VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gyvybės mokslų centras

Biomokslų institutas

Mikrobiologijos ir biotechnologijos katedra

Mikrobiologijos ir biotechnologijos studijų programos IV kurso studentės

Kamilija SINKEVIČ

Bakalaurinis darbas

Impulsinio elektrinio lauko poveikio mikroorganizmams *Helianthus tuberosus* L. stiebagumbį simuliuojančiame gelyje tyrimas

Darbo vadovas
doktorantas Povilas Šimonis

Mokslinis konsultantas
dr. Arūnas Stirkė

Vilnius 2018

Impulsinio elektrinio lauko poveikio mikroorganizmams *Helianthus tuberosus* L. stiebagumbį simuliuojančiame gelyje tyrimas

Darbas atliktas Fizinių ir technologijos mokslų centro Bioelektrochemijos laboratorijoje

Kamilija SINKEVIČ

Darbo vadovas:

doktorantas Povilas ŠIMONIS

TURINYS

Santrumpos **4**
ĮVADAS 5
1. LITERATŪROS APŽVALGA 7
1.1. *Helianthus tuberosus* L. 7
1.1.1. Augalo apibūdinimas 7
1.2. Gumbavaisių gedimo priežastys bei saugojimo laiko pratęsimui taikomi metodai 8
1.2.1. Cheminio ir terminio apdorojimo metodai 8
1.2.2. Neterminio apdorojimo metodai 9
1.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis 10
1.3.1. Elektroporacijos mechanizmas 11
1.3.2. IEL poveikis audiniams bei taikymas biotechnologijoje 12
1.3.3. IEL taikymas vienaląsčių mikroorganizmų inaktyvavimui 13
2. MEDŽIAGOS IR METODAI **15**
2.1. Mikroorganizmų izoliavimas iš *Helianthus tuberosus* L. stiebagumbio 15
2.2. Izoliuotų mikroorganizmų identifikavimas 15
2.3. Elektrinio lauko impulsų generavimo įranga 16
2.4. Izoliato ląstelių auginimas skystoje terpėje 19
2.5. Izoliato ląstelių paruošimas IEL poveikiui 20
2.6. Izoliato ląstelių veikimas IEL suspensijoje 20
2.7. *H. tuberosus* L. stiebagumbį simuliuojančio gelio paruošimas 20
2.8. Izoliato ląstelių veikimas elektriniu lauku standžioje gelio struktūroje 20
2.9. Matematinis ir statistinis duomenų apdorojimas 21
3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS 22
3.1. Mikroorganizmų izoliuotų iš topinambo šakniagumbio identifikavimas 22
3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis izoliato ląstelėms suspensijoje 25
3.2.1. Gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų skaičiaus 26
3.2.2. Gyvybingumo priklausomybė nuo sistemai suteiktos energijos 27
3.2.3. Gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų dažnio 29
3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis izoliato ląstelėms gelyje 30
3.3.1. Gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų skaičiaus ir energijos 30
3.3.2. Impulsinio elektrinio lauko efektyvumo skystoje ir standžioje terpėse palyginimas 31
IŠVADOS 34
Santrauka 35
Summary 36
LITERATŪROS SĄRAŠAS 37

Santrumpos

16S rRNR – 16 svedbergų ribosominė ribonukleorūgštis

bp – bazių pora

C – uždara dvisluoksnio būsena

CFU – colony forming units

DGS – dešimtainis gyvybingumo sumažėjimas

DNR – deoksiribonukleorūgštis

E – elektrinio lauko stipris

$E_{iš}$ – išorinis elektrinis laukas

E_m – membranos elektrinis laukas

EP – elektroporacijos buferis

f – elektrinio lauko impulsų dažnis

G – santykinė išcentrinė jėga

HI – hidrofilinė pora

HO – hidrofobinė pora

IEL – impulsinis elektrinis laukas

YEP – mielių peptono terpė

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

KFV – kolonijas formuojantys vienetai

kor. R^2 – koreguotas determinacijos koeficientas

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

pH – vandenilio jonų koncentracijos tirpale matas

pn – elektrinio lauko impulsų skaičius

TRIS – trishidroksimetilaminometanas

U – fermento aktyvumo vienetai

UV – ultravioletiniai spinduliai

W – elektrinio lauko energija

τ – elektrinio lauko impulso trukmė

ĮVADAS

Topinambo (lot. *Helianthus tuberosus* L.) stiebagumbiai vadinami funkciniu maistu, turinčiu vertingų medžiagų ir teigiamai veikiančiu žmogaus sveikatą. *H. tuberosus* L. kaupia anglį inulino (fruktozės polimero), o ne krakmolo (gliukozės polimero) forma. Virškinimo trakte skaidomas inulinas nedidina gliukozės kiekio kraujyje, todėl topinambai yra vertingi cukriniu diabetu sergantiems žmonėms. Iš dirvožemio stiebagumbiai renkami sezoniškai, tad siekiant užtikrinti jų preinamumą vartotojams metų bėgyje, būtina takyti priemones stabdančias natūraliai vykstančius stiebagumbio gedimo procesus.

Gumbavaisių saugojimo laiko pratęsimui taikomi įvairūs metodai lėtinantys pirminio (fiziologinio) ir antrinio (mikrobiologinio) gedimo procesus. Optimizuojamos saugyklų abiotinės sąlygos keičiant dujinės terpės sudėtį, temperatūrą, drėgmę, naudojamos natūralios kilmės apsauginės medžiagos (pelenai, medienos drožlės, molis, smėlis), kartais gumbavaisiai padengiami dirbtinėmis apsauginėmis dangomis. Net ir po kompleksinių metodų poveikio, gumbavaisių saugojimo laikas yra ribotas, tad pramonėje jaučiamas technologijų stabdančių mikroorganizmų sukeliamą gedimą poreikis.

Siekiant efektyviai prailginti gumbavaisių saugojimo laiką, svarbu ne tik sustabdyti natūraliai vykstančius gedimo procesus, bet ir išsaugoti šio produkto maistinę vertę. Apdorojimas aukšta temperatūra, cheminėmis medžiagomis bei šaldymas nėra tinkami metodai, nes pakeičiamos skoninės, spalvinės, kvapo savybės, denatūruojami baltymai, o taip pat prarandami vitaminai. Liofilizuotuose produktuose išsaugoma didžioji dalis vertingų maistinių medžiagų, tačiau pakinta produkto struktūra ir dažniausiai nėra sunaikinami visi gedimą sukeliantys mikroorganizmai produkto paviršiuje bei viduje. Kadangi vartotojams svarbios produktų maistinės, skoninės savybės, galiojimo laikas ir išvaizda, gamintojai ieško naujų ekonomiškai efektyvių, saugumą užtikrinančių technologijų.

Pastaruoju metu ypatingas dėmesys skiriamas neterminės pasterizacijos impulsinio elektrinio lauko (IEL) poveikio tyrimams ir jo taikymui mikroorganizmų gyvybingumo slopinimui įvairiuose maisto produktuose. IEL gali sukelti negrįžtamus mikroorganizmų membranų pažeidimus, kurie lemia jų žūtį, tuo tarpu mitybiškai vertingos molekulės reikšmingai nepakinta ir nepraranda savo savybių. Šiuo metu IEL poveikis pramonėje pritaikomas skystų produktų pasterizavimui, tačiau trūksta duomenų apie IEL pritaikymo galimybes gumbavaisių ir kitų standžių maisto produktų pasterizavimui.

Šio darbo tikslas yra ištirti impulsinio elektrinio lauko poveikį ir jo pritaikymo galimybę mikroorganizmų žūčiai topinambo stiebagumbį simuliuojančiame gelyje.

Tikslui pasiekti suformuluoti uždaviniai:

1) Izoliuoti ir apibūdinti mikroorganizmus iš topinambo stiebagumbio;
2) Ištirti suspensinių izoliato ląstelių gyvybingumo priklausomybę nuo pulsinio elektrinio lauko parametrų;
3) Ištirti pulsinio elektrinio lauko poveikį mikroorganizmams standžioje gelinėje struktūroje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. *Helianthus tuberosus* L.

1.1.1. Augalo apibūdinimas

Helianthus tuberosus L. yra Asteraceae (astrinių) šeimos augalas kilęs iš Šiaurės Amerikos vidutinio klimato regionų. Pastaraisiais metais kultivuojamas arba paplitęs kaip invazyvus augalas Europoje, Azijoje, Šiaurės Amerikoje, Australijoje (Gunnarsson et al., 2014). Vieno vegetacijos ciklo metu *H. tuberosus* L. išaugina aukštus antžeminius stiebus, o požeminė augalo dalis suformuoja trumpus stolonus, ant kurių auga įvairaus dydžio ir formos stiebagumbiai (Denoroy, 1996). Kiti plačiai vartojami *H. tuberosus* L. pavadinimai yra: topinambas, bulvinė saulėgrąža, Jeruzalės artišokas.

1.1.2. Stiebagumbio savybės

Topinambo stiebagumbiai vadinami diabetiniu ir funkciniu maistu, t.y. maistu, turinčiu tiegiamą poveikį žmogaus sveikatai (Hidaka et al., 2001). Vidutiniškai topinambų stiebagumbius sudaro 80 % vandens, 15 % angliavandenių bei iki 2 % baltymų. Būdingi nedideli polinesočiųjų riebalų rūgščių (linolo rūgšties ir alfa-linolo rūgšties) kiekiai. Skirtingai nei dauguma daržovių, topinambai kaupia anglį ne krakmolo, o inulino, fruktozės polimero, forma. Inulinas sudaro apie 50 % stiebagumbio sausos masės (Rebora, 2008). Tyrimai rodo, kad inulinas atlieka svarbų vaidmenį mažinant cholesterolio kiekį kraujyje, palaikant tinkamą mikro- ir makroelementų balansą žmogaus organizme. Be to, inulinas yra selektyviai fermentuojamas žinduolių storojo žarnyno bifidobakterijų ir tik dalinai suskaidomas virškinimo trakto fermentų, todėl kraujyje cukrų kiekis padidėja nežymiai (Shoaib et al., 2016).

H. tuberosus L. stiebagumbiai pasižymi dideliais mineralų kiekiais: 0,4-3,7 mg·100 g^{-1} geležies, 14-37 mg·100 g^{-1} kalcio, 420-657 mg·100 g^{-1} kalio, 50 µg·100 g^{-1} seleno. Lyginant su bulvėmis (*Solanum tuberosum* L.), topinambai geležies turi apie tris kartus daugiau (Ana et al., 2013). Topinambų stiebagumbiai yra gausus B komplekso vitaminų (tiamino, riboflavino, niacino, B6, pantoteno rūgšties, biotino ir kobalamino), askorbo rūgšties, β-karoteno šaltinis. Sukauptų vitaminų kiekiai neretai varijuoja priklausomai nuo augalo vystymosi stadijos, agronominių ir klimato sąlygų (Antanaitis et al., 2004).

1.1.3. Pramoninė svarba

Topinambai naudojami maisto pramonėje, kaip papildoma medžiaga, suteikianti teigiamų savybių produktui. Pridėjus stiebagumbio miltų į duonos raugą padidinamas produkto

švelnumas, tūris, ilgėja galiojimo laikas (Praznik et al., 2002; Rubel et al., 2015). Inulinas, išgautas iš topinambų, naudojamas kaip majonezo, ledų, šokolado ir miltinių produktų tirštiklis (Shoaib et al., 2016). Kita topinambų stiebagumbių panaudojimo sritis yra komercinė cheminių reagentų produkcija. Iš topinambų biomasės gaminamas etanolis, acetonas, butanolis, 2,3-butandiolis, gintaro rūgštis, pieno rūgštis (Yang et al., 2014).

Vis dėlto, labiausiai topinambai vertinami kaip maistinis augalas. Neretai stiebagumbiai yra apdorojami terminių procesų metu, bet tokiu būdu neigiamai paveikiamos molekulės ir produktas netenka daugelio teigiamų savybių. Siekdami kuo ilgiau išsaugoti vartotojui svarbias stiebagumbio maistines medžiagas ir skonį, kvapą, išvaizdą bei struktūrą, gamintojai ieško efektyvių metodų šakniagumbio saugojimo laiko prailginimui.

1.2. Gumbavaisių gedimo priežastys bei saugojimo laiko pratęsimui taikomi metodai

Žemės ūkio produktai, tame tarpe ir įvairių augalų gumbavaisiai, yra greitai gendantys. Kelių mėnesių bėgyje po derliaus nuėmimo netenkama apie 50 % produkcijos (Rezaee et al., 2013). Po derliaus nuėmino, metaboliniai procesai (pvz., kvėpavimas, transpiracija) tęsiasi ir jiems naudojamos sukauptos medžiagos bei vanduo; prasideda pirminiai (fiziologiniai) ir antriniai (mikrobiologiniai) gedimo procesai (Martinez ir Whitaker, 1995; Zidenga et al., 2012). Dėl to, po derliaus nuėmino, siekiama užtikrinti tinkamiausias sąlygas ir metodus išsaugančius produkto gerąsias savybes, stabdančius gedimą bei prailginančius produkto saugojimo laiką.

Pirminius gedimo procesus sukelia natūraliai gumbavaisyje esantys fermentai, o antrinius – bakterijos ir grybai, kurie patenka ant augalo paviršiaus ar į vidinius jo audinius augimo metu arba po derliaus nuėmimo. Dažniausiai gumbavaisių gedimą sukelia *Rhizopus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Botrytis cinerea*, *Ceratocystis fimbriata*, *Diaporthe batatis*, *Rhizoctonia* spp., *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas marginalis*, *Phytophthora infestans* mikroorganizmai (Tournas, 2005).

1.2.1. Cheminio ir terminio apdorojimo metodai

Derliaus nuėmimo ir transportavimo metu gumbavaisiai dažnai yra pažeidžiami mechaniškai. Tai padidina jų metabolinį aktyvumą, vandens netekimą, didina mikrobiologinės ar vabzdinės (pvz., vabzdžiai pažaidos vietoje sudeda kiaušinėlius, iš kurių vystosi lervos) kilmės užkrato patekimo iš aplinkos tikimybę. Siekiant išvengti neigiamų pasekmių, transportuojant gumbavaisiai yra laikomi vėsioje aplinkoje, kurioje dauguma fiziologinių ir mikrobiologinių procesų sulėtėja. Pagal poreikį pakavimui naudojamos įvairios medžiagos besiskiriančios lankstumu, atsparumu vandeniui, galimybėmis kontroliuoti aplinkos dujinę sudėtį (Mahnič-Kalamiza et al., 2014).

Esant audinio pažeidimui, augale natūraliai aktyvuojasi apsaugos mechanizmas. Į pažaidos vietą transportuojamas suberinas, kuris skatina augalinio audinio sukamštėjimą. Suberinas yra tinkliškas netirpus polimeras iš sočiųjų ir nesočiųjų riebalų rūgščių, kuris jungiasi prie augalų peridermo ir tarnauja kaip vandenį bei mikroorganizmus sulaikantis barjeras (Soliday et al., 1978). Pramonėje, siekiant efektyviau sumažinti neigiamas mechaninių pažeidimų pasekmes, pažeisto audinio paviršiuje suberinas nusodinamas papildomai. Efektyviam suberizacijos procesui būtina 12-18 °C aplinkos temperatūra ir 80-95 % santykinė oro drėgmė. Vis dėlto, šis metodas neužtikrina pilnos gumbavaisių apsaugos ir reikalauja kelių savaičių laikotarpio (Agrawal ir Kolattukudy, 1977).

Dažnai prieš ir po derliaus surinkimo, gumbavaisiai yra apdorojami ir cheminėmis medžiagomis. Norint išvengti mikrobiologinių infekcijų, derlius purškiamas fungicidais arba po surinkimo gumbavaisiai tam tikrą laiką yra laikomi dujinio butilamino aplinkoje, apdorojami metilesteriais, malato hidroksidu, 1,2,4,5-tetrachloro-3-nitrobenzenu, hipochloritu. Tačiau yra žinoma, kad šie cheminiai junginiai pasižymi ir neigiamu poveikiu aplinkai bei žmogaus sveikatai (Rezaee et al., 2013).

Vienas iš saugių ir dažniausiai taikomų maisto produktų pasterizavimo ir sterilizavimo metodų yra kaitinimas. Tačiau aukšta temperatūra paveikia ne tik mikroorganizmų ląsteles bei sporas, bet ir gumbavaisio audinių ląsteles. Karštis sukelia polisacharidų hidrataciją, ląstelių sienelės praranda tvirtumą. Taip pat, idukuojami fizikiniai ir cheminiai procesai, kurie lemia organoleptinių savybių pokyčius bei dalies vertingų maistinių medžiagų praradimą (Adams, 2004; Petruzzi et al., 2017).

1.2.2. Neterminio apdorojimo metodai

Kaip alternatyva terminėms ir cheminėms gumbavaisių apdorojimo technologijoms, atliekami neterminio apdorojimo metodų taikymo tyrimai. Pavyzdžiui, perspektyvi yra aukšto slėgio anglies dioksido (HPCD) technologija (Hu et al., 2013). Anglies dioksidas, tai fiziologiškai saugios, chemiškai inertiškos, nedegios, netoksiškos bei pigios dujos. Esant aukštam (20-50 MPa) anglies dioksido slėgiui, inaktyvuojami mikroorganizmai ir fermentai. Siekiant padidinti HPCD technologijos selektyvumą ir pritaikyti ją pramonei, būtina tinkamai suderinti slėgio, temperatūros ir HPCD poveikio trukmės parametrus (Liu et al., 2008).

HPCD technologija gali būti kombinuojama su didelės galios ultragarso poveikiu. Yra nustatyta, kad didelės galios ir žemo dažnio (20-100 Hz) ultragarsas sukelia mechanines ląstelių pažaidas ir skatina aukštu reaktyvumu pasižyminčių radikalų bei vandenilio peroksido molekulių formavimąsi (Gao et al., 2014). Vis dėlto, HCPD ir didelės galios ultragarso taikymas padidina ne tik mikroorganizmų inaktyvavimo efektyvumą, bet ir reikalauja didesnių energijos sąnaudų.

Be to, produktas, kurį siekiama paveikti, gali būti tik riboto dydžio (Ferrentino ir Spilimbergo, 2015; García-Pérez et al., 2006). Netinkamai taikant šį metodą, pakinta molekuliniai ryšiai, baltymų konformacija ir pH, kas sukelia spalvos, struktūros ir organoleptinių savybių pokyčius. Tai ypatingai svarbu apdorojant kietus maisto produktus (Valverde et al., 2010).

Kitas gumbavaisių gedimą stabdantis metodas yra apdorojimas jonizuojančia spinduliuote. Produktą tinkamai apšvietus gama spinduliuote, ilginamas jo saugojimo laikas, inaktyvuojami mikroorganizmai ir fermentai, stabdomi dygimo procesai ir sumažinamas cheminių konservantų poreikis (Wang ir Chao, 2003). Vis dėlto, yra nustatyta, kad dėl iradiacijos gumbavaisio audiniai gali suminkštėti, pakisti skonio, kvapo savybės bei sumažėti maistinė vertė (Frazier et al., 2006; Rezaee et al., 2013).

Aukštas hidrostatinis slėgis (100-1000 MPa) taip pat inaktyvuoja mikroorganizmus maisto produktuose, bet tuo pačiu sukelia ir didesnių organinių molekulių, baltymų pažeidimus. Selektyvų poveikį ląstelėms, fermentams ar kitoms molekulėms siekiama užtikrinti taikant pasterizaciją mikrobangomis ar radijo bangomis. Dėl dielektrinių savybių skirtumo, įvairias molekules mikrobangos ir radijo bangos paveikia skirtingai. Nors įrodyta, kad pasterizacija šiomis bangomis vyksta du kartus greičiau, nei konvekcinis kaitinimas, metodas vis dar taikomas ribotam maisto produktų asortimentui ir reikalauja papildomų tyrimų (Pereira ir Vicente, 2010; Chandrasekaran et al., 2013).

Vienas iš plačiausiai tiriamų ir perspektyviausių metodų maisto produktų apsaugai ir saugojimo lauko pratęsimui yra impulsinio elektrinio lauko (IEL) poveikis. Šis metodas suteikia galimybę inaktyvuoti mikroorganizmus minimaliai paveikiant maistines, skonines, funkcines produkto charakteristikas (Pereira ir Vicente, 2010). Tai neterminis metodas, kuris jau yra sėkmingai pritaikytas skysto (pvz., pieno produktų (Reineke et al., 2015), sulčių (Torkamani, 2011)) ir pusiau skysto (pvz., kiaušinių) maisto pasterizavimui (Yogesh, 2016). Vis dėlto, jaučiamas informacijos trukūmas apie metodo efektyvumo priklausomybę nuo IEL parametrų, mikroorganizmų tipo bei pasterizuojamo produkto savybių (Deeth et al., 2007).

1.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis

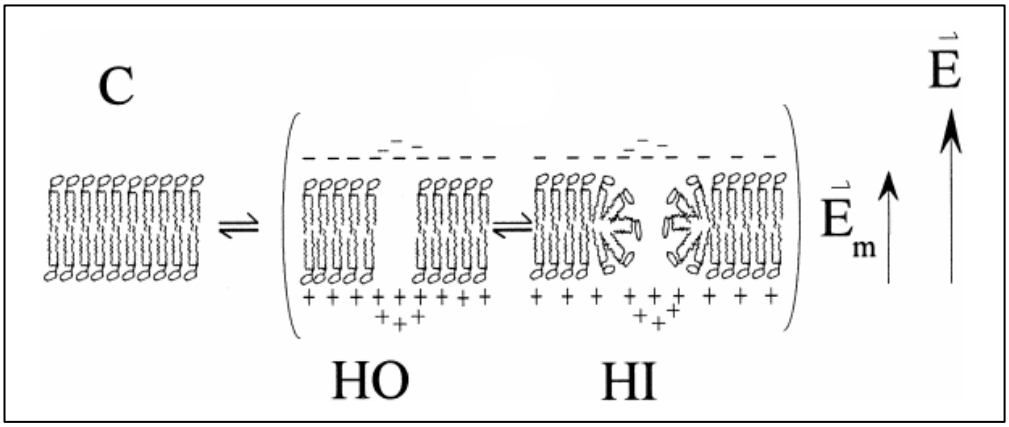
Elektroporacija (taip pat vadinama elektropermeabilizacija) – tai procesas, kurio metu tam tikro stiprio išorinis elektrinis laukas padidina transmembraninį potencialą, ko pasekoje padidėja ląstelės plazminės membranos laidumas ir pralaidumas biologiškai aktyvioms bei neaktyvioms molekulėms (Krassowska ir Filev, 2007).

Elektrinio lauko poveikis gyviems organizmams pradėtas tirti XX amžiaus pirmojoje pusėje. 1967 metais buvo paskelbti tyrimų rezultatai, kurie patvirtino, kad tam tikro stiprio, mikrosekundžių trukmės impulsai turi reikšmingą poveikį mielių bei bakterijų gyvybingumui

(Sale ir Hamilton, 1967). Sekančių tyrimų eigoje iškelta hipotezė, kad dėl elektrinio lauko impulsų poveikio ląstelių membranose susiformuoja poros, kurios aktyvuoja molekulių transportą į ir iš ląstelės. Šis procesas pavadintas „elektroporacija“ (Neumann, 1982). Įvairios trukmės ir stiprio elektrinio lauko impulsų poveikis pradėtas taikyti svetimos DNR įvedimui bei ląstelėse vykstančių biocheminių procesų tyrimams (Kawai et al., 2010).

1.3.1. Elektroporacijos mechanizmas

Sukurta keletas teorinių modelių aiškinančių kaip elektrinis laukas sukelia ląstelės plazminės membranos pralaidumo pokyčius. Plačiausiai priimta teorija yra grindžiama hidrofilinių arba hidrofobinių elektroporų plazminėje membranoje susidarymu (Neumann ir Kakorin, 2000; Rols, 2006). 1999 metais pasiūlytame modelyje (žr. 1 pav.) aiškinama, kad išorinis elektrinis laukas ($E_{iš}$) lemia uždaros membranos būsenos (C) paviršinę joninę poliarizaciją. Uždara membrana suprantama kaip kondensatorius (+, -). Dėl išorinio lauko poveikio yra indukuojamas membranos elektrinis laukas (E_m), kuris inicijuoja vandens molekulių judėjimą į membranos sluoksnį. Šio proceso pasekoje vyksta membranos cheminės būsenos persitvartkymai – susidaro cilindrinės hidrofobinės (HO) ar invertuotos hidrofilinės (HI) poros (Neumann et al., 1999).



Pav. 1. Impulsinio elektrinio lauko sukeltas membranos pralaidumo kitimo modelis. C – uždara dvisluoksnio būsena; HO – hidrofobinė pora; HI – hidrofilinė pora; E_m – membranos elektrinis laukas; $E_{iš}$ – išorinis elektrinis laukas (Neumann et al., 1999).

Neumann‘o pasiūlytą teoriją pagrindė ir molekulinės dinamikos *in silica* simuliacijos, kurios parodė plazminėje membranoje susidarančias poras. Teigiama, kad dėl elektrinio lauko impulsų poveikio vandens molekulės sudaro fosfolipidų persitvarkymą (hidrofilinių arba hidrofobinių porų susidarymą) sukeliačius darinius, fosfatidilserino translokaciją bei dažo perėjimą per dielektrinį sluoksnį (Tieleman, 2004; Tarek, 2005). Vis dėlto, *in silica* tyrimų rezultatai vertinami nevienareikšmiškai. Nustatyta, kad kompiuterinės simuliacijos metu aptinkamos tik didelės poros ir nėra atsižvelgiama į tai, kad elektrinio lauko poveikis gali turėti

ne tik trumpalaikį, bet ir ilgalaikį poveikį ląstelės membranos pralaidumui. Dėl šios priežasties, siūloma vengti elektroporacijos termino (kilusio iš „porų susidarymo“ teorijos) vartojimo ir pakeisti jį išvengiančiu netikslumų, elektropermeabilizacijos, terminu (Escoffre et al., 2009). Tačiau naujausių tyrimų publikacijose sutinkami ir elektropermeabilizacijos, ir elektroporacijos terminai.

Pagrindiniai tiriami IEL parametrai yra elektrinio lauko stipris (E), impulsų skaičius (pn), poliariškumas, trukmė (τ) bei dažnis. Derinant įvairius IEL parametrų dydžius stebimas skirtingas poveikis mikroorganizmų ląstelėms.

1.3.2. IEL poveikis audiniams bei taikymas biotechnologijoje

Elektroporacija sukelia membranos pralaidumo jonams, dažams ar nelaidžioms makromolekulėms padidėjimą (Neumann et al., 2000), todėl jau kelis dešimtmečius vykdomi tyrimai siekiant pritaikyti šį metodą įvairiose biotechnologijos srityse. Pirmasis eksperimentas įrodantis elektroporacijos pritaikymo galimybę plazmidės pernašai į žinduolinę ląstelę buvo publikuotas prieš 36 metus (Neumann et al., 1982). 1985 m. atlikta pirmoji augalo protoplastų, o 1987 metais – bakterinių ląstelių, elektrotransformacija (Fromm et al., 1985; Chassy ir Flickinger, 1987).

Genų elektropernašos efektyvumas pasitvirtino ir *in vivo*: transgenų ekspresijoje, fermentų pakeitimų procesuose, įvairių tipų vėžio kontrolėje, žaizdų gydyme. Stačiakampio formos IEL pradėtas taikyti tiesioginiam plazmidžių įvedimui į skirtingų audinių (odos, kepenų, raumenų, inkstų) ir vėžines ląsteles. Tokiu būdu įvesto geno ekspresija ląstelėje padidėja nuo 20 iki 1000 kartų (Lin et al., 2012; Young ir Dean, 2015). Pramonėje elektrotransformacija svarbi biomolekulių (pvz., antigenų, citokinų, fermentų, hormonų ir toksinų) produkcijai bakterijose, mikrodumbliuose bei mielėse.

Kita svarbi elektroporacijos taikymo sritis yra augalinių ir gyvūninių audinių transformacija bei modifikacija. Siekiant elektriniu lauku paveikti tikslią audinio sritį, elektrodai privalo turėti tiesioginį kontaktą su pasirinktu audiniu. Priklausomai nuo srities, kurioje norima paveikti ląsteles, elektrodai gali būti įvedami su atitinkama adata ar kateteriu (dažniausiai taikoma giliau esantiems audiniams) arba veikiama tiesiogiai per paviršinius sluosknius (Pavselj et al., 2007; Nuccitelli et al., 2009). Svarbu, kad kiekvienu atveju elektrinio lauko parametrai bei poveikis privalo būti vertinami ir parenkami priklausomai nuo audinio ir ląstelių tipo (Arena et al., 2011).

Vienas iš plačiai taikomų metodų yra augalinių ląstelių transformacija įvedant DNR tiesiogiai į pasirinkto audinio ląsteles (Sorokin et al., 2000). Nemažiau tyrimų atliekama ir su gyvūniniais audiniais. Grįžtamąją bei negrįžtamąją elektroporaciją siekiama pritaikyti

efektyviam vėžinių ląstelių, navikų naikinimui. Yra optimizuojamos priešvėžinių vaistų ir DNR įvedimo į vėžines ląsteles (elektrochemoterapijos, elektrogenoterapijos) metodai. Atliekama pasirinkto audinio abliacija nenaudojant papildomų cheminių medžiagų (Mir ir Orlowski, 1999; Davalos et al., 2005).

Maisto biotechnologijoje, taikant IEL poveikį didinamas sulčių išskyrimo iš vaisių ir daržovių efektyvumas. Sulčių ekstrakcija iš vaisių ir daržovių ląstelių vykdoma spaudžiant arba pasyvios difuzijos metodu. Išeigos padidinimui papildomai atliekamas pirminis audinių apdorojimas mechaniniais, terminiais, cheminiais arba fermentiniais metodais (Vorobiev et al., 2012). Kadangi sultys pagrinde vertinamos dėl skoninių savybių ir maistingumo, pramonei svarbu yra ne tik didinti sulčių išeigą, bet ir išsaugoti jų maistinę vertę. Nustatyta, kad pirminiam augalinių audinių apdorojimui taikant elektrinio lauko impulsus, apie 70 % padidinama sulčių spaudimo išeiga, o baltymų, mineralų, β-karoteno koncentracija didėja iki 60 % (Mhemdi et al., 2012).

Taikant IEL poveikį, mažinamos energijos bei laiko sąnaudos įvairių maisto produktų ir pašarų dehidratavimui. Nepažeistos ląstelių membranos yra pagrindinis vandens transportą limituojantis veiksnys. Elektroporacijos sukelti membranų pažeidimai pagreitina audinių dehidratavimo procesą iki 30 % esant ne didesniai nei 60 °C džiovinimo temperatūrai (Jaeger, 2012). Sukeldamas ląstelių membranų pažeidimus, IEL minkština obuolių, bulvių, cukrinių runkelių, morkų, saldžiųjų bulvių tekstūrą. Tokiu būdu sumažinamos vaisių ir daržovių mechaniniam apdorojimui (pvz., pjaustymui, nulupimui) reikalingos energijos sąnaudos (Lebovka et al., 2004; Liu et al., 2017). Be to, nustatyta, jog elektriniu lauku apdorotos bulvės sugeria mažesnį aliejaus kiekį kepimo metu (Ignat et al., 2015).

Kita svarbi elektroporacijos taikymo sritys biotechnologijoje, yra lipidų, cukrų, pigmentinių medžiagų, antioksidantų, flavonoidų ir kitų antrinių metabolitų ekstrakcija iš augalų ir mikrodumblių. Organinės medžiagos dažniausiai yra jautrios šviesai, temperatūrai ir oksidacijai, todėl tradicinių ekstrakcijos technikų (neaukšta temperatūra, spaudimas) efektyvumas gali būti padidinamas kombinuojant jas su elektroporacijos poveikiu (Mahnič-Kalamiza et al., 2014). Nustatyta, kad didelio stiprio IEL gali būti taikomas polifenolių ekstrakcijai iš vynuogių sėklų ir odelių (Boussetta et al., 2011), o išskiriant chlorofilą bei karotenoidus iš *Chlorella vulgaris* mikrodumblių, jų išeiga atitinkamai padidėja 80 % ir 52 % (Widjaja et al., 2009).

1.3.3. IEL taikymas vienaląsčių mikroorganizmų inaktyvavimui

Impulsinio elektrinio lauko sukeliami ląstelės membranos pralaidumo pokyčiai turi žymų poveikį ląstelės homeostazei ir gyvybingumui. Įrodyta, kad priklausomai nuo parametrų, IEL

gali paveikti ir organeles (branduolį, endoplazminį tinklą, vakuoles, granules, citoskeletą) bei viduląstelines molekules (DNR, su apoptoze susijusius faktorius, ROS, citochromą c) (Schoenbach et al., 2004; Batista Napotnik et al., 2016).

Svarbu, jog kitaip nei kietos medžiagos, ląstelės membrana (lipidų sluoksnis, funkcionuojantis kaip tam tikras dviejų dimensijų skystis) gali spontaniškai atsistatyti po IEL poveikio. Jei susidariusių porų dydis ir skaičius neviršija kritinės vertės, plazminė membrana atsistato pakankamai greitai ir ląstelė išlieka gyvybinga, toks IEL poveikis vadinamas grįžtamu. Priešingu atveju IEL poveikis vadinamas negrįžtamu (Böckmann et al., 2008; Kotnik et al., 2012).

Viena iš sričių, kur pritaikomas negrįžtamas IEL poveikis, yra aplinkos (ekologinė) biotechnologija. Tvarkant skystas atliekas bei ligoninių nuotekas, svarbu yra inaktyvuoti visus jose esančius mikroorganizmus, o ypatingai, antibiotikams atsparių kamienų bakterijas. Tam tikslui gali būti panaudojami pakankamai stipraus elektrinio lauko impulsai (Mahnič-Kalamiza et al., 2014). Šiuo atveju IEL laukas negrįžtamai pažeidžia mikroorganizmų ląsteles. O dėl nežymaus atliekų temperatūros padidėjimo išlaikomos aktyvios nukleazės, kurios degraduoja iš žuvusių mikroorganizmų atpalaiduotą DNR ir yra stabdoma horizontali genų pernaša (Rieder et al., 2008).

Nemažiau perspektyvus yra elektroporacijos taikymas maisto pramonėje atliekant neterminę maisto produktų pasterizaciją, kurios metu inaktyvuojami mikroorganizmai aluje (Milani et al., 2015), sidre (Evrendilek et al., 2000), sultyse ir pieno produktuose (Deeth et al., 2007). Tarp dviejų elektrodų esantis produktas veikiamas trumpais (1-100 µs) stipraus (15-40 kV/cm) elektrinio lauko impulsais. Dažniausiai yra kuriamos pratekančio skysčio sistemos, kurios leidžia vienodai efektyviai pasterizuoti įvairius skystų produktų kiekius (HO ir MITTAL, 2000). Be to, pastebėta, kad elektrinio lauko poveikiu gali būti efektyviai inaktyvuojami ir kai kurie terminės pasterizacijos temperatūrai atsparūs mikroorganizmai (Alvarez et al., 2000). Vis dėlto, nepaisant vykdomų tyrimų skysčių pasterizavimo elektrinio lauko impulsais srityje, trūksta duomenų apie kietų struktūrų (pvz., tokių maisto produktų kaip augalų gumbavaisiai) pasterizavimo galimybes, IEL poveikį mikroorganizmams esantiems ne suspensijoje, o standžioje terpėje.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1. Mikroorganizmų izoliavimas iš *Helianthus tuberosus* L. stiebagumbio

Tyrimui naudoti tik mechaniškai nepažeisti *H. tuberosus* L. stiebagumbiai. Siekiant užtikrinti, kad mikroorganizmai bus izoliuojami tik iš vidinių augalo audinių, pirmiausiai atliktas stiebagumbių paviršiaus dezinfekavimas. Stiebagumbis kruopščiai nuplautas distiliuotu vandeniu, toliau 3 minutėms įdėtas į 70 % etanolio (VWR, Prancūzija) tirpalą, 10-15 minučių laikytas 10 % vandenilio peroksido (AppliChem, Vokietija) tirpale ir 4 kartus nuskalautas steriliu distiliuotu vandeniu. Paviršiaus dezinfekavimo efektyvumui įvertinti, Petri lėkštelėse su standžiomis TSA (Fluka, Vokietija) ir Ashby‘s Mannitol Agar (10 g/L manitolio, AppliChem, Vokietija; 0,2 g/L kalio divandenilio fosfato, Sigma-Aldrich, Vokietija; 0,2 g/L magnio sulfato, Sigma-Aldrich, Vokietija; 0,2 g/L kalio chlorido, Carl Roth, Vokietija; 0,1 g/L natrio hidrosulfato monohidrato, Merck KGaA, Vokietija; 5 g/L kalcio karbonato, Sigma-Aldrich, Vokietija; 15 g/L agaro, Merck KGaA, Vokietija; pH 7,4 ± 0,2, 25 °C) terpėmis padaryti dezinfekuoto stiebagumbio paviršiaus atspaudai ir išsėti 3 mėginiai vandens, kuriuo stiebagumbis buvo nuskalautas ketvirtąjį kartą. Lėkštelės laikytos inkubatoriuje INCU-Line (VWR, JAV) prie 30 °C, 72 valandas. Jei lėkštelėse neišaugo mikroorganizmų kolonijos, stiebagumbio paviršius įvertintas kaip sterilus.

Mikroorganizmų išskyrimui iš augalo audinių taikyti du metodai. Pirmas: steriliais įrankiais stiebagumbis supjaustytas 0,5 cm sluoksniais ir Petri lėkštelėse su Ashby‘s Mannitol Agar terpe padaryti gautų sluoksnių atspaudai. Antras: steriliais įrankiais stiebagumbis supjaustytas 1 cm^3 gabalėliais. Gautas šakniagumbio fragmentas sutrintas sterilioje grūstuvėje ir išsiskyręs skystis išsėtas Petri lėkštelėse su Ashby‘s Mannitol Agar terpe. Lėkštelės inkubuotos 96 valandas, 30 °C, inkubatoriuje INCU-Line (VWR, JAV). Išaugusių mikroorganizmų kolonijos persėtos į naujas Petri lėkštelės su Ashby‘s Mannitol Agar terpe ir atliktas kolonijų morfologinis charakterizavimas ir kiti izoliato identifikavimo testai.

2.2. Izoliuotų mikroorganizmų identifikavimas

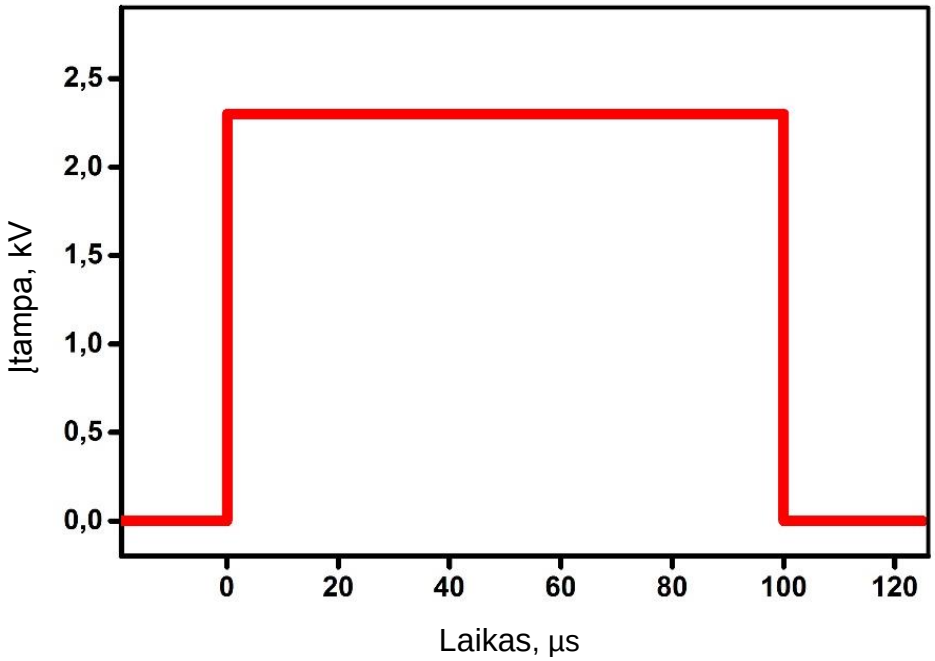
Mikroskopu SK 14 (PZO Warszawa, Lenkija) įvertintas ląstelių judrumas, forma ir dydis. Atliktas izoliuotų mikroorganizmų ląstelių Gram testas pagal rinkinyje (Gram-color modified staining kit, Merck KGaA, Vokietija) pateiktą protokolą. Genotipiniam charakterizavimui atlikta izoliato 16S rRNR geno sekoskaita. Ląstelių genominės DNR išskyrimui naudotas GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Lietuva) rinkinys. 16S rRNR seka amplifikuota polimerazės grandininėje reakcijoje (PGR) su tiesioginiu ir pradmenimis bei

izoliato genomine DNR. 50 µL PGR reakcijos mišinį sudarė 1 µM tiesioginių 27F (5‘-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3‘) pradmenų (Metabion (Vokietija); 1 µM atvirkštinių 1495R (5‘-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3‘) pradmenų (Metabion (Vokietija); 1 µL DNR matricos (izoliato genominės DNR); 5 µL dešimtkartinio Dream Taq buferio, 1 µL dNTP mišinio, 1,25 U DreamTaq DNR polimerazės, 32,5 µL vandens be nukleazių (Thermo Scientific, Lietuva). Reakcija vykdyta termocikleryje FlexCycler (Analytik Jena AG, Vokietija), esant šioms sąlygoms: 2 min 98 °C pirminė denaturacija; 35 ciklai – 30 sek. 96 °C denatūracija, 30 sek. 51 °C pradmenų prilydymas, 1 min 72 °C DNR polimerizacija; 10 min 72 °C galutinė polimerizacija. Amplifikuotos sekos fragmento ilgis įvertintas 0,9 % agarozės (AppliChem, Vokietija) gelyje. PGR produktas išvalytas rinkiniu GeneJET PCR purification Kit (Fisher Scientific, Lietuva) ir jo koncetracija įvertinta NanoDrop spektrofotometru (Thermo Scientific, USA).

Izoliato 16S rRNR geno sekoskaitą atliko BaseClear (Olandija). BioEdit v.7.0.5 (North Carolina State University, Raleigh, USA) programa gauta konsensus seka ir BLAST programa ji palyginta su kitomis NCBI duomenų bazėje esančiomis 16S rRNR genų sekomis. Filogenetiškai izoliatui artimiausių mikroorganizmų 16S rRNR sekų prieigos numeriai atrinkti iš LPSN duomenų bazės (www.bacterio.net). Sekos gautos iš NCBI duomenų bazės. Filogenetinis medis sukonstruotas MEGA 7 programa.

2.3. Elektrinio lauko impulsų generavimo įranga

Suspensijoje esančios izoliato ląstelės buvo veikiamos stačiakampio formos elektrinio lauko impulsais. Stačiakampis impulsas atvaizduotas 2 pav. Lauko generavimui naudotas Fizinių ir technologijos mokslų centre sukurtas elektroporatorius, kurio techniniai parametrai pateikti 1 lentelėje. Ląstelės suspenduotos kiuvetėje su laidaus polimero elektrodais (Lonza, Šveicarija).



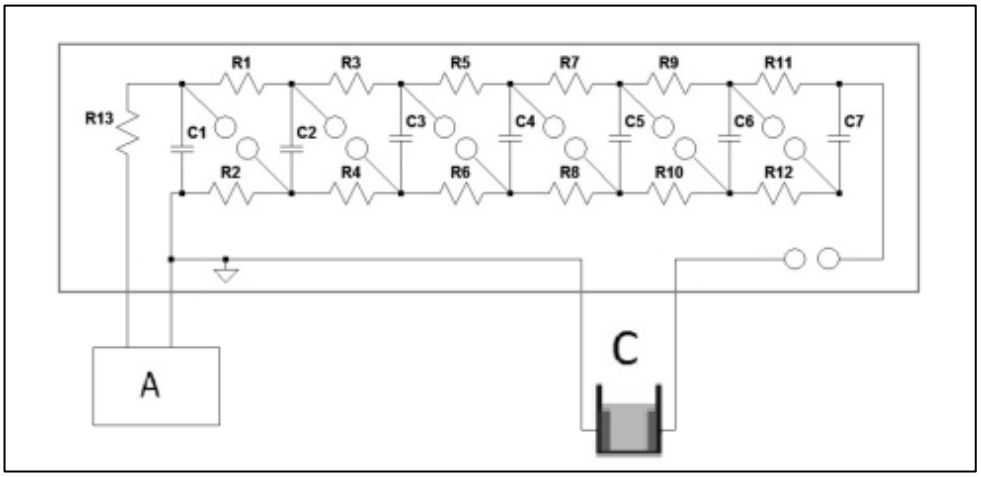
2 pav. Stačiakampio IEL impulso forma. Raudona kreivė atspindi sugeneruoto impulso įtampos dydžio pokytį laike.

1 lentelė. Elektroporatoriaus savybės.

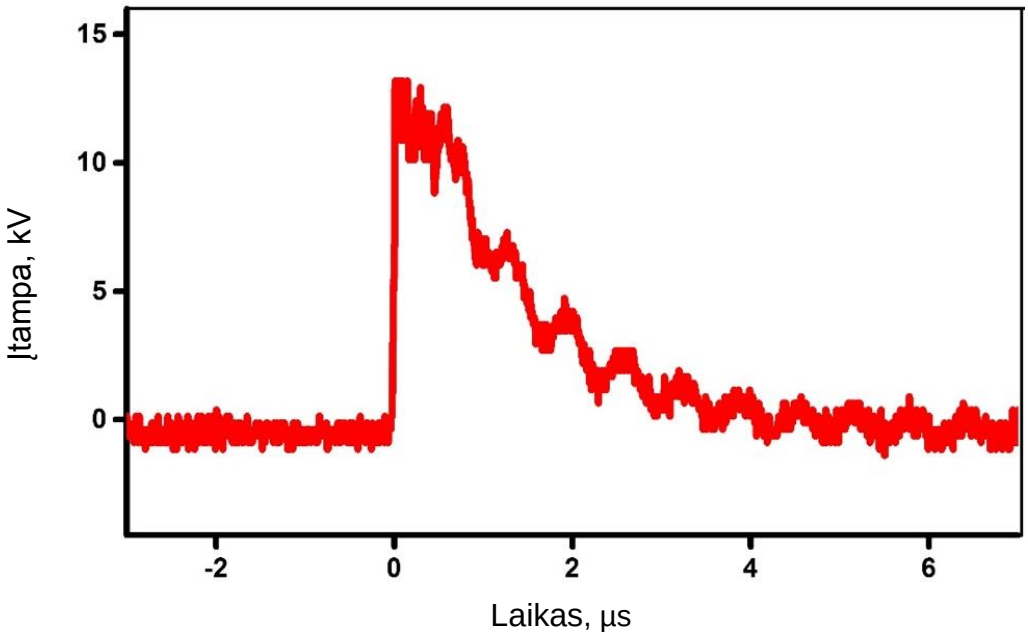
Tiesioginės srovės bangos forma	Stačiakampis
Maksimali impulso trukmė	I intervalas – 60 µs; II intervalas – 250 µs; III intervalas – 1 ms; IV intervalas – 10 ms
Maksimali išėjimo įtampa	I intervalas – 4 kV; II intervalas – 2 kV; III intervalas – 1,8 kV; IV intervalas – 0,9 kV
Impulso charakteristika	Pakilimo laikas – 100 ns; nusileidimo laikas – 300 ns
Impulsų skaičius	1 – 100
Elektrinio impulso vaizdavimas	LCD grafinis vaizduoklis
Nustatytų parametrų vaizdavimas	4 linijų LCD vaizduoklis
Operacinė sistema	Mikrokontroleris XMEGA
Sauga	Generatoriaus atsparumas trumpajam jungimui
Galia	220 V, 50/60 Hz

Gelyje ląstelės buvo elektroporuojamos eksponentės formos elektrinio lauko impulsais. Naudota Fizinių ir technologijos mokslų centre sukurta įranga, kurio schema pateikta 3 pav., o impulso forma atvaizduota 4 pav. Įrangą sudaro: aukštos įtampos šaltinis, 1 µs trukmės eksponentinio užpakalinio fronto formos signalo generavimo schema, kiuvetė, kurioje

patalpinamas mėginys. Impulso signalas stebimas realaus laiko oscilografu. Naudotos dvi skirtingų atstumą (0,4 cm, 0,2 cm) tarp elektrodų turinčios elektroporacijos kiuvetės aliuminio elektrodais (BTX, JAV).



3 pav. 1 µs trukmės eksponentinio užpakalinio fronto formos signalo generavimo schema. A – aukštos įtampos šaltinis, C – kiuvetė.



4 pav. Eksponentinio užpakalinio fronto signalo atvaizdavimas. Raudona kreivė atspindi sugeneruoto impulso įtampos dydžio pokytį laike.

Ląstelių gyvybingumo priklausomybės nuo IEL parametrų tyrimams suspensijoje ir gelyje taikytos skirtingos elektroporacijos parametrų kombinacijos, kurios pateiktos 2 lentelėje.

2 lentelė. Impulsinio elektrinio lauko parametrai.

Terpė, varža	**Kiuvetės tūris**	**Įtampa (U_E)**	**Elektrinio lauko stipris (E)**	**Impulsų skaičius (pn) ir dažnis (*f*)**	**Impulso trukmė (τ)**	**Impulso energija (W)**
Suspensija, 170 Ω	0,12 mL	2,3 kV	14 kV/cm	20-100 vnt., 1 Hz	100 µs	1,16 J
		1,1 kV	5,9 kV/cm	50 vnt., 1-10 Hz	50 µs	0,11 J
		0,2-2,3 kV	1,9-14 kV/cm	100 vnt., 1 Hz	100 µs	0,02-1,16 J
Gelis, 37,5 Ω	0,42 mL	9,6 kV	48 kV/cm	5-30 vnt.	1 µs	2,46 J
Gelis, 75 Ω	0,85 mL	10,9 kV	27,2 kV/cm	5-90 vnt.	1 µs	1,57 J

Impulso energija buvo apskaičiuota pagal (3) formulę, kur W – impulso energija, U_E – įtampa, τ – impulso trukmė, R – mėginio varža. Sistemai suteikta energija apskaičiuojama padauginus vieno impulso energiją ir impulsų skaičiaus.

$$W = \frac{{U_E}^2}{R} \cdot \tau \qquad (3).$$

2.4. Izoliato ląstelių auginimas skystoje terpėje

Izoliuoto mikroorganizmo kamieno auginimas ir ląstelių kultūros paruošimas eksperimentams buvo atliekamas standartinėmis sąlygomis. Ląstelių kultūra auginama skystoje YEP (10 g/L mielių ekstrakto, Merck KGaA, Vokietija; 5 g/L natrio chlorido, Carl Roth, Vokietija; 10 g/L peptono iš kazeino, Carl Roth, Vokietija) ar agarizuotoje (YEP su 15 g/L agaro, Merck KGaA, Vokietija) mitybinėje terpėje 30 °C. Skystoje terpėje ląstelės augintos ~16 valandų aeruojant inkubatoriuje purtyklėje TOU-10-2 (MRC International, Izraelis). Visi eksperimentai buvo atliekami su izoliato ląstelėmis eksponentinėje augimo fazėje, kai ląstelių suspensijos optinis tankis (OT600 nm) lygus 2,0 (KFV/mL= 2^10^{11}). Ląstelių suspensijos optinis tankis išmatuotas spektrofotometru Halo RB-10 (Dynamica Scientific Ltd., Didžioji Britanija).

2.5. Izoliato ląstelių paruošimas IEL poveikiui

Po auginimo ląstelės centrifuguotos 12 minučių, 3500 G, centrifuga SIGMA 1-6P (Sigma-zentrifugen, Vokietija), 2 kartus praplautos Tris-HCl (EP) buferyje (20 mM TRIS, Applichem, Vokietija; HCl, Merck KGaA, Vokietija; 1M sorbitolis, Applichem GmbH, Vokietija; pH 7,4; 4 °C), išmaišomos purtykle Vortex Mixer CLASSIC (VELP Scientifica, Italija), dar kartą nucentrifuguotos ir suspenduotos EP buferyje, sukoncentruotos 2 kartus. Visi tirpalai paruošti naudojant distiliuotą vandenį. Eksperimentams, kuriuose tiriama suspensinių izoliato ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo IEL poveikio paramentrų, buvo paruošiamas pradinis mėginys, su ląstelių koncentracija 6×10^{10} KFV/mL.

2.6. Izoliato ląstelių veikimas IEL suspensijoje

Automatine pipete Transferpette (BrandTech Scientific, JAV) iš pradinio mėginio paimta 120 µL elektrinio lauko poveikiui paruoštų izoliato ląstelių suspenduotų EP buferyje ir patalpinta kiuvetėje. Stačiakampio formos impulsinio elektrinio lauko generatoriuje nustatyti pasirinkti impulso parametrai ir impulsų skaičius. Elektriniu lauku paveiktų ląstelių suspensija išimta iš kiuvetės ir praskiesta EP buferiu iki 2000 KFV/mL. 50 µL suspensijos išsėta ant standžios Ashby‘s Mannitol Agar mitybinės terpės Petri lėkštelėse. Auginta inkubatoriuje INCU-Line (VWR, JAV) prie 30 °C, 72-96 valandas. Po inkubacijos suskaičiuotos išaugusios ląstelių kolonijos. Kontrolei naudotos IEL nepaveiktos izoliato ląstelės suspenduotos EP buferyje.

2.7. *H. tuberosus* L. stiebagumbį simuliuojančio gelio paruošimas

Gelio sudėtis ir paruošimo metodika pritaikyta remiantis kitų mokslininkų atliktais tyrimais (Mobashsher and Abbosh, 2014). Į stiklinėlę įpilta 92 g distiliuoto vandens, įdėta 4 g želatinos (KLINGAI, Lietuva) ir ištirpinta pastoviai kaitinant bei maišant. Į mišinį įdėta 4 g topinambo stiebagumbio miltų (Anvitus, Lietuva) ir 0,5 mL glicerolio (Applichem GmbH, Vokietija). Gelis išpilstytas į mėgintuvėlius ir autoklavuotas.

2.8. Izoliato ląstelių veikimas elektriniu lauku standžioje gelio struktūroje

Mėgintuvėlis su 5 mL paruošto sterilaus gelio laikytas 5 minutes 30 °C vandens vonelėje, kol gelis suskystėjo. Automatine pipete Transferpette (BrandTech Scientific, JAV) paimta 500 µL elektrinio lauko poveikiui paruoštų izoliato ląstelių suspenduotų EP buferyje ir įdėta į mėgintuvėlį su geliu bei viskas gerai išmaišyta purtykle Vortex Mixer CLASSIC (VELP Scientifica, Italija). Kiuvetės su 0,2 cm ir 0,4 cm tarpu tarp elektrodų užpildomos geliu su ląstelėmis. Siekiant užtikrinti, kad visą elektrodų paviršių drėkina gelis, papildomai įpilta 50 µL

gelio be ląstelių. Kiuvetės 10 minučių laikytos 4 °C temperatūroje, kol gelis sustingo ir gauta standi struktūra su gyvomis ląstelėmis. Toliau elektroporavimo įrangoje nustatyti parametrai, kiuvetėje esantis mėginys paveiktas IEL.

Kiuvetė įdėta 1 minutei į 30 °C vandens vonelę. Iš kiuvetės vidurio pipete paimtas ištirpinto gelio su IEL paveiktomis ląstelėmis mėginys ir praskiestas EP buferiu iki 2000 KFV/mL. 50 µL suspensijos išsėta ant standžios Ashby‘s Mannitol Agar mitybinės terpės Petri lėkštelėse. Kiekviena IEL paveikta izoliato ląstelių suspensija išsėta ant trijų Petri lėkštelių. Auginta inkubatoriuje INCU-Line (VWR, JAV) prie 30 °C, 72-96 valandas. Po inkubacijos suskaičiuotos išaugusios ląstelių kolonijos. Kontrolei naudotos IEL nepaveiktos izoliato ląstelės įmaišytos į paruoštą gelį.

2.9. Matematinis ir statistinis duomenų apdorojimas

Eksperimentų duomenų apdorojimui naudotos programos: Microsoft Office Excel 2016 (standartinio nuokrypio, vidurkio skaičiavimas), OriginPro 9.1 (grafikų braižymas, duomenų glodinimas).

Izoliato ląstelių inaktyvavimo efektyvumas buvo išreikštas dešimtainiu gyvybingumo sumažėjimu (DGS) (ang. log reduction, LR), kuris apskaičiuojamas pagal formulę:

$$DGS = -\log(N/N_0) \qquad (1);$$

Formulėje (1), N yra KFV skaičius mėginyje po IEL poveikio, N_0 yra KFV skaičius nepaveiktame mėginyje. Iš eksperimentų gautų logaritminio sumažėjimo duomenų glodinimui ir išgyvenamumo kreivių sukūrimui buvo pritaikytas matematinis modelis (Mafart et al., 2002). Išgyvenamumo kreivės, nusakančios DGS priklausomybę nuo impulsų skaičiaus, lygties formulė:

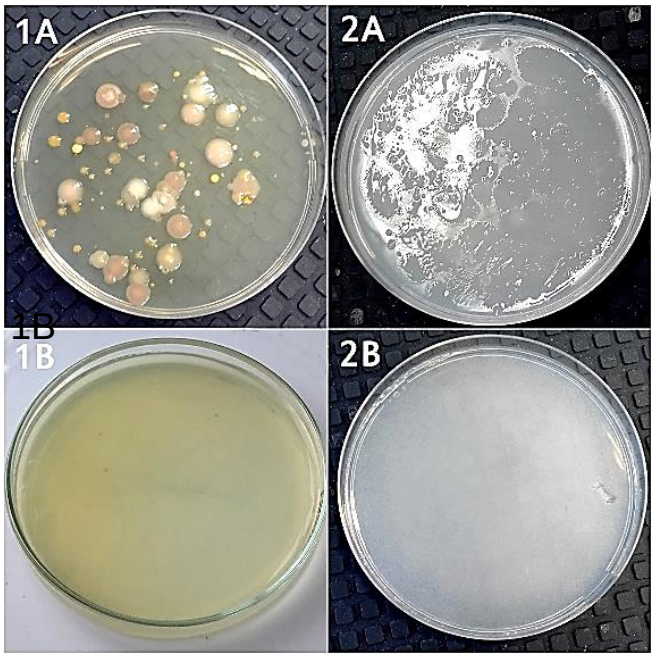
$$DGS = \left(\frac{pn}{pn_{s1}}\right)^{\rho} \qquad (2);$$

Formulę (2) sudaro eksperimentinių duomenų parametrai (*DGS, pn*) ir parametrai aprašantys impulsų skaičių, reikalingą sumažinti LS vienetu (pn_{s1}) bei kreivės formą (ρ). Išgaubtas kreives nusako $\rho > 1$, įgaubtas kreives nusako $\rho < 1$; $\rho = 1$ nurodo linijinį pokytį. Duomenų kreivės, sukurtos pagal pateiktą modelį, vadinamos išgyvenamumo kreivėmis. Ta pati formulė taikoma LS lygčių sudarymui, kai vietoje kintamojo *pn* yra impulso energija, sistemai suteikta energija arba impulsų dažnis (*f*).

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Mikroorganizmų izoliuotų iš topinambo šakniagumbio identifikavimas

Mikroorganizmų izoliavimui iš *H. tuberosus* L. šakniagumbio pasirinkta selektyvi Ashby‘s Mannitol Agar mitybinė terpė. Tai azoto šaltinio neturinti mitybinė terpė, kuri naudojama endofitinių mikroorganizmų išskyrimui iš požeminių augalo dalių (Meng Xianfa et al., 2014). Prieš izoliuojant mikroorganizmus buvo atliktas šakniagumbio paviršiaus sterilinimas. Visose Petri lėkštelėse su sterilinto paviršiaus mėginiais, nebuvo aptikta išaugusių mikroorganizmų kolonijų (žr. 5 pav.). Padarius išvadą, kad paviršiaus sterilinimo metodas yra efektyvus, atliktas mikroorganizmų izoliavimas iš vidinių šakniagumbio audinių.

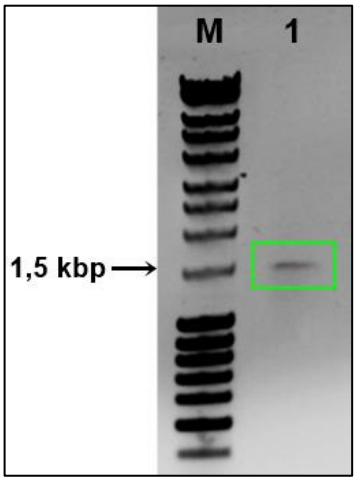


5 pav. Šakniagumbio paviršiaus sterilumą įvertinančio testo rezultatai. 1 – Petri lėkštelės su TSA mitybine terpe; 2 – Petri lėkštelės su Ashby‘s Mannitol Agar mitybine terpe; A – nesterilinto paviršiaus mėginiai po inkubacijos (matomos įvairaus tipo mikroorganizmų kolonijos); B – sterilinto paviršiaus mėginiai po inkubacijos (mikroorganizmų kolonijų nėra).

Pirmiausia įvertintos izoliuotų mikroorganizmų kolonijų morfologinės charakteristikos. Visos Petri lėkštelėse išaugusios kolonijos morfologiškai įvertintos kaip vieno tipo: skaidrios, apvalios, išgaubtos, lygiais kraštais ir lygiu paviršiumi, 2 – 4 mm diametro dydžio. Atlikus Gram testą, ląstelės įvertintos kaip Gram neigiamos. Mikroskopuojant nustatyta, kad izoliato ląstelės yra judrios, lazdelės formos (0,5 µm pločio ir 2,0-3,0 µm ilgio).

Genotipiniam bakterijų identifikavimui iš izoliato ląstelių buvo išskirta genominės DNR ir atliktas 16S rRNR geno sekos amplifikavimas su atitinkamais pradmenimis. Vidutinis bakterijų 16S rRNR geno sekos ilgis lygus 1,55 kbp (Clarridge, 2004). Elektroforezės agarozės

gelyje nustatyta, kad PGR amplifikuota seka atitinka vidutinį 16S rRNR geno sekos ilgį ir yra ~1,5 kbp ilgio (žr. 6 pav.).



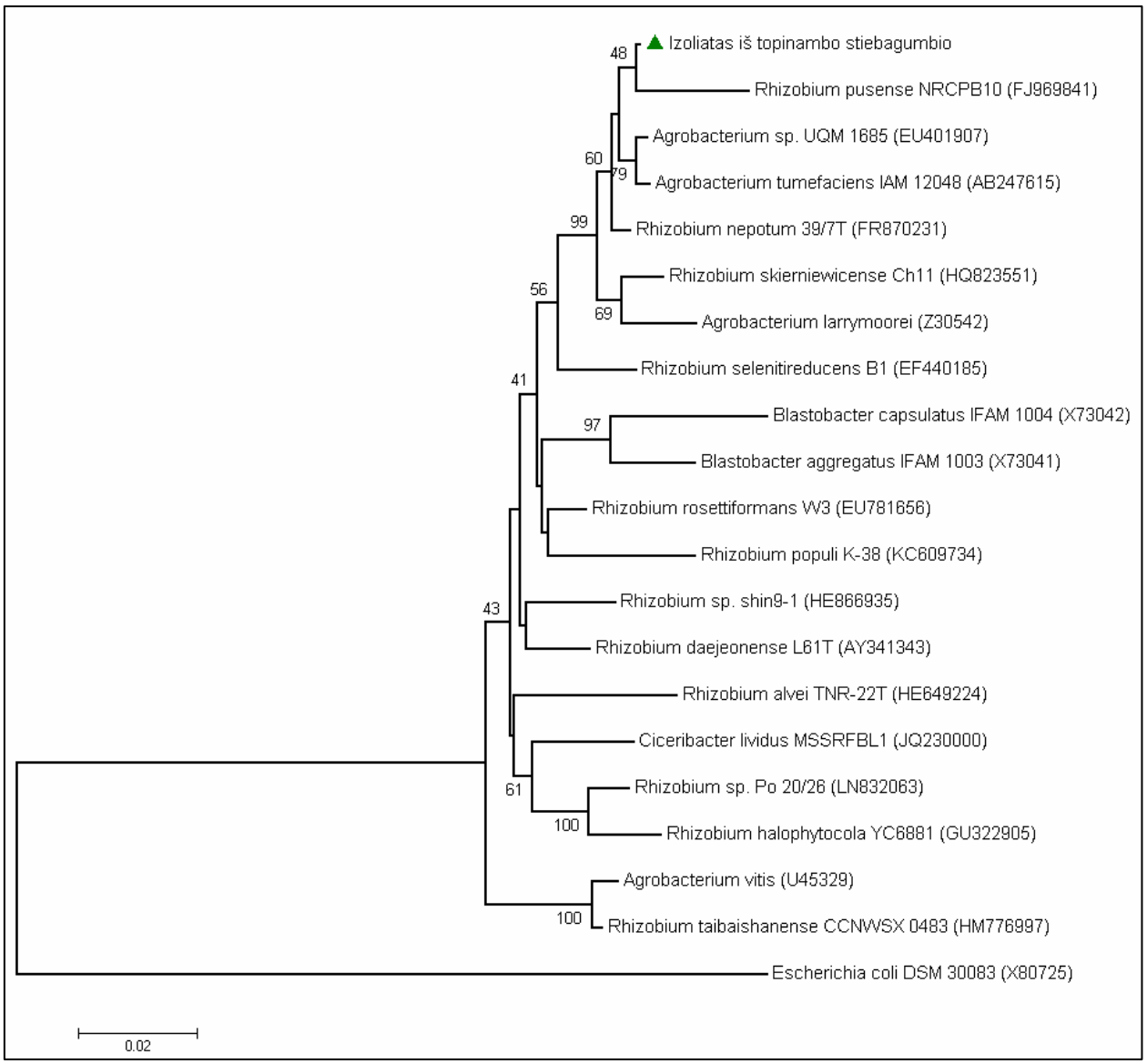
6 pav. Elektroforezės nuotrauka. M takelis – molekulinis standartas; 1 takelis – PGR produktas.

Sekoskaitą atliko BaseClear (Olandija). Gauta seka palyginta BLAST programa su NCBI duomenų bazėje esančiomis 16S rRNR geno sekomis. Pagal BLAST programos rezultatus, izoliato 16S rRNR seka pasižymėjo 99 % panašumu su *Rhizobium nepotum* 39/7 kamienu. Remiantis BLAST gautais rezultatais, iš LPSN duomenų bazės buvo atrinkta 19 filogenetiškai artimiausių bakterijų sekų. Filogenetinio medžio įšaknydinimui pasirinkta *Escherichia coli* 16S rRNR seka. Pagal ClustalW algoritmą atliktas izoliato ir visų atrinktų sekų daugybinis palyginimas; Neighbour-Joining metodu sukonstruotas filogenetinis medis (žr. 7 pav.).

Filogenetinė analizė parodė, kad izoliato ląstelės sudaro bendrą klasterį su *Rhizobium pusense* NRCPB10 kamienu. *Rhizobium* gentis sudaro simbiontinius ryšius su ankštiniais augalais, ko pasekoje susiformuoja augalų gumbai bei vyksta atmosferinio azoto fiksavimas. Plačiausiai *Rhizobium* sp. sutinkamos dirvožemyje ir augalų rizosferoje (Parker, 2001). Yra duomenų, patvirtinančių, kad *Rhizobium* sp. kolonizuoja ir augalinius audinius (Somasegaran ir Hoben, 1994; Mhamdi et al., 2005). Be to, izoliato ląstelių morfologija sutampa su literatūroje pateikiamais aprašymais. *R. pusense* apibūdinamos kaip judrios, Gram neigiamos, lazdelės formos, aerobinės bakterijos. Tyrimai rodo, kad *R. pusense* taip pat gali kolonizuoti augalinius audinius, o anaerobinėmis sąlygomis išgyvena denitrifikuodamos augalo audiniuose esančius azoto junginius (Panday et al., 2011).

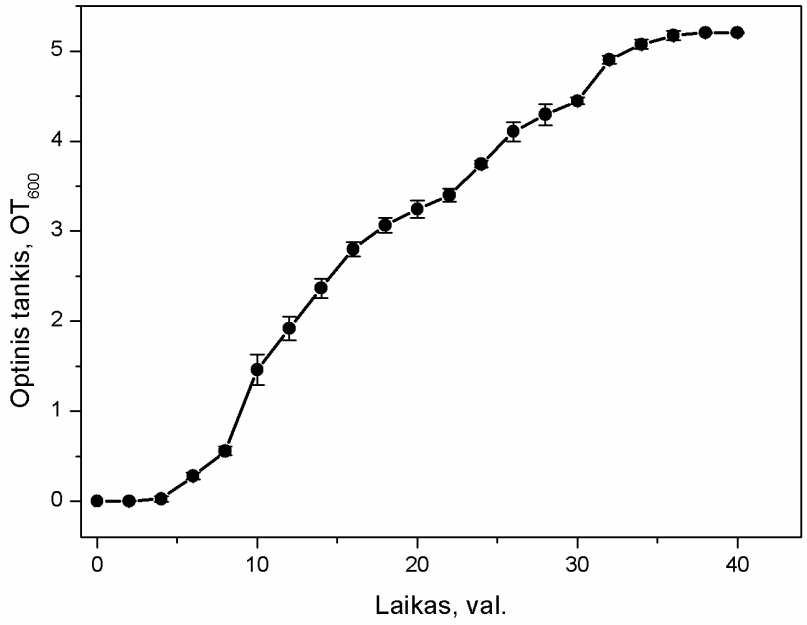
Skystoje Ashby‘s Mannitol Agar mitybinėje terpėje esantis kalcio karbonatas sudarė nuosėdas neleidžiančias vertinti ląstelių optinio tankio spektrofotometru, tad ląstelių kultyvavimui tolimesniems tyrimams buvo pasirinkta YEP mitybinė terpė. *Rhizobium* sp. ir *Agrobacterium* sp. genčių bakterijų kultivavimui dažnai naudojama YEP mitybinė terpė, kurią sudaro pakankamas kiekis mitybinių medžiagų reikalingų greitam ląstelių padauginimui (Guo et

al., 2017; Jube ir Borthakur, 2009). Be to, šioje terpėje nėra komponentų sudarančių nuosėdas. Siekiant gauti duomenis apie izoliato ląstelių augimo greičio priklausomybę nuo ląstelių tankio, buvo sudaryta augimo kreivė skystoje YEP mitybinėje terpėje, 30 °C temperatūroje (žr. 8 pav.).



7 pav. Neighbour-Joining filogenetinis medis sudarytas pagal 16S rRNR geno seką. Vertės virš šakų žymi kiek procentų bootstrap pakartojimų patvirtina šakų topologiją. Skliaustuose pažymėtas kiekvieno kamieno GenBank prieigos numeris. Izoliato iš topinambo stiebagumbio ląstelių pozicija filogenetiniame medyje pažymėta trikampiu.

Yra žinoma, jog IEL poveikis mikroorganizmams priklauso nuo ląstelių tipo, dydžio, jų membranų sandaros (García et al., 2007; Wouters et al., 1999). Be to, ląstelių jautrumui elektrinio lauko poveikiui įtakos turi ląstelių augimo fazė. Nustatyta, kad *E. coli* inaktyvavimui stacionarioje fazėje reikia dviejų 8 kV/cm stiprio IEL impulsų, o eksponentinio augimo fazėje – dviejų 2 kV/cm stiprio impulsų (Schoenbach et al., 1997).



8 pav. Izoliato ląstelių augimo kreivė YEP mitybinėje terpėje. Akių vedlys pateiktas vientisa linija.

Iš augimo kreivės nustatyta, kad ląstelių eksponentinis augimas prasideda ~5 valandą po inokuliavimo. Stacionari fazė prasideda 32 valandą, kai ląstelių optinis tankis OT_{600}= 4,90 ± 0,04. Kadangi maisto produktai dažniausiai yra pasterizuojami mikroorganizmams nepasiekus stacionaraus augimo fazės, šio darbo metu IEL poveikio ląstelėms suspensijoje ir gelyje tyrimams buvo naudojamos ankstyvoje eksponentinio augimo fazėje esančios izoliato ląstelės, kai optinis tankis skystoje YEP mitybinėje terpėje lygus OT_{600}= 2,0.

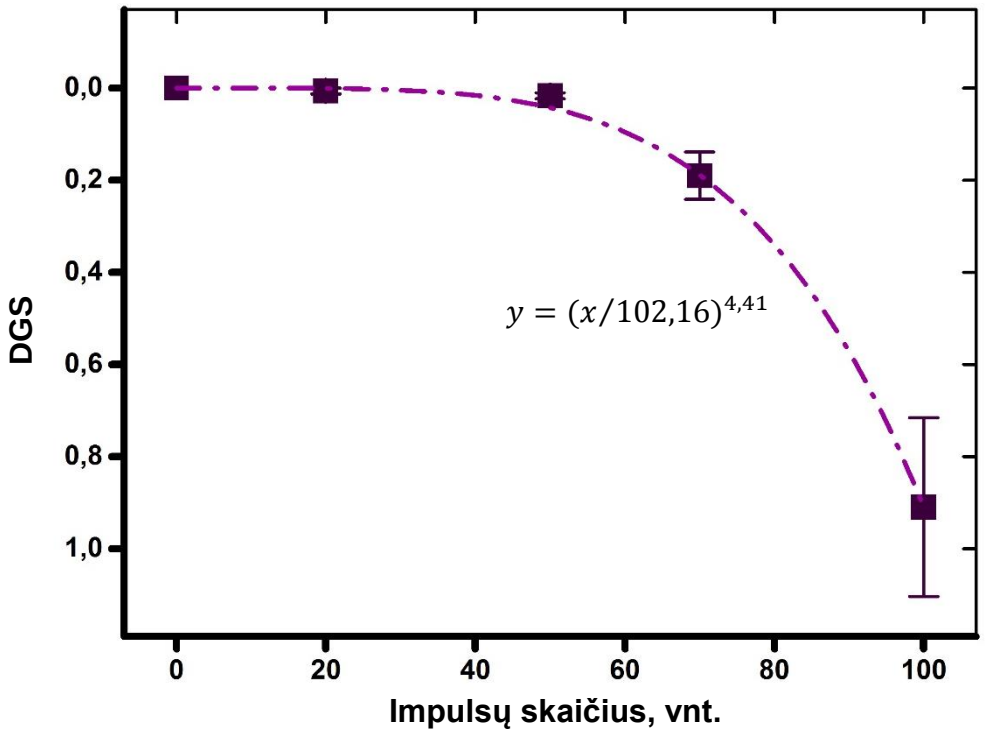
3.2. Impulsinio elektrinio lauko poveikis izoliato ląstelėms suspensijoje

Tikslus gyvybingų kolonijas formuojančių vienetų (KFV) kiekis nustatomas išsėjant ląsteles ant standžios mitybinės terpės. Šis metodas pasižymi dviem privalumais. Pirma, atliekant ląstelių suspensijos serijinius skiedimus galima įvairių koncentracijų ląstelių suspensijas. Antra, išvengiama klaidingo negyvybingų lastelių ir nuosėdų vertinimo (Hazan et al., 2012).

Pirmiausia buvo tiriama izoliato ląstelių suspensijoje gyvybingumo priklausomybė nuo pagrindinių IEL parametrų: impulsų skaičiaus (pn), energijos (W) ir dažnio (*f*). Atliktų tyrimų rezultatuose gyvybingumas pateiktas dešimtainio gyvybingumo sumažėjimo (DGS) išraiška, kur DGS= 0 lygu kontrolės (IEL nepaveiktų ląstelių) vertei, DGS= *x* rodo ląstelių skaičiaus sumažėjimą 10^x kartų.

3.2.1. Gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų skaičiaus

Priklausomybė nuo impulsų skaičiaus (pn= 20; 50; 70; 100) nustatyta esant pastovaus dydžio impulsų energijai (W= 1,16 J), trukmei (τ= 100 μs) ir dažniui (*f*= 1 Hz). Gauti duomenys rodo gyvybingų ląstelių skaičius mažėja, kai yra didinamas IEL impulsų skaičius (žr. 9 pav.).



9 pav. Izoliato ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo elektrinio lauko impulsų skaičiaus, kai impulso energija W= 1,16 J, τ= 100 μs, o *f*= 1 Hz. Punktyrinė violetinės spalvos kreivė atspindi išgyvenamumo kreivę sudarytą glodinant duomenis pagal (2) formulę (kor. R^2= 0,99). DGS – dešimtainis gyvybingumo sumažėjimas.

Tyrimo rezultatai rodo, kad esant pastoviems IEL energijos, impulso trukmės ir dažnio parametrams, izoliato ląstelių inaktyvavimo efektyvumas pradeda žymiai didėti ląstelių suspensiją veikiant daugiau nei 50 impulsų. Po 20 ir 50 impulsų poveikio, DGS vertės išlieka labai artimos kontrolei (*DGS*= 0,01 ± 0,01, *DGS*= 0,02 ± 0,01). 70 impulsų poveikis sukelia žymesnį (*DGS*= 0,19 ± 0,05) DGS vertės padidėjimą. Didžiausias ląstelių gyvybingumo sumažėjimas (*DGS*= 0,91 ± 0,19) užfiksuotas po 100 impulsų poveikio. Atlikus duomenų analizę gauta statistiškai patikima išgyvenamumo kreivė, kurios koreguotas determinacijos koeficientas lygus 0,99. Iš kreivės lygties nustatyta, kad po 102 impulsų poveikio (kai W= 1,16 J, *f*= 1 Hz) ląstelių skaičius mėginyje sumažėja ~10 kartų.

Iš ankstesnių tyrimų yra žinoma, kad ląstelių gyvybingumas priklauso netiesiškai nuo elektrinio lauko impulsų skaičiaus. Atlikus tyrimus su *E. coli* bakterijomis, nustatyta, kad kai IEL stipris E= 69 kV/cm, vienas impulsas sumažina ląstelių gyvybingumą 42 %, 5 impulsai –

64 %, o po 10 impulsų inaktyvuojama apie 79 % bakterijų (Schoenbach et al., 1997). Kitų tyrimų rezultatai rodo, jog siekiant negrįžtamai paveikti ląstelių membranas ir efektyviai inaktyvuoti mikroorganizmus skystoje terpėje, reikalingas tam tikras minimalus impulsų skaičius (Schoenbach ir Dobbs, 2000). Mūsų gauti rezultatai taip pat atspindi šias IEL poveikio ląstelių gyvybingumui savybes.

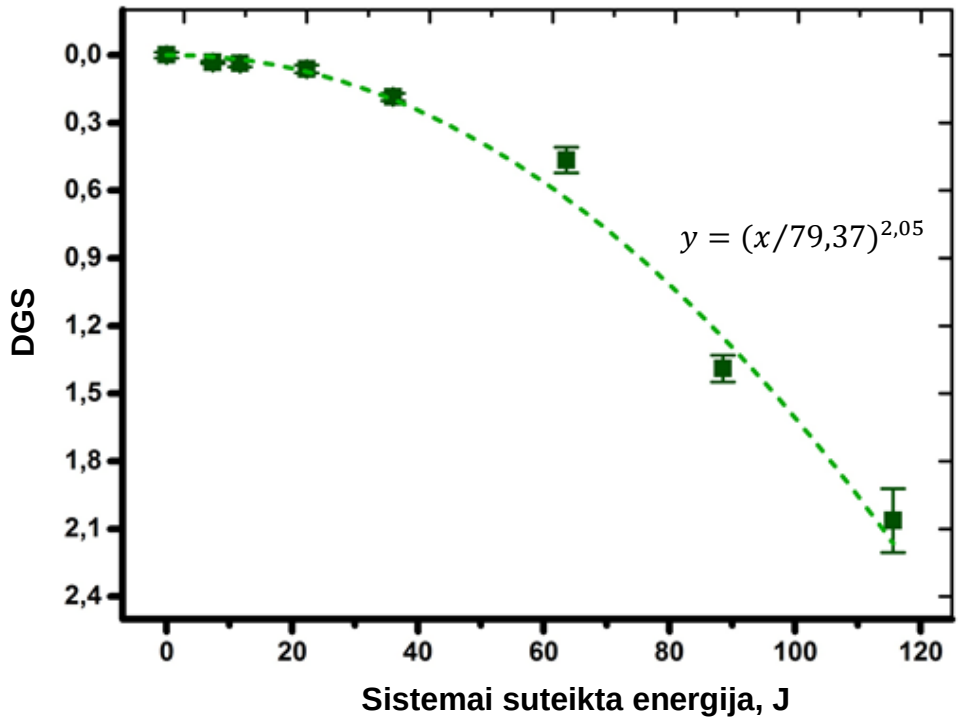
Yra žinoma, kad veikiant ląsteles pakartotinais impulsais, gali būti stebimas sudėtinis (Pakhomov et al., 2015) arba IEL poveikį neutralizuojantis (Schoenbach et al., 2015) efektas. Tokius efektus sukelia elektriniu lauku veikiamos sistemos pokyčiai po kiekvieno impulso. Dėl padidėjusio ląstelių pralaidumo, keičiasi sistemos suspensijos laidumas, temperatūra, pH (Huang et al., 2013). Be to, dėl elektrinio lauko poveikio suspensijoje gali kisti ląstelių orientacija ir pakartotiniai impulsai paveikia didesnį ląstelės membranos plotą, kas lemia elektroporacijos efektyvumo padidėjimą. Šio tyrimo rezultatai rodo sudėtinį pakartotinių elektrinio lauko impulsų poveikio efektą.

3.2.2. Gyvybingumo priklausomybė nuo sistemai suteiktos energijos

Toliau nustatyta izoliato ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo mėginiui (sistemai) suteiktos IEL energijos (žr. 10 pav.), kai impulsų trukmė τ= 100 µs, dažnis f= 1 Hz. Sistemai suteiktos energijos vertė apskaičiuota padauginus vieno impulso energijos dydį (W= 0,07 J; 0,11 J; 0,22 J; 0,36 J; 0,63 J; 0,88 J; 1,16 J) iš impulsų, kuriais paveikiamas mėginys, skaičiaus (pn= 100). Maksimalios mėginiui suteiktos IEL energijos vertė buvo lygi ~116 J.

Didinant impulso energiją, DGS vertės kito nuo DGS= 0,03 ± 0,01 kai W= 7,4 J, iki DGS= 2,06 ± 0,14 kai IEL sistemai suteikta 116 J energija. Reikšmingas (DGS= 0,20 ± 0,02) ląstelių gyvybingumo sumažėjimas matomas, kai vieno impulso energija lygi 0,36 J, o bendrai sistemai suteikiama 36 J energijos. Mažesnis sistemai suteiktos energijos kiekis (W= 7,4 J; W= 11,7 J; W= 22,3 J) sukelia nežymų gyvybingų ląstelių skaičius sumažėją (DGS= 0,03 ± 0,01; DGS= 0,04 ± 0,01; DGS= 0,06 ± 0,02), lyginant su kontrole (DGS= 0,002 ± 0,010).

Eksperimento rezultatų duomenys buvo glodinami ir gauta statistiškai patikima išgyvenamumo kreivė, kurios koreguotas determinacijos koeficientas lygus 0,94. Apskaičiuota, kad siekiant sumažinti ląstelių skaičių 10 kartų, sistemai turi būti suteikta ~79 J energija.



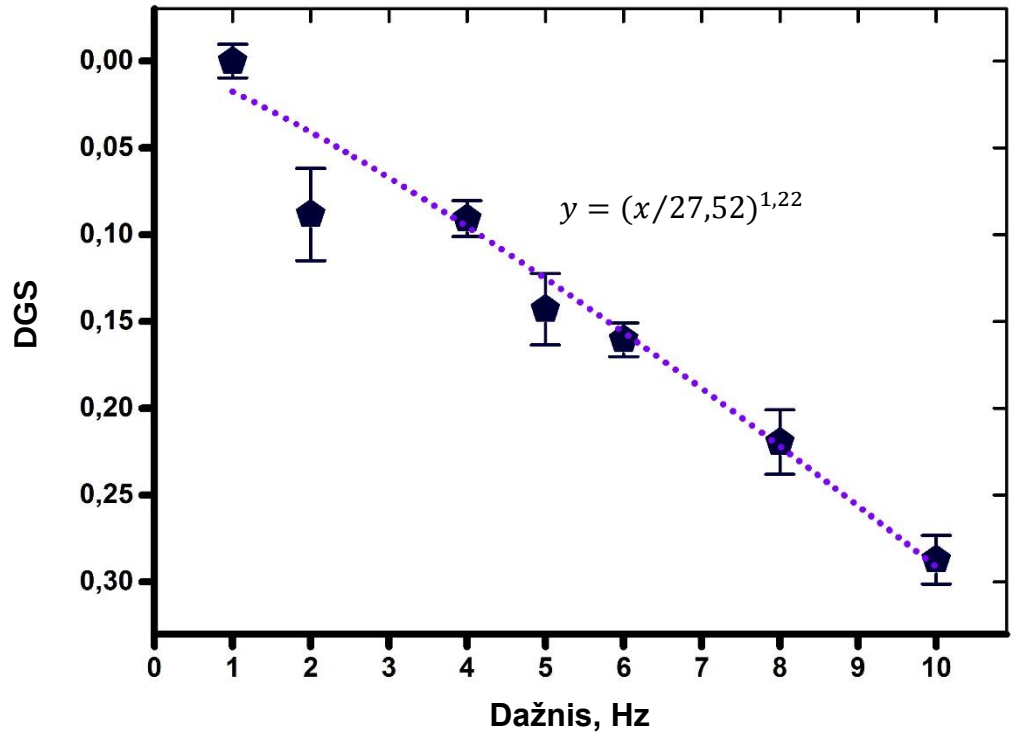
10 pav. Izoliato ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo sistemai suteiktos impulsinio elektrinio lauko energijos, kai τ= 100 µs, *f*= 1 Hz ir pn= 100, W= 0,07 J; 0,11 J; 0,22 J; 0,36 J; 0,63 J; 0,88 J; 1,16 J. DGS – dešimtainis gyvybingumo sumažėjimas, W – impulso energija. Punktyrinė žalios spalvos kreivė atspindi išgyvenamumo kreivę sudarytą glodinant duomenis pagal (2) formulę (kor. R^2= 0,94).

Priklausomai nuo ląstelių tipo, jų inaktyvavimui reikalingas skirtingas impulso energijos kiekis. Dėl membranų ir kitų ląstelės apvalkalų sandaros skirtumų, Gram neigiamų bakterijų inaktyvavimui reikia mažesnės impulso energijos nei Gram teigiamoms ląstelėms. Didžiausiu atsparumu IEL poveikiui pasižymi bakterijų sporos (Yonemoto et al., 1993).

Teigiama, kad norint 10 kartų sumažinti bakterijų kiekį skystame mėginyje, vidutiniškai reikia apie 1-100 J/mL IEL energijos. Atlikus tyrimą su *Pseudomonas fluorescens* (Gram neigiamomis, lazdelės formos) bakterijomis, nustatyta, jog vandenyje gyvybingų *P. fluorescens* ląstelių skaičius po 75 J/mL elektrinio lauko poveikio sumažėja 10 kartų (Heesch et al., 2000). Mūsų tyrime, kad izoliato ląstelių gyvybingumas sumažėtų 10 kartų, 0,12 mL ląstelių suspensijos turėjo būti suteikta 166 J energijos, t.y. 966 J/mL. Taigi, nors *P. fluorescens* ir izoliato iš topinambo stiebagumbio ląstelių morfologija yra panaši, jų inaktyvavimui reikalingas žymiai didesnis energijos kiekis. Toks reikalingų energijos dydžių skirtumas gali būti paaiškinamas terpių, kuriose ląstelės elektroporuojamos savitosios elektrinės varžos dydžių skirtumu bei sugeneruojamų elektrinio lauko impulsų stiprio bei formos skirtumais.

3.2.3. Gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų dažnio

Sekančio eksperimento tikslas buvo nustatyti, ar izoliato ląstelių gyvybingumas priklauso nuo impulsų dažnio, kai kiti IEL parametrai yra pastovaus dydžio (energija W= 0,11 J, impulsų trukmė τ= 50 µs, impulsų skaičius pn= 50 vnt.). Gauti rezultatai rodo mikroorganizmų ląstelių gyvybingumo mažėjimą didėjant impulsų dažniui (žr. 11 pav.).



11 pav. Izoliato ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo elektrinio lauko impulsų dažnio, kai pn= 50 vnt., τ= 50 µs, o impulso energija W= 0,11 J. Punktyrinė violetinės spalvos kreivė atspindi išgyvenamumo kreivę sudarytą glodinant duomenis pagal (2) formulę (koreguotas R^2= 0,97). DGS – dešimtainis gyvybingumo sumažėjimas.

Nustatyta ryški ląstelių gyvybingumo mažėjimo tendencija didėjant impulsų dažniui nuo 1 Hz iki 10 Hz. Dėl didelių standartinio nuokrypio verčių, DGS vertės ties 2 Hz ir 4 Hz dažniais yra labai artimos (*DGS*= 0,08 ± 0,03 ir *DGS*= 0,09 ± 0,01), tačiau lyginant gautus duomenis ties 1 Hz, 5 Hz ir 10 Hz dažniais, matomas žymus ląstelių gyvybingumo mažėjimas (atitinkamai *DGS*= 0,001 ± 0,001, *DGS*= 0,14 ± 0,02 ir *DGS*= 0,28 ± 0,01).

Išgyvenamumo kreivė, gauta atlikus eksperimento duomenų glodinimą, rodo labai artimą tiesinei, ląstelių gyvybingumo priklausomybę nuo IEL impulsų dažnio. Kreivės *b* koeficientas lygus 1,22 (tiesinės priklausomybės atveju būtų *b*= 1). Koreguoto determinacijos koeficiento vertė lygi 0,97, todėl kreivė statistiškai patikimai atspindi rezultatų pasiskirtymą. Iš kreivės lygties nustatyta, kad teoriškai ląstelių skaičius mėginyje gali būti sumažintas ~10 kartų impulsų dažnį padidinus iki 27 Hz, kai impulsų trukmė τ= 50 µs, skaičius pn= 50, energija W= 0,11 J.

Mikroorganizmų gyvybingumo priklausomybė nuo IEL impulsų dažnio stebėta ir kitų mokslininkų darbuose tiriant IEL poveikį *E. coli* bei *Salmonella enterica* bakterijomss. Ląstelių populiacijų dydžiai mėginiuose statistiškai reikšmingai mažėja didinant IEL impulsų dažnį nuo 100 Hz iki 250 Hz (Mosqueda-Melgar et al., 2007).

Apibendrinant IEL impulsų energijos, dažnio bei skaičiaus poveikį izoliato ląstelių gyvybingumui suspensijoje: gyvybingumo mažėjimas stebimas didinant IEL impulsų skaičių, dažnį bei sistemai suteikiamos IEL energijos dydį. Svarbu yra atsižvelgti į tai, kad šiose tyrimuose 100 % ląstelių inaktyvavimas negali būti pasiektas, nes IEL poveikis ląstelėms nėra homogeniškas dėl skirtingo ląstelių dydžio, orientacijos bei susiformuojančių ląstelių agregatų suspensijoje (Weaver ir Chizmadzhev, 1996). Be to, elektroporacijai naudojamos kiuvetės elektrodų paviršius privalo būti pilnai drėkinamas, todėl ląstelių suspensijos tūris yra įdedamas didesnis, nei tūris tarp elektrodų paviršių. IEL poveikis ląstelių suspensijai esančiai virš elektrodų yra minimalus, todėl joje esančios ląstelės yra mažiau arba visai nepaveikiamos.

3.3. Impulsinio elektrinio lauko poveikis izoliato ląstelėms gelyje

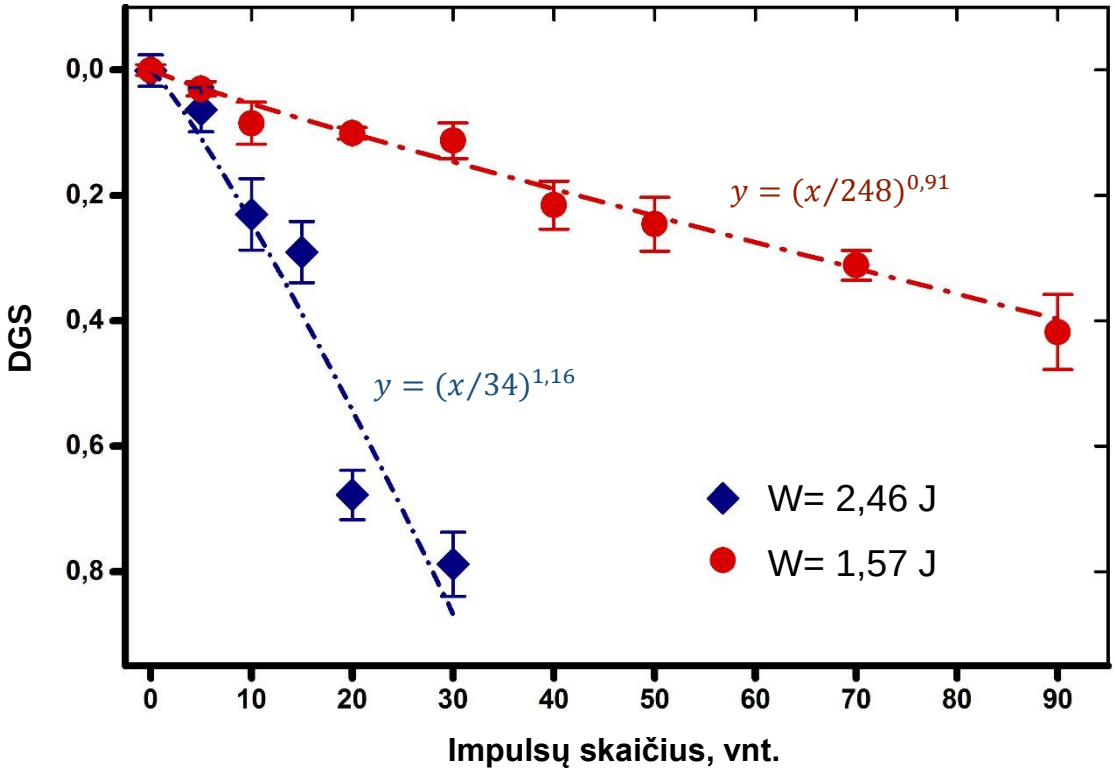
Nors atliekama daug IEL poveikio ląstelėms suspensijoje tyrimų, jaučiamas informacijos apie elektrinio lauko poveikio pritaikymo galimybes mikroorganizmų inaktyvavimui standžiose terpėse, pavyzdžiui, kietuose maisto produktuose, trukūmas. Yra atliekami ląstelių inaktyvavimo tyrimai kolageno gelio struktūrose, kurios simuliuoja audinių inžinerijoje ir medicinoje naudojamas medžiagas bei priemones (Griffiths et al., 2008; Smith et al., 2009). Tačiau siekiant pritaikyti IEL poveikį mikroorganizmų inaktyvavimui natūraliuose audiniuose, yra reikalingi papildomi tyrimai.

3.3.1. Gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų skaičiaus ir energijos

Šiam tyrimui buvo pasirinktas gelis, pagamintas iš želatinos bei topinambų stiebagumbių miltų. Pirmiausia, IEL poveikis izoliato ląstelėms topinambo stiebagumbį simuliuojančiame gelyje tirtas esant dviejų dydžių energijos (W= 1,57 J ir W= 2,46 J) eksponentės formos impulsams ir nustatyta ląstelių gyvybingumo priklausomybė nuo impulsų skaičiaus. Kiekvieno impulso trukmė lygi 1 µs.

Gauti rezultatai (žr. 12 pav.) rodo ryškų skirtumą tarp 1,57 J ir 2,46 J energijos impulsų efektyvumo inaktyvuojant ląsteles. Kai pn= 30 ir W= 2,46 J, *DGS*= 0,79 ± 0,05; o kai pn= 30 ir W= 1,57 J, *DGS*= 0,11 ± 0,03. Nežymus skirtumas matomas tik po 5 impulsų poveikio: *DGS*= 0,06 ± 0,04, kai W= 2,46 J ir *DGS*= 0,3 ± 0,01, kai W= 1,57 J. Po 10 impulsų poveikio skirtumas reikšmingai padidėja: kai W= 2,46 J, *DGS*= 0,23 ± 0,06, o kai W= 1,57 J, *DGS*= 0,08 ± 0,03.

Tyrime naudojamo gelio lydymosi temperatūra yra ~30 °C. Paveikus ląsteles gelyje didesniais impulsų skaičiais, pastebėta, kad gelis kiuvetėje išsilydo. Tai reiškia, jog mėginio temperatūra pakyla virš 30 °C ir ląstelėms gali būti sukeltas ne tik elektrinio lauko, bet ir temperatūros poveikis. Todėl buvo nuspręsta tirti ne didesnio nei 30 (kai W= 1,57 J) ir 90 (kai W= 2,46 J) impulsų skaičiaus poveikį ląstelių gyvybingumui.



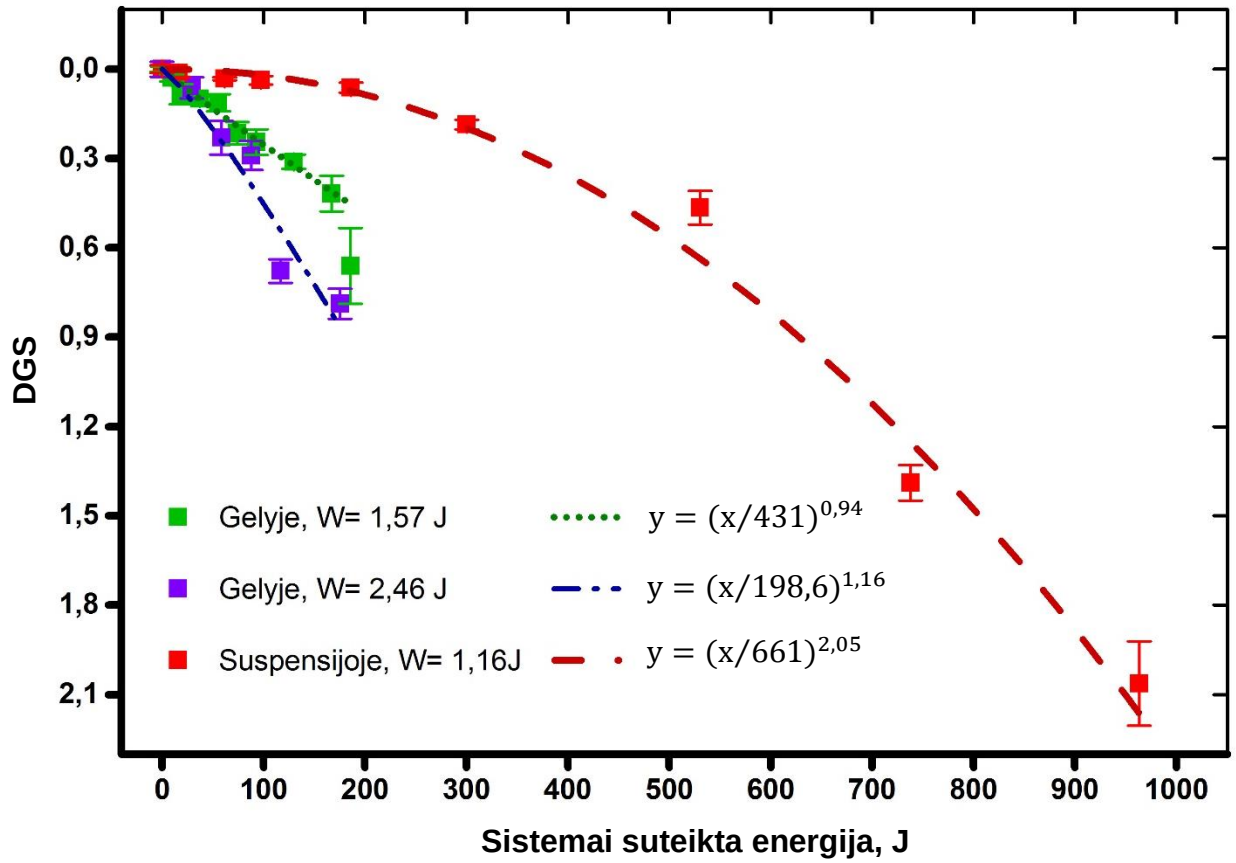
12 pav. Izoliato ląstelių gelyje gyvybingumo priklausomybė nuo elektrinio lauko impulsų energijos ir skaičiaus, kai τ= 1 µs. W – impulso energija, DGS – dešimtainis gyvybingumo sumažėjimas. Punktyrinės kreivės pagal energijos dydį atspindi išgyvenamumo kreivę sudarytą glodinant duomenis pagal (2) formulę (kor. R^2= 0,99, kai W= 1,57 J; kor. R^2= 0,93, kai W= 2,46 J).

Atlikus duomenų glodinimą buvo sudarytos išgyvenamumo kreivės, kurių determinacijos koeficientai (0,99, kai W= 1,57 J ir 0,93, kai W= 2,46 J) patvirtina, kad jos statistiškai patikimai atspindi duomenų pasiskirstymą. Kreivių *a* koeficientai (a= 248 ir a= 34) aiškiai rodo, jog norint sumažinti gyvybingų ląstelių skaičių 10 kartų, mažesnės (W= 1,57 J) energijos impulsų reikia apie ~7,5 karto daugiau, nei didesnės (W= 2,46 J) energijos impulsų.

3.3.2. Impulsinio elektrinio lauko efektyvumo skystoje ir standžioje terpėse palyginimas

Impulsinio elektrinio lauko efektyvumo priklausomybė nuo poveikio terpės buvo įvertinta lyginant IEL paveiktų izoliato ląstelių gyvybingumą suspensijoje bei gelinėje struktūroje (žr. 13 pav.). Vieno impulso ir sistemai suteiktos energijų dydžiai buvo perskaičiuoti

į energijos kiekį suteiktą vienam mililitrui. Nustatyta, kad sistemai suteikiant 9-90 J/mL energijos, ląstelių gyvybingumas mažėja nežymiai (DGS vertės kinta nuo 0,01 ± 0,01 iki 0,29 ± 0,05) nepriklausomai nuo terpės. Didinant sistemai suteiktos energijos vertę, išryškėja skirtumas tarp ląstelių inaktyvavimo efektyvumo gelyje ir suspensijoje. Nustatyta, kad sistemai suteikiant iki 300 J/mL energijos, ląstelių gyvybingumas suspensijoje mažėja nežymiai. Sistemai suteikiamos energijos kiekį padidinus iki 530 J/mL, DGS vertė padidėjo iki 0,47 ± 0,06. Ląsteles veikiant gelyje, panašaus dydžio (*DGS*= 0,42 ± 0,06) ląstelių gyvybingumo sumažėjimas pasiekiamas mėginiui suteikus 167,1 J/mL energijos.



13 pav. Izoliato ląstelių gelyje gyvybingumo priklausomybė nuo sistemai suteiktos energijos ir terpės. W – impulso energija, DGS – dešimtainis gyvybingumo sumažėjimas. Punktyrinės kreivės pagal energijos dydį atspindi išgyvenamumo kreivę sudarytą glodinant duomenis pagal (2) formulę (kor. R^2= 0,98, gelyje, W= 1,57 J; kor. R^2= 0,93, gelyje, W= 2,46 J; kor. R^2= 0,94, suspensijoje W= 1,16 J).

Sukeliant IEL poveikį ląstelėms suspensijoje, maksimali DGS vertė (*DGS*= 2,06 ± 0,14) pasiekta, kai sistemai buvo suteikta 963,5 J/mL energija. Veikiant izoliato ląsteles gelyje, didžiausios DGS vertės (*DGS*= 0,79 ± 0,05; *DGS*= 0,66 ± 0,13) gautos, kai sistemai suteikta energija siekė atinkamai 175 J/mL ir 186 J/mL.

Be to, pastebėta, kad suteikiant sistemai vienodą energijos kiekį, ląstelių inaktyvavimo efektyvumas gelyje priklauso nuo pavienio impulso energijos dydžio. Kai sistemai suteikiama

~170 J/mL energijos, esant didesniai (W= 2,46 J) vieno IEL impulso energijai, gelyje ląstelės inaktyvuojamos efektyviau (*DGS*= 0,79 ± 0,5), nei esant 1,57 J vieno impulso energijai (*DGS*= 0,42 ± 0,06).

Glodinant eksperimento rezultatų duomenis, gautos statistiškai patikimos išgyvenamumo kreivės, kurių koreguoti determinacijos koeficientai lygūs 0,94 (suspensijoje, W= 1,16 J), 0,93 (gelyje, W= 2,46 J) ir 0,98 (gelyje, W= 1,57 J). Energijos, kurią reikia suteikti sistemai, siekiant sumažinti gyvybingų ląstelių skaičių 10 kartų, dydis nustatytas iš išgyvenamuno kreivių lygčių. Izoliato ląsteles veikiant elektriniu lauku suspensijoje, *DGS*= 1 pasiekiamas, kai sistemai suteikta energija lygi 661 J/mL. Gelyje gyvybingų ląstelių skaičius sumažinamas 10 kartų, kai sistemai suteikiamos energijos dydis lygus 198,6 J/mL (kai vieno impulso W= 2,46 J) arba 431 J/mL (kai vieno impulso W= 1,57 J).

Suspensijoje izoliato ląstelės buvo veikiamos stačiakampio formos, o gelyje – eksponentės formos elektrinio lauko impulsais. Yra žinoma, kad impulso forma turi įtakos ląstelių inaktyvavimo efektyvumui. Vienodos energijos stačiakampio formos impulsai inaktyvuoja apie 60 % daugiau ląstelių, nei eksponentės formos impulsai (Schoenbach ir Dobbs, 2000). Šio tyrimo rezultatai rodo, jog paveikiant ląsteles gelyje eksponentės formos impulsais, jų gyvybingumas mažinamas efektyviau, nei veikiant suspensijoje stačiakampio formos impulsais. Tokios priklausomybės priežastimi gali būti suspensijos (472,5 Ω·cm) ir gelio (2040 Ω·cm) elektrinių varžų skirtumas. Taip pat, įtakos galėjo turėti IEL įtampos dydžių skirtumai. Ląsteles veikiant suspensijoje, IEL įtampa buvo žymiai mažesnė (2,3 kV), nei inaktyvuojant ląsteles gelyje (9,6 kV, 10,9 kV).

Atliktų IEL poveikio ląstelių gyvybingumui gelyje tyrimų rezultatai rodo, kad IEL gali būti taikomas mikroorganizmų inaktyvavimui standžiose struktūrose. Inaktyvavimo efektyvumas priklauso ne tik nuo terpės, bet ir nuo sistemai suteiktos energijos vertės,vieno impulso energijos dydžio bei impulsų dažnio.

IŠVADOS

1. Iš *Helianthus tuberusus* L. stiebagumbio izoliuotos Gram neigiamos, lazdelės formos ir judrios bakterijos. Atlikus 16S rRNR geno sekoskaitą ir analizę nustatyta, kad filogenetiškai izoliatas yra artimiausias *Rhizobium pusense* NRCPB10 kamienui.
2. Suspensijoje izoliato ląstelių gyvybingumas priklauso nuo elektrinio lauko impulsų skaičiaus, dažnio ir energijos. Didžiausias bakterijų inaktyvavimo efektyvumas (*DGS*= 2,06 ± 0,14) pasiektas kai impulso trukmė 100 μs, dažnis 1 Hz ir sistemai suteikta energija 166 J.
3. Impulsinio elektrinio lauko impulsai gali būti taikomi mikroorganizmų inaktyvavimui gelinėje struktūroje. Nustatyta, kad gyvybingų ląstelių skaičius gelyje sumažėja 10 kartų sistemai suteikus 199 J/mL (kai W= 2,46 J) arba 431 J/mL (kai W= 1,57 J) energijos, o suspensijoje – 661 J/mL (kai W= 1,16 J) energijos.

Kamilija SINKEVIČ, Vilniaus Universiteto, Mikrobiologijos ir biotechnologijos programos IV kurso studentė

Darbas atliktas Fizinių ir technologijos mokslų centro Bioelektrochemijos laboratorijoje

Impulsinio elektrinio lauko poveikio mikroorganizmams *Helianthus tuberosus* L. stiebagumbį simuliuojančiame gelyje tyrimas

Santrauka

Helianthus tuberosus L. (Jeruzalės artišokas, topinambas) yra plačiai kultivuojamas augalas, pasižymintis vertingomis maistinėmis savybėmis. Siekiant pratęsti šio produkto saugojimo laiką bei užtikrinti jo mikrobiologinę saugą, tiriamos įvairių metodų pritaikymo galimybės. Šiame darbe buvo ištirtas impulsinio elektrinio lauko poveikis ir jo pritaikymo galimybė sukelti mikroorganizmų žūtį topinambo stiebagumbį simuliuojančiame gelyje. Tyrimui buvo izoliuotos Gram neigiamos, lazdelės formos bakterijos iš topinambo stiebagumbio. Atlikta izoliato 16S rRNR geno sekoskaita ir BLAST analizė. Nustatyta, kad filogenetiškai izoliatui artimiausios yra *Rhizobium pusense* rūšies bakterijos. Nustatyta, kad suspensijoje gyvybingų kolonijas formuojančių vienetų (KFV) skaičius mažėja didėjant IEL energijai, impulsų skaičiui (τ) ir dažniui (f). Didžiausias bakterijų inaktyvavimo efektyvumas (KFV skaičius sumažėjo ~100 kartų) suspensijoje pasiektas, kai bendra sistemai suteikta energija lygi 166 J, pn= 100, f= 1 Hz. Įrodyta, kad IEL poveikis gali būti taikomas bakterijų inaktyvavimui standžioje terpėje. Didinant IEL poveikio energiją, topinambo stiebagumbį simuliuojančiame gelyje gyvybingų KFV skaičius maksimaliai buvo sumažintas ~6,3 kartus, kai impulsų skaičius pn= 30, dažnis f= 1 Hz, vieno impulso energija W= 5,86 J/mL.

Kamilija SINKEVIČ, Vilnius University, Microbiology and biotechnology programme, 4th year student

Research has been done in Bioelectrochemistry laboratory in Center for Physical Sciences and Technology

Effects of Pulsed Electric Field on Microorganisms in Gel Biomatrix Simulating *Helianthus tuberosus* L. Tuber

Summary

Helianthus tuberosus L. (Jerusalem artichoke, topinambour) is widely known crop plant with highly valuable nutritional properties. To improve a shelf life and microbiological safety of this product, different preservation methods are being studied. In this research the effects of pulsed electric field (PEF) treatment on microorganisms inactivation were investigated. Gram negative, rod-shaped bacteria were isolated from the topinambour tuber. 16S rRNA gene sequencing was done. BLAST and phylogenetic analysis indicated that the most closely related to the bacterial isolate is *Rhizobium pusense* bacteria. It was shown that after exposure to PEF, viability in suspension decreases with the rise of PEF energy, number of pulses (pn) and frequency (f). The highest bacterial inactivation efficiency (CFU decreased ~100 times) was reached with 166 J total processing PEF energy (pn= 100, f= 1 Hz). The study confirmed that PEF treatment could be applied for bacteria inactivation in a rigid structure. In the gel biomatrix simulating topinambour tuber, viable CFU quantity maximally was reduced ~6,3 times. This effect was reached with 30 pulses, 1 Hz pulse frequency and 5,86 J/mL pulse energy.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

Adams JB. Raw materials quality and the texture of processed vegetables. Texture Food, Elsevier; 2004, p. 342–63. doi:10.1533/978185538362.3.342.

Agrawal VP, Kolattukudy PE. Biochemistry of Suberization. Plant Physiol 1977;59:667–72.

Alvarez I, Raso J, Palop A, Sala FJ. Influence of different factors on the inactivation of Salmonella senftenberg by pulsed electric fields. Int J Food Microbiol 2000;55:143–6.

Ana R, Snezana C, Marina T, Viorica T, Gabriel I, Demetra S, et al. Comparative analysis of the chemical composition of Heliantus tuberosus L. growing in Serbia and Romania. Serbian J Exp Clin Res 2013;14:9–12. doi:10.5937/sjecr14-3840.

Arena CB, Sano MB, Rylander MN, Davalos RV. Theoretical considerations of tissue electroporation with high-frequency bipolar pulses. IEEE Trans Biomed Eng 2011;58:1474–82. doi:10.1109/TBME.2010.2102021.

Batista Napotnik T, Reberšek M, Vernier PT, Mali B, Miklavčič D. Effects of high voltage nanosecond electric pulses on eukaryotic cells (in vitro): A systematic review. Bioelectrochemistry 2016;110:1–12. doi:10.1016/j.bioelechem.2016.02.011.

Böckmann RA, de Groot BL, Kakorin S, Neumann E, Grubmüller H. Kinetics, Statistics, and Energetics of Lipid Membrane Electroporation Studied by Molecular Dynamics Simulations. Biophys J 2008;95:1837–50. doi:10.1529/biophysj.108.129437.

Boussetta N, Vorobiev E, Deloison V, Pochez F, Falcimaigne-Cordin A, Lanoisellé J-L. Valorisation of grape pomace by the extraction of phenolic antioxidants: Application of high voltage electrical discharges. Food Chem 2011;128:364–70. doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.035.

Chandrasekaran S, Ramanathan S, Basak T. Microwave food processing—A review. Food Res Int 2013;52:243–61. doi:10.1016/j.foodres.2013.02.033.

Chassy BM, Flickinger JL. Published by Elsevier FEM 02905 Transformation of Lactobacillus casei by electroporation. 1987.

Davalos RV, Mir ILM, Rubinsky B. Tissue ablation with irreversible electroporation. Ann Biomed Eng 2005;33:223–31.

Deeth HC, Datta N, Ross AIV, Dam XT. Pulsed Electric Field Technology: Effect on Milk and Fruit Juices. In: Tewari G, Juneja VK, editors. Adv. Therm. Non-Therm. Food Preserv., Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing; 2007, p. 241–69. doi:10.1002/9780470277898.ch13.

Escoffre J-M, Portet T, Wasungu L, Teissié J, Dean D, Rols M-P. What is (still not) known of the mechanism by which electroporation mediates gene transfer and expression in cells and tissues. Mol Biotechnol 2009;41:286–95. doi:10.1007/s12033-008-9121-0.

Evrendilek GA, Jin ZT, Ruhlman KT, Qiu X, Zhang QH, Richter ER. Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems. Innov Food Sci Emerg Technol 2000;1:77–86. doi:10.1016/S1466-8564(99)00004-1.

Ferrentino G, Spilimbergo S. High power ultrasound assisted high pressure carbon dioxide pasteurization of fresh cut coconut. Chem Eng Trans 2015:55–60. doi:10.3303/CET1544010.

Frazier MJ, Kleinkopf GE, Brey RR, Olsen NL. Potato sprout inhibition and tuber quality after treatment with high-energy ionizing radiation. Am J Potato Res 2006;83:31. doi:10.1007/BF02869607.

Fromm M, Taylor LP, Walbot V. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc Natl Acad Sci U S A 1985;82:5824–8.

Gao S, Lewis GD, Ashokkumar M, Hemar Y. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. Ultrason Sonochem 2014;21:446–53. doi:10.1016/j.ultsonch.2013.06.006.

García D, Gómez N, Mañas P, Raso J, Pagán R. Pulsed electric fields cause bacterial envelopes permeabilization depending on the treatment intensity, the treatment medium pH and the microorganism investigated. Int J Food Microbiol 2007;113:219–27. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.007.

García-Pérez JV, Cárcel JA, de la Fuente-Blanco S, Riera-Franco de Sarabia E. Ultrasonic drying of foodstuff in a fluidized bed: Parametric study. Ultrasonics 2006;44 Suppl 1:e539-543. doi:10.1016/j.ultras.2006.06.059.

Griffiths S, Smith S, MacGregor SJ, Anderson JG, van der Walle C, Beveridge JR, et al. Pulsed electric field treatment as a potential method for microbial inactivation in scaffold materials for tissue engineering: the inactivation of bacteria in collagen gel. J Appl Microbiol 2008;105:963–9. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03829.x.

Gunnarsson IB, Svensson S-E, Johansson E, Karakashev D, Angelidaki I. Potential of Jerusalem artichoke (Helianthus tuberosus L.) as a biorefinery crop. Ind Crops Prod 2014;56:231–40. doi:10.1016/j.indcrop.2014.03.010.

Guo H, Glaeser SP, Alabid I, Imani J, Haghighi H, Kämpfer P, et al. The Abundance of Endofungal Bacterium Rhizobium radiobacter (syn. Agrobacterium tumefaciens) Increases in Its Fungal Host Piriformospora indica during the Tripartite Sebacinalean Symbiosis with Higher Plants. Front Microbiol 2017;8. doi:10.3389/fmicb.2017.00629.

Hazan R, Que Y-A, Maura D, Rahme LG. A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. BMC Microbiol 2012;12:259. doi:10.1186/1471-2180-12-259.

Heesch EJM van, Pemen AJM, Huijbrechts PAHJ, Laan PCT van der, Prasinski KJ, Zanstra GJ, et al. A fast pulsed power source applied to treatment of conducting liquids and air. IEEE Trans Plasma Sci 2000;28:137–43. doi:10.1109/27.842885.

HO S, MITTAL GS. High Voltage Pulsed Electrical Field for Liquid Food Pasteurization. Food Rev Int 2000;16:395–434. doi:10.1081/FRI-100102317.

Hu W, Zhou L, Xu Z, Zhang Y, Liao X. Enzyme inactivation in food processing using high pressure carbon dioxide technology. Crit Rev Food Sci Nutr 2013;53:145–61. doi:10.1080/10408398.2010.526258.

Huang K, Yu L, Liu D, Gai L, Wang J. Modeling of yeast inactivation of PEF-treated Chinese rice wine: Effects of electric field intensity, treatment time and initial temperature. Food Res Int 2013;54:456–67. doi:10.1016/j.foodres.2013.07.046.

Ignat A, Manzocco L, Brunton NP, Nicoli MC, Lyng JG. The effect of pulsed electric field pre-treatments prior to deep-fat frying on quality aspects of potato fries. Innov Food Sci Emerg Technol 2015;29:65–9. doi:10.1016/j.ifset.2014.07.003.

Jaeger H. PEF enhanced drying of plant based products. Stewart Postharvest Rev 2012;8:1–7. doi:10.2212/spr.2012.2.1.

Jube S, Borthakur D. Development of an Agrobacterium-mediated transformation protocol for the tree-legume Leucaena leucocephala using immature zygotic embryos. Plant Cell Tissue Organ Cult 2009;96:325–33. doi:10.1007/s11240-008-9490-x.

Kawai S, Hashimoto W, Murata K. Transformation of Saccharomyces cerevisiae and other fungi. Bioeng Bugs 2010;1:395–403. doi:10.4161/bbug.1.6.13257.

Kotnik T, Kramar P, Pucihar G, Miklavcic D, Tarek M. Cell membrane electroporation-Part 1: The phenomenon. IEEE Electr Insul Mag 2012;28:14–23. doi:10.1109/MEI.2012.6268438.

Krassowska W, Filev PD. Modeling Electroporation in a Single Cell. Biophys J 2007;92:404–17. doi:10.1529/biophysj.106.094235.

Lebovka NI, Praporscic I, Vorobiev E. Effect of moderate thermal and pulsed electric field treatments on textural properties of carrots, potatoes and apples. Innov Food Sci Emerg Technol 2004;5:9–16. doi:10.1016/j.ifset.2003.12.001.

Lin F, Shen X, Kichaev G, Mendoza JM, Yang M, Armendi P, et al. Optimization of electroporation-enhanced intradermal delivery of DNA vaccine using a minimally invasive surface device. Hum Gene Ther Methods 2012;23:157–68. doi:10.1089/hgtb.2011.209.

Liu T, Dodds E, Leong SY, Eyres GT, Burritt DJ, Oey I. Effect of pulsed electric fields on the structure and frying quality of “kumara” sweet potato tubers. Innov Food Sci Emerg Technol 2017;39:197–208. doi:10.1016/j.ifset.2016.12.010.

Liu X, Gao Y, Peng X, Yang B, Xu H, Zhao J. Inactivation of peroxidase and polyphenol oxidase in red beet (Beta vulgaris L.) extract with high pressure carbon dioxide. Innov Food Sci Emerg Technol 2008;9:24–31. doi:10.1016/j.ifset.2007.04.010.

Mafart P, Couvert O, Gaillard S, Leguerinel I. On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. Int J Food Microbiol 2002:7.

Mahnič-Kalamiza S, Vorobiev E, Miklavčič D. Electroporation in Food Processing and Biorefinery. J Membr Biol 2014;247:1279–304. doi:10.1007/s00232-014-9737-x.

Martinez MV, Whitaker JR. The biochemistry and control of enzymatic browning. Trends Food Sci Technol 1995;6:195–200. doi:10.1016/S0924-2244(00)89054-8.

Meng Xianfa, Yan Dekai, Long Xiaohua, Wang Changhai, Liu Zhaopu, Rengel Zed. Colonization by endophytic Ochrobactrum anthropi Mn1 promotes growth of Jerusalem artichoke. Microb Biotechnol 2014;7:601–10. doi:10.1111/1751-7915.12145.

Mhamdi R, Mrabet M, Laguerre G, Tiwari R, Aouani ME. Colonization of Phaseolus vulgaris nodules by Agrobacterium-like strains. Can J Microbiol 2005;51:105–11. doi:10.1139/w04-120.

Mhemdi H, Bals O, Grimi N, Vorobiev E. Filtration diffusivity and expression behaviour of thermally and electrically pretreated sugar beet tissue and press-cake. Sep Purif Technol 2012;95:118–25. doi:10.1016/j.seppur.2012.04.031.

Milani EA, Alkhafaji S, Silva FVM. Pulsed Electric Field continuous pasteurization of different types of beers. Food Control 2015;50:223–9. doi:10.1016/j.foodcont.2014.08.033.

Mir LM, Orlowski S. Mechanisms of electrochemotherapy. Adv Drug Deliv Rev 1999;35:107–18. doi:10.1016/S0169-409X(98)00066-0.

Mobashsher AT, Abbosh AM. Three-Dimensional Human Head Phantom With Realistic Electrical Properties and Anatomy. IEEE Antennas Wirel Propag Lett 2014;13:1401–4. doi:10.1109/LAWP.2014.2340409.

Mosqueda-Melgar J, Raybaudi-Massilia RM, Martín-Belloso O. Influence of treatment time and pulse frequency on Salmonella Enteritidis, Escherichia coli and Listeria monocytogenes populations inoculated in melon and watermelon juices treated by pulsed electric fields. Int J Food Microbiol 2007;117:192–200. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.04.009.

Neumann E, Kakorin S. Electroporation of curved lipid membranes in ionic strength gradients. Biophys Chem 2000;85:249–71.

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. EMBO J. 1982;1:841–5.

Neumann E, Kakorin S, Toensing K. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. Bioelectrochemistry Bioenerg Lausanne Switz 1999;48:3–16.

Nuccitelli R, Chen X, Pakhomov AG, Baldwin WH, Sheikh S, Pomicter JL, et al. A new pulsed electric field therapy for melanoma disrupts the tumor's blood supply and causes complete remission without recurrence. Int J Cancer 2009;125:438–45. doi:10.1002/ijc.24345.

Pakhomov AG, Gianulis E, Vernier PT, Semenov I, Xiao S, Pakhomova ON. Multiple nanosecond electric pulses increase the number but not the size of long-lived nanopores in the cell membrane. Biochim Biophys Acta 2015;1848:958–66. doi:10.1016/j.bbamem.2014.12.026.

Panday D, Schumann P, Das SK. Rhizobium pusense sp. nov., isolated from the rhizosphere of chickpea (Cicer arietinum L.). Int J Syst Evol Microbiol 2011;61:2632–9. doi:10.1099/ijs.0.028407-0.

Parker J. Rhizobium. In: Brenner S, Miller JH, editors. Encycl. Genet., New York: Academic Press; 2001, p. 1715–6. doi:10.1006/rwgn.2001.1122.

Pavselj N, Preat V, Miklavcic D. A numerical model of skin electroporation as a method to enhance gene transfection in skin. 11th Mediterr. Conf. Med. Biomed. Eng. Comput. 2007, Springer, Berlin, Heidelberg; 2007, p. 597–601. doi:10.1007/978-3-540-73044-6_152.

Pereira RN, Vicente AA. Environmental impact of novel thermal and non-thermal technologies in food processing. Food Res Int 2010;43:1936–43. doi:10.1016/j.foodres.2009.09.013.

Petruzzi L, Campaniello D, Speranza B, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Thermal Treatments for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: A Literature Overview. Compr Rev Food Sci Food Saf 2017;16:668–91. doi:10.1111/1541-4337.12270.

Praznik W, Cieślik E, Filipiak-Florkiewicz A. Soluble dietary fibres in Jerusalem artichoke powders: Composition and application in bread. Food Nahr 2002;46:151–7. doi:10.1002/1521-3803(20020501)46:3<151::AID-FOOD151>3.0.CO;2-4.

Rebora C. Topinambur (Helianthus tuberosus L.): Usos, cultivo y potencialidad en la región de Cuyo. Hortic Argent 2008;27:30–7.

Reineke K, Schottroff F, Meneses N, Knorr D. Sterilization of liquid foods by pulsed electric fields–an innovative ultra-high temperature process. Front Microbiol 2015;6. doi:10.3389/fmicb.2015.00400.

Rezaee M, Almassi M, Minaei S, Paknejad F. Impact of post-harvest radiation treatment timing on shelf life and quality characteristics of potatoes. J Food Sci Technol 2013;50:339–45. doi:10.1007/s13197-011-0337-9.

Rieder A, Schwartz T, Schön-Hölz K, Marten S-M, Süß J, Gusbeth C, et al. Molecular monitoring of inactivation efficiencies of bacteria during pulsed electric field treatment of clinical wastewater. J Appl Microbiol 2008;105:2035–45. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03972.x.

Rols M-P. Electropermeabilization, a physical method for the delivery of therapeutic molecules into cells. Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr 2006;1758:423–8. doi:10.1016/j.bbamem.2006.01.005.

Rubel IA, Pérez EE, Manrique GD, Genovese DB. Fibre enrichment of wheat bread with Jerusalem artichoke inulin: Effect on dough rheology and bread quality. Food Struct 2015;Complete:21–9. doi:10.1016/j.foostr.2014.11.001.

Schoenbach KH, Dobbs FC. Bacterial Decontamination of Liquids with Pulsed Electric Fields 2000:9.

Schoenbach KH, Joshi RP, Kolb JF, Nianyong Chen, Stacey M, Blackmore PF, et al. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. Proc IEEE 2004;92:1122–37. doi:10.1109/JPROC.2004.829009.

Schoenbach KH, Pakhomov AG, Semenov I, Xiao S, Pakhomova ON, Ibey BL. Ion transport into cells exposed to monopolar and bipolar nanosecond pulses. Bioelectrochemistry Amst Neth 2015;103:44–51. doi:10.1016/j.bioelechem.2014.08.015.

Schoenbach KH, Peterkin FE, Alden RW, Beebe SJ. The effect of pulsed electric fields on biological cells: experiments and applications. IEEE Trans Plasma Sci 1997;25:284–92. doi:10.1109/27.602501.

Serway RA. Principles of Physics. Saunders College Pub.; 1998.

Shoaib M, Shehzad A, Omar M, Rakha A, Raza H, Sharif HR, et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. Carbohydr Polym 2016;147:444–54. doi:10.1016/j.carbpol.2016.04.020.

Smith S, Griffiths S, MacGregor S, Beveridge J, Anderson J, Walle C van der, et al. Pulsed electric field as a potential new method for microbial inactivation in scaffold materials for tissue engineering: The effect on collagen as a scaffold. J Biomed Mater Res A 2009;90A:844–51. doi:10.1002/jbm.a.32150.

Soliday CL, Dean BB, Kolattukudy PE. Suberization: Inhibition by Washing and Stimulation by Abscisic Acid in Potato Disks and Tissue Culture. Plant Physiol 1978;61:170–4.

Somasegaran P, Hoben HJ. Collecting Nodules and Isolating Rhizobia. Handb. Rhizobia, Springer, New York, NY; 1994, p. 7–23. doi:10.1007/978-1-4613-8375-8_1.

Sorokin null, Ke null, Chen null, Elliott null. Production of fertile transgenic wheat plants via tissue electroporation. Plant Sci Int J Exp Plant Biol 2000;156:227–33.

Tarek M. Membrane Electroporation: A Molecular Dynamics Simulation. Biophys J 2005;88:4045–53. doi:10.1529/biophysj.104.050617.

The crop physiology of Helianthus tuberosus L.: A model oriented view - ScienceDirect. n.d. https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096195349600062?via%3Dihub (accessed March 18, 2018).

Tieleman DP. The molecular basis of electroporation. BMC Biochem 2004;5:10. doi:10.1186/1471-2091-5-10.

Torkamani A. Impact of PEF and thermal processing on apple juice shelf life. Iran J Microbiol 2011;3:152–5.

Tournas VH. Spoilage of Vegetable Crops by Bacteria and Fungi and Related Health Hazards. Crit Rev Microbiol 2005;31:33–44. doi:10.1080/10408410590886024.

Valverde MT, Marín-Iniesta F, Calvo L. Inactivation of Saccharomyces cerevisiae in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. J Food Eng 2010.

Vorobiev E, Chemat F, Lebovka N. Enhancing extraction processes in the food industry. CRC Press; 2012.

Wang J, Chao Y. Effect of gamma irradiation on quality of dried potato. Radiat Phys Chem 2003;66:293–7. doi:10.1016/S0969-806X(02)00388-2.

Weaver JC, Chizmadzhev YA. Theory of electroporation: A review. Bioelectrochem Bioenerg 1996;41:135–60. doi:10.1016/S0302-4598(96)05062-3.

Widjaja A, Chien C-C, Ju Y-H. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae Chlorella vulgaris. J Taiwan Inst Chem Eng 2009;40:13–20. doi:10.1016/j.jtice.2008.07.007.

Wouters PC, Dutreux N, Smelt JPPM, Lelieveld HLM. Effects of Pulsed Electric Fields on Inactivation Kinetics of Listeria innocua. Appl Environ Microbiol 1999;65:5364–71.

Yang L, He QS, Corscadden K, Udenigwe CC. The prospects of Jerusalem artichoke in functional food ingredients and bioenergy production. Biotechnol Rep 2014;5:77–88. doi:10.1016/j.btre.2014.12.004.

Yogesh K. Pulsed electric field processing of egg products: a review. J Food Sci Technol 2016;53:934–45. doi:10.1007/s13197-015-2061-3.

Yonemoto Y, Yamashita T, Muraji M, Tatebe W, Ooshima H, Kato J, et al. Resistance of yeast and bacterial spores to high voltage electric pulses. J Ferment Bioeng 1993;75:99–102. doi:10.1016/0922-338X(93)90217-V.

Young JL, Dean DA. Electroporation-Mediated Gene Delivery. Adv. Genet., vol. 89, Elsevier; 2015, p. 49–88. doi:10.1016/bs.adgen.2014.10.003.

Zidenga T, Leyva-Guerrero E, Moon H, Siritunga D, Sayre R. Extending Cassava Root Shelf Life via Reduction of Reactive Oxygen Species Production. Plant Physiol 2012;159:1396–407. doi:10.1104/pp.112.200345.