

Düşük Konsantrasyonlu Ozonun *Candida albicans* Üzerine Olan Etkisi

Çigdem İleri¹, Yavuz İ. Sezen²

Özet

Bu çalışmada ozonun *Candida albicans* ATCC 1213 üzerine olan etkileri araştırıldı. Nutrient agara ekilen *Candida albicans* suşu bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Bu agar kültüründen bir koloni alınıp 10 ml lik serum fizyolojik tuzlu su içerisinde sulandırıldı. Vorteks yardımıyla karışımın homojen hale gelmesi sağlandı. Bu süspansiyondan 1 ml alınıp 9 ml lik serum fizyolojik tuzlu su içerisinde sulandırıldı. Seri dilüsyonlarla elde edilen 10^{-2} konsantrasyonlu maya süspansiyonundan 0,1 ml Sabouroud – dekstroz agar (SDA) yüzeyine ekildi. Ekilen maya hücreleri 15, 30, 45, 60 dakika gibi farklı sürelerde, %40 ve %85 gibi farklı nemli ortamlarda, 0,2 ppm ozon verildi. Ozonun *C. albicans* üzerine olan etkisi gözlemlendi. %40 nemli ortamda; kontrol grubunda 398, 15 dakika ozonlanan petride 387, 30 dakika ozonlanan petride 261, 45 dakika ozonlanan petride 197, 60 dakika ozonlanan petride 167 koloni ürettiği gözlemlenmiştir. %85 nemli ortamda yapılan denemelerde ise kontrol grubunda 271, 15 dakika ozonlanan petride 260, 30 dakika ozonlanan petride 63, 45 dakika ozonlanan petride 4, 60 dakika ozonlanan petride 1 koloni ürettiği gözlemlenmiştir. Ozonun yüksek nemli ortamda mayalar üzerine daha etkili olduğu gösterilmiş oldu. Daha sonraki çalışmalarda, ozonun, *C. albicans* ve insan sağlığı üzerine olan etkilerinin farklı konsantrasyonlarda araştırılması gerekmektedir.

Giriş

Doğal bir gaz olan ozon gerektiği gibi kullanıldığında son derece sağlıklıdır. Ozon, yüksek reaktivitesi sayesinde çeşitli organik, inorganik molekül ve atomlarla reaksiyona girerek onları oksitler. Bu reaksiyonlar sonucunda havadaki bakteri ve diğer mikroorganizmaları etkisiz hale getirilerek sterilizasyon sağlanmış olur (1).

Ozon yıllarca içme sularının dezenfekte edilmesi için kullanılmıştır. Ozon, bakterilerin, mantarların ve virüslerin inaktivasyonunda kullanılabilir güçlü bir oksitleyici olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından kanıtlanmıştır. (2, 3, 4)

¹ Arş. Gör., ² Prof. Dr., Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Bölümü, Kocaeli. Yazışmalardan sorumlu yazarın e-posta adresi: c.ileri@gyte.edu.tr

Pseudomonas putida, *Shewanella putrefaciens*, *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter* sp. ve *Lactobacillus plantarum* gibi bakteri türleri uygun besiyerlerine ekim yapıp, özel bir kabin içerisinde, değişik ozonlama süreleri uygulanarak yapılan denemeler sonucunda; ozonun çok düşük konsantrasyonlarının bile ($<0,27 \times 10^{-3}$ g/l) bu beş farklı türdeki bakterinin vejetatif formları üzerinde bakterisit etki gösterdiği belirtilmiştir (5).

Mikroorganizmaların ozona duyarlılığında nem, pH, sıcaklık ve organik madde varlığı gibi birkaç faktör etkilidir (6). Ozon ilk olarak bakteri membranlarındaki glikoprotein, glikolipit veya tryptophan gibi belirli amino asitler üzerine etki eder. Bakteri ölümleri hızlı gelişir ve sıklıkla hücre permeabilitesindeki değişikliği lizis olayı takip eder. Ozon Gram pozitif (spor formu içerenler), Gram negatif bakterilere karşı etkilidir (7). Ozon kullanımının mikrobiyal aktiviteyi azaltması nedeniyle genelde çabuk bozulan yiyeceklerin raf ömrünü uzattığı (8) tarafından rapor edilmiştir.

2002 yılında yapılan çalışma da mikroorganizmaların inaktivasyonunda OH radikallerinin önemli rol oynadığını kanıtlamışlar. Ozon molekülünün pH 8,2'de pH 5,6'ya oranla %40 daha yavaş bozulduğunu Chic-Watson modeline göre hesaplamışlardır (9).

Ozonun düşük nemli ortamlarda zayıf bir dezenfektan olduğu, fakat ortamın nem oranının %60'ın üzerine çıkarıldığında ozonun çok küçük miktarlarıyla bile patojenleri yok edebildiği deneysel olarak ispatlanmıştır (10).

Escherichia coli, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Proteus* türleri üzerine ozonun etkisi araştırılmıştır. 23 °C den 26 °C ye kadar olan sıcaklıklarda, %60'dan %80'e kadar olan nem oranlarında mikroorganizma inoküle edilmiş petriyerler ozona (ağırlıkça %1,52 den %1,65 kadar olan konsantrasyonlarda) 8 dakika maruz bırakıldıktan sonra koloni sayılarında azalma gözlenmiştir. Bakteri koloni sayılarındaki azalma 4 - 7 logaritma birimi kadar değişmiştir (11).

Ozonun potansiyel faydaları yapılan bilimsel çalışmalarla belirlenmiş olsa da, endüstriye yönelik olarak spesifik uygulamalar için spesifikasyonları (uygulama konsantrasyonu, sıcaklığı, süresi vb.) henüz tanımlanmamıştır (12)

Materyal ve Metot

Nutrient agara ekilen *Candida albicans* ATCC 1213 suşu bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Bu taze agar kültüründen bir koloni alınıp 10 ml lik serum fizyolojik tuzlu suya bırakıldı. Vorteks yardımıyla karışımın homojen hale gelmesi sağlandı. Bu süspansiyondan 1 ml alınıp 9 ml lik serum fizyolojik tuzlu suya konuldu. Seri dilisyonlarla elde edilen 10^{-2} oranındaki maya süspansiyonundan mikro pipet yardımıyla 0,1 ml alınıp Sabouroud – dekstroz agar (SDA) yüzeyine yayma ekim yöntemi kullanılarak ekim yapıldı. Bu işlem 8 ayrı petride uygulandı. 8 Petri kutusundan 4'ü ozonlanan kabinde 4'ü de kontrol için hazırlanan kabinde, %40 nemli bir ortamda, 23 °C' de farklı sürelerde bekletildi. Aynı deneme %85 nemli ortamda 27 °C' de yapıldı.

Sonuç

Bu çalışmada 0,2 ppm ozonun *Candida albicans* üzerine etkili olduğu görülmüştür. %40 nemli ortama oranla %85 nemli ortamda ozonun daha güçlü bir oksitleyici olduğu kanıtlanmıştır. Tablo 1' de süreler ve petrilerdeki maya koloni sayıları verilmiştir.

Tablo 1: %40 ve %85 nemli ortamda 0,2 ppm konsantrasyondaki ozonun *C. albicans* üzerine olan etkisi (SDA besiyerinde 10^{-2} seyreltiden Petri kutularına 0,1 ml ekim yapılmıştır).

Ozonlama Süresi (dakika)	%40 Nemli Ortamda Koloni Sayısı		%85 Nemli Ortamda Koloni Sayısı	
	Ozon	Kontrol	Ozon	Kontrol
15	387	398	260	271
30	261	398	63	270
45	197	397	4	284
60	167	398	1	275

0,1 ml 10^{-2} konsantrasyonlu maya süspansiyonundan alınarak Sabouroud – dekstroz agar (SDA) yüzeyine ekilip, 15, 30, 45, 60 dakika gibi farklı sürelerde, %40 ve %85 gibi farklı nemli ortamlarda, 0,2 ppm ozona maruz bırakılan Petri Kutularının fotoğrafları şekil 1 ve 2 de yer almaktadır.

Elde edilen sonuçlar bir formül yardımı ile karşılaştırılabilir. Bu formül aracılığı ile ozonun *C. albicans* üzerine olan etkisini yüzdelerle ifade etmek mümkündür.

[(Kontrol grubundaki koloni sayısı – ozonlanmış petrideki koloni sayısı) / Kontrol grubundaki koloni sayısı] X 100 = yapılan işlemin verimliliği formülü kullanılabilir.

Bu formül %40 nemli ortamdaki verilere uygulandığında;

15 dakika ozonlama; $[(398 - 387) / 398] \times 100 = 2,7$

30 dakika ozonlama; $[(398 - 261) / 398] \times 100 = 34,44$

45 dakika ozonlama; $[(397 - 197) / 397] \times 100 = 50,3$

60 dakika ozonlama; $[(398 - 167) / 398] \times 100 = 58,0$ sonuçları elde edilir.

%85 nemli ortamdaki verilere uygulandığında;

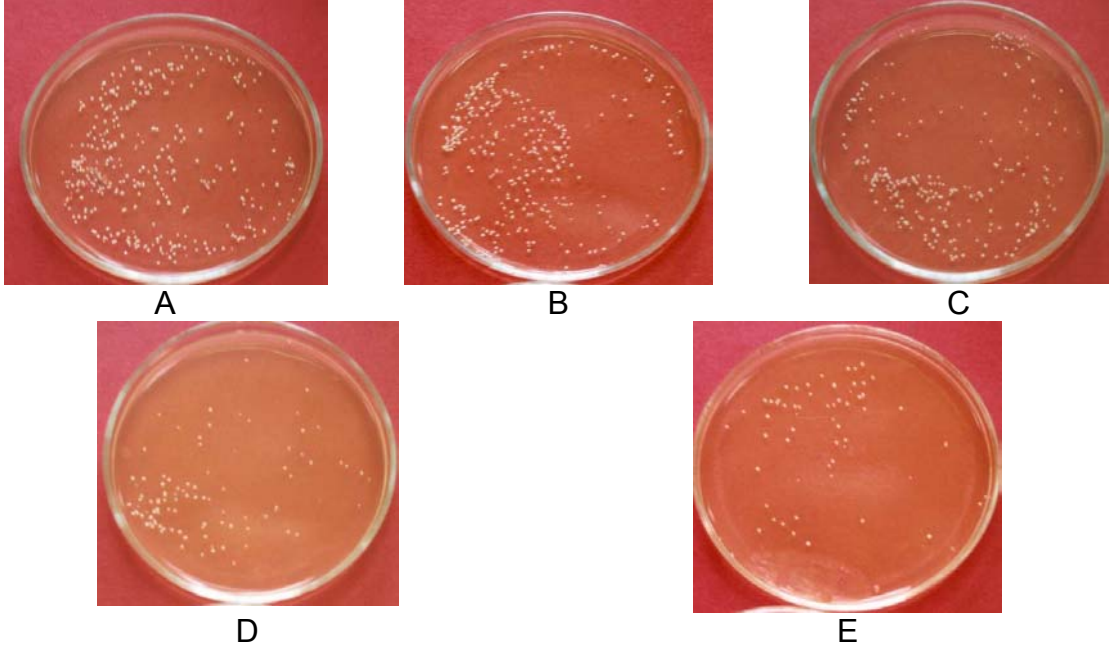
15 dakika ozonlama; $[(271 - 260) / 271] \times 100 = 4,0$

30 dakika ozonlama; $[(270 - 63) / 270] \times 100 = 76,66$

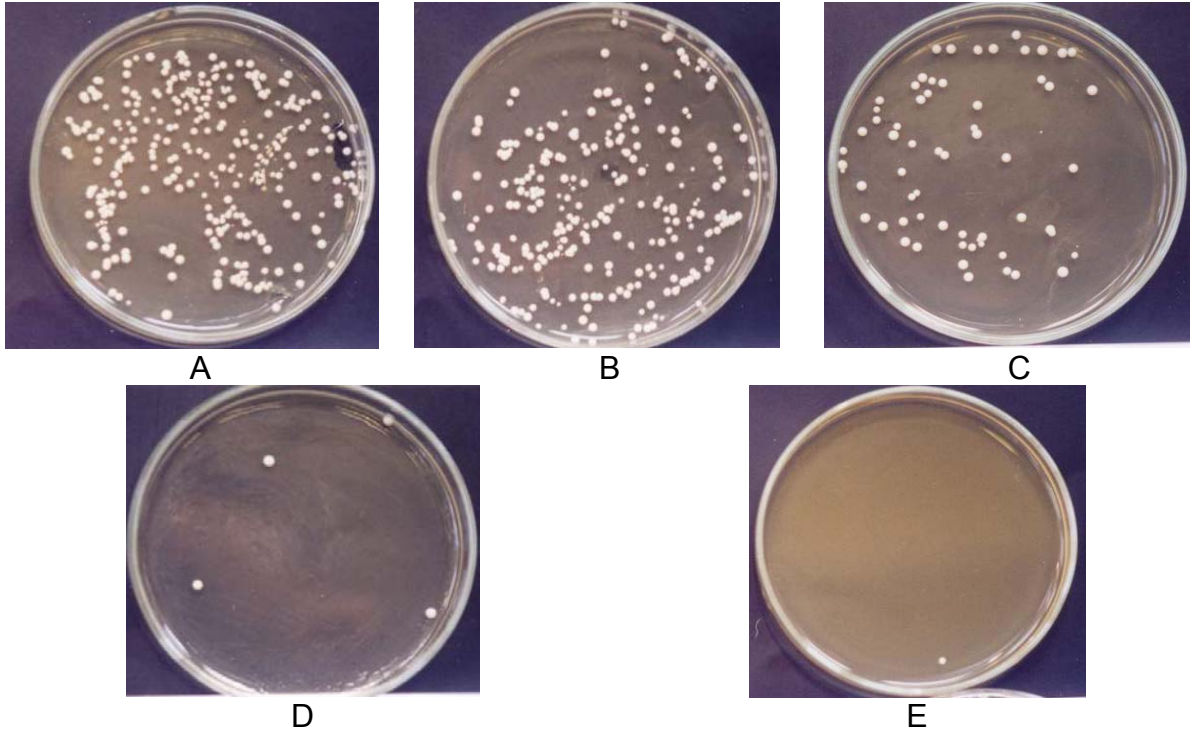
45 dakika ozonlama; $[(284 - 4) / 284] \times 100 = 98,59$

60 dakika ozonlama; $[(275 - 1) / 275] \times 100 = 99,63$ sonuçları elde edilir.

Hesaplamalar sonucunda ozonun %85 nemli ortamda dezenfektan etkisinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir.



Şekil 1: A: Kontrol (ozonlanmamış) petri. B: 15 dakika ozonlanmış petri. C: 30 dakika ozonlanmış petri. D: 45 dakika ozonlanmış petri.E: 60 dakika ozonlanmış petri (tüm denemelerde nem oranı %40 olacak şekilde ayarlanmıştır).



Şekil 2: A: kontrol (ozonlanmamış) petri. B: 15 dakika ozonlanmış petri. C: 30 dakika ozonlanmış petri. D: 45 dakika ozonlanmış petri.E: 60 dakika ozonlanmış petri (tüm denemelerde nem oranı %85 olacak şekilde ayarlanmıştır). ????

Tartışma

Bu çalışmada çok düşük konsantrasyon (0,2 ppm) kullanılarak maya kolonilerinin sayısında yaklaşık 2 logaritma birimi bir azalma gerçekleştirildiği gösterilmiştir.

Oda sıcaklığında, 600 ppm konsantrasyondaki ozonun, *Bakteriophage* λ , *Candida albicans*, *Escherichia coli* üzerine olan etkisi araştırılmıştır (13). *Bakteriophage* λ 'nın, 10 dakikada tamamen inaktive olduğu gözlenirken, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* 'da 40 dakikada 10^5 ve 10^4 faktörlük azalma gözlenmiştir.

1993 yılında yapılan çalışmada 50 ve 600 mikrogram/m³ ozonun havadaki *S. epidermidis*, *M. luteus*, *A. citreus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. marcescens*, *P. fluorescens* ve *C. albicans* mikroorganizmaları üzerine olan etkilerini araştırmışlardır. 50 mikrogram/m³' den 100 mikrogram/m³' e olan konsantrasyonlarla bir saat muamele sonunda mikroorganizma sayısında çok az bir azalma gerçekleşirken, 500 mikrogram/m³'den 600 mikrogram/m³'e kadar olan konsantrasyonlarla bir saat muamele sonunda deneydeki tüm bakteri koloni sayılarında %99 azalmalar gerçekleşmiştir. Ozona, Gram pozitif türlerin gram negatiflere oranla daha duyarlı olduğu görülmüştür. *C. albicans* ise ozona bakterilerden daha dirençli olduğu kanıtlanmıştır (14).

Diş plaklarının çoğunlukla *C. albicans* 'tan oluştuğu ve ozonun bu tür mikroorganizmaları inhibe ettiği bilinmektedir. Bu nedenle dişlerin temizliğinde 10 ppm ozonun kullanılması klinik olarak uygun olduğu düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan deneylerde 10 ppm ozona 30 dakika maruz bırakılarak *C. albicans* sayısında yaklaşık 1/10 azalma gerçekleştiği, 60 dakika ozonlama sonunda da 1/1000 azalma olduğu kanıtlanmıştır (15).

2003 yılında yapılan bir çalışmada arpa yüzeyindeki mantar sporları ve miselleri üzerinde ozonun çok etkili olduğunu göstermişlerdir (16).

Ayrıca *Aspergillus fumigatus* üzerine ozonun etkisi araştırılmıştır. 23 °C'den 26 °C ye kadar olan sıcaklıklarda, %60'dan %80'e kadar olan nem oranlarında *Aspergillus fumigatus* inoküle edilmiş petrilere ozona (ağırlıkça %1,52 den %1,65 kadar olan konsantrasyonlarda) 8 dakika maruz bırakıldıktan sonra koloni sayılarındaki azalma gözlenmiştir. Koloni sayısındaki azalmanın 4 logaritma biriminden fazla olduğu tespit edilmiştir (17).

Sonuç olarak, %85 nemli ortamda bulunan *Candida albicans* inoküle edilmiş petrilere 60 dakika 0,2 ppm ozona maruz bırakıldığında maya koloni sayısında % 99,63 'lük bir azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ve diğer literatüre bakarak ozonun güçlü bir oksitleyici ve dezenfektan olduğu ve bu amaçla pek çok yerde kullanılabileceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. <http://www.crispair.com/ozone.html>

2. Broadwater, W. T., Hoehn, R.C., and King, P.H., (1973) Sensitivity of tree selected bacterial species to ozone. *Applied Microbiology* 26, 391-393.

3. Foegeding, P. M., (1985) Ozone inactivation of *Bacillus* and *Clostridium* spore populations and importance of the spore coat to resistance. *Food Microbiology* 2, 123-134.
4. Ishizaki, K., Shinriki, N. and Matsuyama, H. (1986) Inactivation of *Bacillus* spores by gaseous ozone. *Journal of Applied Bacteriology* 60, 67-72
5. Kirby, R. M., Gibbs, P. A., Silva, M. V. (1998) Sensorial and microbial effects of gaseous ozone on fresh scad (*Trachurus trachurus*). *Journal of Applied Microbiology* 84, 802-810
6. Hoigne, J. and Bader, H. (1975) Ozonation of water: role of hydroxyl radicals as oxidizing intermediates. *Science* 190, 782-784.
7. Greene, A. K., Few, B. K. and Serafini, J.C. (1993) A comparison of ozonation and chlorination for disinfection of stainless steel surfaces. *Journal of Dairy Science* 76, 3617-3620
8. Rice, R. G., Farquhar, J. W. and Bollyky, L.J. (1982) Review of the applications of ozone for increasing storage times of perishable foods. *Ozone Science and Engineering* 4, 147-163.
9. Cho M., Chung H., Yoon J., (2002) Effect of pH and importance of ozone initiated radical reactions in inactivating *Bacillus subtilis* spore. *Ozone Science & Engineering* 24, 145-150.
10. <http://www.airozone.com/ozon.htm>
11. Whistler, P. E. and B. W. Sheldon. 1989b. Bactericidal activity, eggshell conductance and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfectants. *Poultry Sci.* 68:1345-1350.
12. <http://www.mam.gov.tr/tr6cp/proje04.html>
13. Komanapalli I. R. , Lau B. H. S. , (1998) Inactivation of *bacteriophage* λ , *Candida albicans* and *Escherichia coli* by ozone, *Appl Microbiol Biotechnol* , 49; 766-769.
14. Heindel TH., Streib R., Botzenhart K., 1993. Effect of ozone on airborne microorganisms. *Zentralbl Hyg Umweltmed Sep*;194(5-6):464-480.
15. Murakami H., Sakuma S., Nakamura K., 1996. Disinfection of removable dentures using ozone. *Dent Mater J. Dec*;15(2):220-225
16. Allen B., Wu J., Doan H., 2003. Inactivation of fungi associated with barley grain by gaseous ozone. *J Environ Sci Health B. Sep*;38(5):617-630
17. Whistler, P. E. and B. W. Sheldon. 1989b. Bactericidal activity, eggshell conductance and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfectants. *Poultry Sci.* 68:1345-1350.