نشریه علمی «علوم و فناوری‌های پدافند نوین»
سال دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰؛ ص ۲۹۱- ۲۸۵

علمی- پژوهشی

بررسی اثر ضد میکروبی آب ازونیزه جهت رفع آلودگی محیطی

محمد ابراهیم مینایی[۱*]، محمد رضا اکبری[۲]، شاهین فریدفر[۳]

۱- استادیار، ۲ و ۳- پژوهشگر دانشگاه جامع امام حسین(ع)

(دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۷، پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۰)

چکیده

در این تحقیق، اثر ضد میکروبی آب ازونیزه در خودرو رفع آلودگی محیطی DSM2500-SK بررسی شد. به دنبال وقوع یک حمله بیولوژیک، رفع آلودگی سریع و به موقع موجب جلوگیری از گسترش آلودگی و کاهش دامنه آسیب خواهد شد. بر اساس استانداردهای موجود، اثر ضد میکروبی نسبت به آب ازونیزه خروجی از دستگاه بر روی باکتری‌هایی نظیر سودوموناس آئروژینوزا (باکتری محیطی)، استافیلوکوکوس اورئوس (باکتری گرم مثبت)، اشریشیا کولی (باکتری گرم منفی) و باسیلوس سوبتیلیس (باکتری اسپوردار) مورد بررسی قرار گرفت. میزان حساسیت باکتری‌ها با روش اصلاح شده میکرودایلوشن (Micro Dilution) و از طریق تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی آب ازونیزه تعیین و در مرحله بعدی غلظت آب ازونیزه موثر بر باکتری‌ها بررسی شد. افزایش دما، ناخالصی و pH باعث ناپایدار شدن آب ازونیزه می‌شود. نتایج به‌دست آمده نشان داد که حداقل رقت کشنده باکتری توسط ازون باقیمانده در آب با غلظت ppm ۳ برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس CFU/mL ۷/۵×۱۰^{۴}، برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا CFU/mL ۷/۵ ×۱۰^{۵}، برای باکتری اشریشیا کولی O۱۵۷ CFU/mL ۷/۵×۱۰^{۵} است و این محلول گندزدا بر روی اسپور باکتری‌ها تاثیر ندارد. در تعیین غلظت موثر آب ازونیزه بر باکتری مشخص شد که غلظت ۱۰۰ درصد آب ازونیزه خروجی از دستگاه قادر به گندزدایی است.

کلیدواژه‌ها: رفع آلودگی، اثر ضد میکروبی، آب ازونیزه

The Evaluation of Antimicrobial Effect of Ozonized Water for Environmental Decontamination

M. E. Minaei[*], M. R. Akbari, Sh. Faridfar
Imam Hossein University
(Received: 25/02/2021; Accepted: 12/10/2021)

Abstract

In this study, the antimicrobial effect of ozonized water was investigated in the DSM2500-SK environmental decontamination vehicle. Following a biological attack, rapid and timely decontamination would prevent the spread of contamination and reduce the extent of damage. The antimicrobial effect of ozonized water was investigated on some bacteria such as Pseudomonas aeruginosa (peripheral bacteria), Staphylococcus aureus (gram-positive bacteria), Escherichia coli (gram-negative bacteria) and Bacillus subtilis (spores), according to the existing standards. In the first step the sensitivity of bacteria was determined by the modified microdilution method by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of ozonized water and in the next step the concentration of the ozonized water affecting bacteria was investigated. Rising temperatures, impurities and pH cause the instability of ozonized water. The results showed that the minimum lethal dilution of bacteria by ozonized water at a concentration of 3 ppm was 7.5×104 for Staphylococcus aureus, 7.5×105 for Pseudomonas aeruginosa, and 7.5×105 CFU/mL for Escherichia coli O157 and this disinfectant solution has no effect on bacterial spores. For the determination of the effective concentration of ozonized water on bacteria, it was found that the outlet of 100% concentrated ozonized water is capable of disinfection.

Keywords: Environmental Decontamination, Antimicrobial Effect, Ozonized Water

[*] Corresponding Author E-mail: mminaii@ihu.ac.ir

۱- مقدمه

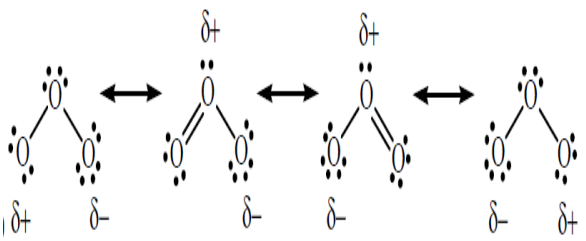
انتخاب ماده ضدعفونی کننده و گندزدای مناسب و به‌کارگیری روش‌های استاندارد گندزدایی می‌تواند در کاهش عفونت‌های ویروسی و باکتریایی در محیط نقش موثری داشته باشد. مواردی مبنی بر استفاده از ضد عفونی کننده‌ها و گندزداهای نامناسب و یا غلظت‌های نامناسب و حتی گران قیمت نیز وجود دارد که اهمیت، به کارگیری شیوه‌های موثر در جهت ضدعفونی و گندزدایی کردن وسایل و محیط بیش از پیش روشن می‌گردد [۱ و ۲].

خودرو رفع آلودگی محیطی DSM2500-SK سامانه‌ای بهینه شده برای استفاده در عملیات رفع آلودگی بیولوژیک، نظیر ویروس کرونا است و مجهز به سامانه تولید ازون (با استفاده از روش پلاسمای سرد) شده است. می‌توان از آب ازونیزه برای جایگزینی مواد کلردار به عنوان سیستم گندزدایی و ضدعفونی کننده سطوح و اجسام استفاده کرد. ازون تولید شده با سازوکار خاصی در آب تزریق و قادر است در سر نازل ازون با غلظت ۳ تا ۵ میلی‌گرم در لیتر تهیه و برای گندزدایی و رفع آلودگی سطوح محیطی مورد استفاده قرار گیرد. از ویژگی‌های این خودرو رفع آلودگی این است که در شرایط بحران، تامین مواد رفع آلودگی در مقیاس وسیع یک محدودیت است و این دستگاه بدون نیاز به تامین مواد اولیه می‌تواند عوامل بیولوژیک را در زمان تماس کوتاه از بین ببرد.

مهمترین و موثرترین روش رفع آلودگی پس از استفاده از عوامل بیولوژیک و یا حتی عوامل شیمیایی، اقدام به رفع آلودگی در همان لحظات اولیه پس از انتشار این عوامل است. لازم است در مناطقی که مردم حضور دارند از ساختمان‌ها و تجهیزات موجود در آنجا نیز رفع آلودگی صورت پذیرد تا عوامل باقی مانده در محیط به حداقل رسیده و از انتشار آن به دیگران جلوگیری به‌عمل آید.

در خصوص رفع آلودگی ذکر این نکته ضروری است که از بین بردن کلیه میکروارگانیسم‌های یک جسم یا بافت زنده امکان‌پذیر نیست. بنابراین معمولاً هدف از رفع آلودگی محیطی، از بین بردن عوامل بیماری‌زا یا کاهش تعداد آنها تا حدامکان می‌باشد [۳].

ازون یک آلوتروپی از اکسیژن است که در دمای اطاق به رنگ آبی و گازی انفجاری است که می‌تواند تابش ماوراء بنفش را در۲۹۰- ۲۲۰ نانو متر جذب کند. حلالیت ازون در محلول آبی ۱۴ میلی مول بر لیتر در دمای ۲۰ درجه سیلسیوس است. ساختار رزونانسی آن در شکل زیر نشان داده شده است.



شکل ۱. حالت‌های مختلف الکترونی ازون

در سال ۱۹۹۷ ازون از سوی اداره غذا و داروی آمریکا (FDA)، در گروه مواد عمومی بی خطر (GRAS[1]) قرار گرفت و در ۲۶ ژوئن سال ۲۰۰۱ کاربرد آن به عنوان یک ماده ضد باکتریایی جهت استفاده در صنایع غذایی به تصویب رسید [۴ و ۵].

ازون، یک اکسیدکننده پروتوپلاسم است. آقای Komanapalli و همکاران [۶] معتقدند گروه‌های سولفیدریل در غشاء باکتری اولین هدفی هستند که مورد تهاجم واقع می‌شوند. بنابرنظر Bablon [۷]، ازون بر روی گروه‌های سولفیدریل از اسیدآمینه های موجود در پروتئین‌های باکتری نیز تأثیر گذاشته و موجب اختلال در فعالیت‌های آنزیمی سلول می‌شود. ازون، یک گاز ناپایدار است که در شرایط اتمسفر طبیعی، نقطه جوش در حدود منهای ۱۱۲ درجه سانتیگراد دارد. وزن ملکولی ازون ۴۸ است. ازون، قدرت حلالیت نسبتا خوبی در آب دارد. این قدرت حلالیت به سهولت در غلظت‌هایی به میزان ۰/۰۱ تا ۰/۰۵ واحد در میلیون واحد (۰/۰۱ تا ۰/۰۵ ppm) و بالاترحاصل می‌شود. ازون در هوا بویژه در هوای سرد و خشک پایدارتر است. برای جبران نمودن نقیصه فوق باید از سیستم های گران قیمت و به چرخش درآورنده و در تماس قراردهنده استفاده شود. علیرغم محدودیت‌ها و مشکلات فوق، توجه روز افزونی به کاربرد ازون برای غیرفعال سازی عوامل بیماریزای سطوح از طریق تولید گاز ازون در هوا و نابودی باکتری ای استافیلوکوک سالیواریوس [۸]، استافیلوکوک اپیدرمیدیس [۹]، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کولی [۱۰] توسط ازون معطوف شده است. رفتار ازون در آب و هوا با یکدیگر متفاوت است. خاصیت اکسیدکنندگی بالای ازون در آب، با واسطه رادیکال های مختلفی است که اصلی‌ترین آنها رادیکال آزاد هیدروکسیل است که از خود ازون نیز فعال‌تر است [۱۱]. قابلیت بالای اکسیدکنندگی ازون، نشات گرفته از این رادیکال‌هاست [۱۲] که موجب ایجاد حالت میکروب کشی قوی ازون می‌گردد. هر چند Facile و همکاران [۱۳] در مقابل معتقدند که در زمان حضور هر دو ترکیب ازون مولکولی و رادیکال های هیدروکسیل، ازون مولکولی به عنوان عامل غالب اکسیدکننده است. رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل، عمر کوتاهی دارند بنابراین نیمه عمر ازون در آب به دلیل تشکیل این ترکیب و واکنش ازون با سایر اجزای آب به مراتب کمتر از هواست [۱۴].

گاز ازون (O3) یک عامل اکسیدکننده قوی است که به‌طور وسیعی برای ضدعفونی و اکسیداسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد. ازون در بسیاری از صنایع نظیر مواد غذایی (ماده ضد میکروبی برای گوشت، مرغ و افزایش عمر میوه و سبزیجات)، تجهیزات بهداشتی، استفاده مجدد از پساب و ... کاربرد دارد [۱۵ و ۱۶].

تجزیه ازون در محلول آبی پیچیده است و به فاکتورهای مانند pH، دما و حضور مواد دیگر وابسته است. حلالیت ازون تابع دما

[1] Generally Recognized As Safe

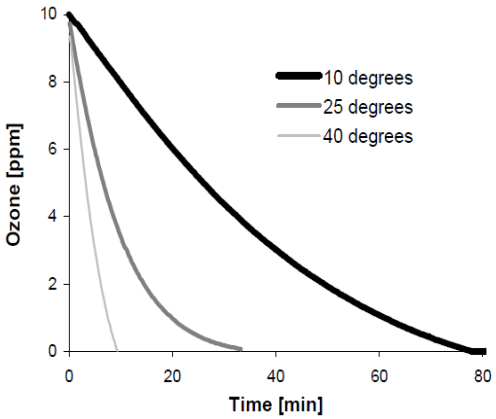
است در جدول (۱) حلالیت در دماهای مختلف آورده شده است. در این جدول مشخص است که بیشینه حلالیت در دمای ۳۰ °C، ۴۰۰ ppm است.

جدول ۱. حلالیت ازون در آب نسبت به دماهای مختلف

دما (°C)	حلالیت ($Kg.m^{-3}$)
۰	۱/۰۹
۱۰	۰/۷۸
۲۰	۰/۵۷
۳۰	۰/۴۰
۴۰	۰/۲۷
۵۰	۰/۱۹
۶۰	۰/۱۴

نیمه عمر ازون یعنی زمانی که غلظت آن به نصف غلظت اولیه می‌رسد. این مقدار تابع دما و pH محیط است. نیمه عمر ازون در آب نسبت به واکنش ازون با سایر اجزای آب به مراتب کمتر از هواست و در دمای ۳۵ °C مدت ۸ دقیقه و برای ۱۵ °C مدت زمان ۳۰ دقیقه گزارش شده است [۱۷].

پایداری ازون حل شده متاثر از دما، سرعت هم زدن محلول، pH، نور ماوراء بنفش، غلظت ازون، غلظت مهار کننده رادیکالی است. ازون در حضور مهار کننده رادیکالی و در دمای پایین پایداری بیشتری دارد. دمای بالا باعث سرعت تجزیه ازون می‌شود به عنوان مثال تاثیر تغییر دما از ۱۰ به ۴۰ درجه سلسیوس در شکل (۲) مصور شده است [۱۷ و ۱۸].



شکل ۲. نیمه عمر ازون در دماهای متفاوت و زمان‌های مختلف

همزدن و افزایش قدرت یونی محلول (قدرت یونی به نمک های حل شده در آب وابسته است) باعث می‌شود سرعت تجزیه ازون افزایش یابد از طرف دیگر هرچه سرعت همزدن بیشتر باشد سرعت تفیک افزایش می‌یابد. برخی از ترکیبات با گرفتن رادیکال OH و تبدیل آن به پراکسید هیدروژن باعث کاهش سرعت تجزیه می‌شود و از طرفی وجود مواد احیا شونده باعث افزایش سرعت تجزیه خواهند شد [۱۹ و ۲۰].

ازون هم به شکل گاز و هم به صورت محلول در آب (آب ازونیزه) خاصیت ضد میکروبی دارد [۱، ۲۱، ۲۲]. آقای Megahed و همکاران گزارش کردند که بار باکتریایی عوامل بیماری‌زا موجود در کود گاوی که در معرض آب ازونیزه قرار گرفته است، به شدت کاهش یافته است [۲۳]. در مطالعه انجام شده توسط Bialoszewski و همکاران، آب ازونیزه قادر به از بین بردن میکروارگانیسم های موجود در یک سوسپانسیون با رقت $1/5-0/5\times10^{8}$ CFU/mL تا ۹ برابر (۳/۶-۱/۲ ppm) بود [۲۴]. از سوی دیگر، استفاده از آب ازونیزه (۰/۴ و ۰/۸ ppm) در برابر E. coli با رقت 3×10^{4} CFU/mL برای ضد عفونی دست‌ها موثر بود [۲۵ و ۲۶]. روش ضدعفونی دست با آب ازونیزه ساده، ارزان و بدون زباله و باقیمانده است و آب ازونیزه می‌تواند جایگزینی برای ضدعفونی کننده‌های مایع سنتی با الکل باشد. آقای Appelgrein و همکاران نشان دادند خاصیت ضد میکروبی ازن در مقایسه با مالش دست‌های مبتنی بر پروپانولول پایین‌تر است [۲۷]. آنها در مطالعه خود با ازن ۰/۴ ppm و از غلظت کمتر الکل (٪ ۶۰) استفاده کردند، اما مقدار آن دو برابر (۳+۳ mL) و زمان قرار گرفتن در معرض طولانی‌تر (۳ دقیقه) و همچنین روی یکی از دست‌ها بود. آقای Isosu و همکاران آب ازونیزه همراه با بنزالکونیوم کلرید و الکل را جایگزین موثری برای روشهای سنتی شستشوی جراحی دانستند [۲۸]. در مطالعه دیگری، آقای Nakamura و همکاران دریافتند که با شستن دست‌ها با آب ازونیزه و یا صابون ضد میکروبی و آب کاهش ۱۰۰۰ برابری میکروب‌ها بدست آمد [۲۹].

آقای Romanovski و همکاران نشان دادند که ازون در مقایسه با هیپوکلریت سدیم یا کلسیم با ۱۵۰ تا ۲۵۰ mg/L کلر فعال، باعث خوردگی کمتری می‌شود. هیپوکلریت یا سایر ترکیبات حاوی کلر پس از گندزدایی سطحی موجب خوردگی می‌شوند. همچنین نشان دادند که ازون نسبت به هیپوکلریت سدیم یا کلسیم کمترین تأثیر منفی را بر سلامت انسان، اکوسیستم ها و منابع دارد. هیپوکلریت کلسیم بالاترین تأثیر منفی بر محیط را نشان داد. این مطالعه نشان می‌دهد که گندزدایی سطحی با ازون در مقایسه با هیپوکلریت از نظر خوردگی، اقتصادی و زیست محیطی برتری دارد [۳۰]. آب ازونیزه سازگاری زیستی بالاتری نسبت به سایر مواد رفع آلودگی کننده نظیر هیپوکلریت سدیم دارد [۲۵].

بررسی احتمال اثرات سمیت سلولی آب ازونیزه روی رده سلولی پستانداران نشان داد که سلول‌های پستانداران دارای سیستم‌های آنتی اکسیدانی پیچیده‌ای هستند که اجازه نمی‌دهد آب ازونیزه روی غشای سیتوپلاسمی اثر کند و در برابر سایر خواص اکسید کننده ازون مقاومت می‌کند، حتی زمانی که گاز

ازون در آب یا روغن حل شده باشد. علاوه بر این، به نظر می‌رسد که ازون این سلول‌ها را تحریک می‌کند تا سایر واکنش‌های بیوشیمیایی را در میتوکندری انجام دهند. این اندامک آدنوزین تری فسفات (ATP) را به‌عنوان پاسخی به رادیکال‌های آزاد تولید می‌کند و این مولکول انرژی، با توجه به این که از آن به‌عنوان یک بهبود فیزیولوژیکی برای سلول‌ها استفاده می‌شود، زنده ماندن سلول‌ها را بهبود می‌بخشد [۳۱ و ۳۲].

غلظت‌های نسبتاً کم ازون محلول در آب و زمان تماس کوتاه برای غیرفعال کردن سوسپانسیون میکروبی کافی است و زمان ۱ دقیقه در معرض ازون در بافر سدیم تیوسولفات برای کاهش غلظت‌های مختلف میکروبی تلقیح شده موثر است [۳۵- ۳۳].

۲- روش تحقیق

در حال حاضر، در اروپا و حتی در سایر نقاط جهان هماهنگی لازم در خصوص ارزیابی و آزمایش گندزداها و ضد عفونی کننده‌ها وجود ندارد و از روش‌های بسیار متفاوت برای ارزیابی استفاده می‌شود. در این مطالعه، مطابق استانداردهای موجود، اثر ضدمیکروبی نسبت به آب ازونیزه خروجی از دستگاه بر روی باکتری‌هایی نظیر سودوموناس آئروژینوزا (باکتری محیطی)، استافیلوکوکوس اورئوس (باکتری گرم مثبت)، اشریشیا کولی (باکتری گرم منفی) و باسیلوس سوبتیلیس (باکتری اسپوردار) مورد بررسی قرار گرفت. میزان حساسیت باکتری‌ها با روش اصلاح شده میکرودایلوشن[1] توصیه شده توسط NCCLS[2] (کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاهی بالینی در وین که استانداردهای عملکرد برای آزمون حساسیت ضد میکروبی مواد و محلول‌های ضد عفونی و گندزدا را بر اساس دستورالعمل‌هایی با نتایج قابل اعتماد و قابل تکرار تعیین می‌کند) و از طریق تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی MIC[3] و حداقل غلظت کشندگی MBC[4] ماده ضد میکروبی (آب ازونیزه) تعیین گردید. در مرحله بعدی غلظت ماده گندزدا (آب ازونیزه) موثر بر باکتری‌ها بررسی شد [۳۴].

* ارگانیسم‌های مورد مطالعه به شرح زیر بوده است:

سودوموناس آئروژینوزا (PTCC ۲۷۸۵۳)، استافیلوکوکوس اورئوس: MRSA (ATCC ۲۵۹۲۳)، اشریشیا کولی O۱۵۷ (سویه جداشده از بیمار و تشخیص با روش‌های بیوشیمیایی و PCR و آنتی‌سرم اختصاصی) و باسیلوس سوبتیلیس (PTCC ۱۰۱۵).

محیط های کشت: جهت کشت باکتری‌ها از محیط مولر هینتون آگار و مولر هینتون براث pH= ۷/۴ در دمای آزمایشگاه

محلول ضدعفونی کننده: ازون باقی‌مانده در آب با غلظت ppm ۳ گرفته شده از خروجی دستگاه

طریقه تهیه دانسیته باکتری‌ها: تعداد چند کلنی تک باکتری (۵-۳ کلنی) توسط سوآب استریل از یک پلیت حاوی کشت تازه باکتری انتخاب شدند. کلنی‌ها به یک لوله محتوی ۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی منتقل و به‌صورت سوسپانسیون درآمدند. هنگام حل شدن کلنی‌ها داخل سرم فیزیولوژی کدورت ایجاد می‌شود که با روش کدورت استاندارد نیم مک فارلند و شمارش باکتری‌ها روی لام نئوبار دانسیته باکتری‌ها تعیین شد. بر این اساس ۱ میلی لیتر از سرم فیزیولوژی تهیه شده دارای $1/5\times10^{8}$ CFU/mL باکتری است.

تهیه رقت‌های باکتری: جهت تهیه سوسپانسیون‌های میکروبی از روش استاندارد مک فارلند استفاده شد. سوسپانسیون‌های مورد استفاده با غلظت نیم درصد مک فارلند درلوله‌های در بسته و استاندارد با تراکم باکتریایی $1/5\times10^{8}$ تهیه گردید. ابتدا ۷ لوله اپندورف ۲ mL استریل، شماره‌گذاری شد و با سمپلر ۱ mL محیط کشت مولر هیتون براث به تمام لوله‌ها منتقل شد. سپس از سوسپانسیون باکتری تهیه شده $1/5\times10^{8}$ CFU/mL باکتری، مقدار ۱ mL به لوله شماره ۱ اضافه شد. از لوله شماره ۱ تا ۷ سریال رقت تهیه شد. به تمام لوله‌ها مقدار ۱ mL آب ازونیزه تازه اضافه شد. از آنجا که هم حجم محیط کشت، آب ازونیزه اضافه شده است در نتیجه، لوله شماره ۱ دارای حدود $7/5\times10^{7}$ CFU/mL باکتری است. در لوله‌های شماره ۱ تا ۷ به‌ترتیب $7/5\times10^{7}$، $7/5\times10^{6}$، $7/5\times10^{5}$، $7/5\times10^{4}$، $7/5\times10^{3}$، $7/5\times10^{2}$ و ۷۵ CFU/mL باکتری وجود دارد.

اصلاح روش: از آنجا که ممکن است ازون محلول در آب با محیط کشت مایع واکنش داشته باشد و اثر میکروب کشی آن از بین برود، روش کار اصلاح شد و با سانتریفوژ کردن، باکتری‌ها در ته میکروتیوب جمع‌آوری شدند. سپس به تمام لوله‌ها مقدار ۱ mL آب ازونیزه تازه اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه مخلوط محیط کشت دارای باکتری و محلول آب ازونیزه در تماس بودند. در کنار این مجموعه یک لوله به‌عنوان کنترل لحاظ گردید.

تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری: پس از مدت ۲۰ دقیقه، مقدار ۱۰۰ µL از لوله‌های شماره ۱ تا ۷ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت مجدد شد (به‌صورت چمنی) و به مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ نگهداری شد. عدم رشد یا رشد کمتر از ۱۵ کلنی در هر رقت به عنوان حداقل رقت کشنده باکتری (MBC) در نظر گرفته می‌شود.

تعیین غلظت موثر آب ازونیزه بر باکتری: پس از تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری، این بار تاثیر غلظت‌های مختلف آب ازونیزه بررسی شد. برای این منظور، تعداد ۴ لوله اپندورف ۲ mL استریل، شماره گذاری شد و ۱ mL محیط کشت مولر هیتون براث

[1] Micro Dilution
[2] National Clinical Committee Laboratory Standards
[3] Minimum Inhibitory Concentration
[4] Minimum Bactericidal Concentration

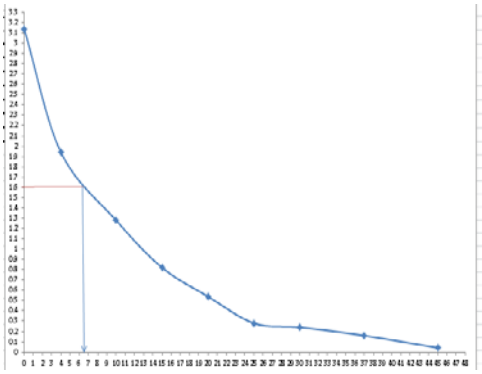
در شرایط استریل به تمام لوله‌ها منتقل شد. سپس از سوسپانسیون باکتری تهیه شده با حداقل غلظت کشندگی، مقدار ۱ mL به لوله شماره ۱ تا ۴ اضافه شد. پس از سانتریفوژ کردن لوله‌ها، باکتری در ته لوله جمع‌آوری شد. به این لوله‌ها آب ازونیزه اضافه شد به صورتی که غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ درصد به‌وجود آمد. برای هم حجم شدن لوله‌ها از محلول آب ازونیزه که ۲۴ ساعت نگهداری شده استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

اندازه‌گیری نیم عمر ازون در آب: پایداری محلول تولید شده توسط سیستم ازون ساز به طور تجربی مورد بررسی قرار گرفت بدین ترتیب که در زمان‌های مختلف غلظت ازون اندازه‌گیری شد. در نهایت نمودار غلظت در برابر زمان ترسیم و از آن نیمه عمر محاسبه گردید. این آزمایش با غلظت اولیه متفاوت چندین بار تکرار شد. داده‌ها و نمودار یکی از نمونه در شکل (۲) آورده شده است. از این نمودار مشخص می‌شود که در دمای $31^{\circ}C$ نیمه عمر آن تقریبا ۶/۵ دقیقه است. (متوسط چند آزمایش متفاوت)

جدول ۲. نیمه عمر ازون در آب بر حسب غلظت

غلظت (ppm)	زمان (دقیقه)
۳/۱۴	۰
۱/۹۴	۴
۱/۲۸	۱۰
۰/۸۲	۱۵
۰/۵۴	۲۰
۰/۲۸	۲۵
۰/۲۴	۳۰
۰/۱۶	۳۷
۰/۰۴	۴۵

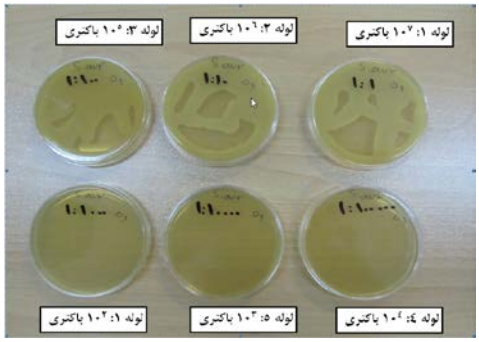


شکل ۲. نیمه عمر آب ازونیزه در زمان‌های مختلف

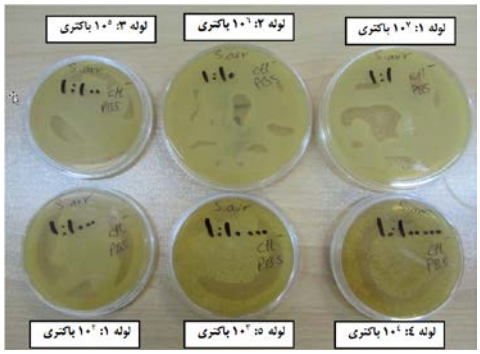
اثر ضد میکروبی آب ازونیزه (با غلظت ppm ۳) بر روی باکتری‌های مورد آزمایش به‌صورت زیر است:

الف- باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

در تعیین MBC، سوسپانسیون باکتری تهیه شده بر اساس نیم مک فارلند تعداد $1/5\times10^{8}$ CFU/mL باکتری بود که در لوله‌ها تیتر شد و لوله شماره ۱ دارای حدود $7/5\times10^{7}$ CFU/mL باکتری است. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده می‌شود که از لوله شماره ۴ به بعد باکتری روی محیط کشت رشد نکرده است، بنابراین حداکثر تعداد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس که می‌تواند توسط آب ازونیزه با غلظت ppm ۳ به‌طور کامل گندزدایی شود، $7/5\times10^{4}$ CFU/mL است (شکل‌های ۳ و ۴).



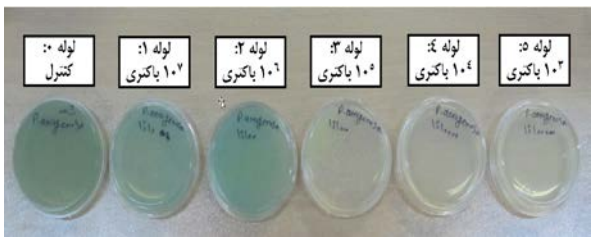
شکل ۳. اثر میکروب‌کشی آب ازونیزه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در رقت‌های مختلف



شکل ۴. کنترل منفی اثر میکروب‌کشی آب ازونیزه بر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در رقت‌های مختلف

ب- باکتری سودوموناس آئروژینوزا

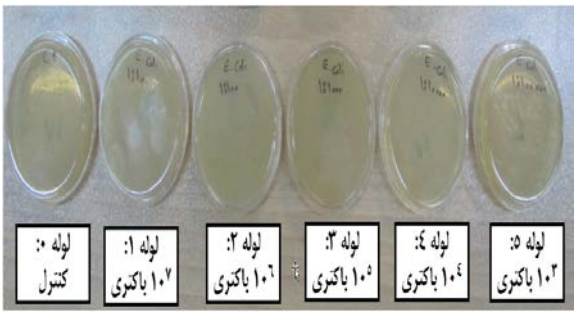
در تعیین MBC، سوسپانسیون باکتری تهیه شده بر اساس نیم مک فارلند تعداد $1/5\times10^{8}$ CFU/mL باکتری بود که در لوله‌ها تیتر شد و لوله شماره ۱ دارای حدود $7/5\times10^{7}$ CFU/mL باکتری است. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده می‌شود که در پلیت‌هایی که باکتری رشد کرده رنگدانه سبز رنگ وجود دارد و از لوله شماره ۳ به بعد باکتری روی محیط کشت رشد نکرده است، بنابراین حداکثر تعداد باکتری سودوموناس آئروژینوزا که می‌تواند توسط آب ازونیزه با غلظت ppm ۳ به‌طور کامل گندزدایی شود، $7/5\times10^{5}$ CFU/mL است (شکل ۵).



شکل ۵. اثر میکروب کشی آب ازونیزه بر باکتری سودوموناس آئروژینوزا در رقت‌های مختلف. در پلیت هایی که باکتری رشد کرده رنگدانه سبز رنگ مشاهده می‌شود.

ج- باکتری اشریشیا کولی O157

در تعیین MBC، سوسپانسیون باکتری تهیه شده بر اساس نیم مک فارلند تعداد $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/mL باکتری بود که در لوله‌ها تیتر شد و لوله شماره ۱ دارای حدود $۷/۵\times۱۰^{۷}$ CFU/mL باکتری است. با توجه به نتایج به‌دست آمده مشاهده می‌شود که از لوله شماره ۳ به بعد باکتری روی محیط کشت رشد نکرده است، بنابراین حداکثر تعداد باکتری اشریشیا کولی O157 که می‌تواند توسط آب ازونیزه با غلظت ppm ۳ به‌طور کامل گندزدایی شود، $۷/۵\times۱۰^{۵}$ CFU/mL است (شکل ۶).



شکل ۶. اثر میکروب‌کشی آب ازونیزه بر باکتری اشریشیا کولی O۱۵۷ در رقت‌های مختلف

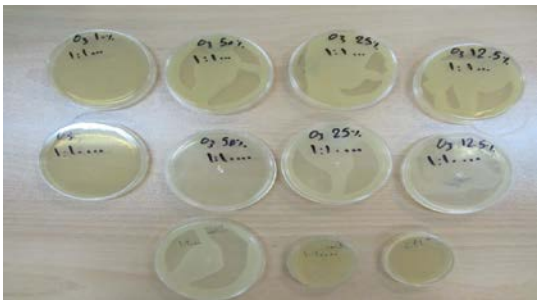
د- باکتری باسیلوس سوبتیلیس

باکتری باسیلوس سوبتیلیس دارای اسپور است که شکل مقاوم باکتری است. مطابق سایر باکتری ها، روش تعیین MBC برای رقت های مختلف باکتری انجام شد. نتایج نشان می‌دهد که محلول آب ازونیزه با غلظت ppm ۳ نمی‌تواند اسپور باکتری را از بین ببرد (شکل ۷).

شکل ۷. اثر میکروب کشی آب ازونیزه بر باکتری اسپوردار باسیلوس سوبتیلیس در رقت‌های مختلف

ه- تعیین غلظت موثر آب ازونیزه بر باکتری

با تعیین حداقل غلظت کشندگی باکتری که $۱۰^{۴}$ CFU/mL و $۱۰^{۵}$ بود، تاثیر غلظت‌های مختلف آب ازونیزه بر روی این تعداد باکتری بررسی شد. نتایج نشان می‌دهد که با غلظت ۱۰۰٪ آب ازونیزه خروجی از دستگاه قادر به گندزدایی کامل است (شکل ۸).



شکل ۸. اثر غلظت های مختلف آب ازونیزه ۱۰۰، ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵ درصد بر باکتری‌ها

۴- نتیجه‌گیری

ازون گازی که پایداری آن در آب شدیدا به دما و خلوص آب و pH وابسته است. افزایش دما، ناخالصی و pH باعث ناپایدار شدن آن می‌شود. نتیجه به‌دست آمده از این مطالعه نشان داد که حداقل رقت کشنده باکتری (MBC) توسط ازون باقی‌مانده در آب با غلظت ۳ ppm برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس CFU/mL $۷/۵\times۱۰^{۴}$، برای باکتری سودوموناس آئروژینوزا CFU/mL $۷/۵\times۱۰^{۵}$، برای باکتری اشریشیا کولی CFU/mL O157 $۷/۵\times۱۰^{۵}$ است و این محلول گندزدا بر روی اسپور باکتری‌ها تاثیر ندارد. در تعیین غلظت موثر آب ازونیزه بر باکتری مشخص شد که غلظت ۱۰۰٪ آب ازونیزه خروجی از دستگاه قادر به گندزدایی است. به‌طور کلی، هدف از رفع آلودگی محیطی، از بین بردن عوامل بیماری‌زا یا کاهش تعداد آنها تا حدامکان می‌باشد. در نتیجه، آب ازونیزه قادر به کاهش باکتری‌ها در محیط می‌شود ولی با توجه به میزان اثر بر باکتری‌ها به‌عنوان یک محلول گندزدا در سطح متوسط لحاظ می‌شود. بر اساس نتایج این تحقیق، آب ازونیزه یک گندزدا برای رفع آلودگی سطوح است و می‌تواند در بسیاری از دستگاه‌های پاشش موجود مفید باشد.

۵- مرجع‌ها

[1] Mascarenhas, L. A.; Oliveira, F. O.; da Silva, E. S.; dos Santos, L.M.; de Alencar Pereira Rodrigues, L.; Neves, P. R.; Santos, A. Á.; Moreira, G. A.; Lobato, G. M.; Nascimento, C. “Technological Advances in Ozone and Ozonized Water Spray Disinfection Devices”; Appl. Sci. 2021, 11, 3081.

[2] Rutala, W. A.; Weber, D. J. “Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee”; Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2008.

[3] Moore, G.; Griffith, C.; Peters, A. “Bactericidal Properties of Ozone and its Potential Application as a Terminal Disinfectant”; J. Food. Prot. 2000, 63, 6-1100.

[4] US FDA, “Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption”; Federal Register 2001, 66, 33829-33830.

[5] Rip, G. R.; Dee, M. G. “Certification of Ozone in USA Food Industries Rice”; International Consulting Enterprises.

[6] Komanapalli, I. R.; Mudd, J. B.; Lau, B. H. “The Effects of Ozone on the Metabolic Activities of Scherichia Coli K-12”; Toxicol. Lett. 1997, 90, 61-6.

[7] Bablon, M. E. “Fundamental Aspects, Practical Application of Ozone”. In: Langlais, B.; Reckhow, D. A.; Brink, D. R., eds. “Ozone in Water Treatment: Application and Engineering”; American Water Works Association Research Foundation Denver Co, 1991, 311-316.

[8] Elford, W. J.; Eude, J. V. “An Investigation of the Merits of Ozone as an Aerial Disinfectant”; J. Hyg. 1942, 42, 240-65.

[9] Heindel, T. H.; Streib, R.; Botzenhart, K. “Effect of Ozone on Airborne Microorganisms”; Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 1993, 194, 464-80.

[10] Kowalski, W. J.; Bahnfleth, W. P.; Whittam, T. S. “Bactericidal Effects of High Airborne Ozone Concentrations on Escherichia Coli and Staphylococcus Aureus”; Ozone Sci. Eng. 1998, 20, 205-21.

[11] Nickols, D,; Varas, A. J.; “Ozonation”; In: Bryant, E. A.; Fulton, G. P.; Budd, G. C.; eds. “Disinfection Alternatives for Safe Drinking Water”; New York: Van Nostrand Reinhod. 1992, 196-258.

[12] Rice, R. G.; “Application of Ozone for Industrial Wastewater Treatment”; Ozone Sci. Eng. 1997, 18, 477-515.

[13] Facile, N.; Barbeau, B.; Prevost, M.; Koudjonou, B. “Evaluating Bacterial Aerobic Spores as a Surrogate for Giardia and Cryptosporidium Inactivation by Ozone”; Water Res. 2000, 34, 3238-46.

[14] Martínez-Sánchez, G. “Ozonized Water, Background, General Use in Medicine and Preclinic Support”; Ozone Therapy Glob. J. 2019, 9, 33–60.

[15] Food and Drug Administration (FDA), Department of Health and Human Services. “Secondary Direct Food Additives Permitted in Food for Human Consumption”; 2011, 21, 173.

[16] Pascual, A.; Lorca, I.; Canut, A. “Use of Ozone in Food Industries for Reducing the Environmental Impact of Cleaning and Disinfection Activities”; Trend Food Sci. Technol. 2007, 18, 29-35.

[17] https://www.lenntech.com/library/ozone/decomposition/ozone-decomposition.htm#ixzz6Sj86A7XO

[18] Eriksson, M. “Ozone Chemistry in Aqueous Solution – Ozone Decomposition and Stabilization”; Licentiate Thesis, Department of Chemistry, Royal Institute of Technology, Stockholm, Sweden, 2004.

[19] Sotelo, J. L.; Beltran, F. J.; Benitez, F. J.; Beltran-Heredia, J. “Ozone Decomposition in Water: Kinetic Study”; Ind. Eng. Chem. Res. 1987, 26, 39-43.

[20] Hahn, J.; Lachmann, G.; Pienaar, J. J. “Kinetics and Simulation of the Decomposition of Ozone in Acidic Aqueous Solutions”; S. Afr. J. Chem. 2000, 53, 132-138.

[21] De Alba, A. M.; Rubio, M.; Morán-Diez, M.; Bernabéu, C.; Hermosa, R.; Monte, E. “Microbiological Evaluation of the Disinfecting Potential of UV-C and UV-C Plus Ozone Generating Robots”; Microorgan. 2021, 9, 172.

[22] Gorito, A. M.; Pesqueira, J. F.; Moreira, N. F.; Ribeiro, A. R.; Pereira, M. F.; Nunes, O. C.; Almeida, C. M.; Silva, A. M. “Ozone-Based Water Treatment (O3, O3/Uv, O3/H2O2) for Removal of Organic Micropollutants, Bacteria Inactivation and Regrowth Prevention”; J. Environ. Chem. Eng. 2021, 9, 105315.

[23] Megahed, A.; Aldridge, B.; Lowe, J. “The Microbial Killing Capacity of Aqueous and Gaseous Ozone on Different Surfaces Contaminated with Dairy Cattle Manure”; PLOS ONE 2018, 13, e0196555.

[24] Białoszewski, D.; Bocian, E.; Bukowska, B.; Czajkowska, M.; Sokół-Leszczy´nska, B.; Tyski, S. “Antimicrobial activity of ozonated water”; Med. Sci. Monit. 2010, 16, 71–75.

[25] Breidablik, H.; Lysebo, D.; Johannessen, L.; Skare, Å.; Andersen, J.; Kleiven, O. “Ozonized Water as an Alternative to Alcohol-based Hand Disinfection”; J. Hosp. Infect. 2019, 102, 419–424.

[26] World Health Organization. Who Guidelines on Hand Hygiene in Health Care: First Global Patient Safety Challenge: Clean Care is Safer Care; WHO: Geneva, Switzerland, 2010.

[27] Appelgrein, C.; Hosgood, G.; Dunn, A. L.; Schaaf, O. “Ozonated Water is Inferior to Propanol-based Hand Rubs for Disinfecting Hands”; J. Hosp. Infect. 2016, 92, 3-340.

[28] Isosu, T.; Kan, K.; Hayashi, T.; Fujii, M. “The Effectiveness of Ozonated Water for Hand Washing Before Surgery”; Japanese Journal of Anesthesiology 2001, 50, 672-675.

[29] Nakamura, K.; Saito, K.; Kashiwazaki, J.; Aoyagi, T.; Arai, K.; Hara, Y. “Evaluation of Ozonized Water Using ASTM E1174 for Standardized Testing of Handwash Formulations for Healthcare Personnel”; J. Hosp. Infect. 2018, 100, 211-213.

[30] Romanovski, V.; Claesson, P. M.; Hedberg, Y. S. “Comparison of Different Surface Disinfection Treatments of Drinking Water Facilities from a Corrosion and Environmental Perspective”; Environ. Sci. & Pollut. Res. 2020, 27, 12704-12716.

[31] Tonus, S. S.; O˘guzkan, S. B.; U˘gra¸s, H. I.; Kıılıç, I. H. “Determining the Cytotoxic Effect Potential of Ozonated Hazelnut Oil”; Ozone Ther. 2018, 3.

[32] Nogales, C. G.; Ferreira, M. B.; Montemor, A. F.; Rodrigues, M. F. D. A.; Lage-Marques, J. L.; Antoniazzi, J. H. “Ozone Therapy as an Adjuvant for Endondontic Protocols: Microbiological—Ex Vivo Study and Citotoxicity Analyses”; J. Appl. Oral Sci. 2016, 24, 607–613.

[33] Shin, G. A.; Sobsey, M. D. “Reduction of Norwalk Virus, Poliovirus, and Bacteriophage MS2 by Ozone Disinfection of Water”; Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 3975-3978.

[34] Kim, J. G.; Yousef, A. E.; Khadre, M. A. “Ozone and Its Current and Future Application in the Food Industry”; Adv. Food Nutr. Res. 2003, 45, 167–218.

[35] Dos Santos, L. M.; da Silva, E. S.; Oliveira, F. O.; de Alencar Pereira Rodrigues, L.; Neves, P. R.; Meira, C. S. “Ozonized Water in Microbial Control: Analysis of the Stability, In Vitro Biocidal Potential, and Cytotoxicity”; Biology 2021, 10, 525.

[36] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 30th ed. CLSI Supplement M100 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2020.