlar bulunmaktadır. Normalde cm^3 'de 1.500–4.000 iyon bulunmaktadır. Negatif iyonlar aşırı hareketlidir ve yeryüzünde negatif bir yük oluşturur; bu yüzden de yeryüzünden itilirler ve böylece pozitif iyonlar negatif iyonlardan daha fazla oranda bulunur. Atmosferik iyonlar doğal olarak oluşurlar ve konsantrasyonlarındaki değişiklik veya pozitif ya da negatif yüklü olmaları bitki, hayvan ve insanlar üzerinde çeşitli etkiler yaratabilir. İyon boşalması olarak adlandırılan bu durum mental veya fiziksel çeşitli sağlık problemlerinin kaynağıdır. Örneğin; kıyıya vuran dalgalar büyük oranda bir negatif yüklü iyon grubu oluşturur ki bu da deniz kıyısında insanların neden kendilerini daha rahatlamış hissettiğini açıklayabilir. Tam aksine elektronik cihazların ve diğer pozitif yüklü iyon kaynaklarının yoğun bulunduğu yerlerde de serotonin hiper fonksiyon sendromu ya da uykusuzluk, sinirlilik, gerginlik, migren, bulantı, çarpıntı, sıcak basması, huzursuzluk gibi durumları kapsayan "irritasyon sendromu" gibi durumların yoğun olarak görülebileceği ve özellikle yaşlıların depresif, inatçı ve aşırı yorgun hissetmelerine neden olabileceği belirtilmektedir (96).

İyonlar yaşam için gereklidir. Sodyum, potasyum, kalsiyum ve diğer iyonlar canlı organizma hücrelerinde, özellikle de hücre membranlarında önemli role sahiptir. Yüksek seviyedeki atmosferik anyonlar, nöral ve müsküler dokuların aktivitesini düşürerek rahatlatıcı bir etki yaratır. Bu atmosferik etki anksiyete ve manik semptomları azaltmada, depresyon tedavisinde kullanılabilir (97, 98). Bu amaçlarla havaya negatif iyon salınımı sağlayan, hava iyonizeri adı verilen cihazlar

kullanılmaktadır. Bu cihazlar aynı zamanda bulunduğu ortamın daha az havasız hissedilmesini sağladığından astım ve depresyona da iyi geldiği düşünülmektedir (99). Negatif iyon konsantrasyonunun beyindeki serotonin üzerine ters orantılı bir etkiye bulunduğu ve negatif iyonların tıpkı güneş ışığının melatoninini baskıladığı gibi serotonin seviyesini düşürdüğü gözlenmiştir. Dolayısıyla negatif iyon konsantrasyonunun düşmesiyle birlikte serotonin düzeyinde bir yükselme ve bunun sonucunda da uyku hali, gerginlik, yorgunluk gibi durumlarda ve hatta migren ataklarında artış gözlenmektedir (100). İyonize havanın alerji tedavisinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Araştırmalar toz ve polen gibi birçok alerjen maddenin pozitif bir elektriksel yüke sahip olduğunu göstermektedir. İn vitro ve in vivo alerji testi denemelerinde negatif iyonların alerjen oranını önemli oranda azalttığı ve bu nedenle havadaki negatif iyonların alerjik bronşit, alerjik sinüzit, astım, kronik obstrüktif pulmoner hastalık gibi hastalıkların tedavisine önemli katkıda bulunabileceği uzun zamandır bilinmektedir (101, 102, 103).

Son zamanlarda farelerle yapılan bir çalışmada; negatif iyonların immün stimulan ve anti-tümör aktivitesi gibi in vivo etkileri incelenmiş ve NK hücre aktivitesini önemli oranda arttırdığı, tümör gelişimini inhibe ettiği ve kanser insidansını önemli oranda düşürdüğü gözlenmiştir (104). Ayrıca negatif iyonların aerobik metabolizmayı düzenleyici etkisi ve venöz kandaki laktat seviyesi, pH, eritrosit deformasyonu, plazma süperoksit dismutaz aktivitesi ve seruloplazmin seviyesindeki değişiklik incelenmiş ve bir saatlik maruziyet sonunda negatif iyonların olumlu yönde etki gösterdiği bildirilmiştir (105). Yine fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, 6 gün boyunca kolesterolce zengin gıdalarla beslenen 8 haftalık fareler negatif iyon maruz bırakılmış ve sonuçta negatif iyon maruz bırakılmayan grubun eritrositlerinin agregasyonu olduğu gözlenirken, negatif iyon maruz bırakılan grubun eritrositlerinin daha düzgün yapılı ve ayrık olduğu gözlenmiştir (106).

Japonya'yı da içeren uzak doğu ülkelerinde özellikle SARS salgını endişesiyle kişisel iyonizerlerin kullanıldığı diş fırçaları, buzdolabı, çamaşır makinesi gibi cihazların üretimi artmıştır. Bu cihazlar için özel bir standart bulunmamaktadır. Çeşitli bilgisayar üretici firmalar da artık hava iyonizerli bilgisayar üretimine başlamıştır (107).

Negatif iyonların nozokomiyal infeksiyonları önlemeye yönelik olarak kullanımı için, hijyeni sağlamadaki etkilerine dair araştırmalar hız kazanmıştır (108). Bu amaçla

hava iyonizasyonunun bakterisit aktivitesi üzerine çok sayıda araştırma yapılmıştır. Pozitif iyonların bakterisit etkisi fiziksel faktörlere bağlanırken, negatif iyonların fiziksel ya da kimyasal etkilere bağlı olabileceği gösterilmiştir. Bu oksijenin varlığına bağlıdır: negatif iyonlar, temelde güçlü oksitleme etkisine sahip oksijen iyonlarından oluşurken, pozitif yüklü iyonlarda oksidasyon görülmemektedir. Marin ve ark. negatif iyonların Gram (-) bakteriler üzerindeki etkisinin Gram (+)'lerden çok daha büyük olduğunu; iyonizasyona maruz bırakılan *E. coli* koloni sayısının kontrol gruptan yaklaşık 15.1 kez daha az olduğunu, *S. aureus*'ta ise aynı koşullarda sadece 4.5 kat azalma olduğunu göstermiştir (109). Negatif iyonlar, biyoaerosol ve toz partiküllerini bağlayarak daha büyük partiküller oluşturur ve bunların havadaki konsantrasyonunu düşürebilir. Bu sayede de hava yoluyla oluşan infeksiyonları azaltabilir. Örneğin negatif hava iyonizerleri kullanılarak tavuklardaki Newcastle Disease Virus geçişinin azaltılabileceği gösterilmiştir (110). Bakır-gümüş iyonizasyonu, özellikle hastane sıcak su sistemlerinde yaygın olarak kabul edilmeye başlanmış bir dezenfeksiyon yöntemidir. Bu pozitif yüklü metalik iyonlar negatif yüklü olan bakteri hücre membranlarına bağlanır ve hücre lizisi ve ölümüne neden olur. Metal iyonları aminoasitlerin sülfidril, amino ve karboksil gruplarına bağlanarak proteinlerin denatürasyonuna neden olur. Fosfatlara bağlandığı zaman, DNA molekülünün yapısal omurgasını bozar ve kırılmaya neden olur. Pozitif yüklü gümüş ve bakır iyonları elektronlarla birleşme eğilimindedir ve bu nedenle bakteri hücrelerine girdiğinde hücresel respirasyon sistemindeki elektron transportunu engeller (70).

Uzun zamandır negatif iyonların mikroorganizmalar üzerindeki etkileri tartışılmaktadır. Bu konudaki araştırmalar; negatif iyonlara maruziyetlerinin ardından *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* ve *Salmonella* sp. bakterilerinin çoğalmalarının inhibe olduğunu gösteren Tchijevski ile başlamıştır (111) ve daha sonra hava iyonlarının mikrobiyal hücrelerin canlılığı üzerinde önemli ve tekrarlanabilir bir etkisi olduğu gösterilmiştir (112). Ardından Marin ve ark. negatif iyonlara maruziyet ile *E. coli* ve *S. aureus* 'un çoğalmalarının inhibe olduğunu göstermiştir (109). Ticari olarak temin edilebilen, ağız boşluğunda kullanılmak üzere tasarlanmış bir "corona discharge" iyon jeneratörünün dış çürükleri (113) ve *C. albicans* türü mayalar üzerindeki etkisi in vitro koşullarda doğrulanmış ve oral kandidiyoz tedavisinde de kıymetli olabileceği vurgulanmıştır (10). Benzer şekilde, in vitro koşullarda çeşitli Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler üzerinde negatif

iyonların letal etkileriyle ilgili gözlemlerine dayanarak; Cousins ve ark. böyle bir iyon jeneratörünün kullanımının çürük lezyonlarından, periodontal ceplerden, kontamine yüzey ve aletlerden bakterilerin eliminasyonun sağlanabileceği kanısına varmışlardır (114). Negatif iyonların; diş kliniklerinde hava kaynaklı mikrobiyal kontaminasyonu azaltmada (115), tavuk üretim çiftliklerindeki *Salmonella* kontaminasyonunu azaltmada (116) ve kümes hayvanları barınaklarında hava yoluyla yayılan virüslerin azaltılmasında (110) etkili olduğu gösterilmiştir.

Negatif iyonların canlı mikroorganizmalar üzerinde fizyolojik etkilerinin olup olmadığına dair çok fazla araştırma mevcuttur (111, 117, 118). Tanimura ve ark. 10^6 ml⁻¹ konsantrasyonundaki negatif iyonun *E. coli*'nin çoğalmasını tamamen inhibe ettiğini, fakat 10^5 ml⁻¹ konsantrasyonundan daha düşük seviyelerdeki negatif iyonların herhangi bir inhibitör etki göstermediğini belirtmiştir. Yine aynı çalışmada negatif iyon maruziyetinin bir kez kesilmesi durumunda bakteri hücrelerinin yeniden çoğalmaya başladığı ve dolayısıyla negatif iyonların mikroorganizmalar üzerinde bakterisit bir etkiden çok bakteriyostatik etkili olabileceği bildirilmiştir (119). Bir başka çalışmada 5×10^4 - 5×10^6 ml⁻¹ arasında değişen konsantrasyonlarındaki negatif iyon maruziyetlerinde; kültüre alınmış bakterilerin çoğalmasının yavaşladığı ve aerosollerdeki bakteri ve fungus sporlarının canlılığının azaldığı gösterilmiştir (120). Bir başka çalışmada ise, negatif iyonların 48 saatlik maruziyet süresi içinde tek başına hiçbir öldürücü etkisi olmadığı gösterilmiş, ancak negatif iyon maruziyet periyodu boyunca bakterilerin çoğalmasının inhibe olabileceği kanısına varılmıştır. Ayrıca bakteriyel hücre ölümü üzerinde ozon ve negatif iyon arasında güçlü bir sinerjistik etki olduğu belirtilmiştir (11). Benzer şekilde Tanimura ve ark. ozon ve negatif iyonun birlikte uygulandığında, tek başına uygulanmalarına göre çok daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir (121). Li ve ark. ozon ve negatif iyon kombinasyonlarının mandalina ve portakalların çürümesini azalttığını bildirmiştir. Bu meyvelerin $1-5 \mu\text{l l}^{-1}$ ozon ile 10^4-10^5 ml⁻¹ negatif iyon kombinasyonuna günlük 10 dk'lık maruziyetleri sonucu %2'den daha az çürüme gösterdiği, bu işleme maruz bırakılmayan meyvelerde ise %25 oranında çürüme görüldüğü gösterilmiştir (122). Hildebrand ve ark.; sofr üzümünün, $0.1-0.5 \mu\text{l l}^{-1}$ ozon ile $2 \times 10^4-7 \times 10^4$ ml⁻¹ negatif iyon kombinasyonunda 10°C 'de 3 hafta tutulması ile yaklaşık %40 oranında çürümenin azaltıldığını göstermişlerdir (123). Song ve ark. depolama sırasında ozon ve negatif iyondan oluşan bir atmosferde tutulması durumunda; soğanların yüzeyinde oluşan küflerin önemli oranda azaldığını göstermişlerdir. Ozon ve negatif iyon

kombinasyonu, depolanacak meyve ve sebzelerin korunmasında kullanılabilir ümit verici bir yöntemdir (124).

Agar plak yüzeyine ekimi yapılan mikroorganizmalar üzerinde negatif iyonların etkisi çeşitli çalışmalarda; hücrelerin fiziksel yer-değiştirmesi, hücre aglütinasyonu, agar jelinin hızlandırılmış olarak kuruması ya da iyon deşarjının kendisi ile ilgili bir etki gibi farklı olaylara dayandırılmıştır (125, 126, 127, 128). İyon deşarjının etkisiyle oluşan serbest elektronlar oksijen ile reaksiyona girip, oksijen radikallerini oluşturmakta ve bu radikaller oksijen ve karbon dioksit ile O_3^- , O_2^- ve CO_3^- anyonlarını oluşturmak üzere birbirini etkilemektedir (128). Elektrik boşalması (corona discharge) ile meydana gelen bu oluşum kütle spektrometrisi kullanılarak doğrulanabilmektedir (129). Negatif iyonların bakterisidal etkisi hem CO_3^- (126) hem de O_2^- (130) iyonlarına dayandırılmıştır. Üstelik iyon deşarjı sırasında negatif iyonların yanı sıra ozon, nitrik oksit ve nitroz oksit oluşumu da mümkündür (128). Bazı araştırmalarda negatif iyonizasyon sırasında gözlenen bakteriyostatik ve/veya bakterisit etkinin, özellikle ozon oluşumuna bağlı olduğu belirtilmiştir (11, 121, 123, 124). Elektriksel boşalmanın ardından Gram negatif bakterilerin dış membranlarının parçalandığı ve sitoplazmik içeriğin hücre dışına doğru sızdığı gözlenmiştir (131, 132). Bunun reaktif oksijen türleri ile membran lipitlerinin oksidasyonu (132) ya da elektriksel yük birikimi ile membranın fiziksel hasarı (132, 133) yoluyla meydana geldiği düşünülmektedir. Benzer şekilde Gram pozitif bakterilerin de hücresel canlılıklarında azalma görülmüş, ancak bu redüksiyonun önemli bir morfolojik değişiklik ile birlikte olmadığı bildirilmiştir. Burada daha çok, dirençli dış membrana difüze olan reaktif türlerin hücre içindeki biyomateryaller ile reaksiyona girerek hücrelerin ölmesine neden olduğu düşünülmektedir (11). Yakın zamanda yapılan araştırmalarda nitrojen ortamında oluşturulan pozitif ve negatif elektriksel deşarjın durağan fazdaki bakteri hücreleri üzerindeki bakterisit etkileri tanımlanmıştır. *Pseudomonas veronii*'nin 10 dk ozona maruz bırakılmasından sonra hücresel canlılıkta %65'lik azalma ve 60 dk sonunda ise %95'e ulaşan azalma rapor edilmiştir. Oksijensiz ortamda reaktif oksijen türleri oluşmayacağından dolayı, bu araştırma sonuçları elektriksel deşarj ile dezenfeksiyonun iyonik etkilerini göstermiştir (134, 135).

Mikroorganizmaların negatif iyonlara duyarlılığını etkileyen faktörleri vurgulayan sınırlı sayıda veri yayınlanmıştır. Negatif iyonların mikroorganizmalar üzerindeki etkileri ile ilgili tam anlamıyla kontrollü bir laboratuvar çalışması planlamanın pratik zorlukları bulunmaktadır (10). Krueger ve Reed negatif iyon akımı

ile ilgili yapılan çalışmalardaki farklı sonuçların hatalı deneysel projelerden kaynaklandığını belirtmiş ve deneysel süreçte araştırmacıların özellikle (a) ozon ve nitroz oksit oluşumu ve (b) iyon yoğunluğu, sıcaklık, nemin izlenmesi ve kontrolü gibi birçok faktörü dikkate alması gerektiğini vurgulamıştır (111). Rosenthal ve ark. teknik açıdan yetersiz iyon jeneratörlerinin kullanımına, deneysel koşulların eksik ve hatalı tanımlanmaları da eklenince yetersiz sonuçlar alındığına dikkat çekmiş ve bu faktörlerin deneylerin tekrarlanabilirliğini güçleştirdiğini belirtmiştir (125). Shargawi ve ark. emitör mesafeleri, maruziyet zamanları, bağıl nem oranları ve aerobik ve oksijensiz koşullar gibi farklı koşullar altında oluşturulan negatif iyonların *C. albicans* izolatları üzerindeki etkisini ve bu sırada oluşan ozon konsantrasyon oranlarını incelemiş ve bu parametrelerin kontrol altına alınmadığı çalışma sonuçlarını karşılaştırmanın anlamsız olduğunu ve hatta bu faktörlerin, çalışmanın aynı laboratuvarında yapılan tekrarlarını bile etkileyebileceğini belirtmiştir (10).

Dolezalek (136) bağıl nemdeki bir artışın, aynı akım yoğunluğu kullanıldığında havadaki elektriksel iletkenlikte ve etki alanında azalma ile sonuçlandığını göstermiştir. Emitör mesafesi ve maruziyet süresi de negatif iyonların letalitesini önemli oranda etkilemekte ve emitöre olan mesafe arttıkça, “corona discharge” ile oluşturulan iyon sayısında düşüş gözlenmektedir (10, 128). Rosenthal ve ark. moleküler oksijenin serbest elektronları temizleyebilecek tek hava bileşeni olduğunu, moleküler nitrojenin elektron yapısının ise hava iyonlarının oluşumunu önlediğini belirtmiş ve bu yüzden de oksijensiz bir atmosferde negatif iyonların oluşturulamayacağını ifade etmiştir (125). Yapay hava iyonizasyonu ile oluşturulan gaz halindeki iyon miktarı, iyonizerin yapısına bağlıdır (118). “Corona discharge” iyonizerleri bir yan ürün olarak, daima cihaz çevresinde koku eşliğini aşan seviyelerde (yaklaşık 0.01 ppm) ozon (127) ve ayrıca az miktarda da nitrik oksit oluştururlar (118). Ancak, iyonizerler tarafından oluşturulan ozon seviyesi; negatif iyonların mikrobisit etkisiyle ilgili deneysel çalışmalarda, nadiren ölçülmüş ya da hesaplanmıştır (10, 117).

İyonizerler, her ne kadar benzer bir mekanizmayla çalışsa da ozon jeneratörleriyle karıştırılmamalıdır. İyonizerlerde pozitif ya da negatif yüklü gaz iyonları oluşturmak için elektriksel çekimle çeşitli partikülleri tutacak özellikte olan statik elektriksel yüklü plakalar kullanılır. Ozon jeneratörleri ise bir “corona discharge”

tüpü veya UV lamba kullanarak, bir oksijen molekülüne ekstra bir oksijen iyonu bağlayacak şekilde dizayn edilmiştir. En iyi iyonizerler bile az da olsa bir miktar ozon üretecektir ve ozon jeneratörleri ise hava yerine saf oksijenle beslenmediği sürece ozonun yanı sıra moleküllerin gaz halindeki iyonlarını da üretecektir (38).

2.3. PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Kromozom, hücrenin kimliğini belirleyen en önemli bileşendir ve bu yüzden suşlar arası ilişkiliği tespit etmede ayrıcalıklı bir ölçüm sunar. Kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimleri ile kesimi sonucu farklı boyutlarda bir dizi fragment oluşur ve agaroz jel elektroforezi ile analiz edildiğinde bu fragmentler farklı paternler oluşturur. Enzimler çoğunlukla bakteriyel kromozomdaki sayısız tanınmış bölgelerdeki DNA'yı kesmek için kullanılır ve ardından çok sayıdaki bant fragmentini yeterli ve doğru olarak karşılaştırmak için konvansiyonel agaroz jel elektroforezi yapılır. Son zamanlarda analiz için DNA'yı daha az sıklıkta kesen restriksiyon enzimleri kullanılmaktadır. Oluşan DNA fragmentleri konvansiyonel agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmayacak kadar büyüktür. Genellikle PFGE olarak sınıflandırılan birkaç alternatif metot bu büyük DNA fragmentlerini ayırabilmektedir. Konvansiyonel agaroz jel elektroforezinde 40–50 kb üzerindeki DNA fragmentlerinin yeterli oranda yürütülmesi mümkün değildir. PFGE'de DNA'nın ayrıştırıldığı elektriksel alanın yönü periyodik olarak değiştirilerek çoğunlukla megabaz-boyutlu DNA olarak adlandırılan 1.000 kb'dan daha uzun DNA moleküllerinin ayrıştırılması mümkün kılınmaktadır. PFGE metotlarında, farklı açılarda ve belirli aralıklarda yönü değiştirilen elektrik akımıyla DNA parçalarının büyüklüklerine göre ayrıştırılması sağlanır. En yaygın kullanılan iki şekli vardır; CHEF (contour-clamped homogenous electric field) ve “field inversion” (alan değiştirme) jel elektroforezi. “Field inversion” jel elektroforezinde periyodik olarak 180 derece tersine çevrilen elektriksel alanın oryantasyonunun sağlandığı konvansiyonel bir elektroforez tankı kullanılır. CHEF'de ayrıştırma için son derece yeterli elektriksel alan koşullarını sağlayan çoklu elektrotlara sahip daha kompleks bir elektroforez tankı kullanılır. Tipik olarak elektroforez cihazı 120 derece açılarla elektrik akımının yönünü değiştirerek DNA moleküllerine yön verir. CHEF çeşitli antimikrobiyal-dirençli bakterilerin yayılımını değerlendirmede kullanılır. İzolatların eş ya da ilişkili diye adlandırılan restriksiyon endonükleaz patern bulguları tek bir suştan yayılımı göstermektedir (137).

PFGE ile oluşturulan DNA fragment paternlerinin yorumlanması ve nozokomiyal patojenlerin tiplemesinde epidemiyolojik olarak kullanışlı bilgi haline çevrilmesi için klinik mikrobiyologlar PFGE paternlerinin nasıl karşılaştırılacağını ve rastgele genetik olayların bu paternleri nasıl değiştirdiğini anlaması gerekir. İdeal olarak, PFGE izolatları birbirleriyle aynı ve epidemiyolojik olarak ilişkisiz suşlardan tamamen farklı olan bir salgın suşunu temsil eder. Alternatif olarak, bir salgın sırasında restriksiyon profilini değiştirebilen nokta mutasyonu ya da DNA'nın insersiyon ve delesyonları gibi rastgele genetik olaylar gerçekleşebilir. Yorumlayıcı kriterin amacı suşlardaki gerçek farklılıkları, bir nozokomiyal salgın sırasında olabilecek rastgele genetiksel polimorfizmlerden ayırabilecek bir klavuz oluşturmaktır. Uygun yorumlayıcı kriter varsayılan salgın suşu ve birbirinden farklı izolatlar arasındaki restriksiyon patern değişikliklerini ilişkilendirmek ve izolatın salgına ait olduğuna dair olası bir tahmin yürütmek için tutarlı, objektif bir rehber sağlar. Bu ilişkilendirme elde edilen patern değişikliklerini yorumlamada gerekli çeşitli genetik olaylar üzerinde yoğunlaşır (137).

PFGE'nin yorumlanmasında çoğunlukla Tenover tarafından önerilen kriterler kullanılır (138). Buna göre 3 restriksiyon fragmentin 1 bant paterni farklılığı; tek bir genetik olay sonucu oluşmuştur ve bu yüzden bu izolatlar yüksek derecede yakın ilişkili olarak sınıflandırılır. 6 restriksiyon fragmenti için 4 bant farklılığı 2 genetik olay sonucu oluşmuştur ve 7 restriksiyon fragmentinden daha büyük farklılıklar 3 ya da daha fazla genetik olay sonucu oluşmuş demektir. PFGE analizinde 3 fragment ile farklı bulunan izolatlar aynı suşun epidemiyolojik olarak ilişkili subtipini ifade edebilir. Bunun aksine, 3 restriksiyon fragmentinden daha fazla yerde farklılık gösteren izolatlar daha zayıf bir epidemiyolojik ilişki gösterebilir. PFGE ve diğer tipleme metotları kullanılarak yapılan bazı araştırmalar restriksiyon enzim (RE) bölgesini değiştirebilen ya da yeni bir RE bölgesi oluşturabilen ya da plazmid, bakteriyofaj veya insersiyon sekansları ile ilişkili DNA insersiyon/delesyonları gibi tek genetik olayların tahmin edilemeyecek kadar kısa sürede hatta iyi tanımlanmış bir salgının 1–3 ayı içinde olabileceğini göstermiştir. Salgın suşuyla karşılaştırılan fragment paternlerindeki farklılık yoluyla 2 genetik değişim olayının tespiti ile bir salgınla ilişkililiğin belirlenmesi her zaman kolay olmamaktadır. Sonuçlar bu izolatların ilişkili olduğunu gösterebilir (özellikle de izolatlar 3–6 ay gibi uzun bir zaman periyodunda

toplanmışsa), fakat aynı zamanda suşların ilişkisiz ve salgının bir parçası olmadığı ihtimali de unutulmamalıdır (137).

Çoğunlukla nozokomiyal bir hastalık salgını durumunda, PFGE paternlerinin analizi BioNumerics gibi bir yazılım program kullanılarak yapılır ya da DNA parmakizi analizi için mevcut diğer programlardan biri kullanılarak yapılır. Rementeria ve arkadaşları 3 software paketinin (GelCompar version 4.0 [Applied Maths], Molecular Analyst Fingerprinting version 1.0 [Bio-Rad, Hercules, CA] ve BiImage version 3.2 [BiImage Corp., Ann Arbor, MI]) ve manuel görüntüleme sonuçlarını karşılaştırmış ve her bir metodun jel analizi için kabul edilebilir sonuçlar verdiğini, ancak her metodun belirlediği genotipler arasında bazı farklılıklar olduğu görülmüştür (139). Az sayıda izolat profilinin çıplak gözle incelenmesi yapılabilirken, bilgisayar programları çoklu jellerin değerlendirilmesinde, band paternlerini normalize edilmesinde ve verilerin veri bankasında depolanmasında kullanılmaktadır. Bu yüzden de çok sayıdaki suş profillerini karşılaştırmada bu programlar daha uygundur. Çoğu analiz programları aynı zamanda suşların evriminin ve izolatlar arası atasal ilişkinin belirlendiği filogenetik analizini sağlayan algoritmalar içerir. Genelde suşlar %100 benzerlik gösteriyorsa eş kabul edilir ve %80'den daha fazla benzerlik gösteriyorsa klonal olarak ilişkili kabul edilir. Tipik filogenetik çıktı dendogram olarak ifade edilir ve suş neslinin ve gruplar arası genetik benzerlik ve farklılıklarının görsel bir temsilidir (137, 139).

PFGE mevcut metotlar arasında tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü en yüksek ve genelde çoğu epidemiyolojik değerlendirmede tercih edilen yöntemdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Test edilen mikroorganizmalar

İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezinde; 2006 yılında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşları çalışmaya alındı. Çalışmada kullanılan klinik izolatlar, hastanemiz Enfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından değerlendirilerek Amerika'daki Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) kriterlerine göre hastane infeksiyonu etkeni olarak kabul edilmiş mikroorganizmalardan oluşmaktaydı. İzolatların mikrobiyolojik identifikasyonları rutin mikrobiyoloji laboratuvarında otomatize sistem (Phoenix, Becton Dickinson-USA) kullanılarak yapıldı.

3.2. Bakteri dilüsyonlarının hazırlanması

Çalışmaya alınan izolatlar %5 kan ilave edilmiş triptik soy agar besiyerlerine inoküle edildi ve 37°C'de 18-20 saat inkübe edildi. Elde edilen saf kültürlerden, 1 ml'lik fosfat tamponu içeren tüplerde 0.5 Mcfarland bulanıklığına karşılık gelen (UV spektrofotometre ile $OD_{600nm}=0.132$ absorbans) 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra yine fosfat tamponu içeren tüplerde 1:10 oranında seri dilüsyonları yapılarak 1.5×10^2 CFU/ml'ye kadar seyreltildi ve toplamda 7 farklı bakteri konsantrasyonu elde edildi. Her dilüsyon için 3 agar plağına ekim yapıldı ve 37°C'de 18 saatlik inkübasyonun ardından koloni sayılarının ortalamaları alınarak seri dilüsyon işleminin feedback kontrolü yapıldı.

3.3. Ozon jeneratörü

Ozontek marka, seramik tüplü, "corona discharge" yöntemli ve hava şartlandırıcılı ozon jeneratörleri kullanıldı. Cihazlardan biri 10.5 mg/saat ve diğeri 6.6 mg/saat konsantrasyonda ozon oluşturma kapasitesine sahip olan iki farklı ozon jeneratörü kullanılmıştır. Saatte 10.5 mg ozon oluşturan cihaz oksijen tüpü ile desteklenirken, 6.6 mg/saat ozon çıktısı olan cihaz hava kompresörü desteğiyle çalışmaktaydı.

3.4. Negatif iyonizer

Purion marka, 250x180x692 mm ebadında, 10-60 m² etki alanına sahip, 0.04 ppm'in altında ozon çıktısı ve 3.3 milyon/cm³ negatif iyon çıktısına sahip negatif iyonizer kullanıldı.

3.5. Bakterilere ozon gazı ve/veya negatif iyon uygulama deneyleri

3.5.1. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilere ozon gazı ve/veya negatif iyon uygulama deneyleri

Alikotlanmış fosfat tamponu içeren tüplerdeki bakteri süspansiyonlarının her bir konsantrasyonu için en az 2 adet kanlı triptik soy agar besiyerine ekim yapıldı ve ekimin ardından plaklar bekletilmeden karton kutu içerisine, plak kapakları açık olarak yerleştirilerek negatif iyon ve/veya ozon gazına maruz bırakıldı. Bu amaçla 10.5 mg/saat ve 6.6 mg/ saat olmak üzere iki farklı konsantrasyonda ozon gazı çıktısına sahip jeneratörler kullanılmıştır. Kontrol plaklar ozon ve/veya negatif iyona maruz bırakılmadan gecelik inkübasyon için 37°C'lik etüve alınırken, her bir konsantrasyon için 10 dk, 20 dk, 30 dk, 40 dk, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 4 saatlik maruziyet süreleri belirlenmiştir. Maruziyet sürelerinin tamamlanmasının ardından plakların kapakları kapatılarak 37°C'de gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün kontrol plaklar ve ozon ve/veya negatif iyona maruz bırakılan plakların koloni sayımları yapılmış ve ortalamaları alınarak kaydedilmiştir.

3.5.2. Fosfat tamponu içerisinde hazırlanan bakteri süspansiyonlarına ozon gazı uygulama deneyleri

İzolatların kanlı triptik soy agar besiyerlerinde üretilmesiyle hazırlanan saf kültürlerden, daha önce anlatıldığı gibi 1.5x10⁸ CFU/ml'den başlayarak 1.5x10² CFU/ml'ye kadar seri dilüsyonları yapılmıştır. Bu amaçla 50 ml'lik vida kapaklı falkon tüpleri ve her tüp için 5 ml fosfat tamponu kullanılmıştır. Her bir konsantrasyon için ve her bir maruziyet süresi için ayrı bir falkon tüpü kullanılmış ve 10 dk, 20 dk, 30 dk, 40 dk, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 4 saat süreyle bakteri süspansiyonu içerisine 6.6 mg/saat konsantrasyonunda ozon gazı verilmiştir. Ozon gazına maruziyet öncesinde ve sonrasında, bu bakteri süspansiyonlarından en az iki kanlı triptik soy agara ekim yapılmış ve gecelik inkübasyonun sonunda koloni sayımları yapılarak kaydedilmiştir. Ozon gazına maruziyet öncesi ve maruziyetin 1. saatinin sonunda 1.5x10⁸ CFU/ml konsantrasyonundaki bakteriyel süspansiyonlar Gram boyama yöntemiyle boyanmış

ve hücre duvar harabiyetini gözlemek amacıyla fotoğraflanmıştır. Ozon gazına maruziyet öncesinde ve yine ozon gazına maruziyetin birinci saatinin sonunda falkon tüplerindeki 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonundaki bakteriyel süspansiyonlar moleküler tiplendirme (PFGE) için kullanılmıştır.

3.5.3 Hastane atık suyu ve soğutma kulesinden alınan numunelere ozon gazı uygulama deneyleri

Hastanemiz klima sistemi soğutma kulesi tanklarından alınan örneklerde birkaç *Bacillus spp.* kolonisi dışında anlamlı üreme olmamış ve *Bacillus spp.* ise kontaminasyon olarak değerlendirilmiştir. Örneklerin alındığı dönemde üreme gözlenmemesi klorlama, ozonlama sistemlerinin aktif olarak çalışmasına bağlandı.

Hastanemiz atık su arıtım sisteminin giriş ve çıkış noktalarından yaklaşık 15 günlük bir periyotta farklı zaman aralıklarıyla, 50 ml' lik steril idrar toplama kaplarına su örnekleri alınmış ve 5 dk ve 10 dk süreyle 10.5 mg/saat konsantrasyonunda ozon gazına maruz bırakılmıştır. Ozonlama öncesi ve sonrasında kanlı triptik soy agar ve EMB (Eozin Metilen Blue) agar besiyerlerine ekimleri yapılarak, koloni sayıları CFU/ml olarak kaydedilmiştir.

3.6. Moleküler tiplendirme (PFGE=*Pulsed Field Gel Electrophoresis*)

Moleküler tiplendirme için bir saat boyunca ozon gazına maruz bırakılan 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonundaki bakteri süspansiyonları kullanılmıştır. Bu amaçla EK-1' de verilen standardize edilmiş PFGE protokolleri kullanılmıştır.

PFGE moleküler tiplendirme 3 farklı şekilde yapılmıştır;

1. İlk gruptaki suşlar ozon gazıyla muamele edilmeden direkt olarak standart PFGE protokolü aşamalarında geçirilmiştir. Bu suşlar EK-1' de verilen protokolde anlatıldığı şekilde kalıba alınmış, lizis ve yıkama işlemlerini takiben bakteri türüne uygun restriksiyon endonükleaz enzimleriyle DNA kesimleri yapılmış ve böylece elektroforez aşaması için hazır hale getirilmiştir.

2. İkinci gruptaki suşların 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonundaki bakteri süspansiyonları hazırlanarak 1 saat süreyle ozon gazı ile muamele edilmiştir. Bir saatlik maruziyetin ardından bakteri süspansiyonlarının santrifüj edilmesiyle elde edilen pellet, standart PFGE yönteminde kullanılan hücre süspansiyon tamponu ile süspanse edilmiş ve EK-1' de verilen PFGE protokolü aynen uygulanmıştır. Yani

bakteri süspansiyonları ile hazırlanan kalıplar sırasıyla liziz, yıkama ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim aşamalarından geçirilmiş ve elektroforez aşamasına hazır hale getirilmiştir.

3. Üçüncü grupta ise, yine 1 saat süreyle ozon gazı ile muamele edilen bakteri süspansiyonları kullanılarak PFGE işlemi için kalıplar hazırlanmıştır. Fakat bu kalıplar liziz aşamasından geçirilmeden, direkt yıkama ve restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim aşamalarına alınmış ve sonuçta elektroforez işlemine hazır hale getirilmiştir.

3.7. Sonuçların istatistiksel analizi

Yapılan denemelerde elde edilen sonuçların istatistiksel analizi, SPSS 15.0 programı ve tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (Friedman Testi) testi kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda Gram negatif bakterilerden *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* ve Gram pozitiflerden ise *Staphylococcus aureus* izolatlarının ozon gazı ve/veya negatif iyonla olan duyarlılıkları araştırılmıştır. Bu amaçla bakterilerin agar plak yüzeylerine ekimleri yapılarak farklı sürelerde ozon ve/veya negatif iyonla maruz bırakılmış ve koloni sayılarındaki değişiklik incelenmiştir. Plak üzerine ekimi yapılan bakterilerin ozon gazına duyarlılıkları araştırılırken 2 farklı konsantrasyonda ozon gazı uygulanmıştır. Ozon gazının hava yoluyla etkinliğinin yanı sıra sudaki etkinliğini de tespit etmek amacıyla fosfat tamponu içerisinde hazırlanan bakteriyel süspansiyonlar içerisinde ozon gazı verilmiş ve yine maruziyeti takiben yapılan ekimlerde koloni sayıları incelenmiştir.

4.1. Bakterilere ozon gazı uygulanmasının sonuçları

4.1.1. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilerin 6.6 mg/saat ozon gazı uygulanmasının sonuçları

Çalışmaya alınan 5 farklı bakterinin 1.5×10^8 CFU/ml'den başlayarak 1.5×10^2 CFU/ml'ye kadar toplamda 7 farklı konsantrasyonu hazırlanarak agar plak yüzeylerine ekimleri yapılmış ve değişik maruziyet sürelerinde ozon gazına duyarlılığına bakılmıştır. Agar plaklara ekimi yapılan tüm bakterilerin ozon gazına duyarlı olduğu ve maruziyet sonrasında görülen koloni sayılarındaki azalmaların istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görülmüştür ($p < 0.001$). Hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerin tüm konsantrasyonlarında özellikle ilk 10 dk içerisinde önemli bir düşüş gözlenmekte ve daha sonra bakteriyel konsantrasyona bağlı olarak zamanla bakteri sayılarındaki bu düşüş devam etmektedir (Tablo 2, 3, 4, 5, 6). Özellikle 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonunda ilk 10 dakika içinde yaklaşık 1 logaritmik düşüş gözlenmektedir. Ancak devam eden maruziyet süreleri içerisinde aynı hızda düşüş gözlenmemiştir. Gram negatif bakterilerin Gram pozitif grupta yer alan *S. aureus*'a göre ozona daha duyarlı olduğu ve en geç ikinci saatin sonunda tüm konsantrasyonlarda bakteri sayılarının sıfırlandığı görülmektedir. Gram negatif

bakteriler arasında ise genel olarak *E. coli*'nin diğer bakterilere göre ozon gazına nispeten daha duyarlı olduğu görülmüştür (Şekil 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5).

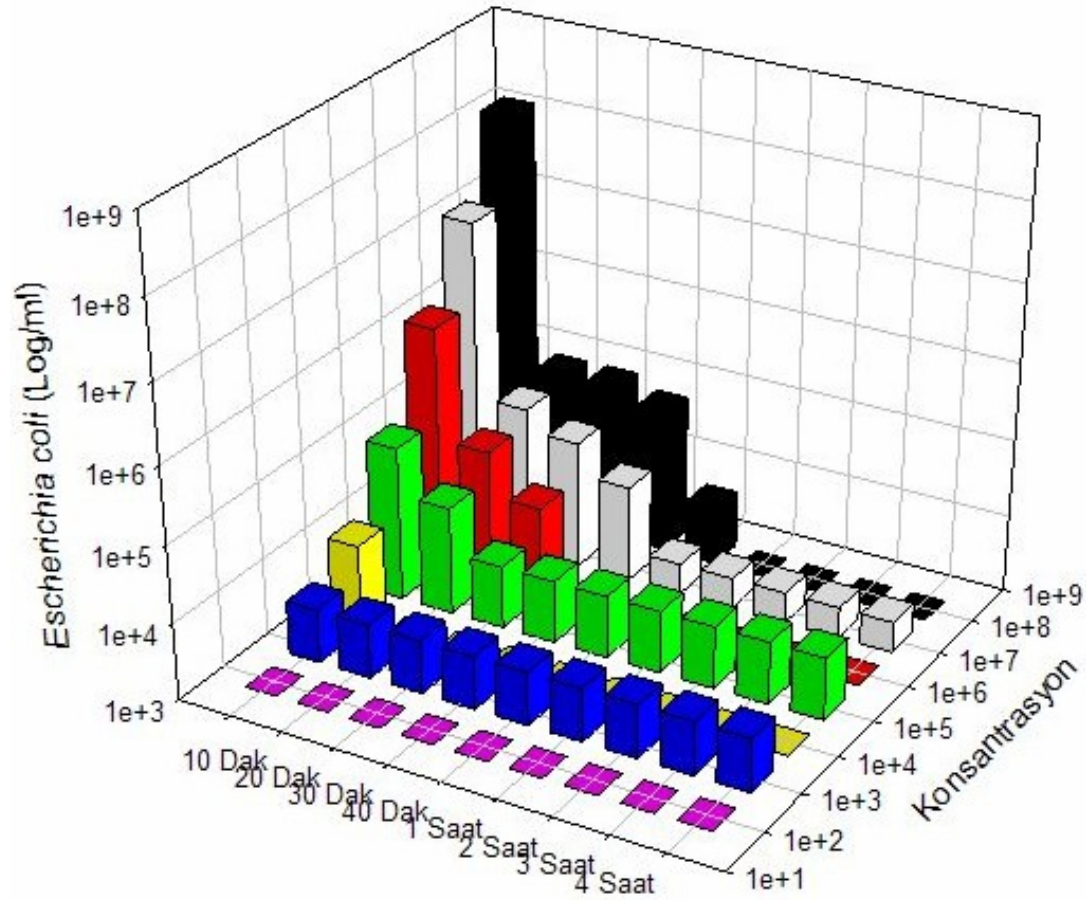
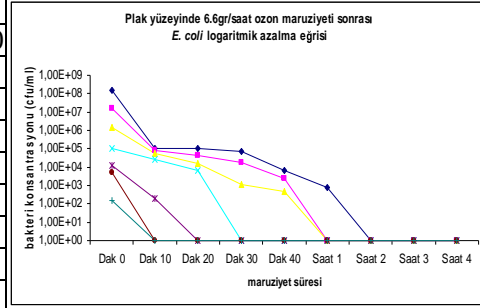
E. coli ve *K. pneumoniae* için ilk 10 dakika içinde tüm konsantrasyonlarda önemli oranda azalmalar gözlenmekte ve 1.5×10^5 CFU/ml konsantrasyona kadar olan sulandırılmalarının ilk 30. dakikada tamamen sıfırlandığı görülmektedir. 1.5×10^6 CFU/ml ve üzeri konsantrasyonlarının ise ilk 10 dakika içinde anlamlı bir düşüş gösterdiği, fakat 2. saate kadar tamamen sıfırlanmadığı görülmektedir (Şekil 3.1, 3.2).

P. aeruginosa ve *A. baumannii* 'de 1.5×10^4 CFU/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda 20. dakikada bakteri sayısının sıfırlandığı, fakat 1.5×10^5 CFU/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda ancak 3. saatte tam bir inhibisyon gözlenebilmektedir. Yine ilk 10 dakikalık süreçte tüm konsantrasyonlar için çok hızlı bir azalma görülmektedir (Şekil 3.3, 3.4).

S. aureus için de diğer bakterilerde olduğu gibi ilk 10 dakika içerisinde koloni sayısında önemli bir azalma söz konusudur. Fakat Gram negatif bakterilere göre *S. aureus* 10. dakikanın ardından çok daha yavaş bir azalma göstermiştir. Özellikle 1.5×10^6 CFU/ml ve daha yüksek konsantrasyonların 4. saatin sonunda bile tamamen inhibe olmadığı görülmektedir (Şekil 3.5).

Tablo 2. Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *E. coli* koloni sayısındaki değişim.

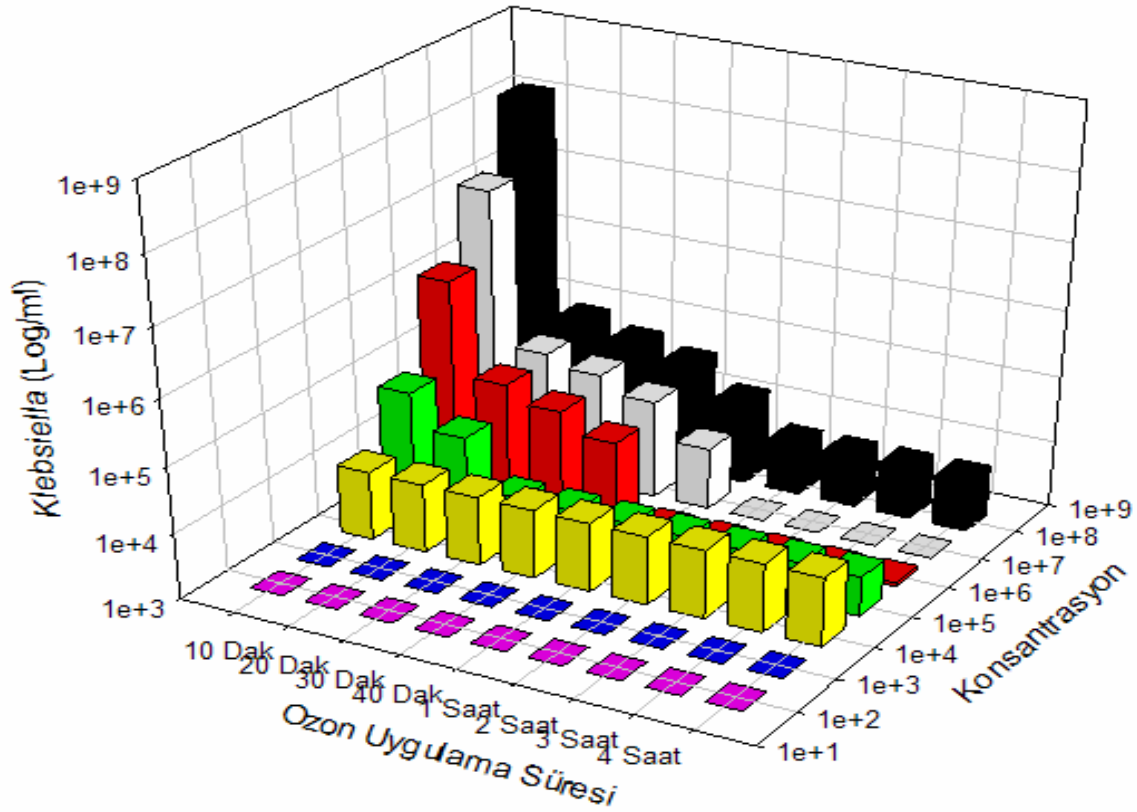
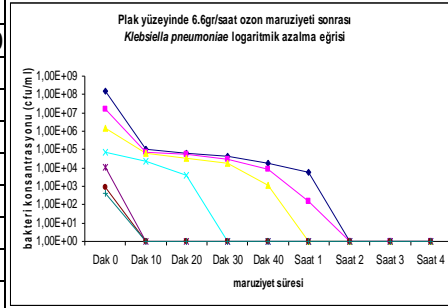
Zaman	Bakteri konsantrasyonu CFU/ml						
	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	13000	5000	150
Dk 0	10^5	85000	55000	25000	200	0	0
Dk 20	10^5	45000	15000	6500	0	0	0
Dk 30	7×10^4	17500	1100	0	0	0	0
Dk 40	6.5×10^3	2500	450	0	0	0	0
Saat 1	800	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.1. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *E. coli* 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 3. Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *K. pneumoniae* koloni sayısındaki değişim.

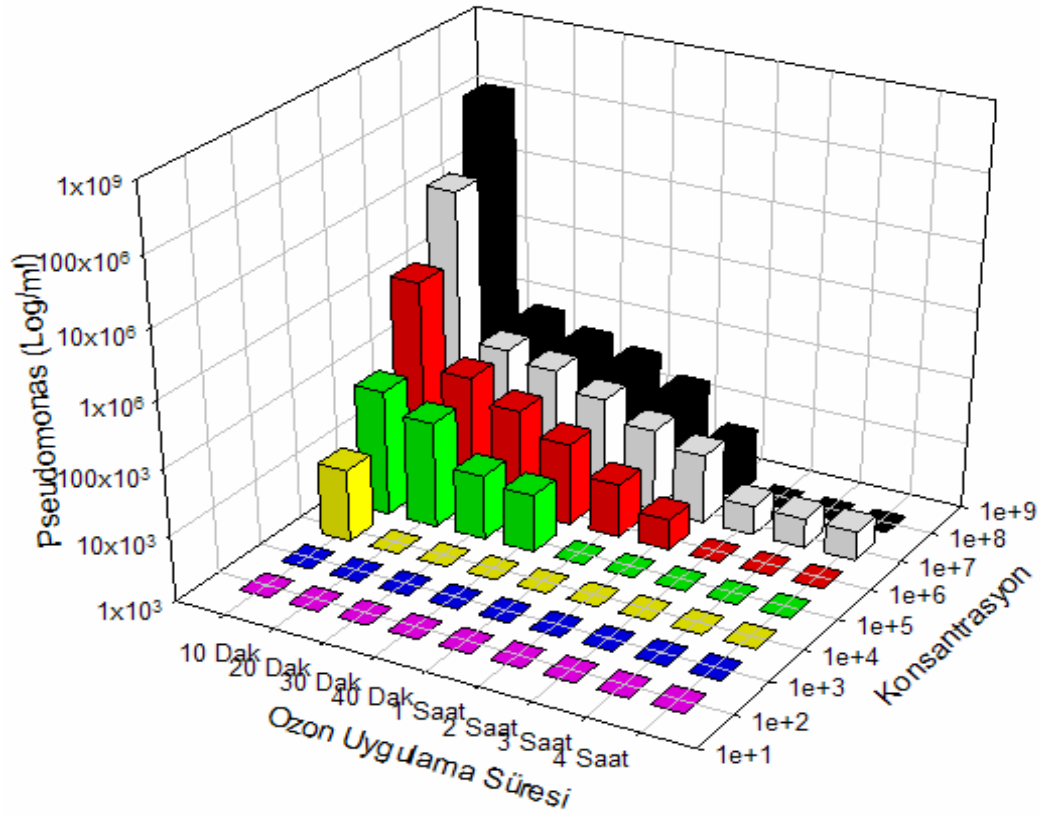
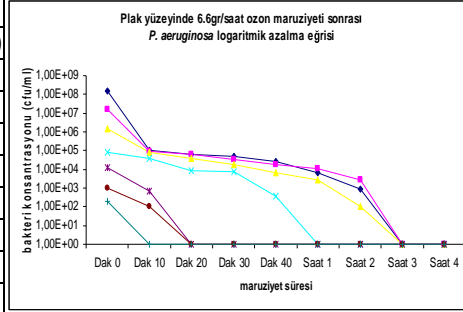
Zaman	Bakteri konsantrasyonu CFU/ml						
	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	72500	11000	900	400
Dk 0	1.5x10 ⁸	1.5x10 ⁷	1.5x10 ⁶	72500	11000	900	400
Dk 10	100000	75000	60000	22500	0	0	0
Dk 20	65000	52500	35000	4000	0	0	0
Dk 30	45000	30000	17500	0	0	0	0
Dk 40	17500	8500	1150	0	0	0	0
Saat 1	6000	150	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.2. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *K. pneumoniae* 'nın 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 4. Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *P. aeruginosa* koloni sayısındaki değişim.

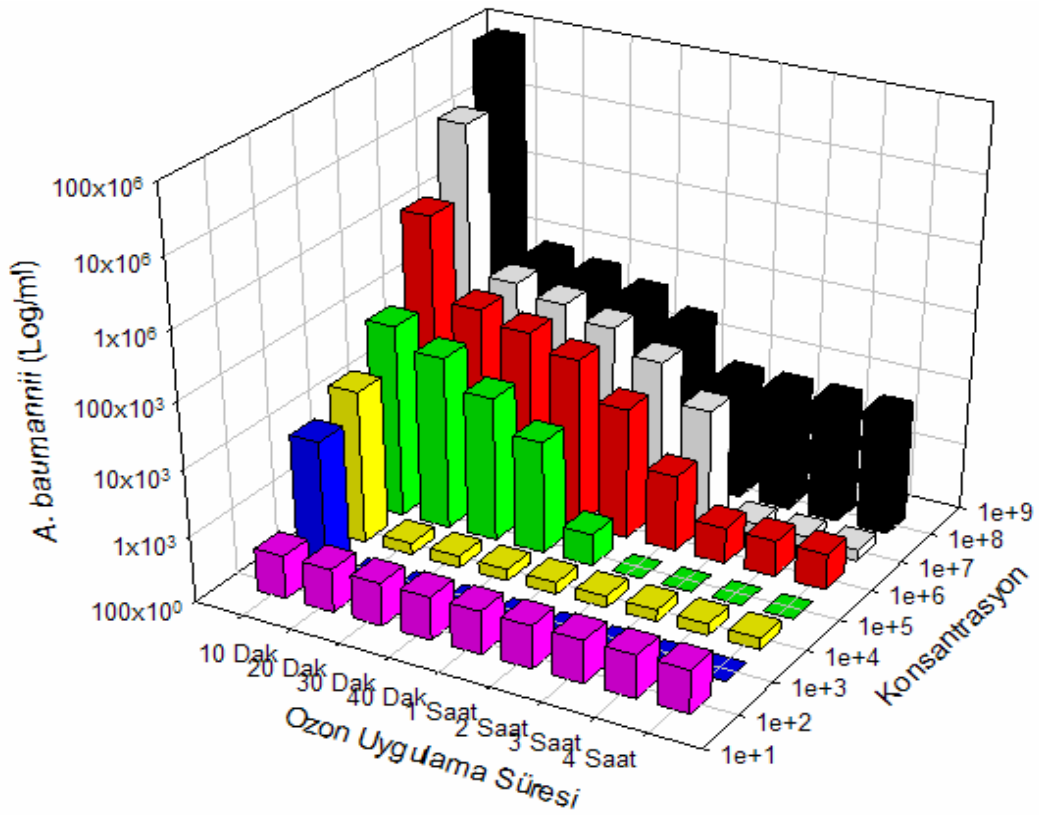
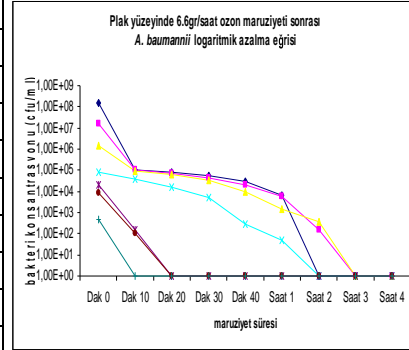
Zaman	Bakteri konsantrasyonu CFU/ml						
	1.5×10^9	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	12500	950	200
Dk 0	100000	90000	80000	40000	650	100	0
Dk 20	65000	65000	37500	8000	0	0	0
Dk 30	47500	35000	17500	7500	0	0	0
Dk 40	25000	17500	6500	350	0	0	0
Saat 1	6500	11000	2900	0	0	0	0
Saat 2	900	2750	100	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.3. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *P. aeruginosa* 'nın 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 5. Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *A. baumannii* koloni sayısındaki değişim.

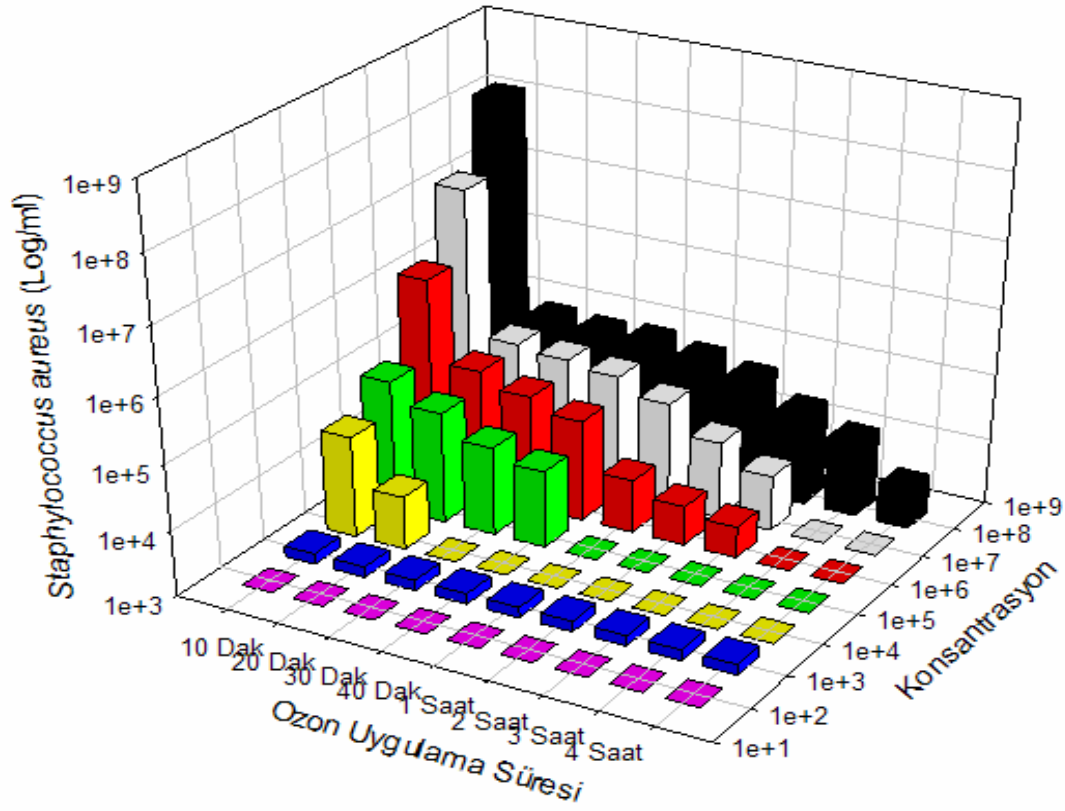
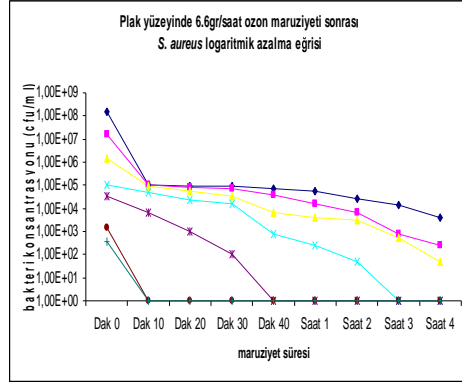
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	20000	9000	450
Dk 10	100000	100000	90000	40000	150	100	0
Dk 20	80000	70000	60000	15000	0	0	0
Dk 30	55000	45000	35000	5000	0	0	0
Dk 40	30000	20000	9500	300	0	0	0
Saat 1	6500	5500	1400	50	0	0	0
Saat 2	0	150	350	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.4. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *A. baumannii* 'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 6. Agar yüzeyine 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *S. aureus* koloni sayısındaki değişim.

Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	1.5×10^5	35000	1450	350
Dk 10	100000	100000	90000	50000	6500	0	0
Dk 20	90000	85000	55000	22500	1000	0	0
Dk 30	95000	70000	35000	15000	100	0	0
Dk 40	75000	40000	6500	750	0	0	0
Saat 1	55000	15000	4000	250	0	0	0
Saat 2	25000	7000	3000	50	0	0	0
Saat 3	14000	800	550	0	0	0	0
Saat 4	4000	250	50	0	0	0	0



Şekil 3.5. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *S. aureus*'un 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

4.1.2. Fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış bakteri süspansiyonlarına ozon gazı uygulanmasının sonuçları

Ozon gazının sudaki etkinliğini tespit etmek amacıyla, fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan bakteri süspansiyonları ozon gazına maruz bırakılmış ve maruziyet süreleri sonrasında besiyerlerine ekimleri yapılarak elde edilen koloni sayıları değerlendirilmiştir. Agar plak yüzeyine ekimin ardından ozon gazına maruziyet sürecinde ozon gazı hava yoluyla mikroorganizmalar üzerinde etkili olurken, bakteri süspansiyonları içerisinde uygulanan ozon gazı ise sıvı ortamda mikroorganizmalar üzerinde etkisini göstermektedir. Çalışılan tüm bakterilerde genel olarak özellikle de yüksek konsantrasyonlarda olmak üzere tam inhibisyonun, agar plak yüzeyinde ozon gazı uygulanan bakterilere kıyasla daha erken gerçekleştiği görülmüştür. Burada da tıpkı agar plaklara ekilmiş bakterilerin ozon maruziyeti denemelerinde olduğu gibi, ilk 10 dakikalık maruziyet süresi en hızlı inhibisyonun gözleendiği süreç olarak görülmektedir (Tablo 7, 8, 9, 10, 11).

E. coli nin agar plak yüzeyinde ve bakteri süspansiyonunda ozon gazına maruziyet denemeleri, sıvı ortamdaki ozon gazının bakteri sayısında daha hızlı bir düşüşe neden olduğunu göstermektedir. Sıvı ortamda ozon gazı uygulandığında 1.5×10^5 CFU/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda 20. dakikaya kadar ve 1.5×10^6 CFU/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda ise 1 saat içinde bakteriler tamamen inhibe olmuştur. Oysa agar plak yüzeyinde maruziyet çalışmalarında 1.5×10^6 CFU/ml ve daha yüksek konsantrasyonlar 2. saate kadar canlılığını sürdürmüştür (Şekil 3.1, 4.1).

K. pneumoniae ile yapılan denemelerde; sıvı ortamda ozon gazı uygulandığında 1.5×10^7 CFU/ml' ye kadar olan konsantrasyonların 40 dakika içinde tamamen inhibe olduğu görülmüştür. Agar plak yüzeyinde yapılan denemelerde ise, 1.5×10^6 CFU/ml ve 1.5×10^7 CFU/ml konsantrasyonlarının sırasıyla 1. ve 2. saatte tam olarak inhibe olduğu görülmüştür. Ancak 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyon için her iki ozon maruziyet denemesinde de 2. saatte tam inhibisyon gözlenebilmiştir (Şekil 3.2, 4.2).

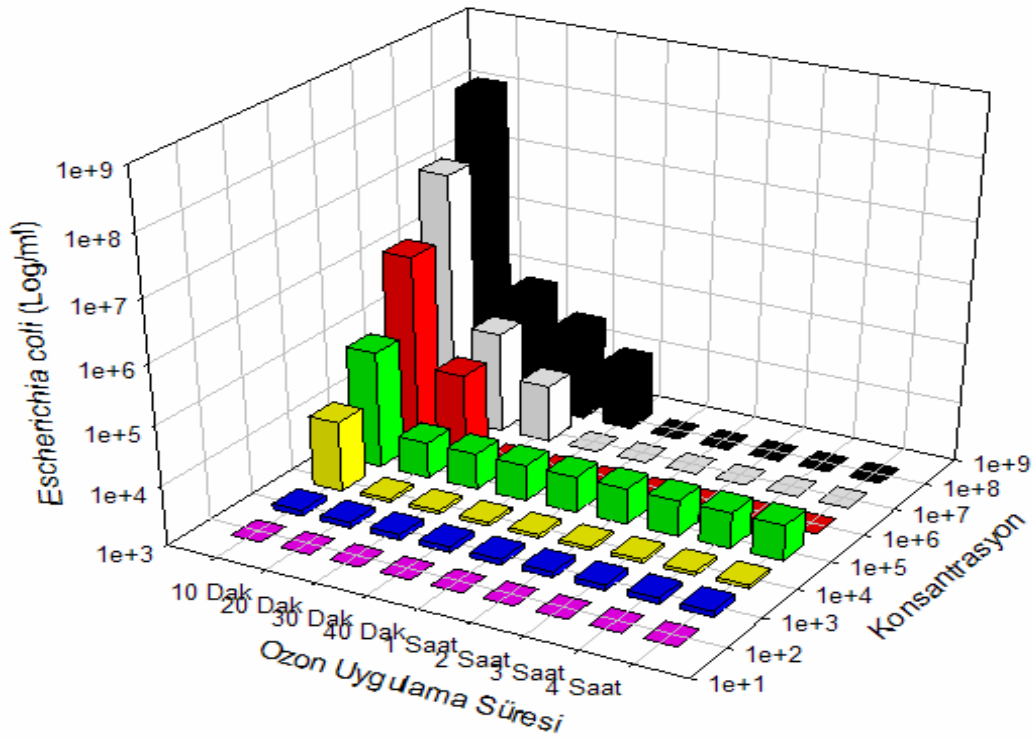
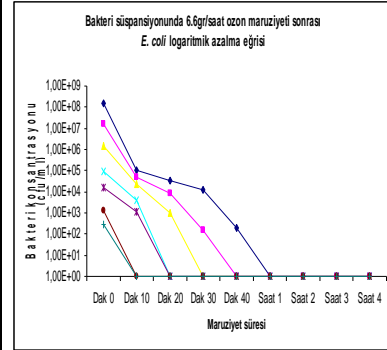
P. aeruginosa için de diğer bakterilerde olduğu gibi sıvı ortamda uygulanan ozon gazı, agar plak yüzeyine uygulanan ozon gazı denemeleriyle kıyaslandığında yine özellikle yüksek konsantrasyonlarda daha erken sürede tam bir inhibisyon sağlamıştır. Sıvı ortamda bakterilerin ozon gazına maruziyetiyle, 1.5×10^5 CFU/ml ve

daha üstü konsantrasyonlarında 40 dakika ile 2 saat arasında bakteriler tamamen inhibe olurken, agar plak yüzeyinde ozon uygulama çalışmalarında ancak 3. saatte bakterilerin tamamen inhibe olduğu görülmektedir. Daha düşük konsantrasyonlarda her iki yöntem ile kısa sürede tam bir inhibisyon sağlanmıştır (Şekil 3.3, 4.3). *A. baumannii* için de benzer bir durum söz konusudur. Sıvı ortamda uygulanan ozon gazı ile yaklaşık 1 saat daha erken tam inhibisyon sağlanabilmiştir (Şekil 3.4, 4.4).

S. aureus'un yine agar plak yüzeyi uygulamalarında olduğu gibi, Gram negatif bakterilere kıyasla ozon gazına daha dirençli olduğu görülmektedir. Ancak agar plak yüzeyi uygulamalarında özellikle 1.5×10^6 CFU/ml ve üzeri konsantrasyonlarda 4. saatte bile tam bir inhibisyon sağlanamazken, sıvı ortamda ozon uygulaması ile 1.5×10^7 CFU/ml ve 1.5×10^8 CFU/ml yoğunlukta sırasıyla 2. ve 3. saatlerde, daha düşük konsantrasyonlarda ise 1 saat içinde tam bir inhibisyon gözlenmiştir (Şekil 3.5, 4.5).

Tablo 7. Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *E. coli* koloni sayısındaki değişim.

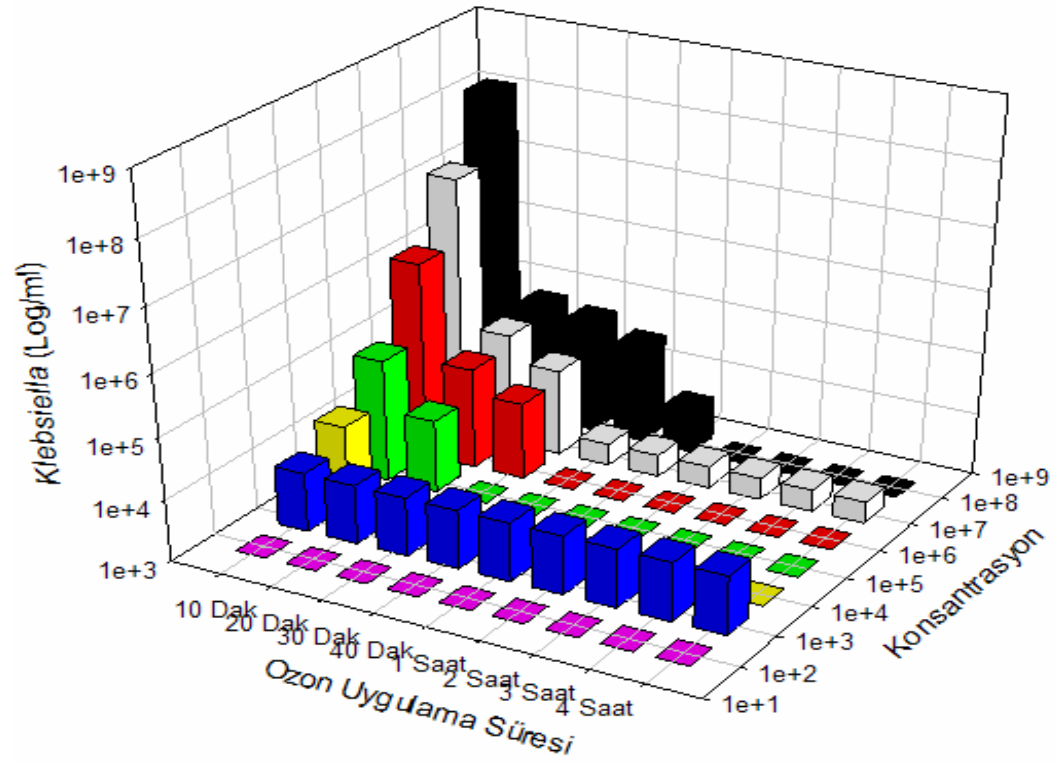
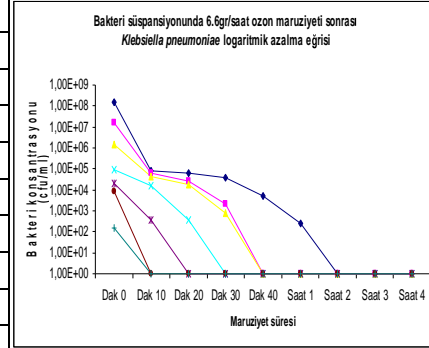
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	90000	15000	1250	300
Dk 10	100000	47500	22500	4000	1150	0	0
Dk 20	35000	9000	950	0	0	0	0
Dk 30	12500	150	0	0	0	0	0
Dk 40	200	0	0	0	0	0	0
Saat 1	0	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0 </td <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td>	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.1. Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan *E. coli*'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 8. Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *K. pneumoniae* koloni sayısındaki değişim.

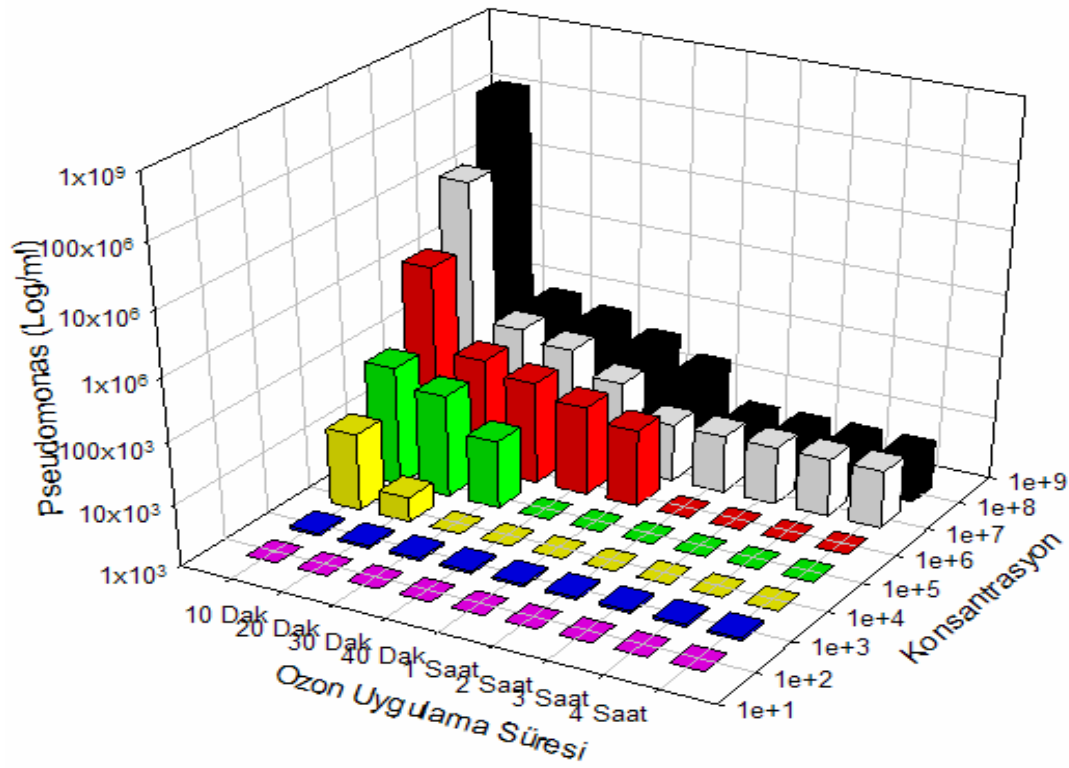
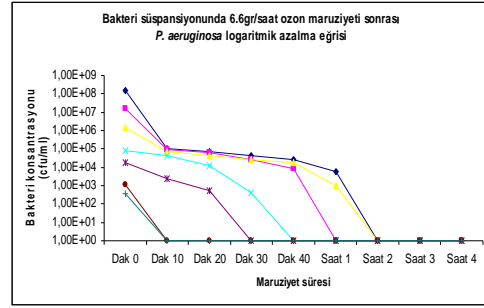
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	95000	20000	9000	150
Dk 10	80000	65000	42500	15000	350	0	0
Dk 20	65000	25000	17500	350	0	0	0
Dk 30	37500	2250	750	0	0	0	0
Dk 40	5000	0	0	0	0	0	0
Saat 1	250	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.2. Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan *K. pneumoniae*'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 9. Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *P. aeruginosa* koloni sayısındaki değişim.

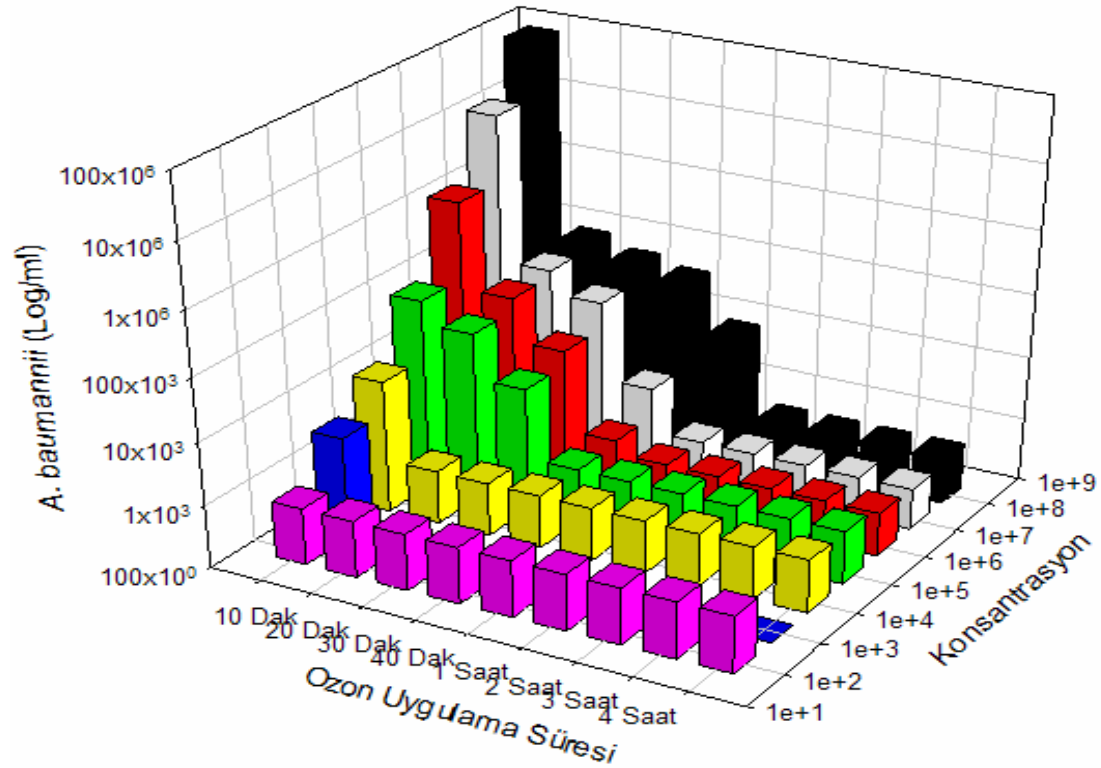
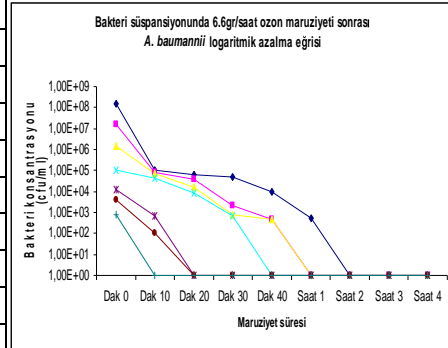
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	85000	17500	1100	350
Dk 10	100000	95000	70000	45000	2500	0	0
Dk 20	75000	65000	45000	12500	550	0	0
Dk 30	45000	27500	27500	400	0	0	0
Dk 40	25000	8500	17500	0	0	0	0
Saat 1	6000	0	950	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.3. Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan *P. aeruginosa*'nın 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 10. Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *A. baumannii* koloni sayısındaki değişim.

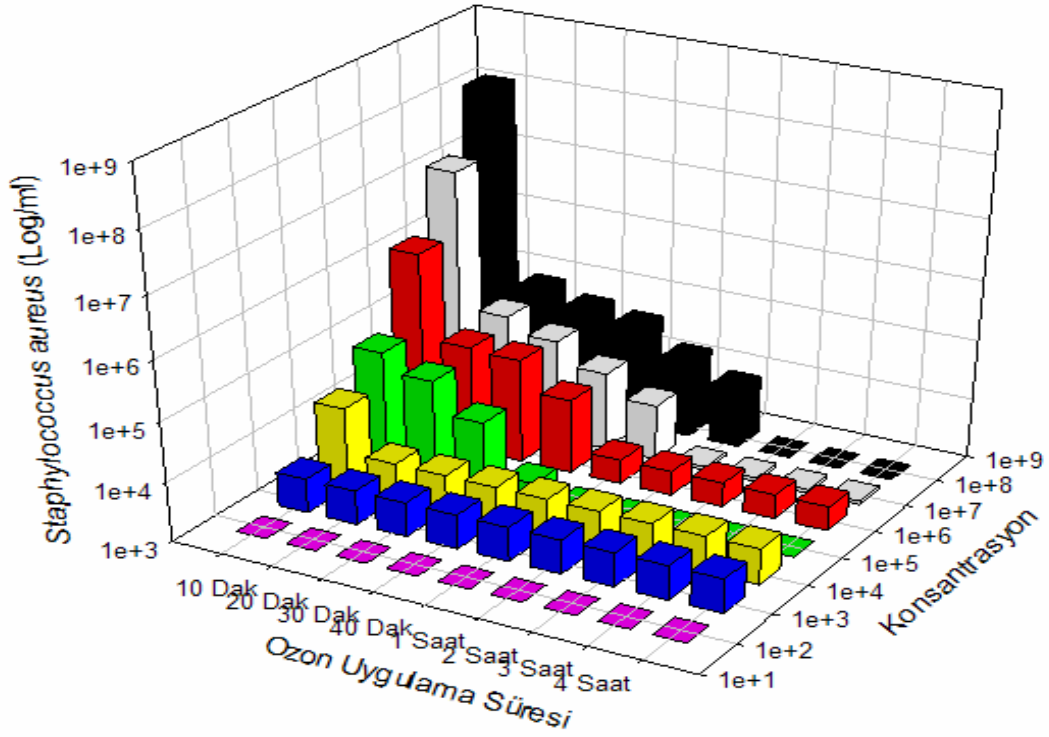
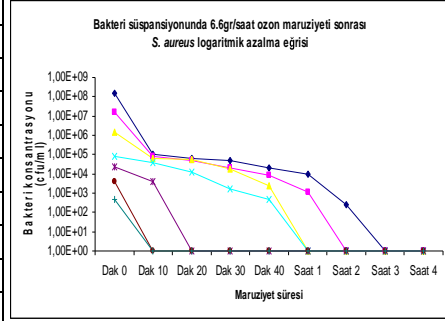
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	1.5×10^5	12500	4000	800
Dk 10	100000	85000	70000	45000	700	100	0
Dk 20	65000	37500	15000	9000	0	0	0
Dk 30	47500	2250	800	700	0	0	0
Dk 40	9500	450	500	0	0	0	0
Saat 1	550	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.4. Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan *A. baumannii*'nin 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 11. Bakteri süspansiyonuna 6.6 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *S. aureus* koloni sayısındaki değişim.

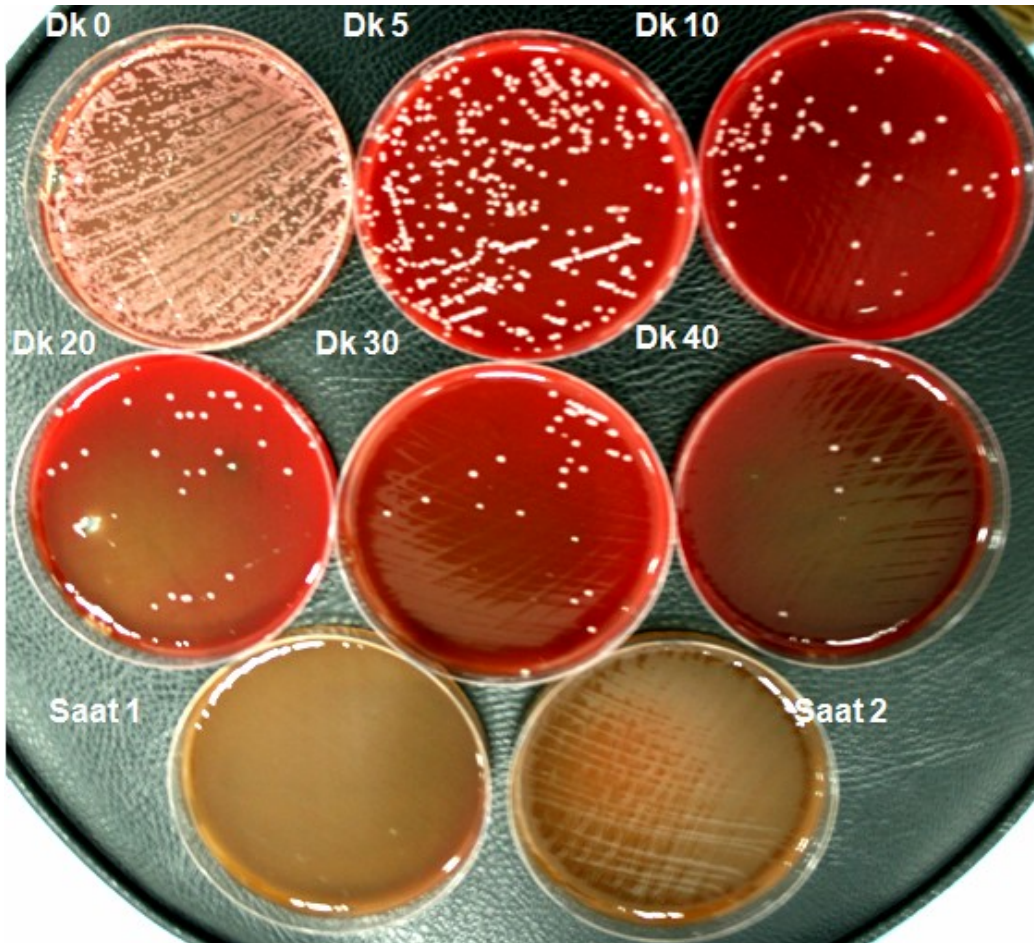
Zaman	Bakteri Konsntrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	22500	3750	500
Dk 10	100000	85000	60000	40000	4000	0	0
Dk 20	65000	47500	55000	12000	0	0	0
Dk 30	50000	20000	17500	1700	0	0	0
Dk 40	20000	8500	2550	450	0	0	0
Saat 1	10000	1150	0	0	0	0	0
Saat 2	250	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 4.5. Fosfat tamponu içerisinde farklı konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları hazırlanan *S. aureus*'un 6.6 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

4.1.3. Agar plaklara ekimi yapılan bakterilere 10.5 mg/saat ozon gazı uygulamasının sonuçları

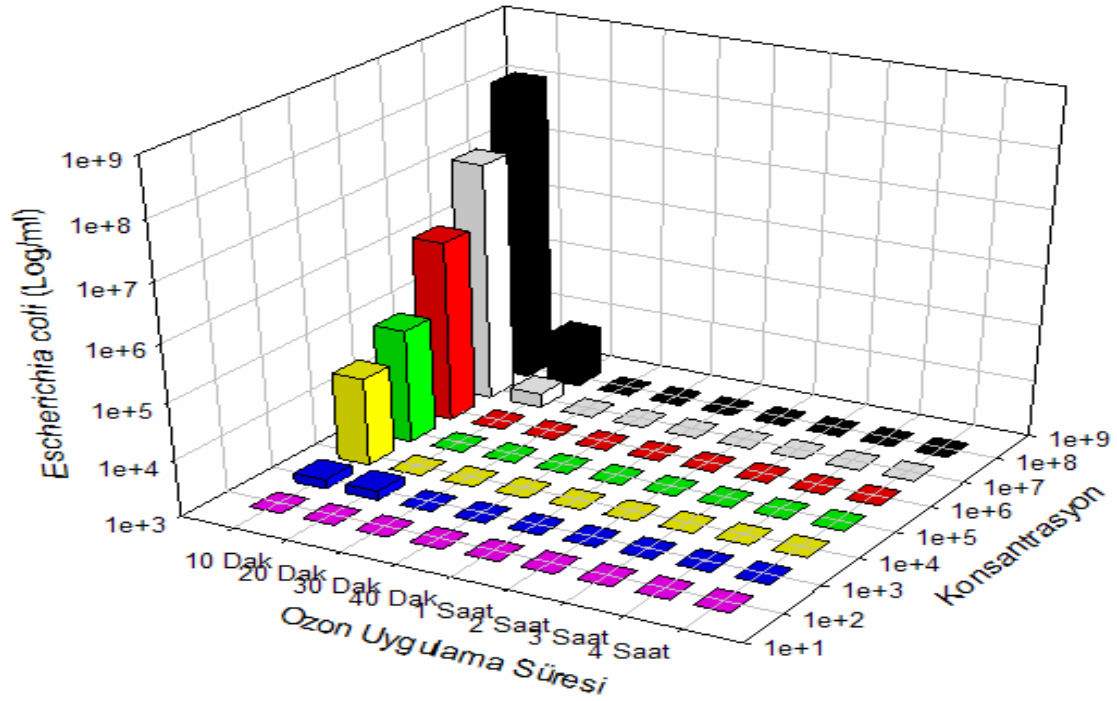
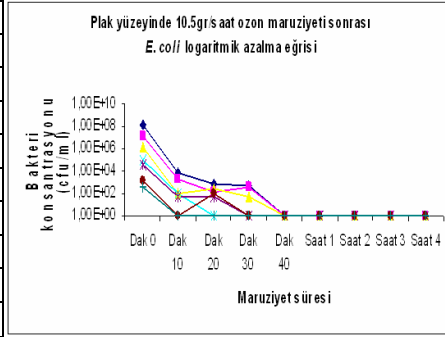
Ozon gazının konsantrasyonu denemeleri ancak *E. coli* ve *S. aureus* için yapılabilmiş ve azalma oranları değerlendirilmiştir. 6.6 mg/saat yoğunlukta ozon gazına göre her iki bakteri sayısında da çok daha hızlı bir azalma gözlenmiştir (Tablo 12, 13). *E. coli* 'de yine yaklaşık 2 logaritmik bir düşüş ile ilk 10 dakika içerisinde en hızlı azalma oranı görülmekte ve ozon konsantrasyonundaki artışa paralel olarak 40 dakika sonra bakteri sayısı tamamen sıfırlanmaktadır (Şekil 5). *S. aureus* 'da yine benzer şekilde daha hızlı bir azalma göstermekte ve 3. saatte bakteri sayısı sıfırlanmaktadır. Ancak diğer ozon uygulamalarında olduğu gibi *S. aureus* ozon gazına daha az duyarlı olarak görülmektedir (Şekil 6.1, 6.2).



Şekil 5. Agar plak yüzeyine ekimi yapılan *E. coli*'nin 10.5 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile farklı sürelerdeki bakteri sayısı.

Tablo 12. Agar yüzeyine 10.5 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *E. coli* koloni sayısındaki değişim.

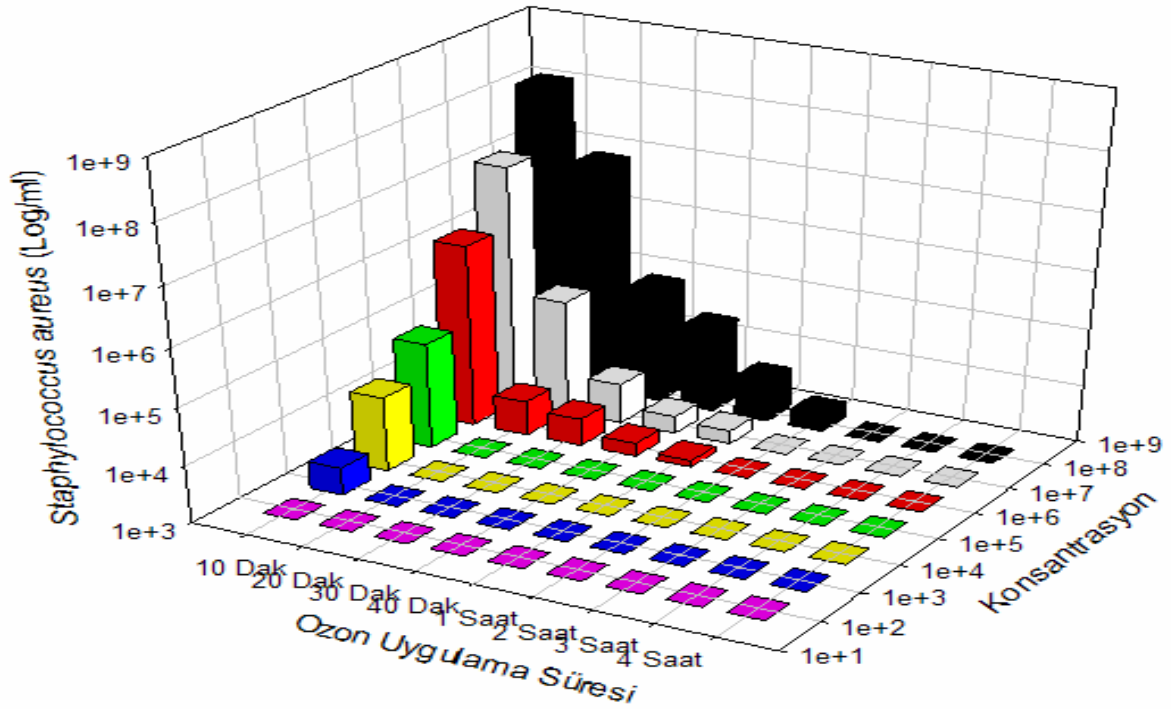
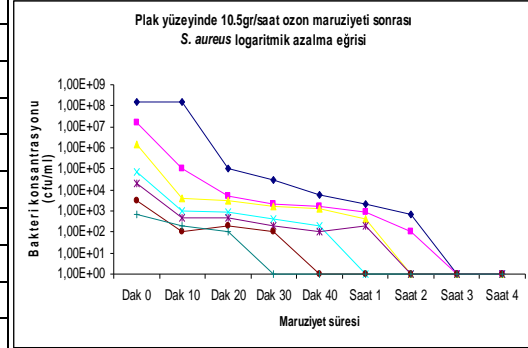
Zaman	Bakteri Konsntrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	35000	1450	350
Dk 10	7500	1750	100	100	50	0	0
Dk 20	800	150	300	0	50	100	0
Dk 30	550	350	50	0	0	0	0
Dk 40	0	0	0	0	0	0	0
Saat 1	0	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 6.1. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *E. coli* 'nin 10.5 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 13. Agar yüzeyine 10.5 mg/saat ozon gazı uygulaması ile *S. aureus* koloni sayısındaki değişim.

Zaman	Bakteri Konsntrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	70000	20000	3000	700
Dk 10	1.5×10^8	10^5	4000	1000	500	100	200
Dk 20	10^4	5000	3000	900	500	200	100
Dk 30	30000	2000	1700	400	200	100	0
Dk 40	5500	1700	1300	200	100	0	0
Saat 1	2000	900	400	0	200	0	0
Saat 2	700	100	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



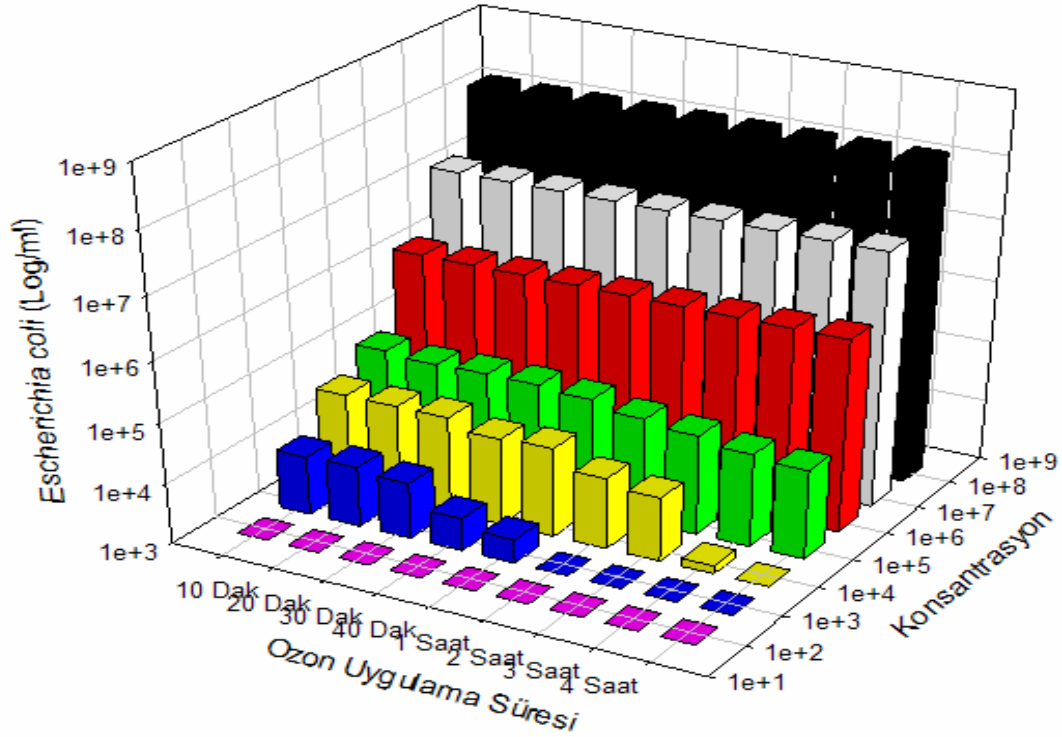
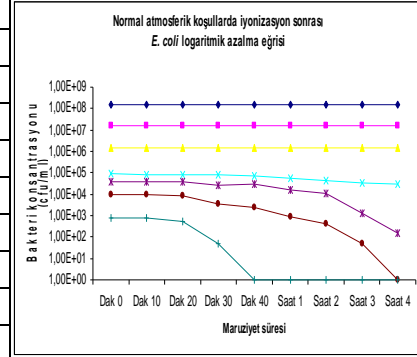
Şekil 6.2. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *S. aureus* 'un 10.5 mg/saat ozon gazı maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

4.2. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilere negatif iyon uygulamasının sonuçları

Bakterilerin negatif iyon duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla; agar plak yüzeylerine farklı konsantrasyonlarda mikroorganizmaların ekimleri yapılmış ve belirli maruziyet sürelerinde negatif iyonizer kullanılarak negatif iyon maruz bırakılmıştır. Negatif iyonlar hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde benzer etki göstermiştir (Tablo 14, 15, 16, 17, 18). Tüm bakterilerde 1.5×10^4 CFU/ml ve daha düşük konsantrasyonlarda uzun sürede inhibisyon sağlanabilirken, 1.5×10^4 CFU/ml'nin üzerindeki konsantrasyonlarda ise 4 saatin sonunda dahi anlamlı azalma sağlamamıştır (Şekil 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5).

Tablo 14. Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile *E. coli* koloni sayısındaki değişim.

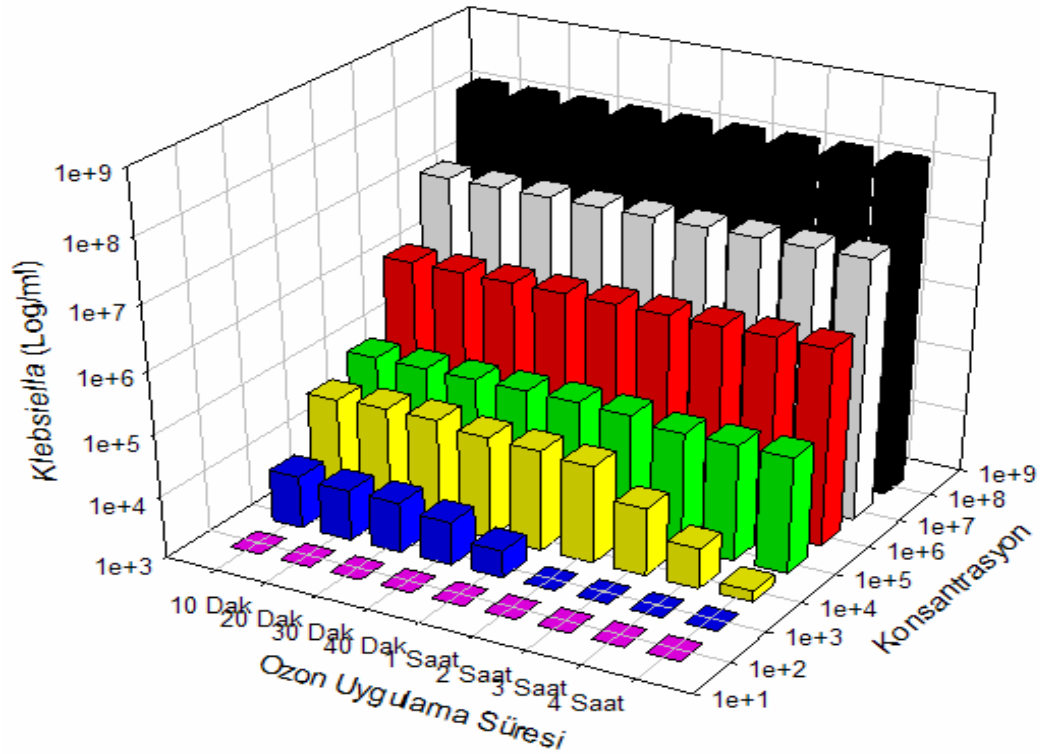
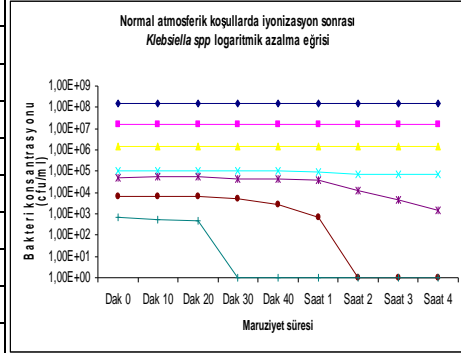
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	90000	40000	9500	750
Dk 10	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	40000	10000	750
Dk 20	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	85000	40000	8500	550
Dk 30	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	85000	27500	3500	50
Dk 40	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	75000	30000	2500	0
Saat 1	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	55000	15000	900	0
Saat 2	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	45000	11500	400	0
Saat 3	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	35000	1350	50	0
Saat 4	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	30000	150	0	0



Şekil 7.1. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *E. coli*'nin negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 15. Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile *K. pneumoniae* koloni sayısındaki değişim.

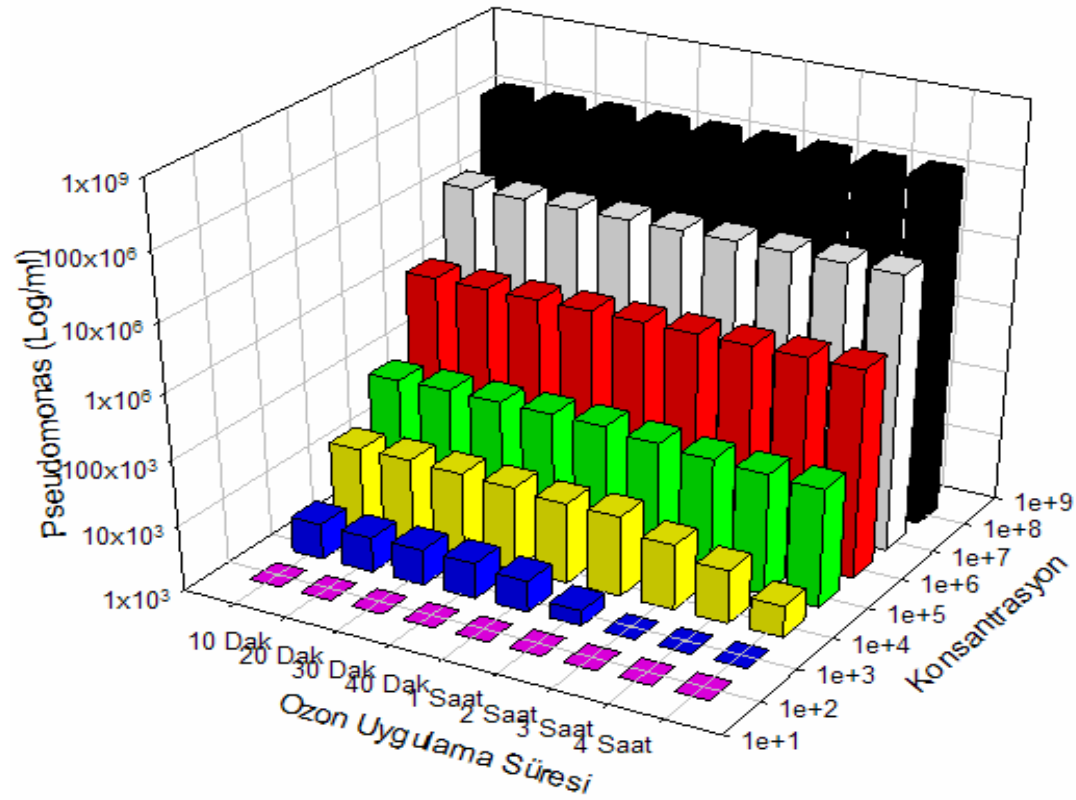
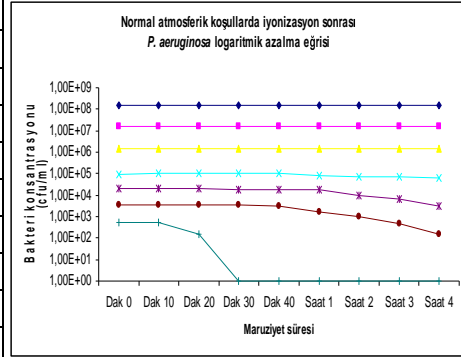
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	50000	7000	700
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	50000	7000	700
Dk 10	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	55000	6500	550
Dk 20	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	55000	6500	450
Dk 30	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	45000	5000	0
Dk 40	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	42500	2750	0
Saat 1	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	95000	37500	650
Saat 2	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	75000	12500	0
Saat 3	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	75000	4500	0
Saat 4	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	75000	1500	0



Şekil 7.2. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *K. pneumoniae*'nin negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 16. Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile *P. aeruginosa* koloni sayısındaki değişim.

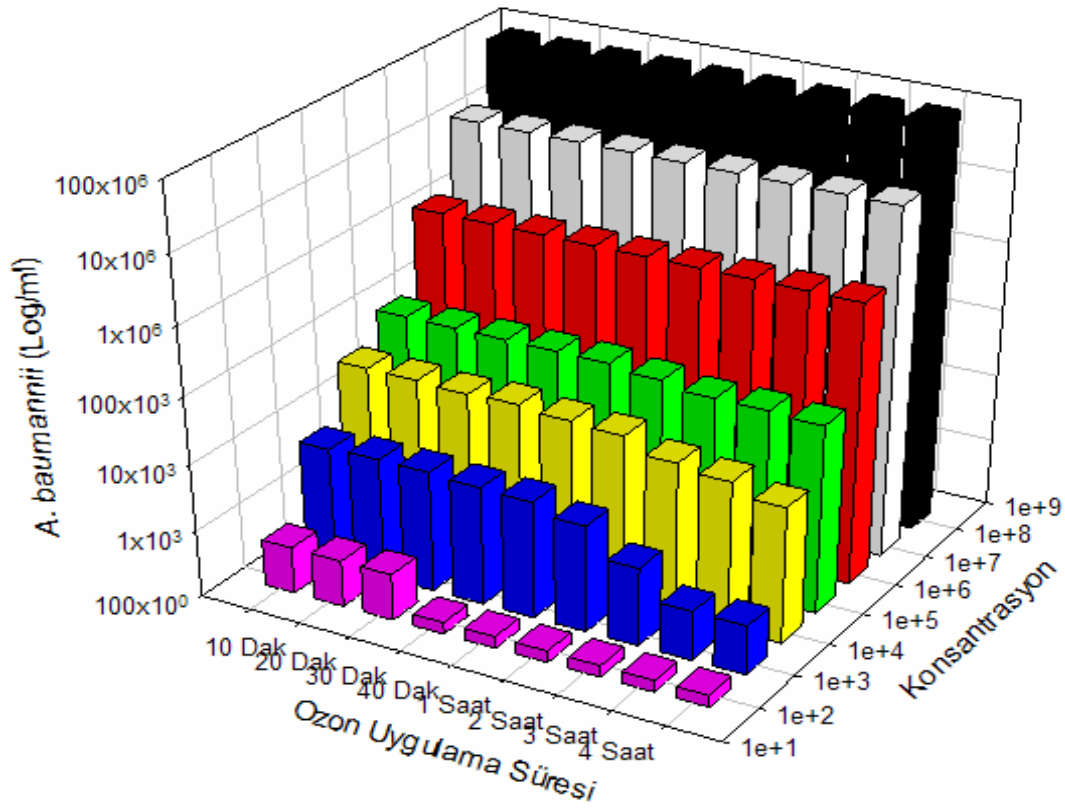
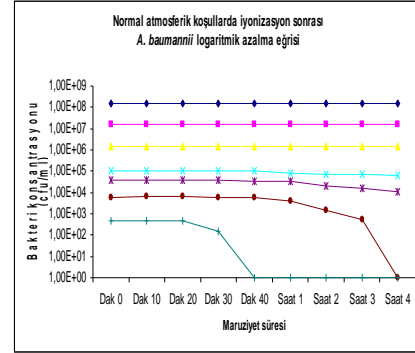
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	20000	3500	550
Dk 10	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	21000	3400	550
Dk 20	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	20000	3500	150
Dk 30	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	19000	3500	0
Dk 40	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	17000	3000	0
Saat 1	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	85000	17000	1700
Saat 2	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	75000	10000	1000
Saat 3	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	70000	6500	450
Saat 4	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	65000	3000	150



Şekil 7.3. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *P. aeruginosa*'nın negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 17. Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile *A. baumannii* koloni sayısındaki değişim.

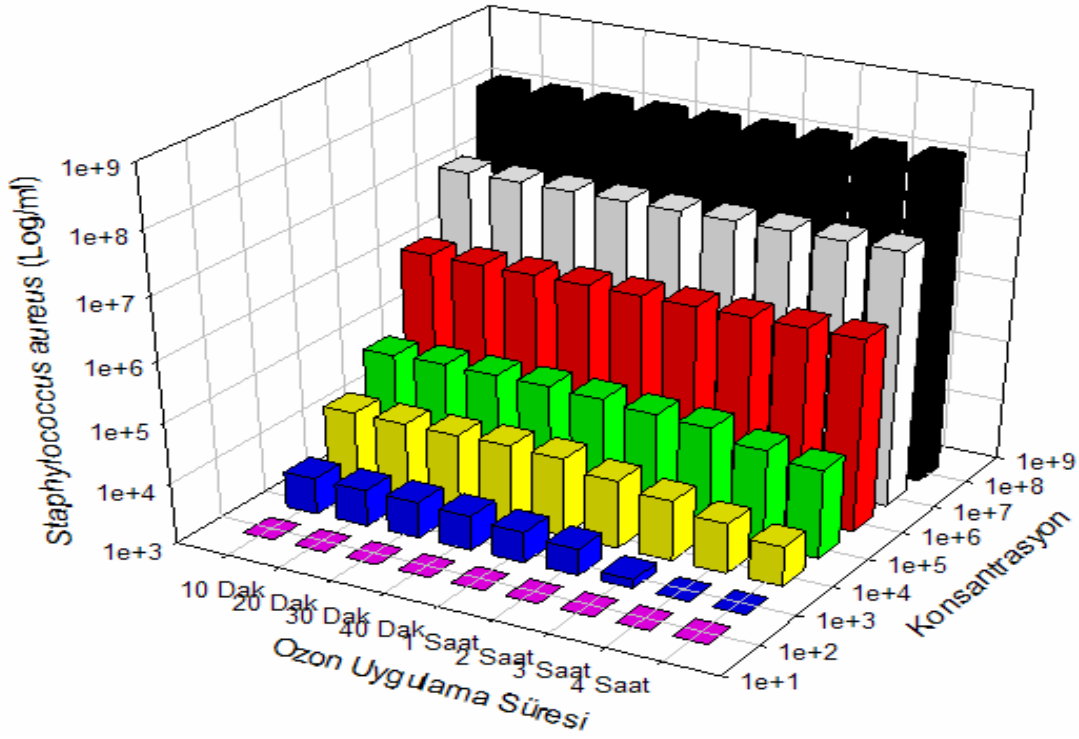
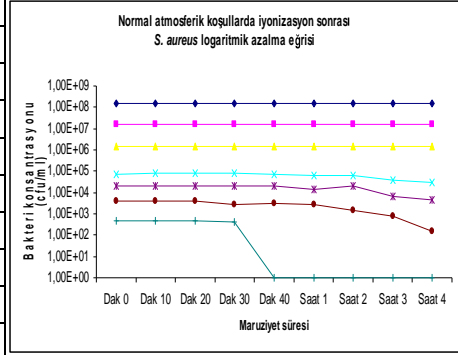
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	40000	6000	500
Dk 10	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	40000	6500	500
Dk 20	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	37500	6500	500
Dk 30	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	40000	6000	150
Dk 40	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	35000	5750	0
Saat 1	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	85000	32500	4000
Saat 2	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	70000	20000	1500
Saat 3	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	70000	16500	550
Saat 4	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	65000	11000	0



Şekil 7.4. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *A. baumannii*'nin negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 18. Agar yüzeyine negatif iyon uygulaması ile *S. aureus* koloni sayısındaki değişim.

Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	75000	20000	4000	500
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	75000	20000	4000	500
Dk 10	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	20000	4000	500
Dk 20	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	20000	4000	450
Dk 30	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	21000	2750	400
Dk 40	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	75000	20000	3250	0
Saat 1	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	65000	13500	2750	0
Saat 2	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	60000	20000	1400	0
Saat 3	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	40000	6750	800	0
Saat 4	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	30000	4500	150	0



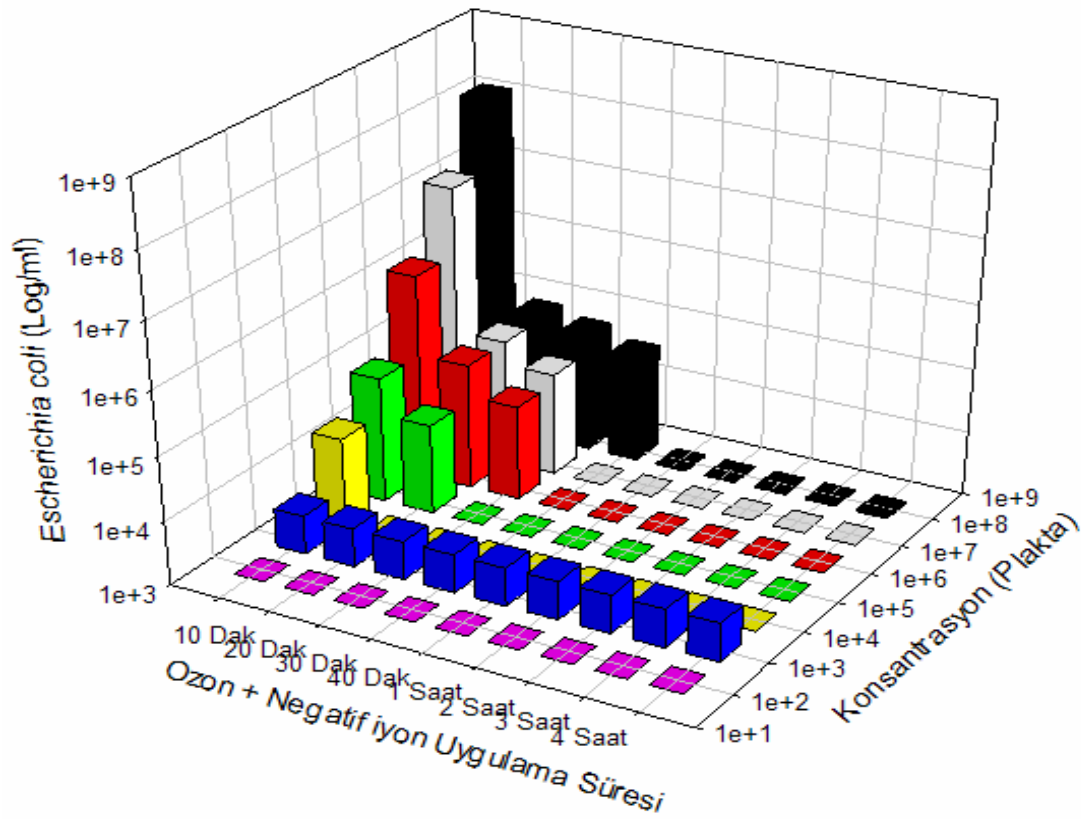
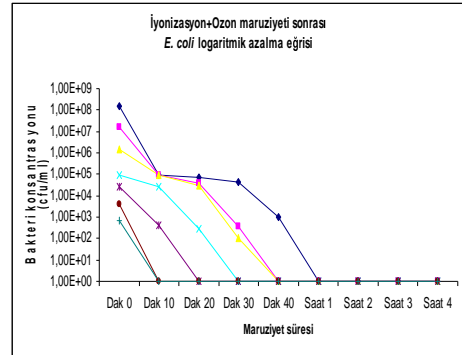
Şekil 7.5. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *S. aureus*'un negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

4.3. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilere eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulamasının sonuçları

Agar plak yüzeyine ekimi yapılan bakteriler ozon gazı ve negatif iyonla aynı anda maruz bırakılmış ve bakteriyel canlılıktaki azalma incelenmiştir. Gram negatif bakterilerin özellikle yüksek konsantrasyonlarında, tek başına ozon maruziyeti denemelerine kıyasla nispeten inhibisyon sürelerinde kısalma gözlenmiştir (Tablo 19, 20, 21, 22, 23). Fakat hücresel canlılıktaki bu azalma *S. aureus*' ta daha belirgin görülmektedir. Gram negatif bakteriler içerisinde ise *E. coli* ve *A. baumannii*' de 1.5×10^6 CFU/ml ve daha yüksek konsantrasyonlarda tam bir inhibisyonun, tek başına ozon maruziyeti denemelerine göre daha kısa sürede sağlanabildiği görülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir ($p > 0.05$). Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus*' ta ise yine yüksek konsantrasyonlar için anlamlı farklılık gözlenmiştir. Bakteriyel canlılığın 1.5×10^4 CFU/ml konsantrasyonda tek başına ozon maruziyetine kıyasla yaklaşık 20 dakika, 1.5×10^5 CFU/ml yoğunlukta ise yaklaşık 2 saat daha erken inhibe olduğu görülmüştür. Ayrıca *S. aureus*' un tek başına ozon maruziyeti karşısında 1.5×10^6 CFU/ml ve daha yüksek konsantrasyonları 4 saatin sonunda dahi tamamen inhibe olmazken, negatif iyon ile ozon gazı birlikte uygulandığında 1.5×10^8 CFU/ml'ye kadar olan konsantrasyonlarında 4. saatte tam bir inhibisyon sağlandığı görülmektedir (Şekil 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5).

Tablo 19. Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile *E. coli* koloni sayısındaki değişim.

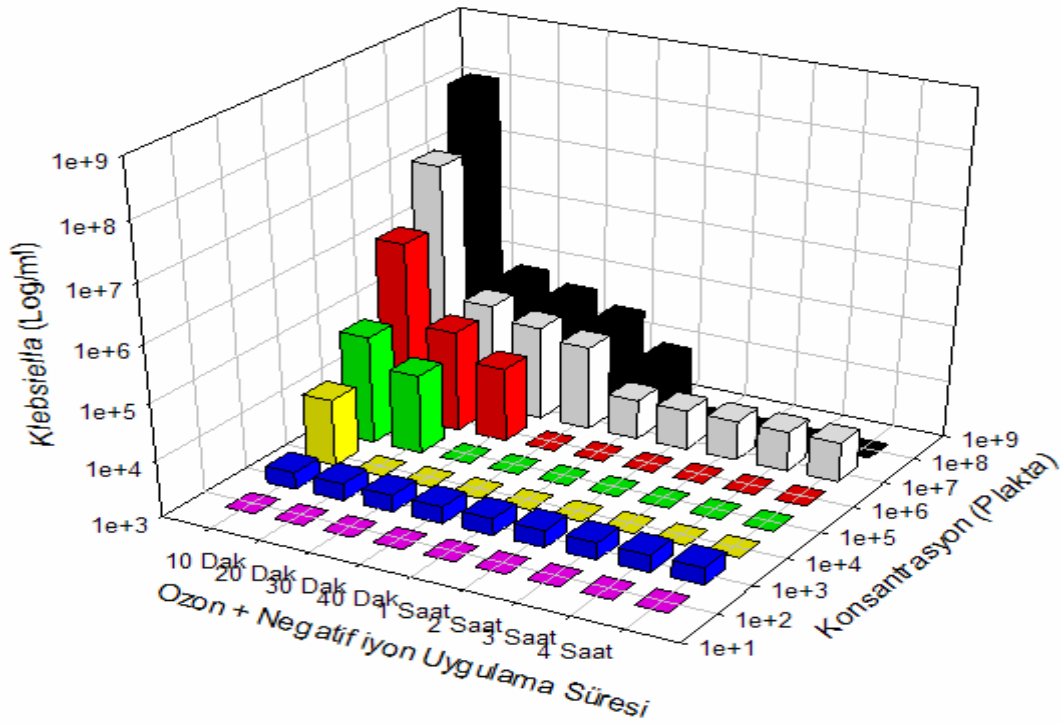
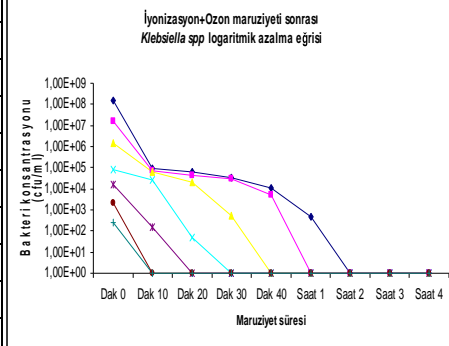
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	90000	25000	4000	700
Dk 10	95000	90000	90000	25000	400	0	0
Dk 20	70000	40000	30000	300	0	0	0
Dk 30	45000	350	100	0	0	0	0
Dk 40	1050	0	0	0	0	0	0
Saat 1	0	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 8.1. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *E. coli*'nin eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 20. Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile *K. pneumoniae* koloni sayısındaki değişim.

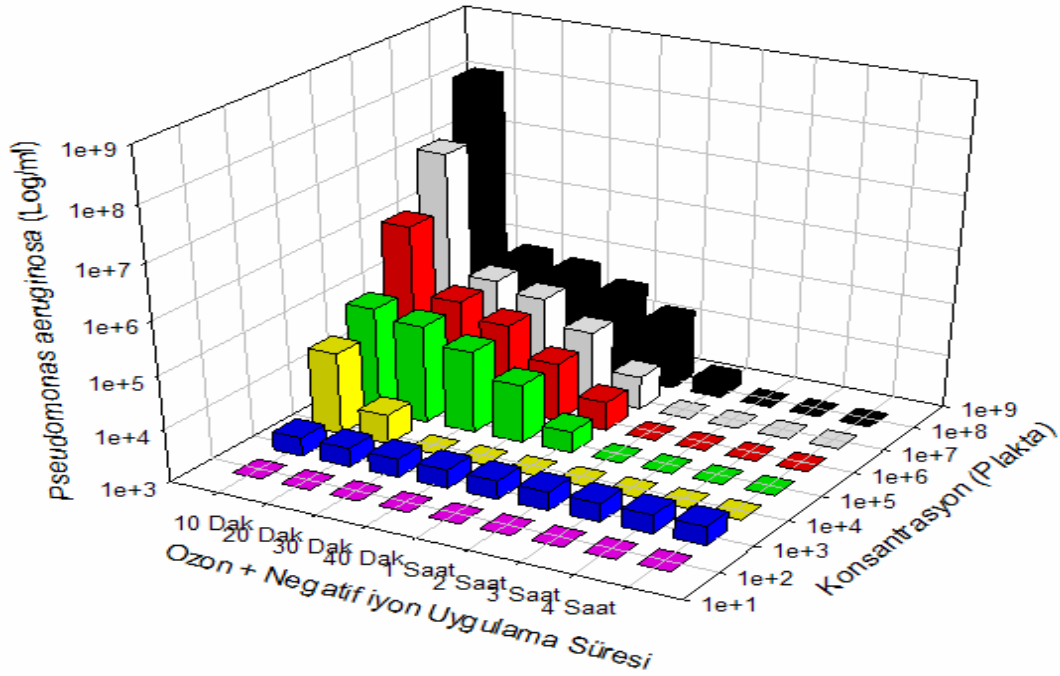
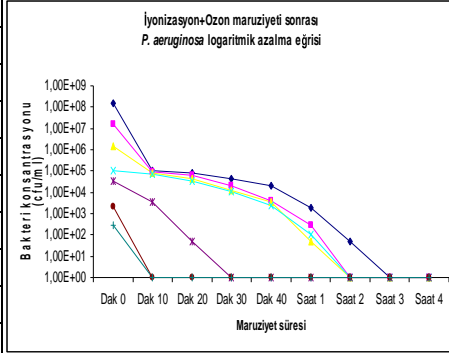
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	80000	15000	2000	250
Dk 10	90000	75000	60000	25000	150	0	0
Dk 20	60000	45000	20000	50	0	0	0
Dk 30	35000	30000	550	0	0	0	0
Dk 40	10750	5000	0	0	0	0	0
Saat 1	500	0	0	0	0	0	0
Saat 2	0	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 8.2. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *K. pneumoniae*'nin eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 21. Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile *P. aeruginosa* koloni sayısındaki değişim.

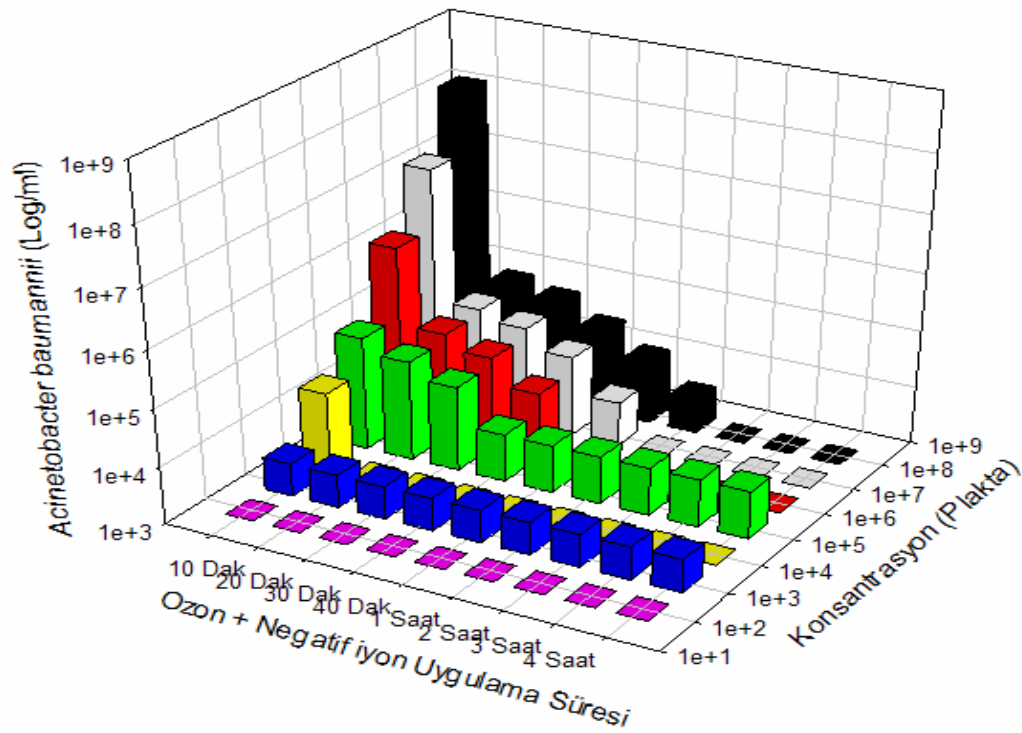
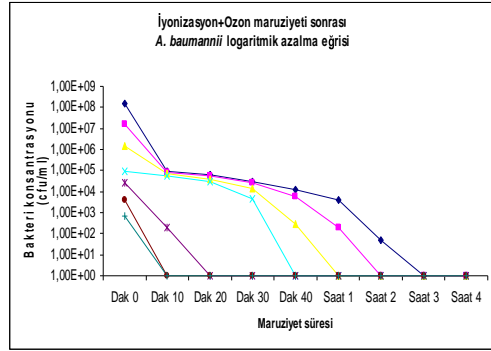
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	10^5	35000	2250	300
Dk 10	10^5	90000	85000	70000	3600	0	0
Dk 20	80000	60000	45000	35000	50	0	0
Dk 30	45000	20000	12500	11500	0	0	0
Dk 40	20000	4150	3500	2500	0	0	0
Saat 1	1950	300	50	100	0	0	0
Saat 2	50	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 8.3. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *P. aeruginosa*'nın eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 22. Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile *A. baumannii* koloni sayısındaki değişim.

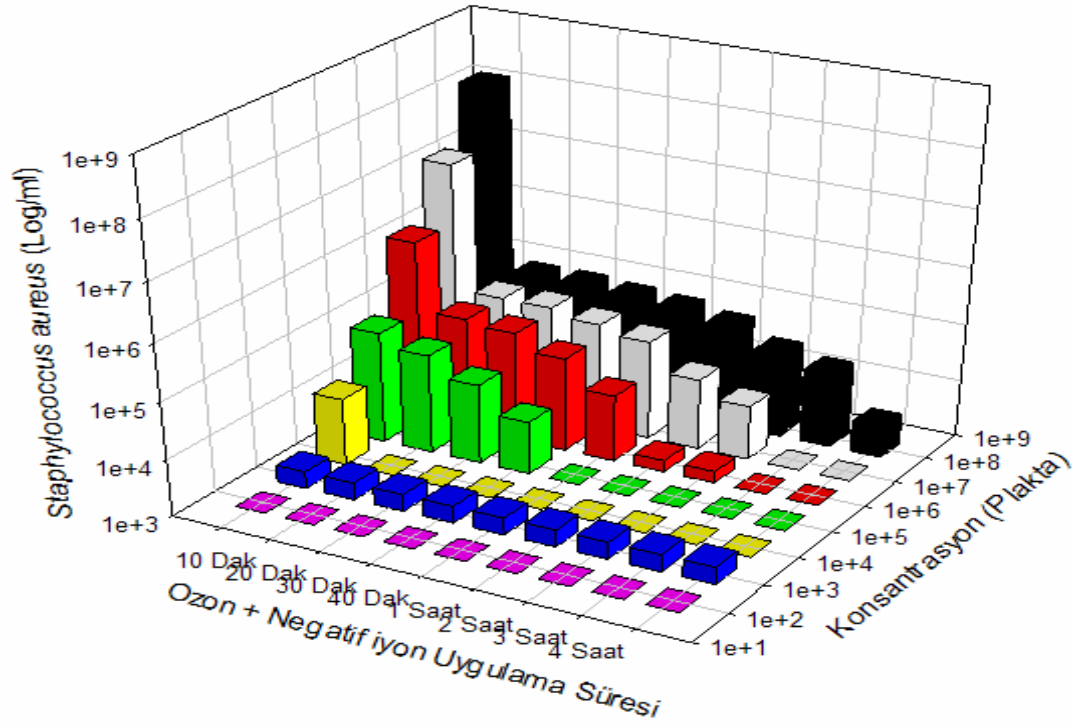
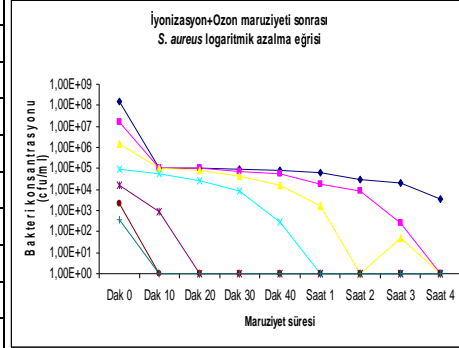
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	95000	25000	3750	700
Dk 10	90000	80000	70000	55000	200	0	0
Dk 20	65000	55000	40000	30000	0	0	0
Dk 30	30000	25000	14000	4500	0	0	0
Dk 40	12500	5750	300	0	0	0	0
Saat 1	4000	200	0	0	0	0	0
Saat 2	50	0	0	0	0	0	0
Saat 3	0	0	0	0	0	0	0
Saat 4	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 8.4. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *A. baumannii*'nin eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyonuna maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

Tablo 23. Agar yüzeyine eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon uygulaması ile *S. aureus* koloni sayısındaki değişim.

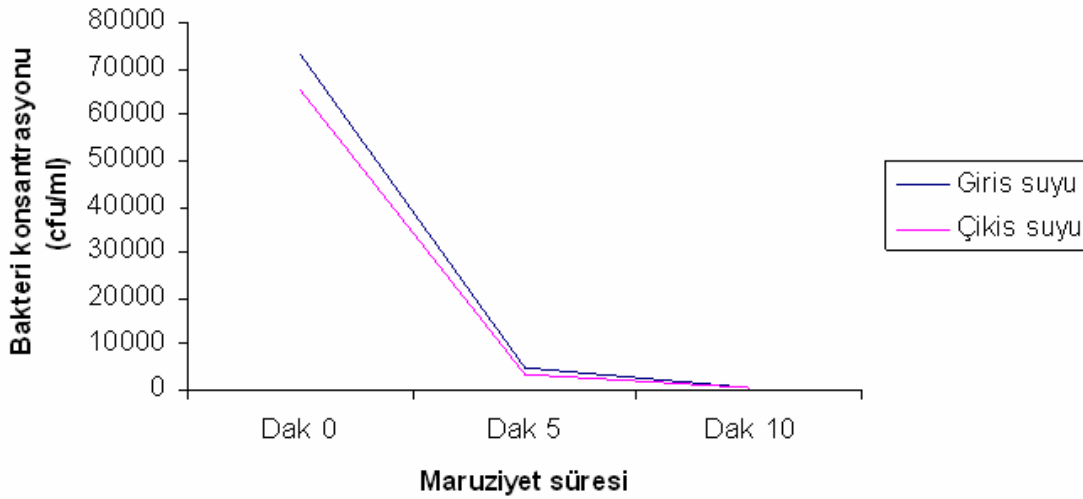
Zaman	Bakteri Konsantrasyonu CFU/ml						
Dk 0	1.5×10^8	1.5×10^7	1.5×10^6	90000	15000	2000	350
Dk 10	10^5	10^5	10^5	55000	900	0	0
Dk 20	10^5	10^5	85000	25000	0	0	0
Dk 30	90000	75000	45000	8500	0	0	0
Dk 40	80000	55000	15000	300	0	0	0
Saat 1	60000	17500	1600	0	0	0	0
Saat 2	30000	9000	0	0	0	0	0
Saat 3	20000	250	50	0	0	0	0
Saat 4	3500	0	0	0	0	0	0



Şekil 8.5. Agar plak yüzeyine farklı konsantrasyonlarda ekimi yapılan *S. aureus*'un eş zamanlı olarak ozon gazı ve negatif iyon maruziyeti ile bakteri sayısındaki değişim.

4.4. Hastane atık suyuna ozon gazı uygulanmasının sonuçları

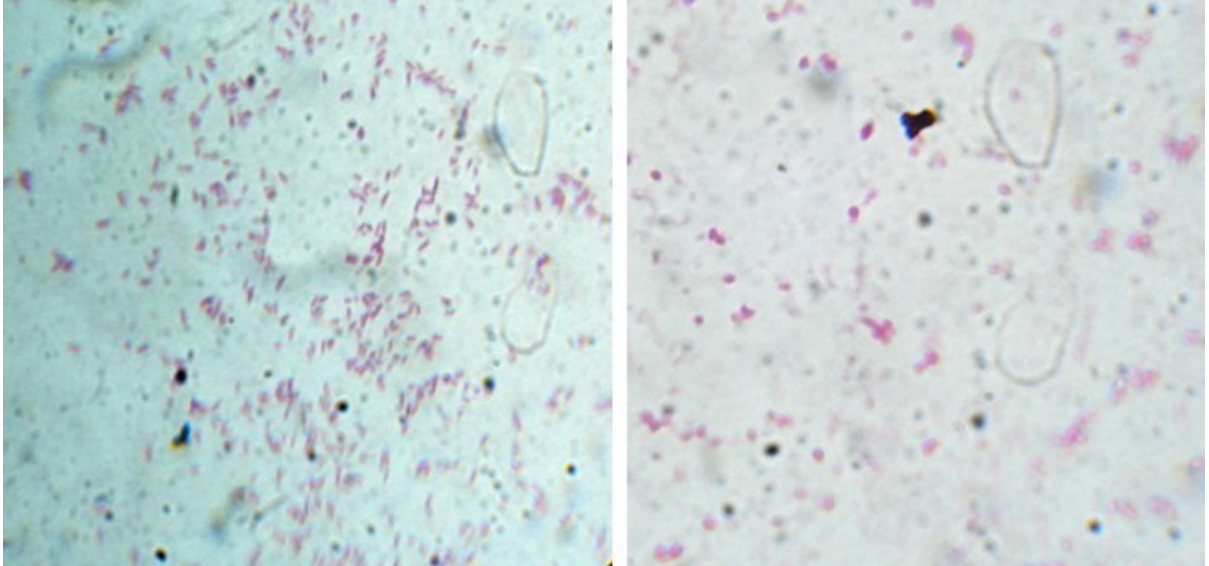
Hastanemiz atık su arıtım sistemi giriş ve çıkış noktalarından alınan su numuneleri 5 ve 10 dakika süreyle 10.5 mg/saat konsantrasyonlu ozon gazı ile muamele edilmiş ve ozon uygulaması öncesi ve sonrasında agar plaklara ekimleri yapılarak, ozon gazının etkinliği incelenmiştir. Atık su sistemi giriş noktasından alınan su numunelerinin ortalama mikroorganizma sayısı 73.365 CFU/ml olup, 5 dakikalık ozon gazı muamelesinin ardından bu sayı ortalama 4.934 CFU/ml'ye düşmüş ve 10 dakikalık ozon gazı muamelesinin ardından da ortalama 378 CFU/ml' ye kadar azalma göstermiştir. Atık su sistemi çıkış noktasından alınan su numunelerindeki ortalama mikroorganizma sayısı ise 65.673 CFU/ml iken, 5 dakikalık ozon gazı uygulamasının ardından ortalama 3.553 CFU/ml ve 10 dakikalık ozon uygulama işleminin ardından da ortalama 290 CFU/ml' ye kadar azalma göstermiştir (Şekil 9). Atık su sistemi su numunelerinin bakteriyel konsantrasyonundaki ozon gazı uygulamasıyla elde edilen bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).



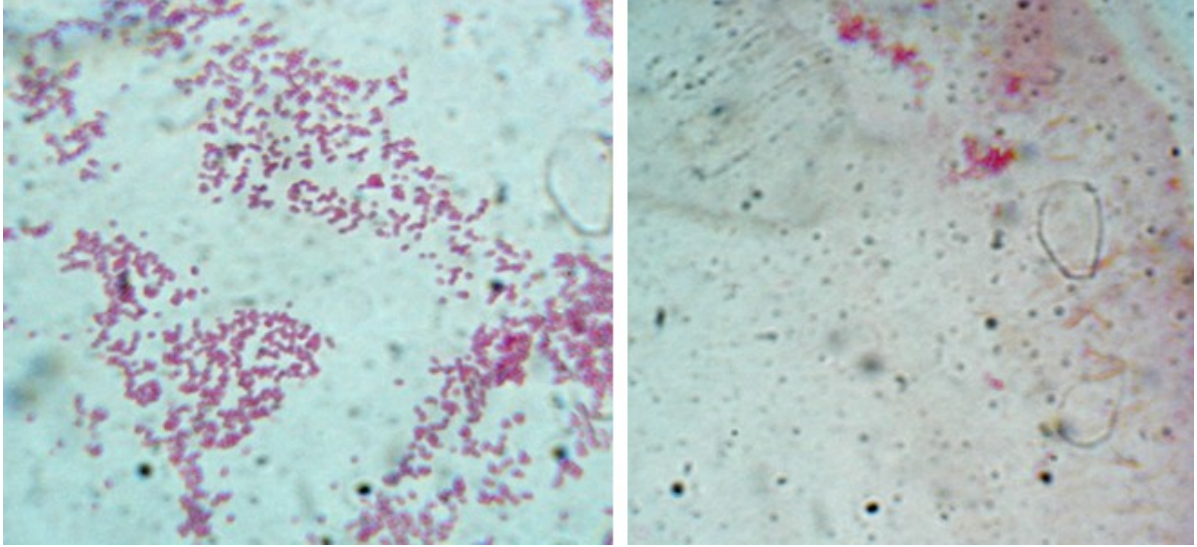
Şekil 9. Atık su arıtım sistemi su numunelerinin ozon gazı ile muamelesi.

4.5. Ozon Gazı Uygulanmış Bakteri Süspansiyonlarının Gram Boyama ve PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) Moleküler Tiplendirme Sonuçları

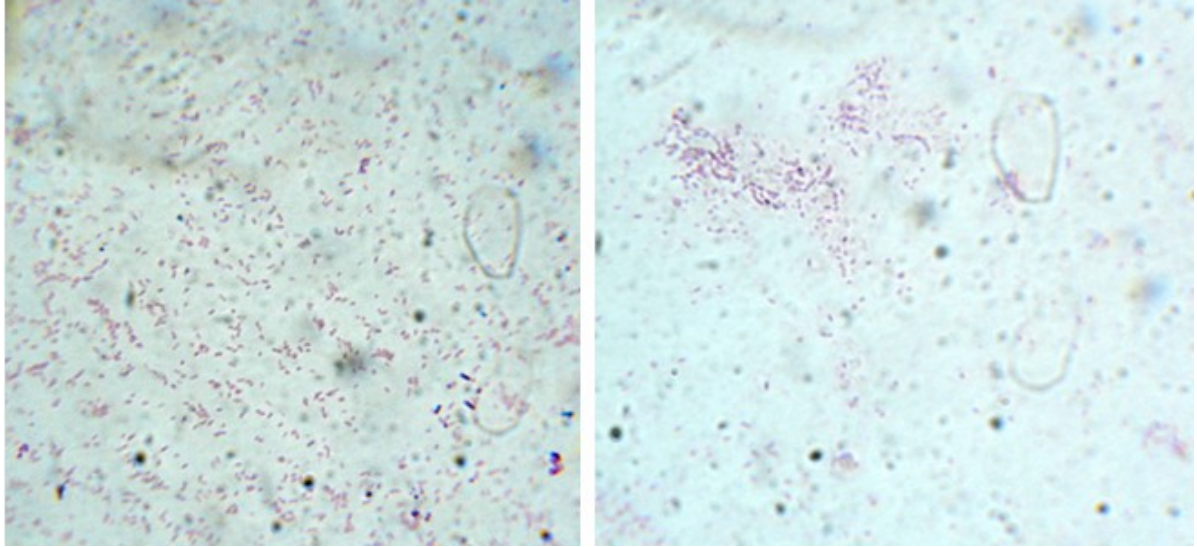
Fosfat tamponu içerisinde 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonunda hazırlanan bakteri süspansiyonları bir saat boyunca ozon gazına maruz bırakıldı. Bu süspansiyonlardan ozonlama öncesi ve sonrasında Gram boyamalar yapılarak mikroskop altında incelendi (Şekil 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5). Gram boyama resimlerinde genel olarak tüm bakterilerin ozonlama sonrası yoğunluklarının azaldığı görülmektedir. Özellikle Gram negatif bakteriler ozonlama sonrasında yapılan preparatlarda ayırt edilememektedir. *E. coli* ve *P. aeruginosa* türlerinde bakteri kalıntılarına benzer yapılar göze çarpmaktadır. *S. aureus*'un ozonlama sonrasında yapılan Gram boyama preparatında ise Gram negatif olarak boyanmış yapılar dikkat çekmektedir.



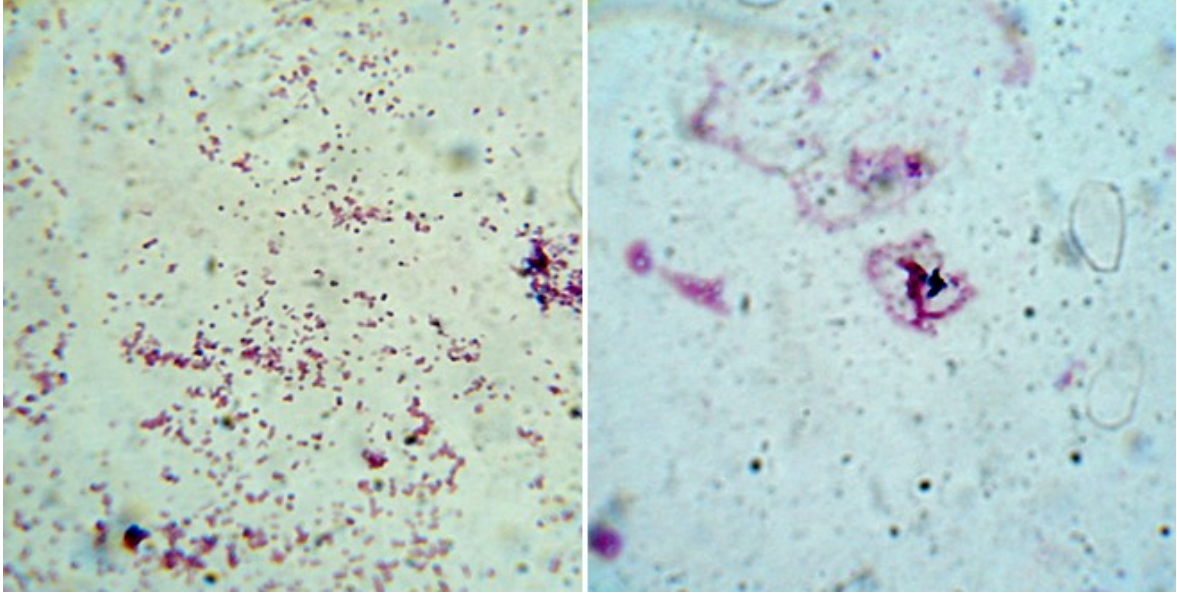
Şekil 10.1. *E. coli* ozonlama öncesi (solda) ve sonrası (sağda) Gram boyama resimleri.



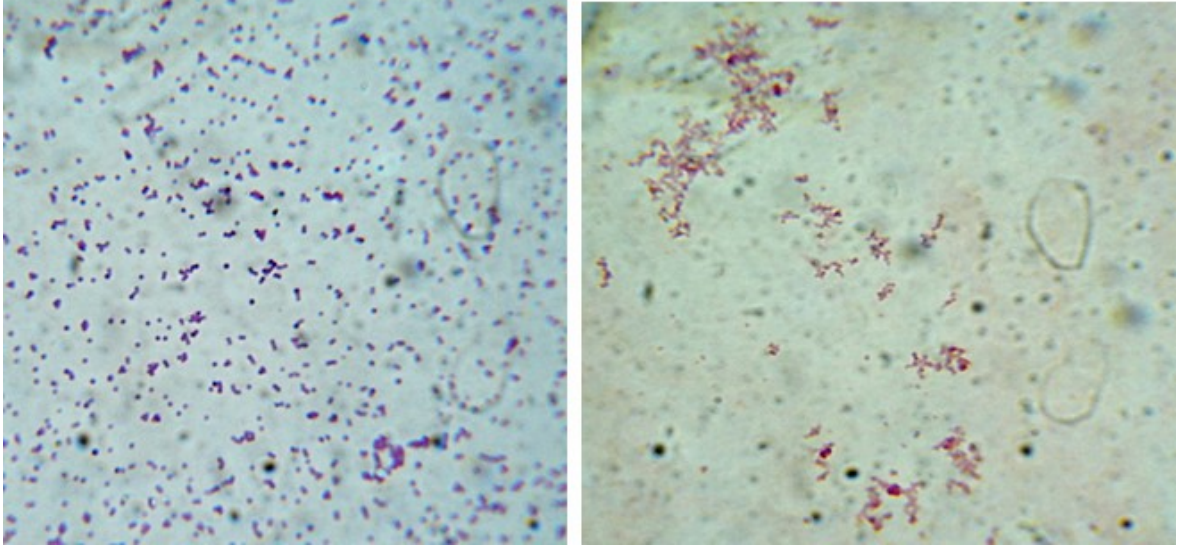
Şekil 10.2. *K. pneumoniae* ozonlama öncesi (solda) ve sonrası (sağda) Gram boyama resimleri.



Şekil 10.3. *P. aeruginosa* ozonlama öncesi (solda) ve sonrası (sağda) Gram boyama resimleri.



Şekil 10.4. *A. baumannii* ozonlama öncesi (solda) ve sonrası (sağda) Gram boyama resimleri.



Şekil 10.5. *S. aureus* ozonlama öncesi (solda) ve sonrası (sağda) Gram boyama resimleri.

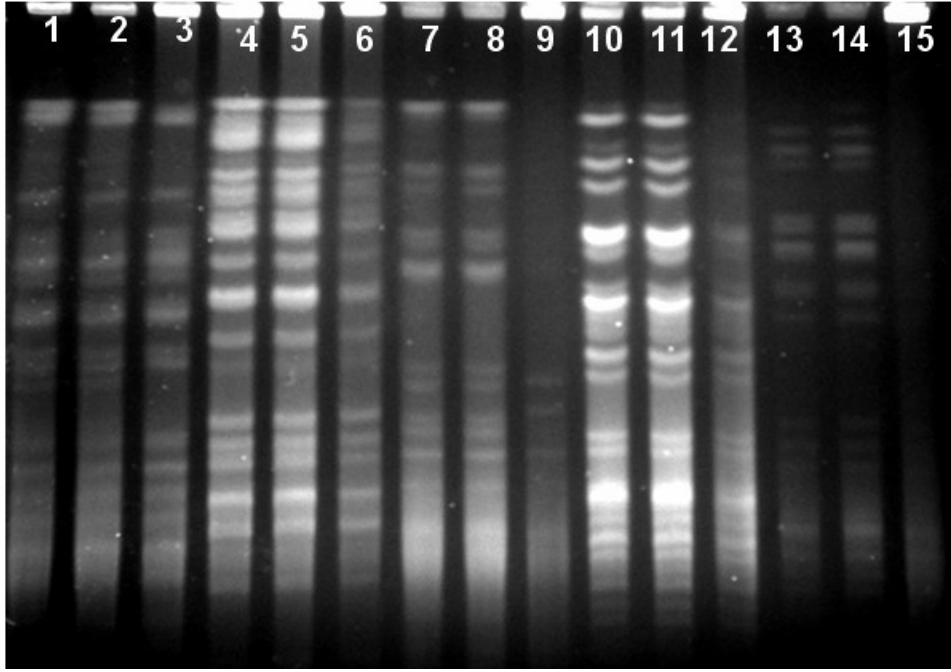
Fosfat tamponu içerisinde 1.5×10^8 CFU/ml konsantrasyonunda hazırlanarak 1 saatlik ozonlama işlemine maruz bırakılan bakteri süspansiyonları, ozonlama öncesinde ve sonrasında moleküler tiplendirme için kullanıldı. Çalışmaya alınan 5 farklı bakteri türü için seçilen her bir izolat, standart PFGE protokolü kullanılarak 3 farklı şekilde işleme alındı. İlk grupta ozon gazına maruz bırakılmayan bakteri süspansiyonu ile standart PFGE protokolü aynen uygulanarak tiplendirme yapıldı ve restriksiyon enzimleri ile kesim işlemine hazır hale getirildi. Bu aşamada kullanılan bakteri süspansiyonları, ozonlama işlemi uygulanmadığı için kontrol grup olarak kabul

edildi. Yine aynı izolatu içeren bakteri süspansiyonu 1 saat süreyle ozon gazına maruz bırakıldı. Ozonlanan bakteri süspansiyonu ikinci grupta standart PFGE protokolü aynen uygulanarak işleme alındı ve restriksiyon enzimi ile kesim aşamasına hazır hale getirildi. Bu ikinci grupta; bakteri DNA'sında ozonlama sonucu oluşabilecek olası hasarı görmek veya varsa restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim bölgelerindeki değişikliği incelemek amaçlanmaktaydı. Üçüncü grupta ise PFGE protokolünün liziz aşaması atlanarak, direkt yıkama aşamasına geçildi ve restriksiyon enzimleri ile kesim aşamasına geçildi. Bu son grupta eğer ozonlama ile bakteri hücre duvarı ve membranı tamamen parçalanmışsa, hücre duvarı ve membran kalıntıları yıkama aşamasında uzaklaştırılacak ve dolayısıyla bakteri DNA'sı restriksiyon enzimi ile kesim için hazır olacaktır. Daha sonra her bir izolat için 3 farklı şekilde hazırlanan kalıplar, bakteri türlerine uygun restriksiyon endonükleaz enzimleri ile inkübasyona bırakıldı. Elektroforez için hazırlanan agaroz jelde, aynı izolatin 3 farklı yöntemle hazırlanan kalıpları yan yana gelecek şekilde yerleştirildi ve elektroforez sürecinin tamamlanmasının ardından jel, etidyum bromür ile boyanarak görüntülendi (Şekil 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5).

Ozonlama işlemine tabi tutulmayan ve "1. grup izolatlar" olarak adlandırılan kontrol gruba ait bant profilleri jel fotoğraflarında net olarak görülmektedir. Bu da PFGE moleküler tiplendirme yönteminin sorunsuz olarak çalıştığını göstermektedir. Kontrol gruba ait bant profilleri ile karşılaştırıldığında; PFGE ile moleküler tiplendirmesi yapılan izolatların hiçbirinin restriksiyon endonükleaz (RE) kesim bölgelerinde bir değişiklik ya da RE kesim bölgesini içeren herhangi bir DNA hasarı gözlenmemiştir. Ozonlama işlemi uygulanmış olan ve "2. grup" olarak adlandırılan izolatların bant profillerinin kontrol grup ile fark göstermediği PFGE jel resimlerinde de açıkça görülebilmektedir (Şekil 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5; 1. ve 2. grup izolatlar).

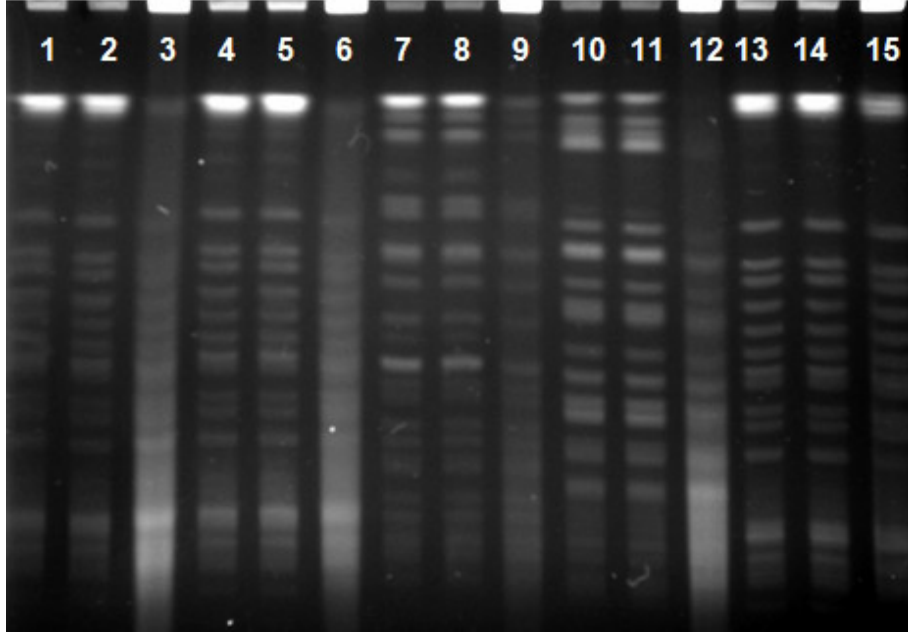
Bakteri hücre duvarı ve membran yapılarının ozonlama ile tamamen parçalandığını göstermek amacıyla "3. grup" olarak adlandırılan izolatlar kullanılmıştır. Bu gruptaki izolatlara 1. grupta (kontrol grubu) yer alan izolatlardan farklı olarak; PFGE protokolü liziz aşaması yerine ozon uygulaması yapılmıştır. Yani PFGE protokolündeki liziz aşamasının hedefi olan, hücre duvarı ve membran yapılarının yıkım işlemi ozonlama ile sağlanmaya çalışılmıştır. *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* türlerine ait resimlerde; 3. grupta bulunan izolatlara ait DNA'ların liziz işlemi yapılmadan, tek başına ozonlama ile kısmen de olsa ekstrakte edilebildiği ve

yine DNA bant profillerinin kontrol gruptan farklı olmadığı görülmektedir. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* türlerine ait resimlerde de görüldüğü gibi; tek başına ozonlama ile bu bakterilerde hücre duvarı ve membran yapıları tamamen parçalamamış veya genomik DNA ekstrakte edilememiştir. Halbuki bu bakterilerin ozon uygulamasına ilaveten PFGE liziz aşamasına alınan 2. grup izolatlarının bant profilleri son derece net bir şekilde görüntülenmiştir.

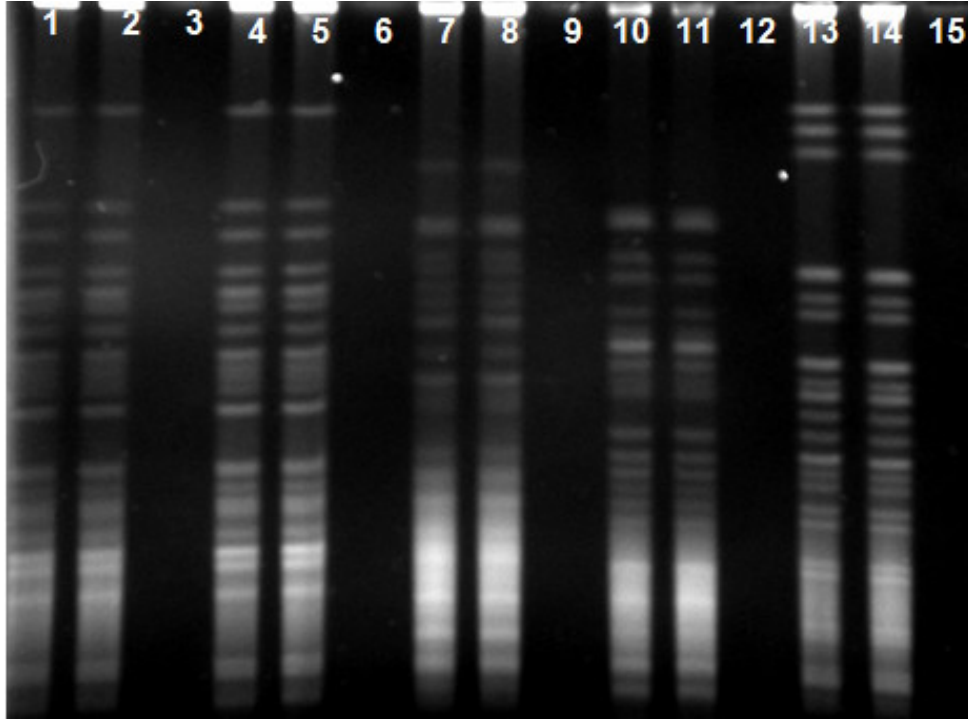


Şekil 11.1. *E. coli* izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri:

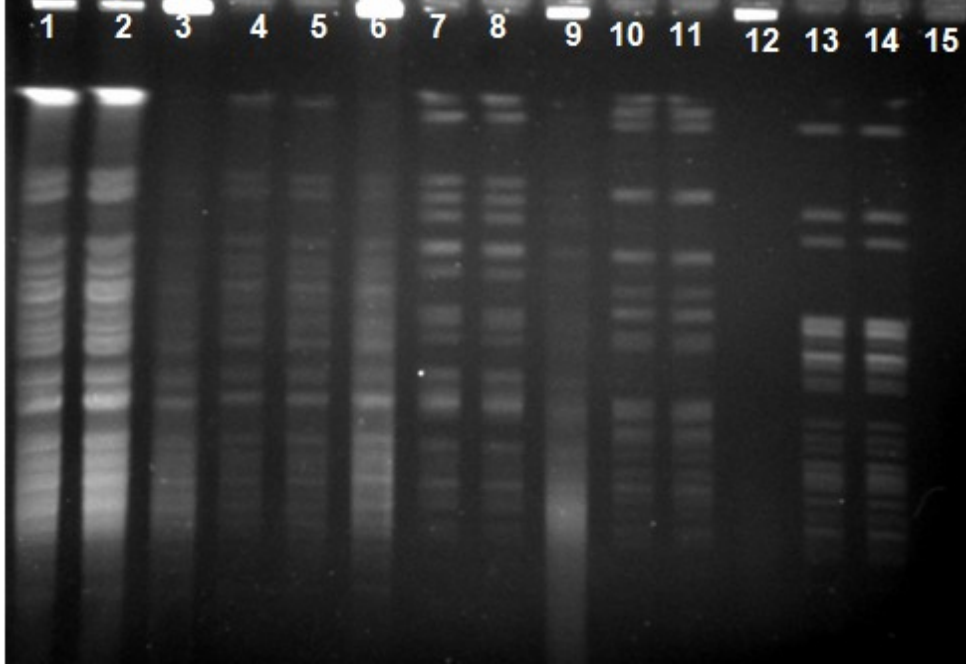
1. grup; Ozonlama yapılmayan, direkt PFGE protokolü uygulanan izolatlar (1, 4, 7, 10, 13).
2. grup; Ozonlama yapılan ve standart PFGE protokolü uygulanan izolatlar (2, 5, 8, 11, 14).
3. grup; Ozonlama yapılan ve PFGE protokolü ile lizizi yapılmayan grup (3, 6, 9, 12, 15).



Şekil 11.2. *K. pneumoniae* izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri:
1. grup; Ozonlama yapılmayan, direkt PFGE protokolü uygulanan izolatlar (1, 4, 7, 10, 13).
2. grup; Ozonlama yapılan ve standart PFGE protokolü uygulanan izolatlar (2, 5, 8, 11, 14).
3. grup; Ozonlama yapılan ve PFGE protokolü ile lizizi yapılmayan grup (3, 6, 9, 12, 15).

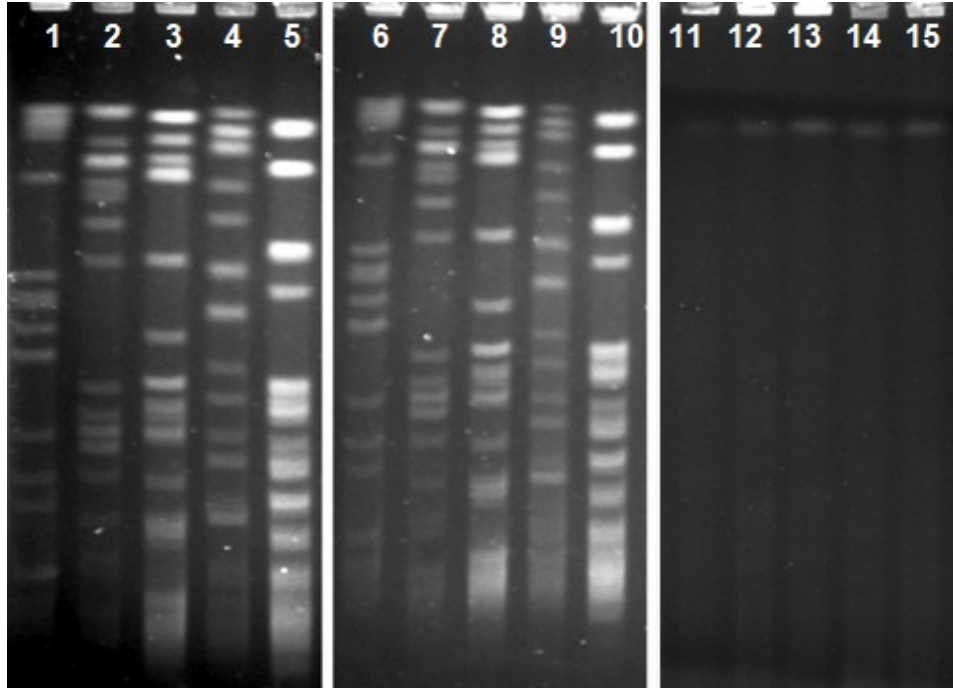


Şekil 11.3. *P. aeruginosa* izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri:
1. grup; Ozonlama yapılmayan, direkt PFGE protokolü uygulanan izolatlar (1, 4, 7, 10, 13).
2. grup; Ozonlama yapılan ve standart PFGE protokolü uygulanan izolatlar (2, 5, 8, 11, 14).
3. grup; Ozonlama yapılan ve PFGE protokolü ile lizizi yapılmayan grup (3, 6, 9, 12, 15).



Şekil 11.4. *A. baumannii* izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri:

1. grup; Ozonlama yapılmayan, direkt PFGE protokolü uygulanan izolatlar (1, 4, 7, 10, 13).
2. grup; Ozonlama yapılan ve standart PFGE protokolü uygulanan izolatlar (2, 5, 8, 11, 14).
3. grup; Ozonlama yapılan ve PFGE protokolü ile lizizi yapılmayan grup (3, 6, 9, 12, 15).



Şekil 11.5. *S. aureus* izolatları ozonlama öncesi ve sonrası PFGE profilleri:

1. grup; Ozonlama yapılmayan, direkt PFGE protokolü uygulanan izolatlar (1, 2, 3, 4, 5).
2. grup; Ozonlama yapılan ve standart PFGE protokolü uygulanan izolatlar (6, 7, 8, 9, 10).
3. grup; Ozonlama yapılan ve PFGE protokolü ile lizizi yapılmayan grup (11, 12, 13, 14, 15).

5. TARTIŞMA

Hastane atık suyu; organik madde konsantrasyonu, içerdığı metaller ve pH açısından evsel atık sularından biraz farklıdır. İlaçlar, dezenfektanlar, farmasötikler gibi maddeler ve antibiyotik dirençli bakteriler hastane atık sularında sıklıkla bulunabilmektedir. Hastane atıklarının su ekosistemi ile teması, doğal ortamların biyolojik dengesi üzerine olumsuz etkisi olan tehlikeli maddelerin varlığıyla ilişkili olarak potansiyel risk oluşturmaktadır (140). Atık suların klorlama ile dezenfeksiyonu oldukça yaygın kullanılmaktadır. Ancak klorlamada temel mekanizmanın; bakterilerin hücre yüzey hidrofobitesinin değişmesi ve böylece hücrelerin agregasyonu şeklinde gerçekleştiği ve dolayısıyla klorlama işleminin ardından yapılan kültürlerde üreme görülebildiği belirtilmiştir. Ozon uygulamasının ardından yapılan kültürlerde ise üreme gözlenmemesi, hücre yüzey hidrofobitesinin değişmemesi ve bakterilerin %95'inin membran permeabilitesinin değişmesi nedeniyle; ozonun klorlama işleminden daha etkili olduğu vurgulanmıştır (141). Ayrıca atık suların klorlanması sırasında canlı organizmalar için son derece toksik olan organo-kloritler ve diğer dezenfeksiyon yan ürünleri oluşmaktadır. UV dezenfeksiyonu ile herhangi bir yan ürün oluşumu görülmemekte, fakat özellikle klinik atık suların yüksek partikül yükü nedeniyle yetersiz kalabilmektedir. Dolayısıyla mikrobisit etkinliği yüksek, ancak dezenfeksiyon yan ürün oluşumuna neden olmayan alternatif dezenfektanlara ihtiyaç duyulmaktadır (142).

Antibakteriyel etkinliği uzun süredir bilinen ozonun (63, 68) olumsuz reaksiyonları, havadaki yüksek ozon konsantrasyonlarıyla ilişkilendirilmiştir. Çünkü sudaki solusyonlarında ozonun son derece yüksek çözünürlükte olduğu ve özellikle yüksek konsantrasyonlarının hızla suya yayıldığı gösterilmiştir. Bu anlamda, sulu ekosistemlerde ozon kullanımının son derece güvenilir olduğu ve potansiyel toksik etki oluşturmadığı belirtilmektedir (143). Hastane atık su dezenfeksiyonunda ozonlama işlemi oldukça etkili olup, ancak atık suların yüksek organik kompozisyonu nedeniyle ozonun yüksek konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulabileceği bildirilmiştir. Ayrıca dezenfeksiyonun etkinliğinde sürekli ozonlama şeklindeki uygulamanın, dönem dönem yapılan ozonlama işleminden 10 kat daha etkili bulunmuştur (77). Çalışmamızda çeşitli bakterilerin ozon gazı ve/veya negatif iyonlara duyarlılıkları ve ozon gazı uygulaması ile bakteri hücre duvar hasarı ve olası DNA hasarı incelenmiştir. Ayrıca negatif iyon ve ozon teknolojilerinin birleştirilerek uygulanması

halinde antibiyotik ve dezenfektanlara dirençli olan mikroorganizmalar dahil, hastane ortamı, klima sistemi soğutma kuleleri ve atık sularda sık rastlanan bakterilerin azaltılıp azaltılamayacağı ve hastane infeksiyonu etkenlerinin kontrol altına alınma olasılıkları araştırılmıştır.

Çalışmamıza alınan tüm bakterilerin gerek ekimlerinin yapıldığı agar plak yüzeyi maruziyetlerinde ve gerekse bakteri süspansiyonu içerisinde yapılan ozon gazı uygulamalarına duyarlı olduğu görülmüştür. Bakterilerin aynı konsantrasyondaki ozon gazına olan duyarlılıkları değişmekle beraber, genel olarak Gram negatif bakterilerin Gram pozitif bir bakteri olan *S. aureus*'a kıyasla daha duyarlı olduğu ve daha hızlı ve yüksek oranda inaktivasyonun sağlandığı görülmüştür. Bu durum Komanapalli ve Lau'nun (52) ozonun proteinleri lipidlerden daha kolay, daha hızlı etkilediği ve dolayısıyla Gram pozitif bakterilerin ozona daha duyarlı olduğu düşüncesiyle çelişmektedir. Thanomsub ve ark.'nın yaptığı çalışmada; basil ve kok formları arasında ve Gram (+) ve Gram (-) bakteriler arasında ilk 30 dk'lık maruziyet sonunda, deformasyon ve hücre canlılığı açısından benzer etkiler gözlenmiştir. Ancak, şiddet ve hasar açısından bazı farklılıklar gözlemlendiği belirtilmiştir. Özellikle de hızlı bir hücre duvarı yenilenme hızına sahip *Bacillus subtilis* gibi Gram (+) bakteri örneklerinin diğerlerinden daha fazla tahrip olduğu belirtilmiştir (53). Thanomsub ve ark.'nın yaptığı çalışmada (53) Gram pozitif bakterilerden *S. aureus* ve *B. subtilis* ve Gram negatif türlerden ise *E. coli* ve *Salmonella spp.*'nin ozona duyarlılıkları incelenmiş ve çalışmamızda kullanılan *E. coli* ve *S. aureus* için çalışmamız ile benzer etkiler gözlenmiştir. Her ne kadar Thanomsub ve ark.'nın çalışmasında; *B. subtilis* için daha şiddetli bir hasar gözlemlendiği belirtilse de, tıpkı çalışmamızda da olduğu gibi *E. coli*'nin *S. aureus*'a kıyasla ozon gazı karşısında daha yüksek oranda azalma gösterdiği belirtilmiştir. Çalışmamızda Gram negatif türler arasında genel olarak ozona en duyarlı mikroorganizma *E. coli* iken, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* türlerinin daha dirençli olduğu görülmüş olup, hastane atık sularının ozonlama ile dezenfeksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir (77). *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida famata* ve *Penicillium citrinum* üzerinde, ozonun yüzey germisit etkinliğinin incelendiği bir başka çalışmada da; ozona en duyarlı mikroorganizmanın *E. coli* olduğu ve 3.5-4 mg konsantrasyonda %80 oranında inaktivasyon sağlandığı, diğer mikroorganizmalarda ise aynı oranda inaktivasyon için 40 kat daha yüksek konsantrasyonda ozon kullanıldığı bildirilmiştir (144). Thanomsub ve ark.'nın da belirttiği gibi (53), çalışmamızda ozon uygulamasına

maruz bırakılan bakterilerin basil ve kok formları arasında hücre canlılığı açısından belirgin bir fark gözlenememiştir.

Ozon gazı uygulamasının yapıldığı tüm denemelerde; çalışılan bütün bakteri türleri için maksimum inaktivasyonun ilk 10 dakikalık süre içerisinde sağlandığı görülmüştür. Agar plak yüzeyinde 6.6 mg/saat konsantrasyonundaki ozon maruziyeti ile 10 dk içerisinde bütün bakteri türlerinin ortalama bakteri konsantrasyonlarında %99.79-%99.84 arasında değişen bir azalma görülmüştür. İnaktivasyon oranının beklendiği gibi ilk 10 dk içerisinde düşük bakteri konsantrasyonları için %100'lere ulaştığı gözlenmiştir. Yine bakteri süspansiyonu ile yapılan denemelerde ve negatif iyon ile ozonun birlikte uygulandığı denemelerde de ilk 10 dk'da %99.78-%99.89 arasında değişen oranda hücresel canlılığın azaldığı gözlenmiştir. İkinci 10 dakikalık dönemde ve ilerleyen maruziyet sürelerinde ise inaktivasyonun daha yavaş gerçekleştiği görülmüştür. Agar plak yüzeyi için ikinci 10 dk'lık dönemde %26.84-%43.22 arasında değişen inaktivasyon sağlanabilirken, bakteri süspansiyonu üzerinde yapılan denemelerde ve ozon ve negatif iyonun birlikte uygulandığı denemelerde ikinci 10 dk'lık süreçteki hücresel canlılığın %35.54-%74.33 arasında değişen oranlarda azalma gösterdiği gözlenmiştir. Ozonun bakteri hücreleri üzerindeki ultrayapısal değişikliklerin incelendiği bir başka çalışmada da benzer şekilde, hücrelerdeki en yüksek azalma oranı 5-15. dakikalar arasında gerçekleşmiştir (53). Çalışmamızda ozon uygulamasını takiben çok kısa sürelerde görülen bu ani inaktivasyon, özellikle yüksek konsantrasyonlu bakteri süspansiyonlarında daha belirgin şekilde görülmektedir. Chiang ve ark. bu durumun yüksek bakteriyel konsantrasyondan kaynaklandığını belirtmiştir (77). Gerçekten çalışmamızın ilerleyen maruziyet sürelerinde de yine yüksek konsantrasyonlarda daha yüksek oranda azalma gerçekleşmiştir.

Bakteri konsantrasyonu arttıkça yeterli inhibisyonu sağlayabilmek için ozon konsantrasyonu ve/veya maruziyet süresini arttırmak gerekebilir. Örneğin, 10 mg/saat konsantrasyonunda ozon gazı ile yapılan bir çalışmada; 10^5 CFU/ml'ye kadar olan bakteriyel konsantrasyonlarda 30 dakikaya kadar tam bir inhibisyon sağlandığı, ancak 10^6 CFU/ml ve üzeri konsantrasyonlarda 150 dakika sonunda bile tam bir inhibisyon sağlanamadığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada elektron mikroskop görüntüleri ile hücrelerdeki tahribat şiddetinin ozon maruziyet süresiyle uyumlu olarak artış gösterdiği belirtilmiştir (53). Çalışmamızda da hem agar plak yüzeyi üzerinde hem de bakteri süspansiyonlarında yapılan ozon uygulamalarında; 1.5×10^5

CFU/ml'den daha düşük konsantrasyonlarda ozonun ortalama ilk 30-40 dk içerisinde hücresel canlılığın tamamen sıfırlandığı, daha yüksek bakteri konsantrasyonlarında ise türe bağlı olarak daha uzun maruziyet sürelerine, daha yüksek ozon konsantrasyonuna ihtiyaç duyulduğu görülmüştür. Çalışmamızda *E. coli* için 1.5×10^8 CFU/ml bakteri konsantrasyonunda agar plak yüzeyinde 6.6 mg/saat ozon konsantrasyonu ile inaktivasyon oranı 2 saatlik maruziyetin ardından %100'e ulaşırken, 10.5 mg/saat ozon konsantrasyonu ile aynı bakteriyel konsantrasyonda ve aynı deneysel koşullarda (agar plak yüzeyi uygulaması) 40 dk'da %100 inaktivasyon sağlanmıştır. Benzer şeklide Selma ve ark. (145) 80 mg/dk konsantrasyonundaki ozon uygulamasıyla 1 saatte mikrobiyal konsantrasyonda 5.9 log CFU/ml'lik bir azalma bildirirken, Aydoğan ve Gurol (86) 3 mg/L kadar düşük seviyedeki ozon konsantrasyonlarında 4 saatlik maruziyet sonunda yaklaşık 3 logaritmalık bir inaktivasyon görüldüğünü bildirmiştir.

Mikroorganizmaların ozon ve/veya negatif iyon duyarlılıkları türe bağlı değişim göstermekle beraber, bakteri konsantrasyonu veya bağıl nem, kültür ortamı bileşenleri ve pH'sı gibi çevresel faktörler ya da maruziyet öncesi mikroorganizmaların bekleme süresi, uygulanan ozon konsantrasyonu ve uygulama şekli gibi deneysel koşullar da mikroorganizmaların ozon ve/veya negatif iyon ile inaktivasyon derecelerini etkileyebilmektedir. Bu nedenle tüm deneysel koşulların sabit olmadığı farklı çalışma sonuçlarının karşılaştırılması bir anlam ifade etmemektedir. Örneğin, patates dekstroz agar (pH=5.6) ile yapılan ozon uygulama çalışmalarında, nutrient agara (pH=6.8) göre bakteri ölümünün daha hızlı gerçekleştiği belirtilmiştir. Yine aynı çalışmada; *Erwinia carotovora* için ozon uygulama öncesindeki bekleme süresiyle ilişkili olarak hücre canlılığı, mikroorganizmanın kültür ortamına ekiminin ardından bekletilmeden ozona maruz bırakılanlarda %34 iken, ekimi takiben 45 dk kadar geciktirilmiş ozon uygulama işleminde %78 olduğu belirtilmiştir. Bu da geciktirilmiş ozon uygulaması sırasında bekletilen hücrelerin kendilerini koruyacak polisakkaritler salgılamalarıyla açıklanmıştır. Polisakkarit üretimiyle bakteriyel hücrelerin antimikrobiyal mekanizmalardan da nispeten hızlı bir şekilde kaçabildiği vurgulanmıştır (11).

Ortamın bağıl nem oranı ile doğru orantılı olarak ozonun inhibitör etkinliğinin de arttığı gözlenmiş ve bu durumun ozonun reaksiyona gireceği su oranının artışı sonucu oluşacak radikal oranının artmasına bağlı olarak gerçekleştiği vurgulanmıştır (144). Ozonun sudaki etkinliğinin havadaki etkinliğinden çok daha yüksek olduğu ve

hızla ayrıştığından çok daha güvenli olduğu uzun süredir bilinmektedir (44, 143). Bizim çalışmamızda da agar plak yüzeyine uygulanan ozon işlemine kıyasla bakteri süspansiyonlarının direkt ozonlanmasının daha etkili olduğu görülmektedir. Daha önce de belirtilen ilk 10 dakikalık ani azalma döneminde anlamlı fark gözlenmezken ($p>0.05$), ilerleyen maruziyet sürelerinde ozonun su içerisinde etkinliğinin arttığı bariz olarak görülmektedir ($p<0.05$). Örneğin 10 dakikalık ani inhibisyon döneminin ardından ikinci 10 dakika içerisinde; ortalama mikrobiyal konsantrasyonun agar plak yüzeyindeki ozon uygulamasıyla %36 ve sıvı ortamdaki ozon uygulamasıyla ise %51 oranında azalma gösterdiği görülmüştür ($p<0.05$).

Ozonla karşılaşan mikroorganizmalarda gözlenen hücre tahribatının ana mekanizması hücre duvarı ve membran üzerindeki fiziksel etkilerdir. Kısa süreli ozon gazı maruziyeti; hücre duvarı harabiyeti, membran permeabilitesinde değişim ve hücre bütünlüğünün bozulması gibi değişikliklere neden olmaktadır. Bu sırada çeşitli hücre içi protein ve DNA'ların hücre duvarı harabiyeti ile hücre dışına çıkabildiği, fakat bu hücre içi bileşenlerin ancak daha uzun süreli maruziyetlerde hasara uğradığı gösterilmiştir (52, 53, 61). Çalışmamızda da 1 saat süreyle ozon uygulanan bakteri süspansiyonlarının Gram boyama görüntüleri; hücre duvar bütünlüğünün bozulduğunu göstermektedir (Şekil 10.1, 10.2, 10.3, 10.4, 10.5). Ayrıca PFGE moleküler tipleme yöntemi sonuçları da hücre duvar bütünlüğünün bozulduğunu desteklemiştir. Çünkü PFGE yönteminde amaç; agaroz kalıplar içerisine alınan bakterilerin, çeşitli enzim ve deterjanlar yardımıyla hücre duvarlarını lizize uğratmak ve sonuçta bakteri DNA'sını açığa çıkarmaktır. Ekstrakte edilen DNA daha sonra RE enzimleri ile kesilmekte ve elektroforez sonrası oluşan bant profilleri değerlendirilmektedir. Çalışmamızda ozon uygulamasını takiben hazırlanan agaroz kalıplara, hücre duvarını parçalamaya yönelik herhangi bir liziz işlemi uygulanmamasına rağmen, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* türlerine ait "3. grup izolatların" agaroz jel resimlerindeki DNA bant profilleri açıkça görülmektedir (Şekil 11.1, 11.2, 11.4). Bu da bu bakterilerin hücre duvar bütünlüklerinin 1 saatlik ozon uygulaması ile, en azından bakteriyel DNA'ları açığa çıkaracak ölçüde bozulduğunu göstermektedir. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* türlerine ait yine "grup 3" olarak adlandırılan izolatlarda ise ozonlama ile hücre duvarı tam anlamıyla parçalanamamış ve dolayısıyla DNA bant profilleri görüntülenemmiştir (Şekil 11.3, 11.5).

PFGE tiplene yöntemi ile ayrıca; ozon ile muamele edilen bakterilerin, ozon uygulaması öncesi ve sonrasında makro restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim bölgelerinde değişiklik olup olmadığına bakılarak, DNA'larındaki kırılmaları tespit etmek amaçlanmıştır. Moleküler tiplene sonuçlarına göre; 1 saatlik ozon uygulamasının bakteri DNA'larını hasara uğratmadığını ya da en azından kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimlerinin kesim bölgelerine denk gelen bir hasar oluşturmadığını söylemek mümkündür. Çünkü ozon uygulamasının ardından standart PFGE protokolünün lizis ve yıkama aşamalarına tabi tutulan ve "2. grup" olarak ifade ettiğimiz izolatların DNA bant profilleri ile ozon uygulaması yapılmayan, direkt standart PFGE protokolünün uygulandığı kontrol grubun (1. grup) bant profilleri arasında herhangi bir fark görülmemektedir (Şekil 11.1, 11.2, 11.3, 11.4, 11.5). Zaten PFGE tiplene yönteminde bant farkı göstermeyen izolatlar "eş izolat" olarak adlandırılmaktadır. Komanapalli'nin (52) çalışmasında da belirtildiği gibi hücre içi yapıların ve bakteriyel DNA'nın hasarı için daha uzun süreli ozon maruziyeti gerektiğini söyleyebiliriz.

Çalışmamızda ayrıca 3.3 milyon/cm^3 konsantrasyonunda negatif iyon ve 0.04 ppm 'in altında ozon çıktısı olan bir negatif iyonizer kullanılarak, mikroorganizmaların negatif iyonlara duyarlılığı araştırılmıştır. Negatif iyonların çalışmaya alınan Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde benzer etkiler oluşturduğu görülmüştür. Marin ve ark.larının *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* standart suşlarını kullanarak, yaklaşık $8-10^6$ iyon/cm³ negatif iyon üretme kapasitesine sahip hava iyonizeri ile yaptığı çalışmada; Gram negatif bakterilerin, negatif iyonlara Gram pozitif bakterilerden yaklaşık 3-3.5 kat daha duyarlı olduğu bildirilirken (109), Fletcher ve ark. ise (146) bizim çalışmamız ile benzer şekilde Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler arasında bir fark görülmediğini belirtmiştir. Bu çelişki kullanılan negatif iyonizerinin iyon konsantrasyonuna, ozon çıktısına veya farklı deneysel koşullara bağlı olabilir. Bizim çalışmamızda negatif iyonların genel olarak 1.5×10^5 CFU/ml ve daha düşük bakteri konsantrasyonlarında 4 saatlik maruziyet süresi sonunda ortalama %43-79 arasında değişen oranda bir azalmaya yol açtığı gözlenmiştir. Fakat hiçbir bakteri türünde 1.5×10^5 CFU/ml'den daha yüksek bakteri konsantrasyonlarında 4 saatin sonunda dahi hiç azalma görülmemiştir. Tavuklar arasında *Salmonella* yayılımını önlemeye yönelik negatif iyonların etkili olabileceğini vurgulayan çeşitli çalışmalarda; negatif iyonizasyon ile yaklaşık 3 saat içerisinde hava ve çevreden alınan örneklerde %50 (116) ve %95 (147) oranında bakteriyel

azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Marin ve ark. (109) bizim de ozon ve negatif iyon denemelerimizde gözlediğimiz gibi, petri ağızları deneysel süreçte açık olmasına rağmen, plaklarda çalışma sonunda herhangi bir hava kaynaklı kontaminasyonun görülmediğini belirtmiştir. Çalışmamızda ozon uygulama denemelerinde görülen ilk 10 dakikalık ani inhibisyon dönemi negatif iyonizasyon sırasında görülmemiş ve ayrıca negatif iyonların, ancak düşük bakteri konsantrasyonlarında ve uzun süreli maruziyetlerde hücresel canlılığı azalttığı gözlenmiştir. Tyagi ve ark.'nın yaptığı çalışmada da benzer şekilde, kısa süreli maruziyetlerde negatif iyonların etkili olmadığı vurgulanmıştır (148). Çalışılan bakteri türleri arasında 1.5×10^5 CFU/ml ve daha düşük bakteri konsantrasyonlarında 4 saatlik maruziyet süresi sonundaki ortalama azalma oranları sırasıyla *E. coli* (%79), *S. aureus* (%65), *K. pneumoniae* (%51), *A. baumannii* (%48) ve *P. aeruginosa* (%43) şeklindedir. Fletcher ve ark. ise (146) negatif iyonizasyon sırasında görülen bu hücresel azalmaların; iyonizatörün çalıştırılması sırasında oluşan ve hücre ölümüne neden olabilecek elektriksel alan ve en önemlisi elektrik boşalmasının (corona discharge) bir yan ürünü olarak oluşabilecek herhangi bir ozondan kaynaklandığını göstermiştir. Negatif iyon maruziyeti sırasında, test edilen mikroorganizmaları etkileyen ana bakterisidal mekanizmanın, ozona maruziyetten ileri gelen oksidasyon hasarı olduğu Fan ve ark. tarafından da belirtilmiştir (11). Shargawi ark.'ları da (10) *Candida albicans* ile yaptığı negatif iyonizasyon denemelerinde; hücre ölümü ve mevcut ozon seviyesi arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bildirmiştir.

Ozon ve negatif iyonun eş zamanlı olarak uygulanması durumunda sinerjistik bir etkinin varlığını araştırmak amacıyla yaptığımız çalışma sonuçları; tüm bakterilerde tek başına ozon uygulamasına kıyasla ozon ve negatif iyon kombinasyonunun daha etkili olduğunu ve inhibisyon süresi ve canlı bakteri sayısını düşürdüğünü göstermiştir. Ozon ve negatif iyon arasında mikrobisit etkinlik açısından bir sinerjizmden çeşitli çalışmalarda da bahsedilmiştir (130, 11, 146). Ozon ve negatif iyonun eş zamanlı uygulandığı çalışmamızda; Gram negatif bakterilerin özellikle yüksek bakteri konsantrasyonlarında tek başına ozona kıyasla inhibisyon sürelerinin kısaldığı görülmüştür. Ancak Gram negatif bazı bakterilerde 10^6 CFU/ml'den düşük bakteri konsantrasyonlarında sinerji görülmemektedir. Sinerjistik etki *S. aureus*'ta daha belirgin olarak görülmektedir. *S. aureus*'un yine özellikle 10^4 CFU/ml ve üzeri bakteri konsantrasyonlarında 20 dk-2 saat arasında değişen erken bir tam inhibisyon süresi sağlanmıştır. Örneğin 10^6 CFU/ml konsantrasyonda tek başına ozon

uygulaması ile 4 saatlik maruziyet sonunda dahi tam bir inhibisyon sağlanamazken, ozon ve negatif iyon kombinasyonu durumunda aynı koşullarda 4. saatte %100 oranında hücrel ölüm gerçekleşmiştir. Tüm bakterilerin ilk 10 dakikalık maruziyet sürelerinde herhangi bir sinerji gözlenmemiş, fakat daha sonraki dönemlerde gözlenen hücrel canlılıktaki azalma, tek başına ozon uygulamasına kıyasla nispeten artış göstermiştir ($p<0.05$).

Hastanemiz klima sistemine ait soğutma kulelerinin dezenfeksiyonunda çalışma periyodu süresinde klorlama ve ozon uygulaması aktif olarak uygulandığı için, soğutma kulesi tanklarından alınan numunelerde herhangi bir bakteriyel üreme gözlenmemiştir. Bu da ozonlama, klorinasyon ve UV radyasyonu gibi aktif olarak kullanılan yöntemlerin etkili dezenfeksiyon sağladığını doğrulamaktadır. Hastanemiz atık su sistemi giriş ve çıkış noktalarından alınan numunelerde ozon uygulaması ile çok kısa sürede istatistiksel olarak anlamlı oranda mikrobiyal azalma görülmüştür. Giriş suyunun ozonlanmasıyla başlangıç mikrobiyal konsantrasyonun 5 dakikada %93.27 ve 10 dakikada %99.48 oranında azaldığı, çıkış suyundun ise sırasıyla %94.59 ve %99.56 oranında mikrobiyal azalma gösterdiği görülmüştür. Tüm bu sonuçlara göre; hastane atık su sistemi dezenfeksiyonunda ozon gazı uygulamasının son derece başarılı olduğu söylenebilir. Ayrıca yapılan bir çalışmada; ozonun su içerisine uygulanmasının ardından, ilk 20 sn içerisinde çeşitli farmasötik maddelerin oksidasyona uğradığı ve dolayısıyla diğer dezenfeksiyon yöntemlerinden daha avantajlı olduğu da belirtilmiştir (149). Atık su dezenfeksiyonunda ozonun etkinliğini ve diğer dezenfeksiyon yöntemlerine olan avantajlarını vurgulayan çok sayıda çalışma yapılmıştır (76, 77, 78, 140, 149). Dolayısıyla gerek yüksek bakterisit etkinliği ve gerekse farmasötiklerin oksidasyonu gibi avantajlarından dolayı, atık su sistemlerinin ozonlama ile dezenfeksiyonu ümit vericidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Hastane atık su sistemi ve soğutma kulelerinin dezenfeksiyonunun sağlanması ve böylece infeksiyonların kontrol altına alınmasında güvenilir ve etkili yeni dezenfeksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

2. Hastane çevresi, ısıtma ve soğutma kuleleri, hastane atık suyu ve kullanılan araçların bakterilerle kontaminasyonunu azaltmak amacıyla ozon gazı kullanımının son derece etkili ve güvenilir olduğu çok sayıda çalışmada belirtilmektedir.

3. Çalışmamızda mikroorganizmaların ozon gazına duyarlılığı bakteri türüne ve konsantrasyonuna ve uygulanan ozon tekniği, konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak değişmekle birlikte, çalışmaya dahil edilen tüm mikroorganizmaların ozon gazına duyarlı olduğu görülmüştür.

4. Negatif iyonların, ancak düşük bakteri konsantrasyonlarında etkili olabildiği, fakat ozon gazı ile kombinasyonu halinde etkinliğinin arttığı görülmüştür.

5. Ozon gazının; özellikle atık su sistemlerinin dezenfeksiyonunda son derece etkili olduğu ve bakteri sayısını % 99 oranında azalttığı saptanmıştır.

6. Ozonun sıvı ortamlardaki uygulamalarında etkinliğinin önemli oranda arttığı ve dolayısıyla atık su sistemleri ve soğutma kuleleri dezenfeksiyonunda da kullanımının son derece etkili ve güvenilir olduğu literatürde belirtilmesine rağmen, hastanemiz soğutma kulelerinde halen uygulanmakta olan klorlama, UV radyasyon ve ozonlama nedeniyle soğutma kulesi su örneklerinde bakteri tespit edilememiş ve dolayısıyla ozonun tek başına etkinliği saptanamamıştır.

7. Bir saatlik ozon gazı uygulaması sonrasında PFGE tiplene kullanılarak; bakterilerin hücre duvar yapılarının bakteri türüne bağlı olarak, büyük ölçüde parçalandığı, fakat hiçbir bakteri türünde bakteri DNA'sının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim bölgelerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Okeke, I.N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Mendez, A.P., Klugman, K.P. (2005). Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*, 5, 481–493.
2. Ayliffe, G.I.J., Coates, D., Hoffman, P.N. (1994). *Chemical Disinfection in Hospitals*. London: PHLS.
3. Duckworth, G. (1990). Revised guidelines for the control of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect*, 16, 351–377.
4. Berrington, A.W. and Pedler, S.J. (1998). Investigation of gaseous ozone for MRSA decontamination of hospital side-rooms. *J Hosp Infect*, 40, 61-65.
5. Wentworth, P.Jr., Mcdunn, J.E., Wentworth, A.D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., Bautista, C., Ruedi, J.M., Gutierrez, A., Janda, K.D., Babior, B.M., Eschenmoser, A. and Lerner, R.A. (2002). Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science*, 298, 2195-2199.
6. Nyffeler, P.T., Boyle, N.A., Eltepu, L., Wong, C.H., Eschenmoser, A., Lerner, R.A., Wentworth, P. Jr. (2004). Dihydrogen trioxide (HOOH) is generated during the thermal reaction between hydrogen peroxide and ozone. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43 (35), 4656-4659.
7. Babior, B.M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A., Wentworth, P. Jr. (2003). Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci*, 100 (6), 3031-3034.
8. Wentworth, P. Jr, Wentworth, A.D., Zhu, X., Wilson, I.A., Janda, K.D., Eschenmoser, A. and Lerner, R.A. (2003). Evidence for the production of trioxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. *Proc Natl Acad Sci*, 100, 1490-1493.
9. Kerr, K.G., Beggs, C.B., Dean, S.G., Thornton, J., Donnelly, J.K., Todd, N.J., Sleight, P.A., Qureshi, A., Taylor, C.C. (2006). Air ionisation and colonisation/infection with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter* species in an intensive care unit. *Intensive Care Med*, 32, 315–317.

10. Shargawi, J.M., Theaker, E.D., Drucker, D.B., Macfarlane, T. and Duxbury, A.J. (1999). Sensitivity of *Candida albicans* to negative air ion streams. *J. Appl. Microbiol*, 87, 889-897.
11. Fan, L., Song, J., Hildebrand, P.D. and Forney, C.F. (2002). Interaction of ozone and negative air ions to control microorganisms. *J Appl Microbiol*, 93, 144–148.
12. Sharma, S., Sachdeva, P. and Viridi, J.S. (2003) Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61, 424– 428.
13. Blasco, M.D., Esteve, C. and Alcaide, E. (2008). Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *J Appl Microbiol*, 105, 469–475.
14. Obst, U., and Schwartz, T. (2007). Microbial Characteristics of Water Distribution: Compiled Investigations in a German Drinking Water Distribution System. *Pract. Periodical of Haz., Toxic, and Radioactive Waste Mgmt*, 11 (2), 78-82.
15. Tsakona, M., Anagnostopoulou, E., and Gidaracos, E. (2007). Hospital waste management and toxicity evaluation: A case study. *Waste Management*, 27, 912-920.
16. Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M. and Vermande, P. (2005). Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mater*, 117, 1-11.
17. Hwang, B-F., Jaakkola, J.JK and Guo, H-R. (2008). Water disinfection by-products and the risk of specific birth defects: a population-based cross-sectional study in Taiwan. *Environmental Health*, 7, 23.
18. Musikavong, C., Wattanachira, S., Marhaba, T.F. and Pavasant, P. (2005). Reduction of organic matter and trihalomethane formation potential in reclaimed water from treated industrial estate wastewater by coagulation. *J Hazard Mater. B*, 127, 48-57.
19. Hong, H.C., Liang, Y., Han, B.P., Mazumder, A.. and Wong, M.H. (2007). Modeling of trihalomethane (THM) formation via chlorination of the water from Dongjiang River (source water for Hong Kong's drinking water). *Science of The Total Environment*, 385, 48-54.

20. Yousefi, Z. and Mohseni-Bandpei, A. (2007). The occurrence of trihalomethanes in the drinking water reservoirs and distribution systems in North of Iran and pollution management *Toxicology Letters*, 172, 126.
21. Panyapinyopol, B., Marhaba, T.F., Kanokkantapong, V. and Pavasant, P. (2005). Characterization of precursors to trihalomethanes formation in Bangkok source water. *J Hazard Mater*, 120, 229-236.
22. Sirivedhin, T. and Gray, K.A. (2005). 2. Comparison of the disinfection by-product formation potentials between a wastewater effluent and surface waters. *Wat. Res*, 39, 1025-1036.
23. Matamoros, V., Mujeriego, R. and Bayona, J. M. (2007). Trihalomethane occurrence in chlorinated reclaimed water at full-scale wastewater treatment plants in NE Spain. *Wat Res*, 41, 3337-3344.
24. Cedergren, M.I., Selbing, A.J., Löfman, O., Källén, B.A. (2002). Chlorination byproducts and nitrate in drinking water and risk for congenital cardiac defects. *Environ Res*, 89, 124-130.
25. Hwang, B.F., Magnus, P., Jaakkola, J.J.K. (2002). Risk of specific birth defects in the relation to chlorination and among of the natural organic matter in the water supply. *Am J Epidemiol*, 156, 374-382.
26. Nieuwenhuijsen, M.J., Toledano, M.B., Bennett, J., Best, N., Hambly, P., de Hoogh, C., Wellesley, D., Boyd, P.A., Abramsky, L., Dattani, N., Fawell, J., Briggs, D., Jarup, L., Elliott, P. (2008). Chlorination disinfection by-products and risk of congenital anomalies in England and Wales. *Environ Health Perspect*, 16, 216-222.
27. Andersen, S.O., Sarma, K.M. (2002). *Protecting the ozone layer*. London, UK: Earthscan Press.
28. Rodriguez, J.M. (1993). Probing stratospheric ozone. *Science*, 261, 1128–1129.
29. Lloyd, S.A. (1993). Stratospheric ozone depletion. *Lancet*. 342, 1156–1160.
30. De Fabo, E.C. (2000). Stratospheric ozone depletion: UVB “effects”, the neglected aspect. *Int J Circumpolar Health*, 59, 2–3.
31. Isaksen, I.S.A. (1998). *Tropospheric ozone: Regional and global scale interactions*. Dordrecht, Holland: Kluwer Academic Press.
32. Slaper, H., Velder, G.J.M., Daniel, J.S., de Gruijl, F.R. and van der Leun, J.C. (1996). Estimates of ozone depletion and skin cancer incidence to examine the Vienna Convention achievements. *Nature*, 384, 256–258.

33. Leh, F. (1973). Ozone, Properties, toxicity, and applications. *J Chem Ed*, 50, 404–405.
34. United States Environmental Protection Agency, 1999. Alternative Disinfectants and Oxidants Guidance Manual. Office of Water. EPA 815-R-99-014, April 1999.
http://www.epa.gov/safewater/mdbp/alternative_disinfectants_guidance.pdf
35. Liberti, L. and Notarnicola, M. (1999). Advanced treatment and disinfection for municipal wastewater reuse in agriculture. *Water Sci. Tech*, 40, 235–245.
36. Von Gunten U. (2003). Ozonation of drinkingwater: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine. *Water Research*, 37, 1469–1487.
37. Victorin, K. (1992). Review of the genotoxicity of ozone, *Mutat Res.*, 277, 221–238.
38. "Ozone Generators that are Sold as Air Cleaners: An Assessment of Effectiveness and Health Consequences". EPA Website.
<http://www.epa.gov/iaq/pubs/ozonegen.html>. Retrieved on 30 August 2006.
39. Klaasen, C.D. (2001). *Casarett & Doull's Toxicology* (6th ed.). New York: McGraw-Hill.
40. Krishna, M.T., Mudway, I., Kelly, F.J., Frew, A.J., Holgate, S.T. (1995). Ozone, airways and allergic airways disease. *Clin Exp Allergy*, 25, 1150–1158.
41. Pryor, W.A.. (1992). *Free Radical Biology & Medicine*, 12, 83–8.
42. Hobbes, C.H. and Mauderly, J.L. (1991). *Clinical Toxicology*, 29, 375–384.
43. National Research Council. (1977) Ozone and other photochemical oxidants. Washington, DC: National Academy of Sci.
44. Straka, M.R., Gordon, G. and Pacey, G.E. (1985). Residual aqueous ozone determination by gas diffusion flow injection analysis. *Analytical Chem.*, 57, 1799–1803.
45. Sandermann, H. (1996). Ozone and Plant Health. *Annual Review of Phytopathology.*, 34, 347-366.
46. Greene, A.K., Few, B.K., and Serafini, J.C. (1993). A comparison of ozonation and chlorination for the disinfection of stainless steel surfaces. *J. Diet. Sci.*, 76, 3617–3620.

47. Pryor, W.A., Das, B. and Church, D.F. (1991). The ozonation of unsaturated fatty acids: aldehydes and hydrogen peroxide as products and possible mediators of ozone toxicity. *Chem Res Toxicol.*, 4, 341–348.
48. Hinze, H., Prakash, D. and Holzer, H. (1987). Effect of ozone on ATP cytosolic enzymes and permeability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 147, 105–108.
49. Mudd, J.B., Levitt, R., Ongun, A., and McManus, T.T. (1969). Reaction of ozone with amino acids and proteins. *Atmos Environ.*, 3, 669–682.
50. Scott, D.B.M. and Leshner E.C. (1963). Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 85, 567–576.
51. Doroszkiewicz, V. , Sikorska, I., Jankowski, S. (1994). Studies on the influence of ozone on complement-mediated killing of bacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 9, 281–286.
52. Komanapalli, I.R. and Lau, B.H.S. (1998). Inactivation of bacteriophage λ , *Escherichia coli* and *Candida albicans* by ozone. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 49, 766–769.
53. Thanomsub, B., Anupunpisit, V., Chanphetch, S., Watcharachaipong, T., Poonkhum, R. and Srisukonth, C. (2002). Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen Appl Microbiol.*, 48, 193–199.
54. Kanofsky, J.R. and Sima, P. (1991). Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem.*, 266, 9039–9042.
55. Maillard, J.Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *J Appl Microbiol, Symposium Supplement*, 92, 16–27.
56. Shinriki, N., Ishizaki, K., Miura, K., Ueda, T. and Harada, F. (1983). Degradation of nucleic acids with ozone. *Chem Pharm Bull.*, 31, 3601–3608.
57. Khadre, M.A. and Yousef, A.E. (2001). Sporicidal action of ozone and hydrogen peroxide: a comparative study. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 131–138.
58. Herbold, K., Flehmig, B. and Botzenhart, K., (1989). Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl Environ Microbiol.* 55, 2949–2953.
59. Toledo, R.T. (1975). Chemical sterilants for aseptic packaging. *Food Technol.* 29, 102–112.

60. www.ozoneapplications.com
61. Broadwater, W.T., Hoehn, R.C. and King, P.H. (1973). Sensitivity of three selected bacterial species to ozone. *Appl Microbiol.*, 26, 391–393.
62. Ishizaki, K., Shinriki, N. and Matsuyama, H. (1986). Inactivation of Bacillus spores by gaseous ozone. *J Appl Bacteriol*, 60, 67–72.
63. Peeters, J.E., Mazas, E.A., Masschelein, W.J., Martinez de Maturana IV, Debacker, E. (1989). Effect of disinfection of drinking water with ozone or chlorine dioxide on survival of Cryptosporidium parvum oocysts. *Appl Environ Microbiol*, 55 (6), 1519–1522.
64. Vaughn, J.M., Chen, Y.S., Lindburg, K., Morales, D. (1987). Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl Environ Microbiol*, 53, 2218–2221.
65. Pryor A. (2001). Petition For the Inclusion of Ozone Gas Used for Weed Control in the National List. Submitted to National Organic Program, USDA
66. Leclerc, H., Schwartzbrod, L., Dei-Cas, E. (2002). Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol.*, 28 (4), 371 – 409.
67. Florjanic, M., Kristl, J. (2006). Microbiological quality assurance of purified water by ozonization of storage and distribution system. *Drug Dev Ind Pharm*, 32 (10), 1113–21.
68. Ozerol, I.H., Bayraktar, M., Cizmeci, Z., Durmaz, R., Akbas, E., Yildirim, Z., Yologlu, S. (2006). Legionnaire's disease: a nosocomial outbreak in Turkey. *Journal of Hospital Infection*, 62, 50–57.
69. Hart, C.A., Makin, T. (1991). Legionella in hospitals: a review. *J Hosp Infect*, 18, 481–489.
70. Blanc, D.S., Carrara, P., Zanetti, G., Francioli, P. (2005). Water disinfection with ozone, copper and silver ions, and temperature increase to control Legionella: seven years of experience in a university teaching hospital. *Journal of Hospital Infection*, 60, 69–72.
71. Anaissie, E.J., Penzak, S.R., Dignani, C. (2002). The hospital water supply as a source of nosocomial infections: a plea for action. *Arch Intern Med.*, 162, 1483-1492.
72. Anaissie, E.J., Kuchar, R.T., Rex, J.H., et al. (2001). Fusariosis associated with pathogenic Fusarium species colonization of a hospital water system: a new

- paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clin Infect Dis.*, 33, 1871-1878.
73. Anaissie, E.J., Stratton, S.L., Dignani, M.C., et al. (2002). Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clin Infect Dis.*, 34, 780-789.
 74. Anaissie, E.J., Costa, S.F. (2001). Nosocomial aspergillosis is waterborne. *Clin Infect Dis.*, 33, 1546-1548.
 75. Squier, C., Yu, V.L., Stout, J.E. (2000). Waterborne Nosocomial Infections, 2 (6), 490-496.
 76. Tanner, B.D., Kuwahara, S., Gerba, C.P., Reynolds, K.A. (2004). Evaluation of electrochemically generated ozone for the disinfection of water and wastewater. *Water Sci Technol.*, 50 (1), 19-25.
 77. Chiang, C.F., Tsai, C.T., Lin, S.T., Huo, C.P., Lo, K.V. (2003). Disinfection of hospital wastewater by continuous ozonization. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.*, 38 (12), 2895–908.
 78. Alonso, E., Santos, A., Riesco, P. (2004). Micro-organism re-growth in wastewater disinfected by UV radiation and ozone: a micro-biological study. *Environ Technol.*, 25 (4), 433–41.
 79. Kim, J.G., Yousef, A.E., Dave, S. (1999). Application of ozone for enhancing the microbiological safety and quality of foods: a review. *J Food Prot* 62 (9), 1071-87.
 80. Xu, L. (1999). Use of ozone to improve the safety of fresh fruits and vegetables. *Food Technol.*, 53 (10) , 58-61.
 81. Zhao, J., Cranston, P.M. (1995). Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. *J Sci Food Agric.*, 68, 11-8.
 82. Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B., Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl Environ Microbiol.* 61(9), 3471-5.
 83. Rodriguez-Romo, L.A., Yousef, A.E. (2005). Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. *J Food Prot.*, 68 (4), 711–7.

84. Finch, G.R., Fairbairn, N. (1991). Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand-free phosphate buffer by using ozone. *Appl Environ Microbiol*, 57 (11) , 3121-6.
85. Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R. (1990). Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl Environ Microbiol.*, 56 (5), 1423-8.
86. Aydogan, A., Gurol, M.D. (2006). Application of gaseous ozone for inactivation of *Bacillus subtilis* spores. *J Air Waste Manag Assoc.*, 56 (2), 179-85.
87. Beggs, C.B. (2003). Airborne transmission of infection in hospital buildings: fact or fiction? *Indoor Built Environ.*, 12, 9–18.
88. Sunnen, G.V. (2003). SARS and Ozone Therapy: Theoretical Considerations, <http://www.triroc.com/sunnen/topics/sars.html>
89. Dunston, N.C., Spivak, S.M. (1997). A Preliminary Investigation of the Effects of Ozone on Post-Fire Volatile Organic Compounds. *Journal of Applied Fire Science.*, 6 (3), 231-242.
90. U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). 1996. Air Quality Criteria for Ozone and Related Photochemical Oxidants. Research Triangle Park, NC: National Center for Environmental Assessment-RTP Office; report nos. EPA/600/P-93/004aF-cF, 3v. NTIS, Springfield, VA; PB-185582, PB96-185590 and PB96-185608.
91. Bezirtzoglou, E., Cretoiu, SM., Moldoveanu, M., Alexopoulos, A., Lazar, V., Nakou, M. (2008). A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *Journal of dentistry*, 36, 600-605.
92. Baysan, A. and Lynch, E. (2006). The use of ozone in dentistry and medicine Part 2: ozone and root caries. *Primary Dental Care*, 13, 37-41.
93. Baysan, A. and Lynch, E. (2005). The use of ozone in dentistry and medicine. *Primary Dental Care*, 12,47-52.
94. Grootvedld, M., Silwood, C.J.L.. and Lynch, E. (2006). High resolution ¹H NMR investigations of the oxidative consumption of salivary biomolecules by ozone: relevance to the therapeutic applications of this agent in clinical dentistry. *Biofactors* , 27, 5-18.

95. Bocci, V. (1999). Biological and clinical effects of ozone. Has ozone therapy a future in medicine? *J Biomed Sci.*, 56, 270–279.
96. http://ion_effects.tripod.com/index.html
97. Giannini, A.J., Castellani, S., Giannini, M.C. (1982). Reversal of hyperserotonergic anxiety with generated anions in human subjects. *Society for Neuroscience Abstracts*, 8, 76-9.
98. Goel, N., Etwaroo, G.R. (2006). Bright light, negative air ions and auditory stimuli produce rapid mood changes in a student population: a placebo-controlled study. *Psychol Med*, 36 (9), 1253-63.
99. Giannini, A.J., Giannini, J.D., Melemis, S., Giannini, J.N. (2007). Treatment of acute mania with ambient air ionization: Variants of climactic heat stress and serotonin syndrome. *Psychological Reports.*,100, 157-163.
100. Diamond, M. (1988). *Enriching Heredity: The Impact of the Environment on the Anatomy of the Brain*. New York: Free Press.
101. Jones, D.P., O'Connor, S.A., Collins, J.V., et al. (1976). Effect of long-term ionized air treatment on patients with bronchial asthma. *Thorax*, 31 (4), 428–32.
102. Gualtierotti, R., Solimene, U., Tonoli, D. (1977). Ionized air respiratory rehabilitation technics. *Minerva Medica*, 68, 3383–9.
103. Kawamoto, S., Oshita, M., Fukuoka, N., Shigeta, S., Aki, T., Hayashi, T., Nishikawa, K., Ono, K. (2006). Decrease in the allergenicity of Japanese cedar pollen allergen by treatment with positive and negative cluster ions. *Int Arch Allergy Immunol*, 141 (4), 313- 21.
104. Yamada, R., Yanoma, S., Akaike, M., Tsuburaya, A., Sugimasa, Y., Takemiya, S., Motohashi, H., Rino, Y., Takanashi, Y., Imada, T. (2006). Water-generated negative air ions activate NK cell and inhibit carcinogenesis in mice. *Cancer Lett*, 239 (2), 190-7.
105. Iwama, H. (2004). Negative air ions created by water shearing improve erythrocyte deformability and aerobic metabolism. *Indoor Air*, 14 (4), 293-297.
106. Yamada, S., Chino, D. (2000). Inhibitory effects of NAI on erythrocyte aggregation. *Med & Biology*, 141 (3), 79-83.
107. Negative-Ions and Computers, Alaska Science Forum (<http://www.gi.alaska.edu/ScienceForum/ASF5/505.html>)

108. "[Air ionizers wipe out hospital infections](http://www.newscientist.com/news/news.jsp?id=ns99993228)". The New Scientist. <http://www.newscientist.com/news/news.jsp?id=ns99993228>. Retrieved on 30 August 2006.
109. Marin, V., Moretti, G., Rassa, M. (1989). Effects of ionization of the air on some bacterial strains. *Ann Ig.*, 1 (6), 1491-500.
110. Mitchell, B.W. and King, D.J. (1994). Effect of negative air ionization on airborne transmission of newcastle disease virus. *Avian Diseases*, 38, 725–732.
111. Krueger, A.P. and Reed, E.J. (1976). Biological impact of small air ions. *Science*, 193, 1209–1213.
112. Kingdon, K.H. (1960). Interaction of atmospheric ions with biological material. *Physics in Medicine and Biology*, 5, 1–10.
113. Burke, F.M., Samarawickrama, D.Y., Johnson, N.D., Beighton, D. and Lynch, E. (1995). Use of negative air ion treatment on carious microflora. *Journal of Dental Research*, 74, 952.
114. Cousins, D., Copus, J. and Wilson, M. (1991). Microbicidal effect of negative air ions. *Journal of Dental Research*, 70, 709.
115. Gabbay, J., Bergerson, O., Levi, N., Brenner, S. and Eli, I. (1990). Effect of ionization on microbial air pollution in the dental clinic. *Environmental Research*, 52, 99–106.
116. Gast, R.K., Mitchell, B.W. and Holt, P.S. (1999). Application of negative air ionization for reducing experimental airborne transmission of *Salmonella enteritidis* to chicks. *Poultry Science*, 78, 57–61.
117. Charry, J.M. (1984). Biological effects of small air ions: a review of finding and methods. *Environmental Research*, 34, 351–389.
118. Reiter, R. (1993). Possible biological effects of electric and magnetic parameters in the environment. *Experientia*, 49, 769–774.
119. Tanimura, Y., Nakatsugawa, N., Ota, K. and Hirotsuji, J. (1997). Inhibition of microbial growth using negative air ions. *Journal of Antibacterial and Antifungal Agents*, 25 (11), 625–631.
120. Phillips, G., Harris, G.J. and Jones, M.W. (1964). Effect of air ions on bacterial aerosols. *International Journal of Biometeorology*, 8 (1), 27–37.
121. Tanimura, Y., Hirotsuji, J. and Tanaka, K. (1998). Food preservation technique using a mixed gas containing negative ions and ozone. *Food Industry*, 41 (10), 71–77.

122. Li, J., Wang, X., Yao, H., Yao, Z., Wang, J. and Luo, Y. (1989). Influence of discharge products on post-harvest physiology of fruit. *International Symposium on High Voltage Engineering*, 6, 1–4.
123. Hildebrand, P.D., Song, J., Forney, C.F., Renderos, W.E. and Ryan, D.A.J. (2001). Effects of corona discharge on decay of fresh fruits and vegetables. *Proceedings of the Fourth International Conference on Postharvest Science. Acta Horticulturae*, 553, 425–426.
124. Song, J., Fan, L., Hildebrand, P.D. and Forney, C.F. (2000). Biological effects of corona discharge on onions in a commercial storage facility. *Hort Technology*, 10 (3), 608–612.
125. Rosenthal, B., Juven, J. and Gordin, S. (1979). Effects of negative charged atmosphere on micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology* 46, 451–454.
126. Rosenthal, I. (1981). A working hypothesis for negative ion generators. *Experientia*, 39, 718–719.
127. Kroling, P. (1985). Natural and artificially produced air ions: a biologically relevant climate factor? *International Journal of Biometeorology*, 29, 233–242.
128. Pethig, R. (1984). Survey of the methodology for evaluating negative air ions relevance to biological studies. *Methods in Enzymology*, 105, 238–248.
129. Shahin, M.M. (1969). Nature of charge carriers in positive and negative corona discharges. *Applied Optics*, 3, 106.
130. Kellog, E.W. III, Yost, M.G., Barthakur, N. and Kreuger, A.P. (1979). Superoxide involvement in the bactericidal effects of negative air ions on *Staphylococcus albus*. *Nature*, 281, 400–401.
131. Laroussi, M., Saylor, G.S., Glascock, B.B., McCurdy, B., Pearce, M.E., Bright, N.G. and Malott, C.M. (1999). Images of biological samples undergoing sterilization by a glow discharge at atmospheric pressure. *IEEE Trans Plasma Sci.*, 27, 34–35.
132. Montie, T.C., Kelly-Wintenberg, D. and Roth, J.R. (2000). An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGPD) for sterilization of surfaces and materials. *IEEE Trans Ind Appl.*, 28, 41–50.
133. Mendis, D.A., Rosenberg, M. and Azam, F. (2000). A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE Trans Plasma Sci.*, 28, 1304–1306.

134. Noyce, J.O. and Hughes, J.F. (2002). Bactericidal effects of negative and positive ions generated in nitrogen on *Escherichia coli*. *J Electrostat*, 54, 179–187.
135. Noyce, J.O. and Hughes, J.F. (2003). Bactericidal effects of negative and positive ions generated in nitrogen on starved *Pseudomonas veronii*. *J Electrostat*, 57, 49–58.
136. Dolezalek, H. (1985). Remarks on the physics of atmospheric ions (natural or artificial). *International Journal of Biometeorology*, 29, 211–221.
137. Singh, A., Goering, R. V., Simjee, S., Foley, S. L. and Zervos M. J. (2006). Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Clin Microbiol Rev*, 19, 512–530.
138. Tenover, F.C., Arbeit, R.D., Goering, R.V., Mickelsen, P.A., Murray, B.E., Persing, D.H., Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 2233–2239.
139. Rementeria, A., Gallego, L., Quindos, G., Garaizar, J. (2001). Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clin. Microbiol. Infect.*, 7, 331–336.
140. Gautam, A.K., Kumar, S., Sabumon, P.C. (2007). Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater, *J. Environ. Manage.*, 83, 298 – 306.
141. Arana, I., Santorum, P., Muela, A. and Barcina, I. (1999). Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 883-888.
142. Tsai, CT. and Lin, ST. (1999). Disinfection of hospital waste sludge using hypochlorite and chlorine dioxide. *Journal of Applied Microbiology*, 86, 827–833.
143. Voidarou, C., Tzora, A., Skoufos, I., Vassos, D., Galogiannis, G., Alexopoulos A. and Bezirtzoglou, E. (2007). Experimental effect of ozone upon some indicator bacteria for preservation of an ecologically protected watery system. *Water, Air, & Soil Pollution*, 181, 161–171.
144. Li, C.-S., Wang, Y.-C. (2003). Surface Germicidal Effects of Ozone for Microorganisms. *AIHA Journal*, 64, 533–537.

145. Selma, M.V., Allende, A., Ivez, F.L-G., Conesa, M.A., Gil, M.I. (2008). Disinfection potential of ozone, ultraviolet-C and their combination in wash water for the fresh-cut vegetable industry. *Food Microbiology*, 25, 809– 814.
146. Fletcher, L.A., Gaunt, L.F., Beggs, C.B., Shepherd, S.J., Sleigh, P.A., Noakes, C.J. and Kerr, K.G. (2007). Bactericidal action of positive and negative ions in air. *BMC Microbiology*, 7, 32.
147. Seo, K.H., Mitchell, B.W., Holt, P.S., Gast, R.K. (2001). Bactericidal Effects of Negative Air Ions on Airborne and Surface *Salmonella* Enteritidis from an Artificially Generated Aerosol. *Journal of Food Protection*, 64 (1), 113-116.
148. Tyagi, A.K., Nirala, B.K., Malik, A. and Singh, K. (2008). The effect of negative air ion exposure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 43 (7), 694-9.
149. Bufflea, M.-O., Schumacherb, J., Salhia, E., Jekelb, M., Guntena, U. (2006). Measurement of the initial phase of ozone decomposition in water and wastewater by means of a continuous quench-flow system: Application to disinfection and pharmaceutical oxidation. *Water Research*, 40, 1884-1894.

EK-1: PFGE moleküler tiplerede kullanılan standart protokoller

a) *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirmesinde kullanılan “pulsed-field” jel elektroforez (PFGE) protokolü

A- İzolatların hazırlanması

1. Falkon tüpleri içerisinde fosfat tamponu ile hazırlanmış Gram negatif bakteriyel süspansiyonlar santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde, bakteri yoğunluğu spektrofotometre yardımıyla 590 nm’de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde süspansiyon edilmiştir.
2. Hücre süspansiyonu, 2500 x g’de, 4°C’de, 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılır.
3. Pelletin üzerine tekrar 1 ml HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapılır.

B- İzolatların agaroz gömülmesi

1. HST içerisinde %2’lik düşük erime ısıları agaroz hazırlanır.
 - 0.200 g düşük erime ısıları agaroz, 100 ml’lik balona konur
 - Üzerine 9 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.
 - Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlanır.
 - Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C’lik su banyosuna konulur.
 - %10’luk sodyum dodezil sülfattan (50°C de ısıtılmış) 1 ml eklenerek iyice karıştırılır.
2. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl ependorf tüplere aktarılır. Daha sonra 50°C’de tutulan ve içerisinde 200 µl düşük erime ısıları agaroz-SDS bulunan tüpe eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanır.
3. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından agaroz kalıbına 100 µl dağıtılır.
4. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C’de, 10 dakika bekletilir.

C- Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml’lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre lizis solüsyon-1 konulur.

6 ml hücre parçalama tamponu-1 (2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K)

hazırlamak için;

proteinaz K (10 mg/ml)	→ 900 µl
lizozim (100mg/ml)	→ 150 µl
10X hücre parçalama tamponu-1	→ 600 µl
Distile su	→ 4350 µl

2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak hücre parçalama tamponu-1 içerisine yerleştirilir.
3. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir
4. hücre parçalama tamponu-1 dökülerek, yerine 0.5 ml hücre parçalama tamponu-2 konulur.

6 ml hücre parçalama tamponu-2 (400µg/ml proteinaz K) hazırlamak için;

proteinaz K (10 mg/ml)	→ 240 µl
hücre parçalama tamponu-2	→ 5760 µl

5. 55°C'de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.

D- Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaşması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletilir.
2. Dikkatlice hücre parçalama tamponu-2 aspire edilir.
3. İçinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 4 ml steril ultra saf sudan eklenerek, 50°C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletilir.
4. Su tamamen aspire edilir. Üçüncü maddede belirtilen su ile yıkama işlemi iki defa daha tekrarlanır. Su tamamen aspire edilir.
5. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE tamponuyla yıkanır.
6. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

E- Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

A. baumannii için etkinliği daha önce araştırılmış olan *Apal*, *E. coli* ve *Klebsiella* spp için *Xbal* ve *Pseudomonas aeruginosa* için *Spel* enzimi kullanılmıştır.

A. baumannii DNA'sını içeren kalıpların *Apal* RE ile kesimi:

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla $\frac{1}{4}$ oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 μ l 1x *Apal* tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletir. (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklanır). Sonra sıvı aspire edilir.
2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10x <i>Apal</i> tamponu	→ 10 μ l
<i>Apal</i> enzimi (10 U / μ l)	→ 3 μ l
<u>steril ultra saf su</u>	<u>→ 87 μl</u>
Toplam hacim	→ 100 μ l
3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir.
5. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

E.coli ve *Klebsiella* bakterilerinin DNA'sını içeren kalıpların *Xba*I RE ile kesimi:

Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10x <i>Xba</i> I tamponu	→ 10 μ l
<i>Xba</i> I enzimi (10 U / μ l)	→ 2 μ l
<u>steril ultra saf su</u>	<u>→ 88 μl</u>
Toplam hacim	→ 100 μ l

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edilir.

P. aeruginosa DNA'sını içeren kalıpların *Spe*I RE ile kesimi:

Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10x <i>Spe</i> I tamponu	→ 10 μ l
<i>Spe</i> I enzimi (10 U / μ l)	→ 2 μ l
<u>steril ultra saf su</u>	<u>→ 88 μl</u>
Toplam hacim	→ 100 μ l

Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edilir.

F- Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 0.5x TBE içinde 100 ml olacak şekilde %1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlanır.
 - i. 1 g "pulsed-field certified agarose" 200 ml'lik balona konur.
 - ii. Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.
 - iii. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutulur.
 - iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konulur.
2. Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırmaması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konulur.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklenir.
4. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir.
5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür.
6. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar %1'lik agarozla doldurulabilir.
7. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir.

G- Elektroforez

E. coli ve ***Klebsiella*** ve ***A. baumannii*** bakterileri için aynı elektroforez koşulları uygulanır. CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları:

Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat (TBE tamponu pH=8.0).

***Pseudomonas aeruginosa* için elektroforez koşulları**

Blok 1: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 45 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat.

Blok 2: Başlangıç vuruş süresi 30 sn, bitiş vuruş süresi 45 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 6 saat (TBE tamponu pH=8.4)

H- Sonucun gözlenmesi ve analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika boyanır.
2. UV ışığa altında görüntülenir.

b) *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler tiplendirmesinde kullanılan “pulsed-field” jel elektroforez (PFGE) protokolü

A- İzolatların hazırlanması

1. Falkon tüpleri içerisinde fosfat tamponu ile hazırlanmış *S. aureus* bakterisi süspansiyonları santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet hücre süspansiyon tamponu (HST) içinde, bakteri yoğunluğu spektrofotometre yardımıyla 590 nm’de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde süspanse edilmiştir.
2. Hücre süspansiyonu, 2500 x g’de, 4°C’de, 15 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üstteki HST atılır.
3. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapılır.
4. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre yardımıyla 590 nm’de 1 absorbans (yaklaşık McFarland 4 bulanıklığı) olacak şekilde ayarlanır.

B- İzolatların agaroz gömülmesi

1. HST içerisinde %2’lik düşük erime ısıları agaroz hazırlanır.
 - 0.20 g agaroz, üzerine 10 ml HST eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın erimesi sağlanır.

- Agaroz iyice çözülmeye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlanır.
 - Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konulur.
2. Her suş için bir agaroz kalıbı işaretlenip buz kabına oturtulur.
 3. HST içinde hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 150 µl alınarak, üzerine 2 µl lizostafin (1 mg/ml distile) eklenir. Hücre-enzim karışımına, 50°C'de tutulan düşük erime ısıly agarozdan 150 µl eklenir. Birkaç defa pipetaj yapılarak hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanır.
 4. Bekletilmeden, hücre-agaroz karışımından 100 µl hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına dağıtılır.
 5. Kalıplar, agaroz katılaştıncaya kadar +4°C'de, 10 dakika bekletilir.

C-Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması

1. 5 ml'lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre parçalama tamponu-1 konulur.

6 ml hücre parçalama tamponu-1 için;

hücre parçalama tamponu-1 → 600 µl

distile su → 5400 µl

2. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solüsyonuna yerleştirilir.
3. 37°C'de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.
4. Hücre parçalama tamponu-1 dökülerek, yerine 0.5 ml hücre parçalama tamponu-2 konulur.

6 ml hücre parçalama tamponu-2 (50µg/ml proteinaz K) hazırlamak için;

proteinaz K (10 mg/ml) → 30 µl

hücre parçalama tamponu-2 → 5970 µl

5. 50°C'de yarım saat çalkalamalı su banyosunda bekletilir.

D- Hücre lizizinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

1. Lizis aşamasından sonra agaroz kalıbının katılaştırılması için tüpler buz içerisinde en az 15 dakika bekletilir.
2. Dikkatlice PK solusyonu aspire edilir.
3. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 30 dakika olmak üzere), 4 ml TE tamponuyla yıkanır

4. Böylece içinde saflaştırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi ile kesime hazır hale getirilmiş olur.

E- Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürü yardımıyla $\frac{1}{4}$ oranında kesilir. Parçalardan biri, 100 μ l 1x *Sma*I tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 30°C'de 10 dakika bekletir. Sonra sıvı aspire edilir.
2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlanır.

10x <i>Sma</i> I tamponu	→ 10 μ l
<i>Sma</i> I enzimi (10 U / μ l)	→ 2.5 μ l
<u>steril ultra saf su</u>	<u>→ 87.5 μl</u>
Toplam hacim	→ 100 μ l
3. Bu karışımın içerisine, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 30°C'de 2 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletilir.
5. Kalıplar elektroforez için hazırdır.

F- Elektroforez jelinin hazırlaması ve kalıpların jele yüklenmesi

1. 0.5x TBE içinde 100 ml olacak şekilde %1'lik agaroz (pulsed-field certified agarose) hazırlanır.
 - i. 1 g "pulsed-field certified agarose" 200 ml'lik balona konur.
 - ii. Üzerine 100 ml 0.5 x TBE eklenir, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlanır.
 - iii. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 60 saniye tutulur, çıkarılarak hafifçe karıştırılır, tekrar 15 saniye mikrodalga fırınında tutulur.
 - iv. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45-50°C'lik su banyosuna konulur.
2. Agaroz dökülecek kaset hazırlanır, sızdırmaması için etrafı bantlanır. Su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konulur.
3. RE ile kesilmiş olan agaroz kalıplarının her biri, 15 dişli tarağın dişlerinin uç kısmına (tarağın uç çizgisine tam paralel olacak şekilde) yerleştirilir. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlerine kontrol suşuna ait kalıplar yüklenir.
4. Kurutma kâğıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alınır. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım

DNA'nın yürüyeceği yöne gelmek kaydıyla, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerleştirilir.

5. Su banyosundan çıkarılmış ve sıcaklığı yaklaşık 45-50°C (çok önemli) olan agaroz dikkati bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine dökülür.
6. Oda ısısında 20–30 dakika katılaşmaya bırakılır. Tarak dikkatlice çıkarılır. İstenirse çukurlar %1'lik agarozla doldurulabilir.
7. Sonra, agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılır, tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mililitre 0.5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilir.

G- Elektroforez

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez koşulları: Başlangıç vuruş süresi 5,3 sn, bitiş vuruş süresi 34,9 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, süre 20 saat

H- Sonucun gözlenmesi ve analizi

1. Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınır. 20 dakika boyanır.
2. UV ışığa altında görüntülenir.
3. *Gel logic 2200 imaging system* (ayrım gücü: 1708x1280 pixel, Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekilir. Resimler TIFF formatında kayıt edilir.

ÖZGEÇMİŞ

Nafia Canan GÜRSOY

1980 Yılında Malatya'da doğdu. 1997 yılında İnönü Üniversitesi Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği Bölümünde lisans öğrenimine başladı. 2001-2003 yılları arasında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programını tamamladı. 2003 yılında İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora Programına başladı. Yabancı dili İngilizcedir.