

Ultrasound ve hidrojen peroksit ile *Klebsiella pneumoniae* dezenfeksiyonu

¹Filiz Bayrakçı Karel*, ¹Fadime Karaer, ¹Ali Savaş Koparal
¹Çevre Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye
*e-mail: fbayrakci@anadolu.edu.tr

Özet

Patojen kaynaklı mikroorganizmalar tarafından oluşturulan su kaynaklı epidemik hastalıkların kontrolü günümüzde halk sağlığını korumakda büyük önem kazanmıştır. Bu nedenle su arıtımında kullanılan dezenfeksiyon işlemi su temininde önemli rol oynamakt su ve içme sularında uygulanan dezenfeksiyon işlemi büyük önem taşımaktadır. Halk sağlığını korumak için sıklıkla kullanılmakta olan geleneksel dezenfeksiyon yöntemleri çeşitli dezavantajlara sahip olması nedeniyle su arıtımında alternative teknolojilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada 22kHz, 36kHz ve 833 kHz ultrasonik frekanslarda işletilen kesikli reaktörlerde *Klebsiella pneumoniae* dezenfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmada H₂O₂'in ultrasonik dezenfeksiyon işlemine olan etkisini incelemek amacıyla, 1x10⁵ CFU/mL başlangıç bakteri derişimi için 5mg/L, 10mg/L ve 20 mg/L derişimlerde hidrojen peroksit (H₂O₂) kullanılmıştır. US (28 kHz) ve H₂O₂ (10 mg/L) hibrit dezenfeksiyon çalışmalarında *Klebsiella pneumoniae* bakterisinin etkin bir şekilde (5 log) giderilebildiği belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Ultrasound, hidrojen peroksit, dezenfeksiyon, *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae disinfection with ultrasound and hydrogen peroxide

Abstract

Control of water borne epidemic disaster caused by pathogenic microorganism has gained huge significance to prevent public health recently. Thus, disinfection process applied for water treatment plays an important role in water supply. Alternative treatment technologies must be developed for water disinfection because conventional disinfection methods widely used to control public health have several disadvantages. In this study, *Klebsiella pneumoniae* disinfection was performed in batch type ultrasonic reactor operated with 22kHz, 36kHz and 833 kHz ultrasonic frequencies. In order to determine the effect of hydrogen peroxide on ultrasonic disinfection process, 5mg/L, 10mg/L and 20 mg/L H₂O₂ were used for 1x10⁵ CFU/mL initial bacterial concentration of *Klebsiella pneumoniae*. In the hybrid disinfection studies performed with US (28 kHz) and H₂O₂ (10 mg/L), it was investigated that *Klebsiella pneumoniae* was efficiently inactivated (5 log).

Keywords: Ultrasound, hydrogen peroxide, disinfection, *Klebsiella pneumoniae*

*İlgili yazar: Çevre Mühendisliği Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Anadolu Üniversitesi, Eskişehir,26555, Türkiye

E-mail: fbayrakci@anadolu.edu.tr, Telefon: +902223213550-6412

1. Giriş

Canlıların yaşamlarının devamı için gerekli olan yer altı suları ve yüzeysel su kaynakları, insan faaliyetleri sonucunda meydana gelen kimyasal, fiziksel ve mikrobiyal kirlilik nedeniyle halk sağlığı açısından risk taşımaktadır [1]. Temiz ve güvenilir içme suyu sağlanabilmesi için uygun Çevre Mevzuatı kapsamında tanımlanan arıtım çalışmalarının gerçekleştirilmesi, su kaynaklarının korunması, suyun uygun şekilde arıtılması ve güvenli bir şebeke sistemi insani tüketim için sunulmalıdır. Temiz ve güvenilir içme ve kullanma suyu sağlamaya yönelik su temininde en önemli ve son basamak olan dezenfeksiyon işlemi, yasal düzenlemelere uygun, kolay uygulanabilir, bilimsel ve teknolojik gelişmeler doğrultusunda kolay güncellenebilir olmalıdır [2].

Dezenfeksiyon; patojenik mikroorganizmaların inaktive edilmesi olarak tanımlanır. Dezenfektan; klor dioksit, klor amin ve ozon gibi patojenik mikroorganizmaları öldürmek ya da inaktive etmek amacıyla suya ilave edilerek dağıtılan oksidan madde veya suda bulunan patojenik mikroorganizmaları öldüren fiziksel veya kimyasal proseslerdir. Su ve atık sularda bulunan patojenik mikroorganizmaların sebep olduğu su kaynaklı hastalıkların önlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Suyun patojenik organizmalar tarafından kontamine olduğunu gösteren birincil parametre olan sudaki koliform varlığı söz konusu olduğunda suyun uygun dezenfeksiyon yöntemi ile arıtılması gerekmektedir. Dezenfeksiyon alternatiflerini belirlemede etki eden ana faktörler; etkinlik, maliyet, uygulanabilirlik, pilot çalışma gereksinimi ve yan etkiler olarak sıralanabilir. Etkinlik dezenfeksiyon yönteminin seçilen mikroorganizmaların hedef seviyede inhibasyonu sağlanması ve güvenilir olmasıdır. Uygulanacak dezenfeksiyon yönteminin kullanım maliyeti; ön arıtım maliyeti, işletme maliyeti, amortisman maliyeti ve toplam maliyetini kapsamaktadır. Ayrıca seçilen yöntem pratik olarak uygulanabilmeli, taşıma, depolama ve alanda üretimi kolay olmalı, uygulaması ve kontrolü kolay olmalı, ön görülen sonuçları sağlamalıdır. Dezenfeksiyon amacıyla kullanılacak yöntemin dozaj çalışması ve tasarım detaylarının belirlenmesi için pilot çalışma gereksinimi araştırılmalıdır. Uygulanacak sistemin potansiyel yan etkileri araştırılmalıdır. Dezenfektan, sucül hayata toksik etki yaratmamalı, besinlerin biyoakümüülasyonu ile taşınmamalı ya da oluşmamalı, kanserojen, mutajen ya da toksik maddelere dönüşmemeli ya da oluşturmamalıdır Dezenfeksiyonun ana gayesi içme suyu işlemlerinde ve arıtılan suların çıkışında rastlanan, su ile taşınabilen ve hastalık yapan mikroorganizmaların giderilmesi ve bulaşmasının önlenmesidir [3].

Ultrases bir ortamdaki moleküllerin hareketleri sırasında meydana getirdikleri titreşimler sonucu oluşur. Bu ses durgun suya taş atıldığında oluşan dalgacıklara benzemektedir. 1917’de Biyolog Galton tarafından keşfedilmiştir [4]. Ultrases dalgaları; işitilebilir mertebe(16-18 kHz)nin üstünde frekansları olan boyuna dalgalardır. Sahip oldukları frekansa göre düşük ve yüksek frekanslı ultrases olarak ikiye ayrılır. Frekansı; 2- 10 MHz aralığında olan düşük frekanslı ultrases dalgaları düşük enerjilerinden dolayı sağlık alanında kullanılmaktadır. Frekansı; 20- 100 kHz aralığında olan düşük frekanslı ultrases dalgaları 1950’li yılların başlarında keşfedilmiştir. Günümüz de ise geniş çapta ilgi görerek, çeşitli alanlarda uygulama alanı bulmaktadır. Son yıllarda sayısı hızla artan ultrasonik su dezenfeksiyonu çalışmaları su ve atıksu arıtımı alanında gerçekleştirilen uygulamaların başında gelmektedir. [4].

Ultrasoundun başlıca dezenfeksiyon mekanizması, akustik kavitasyonların sönümlenmesi sonucu

ortaya çıkan enerji ile artan bir takım fiziksel, mekanik ve kimyasal etkiler ile bakterileri inaktif hale getirilmesi ve bakteriyel kümeleri ya da flokları ayrılarak dezenfeksiyona karşı dirençlerinin kırılmasıdır. Kaviteasyonların sönmelenmesinden kaynaklanan lokal yüksek basınç ve sıcaklık, bakterilerin hücre duvarının parçalanmasına ya da yanında bulunan bakteri kümelerinden ayrılmasına neden olur. Bakteri hücresi frekansa bağlı olarak belli bir süre mekanik olarak zorlandığında zarar görür. Sulu ortamlarda ise açığa çıkan bu enerji sonikasyon boyunca radikallerin (H^+ ve OH^-) oluşumuna neden olur. Radikaller bakteriyel hücre duvarının kimyasal yapısını bozar ve hücre duvarını zayıflatır. Suyun bu sonokimyasal degradasyonunda son ürün kuvvetli bir bakterisit olan hidrojen peroksittir ve açığa çıkan hidrojen peroksit sayesinde kimyasal dezenfeksiyon gerçekleşir [5].

Jyothi ve arkadaşları (2014), 40 kHz, 100W güçte çalışılan ultrasonik reaktörde, 28-30 °C, pH 5,5' ta ve katalizör olarak TiO_2 kullanılmış ve fenol biyolojik bozunmaya uğramıştır. Sonuç olarak; hidrojen peroksit sırasında oluşan, sono-, foto- ve sono-foto-katalitik varlığında su içinde fenol bozulması ile birlikte mikrobiyal inaktivasyonun gerçekleştiğini belirlemişlerdir [6]. Gao ve arkadaşları (2014), *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, ve *Staphylococcus pseudintermedius* mikroorganizmaları ile çalışılmıştır. 20kHz-100kHz arasında uygunluğu dikkate alınarak 100kHz ile 30 °C' de çalışılmıştır. Bakteri süspansiyonu hayatta kalma oranı ve 20 dk sürekli sonikasyon bir kez (13 W) ultrasound gücünün olarak ölçülmüştür. *E. aerogenes* ve *B. subtilis* mikroorganizmaların giderim verimi 4,5-log olarak belirlenmiştir. Ayrıca, üstel büyüme aşamasında ultrasonik uygulama için sabit faza göre, *E. aerogenes* süspansiyonları daha duyarlı olduğunu belirlemişlerdir [7]. Gao ve arkadaşları (2014), 850 kHz ultrasound, *Enterobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus epidermidis*, *A. Pullulans*, Hydrogen peroxide (30%) ve t-butanol kullanılmıştır ve 99% yüksek verim alınmıştır. *A. Pullulans* ultrasound arıtımında yüksek kHz de daha dirençli bakteri olarak saptanmıştır. 2 saat, 3 saat ve 5 saat inkübasyon *E. aerogenes*, *B. subtilis* and *S.epidermidis* için 20 saatlik inkübasyondan sonra sabit hale gelmişlerdir.[8]. Lakeh ve arkadaşları (2013), yaygın balık parazitlerinin (ikinci safha) iplik kurdu *Anguillicola crassus*, kirpikli *Paramecium sp.* larva *Artemia sp.* farklı taksonlarını temsil eden model organizmalar ve toplam canlı sayımı için doza bağlı inaktivasyon oranlarını belirlemek amacıyla düşük frekanslı US tek başına ve UV-C ile birlikte uygulanmıştır. Düşük frekanslı US ile su kültüründe askıda katıların ortalama boyutlarının azalmış ve bundan dolayı UV-C nin antiseptik etkisi 0.6 log birim artma olduğunu belirtmişlerdir [9].

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde sonikasyon tek başına kuvvetli bir dezenfeksiyon sağlamakla birlikte sadece ultrasound kullanılarak %100 ölüm oranına ulaşmak için yüksek ultrasonik yoğunluk gerektiği görülmektedir. Bu durum tekniğin yüksek enerji maliyeti nedeniyle büyük ölçekli mikrobiyal dekontaminasyonda kullanımı konusunda çekincelere neden olmaktadır. Ancak, diğer dezenfeksiyon teknikleriyle birlikte ultrasoundun hibrit sistemlerin kullanılmasıyla dezenfeksiyon etkinliğinin artırılmasının yanı sıra klasik dezenfeksiyon yöntemlerinin sahip dezavantajlar da yok edebilir [4]. Bununla birlikte bazı mikroorganizmaların, UV ışına ve ısı ile arıtım gibi dezenfeksiyon tekniklerine karşı dirençli hale gelmeleri durumunda ultrasoundun dezenfeksiyon mekanizması bu tür canlılar için etkin dezenfeksiyonun gerçekleştirilmesine katkı sağlayacaktır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada ultrasound (US) ile *Klebsiella pneumoniae* bakterisinin dezenfeksiyonu çalışılarak, ultrasonik frekansın dezenfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ultrasoundun hidrojen peroksit ile birlikte kullanımı ile dezenfeksiyon etkinliğinin artırılarak, aynı inaktivasyon süresi için gerekli dezenfeksiyon süresinin azaltılması ve gerekli enerji maliyetinin düşürülmesi amaçlanmıştır.

2.1. Mikrobiyolojik çalışmalar

Bu çalışmada *Klebsiella pneumoniae* bakterisi için ultrasonik reaktörde 28kHz, 45 kHz ve 100 kHz frekanslar kullanılmıştır. Dilüsyon tüpleri, besi yerleri, dilüsyon sıvıları ve plastik malzemeler 120°C de 20 dakika NÜVE 40 otoklavda steril edilmiştir. Diğer cam malzemeler ise Electromag marka etüvde 200 °C’de 2 saat steril edilmiştir. Çalışmalar steril kabin (Heraeus KSP-18 ClassII) içinde ortam sıcaklığında gerçekleştirilmiştir

Dezenfeksiyon çalışmalarında 1×10^5 CFU/mL derişiminde *Klebsiella pneumoniae* bakterisi kullanılarak hazırlanmış 100 mL çalışma çözeltisi kullanılmıştır. Dezenfeksiyon çalışmaları 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir. Kesikli akış koşuşlarında işletilen reaktörden 10 dak aralıklarla başlangıçtan itibaren numune alınarak bakteriyel inaktivasyon oranları hesaplanmıştır. Alınan örneklerin gerekli dilüsyonları yapılarak PCA (plate count agar-Merck) katı besi ortamlarına ekim yapılmış ve bakterilerin gelişmesi 37 °C’de 18-24 saat süreyle inkübatörde (Innova-42 Shaker Series) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda playtlerde gelişen koloniler sayılarak bakteriyel inaktivasyon oranları hesaplanmıştır.

2.2. Ultrasound ile dezenfeksiyon

Çalışmalarda 1×10^5 CFU/mL başlangıç bakteri derişiminde gerçekleştirilen dezenfeksiyon işlemine frekansın etkisi incelenmiştir. 28kHz, 45kHz ve 100 kHz ultrasonik frekans ve 100 W güç uygulanarak dezenfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik sistemde 100 mL çözelti ile ultrasonik reaktörde sistemde başlangıçtan itibaren 10 dakika ara ile alınan örneklerin dilüsyonları yapılarak katı besi yerine ekilmiş ve 37°C de inkübe edilmiştir. Ekim yapılan petrilerdeki koloniler sayılarak bakteri miktarındaki azalma belirlenmiştir.

2.2. Hidrojen peroksit ve ultasound ile dezenfeksiyon

Çalışmada H₂O₂ nin ultrasonik dezenfeksiyon işlemine olan etkisini incelemek amacıyla, 1×10^5 CFU/mL başlangıç bakteri derişiminde 5mg/L, 10mg/L ve 20mg/L derişimlerde H₂O₂ (Merck) en iyi bakteri gideriminin sağlandığı 28 kHz ultrasonik frekansta sisteme ilave edilmiştir. Hidrojen peroksitin *Klebsiella pneumoniae* bakterisi üzerindeki dezenfeksiyon etkinliğinin belirlenmesi amacıyla aynı derişimlerde kesikli arıtım çalışmaları yapılarak hibrit siteminde meydana gelen sinerjik etki belirlenmiştir.

3. Sonuçlar

Bu çalışmada ultrasound ile *Klebsiella pneumoniae* bakterisinin dezenfeksiyonu çalışılarak, ultrasonik frekansın dezenfeksiyon etkinliği üzerindeki etkisi, US ve hidrojen peroksit ile birlikte kullanıldığı hibrit sitemin dezenfeksiyon etkinliği verilmiştir.

3.1. Ultrasonik dezenfeksiyon çalışmalarının sonuçları

Bu çalışmada 1×10^5 CFU/mL başlangıç bakteri derişiminde 28kHz, 45kHz ve 100 kHz ultrasonik frekans ve 100 W güç uygulanarak gerçekleştirilen dezenfeksiyon çalışmalarının sonuçları Tablo 1’de verilmiştir.

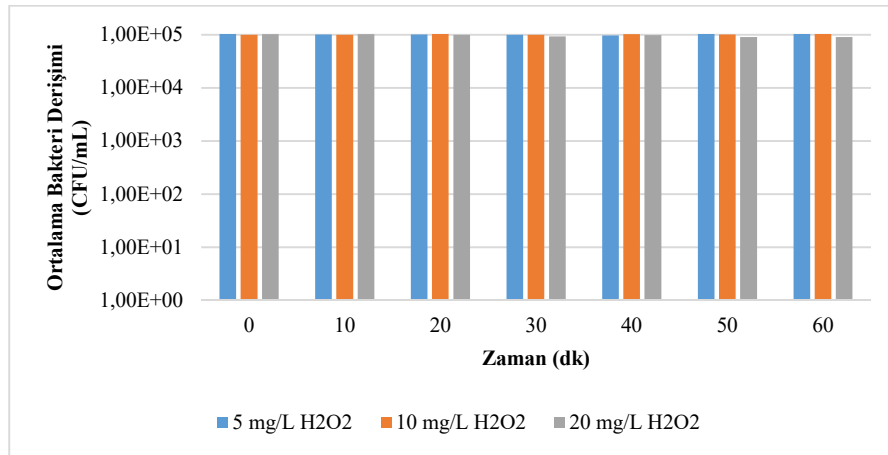
Tablo 1. Farklı US frekanslarında ortalama bakteri derişiminde meydana gelen azalma

Zaman (dk)	US (28kHz)	US (45 kHz)	US (100 kHz)
0	1,E+05	1,E+05	1,E+05
10	3,E+04	6,E+04	4,E+04
20	1,E+04	2,E+04	2,E+04
30	2,E+03	2,E+04	1,E+04
40	2,E+02	8,E+03	1,E+04
50	1,E+02	4,E+03	1,E+04
60	3,E+01	3,E+03	8,E+03

28 kHz, 45 kHz ve 100 kHz ultrasonik frekanslarda yapılan deneyler sonucunda *Klebsiella pneumoniae* için en uygun giderim 28 kHz frekansta olduğu belirlenmiştir.

3.2. Hidrojen peroksitin (H_2O_2) *Klebsiella pneumoniae* dezenfeksiyonu üzerindeki etkinliğinin incelenmesi

5mg/L, 10mg/L ve 20mg/L derişimlerde H_2O_2 ile gerçekleştirilen *Klebsiella pneumoniae* dezenfeksiyon çalışmalarının sonuçları Şekil 1’de verilmiştir.

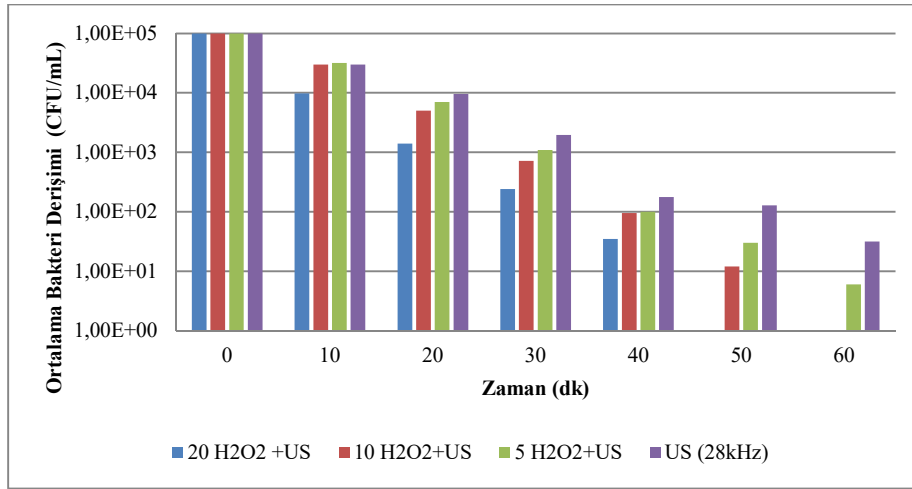


Şekil 1: Farklı H_2O_2 derişimlerinde ortalama bakteri derişiminde meydana gelen azalma

5mg/L, 10mg/L ve 20mg/L derişimlerde H₂O₂ ile çalışıldığında, *Klebsiella pneumoniae* üzerinde bu derişimlerin etkisinin olmadığı görülmüştür. En yüksek derişim olan 20mg/L H₂O₂ derişiminde %11.51 ya da 0.05 log giderim gerçekleştiği belirlenmiştir.

3.3. H₂O₂ ve US dezenfeksiyon çalışmalarının sonuçları

5mg/L, 10mg/L ve 20mg/L derişimlerde H₂O₂ ile ultrasonik dezenfeksiyon çalışmalarında en iyi bakteri inaktivasyonun gözlemlendiği 28 kHz ultrasonik frekansta gerçekleştirilen hibrit dezenfeksiyon çalışmalarının sonuçları Şekil 2’de verilmiştir.



Şekil 1: Farklı H₂O₂ derişimlerinde ultrasound ile gerçekleştirilen dezenfeksiyon çalışmalarında ortalama bakteri derişiminde meydana gelen azalma

US ve H₂O₂ birlikte uygulanan hibrit dezenfeksiyon çalışmalarında 28 kHz’ de gerçekleştirilen US dezenfeksiyon çalışmalarında 60 dakika hidrolik bekletme süresinde bakterilerin tamamı dezenfekte edilemezken en düşük H₂O₂ derişimi olan 5 mg/L H₂O₂+US çalışmalarından başlayarak H₂O₂ ve US’ un sinerjik bir etki gösterdiği gözlemlenmiştir. 20 mg/L H₂O₂+US işlemi ile 50 dk dezenfeksiyon süresince 5 log’ luk giderim gözlemlenmiştir. 10 mg/L H₂O₂+US işleminde 60 dk dezenfeksiyon süresi sonunda 5 log’luk bakteriyel inaktivasyon oranı gözlemlenmiştir. Ayrıca H₂O₂ ilave edilmesinin yalnızca ultrasound dezenfeksiyonundan çok daha kısa sürede mikroorganizma inaktivasyonu sağlandığı gözlemlenmiştir. Bu sayede *Klebsiella pneumonia* dezenfeksiyonu için kullanılan H₂O₂ miktarı azaltılmıştır.

4. Tartışma ve Öneriler

Ultrasonik sistemde farklı frekansların ve ilave edilen H₂O₂’nin mikroorganizma giderim performansına olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın içme ve kullanma suyu arıtımında önemli bir gelişme olacağı ve ulusal kazanımlar sağlayacağı açıktır. İçme ve kullanma suyunun ultrasound ile mikrobiyolojik olarak arıtılabileceği sonucuna varılmıştır. Ultrasonik sistemin tek başına değil hibrit olarak çalıştırılması ile çok daha yüksek verimlerde mikroorganizma inaktivasyonu önerilebilir. Yapılan çalışmalar küçük ölçekli (laboratuvar ortamında) gerçekleştirilmiş olup bu

çalışmaların pilot ölçekli ve daha büyük sistemlerde denenmesi bu çalışma sonucunda öneri olarak verilebilir. Ayrıca hedeflenen su ortamında bulunabilecek diğer mikroorganizmalar için ayrı çalışmalar ile ultrasound sisteminde test edilebilir.

Ek Bilgi:

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 1309F321 proje numaralı ve “Ultrasonik Sistemlerle Suda *Klebsiella Pneumoniae* Dezenfeksiyonuna Ortam İyonlarının Etkisi” başlıklı proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

- [1] Güler, Ç., Çobanoğlu, Z., Arıkan, N., Bunsuz, O., Yılmaz, H., Açıkgöz, B., Sakarya, S., Şentürk, Ş., Keçeci, M., Kale, Ş., *Çevre Sağlığı*, Bilimsel İncece Eğitim Toplantısı Uygulama Kitabı, 1995: p. 11.
- [2] Oğur, U.D.R., TEKBAŞ, Ö.F., Hasde, M., *Klorlama Rehberi (İçme ve Kullanma Sularının Klorlanması)*, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Ankara, 2004.
- [3] Frank, R., Spellman, D., 1999, Choosing Disinfection alternatives for Water and Wastewater Treatment, Technomic, U.S.A.
- [4] Mason, T.J., 1990, Chemistry with Ultrasound, Elsevier, England.
- [5] Joyce, E., Phull, J.P., Lorimer, J.P., Mason, T.J., The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured Bacillus species, Vol. 10, 315 – 318 (2003)
- [6] K.P. Jyothi, S.Y., E.P. Yesodharan, Ultrasound (US), Ultraviolet light (UV) and combination (US + UV) assisted semiconductor catalysed degradation of organic pollutants in water: Oscillation in the concentration of hydrogen peroxide formed in situ, Cochin University of Science and Technology, India, 2014(21): p. 1787-1796.
- [7] Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Lewis, G.D., Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria,
- [8] Gao, S., Hemar, Y., Ashokkumar, M., Paturel, S., Lewis, G.D., Inactivation of bacteria and yeast using high frequency ultrasound treatment, water research 60 (2014) 93 – 104.
- [9] Lakeh, A. B. B., Kloas, W., Jung, R., Ariav, R., Knopf, K., Low frequency ultrasound and UV-C for elimination of pathogens in recirculating aquaculture systems, Ultrasonics Sonochemistry 20 (2013) 1211–1216.