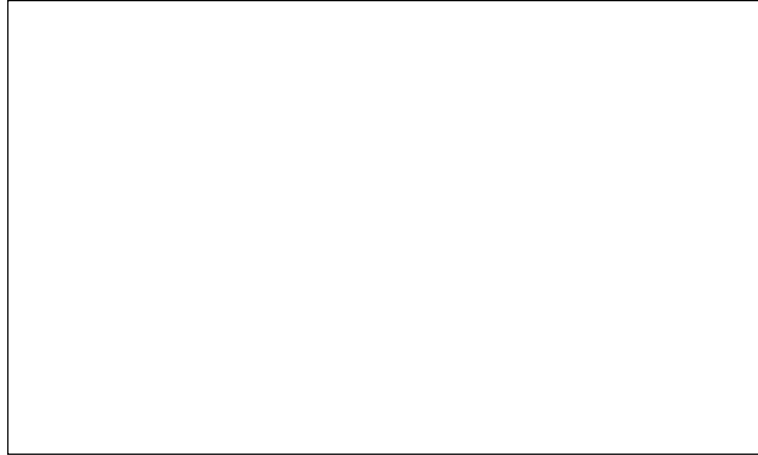




SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ





BAZI MİKROORGANİZMALARIN BİYOFİLM OLUŞTURMA
YETENEĞİ ÜZERİNE DEZENFEKTANLARIN ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Ayşen AKYÜZ
1168208102

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç.Dr. Dumrul GÜLEN
Tez No: 2019/50
2019- TEKİRDAĞ

T.C

**TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI MİKROORGANİZMALARIN BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEĞİ
ÜZERİNE DEZENFEKTANLARIN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ayşen AKYÜZ

1168208102

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Dumrul GÜLEN

Tez No: 10252238

2019-TEKİRDAĞ

KABUL ve ONAY

Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

çerçevesinde Doç.Dr. Dumrul GÜLEN danışmanlığında yürütülmüş bu çalışma,
aşağıdaki jüri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

18/04/2019

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Ayşen
AKYÜZ'ün "BAZI MİKROORGANİZMALARIN BİYOFİLM OLUŞTURMA
YETENEĞİ ÜZERİNE DEZENFEKTANLARIN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI
" başlıklı tezi 18/04/2019 günü saat 15.00'da Namık Kemal Üniversitesi Lisansüstü
Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca
değerlendirilerek kabul edilmiştir.**

.....
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yürüttüğüm tez çalışmamda bilgi ve birikimlerinden yararlandığım danışman hocam Doç. Dr. Dumrul GÜLEN'e teşekkürlerimi iletirim.

Eğitim sürecim içerisinde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda desteklerini gördüğüm, hoşgörü ortamı içerisinde geniş tecrübeleriyle bizlere yön veren, hayatımıza çok güzel dokunuşlarda bulunan çok değerli ve çok sevdiğim Yar. Doç. Berna ERDAL'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

Hayatımın her döneminde desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen; başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan; kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli anneme, babama, ablama ve kardeşim Ebru AKYÜZ'e sonsuz teşekkürler.

ÖZET

Akyüz A. Bazı Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Yeteneği Üzerine Dezenfektanların Etkisinin Araştırılması, Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı Yüksek Lisans Tezi, Tekirdağ 2019. *S.aureus* ve *P.aeruginosa*'nın virulans faktörlerinden olan biyofilm oluşturma yetenekleri son yıllarda büyük ölçüde önem kazanmıştır. Biyofilm bakterileri antibiyotik ve dezenfektanlara karşı daha dirençli hale getirdiğinden dolayı biyofilm oluşumunun önlenmesinde alternatif yöntemler aranmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Biyofilm oluşumunu önleyebilmek için dezenfektanların uygun konsantrasyon ve temas süresinde kullanılması oldukça önemlidir.

Bu çalışmada; hastanede en sık kullanılan farklı konsantrasyonlardaki dezenfektanların ve ozonun *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının üzerindeki etki ve etki süresini araştırmak aynı zamanda etki sürelerinin sonunda üreme gösteren mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilme kapasitesinin, dezenfektan ile temas ettirilmeden önceki biyofilm oluşturabilme yeteneklerini ile karşılaştırmak amacıyla yapıldı.

Çalışma sonucunda elde edilen verilerde ozon kullanılan bütün dezenfektanlardan daha hızlı antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu görüldü. Dezenfektan maddeler arasından en hızlı sürede antimikrobiyal etkinliğe sahip olan perasetik asit ve sırayla ortafitalaldehit, etil alkol, glutalaldehit ve hidrojen peroksittir. Ayrıca temas süreleri sonunda üreyen mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilme yeteneği ile dezenfektan temasa bırakılmadan önceki biyofilm oluşturabilme yeteneği karşılıklı olarak değerlendirildiğinde dezenfektanların biyofilm oluşmasını önlemede etkili olmadığı görüldü. Sonuç olarak; Bu çalışmanın dezenfektan ve ozonun temas süreleri açısından etkilerini ve dezenfektanların biyofilm oluşturma yeteneklerini araştıran nadir çalışmalardan birisidir.

Anahtar kelimeler: Mikroorganizma, Dezenfektan, Ozon, Etkinlik Süresi, Biyofilm

ABSTRACT

Akyüz A. The investigation of the effects of disinfectants on the ability of some microorganisms to form biofilm. Namık Kemal University Institute of Health Sciences, Department of Medical Microbiology Master of Science Thesis, Tekirdağ, Turkey. Biofilm-forming abilities, one of the virulence factors, have gained considerable importance in recent years. As biofilm makes bacteria more resistant to antibiotics and disinfectants, there is a need for alternative methods to prevent biofilm formation. In order to prevent biofilm formation, it is important to use disinfectants at appropriate concentration and contact time.

In this study; The aim of this study was to investigate the duration and duration of action of disinfectants and ozone in *S.aureus* and *P.aeruginosa* strains of different concentrations of the most frequently used in the hospital.

The results of the study revealed that antimicrobial efficacy was faster than that of all disinfectants using ozone. Among the disinfecting agents, peracetic acid having antimicrobial activity in the fastest time and orthafitalaldehyde, ethyl alcohol, glutalaldehyde and hydrogen peroxide respectively. In addition, the biofilm formation ability of microorganisms produced at the end of contact times and the ability to produce biofilm prior to disinfectant contact were evaluated and the disinfectants were not effective in preventing biofilm formation.

As a result; This is one of the rare studies investigating the effects of disinfectant and ozone on contact times and the biofilm formation of disinfectants.

Key words : Microorganism, Disinfection, Ozone, Activity time, Biofilm

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
TABLULAR DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Dezenfeksiyon	4
2.2. Sterilizasyon	4
2.3. Dezenfektan	5
2.3.1. Dezenfeksiyonu Etkileyen Faktörler	6
2.3.2. Dezenfektan Kullanımında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar	6
2.4. Dezenfektanların Sınıflandırılması	7
2.4.1. Düşük Dereceli Dezenfeksiyon	7
2.4.1.1. Fenollü Dezenfektanlar	7
2.4.1.2. Kuarterner Amonyum Bileşikleri	8
2.4.2. Orta Dereceli Dezenfeksiyon	9
2.4.2.1. Alkoller	9
2.4.2.2. Hipokloridler	10
2.4.2.3. İyot ve İyodofor Dezenfektanlar	11

2.4.3. Yüksek Dereceli Dezenfeksiyon	11
2.4.3.1. Hidrojen Peroksit	11
2.4.3.2. Gluteraldehit	12
2.4.3.3. Formaldehit	13
2.4.3.4. Orto-Fitalaldehit (OPA)	13
2.4.3.5. Perasetik Asit	14
2.5. Dezenfektanların Etki Tarzları ve Dezenfektanların Türleri	14
2.5.1. Bakteri Membranlarının Fonksiyonunu Bozanlar	15
2.5.2. Proteinleri Denatüre Edenler	15
2.5.3. Enzim Aktivitesini Bozanlar	15
2.5.4. Nükleer Sistemi Bozanlar	16
2.5.5. Bakteri Sporlarına Etki Edenler	16
2.6.1. Ozon	16
2.6.2. Tarihçe	18
2.6.3. Ozonun Etki Mekanizması	20
2.6.3.1. Antimikrobiyal Etki	20
2.6.3.2. İmmunstimülan Etki	20
2.6.3.3. Antihipoksik Etki	21
2.6.3.4. Analjezik ve Detoksifikasyon Etkisi	21
2.6.3.5. Metabolizma Hızı ve Biyosentez Üzerine Etkisi	21
2.6.4. Ozonun Tıp Alanında Kullanılması	21
2.6.4.1. Ozon Tedavisinin Avantajları	22
2.6.4.2. Ozon Tedavisinin Endikasyonları:	22
2.6.4.3. Ozon Tedavisinin Kontrendikasyonları	23

2.6.4.4. Ozonun Uygulanma Şekilleri:	23
2.6.5. Ozonlu Su	24
2.7. Biyofilmler	24
2.7.1. Tanımlar	24
2.7.2. Tarihçe	25
2.7.3. Biyofilmin Yapısı	26
2.7.4. Biyofilmlerin Oluşumu	27
2.7.5. Bakterilerde Biyofilmin Oluşum Aşamaları	28
2.7.5.1. Savunma:	28
2.7.5.2. Adezyon ve Kolonizasyon:	28
2.7.5.3. Yaşanabilir çevre geliştirme:	28
2.7.6. BAKTERİLERDE BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI	29
2.7.7. Biyofilmlerin Mikroorganizmalarla İlişkileri	32
2.7.8. Biyofilmlerin Neden Olduğu Hastalıklar	33
2.7.11. Biyofilm Analiz Yöntemleri	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.2. Mikroorganizmaların Canlandırılması	40
3.3. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması	41
3.3.1. Mikrotitrasyon Plak Çalışması	41
3.4. Yüzey ve Dezenfektan Seçimleri	42
3.4.1. Dezenfektan Nötralizasyonun Ayarlanması ve Etkiliğinin Değerlendirilmesi	42
3.4.2. Kullanılan Dezenfektan Maddelerin Sulandırılması	43
3.4.3. Sulandırma Çözeltisinin Hazırlanması	43
3.4.4. Dezenfektanların Etkinliğinin Belirlenmesi	44

3.5. Ozonun Etkinliğinin Belirlenmesi	46
4. BULGULAR	47
5.TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	74
7. KAYNAKLAR	76



SİMGELER ve KISALTMALAR

%: Yüzde

>: Büyüktür

<: Küçüktür

≥: Büyük eşittir

°C: Santigrad Derece

Ao: Aritmetik Ortalama

ATCC: American Type Culture Collection

Bap: Biofilm Associated Protein

CFU: Colony Forming Unit

Diğ: Diğerleri

Dk: Dakika

ECM: Extracellular Matrix

ELİSA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

EPS: Expanded Polystyren Foam

FDA: Food and Drug Administration

g: Gram

GAA: Gluteraldehit

GRAS: Generally Recognized As Safe

Ica: Intercellular adhesion

Lec A: (Lectin A) tip I Lectin

Lec B: (Lectin B) tip II Lectin

Lt: Litre

ml: Mililitre

Mm: Milimetre

MSCRAMM: Microbial Surface Component Recognizing Adhezeive Matrix Molecules

NH₄⁺: Amonyum

nM: Nanometre

NO: Nitröz oksit

O₂: Oksijen

O₃: Ozon

OD: Optik Dansite

ODc: Optik Dansite cut-off değeri

OPA: Orto-Phtalaldehide

OSHA: Occupational Safety and Health Agency

P. aeruginosa: *Pseudomonas aeruginosa*

pCO₂: Kan gazı analizi

ph: Potansiyel Hidrojen

Ppm: Parts per milion

PVC: Poli Vinil Clorür

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

SD: Standart sapma

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

TSA: Tryptone Soya Agar

TSB: Tryptone Soya Broth

Uv: Ultraviyole

Vb: ve benzeri

μ l: Mikrolitre

QS: Quorum Sensing

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.6.1. Ozon Gazının Oluşumu	17
Şekil 2.7.1. Ekstraselüler Matriks İçindeki Biyofilm	25
Şekil 2.7.6. Biyofilm Oluşum Basamakları	29

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.6.1 Ozonun Fiziksel Değerleri	17
Tablo 5.1.2 Dezenfektan ve ozon uygulanmadan önce bakteri sayımı	47
Tablo 5.2.1 Glutaraldehitin kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği	49
Tablo 5.2.2 Etil Alkol'ün kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği	51
Tablo 5.2.3 Ortalfitaldehitin kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği	53
Tablo 5.2.4 Perasitik asit'in kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği	55
Tablo 5.2.5 Hidrojen peroksitin kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği	54
Tablo 5.4.5 Ozonlu suyun kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkisi	58
Tablo 5.5 Mikroorganizmaların biyofilm aktivitelerini değerlendirme ölçeği	59
Tablo 5.5.1 Çalışma Sonucunda Kullanılan Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Dereceleri	60
Tablo 5.5.2 Dezenfektan ile temas süresi boyunca üreme gösteren S.aureus suşlarından alınan örneklerin biyofilm oluşturabilme OD değerleri	61
Tablo 5.5.3 Dezenfektan ile temas süresi boyunca üreme gösteren P.aeruginosa suşlarından alınan örneklerin biyofilm oluşturabilme OD değerleri	62

1. GİRİŞ

Staphylococcaceae familyası içinde yer alan *Staphylococcus aureus*, doğada yaygın olarak bulunan, fakültatif anaerob, katalaz testi pozitif, hareketsiz, gram pozitif koktur (Cengiz ve diğ. 1999). *S. aureus* insanda akut ve kronik enfeksiyon etkenidir (Koneman ve diğ. 1997). *S.aureus* neden olduğu enfeksiyonların başında yara enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit, yabancı cisim enfeksiyonları ve nozokomiyel bakteriyemi gelir. *S.aureus*'un patojenitesindeki en önemli virulans faktörleri slime faktör üretmesi ve biyofilm oluşturma yeteneğinin bulunmasıdır (Lowy 1998). *S.aureus*'lar oluşturabildikleri biyofilm sayesinde katater gibi vücut bölgelerine uygulanan tıbbi aletlerin yüzeyine sıkıca tutunup çoğalabilmektedirler. *S.aureus* tıbbi aletle ilişkili enfeksiyonlardan en sık izole edilen etkenlerdendir (Vancraeynest ve diğ. 2004).

Pseudomonadaceae familyası içinde yer alan *Pseudomonas aeruginosa*, doğada yaygın olarak bulunan, nonfermentatif, oksidaz testi pozitif, hareketli, gram negatif bir basildir (Arda ve diğ. 1997). *P.aeruginosa* özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda pnömoni, sepsis, kronik akciğer hastalığı ve pek çok akut enfeksiyona neden olan ve çoklu antibiyotik direnci gösteren bir mikroorganizmadır (Gülseren ve diğ. 1999). *P.aeruginosa* hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %10-25'inden sorumludur. *P.aeruginosa*'nın virulansında hem hücresel hem de hücre dışı faktörler rol oynamaktadır. *P.aeruginosa*'nın en önemli virulans faktörlerinden biriside son yıllarda büyük önem kazanmış olan biyofilm oluşturabilmesidir (Mah ve O'Toole 2001).

Biyofilm, ekstraselüler matriks içerisinde gömülü halde bulunan bir yüzey ve birbirleri arasında kuvvetli bir şekilde bağlanmış mikroorganizmaların oluşturdukları kolonizasyonlar olarak tanımlanır. Biyofilmin temel birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler bir veya daha fazla türde bakteri hücresinden oluşabilir. Biyofilmler kronik veya dirençli bakteri enfeksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır. Biyofilm bakteriyi komplemanların etkileri, fagositoz gibi dış etmenlere karşı korumaktadır.

Biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin antibiyotik ve dezenfektanlara karşı direnci oldukça yüksektir (Donlan ve Costerton 2002).

S.aureus ve *P.aeruginosa* gibi hastane ortamlarında yaygın olarak bulunan ve biyofilm oluşturma yeteneği olan bu bakterilerin enfeksiyon oluşturmada hastane çalışanlarının sterilizasyon, dezenfeksiyon ve antisepsi kurallarını doğru ve yerinde uygulamaması önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (İrikli 2007). Hastanelerde yapılan sterilizasyon, dezenfeksiyon ve antisepsi uygulamalarının kullanma talimatları çerçevesinde yapılması hastane enfeksiyonlarının oluşumlarının önlenmesinde son derece önemlidir. Hastanelerde farklı amaçlarla kullanılan araç ve gereçlerin asepsi şartlarına dikkat edilmelidir. Ayrıca dezenfektan uygulamalarında çalışan sağlık personellerinin maske, eldiven kullanımı, uygun antiseptiklerin kullanımı konusunda iyi eğitim almaları gerekmektedir (Gürler 2002). Farklı hastanelerden izole edilen bakterilerin dezenfektanlara ve antisepsi amaçlı olarak kullanılan kimyasal maddelere karşı duyarlılıklarının birbirinden farklı olduğu bilinmektedir. Bu yüzden de her hastanenin mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı duyarlılık durumunu belirlemesi gerekmektedir. Yapılan farklı çalışmalarda kullanılan bakterilere değişik dezenfektan maddelerin farklı konsantrasyon ve sürelerde etkin olduğu gösterilmiştir (İrikli 2007). Dezenfektan etkinlik testleri standart mikroorganizma suşları ile uluslararası standardizasyon kuruluşlarının tavsiye ettiği şekilde yapılmaktadır (Kampf ve Hollingsworth 2003).

Ozon, doğada yaygın olarak bulunan reaktif bir inorganik molekül olan ve üç oksijen atomunun meydana getirdiği triatomik bir moleküldür (Bocci 2004). Ozon alternatif tıpta uzun yıllardır uygulanmakta olan bir yöntemdir (Saini 2011). Ozon hemostatik, biyosentezi artırıcı, bağışıklık sistemini düzenleyici, analjezik, antihipoksik, antiinflamatuar etkilere sahiptir. Ozonlu su, su içeren bir cihaz içerisinde ozon gazı üretilmesi ile oluşmaktadır (Huth ve diğ. 2006). Ozon günümüzde tekstil sektörü, kâğıt enstitüsü, gıda enstitüsü, tıp ve diş hekimliği gibi birçok alanda güvenle ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle ozonun, tıbbi cihazlar üzerinde oluşan biyofilm üzerindeki etkinliği ve biyofilm oluşumunu önlemede ve gidermede kullanılan dezenfektanlar ile

karşılaştırmalı etkinlikleri konusunda yapılacak olan çalışmalar oldukça değerlidir (Bocci 2004).

Yapılan bu çalışma hastanede en sık kullanılan dezenfektanların ve alternatif tıpta yaygın olarak kullanılmakta olan ozonun *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının üzerinde belirli temas sürelerine bağlı olarak antimikrobiyel etkinliğini belirlemek amacıyla yapıldı. Ayrıca temas sürelerinin sonunda üreme gösteren mikroorganizmaların biyofilm oluşturabilme kapasitesi, dezenfektan ile temasa bırakılmadan önceki biyofilm oluşturmabilme kapasitesi ile karşılaştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dezenfeksiyon

Patojen mikroorganizmaların inaktivasyonuna ‘dezenfeksiyon’ denilmektedir. Dezenfeksiyon işlemi farklı şekillerde yapılmaktadır. Kimyasallar ile dezenfeksiyon; ısı ile dezenfeksiyon ve ultraviyole ışığı ile dezenfeksiyon en yaygın kullanım şekilleridir (Arda 2006). Günümüzde kimyasal maddeler içeren birçok dezenfektan ürünü vardır. Dezenfektan maddeler bakterilerin vejetatif formlarını öldürmede etkiliyken daha dirençli formu olan spor formlarını öldürmeyebilir. Dezenfeksiyon işleminin amacı mikroorganizmaların tamamını öldürmek değil miktarını olabildiğince miktarını en az seviyeye indirgeyebilmektir. Dolayısıyla her dezenfeksiyon işlemi yapıldığında sterilizasyon işlemide yapıldı demek doğru değildir (Ewart 2001; EPA 2004).

2.2. Sterilizasyon

Sporlar da dahil olmak üzere herhangi bir cismin veya cismin üzerinde bulunan bütün mikroorganizmaların, tüm yaşam formlarının öldürülmesi işlemi sterilizasyon olarak tanımlanmaktadır. Sterilizasyon aşamaları fiziksel veya kimyasal şekilde gerçekleşmektedir (Arıkan 1997).

Sterilizasyon işlemi; maddenin her formuna göre farklı biçimlerde gerçekleşmektedir. İyonize olabilen ışınlarla yapılan sterilizasyon, ısı ve filtrasyon gibi fiziksel yöntemlerle yapılan sterilizasyon, gazhalindeki kimyasallarla (formaldehit, etilen oksit, metil bromid, propilen oksit veya beta propiyolakton) veya sıvı formdaki sterilanlar (glutaraldehit, perasetikasit veya hidrojen peroksit) ile yapılan sterilizasyonlar gibi farklı yöntemler bulunmaktadır. Isı ile sterilizasyon; kuru ısı, nemli ısı (buharla sterilizasyon) veya yakma işlemidir. Radyasyonla sterilizasyonda genellikle iyonize olabilen ışınlar (gama, beta, x ışınları) kullanılır, iyonize olmayan ultraviyole ışınlar

özellikle ameliyathane odalarında havanın ortam dezenfeksiyonu sağlamak amacıyla kullanılır (Özyurt 1999).

Hastanelerde en sık kullanılan sterilizasyon yöntemleri etilen oksit ve sıvı sterilizan ile gerçekleşen soğuk sterilizasyon ve buhar ve kuru ısı ile sağlanan sterilizasyonlardır. Sterilizasyon işlemlerinin ideal kullanım şekli tek merkezden yapılabilir olmasıdır. Tüm malzemelerin ön temizliği, en uygun yöntem seçimi ve en doğru uygulamanın sağlanması, sterilizasyon verimliliği ve çalışma güvenliğinin sağlanması açısından büyük önem teşkil etmektedir (Özyurt 1999).

Sterilizasyon işlemleri; dekontaminasyon, temizlik, hazırlık (kurulama, paketlenme), sterilizasyon uygulaması ve dağıtım-kullanım aşamalarını takiben oluşmaktadır (Özyurt1999).

2.3. Dezenfektan

Dezenfektanlar; bakteri sporları hariç tüm mikroorganizmaları belirlilikonsantrasyonlarda belirli süre temastan sonra öldürebilmektedir. Dezenfektanlar çok kısa sürede maksimum etki gösteren kimyasal maddeler değildir (Gürler 2003). Dezenfektanlar uygun görülen konsantrasyonlarda bakteriyel ve fungal sporların bütün formlarının yapıları bozması 6 ile 10 saatlik süreçten sonra gerçekleşmektedir (Özyurt 2000).

Hastane enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasında en uygun antiseptik ve dezenfektanın kullanılması oldukça önemlidir. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalardan çıkarılan ortak sonuç mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı duyarlılıkları hücre yapısının özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir (İnan ve diğ. 2009).

2.3.1. Dezenfeksiyonu Etkileyen Faktörler

- Mikroorganizmanın türü ve miktarı
- Organik madde miktarı
- Dezenfektan konsantrasyonu
- Dezenfeksiyon süresi
- Sıcaklıkla
- pH derecesi
- Yüzey gerilimini azaltıcı maddelerin bulunması
(Eryılmaz ve diğ. 2008; Berkman 1990).

2.3.2. Dezenfektan Kullanımında Dikkat Edilmesi Gereken Hususlar

- Dezenfekte edilecek materyallerin tamamı dezenfektana maruz kalmalıdır,
- Kullanılan solüsyonlardan etkinliği belli aralıklarla test edilmelidir,
- Kullanılmadan önce uygun görülen oranda sulandırılmalıdır,
- Dezenfekte edilecek materyalin ön temizliği yapılmalı ve ayrılabilir parçaları da dezenfektana eklenmelidir.
- Dezenfekte edilecek malzeme kurulandıktan sonra dezenfektana atılmalıdır,
- Dezenfektanların etki süreleri bilinmeli ve etki süresi aşılmamalıdır,
- Hazırlanan dezenfektan solüsyonun hazırlandığı tarih not edilmeli,
- Dezenfektan solüsyon azaldıkça aynı dezenfektan dahi olsa üzerine ilave edilmemelidir,
- Dezenfektan kullanımı eğitimleri verilmeli ve denetimler yapılmalıdır,
- Dezenfektan solüsyonların saklandıkları kapların kapakları olası kontaminasyondan uzak tutulmalıdır,
- Hazırlanan solüsyonun saklanılacağı yer güneş ışığından uzak tutulmalı ve havayla uzun süre temas etmemelidir,
- Dezenfektan kullanan kişiler uygun ekipmanları kullanıp çalışmaya başlamalıdır
(Güven 2003).

2.4. Dezenfektanların Sınıflandırılması

Patojen mikroorganizmalara karşı kullanılan dezenfektanlar etki seviyelerine göre üç ana başlık altında toplanmışlardır (Özyurt 2000). Bunlar düşük dereceli dezenfektanlar, orta seviyeli dezenfektanlar ve yüksek seviyeli dezenfektanlardır (Özer 2003).

2.4.1. Düşük Dereceli Dezenfeksiyon

Düşük dereceli dezenfektanlar uygun konsantrasyonlarda kullanıldığında birçok bakterinin vejetatif formunu, belirli mantarları ve zarflı virüsleri öldürebilmektedir. Fakat bu gruptaki dezenfektanlar mikobakterileri ve bakterisporlarını öldürememektedirler. Bu dezenfektanlar çevresel yüzeylerin temizlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Düşük seviyeli dezenfektanlara fenol ve kuaterner amonyum bileşiklerini örnek olarak verilebilir (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

2.4.1.1. Fenollü Dezenfektanlar

Fenolün, günlük hayatımızda yaygın olarak sıvı sabunlar, ağız çalkalama sularında ve ev temizliği için kullanılan dezenfektanların içlerinde içinde (örneğin; Lisol gibi) bulunmaktadır.

Fenollü dezenfektanların etki gösterdiği mikroorganizmalar;

- Bakteriler (Özellikle gram pozitif bakteriler)
- Zarflı virüslere karşı etkilidirler.

Bakteri sporlarına ve zarfsız virüsleri öldürmekte etkili değildir. Bu dezenfektanların etkileri organik materyallerin varlığında devam etmektedir. Bu materyaller arasında

laboratuvar yüzeyleri ve çok kritik öneme sahip olmayan medikal malzemeler yer almaktadır. Ayrıca hastane çevresindeki kontaminasyonunda da fenollü dezenfektanlar kullanılmaktadır. Fenol içeren dezenfektanların kullanımı için genel olarak güvenlidir denebilir fakat etki süresinin uzunluğuna bağlı olarak deri irritasyonuna sebep olabilmektedir. Bu yüzden de yarı kritik öneme sahip olan malzemelerin dekontaminasyon işleminde fenollerin kullanımı uygun bulunmamaktadır (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

2.4.1.2. Kuarterner Amonyum Bileşikleri

Diğer bir adıyla yüzey aktif katyonik dezenfektanlar olarak bilinen bir grup kimyasal maddelerdir (Cords ve Dychdala 1993; Boothe 1998). Kuarterner amonyum bileşiklerinin sulandırılmış formlarının antiseptik olarak kullanılması uygun görülürken, sulandırılmadan direkt olarak antiseptik amacıyla kullanılması ciddi sağlık problemlerine neden olabilmektedir (Petric ve diğ. 2003).

Kuarterner amonyum bileşikleri hastane dezenfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle stetoskop, katater gibi tıbbi cihazların steril edilmesinde tercih edilen dezenfektanların başında gelir. Hastane dezenfeksiyonu dışında iyi bir nüfuz etme özelliği göstermelerinden dolayı yerlerin, duvarların ve ekipmanların sanitasyonunda kullanılır. Ayrıca yüksek sertlik derecesine sahip sularda ve pamuk içeren materyallerde oldukça etkilidir. Kuarterner amonyum bileşikleri, kullanımda toksik etki göstermezler fakat uzun süreli temaslarda irritasyona neden olduğu bilinmektedir (Dvorak 2008).

Bu bileşiği içeren dezenfektanların içeriğinde; NH_4^+ (amonyum) bulunmaktadır bu durumda aksitil, aril, alkil, benzil, didesil, etilbenzil, gibi NH_4^+ içeren maddeler ile de kombine edilebilir ve buda kullanım şeklinin genişlemesine sebep olmaktadır (Weber 2008).

Kuarterner amonyum bileşiklerinin etki gösterdikleri mikroorganizmalar;

- Bakteriler (gram pozitif ve gram negatif)
- Zarflı viruslardır.

Sporlu bakteriler, zarfsız viruslara ve mantarlara karşı etkili değildir. Kuarternere amonyum bileşikleri, kullanımlarda toksik etki göstermezler fakat uzun süreli temaslarda irritasyona neden olduğu bilinmektedir (Dvorak, 2008; Rutala ve Weber, 2008).

2.4.2. Orta Dereceli Dezenfeksiyon

Gram pozitif bakterilerden mikobakterleri özellikle *Mycobacterium tuberculosis*'i inaktive ederken sporlu bakterilere karşı etkisizdir. Ayrıca mantarlara (aseksüel sporlar dahil ve seksüel sporlar genellikle hariç) ve virüslere karşı etkilidir (Töreci 2003). Orta seviyeli dezenfektanlara; alkoller, glukoprotamin ve iyodoforları örnek olarak verebiliriz (Saniç 2003).

2.4.2.1. Alkoller

Etil alkol ve isopropil alkol; alkoller grubunda yer almaktadır. Bu alkollerin mikroorganizmalar üzerindeki etkileri;

- Bakteriler (vegetatif formlarına bakterisidal etki)
- Mantar (fungusidal etki)
- Virus (zarflı viruslara karşı virusidal etki)

Alkoller bakteri sporları ve zarfsız virusları öldürmekte etkili değildir. Alkollerin %50 konsantrasyonda seyreltildiğinde öldürücü aktiviteleri aniden kesilmektedir. Bu yüzden de alkollerin istenilen etkiyi göstermesinde seyreltme oranlarının düzgün ve uygun görülen oranlarda ayarlanması çok önemlidir. Etil ya da isopropil alkolünel antiseptiği olarak kullanımında bakterisidal etkiyi ortaya çıkarabilmek için su içerisinde

%60-90 (hacim/hacim) oranında bir dilüsyon hazırlanması gerekmektedir. Ayrıca alkollerin uçucu özelliği göz özüne alındığında maddeler üzerindeki etki sürelerini çok iyi ayarlamak gerekmektedir. Alkoller mikroorganizmaların proteinlerini denatüre ederek antimikrobiyal etki gösterir. Alkollerin yanıcı özellikte madde olması, depolanması konusunda özel şartlar aranmasına sebep olmaktadır. Bu yüzden de alkoller muhafaza ederken yanıcı özelliğini göstermemesi için iyi havalandırması olan serin yerler tercih edilmelidir. Alkoller deri yaralarının enfeksiyon kapmamasını önlemek için ayrıca yüzey ya da medikal malzemelerin dezenfeksiyonu için de kullanılmaktadır. Fakat yüzey dezenfektanı olarak kullanılması oldukça pahalıdır. (Larson 1991; Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

2.4.2.2. Hipokloridler

Klorlu dezenfektanlar arasında en yaygın olarak kullanılan hipokloridlerdir. Bunu sebebi hem sıvı olan (örn; sodyum hipoklorid) hem de katı olan (örn; kalsiyum hipoklorid) şekillerinin bulunmasından kaynaklanmaktadır. Sıvı solüsyon halinde bulunan %4-6'lık sodyum hipoklorid en sık kullanılan şeklidir (Petric ve diğ. 2003). Hipokloridler uygun konsantrasyonda kullanıldığında mikroorganizma üzerindeki etkileri;

- Bakteriler (bakteri sporları hariç)
- Mantarlar
- Virusler

Hipoklorid içeren dezavantajlar ev içerisinde kullanıldığında deri, göz, orofarinks ve özefageal irritasyonlara neden olabileceği bilinmektedir. Dekontaminasyon amacıyla tavsiye edilen dezenfektanlar arasında yer almaktadır. Metaller üzerine koroziv etkiye sahip olmaları sebebiyle yüksek konsantrasyonlarda (>500 ppm) kullanıldığında organik materyalleri inaktif edebilmektedirler. Yüzey dezenfeksiyonu amacıyla 1:50 oranında seyretilerek kullanımı uygun görülmektedir (Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008)

2.4.2.3. İyot ve İyodofor Dezenfektanlar

İyot ve iyodoforların bileşimleri birbirine benzeyen dezenfektanlardır. Bunlar mikroorganizma üzerinde uygun süre üzerinde temas edildiğinde bakterisidal, sporosidal, virusidal ve fungusidal etki gösterir. İyodun dezenfeksiyon özelliği tıpkı klor gibi, organik materyalleri nötralize etmesinden kaynaklanmaktadır (Gottardi 1999). İyot uygun şekilde kullanılmazsa ya da etki süresini aşan kullanımlarda dokuyu irrite edebileceği bilinmektedir. Metaller içinde koroziv etki gösterebilmektedir. ‘‘Tamed’’ adı verilen iyodinlerin (ameliyat esnasında kullanılan) çeşitleri doku irritasyonuna sebep olmamaktadır. (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

2.4.3. Yüksek Dereceli Dezenfeksiyon

Uzun süreli kullanılan yüksek dereceli dezenfektanlar bakteri sporlarını da dahil olmak üzere tüm mikroorganizmaların inaktive olmasını sağlar (Gürler 2002). Ayrıca kısa süreli yüksek dereceli dezenfektan kullanımda da bakteri sporlarının büyük bir kısmına karşı sidal etki gösterirler (Özyurt 2005). Bu grup dezenfektanlara gluteraldehid, hidrojen peroksid, perasetik asit, sodyum hipoklorid örnek olarak verilebilir (Saniç 2003).

2.4.3.1. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit ayrıca yara temizlenmesi işleminde antiseptik olarak kullanılır. Anaerobikbakterilere karşı etkilidir. Yüksek konsantrasyonlu uygulamada zamanından daha fazla sürede temasta bırakıldığında dokulara zarar verebilmektedir.

Çevresel dezenfektanlar olarak stabilize hidrojen peroksit yaygın şekilde kullanılmaktadır. Stabilize hidrojen peroksitin etkili olduğu mikroorganizmalar;

- Bakteriler (vejetatif bakteriler ve bakteri sporları)
- Virusler (zarflı ve zarfsız virüsler)
- Mantarlar

Günümüzde üretici firmalar tarafında uygun görülen kullanım süresi 30 dakika içerisinde sterilizasyon, yüksek konsantrasyonlarının ise 5 dakikada dezenfeksiyon yaptığını ortaya koymuşlardır (Petric ve ark. 2003; Dvorak, 2008; Rutala ve Weber, 2008). Hidrojen peroksit %5-20 konsantrasyon aralıklarında daha mikroorganizma üzerinde sidal gösterirken daha çok endüstriyel alanlar kullanılan yüksek konsantrasyonlar (%30) sporsidal etki göstermektedir (Cords ve Dychdala 1993).

2.4.3.2. Gluteraldehit

Gluteraldehitler hem sterilizasyon hem de dezenfeksiyon için en yaygın kullanılan dezenfektanlar arasındadır. Aldehidler germisidal etkili, gluteraldehitler ise bakterisidal, virusidal, fungusidal, sporsidal ve parasitisidal etkilidirler. Gluteraldehitlerin gaz ve likid formları bulunmaktadır. (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

Organik madde varlığında gluteraldehitler, formaldehide göre daha fazla antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. (Quinn ve Markey 2001). Gluteraldehitlerin olarak yüksek seviyede toksik etkiye sahip olabilen bir dezenfektandır. Bu yüzden de bu toksik etkiyi en fazla indirebilmek için glutaldehyitler kullanıldıktan sonra iyi bir havalandırma yapılması önerilmektedir (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008). Glutaldehyitler kullanılırken pH'nın 7,0; sıcaklığın ise yüksek olduğu durumlarda en iyi etkiyi gösterebilmektedir (Quinn ve Markey 2001). Hatta yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında yüksek sıcaklıkta en iyi etki gösteren dezenfektanlar glutaldehyitlerdir (Gelinas ve diğ. 1991).

2.4.3.3. Formaldehit

Gaz ve sıvı formu bulunan formaldehitler dezenfeksiyon ve sterilizasyon amacıyla kullanılmaktadır. Formaldehit, ticari şekilde su bazlı içerik olarak %37'lik seyreltmeyle edilerek satılmaktadır. Formaldehitin su içerikli satılan bu solüsyonu bakterisidal, tüberkülosidal, fungusidal, virusidal vesporosidal olarak etki göstermektedir. Dezenfeksiyon ve sterilizasyon işlemleri amacıyla kullanımında oldukça dikkatli çalışılması gerekmektedir. Kullanımda dikkat edilmesi gereken bazı kurallar bulunmaktadır. Yüksek oranda karsinojenik olduğu için ve doku irritasyonlarından dolayı 8 saatten daha fazla kullanımı önerilmemektedir. Ayrıca formaldehitin kullanıldığı alanlarla uygulamayı yapacak olan çalışanların direk olarak temasında mümkün olduğunca uzak durmasında önemli fayda vardır (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

2.4.3.4. Orto-Fitalaldehit (OPA)

%0.55 1,2-benzenedikarboksialdehid ya da OPA, şeffaf, soluk mavi pH'sı 7.5 olan bir solüsyondur. Opa; ortofitalaldehit içeren, cerrahi aletlerin ve endoskopların sterilizasyonunda kullanılan bir dezenfektandır. Isıya karşı duyarlıdır bu yüzden cerrahi aletlerin yüksek düzey dezenfeksiyonu kullanırken soğuk sterilizasyon şekli kullanımı için uygundur (Esen 2009).

Orto-fitalaldehit (OPA)'in antimikrobiyal etkinliği glutraldehit ile benzerlik göstermektedir. OPA, glutraldehitlere oranla oldukça avantajlıdır. Kokusuzdur ve etkili pH aralığı ph=3-9'dur. Formaldehitler gibi gözler ve burun için de irrite özelliği bulunmamaktadır (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008).

OPA'nın glutraldehite göre avantajları;

- pH değişikliklerinden çok fazla etkilenmez.
- Kullanılmadan önce aktive edilmesi gerekmemektedir.

- Depolama süresi boyunca ve tekrar kullanımlarda aktivasyonunda kayıp olmaz.
- Göz, deri, solunum irritasyonu yapmaz.
- Kokusuzdur.
- İnvitro olarak OPA'nın mikobakterisidal etkisi glüteraldehitden daha hızlıdır.

(Rutala ve Weber 2008).

2.4.3.5. Perasetik Asit

Perasetik asit, hidrojen peroksit ile asetik asitin bir araya gelerek oluşturduğu bir dezenfektandır. Beraber kullanıldığı ürünlerin (asetik asit, su, oksijen, hidrojen peroksit gibi) yapısını bozmaz ve kalıntı bırakmaz. Organik maddeler üzerinde etkisi kalıcı etki yapmaktadır. Perasetik ya da peroksiasetik asit bütün mikroorganizmalara etki etme şekli çok hızlıdır. Düşük ısılarda bile sporsidal etkilidir (Petric ve diğ. 2003; Dvorak 2008; Rutala ve Weber 2008).

Mikroorganizmalar üzerinde bakterisidal, tüberkulosidal, fungusidal, sporsidal ve virüsidal etkilidir (Gorman ve Scott 2004). Kullanım alanları genellikle yiyecek endüstrisinde ve mekânlathanelerin soğuk sterilizasyonudur (Dvorak 2005). Oldukça iritan özelliklere sahip olduğundan çalışılırken çok dikkat edilmesi gerekmektedir. Örneğin %1'lik çözeltisi 6 gün içinde aktivitesinin yarısını kaybeder (Samastı 2008).

2.5. Dezenfektanların Etki Tarzları ve Dezenfektanların Türleri

Dezenfektanların etki tarzları ve dezenfektanların türleri mikroorganizma üzerinde farklılıklar göstermektedir. Bakteri membranlarının fonksiyonunu bozanlar, proteinleri denatüre edenler, enzim aktivitesini bozanlar ve nükleer sistemi bozanlar olarak 4 başlık altında incelenmektedir (Arda 2006).

2.5.1. Bakteri Membranlarının Fonksiyonunu Bozanlar

Dezenfektan maddeler; ozmotik basıncı arttırmak ve yüzey gerilimini düşürerek bakterilerin üremesinin durdurulması veya inaktive edilmesinde etkili olabilirler. Bu etkiyi gösteren dezenfektanlar mikroorganizmaların hücre membranlarının yarı geçirgen özelliğini kaybettirip, organizmanın beslenmesi aksatıp metabolizma ölümüne sebep olurlar. Bu dezenfektanlara fenoller-fenollü bileşikler, sentetik deterjanlar ve organik solventler örnek verilebilir (Arda 2006).

2.5.2. Proteinleri Denatüre Edenler

Bu şekilde etki gösteren dezenfektanlar proteinlerin üç boyutlu yapısını bozarak ve polipeptid zincirinin rastgele halkalanması ve helezonlaşmasına sebep olarak mikroorganizmaların ölümüne neden olmaktadır.

Bu maddeler arasında; asitler ve alkaliler yer almaktadır. Asit maddelere; hidroklorik asit, sülfirik asit, fosforik asit ve nitrik asit, asetik asit, propiyonikasit ve bütirik asit örnek verilebilir. Alkali maddelerden sodyum hidroksit ve potasyum hidroksit kalsiyum dioksit, nitrat iki oksit gibi örnekler verilmektedir (Arda 2006).

2.5.3. Enzim Aktivitesini Bozanlar

Bu maddeler mikroorganizmalarda bulunan enzimlerin katalitik etkiye sahip bölgelerine ya da substantlar ile birleşen fonksiyonel gruplara (-SH gruplarına) karşı afinite duyarak özel bağlarla bu bölgelere bağlanıp mikrobiyosidal ve mikrobiyositik etki göstermektedirler. Ayrıca, bu dezenfektanların yüksek konsantrasyonlarda kullanımı hücrel enzim sisteminin inaktive olmasını ve temel metabolitlerin hücreden dışarıya çıkmasını sağlamaktadır (O'Connor ve Rubino 1991).

Bu dezenfektanlara ağır metaller, tuzlar-iyonlar, oksidan maddeler ve alkilen maddeler örnek olarak verilebilir (Arda 2006).

2.5.4. Nükleer Sistemi Bozanlar

Özellikle mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılmakta olan boyalar bu grup içerisinde yer alır. Bazı boyalar, asidik ve nötr boyalardan daha etkilidirler. Boyalardan başlıcaları; akridin, brillant yeşili, fuksin, kristal viyole, malaşit yeşili, metilen mavisidir. Boyalar, organizmaların DNA'sı ile birleşerek aktivitelerini, replikasyonlarını ve protein sentezlerini engelleyip, nükleik asitlerle beraber bileşik oluştururlar. Malaşit yeşili, kristal viyole ve akridin boyalar bunlar arasında yer almaktadır (Arda 2006).

2.5.5. Bakteri Sporlarına Etki Edenler

Dezenfektanın cinsine göre bakteri sporlarına karşı farklı etki mekanizmaları bulunmaktadır. Kuarterner amonyum bileşenleri, germinasyon aşamasında etki gösterirken, fenoller sporun oluşum aşamasına etki eder. Gluteraldehid, formaldehid, hipoklorit, iyot, hidrojen peroksit ve etilen oksit olgun spor aşamasında etkilidir.

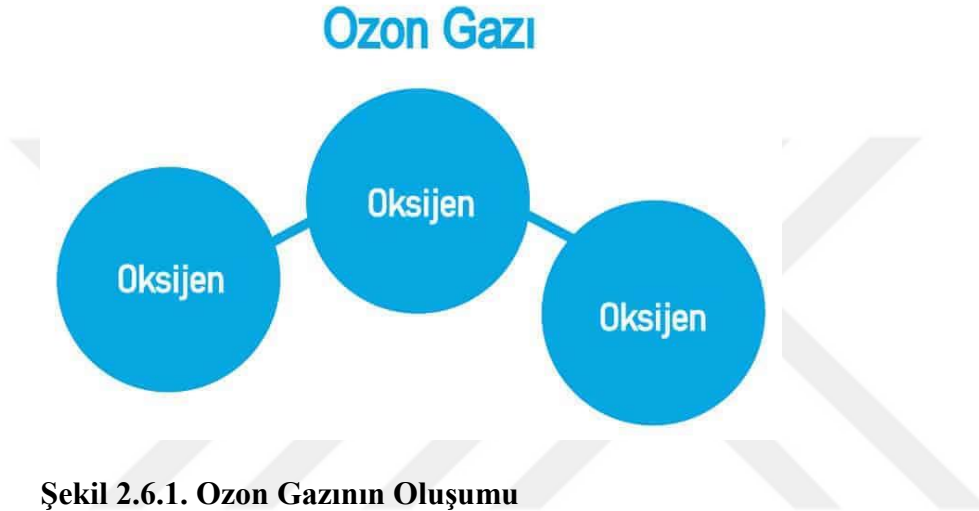
[https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/62731/mod_resource/content/5/7.%20hafta%20sterilizasyon-dezenfeksiyon.pdf]

2.6.1. Ozon

2.6.1. Tanım

Ortamda gaz halinde bulunup oldukça reaktif bir inorganik molekül olan ve üç oksijen atomun meydana getirdiği triatomik moleküle ozon denir. Ozon gazının meydana gelmesi; doğada bulunan oksijen molekülünün fotolizi sonucu ortaya

çıkan oksijen atomlarının çevredeki diğer oksijen molekülleriyle tepkimeye girmesiyle oluşur (Bocci, 2004). Diğer bir deyişle ozonun oluşumu aktif atomik oksijen ($O+2$) ile oksijen molekülünün (O_2) tepkimeye girmesiyle oluşur (Bocci ve Paulesu 1990; Bocci, 2004) (Şekil 2.6.1). Yani ozon, doğada bulunan oksijen atomunun UV ışık ile etkileşimi sonucu elde edilmektedir (Kim 1999).



Ozon aktif ve kararsız bir molekül olduğu için yarılanma ömrü kısadır. Bir çok biyomolekülle tepkimeye girdiği bilinen ozonun fiziksel özellikleri Tablo 2.6.1'de gösterilmektedir (Valacchi ve Bocci 2000; Lynch 2004).

Tablo 2.6.1. Ozonun Fiziksel Değerleri

FİZİKSEL ÖZELLİK	DEĞER
Moleküler Ağırlık	48 g/mol
Erime Noktası	-192,7
Kritik Sıcaklık	-12,1
Kaynama Noktası (101kPa)	111,9
Gaz Formundaki yoğunluğu	2,144 kg.m ³
Buharlaştırma Enerjisi	15,2 Kj.mol ⁻¹

2.6.2. Tarihçe

Van Marum, 1975 yılında çalışma yaparken elektrik kıvılcımları oluşumu esnasında farklı bir kokunun ortaya çıktığını saptamış, bu kokunun aynısını Cruickshank 1801 yılında suyun elektrolizi sırasında da fark etmiştir. (Bocci ve Paulesu, 1990; Bocci, 2004).

Bu gaza 1840 yılında 'Ozon' adını ilk kullanan bilim insanı Shonbein'dir. Ozon yunanca kökenli bir isim olup 'koklamak' anlamına gelir. Ozon tanımlandıktan sonra uzun bir zaman çoğu bilim insanı ozonun etkinliği ve klinik araştırmaları için çeşitli araştırmalar yapmışlardır. Bu araştırmalardan en çok ilgi çekenini Amerika'da 1880' de ozonun etkinliği hakkında yapılan çalışmalar oluşturmaktadır. Amerika'da 1880'den günümüze kadar tüm dünyada yaygın olarak kullanılan 'ozon terapisi' tıpta alternatif terapi yöntemi olarak kabul edilmiştir. Ozon gazı, diğer sanitasyon ajanlarının kullanımını geride bırakarak daha popüler bir sanitasyon yöntemi olarak ortaya çıkmaya başlamıştır (Bocci 2004).

Bocci tarafından yapılan bir çalışmada insan kanına belirli konsantrasyonlarda ozon gazı uygulandığı zaman immün sistem hücrelerinin aktivasyonunu sağlayıp hücre sayısında kayda değer bir artış olduğunu bildirdi. Fakat bu etkinin ortaya çıkmasında ozonun uygun konsantrasyon ve sürelerde uygulanması gerektiği de ifade edildi (Bocci 2004).

ABD'de 20. yy'da ozon güçlü bir dezenfektan ve oksidan madde olarak kullanılmaya başlanmıştır. Tek parçalanma ürünü oksijen olan ozonun direkt olarak gaz olarak veya sulu çözeltilerinin kullanımı mümkün olduğu için 1997 yılında ABD'de GRAS (Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen) statüsüne uygun bulunan ozonun gıda enstitüsünde kullanımına izin verilmiştir. Gaz veya sulu çözeltilerde kullanılan ozonun avantaj ve dezavantajlı olduğu durumlar vardır. Sulu çözelti olarak ozon kullanımının avantajlarına bakacak olursak kullanılacak olan ozon miktarının rahatlıkla

ayarlanabilmesidir. Bir dezavantaj olarak da özellikle ozonun tarımda kullanımında oksidasyona duyarlı besin öğelerinin miktarını azaltması ve besinlerin rengini soldurup kaybetmesine neden olabilmektedir. Bu sebeplere bakarak kullanılacak olan ozonun dozajının doğru ayarlanması oldukça önemlidir. Ozon, tarımın yanında gıda sanayinde de çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Meyve ve sebzelerde; mikotoksinlerin giderilmesi, dezenfeksiyonun sağlanması, ürünün raf ömrünü daha fazla uzatabilmesi mümkündür (Guzel ve diğ. 2004).

Akbaş, Özdemir ve Hwang'ın yaptığı çalışmalara bakacak olursak meyve-sebzelerde bulunan mikotoksin, pestisit kalıntılarının gıdadan ayrılması konusunda son derece umut vaat eden sonuçlar göstermektedir (Akbaş ve Özdemir 2006, İnan ve diğ. 2007, Karaca ve Velioğlu 2009).

Jay ve diğerleri 2005 yılında yaptığı bir çalışmada 0,15-5,0 ppm konsantrasyonlarında ozon gazının mikroorganizma gelişmesini engeleyici etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Jay ve diğ. 2005).

Bocci 2007 yılında yaptığı farklı bir çalışmada ozonun çoğu hastalığın tedavisinde metabolizma arttırıcı etkisi olduğunu ve yaraların iyileşiminde dezenfekte edici özelliğinin bulunduğunu söyledi (Bocci 2007).

Skog ve Chu'nun 2001 yılında yaptığı başka bir çalışmada ise ozon uygulaması yapılmış portakal, ahududu, üzüm, armut ve elmaların mantarlar tarafından çürütülmesini engelleyip raf ömrünü uzattığını söylemişlerdir. (Skog ve Chu 2001).

Bu çalışmaların yanı sıra yapılan diğer çalışmalarda göz önüne alındığında ozonun, bazı gıdaların değerini azalttığıda bildirilmiştir. Bu yüzden ozon dozunun ayarlanırken çok hassas çalışılması gerekmektedir. Ozonun çalışılacağı ortam şartlarının (pH'sı, sıcaklığı, ozonlama süresi) dikkatlice ayarlanması gerekmektedir. (Karaca ve Velioğlu 2007).

Günümüzde ozon su arıtma, kağıt endüstrisi, tekstil sektörü, gıda endüstrisi tıp ve diş hekimliği gibi bir çok alan ve ülkede alanında yaygın ve güvenle kullanılmakta

olup kullanım alanları her geçen gün genişlemektedir. (Bocci ve Paulesu, 1990; Lynch, 2004)

2.6.3. Ozonun Etki Mekanizması

Ozon tedavisi; çeşitli hastalığın tedavisinde alternatif tıpta uzun yıllardır uygulanmaktadır. Ozon tedavisi hücreye kronik oksidatif stresi arttırarak etki etmektedir (Saini 2011). Ozon; analjezik, antihipoksik, antienflamatuar, antimikrobiyal,bağışıklık sistemini düzenleyici, biyosentezi, arttırıcı, enerji metabolizmasını hızlandırıcı, hemostatik metabolizma hızınıarttırıcı etkilere sahiptir (Bocci 2005).

2.6.3.1. Antimikrobiyal Etki

Ozonun antimikrobiyal etkisini hücre zarında zarar meydana getirerek gerçekleştirmektedir. Ozon hücre zarında bulunan hidrokarbonların çift bağları ile kimyasal reaksiyona girer ve sekonder oksidan etkiyle hücre yapısında modifikasyona neden olur. Ozon, antibiyotik direnci gösteren bakterilere karşı oldukça etkilidir. Ayrıca ozonun antimikrobiyal etkisini asidik ph ve sıvı ortamlarda etkinliğinde artış meydana gelmektedir. Viral kaynaklı enfeksiyonlarda ozonun etki mekanizmasını ise; viral protein sentezine engel olup enfekte hücrenin peroksit duyarlılığı ve ozonun reverse transkriptaz enziminin etkinliğini inaktive etmesi oluşturmaktadır (Bocci 2005).

2.6.3.2. İmmunstimülan Etki

Ozon immün sistem hücrelerinin proliferasyonunu ve immünglobulin sentezini uyarıp, makrofajların fagositoz için duyarlılığını arttıp hücrenel ve hümorale immün sisteme etki etmektedir. Bu etki mekanizması sonucu olarak sitokin üretir. Ürettiği bu sitokinlerde immün sistemi baskılanmış kişilere yararlı etkiler meydana getirmektedir (Bhateja 2012).

Ayrıca ozon yaraların iyileşmesinde de interlökinler, lökotrienler ve prostoglandinler gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin sentezini de arttırarak yardımcı olmaktadır (Celiberti 2006).

2.6.3.3. Antihipoksik Etki

Ozon hasarlı dokulardaki parsiyel oksijen basıncını artırıp ve kandaki oksijen taşınımı seviyesinde artış göstererek hücre metabolizmasında farklılaşmaya sebep olur. Oluşan farklılaşmada, oksijenli solunumda kullanılan enerji kaynaklarının kullanımını arttırmaktadır. Ayrıca eritrositlerin etki ettikleri temas yüzeyini arttırmaktadır. Ozon dolaşım sistemini de uyarıp dolaşım bozukluğu hastalıklarında ve organ fonksiyonlarının canlandırılmasında önemlidir (Saini 2011; Celiberti 2006).

3.6.3.4. Analjezik ve Detoksifikasyon Etkisi

Nitroz oksit (NO) gibi vazodilatörlerin salınımına neden olarak arteriol ve venüllerde dilatasyona sebep olmaktadır (Bhateja 2012; Das 2011).

2.6.3.5. Metabolizma Hızı ve Biyosentez Üzerine Etkisi

Ozon mitokondri ve ribozomları uyarıp hücre içi protein sentezini artırır. Bu durumda hücre fonksiyonlarının aktivasyonunu, doku ve organların rejenerasyon potansiyeli arttırmasına neden olmaktadır (Bhateja 2012; Celiberti 2006).

2.6.4. Ozonun Tıp Alanında Kullanılması

Ozon günümüzde birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlardan başlıcaları;

- Kan ve dolaşım problemleri
- Ülseratif kolit, bakteriyel diyare
- Aşırı kan lipid, ürik asit seviyeleri
- Kan şekeri dengelenmesi
- Felç tedavisi

- Migren, baş dönmesi atakları
- İmmün sistem zayıflığı
- Uyku problemleri
- Virüs, bakteri ve mantar enfeksiyonları kaynaklı kronik ve akut enfeksiyonlar.
- Artroz, eklem romatizması
- Akne, egzema, cilt rahatsızlıklarıdır

(Bocci 1996).

2.6.4.1. Ozon Tedavisinin Avantajları

- Anti oksidan sistemin uyarılmasıdır
- Doğal çevreye zararı bulunması
- Dolaşım sistemini uyarıp hasarlı doku tespiti sağlaması
- İmmün bağışıklığı güçlendirmesi
- Oksijen metabolizmasını yapılandırması
- Patojenlerin yok etmesi

(Bhateja 2012).

2.6.4.2. Ozon Tedavisinin Endikasyonları:

- Arteriyal dolaşım bozuklukları,
- Deri lezyonları ve eksternal ülserler
- Diş hekimliği
- İmmün sistemindeki bozulmalar,
- İnflamatuar durumlar,

- Romatizmal hastalıklar

(Saini 2001; Bocci 2005).

2.6.4.3. Ozon Tedavisinin Kontrendikasyonları

- ACE inhibitörü kullanan hastalar,
- Favizm
- Hamilelik
- Hipertiroidizm, trombositopeni ve ciddi kardio-vasküler durumlar,
- Ozon alerjisi

(Bocci 2005).

2.6.4.4. Ozonun Uygulanma Şekilleri:

- İntraartikuler enjeksiyon,
- İntramuskuler enjeksiyon,
- Major oto-hemoterapi,
- Minor oto-hemoterapi,
- Rektal yoldan oksijen/ozon karışımının verilmesi,
- Ozon jenaratörü
- Ozonlanmış su (sprey ya da kompres olarak),
- Ozonlanmış zeytin yağıdır.
- Transkutanöz ozon gazı uygulama

(Bhateja 2012; Bocci 2005; Grootvelt ve diğ. 2004)

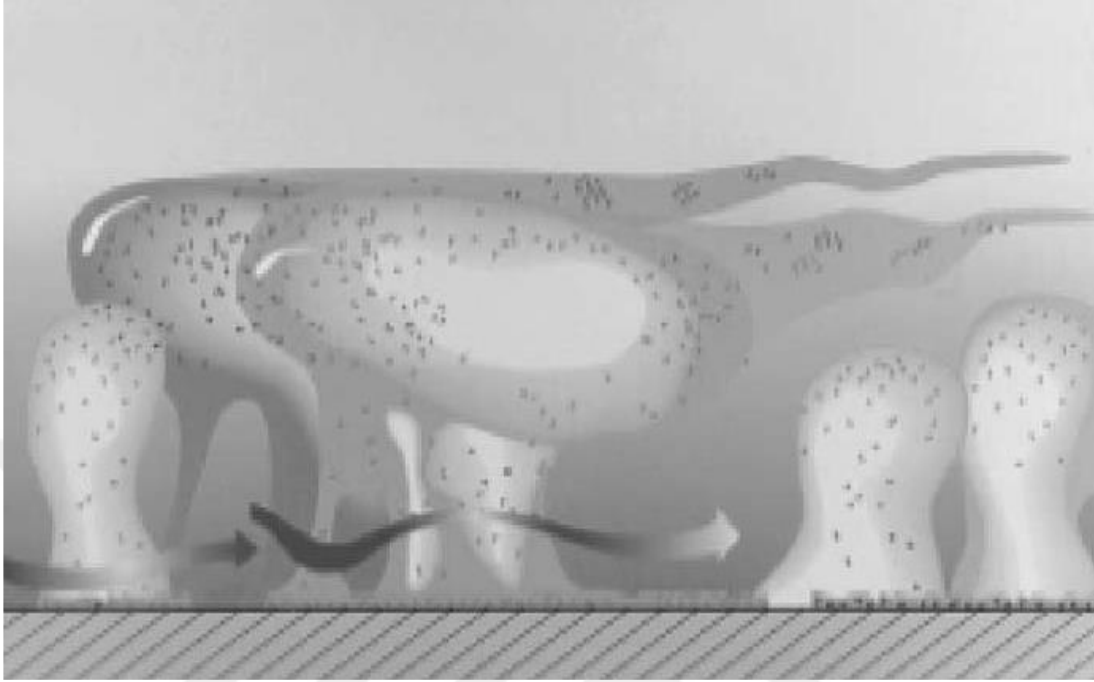
2.6.5. Ozonlu Su

Ozonlu su, sulu bir cihaz içerisinde ozon gazı üretilmesi ile oluşmaktadır. Ozonun oksijene dönüşümü bu cihazlarda daha hızlı olmaktadır ve ozonlu su organik dokularla temasa geldiğinde ayrışması hızlanmaktadır. Bu nedenle ozonlu suyun antibakteriyal etkinliğinin devam etmesi için sürekli taze halde üretilmesi gerekmektedir (Huth ve diğ. 2006; Nagayoshi ve diğ. 2004).

2.7. Biyofilmler

2.7.1. Tanımlar

Biyofilm, ekstraselüler matriks (ECM) içinde gömülü olarak bulunan yüzey ve birbirleriyle sıkıca bağlanmış mikroorganizma topluluğudur (Şekil 2.7.1). Geçmişten günümüze biyofilm konusunda çeşitli bilim insanlarının birbirinden farklı tanımları olmuştur. Costerton ve diğ. Belirttiğine göre biyofilm tanımını “mikroorganizmaların canlı ve cansız yüzeye yapışmasını sağlayan polimerik matriks” olarak tanımlamışlardır. Elder ve diğ. Belirttiği tanımda biyofilmler “ekzopolimer matriks aracılığıyla oluşan yapısal birlik” olarak tanımlamıştır. Carpentier ve Cerf ise biyofilmler için “gömülü olarak bulunan yüzeye yapışmış, organik polimer matriks” demeyi uygun görmüşlerdir. Biyofilmler insan üzerinde en çok kateter gibi vücuda yerleştirilmiş olan tıbbi gereçlerin yüzeylerinde oluşurlar. Ayrıca endüstriyel su sistem boruları ve cam, metal, plastik gibi doğada sıklıkla karşılaşılan objelerin yüzeyinde varlığını gösterirler. Biyofilim içinde yer alan mikroorganizmalar tarafından üretilen ECM'nin temel bileşeni polisakkaritler olur esas biyofilmin oluştuğu yere göre de mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kan bileşenleri gibi maddeleri de içerebilir. Biyofilm içindeki mikroorganizmaların, büyüme oranları, gen transkripsiyonları birbirinden farklı olduğu için birbirinden değişik fenotip özelliği gösterebilirler (Donlan 2002).



Şekil 2.7.1. Ekstraselüler Matriks İçindeki Biyofilm

2.7.2. Tarihçe

17. yy'da Antonie Van Leeuwenhoek'ın mikroskobu keşfetmesinden sonra Leuwenhoek yaptığı mikroskop üzerinde kendi dişeti plaklarının üzerinde oluşmuş olan bakteri gruplarını gözlemlemiştir (Percival ve diğ. 2011). Uzun süreler boyunca bir bilim insanı biyofilm konusunun açığa kavuşabilmesi için çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Yapılan bir çalışmada serbest olarak bulunan mikroorganizmalarının birbirlerine tutunup çoğalma derecelerinin, bir yüzey varlığında mikroorganizmaların birbirlerine tutunup çoğalma derecelerinin daha yavaş olduğunu fark etmişlerdir (Heukelekian ve Heller 1940). Yapılan başka bir çalışmada deniz suyunda bulunan bakterileri incelerken denizin içerisinde bulunan camın yüzeyine tutunan bakterilerin çoğalma hızlarının denizde serbest olarak bulunup çoğalan bakterilerden daha hızlı olduğunu gözlemlemiştir (Zobell 1943). Elektron mikroskobunun kullanımının yaygınlaşmasıyla yüksek çözünürlük ve yüksek büyültmeli yapılan incelemelerden dolayı biyofilmlerle ilgili daha kapsamlı

çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. O yıllarda bir çalışma atık su tesisindeki filtrelerin yüzeyinden örnek alıp elektron mikroskopunu kullanarak incelediklerinde çeşitli türden mikroorganizmaların bir arada bulunduğunu ve etraflarında matriksin polisakkarit forma bulunduğunu göstermişlerdir (Jones ve diğ. 1942). Biyofilmin mikroorganizmaya sağladığı yararlarından biri de mikroorganizmayı antimikrobiyal etkilerden koruduğudur (Murray ve diğ. 2013).

Biyofilm oluşturabilen mikroorganizma ve planktonik mikroorganizmaların metabolik aktifitelelerini karşılaştırdıkları bir çalışmada şu verilere ulaşılmıştır;

- Biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalar farklı yüzeylere tutunmaya daha isteklidir.
- Sulu sistemlerde biyofilm oluşumu, hücrelerin bölünmesi ve ekzopolisakkarit yapımı için gerekli olan besin miktarı ile sınırlanır.
- Ortamda besin eksikliği olduğu durumlarda, mikroorganizmalar ortamdaki organik maddelerin yüzeyine tutunarak lokal biyofilm gelişimine neden olabilir. Fakat bakteriler besin eksikliği fazla olan ortamlarda genellikle yüzeylere tutunamamaktadır (Costerton ve diğ. 1978; Costerton ve diğ. 1995).

2.7.3. Biyofilmin Yapısı

Biyofilmler matrikslerinde canlılıklarını sürdürür. Bu matriksin yapısı ve yoğunluğu mikroorganizmalara göre farklılık gösterir. Bir biyofilmin oluşabilmesi için gerekli olan ortak bileşenler; mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir (Soll 1992). Bu maddelerden herhangi birisi olmazsa biyofilm oluşumu söz konusu olamaz. Biyofilm oluşumunda gerekli olan bileşimlerin oranları ise; %97 su, %2-5 mikroorganizma, %1-2 polisakkarid, %1-2 protein, %1-2 DNA ve iyonlardan oluşmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002). Biyofilmler bir mikroorganizma türü tarafından oluşabileceği gibi birbirinden farklı mikroorganizmaların bir araya gelmesiyle de oluşabilir. Farklı türlerin

bir araya gelmesiyle oluşmuş olan biyofilmlerde her türün bir arada bulunduğu mikrokoloniler vardır. Bu mikrokoloniler de su kanalları ile birbirinden ayrılmıştır. Oksijen difüzyonu ve besin alışverişi bu su kanalları aracılığı ile sağlanır. Mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta arasında zaman alır.

2.7.4. Biyofilmlerin Oluşumu

Biyofilmlere günlük hayatımızda sıklıkla karşılarız. İnsanda; özellikle diş ve dişetlerinin üzerinde oluşan düzenli bakım ile sınırlanabilen plaklar en sık karşılaşılan biyofilmlerdir. Biyofilmin neden olduğu enfeksiyonlarla sıklıkla karşılarız (Percival ve diğ. 2011). Özellikle hastanelerde biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar çok yaygındır. Hatta hastane kaynaklı enfeksiyonların yarısı biyofilm temelli ortaya çıkan vakalar olup morbidite ve mortalitede ciddi artışa neden olurlar (Costerton ve diğ. 1999). Tüm hastane enfeksiyonlarının yarısından fazlası biyofilm temelli olarak ortaya çıkmaktadır (Donlon 2001). Biyofilm oluşum basakmalarının aydınlatılması biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için oldukça önemlidir. Bu kompleks oluşum için direkt mikroskobik inceleme tedavide istenilen başarıya ulaşmada yeterli değildir. Biyofilmin oluşum aşamalarının araştırılmasında in-vivo teknikler, genetik ve moleküler çalışmalar daha başarılıdır.

Biyofilmin oluşum mekanizmalarıyla ilgili yapılan ilk çalışmaların sonuçlarında biyofilmlerin oldukça kompleks yapıda olduğu ve iyi düzenlenmiş bir gelişim sürecine sahip olduğunu göstermiştir (O'Toole ve diğ. 2000).

2.7.5. Bakterilerde Biyofilmin Oluşum Aşamaları

Biyofilm gelişim süreci oldukça kompleks mekanizmaları içeren aktif bir süreçtir. Bakterilerin biyofilm oluşturabilmeleri gerekli olan bazı durumlar vardır. Bunlar sırasıyla;

1. Savunma
2. Adezyon ve Kolonizasyon
3. Yaşanabilir çevre geliştirme
4. Komünite oluşturmak

2.7.5.1. Savunma: Mikroorganizmaların çevresel strese karşı cevap olarak geliştirdiği yapılarıdır. Biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalar, besin kıtlığı, ortamdaki ani pH değişiklikleri, dezenfektanlar, antibiyotik öldürücü maddelerin ortamdaki varlığına karşı planktonik hücrelerden daha fazla direnç gösterirler. Bu yüzden kronik seyirli enfeksiyonlarda strese yanıt olarak biyofilm gelişebilmektedir (Costerton ve diğ. 1999).

2.7.5.2. Adezyon ve Kolonizasyon: İnsan vücudunun bazı bölümlerinde bakterilerin yaşayıp üremesi için besin, su ve oksijen yönünde zengin olan ortamlar bulunmaktadır. Bakteriler canlılıklarını ortam şartları bozulsa da devam ettirebilmek için biyofilm oluştururlar. Bakterilerin vücudun belirli bölgelerine tutunmasını sağlamak için birtakım yöntemleri bulunmaktadır. Bakterinin yüzey proteinleri ile konakçının fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstraselüler matriks proteinleri arasındaki etkileşimler adezyon için oldukça önemlidir. Bu adezin ve matriks proteinleri konakçı ile bakterinin adheransında anahtar rol oynarlar (Çavuşlu ve Oral 2005). Adherans sonrası bu bölgelere göç eden bakteriler bir yandan belli üreme diğer yandan biyofilm oluşturmaya başlarlar. Biyofilm oluşum bakterinin adheransını artırır (Gilmore ve diğ. 2003) (Wolz ve diğ. 2002).

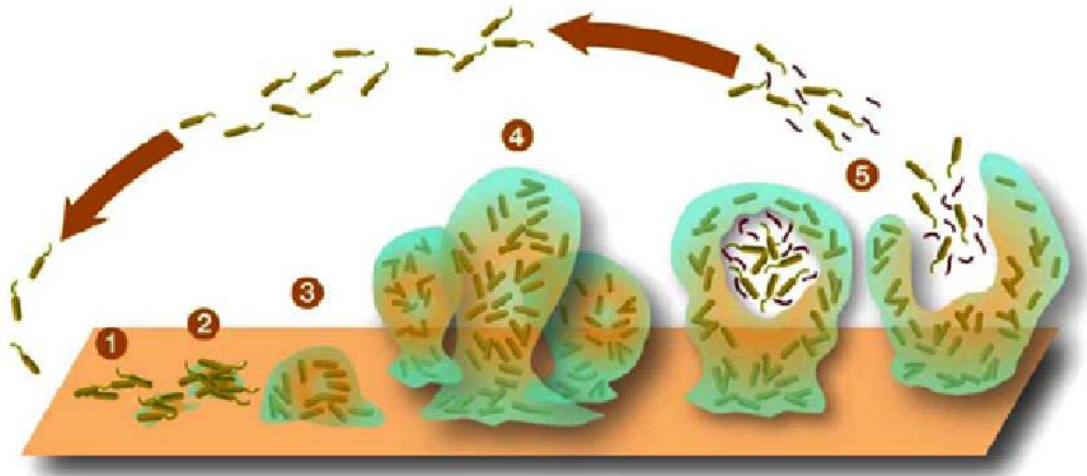
2.7.5.3. Yaşanabilir çevre geliştirme: Çevrede bulunan glukoz gibi bakterinin beslenmesini sağlayabilecek koşullar bakteride ekzopolisakkarit ekspresyonunu artırıp biyofilm oluşmasını hızlandırmaktadır (Ammendolia ve diğ. 1999).

2.7.5.4. Komünite oluşturmak: Bakteri ve konakçı arasındaki ortak paylaşımdır. Bakteriler ortama ne kadar hızlı şekilde adapte olurlarsa biyofilm oluşumları da o kadar hızlı olmaktadır. Kominal yaşamlarının en güzel örneği biyofilm oluşturan tüm mikroorganizmaların çevresel faktörlere verdikleri yanıtlar aynı olsada fenotip olarak birbirlerinden farklı özellik bulundurmalarıdır (Çavuşlu ve Oral 2005).

2.7.6. BAKTERİLERDE BİYOFİLM OLUŞUM BASAMAKLARI

Biyofilm oluşum basamakları temel olarak 5 kısımda incelenir. Bunlar;

1. Dönüşümlü tutunma
2. Geri dönüşümsüz tutunma
3. Koloni gelişimi
4. Biyofilm olgunlaşması
5. Biyofilm hücrelerinin koparak ayrılması



Şekil 2.7.6. Biyofilm Oluşum Basamakları

2.7.6.1. Dönüşümlü Tutunma

Bakterilerin biyofilm oluşturacakları yüzey ile ilk temasında tam olarak bir temas kurulmaz fakat bakteri ile yüzey arasında uzaktan bir etkileşim meydana gelir. Bakteri hücrelerinin yüzey özellikleri bakteriyel tutunmada önemli rol oynar. Bakterinin yüzey ile temasının gerçekteşmesi bakteri hücre yüzeyinin; hidrofobikliğine, pH, sıcaklık, yüzey yükü bir takım fizyokimyasal özelliklere bağlıdır. (Nilsson ve diğ. 2011). Yüzeye tutun gösteren hücreler az miktarda Expanded Polystyren Foam (EPS)'ye sahip olup bağımsız hareket edebilirler (O'Toole ve Kolter 1998).

2.7.6.2. Dönüşümsüz Tutunma

Dönüşümlü tutunma aşamasından dönüşümsüz tutunma aşamasına geçiş bakterinin yapmış olduğu zayıf bağların EPS varlığında kalıcı bağlara dönüşmesidir (Stoodley ve diğ. 2002). Dönüşümsüz tutunmada dönüşümlü tutunmada oluğu gibi uzun mesafe değil yüzeyle kısa mesafeli etkileşimler sağlamaktadır. Bakteri hücreleri 2 şekilde yüzeylere dönüşümsüz olarak bağlanma gösterirler. Bunlardan birincisi EPS oluşturmak ikincisi de fizyolojik olarak sahip oldukları flagella (kamçı) ve pili (ince kıl) gibi organelleridir (Poulsen 1999). Dönüşümsüz tutunma aşaması gerçekteştikten sonra biyofilm hücrelerini yüzeyden uzaklaştırabilmek oldukça güçtür. Günümüzde bu uzaklaşmanın sağlanması için güçlü mekanik kuvvet, enzim, dezenfektan, deterjan, sanitizerler (Sinde ve Carballo 2000) ve/veya yüksek ısılı işlemleri yapılmaktadır (Augustin ve diğ. 2004; Maukonen ve diğ. 2003; Sinde ve Carballo, 2000).

2.7.6.3. Koloni Gelişimi

Yüzeyde biriken bakteri hücrelerinin EPS üretimi ve mikroorganizmaların gelişmesi sonucunda mikrokoloni gelişimi başlar (Chmielewski ve Frank 2003). Bakteri ve alt katmanları arasında bağ oluşumuna yardımcı olan EPS'nin aynı zamanda koloniyi streten koruma görevinde vardır (Donlan 2002). Bir bakteri hücresi biyofilm oluşturacağı yüzeyde koloni oluşturduktan sonra, diğer bakterilerde yine aynı yüzey üzerinde koloni

oluşturabilir. Biyofilm geliştikçe, polimer matriksinde kapsül oluşturmuş mikroorganizmalarda da artış görülür (Poulsen 1999). O'Toole ve Kolter (1998) yaptıkları bir çalışmada *P.aeruginosa* PA14'susunun mikrokoloni oluşturabilmesi için pili 4 genine ihtiyacı olduğunu saptamışlardır. Bakterinin yüzme hareketleri, yüzeyde daha rahat hareket edebilmesini ve alt katmana ulaşabilmesini daha rahat sağlamaktadır. *P.aeruginosa* PA14'susunun pili 4 yardımıyla uzama ve geri çekilme hareketleriyle mikrokolonileri oluşturduğu düşünülmektedir (Skerker ve Berg 2001).

2.7.6.4. Biyofilm Olgunlaşması

Biyofilm hücreleri çevresindeki besin maddelerinin sayesinde apartman yada mantar şekline benzer yapılara dönüşürler (Chmielewski ve Frank 2003). Farklı yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerde su kanalları oluşmaya başlar. Bu su kanallarında biyofilm hücreleri arasında besinlerin alışverişi ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için dolaşım sistemi olarak görev yapan yapmaktadır (Poulsen 1999). Hücrelerin bu düzeydeki yapılara ulaşabilmesi için gerekli olan zaman mikroorganizma türüne göre değişiklik göstermektedir. (Stoodley ve diğ. 2002).

2.7.6.5. Biyofilm Hücrelerinin Koparak Ayrılması

Biyofilm oluşumunun son basamağı olarak biyofilm hücrelerinin yüzeyden koparak ayrılmasıdır. Bu basamakta hücreler planktonik fazlarına geri döner (Sauer ve diğ. 2002). Artan akış kuvveti (Stoodley ve diğ. 2002), iç enzimatik bozulma, EPS yada yüzey bağlayan proteinlerin açığa çıkması gibi hücre içinde görülen faaliyetler biyofilm hücrelerinin ayrılmasında oldukça etkilidir (Kaplan ve diğ. 2004). Ortamda bulunan besin maddesinin kıtlığına bağlı oluşan strest de biyofilm hücrelerinin ortamdan koparak ayrılmasında etkilidir (O'Toole ve Kaplan 2000). Kopma işlemi dış faktörlerin etkisine bağlı olarak gerçekleşebileceği gibi biyofilm oluşturan hücrelerin tek yada çoklu olarak kopmasıyla da gerçekleşebilmektedir (Poulsen 1999).

2.7.7. Biyofilmlerin Mikroorganizmalarla İlişkileri

Bakterilerin oluşturdukları biyofilmlerin bakteriye sağladığı birtakım yararlar vardır. Bu yararlardan bazıları;

1. Çevresel faktörlere direnç

Biyofilmler bakterileri çevre koşullarındaki değişimlere (nem, ısı ve pH) karşı ve ultraviyole ışığın zararlarından korumaktadır (Post ve diğ. 2004).

2. Besinlerin depolanması ve atıkların uzaklaştırılması

Biyofilmlerin oluşum esnasında meydana gelen mikrokolonilerin etrafında dolaşım sistemine benzeyen su kanalları vardır. Bulunan bu su kanallarının görevi de diğer mikrokoloniler ile arasındaki besin alışverişini sağlamak hem de ortamda bulunan metabolit maddelerin ortamdaki uzaklaşmasını sağlamaktır (Post ve diğ. 2004).

3. Fagositozdan ve Antibiyotiklerden Korunma

Bakterilerin ekzopolisakkarid matrikslerin içinde gömülü halde bulunmaları bakterilere birtakım avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajların başında fagosite olmalarının zorlaşması ve hümmoral immün sistem hücrelerinin bakterilere ulaşması da engellenmiş olabilmeleri gelir.

Biyofilme sahip organizmalar, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Biyofilm, kronik seyirli enfeksiyonlara bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olduğu bilinmektedir (Donlan ve Costerton 2002).

4. Metabolik iş birliği yeni genetik özelliklerin kazanılması

Bakteriler ortama daha çabuk adapte olabilmek için biyofilm oluşturmaktadırlar. Bakteriler biyofilm oluşturmalarının hemen ardından hızlı bir şekilde planktonik fazlarına geri dönmektedirler. Bu durumda ortama uygun olarak eksprese ettikleri genler aracılığı ile olmaktadır. Biyofilm üreten tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı

vermiş ortak yaşamlarının en önemli göstergesidir. Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Çoklu ilaç dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında bu durum oldukça önemlidir (Davey ve O'toole 2000).

2.7.8. Biyofilmlerin Neden Olduğu Hastalıklar

Biyofilm oluşturabilen bakteriler insanda çeşitli akut ve kronik enfeksiyonlar yapmaktadır. Bu hastalıkların başında doğal kapak endokarditi, otitis media, kronik bakteriyel prostatit, kistik fibrozis, periodontit gibi doğal seyirli hastalıklar, protez kapak, santral venöz katater, üriner kateter, ortopedik protez, kontakt lens ve intrauterin cihazlar gibi yabancı cisim enfeksiyonları gelir (Donlan ve Costerton 2002).

2.7.9. *P.aeruginosa*'da Biyofilm Oluşumu;

P.aeruginosa'da biyofilm oluşumu ilk olarak flagella ve twitching(segirme) hareketi ile başlar (Erickson ve diğ. 2002). Biyofilmin oluşması için pH, pCO₂, hidrojen seviyesi, besin varlığı gibi değişkenler oldukça etkilidir (Çavuşlu ve Oral 2005). Yapılan çalışmaların sonucuna bakıldığında biyofilm olgunlaşmasında (Quorum Sensing) QS sisteminin gerekli olduğu bildirilmiştir (Parsek ve Greenberg 2000). *P.aeruginosa*'nın biyofilm oluşacak olan yüzeye bağlanmasından sonra, bakteri hücreleri yüzey üzerinde tabaka oluşturacak şekilde üreyip çoğalırlar. Tabaka içerisinde çoğalan bakteri hücreleri, tabakanın yüzeyinde twitching hareketi yaparlar. *P.aeruginosa*'da bu hareketi Tip IV piliye gerçekleştirir. Twitchinghareketi ile *P.aeruginosa*'nın mikrokolonilerini oluşturur (Sonawane ve diğ. 2006).Mikrokolonilerde farklılaşarak olgun biyofilmlere dönüşürler. Mikrokoloniler olgun biyofilmi oluştururken mantar şekline benzerler. Bu mantar şeklindeki yapının içerisinde bulunan hücreler Ekstraselüler Matriks (ECM) içinde gömülü halde bulunurlar. Biyofilimde bulunan su kanalları, içeriye besin

girmesine yardımcı olurken diğer yandan da ve dışarıya metabolik atıkların atılımını sağlar. Tip IV pili mutasyonunda biyofilmin şekli mantara benzememektedir. Pilus yapısında yer alan tip I lektin (LecA) ve tip II lektin (LecB) yokluğunda olgunlaşmamış, ince biyofilm oluşur. LecA ve LecB üretimi QS sistemi tarafından düzenlenmektedir (Tielker ve diğ. 2005),(Winzer ve diğ. 2000).

2.7.10. *Staphylococcus* Türlerinde Biyofilm Oluşumu;

Biyofilm oluşumu *Staphylococcus*'larda iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk olarak bakteriler bir yüzeye yapışıp tutunarak kolonize gerçekleştirirler (erken aderans). Bu aşamadan adımdan “Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules” (MSCRAMM) adındaki yüzey proteinleri sorumludur (Vancraeynest ve diğ. 2004). *Staphylococcus*'larda bulunan yüzey proteinlerinden diğerleri de ekstraselüler (fibronektin, fibrinojen, vitronektin, kollajen, elastin vb.) konak doku ligandlarına bağlanabilir ve solid yüzeylere aderansın başlamasında anahtar rol oynarlar (Jefferson 2004). İkinci aşamada ise hücreler arasında adezyon gerçekleşmekte ve çok tabakalı biyofilmler oluşmaktadır (interselüler adezyon). *S.aureus*'ta biyofilm oluşmasında İcaADBC operonu ve ürünü olan “Polysaccharide Intercellular Adhesin” (PIA) sorumludur. *S.aureus* matrisli bir sığırdan (*S.aureus* V329) izole edilen “Biofilm Associated Protein” (BAP) biyofilm oluşumu için önemli olan bir yapı olduğu bildirilmiştir. *S.aureus*'da bulunan bap geni sayesinde daha güçlü biyofilm oluştururlar. *S.aureus*'da bulunan MSCRAMM, PIA ve Bap'ın bir arada bulunuyor olması biyofilm oluşumuna önemli katkı sağlar. Biyofilm associated protein (bap); yüksek ağırlıklı moleküller içermesi ard arda tekrarlayan C-domainlerini içermesi bakterilerin yüksek biyofilm oluşturma kapasitesini sağlarken aynı zamanda enfeksiyon sürecinde de önemli rol oynayan 2276 aminoasit içeren bir proteindir (Lasa ve Penades 2006).

2.7.11. Biyofilm Analiz Yöntemleri

Biyofilmi oluşturan mikroorganizmaların türü, sayısı ve canlılığı, biyofilmin yaşı, kalınlığı yapısı ve yüzey topografisi gibi karakteristik özellikleri incelemek amacıyla biyofilmlerin analizinde birbirinden farklı metodlar kullanılmaktadır (Kishen ve Haapasalo 2010).

2.7.11.1. Mikrobiyolojik Kültür Teknikleri

Canlı mikroorganizma sayısının tespit edilmesi amacıyla yapılan altın standart olarak kullanılan yöntemdir. Bu yöntemin temelinde mikroorganizmaların besiyerinde üretilen kültürlerinin bir yüzey üzerinde biyofilm oluşturulması ve yüzeye yapışan mikroorganizmaların sayısının koloni oluşturma birimi (CFU) olarak belirlenmesidir. Ölçümler, biyofilm içerisinde çoğalan mikroorganizma sayısını belirlemede yardımcı olur (Kishen ve Haapasalo 2010).

Bu teknik yaygın olarak dezenfeksiyon maddelerin etkisinin ölçülebilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntemle yapılan çalışmalarda dezenfektanlar ve antimikrobiyal ajanlar ile yapılan muameleden sonra geriye kalan canlı mikroorganizma sayısı tespit edilerek çalışmada kullanılan ajanların etkinliği belirlenir (Du ve diğ. 2014; Kishen ve Haapasalo 2010).

2.7.11.2. Kolorimetrik Teknikler

Kolorimetrik tekniklerin kullanım amacı biyofilm üreten mikroorganizmaların boya alma prensibine dayanan yarı niceliksel tekniktir. Bu metotta mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilm belirlenen boyalar ile boyanıp alkol ya da sürfaktan kullanılarak ortamdan boya uzaklaştırılır. Spektrofotometre ile ölçüm yapıp boyanın dağılımının yoğunluğuna bakılır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizma sayılarının belirlenmesini sağlayan hızlı ve kolay bir metoddur (Kishen ve Haapasalo 2010).

2.7.11.3. Mikroskopik Teknikler

Değişik mikroskopların mikroorganizma ile substrat birleşimini, biyofilm oluşumunu, biyofilm yapısını ve biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların şekli, dağılımı ve canlılığının belirlenmesi için kullanılmaktadır (Kishen ve Haapasalo 2010).

- **Işık Mikroskobu**

Işık mikroskobu, biyofilm oluşumunun görüntülediği ilk mikroskopdur. Günümüzde hem in vitro örneklerde hem de histolojik kesitlerde biyofilm değerlendirmesi amacıyla kullanılmaktadır. Avantajlarının başında ucuz ve kullanım kolaylığı gelmektedir. Aynı zamanda hızlı sonuç veren güvenilir bir yöntemdir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların morfolojileri hakkında bilgi almada sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Mohammadi ve diğ. 2013).

- **Taramalı Elektron Mikroskobu**

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), üretildiği ilk zamandan beri biyofilm çalışmalarında yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Mikrobiyal biyofilmlerin yapısal özellikleri ve morfolojileri hakkında bilgi verir. Yüksek çözünürlüğü bu yöntem için bir avantaj olsada örnek hazırlanma aşamalarının fazla zaman alıyor oluşu bu yönteme dezavantaj katmaktadır (Kishen ve Haapasalo 2010; Mohammadi ve diğ. 2013).

- **Transmisyon Elektron Mikroskobu**

Transmisyon elektron mikroskobunda, artefakt meydana gelmesini önlemek için örnek oluşturma aşamaları uzun laboratuvar çalışmalarını gerektirmektedir. Fakat biyofilm yüzeyinin görüntülerin çözünürlüğü çok net olduğu için biyofilm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Mohammadi ve diğ. 2013).

- **Epifloresans Mikroskobu**

Bu yöntem; biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların yapısını, biyofilm hücre yerleşimini, biyofilm pH'sını ve biyofilmin yapısındaki kimyasalların dağılımını

incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Biyofilmin sıklıkla oluştuğu yzeylerdeki olgunlaşmış biyofilmi incelemek için floresan boya ile boyanarak epiflorasans mikroskobunda incelenebilir (Kishen ve Haapasalo 2010).

- **Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop**

Konfokal mikroskop; in vitro koşullardabiyofilm oluşumunun gösterilmesi için en yaygın kullanılan mikroskopların başında gelir. Diğer mikroskobik yöntemlerdeki olumsuz alışma Őartlarından ziyade, bu yöntem ile alınmış en kötü kalın kesitlerde bile biyofilm yapısının incelenmesine olanak vardır (Amos ve White 2003; Chvez de Paz 2007; Kishen ve Haapasalo 2010; Mohammadi ve diğer. 2013).

Bu yöntem ile biyofilmin üç boyutlu yapısı ve mikrokoloniler inideki mikroorganizmaların dağılımları canlılık oranları belirlenebilir. Lazer taramalı konfokal ile dezenfeksiyonu etkinliğinin değerlendirilmesinde güvenilir bir metod olduğu bildirilmiştir (Du ve diğerleri, 2014; Flach ve diğer. 2016).

2.7.11.4. Fiziksel Metotlar

Biyofilmin büyüme oranının tespitinde yaygın olarak kullanılan bu yöntemde biyofilm alanı, ağırlığı, kalınlığı, yoğunluğu gibi parametrelere bakılır (Kishen ve Haapasalo 2010).

2.7.11.5. Biyokimyasal Metotlar

Mikrobiyal biyokütlenin ve ECM'nin ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Mikrobiyal biyokütlenin analizinde kullanılan hızlı metotlar, biyofilmin ıslak ve kuru ağırlığının ölçümü, hücre içeriğinin ölçümü, canlı hücreler ya da hücresel aktivitenin ölçümüdür (Kishen ve Haapasalo 2010).

2.7.11.6. Moleküler Metotlar

Biyofilm üreten mikroorganizmaların genetik yapıları hakkında bilgi sahibi olmak için kullanılan bir yöntemdir. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonarda; biyofilm oluşturan mikroorganizmaların etkinliğinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Bu amaçla; enzim bağlı immunsorbent değerlendirme ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılan yöntemlerden bazılarıdır (Kishen ve Haapasalo 2010).

2.7.11.7. Çeşitli İleri Teknikler

Atomik kuvvet mikroskopisi, Fourier transform infrared spektroskopigibi yöntemleri içerir. Olgunlaşmış biyofilmin kimyasal kompozisyonunun belirlenmesi ve biyofilmin kimyasal yapısının kalitatif ve kantitatif analizi amacıyla kullanılmaktadır (Jhajharia ve diğ. 2015; Kishen ve Haapasalo 2010).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada kullanılan mikroorganizmalar Namık Kemal Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı stoklarından, dezenfektan maddeler ise hastanenin deposundan temin edildi. Çalışmada kullanılan ozon jeneratörü de hastanenin biyomedikal bölümü tarafından çalışmada kullanılmak üzere yapıldı.

3.1.Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

Besiyerleri çalışma gününden bir gün önce taze olarak hazırlanıp kullanım öncesine kadar +4°C'lik buzdolabında saklandı.

3.1.1.Trypticase Soy Agar (TSA) (BD™ Becton, Dickinson and Company, Almanya)

İçerik;

- Pancreatic Digest of Casein: 15 g/l
- Papaic Digest of Soybean: 5 g/l
- Sodium Chloride: 5 g/l
- Agar: 15 g/l

Hazırlanışı; Toz besiyerinden 40 g tartılıp 1 L'yi tamamlayana kadar distile su eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edildi. Steril petri kaplarına kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldü.

3.1.2. Tryptone Soya Broth (TSB) (BD™ Becton, Dickinson and Company, Almanya)

İçerik;

- Tryptone (Pancreatic Digest of Casein) 17 g/lt
- Bacto Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal) 3,0 g/lt
- Glucose (Dextrose): 2,5 g/lt
- Sodium Chloride: 5 g/lt
- Dipotassium Hydrogen Phosphate: 2,5 g/lt

Hazırlanışı; Toz besiyerinden 30 g tartılıp 1 L'yi tamamlayana kadar distile su eklenip otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edildi. Steril tüplere eşit miktarda dağıtıldı.

3.1.2. Blood Agar Base (Kanlı Agar) (Oxoid, İngiltere)

İçerik;

- `Lab-Lemco' powder 10 g/lt
- Peptone Neutralised:10 g/lt
- Sodium chloride:5 g/lt
- Agar: 15g/lt

Hazırlanışı; Toz besiyerinden 40 g tartılıp 1 L'yi tamamlayana kadar distile su eklenip çözdürüldü. pH 7,3'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edildi. Sıcaklığı 45-50 °C'ye kadar soğutulup, içine %5 defibrine insan kanı ilave edilip steril petri kaplarına kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldü.

3.2. Mikroorganizmaların Canlandırılması

Çalışmada biyofilm ürettiği bilinen *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu kullanıldı. Çalışma öncesi dondurucudan -80°C'de saklanan eppendorf içerisindeki stok suşlar çıkarıldı. 5 dakika oda ısısında bekletilip çözdürülen

stok suşların kanlı agar üzerine yayma ekimi yapıldı. Pasajı plaklar 37°C’de 24 saatlik inkübasyon için etüve bırakıldı.

3.3. Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

Çalışmada kullanılan *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşlarının biyofilm üretiminin değerlendirmesi için Christensen ve ark. (62) tanımladığı mikrotitrasyon çalışması aşağıda anlatılan şekilde yapıldı.

3.3.1. Mikrotitrasyon Plak Çalışması

Kanlı agarda 37°C 24 saatlik inkübasyon sonrası *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853’ün taze kültürlerinden 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml: Colony Forming Unit/ mililitre) bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan süspansiyonlar %2 glukoz içeren triptik soy buyyon (TSB) içeren tüplere alınarak etüvde 37°C’de 24 saatlik inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon süresinin sonunda TSB’den alınan kültürlerin 1:100’lük seyreltmesi yapıldı. Seyreltmesi yapılan kültürlerden steril pipetler ile 200µl alınıp 96 kuyucuklu mikropakların içerisine eklendi. Her suş için 3 kuyucuk kullanıldı. Biyofilm üretiminin negatif kontrolü olarak bakteri içermeyen %2 glukoz içeren TSB kullanıldı. Mikropaklar hazırlandıktan sonra 37°C’de 24 saat aerop ortamda inkübasyona kaldırıldı. İnkübasyon süresinin sonunda mikropaklardaki sıvı besiyeri akıtılıp kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkandı. Kuyucukların her birine %2’lik kristal viyolede 200 µl alınıp eklendi. 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. 30 dakika sonrası tekrardan kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkanıp kurutma kâğıdına suyu akacak şekilde yerleştirilip kurutuldu. Kurduğundan emin olunan kuyucukların üzerine 200 µl etanol asetik asit (95:5) eklenerek 10 dakika bekletildi ve boyanın çözünmesi sağlanmış oldu. Kuyucuklar üzerinde tutunmuş olan biyofilmi dalga boyu 540 nm olan ELİSA (Biomerus-Vidas) okuyucuda okutuldu.

Farklı yüzeylere dezenfektan ve ozon uygulaması yapıldıktan sonra üreme gösteren bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğini ölçmek amacıyla mikrotitrasyon plak çalışması yukarıda anlatıldığı şekilde bir kez daha yapıldı. İlk başta yapılan biyofilm oluşturma derecesi ile dezenfektan ve ozona maruz kaldıktan sonra yapılan biyofilm oluşturma dereceleri karşılaştırıldı.

3.4. Yüzey ve Dezenfektan Seçimleri

Çalışmada dezenfektanların ve ozonun farklı yüzeylerdeki mikroorganizmalarının üzerine etkisi ve etki süresini araştırıp aynı zamanda biyofilm oluşturma yeteneklerini gözlemlemek amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda birbirinden farklı 3 yüzey seçildi. Bu yüzeyler; 384 adet 10x10 mm boyutunda cam, 384 adet 10x10 mm boyutunda metal ve 384 adet 10x10 mm boyutunda PVC (Poli Vinil Clorur)'dir.

Hastanede en sık kullanılan, etki ve etkinlik süreleri birbirinden farklı olan dezenfektan maddeler arasından; Etil alkol, glutaraldehit (GAA), hidrojen peroksit, Ortofitalaldehit (OPA) ve Perasetik asit (PAA) kullanıldı.

Son yıllarda alternatif tıpta sıklıkla kullanılan ozonun etkinliğinin dezenfektanların etkinliğiyle karşılaştırmak ve biyofilm oluşturma yeteneğinin ölçülmesi amacıyla hastanemizde yapılmış olan ozonlu su jeneratörü kullanıldı.

3.4.1. Dezenfektan Nötralizasyonun Ayarlanması ve Etkiliğinin Değerlendirilmesi

Dezenfektan ve mikroorganizma temasının belirlenen süreler bitiminde sonlandırmak için nötralizasyon solüsyon hazırlandı. Bu solüsyonu hazırlanırken solüsyonda kullanılan maddeler steril etmek amacıyla 0,25 mikrometrelik filtreden geçirildi. Solüsyonun içerisinde kullanılan maddeler (Wirtanen ve ark, 2001)

- Tween 80 (Sigma, Almanya) % 6,0 L
- Lesithim (Sigma, Almanya) %0,1 L

- Saponin (Sigma, Almanya)% 3 L
- L-histidine (Sigma,Almanya) %0,1 L

son konsantrasyon olacak şekilde TSB ile hazırlandı. Hazırlanan solüsyon steril olması amacıyla 121°C’de 15 dakika steril edildi.

Nötralize edici solüsyonun etkinliğini denemek amacıyla kontrolü yapıldı. Bu amaç doğrultusunda;

Steril U tabanlı tüp içerisine 100 µl distile su, 800 µl dezenfektan ve 10⁸’e seyreltilmiş 100 µl mikroorganizma eklendi. 5 dakika vortekste karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüpün içerisinden 10µl alınarak kanlı agar üzerine ekim yapıldı. Çalışmanın pozitif kontrolü olarak farklı bir steril u tabanlı tüp içerisine 100 µl nötralize edici solüsyon, 800 µl dezenfektan ve 10⁸’e seyreltilmiş 100 µl mikroorganizma eklendi. 5 dakika vortekste karıştırılıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi. İnkübasyon süresinin sonunda tüpün içerisinden 10µl alınarak kanlı agar üzerine ekim yapıldı. 37°C’lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda besiyeri plağında koloni sayımı yapıp nötralizasyon etkinliği belirlendi.

3.4.2. Kullanılan Dezenfektan Maddelerin Sulandırılması

Çalışmada kullanılan dezenfektan maddeler üretici firmanın talimatları doğrultusunda dilüeedildi.

3.4.3. Sulandırma Çözeltisinin Hazırlanması

Dezenfektan maddeyi sulandırmak amacıyla distile su cam balon içerisine konulup otoklavda 121°C’de 15 dakika steril edildi.

- Etil alkol (Alkomed): %70'lik alkol için 100 ml'de 74 ml alkol ve 26 ml distile su olacak şekilde hazırlandı. %50'lik etil alkol için 50 ml alkol ve 50 ml distile su olacak şekilde hazırlandı.
- Glutaraldehit (%2) (Cidex); Sulandırılmadan, çalışmada GA'in renksiz ve sıvı formdaki %100'lük konsantrasyonu kullanıldı. 1/200 ve 1/400'lük sulandırılması yapıldı.
- Perasitik asit (%0,3) (ANİOS RN): Çalışmada perasitik asitin %100'lük konsantrasyonu kullanıldı.1/200 ve 1/400'lük sulandırılması yapıldı.
- OPA (0,55) (Cidex): Çalışmada OPA'nın %0.55'lik konsantrasyonu kullanıldı. 1/200 ve 1/400'lük sulandırılması yapıldı.
- Hidrojen Peroksit (%7,5) (Diversey): Çalışmada hidrojen peroksid'in renksiz ve sıvı formdaki %100'lük konsantrasyonu kullanıldı. 1/200 ve 1/400'lük sulandırılması yapıldı.

3.4.4. Dezenfektanların Etkinliğinin Belirlenmesi

Bu çalışmada dezenfektanların etkinliğini belirlemek için kalitatif süspansiyon testi uygulandı. Çalışmanın amacı belirli yoğunluktaki bakteri süspansiyonunun hastanede en sık kullanılan dezenfektanlarla belirlenen sürede temas ettirilmesidir.

Çalışmada kullanılmak olan mikroorganizmalar *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu önceden anlatıldığı gibi canlandırıldı. 1 gece önceden canlanan suşlar TSA besiyerine ekilerek 37°C'lik etüve kaldırılıp 24 saat inkübasyona bırakıldı. Mikroorganizmaların üreyen kültürlerinden TSB ile 0,5 McFarland (10^8 CFU/ml: Colony Forming Unit/ mililitre) bulanıklığında bakterisüspansiyonları hazırlandı.

Cam, metal ve PVC yüzeylerinin sterillliğini sağlamak amacıyla çalışma öncesi çamaşır suyuyla yıkanıp durulandı. Cam ve metal yüzey otoklava uygun olduğu için 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Her bir yüzey TSA içerisine yerleştirildi. *S.aureus*'un TSB'deki bakteri süspansiyonundan 10 µl alınıp yüzeylerin üzerine ekim yapıldı. Aynı işlem *P.aeruginosa* için de tekrarlandı. Ekimi yapılan bakteriler 37°C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda koloniler sayılarak yüzeydeki bakteri sayısı hesaplandı.

Farklı yüzeylere dezanfektan etkinliğini belirmemek için TSA içerisinde bulunan farklı yüzeyler steril pens ile alınıp steril petrilerin içerisine yerleştirildi. Çalışma günü önceden anlatıldığı gibi ayarlanan dezanfektan konsantrasyonlarından 1 ml farklı yüzeylerin üzerine döküldü. Dezanfektanın etkinliğinin tam olarak ortaya çıkması için dezanfektanların objenin tüm yüzeyini kaplamasına dikkat edildi. Dezanfektanlar uygulandıktan sonra mikroorganizma ile dezanfektanın temas süreleri 1, 5, 10, 15, 30 ve 60 dakika olacak şekilde bekletildi. Belirlenen temas süreleri sonunda yüzeyler steril pens ile petriden çıkartılıp steril konik tabanlı tüp içerisine yerleştirildi. Dezanfektan ile mikroorganizma arasındaki tepkimeyin durdurulması için tüpün içerisine önceden hazırlanışı anlatılan 900 µlnötralizasyon solüsyonu eklendi. Tüp vortekste 15 dakika karıştırıldı. Dezanfektanın etkinliği durduktan sonra yüzeyin üzerinden 0,1 ml örnek alınarak TSA besiyerine ekimi yapıldı ve 37°C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Çalışmada kullanılan dezanfektanların her bir konsantrasyonunun etkinliğini belirlemek amacıyla tüm konsantrasyonlarda aynı işlem uygulandı.

Çalışmanın kontrolü olarak aynı aşamalar izlenip dezanfektan yerine steril serum fizyolojik su kullanıldı.

İnkübasyon süresi sonunda elde edilen koloni sayılarının ilk baştaki yüzeydeki koloni sayısından çıkartılarak logoritmik azalma sayısı hesaplandı. Bu şekilde dezanfektanın etkinlik seviyesi belirlendi. Ayrıca inkübasyon sonunda dezanfektanın biyofilm oluşturma yeteneği üzerindeki etkinliğini göstermek amacıyla üreme gösteren koloniler üzerinden mikrotitrasyon plak çalışması yapıp 540 nm dalga boylu ELİSA'da okutuldu. Sonuçlar dezanfektan uygulanması olmayan *S.aureus* ATCC 29213suşu ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşunun biyofilm oluşturma dereceleri ile karşılaştırıldı.

3.5. Ozonun Etkinliğinin Belirlenmesi

Ozonlu su jeneratörü çalışmaya başlamadan 30 dakika önce power tuşuna basılıp aktif duruma getirildi. Yarım saat sonunda taze olarak üretilen ozon jeneratörün içerisinden steril bir pipet ile ozonlu su çekilip steril tüplere konuldu.

Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların seyreltimi ve farklı yüzeylerin dezenfektan işlemleri daha önce anlatıldı. Cam, metal ve PVC yüzeylerin üzerine *S.aureus* ve *P.aeruginosa* ekimi yapıp inkübasyon süresi boyunca bekletildi. Inkübasyon süresi tamamlanan mikroorganizmalar etüvden çıkarıldı. TSA içerisindeki farklı yüzeyler steril pens yardımıyla alınıp steril falcon tüplerinin içerisine yerleştirildi. Taze olarak üretilmiş olan ozonlu suyun bulunduğu deney tüpünden 1 ml ozonlu su alınıp içerisinde farklı yüzeylerin bulunduğu falcon tüplerinin içerisine döküldü. Yüzeyin tamamının ozon suyu ile kaplanmasına dikkat edildi. Ozonlu suyun etkinlik süresini belirleyip dezenfektan etkinlik süreleriyle kıyaslamak amacıyla 1, 5, 10, 15, 30 ve 60 dakika olacak şekilde ozonlu su içerisinde bekletildi. Belirlenen temas süreleri sonunda yüzeyler steril pens ile falcon tüplerinden çıkartılıp steril distile su ile durulandı. Ozonun etkinliğini belirleyebilmek amacıyla yüzey üzerinden 0,1 ml örnek alınıp TSA besiyerine ekimi yapıldı ve 37°C'lik etüvde 24 saatlik inkübasyona bırakıldı.

Çalışmanın kontrolü amacıyla aynı aşamaları izleyen ozona maruz bırakılmadan ozon yerine serum fizyolojik su kullanıldı.

Inkübasyon süresi sonunda elde edilen koloni sayılarının ilk baştaki yüzeydeki koloni sayısından çıkartılarak logoritmik azalma sayısı hesaplandı. Bu şekilde ozonun etkinlikliğı belirlendi.

3.6. Biyofilm Oluşturma Yeteneklerinin Belirlenmesi

Farklı yüzeylere dezenfektan ve ozon uygulaması yapıldıktan sonra üreme gösteren bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğini ölçmek amacıyla mikrotitrasyon

plak çalışması daha önce anlatıldığı şekilde yapıp 540 nm dalga boyunda ELİSA’da okutuldu. Sonuçlar dezefektan uygulanması olmayan *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853’ün biyofilm oluşturma dereceleri ile karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

5.1. Nötralizan Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Hazırlanan nötralizan çözeltinin çalışmada kullanılan bütün dezenfektanların etkinliğini inaktive ettiği görüldü.

5.1.2. Bakteri Sayısı

S.aureus ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 standart suşlarının dezenfektan ve ozon uygulaması yapılmadan önce kanlı agar besiyerine ekimi yapıp 37°C’lik etüvde 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda mikroorganizmaların üreyen kültürlerine TSB ile 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) bakteri sayımı yapıldı (Tablo 5.1.2).

Tablo 5.1.2. Dezenfektan ve ozon uygulanmadan önce bakteri sayımı

<i>S.aureus</i> ATCC 29213	$1,4 \times 10^8$ CFU/ml
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	$1,6 \times 10^8$ CFU/ml

5.2. Kullanılan Dezenfektan ve Ozonun Mikroorganizmalar Üzerindeki Etkinliği

5.2.1. Glutaraldehit

Çalışmada kullanılan Glutaraldehit (%2)'in *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine etkinliği Tablo 5.2.1de gösterildi. Çalışmada kullanılan cam, metal ve PVC yüzeyin etkinliklerinin aynı olduğu görüldü. Glutaraldehit (%2)'in sulandırılmamış (%100'lük), 1/200 ve 1/400 farklı sulandırılmalarda; 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık temas sürelerinin sonundaki bakteri üremesi şu şekildedir:

GAA'in sulandırılmamış %100'lük konsantrasyonun *S.aureus* ile 1 dakika ve 5 dakika temas süreleri sonunda; GAA'in 1/200'lük sulandırımında *S.aureus* ile 1 dakika, 5 dakika ve 10 dakikalık temas süreleri sonunda; GAA'in 1/400'lük sulandırmanın *S.aureus* ise 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika ve 15 dakikalık temas süresi sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

GAA'in sulandırılmamış %100'lük konsantrasyonun *P.aeruginosa* ile 1 dakika temas süresi sonundayapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlendi. GAA'in 1/200'lük sulandırımında *P.aeruginosa* ile 1 dakika ve 5 dakikalık temas süreleri sonunda; GAA'in 1/400'lük sulandırmanın *P.aeruginosa* ile 1 dakika, 5 dakika ve 10 dakikalık temas süresi sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

Tablo 5.2.1. Glutaraldehitin kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği

Mikro-Organizma	Dezen-fentan	Sulandırım	Etkinlik Yüzeyin	Temas Süresi Boyunca Üreme Durumları (Dakika)					
				1	5	10	15	30	60
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Glutaraldehit	Sulandırılmamış	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-
		1/200	Cam	+	+	+	-	-	-
			Metal	+	+	+	-	-	-
			PVC	+	+	+	-	-	-
		1/400	Cam	+	+	+	+	-	-
			Metal	+	+	+	+	-	-
			PVC	+	+	+	+	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Glutaraldehit	Sulandırılmamış	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	+	+	-	-	-
			Metal	+	+	+	-	-	-
			PVC	+	+	+	-	-	-

5.2.2. Etil Alkol

Çalışmada kullanılan Etil alkolün *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine etkinliği Tablo 5.2.2’de gösterildi.Çalışmada kullanılan cam, metal ve PVC yüzeyin etkinliklerinin aynı olduğu görüldü. Etil alkolün %100, %70 ve %50’lik konsantrasyonlarıyla mikroorganizmaların1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık temas sürelerinin sonundaki üremesi şu şekildedir:

Etil alkolün %95’lik konsantrasyonda *S.aureus* ile 1 dakika ve 5 dakika temas süreleri sonunda; %70’lik konsantrasyonun 1 dakika, 5 dakika ve 10 dakikalık temas süreleri sonunda; %50’lik ise 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika ve 20 dakikalık temas süresi sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

Etil alkolün %95’lik konsantrasyonda *P.aeruginosa* ile yapılan ekimler sonucunda hiçbir temas süresi sonunda üreme gözlemlenmedi. %70’lik konsantrasyonun1 dakikalık temas süreleri sonunda; %50’lik konsantrasyonun ise 1 dakika ve 5 dakikalık temas süresi sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

Tablo 5.2.2. Etil Alkol'ün kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği

Mikro-organizma	Dezenfektan	Konsantrasyon	Etkinlik Yüzeyin	Temas Süresi Boyunca Üreme Durumları (Dakika)					
				1	5	10	15	30	60
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Etil Alkol	%95	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-
		%70	Cam	+	+	+	-	-	-
			Metal	+	+	+	-	-	-
			PVC	+	+	+	-	-	-
		%50	Cam	+	+	+	+	+	-
			Metal	+	+	+	+	+	-
			PVC	+	+	+	+	+	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Etil Alkol	%95	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		%70	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
		%50	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-

5.2.3. Ortafitaldehit

Çalışmada kullanılan OPA (%0.55) *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine etkinliği Tablo 5.2.3'te gösterildi.Çalışmada kullanılan cam, metal ve PVC yüzeyin etkinliklerinin aynı olduğu görüldü. OPA'nın sulandırılmamış (%100'lük) , 1/200 ve 1/400 farklı sulandırılmalarda; 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık temas sürelerinin sonundaki bakteri üremesi şu şekildedir:

OPA'nın sulandırılmamış %100'lük konsantrasyonda yapılan ekimler sonucunda her iki mikroorganizmada hiçbir temas süresi sonunda üreme gözlemlenmedi. OPA'nın 1/200'lük sulandırılmasında *S.aureus* ile 1 dakikalık temas süresi sonunda bakteri üremesi gözlemlendi. OPA'nın 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ile 1 dakika ve 5 dakika sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlendi.

OPA'nın 1/200'lük sulandırılmasında *P.aeruginosa* ile hiçbir temas süresi sonunda bakteri üremesi gözlemlenmedi. OPA'nın 1/400'lük sulandırılmasında *P.aeruginosa* ile 1 dakika sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlendi.

Tablo 5.2.3. Ortalfitaldehitin kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği

Mikro-Organizma	Dezen-fentan	Sulandırım	Etkinlik Yüzeyin	Temas Süresi Boyunca Üreme Durumları (Dakika)					
				1	5	10	15	30	60
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Ortalfitaldehit	Sulandırılmamış	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC27853	Ortalfitaldehit	Sulandırılmamış	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-

5.2.4. Perasitik Asit

Çalışmada kullanılan PAA (%0.3)'nın *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine etkinliği Tablo 5.2.4'te gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan cam, metal ve PVC yüzeyin etkinliklerinin aynı olduğu görüldü. PAA'in sulandırılmamış (%100'lük) , 1/200 ve 1/400 sulandırılmış farklı sulandırılmalarda; 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık temas sürelerinin sonundaki bakteri üremesi şu şekildedir:

PAA'in sulandırılmamış %100'lük konsantrasyonda yapılan ekimler sonucunda her iki mikroorganizmada hiçbir temas süresi sonunda üreme gözlemlenmedi. PAA'in 1/200'lük sulandırılmasında yapılan ekimler sonucunda her iki mikroorganizmada hiçbir temas süresi sonunda üreme gözlemlenmedi. PAA'nın 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ile 1 dakikalık temas süresi sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

PAA'nın 1/400'lük sulandırılmasında *P.aeruginosa* ile 1 dakikalık temas süresi sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlenmiştir.

Tablo 5.2.4. Perasitik asit'in kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği

Mikro- organizma	Dezen- fentan	Sulandırım	Etkinlik Yüzeyin	Temas Süresi Boyunca Üreme Durumları (Dakika)					
				1	5	10	15	30	60
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Perasitik Asit	Sulandırılmamış	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Perasitik Asit	Sulandırılmamış	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	-	-	-	-	-	-
			Metal	-	-	-	-	-	-
			PVC	-	-	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-

5.4.5. Hidrojen Peroksit

Çalışmada kullanılan Hidrojen Peroksit (% 7,5) *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine etkinliği Tablo 5.2.5'te gösterildi. Çalışmada kullanılan cam, metal ve PVC yüzeyin etkinliklerinin aynı olduğu görüldü. PAA'in sulandırılmamış (%100'lük), 1/200 ve 1/400 farklı sulandırılmalarda; 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık temas sürelerinin sonundaki bakteri üremesi şu şekildedir:

Hidrojen peroksitin sulandırılmamış %100'lük konsantrasyonda *S.aureus* ve *P.aeruginosa* ile 1 dakika sonunda yapılan ekimlerdeki bakteri sayımının sonucunda bakteri üremesi gözlemlendi. Hidrojen peroksitin 1/200'lük sulandırılmasında *S.aureus* ile 1 dakika, 5 dakika ve 10 dakikalık temas süreleri sonunda bakteri üremesi gözlemlendi. Hidrojen peroksitin 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ile 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika ve 15 dakikalık temas süreleri sonunda bakteri üremesi gözlemlendi.

Hidrojen peroksit 1/200'lük sulandırılmasında *P.aeruginosa* ile 1 dakikalık temas süresi sonunda bakteri üremesi gözlemlendi. Hidrojen peroksit 1/400'lük sulandırılmasında *P.aeruginosa* ile 1 dakika ve 5 dakikalık ve temas süresi sonunda bakteri üremesi gözlemlendi.

Tablo 5.2.5. Hidrojen peroksitin kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etlinliği

Mikro-Organizma	Dezen-fentan	Sulandırım	Etkinlik Yüzeyin	Temas Süresi Boyunca Üreme Durumları (Dakika)					
				1	5	10	15	30	60
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Hidrojen peroksit	Sulandırılmamış	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	+	+	-	-	-
			Metal	+	+	+	-	-	-
			PVC	+	+	+	-	-	-
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Hidrojen peroksit	Sulandırılmamış	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
		1/200	Cam	+	-	-	-	-	-
			Metal	+	-	-	-	-	-
			PVC	+	-	-	-	-	-
		1/400	Cam	+	+	-	-	-	-
			Metal	+	+	-	-	-	-
			PVC	+	+	-	-	-	-

5.4.5. Ozon

Çalışmada kullanılan ozon jenatöründen elde edilen ozonlu suyun *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerine etkinliği incelendi (Tablo 5.2.6). Çalışmada kullanılan cam, metal ve PVC yüzeyin etkinliklerinin aynı olduğu görüldü. Ozonlu su hiçbir madde ile karıştırılmadan direkt kullanıldı. Ozonlu suyun etkinliğini değerlendirmek için; farklı yüzeyler üzerine inoküle edilmiş mikroorganizmalar ile ozon suyunun 1 dakika, 5 dakika, 10 dakika, 15 dakika, 30 dakika ve 60 dakikalık temas sürelerinin sonundaki bakteri üremesine bakılarak yapıldı. Yapılan çalışmanın sonucunda; cam, metal ve PVC yüzeyde her iki mikroorganizmada da hiçbir temas süresi sonunda bakteri üremesi gözlemlenmedi.

Tablo 5.4.5. Ozonlu suyun kullanılan mikroorganizmalar üzerindeki etkisi

Ozon Sulandırılması	Mikroorganizma	Etkilik Yüzeyi	Ozonla Temas Süresi Boyunca Üreme Durumlar (dk)					
			1	5	10	15	30	60
Sulandırılmamış Ozon	<i>S.aureus</i> ATCC 29213	Cam	-	-	-	-	-	-
		Metal	-	-	-	-	-	-
		PVC	-	-	-	-	-	-
Sulandırılmamış Ozon	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	Cam	-	-	-	-	-	-
		Metal	-	-	-	-	-	-
		PVC	-	-	-	-	-	-

5.5. Biyofilm Oluşturma Yeteneğine Göre Sınıflandırma ve Değerlendirmesi

Bakteriyel biyofilmlerden elde edilen OD değerlerine göre *S. aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının biyofilm üretmeyenler, zayıf, orta ve güçlü biyofilm üretenler olmak üzere dört bölüme ayrılmaktadır. Bu amaçla OD cut-off değeri hesaplanmıştır. OD cut-off değeri, negatif kontrol ile elde edilen ortalama değere üç standart sapma ilave edilerek belirlenmiş ve aşağıda belirtilen şekilde hesaplanmıştır (Tablo 5.5) (Stepanovic ve diğ. 2000).

Tablo 5.5. Mikroorganizmaların biyofilm aktivitelerini değerlendirme ölçęi

OD değeri	Adezyon	Biyofilm derecesi
OD kontrol > OD MB	Yapışma Olmayan	0
OD kontrol < OD MB < 2 OD kontrol	Zayıf Biyofilm	I
2 OD kontrol < OD MB < 4 OD kontrol	Orta Biyofilm	II
4 OD kontrol < OD MB	Güçlü Biyofilm	III
OD: Optik Dansite, OD MB: Mikroorganizma Biyofilminin Optik Dansitesi		

Çalışmada kullanılan *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının dezenfektan ve ozonla temasından sonra ozonla hiçbir temas süresinden sonra bakteri üremesinin olmadığı gözlemlenmedi. Bu yüzden ozonun biyofilm üzerindeki etkinliğini çalışmaya dahil edilmedi. *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının dezenfektanlar ile temasından sonra üremenin gerçekleştiği dakikalardan alınan örneklerin dezenfektanın biyofilm oluşumuna etki edip etmediğini gözlemek amacıyla mikrotitrasyon plak çalışması

yapılıp ELİSA 540 nm dalga boyunca okutuldu (Tablo 5.5.1),(Tablo 5.5.2), (Tablo 5.5.3).

Tablo 5.5.1. Çalışma Sonucunda Kullanılan Mikroorganizmaların Biyofilm Oluşturma Dereceleri

Mikroorga- nizma	OD konsantrasyonu	Zayıf Biyofilm (I)	Orta Biyofilm (II)	Güçlü Biyofilm (III)
<i>S.aureus</i>	OD _c =0,344±0,282	0,34<OD≤0,52	0,52<OD≤0,60	0,78 < OD
<i>P.aeruginosa</i>	OD _c =0,344±0,282	0,34<OD≤0,62	0,62<OD≤1,10	1,10 < OD

Tablo 5.5.2. Dezenfektan ile temas süresi boyunca üreme gösteren S.aureus suşlarından alınan örneklerin biyofilm oluşurabilme OD değerleri

Dezenfektan	Konsantrasyon veya Sulandırılma	Üremenin Devam Ettiği Süre (Dakika)	Biyofilm OD Değeri Ao. OD \pm SD	Biyofim Derecesi	
Gluteraldehit	Sulandırılmamış	1	0,643 \pm 0,145	II	
		5	0,524 \pm 0,193	II	
	1/200	1	0,695 \pm 0,196	II	
		5	0,601 \pm 0,256	II	
		10	0,541 \pm 0,177	II	
	1/400	1	0,863 \pm 0,106	III	
		5	0,811 \pm 0,106	III	
		10	0,773 \pm 0,282	II	
		15	0,632 \pm 0,176	II	
	Etil Alkol	%95	1	0,751 \pm 0,169	II
			5	0,664 \pm 0,253	II
		%70	1	0,813 \pm 0,181	III
5			0,696 \pm 0,159	II	
10			0,641 \pm 0,281	II	
%50		1	0,793 \pm 0,206	III	
		5	0,743 \pm 0,106	II	
		10	0,673 \pm 0,232	II	
		15	0,632 \pm 0,162	II	
		30	0,634 \pm 0,132	II	
Ortafitalaldehit		1/200	1	1,284 \pm 0,505	III
		1/400	1	0,906 \pm 0,195	III
	5		0,714 \pm 0,047	II	
Perasetik asit	1/400	1	0,553 \pm 0,063	II	
Hidrojen Peroksit	Sulandırılmamış	1	0,963 \pm 0,096	III	
	1/200	1	0,759 \pm 0,108	II	
		5	0,725 \pm 0,101	II	
	1/400	1	1,813 \pm 0,225	III	
		5	1,252 \pm 0,433	III	
		10	0,759 \pm 0,256	II	

**OD: Optik Dansite, Ao. : Aritmetik ortalama, SD : Standart sapma
Etil alkol için konsantrasyon; GAA,OPA,PAA ve Hidrojen peroksit için sulandırma dereceleri**

Tablo 5.5.3. Dezenfektan ile temas süresi boyunca üreme gösteren P.aeruginosa suşlarından alınan örneklerin biyofilm oluşturabilme OD değerleri

Dezenfektan	Konsantrasyon veya Sulandırılma	Üremenin Devam Ettiği Süre (Dakika)	Biyofilm OD Değeri Ao. OD ± SD	Biyofilm Derecesi
Gluteraldehit	Sulandırılmamış	1	1,704 ± 0,263	III
	1/200	1	1,378 ± 0,581	III
		5	1,035 ± 0,512	II
		10	1,125 ± 0,900	III
	1/400	1	2,094 ± 0,004	III
		5	1,903 ± 0,113	III
10		1,125 ± 0,900	III	
Etil Alkol	%70	1	1,829 ± 0,275	III
	%50	1	2,004 ± 0,026	III
		5	1,468 ± 0,414	III
Ortafitalaldehit	1/400	1	1,254 ± 0,625	III
Perasetik asit	1/400	1	1,740 ± 0,202	III
Hidrojen Peroksit	Sulandırılmamış	1	1,429 ± 0,475	III
	1/200	1	0,948 ± 0,078	II
		5	0,845 ± 0,175	II
	1/400	1	0,800 ± 0,165	II
		5		

OD: Optik Dansite, Ao. : Aritmetik ortalama, SD : Standart sapma
Etil alkol için konsantrasyon; GAA,OPA,PAA ve Hidrojen peroksit için sulandırma dereceleri

5. TARTIŞMA

Biyofilm, ekstraselüler matriks içerisinde gömülmüş halde bulunan bir yüzey ve birbirleri arasında kuvvetli bir şekilde bağlanmış mikroorganizmaların oluşturdukları kolonizasyonlar olarak tanımlanır. Biyofilmin oluşmasında çeşitli etmenler bir arada bulunur. Mikroorganizmanın sahip olduğu virülans faktörleri ile biyofilmin oluşacak olan yüzey hücrelerinin biyokimyasal ve hidrofobik yapıları, ortamın; sıcaklık, ph, O₂ basıncı, besin, karbon kaynağı gibi çevreye bağlı faktörler biyofilm oluşumunda oldukça etkili etmenlerdir (Sakarya 2005).

P.aeruginosa doğada yaygın olarak bulunan *Pseudomonas* cinsi arasında yer alır. *P.aeruginosa* çeşitli virülans faktörlerine sahiptir (Mah ve O'Toole 2001) . Sahip olduğu bu virülans faktörleri sayesinde özellikle immünsüpresif bireylerde, radyoterapi alan, yaşlı ve uzun süreli antibiyotik kullanan hastalarda ciddi enfeksiyonlara neden olur. *P.aeruginosa*'nın enfeksiyon oluşturmasında etkili olan virülans faktörleri; pilus, LPS, piyoverdin, ramnolipid, proteaz, alginaat, elastaz, ekzo A, kirpik, fosfolipaz C ve biyofilmdir (Karatuna ve Yağcı 2008).

P.aeruginosa antibiyotiklere karşı hızlı geliştirdikleri çoklu antibiyotik direnci ve yaptıkları enfeksiyonlar ile yüksek mortalite ve morbiditeye sebep olmaları nedeniyle dünyada ve ülkemizde önemli bir sorun teşkil eder. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *P.aeruginosa*'nın neden olduğu enfeksiyonların patogenezi incelendiğinde *P.aeruginosa*'nın virülans faktörlerinden biri olan biyofilm oluşturma yeteneği ön plana çıkmaktadır (Aydın ve diğ. 2000) *P.aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmlerin neden olduğu enfeksiyonlar ise doğal kapak endokarditi, osteomyelit, bakteriyel prostatik, orta kulak enfeksiyonu ve kistik fibröz hasta guruplarında gözlenen kronik akciğer enfeksiyonudur. Yapılan farklı çalışmalarda enfeksiyonların aynı zamanda hastane kaynaklı enfeksiyonların %18-25'inden kaynaklandığının bildirmişlerdir (Nordmann ve Guibert 1998).

Doğada yaygın olarak bulunan *Staphylococcus* cinsinin önemli türlerinden biri olan *S.aureus* hem sağlıklı bireylerde hemde immünsüprese bireylerde deri, burun ve üst

solunum yollarında kolonize olup nozokomiyal ve toplum kökenli ciddi enfeksiyonlara neden olurlar (Cengiz 1999).

Tip 1 diyabetli hastalar, uzun süreli antibiyotik kullananlar, hemodiyaliz hastaları ve cerrahi hastalarda *S.aureus* kolonizasyonu oranı daha yüksektir. *S.aureus* neden olduğu enfeksiyonların başında yara enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit, yabancı cisim enfeksiyonları ve nozokomiyel bakteriyemi gelir (Kloos ve Bannerman1999)..*S.aureus*'un enfeksiyon oluşturmada etkili olan virülans faktörleri, yüzey adezinleri, peptidoglikan ve teikoik tabakası, ürettikleri toksinler ve biyofilmdir. *S.aureus* mikrobiyoloji laboratuvarlarında en sık izole edilen etmenlerden birisidir. Hastanelede özellikle *S.aureus* tıbbi aletler, implant gibi yabancı materyallerin yüzeyinde biyofilm oluşumu göstererek tedavisi daha da zorlaştırmaktadır (Lowy 1998).

P.auroginosa ve *S.aureus*'un oluşturduğu biyofilm enfeksiyonlarındaki bu artışa bağlı olarak biyofilm oluşumunu azaltmaya yönelik yeni çalışmaların yapılması hız kazanmıştır.

Hastane ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar dünya genelinde ve ülkemizde yüksek mortaliteye sahiptir. Hastane enfeksiyonu hastaneye yatış süresini takiben 48-72 saat sonra oluşmaya başlayıp gelişme süresi 10 gündür (Töreci 1997). Biyofilm oluşum süresi de mikroorganizma türüne göre değişiklik göstermektedir (Watnick ve Kolter 2000).

Töreci'nin 1997 yılında yaptığı bir çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde (1982) hastane enfeksiyon oranını %5,4 olduğunu ve hastane içindeki bölümler kıyaslandığında bu oranın %11,4 ile beyin cerrahisinde görüldüğünü bildirmiştir. Aynı çalışmada İstanbul Üniversite Tıp Fakültesi (1992) bu oranın %15,2 ile farklı bir cerrahi kliniğine ait olduğunu bildirmiştir. Her hastanenin kullandığı dezenfektanlar ve konsantrasyon oranları birbirinden farklı olduğu için bu oranların ülke genelinde değişiklik göstermesi oldukça doğal bir sonuçtur (Töreci 1997)

Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar ise en sık katater, implant gibi vücudunda tıbbi cihazlar bulunan hastalarda oluşmaktadır. Hastane ve biyofilm kaynaklı enfeksiyonların

ölümle sonuçlanabilecek ciddi hastalıklara neden olduğu için enfeksiyonun oluşmasını önleyebilmek oldukça önemlidir. Hastane temizliğinin doğru ve uygun dezenfektanlar ve antiseptiklerle yapılması hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde oldukça önemlidir (Donlan ve Costerton 2002). Kullanılan dezenfektanlar ve antiseptiklerin biyofilm oluşumu gibi güçlü oluşumların önlenmesinde yetersiz kaldığı durumlarda ise alternatif yöntemlerin etki mekanizmalarının aydınlatılması ve hastanede kullanılabilir form getirilmesinin enfeksiyonların önlenmesinde yardımcı olabileceği düşünülmektedir (Costerton ve diğ. 1999).

Kullanılan dezenfektan maddelerin kimyasal özelliklerinin iyi bilinmesi gereklidir. Dezenfektanların mikroorganizmalar üzerinde etki ettiği konsantrasyonlar ve etki süresi doğru olarak seçilmez. Aynı şekilde uygulanan dezenfektan madde insan üzerinde toksik bir etki barındırmamalıdır (Bilgehan 1995). Bizde çalışmamızda kullandığımız dezenfektan maddelerin suda ve organik sıvılarda eriyebilme, iritan olmama, toksik etkiye sahip olmama, alerjen olmama, geniş antibakteriyel spektruma sahip olma, bakterisit olma, maliyet yönünden uygun olma ve kolay bulunabilme özelliğini göz önünde bulundurarak hastanelerde yaygın olarak kullanılan beş dezenfektan madde kullandık.

Yaptığımız çalışmaya benzer şekilde Nakipoğlu ve diğ. yaptıkları bir çalışmada dokuz yüzey dezenfektanı, dört alet dezenfektanı ve üç el ve cilt antiseptiği kullanmıştır (Nakipoğlu ve diğ. 2004). Külah ve diğ. yaptıkları çalışmada glutaraldehit, incidur, iyot, sekusept pulver, sodyum hipoklorit ve etil alkol kullanılmışlardır. Yapılan bu çalışmalarda göz önüne alındığında kullandığımız dezenfektan maddelerin uygun olarak seçtiğimiz söylenebilir (Külah ve diğ. 2002).

Doğada yaygın olarak bulunan ve hastane enfeksiyonlarında önemli bir sorun teşkil eden *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının üzerinde dezenfektan maddelerin ve ozonun antimikrobiyal aktivitesine bakıldı. Çalışmamızda dezenfektanların farklı konsantrasyonları ve farklı temas süreleri kullanıldı. Çünkü dezenfektan maddenin uygun konsantrasyon ve temas süresinde kullanılması gerekmektedir. Ozonun mikroorganizmalar üzerindeki etkinlik süresini dezenfektan maddeler ile aynı oranda

kıyaslayabilmek için dezenfektanda uygulanan temas sürelerinin ozon içinde aynı olacak şekilde kullanıldı.

Antiseptik ve dezenfektanlar için uluslararası kabul gören test şemaları henüz oluşturulamamıştır. Günümüzde hala farklı ülkelerde farklı prensiplere dayanan testler uygulanmaktadır. Dezenfektanların etkisinin değerlendirilmesinde en etkili çalışma yöntemi üreme gösteren bakterinin kültürlerinin üzerine dezenfektanların farklı konsantrasyonlarının eklenmesi, bir süre maruz bırakılması ve daha sonra ölüp ölmediklerinin gözlemlenmesine dayanır. (Sultan 1999).

Uluslararası standardizasyon kuruluşlarının önerdiği yöntem dezenfektan etkinlik testleri standart mikroorganizma suşları ile yapılmasıdır (Sultan 2009; Reybrouck 2004).

Çalışmamızda kullandığımız dezenfektan ve ozonun etkinliğini altı farklı temas süresine bağlı olarak inceledik. Aynı zamanda dezenfektan maddelerin sulandırılmış formu beklediği zaman etkinliğinin azalacağı bildirildiği için çalışmamız sırasında gereken sulandırmaları taze olarak hazırladık.

Çalışmamızda *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları üzerindeki etil alkolün %95, %70 ve %50'lik konsantrasyonlarının 1,5 ,10 ,15, 30 ve 60 dakikalık etkinliğine bakıldı. Çalışma sonucunda etil alkolün %95'lik konsantrasyonda *S.aureus* ATCC 29213 için 5 dakikada etkinlik gösterirken, *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşu hiçbir temas süresi boyunca üreme gösterememiştir. Etil alkolün %70'lik konsantrasyonunda *S.aureus* ATCC 29213 için etkinlik süresi 10 dakika iken *P.aeruginosa* ATCC 27853 için bu süre 1 dakikadır. Etil alkolün %50lik konsantrasyonda *S.aureus* ATCC 29213 üzerine etkinliği 30 dakika iken *P.aeruginosa* ATCC 27853 için bu süre 5 dakikadır. İrikli yaptığı bir çalışma sonucunda etil alkolün %50'lik konsantrasyonu için en az etkiyi *S. aureus* standart suşunda gösterdiğini saptamışlardır Bu sonuçta bizim çalışmamız ile paralellik göstermektedir. Çıkan sonuçlara bağlı olarak etil alkolün % 50 konsantrasyondaki antisepsi amaçlı olarak kullanıma uygun değildir. Dezenfektan olarak kullanılacağı durumlarda ise dezenfekte edilecek nesne ile 5-30 dakika arası temas süresi gerekli olacaktır.

Etanol ve izopropanol dezenfeksiyon amacıyla yaygın olarak kullanılan alkollerdendir. Bu amaçla en sık kullanılan %60-90 arasındaki konsantrasyonlarda en iyi antimikrobiyal etkiyi gösterirler, konsantrasyon azaldıkça etki azalır (Gorman ve Scott 2004, Nakipoğlu ve Gürler 2004, Purohit ve diğ. 2003). Alkoller bakterisit, fungusit etkinlik gösterir; ancak sporlara etkili değildirler. Saf etil alkolün bakterisit etkisi, alkol ve su karışımından daha azdır; bunun nedeni su varlığında protein denatürasyonunun daha hızlı olmasıdır (Arıkan 1997). Bu nedenle antiseptik amaçlı olarak %70'lik alkol konsantrasyonu en sık kullanılan konsantrasyondur (Nakipoğlu ve Gürler 2004).

Yüce ve ark. yaptıkları bir çalışmada %70 alkolü *S.aureus* ve *P.aeruginosa* standart suşlarının (0.5, 1, 2.5 dk) etkili bulmuşlardır. Bu sonuçlar *S.aureus* açısından bizim çalışmamızla paralellik göstermemektedir (Yüce ve diğ. 1989). Külah'ın yılında yaptığı bir çalışmada *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşuna karşı %50, %70, %95'lik konsantrasyonlarının etil alkol tüm sürelerde etkili olarak bulunmuştur. Yaptığımız çalışma sonuçları bu çalışma ile benzerlik göstermektedir (Külah 2002). Etil alkolün %70'lik konsantrasyonu stetoskop, termometre, fiberoptik endoskop gibi aletlerin dezenfeksiyonu için sık kullanılmaktadır (Arıkan 1997).

Bizim çalışmamızın sonucuna bakarak *S.aureus* için %70'lik etil alkolde 10 dakikalık temasın, *P.aeruginosa* için %70'lik alkolde 1 dakikalık temasın etkili olacağını söyleyebiliriz.

Çalışmamız doğrultusunda %95'lik etil alkol konsantrasyonu yerine etil alkolün %70'lik konsantrasyonu ile benzer etkiye sahip olması sebebiyle yerine daha az alkol kullanımını da sağlayacağından %70'lik etil alkol konsantrasyonunun antisepsi ve dezenfeksiyonda kullanımının uygun olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmada kullanılan diğer dezenfektan olan glutaraldehit (%2)'in sulandırılmamış 1/200 ve 1/400 sulandırımının standart suşlara karşı 1, 5, 10, 15, 30 ve 60 dakikalardaki etkilerini gözlemledik. Yapılan çalışma sonuçlarında glutaraldehit (%2)'nin sulandırılmamış konsantrasyonda *S.aureus* ATCC 29213 suşuna 5 dakikada etki ederken, *P.aeruginosa* ATCC 27853 için bu etki süresi 5 dakikadır. Glutaraldehit (%2)'nin 1/200'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213 etki süresi 10 dakika iken

P.aeruginosa ATCC 27853 için bu süre 5 dakikadır. Glutaraldehit (%2)'nin 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213 suşuna 15 dakikada etki ederken *P.aeruginosa* ATCC 27853 için bu süre 10 dakika olduğu gözlemlenmiştir.

Glutaraldehit yüksek düzey dezenfektan ve kimyasal sterilizan etkili, doymamış bir dialdehiddir. Organik madde varlığında aktif olma, biyosidal aktivite, koroziv olmama gibi birçok avantajları sebebiyle hastanelerde yaygın olarak kullanılır. Glutaraldehit alkali ajanlarla aktif hale gelir, raf ömrü 14-28 gündür ve endoskoplar, solunum desteği için kullanılan aletler, anestezi ekipmanı, spirometri tüpleri, hemodiyaliz sistemleri gibi birçok tıbbi cihazın yüksek düzey dezenfeksiyonu için kullanılır (Rutala 1996, Özyurt 2000, Rutala ve Weber 2005).

Glutaraldehit hızlı etki eden ve geniş spektrumlu bir dezenfektandır. Üretici firmalar tarafından glutaraldehit (%2)'in sulandırılmadan kullanılması önerilmektedir ve bakteriler için temas süresi 10 dakika olarak tespit edilmiştir (Eryılmaz ve Akın 2008). Nakipoğlu ve diğ. yaptıkları araştırmada İstanbul Tıp Fakültesi hastanesinde kullanılmakta olan dezenfektan ve antiseptik maddelerden; üç adet el ve cilt antiseptiği, dokuz adet yüzey dezenfektanı, dört adet alet dezenfektanından oluşan 16 adet kimyasal ajanın mikrobisit aktivitelerini kantitatif süspansiyon testi yaparak araştırmışlardır (Nakipoğlu ve diğ. 2004) Bu 16 adet maddenin *S. aureus* ATCC 6538, *P. aeruginosa* NCTC 6749 ve *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372 üzerine etkisini incelenmişlerdir. Chiroseptol (glutaraldehit içerikli) %1'de 1 saat ve %10'da 6 saatte *S. aureus* ATCC 6538 üzerine %100, *P. aeruginosa* NCTC 6749 üzerine %100 ve *Bacillus subtilis* var *niger* ATCC 9372 üzerine %99.8 oranında etkilibulmuşlardır.

Çalışmada kullanılan suşların tamamı glutaraldehite (%2) karşı bütün temas sürelerinde duyarlı bulunmuştur. Ayrıca bu maddelerin sulandırılmış halde çok uzun süre bekletildiğinde etkinliğinin azalacağı da unutulmamalıdır. Özellikle yoğun bakım birimleri ve yanık merkezleri gibi düşükün hastaların bulunduğu ortamlarda kendini gösteren fırsatçı mikroorganizmalar ile mücadelede asepsi ve antisepsi kurallarına dikkat edilmesi enfeksiyon kontrolü açısından büyük önem taşımaktadır (Özsoy ve diğ. 2001).

Hidrojen peroksit (%7,5) sulandırılmamış konsantrasyonda *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları için 1 dakikalık temas süresi sonunda inaktive olduğu gözlemlendi. Hidrojen peroksit (7,5)'in 1/200'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213 etki süresi 5 dakika iken *P.aeruginosa* ATCC 27853 için etki süresi 1 dakikadır. Hidrojen peroksit (%7,5)'nin 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213'a 10 dakikada etki ederken *P.aeruginosa* ATCC 27852 için bu süre 5 dakika olduğu gözlemlenmiştir.

Hidrojen peroksitin kullanım konsantrasyonu antisepsi, dezenfeksiyon ya da sterilizasyon işleminde kullanılmasına göre %3–90 arasında değişmektedir. Bu maddenin bakterisidal, virüsidal, fungusidal, sporosidal ve mikobakterisidal etkisi bulunmaktadır, bundan dolayı dezenfeksiyonun yanı sıra sterilizasyon amacıyla da kullanılır (Nakipoğlu ve Gürler, 2004). Hidrojen peroksit, %6–25 yoğunluklarda sterilizan olarak kullanılabilir. FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanmış %7,5 konsantrasyonundaki çözeltisi 10 dakikada yüksek düzey dezenfeksiyon sağlar. Endoskopların, kontak lenslerin, hemodiyalizatörlerin, yer ve yüzeylerin dezenfeksiyonunda kullanılır (Samastı, 2008). Alt ve diğ. yaptıkları bir çalışmada %3 hidrojen peroksit solüsyonunun polimer biyomateryaller üzerindeki bakteriyel büyümeyi %99 oranında indirdiğini bildirmişlerdir (Alt ve diğ. 1999) Beneduce ve diğ. %3 hidrojen peroksit solüsyonunun diş fırçalarında bulunan aerobik ve anaerobik bakteri sayısını indirdiğini bildirmişlerdir. Hidrojen peroksit, kendi başına stabil bir oksidandır fakat nötrofil ve makrofajlar tarafından süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi daha reaktif formlara dönüştürülebilir (Beneduce ve diğ. 2009). Oluşan bu daha reaktif oksijen bileşikleri, hücre zarında ve DNA'da hasara neden olarak sitotoksik etki gösterebilir. Bu nedenle, günümüzde hidrojen peroksitin bakterisidal etkisinin ötesinde sitotoksik etkisi daha çok dikkat çekmektedir (Wasserbauer ve diğ. 2008). %3 hidrojen peroksit solüsyonunun, antiseptik amaçlı etkinliğinin araştırıldığı bilimsel çalışmalar neredeyse yok denecek kadar azdır.

OPA (0,55) sulandırılmamış konsantrasyonda *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşlarının hiçbir temas süresi boyunca üremesi görülmedi.

OPA(0,55)'nin 1/200'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213 etki süresi 1 dakika iken *P.aeruginosa* ATCC 27853 hiçbir süre boyunca üreme görülmedi. OPA (0,55)'nin 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213 5 dakikada etki ederken *P.aeruginosa* ATCC 27853 için bu süre 1 dakika olduğu gözlemlenmiştir.

OPA ile temas sırasında kişisel korunma malzemeleri kullanılmalıdır. Ayrıca hastanın mukozasında veya cildinde renk değişimini önlemek için aletler çok iyi durulanmalıdır. OPA solüsyonu yüksek düzey dezenfeksiyon süresi 5- 12 dakikadır. (Avrupa, Asya ve Latin Amerika ülkelerinde 5dak. Kanada ve Avustralya'da 10 dak. Amerika Birleşik Devletlerinde ise 12 dk. olarak uygulanmaktadır) (Günaydın ve diğ. 2013). OPA'nın mikroorganizmalar üzerindeki etkinliğine yönelik bir literatür verisine rastlamadığımız için çalışma sonuçlarımızı karşılaştırabileceğimiz bir kaynak bulunmamaktadır. Bu yüzden de OPA'nın etkinliği hakkında yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Köse ve Yapar 2017).

PAA'in sulandırılmamış konsantrasyonda ve 1/200'lük sulandırılmış konsantrasyonda *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşlarının hiçbir temas süresi boyunca üremesi görülmedi. PAA'in 1/400'lük sulandırılmasında *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşlarına karşı etki süresi 1 dakikadır. Bu çalışmada kullanılan dezenfektan maddeler arasında en etkili antimikrobiyal aktiviteyi gösteren dezenfektan PAA'tir.

Perasetik asit düşük konsantrasyonlarda (<%0,3) dahi sporosidal, bakterisidal, virüsidal ve fungusidal olmasından dolayı hidrojen peroksitten daha güçlü bir biyosid olduğu düşünülmektedir. perasetik asit ya da peroksiasetik asit, asetik asit ve oksijen gibi ürünlere güvenli bir şekilde parçalanmasına ek olarak hidrojen peroksitten farklı olarak peroksidazlar tarafından yıkılamazlar ve organik moleküllerin varlığında aktif olarak kalabilirler. Perasetik asitin hidrojen perokside benzer şekilde protein ve enzimleri denatüre ettiği ve hücre duvar geçirgenliğini artırdığı ileri sürülmektedir. Perasetik asit, 100 ppm'den daha az konsantrasyonlarda ve yaklaşık beş dakika içinde gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri, maya ve fungusları inaktive edebilir. Organik maddenin varlığında mikroorganizmaları etkisizleştirmek için 200-500 ppm

perasetik asit gereklidir. Virüslerde dozaj 12-2250 ppm'e kadar artmaktadır. perasetik asitte hidrojen peroksit gibi yüksek düzey bir dezenfektandır. Kritik ve yarı kritik hastane ve hasta bakım ünitelerinin dezenfeksiyonu oda sıcaklığında perasetik asitin \leq %1 konsantrasyonu ve 20 dakika temas süresi ile gerçekleşir. Perasetik asit bakır, çelik, demir gibi metaller üzerinde korozif etkiye sahip olmasından dolayı, özellikle immersibl endoskop dezenfeksiyonunda %35'lik perasetik asit, %0.2 konsantrasyonuna sulandırılarak, korozif etkisini kaldırıcı bir ajan ve tampon eklenmesiyle otomasyona dayalı sistemler geliştirilmiştir. FDA tarafından %0.2 perasetik asit, 50-56°C ve 12 dakika, sterilizasyon için uygun bulunmuştur. Ancak perasetik asitin gözle temasında geri dönüşsüz hasar, deride yanma ve buharının solunmasıyla burun, boğaz ve akciğerleri tahriş edebilir. Tıbbi, cerrahi ve dental aletleri sterilize etmek için perasetik asit kullanan otomatik bir cihaz 1988 yılında işleve girmiştir. Düşük sıcaklıkta işleyen sterilizasyon yöntemi ABD'de yaygın olarak kullanılmaktadır. Değiştirilebilir parçalar, rijid ve fleksibl endoskoplara sterilizasyonunu sağlamada yardımcı olur. Endoskop kanallarının yıkanmasını sağlayan bağlantı sistemleri çok sayıda fleksibl endoskop için uygundur. Rijid endoskoplara kapaklı bir kap içine yerleştirilir. Kimyasal madde, boşluğa (lümen) doğrudan akan bağlantı kanallarıyla dolar. Diğer sterilizasyon tekniklerinde olduğu gibi sistem, yalnızca kimyasalla temas edebildiği yüzeyleri steril edebilir (Abbasoğlu 2009).

Ozonun *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşlarının üzerindeki etkisi incelendiğinde kullanılan bütün yüzeylerde hiçbir temas süresi sonunda üreme gözlemlenmemiştir. Ozonun kullanılan bütün dezenfektanlardan daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu görülmüştür.

Ozonun bakterileri inaktive etmesi karmaşık bir süreçtir. Çünkü ozon birden fazla yapıya direk olarak zarar vermektedir. Bu yapılar proteinler, doymamış yağlar, hücre membranlarındaki solunum enzimleri, hücre zarlarındaki peptidoglikanlar, sitoplazmadaki enzimler ve nükleik asitlerdir. Ozonun yüksek bir antimikrobiyal aktivite göstermesi bazı araştırmacılar tarafından ozonun mikroorganizmaların başlıca inaktivatörü olarak yorumlanmasına sebep olmaktadır. Ozon doymamış yağ asitlerini,

membrana bağlı enzimler, hücre içeriğinin dışarıya sızmasına yol açan glikoproteinler ve glikoliplerler dahil hücre zarının çeşitli komponentlerini oksidize eder ve sonunda hücre lizislerine neden olur (Scott ve Leshner 1963; Murray ve diğ. 1965). Doymamış yağların çift bağları ve enzimlerin sülfidril grupları ozon tarafından oksidize edildiğinde hücre permeabilitesi dahil normal hücreysel aktivitesinin bozulması ve hızlı ölümlerin gerçekleştirilmesine neden olmaktadır. Ozon, oksidasyon gücü çok yüksek bir gaz olması nedeniyle bilinen en kuvvetli dezenfektan olarak yorumlanmaktadır. Yüksek oksidasyon kuvveti, ozonun bakterilerinin inaktive olmasında etkili olmaktadır. Ozonun dezenfeksiyon etkisi, aynı şartlar altında çalışan klorünkü dezenfeksiyon etkisi 3125 kat daha fazladır [<http://www.airozon.com/ozon-o3/ozonun-avantajlari.htm>]. Sporlara karşı da klor'dan daha etkilidir. Ayrıca ozon havada bulunan oksijenin parçalanması yoluyla elde edildiğinden dolayı dezenfeksiyon olarak görev aldıktan sonra tekrar oksijen atomuna dönüşmektedir. Ozon gazının dezenfeksiyon sonrasında kalıntı bırakmaması, gıda sanayisinde rahatlıkla kullanılması diğer dezenfektanlara karşı ozonu daha avantajlı kılmaktadır (Özden ve diğ. 2006).

Çalışmamızda ayrıca *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün biyofilm oluşturabilme yeteneklerini belirlemek amacıyla herhangi bir dezenfektan madde ile temasından önce kantitatif mikrop plak çalışması yapıp, ELİSA 540 nm okuyucuda okutuldu. *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün ELİSA okuyucudaki sonuçlarına bakarak yüksek düzeyde biyofilm yapabildiği gözlemlendi. *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853'ün suşlarının dezenfektan madde ile belirlenen temas süreleri boyunca maruz kaldıktan sonra üreme gösteren mikroorganizmalar üzerinden alınan örneklerin biyofilm oluşturabilme yeteneklerini kantitatif mikrop plak çalışması ile bakılıp ELİSA 540 nm okuyucuda okutulduktan sonra dezenfektana maruz bırakılmadan önceki biyofilm oluşturabilme yetenekleri ile karşılaştırıldı.

Çalışma sonucunda elde edilen verilere dayanarak dezenfektan maddelere maruz kalan *S.aureus* ve *P.aeruginosa* suşlarının oluşturduğu biyofilmlerde kullanılan bütün dezenfektanlar için biyofilm oluşumunu önlemede etkili olduğu görülmemiştir.

Çalışmada kullanılan *S.aureus* ATCC 29213 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşlarının etil alkol, glutalaldehit, ortafitalaldehit, hidrojen peroksit ve perasitik asitin farklı konsantrasyonları ile temasından sonra üreme gösteren dakikalardan alınan örnekler üzerinden yapılan kantitatif mikropalak testinde her iki mikroorganizmanında biyofilm oluşturabildiği ve ilk baştaki biyofilm oluşturabilme değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık göstermediği görüldü.

Tote ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada PAA'in en hızlı bakterisidal aktiviteye (<1 dak) sahip olduğunu ancak biyofilm oluşumunu gidermede aynı etkiyi göstermediğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada OPA'nın sırasıyla *S. aureus* ve *P. aeruginosa* biyofilmlerini tamamen yok etmek için 10 dakika ve 30 dakika gerektiğini ancak *P. aeruginosa*'nın, biyofilm matris bileşenlerinin aşırı üretimi nedeniyle OPA'ya duyarlılığının zamanla azalacağını belirtmişlerdir. *P. aeruginosa* biyofilmi, hem yapısal bir iskele hem de sert ortamlara karşı koruyucu bir bariyer olarak işlev gören, hücre dışı polimerik maddelerin bir matrisine gömülü bakterilerden oluşur. Aljinat veya diğer polisakaritler, *P. aeruginosa* biyofilmlerinde ana matris bileşenleri olarak rol oynamaktadırlar (Tote 2008)

Çalışmada kullanılan diğer dezenfektanlardan olan hidrojen peroksit, GAA ve etil alkolün biyofilm oluşumunu önleyememe sebebi olarak yine mikroorganizmaların matris yapısına tam olarak nüfuz edememesi olduğu düşünülmektedir.

Biyofilm matris yapısı ve *P. aeruginosa* biyofilmlerinin OPA'ya toleransını etkileyen ek bileşikler halen araştırılmaktadır. Polisakarit hücre içi adezini ayrıca *S. aureus* biyofilm matrisinin, aynı zamanda teikoik asitler bakımından zengin bir ana proteinli bileşeni olarak tarif edilmiştir. Diğer hücre dışı bileşenlerin açığa kavuşması için ileri teknoloji ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Olgun *S.aureus* ve *P.aeruginosa* biyofilmleri, biyofilm oluşmasını engelleyen matris bileşenlerinin üretimin engellenebilmesi için biyofilm matris yapısının tam olarak açığa kavuşması gerekmektedir (Bridier ve diğ. 2011; De Beer ve diğ. 1999; Henoun ve diğ. 2004).

Çalışmada kullandığımız dezenfektanlar farklı yüzeylerde üreme göstermiş mikroorganizmaları inhibe etmede önemli rol oynarken aynı etkiyi biyofilm oluşumunu önleyemedi. Bunun sebebini biyofilmin mikroorganizmaya kazandırdığı dirençten kaynaklandığını düşünmekteyiz. Biyofilm organizmalarını yok etmek veya ortadan kaldırmak için, kullanılan dezenfektanlar EPS'e nüfuz edip mikrobiyel hücreye geçişi sağlanmalıdır. EPS'nin kimyasal bileşimi biyofilm çeşitlerine göre değiştiğinden, spesifik olmayan mekanizmalar tercih edilmektedir.

Sonuç olarak, farklı mikroorganizmalar üzerinde kullanılan dezenfektan ve ozonun antimikrobiyal etkinliği farklılık göstermektedir. Bunun sebebi olarakta kullanılan dezenfektanların konsantrasyonları ve etki sürelerinin her mikroorganizmaya göre farklılık gösterdiğinden kaynaklanmaktadır. Çeşitli dezenfektanların karşılaştırılmasına ilişkin önceki araştırmalar, biyofilm matrikslerine karşı tamamen etkili bir dezenfektanın olmadığını göstermektedir. Farklı dezenfektanların biyofilmlere karşı etkinlik bakımından karşılaştırıldığı ilgili çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin nedeninin, dezenfektanlar uygulandıktan sonra biyofilmler oluşturmak ve ölçüm yapmak için farklı yöntemler ve farklı konsantrasyonlar kullanıldığı düşünülmektedir. Bu nedenle yürütülen çalışmalarda elde edilen sonuçların genelleştirilmesi ve uygulanması için biyofilm çalışmaları için metodik standardizasyon gereklidir. Biyofilmlerin tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmadığından, biyofilm oluşumuna karşı önleyici tedbirler almak, onu ortadan kaldırmaya çalışmaktan daha önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Dezenfektan maddelerin uygun konsantrasyonlarda gerekli temas süreleri boyunca kullanımı çevre kirliliğinin önlenmesinde önemli olacaktır. Yüzeye uygulanacak dezenfektan seçiminde bakterilerin vejetatif formları üzerindeki etkisine, aletler için kullanılacak dezenfektan seçiminde ise bunun yanında sporlu bakterilere karşı etkisi ve korozyon etkisine dikkat edilmelidir.

2. Kullanılan dezenfektan maddelerin konsantrasyonları, etki spektrumu, uygun görülen temas süresi, pH'ı, depolanması gibi parametreler antimikrobiyal etkinliği etkileyen faktörlerdir ve her mikroorganizmanın uygun konsantrasyon ve uygun temas sürelerini aşmadan çalışılması gerekmektedir.

3. Kullanılan mikroorganizmaların, farklı dezenfektanlarınve ozonlu suyun etkinliğinin; temas süresi ve sulandırma oranlarında dirençlerinin birbirinden farklı olduğunu saptadık. Her mikroorganizmanın dezenfektan direnci birbirinden farklı olduğu için mikroorganizmalar üzerinde en etkili uygun konsantrasyonda kullanılan dezenfektanlar seçilmelidir.

4. Çalışmamız sonucunda ozonlu suyun dezenfektan maddelerden daha yüksek antimikrobiyal etki gösterdiği görüldü. Ozonlu su doğada bulunan saf oksijenden elde edilirken, dezenfektanlar çeşitli kimyasalların bir araya gelmesiyle oluşturulur. Dezenfektanlar insan üzerinde çeşitli toksik etkilere sahip oldukları için çalışanların çeşitli güvenlik önlemlerini aldıktan sonra dikkatli bir şekilde çalışması gerekmez. Ozon ise etkinliğini kaybettikten sonra tekrardan bileşeni olan oksijene dönüştüğü için geride kalıntı bırakmaz.

5. Bu sebeplere dayanarak ozonun hastane dezenfeksiyon işlemlerinde yaygın olarak kullanılması hastane çalışanlarının sağlığı ve ekonomik kayıpların azalması açısından daha yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

6. Dezenfektanlar biyofilm oluşumunu ve giderimini önlemede yetersiz kaldığı için biyofilm kaynaklı enfeksiyonların önlenmesinde ozon gibi alternatif yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

7. Dezenfektanlar yanlış konsantrasyonda ve yanlış etki sürelerinde kullanıldığında biyofilm oluşturan mikroorganizmaların hızlı geliştirdiği direnç mekanizması sayesinde biyofilm aktivitelerini da da arttıracığı düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

- Abbasoğlu U. Dezenfektanlar: Sınıflandırma ve amacına uygun kullanım alanları. 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı (ED.ler: Esen Ş, Perçin D, Aydın F, Günaydın M, Zenciroğlu D.) '009; 109-120.
- Akbaş, M.Y. and Özdemir, M. 2006. Effect of different ozone treatments on aflatoxin degradation and physicochemical properties of pistachios. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2099–210.
- Ammendolia MG, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola CR, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by Staphylococcal clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3235-3238.
- Ammendolia, M. G., Di Rosa, R., Montanaro, L., Arciola, C. R. and Baldassarri, L., 1999, Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37:3235-8
- Amos, W.B. and White, J.G. (2003). How the confocal laser scanning microscope entered biological research. *Biology of the Cell*, 95(6), 335-342.
- Arda Mn, Aydın A, Ilgaz A, Mınbay M, Kahraman M, İzgür N, Leloğlu Ö, Akay KS. Özel Mikrobiyoloji. 4. Baskı. Medisan yayınevi; 1997. S:91-96.
- ARDA, M. (2006). Mikrobiyal üremenin kontrolü. In: *Temel Mikrobiyoloji. Medisan yayın serisi*. Ankara. 3. Baskı. p: 80-103.
- Arikan S. Temizlik, dezenfeksiyon ve sterilizasyon. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 1997; 1: 61-68.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T. and Atroshi, F., 2004, Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 7(1), 55-64.
- Aydın K, Çaylan R, Köksal _, Volkan S, Öksüz R. *Pseudomonas aeruginosa* suslarının yıllara göre antibiyotik duyarlılığı. Hastane _nfeks Derg 2000; 4: 92-96.
- Berkman, M. (1990). Hastane Ortamının, Alet ve Gereçlerin Dezenfeksiyonu. *Ankem Dergisi*, 4(3): 76-78.
- Bhateja S. The Miraculous Healing Therapy; Ozone Therapy in Dentistry. *Indian Journal of Dentistry*. 2012; 3: 150-5
- Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 1995; 35-55.
- BOCCI, V. (1996a). Does ozone therapy normalize the cellular redox balance? Implications for therapy of human immunodeficiency virus infection and several other diseases. *Med. Hypotheses*, 46: 150-4.
- BOCCI, V. (2004). Ozone as janus: this controversial gas can be either toxic or medically useful. *Mediators inflamm.*, 13:3-11.
- BOCCI, V., PAULESU, L. (1990). Studies on the biological effects of ozone 1. Induction of interferon gamma on human leucocytes. *Haematologica*, 75: 510-5.
- BOCCI, V.A. (2007). Tropospheric ozone toxicity vs. usefulness of ozone therapy. *Archives of Medical Research*, 38: 265-7.
- Bocci V. Ozone: A New Medical Drug. 1 ed. Netherlands: 2005. p. 5-234
- BOOTHE, H.W. (1998). Antiseptics and disinfectants. In: *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Ed: D. Boothe, Philadelphia PA: Harcourt Brace Jovanovich, Inc. 28:2 edition. p: 233-248.
- Bridier A, Briandet R, Thomas V, Dubois-Brissonnet F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling* 2011; 27: 1017-1032.

- Carpentier, B., Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), p. 499-511.
- Celiberti P, Pazera P, Lussi A. The Impact of Ozone Treatment on Enamel Physical Properties. *Am J Dent*. 2006; 19: 67-72
- Cengiz AT. *Staphylococcus*. In: Ustaçelebi S, Mutlu G, _mir T, Cengiz AT, Tümbay E, Mete Ö, eds. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Günes Kitabevi, 1999: 339-347.
- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Hastane Enfeksiyonları Korunma ve Kontrol Sempozyumu Dizisi. Ocak 2008; (60): 143-168.
- Chávez de Paz, L.E. (2007). Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of Endodontics*, 33(6), 652-662.
- Chmielewski, R. A. N. and Frank, J. F., 2003, Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, Institute of Food Technologists - Vol. 2*.
- CORDS, B.R., DYCHDALA, G.R. (1993). Sanitizers: Halogens, Surface-Active Agents, and Peroxides. In: *Antimicrobials in Foods*. Ed: P.M. Davidson, A.L. Branen. New York, NY: Marcel Dekker, Inc. 2nd edition. p: 469-537.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-1322.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), p. 86-95.
- Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., Lappin-Scott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review Microbiology*, 49, p. 711-45.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), p. 1318-22.
- Das S. Application of Ozone Therapy in Dentistry. *Indian Journal of Dental Advancements*, 2011; , 3: p:538-42
- Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
- Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 847-867.
- De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4339-4344. Henoun Loukili
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-193.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W., 2002, Biofilms : Survival mechanism of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiol*, 15 (2): 167-93.
- Donlan, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), p. 1387-92.
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), p. 881-90.
- Du, T., Wang, Z., Shen, Y., Ma, J., Cao, Y. and Haapasalo, M. (2014). Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of Endodontics*, 40(4), 509-514.
- Dvorak G. Disinfection center for food security and public health, Iowa State University, 2008; 1-20.

- DVORAK, G. (2008). Disinfection 101. Center for Food Security and Public Health. Erişim: [http://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfection101.].
- Elder, M.J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J.K. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye (Lond)*, 9 (Pt 1), p. 102-9.
- Eryılmaz M, Akın A. Dezenfeksiyon ve antisepsi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2008; 37 (4): 311-331
- Eryılmaz, M., Akın, A. (2008). Dezenfeksiyon ve antisepsi. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 37(4): 311-331.19.
- Alicı, Ö. (2007, 4-8 Nisan). *Dezenfeksiyonu Etkileyen Faktörler*. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Antalya.
- EWART, SL. (2001). Disinfectants and control of environmental contamination. In: *Large animal internal medicine: Diseases of horses cattle, sheep and goats*. Ed: B.L. Smith, St Louis: Mosby. 3rd edition. p: 1371-1380.
- Flach, N., Böttcher, D.E., Parolo, C.C., Firmino, L.B., Malt, M., Lammers, M.L. and Grecca, F.S. (2016). Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in-vitro study. *Scanning*, 38(1), 57-62.
- Fonseca AP, Sousa JC. Effect of shear stress on growth, adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* with antibiotic-induced morphological changes. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 236-241.
- GELINAS, P., GOULET, J., TASTAYRE, G.M., PICARD, G.A. (1991). Effect of temperature and contact time on the activity of eight disinfectants-a classifications. *J. Food Protect.* 47:841-847.
- Gilmore KS, Srinivas P, Akins DR, Hatter KL, Gilmore MS. Growth, Development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infect Immun* 2003; 71: 4759-4766.
- Gilmore KS, Srinivas P, Akins DR, Hatter KL, Gilmore MS. Growth, Development, and gene expression in a persistent *Streptococcus gordonii* biofilm. *Infect Immun* 2003; 71: 4759-4766.
- GOTTARDI, W. (1991). Iodine and iodine compounds. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Ed: S.S. Block, Lea & Febiger, Philadelphia. 4. Edition. p:152-166.
- Grootvelt M, Baysan A, Siddiqui N, Sim J, Silwood C. History of Clinical Application of Ozone, Edward Lynch. *Ozone: The Revolution in Dentistry*. 1 ed London: 2004. p. 23-9
- Guzel-Seydim Z.B., Grene A.K. and Seydim, A.C. 2004. Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37, 45-460.
- Gülseren F, Mamikoğlu L, Öztürk S, et al. A surveillance study of antimicrobial resistance of gram negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 373.
- Gürler B. Cerrahide dezenfeksiyon ve sterilizasyon uygulaması: Ne zaman, nasıl, hangi dezenfektan? *ANKEM Derg.* 2002; 16 (3): 219-223.
- Gürler B. Mikroorganizmaların dezenfektan maddelere karşı oluşturduğu direnç. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 2003; 7 (3): 137-140.
- Gürler, B. (2002). Dezenfektan Gerekli mi? Ne Zaman? Hangi Dezenfektan?, M. Günaydın, Ş. Esen, A. Saniç, H. Leblebicioğlu. (Editörler). *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*. Samsun. simad Yayınları, s. 9-12.
- Gürler, B. (2003, 02-04 Ekim). *Dezenfektan Seçimi ve Dezenfektanların Kullanımı Konusunda Güncel Rehberler*. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
- Güven, R. (2003, 2-4 Ekim). *Sterilizasyon-Dezenfeksiyon Konusunda Deneyimler: Klinik ve Poliklinikler*. 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.

- Güven, R. (2003, 2-4 Ekim). *Sterilizasyon–Dezenfeksiyon Konusunda Deneyimler; Klinik ve Poliklinikler*. 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
- Heukelekian, H., Heller, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4), p. 547-58.
- Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R. Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars: a controlled prospective clinical study. *American Journal of Dentistry* 2005; 18: 223–8.
- İnan A, Şenbayrak Akçay S, Özyürek SÇ, Tekin SZ, Erdoğan P, Erdem İ, Engin D Ö, Ceran N, Gökteş P. Hastane kökenli patojenlere karşı çeşitli dezenfektan ve antiseptiklerin etkinliği. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2009; 39 (3-4): 97-102.
- İnan, A., Açı, S.Ş., Özyürek, S.Ç., Tekin, S. Z., Erdoğan, P., Erdem, İ., Derya, Ö. E., Ceran, N., Gökteş, P. (2009). Hastane kökenli patojenlere karşı çeşitli dezenfektan ve antiseptiklerin etkinliği. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*, 39(3-4): 97-102.
- İnan, F., Pala, M. and Doymaz, I. 2007. Use of ozone in detoxification of aflatoxin B1 in red pepper. *The Journal of Stored Products Research*, 43, 425–429.
- İrikli S. Bazı antiseptik ve dezenfektanların in vitro antimikrobik aktivitelerinin araştırılması. 2007, Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Yüksek Lisans tezi, 62 sayfa, Edirne, (Doç. Dr. Müşerref Tatman Otkun).
- Jay, J. M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. *Modern food microbiology* (7th ed.). New York: Springer.
- Jefferson KK, Pier DB, Goldman DA, Pier GB. The teicoplanin-associated locus regulator (TcaR) and the intercellular adhesin locus regulator (IcaR) are transcriptional inhibitors of the *ica* locus in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2004; 186: 2449-2456.
- Jhajharia, K., Parolia, A., Shetty, K.V. and Mehta, L.K. (2015). Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(1), 1-12.
- Jones, H.C., Roth, I.L., Sanders, W.M. 3rd. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), p. 316-25.
- Kampf G, Hollingsworth A. Validity of the four European test strains of prEN 12054 for the determination of comprehensive bactericidal activity of an alcohol-based hand rub. *J Hosp Infect* 2003; 55: 226-231.
- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. and Ramasubbu, N., 2004, Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 2633-6.
- Karaca H. and Velioglu, Y.S. 2009. Effects of some metals and chelating agents on patulin degradation by ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 31, 224-231.
- Karaca, H. and Velioglu, Y.S. 2007. Ozone applications in fruit and vegetable processing. *Food Reviews International*, 23 (1), 91-106.
- Kim J.G., Yousef, A.E. and Dave, S. 1999. Application of ozon efor enhancing the microbiological safety and quality of foods: A review. *J. Food Protect.*, 62(9): 1071-1087.
- Kishen, A. and Haapasalo, M. (2010). Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontics Topics*, 22(1), 58-78.
- Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus and Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. 7th Ed, Washington DC, ASM Press, 1999: 264-277.
- Köse H, Yapar N. The comparison of various disinfectants' efficacy on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm layers. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2017; 47: 1287-1294

- Külah C, Doğan B, Gökdağ İİ, Yalınay Çırak Y, Rota S. Yoğun bakım ünitesi kaynaklı bazı nonfermentatif gram negatif bakterilerin çeşitli antiseptik ve dezenfektanlara duyarlılıkları. ANKEM Dergisi. 2002; 16 (1): 31-35.
- LARSON, EL. (1991) Alcohols. In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Ed: S.S. Block, Lea & Febiger, Philadelphia. 4. Edition. p: 191-203.
- Lasa, I., Penades, J. R., 2006, Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol*, 157: 99-107.
- Leriche V, Sibille P, Carpenter B. Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1851-1856.
- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections . N Engl J Med 1998; 339: 520-532.
- LYNCH, E. (2004). The revolution in dentistry. 1st ed. London: *Qintessence publishing co. ltd*.
- Mah TF, O'Toole GA. Mechanisma of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9(1): 34-39.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. and Saarela, M., 2003, Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327-56.
- Mohammadi, Z., Palazzi, F., Giardino, L. and Shalavi, S. (2013). Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomedical Journal*, 36(2), 59-70.
- Murray RGE, Steed P, Elson HE (1965) The location of mucopeptide of selection of the cell wall of Escherichia coli and other gram-negative bacteria. *Can J Microbiol* 11: 547-560.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., 2012, Medical Microbiology, with student consult Online Access. 7: Medical Microbiology. *Elsevier Health Sciences*, 174-87.
- N, Becker H, Harno J, Bientz M, Meunier O. Effect of peracetic acid and aldehyde disinfectants on biofilm. *J Hosp Infect* 2004; 58: 151-154.
- NAGAYOSHİ, M., KİTAMURA, C., FUKUİZUMİ, T., NİSHİHARA, T., TERASHİTA, M. (2004b). Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J. Endod.*, 30: 778-81.
- Nakipoğlu Y, Gürlü B. Çeşitli dezenfektan ve antiseptik maddelerin antibakteriyal etkinliğinin araştırılması. *Ankem Derg*, 2004; 18 (4): 220-223.
- Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 128-132.
- O'CONNOR, D.O., RUBINO, JR. (1991) Phenolic compounds, In: *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Ed: S.S. Block, Lea & Febiger, Philadelphia. 4.Edition. p: 204-224.
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000; 54: 49-79.
- Özden, Ö., Başaran, F., Muhtaroglu, G., Akuakültürde Yeni Bir Uygulama: Ozon Teknolojisi, *Aquaculture and Fisheries*, s.22-28, 2006.
- Özer, M. (2003, 02-04 Ekim). *Diş Hekimliğinde Farklı Anabilim Dallarında Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon*. 3. Sterilizasyon, Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
- Özsoy MF, Öncü O, Pahsa A, Erdem H, Emekdaş G. Etil alkol, povidon iyod ve benzalkonyum klorürün *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı etkinliği. *Klinik Dergisi*, 2001; 14 (1): 30-32.
- Özyurt M. Dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemleri. *KLİMİK Dergisi* 2000; 13: 41-48.
- Özyurt M. Hastanelerde temizlik, dezenfeksiyon, sterilizasyon ve tıbbi atıkların yok edilmesi. *Hastane İnfeksiyon Dergisi*. 1999; 3 (4): 175-183.

- Özyurt, M. (2005). Aldehit, Peroksijen ve Perasetik Asit ile Klor Verici Ajan İçermeyen ve Alet Dezenfektanı Olarak Önerilen Diğer Dezenfektanlar, Genel Kullanım Alanları ve Antimikrobiyal Etkinlikleri., M. Günaydın, Ş. Esen, A. Saniç, H. Leblebicioğlu. (Editörler). *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*. Samsun. Simad Yayınları, s. 180-199.
- Parsek MR, Greenberg EP. Acyl-homoserine lactone quorum sensing in gramnegative bacteria: A signaling mechanism involved in associations with higher organisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8789–8793.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissue. *Ann Rev Microbiol* 1994; 48: 585–617.
- Percival, S.L., Knottenbelt, D.C. and Cochrane, C.A. (2011) *Introduction to Biofilms*, in *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer: Verlag Berlin Heidelberg
- Percival, S.L., Knottenbelt, D.C. and Cochrane, C.A. (2011) *Introduction to Biofilms*, in *Biofilms and Veterinary Medicine*, Springer: Verlag Berlin Heidelberg
- PETRIĆ, M., STEPHENS, G., MCINTYRE, L., FUNG, J. (2003). A guide to selection and use of disinfectants. BC Center for Disease Control. [http://www.bccdc.ca/NR/rdonlyres/EAA94ACF-02A9-4CF0-BE473F5817A25669/0/InfectionControl_GF_DisinfectntSelectnGuidelines_nov0503].
- Post JC, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Ehrlich GD. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 12: 185- 190.
- Poulsen, L. V., 1999, Microbial biofilm in food processing. *Lebensm. Wiss. u. Techn.*, 32 (6): 321-6.
- Purohit SS, Saluja AK, Kakrani HN. *Pharmaceutical Microbiology*, Agrobios, India, 2003; 325-334.
- QUINN, P.J., MARKEY, B.K. (2001). Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. In: *Disinfection, Sterilization And Preservation*. Ed: S.S. Block, Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. 5th edition. p:1069-1103.
- Reybrouck G. Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of disinfectants. In: Fraise AP, Lambert PA, Mailard JY (eds). Russell, Hugo, Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation & Sterilization. 4th ed. Oxford: Blackwell, 2004; 220-240.
- Rutala AW, Weber DJ. Disinfection, sterilization, and control of hospital waste. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Eds: Principles and Practice of Infectious Diseases. 6. baskı Philadelphia: Elsevier, 2005; 3331-3347.
- Rutala WA. Selection and use of disinfectants. *American Journal of Infection Control*. 1996; 24 (4): 313–342.
- RUTALA, W.A., WEBER, D.J., The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee(HICPAC). (2008). guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities 2008. Erişim: [http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/Disinfection_Nov_2008].
- Saini R. Ozone Therapy in Dentistry: A Strategic Review. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*. 2011; 2: 151-3
- Sakarya S. Biyofilm yapısı ve enfeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. In: Çavuslu S, Oral Ö, editors. 12. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi; 16-20 Kasım 2005; Antalya-Belek. 3-8.
- Samastı M. Hastanelerde dezenfeksiyon kullanım esasları, yapılan hatalar. İÜ.
- Saniç A. Aldehitler ve sterilizan etkili dezenfektanlar. 3. Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kitabı (Ed'ler Günaydın M, Sünbül M.), Samsun 2003: 108-119.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., Davies, D. G., 2002, *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriol*, 184: 1140-54.

- Scott DBM, Leshner EC (1963) Effect of ozone on survival and permeability of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 85: 567-576.
- Shirliff ME, Mader JT, Camper AK. Molecular interactions in biofilms. *Chem & Biol* 2002; 9: 859–871.
- Sinde, E. and Carballo, J., 2000, Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17: 439-47.
- Skog, J. L. and Chu, C. K. 2001. Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Canadian Journal of Plant Science*, 81, 773–778.
- Sonawane A, Jyot J, Ramphal R. *Pseudomonas aeruginosa* LecB is involved in pilus biogenesis and protease IV activity but not in adhesion to respiratory mucins. *Infect Immun* 2006; 74: 7035-7039.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W., 2002, Biofilms as complex differentiated communities, *Annu Rev Microbiol*, 56, 187-209.
- Sultan N. Dezenfektan aktivitesini etkileyen faktörler ve dezenfektan etkinliğinin değerlendirilmesi. 6. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongre Kongre Kitabı (Editör: Esen Ş, Perçin D, Aydın F, Günaydın M, Zenciroğlu D.), 2009; 121-137.
- Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 2001; 147: 3-9.
- Tielker D, Hacker S, Loris R, Strathmann M, Wingender J, Wilhelm S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. *Microbiology* 2005; 151: 1313-1323.
- Tote K, Vanden Berghe DV, Maes L, Cos P. A new colorimetric microtitre model for the detection of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46: 249-254.
- Töreci K. Hastane infeksiyonlarının tanımlanması, epidemiyolojisi ve ekonomik yönü. *ANKEM Derg.* 1997; 11 (no 2) 181-184.
- VALACCHÌ, G, BOCCÌ, V. (2000). Studies on the biological effects of ozone.:11. Release of factors from human endothelial cells. *Mediators inflamm.*, 9: 271-6.
- Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 2004; 103: 241–247.
- Watnick P, Kolter R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 2000; 182:2675-2679
- WEBER, D.J., RUTALA, W.A., SCĠKBERT-BENNETT, E.E. (2007). Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob.Agents. Chemother.* 51(12): 4217–4224.
- Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol* 2000; 182: 6401-6411.
- Wolz C, Goerke C, Landman R, Zimmerli W, Fluckiger U. Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun* 2002; 70: 2758-2762.
- Yüce A, Okuyan M, Abedi M. Çeşitli dezenfektanların ve antiseptiklerin *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* üzerine etkileri. *İnfek Derg* 1989; 3: 93-101.
- Zobell, C.E. (1943). The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), p. 39-56. [https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/62731/mod_resource/content/5/7.%20hafta%20sterilizasyon-dezenfeksiyon.pdf] Erişim Tarihi: 01.06.2017

