

MİKRODALGANIN MAYA HÜCRELERİNİN CANLILIĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Meltem ÇELİKDEMİR¹, Serap GEDİKLİ¹, Pınar AYTAR¹, Gökhan GÜNGÖRMEDİ¹, Ahmet ÇABUK²

ÖZET : Bu çalışmada, *Geotrichum candidum* ve *Candida albicans* hücre süspansiyonları mikrodalgaya maruz bırakılmıştır. Farklı maruz kalma süresi, başlangıç maya hücre konsantrasyonu ve çeşitli mikrodalga güçlerinde inaktivasyonun derecesi düzenli olarak karşılaştırılmıştır. En fazla mikrodalga etkisi; *C. albicans* için 30 saniye, 1×10^{12} başlangıç maya hücre konsantrasyonu ve 600 W mikrodalga uygulaması ile elde edilmiştir. *G. candidum* için ise 60 saniye, 1×10^{14} başlangıç maya hücre konsantrasyonu ve 600 W mikrodalga uygulaması ile elde edilmiştir. Deneysel veriler, denenen maya hücreleri için mikrodalga uygulaması sırasında oluşan sıcaklık nedeni ile öldürücü etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

ANAHTAR SÖZCÜKLER : Mikrodalga, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans*.

EFFECT OF MICROWAVE TO VIABILITY OF YEAST CELLS

ABSTRACT : In this study, cell suspension of *Geotrichum candidum* and *Candida albicans* were exposed to microwave. The degrees of inactivation by the various exposure time, initial yeast cells amount and different power of microwave were compared systematically. Maximum efficiency of microwave was observed at 30 sec of exposure time, 1×10^{12} of initial yeast cell concentration, and 600 W of microwave power for *C. albicans*, 60 sec of exposure time, 1×10^{14} of initial yeast cell concentration and 600 W of microwave power for *G. candidum*. Experimental data shows that microwaves apparently produced lethal effects on the examined yeast by heat generated during microwave exposure.

KEYWORDS : Microwave, *Geotrichum candidum*, *Candida albicans*.

¹Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Meşelik Kampüsü 26480 ESKİŞEHİR

²Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Meşelik Kampüsü 26480 ESKİŞEHİR

I. GİRİŞ

Mikroorganizmaların mikroorganizmalar üzerine etkisi yaklaşık yüz yıldır araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Günümüzde gıda sektöründen çeşitli endüstriyel uygulamalara, tıptan kozmetiğe kadar geniş kullanım alanı bulan mikrodalga fırınlar günlük yaşamda da önemli bir yere sahiptir. Gıda sektöründe ağırlıklı olarak gıdaların mikrobiyal yüklerinin azaltılmasında mikrodalgadan yararlanılmaktadır [2]. Endüstride mikrodalga en çok sanitasyon ve sterilizasyon amacıyla tercih edilmektedir. Yapılan birçok çalışma ile mikrodalga mikroorganizmalar üzerine inhibisyon etkisi olduğu ortaya konmuştur. Ancak mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır [3-7]. Bazı araştırmacılara göre mikrodalga mikroorganizmaların canlılığı üzerine olan olumsuz etkisi mikrodalgaya maruz kalma sürecinde, oluşan sıcaklık artışına bağlanmaktadır [8-10]. Mikrodalga etkisi ile oluşan sıcaklığın etkilediği mikroorganizma türlerine örnek olarak, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, *Listeria* spp., *Saccharomyces cerevisiae* ve *Clostridium perfringens* verilebilir [10-18]. Diğer yandan, Olsen vd'ne göre *Aspergillus niger* ve *Penicillium* sp. sporlarının mikrodalga ile inaktive olduklarını ancak burada herhangi bir sıcaklık artışına rastlamadıkları ve dolayısıyla bu inaktivasyonun sıcaklık ile ilişkilendirilemeyeceği yönünde bulguları bulunmaktadır [16].

Mikroorganizmaların canlılık üzerine etkisi sadece sıcaklık artışı nedeni ile olmamakla birlikte mikrodalga ışınların su moleküllerinin dipolar yapısını değiştirmesiyle ortamdaki hücrelerin DNA kompozisyonu da bozulmaktadır [5]. Mikrodalga aktivasyonu temiz teknoloji alanında kuru ortamlarda yeni bileşiklerin sentezlenmesi sürecinde uygulama alanı bulmaktadır. Son yıllarda organik kimyada madde sentezinde mikrodalga güvenli ve pratik uygulama olanağı sağladığından tercih edilmektedir [6].

Bu çalışmada, *Geotrichum candidum* NRRL Y 552 ve *Candida albicans* CBS 562 üzerine mikrodalga inhibisyonunun gözlemlendiği optimum koşullar belirlenmiştir.

II. MATERYAL ve YÖNTEM

II.1. Mikroorganizma ve Kültür Koşulları

Araştırmada *Geotrichum candidum* NRRL Y 552 ve *Candida albicans* CBS 562 maya kültürleri kullanılmıştır. Mikroorganizmalar malt özütü broth (Merck) besiyerinde 30 C'de 48 saat inkübasyona bırakılarak aktive edilmiş ve bu kültürler çalışmada kullanılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda örnekler

steril fizyolojik tuzlu su çözeltisi içeren tüplerde seyreltme yapılarak hücre sayısı seyreltme plaka tekniği ile yapılmıştır.

II.2. Optimizasyon Çalışmaları

Mikrodalganın denenen maya örnekleri üzerinde en etkili olduğu koşulları belirlemek amacıyla bir dizi optimizasyon çalışması yapılmıştır. Öncelikle sürenin etkisini belirleyebilmek için aktiflenen hücrelerden 2 ml alınarak kapaklı tüplere konulmuştur. Bu tüpler, sürenin etkisini belirleyebilmek için 5, 10, 15, 30, 45 ve 60 sn süre ile 360 W gücünde mikrodalgaya maruz bırakılmıştır. Mikrodalganın denenen maya hücrelerinin canlılığı üzerine etkisini belirlemek üzere malt agar plaklarına 100 µl mikrodalgaya maruz kalmış kültür sıvısı konularak yayma plaka yöntemiyle ekim yapılmıştır. Plaklar 30 °C'de 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Mikrodalgaya maruz bırakılmadan önce ve maruz bırakıldıktan sonra koloni sayımları yapılmıştır.

Belirlenen optimum maruz kalma süresi sabit tutularak, mikrodalga fırının gücü 90, 360 ve 600 W seviyelerinde değiştirilerek denenen mayaların canlılığı üzerine mikrodalga gücünün etkisi araştırılmıştır. Denemede kullanılan her iki maya örneği için canlılık sayımları yukarıda anlatıldığı biçimde yapılmıştır. Mikrodalgaya maruz bırakılan mayaların başlangıç hücre konsantrasyonunun etkisini belirleyebilmek için farklı başlangıç hücre miktarları denenmiştir. Daha önce belirlenen parametreler sabit tutulmuştur. Tüm denemeler 3 tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Kontrol olarak mikrodalga ile muamele edilmemiş aktif kültürler kullanılmıştır.

II.3. Mikrodalganın Etki Şeklinin Belirlenmesi

Belirlenen optimum koşullarda her iki maya örneği için, sıcaklığın etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla mikrodalga uygulaması sırasında ortamdaki sıcaklık değişimleri termometre ile takip edilmiştir. Ayrıca mikrodalgaya maruz kalan hücrelerin canlılıklarının devam edip etmediği metilen mavisi boyama yöntemi ile kontrol edilmiştir.

Mikrodalganın hücre duvarına ve hücre DNA'sına zarar verdiği bilinmektedir. Bu bilgilerden yola çıkarak optimum koşullarda yapılan denemelerde kültür sıvısında protein tayini ve ortamda bulunabilecek nükleik asitlerin varlığı takip edilmiştir. Kültür sıvısında nükleik asitlerin varlığı 260 nm'de yapılan ölçümler (UV-VIS Spektrofotometre, Shimadzu) ile takip edilmiştir. Protein tayini Bradford yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemde boya olarak kullanılan Coomassie brilliant blue G-250, negatif bir yüke sahiptir ve protein üzerindeki pozitif yüke bağlanır. Standart grafik hazırlandıktan sonra alınan örneklerden 80 µl alınarak saf su ile 100 µl'ye tamamlanmış ve üzerlerine 5'er ml renklendirme

reaktifi ilave edilmiştir. Reaksiyon süresi sonunda 595 nm’de absorbans değerleri okunmuştur. Standart grafikten yararlanılarak protein miktarları belirlenmiştir [19].

III. TARTIŞMA ve SONUÇ

G. candidum NRRL Y 552 ve *C. albicans* CBS 562 maya hücreleri üzerine mikrodalgaya maruz kalma süresinin etkisini gösteren Şekil 1’den de görülebileceği gibi mikrodalgaya maruz bırakılan maya hücrelerinin sayısında geçen süreyle birlikte önemli bir azalma olmuştur.

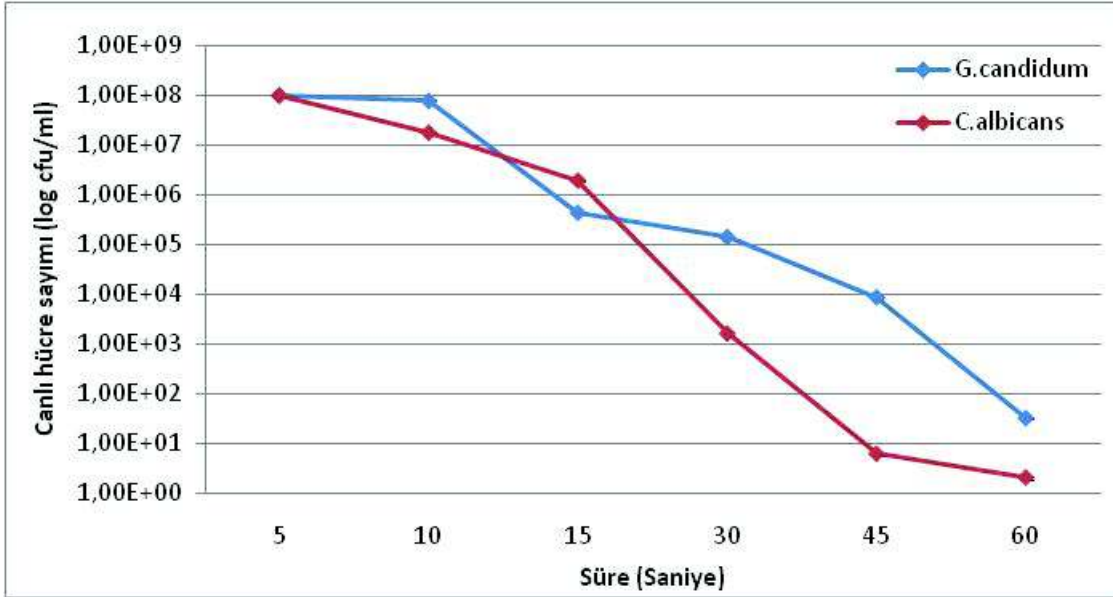
Kısa sürede elde edilen inaktivasyon, endüstrinin bu alanda gereksinim duyduğu önemli bir aşamadır. Ancak burada önemli bir etken de denemede kullanılan hacimdir. Endüstriyel uygulamalar için istenilen hacimde denemeler yapılması gerekmektedir. Burada belirtmek gerekir ki, farklı sürelerde yapılan mikrodalga uygulaması sırasında eş zamanlı olarak ortamdaki sıcaklığının değişimi de takip edilmiştir. Artan süre ile sıcaklığın da arttığı görülmüştür (Şekil 2). Bu durum mikrodalğanın denenen mayaların canlılığı üzerine olan olumsuz etkisinin sıcaklıkla da ilişkilendirilebileceğini düşündürmektedir. Mikrodalga uygulamalarında artan sıcaklığın mikroorganizmaların canlılığı üzerinde olumsuz etki gösterdiği yönünde çalışmalara literatürde de rastlanılmaktadır [5, 9, 17].

Belirlenen optimum süreler sabit tutularak, her iki maya kültürü farklı güçlerde mikrodalgaya maruz bırakılarak, mikrodalğanın gücünün maya hücrelerinin canlılığı üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Beklenildiği üzere, canlılığın en fazla etkilendiği mikrodalga gücü, denemede kullanılan en yüksek mikrodalga gücü (600 W) olarak belirlenmiştir (Şekil 3).

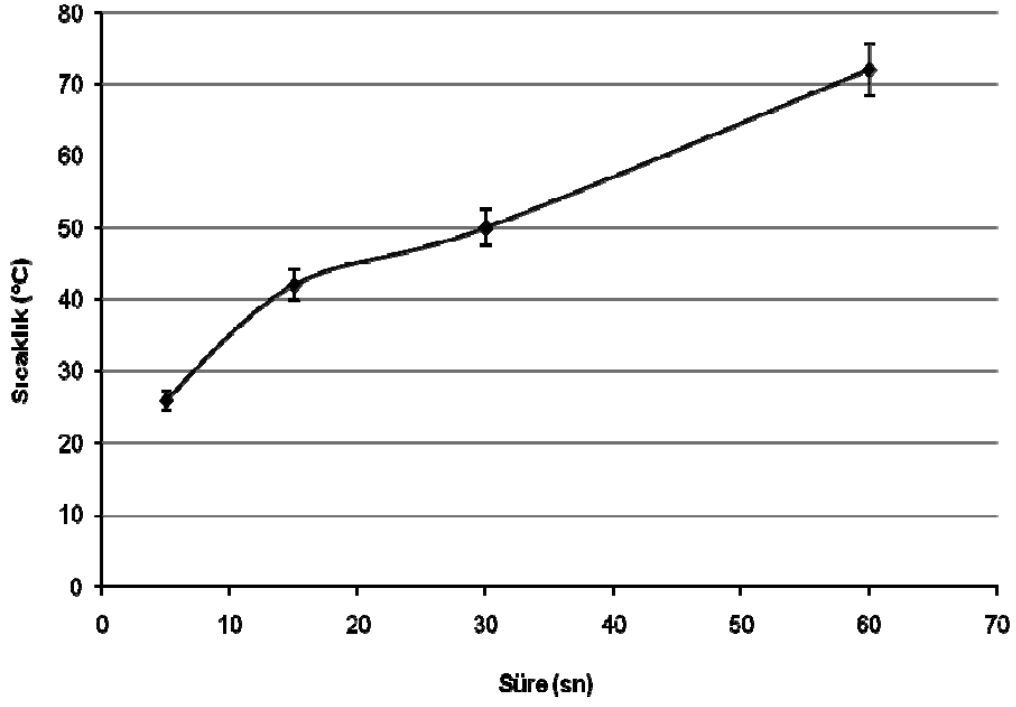
Mikrodalğanın başlangıç maya konsantrasyonuna etkisini değerlendirmek amacı ile mikrodalgaya maruz kalma süresi *G. candidum* için 60 sn, *C. albicans* için 30 sn ve mikrodalga güç seviyesi 600 W sabit tutularak, başlangıç maya hücre konsantrasyonu 1×10^8 /ml ile 1×10^{14} /ml arasında değiştirilmiştir. Şekil 4’ten de görülebileceği gibi, başlangıç maya konsantrasyonunun artması mikrodalğanın etkinliğini azaltmaktadır.

Optimizasyon çalışmaları sonucunda, *G. candidum* NRRL Y 552 için 60 saniye maruz kalma süresi, 600 W mikrodalga güç seviyesi ve 1×10^{12} başlangıç hücre sayısı optimum olarak belirlenirken, *C. albicans* CBS 562 için, 30 saniye maruz kalma süresi, 600 W mikrodalga güç seviyesi ve 1×10^8 /ml başlangıç hücre sayısı optimum olarak belirlenmiştir.

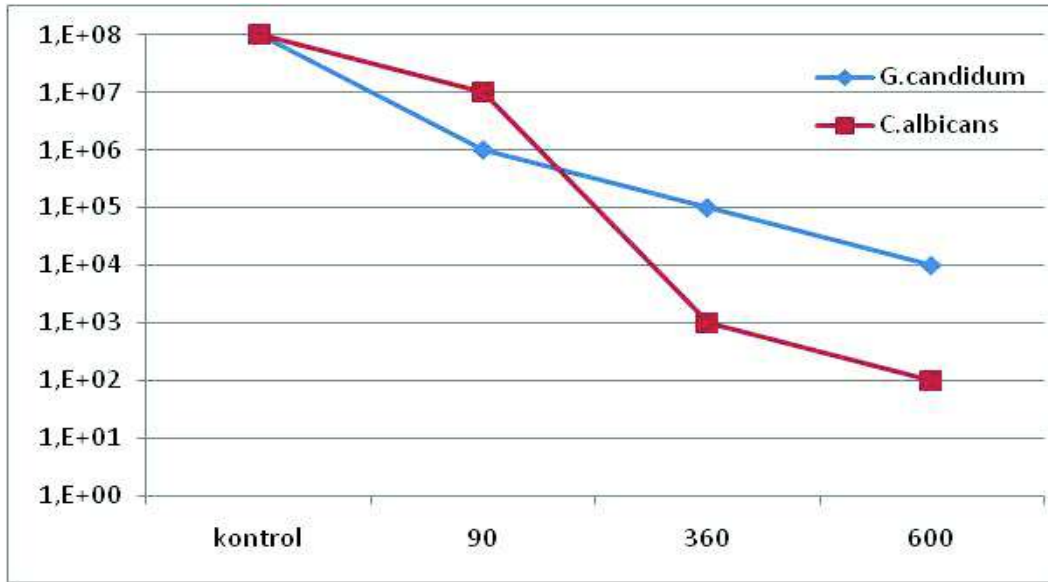
Mikroalgaya ve sıcaklığın mikroorganizmalara etkisi ile nükleik asit ve proteinlerin hücre dışına çıktığı ve kültür sıvısında bulunabileceği bilinmektedir. Bu nedenle, mikroalgaya maruz bırakılan hücrelerden, kültür sıvısına pürin, pirimidinler ve proteinler salınabilmektedir [9,17]. Nükleik asitlerin bir çözeltideki varlığını belirleyebilmek için 260 nm dalga boyunda yapılan ölçümler kontrol grupları ile karşılaştırılarak yapılmıştır. Her iki maya hücresi için spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda herhangi bir absorbans farklılığına rastlanılmamıştır. Bu sonuçlar bize mikroalgaya maruz bırakılan her iki maya hücresi için DNA üzerine bir etki oluşmadığı fikrini vermektedir. Benzer biçimde mikroalgaya etki ile hücre duvarında meydana gelen hasar, sitoplazmadaki proteinlerin kültür sıvısına geçmesine neden olmaktadır. Bu nedenle kültür sıvısında protein tayinleri yapılmıştır. Kontrol grubu olarak mikroalgaya maruz bırakılmayan maya hücreleri kullanılmıştır. Kontrol ve deneme gruplarında yapılan ölçümlerde protein miktarı açısından herhangi bir farklılık gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, her iki maya hücresi için, hücre duvarında protein salınımına neden olabilecek düzeyde bir hücre duvarı hasarı oluşmadığını göstermektedir. Prokaryotlar ve ökaryotlar gerek yapısal gerekse fizyolojik farklılık gösterdiğinden mikroalganın etki mekanizması da farklılık gösterir [18].



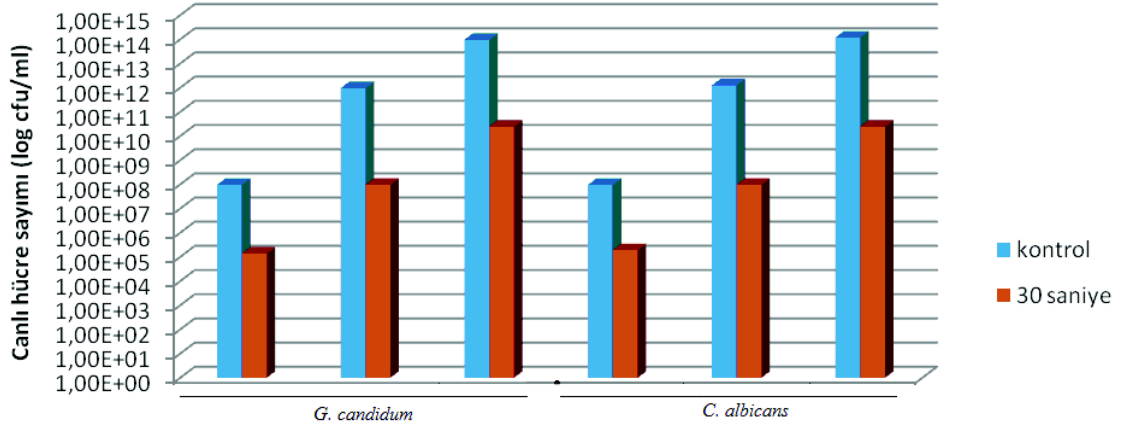
Şekil 1. Mikroalgaya maruz kalan maya hücrelerinin geçen süreye göre sayısal değişimi (Çalışma koşulları: 360 W, 1×10^8 /ml hücre yoğunluğu).



Şekil 2. Mikrodalga fırında artan süre ile birlikte sıcaklık değişimi.



Şekil 3. Mikrodalga gücünün maya hücrelerinin sayısal değişimi üzerine etkisi (Çalışma koşulları: Maruz kalma süresi: *G. candidum* için 1 dk, *C.albicans* için 30 sn, 1×10^6 /ml hücre yoğunluğu).



Şekil 4. Farklı başlangıç maya hücre konsantrasyonları üzerine mikrodalgaın etkisi (Çalışma koşulları: Maruz kalma süresi: *G. candidum* için 1 dk, *C. albicans* için 30 sn, mikrodalga gücü: 600 W-her iki maya için).

Temel olarak mikrodalga etki mekanizması ortama elektromanyetik enerji salınına dayanır. Canlı sistemlerde hücre zarı gibi yapılar elektriksel değişikliklere oldukça duyarlıdır. Özellikle sinir hücreleri gibi spesifikte gösteren hücrelerde etki daha belirgindir. Mikrodalga ökaryot hücre membran kanallarını etkileyerek hücrelerin hayati işlevlerine zarar verir. Literatürde mikrodalga etkisinin sıcaklıkla ilgili olmayabileceği yönündeki bulgular ile sıcaklığın da etkili olabileceğini destekleyen sonuçlar değerlendirildiğinde, mikrodalgaın hücreler üzerine birincil etkisinin elektromanyetik alandan kaynaklandığını göstermektedir. Sıcaklık artışı ise dolaylı bir etki olarak değerlendirilmektedir [20-22].

Her iki maya hücresi için belirlenen optimum koşullarda yapılan denemeler sonunda hücreler metilen mavisi ile boyanarak canlılıklarının devam edip etmediği kontrol edilmiştir. Bilindiği gibi canlı maya hücreleri metilen mavisi ile boyanmaz iken, ölü maya hücreleri boyanmaya direncin ortadan kalkması nedeni ile metilen mavisiyle boyanır. Seçilen optimum koşullarda mikrodalgaya maruz bırakılan her iki maya hücresinin de metilen mavisi ile boyandığı görülmektedir. Bu durum bize seçilen optimum koşullarda yapılan mikrodalga uygulamasının *G. candidum* NRRL Y 552 ve *C. albicans* CBS 562 hücreleri üzerinde öldürücü bir etki gösterdiğini kanıtlamaktadır.

Patel vd. tarafından yapılan bir çalışmada sıcaklığa dayalı olmayan mikrodalga kullanılmıştır. Isıya karşı hassas çeşitli medikal ürünlerin üzerine tutunmuş *E. coli* ve *S. aureus* örnekleri 30 sn'lik sürelerle üç defa mikrodalgaya maruz bırakılmış, ilk muamelede belirgin bir etki görülmezken üçüncü muamele sonrasında *E. coli* üzerinde %98,4; *S. aureus* üzerinde %95,25 oranında etki sağlanmıştır [23].

Sıcaklığa dayalı mikrodalganın kullanıldığı bu çalışmada ise mayalarda, ilk muamelede 30 sn ve 1 dk. gibi kısa sürede büyük ölçüde etki sağlanmıştır. Yapılan araştırmalar mikrodalganın mikroorganizmalar üzerine kısa sürede ölümcül etki gösterdiğine işaret etmektedir [23].

Bu çalışmadan elde edilen veriler her iki maya hücrelerinin canlılığı üzerine mikrodalganın statik bir etki yaptığını ve bunun sıcaklıkla ilişkilendirilebileceğini göstermektedir.

IV. KAYNAKLAR

- [1] G. R. Vela, J. F. Wu, “Mechanism of Lethal Action of 2,450-MHz Radiation on Microorganisms”, *Applied And Environmental Microbiology.*, Vol. 37, No. 3, pp. 550-553, 1978.
- [2] I.M. Woo, I.K. Rhee, H.D. Park , “Differential Damage in Bacterial Cells by Microwave Radiation on the Basis of Cell Wall Structure”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 66, No. 5, pp. 2243–2247, 2000.
- [3] D. Y. C. Fung, F. E. Cunningham, “Effect of microwaves on microorganisms in foods”, *Journal of Food Protection.*, Vol. 43, pp. 641–650, 1980.
- [4] M. E. Stiles, “Thermal inactivation and injury of *Staphylococcus aureus*”, Ph.D. thesis., University of Illinois, Urbana. 1963.
- [5] R. L. Górný, G. Mainelis, A. Wlazło, A. Niesler, D. O. Lis, S. Marzec, E. Siwińska, B. Ł. Izbińska, A. Harkawy, J. K. Kocot, “Viability Of Fungal and Actinomycetal Spores After Microwave Radiation Of Building Materials”, *Ann Agricultural and Environmental Medicine*, Vol.14, pp. 313-324, 2007.
- [6] A. Dandia, M. Satı, K. Arya, R. Sharma, A. Loupy, “Facile One Pot Microwave Induced Solvent-Free Synthesis and Antifungal, Antitubercular Screening of Spiro [1,5]-Benzothiazepin-2,39[39H]indol-2[19H]-ones”, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin.*, Vol. 51, No.10, pp. 1137-1141, 2003.
- [7] H. Fujikawa, K. Ohta, “Patterns of bacterial destruction in solutions by microwave Irradiation”, *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 76, pp. 389-394, 1993.
- [8] H. Fujikawa, H. Ushioda, Y. Kudo, “Kinetics of Escherichia coli destruction by microwave irradiation”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 58, pp. 920-924, 1992.
- [9] S.Gedikli, Ö.Tabak, Ö.Tomsuk, A.Çabuk, “Effect of Microwaves on Some Gram Negative and Gram Positive Bacteria”, *Journal of Applied Biological Sciences.*, Vol. 2, No. 1, pp. 67-71, 2008.
- [10] S.A. Godblith, D. Wang, “Effect of microwaves on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*”, *Applied Microbiology*, Vol. 15, pp. 1271-1375, 1967.

- [11] R.V. Lechowich , L.R. Beuchat, K.I. Fox, F.H. Webster, “Procedure for Evaluating the Effects of 2,450- Megahertz Microwaves upon *Streptococcus faecalis* and *Saccharomyces cerevisiae*”, *Applied Microbiology*, Vol. 17, pp. 106-110, 1969.
- [12] R.A. Heddleson, S. Doores, R.C. Anantheswaran, “Parameters affecting destruction of *Salmonella spp.* by microwave heating”, *Journal of Food Science.*, Vol. 59, pp. 447–451, 1994.
- [13] B.A. Welt, C.H. Tong, J.L. Rossen, D.D. Lund, “Effect of microwave radiation on inactivation of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) spore”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 60, pp. 482-488, 1994.
- [14] J.K. Shin, Y.R. Pyun, “Inactivation of *Lactobacillus plantarum* by pulsed-microwave irradiation”, *Journal of Food Science*, Vol. 62, pp. 163-166, 1997.
- [15] J.M. Farber, J.Y.D. Aoust, M. Diotte, A. Sewell, E. Daley, “Survival of *Listeria spp.* On raw whole chickens in microwave ovens”, *Journal of Food Protection.*, Vol. 61, pp. 1465-1469, 1998.
- [16] C.M. Olsen, “Microwaves inhibit bread mold”, *Food Engineering*, Vol. 37, pp. 51-54, 1965.
- [17] H. Khalil, R. Villota, “Comparative study on injury and recovery of *Staphylococcus aureus* using microwave and conventional heating”, *Journal of Food Protection*, Vol. 51, pp. 181-186, 1988.
- [18] S. Banik , S. Bandyopadhyay, S. Ganguly, “Bioeffects of microwave—a brief review”, *Bioresource Technology*, Vol. 87, pp.155–159, 2003.
- [19] M.M. Bradford, “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”, *Analytical Biochemistry*, Vol. 72, pp. 248-51, 1976.
- [20] A.V.Vorst, “RF/Microwave Radiation Protection”, *TUTB News Letter.*, No 21, pp. 12-16, 2003.
- [21] G. J. Hyland, “Non-Thermal Bioeffects Induced by Low-Intensity Microwave Irradiation of Living Systems”, *Engineering Science and Education Journal*, Vol. 7, pp. 261-268, 1998.
- [22] S. B. Jasnow, J. L. Smith, “Microwave Sanitization of Color Additives Used in Cosmetics: Feasibility Study”, *Applied Microbiology*, Vol. 30, No. 2, pp. 205-211, 1975.
- [23] S. S. Patel, A. A. Owida, Y. S. Morsi, “Microwave sterilization of bovine pericardium for heart valve applications”, *The Japanese Society for Artificial Organs*, Vol. 13, pp. 24–30, 2010.