



Özgün Araştırma/Original Article

Ozon Gazının Antifungal Ajan Olarak Etkinliğinin Belirlenmesi

Determination of Ozone Gas Effectiveness as Antifungal Agent

Beyza Arda^{1*}, Elif Onbaşı², Ayşe Öztürk³, Aycan Cınar⁴

¹Yüksek Lisans Öğrencisi, Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, BURSA, TÜRKİYE
ORCID ID:0000-0003-3193-0270

²Doktora Öğrencisi, Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, BURSA, TÜRKİYE
ORCID ID:0000-0002-5169-7392,³

³Yüksek Lisans Öğrencisi, Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, BURSA, TÜRKİYE
ORCID ID:0000-0001-8286-706X,⁴

⁴Dr. Öğr. Üyesi, Bursa Teknik Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, BURSA, TÜRKİYE
ORCID ID:0000-0003-2038-725X

*: Yazışmalardan sorumlu yazar/Corresponding author: beyzaarda96@gmail.com

Geliş Tarihi:07.05.2021

Kabul Tarihi:26.07.2021

Özet

Amaç: Gıda işletmelerinde ortam havasında baskın olarak bulunan küf ve mayalar, hava kaynaklı kontaminasyon yoluyla gıdalara bulaşmakta ve mikrobiyal bozulmalara neden olmaktadır. Küfler gıda kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerinin ötesinde, insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkiye sahip mikotoksin adı verilen ikincil metabolitler üretmektedir. Günümüzde ozon (O₃) uygulamaları gıda sanayinde küf önleyici ve detoksifikasyon yöntemi olarak kullanılan yeşil teknoloji olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu çalışmada kontrollü hava ortamında O₃ gazının antifungal etkinliği belirlenmiştir.

Materyal ve yöntem: 0,5 McFarland'a ayarlanmış maya (*Candida parapsilosis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*) ve küf sporu (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*) süspansiyonu 250 L hava sızdırmaz özellikteki test kabini içine püskürtülerek; 3, 5 ile 10 dk ozon gazına (10.000 mg/saat) maruz bırakılmıştır. Ozon uygulama öncesi ve sonrası aktif ve pasif örnekleme yapılarak mikroorganizma sayıları kıyaslanarak antifungal etkinlik belirlenmiştir.

Bulgular ve sonuç: 3 dk ozon uygulaması ile test edilen tüm mikroorganizmalarda gelişmenin %100 engellendiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Ozon, Hava, Maya, Küf, Antifungal Aktivite, Gıda Bozulmaları.

Abstract

Objective: Molds and yeasts which are predominant microorganisms in the air of food facility, contaminate foods through airborne and cause microbial spoilage. In addition to their adverse effects on food quality, molds produce mycotoxins which have toxic effects on humans and animals. Nowadays, ozone (O₃) applications appear as a green technology used mold prevention and detoxification method in food industry. In this study, the antifungal activity of O₃ gas was determined in a controlled air environment.

Material and methods: 0,5 McFarland yeast (*Candida parapsilosis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*) and mold spore (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*) suspensions were sprayed into 250 L airtight test cabin and exposed to ozone gas (10.000 mg/hour) for 3, 5, 10 min. Antifungal activity was determined by comparing the number of microorganisms by active- passive sampling before and after ozone application.

Results and conclusion: 100% antifungal effect was detected in all tested microorganisms with 3 minutes of ozone application.

Key words: Ozone, Air, Yeast, Mold, Antifungal Activity, Food Spoilage.

1.Giriş

Gıda işletmelerinde ortam havası; bakteri, küf sporları, virüsler ve onların bileşenlerini içinde barındıran ve bioaerosol olarak adlandırılan mikrobiyal etkenleri içermektedir (Yalçın ve Alçay, 2015). Bu mikroorganizmaların arasında baskın olan küf ve mayalar, hava kaynaklı kontaminasyon yoluyla gıdalarda mikrobiyal bozulmalara, raf ömrünün azalmasına, ürün kayıplarına, müşteri şikayetlerine, geri çağırmalara, önemli ekonomik kayıplara ve hatta üretici markaların prestij kaybına neden olmaktadır. Küresel gıda arzının yaklaşık %25'i mikrobiyal bozulma nedeniyle boşa gitmekte ve kaybedilmektedir (Snyder ve Worobo, 2018a). Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'daki meyve suyu üreticileriyle yapılan bir ankette ise bozulan ürünlerin %92'sinin küf veya maya kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Snyder ve Worobo, 2018b).

Günümüzde, üretilen gıdaların yaklaşık üçte birinde kayıplar yaşandığı veya israf edildiği bilinmektedir (Leyva vd., 2017). Bu durum artan dünya nüfusu ve tüketim miktarı nedeniyle dünya çapında global bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre her yıl tahminen 1,3 milyar ton gıda kaybedilmekte ve/veya israf olmaktadır. Tüm gıda kategorilerinde yer alan kayıplar değerlendirildiğinde ise meyve ve sebze ürünlerinin bu kayıpların %40-50'sini oluşturduğu bildirilmiştir (FAO, 2017). Gelişmekte olan ülkelerde gıda kayıpları (%30-40) genelde hasat sırasında, sonrasında veya ürün işleme aşamasında meydana gelirken, gelişmiş ülkelerde benzer kayıp yüzdeleri (%30) perakende satış veya tüketici noktasında oluşmaktadır (Kitinoja vd., 2011; Günaydın ve Karaca, 2015).

Olumsuz ve zorlu çevre koşullarına karşı direnci yüksek olan ve bu ortamlarda kolayca gelişebilme kabiliyetine sahip olan maya ve küfler, gıda üretim zincirinin herhangi bir aşamasında en önemli mikrobiyal bozulma etmeni olarak karşımıza çıkmaktadır (Cınar ve Onbaşı, 2020). Meyve ve sebze ürünlerinin zengin besin bileşenlerine sahip olması, su aktivitesi (a_w) ve pH değerlerinin küf ve mayaların gelişimine uygun olması nedeniyle bu mikroorganizmalar için ideal bir ortam oluşturmaktadır. Özellikle küf ile kontamine olmuş gıdaların tüketilmesi mide bulantısı, kusma, ishal vb. gıda zehirlenmesi semptomlarına yol açmaktadır (WHO, 2018). Bunlara ilaveten alerjik reaksiyonlara ve solunum problemlerine de neden olabileceği bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) raporuna göre 2017-2021 yılları arasında 10 farklı gıda markası piyasaya sürdüğü ürünlerde küf bulaşı potansiyeli olması nedeniyle ürünlerini geri çekme ve piyasadan toplama kararı almıştır (FDA, 2021).

Gıdalarda gelişen *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria* ve *Fusarium* küf cinslerine ait türlerin gıda kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerinin yanı sıra, insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkiye sahip olabilen mikotoksin adı verilen ikincil metabolitleri sentezleme yeteneğine sahiptirler (Adebo ve ark, 2021). Mikotoksinler, insan ve hayvan sağlığını ciddi derecede tehdit eden ve gıda endüstrisinde yüksek ekonomik öneme sahip olan bir gıda güvenliği riskidir. Kümes hayvanları ve memelilerde yapılan birçok araştırmanın sonucuna göre mikotoksinler; kanserojen, mutajenik, teratojenik, hepatotoksik, nefrotoksik, immünosupresif ve embriyotoksik etkilere sahiptirler (Da Rocha vd., 2014; Escrivá vd., 2017; Silva vd., 2021; Loncar vd., 2021). Amerika Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) raporlarına göre, mikotoksinlerin her yıl dünyadaki mahsullerin yaklaşık %25'ini etkilediği ve milyarlarca dolarlık tarımsal ürün ve endüstriyel kayıplara neden olduğu tahmin edilmektedir (Alshannaq ve Yu, 2017). Amerika Birleşik Devletleri'nde küf ve mikotoksinlerin neden olduğu yıllık zararın yaklaşık 0,5-1,5 milyar dolar olduğu bildirilmektedir (Oğuz, 2017).

Türkiye'de hızlı alarm ve geri çekme sistemleri üzerine yapılan bir çalışmada, 2009-2016 yılları arasında sınır iadeleri ve alarm olarak gösterilen yüzlerce bildirim olduğu ifade edilmiştir. Bu bildirimlerdeki tehlike unsurlarının; mikotoksin (993 adet), pestisit (468 adet), ağır metaller (106 adet), patojen mikroorganizmalar (135 adet) ve migrasyon (49 adet) olduğu belirtilmiştir (Çınar vd., 2017). Çalışma verileri değerlendirildiğinde; Türkiye'de iade edilen ve/veya şikâyete sebep olan etkenler arasında mikotoksinlerin açık ara birinci olduğu görülmektedir. Ayrıca bu tip tehlikelerin en fazla görüldüğü ürün grupları arasında meyve ve sebzeler ve kuruyemişlerin yer aldığı bildirilmiştir. İhracat grubu ve iç piyasa ürünlerinde erken önlem alınmadığı ve gerekli tetkiklerin yapılmadığı durumlarda ürünlerin ihraç edilmesi konusunda problemlerin yaşandığı, ürünlerin geri çağırılabilirdiği, sağlık problemlerinin yaşandığı ve büyük ekonomik kayıplara neden olduğu görülmektedir. Bu olumsuzluklardan dolayı gıda işleminin tüm aşamalarında küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun engellenmesi, halk sağlığı ve ekonomik açıdan kaçınılmaz bir gerçektir.

Mikotoksijenik küflerin doğada yaygın olarak bulunmaları nedeniyle, önlenmesi ve kontaminasyonunun kontrol edilmesi oldukça zordur. Küflerin gıdalara kontaminasyonu; hasat öncesi, hasat zamanı, depolama ve üretim aşamaları olmak üzere dört ana başlık altında tanımlanabilmektedir (Ferrão vd., 2017; Fernandes, 2017). Ürünlerin depolama aşamalarında uygun olmayan sıcaklık, nem, havalandırma koşullarına

maruz kalması küf gelişimine ve mikotoksinlerin sentezine neden olan önemli etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır (Chukwudi vd., 2021). Günümüzde, fiziksel yöntemler (temizlik, öğütme, vb.), biyoteknolojik ajanların uygulanması, detoksifikasyon/bozunma, fermantasyon teknikleri, depolama sırasında kontrollü atmosfer kullanımı ve ozon uygulamaları yoluyla biyolojik kontrollerin sağlanması küf bulaşı ve gelişiminin önlenmesi veya gelişen küflerin eliminasyonu noktasında önem arz etmektedir. Son yıllarda, özellikle ozonun da içinde yer aldığı oksitleyici ajanlar, gıda depolama ve üretim sırasında etkili bir küf önleyici ve detoksifikasyon yöntemi olarak tercih edilmektedir.

Ozon, FDA tarafından güvenilir ajanlar (GRAS) kategorisinde değerlendirilen, özellikle 2001 yılında alınan kararlarla 'gıdalarla doğrudan temasında sakınca olmayan' güvenli bir antimikrobiyal ve dezenfektan maddesi olarak karşımıza çıkmaktadır (Çatal ve İbanoğlu, 2010; Asokapandian vd., 2018). Ozonun herhangi bir kalıntı veya tehlikeli atık olmaksızın gaz veya sulu formda üretim ve depolama ortamlarında kullanımı, diğer kimyasal oksidantlara kıyasla gıda güvenliği için umut veren yeşil bir teknoloji olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır (Pandiselvam vd., 2019). Ozonlamanın gıda sanayinde; sebze ve meyvelerde kullanımının yanı sıra et, kümes hayvanları, deniz ürünleri ve süt ürünlerinde meydana gelen mikrobiyal bozulmaların ortadan kaldırılmasında önerilen en etkili yöntemlerden biri olarak belirtilmiştir.

Literatürde ozonun gıda sanayinde kullanımı üzerine yapılmış birçok çalışmada, ozonun antifungal etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir. Zorlugenç vd. (2008) kuru incire 15 dakika süre ile 13,8 mg/L ozon gazı uygulamasının, *A. flavus* ve *A. parasiticus*'un gelişimini engellediği ve aflatoksin B1 içeriğinin

azaltıldığını bildirmiştir. Aflatoksin B1 içeren fıstık taneleri ve ezmesinin ozon gazına (60 saat, 50 mg/L) maruz bırakıldığı başka bir çalışmada ise her iki ürün içinde aflatoksin B1'de önemli bir azalma (%89,4) olduğu tespit edilmiştir. Ozon uygulamaları ile yapılmış araştırmaların çoğunluğunun ozonun sulu fazına odaklandığı, gaz halindeki ozon kullanımına ilişkin sınırlı sayıda çalışma olduğu görülmektedir.

Literatürde yapılan çalışmalar ozonun güvenli ve etkili bir antifungal ajan olduğunu göstermekle birlikte gaz formundaki ozon kullanımına ilişkin yayınlanmış az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, 250 L hava sızdırmaz (pleksiglas) kabinin ortam havası, seçilen maya ve küf sporu süspansiyonları ile kontamine edilmiş ve 3, 5 ile 10 dk ozon gazına (20 ppm) maruz bırakılıp aktif ve pasif örnekleme ile mikroorganizma sayıları karşılaştırılarak antifungal etkinlik düzeyi belirlenmiştir. Çalışmada ozonun gaz formunun maya (*Candida parapsilosis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*) ve küf (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Penicillium roqueforti*) spor süspansiyonlarına karşı etkinliğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Deneme kabini ve kullanılan cihazlar

Bu çalışmada, 51x70x70 cm ölçülerinde 250 L hacimli, hava sızdırmaz pleksiglas kabin kullanılmıştır. Kabin içi hava sirkülasyonunun sağlanması amacıyla kabin içine 1400 d/dk akış hızındaki mini pervane yerleştirilmiştir.

Kabin içinde uygulanması istenen ozon gazının üretiminde; 10.000 mg/saat ozon kapasiteli EDF marka ozon jeneratörü (EDF-A10K, Türkiye) kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. EDF-A-10 ozon jeneratörü

Hava örneklerinin alınmasında; pasif örneklemenin yanı sıra mikroorganizma yükünün etkin bir şekilde belirlenmesi amacıyla, hava örnekleme cihazı (MERCK Mas-100, Almanya) ile aktif örnekleme gerçekleştirilmiştir (Şekil 2).



Şekil 2. MERCK hava örnekleme cihazı

Şeffaf yapıdaki pleksiglas deneme kabini çeker ocak içerisine yerleştirilmiş ve çalışmanın yapılacağı analiz ortamı Şekil 3'te verildiği gibi hazırlanmıştır.



Şekil 3. Deneyin gerçekleştirildiği ortam ve kullanılan cihazların görüntüsü

2.2. Mikroorganizmaların hazırlanması

Belirli bir hacimdeki hava ortamına uygulanacak olan ozon gazının antifungal etkinliğinin belirlenmesinde; test mikroorganizmaları olarak Çizelge 1'de yer alan 3 maya ve 5 küf türü kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların tamamı, Bursa Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü kültür koleksiyonundan temin edilmiştir.

Küfler ana stoktan bir öze dolusu örnek alınarak Sabouroud Dekstroz Agar (SDA; Oxoid)'a inoküle edilmiştir. Küflerin sporlanması için 28°C'de 7 günlük inkübasyon süresinin ardından sporlar, %0,1'lik Tween-80 ile yıkanarak toplanmıştır. Daha sonra elde edilen spor süspansiyonu Sabouraud Dekstroz Broth (SDB; Oxoid) kullanılarak 0,5

McFarland'a ayarlanmıştır (Rodriguez-Tudela vd., 2003; Arendrup vd., 2014; The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST; 2015). Uygulamadaki 0.5 McFarland'a denk gelen başlangıç küf yükünü belirlemek amacıyla, FTS kullanılarak 10⁷'ye dek seri dilüsyonlar hazırlanmış ve yayma plak yöntemiyle ekimler yapılmıştır. Maya örneklerinin 24-48 saat önceden SDB içerisinde gelişmesi sağlanmıştır. Gelişen maya örnekleri SDB içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmıştır. NCCLS M27-A2 kılavuzuna (2002) göre 0,5 McFarland değerinin 2x10⁴ kob/mL maya içerdiği kabul edilmiştir. Ayarlanan küf ve maya süspansiyonları, püskürtmenin etkin olarak yapılması amacıyla steril parfüm şişelerine aktarılmıştır (Eryılmaz, 2015).

Çizelge 1: Test mikroorganizmaları

Küf	Maya
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Aspergillus paraciticus</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Penicillium expansum</i>	
<i>Penicillium roqueforti</i>	

2.3. Analizin gerçekleştirilmesi

Analize başlamadan önce deneme kabini içi havası ozon gazı ile 5 dakika muamele edilerek, işlem öncesi kabin içinin dezenfeksiyonu sağlanmıştır. Sonrasında, uygulanan ozon gazının deneme kabininden uzaklaşması için 45 dakika çeker ocak içinde bekletilmiştir. Süre sonunda deneme kabininin başlangıç maya küf yükünü belirlemek üzere hava örnekleme yapılmıştır. Böylece deneme öncesinde test kabininin dezenfekte edilip edilmediğinden emin olunmuştur. Pasif örnekleme ortama 2,5 dakika süre boyunca açık petri yerleştirilerek yapılmış, aktif örnekleme için ise hava örnekleme cihazı

(2,5 dakika) kullanılmıştır. Kabin içi dezenfeksiyonundan sonra, ilk olarak test mikroorganizması kabin içine yaklaşık 0,4 mL püskürtülmüştür. Püskürtmeyi takiben 1 dakika sonra hava örnekleme cihazı çalıştırılarak havaya aşılana mikroorganizmanın başlangıç yükü belirlenmiştir. Eş zamanlı olarak pasif örnekleme de gerçekleştirilmiştir. Örnekleme işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Test mikroorganizmaları ile aşılana havaya sırasıyla 3, 5 ve 10 dakika süreyle ozon uygulanmıştır. Deneme süreleri sonunda hava örnekleri alınarak, ozonun antifungal etkinliğinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

Petriler maya örnekleri için 28 °C'de 24-48 saat, küf örnekleri için 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası mikroorganizma sayımı gerçekleştirilmiştir. Çalışmada her bir mikroorganizma uygulaması farklı günlerde gerçekleştirilmiştir ve çapraz bulaşmanın önlenmesi amacıyla deneme sonrası tüm laboratuvar dezenfekte edilmiştir.

$$\% \text{Antifungal etkinlik} = ((A-B) \times 100) / A$$

olarak hesaplanmıştır (Alwi ve Ali, 2014) (Formül 1)

A: Ozon uygulaması öncesi canlı mikroorganizmaların sayısıdır.

B: Ozon uygulaması sonrası canlı mikroorganizmaların sayısıdır.

İstatistiksel analizler

Çalışmada, test maya ve küfleri üzerine 3 farklı süre (3, 5 ve 10 dk) ozon uygulamasının antifungal etkisi IBM SPSS Statistics Version 22 (IBM, New York,

NY, USA) kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Her bir veri seti için öncelikle histogram, varyasyon katsayısı ve Shapiro-Wilk testi kullanılarak normallik dağılımına bakılmıştır. Normal dağılıma uyan veriler için parametrik bir test olan Oneway-ANOVA ile Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak %95 güven aralığında kontrol grubu ile ozonun (3, 5, 10 dk) uygulama dakikaları arasında anlamlı fark olup olmadığı belirlenmiştir ($p < 0,05$).

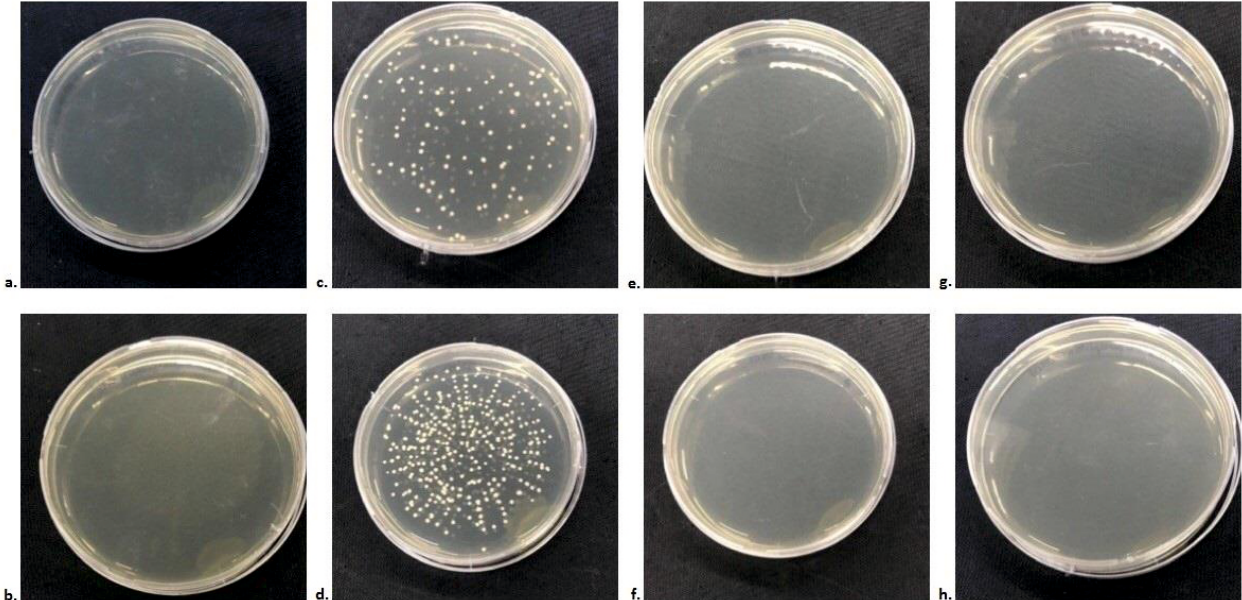
3. Tartışma ve sonuç

Bu çalışma, ortam havasına aşılınmış test maya ve küflerine belli sürelerde (3, 5 ve 10 dk) ozon gazı uygulamasının antifungal etkinliğinin belirlenmesi amacıyla planlanmıştır. Test mikroorganizmaları hava ortamına inoküle edilmeden önce 0,5 McFarland'a ayarlanmıştır. 0,5 McFarland bulanıklığına sahip küf süspansiyonlarının küf sayımı Çizelge 2'de verilmiştir.

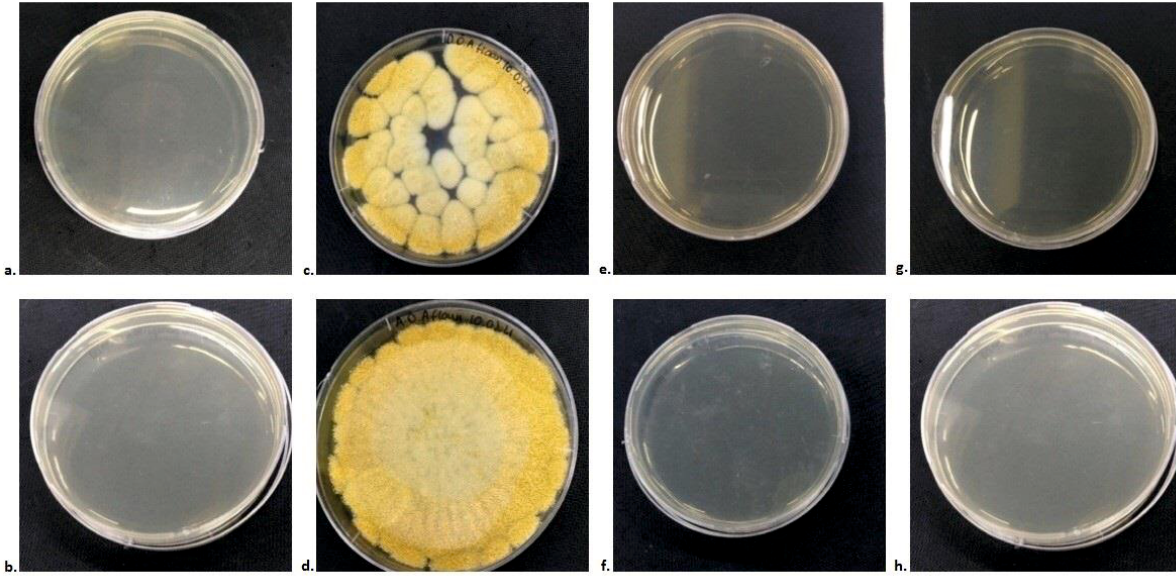
Çizelge 2: 0.5 McFarland'a ayarlanan küf türlerine ait sayım sonuçları

Küf türleri	Sayım sonucu (kob*/m ³)
<i>Aspergillus flavus</i>	2,57×10 ⁶
<i>Aspergillus parasiticus</i>	1,46×10 ⁶
<i>Penicillium digitatum</i>	2,49×10 ⁶
<i>Penicillium expansum</i>	1,06×10 ⁶
<i>Penicillium roqueforti</i>	1,94×10 ⁶

*kob: koloni oluşturan birim



Şekil 4. a. Kontrol pasif hava örneği, b. Kontrol aktif hava örneği, c. *C. parapsilosis* püskürtüldükten sonra pasif hava örneği, d. *C. parapsilosis* püskürtüldükten sonra aktif hava örneği, e. 3 dakikalık ozon uygulanması sonrası pasif hava örneği, f. 3 dakikalık ozon uygulanması sonrası aktif hava örneği, g. 5 dakikalık ozon uygulaması sonrası pasif hava örneği, h. 5 dakikalık ozon uygulaması sonrası aktif hava örneği.



Şekil 5. a. Kontrol pasif hava örneği, b. Kontrol aktif hava örneği, c. *A. flavus* püskürtüldükten sonra pasif hava örneği, d. *A. flavus* püskürtüldükten sonra aktif hava örneği, e. 3 dakikalık ozon uygulanması sonrası pasif hava örneği, f. 3 dakikalık ozon uygulanması sonrası aktif hava örneği, g. 5 dakikalık ozon uygulaması pasif hava örneği, h. 5 dakikalık ozon uygulaması aktif hava örneği.

Şekil 4 ve Şekil 5'te görüldüğü üzere aktif hava örneklerindeki mikroorganizma yoğunluğunun pasif numunelere göre kantitatif olarak fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma ile aktif ve pasif örnekleme birbiri ile kıyaslanması sağlanarak, aktif örnekleme havanın mikroflorasını belirlemede daha etkin olduğu belirlenmiştir.

Ozon uygulamaları sonunda elde edilen maya ve küf sayım sonuçları (aktif ve pasif örnekleme sayımı) doğrultusunda antifungal etkinlik (%) değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 3: Farklı sürelerde ozon uygulaması (3, 5 ve 10 dk) sonrasında antifungal (kob/m³) (%) etkinlik değerleri

Mikroorganizma	Tür	Kontrol		3, 5 ve 10 dakika (%) etkinlik değerleri	
		Aktif	Pasif	Aktif	Pasif
Küf	<i>A. flavus</i>	>300 ^a	57 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
	<i>A. parasiticus</i>	>300 ^a	57 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
	<i>P. digitatum</i>	>300 ^a	39 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
	<i>P. expansum</i>	>300 ^a	47 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
	<i>P. roqueforti</i>	>300 ^a	150 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
Maya	<i>C. parapsilosis</i>	>300 ^a	120 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
	<i>S. pombe</i>	>300 ^a	3 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d
	<i>S. cerevisiae</i>	>300 ^a	15 ^c	0 (100) ^b	0 (100) ^d

*a,b,c,d: Aynı satırdaki farklı harfler ozon maruziyet dakikaları arası istatistiki olarak farklılığı göstermektedir ($p < 0.05$).

Çizelge 3'te yer alan *A. flavus* ve *A. parasiticus* değerleri doğrultusunda; aktif kontrolde sırasıyla 10⁷ ve 10⁶ kob/m³ (Çizelge 1) tespit edilen mikroorganizmaların 3, 5 ve 10 dakika ozon uygulaması sonucunda, gelişimlerinin tamamen engellendiği saptanmıştır. Pasif kontrolde ise 57 kob/m³ gelişen küf sporlarının 3, 5 ve 10 dakika ozon maruziyeti ile gelişiminin durdurulduğu belirlenmiştir. Pasif örnekleme başlangıç küf

sayıları dikkate alındığında, bu yöntemin hava numunesini temsil etmede yetersiz olduğu görülmüştür. Literatürde yapılan bir çalışmada; Brezilya fıındığındaki *A. flavus*'un ozon gazı muamelesi (240 dakika, 8,88 mg/L) ile 3.10 log azaldığı bildirilmiştir (De Oliveira vd., 2020). Ozon gazına (60 µmol/mol) farklı dakikalarda maruz kalmanın (40, 60, 90, ve 120 dak.) *Fusarium*, *Aspergillus* ve *Penicillium* toksijenik türleri

üzerindeki etkilerinin *in-vitro* olarak incelendiği çalışmada; *F. graminearum* ve *P. citrinum*'un 120 dakikalık ozon maruziyeti ile tamamen inhibe edildiği saptanmıştır. Diğer yandan bu çalışmada *A. parasiticus* ve *A. flavus* gelişmelerinin önemli ölçüde azaldığı fakat tamamen inhibe edilmediği ifade edilmiştir (Savi ve Scussel, 2014). Mevcut çalışma ile kıyaslandığında, sonuçlar arasındaki farklılıkların ozon doz/süre, uygulama yöntemi farklılıkları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

P. digitatum ve *P. roqueforti* sonuçları incelendiğinde; aktif kontrolde 10^6 kob/m³ tespit edilen mikroorganizmaların 3 dakika ozon uygulaması ile tamamen elimine edildiği belirlenmiştir. Ames vd., (2013) 150 nL/L, yaklaşık 100 gün ozon maruziyeti sonucunda *P. digitatum* sporlanmasının yaklaşık %50'ye düştüğünü bildirilmiş olup, çalışmamızdan daha düşük etki göstermesi uygulanan doz ve yöntem farklılığı ile ilişkilendirilmiştir. Peynir olgunlaşma odalarının ozonla dezenfeksiyonun etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan bir başka araştırmada; Serra vd. (2003) başlangıç olarak olgunlaştırma odalarının hava yükünü belirleyerek, mevcut küflerin tanımlamalarını yapmışlardır. Ozon uygulaması öncesi depo havasının, *A. flavus*, *P. digitatum*, *P. expansum*'un da içinde yer aldığı 69 küf türünü barındırdığı bildirilmiştir. Ortam havası ozon gazı (8 g/h) ile muamele edilmiş ve antifungal etkinliğin 20 hafta boyunca (geceleri, mesai dışı) takip edildiği bildirilmiştir. Çalışma sonunda küf sayısında 10 kat azalış (<50 kob/m³) olduğu ifade edilmiştir.

Mevcut çalışmadaki *P. expansum* sonuçlarına göre; aktif kontrolde 10^6 kob/m³ ve pasif kontrolde 47 kob/m³ olan küf yükünün 3 dakika ozon uygulaması ile 0 kob/m³ değerine düştüğü saptanmıştır. Hasat sonrası kivi'nin depolama ortamında, 0°C'de 7 gün (1 saat boyunca) 79,44 ppm dozunda ozon gazına maruz bırakıldığı bir çalışmada ise *P. expansum*'un %36 oranında inhibe edildiği bildirilmiştir (Luo vd., 2018). Pratikte yapılan bu uygulamada depo koşulları ile *in-vitro* uygulama farklılıklarından kaynaklanan bir durum olabileceği düşünülmektedir.

Test mayaları üzerindeki etki Çizelge 3'te incelendiğinde, aktif kontrolde başlangıçta yaklaşık 10^6 kob/m³ olan maya yüküne sahip havanın 3, 5 dakika ve 10 dakika ozon maruziyeti sonucunda, maya gelişiminin tamamen engellendiği (0 kob/m³) gözlenmiştir. Pasif kontrolde ise sırasıyla; 15, 120, 3 kob/m³ olarak belirlenen maya yükünün 5 dakika ve 10 dakika ozon uygulaması ile aktif kontrolle benzer şekilde inhibe edildiği belirlenmiştir. Et üretim tesisinde gerçekleştirilen bir çalışmada ise; *Aspergillus niger*, *P. roqueforti*, *Mucor racemosus*, *S.*

cerevisiae ile inoküle edilmiş yüzeylerin 20 ppm, 4 saat ozon gazına maruz bırakıldığında, çalışmada test edilen mikroorganizmalardan sadece *S. cerevisiae*'nin gelişiminde 2.8 log azalma olduğu bildirilmiştir (Vallone ve Stella, 2014). Çalışmamızda ozonun havaya uygulaması ve kullanılan test mikroorganizmalardaki muhtemel suş farkları sonuçların farklılığına etken olabilir. Masotti vd. (2019) bir mandıranın paketleme odasının ozon gazı ile dezenfeksiyon olanaklarını incelemiştir. Ortam havasına uygulanan ozon gazının (40 L/dk) etkinliği 5 hafta boyunca takip edilmiş ve bu süreç sonunda bakterilerin tamamen engellendiği, sayısının da %98 oranında engellendiği ifade edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar çalışmamızı destekler niteliktedir.

Çalışma bulguları doğrultusunda ortalama 10^6 kob/m³ mikroorganizma ile kontamine edilmiş havanın, 250 L hacminde kapalı alanda 3, 5 ve 10 dakika ozon uygulaması ile test edilen tüm mikroorganizmaların gelişimini tamamen engellediği tespit edilmiştir. Aktif ve pasif kontrol grupları kıyaslandığında, pasif örneklemenin hava yükünü belirlemede doğru bir yöntem olmadığı göstermiştir. Sonuç olarak, havaya 3 dakika ozon uygulamasının test mikroorganizmaları üzerinde %100 engelleyici etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca hava örnekleme cihazının özellikle ortam havasındaki küf ve mayaları absorbe etmede başarılı olduğu ve hava mikroflorasını doğru yansıtması açısından kullanımının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Yenilikçi teknoloji olarak bilinen ozon gazının son yıllarda gıda endüstrisinde depolama ortamlarında, ekipman hijyen-sanitasyonunda ve hammaddelerin dezenfeksiyonunda kullanımı yaygınlaşmaktadır. Gaz formunun antifungal etkinliği bu çalışmada 3 dakika uygulama ile, kontrollü bir kabin sistemindeki hava ortamında kontamine edilen küf (*A. flavus*, *A. parasiticus*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*) ve mayaları (*C. parapsilosis*, *S. pombe* ve *S. cerevisiae*) tamamen engellemede başarı gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında, ozon gazının uygun doz ve dakikalarda antifungal ajan olarak kullanılması önerilmektedir.

Çalışmada aynı zamanda aktif (hava örnekleme cihazı) ve pasif hava örnekleme cihazları kullanılarak havadaki maya ve küf ölçümleri nicel olarak karşılaştırılmış ve aktif yöntemin pasif yöntemden daha iyi bir izleme aracı olduğu tespit edilmiştir. Günümüzde, gıda endüstrisinde standart kalite kontrol uygulamalarında (HACCP, ISO 22000 vb.) ve çevresel izleme programlarında aerosollerin periyodik izlenmesi güvenli gıda üretiminin sağlanmasında zorunluluk haline gelmektedir.

4. Kaynaklar

- Adebo, O.A., Molelekoa, T., Makhuvele, R., Adebisi, J.A., Oyedeji, A.B., Gbashi, S. and Njobeh, P.B. (2021). A review on novel non-thermal food processing techniques for mycotoxin reduction. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(1):13-27.
- Alshannaq, A. and Yu, J.H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6):632.
- Alwi, N.A., and Ali, A. (2014). Reduction of *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* sv. Typhimurium populations on fresh-cut bell pepper using gaseous ozone. *Food Control*, 46: 304-311.
- Ames, Z.R., Feliziani, E., and Smilanick, J.L. (2013). Germination of fungal conidia after exposure to low concentration ozone atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 83:22–26.
- Arendrup, M.C., Howard, S., Lass-Florl, C., Mouton, J.W., Meletiadis, J. and CuencaEstrella, M. (2014). EUCAST testing of isavuconazole susceptibility in *Aspergillus*: Comparison of results for inoculum standardization using conidium counting versus optical density. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 6432-6436.
- Asokapandian, S., Periasamy, S., and Swamy, G.J. (2018). Ozone for fruit juice preservation. In *Fruit Juices*. Academic Press, s. 511-527.
- Chukwudi, U.P., Kutu, F.R., and Mavengahama, S. (2021). Mycotoxins in Maize and Implications on Food Security: A Review. *Agricultural Reviews*, 42(1).
- Çınar, A., and Onbaşı, E. (2020). Mycotoxins: The hidden danger in foods. In *Mycotoxins and food safety*. IntechOpen, s. 43-65, London, UK.
- Çatal, H. ve İbanoğlu, Ş. (2010). Gıdaların Ozonlanması. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5: 47-55.
- Çınar, S., Yılmaz, S.N., Aydın, E. ve Yorulmaz, A. (2017). Gıda ve Yem İçin Hızlı Alarm Sistemi (RASFF) 2009-2016 Türkiye Raporu. *Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 5(8) : 873-882.
- Da Rocha, M.E.B., Freire, F.D.C.O., Maia, F.E.F., Guedes, M.I.F. and Rondina, D. (2014). Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*, 36(1): 159-165.
- De Oliveira, J.M., de Alencar, E.R., Blum, L.E.B., de Souza Ferreira, W.F., Botelho, S.D.C.C., Racanicci, A.M.C. and da Silva, C.R. (2020). Ozonation of Brazil nuts: Decomposition kinetics, control of *Aspergillus flavus* and the effect on color and on raw oil quality. *LWT*, 123 :109106.
- Eryılmaz, D. (2015). Mikrobiyal Hava Toplayıcı ve Okuyucu Sistemi Tasarımı ve Prototip Üretimi. *Biyomühendislik Bölümü, Ankara*. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>, (Accessed: 06.05.2021)
- Escrivá, L., Oueslati, S., Font, G. and Manyes, L. (2017). *Alternaria* mycotoxins in food and feed: An overview. *Journal of Food Quality*, 1–20.
- EUCAST (2015). Method for susceptibility testing of moulds; For the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. Copenhagen, Denmark.
- FAO (2017). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Save Food: Global Initiative on Food Loss and Waste Reduction—Key Findings. <http://www.fao.org/save-food/resources/keyfindings/en/> (Accessed 20.04.2021).
- FDA (2021). Recalls, Market Withdrawals, & Safety Alerts. <https://www.fda.gov/safety/recalls-market-withdrawals-safety-alerts> (Accessed 01.05.2021).
- Fernandes, T.H. (2017). Mycotoxins, food and health mycotoxins, food and health. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, 5(7) :1-10.
- Ferrão, J., Bell, V., Chabite, I.T. and Fernandes, T.H. (2017). Mycotoxins, food and health mycotoxins, food and health. *Journal of Nutritional Health & Food Science*, 5(7) :1-10.
- Günaydın, Ş. ve Karaca, H. (2015). Küf gelişimi ve mikotoksin oluşumunun kontrolünde doğal bitki ekstraktlarının kullanımı. *Akademik Gıda*, 13(2) :173-182.
- Kitinoja, L., Saran, S., Roy, S.K. and Kader, A.A. (2011). Postharvest technology for developing countries: Challenges and opportunities in research, outreach and advocacy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91: 597–603.
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A. and Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms*, 5(3) :37.
- Loncar, J., Bellich, B., Parroni, A., Reverberi, M., Rizzo, R., Zjalić, S. and Cescutti, P. (2021). Oligosaccharides Derived from Trimesan: Their Structure and Activity on Mycotoxin Inhibition in *Aspergillus flavus* and *Aspergillus carbonarius*. *Biomolecules*, 11(2) :243.
- Luo, Y., Liu, X. and Li, J. (2018). Updating Techniques on Controlling mycotoxins-A Review. *Food Control*, 89 :123–132.

- Masotti, F., Vallone, L., Ranzini, S., Silveti, T., Morandi, S. and Brasca, M. (2019). Effectiveness of air disinfection by ozonation or hydrogen peroxide aerosolization in dairy environments. *Food Control*, 97 :32-38.
- NCCLS, (2002). National Committee for Clinical and Laboratory Standards. M27-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 22 :15.
- Oğuz, H. (2017). Mikotoksinler ve Önemi. *Türkiye Klinikleri Veterinary Sciences Pharmacology and Toxicology*, 3(2) :113-119.
- Pandiselvam, R., Subhashini, S., Banuu Priya, E., Kothakota, A., Ramesh, S. and Shahir, S. (2019). Ozone Based Food Preservation: A Promising Green Technology for Enhanced Food Safety. *Ozone: Science and Engineering*, 41(1) :17-34.
- Rodriguez-Tudela, J.L., Chryssanthou, E., Petrikkou, E., Mosquera, J., Denning, D.W. and Cuenca-Estrella, M. (2003). Interlaboratory evaluation of hemacytometer method of inoculum preparation for testing antifungal susceptibilities of filamentous fungi. *Journal Clinic Microbiology*, 41 :5236-5237.
- Savi, G.D. and Scussel, V.M. (2014). Effects of Ozone Gas Exposure on Toxigenic Fungi Species from *Fusarium*, *Aspergillus*, and *Penicillium* Genera. *Ozone: Science & Engineering*, 36(2) :144-152.
- Serra, R., Abrunhosa, L., Kozakiewicz, Z., Venâncio, A. and Lima, N. (2003). Use of ozone to reduce molds in a cheese ripening room. *Journal of Food Protection*, 66(12) :2355-2358.
- Silva, J.V.B.D., Oliveira, C.A.F.D. and Ramalho, L.N.Z. (2021). An overview of mycotoxins, their pathogenic effects, foods where they are found and their diagnostic biomarkers. *Food Science and Technology, (AHEAD)*.
- Snyder, A.B. and Worobo, R.W. (2018a). The incidence and impact of microbial spoilage as reported by juice manufacturers. *Food Control*, 85 :144-150.
- Snyder, A.B. and Worobo, R.W. (2018b). Fungal spoilage in food processing. *Journal of food protection*, 81(6) :1035-1040.
- Vallone, L. and Stella, S. (2014). Evaluation of antifungal effect of gaseous ozone in a meat processing plant. *Italian Journal of Food Safety*, 3(2).
- World Health Organization (WHO), (2018). Mycotoxins. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>, (Accessed 20.04.2021).
- Yalçın, S. ve Alçay, A. Ü. (2015). İç Ortam Havası Biyoaerosolleri ve mikrobiyal hava kalitesi ölçüm metodları. *Anadolu Bil Meslek Yüksekokulu Dergisi*, (37) :17-30.
- Zorlugenç, B., Zorlugenç, F.K., Öztekin, S. and Evliya, I.B. (2008). The influence of gaseous ozone and ozonated water on microbial flora and degradation of Aflatoxin B1 in dried figs. *Food and Chemical Toxicology* 46(12) :3593-3597.