Publikálva:

Neményi, M. – Lőrincz, A. (2002): Komplex ultrahangrendszer értékelése a besugárzás miatt kialakult mikroorganizmus-csíraszám csökkentő hatás alapján. MTA-AMB Kutatási-Fejlesztési Tanácskozás, Gödöllő, 2002. január 20-21. Vol. 2. pp. 145-149.

Komplex ultrahangrendszer értékelése a besugárzás miatt kialakult mikroorganizmus-csíraszám csökkentő hatás alapján

1. Bevezetés

Az élelmiszereink minőségét veszélyeztető ágensek közül a mikroorganizmusok, mint ételfertőzést, illetve bizonyos körülmények között ételmérgezést előidéző szervezetek az élen járnak. Sok technológiai megoldás áll a modern élelmiszeripar rendelkezésére, hogy ezt a veszélyforrást a minimálisra csökkentse. Ezek a megoldások azonban a mai élelmiszerekkel szemben támasztott követelményeknek nem minden esetben felelnek meg. Erre példa, hogy a legáltalánosabban alkalmazott hőkezelés során egyes vitaminok inaktiválódhatnak, vagy a fehérjék denaturálódhatnak, így az adott élelmiszer biológiai értéke csökkenhet. Természetesen vannak az egyes élelmiszerekre speciálisan alkalmazott precíziós csíraszám csökkentési eljárások is, amelyek bekerülése jóval nagyobb költségráfordítást igényel a hagyományos módszerekkel szemben. Azonban az ebből származó piaci versenyhelyzet előny miatt az élelmiszeriparban reményeink szerint ez utóbbi törekvés kerül előtérbe. Az általunk vizsgált ultrahangos csírátlanítási módszer nem újdonság az élelmiszeriparban. A hetvenes évek népélelmezési törekvései természetesen a módszer alkalmatlanságát bizonyították. A mai társadalmi fogyasztói igények azonban lehetővé teszik kiváló minőségű élelmiszerek előállítását. Ezen gondolatok alapján végeztük el kísérleteinket, melyek eredményeképpen tovább bízhatunk a módszer alkalmazhatóságában.

2. Irodalmi áttekintés

Thacker[1], vizsgálta a haploid és diploid pékélesztő (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtek túlélését, és eltéréseket tapasztalt. Méghozzá ezzel kapcsolatban nem szinkronizált populációk vizsgálatát javasolja, a sejtek eltérő kavitációs érzékenysége miatt, ezáltal a kapott túlélési

görbék nem egy, hanem több fázisúak lesznek lefutásukban. Emiatt az eredményei bizonyos eltérést mutattak a szokványos exponenciális túlélési görbétől, habár a kavitációs határon dolgozó kutatók a pusztulási arányt az egyszerűség kedvéért állandó exponenciális lefutásúra veszik. **Hughes[2],** szintén élesztő sejteket tárt fel kavitáció segítségével és arra a megállapításra jutott, hogy a kavitáció során keletkező szabad gyökök kevésbé járulnak hozzá a sejtek feltáródásához, mint a kavitáció mechanikai roncsoló hatásai. **Hradzia[3],** ezzel kapcsolatosan azt állítja, hogy a sejt szuszpenziókban keletkező szabadgyökök és más anyagok által kiváltott szonokémiai hatások a sejtek életképességének mindössze 2-3 %-os csökkenését okozzák. **Thacker[4],** vizsgált továbbá négy genetikai rendszerhez tartozó élesztő sejteket, az ultrahang mutagén hatásának tekintetében. A mitokondriális DNS-ben legtöbbször mutációs hatás volt kimutatható, azon a frekvencián és intenzitáson, ahol kavitáció alakult ki. A mutagén hatás pedig növekedett a hőmérséklet emelkedésével. **D.E Hughes és W.L. Nyborg[5]**, Vizsgálták az *Escherichia coli* baktériumok ultrahang általi pusztulását, és azt tapasztalták, hogy stabil kavitáció esetében is megtörtént a sejtek pusztulása, így ez alapján azt állítják, hogy a tranziens, összeomló típusú kavitáció nem elengedhetetlen a sejtek széttöredezéséhez. **Ter Haar[6]** szerint, az ultrahangnak alávetett sejtek esetében, amelyeknél hőmérséklet növekedés lép fel és amely sejtek nem pusztulnak el rögtön, ott szaporodóképesség vesztés lép fel. **Chapmann[7],** kimutatta, hogy az ultrahang képes szubletális változásokat indukálni a plazmamembránban például a kálium anyagforgalom azonnali csökkenésével.

3. Anyag és módszer

Kísérleti teszt mikroorganizmusként 1 g pékélesztőt (*Saccharomyces cerevisiae*) szuszpendáltattunk 500 ml vízben, így a sejtkoncentráció $2*10^6$/ml. A jobb detektálhatóság miatt a szuszpenzióba egy csepp metilén kék oldatot cseppentettünk ez így még nem befolyásolta a mikroorganizmus vitalitását. Ezt a szuszpenziót folyadékáramoltatásos rendszerbe töltöttük perisztaltikus pumpa segítségével. A folyadékáramoltatásos rendszert azért alkalmazunk, mert a különböző céllal alkalmazott szerkezeti

egységeket lehetetlen egy térben elhelyezni. A folyadékot a betöltés és a rendszer rövidre zárása után a perisztaltikus pumpa keringeti a különböző szerkezeti egységek között. A folyadékot ezek után nem közvetlenül, hanem speciálisan erre a célra kialakított átfolyó küvetták által kezelhetjük, illetve vizsgálhatjuk. Így a szuszpenzió speciálisan kialakított ultrahangos kezelő küvettákon keresztül csatlakozik az ultrahangos rendszerhez, ahol a tulajdonképpeni kezelés történik adott frekvencián és teljesítményen. Majd a folyadék tovább haladva a detektorként alkalmazott biológiai mikroszkópban elhelyezett detektorcellába jut, ahonnan a kép CCD kamerán át a számítógépes archiváló rendszerbe, illetve egy speciális álszín-kódoló nevű műszerbe jut. A műszer a szürkeségi fokok alapján képes különbséget tenni az objektumok között, és ezt területegységre vonatkoztatja. A területegységeket két pontos kalibráció alapján is képes állandóan nyomon kísérni és jelen esetben a sejtpusztulás mértékét az előzetesen kalibrált 100%-os értékhez képest kijelezni, valamint ezt az értéket feszültségjellé alakítva egy plotterhez irányítani, ahol idő függvényében görbét kapunk, amely alapján a mindenkori sejtkoncentrációt kísérhetjük nyomon. A rendszerhez tartozik még egy termosztát, amely állandó hőmérsékletet biztosít. A rendszerek egymáshoz kapcsolódnak. Mivel az analitikai egység még fejlesztési stádiumban van, a kapott sejtszám értékek a folyadékrendszer megcsapoló csonkján időegységenként vett minta sejtszámának immerziós objektív alatti leszámolásával kerülnek meghatározásra. Sejtnek minden esetben az ép sejtfallal rendelkező vitalitást tükröző sejtek minősülnek. A kezeléseket 0,8-1MHz frekvencia mellett 7,5; 9,6; 10,5 és 12 W/cm^2 teljesítményeken végeztük és meghatározott időpontokban mintát vettünk a szuszpenzióból, amit kiértékeltünk az immerziós objektív alatt látható átlagos sejtszámok alapján.

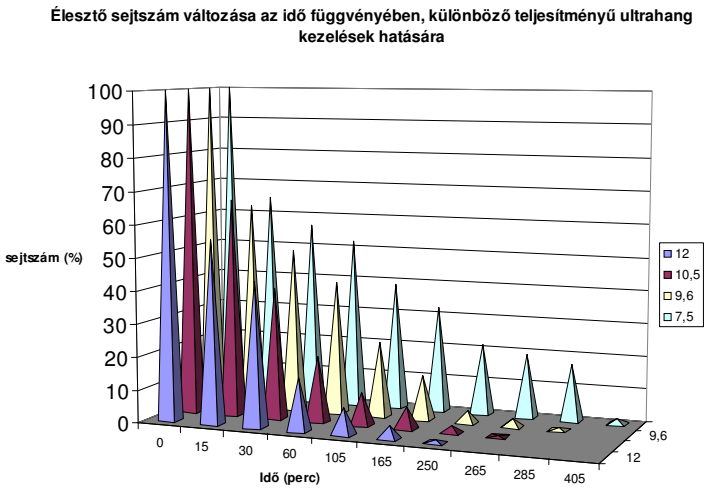
4. Eredmények és értékelésük

A mintavételek sejtszám alakulása százalékos arányban az 1. táblázatból, és az 1. ábrából látszik. Láthatjuk hogy a nagyobb teljesítmények alkalmazása mellett az idő függvényében drasztikusabb sejtpusztulások figyelhetők meg. Hogy egy modellképletet kaphassunk, a rendszert 22 db/látótér kiinduló sejtszámokra korrigáltuk (2. táblázat) és ezeket az értékeket pontdiagramban

ábrázoltuk. A pontokra különböző trendfüggvényeket helyezve (2. ábra) a logaritmusos trendfüggvények mutatták a legmagasabb szintű korrelációt. A függvények addíciós és szorzó tényezőire trend függvényeket helyezve, végeredményképpen a 3. táblázatban látható képletet kaptuk. Ennek segítségével kiszámítható, hogy adott kiinduló sejtszámú anyagot mekkora *teljesítményű* ultrahanggal kell kezelni, hogy a sejtszám a kívánt értékre csökkenjen adott idő elteltével, vagy éppen egy állandó teljesítményű ultrahang behatás *idejét* lehet meghatározni a szükséges sejtszám eléréséhez. Természetesen ezek az értékek a mi rendszerünkre vonatkoznak, és általános alkalmazhatóságához korrekciós tényezőt kell alkalmazni az aktuális viszonyoknak megfelelően. Végül az 3. ábrán a 7,5 W/cm^2 teljesítményű kezelés visszahelyettesítését mutatja, azt hogy a képlet a valóságos kiinduló sejtszámhoz képest soha nem mutat 15%-nál nagyobb eltérést.

1, táblázat: Látóterenkénti sejtszám alakulása az idő függvényében a kiindulási sejtszámot 100%-ban meg határozva

	Immerziós	látóterenkénti	sejtszám	(%)
kezelési idő (perc)	7,5W/cm^2	9,6W/cm^2	10,5W/cm^2	12W/cm^2
0	100	100	100	100
15	65,21	63,63	66,66	56
30	56,552	50	40	44
60	52,17	40,9	20	16
105	39,13	22,72	10	8
165	32,6	13,63	6,66	4
250	21,73	3,63	2	0,8
265	19,56	2,27	0	
285	17,39	0,9		
405	1,7			

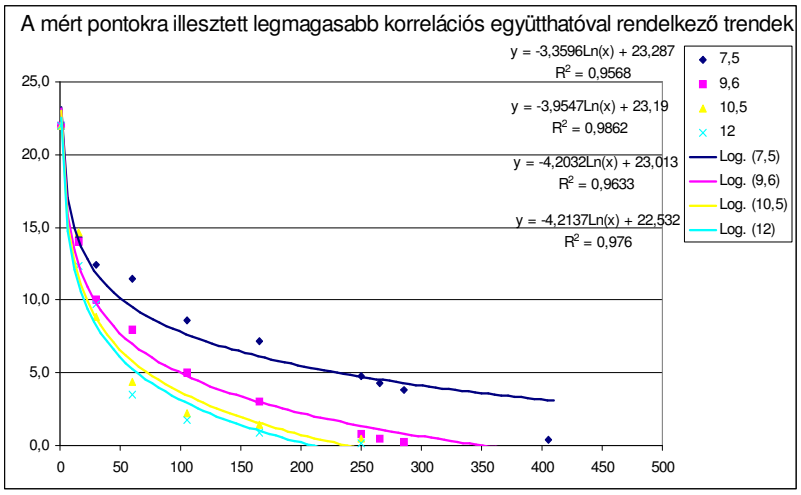


1. ábra: Élesztő sejtszám változása az idő függvényében a különböző teljesítményű ultrahang kezelések hatására

2, táblázat: 22 db/ látótér sejtszámra korrigált kiindulási sejtszám

Az immerziós látótérben számlált sejtek számának 22 darabra történő korrekciója a logaritmusos trendfüggvény érdekében

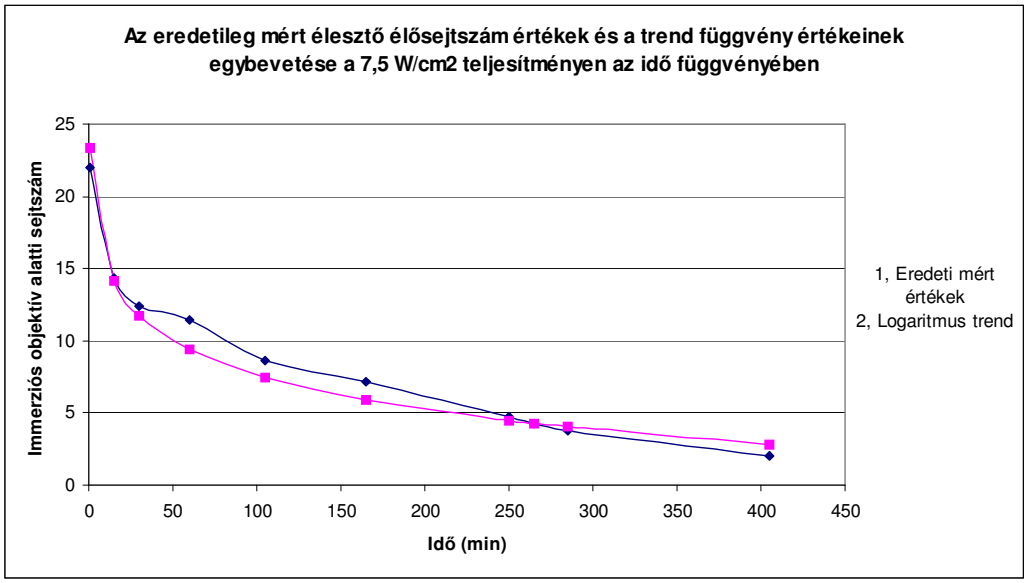
	7,5	**9,6**	**10,5**	**12,0**	**4,0**	**40,0**
1	22,0	22,0	22,0	22,0	24,4	20,9
15	14,3	14,0	14,7	12,3	18,5	2,9
30	12,4	11,0	8,8	9,7	16,9	-1,8
60	11,5	9,0	4,4	3,5	15,4	-6,4
105	8,6	5,0	2,2	1,8	14,2	-10,1
165	7,2	3,0	1,5	0,9	13,2	-13,1
250	4,8	0,8	0,4	0,2	12,2	-15,9
265	4,3	0,5			12,1	-16,3
285	3,8	0,2			12,0	-16,8
405	0,4				11,2	-19,1



2. ábra: 22 db/ látótér sejtszámra korrigált kiindulási sejtszám pontdiagrammja, illetve az alap trendfüggvények

3. táblázat: a végső összefüggés az ultrahangos kezelés modellezésére

$y=a*\ln x_0+b$ (x_0=idő, min) $a=-1.9376*\ln x_1+0.4753$ (x_1=teljesítmény, W/cm2) $b=-1.5277*\ln x_1+26.567$ (X_1=teljesítmény, W/cm2)



3. ábra: a valós és a képlet alapján számított értékek egymásra vetítése

5. Következtetés

Az ultrahangos kezelés nagy reményeket nyújt a precíziós fizikai élelmiszerkezelések csoportjában. A jövőben a mikrobiális szelektivitás vizsgálata, a koncentráció és hőmérséklet függés tanulmányozása a célunk.

6. Irodalomjegyzék

1. 1. Thacker, J. (1973): An approach the mechanism of killing cells in suspension by ultrasound. Biochem. Biophis. Acta. 304, 240.
2. 2. Hughes, D. E. (1961): J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng., 3. p. 405.

3. 3. Hrazdira, I. – Skorpikova, J. – Dolnikova, M. –Janicsh, R. – Mornstein, V. (1998): The combined effect of ultrasound and cytostatic treatment on the cytoskeleton of HeLa cells. Folia Biol, 44 (Suppl.): S 14.
4. 4. Thacker, J. (1974): Brit. J. Radiol. 47, p.130.
5. 5. Hughes, D. E. and Nyborg, W. L. (1962): Cell disruption by ultrasound. Science, 38:108-114s
6. 6. ter Haar, G. R. – Straford, I. J. – Hill, C. R. (1980): Br. J. Radiol. 53, 784.
7. 7. Chapman, I. V. (1974): Br. J. Radiol. 47, 411.