

ZDZISŁAW STARONIEWICZ, PIOTR LUBICKI*, BOLESŁAW MAZUREK*

Dezaktywacja bakterii przy użyciu wysokich napięć impulsowych

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

*Instytut Podstaw Elektrotechniki i Elektrotechnologii Politechniki Wrocławskiej, Pl. Grunwaldzki 13, 50-377 Wrocław

Summary

Deactivation of bacteria by using high impulsive voltages

The influence of high impulse voltages on Gram negative (*Escherichia coli*) and Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*) bacteria was examined. The impulses were produced in a one-grade generator of high insult voltages. A complete reduction of *E. coli* was noted for $U = 40$ kV and $n = 50$. On the other hand, for *S. aureus* and *L. monocytogenes* the number of live bacterial cells in one cubic cm was reduced by four or three grades of value. The observed differences in the survival of the bacteria examined result from differences in bacterial wall structure, size and shape. On the basis of the research we may conclude that the impulsive electric field may destroy microbial cells. Therefore, high impulsive voltage methods may be used to sterilize consumptive liquids.

Destrukcyjny wpływ wysokich napięć impulsowych na komórki bakterii i grzybów stwierdzono w latach sześćdziesiątych (8). Skuteczność niszczenia komórek zależy od wartości przyłożonego pola elektrycznego i od całkowitego czasu jego trwania (2). Pod wpływem pola elektrycznego o określonej wartości w ścianie komórkowej tworzą się pory; jest to zjawisko elektroporacji (10). Istnieją dwa rodzaje elektroporacji: odwracalna i nieodwracalna. Elektroporacja odwracalna została wykorzystana w inżynierii genetycznej do łączenia komórek (elektrofuzja) oraz do wprowadzania do wnętrza komórki elementów genetycznych bez jej uszkodzenia (elektroiniekcja) (7, 10). Rozwijane obecnie badania, dotyczące możliwości zastosowania zjawiska elektroporacji nieodwracalnej do niszczenia mikroorganizmów, skupiają się głównie na sterylizacji cieczy farmakologicznych i konsumpcyjnych (1, 3, 4, 5, 6).

Mechanizm elektroporacji nieodwracalnej, ze względu na właściwości elektryczne ściany komórkowej (dielektryk o przenikalności względnej $\epsilon=2-10$), płynu wewnątrz komórki ($\epsilon=45-60$, rezystywność $\rho=10-10^2 \Omega\text{cm}$) oraz cieczy, w której żyje komórka ($\epsilon=60-80$, rezystywność $\rho=10^2-10^4 \Omega\text{cm}$), można podzielić na kilka etapów (4, 5, 7, 10). W pierwszym etapie następuje akumulacja ładunków elektrycznych, która powoduje powstawanie różnicy potencjałów pomiędzy powierzchniami ściany komórkowej (czas trwania $t \approx 500$ ns – jest to czas „ładowania się” ściany komórkowej). Następnie obserwuje się dalszy wzrost różnicy potencjałów i fluktuacje kształtu ściany komórkowej (ściskanie i moment gnący) spowodowane powstaniem naprężeń mechanicznych pod wpływem oddziaływań kulombowskich pomiędzy powierzchniami ściany ($t \approx 1$ μs). Kolejny etap to powstawanie lokalnych przerw w ścianie komórkowej poprzez przemieszczenia molekularne ($t \approx 50$ ns). W ostatnim etapie elektroporacji nieodwracalnej następuje dalsza ekspansja porów i mechaniczne przerwanie ściany komórkowej ($t=1-10$ ms). Impulsy napięciowe zdolne zniszczyć

komórkę biologiczną powinny działać z częstotliwością $f < 10$ Hz i posiadać czas narostu $t_n > 500$ ns (5).

Ewentualne zastosowanie metody impulsów wysokiego napięcia do sterylizacji cieczy konsumpcyjnych wymaga uprzedniego zbadania wpływu impulsów wysokonapięciowych na komórki różnych grup drobnoustrojów.

Celem pracy było określenie wpływu niszczącego działania impulsowego pola elektrycznego na bakterie gramujemne (*Escherichia coli*) i gramododatnie (*Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*).

Materiał i metody

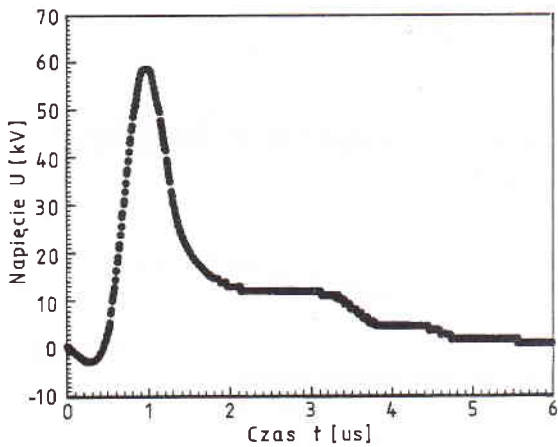
Do badań użyto szczepów wzorcowych *Escherichia coli* PCM 2057, *Staphylococcus aureus* PCM 520 (209 P) pochodzących z kolekcji drobnoustrojów Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. L. Hirszfelda PAN we Wrocławiu oraz szczepu *Listeria monocytogenes* (serotyp 4b) z kolekcji Katedry Mikrobiologii Weterynaryjnej AR we Wrocławiu. Z tych bakterii hodowanych na podłożu Tryptic Soy Agar (Difco) w temperaturze 37°C przez 24 h sporządzano zawiesiny w płynie fizjologicznym o pH od 7,2 do 7,4. Wpływ impulsów wysokiego napięcia na pałeczki *E. coli* i *L. monocytogenes* oraz gronkowce oceniano przez oznaczenie liczby bakterii metodą rozcieńczeń seryjnych. Badane próbki zawiesin drobnoustrojów wysiewano na płytki Petriego z podłożem agarowym tryptonowo-sojowym. Płytki z posiewami umieszczano w cieplarni i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Następnie liczono wyrosłe kolonie mnożąc wynik przez rozcieńczenie i 10 (na płytkę wysiewano $0,1 \text{ cm}^3$ zawiesiny). Otrzymana liczba odpowiadała zawartości bakterii w 1 cm^3 badanej zawiesiny. Każdorazowo oznaczano liczbę bakterii przed i po zadziaaniu impulsów elektrycznych.

Do wytwarzania impulsów zastosowano układ jednostopniowego generatora wysokich napięć udarowych. W celu otrzymania odpowiednio krótkich impulsów zastosowano iskiernik ucinający udar poprzez wyładowanie na powierzchni materiału ceramicznego. Otrzymywane przebiegi mierzono za pomocą cyfrowego oscyloskopu Kikusui sprzężonego z oporowym dzielnikiem napięć udarowych. Typowy przebieg oscyloskopowy podawanego impulsu dla jednej z wartości napięcia ilustruje ryc. 1. Pomiar wykonano w układzie elektrod czasowych (4), oddalonych o $h=5$ mm, w stanie stacjonarnym, tzn. bez przepływu zawiesiny bakteryjnej w przestrzeni międzyelektrodowej. Objętość próbki każdorazowo wynosiła 30 cm^3 .

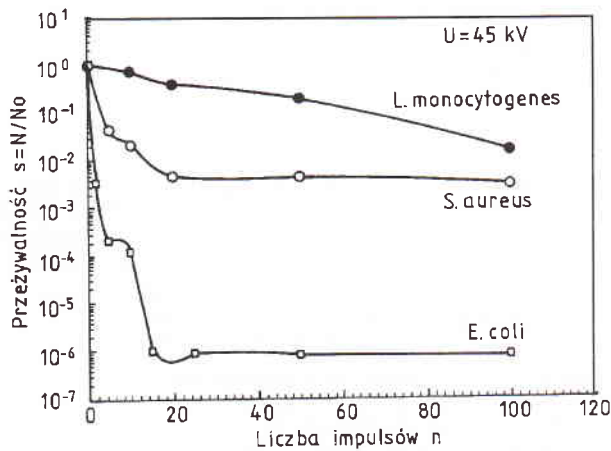
Badano zależność przeżywalności bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* od wartości szczytowej napięcia impulsu i ilości podawanych impulsów. Przeżywalność oznaczano określając stosunek liczby aktywnych bakterii w 1 cm^3 zawiesiny – N – po przyłożeniu impulsów polu elektrycznego do liczby aktywnych komórek bakterii w 1 cm^3 – N_0 – przed badaniem.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki badań zależności przeżywalności bakterii gramujemnych (*E. coli*) i gramododatnich (*S. aureus*, *L. monocytogenes*) od liczby impulsów przedstawiono na ryc. 2. Cał-



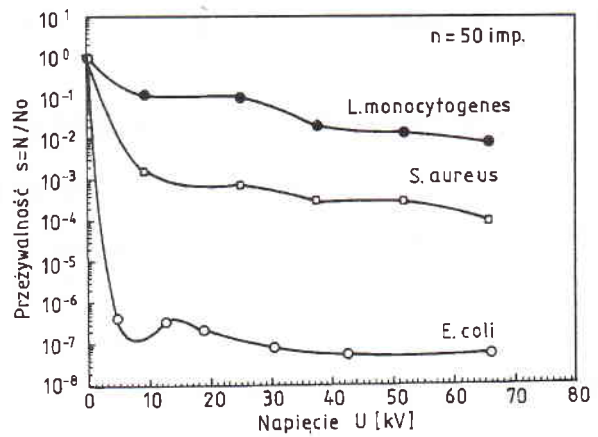
Ryc. 1. Przebieg oscyloskopowy impulsu wysokiego napięcia używanego do badań przeżywalności bakterii *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*



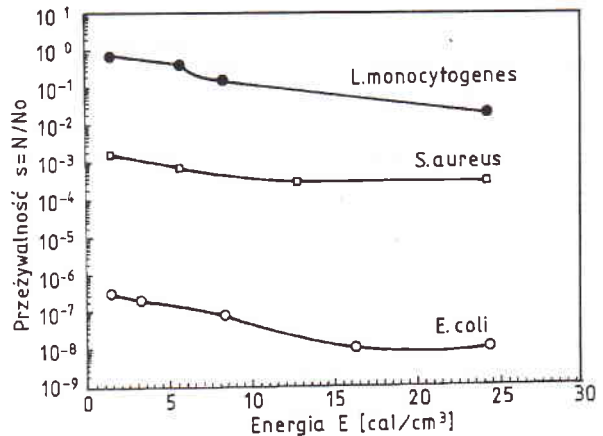
Ryc. 2. Zależność przeżywalności bakterii od liczby impulsów (*S. aureus* - $N_0=1,4 \cdot 10^8/\text{cm}^3$, *E. coli* - $N_0=5 \cdot 10^6/\text{cm}^3$, *L. monocytogenes* - $N_0=1,2 \cdot 10^9/\text{cm}^3$)

kowitą dezaktywację *E. coli* uzyskano dla napięcia $U=45$ kV już dla $n=15$ impulsów. Dwa impulsy powodowały zmniejszenie liczby bakterii o około dwa rzędy. Z ryciny wynika, że notowano silną zależność przeżywalności pałeczek *E. coli* od liczby impulsów w zakresie od $n=0$ do $n=15$. Dla bakterii gramodatnich redukcja była znacznie mniejsza. Przy napięciu szczytowym impulsu $U=45$ kV dla $n=20$ obserwowano spadek liczby żywych bakterii *S. aureus* o około trzy rzędy. Zależność przeżywalności gronkowca złocistego od liczby impulsów w zakresie od $n=0$ do $n=20$ była słabsza w porównaniu do *E. coli*. Obserwowano także znacznie mniejszy, od już opisanych, wpływ pola elektrycznego na komórki *L. monocytogenes*. Zależność przeżywalności tych pałeczek od liczby impulsów nie była tak duża w zakresie od $n=0$ do $n=20$ jak w przypadkach *E. coli* i *S. aureus*. Dla $n=100$ notowano spadek liczby bakterii tylko o dwa rzędy.

Ryc. 3 przedstawia zależność przeżywalności badanych bakterii od szczytowej wartości napięcia przyłożonego impulsu dla $n=50$. Całkowitą redukcję *E. coli* uzyskano dla napięcia $U=40$ kV. Również dla małych wartości napięcia $U=10$ kV redukcja tych bakterii jest duża – około sześć rzędów. W przypadku *S. aureus* nie stwierdzono w całym zakresie badanych napięć pełnej redukcji żywych bakterii. Spadek ich liczby o cztery rzędy zachodził dla napięcia $U>60$ kV przy liczbie podawanych impulsów $n=50$. Dla *L. monocytogenes* przy napięciu maksymalnym $U>70$ kV uzyskano redukcję o około dwa rzędy.



Ryc. 3. Zależność przeżywalności bakterii od wartości szczytowej impulsu wysokiego napięcia (*S. aureus* - $N_0=1,3 \cdot 10^8/\text{cm}^3$, *E. coli* - $N_0=5 \cdot 10^8/\text{cm}^3$, *L. monocytogenes* - $N_0=1,2 \cdot 10^9/\text{cm}^3$)



Ryc. 4. Zależność przeżywalności bakterii od energii dostarczonej na 1 cm^3 zawiesiny

Częstotliwość podawanych impulsów w przeprowadzonych badaniach wynosiła $f=1$ Hz. Wykazano, że dla wszystkich badanych bakterii większe napięcie i wyższa liczba podawanych impulsów (całkowity czas trwania napięcia) powodowały większą redukcję drobnoustrojów.

Interesującą zależnością, z punktu widzenia zastosowań, jest zależność przeżywalności od energii, którą należy dostarczyć na 1 cm^3 zawiesiny bakteryjnej. Energia ta obliczana jest wg następującego wzoru (6):

$$E = 0,24 \cdot \left(\frac{1}{2} U_{\text{max}}^2 C_p \right) \frac{n}{V}$$

gdzie: C_p – pojemność próbki (45 nF), U_{max} – wartość maksymalna napięcia, n – liczba podanych impulsów, V – objętość próbki (30 cm^3).

Jak wynika z zależności przeżywalności od dostarczanej energii (ryc. 4) do całkowitej redukcji *E. coli* wystarcza około 15 cal/cm^3 . Jest to znacznie mniej niż w szeroko rozpowszechnionym w przemyśle spożywczym procesie sterylizacji cieplnej cieczy konsumpcyjnych (ogrzewanie w 63°C przez 45 minut). Dla gronkowca złocistego zmniejszenie liczby bakterii o około cztery rzędy uzyskano dla energii 25 cal/cm^3 . W przypadku *Listeria monocytogenes* przy 25 cal/cm^3 notowano redukcję bakterii o dwa rzędy.

Wyniki badań przeżywalności bakterii *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Listeria monocytogenes* potwierdziły niszczący wpływ impulsowego pola elektrycznego na komórki biologiczne. Różna redukcja dla różnych rodzajów bakterii

wynika z odmienności ich budowy. Wydaje się, że ważne są tu różnice składu i morfologii ściany komórkowej bakterii gramododatnich i gramujemnych oraz różnice w wielkości badanych bakterii.

Według danych piśmiennictwa natężenia pól elektrycznych na ścianie komórkowej powodujących elektroporację nieodwracalną wynoszą w zależności od rodzaju komórki biologicznej od 20 kV/cm do 40 kV/cm, dla czasu narostu impulsu od kilku do kilkudziesięciu mikrosekund (2, 7, 8, 10). W badaniach własnych zastosowane natężenia pola elektrycznego były znacznie wyższe – do około 100 kV/cm. W takim przypadku, aby nie dopuścić do nadmiernego ogrzania cieczy w przestrzeni międzyelektrodowej i uniknąć zniszczenia bakterii poprzez wzrost temperatury, górna granica czasu narostu impulsu musi być mniejsza od 10 μ s. Zastosowane impulsy wysokiego napięcia charakteryzowały się bardzo krótkim czasem narostu $t_n=0,8 \mu$ s. Zastosowanie tak krótkich t_n i dużych natężeń pola elektrycznego miało na celu sprawdzenie możliwości dezaktywacji bakterii przy zminimalizowaniu wpływu wysokiego napięcia na płyn, w którym przebywały drobnoustroje. Miałoby to znaczenie w przypadku aplikacji metody do cieczy konsumpcyjnych. Uzyskano wyższe wartości natężenia pola od podawanych w piśmiennictwie (2, 7, 8, 10) – 30 kV/cm, powodujące całkowitą redukcję *E. coli* – około 60 kV/cm. Wynika to zarówno z zastosowania większych objętości zawiesiny bakteryjnej (wówczas duży wpływ na przeżywalność ma przypadkowość rozmieszczenia bakterii w przestrzeni międzyelektrodowej), jak i z zastosowania impulsów o bardzo krótkim czasie narostu napięcia.

Redukcja bakterii w cieczy przewodzącej (płyn fizjologiczny wytworzony na bazie NaCl) ujawnia możliwość zastosowania metody impulsów wysokiego napięcia do sterylizacji cieczy konsumpcyjnych. Metoda ta wymagałaby dostarczenia kilkakrotnie mniejszej energii niż stosowana w przemyśle metoda termiczna. O jej przydatności dla przemysłu spożywczego decydować będą badania fizyko-chemiczne, dalsze badania mikrobiologiczne oraz w niektórych przypadkach badania sensoryczne sterylizowanych tą metodą cieczy konsumpcyjnych.

Piśmiennictwo

1. Gupta R. P., Murray W.: 7th IEEE Pulsed Power Conf., Monterey, CA June 11-14, 1989.
2. Hamilton W. A., Sale A. J. H.: Biochim. Biophys. Acta 148, 789, 1967.
3. Jayaram S., Castle G. S. P., Margaritis A.: IEEE Trans. on Electrical Insul., 1993.
4. Lubicki P., Mazurek B., Staroniewicz Z.: Mat. III Sympozjum Naukowo-Techniczne „Nowoczesne Technologie Elektrostatyczne”, Białystok, 15-16 października 1993, s. 30.
5. Lubicki P., Mazurek B., Staroniewicz Z.: Mat. I Sympozjum Naukowe „Ochrona środowiska w dydaktyce Wydziałów Elektrycznych szkół wyższych”, Warszawa 8-9 grudnia 1993, s. 70.
6. Matsumoto Y., Shioji N., Satake T., Sakuma A.: IEEE Trans. on Electrical Insul., IAS Annual Meeting, 25, 652, 1991.
7. Neumann E., Sowers A. E., Jordan C. A.: Electroporation and electrofusion in cell biology, Plenum Press, New York 1989.
8. Sale A. J. H., Hamilton W. A.: Biochim. Biophys. Acta 148, 781, 1967.
9. Sugar I. P., Forster W., Neumann E.: Biophys. Chem. 26, 321, 1987.
10. Zimmermann U.: Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105, 175, 1986.

Adres autora: dr hab. Zdzisław Staroniewicz, ul. Sopotka 21 m. 6, 50-344 Wrocław

JERZY LECH GUNDŁACH, ANDRZEJ BERNARD SADZIKOWSKI,
KRZYSZTOF TOMCZUK, MIROSŁAW GRZĘDA*

Rozmieszczenie larw *Trichinella spiralis* w mięśniach doświadczalnie zarażonych świń i szczurów

Katedra Parazytologii i Klinika Chorób Pasożytniczych Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin

*Puławskie Zakłady Przemysłu Bioweterynaryjnego „Biowet”, 24-100 Puławy

Summary

Distribution of the *Trichinella spiralis* larvae in the muscles of experimentally infested pigs and rats

The distribution and the number of the *T. spiralis* larvae per 1 g of muscle were determined in rats experimentally infested at the rate of 200, 500 or fed meat containing the larvae. The examinations were also carried out on pigs fed 200, 1000 and 10 000 larvae. The intensity of larvae invasion and distribution depended on the dose used for infestation. The highest number of the larvae in rats and pigs infested with lower doses of *T. spiralis* was found in the tongue muscles, masseter, femur and diaphragm. In animals infested with medium-sized inocula (rats with 500 and pigs 1000 larvae) the highest number of the larvae was noted in the intercostal muscles, in the masseter in the transversal muscles of the abdomen, in the biceps muscle of the thigh and in the diaphragm. In pigs infested with 10 000 larvae and in rats fed infested meat the highest number of the *T. spiralis* larvae was found in the

diaphragm. Numerous larvae were also noted in the tails and oesophagi of the animals under study.

Badania nad rozmieszczeniem larw *Trichinella spiralis* w organizmach żywicieli są istotne z punktów widzenia diagnostyki i inwazjologii włośnicy. Skuteczność diagnostyki tej inwazji, szczególnie przypadków o niskiej intensywności, zależy od wielkości badanej próbki, a także miejsca jej pobrania. Aktualnie obowiązujące przepisy nakazują badanie próbek pobranych z filarów przepony, a w razie ich braku z jej części żebrowej lub mięśni brzusznych. Jak wynika z danych piśmiennictwa (3, 5, 6, 8) niekwestionowana jest przydatność przepony do tego typu badań, pewne kontrowersje budzi natomiast wybór miejsc, z których pobierane mogą być próby do badań na włośnię w przypadku braku przepony.

Celem badań było określenie rozmieszczenia i koncentracji larw *Trichinella spiralis* w wybranych mięśniach u doświadczalnie zarażonych świń i szczurów.