

**REDOX-POTENCIÁL MÉRÉSEN ALAPULÓ GYORS MIKROBIOLÓGIAI MÓDSZER VALIDÁLÁSA ÉS IPARI
ALKALMAZHATÓSÁGÁNAK VIZSGÁLATA**

Nádaskiné dr. Szakmár Katalin

Budapest

2009.

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. június 9-ki határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke:

Deák Tibor, DSc, BCE

Tagjai:

Mohácsiné Farkas Csilla, PhD, BCE

Korány Kornél, CSc, BCE

Szigeti Jenő, CSc, NyME

Varga László, PhD, NyME

Opponensek:

Némedi László, CSc, Budapest, II. Lévy u. 6/a

Lehoczkine Tornai Judit, CSc, BCE

Titkár:

Kiskó Gabriella, PhD, BCE

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

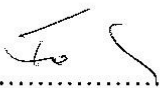
tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Fodor Péter,
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem

Témavezető: Dr. Reichart Olivér
egyetemi docens, CSc
Élelmiszer-higiéniai Tanszék
Állatorvos-tudományi Kar
Szent István Egyetem

A doktori iskola- és a témavezető jóváhagyó aláírása:

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, a műhelyvita során elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés védési eljárásra bocsátható.


.....
Az iskolavezető jóváhagyása


.....
A témavezető jóváhagyása

1. BEVEZETÉS	2
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3
2.1. Élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága	3
2.2. A víz mikrobiológiai biztonsága	5
2.3. A víz mikrobiológiai szennyeződésének forrásai	8
2.3.1. <i>Autochton mikroorganizmusok</i>	8
2.3.2. <i>Allochton mikroorganizmusok</i>	9
2.4. A víz mikrobiológiai vizsgálata	10
2.5. Gyors mikrobiológiai vizsgálati módszerek áttekintése	12
2.5.1. <i>Összes mikrobaszám meghatározási módszerek</i>	13
2.5.1.1. ATP meghatározás	13
2.5.1.2. Flow citométer	14
2.5.1.3. Epifluoreszcenciás szűrés (DEFT)	15
2.5.2. <i>Élősejtszám meghatározási módszerek</i>	15
2.5.2.1. Impedimetriás mérések	15
2.5.2.2. Redox-potenciál mérésen alapuló módszerek	17
2.6. Mérési módszerek validálása	24
3. CÉLKITŰZÉS	27
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	28
4.1. Klasszikus mikrobiológiai módszerek	28
4.2. Redox-potenciál méréshez felhasznált táptalajok	29
4.3. Redox-potenciál mérés	30
4.3.1. <i>A műszer leírása</i>	30
4.3.2. <i>Mérőcellák bemutatása</i>	35
4.3.2.1. 100 ml-es mérőcella	35
4.3.2.2. 10 ml-es mérőcella	36
4.3.2.3. Indirekt mérőcella	36
4.3.3. <i>Mérési eljárás ismertetése</i>	37
4.3.3.1. A szaporodási görbe és a redox-potenciál görbe kapcsolata	37
4.3.3.2. Külső kalibrációs görbe felvétele	38
4.3.3.3. Belső kalibrációs görbe felvétele	40

4.3.3.4. Indirekt mérés	40
5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉS	41
5.1. A redox-potenciál, mint mérési paraméter kiválasztásának indoklása	41
5.1.1. <i>Escherichia coli</i>	41
5.1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42
5.1.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	42
5.1.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	43
5.1.5. <i>Lactobacillus plantarum</i>	43
5.1.6. <i>Clostridium perfringens</i>	44
5.2. A mikroba szaporodás és a redox-potenciál változásának összefüggése	45
5.2.1. Szelektív táptalaj hatása a redox görbe lefutására	45
5.2.2. Redox görbék mikroba specifitása	45
5.2.3. Az egyes mikroorganizmusok redox görbéinek finomszerkezete	47
5.2.3.1. <i>Escherichia coli</i>	47
5.2.3.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	47
5.2.3.3. <i>Enterococcus faecalis</i>	48
5.2.3.4. <i>Bacillus cereus</i>	49
5.2.3.5. <i>Staphylococcus aureus</i>	50
5.2.4. Penész- és élesztőgombák számának meghatározása indirekt méréssel	50
5.2.5. Belső kalibrációs görbe meghatározása	51
5.3. A mérési eljárás validálása	54
5.3.1. Szelektivitás	55
5.3.2. Linearitás	56
5.3.2.1. Kóliform mikrobák meghatározásának linearitása	57
5.3.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> meghatározásának linearitása	59
5.3.2.3. <i>Enterococcus faecalis</i> meghatározásának linearitása	59
5.3.3. Érzékenység	60
5.3.4. Kimutatási határ	61
5.3.5. Meghatározási határ	61
5.3.6. Méréstartomány	61
5.3.7. Pontosság	61
5.3.8. Precizitás	62
5.3.8.1. Ismételhetőségi értékek meghatározása laboratóriumi tiszta tenyészetekkel	62

5.3.8.2. Véletlen hiba meghatározása üzemi vizsgálatokkal	66
5.3.9. Zavartűrés	72
5.4. Ivóvíz vizsgálatok	73
5.4.1. Összcsíraszám meghatározása	73
5.4.2. Coliform és <i>E. coli</i> számának meghatározása	76
5.4.3. Enterococcusok számának meghatározása	78
5.5. Ásványvíz vizsgálatok	81
5.5.1. Coliform és <i>E. coli</i> minimálisan szükséges mérési idejének meghatározása	82
5.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> minimálisan szükséges mérési idejének meghatározása	83
5.5.3. <i>Enterococcus faecalis</i> minimálisan szükséges mérési idejének meghatározása	84
5.5.4. Üzemi ellenőrző vizsgálatok	84
6. KÖVETKEZTETÉSEK	88
7. ÖSSZEFOGLALÁS	89

1. BEVEZETÉS

A mikrobiológiai minőségellenőrzéssel kapcsolatos feladatok utóbbi évtizedekben bekövetkezett igen nagy mértékű növekedése támasztotta azt az igényt, hogy a mikroorganizmusok kimutatására szolgáló klasszikus élősejtszám-meghatározási módszereket gyorsabb, és emellett automatizálható új vizsgálati eljárásokkal váltsák fel.

Különösen nagy jelentőségű a gyors mikrobiológiai eredmény megadása ivóvíz vizsgálatok esetében, ahol a későn felismert nem megfelelő mikrobiológiai állapot esetenként komoly egészségügyi kockázatot jelent. Ásványvíz vizsgálatok esetében pedig a későn észlelt mikrobiológiai szennyeződés az üzemnek jelent komoly gazdasági kárt (legyártott tételek megsemmisítése).

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok időigénye a meghatározandó mikroorganizmustól függően 24-72 óra (esetenként jelentősen hosszabb idő). A mikrobiológiai kockázatok gyors felismerésének és csökkentésének igénye, a minőségbiztosítási és HACCP rendszerek hatékony működtetése szükségessé teszi a mikrobiológiai kiértékelés meggyorsítását, célszerű automatizálását, lehetőleg egyidejű költségcsökkentés mellett.

A vizsgálati idő csökkentése céljából fejlesztették ki a különböző műszeres mérési módszereket. A módszerek egy része (ATP mérés, turbidimetriás mérés, áramlásos citometriás mérés) az összes mikrobaszám (élő és holt sejtek együttes száma) meghatározására alkalmas. Másik fejlesztési irányvonalat képviselnek az impedimetriás mérési módszerek, amelyek a mikrobaszaporodás anyagszere-termékei által okozott vezetőképesség-változás detektálásán alapulnak (MALTHUS, BacTrac, RABIT).

A mikrobák szaporodása során – hasonlóan a vezetőképesség változáshoz – a táptalaj redox-potenciál értéke is változik. A redox-potenciál mérési lehetősége nagyon régóta ismert, de mikrobák számának meghatározására eddig még nem alkalmazták. A SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékének és a Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar Fizika és Automatizálás Tanszékének munkatársai által kifejlesztett és forgalmazott (szabadalmaztatás alatt álló) *MICROTESTER* elnevezésű berendezés a mikrobaszaporodás eredményeként bekövetkező redox-potenciál változás mérésén alapul. A fejlesztésben való közreműködőként az új módszer mikrobiológiai megalapozásához szükséges vizsgálatokat önállóan végeztem, dolgozatomban ezen eredmények felhasználásával az új eljárás teljesítmény-jellemzőit, alkalmazási lehetőségeit és vízre vonatkozó validálását ismertetem.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága

Az élelmiszerbiztonság fogalma sokáig a kémiai biztonságot jelentette. A szabályozók és a felhasználók is sokkal nagyobb figyelmet fordítottak a termelés, vagy a feldolgozás során az élelmiszerbe kerülő kémiai anyagokra, mint a potenciális mikrobiológiai kockázatokra. Mára ez a helyzet megváltozott, a korábbi feltételezésekkel ellentétben az élelmiszerfogyasztásban jelentkező legnagyobb kockázatot a mikrobiológiai szennyeződések jelentik (Trail, 1999). A megelőzés hatékonysága függ az élelmiszer termelés, feldolgozás és felhasználás valamennyi lépésétől a „farmtól az tányéig” (Stringer, 2004).

A nemzetközi és hazai jogszabályok egyértelműen kimondják, hogy az élelmiszer biztonságáért alapvetően az élelmiszer termelő és feldolgozó felelős. Ez a felelősség bizonyos mértékben tovább adódik a forgalmazó felé. Az aggálytalan élelmiszer előállítás után a forgalmazó felelőssége, hogy az továbbra is aggálytalan maradjon és károsodás nélkül jusson el a fogyasztóhoz (Bíró & Bíró, 2000).

Az élelmiszer-előállítás technológiájában bekövetkező változások új veszélyekkel és kihívásokkal járnak együtt, melyhez hozzájárul, hogy eddig nem ismert, vagy új tulajdonságokat mutató kórokozók jelennek meg. Változnak az ételfogyasztási és életmódbeli szokások is, egyre nagyobb az igény az eddig szokásosan nem fogyasztott egzotikus ételek iránt. Megnövekedett a kereslet a kíméletesen feldolgozott, a természetes állapotot minél jobban megközelítő, de hosszú ideig tárolható és kényelmesen felhasználható élelmiszerek iránt.

Azokban az országokban, ahol a hatékony higiéniai intézkedésekkel sikerült a hagyományos élelmiszer-fertőzéseknek gátat vetni, új tulajdonságokkal rendelkező kórokozók jelentek meg, melyek alkalmazkodtak a megváltozott körülményekhez. Egyre gyakrabban fordulnak elő olyan élelmiszer-fertőzések, melyeket élelmiszerben eddig nem előforduló, vagy új tulajdonságokat mutató kórokozók idéznek elő.

Az élelmiszer eredetű megbetegedések világszerte jelentős és egyre növekvő problémát jelentenek, amelyek előidézésében különféle baktériumok, vírusok, sarjadzó- és penészgombák, valamint prionfehérjék játszhatnak kóroktani szerepet.

A fejlődő országokban az élelmiszerekkel terjesztett fertőzésekben a baktériumok és vírusok mellett a paraziták (élősködők, bélférgek) is jelentős arányt képviselnek. Az élelmiszer eredetű megbetegedések azonban a fejlett országokban is gyakoriak (Szeitzné, 2008).

A téma fontosságára tekintettel a WHO World Health Assembly 33. konferenciáján (2000 májusában) leszögezte, hogy az élelmiszerbiztonság „közegészségügyi prioritás” (Farkas, 2003).

Több mint kétszáz mikroorganizmusról tudjuk már, hogy képes élelmiszer útján megbetegedést okozni, és ez a szám folyamatosan nő (WHO, 1998).

Élelmiszer eredetű megbetegedések az Európai Unióban

Az Európai Unióban először a 2003/99/EK irányelv rendelkezett arról, hogy 2005-től a tagországok vizsgálják ki, és szolgáltatassanak adatokat az élelmiszer eredetű vagy azzal összefüggésbe-hozható megbetegedésekről.

Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal (EFSA) és az Európai Betegségmegelőzési és Járványvédelmi Központ (ECDC) 2007 decemberében kibocsátott közös zoonózis jelentése részletes összesítést ad az élelmiszer eredetű eseményekről. E szerint 2006-ban összesen 5710 élelmiszer eredetű esemény került bejelentésre, mely 6,6%-kal haladta meg az előző évit. Ezeknek az eseményeknek során 53.568 személy betegedett meg, 5.525 fő került kórházba és 50 fő elhalálozott.

A jelentés 22 tagállam adatain alapul, Málta, Ciprus és Luxemburg nem szolgáltatott adatokat.

Az eseményeket két csoportra osztották: háztartási (egy háztartás tagjait érintő), illetve általános (több háztartás tagjait érintő) események. 2006-ban 3001 általános és 2709 háztartási esemény került bejelentésre. A háztartási események száma az előző évihez képest 19,8%-kal nőtt, míg az általános események száma gyakorlatilag azonos maradt. Az elhalálozások száma az előző évhez képest csaknem kétszeresére nőtt, elsősorban a csehországi kiterjedt listeriózis járvány miatt. A megbetegedések leggyakoribb kórokozója továbbra is a *Salmonella* (53,9%), szemben a 2005. évi 63,6%-kal. Ezt követték a vírusos élelmiszer-fertőzések (10,2%), melyek száma első ízben előzte meg a *Campylobacter* ételfertőzéseket (6,9%). Egy-egy vírusos ételfertőzési esemény átlagosan több személyt érintett, mint a *Salmonella*, illetve *Campylobacter* által okozottak (23; 7; 3), azonban ezek kevésbé voltak súlyosak, kevesebben kerültek emiatt kórházba. A legsúlyosabb ételfertőzések okozója a *Listeria* volt. Kilenc járványban összesen 120 személy megbetegedését sikerült felderíteni, akik közül 74,2% (89) került kórházba és 17 fő elhalálozott. A csehországi nagy listeriózis járvány önmagában 78 fő megbetegedésével és 13 halálessel járt. A megbetegedést ebben az esetben fertőzött lágy sajt fogyasztása okozta.

Egyéb, élelmiszer-fertőzési eseményekben szereplő jelentősebb kórokozók: *Staphylococcus*, *Shigella*, *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Yersinia*, *Clostridium*, *Giardia*, *Trichinella*, *Klebsiella*, *Cryptosporidium*, *Brucella*, *Flavivírus*, *Streptococcus*. Az események 16%-ában a kórokozó ágens ismeretlen maradt.

A leggyakoribb közvetítő élelmiszer a tojás és a tojástermékek voltak, melyek az események 17,8%-ában játszottak szerepet. Ezeket követte a hús (10,3%), hal (4,6 %) és a tejtermékek (3,2%). (EFSA 2007)

Magyarország mikrobiológiai élelmiszerbiztonsági helyzete

A bejelentett megbetegedések adatai szerint az elvileg élelmiszer útján is terjedő fertőző betegségek csoportján belül a kórokozó szerint meghatározott élelmiszer-fertőzések közt legnagyobb arányban a szalmonellózis, illetve a campylobakteriozis fordult elő közel hasonló gyakorisággal (~7-9000 beteg/év), de változó sorrendben. A harmadik leggyakoribb kórkép a HAV (Hepatitis A Vírus) által okozott hepatitis, negyedik a shigellosis. A legnagyobb betegszámmal bejelentett enterális kórkép azonban az Enteritis infectiosa. Az Enteritis infectiosa bejelentése 1998 óta kötelező, mely tüneti kórkép a bejelentés kezdete óta nagy számban fordul elő, és az első években folyamatos emelkedést mutatott. Jelenleg már ez a legnagyobb számban bejelentett fertőző megbetegedés, betegszáma egyes években a 40 000-et is megközelíti, illetve meghaladja. Enteritis infectiosa néven azon feltehetően fertőzőes eredetű, különböző súlyosságú enterális megbetegedések jelentendők, melyeket leggyakrabban hasmenés, hasi fájdalom, hányinger, hányás, láz vagy e tünetek egy része jellemez. Ide tartoznak azok az ismeretlen etiológiájú gastroenteritisek (gyomor-bélrendszeri gyulladások), melyeknél a mikrobiológiai vizsgálatok a kötelezően jelentendő betegséget előidéző baktériumok kóroki szerepét kizárták, így okuk ismeretlen maradt (Szeitzné et al, 2008).

2.2. A víz mikrobiológiai biztonsága

A XX. század közepéig úgy tűnt, hogy a környezet kémiai szennyeződése lesz az emberiség fő problémája és bár ez igaz a levegőszennyezettség és a talaj szennyezettsége esetén, azonban az epidemiológiai adatokból kiderült, hogy (főként a trópusi területek miatt) a föld lakosságára a fertőzött víz nagyságrendekkel nagyobb veszélyt jelent, mint a levegő és a talaj szennyezettsége és a víz által okozott betegségek elsősorban mikrobiológiai eredetűek.

A WHO szerint ennek okai a következők: (Némedi, 2006).

- Ökológiai változások
- Módosult emberi magatartás
- Az emberek és áruk globális mozgása
- Iparszerű állattenyésztés és növénytermesztés

- Kórokozók és potenciális kórokozók diverzitásának, virulenciájának, invazivitásának és patogenitásának növekedése, alkalmazkodása az új környezethez
- R-faktor átvitel fokozódó veszélye.

A vízeredetű hasmenéses fertőzések jelentik az egész világon az egyik legnagyobb egészségügyi veszélyt. A fertőzött és nem megfelelően fertőtlenített víz által közvetített hasmenéses megbetegedések évente 1,7-2,5 millió ember halálát okozzák, főleg gyermekekét és csecsemőket (Girard et al, 2006).

A hasmenéses megbetegedések a világon a megbetegedések számát tekintve a harmadik, a halálozások számát tekintve a hatodik helyen állnak (WHO, 2005).

A hasmenéses megbetegedések legfontosabb kórokozói közé tartozik a *Vibrio cholerae*, sokféle *Salmonella* (beleértve a *Salmonella typhi*-t) és *Shigella* species, *Campylobacter* fajok, (különösen a *Campylobacter jejuni*) és az enteropatogén *E. coli* törzsek széles skálája, beleértve az enterotoxikogén (ETEC) törzseket is, amelyek az utazók hasmenésének leggyakoribb okozói.

Hasmenéses megbetegedéseket okozhatnak egyéb patogén baktériumok is, így pl. a *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile* vagy a *Klebsiella* is, valamint protozoák, például *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* és *Entamoeba histolytica*.

Vírusok közül a rotavírusok, enterális adenovírusok, astrovírusok és calicivírusok okozzák a megbetegedéseket, főleg az iparilag fejlett országokban (WHO, 2009).

Magyarország helyzete

Magyarországon a két legfontosabb kórokozó, a *Salmonella ssp.* és a *Campylobacter ssp.* által okozott fertőzések ivóvízzel közvetített terjedése a következőkben foglalható össze (Krisztalovics et al, 2008).

- *Salmonella*

Hasonlóan a fejlett ipari országokhoz, Magyarországon is a szalmonellózisok állnak a vezető helyen. A kórokozónak ivóvíz által történő járványos terjedését a betegség hazai történetében eddig 14 járvány estén sikerült igazolni: 1972 – 80 között 8, 1981 – 89 között 5, 1990 – 98 között 1 alkalommal, 2004 – 2006 között ivóvíz által előidézett járvány nem fordult elő.

- *Campylobacter*

A kampilobakteriózis járványügyi jellemzője, hogy szalmonellózisénál jóval kisebb arányban ismerhető fel az esetek közötti epidemiológiai kapcsolat. A járványok 70%-ában nem vált ismertté,

hogyan terjedt a kórokozó. Míg a vezetékes ivóvíz által okozott járványok csupán 8%-át teszik ki az összes regisztrált járványnak, addig az ezekben a járványokban megbetegedettek száma – az összes terjedési módot tekintve – 90%-a az összegzett betegek számának.

Kiemelésre érdemes hazai kampilobakteriózis járványok:

- 1991-ben egy 1130 lakosú Veszprém megyei községben a szennyvíz elérte az ivóvíz-szolgáltató ásott kút védett övezetét, emiatt területi ivóvíz-járvány alakult ki. Orvosnál 22 beteg jelentkezett, de a járvány kivizsgálása során összesen 213 beteget derítettek fel, akik székletmintájából *C. jejuni*-t és *C. coli*-t, a járvány idején megmintázott ásott kút vizéből *C. coli*-t azonosítottak.
- 2001-ben egy Győr-Moson-Sopron megyei üzemben műszaki hiba következtében háztartási szennyvíz jutott a gyár ivóvízrendszerébe, és az expozíciónak kitett 203 személy közül összesen 68 fő betegedett meg. 14 beteg székletéből *Campylobacter*-t azonosítottak, további 54 betegnél a gastroenteritis kórokozója azonosíthatatlan maradt. Egy kampilobakteriózisban megbetegedett dolgozó a gyógyulását követően, még a szennyezett vízzel történt expozíciónak megfelelő lappangási idővel hastífuszban is megbetegedett. A szennyezett ivóvíz tehát kevert etiológiájú járványt idézett elő.
- 2004-ben két szomszédos Veszprém megyei község lakosai körében észleltek gastroenteritis járványt. A járványügyi vizsgálat az összesen 1390 lakos közül 203 beteget derített fel. 11 beteg mintájában calicivírust, 8 betegében *Campylobacter*-t azonosítottak. A vízminták bakteriológiai vizsgálata „megfelelő” minősítéssel zárult, a biológiai vizsgálat alapján azonban peték és véglények jelenléte miatt „kifogásolt” minősítést kaptak. A statisztikai elemző módszerrel végzett vizsgálat a vezetékes ivóvíz fertőzést terjesztő szerepét valószínűsítette ebben a kevert etiológiájú járványban.
- 2006 júniusában Miskolcon, a város déli részére és néhány környező településre kiterjedő ivóvíz-járvány alakult ki. A máig felderítetlen módon fekáliával szennyeződött kút révén fertőzött vezetékes ivóvíz által feltehetően exponálódott kb. 60.000 ember között 3.611 gastroenteritis megbetegedésre derült fény, 179 beteg állapota kórházi ápolást igényelt. A járvánnyal kapcsolatba hozható HAV hepatitis megbetegedéseket nem azonosítottak. 69 beteg székletmintája közül 20-ban calicivírust azonosítottak, 521 beteg székletbakteriológiai vizsgálata során 75 esetben *Campylobacter* speciést izoláltak.

2.3. A víz mikrobiológiai szennyeződésének forrásai

A természetes vizek mikrobiológiai szennyeződése két forrásból származik (Némedi, 2006), a víz eredeti (autochton) mikroorganizmusaiból, valamint a vízbe bekerülő idegen (allochton) mikroorganizmusokból.

2.3.1. Autochton mikroorganizmusok

A víz autochton (eredeti, őshonos) mikroflórájának összetételét befolyásoló tényezők:

- a vízáadó réteg geológiai állapota;
- a hőmérséklet;
- a sótartalom;
- a szerves anyagok;
- a szerves anyagok;
- a nyomás és a vízmozgás;
- a pH és a redox-potenciál;
- a fényviszonyok;
- a gázok;
- a biológiai környezet

Általánosságban az eredeti (autochton) mikroba közösségre jellemző a Gram negatív dominancia:

- *Pseudomonas*,
- *Moraxella (Achromobacter)*,
- *Chromobacterium, Acinetobacter*,
- *Flavobacterium*,
- *Xanthomonas*.

Kevés Gram pozitív:

- *Micrococcus*,
- *Arthrobacter*.

Ezek a mikrobák alacsony nitrogén igényűek. Minimális szervesanyag jelenlétében már képesek szaporodni (kemo-organotrófok ill. autotrófok). Aerobok és pszichrofilek. Természetesen heterotróf mikrobák is megtalálhatók, amelyek a víz felhasználása során (pl. palackozás, vagy ivóvíz ellátás) felszaporodnak és 72 óra múlva akár a ml-enkénti 10^4 , 10^5 sejtszámot is elérhetik.

2.3.2. Allochton mikroorganizmusok

A felszín alatti vizek folyamatos és intenzív szennyezése során az eredeti mikroflóra kibővül jelentős egyedszámú allochton (jövevény, idegen) fajokkal.

Az antropogén hatások minőségétől és mértékétől függően megjelenhetnek kórokozó baktériumok:

- *Salmonella typhi*
- *Vibrio cholerae*
- *Campylobacter jejuni*
- enteropatogén *E. coli*
- egyéb *Salmonella*-k, *Shigella*-k, *Yersinia*-k,
- *Aeromonas hydrophila*

vírusok:

- adenovírusok,
- rotavírusok,
- Hepatitis A vírus
- calici vírusok

paraziták:

- *Entamoeba histolytica*
- *Giardia lamblia*
- *Cryptosporidium parvum*
- *Ascaris lumbricoides*

HACCP hibák eredményeként a felszín alatti vizekbe kerülhetnek a levegőből származó baktériumok

- *Bacillus*-ok
- *Streptomyces*-ek

Indikátor mikrobák

- *E. coli*,
- Kóliformok,
- szulfít-redukáló *Clostridium*-ok,
- *Pseudomonas aeruginosa*

A víz felhasználása (ivóvíz ellátás, palackozás) során gombák is elszaporodhatnak, amelyek gyakran okoznak nem kívánatos íz és szagváltozást.

Némedi (2006) szerint vezetéki víz mikrobiológiai kockázatát nem a mikrobák másodlagos szaporodása, hanem a zárt rendszer megszakadása, illetve a nyers víz eredeti fertőzöttsége okozza. A vezetéki víz baktérium közösségének faji összetétele nem specifikus, pillanatnyi állapota a szennyező forrástól függ.

2.4. A víz mikrobiológiai vizsgálata

Bár ma már valamennyi vízben előforduló mikroorganizmus kimutatható, ezek a vizsgálatok általában nagyon drágák és időigényesek. Ezért terjedt el az egész világon az indikátor (és index) mikroorganizmusok vizsgálata (Waite, 1991). Ezek a következők (Payment et al. 2003) :

Összes kóliform szám

A kóliform csoport az *Enterobacteriaceae* családba tartozó baktériumok növekedési és biokémiai jellemzők alapján jól definiált csoportja, amelyek többé-kevésbé összefüggésben vannak a fekáliás szennyeződéssel. Általános jellemzőjük, hogy fakultatív anaerob, Gram-negatív, spórátlan, pálcika alakú baktériumok, amelyek növekedni képesek epesók jelenlétében. Oxidáz negatívak, a laktózt 35-37 °C-on, 24-48 óra alatt sav- és gázképzéssel fermentálják. Más megközelítésben a kóliformok az *Enterobacteriaceae* család azon tagjai, amelyek 37 °C-on szaporodnak és β -galaktozidáz enzimet termelnek. Nem közvetlen jelzői a fekáliás szennyeződésnek, vagy az egészségügyi kockázatnak, de jó tájékoztatást nyújtanak a víz mikrobiológiai állapotáról.

Escherichia coli

Az *Enterobacteriaceae* család taxonómiaiilag jól definiált tagja, jellemző tulajdonsága a β -galaktozidáz és β -glükoronidáz enzimek termelése. Szaporodik 44-45 °C-on komplex táptalajokon, a laktózt és a mannitot sav- és gáztermeléssel fermentálja, triptofánból indolt termel. A fekáliás szennyeződés közvetlen indikátora, koncentrációja a friss emberi és állati székletben 10^9 /g.

Enterococcusok és fekál streptococcusok

Gram-pozitív, láncokat formáló kokkusok, amelyek általában emberi és állati székletben fordulnak elő. Valamennyi tagjuk a Lancefield D szerológiai csoportba tartozik. A fekál streptococcusokon belül azok, amelyek jól tűrik a nátrium-kloridot és a lúgos pH-t az *Enterococcusok*. A legtöbb

Enterococcus faj fekáliás eredetű és gyakorlati szempontból a humán fekáliás szennyeződés indikátoraként jól használhatók.

Környezeti hatásoknak (pl. klórozás) jobban ellenállnak, mint az *E. coli*, vagy a kóliformok. Jelenlétük az ivóvízben nem megfelelő fertőtlenítésre utal.

Heterotróf aerob baktériumok

A heterotróf aerob baktériumok számát általában két hőmérsékleten, 22°C-on és 37 °C-on vizsgáljuk. Ezek a mikroorganizmusok nem jeleznek fekáliás szennyeződést és jelenlétük nem utal közvetlenül a fertőtlenítés hiányosságaira, de hosszú távú vizsgálatuk alkalmas a vízkezelés jellemzésére, melynek során a cél koncentrációjuk lehető legkisebb értéken való tartása. Számuk hirtelen növekedése a vízkezelés (tisztítás, fertőtlenítés) hibájára utal.

Szulfít-redukáló klosztrídiumok és Clostridium perfringens

Obligát anaerob, spóráképző baktériumok, legjellemzőbb képviselőjük a *Clostridium perfringens*, amely a széklet mikroflórájának természetes tagja (sokkal kisebb számban, mint az *E. coli*). A spórák a vízben hosszú ideig élhetnek és a fertőtlenítésnek jól ellenállnak. Eltávolításuk a vízből szűréssel lehetséges. Jelenlétük az ivóvízben a szűrési eljárás hibáira utal és protozoa ciszták jelenlétének lehetőségét jelzi.

Pseudomonas aeruginosa és Aeromonas spp

Az *Aeromonas* és a *Pseudomonas* spp. Gram-negatív, pálca-formájú, oxidáz pozitív spórátlan baktérium. Ezek a baktériumok a természetben széleskörűen elterjedtek, néhány közülük opportunistá patogén.

Ps. aeruginosa gyakran előfordul a fekáliában, talajban, vízben, és szennyvízben, de a fekáliás szennyeződés indikátoraként nem használható, mert szaporodni képes a vizes környezetben és a vízzel érintkező szerves anyagok felszínén.

Vizsgálata a vízelosztó rendszer általános tisztaságáról ad tájékoztatást. Jelenléte a víz mikrobiológiai minőségének romlására utal és gyakran társul a víz hőmérsékletének növekedésével, vagy a víz áramlási sebességének jelentős csökkenésével a vízelosztó rendszerben és gyakran okozza a víz szagának, ízének és zavarosságának nemkívánatos változását.

Az *Aeromonas* jelenlétének nincs köze a fekáliás szennyeződéshez. Általában a vízkezelési eljárások számukat a kimutathatósági határ alá csökkentik. Nagy számuk másodlagos szaporodásra utal a vezetékben, vagy a tárolókban. Szaporodásuk függ a víz szerves-anyag tartalmától, hőmérsékletétől, az elosztó rendszerben való tartózkodási időtől és a maradék klór jelenlététől.

Hazánkban az ivóvíz mikrobiológiai követelményeit és az alkalmazható vizsgálati eljárásokat a 201/2001. (X.25.) Korm. rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről, írja elő. Ásványvíz minőségi követelményeit a 65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet a természetes ásványvíz, a forrásvíz, az ivóvíz, az ásványi anyaggal dúsított ivóvíz és az ízesített víz palackozásának és forgalomba hozatalának szabályairól rendelet tartalmazza.

Az ivóvíz mikrobiológiai minőségi követelményeit az 1. táblázatban foglaltam össze. Az ásványvíz mikrobiológiai minőségi követelményeit a 2. táblázat tartalmazza.

1. Táblázat. Ivóvíz mikrobiológiai minőségi követelményei.

Mikroorganizmusok	Határértékek
Kóliform mikrobaszám	0/100 ml
<i>E. coli</i>	0/100 ml
<i>Enterococcus</i>	0/100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/100 ml
<i>Clostridium perfringens</i>	0/50 ml

2. Táblázat. Ásványvíz mikrobiológiai minőségi követelményei.

Mikroorganizmusok	Határértékek
Összcsíraszám 22 °C-on	100 tke/ml
Összcsíraszám 37 °C-on	20 tke/ml
Kóliform mikrobaszám	0/250 ml
<i>E. coli</i>	0/250 ml
<i>Enterococcus</i>	0/250 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/250 ml

2.5. Gyors mikrobiológiai vizsgálati módszerek áttekintése

Korunkban jelentősen növekedtek az élelmiszerek mikrobiológiai szennyezettségével kapcsolatos gondok és feladatok. A növekedés okai (Farkas & Mohácsi-Farkas, 2008):

- az élelmiszer-kereskedelem globalizálódása (bonyolult és hosszú élelmiszer-lánc);
- fokozódó urbanizáció és népesség sűrűség, a fogyasztók életvitelének változása;
- nagy nemzetközi személyforgalom;
- intenzív, tömeges növénytermesztési és állattartási gyakorlat;

- fokozódó környezet-szennyezés, megváltozott mikroorganizmusok, megváltozott nyersanyagok.

A klímaváltozás (melegedés) miatt

- rövidebb „post harvest” tárolhatóság;
- a hűtőlánc fenntartása megnehezül;
- fokozott rovarkártétel;
- fokozott mikrobás szennyezettség és mikotoxin veszély.

Mivel a klasszikus tenyésztési módszerekkel a mikroorganizmusok számának meghatározása nagyon időigényes feladat (24 – 72 óra), ezért már nagyon régen felmerült az igény gyors vizsgálati módszerek kifejlesztésére.

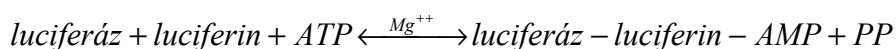
A módszerek két nagy csoportba oszthatók:

- összes (élő- és holt) mikrobák együttes számának meghatározására alkalmas módszerek
- élő mikrobák számának meghatározására alkalmas módszerek

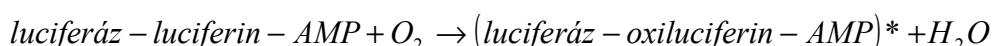
2.5.1. Összes mikrobaszám meghatározási módszerek

2.5.1.1. ATP meghatározás

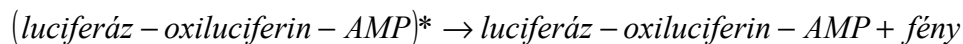
Szennyezett felületek csíraszámának becslésére alkalmazható, nagyon egyszerű eljárás, amely a luciferin és ATP reakciójakor keletkező lumineszkáló termék meghatározásán alapszik (Stewart, 1990). A módszer a szentjánosbogár fénykibocsátásában is működő luciferin luciferáz enzimrendszert alkalmazza (Deák 2006). Az eljárás lényege, hogy a vizsgált mintához luciferase enzimet adnak, az enzim reakcióba lép az élő szervezetek – mikrobák – energiatároló komponensével, az ATP-vel. A reakcióhoz szükség van ATP-re és a luciferin-luciferáz enzim-szubsztrát rendszerre. A reakció során oxiluciferin-luciferáz-AMP komplex képződik, oxidálódik. A gerjesztett állapotban lévő átmeneti komplex (*-gal jelölve) energia-többletét a normál állapotba visszatérve foton formájában adja le (Stannard, 1989).



A komplex oxidálódik



A komplex az energiát foton formájában adja le:



A készülék (ún. luminométer) a folyamat során keletkező fényt érzékeli és méri. Minél erősebb a fényintenzitás, annál magasabb az ATP-tartalom és annál nagyobb a szennyeződés. A mérés rendkívül érzékeny, hiszen 10^{-13} g ATP már kimutatható. Ha figyelembe vesszük, hogy a mikrobasejtek kb. 10^{-15} g, azaz 1 femto-grammnyi ATP-t tartalmaznak, kiderül, hogy elméletileg már 5-10 élesztősejt vagy 100 baktériumsejt is kimutatható.

A luminometriás módszert leggyakrabban felületek higiéniai vizsgálatára használják, ahol néhány perc alatt megoldható a tisztítás-fertőtlenítés hatásfokának ellenőrzése. Az ATP gyors higiéniai mérőkészülékkel megfelelő minta-előkészítés után rövid idő (mintegy 5 másodperc) alatt eredményt kapunk a mintázott felület higiéniai állapotáról. A mérés csak arról ad tájékoztatást, hogy a felület tiszta-e vagy sem, azt azonban nem képes kimutatni, hogy mennyire és milyen baktériummal szennyezett. Ha pontosan azonosítani akarják a kórokozót, a minta előkészítéséhez szükséges idő miatt az eljárás tovább tart (Deák, 2006).

Nyersanyagok (hal, hús, tej), késztermékek (italipar, tejipar) valamint víz vizsgálatára is alkalmas a gyors teszt. Élelmiszerek vizsgálatánál azonban a növényi és állati sejtekben a mikroba eredetűnél lényegesen nagyobb koncentrációban van ATP. Ilyenkor detergenssekkel való előkezelés után lehet csak elkülöníteni a mintában levő mikroba-, illetve növényi vagy állati eredetű ATP-t (Stanley *et al.*, 1990). Komolyabb készülékekkel többletreakciók elvégzésével elkülöníthetően mérhető a) szabad ATP, b) szomatikus sejtekből származó ATP és c) mikrobasejtekből szabaddá tett ATP.

2.5.1.2. Flow cytometer

Az áramlásos citometriát (flow cytometry) az 1980-as évek végétől alkalmazzák gyors mikrobiológiai vizsgálatokra. Donnelly és Baigent (1986) tej *Listeria monocytogenes* számának meghatározására, Diaper és Edwards (1994) természetes vizek *Staphylococcus aureus* számának meghatározására alkalmazták a módszert.

Az átfolyó (flow) citometria során a sejteket gyorsan mozgó folyadékáramban áramoltatják. A mérőállomásnál áthaladva a megvilágító fény szóródik a sejteken. Az áthaladó sejtek detektálása fluoreszcenciás vagy lézeres részecskeszámláló berendezéssel történik, tehát a fény szóródásának intenzitása szolgáltat információkat a mikrobákról (sejtszám, sejtek alakja, mérete, életképessége, felületi morfológiája). A módszer előnye, hogy a folyadékok esetén „real time” (menet közben eredményt adó) eljárásként alkalmazható (Deák, 2006). Mikrobiológiai minőségellenőrzésben való

elterjedésének két legfőbb akadálya a berendezés rendkívül költséges volta és az a tény, hogy csak tiszta folyadékok vizsgálatára alkalmas.

2.5.1.3. Epifluoreszcenciás szűrési technika (DEFT)

Közvetlen mikroszkópos sejtszámlálás elvén alapul a direkt epifluoreszcenciás szűrési technika. A mikroszkópos módszerek kimutatási határa meglehetősen nagy, 10^6 sejt/ml vagy sejt/g, tehát csak akkor használhatók közvetlenül, ha az élelmiszer minta mikrobás szennyezettsége nagy. A mikroszkópos módszerek érzékenysége növelhető membránszűréssel. A direkt epifluoreszcenciás szűrési technikánál (DEFT) a folyadék membránszűrése után a szűrőn felfogott mikroorganizmusokat fluoreszkáló festékkel (pl. acridine orange) festik meg. A membrán fluoreszcens mikroszkóp alatt, UV fényel megvilágítva vizsgálható.

A módszert eredetileg a nyers tej gyors mikrobaszám meghatározására fejlesztették ki. Ma már teljesen automata berendezéseket használnak tejüzemekben és egyes laboratóriumokban, ahol kivételesen gyors mikroba-számláló műszerre van szükség (pl. Bentley IBC, COBRA). A berendezés a mintához fluoreszcens festéket kever (pl. acridin orange, fluoreszcein) majd membránszűrőn átszűri, így a megfestett sejtek a filteren maradnak. A fluoreszcens festékkel megfestett baktériumok az UV- fénysugarakat elnyelik és azokat hosszabb, már a látható fény hullámtartományába eső sugarak formájában bocsátják ki, azaz fluoreszkálnak. Beépített detektor érzékeli a membránon lévő fluoreszkáló sejtek számát. Az adatok feldolgozását és az eredmény megadását számítógép végzi (Pettipher, 1989).

2.5.2. Élő mikrobaszám meghatározási módszerek

2.5.2.1. Impedimetriás módszerek

Az impedimetrián alapuló gyors vizsgálati módszerek alapja, hogy a mikroorganizmusok szaporodása során az anyagsere eredményeképpen a semleges töltésű szubsztrát-molekulákból elektrolit jellegű végtermékek képződnek, s ennek következtében a közeg elektromos ellenállása és kapacitanciája jól mérhetően megváltozik (Martin and Selby, 1980, Sorrells, 1981). A tápközegbe merülő elektródákra szinuszos váltófeszültséget kapcsolva, a mérhető impedancia változása tükrözi a tápközeg ellenállásának és kapacitanciájának változásait. A mikrobiális anyagsere eredményeként általában nő a vezetőképesség és a kapacitancia, ami az impedancia (Z) csökkenéséhez vezet. Detektálva az admittancia ($1/Z$) értékeket az idő függvényében, eredményül egy olyan görbéhez jutunk, amely kapcsolatba hozható a vizsgált mikroorganizmusok szaporodásával. A μS egységekben kifejezett admittancia-értékeknek egy előírt mértékű változásához szükséges idő, az ún. detektációs idő (TTD,

Time To Detection) lineáris kapcsolatban áll a kiindulási élősejtszám logaritmusával (lgN). Meghatározva az összetartozó TTD-IgN értékek egyenletét, egy olyan kalibrációs görbéhez jutunk, amelynek alapján a kiindulási élősejtszám meghatározható.

Az impedimetriás mérési technikát élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatokban az 1980-as évek második felétől már széleskörűen alkalmazták. Nieuwenhof & Hoolwerf (1987) tej össz-mikrobaszám, Henschke és Thomas (1987) borélesztők kimutatására, Ogden & Cann (1987), Arnott *et al.* (1988) *Salmonella* kimutatás, Bullock & Frodsham (1989) édesipari termékek szalmonellás fertőzöttségének vizsgálatára, Cousins and Marlatt (1990) tej *Enterobacterium* szám, Gatti & Neviani (1993) *Enterococcus faecalis* és *Enterococcus faecium* meghatározásra alkalmazták a módszert.

A táptalaj kezdeti impedanciáját az oldat összetétele határozza meg. Nagy só koncentrációjú oldatok esetén (pl. *Salmonella*-, *Listeria*-szelektív táptalajok) a mikroorganizmusok szaporodása kis impedancia változást eredményez. Ezekben az esetekben a tápközeg impedanciájának változása közvetlenül csak bizonytalanul mérhető, ehelyett indirekt mérés alkalmazható. Az indirekt mérés során a képződő CO₂-t vezetik a – lúgos oldattal töltött – mérőcellába és a CO₂ hatására bekövetkező impedancia változást mérik (Bolton, 1990; Deák, 1993a,b; Timms *et al.*, 1996).

Az impedimetriás módszer előnyei

- Gyors eredmény
- Automatikus kiértékelés
- Alacsony működési költség

Az impedimetriás módszer hátrányai:

- Az impedancia függ a mérőcella alakjától, ezért a mérés csak a speciálisan kialakított mérőcellában végezhető el, így a minta mennyisége meghatározott,
- Nagy só koncentrációjú tápoldat impedancia mérésre közvetlenül nem használható, az indirekt módszernek gátat szab, hogy nem minden mikroorganizmus termel a szaporodás során CO₂-ot.
- A mért jel erősen hőmérséklet-érzékeny, ezért nagy pontosságú és igen költséges termosztát alkalmazását teszi szükségessé. (RABIT berendezés esetén az alumínium blokk-termosztát hőmérséklet-szabályozása $\pm 0,002$ °C pontosságú).

2.5.2.2. Redox-potenciál mérésen alapuló módszerek

A baktériumok energianyerése, oxidációs-redukciós potenciál

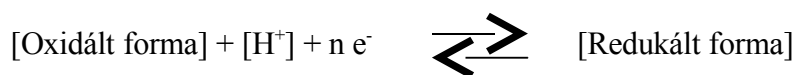
A mikroba-szaporodás energiaforrása a biológiai oxidáció. A mikroorganizmusok anyagcseréjét és szaporodását alapvetően meghatározza energiatermelésük, melynek hatékonysága az oxigénhez való viszonyuktól függ. Aerob légzéssel sokkal több energiát tudnak felszabadítani, mint a különböző anaerob erjedési folyamatokkal. A baktériumok energianyerési folyamatainak kiindulási anyagai változatosak, főleg szénhidrátok, az energiát ugyanis a glükóz lebontásából nyerik. A glükózból való energianyerés fő útjai a glükolízis és a trikarboxilciklus, bár ugyanazon baktériumban a glükózbontás más, kevésbé hatékony útjai is léteznek. A nagy energiájú foszfátkötésekben (ADP, ATP) tárolt energia egy részét mozgásra, bioszintézisre, transzport folyamataikra használják, a másik része szabad hő formájában távozik.

Az obligát aerob baktériumok energiatermelő anyagcseréje az aerob légzés, melyhez a levegő molekuláris oxigénjére van szükségük. Az aerob folyamat során nagy energiatartalmú szerves molekulákat bontanak le, és az így felszabaduló energiát hasznosítják. A szerves molekulákról hidrogénatomok távoznak megfelelő enzimek hidrogénátvevő koenzimjeinek a segítségével a citokróm enzimrendszer tagjain keresztül. A hidrogént átvevő koenzimek ezzel redukált állapotba jutnak. A redukált koenzimek a hidrogénatomokat elemi részecskék formájában adják le. Az elektronokat molekuláris oxigén veszi át. A baktériumok oxidatív energianyerése során tehát a szénhidrátok végül vízzé és szén-dioxiddá oxidálódnak.

Az obligát anaerob fajok csak oxigén nélkül képesek szaporodni, sőt az oxigén elpusztítja a sejteket. Ezek erjesztenek, az energianyeréshez rendelkezésre álló anyagok oxidációja hidrogénelvonással, molekuláris oxigén jelenléte nélkül történik. A glükózt közvetlenül használják fel, fermentációjának első szakasza a glükolízis lépcsői szerint megy végbe. Baktériumfajoktól és -csoportoktól függően különféle szerves savak, alkoholok, gázok, stb. keletkeznek, ha kevés a könnyen fermentálható (kis redox-potenciálú) szénhidrát.

A kórokozó baktériumok többsége *fakultatív anaerob*. Ezek a mikroorganizmusok oxigén jelenlétében vagy hiányában egyaránt képesek szaporodni, aerob körülmények között légzéssel, anaerob körülmények között erjesztéssel nyerik az energiát. Bőséges oxigénellátás mellett oxidatív úton a glükózból főleg szén-dioxid és víz keletkezik. De például a fakultatív anaerob *E. coli* glükózfermentációja során gázok és szerves savak is képződnek.

Biológiai rendszerek reverzibilis redox-folyamatai az alábbi egyenlet szerint mennek végbe:



A fenti redox folyamatra felírható Nernst-egyenlet (Adams and Moss, 1995):

$$E_h = E_0 + \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \cdot \frac{[\text{ox.}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{red.}]}$$

Ahol E_h : a normál hidrogén elektródra vonatkoztatott redox-potenciál,

E_0 : a rendszer standard redox-potenciálja, amikor $\text{pH} = 0$, és az oxidált [ox.] és redukált [red.] alak koncentrációja megegyezik,

R: az egyetemes gázállandó ($R = 8,314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$),

T: az abszolút hőmérséklet (K),

F: a Faraday konstans ($F = 9,648 \cdot 10^4 \text{ J} \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$),

n: a reakcióban átvitt elektronok száma.

Néhány fontos redox-pár E_0 normál potenciálját tartalmazza a 3. táblázat.

3. Táblázat Néhány fontos redox-pár normál potenciálja (Adams and Moss, 1995)

Redox-pár	E_0 (mV)
$1/2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$	+820
$\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$	+760
Citokrom C ox/red	+250
Dehidroaszcorbinsav/aszcorbinsav	+80
Metilénkék ox/red	+11
Piruvát/laktát	-190
Glutation ox/Glutation red.	-230
NAD^+/NADH	-320

A Nernst egyenletből láthatóan a mért redox-potenciál érték erősen függ a pH-tól és a redox-párok relatív koncentrációjától. Mivel az élelmiszerekben, tápközegekben a redox-párok jellegét, koncentráció-arányát általában nem ismerjük, az egységes tárgyalhatóság érdekében az összetett biológiai rendszerek elektród-potenciált kialakító folyamatának az alábbi egyenletet tekintik:



Ebben az esetben a mérhető elektród-potenciál arányos egy feltételezett (fiktív) H₂ gáz parciális nyomásával. A különböző rendszerek redukáló-képességének jellemzésére egy velük azonos elektródpotenciált eredményező, azonos pH-jú hidrogén-elektrodban lévő H₂ gáz nyomásának negatív logaritmus (rH) szolgál.

$$rH = -\lg P_{H_2}$$

A mért E_h (mV) értékből az rH a következő összefüggéssel számolható:

$$rH = \frac{2 \cdot E_h}{\vartheta \cdot T} + 2 \cdot pH$$

$$\vartheta = 2,303 \cdot \frac{R}{F} = 0,1984 \text{ mV K}^{-1}$$

Az rH skála 0-42-ig terjed, 0-15 érték erősen redukáló, 25-42 érték pedig erősen oxidáló rendszert jelez. Minél nagyobb az rH-érték, a közeg annál erősebb oxidáló hatással rendelkezik (Brown and Emberger, 1980).

Az élelmiszerek redox-potenciálját befolyásoló tényezők (Adams and Moss, 1995):

- Redox-párok jelenléte
- Oxidált/redukált arány
- pH
- Redox fékező kapacitás
- Oxigén hozzáférhetősége
- Mikrobiális aktivitás

Normál légköri viszonyok között a tápközegek, ill. élelmiszerek redox-potenciálja állandó pH esetén döntően az oxigén-telítettség mértékétől függ (Jacob, 1970), ezért a mikroorganizmusok szaporodásának redox-potenciál igényét általában szaporodásuk oxigénigényével jellemzik.

A mikroorganizmusok szaporodásának oxigénigénye rH-értékben megadva:

- Aerob mikroorganizmusok: rH > 14
- Mikroaerofil mikroorganizmusok: 7,4 < rH < 14
- Anaerob mikroorganizmusok: rH < 7,4

Az aerob mikroorganizmusok pozitív, 300 mV-ot elérő, vagy meghaladó E_h - értékeket igényelnek a szaporodásukhoz, míg az anaerobok negatív, -300 mV-nál kisebb értéknél tudnak szaporodni.

A legtöbb állati eredetű élelmiszer belsejében kicsi és jól kiegyensúlyozott a redox-potenciál értéke. Ezt a szövetekben viszonylag nagy mennyiségben előforduló redukáló tulajdonságú anyagok okozzák. Az élelmiszer összetevői közül a szulfhidril-csoportot tartalmazó vegyületek, redukáló cukrok és más anyagok elősegítik a redukált viszonyok fenntartását. Az ilyen, nagy „redox-fékező” kapacitású termékben, még levegő jelenlétében is, az E_h érték -200 mV körül marad és lehetővé válik az obligát anaerobok szaporodása (Brown & Emeberger, 1980).

Oxigén-igényük alapján a mikroorganizmusok szaporodása csak bizonyos redox-potenciál tartományban megy végbe, ennek megfelelően a redox-potenciál mérésével esetenként a közegben szaporodni képes mikroorganizmusok jellegére (aerob, anaerob, fakultatív anaerob, aerotoleráns anaerob) is következtethetünk. Mivel azonban a biológiai oxidáció a környezet redukálódását eredményezi, az aerob mikrobák szaporodásának következtében a redox-potenciál oly mértékig csökkenhet, hogy az már az anaerobok számára is kedvezővé válik. Ennek következményeként a kezdeti aerob környezetben is kialakulhat anaerob mikroflóra. A kezdeti redox-potenciál értéke alapján a később kialakuló mikroflórára nem lehet következtetni. Rodel és Lucke (1990) csökkentett redox-potenciál hatását vizsgálták *Bacillus subtilis* és *Bacillus licheniformis* szaporodására táplevesben és pasztörözött kolbász-keverékben. Azt állapították meg, hogy az E_h érték ismerete nem teszi lehetővé a bacillusok növekedési potenciáljának előrejelzését pasztörözött húskészítményekben. Ezt a bizonytalanságot az élelmiszer-biztoság és -minőség „tervezésénél” figyelembe kell venni.

A redox-potenciál szaporodásra kifejtett hatása a mikrobák energia-nyerési mechanizmusának ismeretében értelmezhető. A sejtek aktív transzportjának, illetve energiatermelésének egyik kulcslépése a sejtmembránon keresztül történő protonátvitel. Tekintettel arra, hogy a protonok töltéshordozók is, a protongradiens kialakulásakor elektromos potenciálkülönbség is létrejön a pH különbség mellett. Az így kialakuló elektrokémiai potenciálkülönbség ($\Delta\mu$) értéke (Mitchell & Moyle, 1969):

$$\Delta\mu = \Delta\Psi - \frac{2,3 \cdot R \cdot T}{F} \Delta \text{pH}$$

ahol $\Delta\Psi$ és ΔpH a membrán két oldala között kialakuló elektromos potenciál- és pH-különbség, R a gázállandó, T az abszolút hőmérséklet, F pedig a Faraday állandó.

Nyilvánvaló, hogy a külső környezet redox-potenciálja és pH-ja befolyásolja az elektrokémiai potenciálkülönbség kialakulását, s ezen keresztül befolyással van a mikroba energianyerő folyamataira.

A redox-potenciál szaporodástól függő, illetve azt befolyásoló hatását a fermentációs iparok messzemenően kihasználják. A redox-potenciál folyamatos mérésével jelentős információt nyerhetünk a végbemenő anyagcsere folyamatokról pl. alkoholos erjedésnél (Kukec et al., 2002). Másik lehetőség a redox viszonyok szabályozásán keresztül (pl. a levegőztetés intenzitásának változtatásával) a fermentáció irányának befolyásolása. Ez utóbbi esetben elég csak az aerob és anaerob szennyvízkezelési technológiákra utalni.

A mikroba-szaporodást kísérő redox-potenciál csökkenés mérése alkalmas lehet a mikrobiális aktivitás kimutatása mellett az élősejtszám becslésére is. Erre vonatkozóan a 20. század első harmadától kezdődően festék-redukciós próbák terjedtek el, döntően a tej mikrobiológia állapotának relatíve gyors meghatározására.

A mikroorganizmusok redukciós aktivitásán alapuló meghatározási módszerek elméleti hátterének és történetének kitűnő összefoglalását adja Kroll (1989).

Színreakción alapuló mérési módszerek

A prokarióta sejtek anyagcseréjére jellemző hidrogén-transzport aktivitás redox indikátorokkal kimutatható. Az élő sejtek hidrogén-transzport rendszere a kék színű metilénkék indikátort reverzibilis reakcióban színtelen leuko-metilénkékké redukálja. A mikrobákat tartalmazó élelmiszert, vagy szuszpenziót összekeverve megfelelő koncentrációjú metilénkék oldattal, az elszíntelenedési idő fordítottan arányos a mikroba-koncentrációval. Szoros korreláció az elszíntelenedési idő és a telepszám között azonban nem várható. Ennek okai:

- A különböző mikroorganizmusok eltérő redukciós aktivitással jellemezhetők,
- Néhány élelmiszer önmagában is képes a redukcióra,
- Az atmoszférikus oxigén abszorpciója csökkenti a redukció sebességét.

A hátrányok ellenére az egyszerű és gyors redukciós próbák tájékoztató jellegű telepszám becslésre alkalmasnak bizonyultak.

Az 1930-as évektől kezdődően metilénkék helyett egy másik redox-indikátor, a rezazurin terjedt el. Ennek előnye, hogy az oxidált forma kék színéből a redukált forma rózsaszín árnyalatába való

átmenet sokkal gyorsabb, mint a metilénkék elszíntelenedése. Hátránya, hogy a módszer kevésbé standardizálható és a rezazurin fényérzékeny (Mossel *et al.*, 1995).

A redukciós próbáknál a tej és festék standard mennyiségeit (rendszerint 10 ml tejet és 1 ml festékoldatot) összekeverték és meghatározott hőmérsékleten inkubálták. A tejhez adott festékoldat (redox-indikátor) színváltozásának idejéből, vagy meghatározott idő alatt bekövetkező színváltozásából következtettek a tej csíraszámára. A metilénkék oxidált állapotban kék, redukált állapotban színtelen. A színátcsapás +0,06 – 0,01 V redox-potenciál tartományban következik be. A rezazurin pasztellkék színű oxidált alakja +0,2 – 0,0 V között két lépésben dihidrorezorufinná redukálódik, miközben a redukció fokától függően lila, rózsaszínű, végül színtelen lesz (Kiss, 1974.).

A redukciós próbákat elterjedten használták nyerstej, fermentált tejtermék (Garvie & Rowlands, 1952), jégkrém (Alexander and Rothwell, 1970; Aderson and Whitehead, 1974), fagyasztott ételek (Kümmerlin, 1982) esetében.

A szaporodás detektálására tetrazólium sók (TTC) alkalmazása is elterjedt. Tengerdy és munkatársai (1967) TTC színintenzitás mérésével vizsgálták *Escherichia coli* és *Staphylococcus aureus* szaporodását. A mérés során TTC-t adtak a vizsgálandó mikroorganizmusok szaporodó tenyészetéhez és 3-4 óra után mérték a vörös színű formazán (a TTC redukált formája) színintenzitását 420 nm hullámhosszon. Azt tapasztalták, hogy a színintenzitás összefüggésben van a baktériumok TTC hozzáadása előtti számával.

Festékekkel párosított elektród rendszert használtak Nishikawa és munkatársai (1982) szennyezett víz sejtszámának gyors meghatározására. A rendszer platina anódból és ezüst peroxid katódból, valamint a mikroorganizmusokat tartalmazó membrán szűrőlapból állt. A mikroorganizmusokat membránon szűrték és a szűrőlapot az anódra rögzítették, amely redox-festéket (2,4-diklorfenol-indolfenol) tartalmazó foszfát pufferbe merült (0,05M, pH=7) és a képződő áramot mérték. A reakció idő 10-20 perc volt és 10^4 sejt/ml felett az áramerősség arányos volt a sejtszámmal.

Műszeres mérés

A redox-potenciál mérhető egy inert fém elektród (általában platina) és egy vonatkoztatási elektród alkalmazásával. Elvileg a vonatkozási elektród a normál hidrogén elektród, a gyakorlatban azonban kalomel, vagy más referencia elektródot használunk, amelynek a normál hidrogén-elektrodra

vonatkoztatott potenciálja ismert. Ma már gyakorlatilag kombinált redox-elektrodákat használunk, melyeknél a mérő és a vonatkoztatási elektrodákat egyetlen elektroda testbe építették be.

Annak ellenére, hogy a mikroorganizmusok szaporodását kísérő redox-potenciál változás jól mérhető, az E_h változás műszeres mérésére alapozott sejtszám becslési módszernek nincs irodalma. Erre a meglepő hiányra Kroll (1989) is utal, okát az E_h érték és az oxigén közötti „zavaró” kölcsönhatás miatti bizonytalansággal magyarázza. Jóllehet az azóta eltelt időben a mérő-elektrodák sokat fejlődtek és megbízhatókká váltak, a közvetlen redox-potenciál mérésre alapozott mikrobaszám meghatározás tekintetében csak munkatársaimmal közös kutatási eredményeinkre hivatkozhatom.

A SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék és a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszertudományi Kar, Fizika-Automatizálás Tanszék munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatott eljárás (Reichart *et al.*, 2005) és annak megvalósítását szolgáló MICROTESTER nevű berendezés a közeg redox-potenciáljának mérése alapján teszi lehetővé a minta mikrobaszámának gyors meghatározását. A mérési eljárás elméleti alapjait, műszaki megvalósítását és kóliform mikrobák meghatározására történő validálását közleményünkben (Reichart *et al.*, 2007) ismertettük. Az új módszer részletes leírását dolgozatom „Anyagok és módszerek” c. fejezete tartalmazza.

2.6. Mérési módszerek validálása

Egy módszer validálásán értjük annak bizonyítását, hogy a validálandó (alternatív) eljárás teljesítményjellemzői kielégítik az analitikai módszerrel szemben támasztott követelményeket és az általa szolgáltatott eredmények megfelelnek a referencia-módszerrel meghatározott értékeknek.

A mérési módszer validálását a következő előírások szerint végeztük:

- MSZ EN ISO/IEC 17025 szabvány validációra vonatkozó 5.4.5. pontját értelmező, NAT által kiadott NAR-20 dokumentum 1. Függelékében („Útmutatás az analitikai módszerek validálásához”).
- Mikrobiológiai alternatív módszerek validálására vonatkozó MSZ EN ISO 16140 szabvány.

A validálás során a következő teljesítmény-jellemzőket határoztuk meg (Reichart, 2004):

Szelektivitás:

A módszer milyen mértékben képes az adott alkotó (mikroba-csoport) meghatározására zavaró komponensek jelenlétében. Azt a módszert, amely az alkotó vagy alkotók egy csoportjára tökéletesen szelektív, **specifikusnak** nevezzük.

Meghatározása: Elemzések különböző szelektív táptalajokkal és kevert tenyészetekkel.

Kimutatási határ:

Az a koncentráció, vagy anyagmennyiség, (mikroba-koncentráció) amelyhez tartozó jel értéke megegyezik a vak minta közepes jelének és a vak minta jel 3-szoros SD értékének összegével.

$$J_{KH} = J_{vak} + 3 \cdot SD_{vak}$$

Meghatározási határ :

A mennyiségi mérés alsó határa, alsó méréshatár. Az a legkisebb koncentráció, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg. Az analitikai mérőgörbe legalsó értékelhető pontja.

$$J_{MH} = J_{vak} + 10 \cdot SD_{vak}$$

Mérési tartomány:

Az a munkatartomány, amelyen belül az adott feladatnál kielégítő pontosság és precizitás érhető el.

Meghatározása: Kalibrációs görbe felvételével.

Regressziós egyenlettel, legkisebb négyzetek módszerével számítva.

Linearitás:

Legkisebb négyzetek módszerével, lineáris regresszió számítás.

Matematikai feltételek a számításhoz

Az Y változónak X minden értékénél **normális eloszlásúnak** és **homogén szórásúnak** kell lennie. (Szükség esetén transzformációval normalizálható).

Inhomogén szórások esetében megfelelő súlyozás (pl. a szórás reciprokával).

Lehetőleg az X értékek ekvidisztáns elrendezése.

Eltérő esetben a kiugró pontok nagyon elhúzzák az egyenest.

Érzékenység:

Az analitikai mérőgörbe deriváltja, egyenes esetében a meredeksége.

Pontosság, Helyesség:

Az eredmények valódi értékhez való közelítésének mértéke, amely tovább bontható:

Torzítatlanság:

A mérési eredmények számtani átlaga és a valódi érték közötti megegyezés mértéke.

A rendszeres hibára jellemző.

Precizitás:

A megismételt vizsgálatok eredményei közötti egyezés mértéke. A véletlen hibára jellemző. Tovább bontható

Ismételhetőség (laboratóriumon belül)

Véletlen hiba (párhuzamosok szórása)

Laboratóriumon belüli hiba (ismételt mérések)

Reprodukálhatóság (laboratóriumok között)

Laboratóriumok közötti módszer-összehasonlító vizsgálatokkal elemezhető. Variancia-analízissel értékelhető.

Zavartűrés:

Eszköz- és környezetállóság.

Pl. A redox-potenciál mérési módszer sokkal kevésbé érzékeny a hőmérséklet változásra, mint az impedimetriás módszer.

Az új módszer teljesítményjellemzőinek meghatározását az általános előírásokat értelemszerűen mikrobiológiai adatokra vonatkoztatva végeztem el.

3. CÉLKITŰZÉS

A redox-potenciál mérésen alapuló *MicroTester* készülék alkalmazása lehetőséget teremt arra, hogy a vizsgált minták mikrobaszámát a jelenlegi tenyésztési módszereknél gyorsabban és nagyobb mintamennyiségekből (Pl. az általánosan előírt 100-250 ml helyett 1000-10000 ml mintából) határozzuk meg. A módszer egyik nagyon fontos előnye a klasszikus tenyésztési meghatározásokhoz viszonyítva, hogy míg a tenyésztési módszerek kiértékelésének időigénye független a vizsgált mikrobaszámtól, addig a redox-potenciál mérésen alapuló eljárás kimutatási időigénye a mikrobák számának növelése (membránszűrés) révén jelentősen csökkenthető.

Munkám célja a következőkben foglalható össze:

- mikroorganizmusok szaporodása során bekövetkező redox-potenciál változás vizsgálata és az egyes mikroorganizmusok szaporodási redox-görbéinek meghatározása
- annak igazolása, hogy a redox-potenciál mérés alkalmazható élelmiszerek és különösen a víz mikrobaszámának gyors meghatározására
- a redox-potenciál méréssel történő gyors mikrobiológiai vizsgálati módszer validálása ivó- és ásványvíz mikrobiológiai vizsgálatára az alábbi mikrobacsoportokra vonatkozóan:
 - Össz-mikrobaszám 37 és 22 °C-os tenyésztéssel
 - Kóliform baktériumok kimutatása és számszerű meghatározása
 - *Escherichia coli* kimutatása és számszerű meghatározása
 - Enterokokkusz bélbaktériumok kimutatása és számszerű meghatározása.
 - *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása és számszerű meghatározása.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Klasszikus mikrobiológiai módszerek

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatokat (lemezöntés, szélesztés, membránszűrés) a következő táptalajok felhasználásával végeztük:

Összcsíraszám meghatározása

Plate count (PC) agar (MERCK 1.05463)

Kóliformok és *Escherichia coli* számának meghatározása

Laktózos TTC agar (MERCK 1.07680)

Enterococcusok számának meghatározása

Slanetz-Bartley agar (MERCK 1.05289)

Pseudomonas aeruginosa számának meghatározása

Cetrimid agar (MERCK 1.05284)

Lactobacillus plantarum számának meghatározása

MRS agar (MERCK 1.10660)

Clostridium perfringens tenyésztésére

Félfolyékony szulfitredukáló táptalaj

Saccharomyces cerevisiae és *Aspergillus niger* számának meghatározása

Maláta-kivonat agar (MERCK)

Hígítási sor készítéséhez hígító-folyadékként 1 g/l peptont és 8,5 g/l Nátrium-kloridot tartalmazó, 7,2±0,2 pH-jú sós peptonvizet használtunk.

A vizsgálatokhoz felhasznált mikroorganizmusok a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék Mikrobiológiai Laboratóriumának törzsgyűjteményéből származtak és a következők voltak:

- *Escherichia coli* NCAIM B.01748
- *Enterobacter aerogenes* NCAIM B.02039
- *Citrobacter freundii* NCAIM B.01468
- *Klebsiella oxytoca* NCAIM B.02075
- *Acinetobacter lwoffii* NCAIM B.01641
- *Pseudomonas aeruginosa* NCAIM B.01687

- *Pseudomonas fluorescens* NCAIM B.01102
- *Bacillus cereus* NCAIM B.01718
- *Enterococcus faecalis* NCAIM B.01312
- *Lactobacillus plantarum* ATCC.8014
- *Clostridium perfringens* NCAIM B.01417
- *Saccharomyces cerevisiae* NCAIM Y.00801
- *Aspergillus niger* NCAIM F.00893

A szabványos vízvizsgálatok a következő előírások szerint történtek:

Összcsíraszám meghatározása 22 °C-on és 37 °C-on lemezöntéssel

MSZ EN ISO 6222:2000

Kóliformok és *Escherichia coli* kimutatása és számának meghatározása membránszűréssel

MSZ EN ISO 9308-1:2001

Enterobaktériumok kimutatása és számának meghatározása membránszűréssel

MSZ EN ISO 7899-2:2000

Pseudomonas aeruginosa kimutatása és számának meghatározása membránszűréssel

MSZ EN 12780:2003

4.2. Redox-potenciál méréshez felhasznált táptalajok

Összcsíraszám meghatározása

Feles koncentrációjú Trypton-szója leves (1/2 TSB) (MERCK 1.05459)

Kóliformok és *Escherichia coli* számának meghatározása

Brillantzöld-laktóz-epe leves (BLE) (MERCK 1.06464)

Enterococcusok számának meghatározása

Azid-glükóz leves (MERCK 1.01590)

Pseudomonas aeruginosa számának meghatározása

Cetrimid leves (Fluka)

Lactobacillus plantarum számának meghatározása

MRS leves (MERCK 1.10661)

Clostridium perfringens számának meghatározása

Tioglikolát tápoldat (MERCK 1.08191)

4.3. Redox-potenciál mérés

4.3.1. A műszer leírása

Az alábbi ismertetést a SZIE ÁOTK Élelmiszerhigiéniai Tanszékének és a Corvinus Egyetem Fizikai- és Automatizálási Tanszékének munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatás alatt álló redox-potenciál mérő berendezésének (MicroTester) szabadalmi leírása alapján közlöm. (Reichart *et al.* 2005).

A műszert és a hozzátartozó szoftvert a Corvinus Egyetem Fizikai- és Automatizálási Tanszékének munkatársai készítették.

A redox-potenciál méréséhez kereskedelmi forgalomból beszerezhető kombinált mérőelektrodákat használunk.

A moduláris felépítésű mérő rendszer a mérési igényeknek megfelelően bővíthető. Minimális csatornaszám: 4, maximális csatornaszám: egy készülékben 64 csatorna, de szükség esetén a készülékek láncolhatóak, így több készülék összekapcsolásával 256 csatornaszám érhető el.

(A prototípus berendezés csatornaszáma 12.)

Minimális kiépítésben a rendszer elemei:

készülékház, a következő elemekkel és funkciókkal:

- szükség szerinti számú kártyahely a bemeneti modulok fizikai fogadására
- belső tápellátási rendszer
- címbusz a csatornacímzéshez
- analóg busz a transzformált analóg bemeneti jel és referenciafeszültségek multiplexeléséhez
- Analóg/Digitális konverter
- mikrokontroller a csatorna-kiválasztás, digitalizálás és a számítógéppel folytatott kommunikáció menedzselésére
- 1 db 4-csatornás bemeneti modul (max. 16 modulhellyel, $16 \times 4 = 64$ csatornához)
- külső hálózati tápegység (adapter) a készülék tápellátásához

A rendszer működtetéséhez szükséges egy IBM-kompatibilis személyi számítógép szabványos RS232C interfésszel (COM port). A hardver irányítás szempontjából a PC konfigurációja nem kritikus, a vezérlő és adatfeldolgozó szoftver szempontjából ajánlott minimális konfiguráció:

- P4 processzor (min. Celeron 300 MHz)
- 256 Mb RAM
- min. 10 Gb HDD
- CD-olvasó
- Win2000 vagy WinXP operációs rendszer

Elektromos jellemzők:

Analóg bemenetek (valamennyi bemenet ekvivalens):

- kombinált redox elektródok bemeneti csatlakozói: BNC
- csatornánként független chopper-stabilizált instrumentációs bemeneti modul
- bemeneti impedancia: $> 1 \text{ terraohm } (10^{12} \Omega)$
- bemeneti jelszint: $\pm 2 \text{ V}$
- max. feszültség a bemeneten: $\pm 12 \text{ V}$

Digitális egység

- digitalizálás módja: kettős integrálású (Dual Slope) a pontosság és zajelnyomás érdekében
- felbontás: 4,5 digit (0,1 mV)
- konverziós idő: 16 csatornára max. 3 s

Kommunikációs egység

A kommunikáció a mérőrendszer és a PC között soros porton (RS232) keresztül történik. Ennek protokollja:

9600 baud, no parity, 8 data bits, 1 stop bit (9600, n, 8, 1).

Hardver handshake nincs.

A PC egy STX (ASCII) parancsot küld a készüléknek és a készülék egy n·6 ASCII karakteres eredményt küld vissza válaszként (n: a csatornaszám). Konverziós idő: 16 csatornára maximum 3 s. A csatornánkénti 6 karakter jelentése sorrendben:

- előjel (+/-)
- a mért eredmény mV-ban kifejezett értékének számjegyei
 - ezres helyiérték
 - százaskénti helyiérték
 - tízes helyiérték

- egyes helyiérték
- első tizedes helyiérték

A vezérlés és adatfeldolgozás céljára kifejlesztett program működésének leírása

Adatgyűjtés

A program a „Mérés > Start” menüponttal történő indítás után folyamatos adatgyűjtést végez, minden mérőcsatornát kiolvas. A beolvasott adatok rögzítése csak akkor történik meg, ha a csatorna beállításai szerint ez szükséges. Az elektronika triggerelése után csatornánként 300 ms számítható várakozási időnek (a számítógép okozta csúszások és egyéb várakozási idők miatti tartalékkal). A csatornák számától függően a mintavételezés lehetséges minimális periódusideje a 4. táblázatban található.

4. Táblázat. A mintavételezés lehetséges minimális periódusideje.

Csatornaszám	Mintavételezés
16-ig	5 s (16 x 300 ms = 4800 ms)
32-ig	10 s (32 x 300 ms = 9600 ms)
64-ig	20 s (64 x 300 ms = 19200 ms)

A redox-potenciál mérés jellemző periódusideje 5-10 min, ezért még a 64 csatornás készülék 20 s periódusa is elfogadható.

Zajszűrés

A zajos környezetben történő adatgyűjtés támogatására bekapcsolható a simítás. Az algoritmus a forráskódban rögzített ideig (legalább 5 beolvasás ajánlott) megkapott adatok közül törli a legkisebb és legnagyobb értékeket, a maradékot (legalább 3 adat) pedig átlagolja.

Paraméterezés

Az adatgyűjtés csatornánként egyedileg paraméterezhető

Tárolás, mentés

A begyűjtött adatokat táblázatban tárolja a szoftver, amely táblázat egyben és csatornánként is elmenthető. A mentés formátuma ASCII tagolt szöveg. A tizedes jelet az operációs rendszer területi beállításai adják, így a telepített táblázatkezelő és statisztikai programokba könnyen beolvasható konverzió nélkül. A csatornánként történő mentés során az adatok értékelése is mentésre kerül. A

csatornák egyedi paramétereizhetősége miatt minden esetben az adatok mellett a tárolás - mérés kezdetétől mért - relatív ideje is mentésre kerül.

Adat kezelés, értékelés

Referencia érték

A redox-potenciál mérés során mV értékeket mér az elektronika, melyek korrigálhatóak egy additív (pl. normál hidrogén elektródra vonatkozó) referencia értékkel. A jelölés ekkor „E, mV”-ról „Eh, mV”-ra változik.

Detektációs idő számítása

A detektációs idő az a pillanat, amikor a mért idősorban a mV értékek idő szerinti differencia-hányadosa meghaladja a választott határértéket. A véletlen mérési hibák kiküszöbölése miatt beállítható, hogy több egymást követő, a határértéket meghaladó differencia-hányados esetén jelölje csak az adott pontot detektációs időként. A szoftverben beállítható paraméterek:

- kritikus differencia-hányados (detektációs kritérium) értéke (mV/min)
- a kritikus értéket meghaladó mérési pontok minimálisan megkívánt száma (a pozitív mérések száma, javasolt: 3)
- értékelés kezdete (min)
- sejtszám határérték, amely felett a minta mikrobiológiai állapota kifogásolandó (N_{krit})

Értékelés

Az értékelés kezdete beállításával az idősor eleje nem vesz részt a számításban. A mérés elejének bizonytalanságai így kiküszöbölhetőek. A detektációs idő számított értékét (TTD) az előzetesen meghatározott kalibrációs görbe egyenletébe helyettesítve, kiszámítható a vizsgált minta mikrobaszáma.

A számított és a felhasználó által megadott sejtszámok összehasonlításából meghatározható a csatorna mérésének mikrobiológiai értékelése: elfogadható (PASSED), vagy elutasított (FAILED). Ha a számított érték eléri a felhasználó által megadott határt, az értékelés: FAILED.

Grafikus megjelenítés

Grafikon típusok

A következő grafikon típusok választhatóak:

- összesített: minden mérő csatorna megjelenik
- mozaik: minden csatorna önálló grafikonnal jelenik meg
- csoportosított: kijelölt adatsorok egy grafikonon jelennek meg (max. 4 db csoport hozható létre)

A mozaik típusnál minden egyedi grafikonon látható a detektációs idő értéke (ha van), és annak alapján számított sejtszám, valamint a sejtszám szerinti értékelés.

A mozaik elrendezésben a grafikonok színkódokkal is jelöltek az egyszerű áttekinthetőség érdekében:

- kék: futó mérés
- piros: elutasított eredményű mérés (FAILED)
- zöld: elfogadott eredményű mérés (PASSED)
- szürke: befejezett mérés

A színeket a program *ini* fájlban tárolja, szabadon szerkeszthetők hexadecimális formátumban.

Egyéb lehetőségek

Fájl formátumok

A program minden esetben ASCII szöveges állományokat használ a könnyű szerkeszthetőség érdekében. A használt állományok:

- redox.ini : általános beállítások és fordítások szövegei
- redox.eq : egyenletek a sejtszám számításhoz
- redox.plt : mérőprogramok listája
- *.prg : mérőprogramok egyedi csatornákra, vagy összesítve minden csatornára.

A mérőprogramok és beállítások állományainak szerkezete megegyezik a Windows INI fájlok szabványos szerkezetével.

A mentett adatok szintén szöveges állományba kerülnek:

- *.prn : egyszerű lista a csatornák legfontosabb beállításairól és adatairól. Ezek a fájlok csak adatokat tartalmaznak. Szerkezetük – a forráskód alapján is – könnyen visszafejthető, de közvetlen módosításuk nem javasolt.
- *.xls : minden ismert Excel verzió által támogatott tabulátorral tagolt szöveges formátum, amely az összes csatorna adatait tartalmazza.

Port monitor

Az aktuális adatok folyamatos követésére beépítve található egy port monitor ablak, amely a port olvasás periódusidejével frissülve minden aktív csatorna adatát megmutatja.

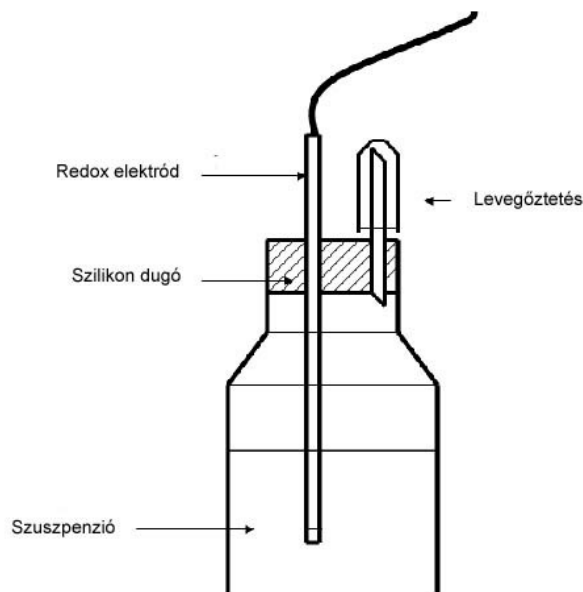
A következő ábrákon (1-4.) a 16 csatornás mérőműszer, valamint a különböző mérőcellák láthatók.



1. ábra. 16 csatornás mérőműszer teljes kiépítéssel.

4.3.2. Mérőcellák bemutatása

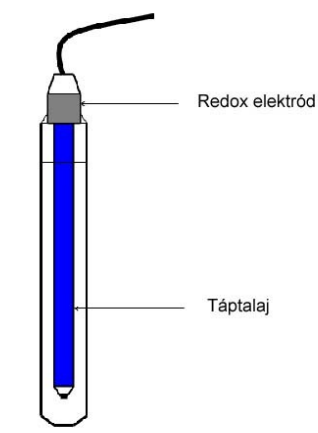
4.3.2.1. 100 ml-es mérőcella



2. ábra 100 ml-es mérőcella

A mérőcella alkalmas közvetlen beoltással történő mérésre, valamint membránszűrést követő redox-potenciál mérésre is. Közvetlen beoltás esetén 90 ml táplevesbe - általában, de nem feltétlenül - 10 ml vizsgálati anyagot oltunk. Membránszűrési vizsgálat során a membránt helyezzük a táplevesbe. Egy mérőcellába több membrán is helyezhető.

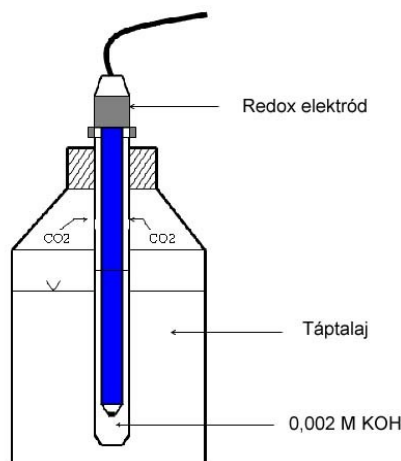
4.3.2.2. 10 ml-es mérőcella



3. ábra. 10 ml-es mérőcella.

A mérőcella közvetlen beoltással történő vizsgálatokra alkalmas. 9 ml táplevesbe 1 ml, vagy 1 g vizsgálati anyagot helyezünk. Különösen alkalmas a cella tamponos vizsgálatokra. Ebben az esetben lehetőség van a tampon mérőcellába helyezésével közvetlen vizsgálatra.

4.3.2.3. Indirekt mérőcella



4. ábra. Indirekt mérőcella.

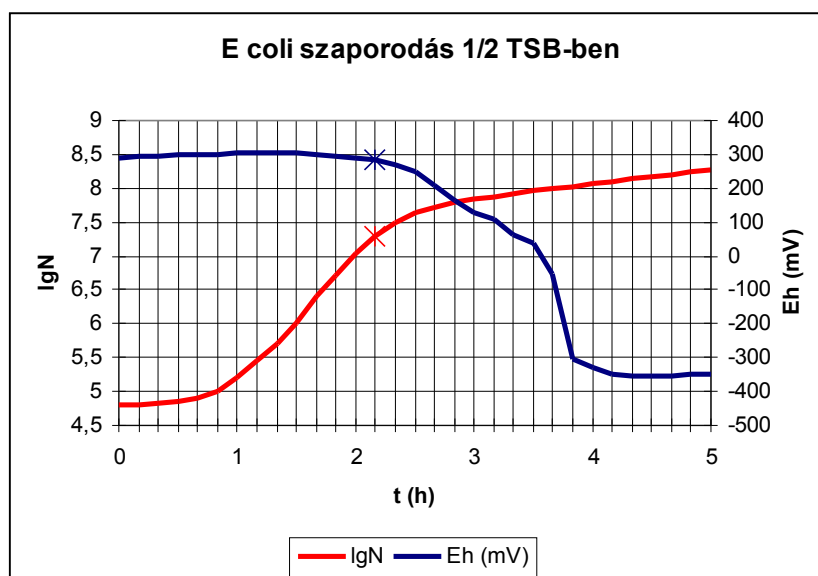
Ezt a mérőcellát penész- és élesztőgombák vizsgálatánál alkalmazzuk. Ebben az esetben a szaporodás során képződő CO₂-ot 0,002 M KOH oldatban nyeletjük el. Az elektród a KOH redox-potenciál változását méri.

4.3.3. Mérési eljárás ismertetése

4.3.3.1. A szaporodási görbe és a redox-potenciál görbe kapcsolata

A mérési eljárás elvi alapja az, hogy a baktériumok szaporodása folyamán az energia-termelő biológiai oxidációs reakciók eredményeként a környezet redox-potenciálja egy meghatározott mikroba koncentráció felett jól detektálhatóan csökken. Detektációs időnek (TTD) tekintjük azt az időpontot, amikor a redox-potenciál változás sebességének abszolút értéke egy, a véletlen hatásoktól szignifikánsan különböző értéket (pl. $|dE/dt| \geq 0,5 \text{ mV/perc}$) meghalad. Ezt az értéket detektációs kritériumnak nevezzük (Reichart et al 2007).

Az 5. ábra a redox-potenciál változását szemlélteti *Escherichia coli* szaporodása során.



5. ábra. A mikrobaszaporodás és a redox-potenciál változás összefüggése.

A kritikus redox-potenciál csökkenés mértéke (detektációs kritérium) mikroba típusonként változik, *Escherichia coli* esetében $\Delta E_h/\Delta t = -1 \text{ mV/min}$

Az ábrán X-el jelölve a kritikus redox-potenciál csökkenéshez tartozó lgN érték 2,1 óránál (lgN = 7,30; $N = 2,00 \times 10^7 \text{ tke/ml}$)

4.3.3.2. Külső kalibrációs görbe felvétele

Mivel a kritikus redox-potenciál csökkenés meghatározott mikrobaszámnál következik be, ezért a TTD függ a minta kezdeti mikrobaszámától.

Kalibrációs görbe készítéséhez a vizsgálandó mikroba szuszpenzióból, sós peptonvízben 10-es alapú hígítási sort készítettem. A hígítási sor tagjaiból 1-1 ml-t oltottam 90 ml 1/2 TSB táptalajt (4.1.8.) tartalmazó mérőcellába (4.3.2.1) majd a mérőcellákat vízfürdős termosztátba helyeztem ($T=37^\circ\text{C}$) és felvettem az egyes hígításokhoz tartozó redox görbéket. Egyidejűleg meghatároztam a hígítási sor tagjainak mikrobaszámát PC táptalajon (4.1.2.) , 37°C -on 24 órás tenyésztéssel.

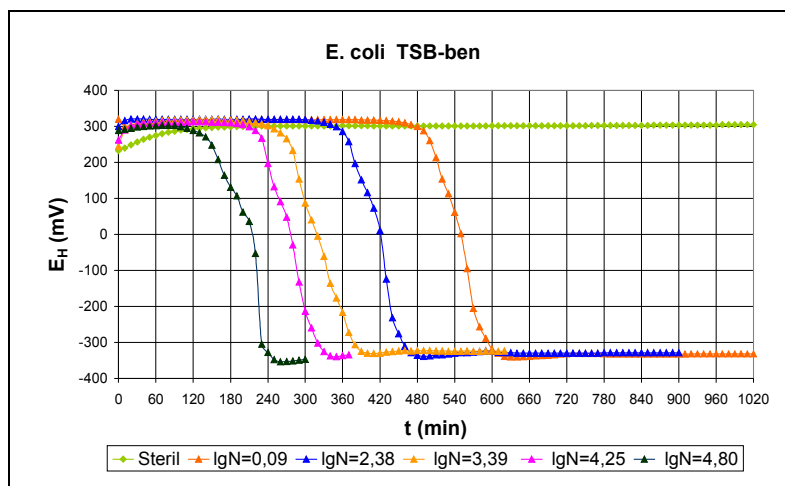
A redox-potenciál kritikus változásához tartozó időt (TTD, Time to Detection, Detektációs idő) a műszer automatikusan határozza meg.

Detektációs időnek tekintjük azt az időpontot, amikor a redox-potenciál csökkenési sebessége (a redox-görbe idő szerinti differencia-hányadosa) meghaladja az általunk előírt kritikus értéket (Pl. kóliform mikroorganizmusok esetében $|\Delta E/\Delta t| > 1 \text{ mV/perc}$).

Különböző kiindulási sejtkoncentrációknál meghatározva a detektációs időket (TTD), szoros lineáris korreláció állapítható meg a TTD értékek és a kezdeti sejtszámok logaritmusa ($\lg N_0$) között. Az

összetartozó $\lg N_0$ – TTD értékpárokból lineáris regresszióval kiszámított összefüggés adja a kalibrációs görbe egyenletét, amely a továbbiakban alapját képezi a kiindulási sejtkoncentráció redox-potenciál méréssel történő meghatározásának.

A 6. ábrán *Escherichia coli* különböző kezdeti mikrobaszámú mintáinak redox-potenciál csökkenése látható. A redox-potenciál értékeket a műszer 10 percenként detektálta.



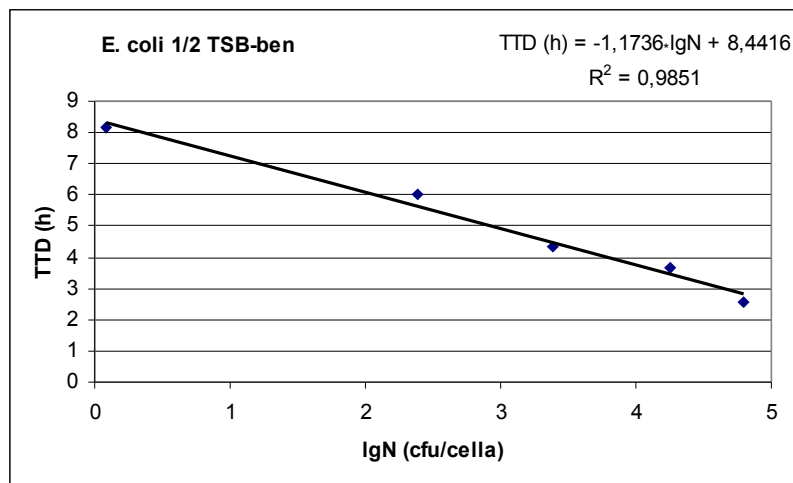
6. ábra. *Escherichia coli* redox-potenciál változása különböző kezdeti mikrobaszámok esetén.

Az összetartozó $\lg N$ – TTD értékpárokat az 5. táblázatban foglaltam össze, ahol a TTD a $\Delta E_H / \Delta t = -1$ mV/min csökkenéshez tartozó idő órában, $\lg N$ a kezdeti mikrobaszám logaritmus (N=tke/cella)

5. Táblázat. A kezdeti mikrobaszám és a detektációs idő összefüggése.

$\lg N$ (N=tke/cella)	TTD (h)
0,09	8,17
2,38	6,00
3,39	4,33
4,25	3,67
4,80	2,54

Ábrázolva a TTD értékeket a $\lg N$ függvényében egy egyenest kapunk, amely a 7. ábrán látható. Ez az egyenes a kalibrációs görbe.



7. ábra. *Escherichia coli* kalibrációs görbéje 1/2 TSB táptalajban (T=37 °C).

A kalibrációs görbék felvétele megfelelő táptalajokkal az előbbiekkal megegyező módon történt.

A MicroTester alkalmazása során, először a vizsgálni kívánt mikroorganizmus kalibrációs görbéjének egyenletét számítjuk ki:

$$TTD = a \cdot \lg N + b$$

A mérések során a rendszer TTD értékeket határoz meg, amelyekből a kalibrációs görbe alapján számítja ki a lgN értékeket a következő egyenlet felhasználásával:

$$\lg N = A \cdot TTD + B, \quad \text{ahol } A = 1/a \quad B = b/a$$

A értéke mindig negatív, mértékegysége attól függ, hogy a TTD értékeket percben vagy órában fejeztük ki. A és B értékét betáplálva a programba lehetőségünk van a vizsgált minták elősejtszámának automatikus meghatározására. Az elősejtszám mértékegysége (tke/ml, sejt/g, stb.) attól függ, hogy a kalibrációs görbe felvételekor az N_0 értékeket hogyan adtuk meg.

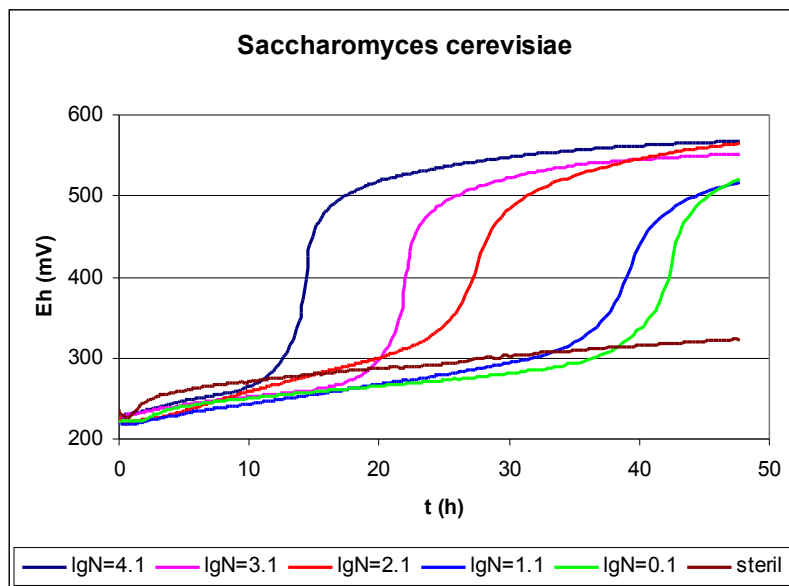
4.3.3.3. Belső kalibrációs görbe felvétele

Ezt a módszert akkor alkalmazzuk, amikor nem tudunk előzetesen felvett kalibrációs görbét használni, mert a mikroflóra összetétele nem ismert. A módszert az eredmények fejezetben ismertetem.

4.3.3.4. Indirekt mérés

Penész- és élesztőgombák szaporodása során a redox-potenciál változása közvetlenül nem mérhető. Ebben az esetben - az impedimetriás eljárásokhoz hasonlóan – indirekt módon, a szaporodás során

képződő CO₂ mérésével lehet a szaporodást detektálni. A mérést a 4.3.2.3. pontban látható mérőcellával végezzük. A gombák légzése során képződő CO₂-ot 0,002 M KOH oldatban nyeletjük el és az oldat redox-potenciál változását mérjük. Ebben az esetben a redox-potenciál nem csökken, hanem nő, detektációs kritériumként a $\Delta E/\Delta t \geq 0,2 \text{ mV/min}$ értéket használtam. *Saccharomyces cerevisiae* szaporodási redox-görbéi láthatók a 8. ábrán.



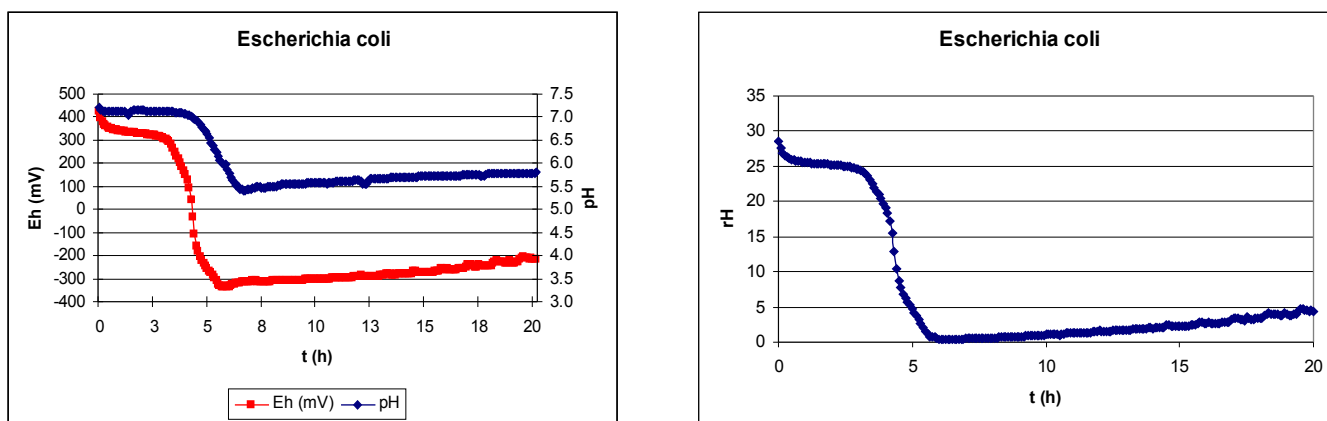
8. ábra. *Saccharomyces cerevisiae* indirekt méréssel meghatározott szaporodási redox-görbéi maláta levesben (T=25 °C, KOH=0,002M)

5. KÍSÉRLETI EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

5.1. A redox-potenciál, mint mérési paraméter kiválasztásának indoklása

A szaporodás során mért redox-potenciál érték nem független a táptalaj pH-jától, amely maga is változik a szaporodás során. Annak a kérdésnek eldöntésére, hogy a mért redox-potenciál változást mennyiben befolyásolja a pH változása, együttesen mértem az egyes mikrobák E_h és pH változását. A kapott értékekből kiszámítottam a kombinált hatást kifejező rH értékeket is. Az egyes mikrobák E_h , pH és rH értékeinek változása a 9-14. ábrákon látható.

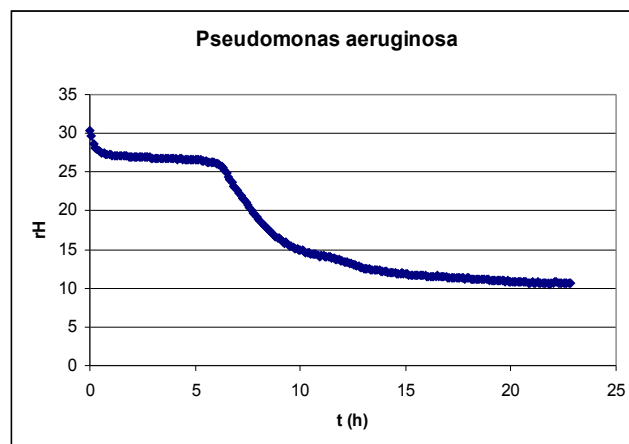
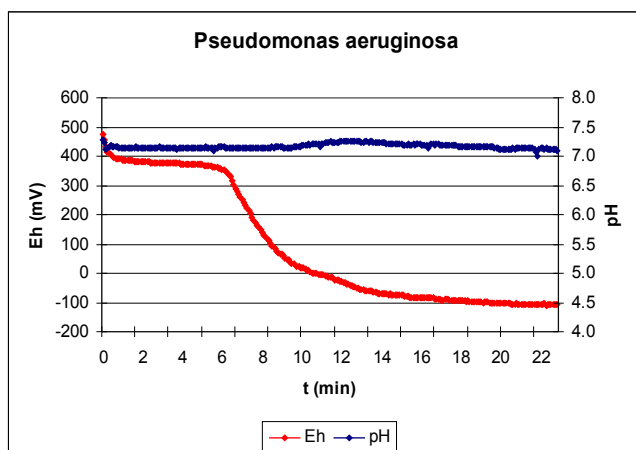
5.1.1. *Escherichia coli*



9. ábra. *Escherichia coli* E_h , pH és rH változása $\frac{1}{2}$ TSB levesben,
 $T = 37^\circ\text{C}$, $N_0 = 5,48 \times 10^5$ tke/ml

A fakultatív anaerob *Escherichia coli* szaporodása során az E_h csökkenése 800 mV, a pH csökkenés 1,5 egység, az rH csökkenése 25 egység. A redox-potenciál csökkenését döntően nem a pH változása okozza. (A pH 1,5 egységnyi csökkenése önmagában 3 egység rH csökkenést eredményez.)

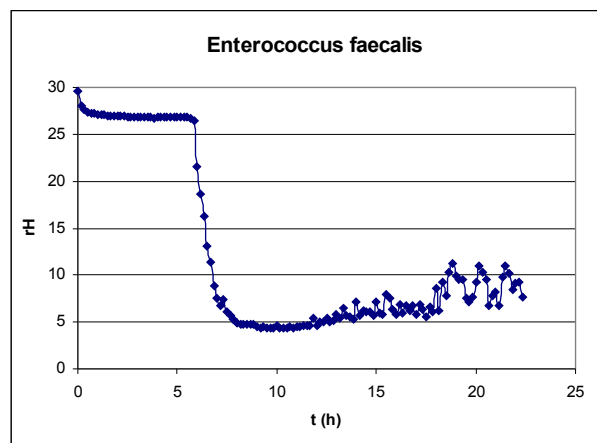
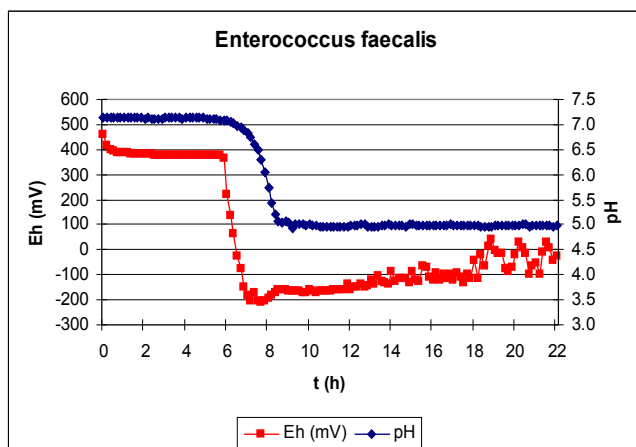
5.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*



10. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* E_h , pH és rH változása $\frac{1}{2}$ TSB levesben,
 $T = 37^\circ\text{C}$, $N_0 = 3,25 \times 10^5$ tke/ml.

Az aerob *Pseudomonas aeruginosa* szaporodási E_h csökkenése 500 mV, a pH nem változik az rH csökkenése 20 egység. Ebben az esetben a pH a redox-potenciál változását egyáltalán nem befolyásolja.

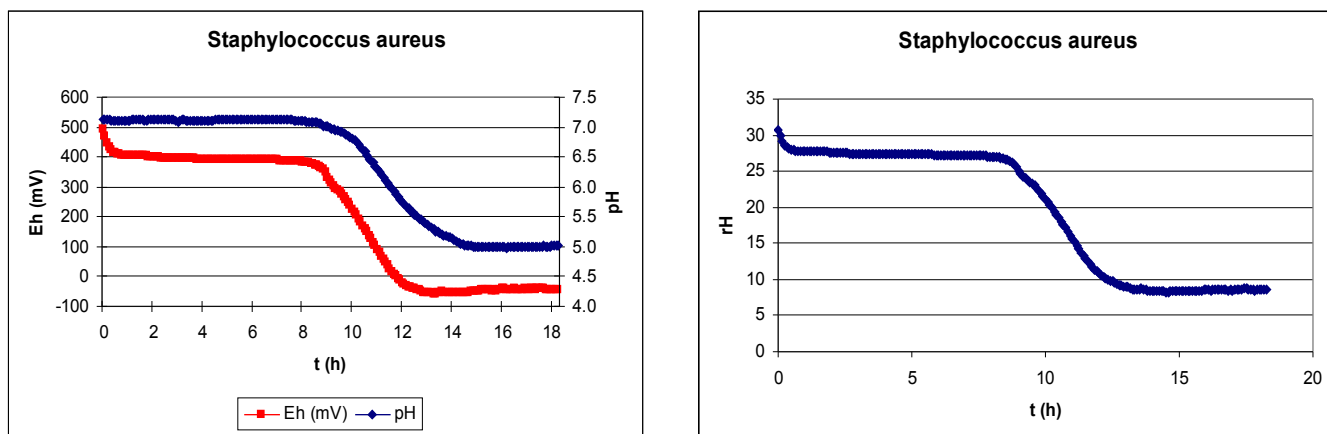
5.1.3. *Enterococcus faecalis*



11. ábra. *Enterococcus faecalis* E_h , pH és rH változása $\frac{1}{2}$ TSB levesben,
 $T = 37^\circ\text{C}$, $N_0 = 9,50 \times 10^4$ tke/ml.

Az aerotoleráns anaerob *Enterococcus faecalis* E_h csökkenése 600 mV, a pH csökkenés 2 egység, az rH csökkenése 20 egység. Látható, hogy a redox-potenciál csökkenését döntően nem a pH változása okozza. (A pH 2 egységnyi csökkenése önmagában 4 egység rH csökkenést eredményez.)

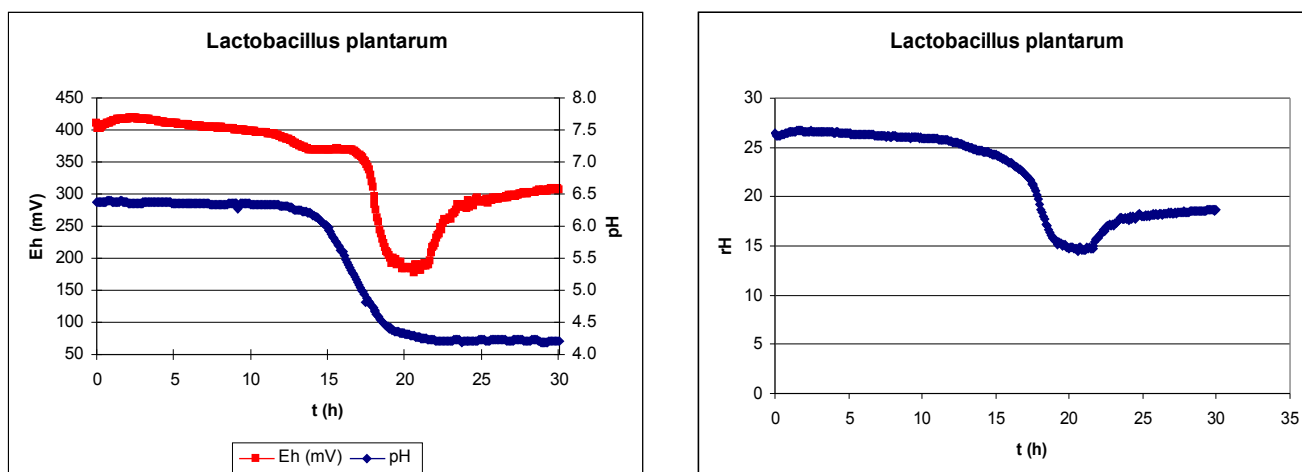
5.1.4. *Staphylococcus aureus*



12. ábra. *Staphylococcus aureus* E_h , pH és rH változása 1/2 TSB levesben, $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $N_0 = 1,61 \times 10^4$ tke/ml.

A fakultatív anaerob *Staphylococcus aureus* szaporodása 500 mV E_h csökkenést eredményez, a pH csökkenés 2 egység, az rH csökkenése 20 egység. A redox-potenciál csökkenését döntően ebben az esetben sem a pH változása okozza. (A pH 2 egységnyi csökkenése önmagában 4 egység rH csökkenést eredményez.)

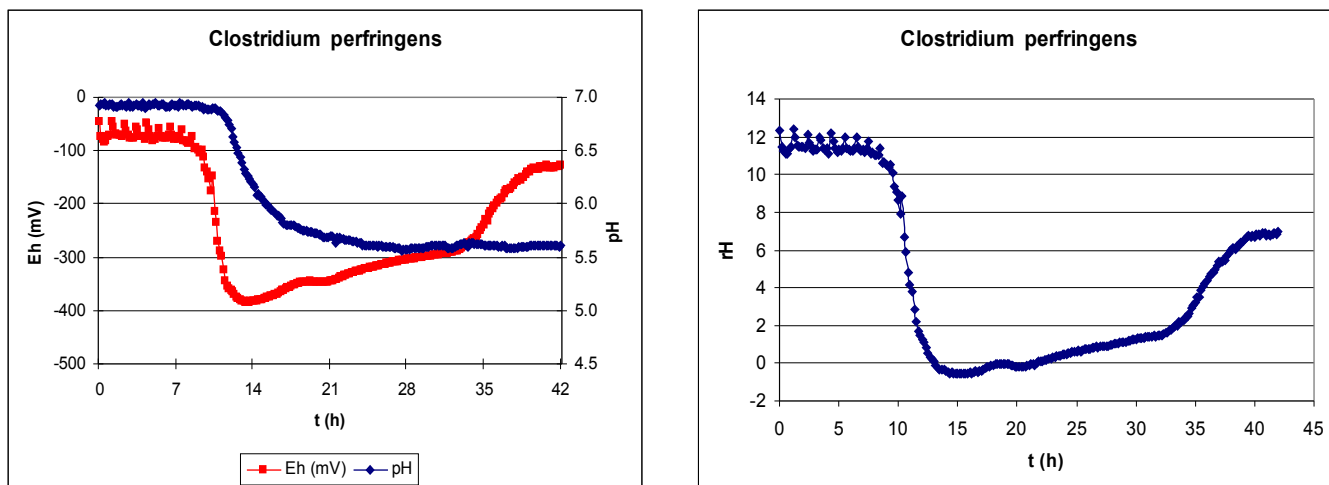
5.1.5. *Lactobacillus plantarum*



13. ábra. *Lactobacillus plantarum* E_h , pH és rH változása MRS levesben, $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$, $N_0 = 5,10 \times 10^4$ tke/ml.

Az aerotoleráns anaerob *Lactobacillus plantarum* szaporodása eredményezte a vizsgált mikroorganizmusok közül a legkisebb mértékű redox-potenciál csökkenést, 200 mV-ot és jellegzetes a redox-görbe alakja is. A pH csökkenése 2,5 egység, az rH csökkenése csak 10 egység, azonban még ebben az esetben sem a pH változás határozza meg az rH csökkenését, mert a pH 2,5 egységnyi változása csak 5 egység rH csökkenést eredményez.

5.1.6. *Clostridium perfringens*



14. ábra. *Clostridium perfringens* E_h , pH és rH változása Tioglikolát levesben,
 $T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $N_0 = 2,3 \times 10^4$ tke/ml.

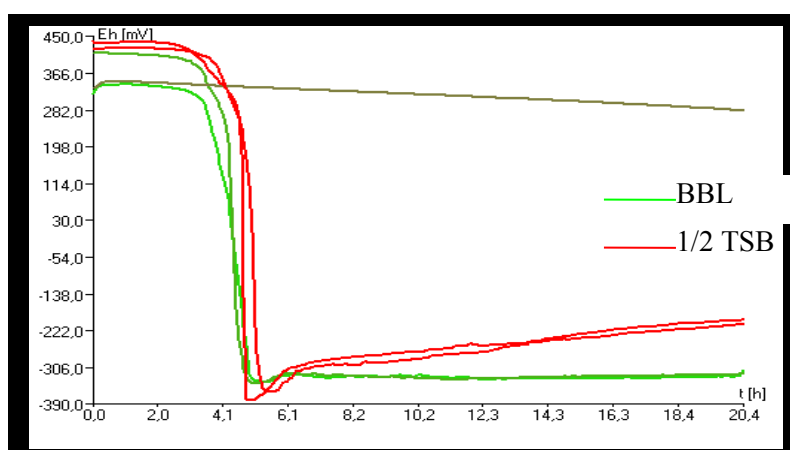
Az általam vizsgált mikrobák közül a *Clostridium perfringens* volt az egyetlen obligát anaerob baktérium. Ebben az esetben már a táptalaj kezdeti redox-potenciál értéke is nagyon kicsi (kb. -50 mV). A szaporodás során ez E_h 350 mV-tal csökken és a vizsgált mikrobák közül a legkisebb értéket eredményezi. A pH csökkenés 2,5 egység. Az rH csökkenése 10 egység.

A vizsgálati eredményekből egyértelműen kiderül, hogy a szaporodás detektálására a pH változás nem alkalmas. A szaporodás a redox-potenciál mérésével jól követhető, a redox-potenciál csökkenés minden mikroba esetében jól detektálható. Minden mikroba esetében egyértelműen meghatározható a detektációs idő (TTD). A detektációs kritérium (dE_h/dt) értéke -0,4 és -1 mV/min között mikrobacsoportonként változik, de egy-egy mikrobacsoportra tekintve jellemző érték.

5.2. A mikrobaszaporodás és a redox-potenciál változásának összefüggése

5.2.1. Szelektív táptalaj hatása redox görbe lefutására

Megvizsgáltuk, hogy szelektív táptalaj (BLE) alkalmazása befolyásolja-e a görbe alakját. A mérési eredmények a 15. ábrán láthatók.



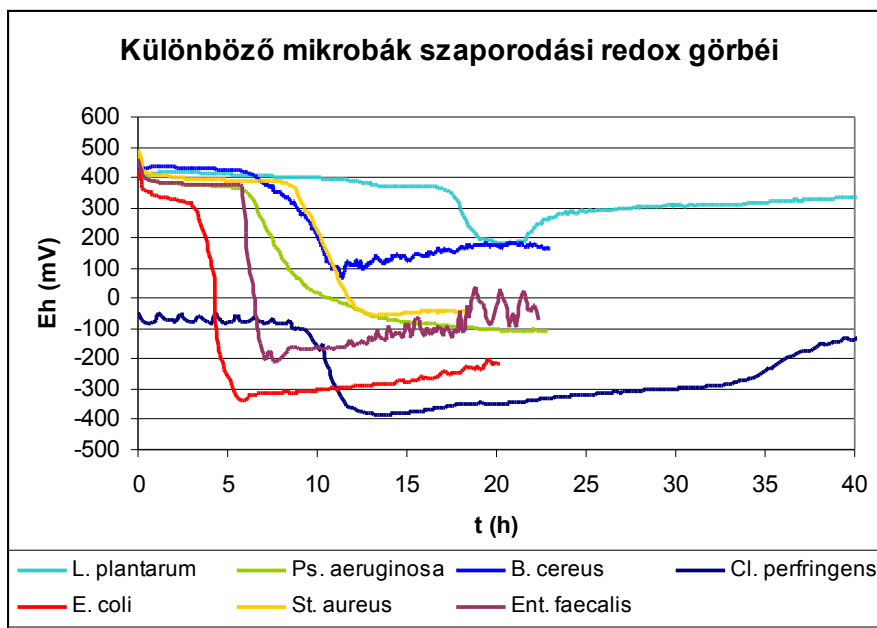
15. ábra. *Escherichia coli* redox-potenciál változása 1/2 TSB és BLE táptalajokban (T=37 °C)

Az ábráról megállapítható, hogy a szelektív táptalaj alkalmazása a görbe lefutását nem befolyásolja.

5.2.2. Redox görbék mikroba specifitása

Mint az 5.1. fejezet eredményeiből is látható, a redox-potenciál valamennyi, általunk vizsgált, baktérium szaporodása során csökken, azonban a csökkenés mértékében és sebességében jelentős különbségek figyelhetők meg, amelyek mikrobacsoportonként változnak és az egyes mikrobacsoportokra jellemző görbéket adnak.

Néhány mikroba jellegzetes redox-potenciál változási görbáját láthatjuk a 16. ábrán.



16. ábra. A redox-potenciál változása különböző mikrobák szaporodása során.

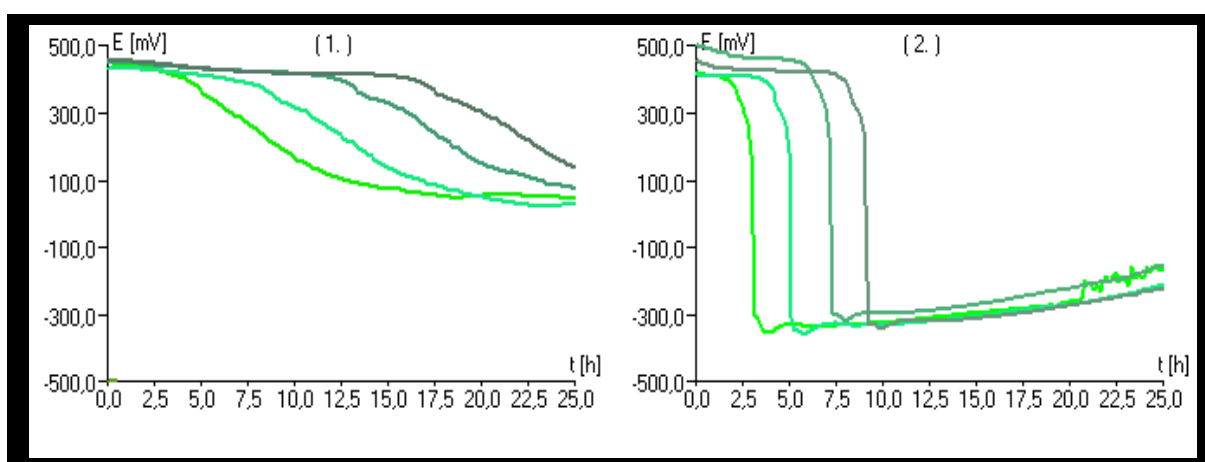
Táptalajok és tenyésztési hőmérsékletek:

Ps. aeruginosa, *E. coli*, *St. aureus*, *Ent. faecalis*: TSB, T=37 °C;

B. cereus: TSB, T= 30 °C; *L. plantarum*: MRS, T=37 °C; *Cl. perfringens*: Tioglikolát leves, T= 37 °C

Az eltérő lefutású görbék lehetőséget adnak arra, hogy a görbe alakjából következtessünk a mintában jelenlévő mikroba fajra. Ez a lehetőség tovább növelheti a táptalajok szelektivitását.

A 17. ábrán *Pseudomonas aeruginosa* és *Escherichia coli* szaporodását mutatom be BLE táptalajban, 44 °C hőmérsékleten.



17. ábra *Pseudomonas aeruginosa* és *Escherichia coli* redox görbéi BLE tápvelesben (T=44 °C)

(1) *Pseudomonas aeruginosa*; (2) *Escherichia coli*

Látható, hogy bár a *Pseudomonas aeruginosa* képes szaporodni BLE táplevesben, 44 °C hőmérsékleten, az eltérő redox-görbék alapján az *E. coli*től jól elkülöníthető. Vegyes tenyészet esetén, ha a mintában egyidejűleg *Ps. aeruginosa* és *E. coli* is jelen van, az *E. coli* erőteljesebb redox-potenciál csökkentő hatása miatt jelenléte kimutatható.

5.2.3. Az egyes mikroorganizmusok redox-görbéinek finomszerkezete

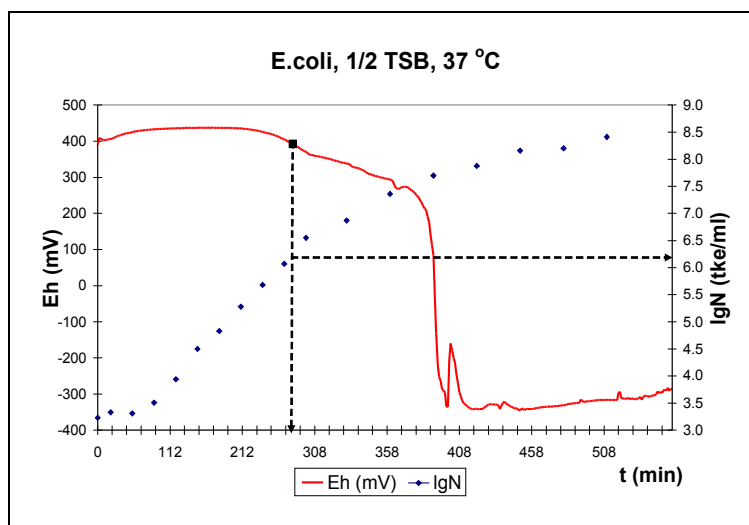
5.2.3.1. *Escherichia coli*

A 18. ábrán *E. coli* szaporodási görbéje és a hozzá tartozó redox-görbe látható.

A szaporodási görbéhez a mikrobaszám meghatározása – félóránként vett mintákkal - lemezöntéses módszerrel, 10-es alapú hígítási sor készítésével történt. A redox-potenciál értékeket kétpercenként detektáltuk.

Az ábrán szaggatott vonallal jelöltük a TTD-hez tartozó lg mikrobaszám értéket.

A detektációs kritérium $dE_h/dt = -1$ mV/min



18. ábra *E. coli* szaporodási és redox-görbéje

TTD = 282 min. A TTD-hez tartozó mikrobaszám: $\lg N = 6,25$; $N = 1,78 \times 10^6$ tke/ml.

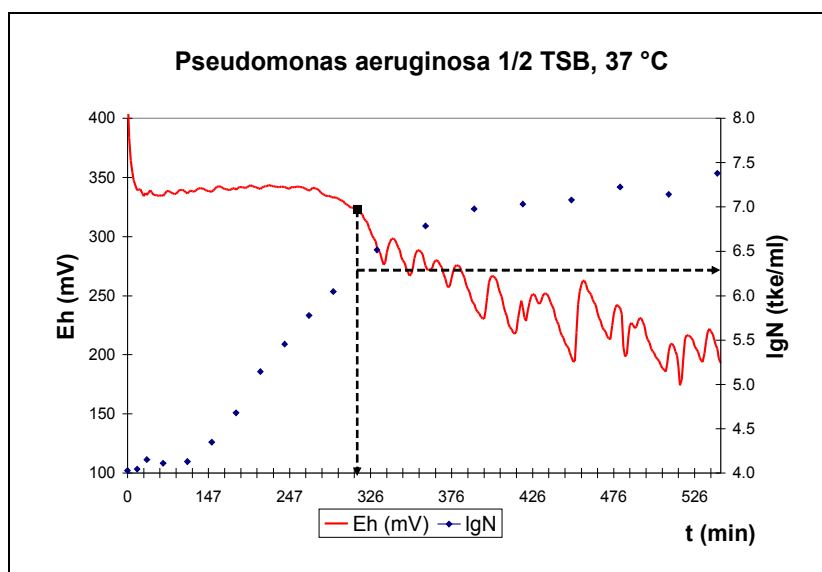
5.2.3.2. *Pseudomonas aeruginosa*

A 19. ábrán *Pseudomonas aeruginosa* szaporodási görbéje és a hozzá tartozó redox-görbe látható.

A szaporodási görbéhez a mikrobaszám meghatározása – félóránként vett mintákkal - lemezöntéses módszerrel, 10-es alapú hígítási sor készítésével történt. A redox-potenciál értékeket kétpercenként detektáltuk.

Az ábrán szaggatott vonallal jelöltük a TTD-hez tartozó lg mikrobaszám értéket.

A detektációs kritérium $dE_h/dt = -0,5 \text{ mV/min}$



19. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* szaporodási és redox-görbéje, TTD = 318 min. A TTD-hez tartozó mikrobaszám: $\lg N = 6,28$; $N = 1,91 \times 10^6 \text{ tke/ml}$.

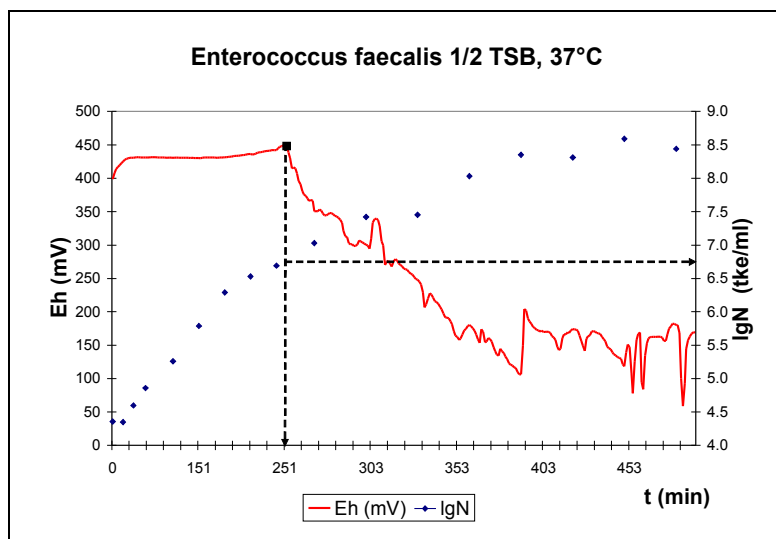
5.2.3.3. *Enterococcus faecalis*

A 20. ábrán *Enterococcus faecalis* szaporodási görbéje és a hozzátartozó redox-görbe látható.

A szaporodási görbéhez a mikrobaszám meghatározása – félóránként vett mintákkal - lemezöntéses módszerrel, 10-es alapú hígítási sor készítésével történt. A redox-potenciál értékeket kétpercenként detektáltuk.

Az ábrán szaggatott vonallal jelöltük a TTD-hez tartozó lg mikrobaszám értéket.

A detektációs kritérium $dE_h/dt = -0,4 \text{ mV/min}$



20. ábra. *Enterococcus faecalis* szaporodási és redox-görbéje, TTD = 253 min. A TTD-hez tartozó mikrobaszám: $\lg N = 6,85$; $N = 7,08 \times 10^6$ tke/ml.

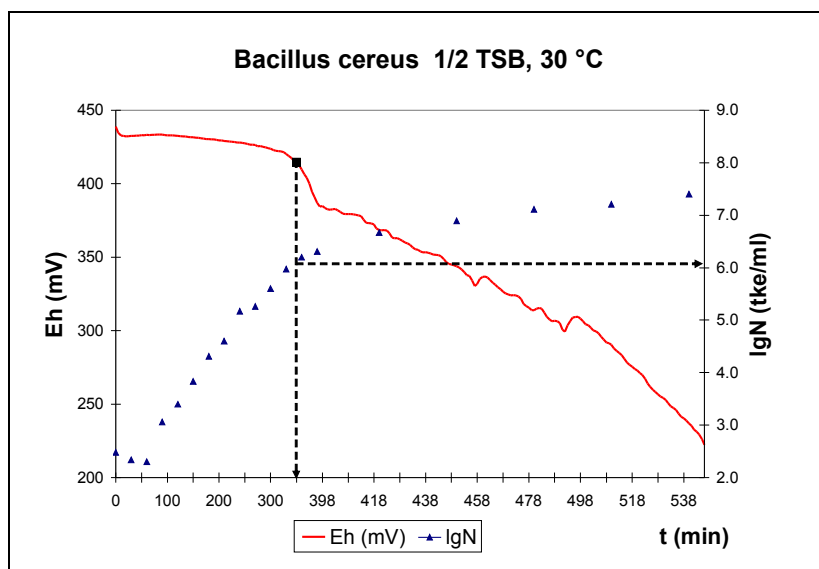
5.2.3.4. *Bacillus cereus*

A 21. ábrán *Bacillus cereus* szaporodási görbéje és a hozzá tartozó redox-görbe látható.

A szaporodási görbéhez a mikrobaszám meghatározása – félóránként vett mintákkal - lemezöntéses módszerrel, 10-es alapú hígítási sor készítésével történt. A redox-potenciál értékeket kétpercenként detektáltuk.

Az ábrán szaggatott vonallal jelöltük a TTD-hez tartozó lg mikrobaszám értéket.

A detektációs kritérium $dE_h/dt = -0,5$ mV/min



21. ábra. *Bacillus cereus* szaporodási és redox-görbéje, TTD = 355 min. A TTD-hez tartozó mikrobaszám: $\lg N = 6,10$; $N = 1,26 \times 10^6$ tke/ml.

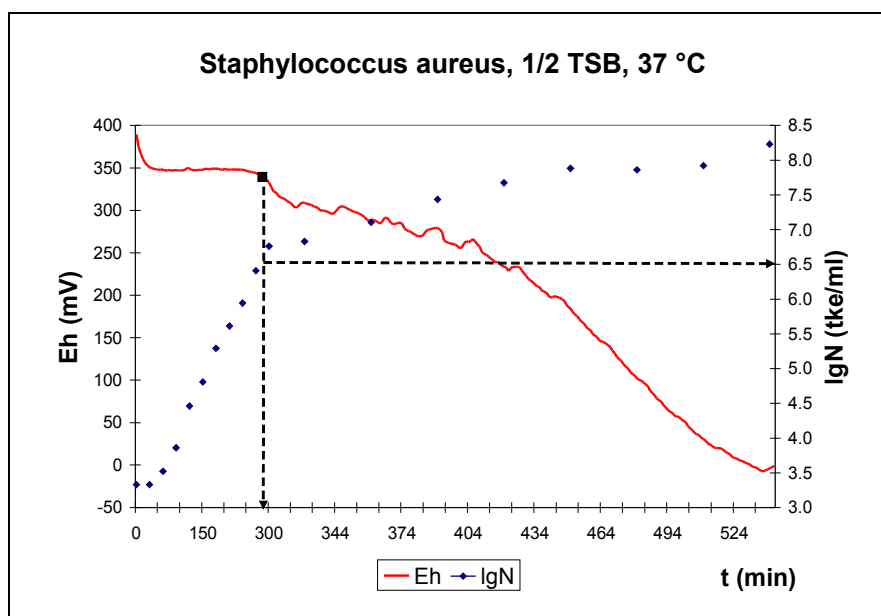
5.2.3.5. *Staphylococcus aureus*

A 22. ábrán *Staphylococcus aureus* szaporodási görbéje és a hozzá tartozó redox-görbe látható.

A szaporodási görbéhez a mikrobaszám meghatározása – félóránként vett mintákkal - lemezöntéses módszerrel, 10-es alapú hígítási sor készítésével történt. A redox-potenciál értékeket kétpercenként detektáltuk.

Az ábrán szaggatott vonallal jelöltük a TTD-hez tartozó lg mikrobaszám értéket.

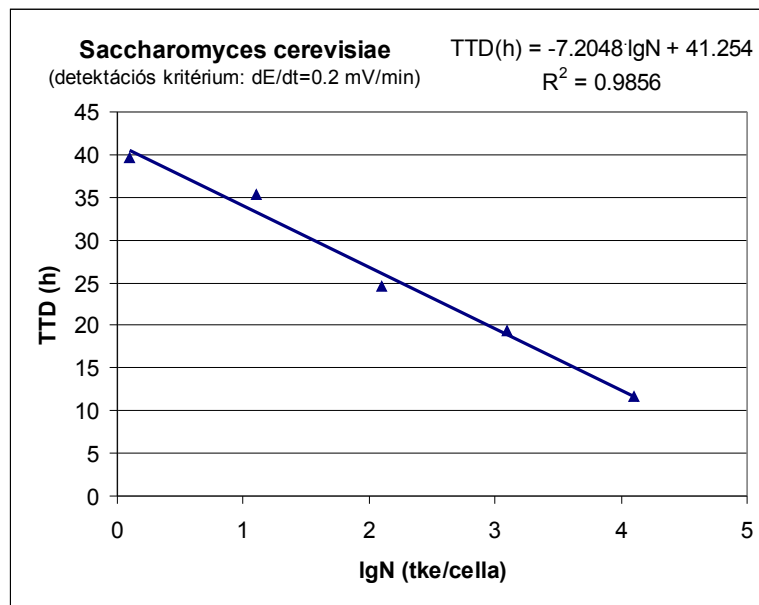
A detektációs kritérium $dE_h/dt = -0,5 \text{ mV/min}$



22. ábra. *Staphylococcus aureus* szaporodási és redox-görbéje, TTD = 318 min. A TTD-hez tartozó mikrobaszám: $\lg N = 6,65$; $N = 4,47 \times 10^6 \text{ tke/ml}$.

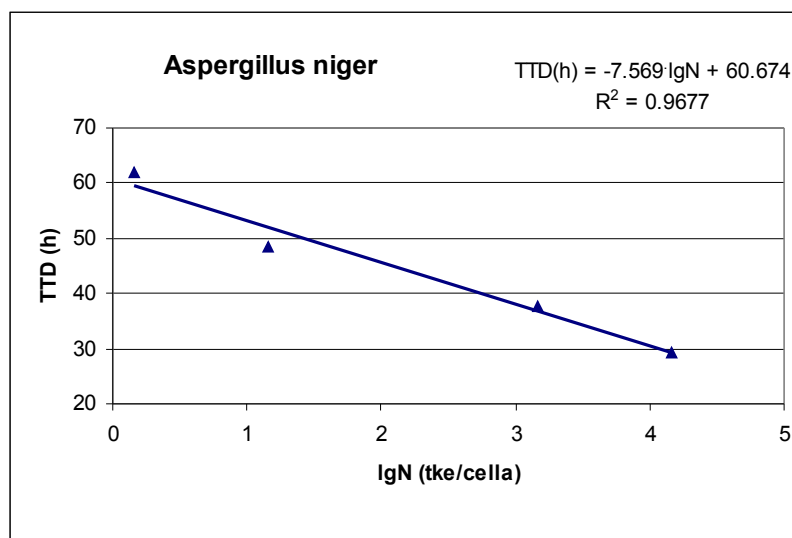
3.4. Penész- és élesztőgombák számának meghatározása indirekt méréssel

Penész- és élesztőgombák szaporodásának mérésére a redox-potenciál mérés közvetlenül nem alkalmas, mert a táptalaj redox-potenciál változása kicsi és nem egyértelmű. Ilyenkor azonban lehetőségünk van a szaporodás során képződő CO_2 redox-potenciál méréssel történő detektálására. A mérést 4.3.4. pontban leírt módon, a 4.3.2.3. pontban bemutatott mérőcellával *Saccharomyces cerevisiae* és *Aspergillus niger* tisztatenyészetével végeztük, maláta levesben, 25°C hőmérsékleten. A mikrobaszám értékeket maláta- agar táptalajon határoztuk meg. A redox görbék a 8. ábrán láthatók. *Saccharomyces cerevisiae* kalibrációs görbáját a 23. ábra mutatja be.



23. ábra. *Saccharomyces cerevisiae* kalibrációs görbéje malátalevesben, indirekt méréssel.
 ($T = 25$ °C, $dE_h/dt = 0,2$ mV/min)

Aspergillus niger kalibrációs görbéje a 24. ábrán látható

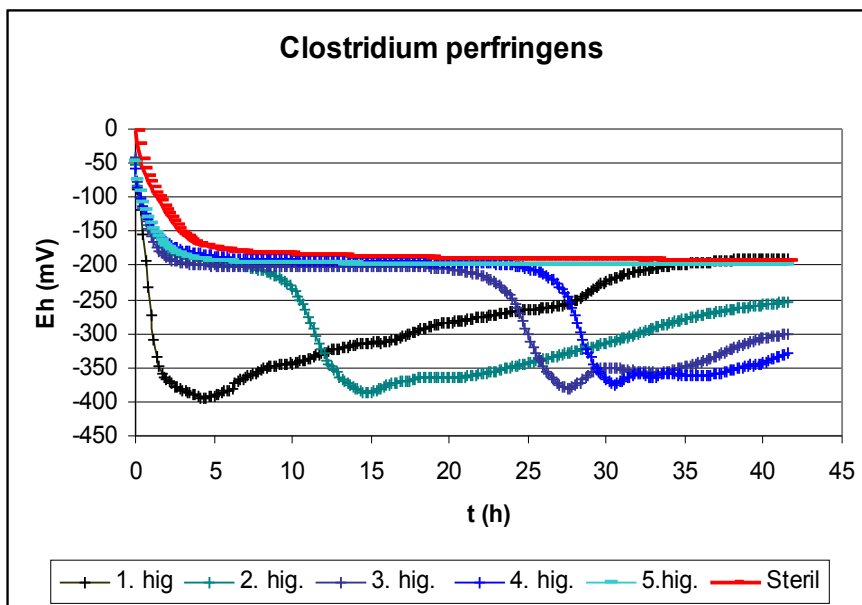


24. ábra. *Aspergillus niger* kalibrációs görbéje malátalevesben, indirekt méréssel.
 ($T = 25$ °C, $dE_h/dt = 0,2$ mV/min)

3.5. Belső kalibrációs görbe meghatározása

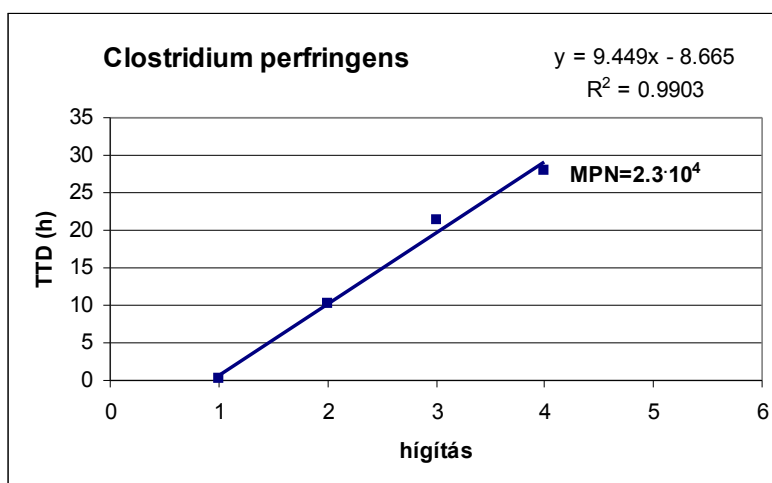
Ebben az esetben a mintából 10-es alapú hígítási sort készítünk, úgy, hogy az utolsó hígítás(ok)ban már ne legyen élősejt kimutatható (MPN módszer). A hígítási sor minden tagját egy (vagy több

párhuzamos) mérőcellába oltjuk és meghatározzuk a TTD értékeket. A szaporodást mutató utolsó hígítási szintek ismeretében MPN-táblázat segítségével kiszámítjuk a minta kezdeti élősejtszámát. Példaként a *Clostridium perfringens* belső kalibrációs görbéjének meghatározását mutatom be. A 25. ábrán *Clostridium perfringens* különböző hígításainak redox-görbéi láthatók. A mérés tioglikolát tápoldatban történt, 37 °C-on.



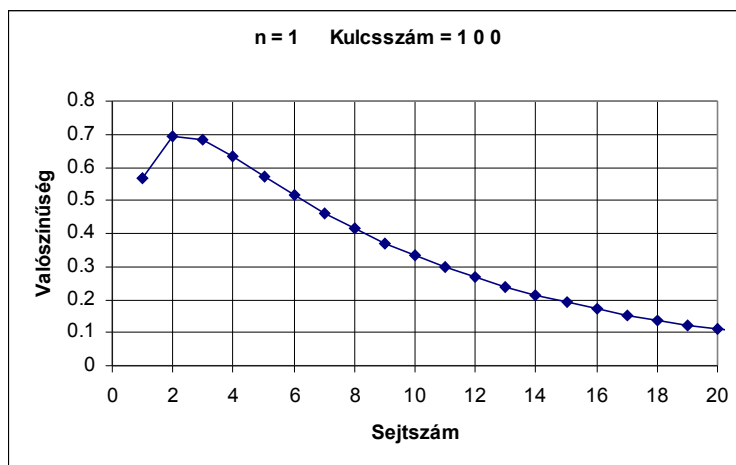
25. ábra. *Clostridium perfringens* redox görbéi tioglikolát tápoldatban (T=37 °C)

A TTD értékeket a hígítás függvényében a 26. ábra szemlélteti.



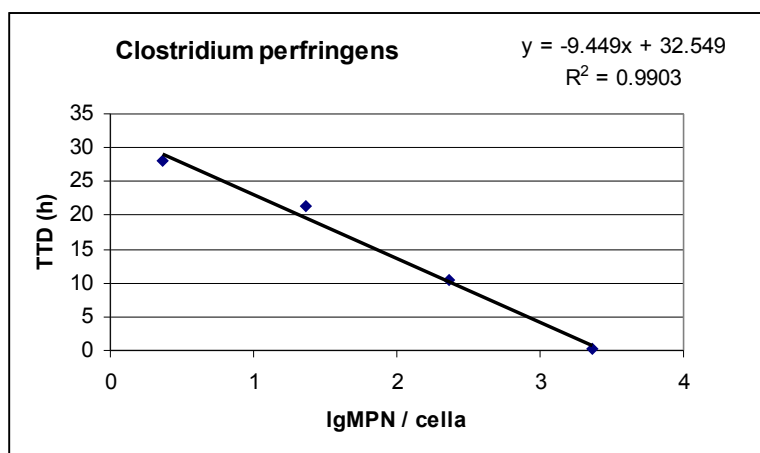
26. ábra. *Clostridium perfringens* TTD értékei a hígítás függvényében tioglikolát tápoldatban (T = 37 °C)

Egy párhuzamosban történő MPN vizsgálat 100 kulcsszámahoz tartozó élősejtszámok valószínűségi görbáját mutatja be a 27. ábra. Az ábráról leolvasható, hogy a legvalószínűbb sejtszám MPN=2,3.



27. ábra. MPN módszer 100 kulcsszámahoz tartozó sejtszám-valószínűségi értékek.

Az utolsó pozitív hígítási szint ismeretében meghatározott N_0 értékből a kalibrációs görbe megszerkeszthető, amely a 28. ábrán látható.



28. ábra. *Clostridium perfringens* kalibrációs görbéje tioglikolát tápoldatban ($T = 37^\circ\text{C}$)

A 28. ábrán látható kalibrációs görbe a továbbiakban külső kalibrációs görbeként használható.

5.3. A mérési eljárás validálása

A redox-potenciál mérésre alapozott mikrobaszám-meghatározási módszer validálásakor az alábbi teljesítményjellemzőket határoztuk meg:

- Szelektivitás (Selectivity)
- Linearitás (Linearity)
- Érzékenység (Sensitivity)
- Kimutatási határ (Detection limit)
- Meghatározási határ (Quantitation limit)
- Mérési tartomány (Range)
- Pontosság (Accuracy / Trueness)
- Precizitás (Precision)
 - Ismételhetőség (Repeatability)
 - Reprodukálhatóság (Reproducibility)
- Zavartűrés (Robustness)

A redox-potenciál mérésen alapuló eljárás az elősejtszámot kalibrációs görbe alapján számítja ki, ezért az érzékenység, kimutatási határ, mérési tartomány és az ismételhetőség számszerű meghatározása a kalibrációs görbe matematikai-statisztikai kiértékelése alapján történt.

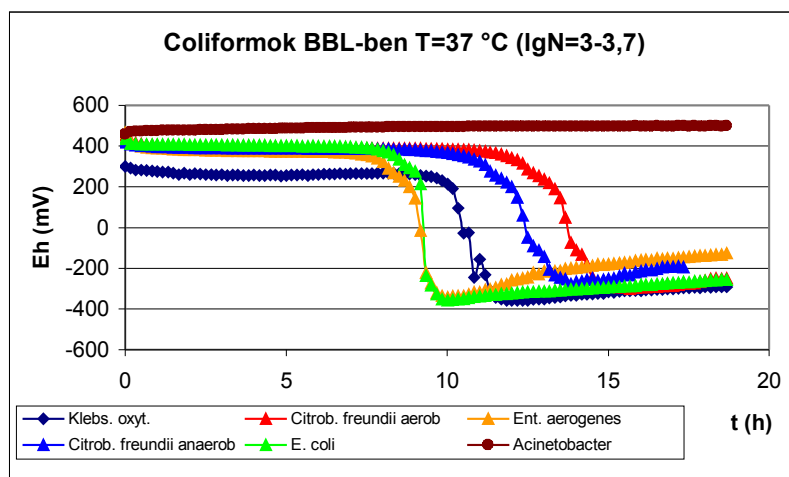
7 Táblázat. Teszt mikroorganizmusok és táptalajok.

Mikroorganizmusok	Redox-potenciál mérés	Telepszámlálás
<i>Escherichia coli</i>	BLE, TSB	PC, Tergitol
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BLE, TSB	PC, Tergitol
<i>Citrobacter freundii</i>	BLE, TSB	PC, Tergitol
<i>Klebsiella oxytoca</i>	BLE, TSB	PC, Tergitol
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	BLE, TSB	PC, Tergitol
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimid, TSB	PC, Cetrimid
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Cetrimid, TSB	PC, Cetrimid
<i>Enterococcus faecalis</i>	Azid, TSB	PC, Slanetz-Bartley
Összesíra	TSB	PC

5.3.1. Szelektivitás

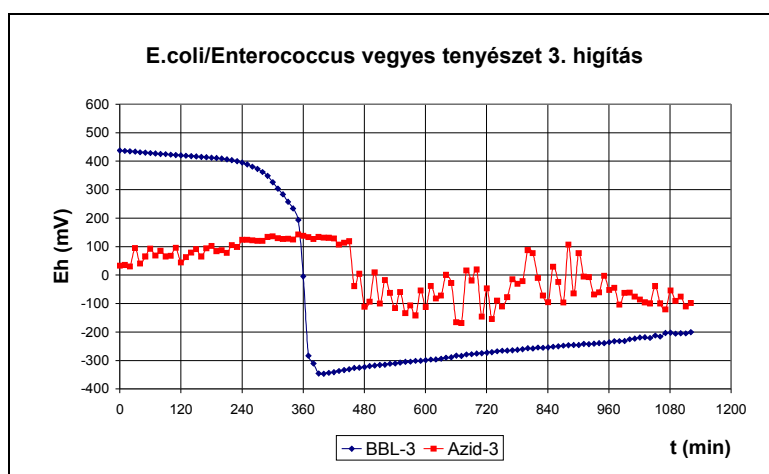
A módszer szelektivitását alapvetően az alkalmazott táptalajok szelektivitása határozza meg.

Kóliformok, Enterococcusok és *Pseudomonas aeruginosa* szelektív meghatározásához BLE-, Azid- és Cetrimid levest használtunk. Minden esetben a jellegzetes zavaró mikroflórával vegyesen oltottuk a mérőcellákat. A mért redox-görbét a 29., 30. és 31. ábrák szemléltetik.



29. ábra. Kóliformok és *Acinetobacter lwoffii* BLE-ben.

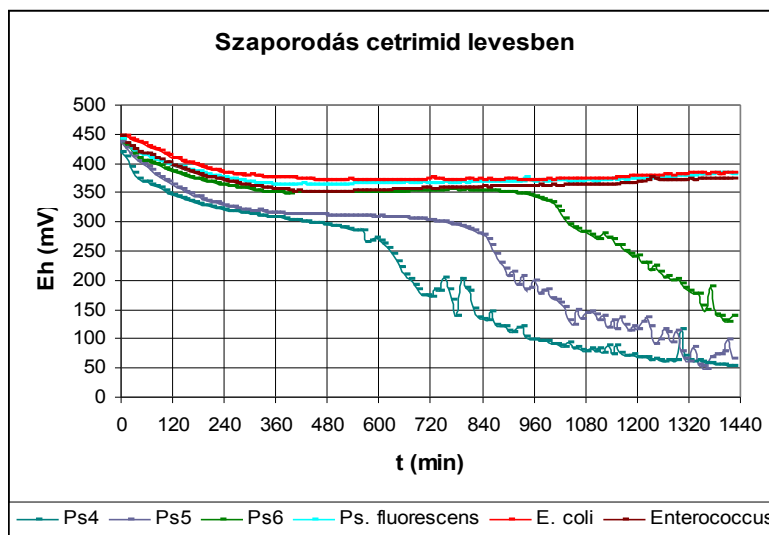
- Mind a négy kóliform mikroorganizmus határozott, értékelhető görbét ad.
- Az Endo és Tergitol agaron zavaró mikrobaként leggyakrabban előforduló *Acinetobacter lwoffii* BLE-ben nem ad értékelhető görbét.



30. ábra. *Escherichia coli* és *Enterococcus faecalis* kevert tenyésztete BLE és Azid táplevesekben.

A redox-görbék alakjából egyértelműen megállapítható, hogy a szelektív táplevesekben csak a cél-mikroba szaporodik:

- BLE-levesben jellegzetes *E. coli* görbét kapunk.
- Azid-levesben jellegzetes *Enterococcus faecalis* görbét kapunk.
-



31. ábra. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* és *Enterococcus faecalis* szaporodása Cetrimid-levesben (T = 37 °C)
(A Ps jelölés mellett lévő számok a *Ps. aeruginosa* törzsoldat hígítási szintjét jelzik)

- Csak a *Pseudomonas aeruginosa* ad jelet
- *Pseudomonas fluorescens*, *E. coli* és *Enterococcus faecalis* nem szaporodik, redox görbéik vízszintesek.

5.3.2. Linearitás

Az analitikai eljárás által adott jel (TTD) és a meghatározandó mennyiség ($\lg N$) közötti összefüggés linearitása.

A redox-potenciál mérésen alapuló elősejtszám-meghatározási módszer linearitását a kiindulási sejtkoncentráció logaritmusának függvényében ábrázolt TTD értékekkel szemléltetem. Teszt-mikroba szuszpenziójából tízes léptékű hígítási sort készítünk sós pepton oldattal. A hígítási sor minden egyes tagjából 1,0 ml-t pipetázunk a mérőcellába, és műszeresen meghatározzuk a TTD értékét. Az alap szuszpenzió mikrobaszámát lemezöntéssel módszerrel meghatározzuk és ebből az értékből

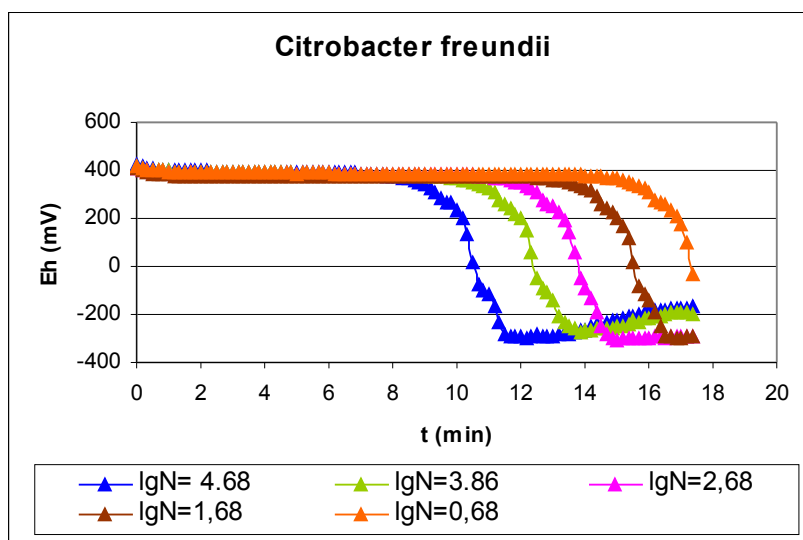
kiszámítjuk az egyes hígításokhoz tartozó mikrobaszámokat. A TTD értékeket ábrázolva a lgN értékek függvényében, az összefüggést lineáris regresszióval határozzuk meg.

Az eljárást *Citrobacter freundii* adatainak kiértékelésén keresztül részletesen mutatom be. A többi mikroorganizmus TTD-görbéinek linearitását csak ábrákkal szemléltetem. Az ábrákon az egyenes egyenletét és a determinációs együttható (R^2) értékét is feltüntettem.

5.3.2.1. Kóliform mikrobák meghatározásának linearitása

Citrobacter freundii

Az anaerob körülmények között (zárt mérőcellában) felvett redox-görbék a 32. ábrán láthatók. Az alap szuszpenzió mikroba-koncentrációjából számított sejtszámokat (N), azok logaritmusát (lgN) és a hozzájuk tartozó detektációs időket (TTD) a 8. táblázat tartalmazza.

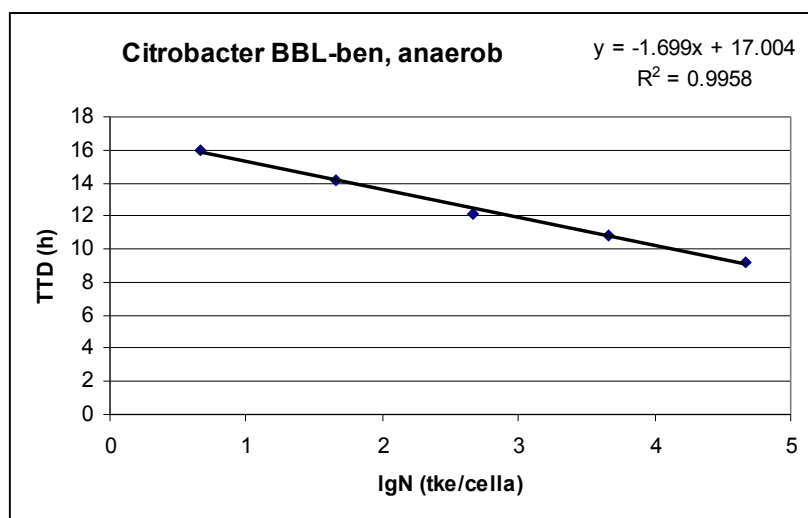


32. ábra. *Citrobacter freundii* anaerob redox görbéi BLE-levesben ($T = 37^\circ\text{C}$)

8. Táblázat. *Citrobacter freundii* hígítási sor tagjaihoz tartozó sejtszám és TTD értékek

Hígítási szint	4.	5.	6.	7.	8.
N (tke/cella)	$4.6 \cdot 10^4$	$4.6 \cdot 10^3$	$4.6 \cdot 10^2$	$4.6 \cdot 10^1$	$4.6 \cdot 10^0$
lg N	4.68	3.68	2.68	1.68	0.68
TTD (h)	9,18	10,85	12,18	14,18	16,02

A kalibrációs görbét a 33. ábra mutatja be.



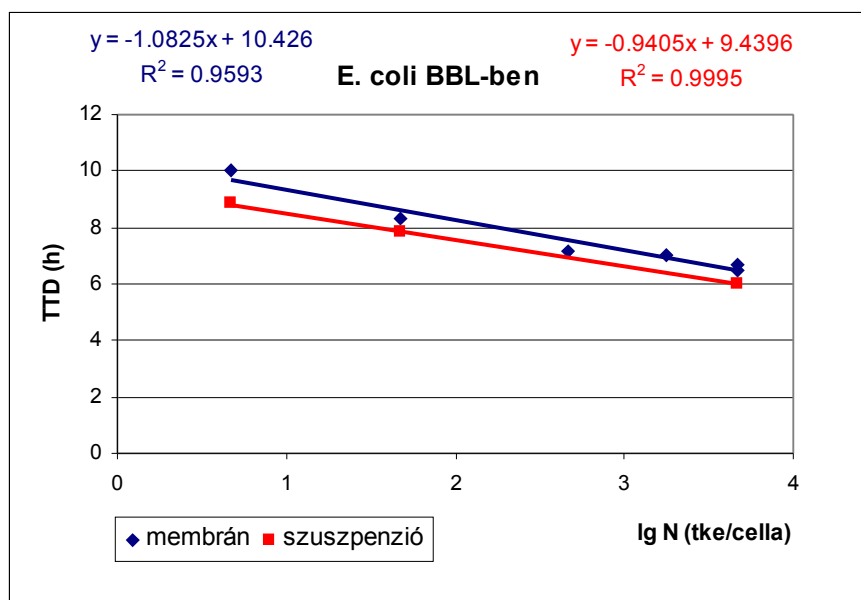
33. ábra. *Citrobacter freundii* anaerob kalibrációs görbéje BLE-levesben (T = 37 °C)

Escherichia coli

Kis koncentrációknál a kalibrációs görbét két módszerrel határoztuk meg:

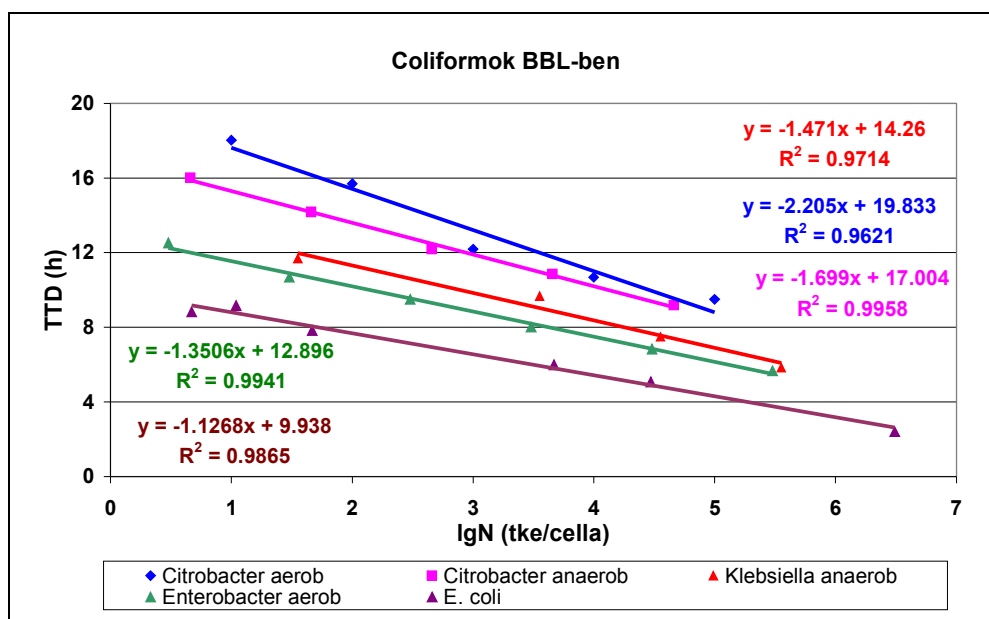
- A sejtszuszpenzió közvetlen bemérése a mérőcellába
- Membránszűrés után a membrán behelyezése a mérőcellába

A két módszerrel kapott kalibrációs görbék a 34. ábrán láthatók.



34. ábra. *E. coli* aerob kalibrációs görbéi BLE-levesben (T = 37 °C)

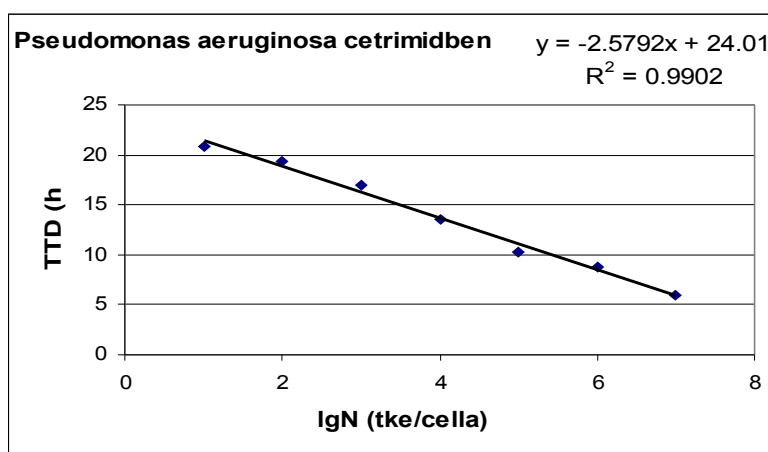
A kóliform mikroorganizmusok kalibrációs görbéit összesítve ábrázoltam a 35. ábrán.



35. ábra. Kóliform mikrobák kalibrációs görbéi BLE-levesben ($T = 37\text{ °C}$)

5.3.2.2. *Pseudomonas aeruginosa* meghatározásának linearitása

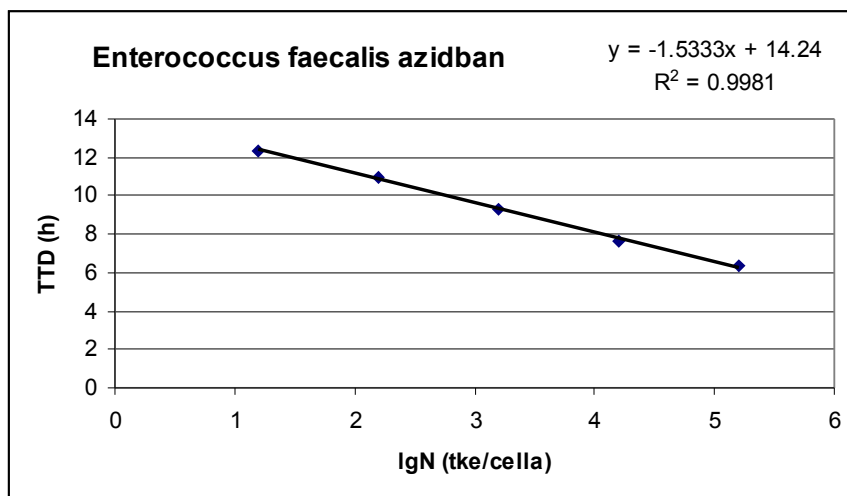
Pseudomonas aeruginosa kalibrációs görbét cetrimid levesben határoztuk meg. A kalibrációs görbét a 36. ábra szemlélteti.



36. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* kalibrációs görbéje Cetrimid-levesben ($T = 37\text{ °C}$)

5.3.2.3. *Enterococcus faecalis* meghatározásának linearitása

Enterococcus faecalis kalibrációs görbét cetrimid levesben határoztuk meg. A kalibrációs görbe a 37. ábrán látható.



37. ábra. *Enterococcus faecalis* kalibrációs görbéje Azid-levesben (T = 37 °C)

5.3.3. Érzékenység

A mérési módszer érzékenységét a kalibrációs görbe meredeksége adja meg, az adatokat a 9. táblázat foglalja össze.

9. Táblázat. A redox-potenciál mérésen alapuló sejtszám-meghatározás érzékenysége

Microorganizmus	Tápleves	Regressziós egyenlet	Érzékenység (min/lg egység)	95 %-os konf. i.v.
<i>Citrobacter freundii</i> anaerob	BLE	TTD (min) = 1190 - 132·lgN	132	±49
<i>Citrobacter freundii</i> aerob	BLE	TTD (min) = 1020 - 102·lgN	102	±13
<i>Klebsiella oxytoca</i> anaerob	BLE	TTD (min) = 856 - 88·lgN	88	±46
<i>Enterobacter aerogenes</i>	BLE	TTD (min) = 774 - 81·lgN	81	±9
<i>Escherichia coli</i>	BLE	TTD (min) = 596 - 68·lgN	68	±11
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimid	TTD (min) = 1440 - 155·lgN	155	±18
<i>Enterococcus faecalis</i>	Azid	TTD (min) = 836 - 92·lgN	92	±7

A 9. táblázatban összefoglalt adatokból megállapítható, hogy a kiindulási sejtkoncentráció egy nagyságrendnyi növelése a detektációs időt mikrobától függően 68 – 155 perccel csökkenti.

5.3.4. Kimutatási határ

Kimutatási határ az a legkisebb sejtszám a mérőcellában, amely még detektációs időt ad.

Mivel a steril tápleves redox-potenciál változása nem éri el a detektációs kritériumként megadott értéket, a TTD értékek mindig sejtszaporodást reprezentálnak. Az **elméleti kimutatási határ 1 sejt/mérőcella**, ezért az eljárás alkalmas jelenlét/hiány vizsgálatára is.

5.3.5. Meghatározási határ

Meghatározási határ azt a legkisebb mikrobaszámot jelenti, amely még elfogadható pontossággal és precizitással határozható meg.

Kis sejtkoncentrációk esetében a mikrobák a kivett minta-térfogatban Poisson eloszlást követnek. A mikrobaszám 10-15 fölötti átlagértékénél ez az eloszlás már normál-eloszlással közelíthető, amely megfelel a regresszió-számítás matematikai-statisztikai feltételeinek. Az **elméleti meghatározási határ 10 sejt/inokulum ($\lg N_0 = 1,0$)**, ami igen jól egyezik a kalibrációs görbék adataival.

5.3.6. Méréstartomány

Méréstartomány alatt értjük azt a tartományt, amelyen belül a sejtkoncentráció megfelelő pontossággal, precizitással és lehetőleg linearitással meghatározható

A kalibrációs görbék bizonyosága szerint a vizsgált **módszer méréstartománya $\lg N_0=1$ és $\lg N_0=7$ (10 és 10^7 sejt/inokulum) érték közé esik**. 10 alatt a sejtszám mintán belüli Poisson eloszlása okoz problémát, 10^7 sejt/mérőcella koncentráció fölött a TTD értéke túl kicsi a mérési módszer tranziens folyamatainak (hőmérséklet-, redox-egyensúly beállása, szaporodás lagperiódusa) időigényéhez viszonyítva.

5.3.7. Pontosság

A módszer pontossága a méréstartomány valódiságának mértéke, a módszer rendszeres hibájának jellemzője.

A redox-potenciál mérésen alapuló mikrobaszám-meghatározási eljárás a sejtszám-logaritmus és a detektációs idő között meghatározott regressziós összefüggéseken alapszik, a módszer pontossága a

kalibrációs görbék megbízhatóságától függ. *A pontos meghatározáshoz minden mikroba-populáció és tápközeg kombináció egyedi kalibrációs görbét igényel.*

5.3.8. Precizitás

A módszer precizitása a kölcsönösen független megismételt vizsgálatok eredményei közötti egyezés mértéke, a módszer véletlen hibája, a becsült tapasztalati szórással (SD) adható meg. Egy vizsgálati eljárás precizitásának két fő jellemzője az ismételhetőség és a reprodukálhatóság.

- **Ismételhetőség** a precizitás azon fajtája, amely ismételhető körülmények között elvégzett kísérletekre vonatkozik.

Véletlen hiba: (azonos laboratórium, azonos minta, azonos módszer, azonos műszer, azonos kezelő, rövid időintervallum a párhuzamos mérések között).

Intermediate precision: (azonos laboratórium, azonos minta, azonos műszer, eltérő kezelő, eltérő napokon vizsgál)

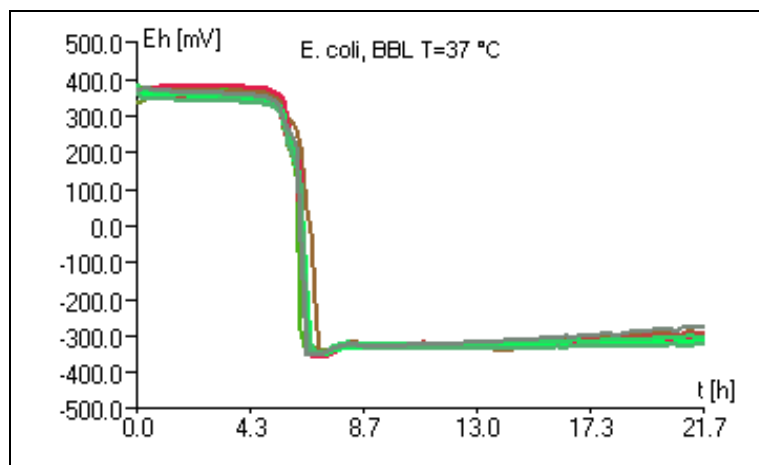
- **Reprodukálhatóság** a precizitás azon fajtája, amely reprodukálható körülmények között elvégzett kísérletekre vonatkozik (különböző laboratórium, azonos minta, azonos, vagy különböző módszer, különböző műszer, különböző kezelő, hosszabb időintervallum a párhuzamos mérések között).

Vizsgálólaboratóriumok módszereinek jellemzésére elsősorban a véletlen hibával kifejezett ismételhetőség megadása szükséges.

Reprodukálhatóság meghatározása laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatok alapján történik, erre jelenleg nincs lehetőség.

5.3.8.1. Ismételhetőségi értékek meghatározása laboratóriumi tiszta tenyészetekkel

Hagyományos tenyésztéses élősejtszám-meghatározási módszereknél párhuzamos vizsgálatok esetében a korrigált tapasztalati szórás (SD) értéke adja meg az ismételhetőséget. *E. coli* tisztatenyészetének redox-potenciál változását mértük BLE levesben, 37 °C-on. A mérést 10 párhuzamosban végeztük. A redox-görbék a 38. ábrán láthatók.



38. ábra. *E. coli* redox-görbéi BLE levesben (T=37 °C, n=10)

A műszer által mért TTD értékeket a 10. táblázat foglalja össze.

10. Táblázat. *E.coli* TTD értékei BLE levesben (T=37°C)

Elektróda sorszáma	TTD (h)
1.	5,67
2.	5,50
3.	5,67
4.	5,67
5.	5,67
6.	5,67
7.	5,67
8.	5,50
9.	5,67
10.	5,50
átlag	5,619
SD _{TTD}	0,08212

Műszeres mikrobaszám-meghatározási módszernél, mivel az eljárás kalibrációs görbéken alapul, az ismételhetőséget a lgN-TTD értékek regresszió analízisének maradék szórásnégyzetéből számítjuk.

Az ismételhetőségre jellemző szórás meghatározására két lehetőségünk van:

- A $TTD = -a \lg N + b$ kalibrációs görbe regresszió-analíziséből leszármaztatva.

Kalibrációs görbék egyenletének regresszió-analíziséből meghatározva σ_{TTD} értékét és ebből kiszámítva a $\lg N$ értékek maradék szórását ($\sigma_{\lg N}$)

$$\sigma_{\lg N} = \frac{\sigma_{TTD}}{a}$$

- A kalibrációs görbéhez meghatározott $\lg N$ – TTD érték párokból meghatározott $\lg N = f(TTD)$ összefüggés regresszió-analíziséből közvetlenül meghatározva.

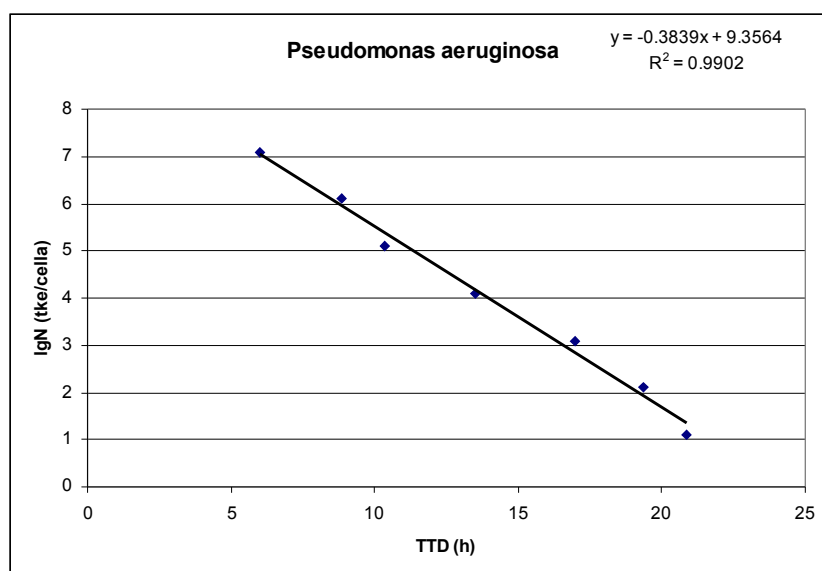
Amennyiben a kalibrációs görbék felvételénél minden sejtszámhoz csak egy TTD értéket mérünk, a két számítási eljárás teljesen azonos eredményt ad. Ebben az esetben a maradék szórás megegyezik a regresszió standard hibájával.

Számításaink során, kihasználva az alkalmazott program (Excel) által nyújtott lehetőségeket, a maradék szórások kiszámítására a $\lg N = f(TTD)$ regresszió-analízist használtuk fel. A számításmenetet *Pseudomonas aeruginosa* adatok kiértékelésén keresztül mutatom be. Az alapadatokat a 11. táblázatban foglaltam össze.

11. Táblázat. *Pseudomonas aeruginosa* kalibrációs görbe alapadatai.

$\lg N$ ($N = \text{tke/cella}$)	TTD (h)
7,1	6,00
6,1	8,83
5,1	10,33
4,1	13,50
3,1	17,00
2,1	19,33
1,1	20,85

A 11. táblázat adataiból megszerkesztett kalibrációs görbe a 39. ábrán látható.



39. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* sejtszámok a TTD függvényében.

A kalibrációs görbe regresszió-analízisét a 2. melléklet tartalmazza.

lgN értékek maradék szórásnégyzete: $S^2_{\lg N} = 0,0547$

lgN értékek maradék szórása $SD_{\lg N} = 0,234$

Az N értékek relatív szórása: $RSD_N = 10^{0,234} = 1,714 = 71 \%$

A redox-potenciál mérésen alapuló mérési módszer ismételhetőségének adatait a 12. táblázat foglalja össze.

12. Táblázat. Redox-potenciál mérésen alapuló módszer ismételhetősége tiszta tenyészetek vizsgálatánál

Mikroba	Tápleves	Ismételhetőség $SD_{\lg N}$	Relatív szórás $RSD_N (\%)$
<i>E. coli</i> szuszpenzió	BLE	0,0484	12
<i>E coli</i> membrán	BLE	0,2732	88
<i>Citrobacter freundii</i> aerob	BLE	0,3553	127
<i>Citrobacter freundii</i> anaerob	BLE	0,1195	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cetrimid	0,2338	71
<i>Enterococcus faecalis</i>	Azid	0,0786	8

A laboratóriumi körülmények között meghatározott ismételhetőségi értékek, illetve relatív szórások csak tájékoztató jellegűek, erősen függenek a törzsgyűjteményből származó mikrobák aktuális fiziológiai állapotától. ***A valós ismételhetőségi értékek csak üzemi mérések alapján határozhatók meg.***

5.3.8.2. Véletlen hiba meghatározása üzemi vizsgálatokkal

A MicroTester műszeres vizsgálatokat a FEJÉRVÍZ ZRT. Vízvizsgáló Laboratórium Szennyvízvizsgáló részlegénél végeztük. A vizsgált minták mikrobaszámát szabványos módszerekkel a FEJÉRVÍZ ZRT. Vízvizsgáló Laboratórium Ivóvízvizsgáló Részlegének Akkreditált Laboratóriuma határozta meg.

A vizsgálati módszerekre jellemző véletlen hiba meghatározása azonos minták vizsgálatával történt. A frissen behozott vízminták mikrobacsoportonkénti vizsgálatára a két laboratóriumi részlegben azonos napokon került sor. A kalibrációs görbéket a Szennyvíz-vizsgáló részlegben mért TTD értékek és az Ivóvízvizsgáló Laboratórium által meghatározott élősejtszámok felhasználásával szerkesztettük meg.

Tenyésztési módszerek véletlen hibájának meghatározása

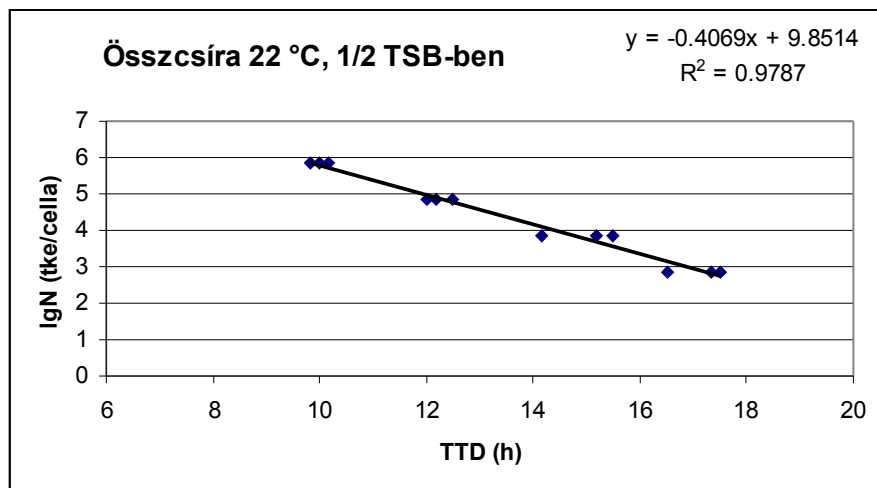
Az élősejtszámokat a módszerek által nyerhető telepszámok eloszlás-vizsgálata és relatív szórásának meghatározása érdekében a Laboratórium 50-50 párhuzamos vizsgálattal határozta meg. Az élősejtszám meghatározás membránszűréssel történt a minta előzetes hígítása után. Az eredményeket a 3. melléklet tartalmazza. A mintamennyiséget a fejlécben tüntettük fel.

Műszeres mérés véletlen hibájának meghatározása

A műszeres élősejtszám meghatározásokhoz a mintából különböző mennyiségeket membránon (0,45 µm) leszűrtünk 3-3 párhuzamosban, és a szűrőlapokat szelektív táplevest tartalmazó mérőcellákba helyezve felvettük a kalibrációs görbéket.

Összcsíraszám 22 °C kiértékelése

A mérés alapadatait a 4. melléklet tartalmazza, a kalibrációs görbe a 40. ábrán látható



40. ábra. 22 °C-os összcsíraszámok a TTD függvényében

A regresszió-analízis adatait a 4. melléklet foglalja össze

IgN értékek maradék szórása

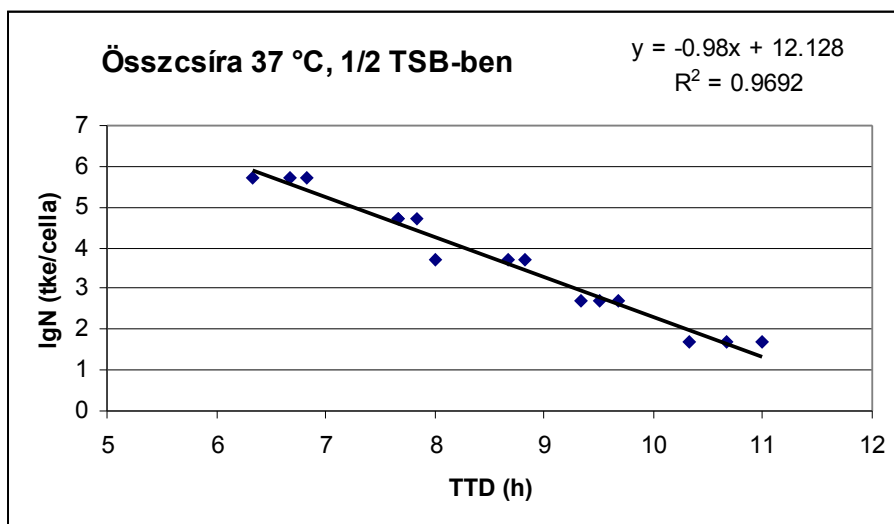
$$SD_{IgN} = 0,1788$$

Az N értékek relatív szórása:

$$RSD_N = 10^{0,1788} = 1,509 = 59 \%$$

Összcsíraszám 37 °C kiértékelése

A mérés alapadatait az 5. melléklet tartalmazza, a kalibrációs görbe a 41. ábrán látható.



41. ábra. 37 °C-os összcsíraszámok a TTD függvényében

A regresszió-analízis adatait az 5. melléklet foglalja össze.

IgN értékek maradék szórása

$$SD_{IgN} = 0,2667$$

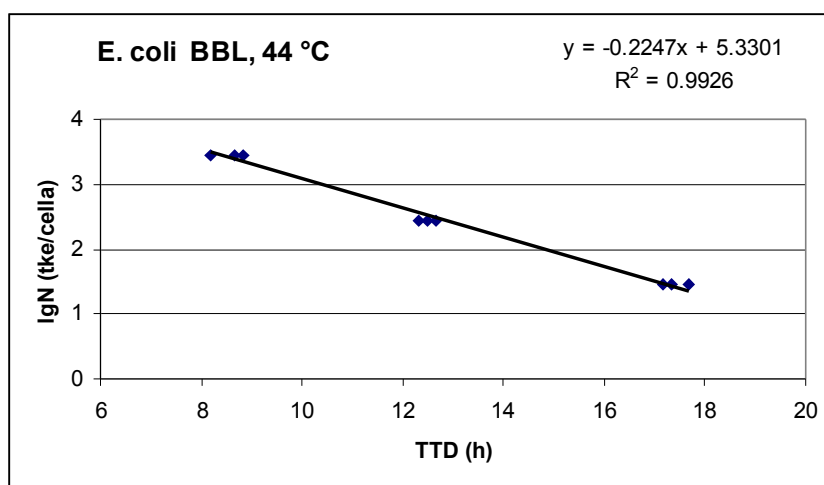
Az N értékek relatív szórása:

$$RSD_N = 10^{0,2667} = 1,848 = 85 \%$$

E. coli mérések kiértékelése

Műszeres méréssel meghatározva jellegzetes *E. coli* redox-görbéket kaptunk, amelyek a módszer szelektivitását egyértelműen bizonyították.

A mérés alapadatait a 6. melléklet tartalmazza a kalibrációs görbe a 42. ábrán látható



42. ábra. *E. coli* számok a TTD függvényében

A regresszió-analízis adatait a 6. melléklet foglalja össze

IgN értékek maradék szórása

$$SD_{IgN} = 0,0797$$

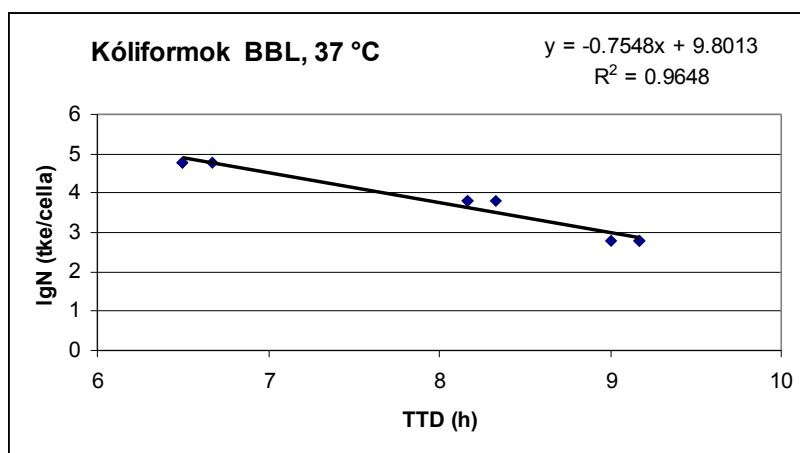
Az N értékek relatív szórása:

$$RSD_N = 10^{0,0797} = 1,201 = 20 \%$$

Kóliform mérések kiértékelése

Műszeres méréssel meghatározva jellegzetes kóliform redox-görbéket kaptunk, amelyek a módszer szelektivitását egyértelműen bizonyították.

A mérés alapadatait a 7. melléklet tartalmazza, a kalibrációs görbe a 43. ábrán látható



43. ábra. *Kóliform* számok a TTD függvényében

A regresszió-analízis adatait a 7. melléklet foglalja össze

IgN értékek maradék szórása

$$SD_{IgN} = 0,1736$$

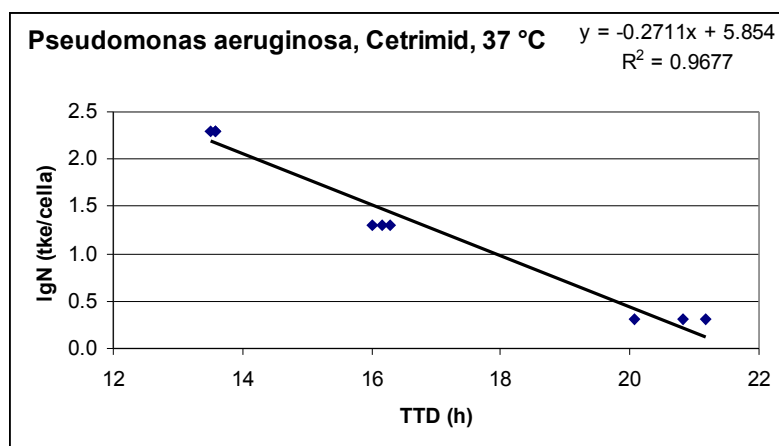
Az N értékek relatív szórása:

$$RSD_N = 10^{0,1736} = 1,491 = 49 \%$$

Pseudomonas aeruginosa mérések kiértékelése

Előzetes üzemi tapasztalatok alapján vegyes mikroflóra esetén a kiértékelést dupla erősségű ceftrimid leves alkalmazásával jelentősen gyorsítani lehet, ezért a műszeres méréseknél ezt alkalmaztuk. Eredményül jellegzetes *Pseudomonas* redox-görbéket kaptunk, amelyek a módszer szelektivitását egyértelműen bizonyították. A mérés alapadatait a 8. melléklet tartalmazza

A kalibrációs görbe a 44. ábrán látható.



44. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* számok a TTD függvényében

A regresszió-analízis adatait a 8. melléklet foglalja össze.

IgN értékek maradék szórása

$$SD_{IgN} = 0,1663$$

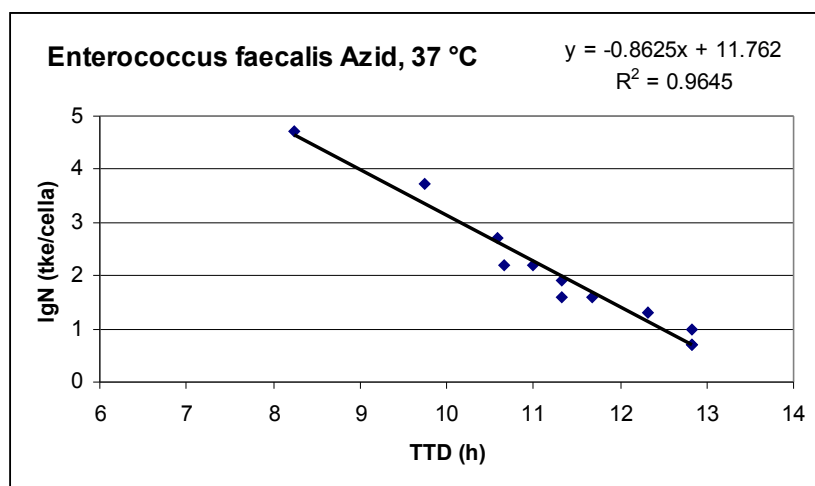
Az N értékek relatív szórása:

$$RSD_N = 10^{0,1663} = 1,466 = 47 \%$$

Enterococcus faecalis mérések kiértékelése

Enterococcus meghatározáshoz a csókakői kútvízből nem sikerült kalibrációs görbét készíteni, ezért erre vonatkozóan a véletlen hibát tiszta tenyészetek független méréseinek egyesítése révén becsültük (intermediate ismételhetőség).

A mérés alapadatait a 9. melléklet tartalmazza, a kalibrációs görbe a 45. ábrán látható



45. ábra. *Enterococcus* számok a TTD függvényében.

A regresszió-analízis adatait a 9. melléklet foglalja össze.

IgN értékek maradék szórása

$$SD_{IgN} = 0,2390$$

Az N értékek relatív szórása:

$$RSD_N = 10^{0,2390} = 1,734 = 73 \%$$

A Műszeres és tenyésztési eljárások véletlen hibájának összehasonlítása.

Az ismételhetőség becslésére szolgáló véletlen hibák értékét a 13. táblázatban foglaltuk össze.

A táblázatban a relatív szórások mellett azok matematikai statisztikai kiértékelése érdekében kiszámítottuk a tenyésztési eljárások RSD_N értékéből az SD_{IgN} értékeket: $SD_{IgN} = \lg RSD_N$.

Az SD_{lgN} értékek már függetlenek a sejtszámtól, így velük a különbségek szignifikanciáját vizsgáló párosított t-próba elvégezhető. A mérésekből az *Enterococcus* adatokat kihagytuk, mert a vizsgált mintákból kalibrációs görbét nem sikerült szerkeszteni.

13. Táblázat. Műszeres és tenyésztési elősejtszám véletlen hibáinak összefoglalása.

Szennyvíztelepi mérések.

Mikrobacsoport	Műszeres mérés			Tenyésztés		
	SD_{lgN}	RSD_N	CV %	SD_{lgN}	RSD_N	CV %
Összcsíra 22 °C	0,201	1,59	59	0,041	1,10	10
Összcsíra 37 °C	0,267	1,85	85	0,072	1,18	18
<i>E. coli</i>	0,079	1,20	20	0,149	1,41	41
Kóliform	0,173	1,49	49	0,037	1,09	9
<i>Pseudomonas</i>	0,167	1,47	47	0,176	1,50	50

Az SD_{lgN} értékek párosított t-próbája a 14. táblázatban látható.

14. Táblázat. SD_{lgN} értékek párosított t-próbája

	<i>Műszer</i>	<i>Tenyésztés</i>
Várható érték	0,1774	0,0950
Variancia	0,00460	0,004072
Megfigyelések	5	5
Pearson-féle korreláció	-0,5336	
Feltételezett átlagos eltérés	0	
df	4	
t érték	1,598	
P(T<=t) egyszélű	0,0926	
t kritikus egyszélű	2,131	
P(T<=t) kétszélű	0,1852	
t kritikus kétszélű	2,776	

A két módszer közötti átlagos különbség: $SD_{lgN}(\text{műszer}) - SD_{lgN}(\text{tenyésztés}) = 0,0824$.

Ez azt jelenti, hogy a műszeres mérések véletlenhibája átlagosan $10^{0,0824} = 1,21$ -szer, azaz kb. 21 %-kal nagyobb, mint a tenyésztési eljárások esetében. A különbség azonban a 13. táblázatban összefoglalt statisztikai próba szerint nem szignifikáns.

Az üzemi körülmények közötti vizsgálatok 14. táblázatban összefoglalt eredményeinek értékelése alapján levonható következtetés: *A műszeres elősejtszám meghatározás véletlen hibája nem különbözik szignifikánsan a tenyésztési módszerek véletlen hibájától.*

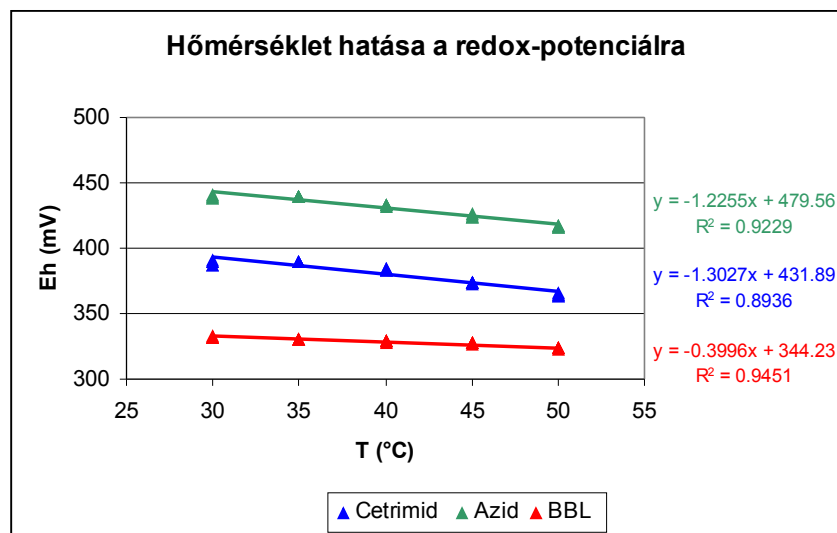
5.3.9. Zavartűrés

Egy analitikai eljárás zavartűrése a környezeti tényezők zavaró hatásával szembeni „ellenálló-képesség” mértéke. A redox-potenciál mérésen alapuló mikrobaszám meghatározási módszer legfontosabb környezeti paramétere a hőmérséklet, amely kettős hatást fejt ki:

- A mikroorganizmusok szaporodási sebessége erősen függ a hőmérséklettől.
- A mért redox-potenciál a Nernst-egyenletnek megfelelően függ a hőmérséklettől.

A méréseket a vizsgált mikroba vagy mikrobacsoport szaporodási optimumán végezve a szaporodási sebesség $\pm 0,5$ °C-os intervallumban nem változik. (Szuboptimális hőmérséklet-tartományban a szaporodási sebesség természetesen erősen hőmérséklet-függő.)

A hőmérséklet hatását a mérőrendszerben alkalmazott táplevesek redox potenciáljára kísérletileg határoztuk meg. Az eredmények a 46. ábrán láthatók.



46. ábra. A hőmérséklet hatása a tápközegek redox-potenciáljára.

A 46. ábrán feltüntetett egyenletekből leolvasható hőmérséklet-függés értékeit a 15. táblázat foglalja össze.

15. Táblázat. A hőmérséklet hatása a közeg redox-potenciáljára.

Közeg	Hőmérséklet (°C)	$\Delta E / \Delta T$ (mV/°C)
Cetrimid leves	28 -45	-1.30
Azid leves	28 -45	-1.23
BLE leves	28 -45	-0,40

Mivel a detektációs kritérium általában 10 perces mérésközök esetén -10 mV/10 perc, a termosztálás $\pm 0,5$ °C-os hőingadozásának hatása elhanyagolható.

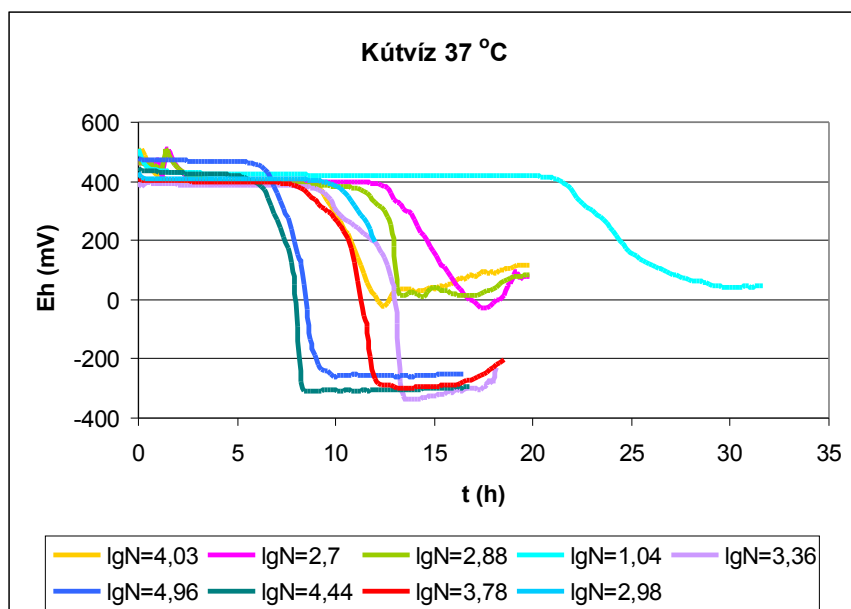
5.4. Ivóvíz vizsgálatok

5.4.1. Összcsíraszám meghatározása

A méréseket Székesfehérváron végeztük a Fejérvíz Zrt. Vízvizsgáló Laboratóriuma által rendelkezésünkre bocsátott - a városi ivóvíz kutakból származó – ivóvízzel. A vízből az utolsó klórozás előtt vettünk mintát.

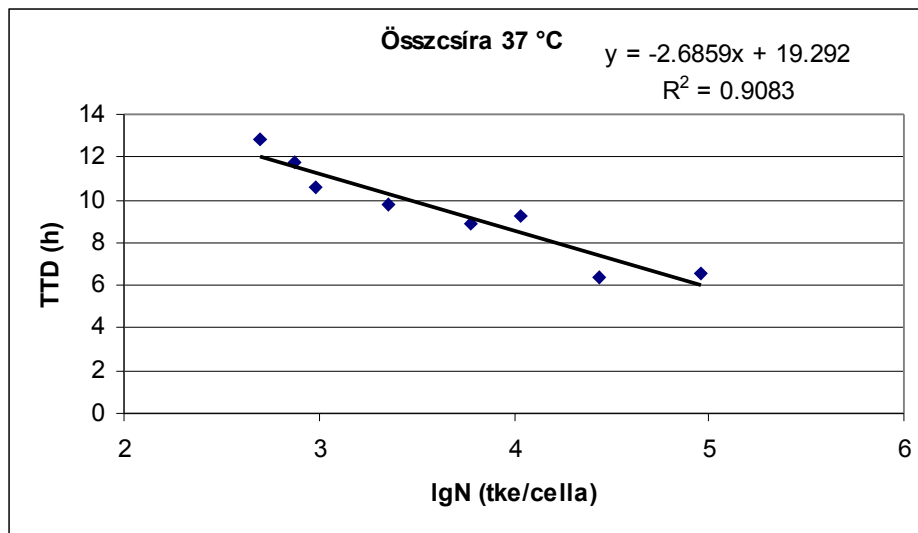
A mikrobaszám szabványos meghatározását a Fejérvíz Zrt. Vízvizsgáló Laboratóriumának munkatársai végezték. A redox-potenciál mérést MicroTester berendezéssel végeztük a Fejérvíz Zrt. Vízvizsgáló Laboratórium Szennyvízvizsgáló részlegénél.

Különböző kutakból, különböző időpontokban mintákat vettünk és mértük a minták redox-potenciál változását. A 37 °C-on 1/2 TSB táplevesben végzett vizsgálatok eredményei (9 minta) a 47. ábrán láthatók.



47. ábra. Kútvíz összcsíra 37 °C

A különböző időpontokban, különböző kutakból származó vízminták eredményei alapján kalibrációs görbét szerkesztettem, amely a 48. ábrán látható.



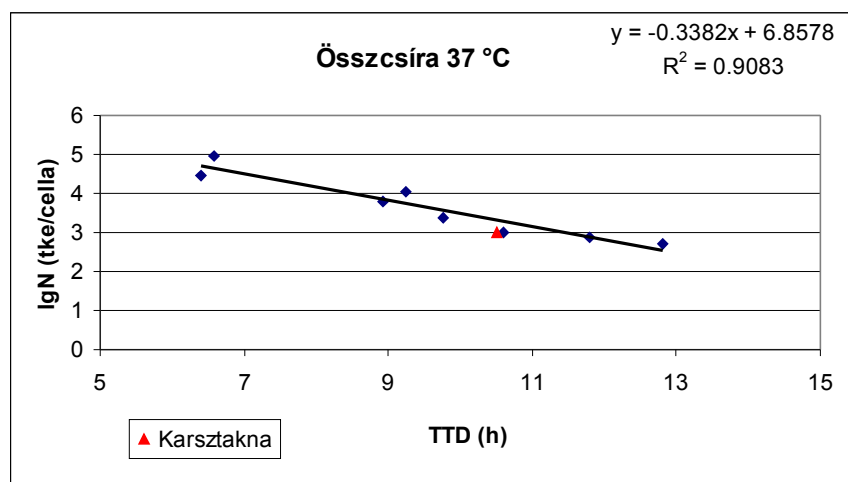
48. ábra. Kútvíz összcsíraszám meghatározásának kalibrációs görbéje

A kalibrációs görbe egyenlete: $TTD(h) = 19,29 - 2,686 \cdot \lg N(tke/cella)$

Egyetlen sejt kimutatásához szükséges idő ($\lg N=0$): 20 h

A műszer a TTD mért értékeiből határozza meg a mikrobaszámot, ezért a továbbiakban kalibrációs görbeként a $\lg N=f(TTD)$ összefüggést használom.

Különböző helyekről származó vízminták előzetesen felvett kalibrációs görbék alapján történő sejtszám-meghatározásához a műszeres méréseket és a tenyésztési élősejtszám-meghatározásokat a FEJÉRVÍZ ZRT. Vízvizsgáló Laboratórium Szennyvízvizsgáló részlegénél végeztük. Az eredményeket grafikusan szemléltetem (49-53. ábrák) Az ábrákon a kalibrációs görbe mellett pirossal jelölve tüntettem fel a vízmintának megfelelő pontot, amelyhez a TTD értéket műszeresen mértük, az élősejtszámot pedig tenyésztéssel is meghatároztuk. A pirossal jelölt minta eredmények a kalibrációs görbék egyenesének meghatározásában nem szerepelnek. A mérési eredményeket a 16-19. és 21. táblázatok tartalmazzák.



49. ábra. Összcsíraszám 37 °C meghatározása.

Kalibrációs görbe: Székesfehérvár környéki kutak vízmintáinak egyesített adataiból felvéve.

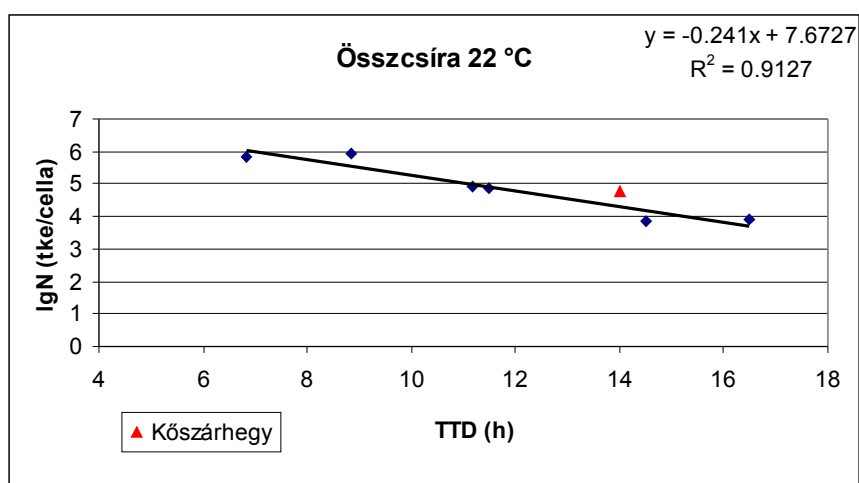
Ellenőrző minta: Karsztakna vízmintája.

Tenyésztéssel meghatározott mikrobaszám: 10 tke/ml.

16. Táblázat. Összcsíra 37°C mérés eredménye

Leszűrt minta (ml)	Műszeres mérés eredményei			MicroTester tke/ml minta	Tenyésztés tke/ml minta
	TTD (h)	IgN/cella	tke/cella		
100	10,50	3,307	$2,03 \cdot 10^3$	20	10

Az 50. ábrán a 22 °C-os összcsíraszám mérési eredményi láthatók.



50. ábra. Összcsíraszám 22 °C meghatározása.

Kalibrációs görbe: Székesfehérvár környéki kutak vízmintáinak egyesített adataiból felvéve.

Ellenőrző minta: Kőszárhegyi ásott kút vízmintája.

Tenyésztéssel meghatározott mikrobaszám: 61 tke/ml.

17. Táblázat. Kútvíz minta összcsíra 22°C műszerrel és tenyésztéssel végzett mérés eredménye

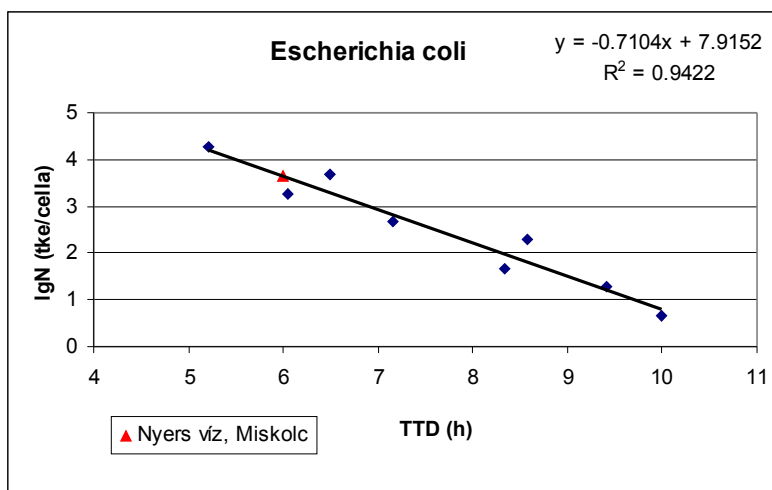
Leszűrt minta (ml)	Műszeres mérés eredményei			MicroTester tke/ml minta	Tenyésztés tke/ml minta
	TTD (h)	IgN/cella	tke/cella		
1000	14	4,299	$1,99 \cdot 10^4$	20	61

5.4.2. Kóliformok és *Escherichia coli* számának meghatározása

Escherichia coli számának meghatározása

A kalibrációs görbét laboratóriumi mérések egyesített adataiból vettem fel.

A miskolci nyersvíz műszeres mérését a Miskolci Vízmű Kft. Akkreditált Vizsgálólaboratóriumában végeztük. A vízminta *E. coli* számának szabványos módszerrel történő meghatározását a Laboratórium munkatársai végezték.



51. ábra. *E. coli* számának meghatározása (T = 44 °C)

Kalibrációs görbe: Laboratóriumi tenyészetek egyesített adataiból felvéve.

Ellenőrző minta: Miskolci nyersvíz.

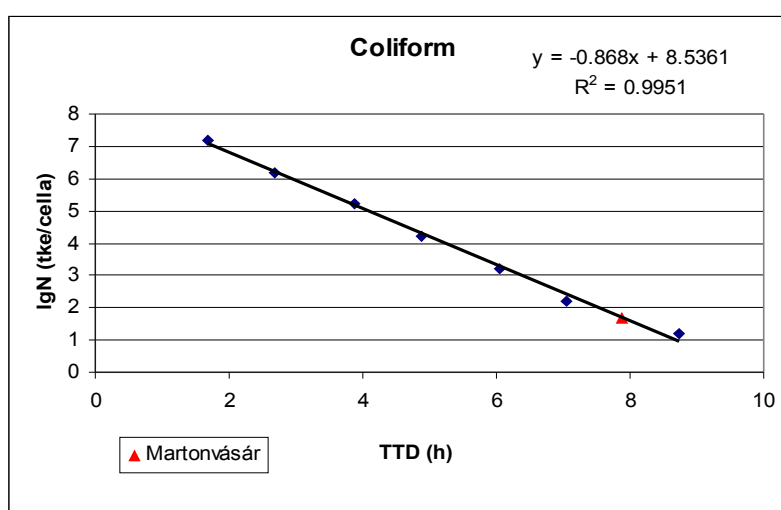
Tenyésztéssel meghatározott mikrobaszám: 45 tke/100 ml.

18. Táblázat. *E. coli* mérés eredménye.

Leszűrt minta (ml)	Műszeres mérés eredményei			MicroTester tke/100 ml minta	Tenyésztés tke/100 ml minta
	TTD (h)	lgN/cella	tke/cella		
10.000	6,0	3,653	$4,49 \cdot 10^3$	45	45

Kóliformok számának meghatározása

Kalibrációs görbe felvételéhez kútvízből izolált vegyes Kóliform tenyészetet használtunk. A kalibrációs görbe a 52. ábrán látható.



52. ábra. Kóliformok számának meghatározása ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Kalibrációs görbe: Kútvízből izolált vegyes mikroflóra adataiból felvéve.

Ellenőrző minta: Martonvásári kútvíz.

Tenyésztéssel meghatározott mikrobaszám: 49 tke/100 ml.

19. Táblázat. Kóliform mérés eredménye.

Leszűrt minta (ml)	Műszeres mérés eredményei			MicroTester tke/ml minta	Tenyésztés tke/ml minta
	TTD (h)	lgN/cella	tke/cella		
100	7,89	1,688	$4,88 \cdot 10^1$	49	49

Az ivóvíz általában akkor szennyeződik kóliform mikroorganizmusokkal, ha kommunális szennyvíz szivárog bele (csőrepedés, stb.). Megvizsgáltuk, hogy redox-potenciál mérés segítségével milyen mennyiségű szennyvizet lehet kimutatni a csapvízből és mennyi idő alatt.

Nyers, kommunális szennyvizet kevertünk különböző mennyiségben a csapvízhez, amelyből a klórt nem távolítottuk el, így modellezve azt az esetet, ha a hálózati ivóvízbe szennyeződés

kerül. A szennyvízben eredetileg jelenlévő kóliform mikroorganizmusok számát szabványos módszerrel határoztuk meg, a csapvízzel kevert szennyvizét MicroTesterrel. A szennyvíz a Fehérvári szennyvíztisztító telep nyers szennyvize volt.

Az értékeket a 20. táblázatban foglaltam össze.

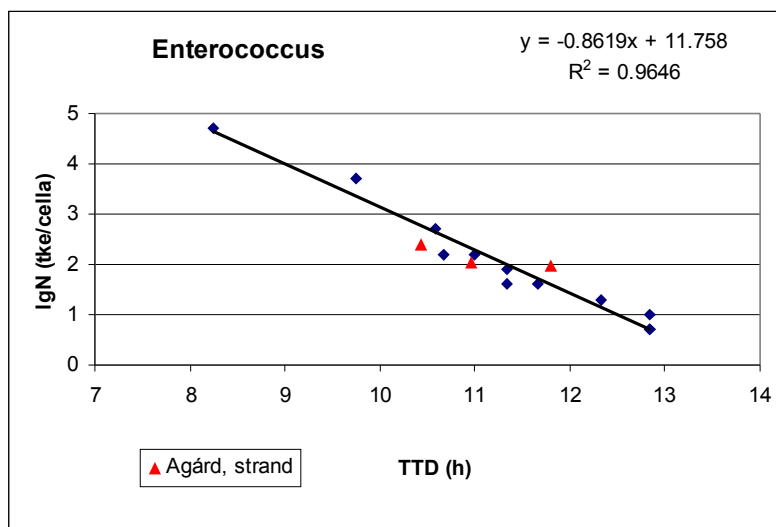
20. Táblázat. Kóliform mikroorganizmusok kimutatása szennyvízzel kevert csapvízből.

szennyvíz (ml) 1000 ml csapvízben	N (tke/ml szennyezett csapvíz)	lgN	TTD (h)
0,01	$2,44 \cdot 10^0$	0,39	8,91
0,10	$2,44 \cdot 10^1$	1,39	8,40
0,50	$1,22 \cdot 10^2$	2,09	7,92
1,00	$2,44 \cdot 10^2$	2,39	7,23
10,00	$2,44 \cdot 10^3$	3,39	6,07
50,00	$1,22 \cdot 10^4$	4,09	5,75
100,00	$2,44 \cdot 10^4$	4,39	5,39

Az eredményekből megállapítható hogy 1 m³ csapvízbe 10 ml szennyvízzel bevitt Kóliform mikroba (1/100 000 arányú szennyvizes fertőzés) kb. 9 óra alatt kimutatható.

5.4.3. *Enterococcus*ok számának meghatározása

Enterococcus faecalis kalibrációs görbét laboratóriumi törzsek egyesített adataiból vettem fel.



53. ábra. *Enterococcus*ok számának meghatározása (T = 37 °C)

Kalibrációs görbe: Laboratóriumi törzsek egyesített adataiból felvéve.

Ellenőrző minta: Agárdi strand vízmintája három párhuzamos mérésben.

Tenyésztéssel meghatározott 3 párhuzamos mikrobaszám: 9, 25, 11 tke/ml.

21. Táblázat. Enterococcus mérés eredménye.

Leszűrt minta (ml)	Műszeres mérés eredményei			MicroTester tke/ml minta	Tenyésztés tke/ml minta
	TTD (h)	lgN/cella	tke/cella		
10	11,79	1,596	$3,95 \cdot 10^1$	4	9
10	10,43	2,768	$5,87 \cdot 10^2$	59	25
10	10,96	2,312	$2,05 \cdot 10^2$	20	11

Hasonlóan a kóliformokhoz az ivóvíz általában akkor szennyeződik Enterococcusokkal, ha kommunális szennyvíz szivárog bele (csőrepedés, stb.). Megvizsgáltuk, hogy redox-potenciál mérés segítségével milyen mennyiségű szennyvizet lehet kimutatni a csapvízből és mennyi idő alatt.

Nyers, kommunális szennyvizet kevertünk különböző mennyiségben a csapvízhez, amelyből a klórt nem távolítottuk el, így modellezve azt az esetet, ha a hálózati ivóvízbe szennyeződés kerül. A szennyvízben jelenlévő Enterococcusok számát szabványos módszerrel határoztuk meg. A szennyvíz a Fehérvári szennyvíztisztító telep nyers szennyvize volt.

Az értékeket a 22. táblázatban foglaltam össze.

22. Táblázat. Enterococcusok kimutatása szennyvízzel kevert csapvízből.

szennyvíz (ml) 1000 ml csapvízben	N (tke/ml csapvíz)	lgN	TTD (h)
0,1	$3,60 \cdot 10^0$	0,56	15,17
0,5	$1,80 \cdot 10^1$	1,26	13,66
5,0	$1,80 \cdot 10^2$	2,26	11,65
10,0	$3,60 \cdot 10^2$	2,56	10,96
50,0	$1,80 \cdot 10^3$	3,26	10,46

Az eredményekből megállapítható hogy 1 m³ csapvízbe 100 ml szennyvízzel bevitt Enterococcus (1/10 000 arányú szennyvizes fertőzés) kb. 15 óra alatt kimutatható.

A műszeresen és tenyésztéssel meghatározott eredmények összehasonlítása

A hagyományos tenyésztéses és műszeres mérés eredményeit a 23. táblázatban foglaltam össze.

23. Táblázat. Üzemi mérések klasszikus és műszeres eredményeinek összefoglalása.

<i>Mikrobacsoport</i>	<i>Tenyésztés</i>			<i>Műszeres mérés</i>		
	Időigény óra	N tke/100ml	lgN	Időigény óra	N tke/100ml	lgN
<i>Összcsíra 22 °C</i>	72	$2,0 \cdot 10^3$	3,30	15	$6,1 \cdot 10^3$	3,79
<i>Összcsíra 37 °C</i>	72	$2,0 \cdot 10^3$	3,30	11	$1,0 \cdot 10^3$	3,00
<i>E. coli</i>	24	$4,5 \cdot 10^1$	1,65	7	$4,5 \cdot 10^1$	1,65
<i>Kóliform</i>	24	$4,9 \cdot 10^1$	1,69	9	$4,9 \cdot 10^1$	1,69
<i>Enterococcus 1</i>	48	$4,0 \cdot 10^2$	2,60	12	$9,0 \cdot 10^2$	2,95
<i>Enterococcus 2.</i>	48	$5,9 \cdot 10^3$	3,77	11	$2,5 \cdot 10^3$	3,40
<i>Enterococcus 3.</i>	48	$2,0 \cdot 10^3$	3,30	12	$1,1 \cdot 10^3$	3,04

A két módszerrel meghatározott sejtszámok közötti különbség szignifikanciáját a mikrobaszám logaritmusok párosított t-próbájával vizsgáljuk amelyet a 24. táblázat tartalmaz.

24. Táblázat. Sejtszám logaritmus értékek párosított t-próbája

	<i>Műszer</i>	<i>Tenyésztés</i>
Várható érték	2,8027	2,7887
Variancia	0,7138	0,6661
Megfigyelések	7	7
Pearson-féle korreláció	0,9215	
Feltételezett átlagos eltérés	0,0000	
Df	6	
t érték	0,1122	
P(T<=t) egyszélű	0,4572	
t kritikus egyszélű	1,9432	
P(T<=t) kétszélű	0,9143	
t kritikus kétszélű	2,4469	

A két módszer közötti átlagos különbség: $\lg N(\text{műszer}) - \lg N(\text{tenyésztés}) = 0,014$. Ez azt jelenti, hogy a műszeres mérések átlagosan $10^{0,014} = 1,03$ -szor, azaz kb 3%-kal nagyobb sejtszámot adnak, mint a

tenyésztési módszerek. Ez **a különbség azonban** a 24. táblázatban összefoglalt **statisztikai próba szerint nem szignifikáns**.

5.5. Ásványvíz vizsgálatok

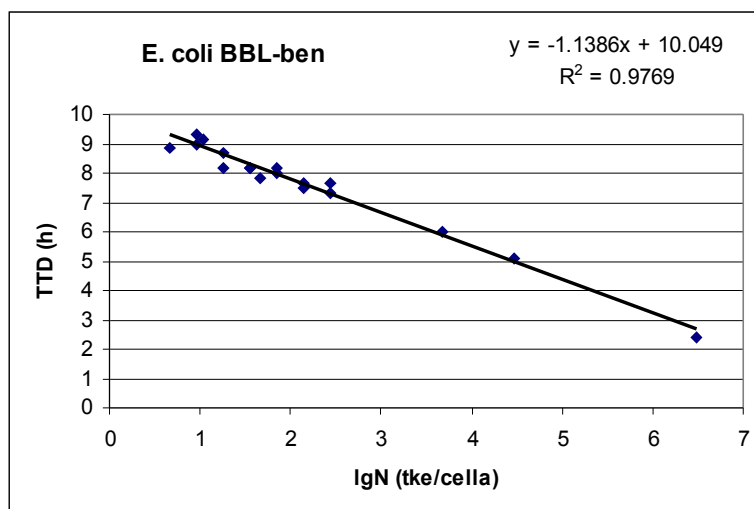
Az ásványvíz vizsgálatokat a Coca Cola Beverages üzemi laboratóriumaiban végeztük részben Tylicz-ben (Lengyelország), részben Zalaszentgróton. A munka elsődleges célja Kóliformok, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Enterococcus faecalis* gyors kimutatása volt. Valamennyi vizsgált mikroba null-toleráns (250 ml vizsgálati mintában nem lehet jelen).

Null-toleráns mikrobák műszeres mérésének alapvető problémája annak meghatározása, hogy mennyi ideig kell mérnünk ahhoz, hogy egyetlen élő mikroba sejtet ki tudjunk mutatni. Ezért először meghatároztuk az egy mikrobasejt kimutatásához szükséges vizsgálati időt.

A vizsgálati idő meghatározása a $TTD=f(\lg N)$ formában felvett kalibrációs görbékből történt.

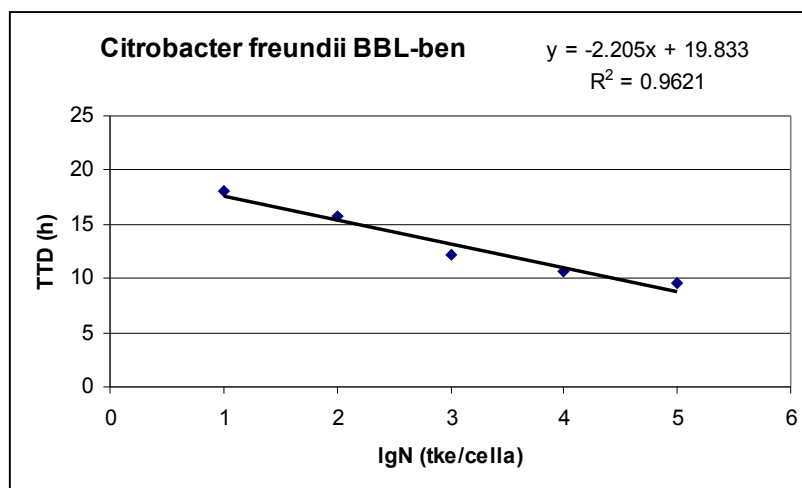
5.5.1. Kóliform és *E. coli* minimálisan szükséges mérési idejének meghatározása

A vizsgálatokat az 54. és 55. ábrán bemutatott kalibrációs görbékkel végeztük. A görbék felvételéhez laboratóriumi törzsek tisztatenyészeit használtuk.



54. ábra. *E. coli* kalibrációs görbéje ($T = 44\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Az egyenes egyenletéből megállapítható az $N=1$ tke/cella ($\lg N=0$) kimutatásához szükséges idő: $t_{\lg N=0} = 10$ h. Az adatok regresszió analízisével meghatároztam a tengelymetszet 99 %-os konfidencia intervallumát amely 9,72 -10,38 h. **Maximális vizsgálati idő: 11 h.**

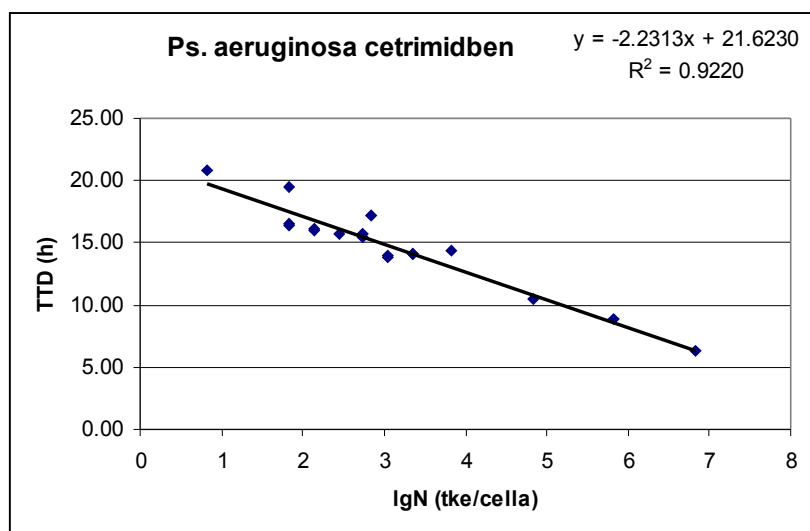


55. ábra. *Citrobacter freundii* kalibrációs görbéje ($T=37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Kóliform vizsgálatok kalibrációs görbéjeként azért választottam a *Citrobacter freundii*-t, mert ásványvíz mintából származó vegyes kóliform tenyészet nem állt rendelkezésünkre és előzetes vizsgálataink alapján a kóliform mikrobák tisztatenyészetek közül a *Citrobacter freundii* szaporodott a leglassabban, illetve ennek a mikrobának az 1 tke/cella kimutatásához szükséges vizsgálati ideje volt a leghosszabb $t_{\lg N=0} = 19,8$ h. A tengelymetszet 99%-os konfidencia intervalluma: 17,16 - 22,50 h. **Maximális vizsgálati idő: 23 h.**

5.5.2. *Pseudomonas aeruginosa* minimálisan szükséges mérési idejének meghatározása

A kalibrációs görbét laboratóriumi tisztatenysézzel vettük fel, amely a 56. ábrán látható.

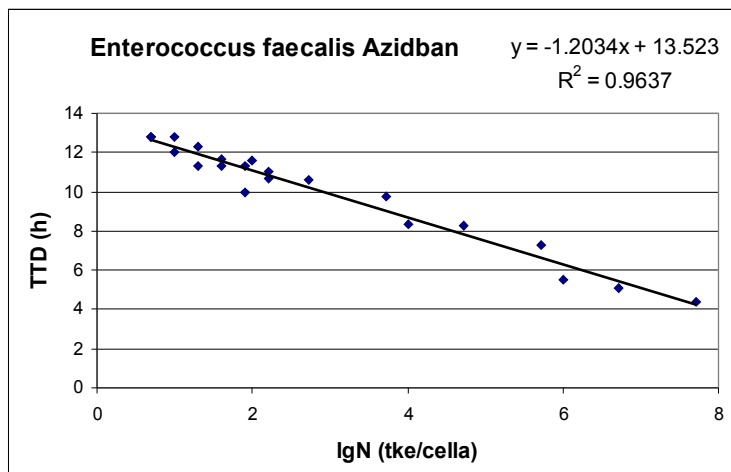


56. ábra. *Pseudomonas aeruginosa* kalibrációs görbéje ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Az egyenes egyenletéből megállapítható az $N=1$ tke/cella ($\lg N=0$) kimutatásához szükséges idő: $t_{\lg N=0} = 21,62$ h. A tengelymetszet 99%-os konfidencia intervalluma: 20,45 – 22,79 h. **Maximális vizsgálati idő: 23 h.**

5.5.3. *Enterococcus faecalis* minimálisan szükséges mérési idejének meghatározása

A 57. ábrán bemutatott kalibrációs görbét laboratóriumi tisztatenyésztéssel vettük fel.



57. ábra. *Enterococcus faecalis* kalibrációs görbéje (T = 37 °C)

Az egyenes egyenletéből megállapítható az N=1 tke/cella (lgN=0) kimutatásához szükséges idő:

$t_{lgN0} = 13,5$ h. A tengelymetszet 99%-os konfidencia intervalluma: 12,98 - 14,07 h. **Maximális vizsgálati idő: 15 h.**

5.5.4. Üzemi ellenőrző vizsgálatok

Az üzemi ellenőrző vizsgálatok első részét a Coca Cola tyliczi ásványvíz üzemének mikrobiológiai laboratóriumában végeztük.

Először 72 db palackozott ásványvíz mintát vizsgáltunk hagyományos módszerrel és műszeres méréssel. A hagyományos módszerrel végzett méréseket a laboratórium dolgozói végezték a következő módon:

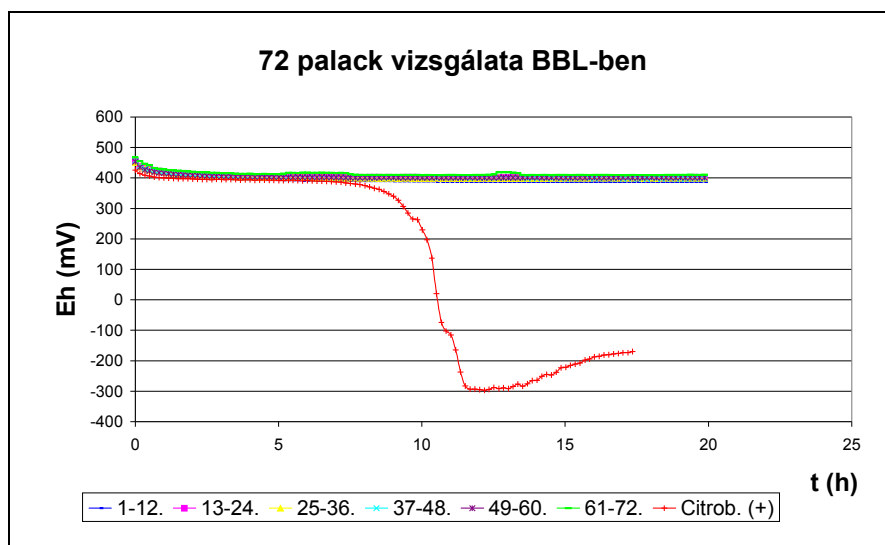
3 x 250 ml ásványvizet szűrtek le egy membránszűrőn (45 μ m). A tenyésztést Tergitol agaron végezték 37 °C-on 48 óráig. Egy Petri-csészén 3 palack ásványvizet vizsgáltak.

A műszeres mérés a következő módon történt:

3 x 250 ml ásványvizet szűrtünk le egy membránszűrőn (45 μ m). Egy mérőcellába 4 membránt helyeztünk el. A mérést BLE levesben 37 °C-on végeztük. Egy mérőcellában 12 palack ásványvizet vizsgáltunk.

Pozitív kontrollként 1 ml *Citrobacter freundii* szuszpenziót használtunk (lgN = 3.66).

Az eredményeket az 58. ábrán mutatom be.



58. ábra. 72 palackos üzemi mérés eredményei ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$)
A piros vonal a pozitív kontrollként alkalmazott *Citrobacter freundii* redox-görbéje.

A laboratóriumi és a műszeres mérés eredményeit a 24. táblázatban foglaltam össze.

24. Táblázat. 72 palackos mérés eredményeinek összefoglalása.

Palackok sorszáma	1 – 12.	13 – 24.	25 – 36.	37 – 48.	49 – 60.	61 – 72.
Laboratóriumi mérés eredménye	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív
Műszeres mérés eredménye	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív

Valamennyi vizsgált minta negatív volt. A műszeres mérés nem eredményezett fals pozitív eredményt.

Ezután 66 db palackozott ásványvíz mintát vizsgáltunk hagyományos módszerrel és műszeres méréssel. Laboratóriumi mérés:

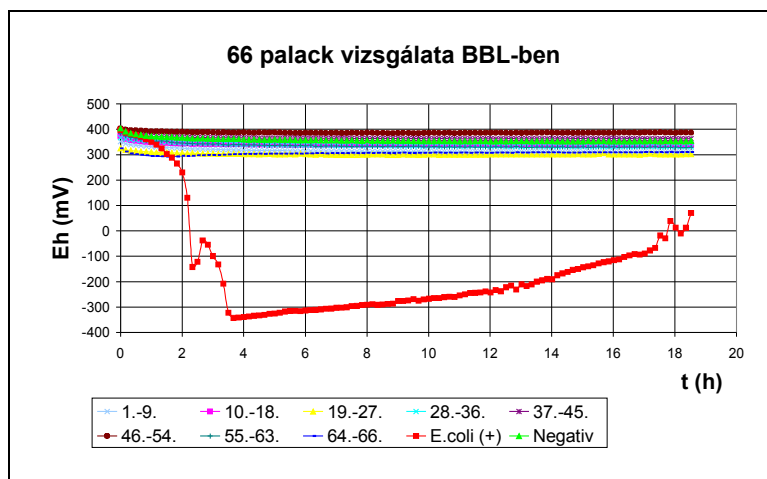
3 x 250 ml ásványvizet szűrtek le egy membránszűrőn ($45\text{ }\mu\text{m}$). A tenyésztést Tergitol agaron végezték $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 48 óráig. Egy Petri-csészén 3 palack ásványvizet vizsgáltak.

A műszeres mérés a következő módon történt:

3 x 250 ml ásványvizet szűrtünk le egy membránszűrőn (45 µm). Egy mérőcellába 3 membránt helyeztünk el. A mérést BLE levesben 37 °C-on végeztük. Egy mérőcellában 9 palack ásványvizet vizsgáltunk.

Pozitív kontrollként 1 ml *Escherichia coli* szuszpenziót használtunk (lgN = 6.66).

Az eredmények az 59. ábrán láthatók.



59. ábra. 66 palackos üzemi mérés eredményei (T = 37 °C)

A laboratóriumi és a műszeres mérés eredményeit a 25. táblázatban foglaltam össze.

25. Táblázat. 66 palackos mérés eredményeinek összefoglalása.

Palackok sorszáma	1 – 9.	10 – 18.	19 – 27.	28 – 36.	46 – 54.	55 – 63.	64 – 66.
Laboratóriumi mérés eredménye	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív
Műszeres mérés eredménye	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív	negatív

Valamennyi vizsgált minta negatív volt. A műszeres mérés nem eredményezett fals pozitív eredményt.

A további üzemi ellenőrző vizsgálatokat a Coca-Cola zalaszentgróti ásványvíz üzeme mikrobiológiai laboratóriumának munkatársai végezték és bocsátották rendelkezésemre.

Az üzemben egy éven keresztül mérték a Kóliformok, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, és Enterococcusok számát egyidejűleg szabványos módszerekkel és MicroTester berendezéssel, úgy hogy 500 ml-es ásványvizes palackok tartalmának egyik felét szabványos módszerekkel, másik felét redox-potenciál méréssel vizsgálták. Az eredményeket a 26. táblázat foglalja össze.

26. Táblázat. Üzemi vizsgálatok eredményei (Hoffmanné és Tar-Géri, 2008).

Vizsgált mikroba	Összes mérés (db)	Egyező eredmény a szabványos és redox vizsgálatok között (%)	Fals pozitív eredmény (%)	Fals negatív eredmény (%)
<i>Escherichia coli</i>	942	99,89	0,11	0,00
<i>Kóliform</i>	4674	99,87	0,00	0,13
<i>Enterococcus</i>	3000	99,93	0,00	0,07
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3372	99,82	0,06	0,12

8. KÖVETKEZTETÉSEK

A redox-potenciál mérésre alapozott mérési eljárás és kialakított berendezés nagyon hatékony eszköznek bizonyult a mikroorganizmusok számának gyors meghatározására. Vizsgálati eredményeim alapján az alábbi következtetéseket vontam le.

- Baktériumok szaporodása során a tápközeg redox-potenciálja minden esetben, függetlenül a baktérium légzési típusától (aerob, fakultatív anaerob, aerotoleráns anaerob, obligát anaerob) csökken. A redox-potenciál csökkenése a MicroTester berendezéssel jól követhető.
- A redox-görbe alakja jellemző az egyes mikrobacsoportokra, a görbe alakját az alkalmazott táptalaj, a mérőcella mérete, vagy formája, a mikroorganizmus hordozóra rögzítése (membránszűrő lap) lényegesen nem befolyásolja.
- A módszer szelektivitása a felhasznált táptalajok szelektivitásától függ, különös előnyt jelent, hogy a redox-görbe alakja segítséget nyújt a mikroba-csoport azonosításához.
- Minden mikrobára meghatározható egy detektációs kritérium. A detektációs kritérium mikroba-csoportonként jellemző érték.
- A detektációs idő szoros lineáris kapcsolatban van a kezdeti mikrobaszám logaritmusával, így minden mikrobára felvehető a kalibrációs görbe ($\lg N - TTD$ összefüggés), amelynek alapján a cellában lévő mikroorganizmusok kezdeti száma a TTD értékből kiszámítható.
- Mivel a mikrobaszám meghatározási ideje a kezdeti sejtszámtól függ, nagy mikrobiális szennyezés (pl. az ivóvíz szennyvízzel való keveredése esetén) rendkívül gyorsan (néhány óra alatt) kimutatható. A mérési idő membránszűrés alkalmazásával lényegesen rövidíthető. A módszer különösen alkalmas az ivóvíz hirtelen szennyeződésének (havária) gyors detektálására.
- A eljárás víz mikrobiológiai vizsgálatára történt sikeres validálása valószínűsíti annak lehetőségét, hogy módszert más élelmiszerek (pl. nyerstej) vizsgálatára is alkalmazhatjuk.
- Null-toleráns mikrobák vizsgálatakor meghatározható az egyetlen sejt kimutatásához szükséges idő, amely a hagyományos eljárások 48 órájával szemben csupán 12-24 óra. A szennyező mikroorganizmusok gyors kimutatására a berendezés üzemi alkalmazása során – nagyszámú minta vizsgálata alapján - megfelelőnek bizonyult.
- A redox-potenciál mérésen alapuló mikrobaszám meghatározás a hagyományos élősejtszám meghatározási módszereknél lényegesen gyorsabb, a lecsökkent időigény miatt az eredmények a technológiába (pl. palackozott víz gyártása során) visszacsatolhatók, a fertőzött tételek okozta kockázatok jelentősen csökkenthetők.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok időigénye a meghatározandó mikroorganizmustól függően 24-72 óra (esetenként jelentősen hosszabb idő). A mikrobiológiai kockázatok gyors felismerésének és csökkentésének igénye, a minőségbiztosítási és HACCP rendszerek hatékony működtetése szükségessé teszi a mikrobiológiai kiértékelés meggyorsítását és célszerű automatizálását

A SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék és a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszer-tudományi Kar Fizika és Automatizálás Tanszék munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatott MICROTESTER elnevezésű berendezés alkalmas a vizsgálati idő jelentős mértékű csökkentésére. Az eljárás a mikrobaszaporodást kísérő redox-potenciál változás detektálásán alapul.

Munkám során megvizsgáltam néhány élelmiszeripari szempontból fontos mikroba, ill. mikroba csoport szaporodási redox-görbéjének változását. Megállapítottam, hogy a redox-potenciál változás a berendezéssel jól követhető. A redox-görbe alakja a vizsgált mikrobára jellemző és állandó. Minden baktérium esetében meghatározható egy detektációs kritérium, amely a vizsgált baktériumra jellemző érték. A detektációs kritérium alapján mért detektációs idő szoros lineáris összefüggésben van a mérőcellában lévő mikroorganizmusok kezdeti sejtszámának logaritmusával, így minden baktérium esetében felvehető a kalibrációs görbe, amelynek alapján a vizsgált minta baktérium-száma meghatározható. Ismeretlen mikroflórájú minták vizsgálatára az MPN módszerrel kombinált redox-potenciál mérés alkalmazható. Penész- és élesztő gombák száma indirekt méréssel határozható meg.

Kiemelten foglalkoztam a módszer alkalmazhatóságával ivó- és ásványvíz vizsgálatára. Munkám során meghatároztam a fontosabb mikroorganizmusok kalibrációs görbéit. Megállapítottam, hogy a módszer megfelel valamennyi indikátor mikroba számának meghatározására. Null-toleráns mikrobák esetében meghatároztam azt a minimálisan szükséges mérési időt, amellyel a mikroba hiánya a vizsgált mintában biztonságosan igazolható.

A módszert vízvizsgálatokra validáltam és üzemi mérésekkel ellenőriztem.

Mindezek alapján megállapítottam, hogy az eljárás és a berendezés alkalmas élelmiszerek mikrobaszámának gyors meghatározására. A szükséges mérési idő a hagyományos módszereknél lényegesen rövidebb, erősen szennyezett minták esetén csak néhány óra, ez különösen alkalmassá teszi a módszert a mikrobiológiai szempontból nem megfelelő gyártási tételek kiszűrésére, illetve, ivóvíz vizsgálatok esetén a havária állapotok gyors jelzésére.

Új tudományos eredmények:

A mikrobaszám redox-potenciál mérésre alapozott új vizsgálati módszerének kifejlesztéséhez kapcsolódóan az eljárás mikrobiológiai megalapozásához és ipari alkalmazásához szükséges vizsgálatokat végeztem. A vizsgálatok során

- Meghatároztam az élelmiszeripari szempontból fontos mikroorganizmusok szaporodási redox-görbéit.
- Bizonyítottam, hogy a szaporodási redox-görbéből minden vizsgált mikroba esetében meghatározható egy detektációs kritérium, amelynek alapján detektációs idő állapítható meg.
- Bizonyítottam, hogy a detektációs idő és a kezdeti mikrobaszám logaritmusuk szoros, lineáris kapcsolatban van egymással, lehetővé téve a mikrobaszám meghatározására alkalmas kalibrációs görbe felvételét. Az általam meghatározott kalibrációs görbék a továbbiakban alapul szolgáltak az üzemi kísérletekhez és a gyakorlati alkalmazáshoz.
- A redox-potenciál mérési módszert MPN jellegű kiértékeléssel kombinálva, bizonyítottam, hogy az új eljárás ismeretlen mikroflórájú minta legvalószínűbb mikrobaszámának becslésére előzetesen felvett kalibrációs görbe nélkül is alkalmas. (Kezelt szennyvíz kóliform- és összes mikrobaszámának, felületi higiéniai minták enterobaktérium- és összes mikrobaszámának értékelése.)
- A mérési eljárás vízvizsgálatokra vonatkozó validálása során vízvizsgálatokra vonatkozóan meghatároztam a módszer teljesítmény-jellemzőit.
- A módszer ipari körülmények közötti alkalmazhatóságát ásványvíz üzemben és vízmű-telepen végzett mérésekkel igazoltam.

MELLÉKLETEK

Tartalomjegyzék

1. Melléklet	Irodalomjegyzék
2. Melléklet	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> adatok regresszió-analízise
3. Melléklet	Csókakői kútvíz szabványos mikrobiológiai vizsgálati eredményei
4. Melléklet	Csókakői kútvíz összecsíraszám 22 °C mérés alapadatai és regresszió analízise
5. Melléklet	Csókakői kútvíz összecsíraszám 37 °C mérés alapadatai és regresszió analízise
6. Melléklet	Csókakői kútvíz <i>E. coli</i> szám mérés alapadatai és regresszió analízise
7. Melléklet	Csókakői kútvíz Coliform szám mérés alapadatai és regresszió analízise
8. Melléklet	Csókakői kútvíz <i>Pseudomonas aeruginosa</i> szám mérés alapadatai és regresszió analízise
9. Melléklet	Különböző vízmintákból származó <i>Enterococcus faecalis</i> mérések alapadatai és regresszió analízise

1. Melléklet

IRODALOMJEGYZÉK

- Adams, M.R., Moss, M.O. (1995): Food microbiology. Cambridge: The Royal Society of Chemistry
p. 25-28.
- Alexander, J. & Rothwell, J., (1970): A study of some factors affecting methylene blue test and the effect of freezing on bacterial content of ice-cream. *Journal of Food Technology* 5 387-402.
- Anderson, G.E. & Whitehead, J.A., (1974): The validity of the methylene blue reduction test in the grading of ice-cream. *Journal of Applied Bacteriology*, 37, 487-492.
- Arnott, M.L., Gutteridge, C.S., Pugh, S.J. & Griffiths, J.L. (1988): Detection of salmonellas in confectionery products by conductance. *Journal of Applied Bacteriology* 64 p. 409-420.
- Bíró G. & Bíró Gy. (2000): Élelmiszer-biztonság, Táplálkozás-egészségügy. Budapest: Agrinform kiadó p. 37-47.
- Bolton, F.J., (1990): An investigation of indirect conductimetry for detection of some food-borne bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, 69 p. 655-661.
- Brown, M.H., Emberger, O. (1980): Oxidation-Reduction Potential. in: *Microbial Ecology of Foods* Vol 1. New York: Academic Press p. 112-125.
- Bullock, R. D. & Frodsham, D. (1989): Rapid impedance detection of salmonellas in confectionery using modified LICNR broth. *Journal of Applied Bacteriology* 66 p. 385-391.
- Cousins, D., L. & Marlatt, F., (1990): An evaluation of conductance method for the enumeration of Enterobacteriaceae in milk. *Journal of Food Protection* 53 (7) p. 568-570.
- Deak, T. & Beuchat, L.R., (1993a): Evaluation of the indirect conductance method for the detection of yeasts in laboratory media and apple juice. *Food Microbiology* 10 (3) p. 255-262
- Deak, T. & Beuchat, L.R., (1993b): Comparison of conductometric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices, *Journal of Applied Bacteriology* 75 p. 546- 550.
- Deák T. (2006): Élelmiszer-mikrobiológia, Budapest: Mezőgazda kiadó p. 320-323.
- Diaper, J.P. & Edwards, C. (1994): Survival of *Staphylococcus aureus* in lakewater monitored by flow cytometry. *Microbiology* 140, 35-42.
- Donnelly, C.W. & Baigent, G.J., (1986): Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 52, 689-695.
- EFSA (2007): The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic

Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union 2006, The EFSA Journal 130

Farkas J. (2003) Élelmiszer – táplálkozás – egészség. *Élelmezési Ipar*, 56 (3) p. 70-71.

Farkas J. & Mohácsiné Farkas Cs., (2008): Analitikai technikák az élelmiszerek mikrobás szennyezettségének gyors vizsgálatára. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 54 2008/KSz. p. 101-109.

Ford, T.E., (1999): Microbiological Safety of Drinking Water: United States and Global Perspectives. *Environmental Health Perspectives Supplements* 107 (S1) p. 191-206

Garvie, E.I. & Rowlands, A., (1952): The role of micro-organisms in dye reduction and keeping quality

tests. II. The effect of microorganisms when added to milk in pure and mixed culture. *Journal of Dairy Research*. 19., 263-274.

Gatti, M. & Neviani, E. (1993): A new simple medium for the detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by measurement of conductance changes. *Letters in Applied Microbiology*, 17 p. 72-74.

Girard, M.P., Steele, D., Chaignat, C.L., Kieny, M.P. (2006): A review of vaccine research and development: human enteric infections. *Vaccine*, 24 (15) p. 2732-2750.

Henschke, P. A. & Thomas, S. T. (1987): Detection of wine-spoiling yeasts by electronic methods. *Journal of Applied Bacteriology* 64 p. 123-133.

Hoffmanné Hajdú Á & Tar-Géri T. (2008): Redox-potenciál mérésen alapuló mikrobiológiai vizsgálatok a NaturAqua ásványvíz palackozóban. in: *XVI Élelmiszer Minőségellenőrzési Tudományos Konferencia*. ed: Molnár P., Boros F. Budapest: EOQ MNB p.308-310

Jacob, H.E., (1970): Redox potential. in: *Methods Microbiol*, vol 2. London: Academic Press p. 91-123.

Krisztalovics K., Szentgáliné Csórián E., Mezey I. (2008): Élelmiszer-fogyasztás révén is terjedni képes fertőző betegségek előfordulása és hazai adatgyűjtési rendszere. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 54 (2008/KSz) p. 60-77.

Kroll, R.G. (1989) Dye reduction and other colorimetric methods for the assessment of microbial contamination. In: Adams, M.R., Hope, C.F.A. (Eds.), *Rapid Methods in Food Microbiology. Progress in Industrial Microbiology*, vol 26. Elsevier, Amsterdam, pp. 191-233.

Kukec, A., Berovič, M., Čelan, Š. And Wondra, M. (2002): The Role of On-line Redox Potential Measurement in *Sauvignon blanc* Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 40, (1) 49-55.

Kümmerlin, R. (1982): Resazurin test for microbiological control of deep-frozen shrimps. *Journal of*

Food Technology, 17, 513-515.

Martin, S.B. & Selby, M.J., (1980): Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 518-524.

Mitchell, P. & Moyle, J. (1969). Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 7 p. 471-484.

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B. and Baird, R.M, (1995): Essentials of the Microbiology of

foods. John Wiley & Sons, Chichester, p.306-308.

MSZ EN ISO 7899-2:2000 Enterococcus bélbaktériumok kimutatása és megszámlálása.

Membránszűrés

MSZ EN ISO 9308-1:2001 Escherichia coli és Coliform baktériumok kimutatása és számlálása vízben.

Membránszűrés

MSZ EN 12780:2003 Pseudomonas aeruginosa szám meghatározása. Membránszűrési módszer

MSZ-EN-ISO 6222:2000 Vízminőség. Tenyésztendő mikroorganizmusok számának meghatározása –
Telepszám-meghatározás agar táptalaj beoltásával

MSZ EN ISO/IEC 17025:2005 Vizsgáló- és kalibráló laboratóriumok felkészültségének általános követelményei

MSZ EN ISO 16140:2004 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A választható módszerek validálásának protokollja

NAR-20 Alkalmazási útmutató az MSZ EN ISO/IEC 17025 szabványhoz, 1. függelék

Némedi L., (2006): A mikrobiológiai kockázat jellemzése a vízi környezet és a vízi közművek területein. Budapest: Magyar Vízközmű Szövetség p. 9.; 28-32.

Nieuwenhof, F.F.J. & Hoolwerf, J.D., (1987): Impedance measurement as an alternative to the plate count method for estimating the total count of bacteria in raw milk. *Journal of Food Protection* 50 (8) p. 665-668.

Nishikawa, S., Sakai, S., Karube, I., Matsunaga, T., Suzuki, S. (1982): Dye-coupled electrode system for the rapid enumeration of cell populations in polluted water. *Applied and Environmental Microbiology* 43 (4) p. 814-818.

Ogden, I.D. & Cann, D.C., (1987): A modified conductance medium for the detection of Salmonella spp. *Journal of Applied Bacteriology* 63 p. 459-464.

Payment P., Waite, M., Dufour, A. (2003): Introducing parameters for the assessment of drinking water

quality. in: *Assessing microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods*. WHO Drinking Water Quality Series, OECD – WHO, Paris, France: IWA Publishing, London. p. 47-77

Pettipher, G.L. (1989): The direct epifluorescent filter technique in: *Rapid methods in food microbiology* ed: Adams, M.R., Hope, C.F.A., Amsterdam: Elsevier (Progress in industrial microbiology 26) p. 19-52.

Reichart O., (2004): Vizsgálati módszerek validálása, a mérési bizonytalanság becslése értelmezése és kezelése, Szóbeli közlés, elhangzott a NAT 2004. évi konferenciáján

Reichart O., Szakmár K., Felföldi L., Baranyai L., Jozwiák Á. (2005): Eljárás mikroorganizmusok szilárd, folyékony és légnemű anyagokban való jelenlétének kimutatására és számszerű meghatározására.

Reichart O., Szakmár K., Jozwiák Á., Felföldi J., Baranyai L. (2007): Redox potential measurement as

a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination. *International Journal of Food Microbiology*, 114, p 143-148.

Rodel, W., Lucke, F.K., (1990): Effect of redox potential on *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* in broth and in pasteurized sausage mixtures. *International Journal of Food Microbiology*, 10. (3-4), p. 291-301.

Sorrells, K.M., (1981): Rapid detection of bacterial content in cereal grain products by automated impedance measurement. *Journal of Food Protection*, 44, 832-834.

Stanley, P.E., McCarthy, B.J. & Smither, R. (Eds), (1990): *ATP Luminescence: Rapid Methods in Microbiology*. Blackwell, Oxford.

Stannard, C. J. (1989): ATP estimation in: *Rapid methods in food microbiology*, ed: Adams, M.R., Hope, C.F.A., Amsterdam: Elsevier, (Progress in industrial microbiology 26) p. 1-16.

Stringer, M. (2004): Food Safety Objectives-Role in Microbiological Food Safety Management, Summary report of a workshop held in April 2003 in Marseille, France in: *Organized by ILSI Europe Risk Analysis in Microbiology Task Force in Collaboration with the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)*

Stewart, G.S.A.B., (1990): In vivo bioluminescence: new potentials for microbiology. *Letters in Applied Microbiology*, 10, 1-8.

Szeitzné Szabó M, (2008): Az élelmiszerbiztonság napjainkban. *Élelmiszervizsgálati Közlemények*, 54 (2008/KSz) p. 5-6.

Szeitzné Szabó M., Krisztalovics K., Sréterné Lancz Zs, Fehér Á, Cseh J. (2008): Magyarország

mikrobiológiai élelmiszerbiztonsági helyzete. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* 54 (2008/KSz)

p. 7-42.

Tengerdy, R.P., Nagy, J.G., Martin, B. (1967): Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. *Applied Microbiology* 15 (4) p. 954-955.

Timms, S., Colquhoun, K.O., Fricker, C.R., (1996): Detection of *Escherichia coli* in potable water using indirect impedance technology. *Journal of Microbiological Methods* 26 p. 125-132.

Trail, B. (1999): Food and Nutritional Policy in EU. Brussels, p. 1-210.

Waite, W.M. (1991) Drinking water standards – a personal perspective. In: *Proceedings of the UK Symposium on Health-related Water*

WHO (1998): Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe Newsletter. 57 p. 5-6.

WHO (1999): World Health Report 1999. Geneva: World Health Organization

WHO (2005): Water Safety Plans, Geneva: World Health Organization p. 1.

WHO (2009): Diarrhoeal Diseases

http://www.who.int/vaccine_research/diseases/diarrhoeal/en/index1.html

201/2001. (X.25.) Korm. rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről

65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet a természetes ásványvíz, a forrásvíz, az ivóvíz, az ásványi anyaggal dúsított ivóvíz és az ízesített víz palackozásának és forgalomba hozatalának szabályairól

2. Melléklet

Pseudomonas aeruginosa adatok regresszió-analízise.

<i>Regressziós statisztika</i>	
r értéke	0,9951
r-négyzet	0,9902
Korrigált r-négyzet	0,9883
Standard hiba	0,2338
Megfigyelések	7

VARIANCIAANALÍZIS					
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F szign.</i>
Regresszió	1	27,7266	27,7266	507,10	0,0000
Maradék	5	0,2734	0,0547		
Összesen	6	28,0000			

	<i>Koefficiensek</i>	<i>Stand. hiba</i>	<i>t érték</i>	<i>p-érték</i>	<i>Alsó 95%</i>	<i>Fels 95%</i>
Tengelymetszet	9,3564	0,2496	37,4867	2,54E-07	8,7148	9,9980
Meredekség	-0,3839	0,0170	-22,5189	3,21E-06	-0,4277	-0,3401

3. Melléklet

Csókakői kútvíz szabványos mikrobiológiai vizsgálati eredményei
(Telepszám/vizsgált mennyiség).

sorsz.	Összesíra 22 °C 0,05 ml	Összesíra 37 °C 0,05 ml.	E. coli 1 ml	Coliform 1 ml	Ps. aeru. 10 ml	Enteroc. 10 ml
1	41	25	2	79	2	14
2	35	29	3	81	3	15
3	32	25	3	51	3	16
4	40	26	4	65	2	17
5	33	22	2	69	3	17
6	43	36	2	64	3	16
7	31	24	4	50	1	17
8	35	27	5	63	2	14
9	37	37	3	65	1	17
10	32	28	1	65	3	12
11	32	23	3	53	3	17
12	30	25	3	62	4	19
13	33	27	2	61	1	19
14	32	35	3	48	1	24
15	33	24	2	61	1	15
16	37	26	3	58	3	15
17	32	25	2	66	1	15
18	32	24	2	63	3	23
19	34	22	3	62	3	20
20	32	25	1	63	4	17
21	32	34	2	61	1	15
22	38	22	1	65	2	17
23	32	21	2	65	3	17
24	33	24	3	62	2	14
25	31	28	1	61	2	15
26	30	26	3	56	2	24
27	38	33	2	64	1	16
28	34	20	4	61	3	22
29	32	21	3	61	1	14
30	32	20	4	57	1	15
31	31	20	6	62	1	16
32	33	24	4	59	1	15
33	32	22	5	56	1	14
34	31	25	3	68	3	22
35	37	24	4	63	4	19
36	30	32	5	68	2	22
37	30	35	3	60	1	18

folytatás

sorsz.	Összcsíra 22 °C 0,05 ml	Összcsíra 37 °C 0,05 ml.	E. coli 1 ml	Coliform 1 ml	Ps. aeru. 10 ml	Enteroc. 10 ml
38	36	30	4	60	2	18
39	31	22	2	61	1	13
40	38	19	3	63	1	19
41	33	27	2	62	3	21
42	31	25	4	63	2	23
43	33	21	1	62	2	17
44	29	25	2	61	3	16
45	28	27	2	66	2	17
46	37	19	1	65	1	16
47	33	22	3	55	1	15
48	28	25	4	57	1	17
49	36	19	3	62	1	16
50	37	20	2	57	1	19
Összeg	1672	1267	141	3092	99	861
Átlag	33,44	25,34	2,82	61,84	1,98	17,22
Szórás	3,27	4,63	1,17	5,80	0,98	2,92
CV%	9,8	18,3	41,5	9,4	49,5	17

4. Melléklet

Csókakői kútvíz összcsíraszám 22 °C mérés alapadatai

víz (ml)	lgN (cfu/cella)	TTD (h)
1	2,83	17,5
1	2,83	16,5
1	2,83	17,33
10	3,83	15,5
10	3,83	15,17
10	3,83	14,17
100	4,83	12,17
100	4,83	12
100	4,83	12,5
1000	5,83	10,17
1000	5,83	10
1000	5,83	9,83

22 °C-os összcsíraszámok regresszió-analízise.

Regressziós statisztika	
r értéke	0,9893
r-négyzet	0,9787
Korrigált r-négyzet	0,9766
Standard hiba	0,1788
Megfigyelések	12

VARIANCIANALÍZIS

	df	SS	MS	F	F szign.
Regresszió	1	14,6803	14,6803	459,13475	1,092E-09
Maradék	10	0,3197	0,0320		
Összesen	11	15,0000			

	Koefficiensek	St. hiba	t érték	p-érték	Alsó 95%	Felső 95%
Tengelymetszet	9,8513	0,26279	37,48	4,347E-12	9,26582	10,4369
Meredekség	-0,4068	0,01899	-21,42	1,093E-09	-0,44919	-0,3645

5. Melléklet

Csókakői kútvíz összcsíraszám 37 °C mérés alapadatai

víz (ml)	lgN (cfu/cella)	TTD (h)
0,1	1,7	11,00
0,1	1,7	10,33
0,1	1,7	10,67
1	2,7	9,67
1	2,7	9,50
1	2,7	9,33
10	3,7	8,67
10	3,7	8,83
10	3,7	8,00
100	4,7	7,83
100	4,7	7,67
100	4,7	7,67
1000	5,7	6,67
1000	5,7	6,83
1000	5,7	6,33

37 °C-os összcsíraszámok regresszió-analízise.

<i>Regressziós statisztika</i>	
r értéke	0,9845
r-négyzet	0,9692
Korrigált r-négyzet	0,9668
Standard hiba	0,2667
Megfigyelések	15

VARIANCIANALÍZIS

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F szign.</i>
Regresszió	1	29,0754	29,0754	408,7	3,31E-11
Maradék	13	0,9246	0,0711		
Összesen	14	30,0000			

	<i>Koefficiensek</i>	<i>Standard hiba</i>	<i>t érték</i>	<i>p-érték</i>	<i>Alsó 95%</i>	<i>Felső 95%</i>
Tengelymetszet	12,12764	0,4225	28,70594	3,82E-13	11,214	13,040
Meredekség	-0,97996	0,0485	-20,2185	3,31E-11	-1,08467	-0,87525

6. Melléklet

Csókakői kútvíz *E. coli* szám mérés alapadatai

víz (ml)	lgN (cfu/cella)	TTD (h)
10	1,45	17,33
10	1,45	17,67
10	1,45	17,17
100	2,45	12,5
100	2,45	12,33
100	2,45	12,67
1000	3,45	8,67
1000	3,45	8,83
1000	3,45	8,17

E. coli számok regresszió-analízise

Regressziós statisztika	
r értéke	0,9963
r-négyzet	0,9926
Korrigált r-négyzet	0,9915
Standard hiba	0,0797
Megfigyelések	9

VARIANCIANALÍZIS					
	df	SS	MS	F	F szign.
Regresszió	1	5,9556	5,9556	938,1	1,02E-08
Maradék	7	0,0444	0,0063		
Összesen	8	6,0000			

	Koefficiensek	St. hiba	t érték	p-érték	Alsó 95%	Felső 95%
Tengelymetszet	5,330144	0,097714	54,5	1,82E-10	5,099	5,561
Merekség	-0,22474	0,007338	-30,6	1,02E-08	-0,2421	-0,2074

7. Melléklet

Csókakői kútvíz Coliform szám mérés alapadatai

víz (ml)	lgN (cfu/cella)	TTD (h)
10	2,79	9,17
10	2,79	9,17
10	2,79	9,00
100	3,79	8,33
100	3,79	8,17
100	3,79	8,17
1000	4,79	6,50
1000	4,79	6,50
1000	4,79	6,67

Coliform számok regresszió-analízise

<i>Regressziós statisztika</i>	
r értéke	0,9823
r-négyzet	0,9648
Korrigált r-négyzet	0,9598
Standard hiba	0,1736
Megfigyelések	9

VARIANCIAANALÍZIS

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F szign.</i>
Regresszió	1	5,7891	5,7891	192,1	0,0000
Maradék	7	0,2109	0,0301		
Összesen	8	6,0000			

	<i>Koefficiensek</i>	<i>Standard hiba</i>	<i>t érték</i>	<i>p-érték</i>	<i>Alsó 95%</i>	<i>Felső 95%</i>
Tengelymetszet	9,80133	0,43751	22,4	8,93E-08	8,77	10,84
Meredekség	-0,75477	0,05445	-13,86	2,4E-06	-0,8835	-0,6260

8. Melléklet

Csókakői kútvíz *Pseudomonas aeruginosa* szám mérés alapadatai

víz (ml)	lgN (cfu/cella)	TTD (h)
10	0,30	20,83
10	0,30	21,17
10	0,30	20,08
100	1,30	16,29
100	1,30	16,17
100	1,30	16,00
1000	2,30	13,50
1000	2,30	13,58
1000	2,30	13,58

Pseudomonas aeruginosa számok regresszió-analízise

Regressziós statisztika	
r értéke	0,9837
r-négyzet	0,9677
Korrigált r-négyzet	0,9631
Standard hiba	0,1663
Megfigyelések	9

VARIANCIAANALÍZIS

	df	SS	MS	F	F szign.
Regresszió	1	5,8063	5,8063	209,9	0,0000
Maradék	7	0,1937	0,0277		
Összesen	8	6,0000			

	Koefficiensek	Stand. hiba	t érték	p-érték	Alsó 95%	Felső 95%
Tengelymetszet	5,8540	0,3192	18,3	3,55E-07	5,099	6,609
Merekség	-0,2711	0,0187	-14,5	1,78E-06	-0,3153	-0,2268

9. Melléklet

Különböző vízmintákból származó *Enterococcus faecalis* mérések alapadatai

lgN (cfu/cella)	TTD (h)
2,20	10,67
1,90	11,33
1,60	11,67
1,30	12,33
1,00	12,83
0,70	12,83
2,20	11,00
1,60	11,33
0,70	12,83
4,72	8,25
3,72	9,75
2,72	10,58

Enterococcus számok regresszió-analízise

Regressziós statisztika	
r értéke	0,9822
r-négyzet	0,9646
Korrigált r-négyzet	0,9611
Standard hiba	0,2390
Megfigyelések	12

VARIANCIAANALÍZIS

	df	SS	MS	F	F szign.
Regresszió	1	15,5758	15,57582	272,8	1,38E-08
Maradék	10	0,5710	0,057097		
Összesen	11	16,1468			

	Koefficiensek	Stand. hiba	t érték	p-érték	Alsó 95%	Felső 95%
Tengelymetszet	11,7580	0,5929	19,83	2,33E-09	10,44	13,08
Meredekség	-0,8619	0,0522	-16,52	1,38E-08	-0,9782	-0,7457