

# Ozon ve Negatif İyon Uygulamasının Çeşitli Bakteriler Üzerine Etkilerinin İncelenmesi ve Hastane Atık Suları Dezenfeksiyonunda Kullanımının Değerlendirilmesi

## The Effects of Negative Ions and Ozone on Various Bacteria and The Evaluation of Their Use in Hospital Wastewater Disinfection

Nafia Canan GÜRSOY<sup>1</sup>, İbrahim Halil ÖZEROL<sup>1</sup>

<sup>1</sup> İnönü Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye

### ÖZET

**Giriş:** Son yıllarda antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların neden olduğu hastane ve/veya toplum kaynaklı infeksiyonlarda artış görülmektedir. Bu infeksiyonların önlenmesi veya azaltılmasında hastane atık sularının dezenfeksiyonunda kullanılacak güvenilir, etkili dezenfeksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda; hastane infeksiyonu etkeni olarak tanımlanmış çoğul dirençli *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* izolatlarının ozon gazı ve/veya negatif iyon duyarlılıkları araştırılmış ve bu dezenfeksiyon yöntemlerinin hastanemiz atık su sisteminde kullanımı değerlendirilmiştir.

**Materyal ve Metod:** Hastanemiz infeksiyon kontrol komitesince hastane infeksiyonu etkeni olarak tanımlanmış, çoğul dirençli klinik izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlardan  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL konsantrasyonunda bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve daha sonra  $1.5 \times 10^2$  cfu/mL'ye kadar seri dilüsyonları yapılmıştır. Ozon oluşturma kapasitesi 10.5 mg/saat ve 6.6 mg/saat konsantrasyonunda iki farklı ozon jeneratörü ve 3.3 milyon/cm<sup>3</sup> negatif iyon çıkıtısına sahip negatif iyonizer kullanılmıştır. Toplamda yedi farklı bakteri konsantrasyonu üzerinde; değişik sürelerde ozon ve/veya negatif iyon uygulaması yapılarak, bakteri sayısında gözlenen değişiklikler kaydedilmiştir. Ozonun agar plak yüzeyindeki bakteriler üzerine etkinliğinin yanı sıra, sulu ortamdaki etkinliği de incelenmiş ve son olarak hastanemiz atık su arıtım sisteminin giriş ve çıkış noktalarından alınan su örneklerine ozon uygulamasıyla, atık su arıtım sistemindeki dezenfeksiyon etkinliği değerlendirilmiştir.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan tüm bakteri türlerinin ozon gazına son derece duyarlı olduğu ve kısa maruziyet sürelerinde üremelerinin inhibe olduğu belirlenmiştir. Fakat özellikle yüksek bakteri konsantrasyonlarında ozon gazının yüksek konsantrasyonlarına ve/veya sürekli olarak ozon uygulamasına ihtiyaç duyulabileceği görülmüştür. Ayrıca ozonun sudaki etkinliğinin çok daha yüksek olduğu görülmüştür. Negatif iyonun yüksek bakteri konsantrasyonlarında etkili olmadığı, dolayısıyla patojen yükü yüksek olan atık su sistemlerinin dezenfeksiyonunda kullanımının yararlı olmayacağı görülmüştür.

**Sonuç:** Hastane atık su sistemleri dezenfeksiyonunda ozon gazı kullanımının etkili ve güvenilir olacağı kanısına varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Ozon; Negatif iyon; Dezenfeksiyon; Hastane atık suları

## SUMMARY

### The Effects of Negative Ions and Ozone on Various Bacteria and The Evaluation of Their Use in Hospital Wastewater Disinfection

Nafia Canan GÜRSOY<sup>1</sup>, İbrahim Halil ÖZEROL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medical Microbiology, Inonu University Research and Application Hospital, Malatya, Turkey

**Introduction:** In recent years, there has been an increase in hospital and/or community-acquired infections caused by antibiotic-resistant microorganisms. To prevent or to reduce these infections, reliable, effective disinfection methods are needed to be used in disinfecting the hospital wastewater. In this study, the sensitivity of multidrug resistant strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* bacteria, which are often encountered as hospital infection agents to ozone gas and/or negative ions, is investigated, and the use of these disinfection methods in our hospital's waste water systems is evaluated.

**Materials and Methods:** Our study included multidrug resistant clinical isolates identified by our hospital infection control committee as agents of hospital-acquired infection. Bacterial suspensions were prepared from the isolates at a concentration of  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL and serial dilutions were then made to  $1.5 \times 10^2$  cfu/mL. Two different ozone generators with an ozone generating capacity at concentrations of 10.5 mg/h and 6.6 mg/h and a negative ionizer with a negative ion output of 3.3 million/cm<sup>3</sup> were used. For a total of seven different bacterial concentrations, ozone and/or negative ion application was performed at different application times, and the changes observed in the number of bacteria were recorded. The effectiveness of the ozone on the agar plate surface and in the aqueous medium were examined, and finally, the disinfection efficiency on the waste water treatment system was evaluated by applying ozone to the water samples taken from the entrance and exit points of the hospital wastewater treatment system.

**Results:** It was determined that all bacterial species studied were highly susceptible to ozone gas, and their growth was inhibited in a short exposure time. However, it was observed that high concentrations of ozone gas and/or continuous ozone application might be required, especially at high bacterial concentrations. It was also found that the activity of ozone in the aqueous environment was much higher. It was observed that the negative ions were ineffective at high bacterial concentrations and therefore the use of this method in the disinfection of wastewater systems with high pathogen load was not beneficial.

**Conclusion:** It is concluded that the use of ozone gas in the disinfection of hospital wastewater systems is effective and reliable.

**Key Words:** Ozone; Negative ions; Disinfection; Hospital wastewater

## GİRİŞ

Hastane atık suları; içerdiği organik madde konsantrasyonu, ilaçlar, dezenfektanlar, farmasötikler gibi maddeler ve antibiyotik dirençli bakteriler açısından evsel atık sulardan farklılık göstermektedir. Hastane atık sularının su ekosistemiyle buluşması, doğal ortamların biyolojik dengesi üzerinde birçok olumsuzluk oluşturma riskine sahiptir<sup>[1]</sup>. Bu nedenle hastane atık su arıtımında kullanılacak teknolojilerin yeterlilik ve verimliliği; farmasötik ajanların (ve metabolitlerinin) ve patojen mikroorganizmaların (özellikle çoğul dirençliler) çevreye salınmasının engellenmesi açısından kilit rol oynamaktadır<sup>[2-4]</sup>.

Akuatik ortamlarda kimyasal ve mikrobiyolojik kontaminantların varlığının ortaya çıkmasıyla

birlikte, yeraltı su kaynaklarının ve çevresel kontaminasyonun engellenebilmesi için ilave atık su arıtım işlemlerine duyulan ihtiyaç tüm dünyada tartışılmaktadır. Bu amaçla çok sayıda atık su arıtım prosesi geliştirilmiş, fakat temel olarak hepsinde kimyasalların bertaraf edilmesi amaçlanmıştır. Dolayısıyla şimdiye kadar uygulanmakta olan atık su arıtım proseslerinin dezenfeksiyon etkinliği ve çevreye olan etkisi tartışmalıdır<sup>[5]</sup>.

Atık suların klorlama ile dezenfeksiyonu halen en yaygın kullanılan dezenfeksiyon yöntemidir. Ancak klorlamada temel mekanizmanın; bakterilerin hücre yüzey hidrofobitesinin değişmesi ve böylece hücrelerin agregasyonu şeklinde gerçekleştiği ve dolayısıyla klorlama işleminin ardından yapılan kültürlerde üreme görülebildiği belirtilmiş

tir<sup>[6]</sup>. Ayrıca atık suların klorlanması sırasında yüksek konsantrasyonda klor ihtiyacı duyulmakta ve bunun sonucunda da canlı organizmalar için son derece toksik olan organo-kloridler ve diğer dezenfeksiyon yan ürünleri oluşmaktadır. Dolayısıyla mikrobisid etkinliği yüksek, ancak dezenfeksiyon yan ürün oluşumuna neden olmayan, maliyet etkin alternatif atık su dezenfeksiyon yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır<sup>[7,8]</sup>.

Güçlü oksidasyon potansiyeli ve antibakteriyel etkinliği uzun süredir bilinen ozonun sulu ortamlarda son derece yüksek çözünürlükte olduğu ve özellikle yüksek konsantrasyonlarının hızla suya yayıldığı gösterilmiştir. Bu anlamda, sulu ekosistemlerde ozon kullanımının son derece güvenilir olduğu ve dezenfeksiyon yan ürünleri gibi potansiyel toksik etki oluşturmadığı belirtilmektedir<sup>[9]</sup>. Negatif iyonların mikroorganizmalar üzerindeki etkileriyle ilgili araştırmalar; negatif iyonlara maruziyetlerinin ardından *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* ve *Salmonella* spp. bakterilerinin çoğalmalarının inhibe olduğunun gösterilmesiyle başlamış ve daha sonra hava iyonlarının mikrobiyal hücrelerin canlılığı üzerinde önemli ve tekrarlanabilir bir etkisi olduğu gösterilmiştir<sup>[10,11]</sup>. Ayrıca bakteriyel hücre ölümü üzerinde ozon ve negatif iyon arasında güçlü bir sinerjistik etki olduğu belirtilmiştir<sup>[12]</sup>.

Bu çalışmada; hastane infeksiyonu etkeni olarak sıklıkla karşılaşılan çoğul dirençli çeşitli bakterilerin ozon gazı ve/veya negatif iyon duyarlılıkları ve ozon gazı uygulamasının hastanemiz atık su sisteminde kullanımı değerlendirilmiştir.

## MATERYAL ve METOD

Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve hastanemiz İnfeksiyon Kontrol Komitesi tarafından hastane infeksiyonu etkeni olarak değerlendirilen, çoğul ilaç dirençli *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. aureus* izolatları çalışmaya dahil edildi. İzolatların identifikasyonları ve antibiyotiklere direnç durumları konvansiyonel yöntemlerle ve otomatize sistem (Phoenix, Becton Dickinson-USA) kullanılarak yapıldı.

Çalışmaya alınan izolatların saf kültürlerinden, 0.5 McFarland bulanıklığına karşılık gelen (UV

spektrofotometre ile  $OD_{600nm} = 0.132$  absorbans)  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL konsantrasyonunda bakteri süspansiyonu hazırlandı ve daha sonra fosfat tamponu içerisinde 1/10 oranında seri dilüsyonları yapılarak  $1.5 \times 10^2$  cfu/mL'ye kadar seyreltildi, toplamda yedi farklı bakteri konsantrasyonu elde edildi. Her dilüsyonun üç tekrarı yapılarak, koloni sayılarının ortalamaları alındı.

## Ozon Jeneratörü ve Negatif İyonizer

Ozontek marka, seramik tüplü, "corona discharge" yöntemli ve hava şartlandırıcılı 10.5 mg/saat ve 6.6 mg/saat konsantrasyonda ozon oluşturma kapasitesinde iki farklı ozon jeneratörü kullanıldı.

Purion marka, 250 x 180 x 692 mm ebadında, 10-60 m<sup>2</sup> etki alanına sahip, 0.04 ppm'in altında ozon çıktısı ve 3.3 milyon/cm<sup>3</sup> negatif iyon çıktısına sahip negatif iyonizer kullanıldı.

## Bakterilere Ozon Gazı ve/veya Negatif İyon Uygulama Deneyleri

İlk olarak seri dilüsyonları yapılan bakteri süspansiyonlarının kanlı triptik soy agar besiyerine ekimi yapıldı ve ekimin ardından plaklar bekletilmeden, plak kapakları açık olacak şekilde, karton kutu içerisine yerleştirilerek farklı sürelerde negatif iyon ve/veya ozon gazına (10.5 mg/saat ve 6.6 mg/saat konsantrasyonlarda) maruz bırakıldı. Gecelik inkübasyonun ardından tüm plakların koloni sayımları (cfu/mL) yapılarak kaydedildi.

Ayrıca ozonun sudaki etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla; fosfat tamponu içerisinde hazırlanan bakteri süspansiyonlarına da farklı sürelerde 6.6 mg/saat konsantrasyonunda ozon gazı uygulandı. Ozon uygulaması öncesi ve sonrasında, bakteri süspansiyonları Gram boyama yöntemiyle boyanarak hücre duvar harabiyeti incelendi ve en az iki kanlı triptik soy agara ekimi yapılarak gecelik inkübasyon sonundaki koloni sayısı kaydedildi.

Gerek agar plaklara ekimi yapılan bakterilere ve gerekse direkt bakteri süspansiyonlarına ozon ve/veya negatif iyon uygulanma işlemi; her bir konsantrasyon için 10 dakika, 20 dakika, 30 dakika, 40 dakika, 1 saat, 2 saat, 3 saat ve 4 saatlik sürelerle yapıldı.

### **Hastane Atık Suyundan Alınan Numunelere Ozon Gazı Uygulama Deneyleri**

Hastanemiz atık su arıtım sisteminin giriş ve çıkış noktalarından yaklaşık 15 günlük bir periyotta farklı zaman aralıklarında atık su örnekleri alındı ve bu örnekler 5 dakika ve 10 dakika süreyle 10.5 mg/saat konsantrasyonunda ozon gazı uygulandı. Ozonlama öncesi ve sonrasında agar besiyerlerine ekimleri yapılarak, koloni sayıları kaydedildi.

#### **İstatistiksel Analiz**

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

#### **BULGULAR**

Agar plaklara ekimi yapılan tüm bakteriler ozon gazına duyarlı olup, maruziyet sonrasında görülen koloni sayılarındaki azalmalar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ). Hem gram-negatif hem de gram-pozitif bakterilerin tüm konsantrasyonlarında, ozon uygulamasının özellikle ilk 10 dakika içerisinde önemli bir sayısal düşüşe neden olduğu ve daha sonra bakteriyel konsantrasyona bağlı olarak zamanla bakteri sayılarındaki bu düşüşün devam ettiği görülmüştür (Şekil 1). Özellikle  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL konsantrasyonunda ilk 10 dakika içinde yaklaşık 1 logaritmik düşüş görülmüş, ancak devam eden maruziyet süreleri içerisinde aynı hızda düşüş gözlenmemiştir. Gram-pozitif bakterilerde 10. dakikanın ardından çok daha yavaş bir azalma gözlenmiş, özellikle yüksek konsantrasyonların dördüncü saatin sonunda bile tamamen inhibe olmadığı görülmüştür (Şekil 1). Gram-negatif bakterilerin ozona daha duyarlı olduğu ve en geç ikinci saatin sonunda tüm konsantrasyonlarda bakteri sayılarının sıfırlandığı görülmüştür. Gram-negatif bakteriler arasında ise genel olarak *E. coli*'nin diğer bakterilere göre ozon gazına nispeten daha duyarlı olduğu görülmüştür (Şekil 1).

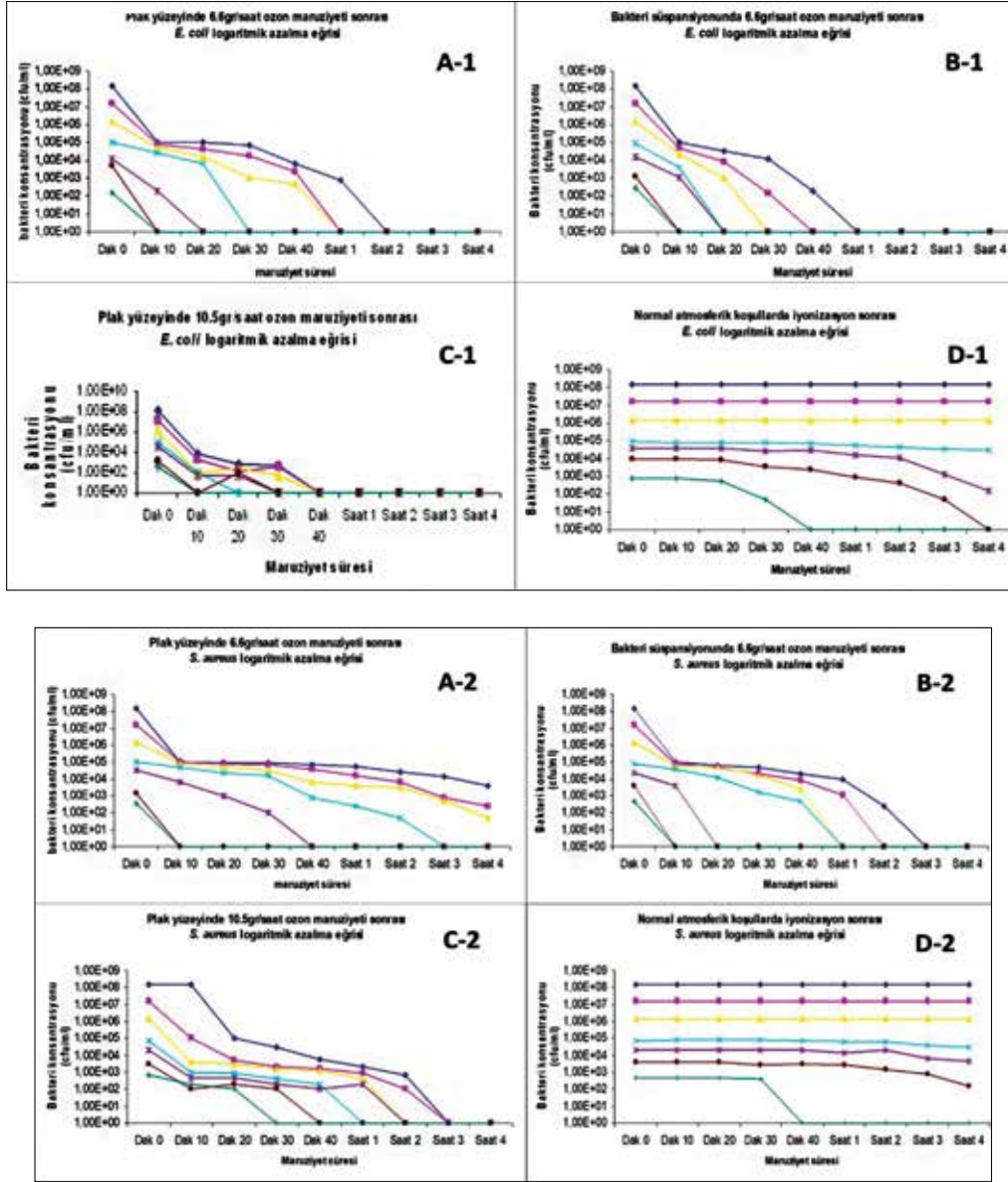
Fosfat tamponu içerisindeki bakteri süspansiyonlarının ozonlanması testlerinde; ozonun sudaki etkinliğinin agar plak yüzeyi uygulamalarına kıyasla çok daha etkili olduğu görülmüştür. Sıvı ortamda ozon gazı uygulandığında özellikle  $1.5 \times 10^5$

cfu/mL ve daha düşük konsantrasyonlarda ortalama yarım saat içerisinde bakterilerin tamamen inhibe edilebildiği görülmüştür. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise sıvı ortamda uygulanan ozon gazı ile yaklaşık bir saat daha erken tam inhibisyon sağlanabildiği gözlenmiştir (Şekil 1).

*E. coli* ve *S. aureus* üzerinde yapılan ozon gazı konsantrasyon testlerinde; beklenildiği gibi ozon konsantrasyonundaki artışa paralel olarak çok daha güçlü bakteriyel inhibisyon sağlandığı gözlenmiştir. İlk 10 dakika içerisinde yaklaşık 2 logaritmik bir düşüşle yine en hızlı inhibisyon *E. coli*'de görülmüş ve ozon konsantrasyonundaki artışa paralel olarak 40 dakikalık uygulama sonunda bakteri sayısı tamamen sıfırlanmıştır (Şekil 1). *S. aureus*'da yine benzer şekilde ozon konsantrasyonunun arttırılmasıyla birlikte daha hızlı bir azalma olduğu göstermiş ve üçüncü saatte bakteri sayısının sıfırlandığı gözlenmiştir.

Fosfat tamponu içerisinde  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL konsantrasyonunda hazırlanan bakteri süspansiyonları bir saat boyunca ozon gazına maruz bırakılmış ve bu süspansiyonlardan ozonlama öncesi ve sonrasında Gram boyamalar yapılarak mikroskop altında incelenmiştir. Gram boyama incelemelerinde genel olarak tüm bakterilerin ozonlama sonrası yoğunluklarının azaldığı ve özellikle gram-negatif bakterilerin ozonlama sonrası preparatlarında bakteri hücrelerinin ayırt edilemediği, daha çok bakteri kalıntılarına benzer artefaktlar olduğu görülmüştür. *S. aureus*'un ozonlama sonrasında yapılan Gram boyama preparatında ise gram-negatif olarak boyanmış olduğu dikkat çekmiştir.

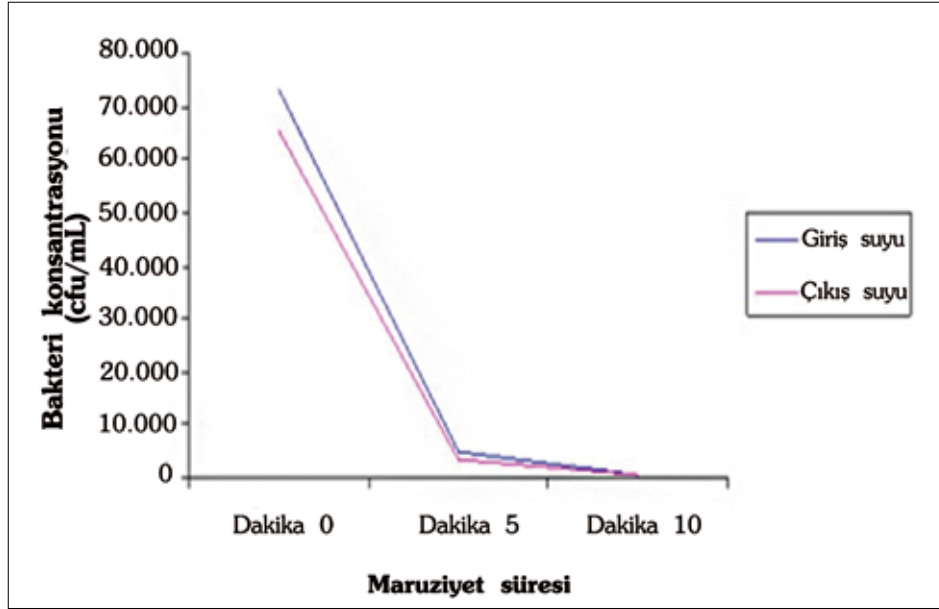
Negatif iyon uygulamalarında gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerde benzer etki görülmüştür. Genel olarak negatif iyon uygulamasıyla;  $1.5 \times 10^4$  cfu/mL ve daha düşük konsantrasyonlarda uzun sürede inhibisyon sağlanabilirken,  $1.5 \times 10^4$  cfu/mL'nin üzerindeki konsantrasyonlarda ise dört saatin sonunda dahi anlamlı azalma sağlamamıştır. Ozon ve negatif iyonun eş zamanlı olarak uygulandığı testlerde; tek başına ozon maruziyeti denemelerine kıyasla, özellikle *S. aureus*'ta daha belirgin olmak üzere, nispeten inhibisyon sürelerinde kısalma gözlenmiştir. Fakat gram-negatif bakterilerde düşük konsantrasyonlarda dahi bu inhibisyon sürelerindeki düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0.05$ ).



Şekil 1. A. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilerin 6.6 mg/saat ozon gazı uygulanmasının sonuçları, B. Fosfat tamponu içerisinde hazırlanmış bakteri süspansiyonlarına ozon gazı uygulanmasının sonuçları, C. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilere 10.5 mg/saat ozon gazı uygulamasının sonuçları, D. Agar plaklarına ekimi yapılan bakterilere negatif iyon uygulamasının sonuçları. 1. *Escherichia coli*, 2. *Staphylococcus aureus*.

Hastanemiz atık su arıtım sistemi giriş noktasından alınan su numunelerinde ortalama mikroorganizma sayısı 73.365 cfu/mL olup, 5 dakikalık ozon gazı muamelesinin ardından bu sayının ortalama 4934 cfu/mL'ye ve 10 dakikalık ozon uygulamasıyla 378 cfu/mL'ye kadar düştüğü görülmüştür. Atık su sistemi çıkış noktasından alınan su numunelerindeki ortalama mikroorganiz-

ma sayısı ise 65.673 cfu/mL iken, 5 dakikalık ozon uygulamasının ardından ortalama 3553 cfu/mL, 10 dakikalık uygulama sonrasında ise 290 cfu/mL'ye kadar azalmıştır (Şekil 2). Atık su sistemi su numunelerinin bakteriyel konsantrasyonundaki ozon gazı uygulamasıyla elde edilen bu düşüş istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ).



Şekil 2. Atık su arıtım sistemi su numunelerinin ozon gazı ile muamelesi sonrasında bakteri canlılığında azalma.

## TARTIŞMA

Konvansiyonel klorlama yöntemi; çok daha gelişmiş dezenfeksiyon yöntemlerine kıyasla daha ekonomik olması nedeniyle, dezenfeksiyon sonrası toksik dezenfektan yan ürünlerinin varlığına rağmen, halen en çok uygulanan su dezenfeksiyon yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda; antibiyotik dirençli bakterilerin ortadan kaldırılmasında çok da yeterli olmadığı ve hatta bazen bu bakterilerin seleksiyonuna neden olarak, direncin yayılımını önlemede yetersiz kaldığı bildirilmektedir<sup>[8,13]</sup>. Dolayısıyla öncelikli olarak azotu, biyolojik olarak parçalanabilir organik bileşikler, amonyak, nitrat ve fosfatı bertaraf etmeyi amaçlayan ikincil ve üçüncül atık su arıtma işlemlerine ek olarak, mikrokirleticileri ve mikrobiyolojik kontaminantları da etkili bir şekilde azaltmaya yönelik ilave proseslere gerek duyulmaktadır. Bu bağlamda organik mikrokirleticilerin uzaklaştırılmasında ve aynı zamanda son derece reaktif radikaller aracılığıyla patojen mikroorganizmaların azaltılması ve inaktivasyonunda ozonlama işleminin oldukça etkili bir yöntem olduğu bildirilmektedir<sup>[5,14,15]</sup>.

Çalışmamıza alınan tüm bakterilerin; gerek ekimlerinin yapıldığı agar plak yüzeyi maruziyet-

lerinde ve gerekse sıvı ortamdaki bakteri süspansiyonu içerisinde ozon uygulamalarına son derece duyarlı olduğu görülmüştür. Bakterilerin aynı konsantrasyondaki ozon gazına olan duyarlılıkları değişmekle beraber; genel olarak gram-negatif bakterilerin *S. aureus*'a kıyasla daha duyarlı olduğu, daha hızlı ve yüksek oranda inaktivasyon sağlandığı görülmüştür. Çalışmamızda gram-negatif türler arasında genel olarak ozona en duyarlı mikroorganizma *E. coli* iken, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* türlerinin daha dirençli olduğu görülmüş olup, hastane atık sularının ozonlama ile dezenfeksiyonunun araştırıldığı bir çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiştir<sup>[16]</sup>. Ekstraselüler polimerik maddelerin artmış sekresyonu sonucu *P. aeruginosa* gibi mukoid karakterdeki organizmaların ozona daha az duyarlı olduğu bildirilmektedir<sup>[5,15]</sup>. Ozona en duyarlı mikroorganizmanın *E. coli* olduğunun vurgulandığı bir başka çalışmada; 3.5-4 mg konsantrasyondaki ozonun %80 oranında inaktivasyon sağladığı, diğer mikroorganizmalarda ise aynı oranda inaktivasyon için 40 kat daha yüksek konsantrasyonda ozon kullanılması gerekebileceği bildirilmiştir<sup>[17]</sup>. Bu çalışmanın aksine, çalışmamızda incelenen türler arasında *E. coli* dışındaki bakteriler için de bu denli yüksek konsantrasyonda ozonlama işlemine gerek duyulmadığı görülmüştür.

Ozon gazı uygulamasının yapıldığı tüm testlerde; çalışılan bütün bakteri türleri için maksimum inaktivasyonun ilk 10 dakikalık süre içerisinde sağlandığı görülmüştür. Agar plak yüzeyinde 6.6 mg/saat konsantrasyonundaki ozon maruziyeti ile 10 dakika içerisinde; bütün bakteri türlerinin ortalama bakteri konsantrasyonlarında, %99.79-99.84 arasında değişen bir azalma görülmüştür. İnaktivasyon oranının beklendiği gibi ilk 10 dakika içerisinde düşük bakteri konsantrasyonları için %100'lere ulaştığı gözlenmiştir. Yine bakteri süspansiyonu ile yapılan denemelerde ve negatif iyon ile ozonun birlikte uygulandığı denemelerde de ilk 10 dakikada %99.78-99.89 arasında değişen oranda hücre sel canlılığın azaldığı gözlenmiştir. Ozonun bakteri hücreleri üzerindeki ultrayapısal değişikliklerin incelendiği bir başka çalışmada da benzer şekilde, hücre sel canlılıktaki en yüksek azalma oranının 5-15. dakikalar arasında gerçekleştiği belirtilmiş ve bu durumun yüksek bakteriyel konsantrasyonlarda daha belirgin gözlemlendiği vurgulanmıştır<sup>[16,18]</sup>.

Çalışmamız sonuçlarına göre; bakteri konsantrasyonu arttıkça yeterli inhibisyonu sağlayabilmek için ozon konsantrasyonu ve/veya maruziyet süresini arttırmak gerekmektedir. Örneğin  $1.5 \times 10^5$  cfu/mL'den daha düşük bakteriyel konsantrasyonlarında 6.6 mg/saat ozon uygulaması ile ortalama ilk 30-40 dakika içerisinde hücre sel canlılığın tamamen kaybolduğu, ancak  $1.5 \times 10^8$  cfu/mL bakteri konsantrasyonunda bu sürenin iki saati bulabildiği görülmektedir. Oysa 10.5 mg/saat ozon konsantrasyonu ile aynı bakteriyel konsantrasyonda ve aynı deneysel koşullarda (agar plak yüzeyi uygulaması) 40 dakikada %100 inaktivasyon sağlanmıştır.

Mikroorganizmaların ozona duyarlılıkları türe bağlı değişim göstermekle beraber, bakterilerin antibiyotik direnç durumları ve konsantrasyonu, bağıl nem, kültür ortamı bileşenleri ve pH'sı gibi çevresel faktörler ya da maruziyet öncesi mikroorganizmaların bekleme süresi, uygulanan ozon konsantrasyonu ve uygulama şekli gibi deneysel koşullar da mikroorganizmaların ozonla inaktivasyon derecelerini etkileyebilmektedir<sup>[5,8,12]</sup>. Bu nedenle tüm deneysel koşulların sabit olmadığı farklı çalışma sonuçlarının karşılaştırılması bir anlam ifade etmemektedir. Örneğin, patates dekstroza agar (pH= 5.6) ile yapılan ozon uygulama çalış-

malarında, nutrient agar (pH= 6.8) göre bakteri ölümünün daha hızlı gerçekleştiği; ayrıca ozon uygulama öncesindeki bekleme süresiyle ilişkili olarak hücre canlılığı, mikroorganizmanın kültür ortamına ekiminin ardından bekletilmeden ozona maruz bırakılması durumunda hücre canlılığının %34 iken, ekimi takiben 45 dakika kadar geciktirilmiş ozon uygulama işleminde %78'lere kadar yükseldiği bildirilmiştir<sup>[12]</sup>. Bu durum geciktirilmiş ozon uygulaması sırasında bekletilen hücrelerin kendilerini koruyacak polisakkaridler salgılamalarıyla açıklanmıştır.

Ortamın bağıl nem oranıyla doğru orantılı olarak ozonun inhibitör etkinliğinin de arttığı gözlenmiş ve bu durumun ozonun reaksiyona gireceği su oranının artışı sonucu oluşacak radikal oranının artmasına bağlı olduğu belirtilmiştir<sup>[17]</sup>. Ozonun sudaki etkinliğinin havadaki etkinliğinden çok daha yüksek olduğu ve suda hızla ayrıştığından çok daha güvenli olduğu bildirilmiştir<sup>[9,19]</sup>. Bizim çalışmamızda da agar plak yüzeyine uygulanan ozon işlemine kıyasla bakteri süspansiyonlarının direkt ozonlanmasının daha etkili olduğu görülmüştür. Daha önce de belirtilen ilk 10 dakikalık ani azalma döneminde anlamlı fark gözlenmezken ( $p > 0.05$ ), ilerleyen maruziyet sürelerinde ozonun su içerisinde etkinliğinin arttığı bariz olarak görülmektedir ( $p < 0.05$ ). Örneğin, 10 dakikalık ani inhibisyon döneminin ardından ikinci 10 dakika içerisinde; ortalama mikrobiyal konsantrasyonun agar plak yüzeyindeki ozon uygulamasıyla %36, sıvı ortamdaki ozon uygulamasıyla ise %51 oranında azalma gösterdiği görülmüştür ( $p < 0.05$ ).

Ozonla karşılaşan mikroorganizmalarda gözlenen hücre tahribatının ana mekanizması hücre duvarı ve membran üzerindeki fiziksel etkilerdir. Kısa süreli ozon gazı maruziyeti; hücre duvarı harabiyeti, membran permeabilitesinde değişim ve hücre bütünlüğünün bozulması gibi değişikliklere neden olmaktadır. Bu sırada çeşitli hücre içi protein ve DNA'ların hücre duvarı harabiyeti ile hücre dışına çıkabildiği, fakat bu hücre içi bileşenlerin, ancak daha uzun süreli maruziyetlerde hasara uğradığı gösterilmiştir<sup>[20-22]</sup>. Çalışmamızda da bir saat süreyle ozon uygulanan bakteri süspansiyonlarının Gram boyama görüntüleriyle hücre duvar bütünlüğünün bozulduğu görülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca 3.3 milyon/cm<sup>3</sup> konsantrasyonunda negatif iyon ve 0.04 ppm'in altında ozon çıktısı olan bir negatif iyonizer kullanılarak, mikroorganizmaların negatif iyonlara duyarlılığı araştırılmıştır. Negatif iyon uygulanan hiçbir bakteri türünde; 1.5 x 10<sup>5</sup> cfu/mL'den daha yüksek bakteri konsantrasyonlarında dört saatin sonunda dahi hiç azalma görülmezken, ancak düşük bakteri konsantrasyonlarında ve uzun süreli maruziyetlerde hücre canlılığı nispeten azalttığı gözlenmiştir. Tyagi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da benzer şekilde, kısa süreli maruziyetlerde negatif iyonların etkili olmadığı vurgulanmıştır<sup>[23]</sup>. Çeşitli bakterilerin negatif iyonizasyon karşısında gösterdiği bu hücre azalmaların; muhtemelen iyonizatörün çalıştırılması sırasında oluşan ve hücre ölümüne neden olabilecek elektriksel alan ve en önemlisi elektrik boşalmasının (corona discharge) bir yan ürünü olarak oluşabilecek herhangi bir ozondan kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Hatta negatif iyon maruziyeti sırasında, test edilen mikroorganizmaları etkileyen ana bakteriyel mekanizmanın da ozona maruziyetten ileri gelen oksidasyon hasarı olduğu vurgulanmaktadır<sup>[12]</sup>.

Ozon ve negatif iyonun eş zamanlı olarak uygulanması durumunda mikrobisid etkinlik açısından bir sinerjizmden bahsedilmesine rağmen ve çalışmamızda *S. aureus*'ta kısmen bu tür bir sinerjizm gözlenmiş, ancak hastane atık suyu gibi patojen yükü yüksek uygulamalarda negatif iyon kullanımının ciddi bir avantaj sağlamayacağı düşünülmüştür<sup>[24]</sup>.

Hastane atık suları; bir yandan tanı amaçlı laboratuvar ve araştırma faaliyetleri bir yandan da hasta bakımı ile ilişkili atıklar nedeniyle, geleneksel atık su arıtma teknolojilerinin yetersiz kaldığı yüksek farmasötik ve mikrokirletici yüküne sahiptir. Hastanemiz atık su sistemi giriş ve çıkış noktalarından alınan numunelerde; giriş suyunun ozonlanmasıyla başlangıç mikrobiyal konsantrasyonunun 5 dakikada %93.3 ve 10 dakikada %99.5 oranında azaldığı, çıkış suyunun ise sırasıyla %94.6 ve %99.6 oranında mikrobiyal azalma gösterdiği görülmüştür. Hastane atık su arıtma sistemlerinde ozon uygulamasının pratikte kullanımının incelendiği çalışmalarda da; gerek ham gerekse işlenmiş atık suların kısa süreli ozonlanmasıyla dirençli patojenler, antibiyotik direnç genleri ve sitostatik bileşiklerin %97-100 oranın-

da azaltılabildiği gösterilmiştir<sup>[5,25]</sup>. Ancak hastane atık su arıtma proseslerinde oksidasyonun sürecinin etkinliğinin artırılması için mutlaka bir ön biyolojik işlem ile yüksek organik yükün azaltılması önerilmektedir<sup>[25]</sup>. Tüm bu sonuçlara göre; hem yüksek bakteriyel etkinliği, toksik dezenfeksiyon yan ürün oluşumu göstermemesi hem de farmasötiklerin oksidasyonu gibi avantajlarından dolayı, patojen ve sitostatik yükü yüksek olan hastane atık su sistemlerinin ozonlama gibi ileri oksidasyon işlemlerinin ümit verici olduğu düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Gautam AK, Kumar S, Sabumon PC. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *J Environ Manage* 2007;83(3):298-306.
2. Pauwels B, Verstraete W. The treatment of hospital wastewater: an appraisal. *J Water Health* 2006;4(4):405-16.
3. Hawkshead JJ. Hospital wastewater containing pharmaceutically active compounds and drug-resistant organisms: a source of environmental toxicity and increased antibiotic resistance. *J Residuals Sci Technol* 2008;5:51-60.
4. Varela AR, Manaia CM. Human health implications of clinically relevant bacteria in wastewater habitats. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013;20(6):3550-69.
5. Alexander J, Knopp G, Dötsch A, Wieland A, Schwartz T. Ozone treatment of conditioned wastewater selects antibiotic resistance genes, opportunistic bacteria, and induce strong population shifts. *Sci Total Environ* 2016;559:103-12.
6. Arana I, Santorum P, Muela A, Barcina I. Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. *J Appl Microbiol* 1999;86(5):883-8.
7. Tsai CT, Lin ST. Disinfection of hospital waste sludge using hypochlorite and chlorine dioxide. *J Appl Microbiol* 1999;86(5):827-33.
8. Oh J, Salcedo DE, Medriano CA, Kim S. Comparison of different disinfection processes in the effective removal of antibiotic-resistant bacteria and genes. *J Environ Sci (China)* 2014;26(6):1238-42.
9. Voidarou C, Tzora A, Skoufos I, Vassos D, Galogiannis G, Alexopoulos A, et al. Experimental effect of ozone upon some indicator bacteria for preservation of an ecologically protected watery system. *Water Air Soil Pollut* 2007;181:161-71.
10. Krueger AP, Reed EJ. Biological impact of small air ions. *Science* 1976;193(4259):1209-13.
11. Marin V, Moretti G, Rassa M. Effects of ionization of the air on some bacterial strains. *Ann Ig* 1989;1(6):1491-500.
12. Fan L, Song J, Hildebrand PD, Forney CF. Interaction of ozone and negative air ions to control micro-organisms. *J Appl Microbiol* 2002;93(1):144-8.



13. Oncu NB, Menciloglu YZ, Balcioglu IA. Comparison of the effectiveness of chlorine, ozone, and photocatalytic disinfection in reducing the risk of antibiotic resistance pollution. *J Adv Oxid Technol* 2011;14:196-203.
14. Dodd MC. Potential impacts of disinfection processes on elimination and deactivation of antibiotic resistance genes during water and wastewater treatment. *J Environ Monit* 2012;14(7):1754-71.
15. Lüddecke F, Heß S, Gallert C, Winter J, Güde H, Löffler H. Removal of total and antibiotic resistant bacteria in advanced wastewater treatment by ozonation in combination with different filtering techniques. *Water Res* 2015;69:243-51.
16. Chiang CF, Tsai CT, Lin ST, Huo CP, Lo KV. Disinfection of hospital wastewater by continuous ozonation. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2003;38(12):2895-908.
17. Li CS, Wang YC. Surface germicidal effects of ozone for microorganisms. *AIHA J (Fairfax, Va)* 2003;64(4):533-7.
18. Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T, Poonkhum R, Srisukonth C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 2002;48(4):193-9.
19. Baeza M, Alonso J, Bartrolí J. Residual aqueous ozone determination by gas diffusion reverse flow injection analysis. *Anal Bioanal Chem* 2005;382(2):388-95.
20. Komanapalli IR, Lau BH. Inactivation of bacteriophage lambda, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by ozone. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998;49(6):766-9.
21. Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T, Poonkhum R, Srisukonth C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 2002;48(4):193-9.
22. Fontes B, Cattani Heimbecker AM, de Souza Brito G, Costa SF, van der Heijden IM, Levin AS, et al. Effect of low-dose gaseous ozone on pathogenic bacteria. *BMC Infectious Diseases* 2012;12:358.
23. Tyagi AK, Nirala BK, Malik A, Singh K. The effect of negative air ion exposure on *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2008;43(7):694-9.
24. Fletcher LA, Gaunt LF, Beggs CB, Shepherd SJ, Sleigh PA, Noakes CJ, Kerr KG. Bactericidal action of positive and negative ions in air. *BMC Microbiol* 2007;7:32.
25. Ferre-Aracil J, Valcórce Y, Negreira N, López De Alda M, Barceló D, Cardona SC, Navarro-Laboulai J. Ozonation of hospital raw wastewaters for cytostatic compounds removal. Kinetic modelling and economic assessment of the process. *Sci Total Environ* 2016;556:70-9.

#### Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Nafia Canan GÜRİSOY

İnönü Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
Malatya-Türkiye

E-posta: cananatesgursoy@yahoo.com