

# HOGYAN BIZTOSÍTHAT AZ OXIGÉNÉRZÉKELŐ TECHNOLÓGIA GYORSABB VIZSGÁLATI EREDMÉNYEKET AZ ÉLELMISZER- ÉS ITALMIKROBIOLÓGIA SZÁMÁRA?

**Írta: Colin Fricker<sup>1</sup>, Dilidaer Yusufu<sup>2</sup> és Andrew Mills<sup>2</sup>**

Oculer Ltd, Ballina, Írország<sup>1</sup>, illetve Kémiai és Vegyészmérnöki Kar, Queens University, Belfast, Egyesült Királyság<sup>2</sup>

## Miért érdemes O<sub>2</sub> érzékelőt használni?

Az O<sub>2</sub> érzékelőket széles körben használják a biológia számos területén, és alkalmazzák azokat a baktériumok aktivitásának és növekedésének megfigyelésére a környezetben. Azonban kevés beszámoló szól a laboratóriumi mikrobák szaporodásának specifikus kimutatására való alkalmazásukról. A megfelelő táptalaj, a hőmérséklet és egy immobilizált O<sub>2</sub>-csökkentő érzékelő kombinációjával következetesen és pontosan kimutatható a mikroorganizmusok, köztük a baktériumok, élesztők és a gombák növekedése. Ahogy a mikroorganizmusok növekednek, felhasználják a táptalajban lévő oxigént, és egy bizonyos időpontban ez az oxigén csökkenés hatással lesz az érzékelőre, ami a festék élettartamának nagyon gyors növekedését eredményezi, mely egy megfelelő műszerrel kimutatható.

A megfelelő O<sub>2</sub>-érzékelő és a megfelelő immobilizáló polimer együttes használata olyan érzékelő rendszert eredményez, amely hosszú eltarthatósági idővel rendelkezik, hőálló, valamint nem befolyásolja a közeg pH-ja vagy ionerőssége. Fontos megjegyezni, hogy mivel az érzékelő immobilizálásához használt polimer a gázokon kívül a legtöbb molekula számára át nem eresztő, az érzékelőt nem befolyásolják a különböző élelmiszer mátrixok vagy ionos molekulák. Az, hogy az érzékelő rendszert nem befolyásolja a pH, azt jelenti, hogy a közeg >7,0 pH-ra pufferelehető, ami lehetővé teszi bizonyos mikroorganizmusok gyorsabb növekedését és regenerálódását. Ez hátrányos a szén-dioxid kimutatására, mivel ilyen pH körülmények között a CO<sub>2</sub> kezdetben hidrogén-karbonáttá alakul, ami hosszabb kimutatási időt eredményez.

## Elmélet az O<sub>2</sub> érzékelő mögött

Szinte az összes kereskedelmi forgalomban kapható O<sub>2</sub> optikai indikátor azon a képességen alapul, hogy az O<sub>2</sub> képes kioltani (azaz elnyomni) egy festék, a D által mutatott lumineszcenciát. Az erre a célra megfelelő festékek választéka korlátozott, és a legtöbbjük platinát vagy ruténiumot tartalmaz. A D lumineszkál, ha olyan fénynek van kitéve, amelyet

elnyel; ez a gerjesztő fény. A gerjesztő és a keletkező lumineszcens fény hullámhossza, azaz színe általában nagyon különböző, ami megkönnyíti az utóbbi megfigyelését. Amennyiben a gerjesztő fényt állandó sugárban juttatjuk az indikátorhoz, akkor az folyamatosan lumineszkál.

Ha azonban, mint az O<sub>2</sub>-érzékelésnél, a gerjesztő fényt nagyon rövid impulzus, azaz villanás formájában adjuk le, a lumineszcencia intenzitása azonnal tetőzik, majd nullára csökken. A gyakorlatban nehéz meghatározni, hogy mennyi idő alatt ér véget ez a csökkenés, ezért ehelyett azt az időt mérik, amíg a lumineszcencia csúcsintenzitása egy meghatározott hányaddal csökken. A fotokémiában általában és az O<sub>2</sub>-érzékelő technológiában konkrétan ez a hányados mindig a természetes szám e (2,71828) reciproka, így a hányados 0,368. Ezt az időt nevezzük a festék lumineszcencia-élettartamának, azaz T-nek.

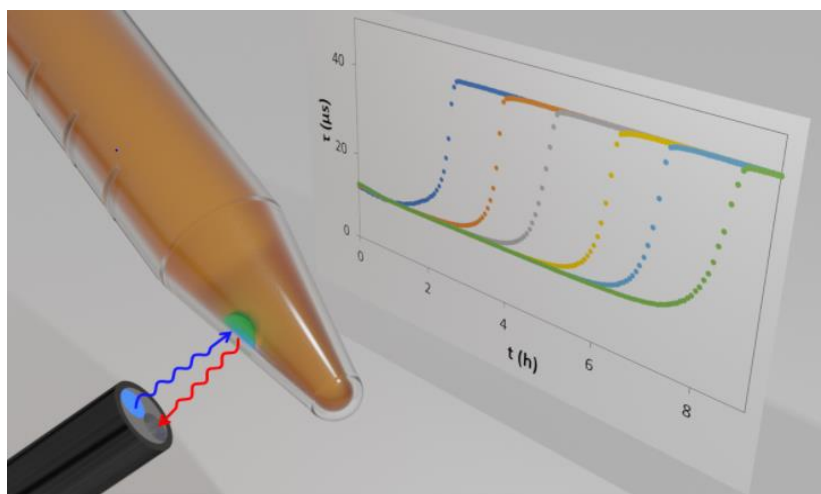
Minden lumineszcens festék esetében a T értéke O<sub>2</sub> hiányában, azaz a T<sub>0</sub>, a színezékre jellemző, ezért minden színezék esetében más és más. Az O<sub>2</sub>-érzékelny festékek esetében a T<sub>0</sub> jellemzően 40-100 ms, és a Stern-Volmer-egyenletnek megfelelően a T az O<sub>2</sub> parciális nyomásának, azaz P<sub>O<sub>2</sub></sub>-nek a növekedésével csökken:

$$T_0/T = 1 + K_{SV}P_{O_2}$$

ahol, K<sub>SV</sub> a Stern-Volmer konstans, amely függ a T<sub>0</sub>-tól, valamint attól, hogy az O<sub>2</sub> milyen gyorsan áramlik a festékhez és oltja ki annak lumineszcenciáját.

A legtöbb kereskedelmi forgalomban kapható O<sub>2</sub> optikai indikátorban a lumineszcens festékanyagot O<sub>2</sub>-áteresztő műanyagba ágyazzák, hogy színes "pontot" képezzen – mely az ebben a munkában használt szokásos Pt-porfirin festék miatt gyakran zöld színű. Az érzékelő pontot általában egy átlátszó palack vagy kémcső falára helyezik, amely a vizsgált vizes vagy gáznemű közeget tartalmazza. A pontban lévő festék élettartamát ezután a kémcsőhöz nyomott érzékelő szondával, az O<sub>2</sub> "ponttal" szemben, az 1. ábrán látható módon, nyomon követjük. Az érzékelő sonda biztosítja a gerjesztő fényt, összegyűjti a lumineszcens fényt és méri annak élettartamát.

A mikrobiológiában a vizsgálati minta log (TKE) számának meghatározására alkalmazott módszer az, amikor a növekedést elősegítő táptalajt egy fiolába helyezik, és beoltják a vizsgálni kívánt mintával. Ahogy a baktériumok növekedni kezdenek a közegben, az oldott O<sub>2</sub> szintje a levegővel telített oldathoz tartozó kezdeti értékről, azaz 0,21 atm-ről nullára csökken, és így a T mért értéke a levegővel telített oldatban mért értékről T<sub>0</sub>-ra nő. Az 1. ábra a T és az inkubációs idő közötti tipikus profilokat mutatja be különböző TKE beoltási értékek esetén. Ezek a profilok felhasználhatók egy egyszerű, egyenes vonalú kalibrációs grafikon létrehozására, amely a log (TKE) értéket a T meghatározott értékének eléréséhez szükséges idővel, azaz egy adott O<sub>2</sub>-szinttel hozza összefüggésbe. Ez a kalibrációs grafikon ezután felhasználható a baktériumok log (TKE) értékének meghatározására egy adott vizsgálati mintában.



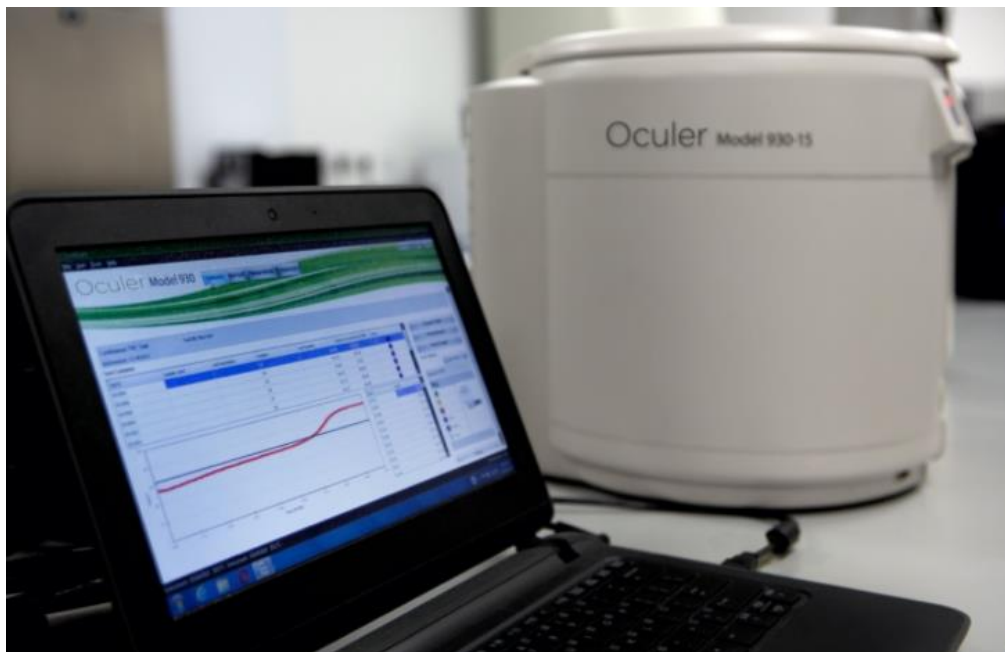
1. ábra

### A vizsgálat egyszerűsége

Az olyan rendszerek alkalmazása, amelyek lehetővé teszik a táptalajban a mikrobák növekedése miatt bekövetkező változások közvetlen kimutatását, rendkívül egyszerű és sokkal rövidebb idő alatt történő kimutatását eredményeznek. Így jellemzően az érzékelőt egy tenyésztőedényben rögzítik, és hozzáadják a táptalajt. A vizsgálni kívánt mintát ezután közvetlenül az edénybe adagolják, és a vizsgálat időtartamára egy kombinált inkubátorban/olvasóban inkubálják. Az érzékelőt gyakori időközönként lekérdezik, és amikor jelentős  $O_2$ -csökkenést észlelnek, a leolvasott érték megváltozik, ami figyelmezteti a felhasználót, hogy a minta adott mikroorganizmusokat tartalmaz. Mivel nem kell megvárni a telepek kialakulását, mint a mikrobiális terhelés meghatározására használt hagyományos módszerek esetében, az eredmények gyorsan rendelkezésre állnak, és minél nagyobb a mikrobiális terhelés, annál gyorsabban kapunk pozitív jelzést.

### Az Oculer Greenlight™ Rendszer

Az Oculer Ltd. által forgalmazott Greenlight™ rendszer egy inkubátort és lumineszcens detektort tartalmazó, önálló, asztali műszer, amelynek használata nem igényel speciális mikrobiológiai szakértelmet. A megfelelő táptalajt tartalmazó minta fiolát gamma besugárzás után szállítjuk. A készülék két változata 48 x 2 ml-es vagy 24 x 15 ml-es fiola inkubálására alkalmas. Amennyiben a mintákat offline inkubálják, a lefuttatható minták száma 432-re nő a 48 x 2 ml-es változatnál, illetve 216-ra nő a 24 x 15 ml-es változatnál. Kvantitatív üzemmódban használva a Greenlight készülék kiszámítja a célbaktériumok koncentrációját, és az eredményeket telepképző egységekben (TKE) fejezi ki.



A Greenlight rendszert a legkülönbözőbb mátrixokhoz használták, beleértve a tejes és nem tejes italokat, szénsavas italokat, joghurtot, technológiai vizet, gyümölcslevet és számos más folyékony és félszilárd mátrixot. Rendelkezésre állnak az összes mikroba szám, az élesztő- és penészgombák, az összes kóliform, az *E.coli*, az *Alicyclobacillus* spp. és a kereskedelmi sterilitás vizsgálatai. A felületek környezeti monitorozásához is rendelkezésre áll egy készlet. A használt minta mérete a vizsgálatától függően akár 10 ml is lehet. A legtöbb vizsgálat 24 órán belül befejeződik, az élesztő- és penészgombák vizsgálatának ideje 5-7 napról 48 órára csökken, az *Alicyclobacillus* esetében pedig a vizsgálati idő legfeljebb 72 óra.

### **A Greenlight™ használata kereskedelmi sterilitás vizsgálatához**

A Greenlight rendszer ideálisan alkalmas a kereskedelmi sterilitás meghatározására. A nagy mintatérfogat (10 ml) és kis mennyiségű koncentrált táptalaj használata lehetővé teszi, hogy csak azon organizmusok növekedését mutassuk ki, amelyek a tényleges termékben növekedhetnek. A minimális hígítás alkalmazása biztosítja, hogy a pH és a természetesen előforduló mikrobiális inhibitorok koncentrációja közel azonos legyen az eredeti termékéhez, és megakadályozza a problémát nem okozó mikroorganizmusok növekedését, mivel azok nem lennének képesek a késztermékben növekedni. Ez nagymértékben növeli a vizsgálat megbízhatóságát.

Egy nemrégiben végzett, növényi alapú ízesített tejet és más alkoholmentes italokat (496 db minta) vizsgáló kutatás kimutatta, hogy a Greenlight érzékenyebb és gyorsabb a standard lemezes eljáráshoz képest. A késztermék mintákat alacsony számú potenciális szennyező mikroorganizmusokkal (1-10 TKE/100 ml) oltották be, és hét napig inkubálták. További mintákat készítettek még hígítással, majd hét napig inkubálták azokat. Az inkubálás után az alikvotot eltávolították, majd azt szélesztéssel, lemezöntéssel és Greenlight-tal elemezték.

**1. táblázat A Greenlight, a lemezöntés (1 ml) és a szélesztés (0,1 ml) összehasonlítása pozitív minták kimutatására 496 kereskedelmi sterilitás vizsgálat esetében**

<b>Pozitív minták száma</b>				
<b>Greenlight 48 h</b>	<b>Lemezöntés 24 h</b>	<b>Lemezöntés 72 h</b>	<b>Szélesztés 24 h</b>	<b>Szélesztés 72 h</b>
119	66	110	39	77

A Greenlight több mintában mutatott ki növekedést, mint a hagyományos lemezöntéses technika, és 48 órán belül eredményt hozott (valójában a pozitív eredmény regisztrálásához szükséges leghosszabb inkubációs idő 29 óra és 11 perc volt). Nem meglepő módon a lemezöntéses technikával több pozitív mintát mutattak ki, mint a szélesztéses módszerrel. A Greenlight rendszerrel 10 ml mintát vizsgáltak, a lemezöntéssel 1 ml-t, a szélesztéssel pedig 0,1 ml-t. Egyértelmű, hogy sok esetben még hét napos inkubáció után is viszonylag alacsony a jelenlévő mikroorganizmusok száma, és ezt bizonyítják a kimutatásban mutatkozó különbségek is a különböző mintamennyiségek esetében.

A nagy (10 ml-es) minta használata növeli az érzékenységet és jelentősen csökkenti a szennyeződés kimutatásának teljes idejét. A növekedés kimutatására a kezdeti inkubáció után alkalmazott egyéb módszerek (amelyek még kisebb méretű mintát használnak, mint például az ATP - bár gyors eredményt adnak) a Greenlight által kimutatott pozitív minták jelentős részét nem detektálják. A Greenlight™ rendszer használata jelentős előnyökkel jár a kereskedelmi sterilitás vizsgálata során, mind a sebesség, mind az érzékenység tekintetében.

### **Pár szó a szerzőkről**



Colin az Oculer Ltd. tudományos főmunkatársa, ahol gyorsteszték kifejlesztésén dolgozik az élelmiszerekben és más mátrixokban- például vízben, testápolási termékekben és gyógyszerekben található mikrobiális szennyeződések kimutatására. A Royal Society of Biology és a Royal Society for Public Health tagja. Aktív tagja több ISO-bizottságnak, valamint az IFU mikrobiológiai munkacsoportjának. Colin a mikrobiológia számos területéről publikált széles körben, a környezetvédelemtől a klinikai vizsgálatokig.



Dr. Dilidaer Yusufu 2013-ban szerzett BSc diplomát a Pekingi Technológiai Intézetben (Kína), PhD fokozatát pedig 2019-ben a Belfasti Queen's Egyetemen szerezte. Jelenleg posztdoktori kutatóként dolgozik Prof. Andrew Mills csoportjában a belfasti Queen's Universityn. Kutatási területe elsősorban a kolorimetrikus és fluoreszcens O<sub>2</sub>- és CO<sub>2</sub>-érzékelők fejlesztésére összpontosít, különös tekintettel azok élelmiszer-csomagolásban és sebmonitorozásban való felhasználására.



Andrew Mills a belfasti Queen's University Kémiai és Vegyészmérnöki Karának anyagkémiai professzora. Kutatási területei: festék- és félvezető-fotokémia, redoxikatalízis, napenergia-átalakítás, valamint szín- és fluoreszcencia alapú indikátorok. Ő az RSC Materials for Industry - Derek Birchall Award 2019-es díjazottja az intelligens - optikai érzékelős - tinták, pigmentek és extrudált műanyagtechnológiák terén végzett úttörő munkájáért.