

Praktyczne zastosowanie ozonu jako środka przeciwgrzybicznego (przeciwpleśniowego)

James B. Hudson i Manju Sharma
Viroforce Systems Inc. Laboratory, Vancouver, Kanada

Ocenie poddana została zdolność przenośnego generatora ozonu (Viroforce 1000) to inaktywacji 13 różnych gatunków obecnych w środowisku naturalnym grzybów. Próbki w postaci warstwy wilgotnej lub suchej poddano jednemu lub dwóm cyklom obróbki (35 ppm ozonu przez 20 minut, z krótkim okresem wilgotności względnej > 90%), a następnie pomiarom poddano reszkową zdolność do przeżycia. Ozon był w stanie inaktywować 3 log₁₀ cfu (jednostek tworzących kolonię) większości grzybów zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i symulowanych warunkach terenowych, na różnych powierzchniach. Wnioskujemy, iż generator ozonu może okazać się wartościowym narzędziem do dekontaminacji i usuwania pleśni w budynkach.

Słowa kluczowe Ozon, grzyby, pleśń, przeciwgrzybiczny, opieka zdrowotna, grzyby środowiskowe, Stachybotrys chartarium, Trichoderma viride

WSTĘP

Obecność pleśni w budynkach pociąga za sobą negatywne skutki dla zdrowia. Różnorodne mikroby, w tym szereg gatunków grzybów i bakterii, doskonale rowija się w warunkach oferowanych przez wilgotne materiały budowlane zawierające zarówno składniki odżywcze, jak i wilgoć niezbędną do rozwoju drobnoustrojów. Doprowadziło to do sformułowania „syndromu chorego budynku” (Sick Building Syndrome, SBS) dotyczącego osób bezpośrednio lub pośrednio dotkniętych obecnością grzybów i bakterii na powierzchniach i w powietrzu. Podobne sytuacje odnotowywano w ośrodkach opieki zdrowotnej, w szczególności na oddziałach intensywnej opieki medycznej, na których znajdować mogą się pacjenci szczególnie podatni na zanieczyszczenia drobnoustrojowe (Hope i Simon, 2007; Gniadek i Macura, 2007; Huttunen i in., 2008; Gottschalk i in., 2008). Poza ryzykiem zakażenia grzybami osób o obniżonej odporności, produkty rozwoju drobnoustrojów obejmują mykotoksyny, endotoksyny oraz liczne mikrobowe lotne związki organiczne (Volatile Organic Compounds, VOC). Produkty te mogą mieć działanie cytotoksyczne i uczulające lub wywoływać działanie mediatorów zapalnych (Hope i Simon, 2007; Huttunen i in., 2008).

Do usuwania uszkodzeń materiałów budowlanych i armatury spowodowanych rozwojem pleśni z pewnym powodzeniem wykorzystywanych jest szereg metod usuwania pleśni (Kleinheinz i in., 2006), które obejmują metody mechaniczne o nieodłącznych jednak wadach takich, jak koszty, nakłady pracy i konieczność wdychania zarodników. Dla przykładu – spory mogą wydostawać się z odkurzaczy piorących w przypadku braku odpowiedniej ilości cieczy. Materiały porowate, wilgotne i zapleśniałe, mogą wymagać usunięcia. Ponieważ pleśnie są w stanie infiltrować substancje porowate i rozwijać się lub wypełniać puste przestrzenie i szczeliny, ich całkowite usunięcie może okazać się trudne lub wręcz niemożliwe. Aerozole podchlorynu sodu okazały się skuteczne, jednak ogólnie nie do przyjęcia (Martyny i in. 2005).

Szacuje się, iż w samych Stanach Zjednoczonych naprawa budynków generuje wiele miliardów dolarów obrotów (Kleinheinz i in., 2006), z czego wynikają finansowe i zdrowotne podstawy do opracowania akceptowalnej, efektywnej procedury walki z pleśnią.

Skuteczność działania ozonu w walce z bakteriami wykazano w środowisku wodnym i gazowym, w różnego rodzaju zastosowaniach, np. w pralniach i zakładach spożywczych (Bialka i Demirci, 2007; Naitou i Takahara, 2008; Selma i in., 2008; Akbas i in., 2008).

Ozon posiada kilka zalet w porównaniu z alternatywnymi procedurami wykorzystującymi ciecze: jest łatwy i tani w produkcji, szybko rozprzestrzenia się w całym pomieszczeniu, w tym w pęknięciach i szczelinach, a choć toksyczny w wysokim stężeniu, naturalnie przekształca się w tlen. Dawki ozonu kon-

trolować można zdalnie, spoza poddanego jego działaniu i szczelnie zamkniętego pomieszczenia. Ozon jest również środkiem silnie utleniającym, zdolnym nie tylko do inaktywacji mikrobów obecnych na różnych powierzchniach (Sharma i Hudson, 2008), ale i skutecznym środkiem dezynfekującym, prawdopodobnie zdolnym do inaktywacji produktów rozwoju drobnoustrojów, o których mowa powyżej. Korzun i in. (2008) przeprowadzili niedawno ocenę skuteczności oddziaływania ozonu na szereg istotnych grzybów środowiskowych, uzyskując obiecujące wyniki, choć przyjęta przez nich dawka była niższa od opisywanej przez nas jako skuteczne stężenie antywirusowe i antibakteryjne (Hudson i in., 2007; Sharma i Hudson, 2008). W niniejszym raporcie opisano zastosowanie oryginalnego, przenośnego generatora ozonu jako skutecznego urządzenia przeciwgrzybicznego.

MATERIAŁY I METODY

Urządzenia

Laboratoryjną komorę testową stanowił pojemnik z prasowanego poliwęglanu, posiadający przezroczyste, plastikowe okienko przednie, podnoszone celem uzyskania dostępu do próbek. W komorze testowej umieszczono niewielki generator ozonu (Treated Air Systems, Vancouver) wyposażony w tarczę sterowania, na której ustawić można było wcześniej znane dawki ozonu wyrażone w ppm, rurkę próbnika ozonu podłączoną do zewnętrznego systemu pomiaru ozonu (zob. poniżej) oraz próbnik higrometru do pomiaru wilgotności względnej i temperatury. Poziom wilgotności ustalano ręcznie, dawkując mgłą dejonizowanej wody sterylnej.

Pomieszczenie badawcze do przeprowadzania badań terenowych stanowiło pomieszczenie biurowe o kubaturze 34 m³, zawierające standardowe meble biurowe, które znajdowało się w pobliżu laboratorium. W czasie badań wykorzystano generator ozonu 1000 Viroforce będący przenośnym modułem zawierającym szereg modułów do wyładowań koronowych, wentylator i wydajny katalizator (skruber) pozwalający na ponowne przekształcenie ozonu w tlen po upływie okresu ekspozycji ozonu (Rys 1). Ponadto, do zapewnienia niezbędnej pary wykorzystano ogólnie dostępny nawilżacz (Humidifirst Inc, Florida). Wszystkie elementy sterowane były zdalnie spoza pomieszczenia testowego.

W obu sytuacjach stężenie ozonu monitorowano w sposób ciągły z wykorzystaniem wytwarzanego przez Advanced Pollution Instrumentation Inc. systemu 450 (Teledyne, San Diego, CA), dokonującego pomiarów próbek ozonowanego powietrza przepuszczonego przez spektrometr UV. Teflonową rurkę do pobierania próbek umieścić można było w odpowiednim miejscu na cały czas trwania eksperymentu. Wilgotność względną i temperaturę mierzono z wykorzystaniem przenośnego higrometru (VWR Scientific, Ontario). Próbki umieszczono w łatwym dostępnym miejscu w pomieszczeniu testowym.

Podczas testów wstępnych wykorzystano 2-3 ręczne czujniki ozonu (Ecozone, USA) umieszczone w losowo wybranych miejscach celem potwierdzenia jednorodnego rozkładu ozonu w pomieszczeniu. Różnicowanie pomiędzy poziomami ozonu zmierzonymi z wykorzystaniem czujników i próbnika nie przekraczało $\pm 10\%$.



Rys. 1. Programowalny generator ozonu Viroforce 1000 (z prawej) i dodatkowy nawilżacz z jednostką sterowania oraz zbiornikiem wody (z lewej).

Materiały

Jako powierzchnie plastikowe wykorzystane zostały wieka sterylnych, polistyrenowych tacek do hodowli tkankowych. Próbkę tkanin i bawełny (charakterystycznych dla szpitali i pokoi hotelowych) pocięto na niewielkie elementy, oczyszczono z wykorzystaniem detergentu, przemyto, wysuszone i wyjałowiono w autoklawie. Patyczki higieniczne i inne materiały podgrzewano w kuchence mikrofalowej przez 2 minuty. Bydlęcą surowicę płodową i PBS (buforowaną fosforanami sól fizjologiczną) pozyskano od firmy Invitrogen (Ontario). Sterylne, plastikowe, 24-otworowe tacki i inne materiały eksploatacyjne marki BD-Falcon pozyskano od firmy VWR Scientific (Ontario). Tacki Sabouraud-dextrose pozyskano od firmy PML Microbiologicals, Willsonville, Oregon.

Szczepy grzybów

Poniższe szczepy grzybów zostały pobrane w zniszczonych budynkach w stanie Kolumbia Brytyjska i oznaczone przez dr Eduardo Jovela z Uniwersytetu stanu Kolumbia Brytyjska, dzięki uprzejmości którego pozyskaliśmy ich kolonie wyhodowane na tackach agarowych: *Alternaria sp.*, *Aspergillus (flavus, niger, fumigatus)*, *Aureobasidium sp.*, *Botrytis sp.*, *Cladosporium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.*, *Penicillium brevicompactum*, *Stachybotris chartarium*, *Trichoderma viride*, *Ulocladium sp.* Wykorzystane zostały również szczepy ATCC *Candida albicans* i *A. flavus*. *C. albicans* wykorzystano zarówno jako komórki drożdży, jak i jako formy strzępkowe.

Wszystkie organizmy umieszczono i przechowywano w laboratorium na standardowych tackach agarowych Sabouraud-dextrose (PML Microbiologicals, Oregon). Kolonie *C. albicans* otrzymano w identyczny sposób, a wymieszane populacje komórek drożdży i strzępki (w stosunku ok. 1:1) otrzymano poprzez wyhodowanie komórek w płynie Dulbecco MEM uzupełnionym o 10% bydlęcą surowicę płodową. Komórki i strzępki pobrano poprzez odwirowanie i ponowne umieszczenie w PBS do dalszych badań.

Procedura badań

Inokulum kultur pleśni przygotowano poprzez wycięcie 5-mm³ bloków agaru zawierających aktywnie rosnące grzybnie i spory, a następnie umieszczenie ich w 5 ml PBS (buforowanej fosforanami soli fizjologicznej). Materiał poddano dokładnej homogenizacji w wirówce. Nie podejmowano prób oddzielenia grzybni od sporów, w związku z czym każdy preparat zawierał mieszaninę obu tych form i uznany został za reprezentatywny dla kultur rozwijających się w środowisku naturalnym. W przypadku niektórych eksperymentów sterylną bydlęcą surowicę płodową wymieszano z PBS celem pozorowania obciążenia organicznego (i wykazania, czy obciążenie organiczne ma wpływ na przeciwgrzybiczne działanie ozonu). Początkowe stężenie każdego preparatu (cfu/ml) różniło się ze względu na różny stopień wzrostu i gęstość organizmów zawartych w blokach agaru.

Badania ilościowe przeprowadzono w następujący sposób: Każdą próbkę składającą się z 100 pl zawiesiny dwukrotnie umieszczono na sterylnej powierzchni wieka plastikowej tacki w biobezpiecznej osłonie do wyschnięcia (ok. 45 min.). Suche próbki osłonięto i umieszczono w różnych miejscach komory testowej lub pomieszczenia testowego, w przypadku którego generator ozonu i urządzenie nawilżające (RHD) umieszczono centralnie. Urządzenia te obsługiwane były zdalnie spoza pomieszczenia. Wszystkie otwory wentylacyjne i okna w pomieszczeniu zostały szczelnie zamknięte. Wraz z rozpoczęciem testu próbki odsłonięto, drzwi zamknięto i uszczelniono taśmą, a generator włączono z wykorzystaniem programowalnego pilota zdalnego sterowania.

Poziom ozonu osiągnął wartość 35±5 ppm w ciągu kilku minut i utrzymał się do czasu upływu 20 minut. Następnie włączono RHD celem doprowadzenia mgły wody na okres 5 min. Zarówno generator ozonu, jak i RHD zostały następnie wyłączone na kolejne 5 min. celem umożliwienia „inkubacji” w wilgotnej atmosferze (wilgotność względna zazwyczaj osiągała poziom 99%). Następnie włączony został katalizator celem usunięcia całości ozonu. Poziom ozonu spadł poniżej 1 ppp w ciągu 15 min., po czym otwarto drzwi i zabrano próbki testowe. Wszystkie testy przeprowadzono w temperaturze otoczeni wynoszącej 19-21 °C.

W testach laboratoryjnych, po upływie 20-min. ekspozycji ozonu w poliwęglanowej komorze testowej, okno podniesiono n chwilę celem doprowadzenia mgły sterylnej, czystej wody ze spryskiwacza. Doprowadziło to do gwałtownego wzrostu wilgotności względnej do poziomu 90-99%.

Wszystkie próbki ponownie umieszczono w PBS (buforowanej fosforanami soli fizjologicznej), w której sporządzono kolejno dziesięciokrotne roztwory. Pobranie próbek z materiałów innych, niż sztuczne wymagało dodatkowego odwirowania i wyciśnięcia tych materiałów. Tym niemniej, preparaty kontrolne dla takich próbek poddano identycznej obróbce. Alikwoty 2,5 pl zlokalizowano i zaoczkowano na tackach Sabouraud-dextrose. Próbkę kontrolną, nie poddaną obróbce, przez cały czas przechowywane były w biobezpiecznej szafce. Tacki agarowe poddano inkubacji w temperaturze 35 °C przez minimum 48 godzin, po czym kolonie grzybów zostały przeliczone.

Jak wcześniej wskazano, w przypadku niektórych eksperymentów wilgotne Inokulum grzybów wykorzystywane bez osuszania, a w innych natomiast testy próbek wilgotnych i suchych przeprowadzono przy wilgotności względnej otoczenia wynoszącej 40-45%.

WYNIKI

Badania laboratoryjne

Wszystkie 13 gatunków grzybów, w tym komórki i strzępki *Candida albicans*, początkowo poddano badaniu na podatność na działanie ozonu w testach laboratoryjnych. Zreplikowane, 100-ml próbki zawiesiny grzybów w PBS osuszono na sterylnych tackach plastikowych w biobezpiecznej szafce, a następnie poddano działaniu standardowej dawki ozonu (35 ppm przez 20 min.). Badania wstępne wykazały, iż niższe stężenia ozonu były mniej skuteczne.

Wyniki podsumowano w tabeli 1. Ze względu na straty cfu podczas osuszania, jak również rozcieńczanie na etapie oznaczania próbek, nie zawsze było możliwe określenie dokładnych punktów końcowych inaktywacji. Tym niemniej, w przypadku wszystkich gatunków grzybów, jeśli wilgotność względna przekraczała 90%, spadek przekraczał 3 log₁₀. Nie wszystkie gatunki poddano badaniu przy zachowaniu wilgotności względnej otoczenia. W przypadku *C. albicans* i *Trichoderma viride* wartości te nie przekraczały 4,0 log₁₀. Wyniki te wskazują również, iż wilgotne warstwy wszystkich gatunków grzybów były równie podatne.

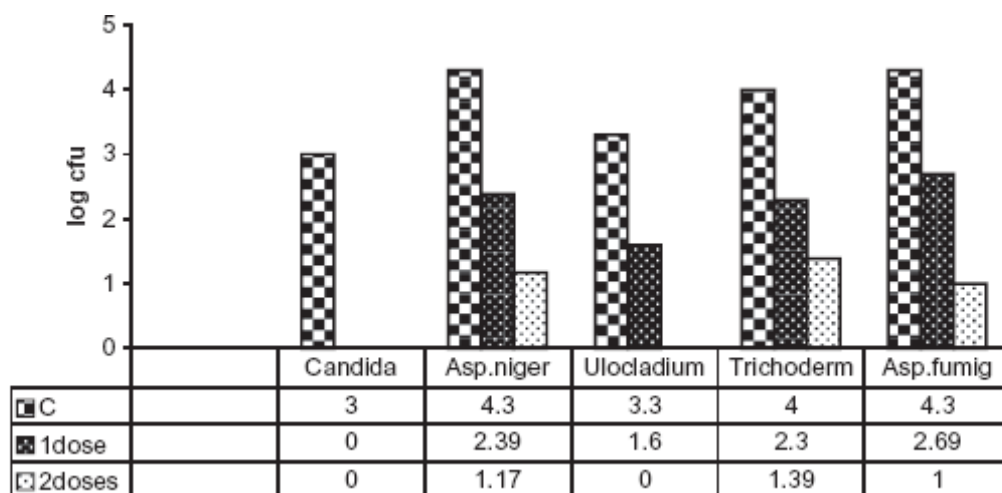
W przypadku niektórych eksperymentów przed suszeniem w próbkach umieszczono do 50% objętości bydłcej surowicy płodowej. Nie miało to jednak wpływu na wyniki (dane nie zostały przedstawione). Grzyby *Candida albicans* i *Trichoderma viride* zbadano również na kilku innych powierzchniach, papierze filtracyjnym, bawełnie, kartonie i tkaninie, i uznane zostały za równie podatne na działanie ozonu, co przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 1. Podatność grzybów na ozon

Gatunek	Redukcja log ₁₀ cfu (jednostek tworzących kolonie)		
	Próbka wilgotna wysoka wilgotność względna (> 90%)	Próbka sucha wysoka wilgotność	Próbka sucha/wilgotna niska wilgotność (45%)
<i>Aspergillus species (flavus, niger, fumigatus)</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	~1.5
<i>Aureobasidium species</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	nt
<i>Botrytis species</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	nt
<i>Candida albicans</i> (cells and hyphae)	≥4.0	≥4.0	1.5–2.0
<i>Cladosporium species</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	~1.0
<i>Geotrichum species</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	nt
<i>Mucor species</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	~1.0
<i>Penicillium brevicompactum</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	nt
<i>Stachybotris chartarium</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	~1.0
<i>Trichoderma viride</i>	≥4.0	≥4.0	~1.5
<i>Ulocladium species</i>	➤ 3.0	➤ 3.0	~1.0

TABELA 2. Podatność *Trichoderma viride* i *Candida albicans* na ozon na różnych powierzchniach: Redukcja lg₁₀ cfu (jednostek tworzących kolonie)

Grzyby	Plastik	Bawełna	Tkanina	Papier filtr.	Karton
<i>Trichoderma viride</i>	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
<i>Candida albicans</i>	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4



Rys 2. Przeciwgrzybiczy wpływ jednej i dwóch dawek (cykli obróbki) ozonu przy wysokiej wilgotności (> 90% wilgotności względnej). Wartości wyrażone jako cfu (jednostek tworzących kolonie) na 2,5 ml regenerowanych próbek (szczegółowe informacje zawarto w części poświęconej materiałom i metodom). 5 wskazanych organizmów (*Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Ulocladium sp.*, *Trichoderma viride*, *Aspergillus fumigatus*) jednocześnie poddano jednemu cyklowi standardowego cyklu pracy generatora ozonu w pomieszczeniu testowym. Połowę próbek (wszystkie w dwóch egzemplarzach) pobrano z pomieszczenia i poddano regeneracji, zamiast pozostałą połowę poddano kolejnemu cyklowi obróbki, a dopiero wtedy regeneracji. Próbkę kontrolną przechowywano w biobezpiecznej szafce przez cały czas trwania eksperymentu. Początkowe stężenia dla powyższych 5 organizmów różniły się od siebie. Po jednym cyklu nie wykryto żadnych cfu *C. albicans*; po dwóch cyklach nie wykryto żadnych cfu *Ulocladium*.

Badania terenowe

Badania terenowe przeprowadzono w pomieszczeniu biurowym sąsiadującym z laboratorium. Pomieszczenie o kubaturze 34 m³ wyposażone było w standardowe meble biurowe, posiadało również duże okno. Początkowo, do oceny efektywności działania prototypu generatora ozonu i szybkiego nawilżacza wykorzystano gatunek *C. albicans*. W trakcie standardowego programu poziom ozonu wzrósł w ciągu kilku minut do maksymalnej wartości 35±5 ppm i utrzymał się na niej do końca 20-minutowego okresu, kiedy to automatycznie włączano nawilżacz.

Wilgotność względna wzrosła gwałtownie od poziomu wilgotności otoczenia (40-45% wilgotności względnej) do poziomu przekraczającego 90% (zazwyczaj 99%) w ciągu zaledwie 5 min. Po upływie kolejnych 5 minut inkubacji na tym poziomie generator i nawilżacz wyłączono, włączono natomiast katalizator. Stężenie ozonu spadło poniżej 1 ppm po upływie 15 minut, kiedy to próbki zebrano i przeniesiono do laboratorium do dalszej obróbki. Pojedyncza ekspozycja *C. albicans* na takie działanie stale prowadziła do inaktywacji ponad 3 log₁₀ cfu (Rys. 2); w przypadku większości testów doprowadzono do całkowitej ich eliminacji.

Pozostałe gatunki grzybów zbadano w grupach z wykorzystaniem identycznych procedur. Większość z nich wydawała się charakteryzować większą odpornością, niż *C. albicans* ze względu na to, iż pojedynczy cykl zwykle nie wystarczał do wyeliminowania wszystkich badanych organizmów. Tym niemniej, drugi cykl obróbki, przeprowadzony tuż po pierwszym, okazał się o wiele bardziej skuteczny, co przedstawiono Rys. 2. We wszystkich przypadkach po drugim cyklu liczba cfu była niższa. Dlatego w kolejnych testach przeprowadzono dwa kolejne, standardowe cykle, choć maksymalny poziom ozonu osiągnięty w trakcie drugiego cyklu był znacznie niższy (ok. 20 ppm) ze względu na szczątkową wilgotność będącą pozostałością cyklu pierwszego (wydajność generatora ozonu uległa pewnemu zmniejszeniu przy wysokiej wilgotności względnej).

Podobne wyniki uzyskano w przypadku warstw wilgotnych gatunków wskazanych na Rys. 2. Pozostałe gatunki grzybów poddano dwóm cyklom, ustalając, iż są one podatne na działanie ozonu, choć wystąpiły pewne różnice dotyczące względnej podatności każdego z gatunków, czego jednak nie poddano systematycznym badaniom. Różnice dotyczące maksymalnej inaktywacji log₁₀ w przypadku niektórych gatunków stanowiły odzwierciedlenie różnych stężeń początkowych. *Stachybotris* i *Botrytis* były szczególnie trudne do uzyskania w przypadku wysokiej liczby cfu/ml.

W trakcie testów dodatkowych zreplikowane próbki gatunku *Trichoderma viride* osuszono na plastikowych tackach, jak również na próbkach tkanin, bawełny, papieru filtracyjnego i kartonu. Próbkę te umieszczono następnie w różnych miejscach pomieszczenia celem upozorowania możliwych miejsc zanieczyszczenia budynku. Wszystkie próbki wykazywały zbliżoną podatność na działania ozonu,

niezależnie od umiejscowienia lub powierzchni, na jakiej zostały one osuszone. Tym niemniej, po kilku dniach inkubacji próbek pojawiło się kilka kolonii w próbkach wygenerowanych z powierzchni nieplastikowych, które następnie rozprzestrzeniły się na podłoża o zbliżonym charakterze, co świadczyło o niepełnej inaktywacji.

DYSKUSJA

Liczne badania wskazują na to, iż ekspozycja na drobnoustroje znajdujące się w powietrzu wewnątrz budynku, wynikające z jego zawilgocenia, może stanowić przyczynę poważnych problemów zdrowotnych, w tym podrażnień, infekcji dróg oddechowych oraz zwiększonego ryzyka zachorowania na astmę, a także wielu innych symptomów i chorób wywoływanych przez mykotoksyny i lotne związki organiczne (Lai, 2006; Gniadek i Macura, 2007; Hope i Simon, 2007; Gottschalk i in., 2008; Huttunen i in., 2008). Poza tym, niektóre gatunki powiązane z zagrażającymi życiu zakażeniami oportunistycznymi u pacjentów z obniżoną odpornością (Marr i in., 2002).

Dekontaminacja z wykorzystaniem ozonu ma szereg potencjalnych zalet. Ozon jest w stanie skutecznie spenetrować każdą część pomieszczenia, w tym miejsca, gdzie dostęp oraz zastosowanie konwencjonalnych płynów i ręcznych procedur konserwacyjnych może okazać się utrudnione. Proces można aktywować i dezaktywować z zewnątrz, po uszczelnieniu pomieszczenia. Ozon jest tani w produkcji, i- choć toksyczny – szybko przekształca się w tlen, a okres połowicznego rozpadu wynosi ok. 20 min. Wykorzystanie katalizatora znacznie przyspiesza proces eliminacji grzybów/pleśni. Ozon wskazywany jest jako bezpieczny środek dezynfekujący w przemyśle spożywczym i rolnictwie (Serra i in., 2003; Bialka i Demirci, 2007; Akbas i Ozdemir, 2008; Naitou i Takahara, 2008; Selma i in., 2008), chociaż zazwyczaj w niższych stężeniach, niż zastosowane z obecnych badań. Tym niemniej, ze względu na szybkość i skuteczność konwersji katalizacyjnej, prowadzącej do przywrócenia typowych wartości otoczenia w ciągu 15-20 minut, jak również całkowitej długości cyklu nieprzekraczającej jednej godziny, uważamy, że system Viroforce jest bezpieczny i praktyczny.

W niniejszych badaniach wykazano, iż prototypowy generator ozonu wytwarza ozon w stężeniu eliminujący obecność grzybów (rzędu 35 ppm). Potencjalne działanie grzybobójcze generatora ozonu po upływie 20 minut ekspozycji i przy wilgotności względnej poniżej 90% wykazano w odniesieniu do różnorodnych gatunków grzybów, w tym sporów wytwarzających pleśń. Inaktywacja próbek grzybów *Trichoderma* osuszanych na miękkich powierzchniach, jak np. tkaninach, bawełnie i papierze filtracyjnym, porównywalna była z zaobserwowaną w przypadku próbek umieszczonych na tworzywie sztucznym, co potwierdza, iż ozon może mieć właściwości grzybobójcze w przypadku próbek umieszczonych na zasłonach, bieliźnie, meblach i ścianach budynku lub zakładu opieki zdrowotnej. Ma to istotne znaczenie ze względu na fakt, iż niektórzy autorzy sugerują, że ozon w postaci gazowej może być mniej skuteczny w przypadku organizmów powiązanych z powierzchnią (Serra i in., 2003). Nie stanowiło to jednak ograniczenia dla naszych badań, być może ze względu na wyższego stężenia ozonu przez nas przyjęte.

Korzun i in. (2008) podniósł kilka kwestii istotnych dla zastosowania ozonu do eliminowania pleśni. W prowadzonych przez siebie badaniach uzyskał on istotny spadek liczby cfu grzybów, nie doprowadził jednak do całkowitego ich wyeliminowania ze względu na ekspozycję na stężenia ozonu nieprzekraczające 12 ppm. Stwierdziliśmy, iż do uzyskania 3 log₁₀ redukcji większości badanych grzybów konieczne jest zastosowanie znacznie wyższych stężeń i poddanie dwóm cyklom działania; wyjątek stanowi nieco bardziej podatny na działanie ozonu gatunek *C. albicans*, którego poziom ograniczono o 4 log₁₀ cfu już po pierwszym cyklu. Toksyczny potencjał wysokich stężeń ozonu wyeliminowano poprzez zdalną obsługę generatora i katalizatora, spoza szczelnie zamkniętego pomieszczenia. W przypadku większych pomieszczeń istnieje możliwość jednoczesnego zastosowania większej liczby takich urządzeń.

Korzun i in. (2008) przeprowadził badania konidii grzybów umieszczonych na powierzchni tacek agarowych. Stwierdziliśmy, iż możliwe jest wykorzystanie kilku różnych, twardych i miękkich powierzchni, natomiast dodanie do próbek surowicy celem upozorowania obciążenia organicznego nie ma wpływu na uzyskiwane wyniki. Zaniepokojenie Korzuna budziły również ograniczenia wielkościowe dotyczące systemu generowania ozonu. Tym niemniej, stosowane przez nas generatory można rozbudować lub zredukować, w zależności od wymogów. Zaniepokojenie budziły również możliwe ograniczenia dotyczące szczepów laboratoryjnych, które mogły zachowywać się w sposób odmienny od szczepów spotykanych w warunkach naturalnych. Większość badanych przez nas grzybów wyizolowano z budynków zniszczonych i poddano minimalnej obróbce w warunkach laboratoryjnych.

Wykorzystanie płynnych środków dezynfekujących do ogólnej dekontaminacji wymaga dużego nakładu pracy i nie jest zalecane w przypadku zasłon, ścian i sufitów, natomiast dekontaminacja z wykorzystaniem gazu jest łatwiejsza. Wykorzystanie ozonu może prowadzić również do wyeliminowania nieprzyjemnych zapachów, w tym powodowanych przez pleśń. Celem pełnego wyeliminowania pleśni zaleca się również kilkukrotne zastosowanie ozonu.

Mechanizm wpływu ozonu na grzyby i inne drobnoustroje nie został rozszyfrowany, jednak silnie utleniający wpływ na szereg makromolekuł (Cataldo, 2006) sugeruje, iż na wpływ ozonu podatne mogą okazać się błony bakteryjne, białka i kwasy nukleinowe. Tym niemniej, wysoka wilgotność niezbędna do uzyskania optymalnej efektywności wskazuje na to, iż jony wodorotlenowe, a możliwe, że również inne obecne w wodzie pierwiastki mogą uczestniczyć w tym procesie, co sugeruje się w przypadku środowisk wodnych (Lin i Wu, 2006).

MATERIAŁY REFERENCYJNE

- Akbas, M.Y. i M. Ozdemir, „Application of Gaseous Ozone to Control Populations of Escherichia coli, Bacillus cereus, and Bacillus cereus Spores in Dried Figs”, *Food Microbiol.*, 25:386-391 (2008).
- Bialka, K.L. i A. Demirci, „Decontamination of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella enterica on Blueberries Using Ozone and Pulsed UV-Light”, *J. Food Sci.*, 72:M391-M396 (2007).
- Cataldo, F. „Ozone Degradation of Biological Macromolecules: Proteins, Hemoglobin, RNA, and DNA”, *Ozone: Sci. Eng.*, 28:317-328 (2006).
- Gniadek, A. i A.B. Macura, „Intensive Care Unit Environment Contamination with Fungi”, *Adv. Med. Sci.*, 52:283-287 (2007).
- Gottschalk, C., J. Bauer i K. Meyer, „Detection of Satratoxin G and H in Indoor Air from a Water-Damaged Building”, *Mycopathologia*, 166:103-107 (2008).
- Hope, A.P. i R.A. Simon, „Excess Dampness and Mold Growth in Homes: An Evidence-based Review of the Aeroirritant Effect and its Potential Causes”, *Allergy Asthma Proc.* 28:262-270 (2007).
- Hudson, J.B., M. Sharma, i M. Petric, „Inactivation of Norovirus by Ozone Gas in Conditions Relevant to Healthcare”, *J. Hosp. Inf.*, 66:40-45 (2007).
- Huttunen, K. H. Rintala, M.-R. Hirvonen, A. Vepsäläinen, A. Hyvärinen, T. Meklin, M. Toivola i A. Nevalainen, „Indoor Air Particles and Bioaerosols Before and After Renovation of Moisture-Damaged Buildings: The Effect on Biological Activity and Microbial flora. *Environ. Res.*, 107:291-298 (2008).
- Kleinheinz, G.T., B.M. Langolf, i E. Englebert, „Characterization of Airborne Fungal Levels after Mold Remediation”, *Microbiol. Res.*, 161:367-376 (2006).
- Korzun, W., J. Hall i R. Sauer, „The Effect of Ozone on Common Environmental Fungi”, *Clin. Lab. Sci.*, 21:107-111 (2008).
- Lai, K.M. „Hazard Identification, Dose-Response and Environmental Characteristic of Stachybotryotoxins and other Health-related Products from Stachybotrys”, *Environ Technol.*, 27(3):329-335 (2006).
- Lin, Y.-C. i S.-C. Wu, „Effects of Ozone Exposure on Inactivation of Intra- and Extracellular Enterovirus 71”, *Antiviral Res.*, 70:147-153 (2006).
- Marr, K.A., R.A. Carter, F. Crippa, A. Wald i L. Corey, „Epidemiology i Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients”, *Clin. Infect. Dis.*, 34:909-917 (2002).
- Martyny, J.W., R.J. Harbeck, K. Pacheko, E.A. Barker, M. Sills, L. Silveira, S. Arbuckle, L. Newman, „Aerosolized Sodium Hypochlorite Inhibits Viability and Allergenicity of Mold on Building Materials”, *J. Allergy Clin Immunol.*, 116:630-635(2005).
- Naitou, S. i H. Takahara, „Recent Developments in Food and Agricultural Uses of Ozone as an Antimicrobial Agent - Food Packaging, Film Sterilizing Machine Using Ozone”, *Ozone: ScienceEng.*, 30:81-87 (2008).
- Selma, M.V., A. Allende, F. Lopez-Galvez, M.A. Conesa i M.I. Gil „Disinfection Potential of Ozone, Ultraviolet-C, and Their Combination in Wash Water for the Fresh-Cut Vegetable Industry”, *Food Microbiol.*, 25:809-814 (2008).
- Serra, R. L. Abrunhosa, Z. Kozakiewicz, A. Venancio, i N. Lima, „Use of Ozone to Reduce Molds in a Cheese Ripening Room”, *J. Food Protect.*, 66:2355-2358 (2003).
- Sharma, M. i J.B. Hudson, „Ozone Gas is an Effective and Practical Antibacterial Agent”, *Am. J. Infect. Control*, 36:559-563 (2008).
- Stark, H., M. Roponen, M. Purokivi, J. Randell, H. Tukiainen, i M.R. Hirvonen, „Aspergillus fumigatus Challenge Increases Cytokine Levels in Nasal Lavage Fluid”, *Inhal Toxicol* 18(13): 1033-1039 (2006).
- Stratus, D.C. i S.C. Wilson, „Respirable Trichothecene Mycotoxins Can be Demonstrated in the Air of Stachybotrys chartarum-Contaminated Buildings”, *J. Allergy Clin Immunol.* 117(2):326-333 (2006).