

Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

**AZ ÉLELMISZER MIKROBIOLÓGIA KIEMELT SZEMPONTJAI PALACKOZOTT
FORRÁS- ÉS ÁSVÁNYVÍZ GYÁRTÁSA SORÁN**

Pap Kata
Doktori értekezés

Budapest
2011

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Fodor Péter DSc
Egyetemi tanár
Alkalmazott Kémia Tanszék

Témavezető: Mohácsiné. Farkas Csilla PhD
Egyetemi docens
Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar,
Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2001. február 8-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Kiss István DSc,

Tagjai

Farkas József MHAS

Nguyen Duc Quang PhD

Szigeti Jenő DSc

Varga László PhD

Opponensek

Beczner Judit CSc

Deák Tibor DSc

Titkár

Nguyen Duc Quang PhD

TARTALOMJEGYZÉK	i
1. BEVEZETÉS	1
2. CÉLKITŰZÉSEK	3
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	4
3.1. A PALACKOZOTT FORRÁS- ÉS ÁSVÁNYVIZEK MIKROBIOLÓGIAI BIZTONSÁGA	4
3.1.1. <i>A felszín alatti víznyerő helyek</i>	4
3.1.2. <i>A felszín alatti vizek jellemző mikrobiológiai összetétele</i>	4
3.1.2.1. <i>A felszín alatti vizek mikrobiológiai vizsgálatának főbb problémái</i>	6
3.1.3. <i>A mikrobiológiai szennyeződés kockázata a víznyerés során</i>	6
3.1.4. <i>Mikrobiológiai kockázatok a vízkezelés során</i>	7
3.1.5. <i>Mikrobiológiai kockázatok a palackozás során</i>	7
3.1.5.1. <i>A palackozott forrás- illetve ásványvíz autochton mikrobiotája, annak jelentősége</i>	8
3.1.5.2. <i>Patogén, indikátor és index baktériumok a palackozott forrás- illetve ásványvízben</i>	9
3.2. BIOFILMEK JELENTŐSÉGE AZ ÉLELMISZERIPARBAN	10
3.2.1. <i>A biofilmek kialakulása</i>	10
3.2.1.1. <i>A felület kondicionálása, molekuláris megtapadás</i>	11
3.2.1.2. <i>Mikrobák megtapadása</i>	12
3.2.1.3. <i>Mikrokolóniák kialakulása</i>	12
3.2.1.4. <i>A tulajdonképpeni biofilm kialakulása</i>	13
3.2.1.5. <i>A biofilm terjedése, rekolonizáció</i>	13
3.2.1.6. <i>A biofilm növekedési kinetikája</i>	13
3.2.2. <i>Az érett biofilm szerkezete</i>	14
3.2.2.1. <i>Az EPS</i>	16
3.2.3. <i>A biofilmek hasznosítása</i>	17
3.2.4. <i>A nem kívánatos biofilmek és jelentőségük az élelmiszeriparban</i>	17
3.2.4.1. <i>A biofilmek detektálása</i>	18
3.2.4.2. <i>A biofilmek antimikrobás szerekkel szembeni rezisztenciája</i>	20
3.2.4.3. <i>A biofilmek inaktiválása</i>	21
3.2.4.4. <i>A biofilmek kialakulásának megelőzése</i>	23
3.3 A PENÉSZGOMBÁK JELENTŐSÉGE PALACKOZOTT FORRÁS- ÉS ÁSVÁNYVÍZ ELŐÁLLÍTÁSA SORÁN	25
3.3.1. <i>A penészgombák előfordulása és jelentősége a vezetékes ivóvíz ellátó rendszerekben</i>	25
3.3.2. <i>A penészgombák előfordulása és jelentősége a palackozott forrás- és ásványvizekben</i>	27
3.3.2.1. <i>Penészgombák a palackozott forrás- és ásványvizekben</i>	27
3.3.2.2. <i>Laboratóriumi körülmények között beoltott penészgombák túlélése, szaporodása a palackozott forrás- és ásványvizekben</i>	28
3.3.2.3. <i>A palackozott forrás- és ásványvizekben előforduló penészgombák patogenitása, mikotoxin termelése vízben</i>	29
3.3.2.4. <i>Penészgombák által okozott termékkárosítás a palackozott forrás- és ásványvizekben</i>	29
3.3.3 <i>A penészgombák kimutatására és mennyiségi meghatározására irányuló módszerek és azok korlátai</i>	30

4. MÓDSZEREK	31
4.1. <i>PSEUDOMONAS</i> TÖRZSEK ÁLTAL KÉPZETT STATIKUS BIOFILMEK VIZSGÁLATA VÍZSZINTES HELYZETŰ ROZSDAMENTES ACÉL (WNR1.4301) FELÜLETEN	31
4.1.1. <i>Mikroorganizmusok</i>	31
4.1.2. <i>Pseudomonas törzsoldatok készítése</i>	31
4.1.3. <i>Statikus biofilm képzés vízszintes felületen, BHI táplevesben</i>	31
4.1.4. <i>Statikus biofilm képzés vízszintes felületen, szénsavmentes ásványvízben</i>	32
4.1.5. <i>Biofilmképzés nyomon követése akridin narancs festéssel</i>	32
4.1.6. <i>A biofilm EPS kialakulásának mikroszkópos nyomon követése FITC festéssel</i>	33
4.1.7. <i>Mikroszkópos képanalízis</i>	33
4.1.7.1. <i>Mikroszkópos képek archiválása</i>	33
4.1.7.2. <i>Képelemzés</i>	33
4.1.8. <i>A biofilmek által benőtt felületek fertőtlenítése és a biofilmek eltávolítása</i>	34
4.1.8.1. <i>Mikroorganizmusok</i>	34
4.1.8.2. <i>Fertőtlenítőszer</i>	34
4.1.9. <i>A biofilmet alkotó sejtek túlélésének vizsgálata</i>	35
4.1.9.1. <i>Telepszám meghatározás lemezöntéssel</i>	35
4.1.9.2. <i>A biofilmet alkotó sejtek aktivitásának nyomon követése RABIT készülékkel</i>	36
4.1.9.3. <i>Mikroszkópos vizsgálat (akridin narancs festés), digitális képalkotás, archiválás</i>	36
4.1.10. <i>Mikroszkópos képanalízis</i>	36
4.2. <i>PENÉSZGOMBÁK SZEMMEL LÁTHATÓ TERMÉKKÁROSÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ, KERESKEDELEMBEN KAPHATÓ PALACKOZOTT FORRÁS- ÉS ÁSVÁNYVIZEKBEN</i>	36
4.2.1. <i>Vizsgált palackozott forrás- és ásványvizek</i>	36
4.2.2. <i>Oldott oxigén vizsgálat</i>	37
4.2.3. <i>A termékminták beoltásához használt penészgombák</i>	38
4.2.4. <i>Penészgombák szaporítása</i>	38
4.2.5. <i>A beoltáshoz felhasznált konídium begyűjtése</i>	38
4.2.6. <i>A vizsgált palackozott forrás- és ásványvizek penészgombákkal való beoltása</i>	38
4.2.6.1. <i>Különböző koncentrációjú beoltási szuszpenziók készítése</i>	39
4.2.6.2. <i>A termékminták beoltása</i>	39
4.2.7. <i>A beoltott palackozott forrás- és ásványvizek inkubálása</i>	40
4.2.8. <i>A szemmel látható termékkárosodás vizuális nyomon követése</i>	40
4.2.9. <i>Túlélő telepképző egységek szám meghatározása</i>	40
4.2.9.1. <i>Túlélő telepképző egység szám meghatározás membránszűréssel</i>	41
4.2.9.2. <i>Túlélő telepképző egység szám meghatározás lemezöntéssel</i>	41
4.2.10. <i>Az eredmények statisztikai elemzése</i>	43

5. EREDMÉNYEK	44
5.1. PSEUDOMONAS TÖRZSEK MEGTAPADÁSA VÍZSZINTES ROZSDAMENTES ACÉL (WNR1.4301) FELÜLETEN	44
5.1.1. <i>A vizsgált Pseudomonas törzsek által BHI táplevesben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei akridin narancs festéssel</i>	44
5.1.1.1. <i>Ps. aeruginosa ATCC 9027 BHI táplevesben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel</i>	46
5.1.1.2. <i>Ps. stutzeri CC B 21 BHI táplevesben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel</i>	47
5.1.2. <i>A vizsgált Pseudomonas törzsek által ásványvízben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei akridin narancs festéssel</i>	49
5.1.2.1. <i>Ps. aeruginosa ATCC 9027 ásványvízben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel</i>	49
5.1.2.2. <i>Ps. stutzeri CC B 21 ásványvízben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel</i>	51
5.1.3. <i>Az akridin narancs festés eredményeinek összehasonlítása a vizsgált Pseudomonas törzsekkel modellezett biofilmeknél ideális és tápanyag szegény közegben</i>	53
5.1.4. <i>A vizsgált Pseudomonas törzsek által BHI táplevesben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei FITC festéssel</i>	55
5.1.4.1. <i>Ps. aeruginosa ATCC 9027 BHI táplevesben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel</i>	57
5.1.4.2. <i>Ps. stutzeri CC B 21 BHI táplevesben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel</i>	57
5.1.5. <i>A vizsgált Pseudomonas törzsek által ásványvízben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei FITC festéssel</i>	58
5.1.5.1. <i>Ps. aeruginosa ATCC 9027 ásványvízben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel</i>	59
5.1.5.2. <i>Ps. stutzeri CC B 21 ásványvízben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel</i>	59
5.1.6. <i>A FITC festés eredményeinek összehasonlítása a vizsgált Pseudomonas törzsekkel modellezett biofilmeknél ideális és tápanyag szegény közegben</i>	60
5.2. PS. AERUGINOSA ATCC 9027 BIOFILM ELTÁVOLÍTÁSA KÜLÖNBÖZŐ FERTŐTLENÍTŐSZERREKKEL	62
5.2.1. <i>A vizsgált fertőtlenítő eljárások biofilm inaktiválásának vizsgálata telepszámlálással és RABIT impedimetriás berendezéssel</i>	62
5.2.2. <i>A vizsgált fertőtlenítő eljárások biofilm inaktiválása – akridin narancs festéssel végzett sejt eltávolító hatás vizsgálatok eredményei</i>	64

5.3. PENÉSZGOMBÁK SZEMMEL LÁTHATÓ TERMÉKKÁROSÍTÁSÁNAK VIZSGÁLATA KÜLÖNBÖZŐ, KERESKEDELEMBEN KAPHATÓ PALACKOZOTT FORRÁS- ÉS ÁSVÁNYVIZEKBEN	66
5.3.1. A vizuális nyomon követés eredményei a szénsavas palackozott vízmintákban	66
5.3.2. vizuális nyomon követés eredményei a szénsavmentes palackozott vízmintákban	66
5.3.3. A vizuális nyomon követés eredményei a beoltáshoz felhasznált különböző penészgomba fajok esetében a szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvíz termékmintáknál	69
5.3.4. A vizuális nyomon követés eredményeinek összefoglalása	71
5.4. TÚLÉLŐ TELEPKÉPZŐ EGYSÉG SZÁM MEGHATÁROZÁS EREDMÉNYEI	72
5.4.1. Túlélő telepképző egység száma szénsavas palackozott vízmintákban	72
5.4.1.1. Túlélő telepképző egység szám a <i>F. oxysporum</i> CC F 36 törzssel beoltott szénsavas mintáknál	75
5.4.1.2. Túlélő telepképző egység szám a <i>C. cladosporoides</i> CC F 50 törzssel beoltott szénsavas mintáknál	77
5.4.1.3. Túlélő telepképző egység szám a <i>P. chrysogenum</i> NCAIM F 00837 törzssel beoltott szénsavas mintáknál	78
5.4.1.4. Túlélő telepképző egység szám az <i>A. fumigatus</i> NCAIM F 00673 törzssel beoltott szénsavas mintáknál	79
5.4.2. Túlélő telepképző egység szám a szénsavmentes palackozott vízmintákban	79
5.4.2.1. Túlélő telepképző egység szám a <i>F. oxysporum</i> CC F 36 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál	83
5.4.2.2. Túlélő telepképző egység szám a <i>C. cladosporoides</i> CC F 50 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál	85
5.4.2.3. Túlélő telepképző egység szám a <i>P. chrysogenum</i> NCAIM F 00837 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál	86
5.4.2.4. Túlélő telepképző egység szám az <i>A. fumigatus</i> NCAIM F 00673 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál	88
5.4.3. A túlélő telepképző egység szám meghatározás eredményeinek összefoglalása	89
5.5. A VIZUÁLIS NYOMON KÖVETÉS ÉS A TELEPKÉPZŐ EGYSÉG MEGHATÁROZÁS EREDMÉNYEINEK ÖSSZEVETÉSE	90
5.6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	92
6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	94
7. ÖSSZEFOGLALÁS	98
8. SUMMARY	103
9. MELLÉKLETEK	107
M.1. FELHASZNÁLT IRODALOM	107
M. 2. FELHASZNÁLT TÁPTALAJOK ÉS ANYAGOK RECEPTJE	118
M. 3. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	119
M. 4. FÉNYKÉPEK	120
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	129

1. BEVEZETÉS

A palackozott forrás- és ásványvíz fogyasztás szerte Európában, így hazánkban is jelentős emelkedést mutat az elmúlt 10 évben. A fogyasztók növekvő mennyiségi igénye az egyre tudatosabb fogyasztói magatartással a minőségi igények emelkedését is magával hozza. A széles választék biztosítása mellett igen fontos az élelmiszerbiztonsági és érzékszervi szempontból is kifogástalan termékek biztosítása a piacon. Az érvényes magyar jogszabály (65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet) a természetes forrás- illetve ásványvizeknél nem engedélyezi a mikrobiológiai kezelések vagy tartósítási eljárások alkalmazását. A végtermék összetétele egyes magas szénsavtartalmú termékektől eltekintve nem bír gátló hatással a mikrobák szaporodására. Számos szakirodalmi adat beszámol különböző mikrobák szénsavas ivóvizekben való túléléséről is.

A vízrendszerek mikrobiológiájának egy viszonylag sokat vizsgált területe a biofilmek előfordulásának vizsgálata. A szakirodalmi adatok alapján egyik legjelentősebb biofilm képzéssel bíró baktérium faj a *Pseudomonas aeruginosa*, mely fakultatív patogén volta miatt is nagy veszélyforrást jelent a forrás- illetve ásványvíz palackozó üzemekben. Más *Pseudomonas* fajok gyártóterületeken, berendezésekben való megjelenése, biofilm képzése szintén súlyos higiénés problémát okozhat. Az általuk képzett biofilmekbe más, patogén mikroorganizmusok is beépülhetnek, így akár az élelmiszerbiztonságot is fenyegethetik. A kialakult biofilmek inaktiválása igen nehéz az antimikrobás szerekkel szemben kialakult nagyfokú rezisztencia valamint a biofilmet alkotó sejtek által termelt poliszacharidok (EPS) felülethez való erős tapadása miatt. A hatástalan fertőtlenítő eljárások után a felületen maradt vékony biofilm réteg és a felületen található tápanyagok újabb biofilm képződését segíthetik. A biofilm inaktiválásánál tehát olyan módszert kell találni, mely nem csak elpusztítja, de el is távolítja a felületről az ott kialakult biofilmet.

A palackozott forrás- és ásványvíz gyártás másik, keveset vizsgált területe a penészgombák előfordulása a palackozott ivóvizekben. A fonalgomba fajok bár számos alkalommal kimutathatók a palackozott ivóvizekben, jelenlétük mindenképpen környezeti kontaminációra utal. A fonalgombák szénsavmentes ásvány- vagy forrásvízben növekedni képesek, esetleges toxin termelésük illetve patogén, allergén penészgomba esetén pusztító jelenlétük is egészségügyi, élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent. Az ivóvízben jelenlévő fonalgombák az egészségkárosító hatás mellett az ivóvíz érzékszervi tulajdonságainak romlását is okozhatják, abban szemmel látható telepet képezhetnek rontva a termék megjelenését, ezzel nagyszámú fogyasztói panaszt okozva. A penészgombák a vizuális megjelenés mellett kedvezőtlen aromaanyagok termelésével dohos, fanyar, keserű illetve „sár íz” jellegű ízeltérést okozhatnak.

A természetes forrás- illetve ásványvizek gyártása során tehát kiemelt fontossággal bír az élelmiszerhigiénia és az élelmiszer-mikrobiológiai rizikófaktorok ismerete és ennek tükrében a megfelelő megelőző tevékenységek (mikrobiológiai monitoring, termék felszabadítási és figyelmeztetési határértékek felállítása, hatékony és rendszeres tisztítás és fertőtlenítés) bevezetése.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Munkám célja volt, hogy választ adjak a forrás- és ásványvíz gyártó iparágnak arra a jelentős gyakorlati kérdésére, hogy egyes, a jogszabályi rendelkezésekből hiányzó mikroorganizmusok ipari szempontból jelentős mikrobiológiai illetve üzemhygiéniai kérdést jelentenek-e. Céлом volt, hogy összehasonlítsam a jogszabályokban szabályozott *Pseudomonas aeruginosa* jeletőségét a palackozott forrás-és ásványvízgyártás során egy olyan ipari izolátummal, mely a mindennapos, a *Pseudomonas aeruginosa* meghatározására irányuló mikrobiológia monitoring során került azonosításra. Szintén céljaim közé tartozott, hogy meghatározzam a *Pseudomonas aeruginosa* biofilmek eltávolításának lehetőségeit a gyakorlatban takarításhoz használatos tisztító-fertőtlenítő szerekkel. Céлом volt az is, hogy a penészgombák jelentőségét meghatározzam a palackozott forrás- és ásványvizekben.

A fentiek alapján a részletes célkitűzéseim a következők voltak:

- Törzsgyűjteményből származó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 és víznyerőhelyről izolált *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 vízszintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, tápanyagban gazdag (BHI tápleves) illetve tápanyagszegény (szénsavmentes ásványvíz) közegben való biofilmképzésének nyomon követése különböző módszerekkel.
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 által vízszínes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, tápanyagban gazdag közegben (BHI tápleves) képzett biofilmjének különböző, kereskedelembe kapható fertőtlenítőszerrel való inaktiválásának illetve eltávolításának vizsgálata.
- Palackozott forrás- illetve ásványvízből izolált penészgomba törzsek (*F. oxysporum* CC F 36; *C. cladosporoides* CC F 50; *P. chrysogenum* NCAIM F 00837; *A. fumigatus* NCAIM F 00673) túlélésének, szaporodásának nyomon követése 12 ásványi anyag- és szénsavtartalmában különböző (6 szénsavas és 6 szénsavmentes), kereskedelembe kapható palackozott forrás- és ásványvízben
- Szabad szemmel is látható micéliumképzés (termékkárosítás) nyomon követése 26 héten keresztül, 12 ásványi anyag- és szénsavtartalmában különböző (6 szénsavas és 6 szénsavmentes), kereskedelembe kapható palackozott forrás- és ásványvízben

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A palackozott forrás- és ásványvizek mikrobiológiai biztonsága

A palackozott ivóvizek mikrobiológiájával, a mikrobiológiai kockázatok elemzésével foglalkozó szakirodalom igen jelentős. A szakirodalmi összefoglalóm e részében elsősorban a vízforrások (víznyerő helyek) természetes mikrobiotája (autochton mikrobióta) jelenlétére és jelentőségére igyekszem rámutatni, nem mellőzve természetesen a víznyerés és feldolgozás, palackozás veszélyeit, élelmiszerbiztonság illetve termékkárosítás szempontjából jelentős kockázatait.

3.1.1. A felszín alatti víznyerő helyek

A vízadó rétegek mélységük alapján jellemzően 3 fő csoportba sorolhatók, úgymint sekély, közepes mélységű és mély (300 méternél mélyebb) vízadó réteg. A sekélyvízadó réteget aktív vízmozgások jellemzik, azaz a felszíni vizek és a helyi szennyeződések a talajon keresztül gyors beszűrődést mutatnak a vízadó rétegbe. A beszűrődés sebessége itt napi szinten méterekben fejezhető ki. A közepes vízadó réteget a felszíni vizektől és a talajvíztől vízzáró réteg választja el, de a vízadó réteg mélysége nem haladja meg a 300 métert. Erre a vízadó rétegre jóval lassabb beszűrődés jellemző, melynek sebessége éves szinten méterekben fejezhető ki. A mély vízadó rétegek jellemzően 300 méternél mélyebben helyezkednek el és a felszíni vizek, szennyeződések beszűrődésének mértéke igen csekély, az 1-1 métert évszázadok alatt tesz meg. A konkrét vízmozgások természetesen az adott geológiai viszonyoktól függően erősen változnak, de a vízadó réteg mélysége mindenképpen világosan befolyásolja a mikrobiológiai és kémiai stabilitást. A forrás- illetve ásványvizek Európa szerte jellemzően közepes-, Magyarországon nem ritkán mély vízadó rétegekből származnak. A vízbázis védelme érdekében a vízkivételi hely körül a fent említett hidrogeológiai viszonyoktól, a vízadó réteg mélységétől, a felszín alatti vizek mozgásától függően védőterület meghatározása válhat szükségessé, ahol tilos vagy korlátozott a vízbeszerző hely felé áramló víz mennyiségét és minőségét veszélyeztető minden tevékenység. A védőterület meghatározása minden esetben hidrogeológiai modellezés alapján történik. (Leclerc & Moreau, 2002)

3.1.2. A felszín alatti vizek jellemző mikrobiológiai összetétele

Az 1970-es évek előtt a felszín alatti vízadó rétegekben természetesen előforduló (autochton) mikrobiótáról megjelent publikációk száma meglehetősen limitált volt. A mikrobiológiai módszerek, így például a steril mintavételi módszerek fejlődésével azonban egyre több információval bővültek az ismeretek. A legújabb tanulmányok kimutatták, hogy a különböző mélységű geológiai rétegekből és a különböző helyekről származó aerob heterotróf baktériumok

fiziológiai és morfológiai jellemzői nagymértékben eltérőek a mélység függvényében és határozottan különböznek a más mélységekben előforduló mikroba közösségektől (Leclerc & da Costa, 1998; Leclerc & Moreau, 2002).

A felszín alatti vizekben jellemzően heterotróf baktériumok mutathatók ki. Az eukarióták jelenléte csak korlátozott számban igazolódott, de jelenlétük nem zárható ki. A leggyakrabban kimutatott baktériumok olyan aerob Gram negatív pálcák, amelyek oxigént használnak fel terminális elektron akzeptorként. Így a *Pseudomonas* fajok igen elterjedtek a felszín alatti vízrendszerekben, de szintén gyakran kimutathatók a *Caulobacterek*, citophagok, *Flexibacterek*, és *Flavobacterek* (Leclerc & da Costa, 1998; Leclerc & Moreau, 2002). Több szakirodalmi adat utal arra, hogy az aerob vízbázisokban protozoák is kimutathatók, de a baktériumok száma itt is mindig jelentősen meghaladta a protozoákét (Balkwill, 1989; Fredrickson et al., 1989; Sinclair & Ghiorse, 1989; Leclerc & Moreau, 2002). A felszín alatti vizekben az anaerob mikroorganizmusok is jellemzőek lehetnek, így a szulfitredukáló baktériumok száma egyes vízbázisokban jelentős lehet (Jones et al., 1989). A különböző nitrogénhasznosító fajok jelenléte az oxigén koncentrációjától függ. Aerob körülmények és nagy ammónia-tartalom mellett a nitrifikáció a jellemző, ellenben az igen kis oxigén koncentráció (>30 µmol/l) mellett a denitrifikáló illetve nitrátredukáló baktériumok is szerepet kaphatnak, így a már említett *Pseudomonas* fajok mellett a *Paracoccus*, *Thiobacillus* és *Bacillus* fajok is jelentős számban kimutathatók. Nagy vas és mangán koncentrációnál lehet számolni a vas- illetve mangánhasznosító baktériumok szignifikáns jelenlétével is (Leclerc és da Costa 1998; Leclerc & Moreau, 2002).

Amennyiben a vízbázis nem kellőképpen védett előfordulhat a felszíni vizek vagy a környezeti szennyvizek beszivárgása. A víznyerő helyről kimutatott patogén, termotoleráns kóliform illetve egyéb fekáliindikátor baktériumok a vízbázis vagy a víznyerő hely (kút) másodlagos fertőződése esetén fordulnak elő.

3.1.2.1.A felszín alatti vizek mikrobiológiai vizsgálatának főbb problémái

A mindennapi élelmiszeripari gyakorlatban a felszín alatti vizek összes életképes csíra meghatározásánál szem előtt kell tartanunk két jelentős paramétert, úgymint a közeg limitált szerves anyag tartalmát valamint a hőmérsékletet. A vízbázisban a tápanyag korlátozott elérhetősége miatt a forrás- illetve ásványvizek természetes mikrobiótáját alkotó baktériumok gyakran éhezési állapotban vannak. Ennek következtében egyrészt megváltozhat a morfológiájuk, így a sejtek alakja deformálódhat, tojásformát vehet fel, az átmérőjük pedig oly mértékben csökkenhet, hogy a szokásos 0,45 µm átmérőjű-, de egyes szakirodalmi adatok szerint akár a 0,2 µm membránszűrőn is átférnek (Moyer & Morita, 1989; Leclerc & Moreau, 2002), így előfordulhat, hogy a mindennapi rutinban használt membránszűrés nem hatásos a kimutatásukra. Másfelől a szokásos, tápanyagban dús táptalajok egyfajta „tápanyagsokkot” jelenthetnek, így a kimutatni kívánt baktériumok vizsgálatánál a kifejezetten kevés tápanyagot tartalmazó táptalajokat, pl. R2A agart illetve 1:10 arányban hígított táptalajt érdemes alkalmazni (Leclerc & Moreau, 2002; Bischofsberger et al., 1990). A kis tápanyagtartalom miatt a baktériumok esetenként élő, de nem tenyészhető állapotba is kerülhetnek, így a leoltást megelőző előinkubálás vagy alternatív mikrobiológiai módszerek – pl. konduktometriás illetve impedimetriás, valamint molekuláris biológiai módszerek illetve különböző festési eljárások (pl: akridin narancs) alkalmazása egyaránt hasznos lehet (Leclerc & da Costa, 1998).

A vízbázis kis hőmérséklete miatt az autochton baktériumok gyakran pszichotrófok, így elterjedt helyes gyakorlat a táptalajok 20-22 °C-on történő inkubációja. Tekintettel kell lenni azonban arra, hogy kisebb hőmérsékleten a baktériumok anyagcseréje lassabb, így az inkubációs időt minimum 3 napban, esetenként akár 7-14 napban is helyes meghatározni. Szintén szem előtt kell tartani azt a tényt is, hogy artézi kutak esetében a vízbázis gyakran nagyobb hőmérsékletű, 28-30 °C-os is lehet, ilyen esetekben az optimális inkubálási hőmérsékletet ehhez a hőmérséklethez kell igazítani. (Leclerc & da Costa, 1998)

3.1.3. A mikrobiológiai szennyeződés kockázata a víznyerés során

A forrás- illetve ásványvizek a legtöbb esetben kútúrás után szivattyúzva kerülnek a felszínre. Artézi kutak esetében a szivattyúzás nem szükséges, itt a magas nyomású vízbázisból a víz a kútúrás során a felszínre tör. A kútúrás, a kút létesítése és szükség esetén a szivattyúzás is mikrobiológiai szennyeződési források. A kút fúrása során a talaj környezeti mikroba populációja, a kút illetve szivattyú létesítése során pedig a felhasznált anyagok, berendezések, az üzemeltető személyzet fertőzhetik be a kutat. Mindezek elkerülésére a kút létesítése illetve beüzemelése során

az élelmiszerhigiéniai alapszabályok betartása igen fontos, a víznyerő hely létesítése után pedig fertőtlenítés válhat szükségessé (Leclerc & Moreau, 2002).

3.1.4. Mikrobiológiai kockázatok a vízkezelés során

A víznyerő helyen kitermelt forrás- illetve ásványvíz a feldolgozási műveletek alatt számos mikrobiológiai kockázatnak van kitéve. A kutat és a vízkezelőt illetve a palackozó üzemet gyakran hosszú földalatti csővezeték köti össze. Amennyiben ezek a zárt rendszerek nem kapnak rendszeres karbantartást, tisztítást és szükség esetén fertőtlenítést, felmerül a biofilm kialakulásának veszélye. A csővezetékek esetleges külső mechanikai sérülése esetén pedig a környező talajból, talajvízből termékkárosító illetve kórokozó mikroorganizmusok is bekerülhetnek a rendszerbe. Ezek a szennyeződések az esetek nagy részében azonnal jelentkeznek a mikrobiológiai monitoring eredményeiben. Előfordulhat azonban, hogy a kis koncentráció miatt élő sejtek nem mutathatók ki azonnal, de a káros mikroorganizmusok a csővezetékekben kialakult biofilmekbe beépülnek, és ott a későbbiek során osztódásnak indulnak, ezzel nehezen kezelhető krónikus problémát generálva. Igen fontos tehát a csővezetékek rendszeres tisztítása és fertőtlenítése és a mintavétel esetenkénti szűrőpróbaszerű megemlése mind gyakoriságában mind térfogatában.

A hatályos magyar szabályozás (65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet) szerint a forrás- illetve ásványvizek esetén csak olyan kezelési eljárás alkalmazható, amely azok lényeges fizikai-kémiai összetételét nem változtatja meg. A gyakorlatban előfordulnak tehát engedélyezett eljárásokkal, így például a víz levegőztetése, illetve homokágyon való szűrése, amelyek a nem stabil elemek, például a vas, mangán oxidációját és/vagy szűrését, ülepitését illetve a zavaró aromaanyagok (pl. kénvegyületek) illetve a szabad széndioxid eltávolítását célozzák. Az említett vízkezelések során használatos tartályok, levegőztető oszlopok, ülepitő tartályok illetve homokágyak fertőtlenítése, rendszeres tisztítása igen fontos.

A szénsavval dúsított forrás- illetve ásványvizek előállításához felhasznált széndioxid gáz illetve a szükséges berendezések mikrobiológiai tisztasága is fontos tényező. Bár a szénsavas termékekben a mikroorganizmusok túlélése limitált, előfordulhat túlélés, illetve kis szénsav tartalom mellett akár szaporodás is (Hunter, 1990).

A napjainkban egyre nagyobb teret nyerő ízesített forrás- illetve ásványvizek előállítása további kockázatokkal jár, ennek tárgyalása jelen dolgozatnak nem témája.

3.1.5. Mikrobiológiai kockázatok a palackozás során

A palackozás során a palackozó illetve záró gépek, a kezelőszemélyzet, a felhasznált csomagolóanyagok egyaránt veszélyforrást jelentenek. Jelentős lehet a káros mikroorganizmusok túlélése a berendezések tömítőanyagain, a nem kellően karbantartott berendezések kenőanyagain, a

sűrített levegő- illetve nitrogénellátó rendszerekben, valamint a nem kellőképpen tisztított-fertőtlenített töltőszár és a kupakzáró berendezés is igen gyakori fertőzőforrás.

3.1.5.1.A palackozott forrás- illetve ásványvíz autochton mikrobiotája, annak jelentősége

A palackozott vizek ideális esetben tartalmazzák a vízbázisból kinyert forrás- illetve ásványvíz eredeti mikrobiotáját, amely több tanulmány szerint is gátló hatást gyakorol a feldolgozás során a termékbe került szennyező illetve patogén mikroorganizmusokkal szemben (Leclerc & da Costa, 1998; Moreira et al., 1994).

Mint arra számos szakirodalmi adat rámutat, a víznyerő helyen mintázott forrás- illetve ásványvíz és a palackozott végtermék összes élő csíraszám között jelentős számbeli különbség tapasztalható. Míg a kútból vett minták összes életképes csíraszámát átlagosan 0-10 TKE/ml, addig az a palackozott végtermékben 3-7 nap elteltével akár 10^4 - 10^5 /ml nagyságrendet is elérheti (Gonzalez et al., 1987; Warburton 1993; Bischofsberger et al., 1990; Morais és da Costa 1990). Ennek magyarázatára alapvetően két elméletet lehet a szakirodalomban fellelni. Feltételezhető, hogy a korábban említett élő, de nem tenyészthető állapotban lévő baktériumok a tárolás során regenerálódnak és így kimutathatóvá válnak, azonban az is elképzelhető, hogy a nagymértékű csíraszám növekedés a már a víznyerő helyen kimutatható, eredetileg is jelen levő néhány sejt osztódásának köszönhető (Leclerc és da Costa 1998). Bischofsberger és munkatársai (1990) az ásványvizekben kimutatható összes élő aerob és fakultatív anaerob sejtszámot vizsgálták, de a vizsgálandó paraméterek közé a csomagolóanyagot is bevették. Mintavételi mátrixukat 5 különböző kútból, az innen származó ásványvizek kevert vizes tárolótartályából illetve a különböző csomagolóanyagú (PET illetve üveg) szénsavmentes palackozott termékekből állították össze. A palackozott termékek esetében 20 °C-on történő 2 éves tárolási időt alkalmaztak. A különböző forrásból származó vizekben egyaránt kevés, 1-4 telep volt kimutatható milliliterenként és ez az eredmény a keverőtartályból vett mintában, illetve a palackozott késztermék mintában sem változott nagyságrendileg. Egy hét tárolás után azonban mind a PET-, mind az üvegpalackos termékekben jelentős kimutatható telepszám növekedés volt tapasztalható, amely a PET palackokban a 10^5 , üvegpalackokban pedig a 10^3 nagyságrendet érte el. A következő négy hét folyamán a TKE értékek igen lassan csökkenni kezdtek vagy állandó értéken maradtak, a 2 éves tárolási időszak végén vett minták pedig még mindig tartalmaztak megközelítőleg 10^3 nagyságrendben túlélő és tenyészthető sejteket. Más tanulmányok szintén kiemelik a csomagolóanyagok jelentőségét. A palackozás előtt mosott üvegpalackba töltött ásványvizekben rendre kisebb összcsíraszámot mutattak ki, mint a műanyag (PET illetve PVC) palackokba töltött ugyanazon ásványvizek esetében. Ez egyrészt az üvegpalackok tisztítása során a palack felületén nyomokban megmaradt tisztítószer bakteriosztatikus hatásával magyarázható, másfelől bizonyos szakirodalmi eredmények arra is

engednek következtetni, hogy a műanyag palackok felületéről szerves anyagok oldódhatnak a termékbe, melyet a benne lévő mikroorganizmusok hasznosítanak (Gonzalez et al., 1987; Morais & da Costa, 1990; Mavridou, 1992). Ezen kívül a csomagolóanyagok felületi érdessége, alakja, a hidrofób/hidrofil tulajdonsága illetve a palackok mérete is befolyásolja a baktériumok szaporodását (Bischofsberger et al., 1990; Leclerc & da Costa 1998).

3.1.5.2. Patogén, indikátor és index baktériumok a palackozott forrás- illetve ásványvízben

Számos szakirodalom beszámol arról, hogy az összcsíraszám növekedése mellett a palackozott végtermékben megjelenhetnek patogén, indikátor, illetve kóliform baktériumok. Az indikátor baktériumok jelenléte nem jelenti feltétlenül a közvetlen egészségkárosítás veszélyét, de az üzemi HACCP hiányosságaira rámutatnak. Ezzel szemben a termotoleráns *E. coli* illetve egyéb termotoleráns kóliform fajok egyértelműen fekáliás szennyeződésre utalnak, jelentőségük igen nagy. Kimutathatóságuk esetén nagy a veszélye a fertőtlenítési eljárásokra ellenállóbb és nehezebben kimutatható patogén enterobaktériumok, enterovírusok vagy akár patogén protozoák előfordulásának. A Gram-pozitív baktériumok jelenléte a palackozott végtermékben szintén gyakran a környezeti szennyeződés indikátoraként tekinthetők, hiszen a *Micrococcus* illetve *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó fajok jellemzően előfordulnak az emlősök, így az ember bőrén, nyálkahártyáin. A *Streptococcus* fajok pedig a termotoleráns koliformokhoz hasonlóan a fekáliás szennyeződésre utalhatnak. Egyes szulfitredukáló anaerob baktériumok a vízbázis szennyeződésére utalnak, míg más spóráképző Gram-pozitív baktériumok, mint a *Bacillus* illetve *Clostridium* fajok részei lehetnek a felszín alatti vizek autochton mikrobiotájának, ebből adódón a palackozott termékekből is kimutathatóak (Leclerc & da Costa, 1998; Leclerc & Moreau, 2002; Hunter et al., 1987).

A palackozott szénsavmentes termékekben a patogén illetve fakultatív patogén baktériumok jelentős élelmiszerbiztonsági kockázatot jelenthetnek, bár, mint azt korábban említésre került, szakirodalmi adatok mutatnak rá az ásványvizekben természetesen jelenlévő baktériumok gátló hatására. (Leclerc & da Costa, 1998; Moreira et al., 1994). Ennek ellenére Hunter (1990) kimutatta az *E. coli* 42 napos, a *Salmonella typhimurium*, az *Aeromonas hydrophilia* és a *Pseudomonas aeruginosa* 70 napos túlélését szénsavmentes ásványvízben. Szénsavas ásványvízben ugyanezen baktériumok túlélése 25-50%-al csökkent. A *Yersinia enterocolitica*-val kapcsolatos kísérletek a beoltást követő első nyolc hétben szaporodásról, számolnak be, valamint arról hogy az még a 64. héten is kimutatható volt (Karapinar & Gönül, 1991).

Ellentétben a legtöbb enterobaktériummal, a *Pseudomonas aeruginosa* az olyan tápanyagban szegény közegben, mint a forrás- illetve ásványvíz is élénk szaporodásra képes, bár a kísérő autogén mikrobióta itt is gátlást, vagy a szaporodás lassulását eredményezheti. (Leclerc & da Costa, 1998;

Leclerc & Moreau, 2002; Moreira et al., 1994). A *Pseudomonas aeruginosa* nem csak a fakultatív patogenitása miatt, hanem a későbbiekben részletezett igen erőteljes biofilm képzése miatt is jelentős kockázati tényező az ásvány- illetve forrásvíz palackozása során.

A termék szempontjából szintén jelentős, bár keveset vizsgált szempont a penészgombák jelenléte. Szénsavmentes ásvány- vagy forrásvízben szaporodni képesek illetve szemmel látható telepet képezhetnek, a termék megjelenését rontva. Toxin termelés illetve patogén penészgomba esetén pedig egészségügyi, élelmiszerbiztonsági kockázatot is jelentenek. Szerepük a későbbiekben kerül részletezésre.

3.2. Biofilmek jelentősége az élelmiszeriparban

A biofilmekről a szakirodalom számos, lényegében hasonló meghatározást fogalmaz meg, így például Bakke és munkatársai (1984) a biofilmet a sejtek és extracelluláris termékeik felülethez kapcsolódó biológiailag aktív mátrixaként, Costerton és munkatársai (1987) pedig a mikroorganizmusok felülethez tapadt, az általuk termelt extracelluláris polimerben (extracellular polymeric substance, későbbiekben EPS) rögzült, funkcionális társulásaként definiálja. Allison és Sutherland (1987) megfogalmazásában szintén kiemeli a mikrobák szilárd felületen történő megtapadását, szaporodását, az általuk termelt szerves polimereknek a biofilm felépülésében betöltött szerepét. A definíciók közös jellemzője tehát, hogy a biofilmet vizes közegben lévő mikrobák szilárd felülethez kötődött aktív sejthalmazának, társulásának tekintik, valamint, hogy a sejtek által termelt EPS-t esszenciális fontosságúnak, a biofilm építőelemének tartják.

A biofilmek előfordulnak a természetben, folyók, természetes vizek medre, víz alatti felületek, kövek felszínén, élő szervezetekben (fogak, implantátumok felületén) valamint az ipari környezetben egyaránt. Jelenlétük az élelmiszeriparban egyaránt lehet hasznos vagy káros. Egyes technológiák során nagy jelentőséggel bírnak bizonyos jól kézben tartott biofilmek, azonban a gyártóterületeken, berendezésekben való megjelenésük súlyos higiénés problémát is okozhat. Biofilmet termékkárosító és patogén mikroorganizmusok is képezhetnek így az üzemhigiéniai problémák mellett a járványügyi jelentőségük is kiemelkedő lehet. A biofilmet alkotó mikrobák felülethez való kötődésük során morfológiai változásokon is átesnek, anyagcseréjük megváltozhat, az általuk kiválasztott, biofilmet védő poliszacharid mátrix pedig jelentős védelmet nyújt a környezeti behatások ellen. A nem kívánatos biofilmek detektálása és eltávolítása így egyaránt nehéz feladatot ad a szakembereknek.

3.2.1. A biofilmek kialakulása

A mikrobák a természetben és az ipari körülmények között is kétfajta állapotban fordulnak elő, úgymint planktonikus, azaz szabadon lebegő, valamint felülethez kötött állapotban. A mikrobák a

planktonikus állapotnál jobban kedvelik, ha megtapadhatnak valamilyen felületen. A szilárd felszínhez való kötődés jobb tápanyagellátást és nagyobb védelmet biztosít a környezeti behatásokkal szemben. Biofilmek egyaránt kialakulnak élő szöveteken és mesterséges felületeken. Nagyobb a biofilm kialakulásának valószínűsége a kevés tápanyagot tartalmazó áramló rendszerekben, ahol a kiéhezett sejtek a felületen megtapadva folyamatos tápanyagellátásban részesülnek (Marshall, 1992). Megfigyelték, hogy sok mikroorganizmus nyálkás, ragadós poliszacharidot választ ki, amely segíti a felületen való megtapadást, a táplálkozást és egyben védi a biofilmeket a hőingadozás és az antimikrobás szerekkel szemben. (Jelenik-Nikolics Marshall & Lévai, 2000). A kiválasztott poliszacharidok egyrészt gyakran aminocsoportokkal rendelkeznek, így pozitív töltésüknél fogva könnyen kötődnek negatív töltésű felületekhez, másrészt kémiai összetételüknek fogva polidiolok is egyben, ami hidrogén kötések kialakulását is lehetővé teszi. A kiválasztott poliszacharidok független láncai az amid- és hidroxilcsoportok között kialakuló hidrogénkötések révén öntapadó vázlat hoznak létre, ezáltal a különálló mikrobákat összeragasztják, és a biofilmet a felülethez tapasztják. A háromdimenziós, a sejtek által kiválasztott mátrixot (tokot) glikokalixnak vagy EPS-nek (extracellular polymeric substance) is nevezik. (Jelenik-Nikolics, 2001; Kumar & Anand 1998.)

A biofilm kialakulásának fázisai a következők

3.2.1.1.A felület kondicionálása, molekuláris megtapadás

A vizes közegbe merített szilárd anyagok felületén makromolekulák és kis molekulatömegű hidrofób molekulák tapadnak meg, megváltoztatva ez által a felület töltését, és szabad energiáját, ezzel elősegítik a mikrobák megtapadását a felületen. (Marshall, 1992.). Az ipari gyakorlatban, a szilárd felületeken a tápanyagban gazdag közegből szerves és szervesetlen molekulák, fehérjék, szénhidrátok tapadnak meg, így az élelmiszeripari berendezésekben, csőrendszerek felületén diffúzió illetve a csőrendszerekben esetenként fellépő turbulens áramlás útján úgynevezett „kondicionáló film” alakul ki, mely a biofilmek megtapadása szempontjából előnyösen változtatja meg a felület hidrofobicitását és elektronikus töltését (Kumar, Anand, 1998). A kondicionáló réteg tápanyag ellátottsága is jóval nagyobb, (Hood, Zottola, 1997) mint az áramló vizes fázisé. Mindezek a tényezők együttesen segítik a biofilm kialakulásának következő lépését, a sejt megtapadást. A szakirodalomban található kísérletek eredményei egyaránt említik a molekuláris tápanyagok biofilm kialakulást gátló illetve segítő hatásáról. Így például Al-Makhafi és munkatársai (1995) publikációja szerint az albumin segítette a *Listeria monocytogenes* adhézióját. Míg Helke és munkatársai (1993) a tejfehérjék, (kazein és a β -lactoglobulin) *Listeria monocytogenes* és *Salmonella typhimurium* adhézióját gátló hatásáról számolnak be, addig Speers és Gilmour (1985) a búzafehérjék sejtmeztapadást segítő hatását találta bizonyítottnak. A biofilm

kialakulását szintén befolyásolja a felület anyaga és annak érdessége. Az élelmiszeripari gyakorlatban leggyakrabban használatos anyagok, úgymint rozsdamentes acél, alumínium, üveg, teflon, nylon mindegyike kiváló felületnek bizonyultak a biofilmek kialakulásáról szóló kísérletekben (Herald és Zottola, 1988a, b; Mafu et al., 1990; Blackman és Frank, 1996).

3.2.1.2. Mikrobák megtapadása

A biofilm kialakulásának második lépése, a mikrobák megtapadása történhet fizikokémiai úton, úgynevezett passzív adhézióval, illetve aktív módon. Az aktív adhézió gyorsan kialakul, de a kötődés nem erős. Ez reverzibilis biofilm kialakulásához vezet, szemben a passzív adhézióval, mely időigényesebb, de irreverzibilis megtapadást eredményez. Az aktív és a passzív adhézió párhuzamosan is végbe mehet, de mértékük függ az adott mikrobától és a felülettől (Marshall, 1992.). A reverzibilis kötődés kialakulásában elsősorban a van der Waals erő, elektrosztatikus erő és a hidrofób kölcsönhatások játszanak közre, míg az irreverzibilis kötődés esetén gyenge kölcsönhatások, úgymint dipól-dipól kölcsönhatás, hidrogén-, ionos- illetve kovalens kötések jellemzőek. Számos szakirodalom számol be arról, hogy a repulzív erők gátolják, míg a sejtfelszíni képletek és termékek (flagella, fimbria, pilus, EPS) segítik a sejtek szilárd felületen való megkötődését. (Jones & Isaacson, 1983). A felület fiziko-kémiai tulajdonságai, úgymint hidrofóbítás, hőmérséklet, pH szintén befolyásolják a sejtek megtapadását. Stanley (1983) vizsgálatában megállapította, hogy a *Pseudomonas fragi* rozsdamentes acélhoz való megkötődése a metabolikus folyamatok számára optimális pH 7-8 tartományban a legkifejezettebb. Szintén a környezeti pH meghatározó szerepét igazolta Herald és Zottola (1988a) *Y. enterocolitica* és *L. monocytogenes* esetében. Egy másik tanulmányukban emellett a hőmérséklet jelentőségét is kimutatták, a szilárd felszínhez való kötődés hő optimumát 21 °C-ban határozták meg (Herald & Zottola, 1988 b).

3.2.1.3. Mikrokolóniák kialakulása

Ebben a fázisban a felületen megtapadt mikrobák szaporodásnak indulnak, mikrokolóniákat hoznak létre, majd megkezdődik az EPS kiválasztása, amely a tulajdonképpeni biofilmet összetartja (Kumar & Anand, 1998; Marshall, 1992). A szilárd felületen korábban kialakult kondicionáló film és a mikrokönyezet egyaránt befolyásolja a mikrokolóniák növekedését és az EPS kialakulásának sebességét, annak összetételét. *Pseudomonas* törzsek által termelt poliszacharidok összetételét nagyban meghatározza a tápanyag ellátottság (Uhlinger & White, 1983).

3.2.1.4.A tulajdonképpeni biofilm kialakulása

A szilárd felszínhez tapadt, és ott szaporodásnak indult mikroba sejtek egy háromdimenziós mátrixot alakítanak ki, melyet az általuk termelt poliszacharid tart össze. A biofilm vastagsága függ az eltelt időtől, a biofilmet alkotó mikrobáktól és az elérhető tápanyagoktól. A biofilm felépítésében általában több mikroba faj is részt vehet, összetétele így heterogén, benne idővel különböző rétegek, a tápanyag ellátást szolgáló csatornák alakulnak ki. A kialakult biofilmben anyagcsere szempontjából több szintet is megkülönböztethetünk. A felülethez közeli részekben anaerob anyagcserét, a vizes fázishoz közeli részek aerob anyagcserét folytató mikrobák detektálhatók. (Marshall, 1992; Costerton et al., 1994a). A biofilmet alkotó különböző mikroorganizmusok egymásra gátló illetve segítő hatással is lehetnek. A több mikroorganizmusból álló, heterogén biofilmek általában vastagabbak és stabilabbak, mint az egyetlen törzs által felépítettek. Erre az eredményre jutott többek között Siebel és Characklis (1991) *Klebsiella pneumoniae* és *Pseudomonas aeruginosa* homogén illetve heterogén biofilmjét összehasonlítva. Szakirodalmi adatok alapján az is megállapítható, hogy a már kialakult *Pseudomonas fragi* biofilm a *Listeria monocytogenes* megtapadását és vastagabb biofilm kialakulását is segítette (Sasahara & Zottola 1993). A különböző mikroorganizmusok megtapadásában az EPS segítő szerepéről számol be más tanulmány is (Sutherland, 2001).

3.2.1.5.A biofilm terjedése, rekolonizáció

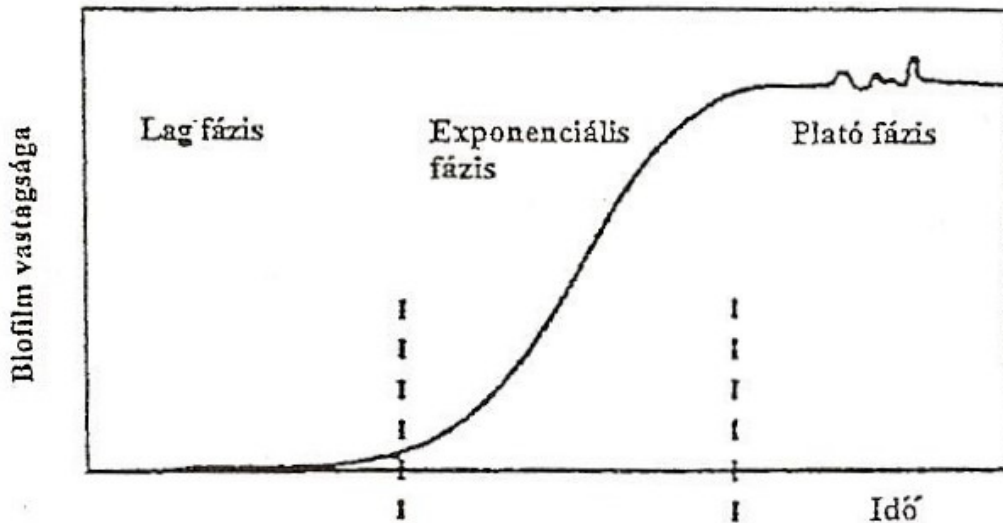
A biofilm növekedésének gátat szabnak az adott mikrokörnyezetben elérhető tápanyagok hiánya és az esetleg felhalmozódott anyagcseretermékek is, így a biofilm mátrix növekedése, vastagodása egy idő után már nem lehetséges. A felületen kialakult vastag réteg azonban különböző környezeti hatások eredményeképpen, felszakadozhat, abból kisebb mikrokolóniák leválhatnak és újabb felületen megtapadva a biofilm továbbterjedhet. Ilyen környezeti hatások lehetnek például a folyadék áramlási sebességének megváltozása, turbulens áramlás, kémiai szerekkel vagy fizikai módszerekkel végzett hatástalan biofilm inaktiválás (Applegate & Bryers, 1991; Marshall, 1992; Telgmann et al., 2004; Stoodley et al., 2001)

3.2.1.6.A biofilm növekedési kinetikája

A biofilm növekedési kinetikáját a (1. ábra) szemlélteti, mely szerint jellegzetesen három fázist különböztethetünk meg (Jelenik-Nikolics & Lévai, 2000).:

- *Lag fázis:* A diffúzióval, esetleg turbulens áramlással szállított mikroorganizmusok megtapadnak a felületen, amit a felület durvasága és a planktonikus sejtek száma nagymértékben befolyásol. A mikroorganizmus-szám ekkor nem nő szignifikánsan.

- *Exponenciális fázis:* Bizonyos idő után megkezdődik a logaritmusos osztódás, az EPS termelődés. A biofilm kialakult. Az újabb planktonikus sejtek egyszerűen megtelepedhetnek a biofilm felszínén, a felület tulajdonságai és a sejtszám itt már nem befolyásoló tényezők.
- *Plató fázis:* A biofilm stabilizálódott. Kiterjedése a tápanyagok mennyiségétől függ, valamint azoktól a nyíróerőktől, és egyéb behatásoktól, amik megsértik a biofilmet. Így nagyobb darabok hasadhatnak le, és szennyezhetik a rendszert.



A biofilm növekedésének szakaszai

1. ábra: A biofilm növekedésének szakaszai (Jelenik-Nikolics & Lévai, 2000)

Zárt, keringtetett rendszerekben a bakteriális biofilmek növekedése szempontjából meghatározó az áramlás típusa. Laminárisan áramló illetve álló vízben a biofilm tápanyag transzportja molekuláris diffúzió alapszik, ami a leglassabb tömegszállítási folyamat, így ez lassú biofilm növekedést jelent. Turbulens áramlás esetén fokozódik a tápanyag transzport a biofilmhez, így a biofilmet alkotó baktériumok szaporodása nagyobb lehet, mint lamináris áramlás esetén. (Jelenik-Nikolics & Lévai 2000)

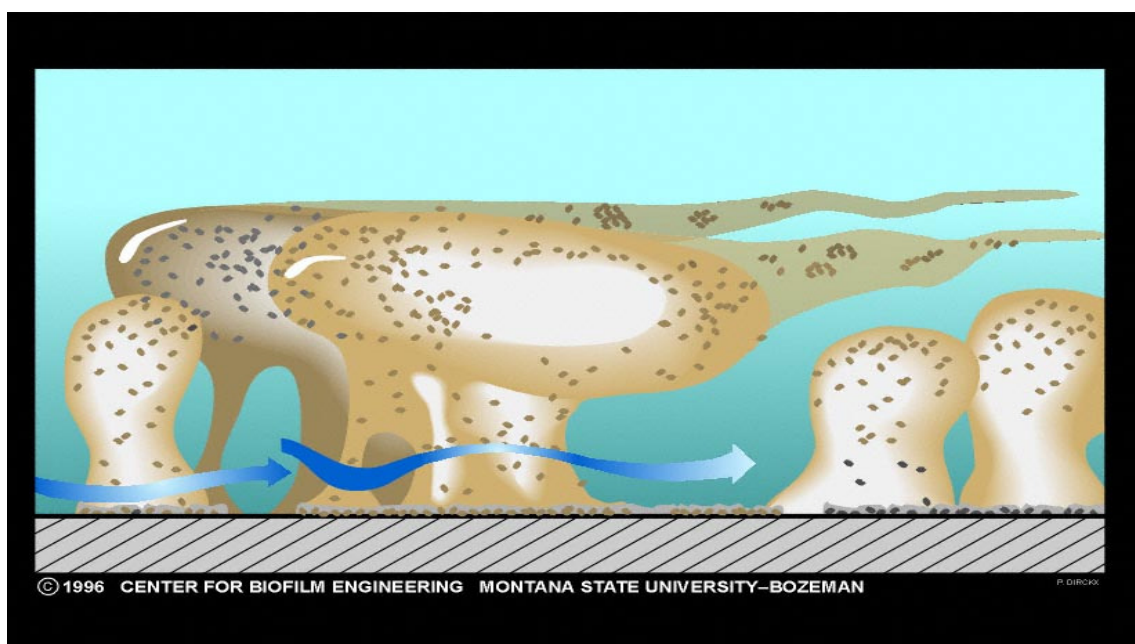
3.2.2. Az érett biofilm szerkezete

A kialakult biofilm mátrix összetétele az azt alkotó mikrobajektől, azok fiziológiai állapotától, és a felhasználható tápanyagoktól is függ. Átlagos összetételét az 1. táblázat mutatja.

1. táblázat: a biofilm mátrix összetétele (Sutherland, 2001)

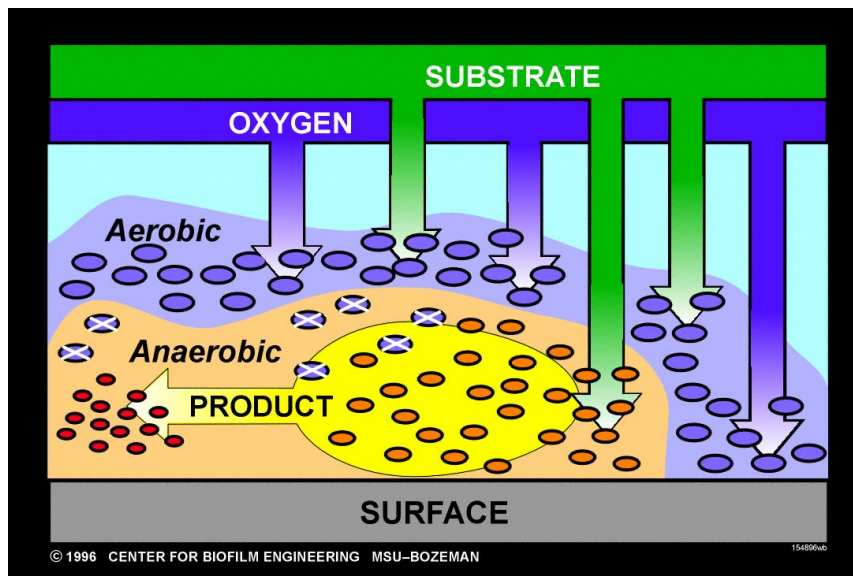
Komponens	A mátrix %-a
Víz	>97 %
Mikroba sejt	2-5 % (több faj)
Poliszacharidok (homo- és heteroszacharidok)	1-2 %
Fehérjék (extracelluláris, valamint sejtörmelék)	<1-2 % (többféle fehérje, enzimek)
DNS, RNS	1-2 % (sejtörmelék)
ionok	? (kötött és szabad)

Több tanulmány kimutatta, hogy a biofilm mátrixban kapillárisok, csatornák alakulnak ki, amelyeken keresztül a sejtek víz és a tápanyag ellátása biztosított (Poulsen, 1999; Costerton et al., 1994; Massol-Deyá et al., 1995). Ezt a szerkezetét jól illusztrálja a 2. ábra.



2. ábra: A biofilm szerkezete (www.erc.montana.edu)

A kialakult biofilmben a felülettől távolodva különböző anyagcserét folytató mikrobákat figyeltek meg. A felülethez közeli részekben anaerob anyagcserét, a vizes fázishoz közeli részekben aerob anyagcserét folytató mikrobák detektálhatók (3. ábra) (Marshall, 1992; www.erc.montana.edu).



3 ábra: Heterogén biofilm (www.erc.montana.edu)

3.2.2.1. Az EPS

Scanning elektronmikroszkóppal jól megfigyelhető jelenség, hogy a biofilm kialakulásának már korai szakaszában a szilárd felületen megtapadt sejtek egy vékony szálát kezdenek el kiválasztani (Firstenberg-Eden et al., 1979). A vékony, de idővel egyre vastagodó poliszacharid szál a már sokszor említett „extracellular polymeric substance”, azaz EPS néven ismert a szakirodalomban, melynek számos más funkciója mellett nagy szerepe van a biofilm mátrix aktív részeként, annak összetartásában. Ilyen meghatározó funkció például a szerves és szervetlen molekulák, tápanyagok megkötése, más mikroba fajok rögzítése a biofilmben (Bryers, 1984; Marshall, 1992). Az EPS a planktonikus sejtek megtapadásán kívül a biofilmet alkotó sejtek osztódása során keletkezett friss sejteket is rögzíti a biofilm felszínén, így biztosítva annak folytonos megújulását és vastagodását. Az EPS biofilmben betöltött aktív szerepét bizonyítja Vandevivre és Kirchman (1993) publikációja, mely arról számol be, hogy a szilárd felülethez tapadt sejtek emelkedett poliszacharid termelése folyékony tápközegbe visszaoltást követően az eredeti mennyiségre állt vissza, tehát a fokozott EPS termelés nem a biofilm sejtjeinek genotípusos változásának köszönhető, hanem egyfajta reakció a mikrokörnyezeti körülményekre. Az EPS további fontos szerepe a biofilm védelme a kedvezőtlen fizikai, kémiai környezeti hatásokkal szemben, úgymint, kiszáradás, hőhatás, kémiai fertőtlenítés, mechanikus tisztítás. Erre példa a számos szakirodalom által említett, a biofilmek fertőtlenítőszerekkel szembeni rezisztenciája (Krysinski et al., 1992; Frank & Koffi 1990; LeChevallier et al., 1988; Evans et al., 1991).

3.2.3. A biofilmek hasznosítása

A biofilmek hasznos tulajdonságait számos iparág is kiaknázza. A természetben előforduló biofilmek közrejátszanak a vizek minőségének fenntartásában. Az itt előforduló mikrobák segítik a toxikus anyagok biodegradálódását. A biofilmek szerves anyag megkötő képességét az öntözésre használt szennyvizek tisztításában is kihasználják (Fuchs et al., 1996). A természetes módon immobilizált mikrobacejtek a bioreaktorokban is használatosak, ezzel növelhető a fermentáció hatékonysága és stabilitása. (Demicri et al., 1993a, b; Demicri & Pormetto, 1995; Pakula & Freeman, 1996) Az ipari gyakorlatban a biofilmet alkotó mikrobák ecetsav-, etanol illetve poliszacharid képző tulajdonságát is hasznosítják. (Macaskie et al., 1995). A gasztrointesztinális traktusban természetesen előforduló tejsav baktériumok és *Bifidobacterium* fajok által képzett biofilmek mintegy védőréteget képeznek a patogén baktériumokkal szemben. Amennyiben kellő számban jelen vannak, segítik a bélflóra egészséges egyensúlyának fenntartását. (Fuller, 1989; Kumar & Anand, 1998).

3.2.4. A nem kívánatos biofilmek és jelentőségük az élelmiszeriparban

Az élelmiszeripar mindennapos higiénés feladatai között jelentős szerepe van a nem kívánatos biofilmek ellen való küzdelemnek. Biofilmek előfordulhatnak bármely zárt rendszerben: tartályokban, csővezetékben, CIP rendszerekben. Jellemzően azokon a pontokon, ahol az áramlási sebesség csökken, illetve amely helyek a tisztítás- fertőtlenítés során nehezebben elérhetőek így például tartályokban, hőcserélőkben, csőhajlatokban, tömítések mentén, mintavételi pontokban, holtágakban, membránok, szűrők felületén. A gyakorlatban ilyen, zárt csővezetékben megtapadt biofilmekkel találkozhatunk a gyógyszeriparban, ionmentes víz és desztillált víz rendszerekben (Jelenik-Nikolics, 2001), az élelmiszeriparban hasonló módon, termofil *Streptococcusok* okozhatnak gondot tejipari csővezetékben (Flint et al., 1997). Az ivóvízrendszerekben jelen lévő biofilmekről számos szakirodalom beszámol (Mackay et al., 1999; Momba & Binda, 2002; Park et al., 2001; Van der Kooij et al., 1982).

A biofilmek az élelmiszeripari termelő üzemek berendezéseiben igen súlyos higiénés problémát, termékkárosítást okozhatnak, kórokozók esetében pedig akár az élelmiszerbiztonságot is fenyegethetik. Ilyen, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campilobacter jejuni* és *Eshericia coli* O157:H7 által képzett biofilmről számol be az élelmiszeripar területéről Kumar, C.G. és Anand (1998). Fontos megemlíteni, hogy nem kizárólag a zárt termelő rendszerek belsejében kialakult biofilmek jelentenek veszélyforrást. Jelentős rizikófaktor a termelő környezetben, a mindennapi tisztító-fertőtlenítő takarítás ellenére is sokszor jelen levő biofilm is. Romlást okozó *Pseudomonas* fajokat izoláltak az élelmiszer feldolgozó környezetben; lefolyókon, padlókon,

gyümölcsökön, zöldségeken, húsok felületén, melyek biofilmet képeznek akár *Listeria*, *Salmonella* és más patogén fajokkal együtt (Chemielewski & Frank, 2003). Ivóvizet felhasználó élelmiszerüzemekben az ivóvízrendszerekben kialakult biofilmekbe beágyazódott patogén illetve fakultatív patogén baktériumok, így *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Mycobacter*, *Klebsiella*, *Campylobacter* spp illetve *Helicobacter pylori* potenciális élelmiszer biztonsági veszélyforrássá válhatnak (Mackay et al., 1999; Park et al., 2001; Buswell et al., 1998; Wadowsky et al., 1982; Burke et al., 1984; Armon et al., 1997; Momba et al., 2000). Helmi és munkatársai (2008) arról számolnak be, hogy patogén vírusok és protozoonok is képesek beágyazódni az ivóvízrendszerben kialakult biofilmekbe és abból akár 34 nap elmúltával is kimutathatóak.

A termék veszélyeztetése mellett a biofilmek jelentős gazdasági tényezők is. Hőcserélőkben, hűtőtornyokban megtelepedett biofilmek a hőátadást csökkentő hatásuk következtében közvetlen pénzügyi kárt okoznak (Lehmann et al., 1992). Vízrendszerekben, keringtetett csőrendszerekben az áramlás sebességét csökkentik, szűrőrendszerekben a membránok eltömődéséhez majd átszakadásához vezethetnek, metabolikus termékeik pedig a fém felületek károsodásához, rozsdásodáshoz vezethetnek (Costerton & Lappin-Scott, 1989).

A biofilmek inaktiválása igen nehéz, a felületen megtapadt sejteknek akár 500-szoros ellenállása tapasztalható az antimikrobás szerekkel szemben (Jelenik-Nikolics, 2001), a felülethez való erős kötődésük pedig az elhalt sejtek eltávolítását is jelentősen megnehezíti. A nem kellően hatásos biofilm eltávolítás során az EPS illetve az elhalt sejtek a felületen maradnak, melyek szerves anyagként táptalajul szolgálhat, illetve kedvező felületet ad újabb mikrobák megtapadására. A biofilm inaktiválásánál tehát olyan módszert kell találni, mely nem csak elpusztítja, de el is távolítja a felületről az ott kialakult biofilmet.

3.2.4.1. A biofilmek detektálása

A biofilmek detektálása a szilárd felszínhez való erős kötődés miatt a mindennapos élelmiszer mikrobiológiai gyakorlatban problémát okozhat. A zárt, keringtetett rendszerekben kialakult biofilm a rendszeresen vett minták esetében nem minden alkalommal mutat magas csíraszámot. Jellemző, lehet azonban egy-egy kiugróan magas érték, mely az áramlási viszonyok hirtelen megváltozása következtében egy biofilm-darab leszakadásából eredhet. Ezt a jelenséget kihasználva a biofilm detektálására hasznos lehet a mintavételt megelőzően átmenetileg turbulens áramlást előidézni. (Jelenik-Nikolics, 2001).

A biofilmben jelenlevő mikroba morfológiailag is különbözhet a planktonikus sejtől. Előfordulhat Gram-festésbeli eltérés, valamint *P. aeruginosa* esetében közel 50 %-os méretcsökkenést is észleltek, ami különösen veszélyes, hiszen így a mikrobák a 0,2 µm-es pórusú membránszűrőn is

átférnek (Jelenik-Nikolics & Lévai, 2000; Kumar & Anand, 1998). A detektálás eredményességét csökkenti az is, hogy számos biofilmet alkotó mikroba a kedvezőtlen környezeti hatások miatt (kevés tápanyag, hőhatás, kedvezőtlenül hideg környezet vagy kémiai anyagok) nehezen vagy egyáltalán nem tenyészthetővé válik. A tenyésztési eljárások mellett így nagy teret kapnak a különböző *in situ*, mikroszkópos módszerek, úgymint epifluoreszcens mikroszkópos, szkennig elektronmikroszkópos, atomi erő mikroszkóp (Kumar & Anand, 1998). Szintén az epifluoreszcens mikroszkóp biofilmek vizsgálatára való alkalmazásáról számolnak be Wirtanen és munkatársai (1996) illetve Strathmann és munkatársai (2002). Az epifluoreszcens- valamint a pásztázó elektron mikroszkóp használata a biofilmek vizsgálatában elterjedt. (Cloete & Jacobs, 2001; Strathmann et al., 2002; Camper et al., 1999) Ezek mellett számos más mikroszkópos technikáról számolnak be Surman és munkatársai (1996), úgymint Hoffman modulációs kontraszt mikroszkóp, Differenciális interferencia kontraszt mikroszkópia, pásztázó elektron mikroszkópia, transzmissziós elektron mikroszkópia, atomi erő mikroszkópia, pásztázó konfokális lézer mikroszkópia illetve környezetszimulációs pásztázó elektronmikroszkópia. Bizonyos mikroszkópos technikák alkalmazásakor feltétlenül szükséges a biofilmek festése. Erre több módszer is használható, különböző festékek vannak a sejtek, valamint az EPS mátrix láthatóvá tételére. Fluoreszcens festékekkel jelölt lektinek (fluoreszcein izotiocianáttal jelölt concanavalin-A, concanavalin-A488 illetve tetrametil rodamin izotiocianáttal vagy Alexafluor 488-al jelölt búzacsíra-agglutinin) az EPS-ben található szénhidrátokhoz kötődnek, így a mintát epifluoreszcens, vagy pásztázó konfokális lézer mikroszkóppal vizsgálva az EPS láthatóvá válik. (Strathmann et al., 2002; Hassan et al., 2002). Az EPS mellett a biofilmet alkotó sejteket is megfesthetjük különböző festékekkel, mint például az akridin narancssal (Surman et al., 1996). Camper és munkatársai (1999) a fent említett mikroszkópos technikák mellett molekuláris módszerek használatáról számolnak be, így a nukleinsav festéséről vagy fluoreszcens anyaggal illetve radioaktív anyaggal való jelöléséről illetve *in situ* hibridizációról. Ezek a módszerek a biofilmet alkotó sejtek metabolikus aktivitásáról is képet adhatnak.

A fent említett *in situ* módszerek előnye, hogy a felületen kialakult biofilmet közvetlen képes vizsgálni, hátránya azonban hogy azt a rendszerből ki kell emelni, így a használati jelentősége olyan helyszínekre limitált, ahol beépíthető és onnan könnyen kiemelhető próbafelületek a rendszer megzavarása és mikrobiológiai rizikó nélkül alkalmazhatóak. Alacsony tápanyag tartalmú rendszerekben, mint például a pl. vízrendszerek jól alkalmazható monitoring rendszer lehet a TOC (Total Organic Carbon) illetve DOC (Dissolved Organic Carbon) mérése. Számos publikáció szerint azonban ezek a mérések ellentmondásos eredményeket adhatnak (Delille et al., 2007; Van der Kooij et al., 1982). A legújabb szakirodalmi publikációk (Delille et al., 2007; Quilès et al., 2010) az ATR-FITR (Attenuated Total reflectance-Fourier Transform Infrared) spektroszkópia

sikeres alkalmazásáról számolnak be laboratóriumi modell körülmények között. Bár a módszer még fejlesztést igényel, nagy előnye hogy a zárt rendszereket egy egyszerű by-pass megoldással helyben, valós időben tudja monitorozni.

3.2.4.2.A biofilmek antimikrobás szerekkel szembeni rezisztenciája

A biofilmet alkotó, felülethez tapad, EPS mátrixba beágyazódott sejtek antimikrobás szerekkel szembeni ellenállása szignifikánsan nagyobb a planktonikus sejtekénél (Frank & Koffi 1990; Krysinski et al., 1992; Kim et al., 2007). Ez több tényezőre vezethető vissza, melyek közül a legismertebb az EPS mechanikus védelme. A biofilm mátrixot összetartó poliszacharidon keresztül a fertőtlenítőszer csak lassan vagy egyáltalán nem képesek átdiffundálni. Ehhez járul hozzá az a körülmény, hogy a biofilm belsejében éhező állapotba lévő, csökkent anyagcserét folytató sejtek a toxikus anyagokat is lassabban veszik fel (Evans et al., 1991). A sejtek elhelyezkedése is magyarázatot ad az antimikrobás szerekkel szembeni rezisztenciára. A felülettel érintkező sejtek ugyanis csak a külső felületükkel érintkeznek az őket körülölelő mikrokörnyezettel, a szilárd felülettel érintkező részük nem. Ezeket a sejteket a szilárd felületről eltávolítva a rezisztencia nem észlelhető (Frank és Koffi, 1990). A fenti elméletet támasztják alá Kim és munkatársainak kísérleti eredményei (2007). Publikációjukban 13 különböző, kereskedelemben kapható fertőtlenítőszer hatékonyságát hasonlítják össze *Enterobacter sakazakii* törzsoldata ellen szuszpenzióban, rozsdamentes acél felületre szárítva, illetve szintén rozsdamentes acél felületen kialakult biofilm esetében. Mindegyik, általuk vizsgált fertőtlenítőszer a szuszpenziós tesztben mutatta a legnagyobb és a biofilm esetében a legkisebb hatékonyságot. Szintén a biofilm illetve a planktonikus sejtek fertőtlenítőszerekkel szembeni érzékenységében mutatkozó különbségre mutatnak rá Wirtanen és munkatársai (2001). Tanulmányukban különböző hatóanyagú fertőtlenítőszeret vizsgálva a szabadon lebegő *Pseudomonas* sejtek ellen a tenzid illetve peroxid hatóanyagú fertőtlenítőszer, míg a biofilm inaktiválására a peroxid és a klór hatóanyagú fertőtlenítőszer bizonyult a leghatékonyabbnak.

LeChevallier, és munkatársai. (1988) a hipoklórossav és a monoklóramin biofilm roncsoló hatását vizsgálva megállapították, hogy míg a monoklóramin képes behatolni a glikokalixon keresztül a biofilm belsejébe, addig a hipoklórossav erre nem képes. Így a monoklóramin esetében 100-szoros, a hipoklórossav esetében 3000-szeres rezisztencia mutatkozott a felülethez kötött mikrobáknál a planktonikushoz képest. Dhaliwal és munkatársai (1992) szintén kimutatták, hogy a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* és *Listeria monocytogenes* planktonikus sejtjeihez képest a különböző szilárd felületekhez (PVC, teflon, plexi, fa, gumi, rozsdamentes acél) tapadt sejtek emelkedett rezisztenciáját mutattak. Hasonló eredményekről számol be Mosteller és Bishop

(1993) *Pseudoonas fluorescens*, *Yersinia enterocolitica* és *Listeria monocytogenes* Teflon illetve gumi felülethez tapadt biofilmjét és planktonikus sejtjeit különböző fertőtlenítőszerrel kezelve.

3.2.4.3. A biofilmek inaktiválása

A biofilmek inaktiválása és eltávolítása nagy nehézséget okoz az élelmiszeriparban, az antimikrobás szerekkel szemben kialakult nagyfokú rezisztencia valamint az EPS felülethez való erős tapadása miatt. A nem kellően hatékony fertőtlenítő és tisztító eljárások után az elpusztított sejtek illetve az EPS a felületeken maradvá kiváló táptalajt és könnyű megtapadási felületet nyújtanak a planktonikus sejteknek, ezzel elősegítve az újabb biofilm gyors kialakulását. A hatástalan fertőtlenítő eljárás után a felületen maradt vékony biofilm réteg illetve az élő, de nem tenyészthető sejtek idővel regenerálódhatnak, és a felületen található tápanyagokat hasznosítva újabb biofilm képződése indulhat el, az adott kémiai szerrel szemben most már akár rezisztens mikrobióta kialakulásával (Zottola & Sasahara, 1994; Hood & Zottola, 1995).

A biofilmek inaktiválása történhet kémiai, fizikai, módszerekkel, biológiailag aktív szerekkel illetve ezen eljárások kombinálásával.

Biofilmek inaktiválása kémiai módszerekkel:

A fentiekben részletezett okok miatt a biofilmek elleni küzdelem során nem elégedhetünk meg a hagyományos túlélő sejtszám vizsgálatok eredményeivel. Előfordulhat, hogy a biofilmet összetartó EPS illetve hagyományos módszerrel nem kimutatható, élő, de nem tenyészthető sejtek maradnak a felületen. Ilyen, eredménytelen biofilm inaktiválásról számolnak be Meiller és munkatársai (1999) publikációjukban. Fogászati vízrendszer fertőtlenítési kísérletükben három különböző hatóanyagú fertőtlenítőszer alkalmaztak, Na-hypokloritot, glutáraldehidet és izopropil alkoholt. Bár a fertőtlenítés utáni mintákban nem sikerült túlélő mikroorganizmust kimutatni, a felületek mikroszkópos vizsgálatával megállapíthatóvá vált, hogy a biofilm mátrixot a szerek nem távolították el. Az ismételt mikrobiológiai mintázások már másnap kimutattak élő sejtszámot, 15 nap elteltével pedig a biofilm ismét felépült, a Kontrollal megegyező élő csíraszámot tapasztaltak. Más szakirodalmi adatok szintén arról tesznek tanúságot, hogy *P. fluorescens*, *L. monocytogenes* és *B. subtilis* biofilmet 12 %-os hipoklorit oldattal 30 perc alatt sikerült ugyan inaktiválni, azonban a kezelés után is kimutatható volt a felületen a glikokalix mátrix. (Wirtanen et.al. 1992).

A biofilm szerkezetét, annak emelkedett rezisztenciáját figyelembe véve, a megfelelő fertőtlenítőszer kiválasztásával, különböző kémiai fertőtlenítő eljárások kombinálásával eredményes biofilm inaktiválást érhetünk el. Számos publikáció említi az oxidálószer EPS polimerizáló hatása miatti erőlyes biofilm eltávolító és fertőtlenítő hatását, így a perecetsav (Holah et al., 1990), az aktív klór (Kumar & Anand, 1998), illetve hidrogén peroxid (Christensen, 1989; Juven & Pierson, 1996) használatával eredményes biofilm inaktiválást végezhetünk.

Ezüst és réz együttes alkalmazása hatékonynak bizonyult a hűtőtornyok biofilm elleni védelmében (Kim et al., 2004), azonban Silvestry-Rodriguez és munkatársai (2008) az ezüst 100 µl/l koncentrációs koncentrációja esetében e fertőtlenítő eljárás hatástalanságáról számol be. Szintén a különböző hatóanyagok kombinációjára jó példa Oh és Marshall (1995) közleménye, melyben a monolaurin szerves savakkal kombinált alkalmazásáról számolnak be. Wirtanen és munkatársai (1996) pedig a kelátképzőkkel, (EDTA) kombinált lúgos tisztítószeres biofilm eltávolító hatékonyságát mutatták ki. A tisztító hatással is rendelkező fertőtlenítőszeresekben segédanyagként gyakran alkalmaznak felületaktív vegyületeket. Cloete és Jacobs (2001) a különböző felületaktív szerek biofilm eltávolító hatását vizsgálva a nem ionos felületaktív szert jelentősen hatásosabbnak találta az anionoshoz képest. Karpanen és munkatársai (2008), a klórhexidin diglukonát illóolajokkal (teafaolajjal, eukaliptusz olajjal és thymollal) való kombinációját vizsgálva megállapították, hogy a thymol és klórhexidin diglukonát biofilm inaktiváló hatása egymással szinergizmust mutat, a kombináció hatékonysága szignifikánsan nagyobb, mint az alkotóké egymagukban.

Különös nehézségekkel kell megküzdeni abban az esetben, ha az élelmiszeripari üzem számára hasznos starterkultúrákat megőrizve kell a káros biofilmeket inaktiválni, eltávolítani. Ilyen esetben a fertőtlenítő eljárások szelektivitása nem nélkülözhető. A *Lactobacillus* spp. és *Staphylococcus carnosus*, mint hasznos mikrobióta mellett, a *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* és *Listeria monocytogenes* biofilmek inaktiválását tűzték célul Ammor és munkatársai (2004). Kísérleteikben megállapították, hogy a különböző, az élelmiszeriparban használatos fertőtlenítő eljárások közül a leginkább szelektívnek, de kellőképpen hatékonynak a monolaurin (0.075% w/v) ecetsavval kombinált oldata (pH 4,5) bizonyult.

Biofilm inaktiválás biológiailag aktív szerekkel

Johansen és munkatársai (1997) vizsgálatai arra mutatnak, hogy a biofilmek eltávolításában segítségre lehetnek bizonyos enzimek. A glukózoxidáz, laktoperoxidáz kombináció baktericid hatása megfelelő volt *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. mutans*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa*, *A. viscosus*, *F. nucleatum* biofilmek ellen, a felületről való eltávolítás azonban nem járt sikerrel. Poliszacharid-hidrolizáló enzimek keverékével eltávolították a mikrobákat a felületről, de nem volt szignifikáns baktericid hatás. Az említett enzimek együttes használatával teljes mikrobaölő és biofilm eltávolító hatást detektáltak.

A tejsavbaktériumok által termelt nisin alkalmazása segíthet megelőzni a biofilmek kialakulását. Felületre adszorbeált nisin csökkentette a *L. monocytogenes* kontaminációt (Daeschel et al., 1992). A bakteriocinek élelmiszeripari csomagolóanyagon való sikeres alkalmazásáról számolnak be Ming és munkatársai (1997).

Biofilm inaktiválás fizikai módszerekkel

Jelenik-Nikolics és Lévai (2000) valamint Jelenik-Nikolics (2001) a biofilm eltávolítás fizikai módszereiről számolnak be. Jó eredményekkel alkalmazható a mechanikus biofilm eltávolítás, mely során a biofilmmel fertőzött csővezetéken rugalmas szivacsabdákat pumpálnak át. Zárt, keringtetett rendszerekben a folyadékáram nyíróerejét hasznosíthatjuk a biofilm inaktiválására. A biofilm magas víztartalma a fagyasztásos technikát is lehetővé teszi, mely során lassú fagyasztással nagyméretű jégkristályok keletkeznek. Felolvasztás után a biofilm teljes eltávolítása is lehetséges. Okuno és munkatársai (1993) valamint Pothakamury és munkatársai (1993) a szuper erős mágneses teret alkalmazták sikeresen biofilmek inaktiválására. A pulzáló elektromos tér alkalmazásáról is sikeres kísérletek számolnak be (Hamilton & Sale, 1967; Castro et al., 1993; Pothakamury et al., 1993).

Kombinált biofilm inaktiválási módszerek

A biofilm inaktiválása leghatékonyabban a felsorolt módszerek kombinációjával lehetséges. A felületről eltávolított sejtek kémiai szerekkel szembeni rezisztenciája jelentősen kisebb, mint a biofilmet alkotóké. Így nagy jelentőséggel bír a mechanikus tisztítással kombinált fertőtlenítés (Blenkisopp & Costerto, 1991; Brackett, 1992; Wirtanen & Mattila-Sandholm, 1993; 1994).

A monolaurint nagy hatékonysággal kombinálta 5 perces 65 C-os hőkezeléssel *L. monocytogenes* biofilm eltávolításra Oh és Marshall (1995). Hasonlóan, Antoniou és Frank (2005) sikeresen használta a hőkezeléssel kombinált lúgos tisztítószerekkel való tisztítást *Pseudomonas putida* biofilm eltávolítására rozsdamentes acél felületről.

3.2.4.4. A biofilmek kialakulásának megelőzése

A kialakult biofilmek inaktiválása mellett nem szabad megfeledkeznünk a megelőzés fontosságáról. Az üzem illetve a technológia tervezésekor szem előtt kell tartani, hogy a biofilmek a legkönnyebben azokon a helyeken alakul ki, melyek tisztítása nehéz vagy egyáltalán nem megoldott, zárt csővezetékek esetén a csőhajlatok, holtágak a hegesztési felületek számítanak rizikós helynek. Szintén könnyen kialakul biofilm a hőcserélők, membránszűrők, szelepek felületén. A csővezetékek, berendezések anyagának kiválasztásakor szem előtt kell tartani azok fertőtleníthetőségét, mechanikus tisztítással, magas hővel szembeni ellenálló képességét. Különböző, az élelmiszeriparban használatos felületek tisztíthatóságáról számos irodalmi publikáció található. Krysinski és munkatársai (1992) a rozsdamentes acél felület tisztíthatóságát és fertőtleníthetőségét szignifikánsan jobbnak találta a poliészter illetve poliészter/poliuretán felülettel összehasonlítva. Más publikáció (LeClercq-Perlat & Lalande, 1994) új állapotú rozsdamentes acél, polivinil, nylon és üveg felületek tisztíthatóságában szignifikáns eltérés nem tapasztalt, ugyanakkor többszöri mechanikus tisztítás után a karcosodás a rozsdamentes acél felületnél volt a legenyhébb,

Így itt is bebizonyosodott, hogy a tisztíthatóságát ez az anyag őrzi meg legtovább. Jól alkalmazhatók az élelmiszeriparban bizonyos, a baktériumok megtapadását gátló anyagok. Ronner és Wong (1993) különböző anyagból készült felületek baktericid hatását vizsgálva a Buna-n gumit találták leghatékonyabbnak a biofilm képződés megelőzésére *L. monocytogenes* esetében, azonban az itt megtapadt sejtek ellenállóbbnak bizonyultak a fertőtlenítőszerekkel szemben, mint a rozsdamentes acél felületen kialakult biofilm.

A kémiai tisztító illetve fertőtlenítőszerektől az azoknak nem ellenálló felületeken korrózió alakulhat ki, melyek egyaránt csökkentik a fertőtlenítés hatékonyságát, mi több ideális felületet nyújtanak a biofilmek kialakulásának (Dunsmore et al., 1981). A belső felületek rendszeres ellenőrzése, karbantartása segíthet a felületek simaságának megőrzésében. A legkisebb felületi érdesség, korrózió, lerakódás, hegesztési felület elégtelensége egyaránt a biofilmek kialakulásához vezethet.

Jól működő üzemekben a rendszeres tisztítás és fertőtlenítés, karbantartás bír nagy jelentőséggel. Fontos a megfelelő fertőtlenítőszer kiválasztása is. Kool és munkatársai (1999) nozokómiális legionellózis előfordulását vizsgálva aktív klórral illetve monoklóraminnal fertőtlenített vízrendszereket működtető kórházakban arra a következtetésre jutott, hogy a legionellózis szignifikánsan gyakrabban fordult elő az aktív klórral fertőtlenített vízrendszerekkel rendelkező kórházakban. Ezek a statisztikai eredmények arra engednek következtetni, hogy a monoklóramin hatásosabb a *Legionella* biofilm elleni megelőző fertőtlenítésben. Hasonló eredményekre jutott Momba és Binda (2002). Az aktív klór és monoklóramin kombinációjával alkalmazott fertőtlenítést követően a biofilm újraépülését a fenntartó jelleggel, 0.35 mg l⁻¹ koncentrációban jelen lévő monoklóramin megakadályozta mind rozsdamentes, mind galvanizált acél felületen, míg az aktív klór erre nem volt képes.

A kémiai szerekkel szemben kialakuló rezisztencia kialakulásának valószínűségét csökkenti a fertőtlenítőszerek meghatározott rendszer szerinti rotálása. Mindemellett a mechanikus tisztítás szükségességét nem lehet elégszer hangsúlyozni.

3.3. A penészgombák jelentősége palackozott forrás- és ásványvíz előállításakor

A szakirodalmi áttekintésem e fejezetében a penészgombák ivóvíz ellátó rendszerekben illetve palackozott ivóvizekben való előfordulásáról, potenciális patogenitásukról megjelent publikációkat igyekszem összegezni, kiemelve a penészgombák jelentőségét a palackozott forrás- és ásványvízgyártás szempontjából.

A penészgombák ivóvizekben való jelenlétével az elmúlt évtized előtt igen csekély szakirodalmi publikáció foglalkozott. Napjainkban megfigyelhető, hogy az élelmiszer mikrobiológia figyelembe téma felé is kezd fordulni, bár az ez irányú szócikkek száma még mindig igen csekély. Az ivóvíz mikrobiológiájával foglalkozó szakirodalomban relatíve kis érdeklődés oka az, hogy a penészgombák egészségkárosító hatása ellentétben a jól ismert és sokat vizsgált patogén baktériumokéval, vagy vírusokéval általában nem jelentkezik azonnal, és nem mutat akut tüneteket. Ugyanakkor vannak publikációk, amelyek beszámolnak a penészgombák allergiás, krónikus patogén, hatásáról is (Hageskal et al., 2009; Denning et al., 2006; Jaakkola et al., 2002; Lugauskas et al., 2004; Schwab & Straus, 2004). A penészgombák közvetlen patogenitása mellett egy másik, az élelmiszeripar egyéb területein gyakran vizsgált terület a mikotoxinok termelődése. A közelmúltig nem volt fellelhető publikáció, amely a penészgombák ivóvízben való mikotoxin termelődését bizonyította volna. A legújabb publikációk azonban már kimutatták a mikotoxinok vízben való termelődésének lehetőségét is (Criado et al., 2005; Paterson et al., 1997; Russel & Patterson 2007).

3.3.1. A penészgombák előfordulása és jelentősége a vezetékes ivóvíz ellátó rendszerekben

A fonalas illetve sarjadzó gombák felszíni, illetve felszín alatti vizekben való előfordulásáról szakirodalmi publikációk számolnak be, a szerzők azonban mindenesetben kiemelik, hogy számuk igen csekély, nagyságrendekkel elmarad az ugyanazon környezetben kimutatható baktériumokétól (Leclerc & Moreau, 2002). Bár bizonyos gombák részesei lehetnek a vizes közegek természetes mikrobiotájának, azonban jelentős hányaduk a szárazföldi környezethez adaptálódott, így leggyakrabban szerves anyagokból, földből, és a levegőből mutathatók ki. E gombafajok számos alkalommal épp úgy kimutathatók, mind a vezetékes-, mind a palackozott ivóvizekben, de jelenlétük mindenképpen környezeti kontaminációra utal (Hageskal et al., 2009).

Frankova és Horecka (1995) mérései alapján, szlovákiai kútvezetek és vezetékes vízhálózatból vett minták 44 %-ban volt kimutatható *Cladosporium* 30%-ban *Penicillium* és 4,5%-ban *Alternaria* nemzetségekbe tartozó fajok. Nagy és Olson 1982 hasonlóan, vezetékes ivóvíz hálózatból vett mintáik 28%-ában *Penicillium*, 2,5 %-ában *Alternaria* nemzetségekbe tartozó fajokat identifikáltak. Hinzelin és Block (1985) szintén vezetékes ivóvíz hálózatban *Penicillium* fajok jelenlétét igazolta a

mintáik 23%-ában, *Cladosporium* fajokat pedig a minták 4,6%-ában. Hasonlóan, lakossági ivóvíz rendszerből identifikált fonalgombákról számol be számos más szerző is (Goncalves et al., 2006; Göttlich et al. 2002; Hageskal et al., 2006; 2007; 2008; Lahti, 1993; Kanzler et al., 2007; Niemi et al., 1982). Hageskal és munkatársai (2009) által elvégzett statisztikai elemzés szerint a penészgombák előfordulása az ivóvizekben igen változó mértékű lehet. A vizsgált mintáknak olykor mindössze a 7,5 százaléka mutatott pozitívítást, de esetenként ez az arány elérte az akár a 89%-ot is. Az is kimutatható, hogy a felszíni víz eredetű ivóvizekben háromszoros gyakorisággal fordul elő penészgomba a felszín alatti forrással rendelkezőkhöz képest. Szintén gyakoribb az előfordulásuk a hideg, mint a meleg vízrendszerekben.

A vízellátó rendszerekből izolált penészgombák között fakultatív patogének, patogének illetve allergén fajok is előfordulnak, melyek immunszuppresszált betegeknél súlyos megbetegedést okozhatnak. Az oslói egyetemi kórházban a vezetékes vízrendszer csapjaiból vett minták 49 %-a pozitív volt *A. fumigatus* fajra. (Warris et al., 2001). Anaissie és munkatársai (2002), valamint Warris és munkatársai (2001) kimutatták, hogy a kórházi mosdókban, tusolás után vett levegőmintában mind a *Fusarium* spp. mind az *Aspergillus* spp. koncentrációja jelentősen emelkedett. Szintén kórházi vízvezetékben előforduló penészgombák jelentőségére hívják fel a figyelmet más szerzők (Arvanitidou et al., 1999; Anaissie et al., 2001; 2003; Arvanitidou et al., 2000; Hapcigolu et al., 2005; Panagopoulou et al., 2002; Pires-Goncalves et al., 2008; Warris et al., 2002). Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a kórházi vízellátó rendszerek nagy szerepet játszhatnak a nozokómiális gombás fertőzések terjedésében. (Hageskal et al., 2009). Hasonló körülmények között a patogének mellett allergén fonalgombák, úgymint *Aspergillus fumigatus*, *Mucor* spp., *Absidia*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma viridae* okozhat bőrirritációt, allergiás asztmát illetve hiperszenzitív tüdőgyulladást (Hageskal et al., 2006; 2009; Denning et al., 2006; Jaakkola et al., 2002; Lugauskas et al., 2004; Schwab & Straus 2004). A felsorolt számos szakirodalmi hivatkozás mindegyike a fonalgombák patogenitását illetve allergizáló hatását a bőrrel való közvetlen találkozásra illetve a fertőzött aeroszol cseppek valamint a penészgomba spóráinak belélegzésére vezeti vissza. Mindezek mellett meg kell említeni, hogy bár nem található egyértelmű szakirodalmi adat a fonalgombák allergizáló hatására a fertőzött ivóvízzel való elfogyasztás után, ez a rizikó faktor sem zárható ki (Hageskal et al., 2009).

Az ivóvízben jelenlévő fonalgombák az egészségkárosító hatás mellett az ivóvíz érzékszervi károsítását is okozhatják. Montiel (1999) és munkatársai valamint Nyström és munkatársai (1992) publikációikban külön kiemelik a penészgombák ivóvízre gyakorolt káros érzékszervi hatását.

Mindezeket figyelembe véve igen fontos szempont, hogy a vezetékes ivóvízellátás célját szolgáló a vízkezelés során az alkalmazott fertőtlenítő eljárások a penészgombák ellen is hatékonyak legyenek. A rutinszerűen alkalmazott klór azonban nem látszik megfelelőnek ebből a szempontból, hiszen a

szakirodalmi adatok egyértelműen rámutatnak arra, hogy *Cladosporium*, *Penicillium* és *Alternaria* fajok gyakran kimutathatóak a klórozott vezetékes vízből. A klór-dioxin illetve ózonkezelés azonban hatásosnak bizonyul (Hageskal et al., 2009). A szintén gyakran alkalmazott UV kezelést egyes szakirodalmi utalások hatásosnak tartják (Kanzler et al., 2007), míg más szerzők szerint az UV sugárzással szemben a nagy pigment tartalmú penészgombák rezisztenciát mutathatnak (Hageskal et al., 2009; Riberio et al., 2006). A kórházi vízellátó rendszerek intézményen belüli fertőtlenítésére a réz illetve ezüst ionok alkalmazását javasolja Pedro-Botet és munkatársai (2007), míg Hageskal és munkatársai a felhasználás helyén történő szűrést tartja hatásosnak. Riberio és munkatársai (2006) publikációjukban arról számolnak be, hogy a 0,4 µm pórusátmérőjű szűrő a penészgombák ellen csak rövid ideig volt hatásos. A szűrés után vett minták arra utalnak, hogy azon a micéliumok átnőhetnek és a túoldalalon is képesek sporulálni. Fontos tehát a szűrők hatékonyságának rendszeres ellenőrzése és azok szükség szerinti cseréje.

3.3.2. A penészgombák előfordulása és jelentősége a palackozott forrás- és ásványvizekben

A penészgombák palackozott ivóvízben való előfordulásáról kevés szakirodalmi adat lelhető fel. A szabad szemmel is látható penészfonalak esetenkénti jelenléte a kereskedelemben kapható palackozott ivóvizekben azonban egyértelművé teszi a fonalgombák termékkárosító hatását. E termékek mikrobiológia vizsgálata során az is világossá vált az élelmiszer mikrobiológusok számára, hogy a palackozott ivóvizekben előforduló termékkárosító penészek patogének, fakultatív patogének illetve mikotoxin termelők is lehetnek. Arra is fellelhetők szakirodalmi adatok, hogy a szemmel nem észlelhető termékkárosítás esetén is előfordulnak fonalgombák mind a palackozott forrás- és ásványvizekben mind a vízkezelésen átesett palackozott ivóvizekben is.

3.3.2.1. Penészgombák a palackozott forrás- és ásványvizekben

Cabral és munkatársai (2002) több lépésben, összesen 126 palack szénsavmentes ásványvizet vizsgáltak, melyek egy részében szemmel látható micélium növekedés volt tapasztalható. Azokban a palackokban, melyekben szabad szemmel látható telep mutatkozott, a minták 50 %-ban volt kimutatható *Cladosporium cladosporoides*, 46%-ban *Penicillium* spp. és 21%-ban *Alternaria alternata*. A palack falára tapadó telepből kizárólag *Cladosporium cladosporoides* volt kimutatható, a többi fajra a szabadon lebegő, felhőszerű képlet volt a jellemző. A szabad szemmel látható penész telepet nem tartalmazó mintáknál az arány hasonló volt, a minták 33-46%-ában *Penicillium*, 17-32%-ban *Cladosporium* volt kimutatható. A kimutatható penészgomba szám meglepően kicsinek bizonyult, a legnagyobb érték a 70 TKE/100 ml volt. Ez az eredmény is tükrözi azt a jól ismert ténytet, hogy a kimutatható penész szám nincsen minden esetben korrelációban a termékkárosítás mértékével (Hageskal et al., 2009). Cabral és munkatársai (2002) fent részletezett eredményeihez

igen hasonló tapasztalatokról számolnak be Fujikawa és munkatársai (1997), akik Tokióban kapható palackozott ásványvizet vizsgálva a legnagyobb számban *Penicillium*-ot, majd sorrendben *Acremonium*-ot és *Cladosporium*-ot izoláltak.

3.3.2.2. Laboratóriumi körülmények között beoltott penészgombák túlélése, szaporodása a palackozott forrás- és ásványvizekben

A kereskedelembe kapható palackozott forrás- illetve ásványvízben való penészek számszerű meghatározása és identifikálása mellett a laboratóriumi körülmények között beoltott penészek túlélésének vizsgálatára is fellelhetők szakirodalmi publikációk. Fujikawa és munkatársai (1999) olyan *Penicillium* spp és *Cladosporium* spp. törzseket használtak fel kísérleteikben, melyek korábban szemmel látható telepet képeztek kereskedelembe kapható palackozott ásványvízben. Kísérleteik során a penészgombákat sterilre szűrt, illetve nem sterilizált, szénsavmentes ásványvizet tartalmazó palackokba oltotta. Eredményeik az autochton mikrobióta penész gátló hatásáról tesznek tanúbizonyságot. A nem sterilizált palackokba oltott penészek ugyanis nem mutattak sem telepszám növekedést, sem szemmel látható micéliumképzést a palackokban. Ezzel szemben a beoltás előtt sterilre szűrt ásványvizet tartalmazó mintákban mind szemmel látható micélium képződés, mind élő penészszám növekedést tapasztaltak.

Criado és munkatársai (2003) a PET palackokból kioldódó szerves anyagok szénsavmentes ásványvizet tartalmazó palackokba oltott *P. citricum*, *A. alternata* illetve *C. cladosporioides* szemmel látható micéliumképzésére gyakorolt hatásáról számolnak be. A palackok egy részét előinkubálták, azaz 5 hónapon keresztül tárolták, így ezekben az ásványvizekben megnövekedett a PET palackból kioldódott szerves anyag. A beoltás előtt előtárolt palackokban a penészgombák korábban képeztek szabad szemmel látható micéliumokat, mint a beoltás előtt nem tárolt palackokba oltott penészek.

Az említett kísérleti eredmények ismét rávilágítanak az autochton mikrobióta jelentőségére, másrészt felhívják a figyelmet a csomagolóanyag megválasztásának fontosságára, valamint a tárolási idő csökkentésének jelentőségére.

3.3.2.3. A palackozott forrás- és ásványvizekben előforduló penészgombák patogenitása, mikotoxin termelése vízben

Számos alkalommal izoláltak olyan *Aspergillus* és *Penicillium* fajt a palackozott forrás- és ásványvizekből, melyekről régóta közismert, hogy megfelelő körülmények között mikotoxint képesek termelni élelmiszerekben. Arról is beszámolnak szakirodalmi publikációk, hogy a penészgombák növekedése ill. szaporodása és a mikotoxinok termelődése nem feltétlen jár együtt, mivel ez utóbbihoz gyakran speciálisabb körülmények szükségesek. (Egmond & Speijers, 1999). Talán éppen ezeken az elméleteken alapult az az általános nézet, hogy bár toxintermelésre is képes penészgombák időről időre kimutathatók az ivóvizekben, forrás- és ásványvizekben, azok vízben mikotoxint mégsem képesek termelni.

Mindezek ellenére fellelhető olyan szakirodalmi adat is, mely a mikotoxinok termelődéséről számol be palackozott ivóvízből illetve víztároló tartályokból. Paterson és munkatársai (1997) *Aspergillus flavus* által termelt aflatoxint mutattak ki hidegvizes tárolótartályból. Russel és Patterson (2007) publikációjukban kis mennyiségű zearalenon termelődéséről számol be ivóvízbe oltott *Fusarium graminearum* esetében. Criado és munkatársai (2005) pedig *Penicillium citrinum* fajjal beoltott palackozott szénsavmentes ásványvízből 5 hónapos tárolási idő után citrinint mutattak ki.

A fent említett szakirodalmi adatok mellett meg kell említeni, hogy a vízben termelt mikotoxinok mennyisége általában kicsi, és az a közeg természeténél fogva nagymértékben hígul. A fertőzött vizekkel való akár kis mennyiségű mikotoxin rendszeres fogyasztása azonban hosszútávon mindenképpen egészségkárosító hatást érhet el.

3.3.2.4. Penészgombák által okozott termékkárosítás a palackozott forrás- és ásványvizekben

A penészgombák által okozott legszembetűnőbb termékkárosítás a palackozott forrás- illetve ásványvizekben a szabad szemmel látható micélium. A penésztelep kialakulhat a csomagolóanyag falára tapadva, azaz a palack felületén illetve a vízben lebegő, felhőszerű képletet is alkothat. Az ilyen megjelenésű termék a fentiekben részletezett potenciális egészségkárosítás veszélye mellett erős viszolygást kelt a fogyasztóban és nagymértékben rontja a márka iránti bizalmat, így a gyártó szempontjából hosszú távú negatív hatása is van. Ilyen, látható micéliumok képződésével járó penészgombás termékkárosításról számolnak be Cabral és munkatársai (2002), Fujikawa és munkatársai (1997).

A penészgombák másik, szintén erős, érzékszervi termékkárosítása, a vizuális megjelenés mellett a kedvezőtlen aromaanyagok termelése. Így például ivóvízre gyakorolt kedvezőtlen hatásról számolnak be Montiel és munkatársai (1999) valamint Nystörm és kollégái (1992). Bár e két említett publikációban a penészgombák által okozott dohos, fanyar, keserű illetve „sár íz” a vezetékes ivóvizekben fordul elő, nem zárható ki a penészgombák ilyen irányú termékkárosítása,

ezzel a nemkívánatos ízhiba megjelenése a palackozott forrás- illetve ásványvizeknél sem. Kikuchi és munkatársai (1981) valamint Mattheis és Roberts (1992) a föld-ízért és szagért felelős geozmin penészgombák általi termelődését találták igazoltnak. Szintén penészgombákra visszavezethető különböző idegen szagokról számolnak be Ezeonu és munkatársai (1994) valamint. Kamiski és munkatársai (1974)

3.3.3. A penészgombák kimutatására és mennyiségi meghatározására irányuló módszerek és azok korlátai

A penészgombák élelmiszerből történő kimutatására, identifikációjára használatos módszerek számos kérdést vetnek fel.

A fonalgombák kimutatásával, számszerűsítésével kapcsolatos egyik legismertebb probléma az, hogy előfordulásuk a termékben soha nem homogén. A probléma megoldása a homogenizálás, mely célból a folyékony közeg esetében erős keverést, illetve palackozott termékek esetében rázást alkalmazhatunk. Ezekkel a módszerekkel a fonalgomba előfordulása ugyan jóval homogénebb lesz, de a micéliumok töredezése révén így nagyobb telepszámot kapunk. A homogén eloszlás elérése után a tradicionális tenyésztési módszerek használata esetén membránszűrést, táptalaj lemezöntést illetve felületi szélesztési technikát is használhatunk. Mindegyik esetben egyaránt felmerül a táptalaj illetve a tenyésztési hőmérséklet kérdése. Táptalajként a nagy tápanyagtartalmú Sabouraud dextróz agart (Hapcigolu et al., 2005), Sabouraud maltóz agart (Kanzler et al., 2007) MEA agart, (Niemi et al., 1982) alkalmaznak, melyek nem gátolják a penészgombák növekedését. Más szerzők olyan táptalajt alkalmaznak, melyek a táptalajt gyorsan benövő penészek növekedés gátlásával a számlálást segítik, így például a 18% glycerol tartalmú DG18 agart (Hageskal et al., 2007) illetve a kisebb tápanyagtartalmú CMA/2 agart (Goncalves et al., 2006). A konvencionális, tenyésztésen alapuló módszerek következő felmerülő kérdései az inkubációs hőmérséklet illetve inkubációs idő.

Az inkubációs idő általában hosszú, 120 óra, mivel azonban számos penészgomba hajlamos az erőteljes növekedésre, ajánlatos a táptalajt 24 óránként ellenőrizni és a keletkezett telepeket számlálás után eltávolítani, majd a táptalajt tovább inkubálni (Hageskal et al., 2009).

A hőmérséklet megválasztásánál mindig tekintettel kell lenni a kimutatni kívánt penészgomba növekedési, ill. a sporulációs hőoptimumára, mely különösen fontos a faj szintű identifikálás esetén. Mindemellett fontos megemlíteni, hogy egyes penészfajok nem sporulálnak, így esetükben a faj szintű meghatározás morfológiai módszerrel nem lehetséges. A DNS alapú molekuláris technikák alkalmazása ezzel szemben nem igényel sporuláló, de még élő telepet sem, használatuk jelentősen gyorsítja és pontosítja az identifikálást, de nem szabad megfeledkeznünk azonban, hogy a megbízhatóságuk a felhasznált adatbázis illetve génbank precizitásától függ.

4. MÓDSZEREK

4.1. *Pseudomonas* törzsek által képzett statikus biofilmek vizsgálata vízszintes helyzetű rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen

4.1.1. Mikroorganizmusok

A biofilm vizsgálatainkhoz 2, a palackozott ivóvízgyártás során jelentős törzssel dolgoztunk.

- *Pseudomonas stutzeri* CC B 21: felszín alatti, élelmiszeripari víznyerő helyről izolált törzs
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 törzsgyűjteményi törzs

A *Pseudomonas aeruginosa* fakultatív patogén, szakirodalmi adatok szerint kiváló biofilm képző tulajdonsággal rendelkezik. Az ásványvíz minőségi követelményeit tartalmazó 65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet alapján természetes ásványvízben, a forrásvízben, az ivóvízben, az ásványi anyaggal dúsított ivóvíz és ízesített víz 250 ml-ében nem lehet jelen. Ezzel szemben a *Pseudomonas stutzeri* jelenlétét a palackozott forrás- és ásványvizekben a fent említett rendelet nem tiltja, a víznyerő helyekben és az élelmiszeripari vízrendszerekben előfordul. Egyes szakirodalmi források azonban a *Pseudomonas stutzeri* is fakultatív patogénként tartják számon (Kose et al., 2004; Lalucat et al., 2006; Lebowitz et al.; 2001, Potvliege et al. 1987). Az általunk felhasznált törzs egy élelmiszeripari kútfúrás követő első mikrobiológiai monitor során került izolálásra. Az azonosítása API 20E valamint BBL Crystal segítségével történt, majd az itt kapott eredményeket eredményt szekvenálással erősítettük meg.

4.1.2. *Pseudomonas* törzsoldatok készítése

A *Pseudomonas stutzeri* illetve *Pseudomonas aeruginosa* törzseket első lépésben BHI ferde agarra oltottam, 37 °C –on 24 órán át inkubáltam, majd törzsoldatot készítettem a következő módon: ferde BHI agarokat tartalmazó csöveket 6 ml pepton hígítóval lemostam, így nagyságrendileg 10⁹ TKE/ml sűrűségű törzsoldat készült. A törzsoldat pontos sejtszámát Thoma kamrás számlálással és hígítási sor készítése után lemezöntéssel is ellenőriztük.

4.1.3. Statikus biofilm képzés vízszintes felületen, BHI táplevesben

A frissen elkészített törzsoldatot 1000-szeres hígítással BHI (MERCK 1.10493) táplevesbe oltottam be, így 10⁶ TKE/ml kiindulási telepszám koncentrációt kaptam. A sejtkoncentráció ellenőrzése a beoltott a táplevesekből készült 10-es hígítási sorral, TGE agarra való lemezöntéssel történt.

A statikus biofilm képzési kísérleteinknél a palackozott forrás- és ásványvíz gyártása során előforduló biofilmeket modelleztük, így kísérleteinket az ipari gyakorlatban használatos,

gyógyszeripari minőségű rozsdamentes acél (Wnr1.4301) kupon felületeken végeztük el. A 250 x 750 mm élhosszúságú rozsdamentes acéllemezeket a felhasználás előtt 24 órán át Domestos fertőtlenítőszerben való áztatás után mechanikailag megtisztítottam, öblítettem majd hőlégenderivátorban 180 °C-on steriliztem. A statikus biofilm modellezéshez steril, 18 cm átmérőjű Petri-csészékbe 10-10 db rozsdamentes acél lemezt helyeztem úgy, hogy azok ne fedjék egymást, majd a Petri csészékbe 200 ml beoltott BHI táplevest öntöttem. A Petri-csészéket parafilm fóliával lezártam és mozgítás nélkül szobahőmérsékleten tároltam (melléklet, 26. ábra). A második héttől kezdve hetente 50 ml BHI tápleves hozzáadásával pótoltam az elhasznált tápanyagokat, így ideális környezetet biztosítottam a biofilm növekedéshez

4.1.4. Statikus biofilm képzés vízszintes felületen, szén-savmentes ásványvízben

Nem ideális közegnek kereskedelmi forgalomban kapható 500 ml-es szén-savmentes ásványvíz szolgált. A palackokat 5-5 ml frissen készített 10^8 telepszám sűrűségű törzsoldattal oltottam be, így itt is 10^6 TKE/ml kiindulási telepszám koncentrációt kaptam. A sejtkoncentráció ellenőrzése a fent leírtakhoz hasonlóan, beoltott a palackokból készült 10-es hígítási sorral, TGE agarral való lemezöntéssel történt.

Steril, 18 cm átmérőjű Petricsészékbe 10-10 fent leírt módon előkészített és sterilizett rozsdamentes acéllemezt helyeztem, majd ezekre 200-200 ml beoltott ásványvizet öntöttem (melléklet, 26. ábra). A lemezöntéssel történő élő telepszám meghatározásához itt is kisebb, 10 mm x 35 mm-es kuponokat használtam. A Petri csészéket parafilm fóliával lezártam és mozgítás nélkül szobahőmérsékleten tároltam. A második héttől hetente 50 ml ásványvíz hozzáadásával pótoltam az elhasznált tápanyagokat.

4.1.5. Biofilmképzés nyomon követése akridin narancs festéssel

Az akridin narancs a sejtekben lévő DNS-hez kötődik, és UV megvilágítás hatására fluoreszkál. Ezzel a festési eljárással tehát a felülethez kötődő sejteket tehetjük láthatóvá. Az akridin narancs festés előnye, hogy a felületen megtapadt sejteket közvetlenül tudjuk vizsgálni. Hátránya, hogy az öreg biofilmeknél nehézséget okoz a festés kivitelezése, egyrészt mivel a festékoldat a vastag biofilm felső rétegét eltávolíthatja, másrészt a minta igen lassan szárad.

A festékoldat elkészítésekor 0,02 g akridin narancs festéket 100 ml desztillált vízben feloldottam, azt hűtőszekrényben maximum 1 hétig tároltam. Festés során az akridin narancs oldatot automata pipettával feleslegben felvittem a mintafelületekre, 2 percig állni hagytam, majd desztillált vízzel öblítettem. A lemezeket 37 °C –on szárítottam, a mikroszkópos vizsgálatig sötétben tartottam.

4.1.6. A biofilm EPS kialakulásának mikroszkópos nyomon követése FITC festéssel

Vizsgálataim során szakirodalmi ajánlás (Strathmann et al, 2002, Wingender et al, 2001) nyomán fluorescein isothiocyanát festékkel jelölt Concavalin A lectinnel (Sigma, C7642-Concavalin A type IV - a továbbiakban FITC) dolgoztam. A por alakú festékből foszfát pufferben (pH 7,5) való feloldással 1mg/ml koncentrációjú törzsoldatot készítettem, melyet fagyasztva tároltam. A felhasználáskor további 2 hígítási lépésben értem el a 10 µg / ml felhasználási koncentrációt. A festékoldatot automata pipettával feleslegben felvittem a mintafelületekre és sötétben 30 perces behatási időt alkalmaztam. Ezután a lemezeket desztillált vízzel öblítettem és 37 °C –on szárítottam. A megfestett lemezeket a mikroszkópos vizsgálatig sötétben tartottam.

A FITC festék működési elve azon alapul, hogy a Concavalin A lectin jól kötődik az EPS-ben található szénhidrátokhoz (D-(+) glükóz, D-(+)mannóz), a hozzá kötött fluorescein isothiocyanát festék pedig UV fényben fluoreszkál, így ezzel a festéssel epifluoreszcens mikroszkóp segítségével az EPS poliszacharid mátrixot tudjuk láthatóvá tenni.

4.1.7. Mikroszkópos képanalízis

Mindkét általam felhasznált festék UV fényben fluoreszkál. A megfestett, megszáradt lemezeket Olympus BH2 epifluoreszcens mikroszkóppal 455 nm-en, KB4 valamint EY455 szűrőt használva, homogén immerzióval vizsgáltam, 100-as nagyítású, D PLAN APO UV objektívvel. Az elkészült digitális fényképeket számítógépen tároltam, majd színintenzitás alapján elemeztem.

A mikroszkópos képanalízis eredményeinek értékelésénél mindenképpen figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a rendelkezésemre álló képalkotó rendszer mélységélessége meglehetősen kicsi, így a vizsgálat során a biofilmnek csak a legfelső rétegét vizsgálhattam, a háromdimenziós képalkotásra ez a rendszer alkalmatlan.

4.1.7.1. Mikroszkópos képek archiválása

A mikroszkóphoz csatlakoztatott DP 10 digitális fényképezőgéppel készítettem képeket. A megfestett lemezek véletlenszerűen kiválasztott pontjáról kiindulva két látómezőt jobbra majd 1 látómezőt lefele haladva, lemezenként 12-12 képet készítettem.

Mindkét alkalmazott festékkel 2-2 párhuzamos mintát festettem meg, és minden egyes lemezről 12 képet készítettem, így összesen 24-24 kép készült mintavételenként.

4.1.7.2. Képelemzés

A digitális fényképek elemzését dr. Gillay Zoltán által kidolgozott módszerrel végeztük el. Az elkészített képeket *Mathcad 2001 Professional* programmal számszerűsítettük RGB rendszer

alapján. Akridin narancsos festés esetén a képek piros (R -red), FITC-vel való festés esetén a képek zöld (G –green) intenzitása alapján. A kapott adatokat *SPSS* és *Microsoft Excel* programokkal értékeltem ki.

4.1.8. A biofilmek által benőtt felületek fertőtlenítése és a biofilmek eltávolítása

4.1.8.1.Mikroorganizmusok

A biofilm inaktiválási kísérletekhez a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 törzsgyűjteményi törzset használtam fel.

4.1.8.2.Fertőtlenítőszer

A felhasznált fertőtlenítőszereket úgy válogattam ki, hogy azok reprezentálják az élelmiszeripari gépek és berendezések környezetének tisztításakor illetve fertőtlenítésekor, valamint a fertőtlenítő takarításban használt főbb hatóanyagokat. A felhasznált fertőtlenítőszereket a 2. táblázat összegzi. A fertőtlenítés modellezése során a biofilmet tartalmazó rozsdamentes acél (Wnr1.4301) lemezeket a baktérium szuszpenzióból steril csipesszel vettem ki és helyeztem a felhasználási koncentrációra hígított fertőtlenítőszer oldatba. A fertőtlenítést 30 percen át szobahőmérsékleten, mechanikus tisztítás nélküli áztatással modelleztem. A behatási idő elteltével a fertőtlenítőszer inaktiválása céljából a rozsdamentes acél lemezeket steril vízzel öblítettem.

2. táblázat: A biofilm inaktiválási kísérletekhez felhasznált fertőtlenítőszeres összefoglalása

Fertőtlenítőszer	hatóanyag	segédanyagok	Felhasznált koncentráció
Biguanid Fläche	Dimetilbenzil-kókuszsír-alkil-ammonium klorid, Kókuszs-propilén-diamin-guanidinacetát	Propán diol, 2-(2-Butoxi)etanol, Alkohol-etoxilát	1 %
Descosal	Glioxál, Dimetilbenzil-kókuszsír-alkil-ammonium klorid	Alkohol-etoxilát	1 %
DisquatL	Quaterner ammonium klorid		1 %
Domestos	Nátrium-hypoklorit	Nem ionos tenzid, Nátrium-hidroxid	2 %
Innofluid TF Klór	Nátrium-hypoklorit	Kálium-hidroxid	2 %

4.1.9. A biofilmet alkotó sejtek túlélésének vizsgálata

A biofilm eltávolítási kísérleteimben a felületen megtapadt sejtek túlélésének nyomon követésére 3 különböző módszert alkalmaztam. A klasszikus telepszámlálás módszerét kiegészítettem a táptalaj impedimetriájának változásán alapuló RABIT berendezéssel végzett vizsgálatokkal valamint a felületek festés utáni direkt mikroszkópos vizsgálatával. A biofilm kialakulását vizsgáló kísérleteimmel szemben az inaktiválási kísérletek során az EPS jelenlétét nem vizsgáltam, így kizárólag az akridin narancs festést használtam.

4.1.9.1. Telepszám meghatározás lemezöntéssel

A lemezöntéssel történő élő telepszám meghatározás előnye a relatív olcsó volta, hiszen különleges berendezést, műszert nem igényel. Biofilmek (különösen öregebb biofilmek) esetében azonban nehézségek adódhatnak, mivel a sejteket nehéz az acél kuponról leválasztani.

A lemezöntéssel történő telepszám meghatározásához a 10 mm x 35 mm-es nagyságú kuponokat használtam. A Petri csészéből steril csipesszel kivett lemezeket 2% Tween 80-nal kiegészített hígító folyadékot tartalmazó kémcsőbe helyeztem és 2 percig vortexeltem. Ezt követően decimális hígítási sort készítettem és 1-1 ml-t üres Petri csészébe pipettáztam majd a mintákra megközelítőleg 20 ml,

50 °C-os TGE táptalajt öntöttem és azt a mintával óvatosan elkevertem. A kihűlt táptalajokat a kiértékelésig megfordított állapotban 37 °C-on 24 órán át inkubáltam.

4.1.9.2.A biofilmet alkotó sejtek aktivitásának nyomon követése RABIT készülékkel

A RABIT berendezéssel történő vizsgálat előnye, hogy a kuponokat közvetlenül tudjuk felhasználni, így a sejtek felületről történő leválasztásának hibalehetősége elhanyagolható.

A vizsgálathoz a lemezöntéssel való összehasonlíthatóság érdekében szintén 10 mm x 35 mm-es kis rozsdamentes acél (Wnr1.4301) kuponokat használtam. A felületeket a Petri csészéből steril csipesszel kivettem és közvetlenül az előkészített, 4.5 ml DonWhitley táptalajt (Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, UK) tartalmazó steril RABIT csövekbe helyeztem. Mindkét *Pseudomonas* törzsnél 37 °C-os, 48 órás inkubálást, direkt mérési módszert használtam. A direkt mérési módszernél a detekciós idő (Time To Detection – későbbiekben TTD) mutatja azt az időt, ami alatt a táptalaj vezetőképességének változása először eléri vagy meghaladja az 5 µS/min-t. Tehát minél kisebb a TTD, annál nagyobb a mintában található élő sejtszám. Amennyiben a TTD >48 h, úgy élő sejt nem volt kimutatható.

4.1.9.3.Mikroszkópos vizsgálat (akridin narancs festés), digitális képalkotás, archiválás

Steril vizes öblítést követően a 4.1.5. fejezetben részletezett módon akridin narancs oldattal 2 perces festést alkalmaztam, majd a lemezeket 37 °C –on szárítottam, a mikroszkópos vizsgálatig sötétben tartottam.

4.1.10. Mikroszkópos képanalízis

A mikroszkópos fényképeket a 4.1.7. fejezetben részletezett módon készítettem és elemeztem.

4.2. Penészgombák szemmel látható termékkárosításának vizsgálata különböző, kereskedelemben kapható palackozott forrás- és ásványvizekben

4.2.1. Vizsgált palackozott forrás- és ásványvizek

A minta mátrix összeállításánál szem előtt tartottuk a palackozott forrás- és ásványvíz termékcsalád európai sokszínűségét. Ezek alapján a termékeket Európa 4 különböző országából gyűjtöttük össze, így 4 gyártóüzem összesen 12 különböző, a kereskedelemben kapható palackozott ivóvizét vontunk be a kísérletünkbe. Mintáink között egyaránt szerepel ásványvíz és forrásvíz különböző csomagolóanyagban, úgymint PET- illetve üvegpalack. A termékek ásványi anyag- és szénadtartalma is különböző. Amennyiben egy adott terméknél kereskedelemben elérhető volt

többféle kiszerelés, úgy a csomagolóanyag maximális fajlagos felületének elérése érdekében a legkisebb térfogatút igyekeztünk beszerezni. A vizsgált palackozott forrás- és ásványvizeket összefoglalva a 3. táblázat szemlélteti.

3. táblázat: A kísérleteinkhez felhasznált palackozott ásvány- és forrásvizek összefoglalása

Ásványvíz illetve Forrásvíz	Térfogat, csomagoló- anyag	Átlagos oldott oxigén (ppm)	Átlagos oxigén tartalom a gáztérben (mg/l)	Szén- dioxid tartalom (g/l)	Ásványi anyag tartalom (mg/l)	pH	Minőség megőrzési idő (hét)
FV1	500 ml PET	3,615	16,830	0	376,6	7,74	52
FV2	500 ml PET	3,187	23,883	0	369,0	7,93	52
AV3	500 ml PET	2,377	12,663	0	1870,0	7,87	52
AV4	500 ml PET	2,820	6,177*	0	644,5	7,35	52
AV5	500 ml PET	0,747	6,013*	0	627,0	7,49	52
AV6	330 ml üveg	3,497	5,010*	0	627,0	7,30	52
AV7	500 ml PET	2,137	4,010	6,0	627,0	4,90	26
FV8	500 ml PET	2,023	4,100	6,0	369,0	6,00	26
FV9	500 ml PET	2,417	5,243	4,4	376,6	5,60	26
AV10	500 ml PET	1,783	7,093	5,2	1870,0	5,32	26
AV11	500 ml PET	2,297	3,667	6,0	1945,5	5,78	26
AV12	1500 ml PET	2,803	4,900	4,0	627,0	5,30	26

FV= forrásvíz;

AV= ásványvíz

* nitrogénpárnát alkalmazó töltés technológia

4.2.2. Oldott oxigén vizsgálat

Az oldott oxigén meghatározását ORBISPHERE 3625 berendezéssel végeztük. A berendezés analizátora a lumineszcencia elvén működik. A szenzor az aktív lumineszcens pontot kék fényel gerjeszti, majd a keletkező vörös lumineszcens fényt méri a detektor. Oxigén jelenlétében a vörös fény utánvilágítási ideje megváltozik. Kalibrációs görbe alapján az utánvilágítási időből meghatározható az oxigén parciális nyomása.

Oxigén szenzor: O2 Electrochemical Sensor, 2956A membránnal

Az elektronikus oxigén szenzort a lezárt palackon, a folyadékszint felett átszűrve közvetlenül a gáztérből mérhető az oxigén tartalom. A szenzort a folyadékszint alá helyezve az oldott oxigén mérhető.

4.2.3. A termékminták beoltásához használt penészgombák

A kísérleteinkhez kizárólag olyan penészgombákat használtunk fel, melyeket az azt megelőző 2 évben a kereskedelemben kapható palackozott forrás- és ásványvizekből izoláltunk, függetlenül attól, hogy az adott izolátum az eredeti termékben szemmel látható termékkárosítást okozott-e.

A vizsgálatokba bevont penészgombák tehát az alábbiak voltak:

- *F. oxysporum* CC F 36: forrásvízből izolált – a forrástermékben szemmel látható termékkárosítást nem észleltünk
- *C. cladosporoides* CC F 50: ásványvízből izolált - a forrástermékben szemmel látható romlást okozott
- *P. chrysogenum* NCAIM F 00837: ásványvízből izolált - a forrástermékben szemmel látható romlást okozott
- *A. fumigatus* NCAIM F 00673: ásványvízből izolált – a forrástermékben szemmel látható termékkárosítást nem észleltünk

4.2.4. Penészgombák szaporítása

A beoltáshoz használt penészgombákat Malt Extract Agar-on szaporítottuk. (MEA; Merck 1.05398). A *C. cladosporoides* CC F 50 valamint a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében 25 °C-os, a *F. oxysporum* CC F 36 esetében. 28°C-os, az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében 37°C-os, inkubálási hőmérsékletet használtunk.

4.2.5. A beoltáshoz felhasznált konídium begyűjtése

A beoltáshoz felhasznált konídium szuszpenziók előállításához a penészgombákat Roux-palackban lévő MEA agarra oltottuk át. Mintánként 2 párhuzamos Roux-palackot használtunk. A *C. cladosporoides* CC F 50 valamint a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében 25 °C-os inkubálási hőmérsékletet, míg a *F. oxysporum* CC F 36 esetében 28°C-ot, az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzsnél 37°C-ot használtunk. Az inkubációs idő egységesen 5 nap volt. A konídiumokat steril vízben, illetve az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében 0.1%-os “TWEEN 80” oldatban oldottuk fel, illetve hígítottuk a kívánt koncentrációra. A konídium koncentrációt Buerker kamra segítségével ellenőriztük.

4.2.6. A vizsgált palackozott forrás- és ásványvizek penészgombákkal való beoltása

A palackozott forrás- és ásványvízmintákat az alábbi végső koncentrációra állítottuk be:

- <10 konídium /100 ml termék
- ~10-50 konídium /100 ml termék

- ~100-500 konídium /100 ml termék

A beoltás pontos koncentrációját membránszűréssel ellenőriztük.

4.2.6.1. Különböző koncentrációjú beoltási szuszpenziók készítése

A beoltásokhoz 3 különböző koncentrációjú, egyenként 200-200 ml-es törzsoldatot készítettünk, melyek felhasználását a 4. táblázat részletezi:

4. táblázat: A különböző koncentrációjú penészgomba konídium törzsoldatok felhasználása a termékminták beoltásához.

Törzsoldat koncentrációja	Beoltáshoz felhasznált térfogat	Beoltott termék térfogata	Konídium koncentráció a termékben
~ 3.0 x 10 ⁴ konídium/ml	8 µl	330 ml	10 konídium /100 ml
	10 µl	500 ml	
	30 µl	1500 ml	
~ 2.0 x 10 ⁵ konídium/ml l	8 µl	330 ml	~10-50 konídium /100 ml
	10 µl	500 ml	
	30 µl	1500 ml	
~ 2.0 x 10 ⁶ konídium/ml	8 µl	330 ml	~100-500 konídium /100 ml
	10 µl	500 ml	
	30 µl	1500 ml	

4.2.6.2. A termékminták beoltása

A vizuális nyomon követés valamint a túlélő telepszám meghatározása céljából készített termékminták beoltása egy időben, koncentrációnként azonos törzsoldatból történt. A 330 ml-es termékminták esetén, annak érdekében, hogy a kísérlet végére is megfelelő mennyiségű minta álljon rendelkezésre a túlélő telepszám meghatározásához, dupla darabszámmal dolgoztunk. Összességében az alábbi mennyiségű termékminta került beoltásra:

- Vizuális nyomon követés céljára: 3 parallel palack penészgombánként és vízmintánkként, összességében: **432 palack** (4 különböző penészgomba törzs x 12 féle termékminta x 3 parallel x 3 koncentráció)
- Túlélő telepszám meghatározására: mivel a szénsavas termékek esetén minden egyes telepszám meghatározáshoz külön palackra volt szükség, így a beoltott minta mennyiség a következőképpen alakult:

- **Szénsavas** vízminták: **648 palack** (4 különböző penészgomba törzs x 3 koncentráció x 6 féle termékminta x 9 palack a telepszám meghatározás különböző időpontjaira – 0., 1., 2., 3., 4., 6., 8., 10., 12. hét)
- **Szénsavmentes** vízminták: **84** palack (4 különböző penészgomba törzs x 3 koncentráció x 6 féle termékminta + 12 extra minta a 0.33 ml –es kiserelés esetében)

Kísérleteinkhez tehát **összesen 1164 db palack** került beoltásra.

4.2.7. A beoltott palackozott forrás- és ásványvizek inkubálása

A beoltott termékmintákat termosztát szobában, szobahőmérsékleten (25 °C) on inkubáltuk.

4.2.8. A szemmel látható termékkárosodás vizuális nyomon követése

A vizuális nyomon követést állandó fény melletti átvilágítással végeztük. A vizuális nyomon követés teljes időtartama a szénsavas termékminták szavatossági idejével megegyezően, 26 héten át végeztük. Ez idő alatt heti rendszerességgel minden egyes palackot egyenként átvizsgáltunk. Pozitívnak értékeltük az apró, illetve a felhőszerű lebegő képleteket.

4.2.9. Túlélő telepképző egységek szám meghatározása

A vizuális nyomon követés mellett a túlélő telepképző egység szám meghatározását is elvégeztük, arra keresve a választ, hogy a túlélő telepképző egység szám alátámasztja-e a kapott eredményeinket.

Értékelhető eredmények érdekében a beoltott illetve túlélő telepképző egység számot a várható értékektől függően membránszűréssel illetve lemezöntéssel határoztuk meg. Abban az esetben, ha a telepszám várható értéke magasabb volt, mint 10²/10 ml, lemezöntést (1 ml minta), kisebb értékeknél membránszűrést (10, 20, 50, 100, 250, illetve 500 ml minta) alkalmaztunk (lásd 5. és 6. táblázatok).

A mintázást az első 4 hétben hetente végeztük, majd azt 2 hetes mintavételi frekvenciára csökkentettük. **Szénsavmentes** termékminták esetében az élő telepszám meghatározást minden esetben 20 hétig folytattuk. A nyomon követés érdekében termékmintánként ugyanazon palackot használtuk a vizsgálat végéig. Ez alól a szabály alól a 330 ml-es kiserelésű termékminták voltak kivételek, mivel a 330 ml nem lett volna elegendő a kísérlet végéig. Ez esetben az első palack kiürülésével nyitottuk meg a második palackot, és abból folytattuk a mintázást.

A **szénsavas** termékminták esetében a túlélő telepszám meghatározását 12 hetes intervallumra, illetve a szemmel látható termékromlás megjelenéséig terveztük. A *C. cladosporoides* CC F 50, *P.*

chrysogenum NCAIM F 00837, *F. oxysporum* CC F 36 törzsek esetében a túlélő telepszám a 10-12. héten egyértelműen nullára csökkent, így ezeknél a mintáknál a membránszűrést nem is folytattuk tovább a 12. hét után. Az *A. fumigatus* NCAIM F 00673-al beoltott szénsavas termékminták esetében azonban a 12. hét után is észleltünk túlélő telepszámot, így a vizsgálatokat a 26. héten végzett membránszűréssel kiegészítettük.

A mintázást megelőzően a homogén mintavétel érdekében a termékmintákat minden esetben erőteljesen felráztuk.

4.2.9.1. Túlélő telepképző egység szám meghatározás membránszűréssel

A minta mennyiségét az előzetes eredmények alapján becsült várható értéktől függően választottuk meg (10, 20, 50, 100, 250, illetve 500 ml). A szűrést Sartorius készüléken végeztük, 0,45 µm-es pórus átmérőjű membránt használtuk. A membránt szűrés után MEA táptalajra helyeztük. Az inkubációs hőmérséklet *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837, és *F. oxysporum* CC F 36 esetében 26-28 °C; *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében 37 °C volt. Az eredményeket 2, 3 és 5 nap után olvastuk le.

4.2.9.2. Túlélő telepképző egység szám meghatározás lemezöntéssel

Amennyiben a telepszám várható értéke nagyobb volt $10^2/10$ ml –nél, lemezöntést (20 ml 46-50°C MEA + 1 ml termékminta alapos homogenizálás után) alkalmaztunk.

A Petri csészéket a lemezöntésnél leírtak szerint, a *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837. és *F. oxysporum* CC F 36 törzsszel beoltott termékminták esetén 26-28 °C –on, *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében 37° C-on, 5 napig inkubáltuk. Az eredményeket 2, 3 illetve 5 nap után is leolvastuk.

5. táblázat: Mintázási gyakoriság és a minták térfogata szénsavas termékminták membránszűrésénél

Mintázás időpontja	Minta térfogata		
	Kiindulási konídium koncentráció <10 konídium/100 ml	Kiindulási konídium koncentráció 10-50 konídium/100 ml	Kiindulási konídium koncentráció 100-500 konídium/100 ml
0. hét (kiindulási koncentráció meghatározása)	100 ml	100 ml	50 ml
1. hét 2. hét 3. hét 4. hét 6. hét 8. hét 10. hét 12. hét	100, 250, 500 ml - az előző eredményektől függően	100, 250, 500 ml - az előző eredményektől függően	50, 100, 250, 500 ml - az előző eredményektől függően
26*. hét	500 ml	500 ml	500 ml

*Kizárólag *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetén

6. táblázat Mintázási gyakoriság és a minták térfogata szénsavas termékminták membránszűrésénél illetve lemezöntésnél

Mintázás időpontja	Minta térfogata		
	Kiindulási konídium koncentráció <10 konídium/100 ml	Kiindulási konídium koncentráció 10-50 konídium/100 ml	Kiindulási konídium koncentráció 100-500 konídium/100 ml
0. hét (kiindulási koncentráció meghatározása)	100 ml	100 ml	50 ml
1. hét 2. hét 3. hét 4. hét 6. hét 8. hét 10. hét 12. hét 14. hét 16. hét 18. hét 20. hét	50/20/10/1* ml- az előző eredményektől függően		

* 1 ml mintatérfigat esetében lemezöntést használtunk

4.2.10. Az eredmények statisztikai elemzése

A kapott eredményeket GraphPad Prism4 program segítségével elemeztem. Első lépésben az eredményeket a vizsgált penészgombák illetve felhasznált forrás- és ásványvizek szerint csoportokba rendezve varianciaanalízist (ANOVA) végeztem, majd ahol szignifikáns eltérést találtam, ott további analízisként páronkénti összehasonlítást (Bonferroni's Multiple Comparison) is végeztem.

5. EREDMÉNYEK

5.1. *Pseudomonas* törzsek megtapadása vízszintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen

A két vizsgált *Pseudomonas* törzs (kútvízből izolált *Ps. stutzeri* CC B 21 és *Ps. aeruginosa* ATCC 9027) statikus biofilmképző képességét akridin narancs illetve fluorescein isothiocyánát (továbbiakban FITC) festéssel követtük nyomon 28 napon át. Minden vizsgálatnál a véglegesen megtapadt sejteket vizsgáltuk, így a rozsdamentes acéllemezeket vizsgálat előtt steril vízzel öblítettük.

A festést követően digitális mikroszkópos fényképeket is készítettünk, melyeket képelemzéssel értékeltük. A vizsgált időszakban készített összes digitális mikroszkópos fényképeket mintavételi naponként színintenzitás szerint sorba rendezve mutatják a mellékletben elhelyezett 21-28. táblázatok.

A két vizsgált törzs statikus biofilm képzését előzetes vizsgálatink során lemezöntéssel is nyomon követtük, az eredmények azonban nem adtak információt a biofilm felépülésének kinetikájával kapcsolatban, így a dolgozatomban ezeket az eredményeket részleteiben nem elemzem.

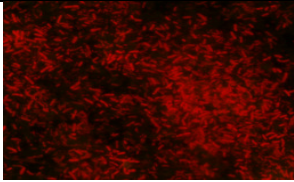
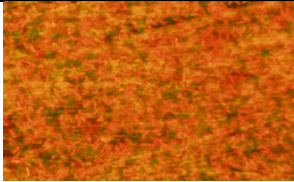
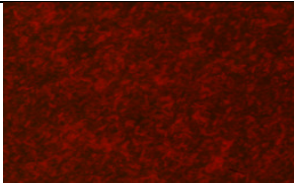
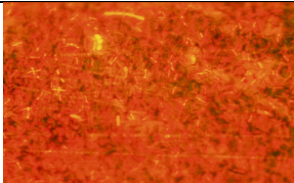
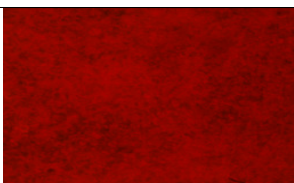
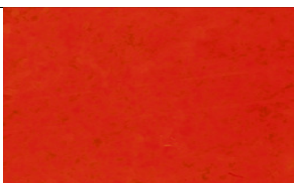



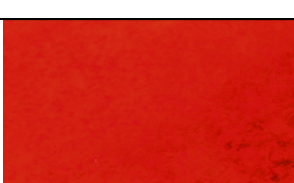
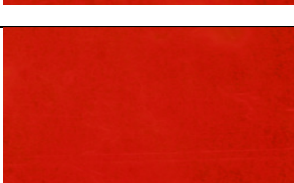
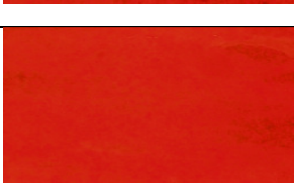
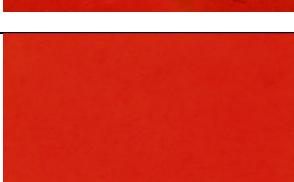
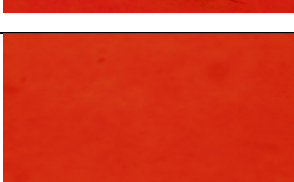


5.1.1. A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által BHI táplevesben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei akridin narancs festéssel

Az akridin narancs a sejteket festi meg, így a biofilm képződés kezdeti szakaszában a sejtek felületre való kitapadását majd a szaporodásukat és kolonizációjukat teszi mikroszkóp segítségével láthatóvá, majd képanalízis után számszerűsíthetővé.

A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által BHI táplevesben képzett statikus biofilmek akridin narancs festésének eredményének vizuális kiértékelést segíti a 7. táblázat, mely 1-1 jellemző, akridin narancs festést követő mikroszkópos fényképet állít párhuzamba. A képeken jól látszik, hogy BHI táptalajban mindkét vizsgált törzs igen jelentős tapadást mutat a vizsgált vízszintes helyzetű rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felülethez. A felülethez való kitapadás az idő függvényében eleinte növekedő, majd stagnáló tendenciát mutat. A *Ps. stutzeri* CC B 21 felülethez való tapadása gyorsabb, már a kezdeti időpontokban (első három nap) is nagyszámú felülethez tapadt sejtet sikerült megfesteni. A vizsgálati idő első napjaiban mind a *Ps. stutzeri* CC B 21, mind a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 törzs inhomogén, míg a vizsgálati idő végén masszív, homogén biofilmet képzett.

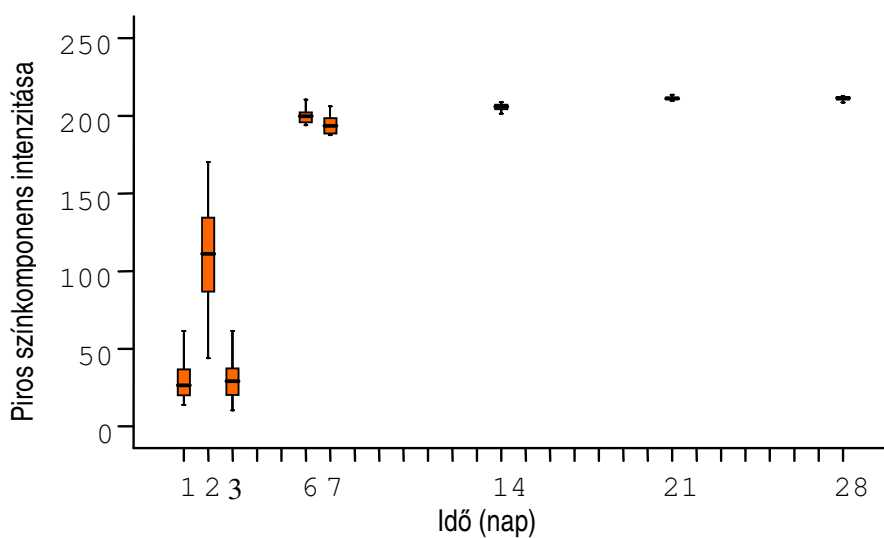
A fényképek piros színárnyalatának mérésével számszerűsített eredmények értékelését törzsenként a következő alfejezetekben elemzem.

7. táblázat: BHI táptalajban, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, akridin narancssal festett különböző korú *Pseudomonas* biofilmek mikroszkópikus fényképei

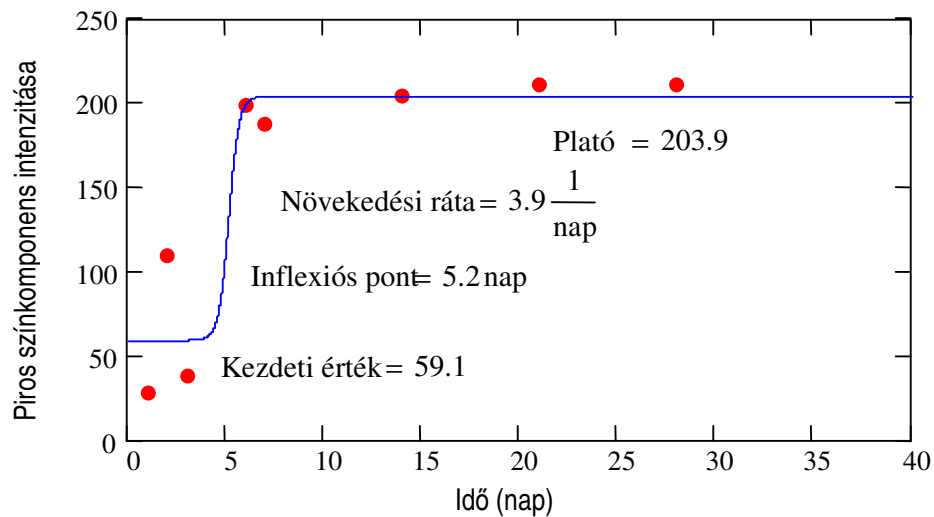
Idő (nap)	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Ps. stutzeri</i> CC B 21
1.		
2.		
3.		
6.		
7.		
14.		
21.		
28.		

5.1.1.1. *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 BHI táplevesben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel

A BHI táplevesben rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett statikus *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 biofilmről az akridin narancs festést követően készült mikroszkópos fényképek piros színkomponensének intenzitását vizsgáltuk. A piros színkomponens intenzitását szemléltető doboz diagramot (4. ábra) vizsgálva megállapítható, hogy az eredmények a korai szakaszban jelentős szórással bírtak, mely a biofilm inhomogenitását mutatja. A fiatal biofilm ezen tulajdonságát megelőző vizsgálatainkban is tapasztaltuk, így a nagy szórás kompenzálása céljából minden vizsgálat alkalmával eleve nagyszámú (24 kép alkalmanként) mintát vettünk. Az idősebb biofilm egyre nagyobb felületeket fedett be, így egységesebb képeket kaptunk, a szórás jelentősen csökkent. A digitális fényképek képelemzésének eredményei alapján elmondható, hogy BHI táplevesben a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 sejtek rozsdamentes acél felülethez való tapadása időben növekvő tendenciát mutat és egy maximum értékhez tart, így telítési görbe vehető fel, (5. ábra) mely a 6. napon érte el a plato szakaszt. Ez a tendencia egybeesik a Jelenik –Nikolics által (Jelenik-Nikolics & Lévai, 2000) publikált biofilm kinetikai görbével.



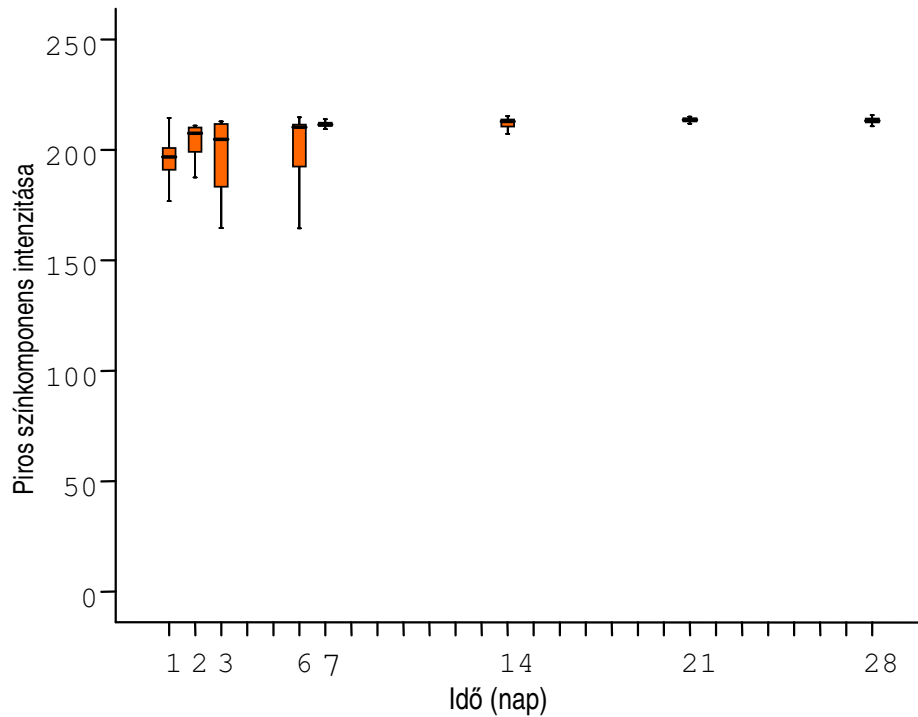
4. ábra: Piros színkomponens intenzitás értékei BHI táplevesben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 biofilm akridin narancssal festett digitális fényképein az idő függvényében



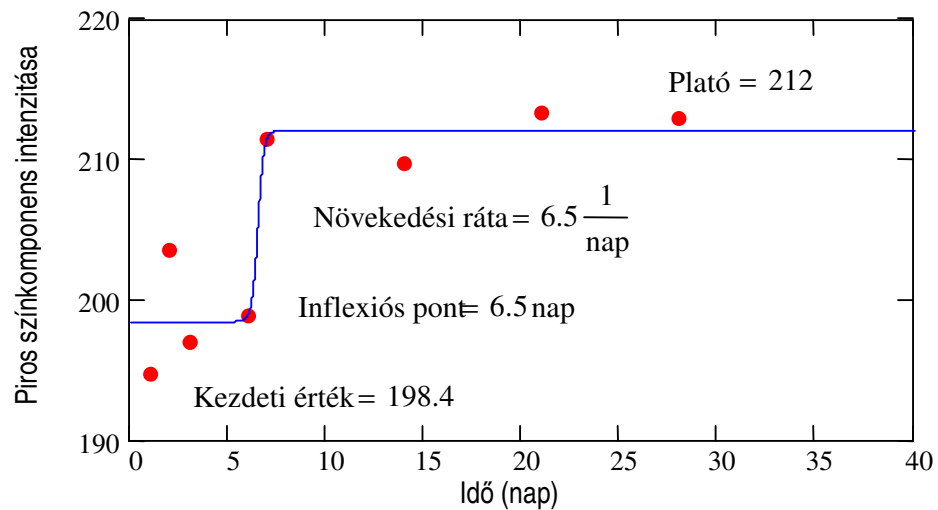
5. ábra: *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, BHI táplevesben képzett, akridin narancssal festett biofilmjének piros színkomponens intenzitás értékeire illesztett telítési görbe

5.1.1.2. *Ps. stutzeri* CC B 21 BHI táplevesben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel

Ps. stutzeri CC B 21 által BHI táplevesben rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett statikus biofilm akridin narancs festésének eredményei alapján, hasonlóan az előző fejezetben részletezett, *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 BHI táplevesben képzett biofilmjével kinetikai görbe állítható fel. A *Ps. stutzeri* CC B 21 esetében szintén időben növekedő értékeket tapasztalhatunk melyek telítési görbét (7. ábra) vesznek fel. Itt azonban már a korai biofilmnél is nagyobb mennyiségű felületre kitapadt sejt detektálható (6. és 7. ábra), azaz a sejtek felületi kitapadása gyorsabb. A fiatal biofilm a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 törzs által képzett biofilmhez hasonlóan erősen inhomogén, így az értékek kezdetben erősen szórnak, mely szórás később jelentősen csökken.



6. ábra: Piros színtelepszint értékei BHI táplevesben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett *Ps. stutzeri* CC B 21 biofilm akridin narancssal festett digitális fényképein az idő függvényében



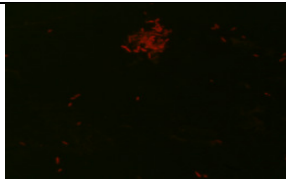

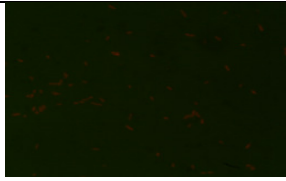

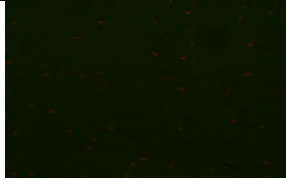


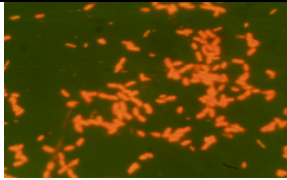
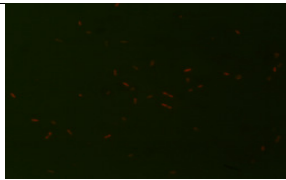

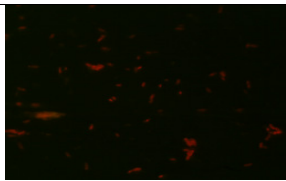
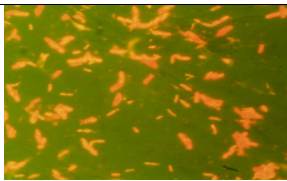
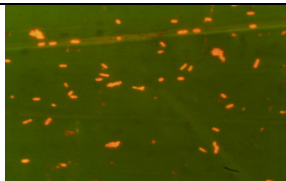
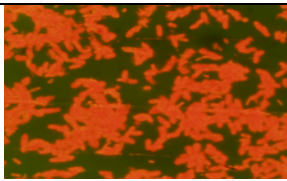

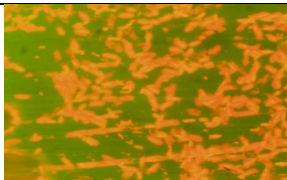
7. ábra: *Ps. stutzeri* CC B 21 rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, BHI táplevesben képzett, akridin narancssal festett biofilmjének piros színtelepszint értékeire illesztett telítési görbe

5.1.2. A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által ásványvízben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei akridin narancs festéssel

A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által ásványvízben képzett statikus biofilmek vizuális kiértékelést segíti a 8. táblázat, mely 1-1 jellemző, akridin narancs festést követő mikroszkópos fényképet állít párhuzamba.

Mindkét vizsgált törzs rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felülethez való tapadása jelentősen kisebb ásványvízben, mint az ideális közegnek tekinthető BHI táptalajban. A felülethez való kitapadás az idő függvényében itt is növekedő tendenciát mutat. Azonban - ahogy a következő fejezetekben bemutatom - telítési görbék nem állíthatók fel. A *Ps. stutzeri* CC B 21 felülethez való tapadása ásványvízben jóval intenzívebb a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 törzsénél de a vizsgált időtartamban egyik törzs sem éri el a BHI táplevesben tapasztalt homogén biofilm állapotot. Az eredmények szórása végig nagy marad.

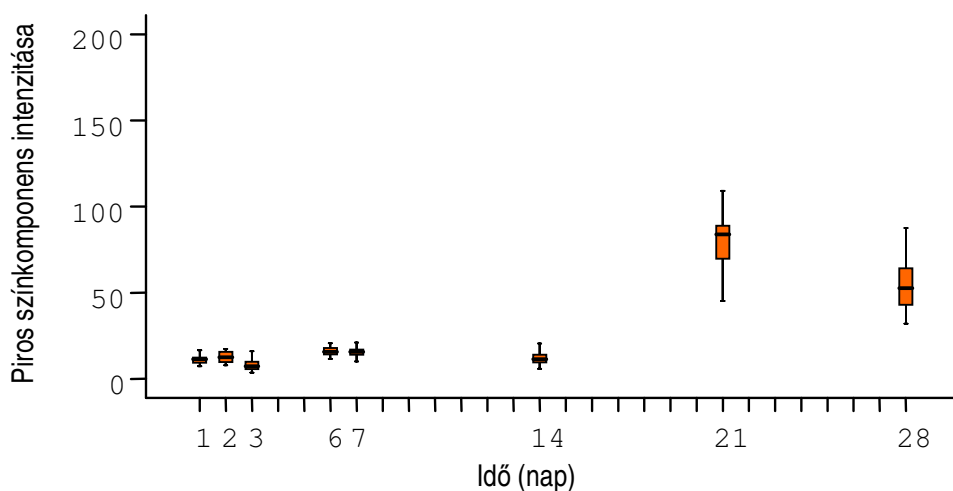
8. táblázat: Szénsavmentes ásványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, akridin narancssal festett különböző korú *Pseudomonas* biofilmek mikroszkópikus fényképei

Idő (nap)	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Ps. stutzeri</i> CC B 21
1.		
2.		
3.		
6.		
7.		
14.		
21.		
28.		

5.1.2.1. *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 ásványvízben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel

A mikroszkópos képek analízisének eredményeit szemléltető doboz diagram (8. ábra) jól mutatja, hogy az első 14 napban kevesebb számban találtunk a felületre kitapadt sejtet, majd a 21. naptól ez az érték növekedik, de nem éri el a BHI táplevesben modellezett biofilmnél megfigyelt értéket, a biofilm réteg inhomogén, az eredmények nagy szórást mutatnak. Az ábrát összehasonlítva a 4. ábrával, megállapítható, hogy a nem ideális ásványvíz közegben jelentősen kevesebb sejt tapadt a vizsgált rozsdamentes acél felületre, mint a tápanyagban gazdag, ideálisnak tekinthető BHI táptalajban.

A megfigyelt időtartam alatt mért eredmények alapján, ahogy az előző fejezetben említettem, telítési görbe nem állítható fel.



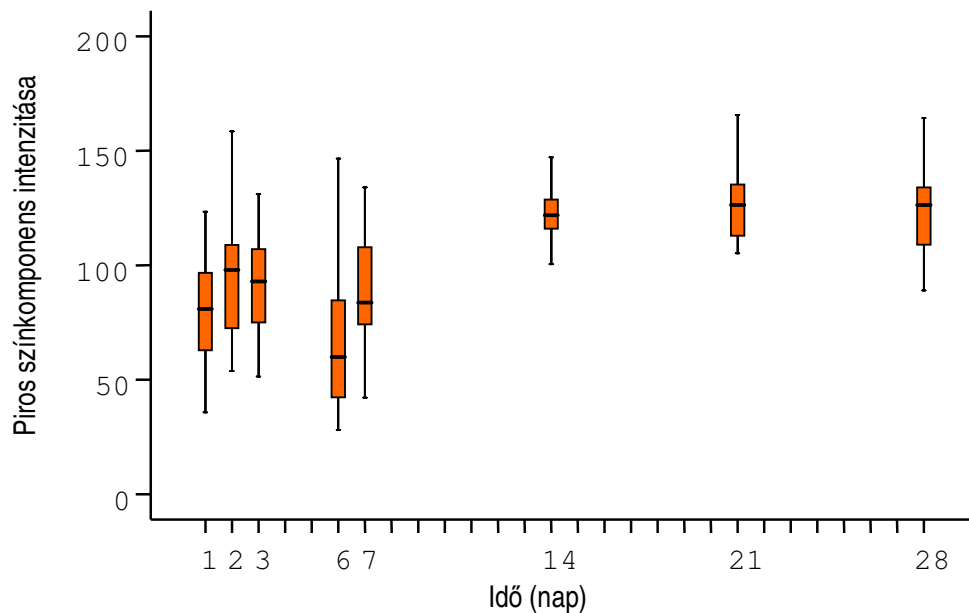
8. ábra: Piros színkomponens intenzitás értékei szénsavmentes ásványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 biofilm, akridin narancssal festett digitális fényképein az idő függvényében

5.1.2.2. *Ps. stutzeri* CC B 21 ásványvízben képzett statikus biofilmjének mikroszkópos vizsgálata akridin narancs festéssel

A *Ps. stutzeri* CC B 21 ásványvízben modellezett biofilm akridin narancs festésének mikroszkópos fényképeinek összefoglaló táblázatát (24. táblázat) a mellékletben helyeztem el. A *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 eredményeihez hasonlóan itt is igaz, hogy a nem ideális ásványvíz közegben jelentősen

kevesebb sejt tapadt a vizsgált rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületre, mint a tápanyagban gazdag, ideálisnak tekinthető BHI táptalajban.

A digitális képanalízis eredményeit szemléltető doboz diagram (9. ábra) alapján megállapítható, hogy az eredmények kisebbek, mint a BHI táplevesben képzett azonos törzs esetében, azonban nagyobbak, mint az azonos közegben *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 által képzett biofilmnél. A vizsgált időtartam alatt a *Ps. stutzeri* CC B 21 eredményei esetében nem mutatható ki emelkedés, a szórás végig magas értéket mutat, telítési görbe nem állítható fel. Mindezek a biofilm képződés korai szakaszára jellemző inhomogén biofilm jellemzői.



9. ábra: Piros színkomponens intenzitás értékei szénsavmentes ásványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett *Ps. stutzeri* CC B 21 biofilm akridin narancssal festett digitális fényképein az idő függvényében

5.1.3. Az akridin narancs festés eredményeinek összehasonlítása a vizsgált *Pseudomonas* törzsekkel modellezett biofilmeknél ideális és tápanyag szegény közegben

Az eredmények összehasonlíthatóságának érdekében a 10. ábrán a két baktériumtörzs akridin narancssal festett, BHI táplevesben és ásványvízben képzett biofilmjeiről készített képek piros szín összetevőinek intenzitás átlagértékeit ábrázoltam az idő függvényében. Az ábrát szemlélve egyértelműen megállapítható, ami az előzőekben bemutatott mikroszkópos fényképeken (8. 7. táblázatok) és doboz diagramokon (4-9. ábrák) is jól látszik, hogy:

- ásványvízben mindkét baktériumtörzs esetében jóval gyengébb biofilm képződés volt tapasztalható, mint az ideális környezetet modellező BHI táplevesben,
- a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 ásványvízben kisebb mértékű, a tápanyag dús BHI táplevesben pedig lassabb megtapadást mutatott, mint a *Ps. stutzeri* CC B 21

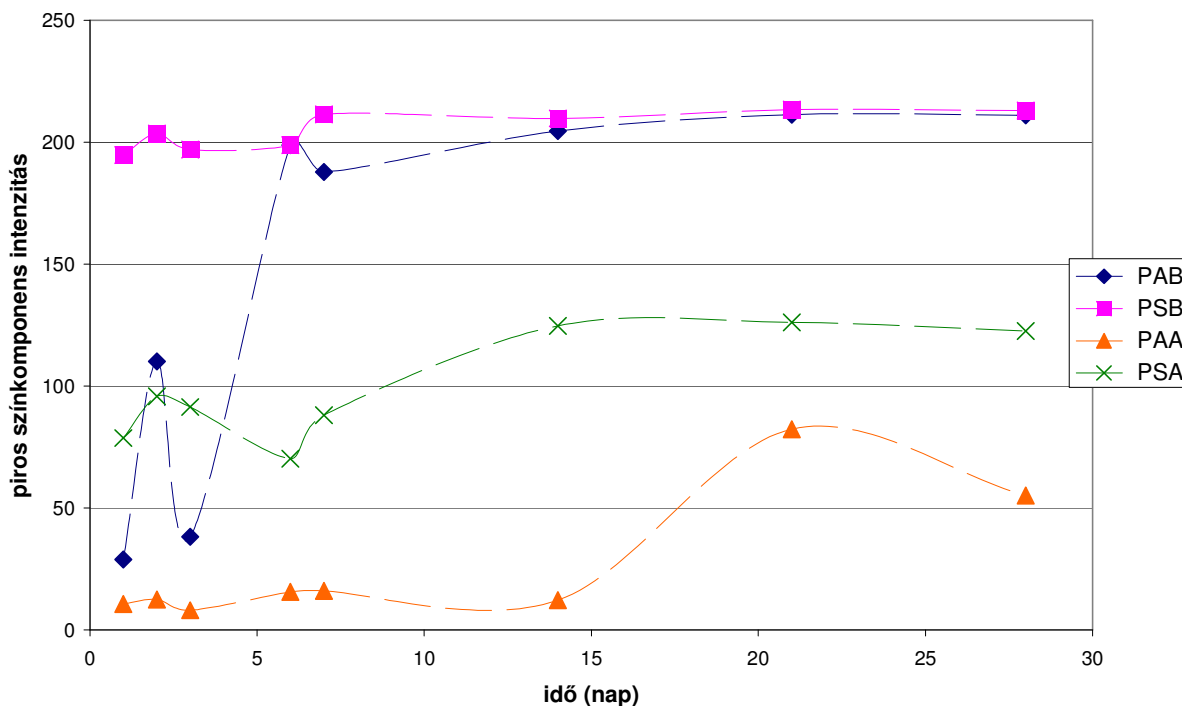
Az előző fejezetekben elemzett telítési görbék és doboz diagramok (4-9. ábrák) alapján ezen kívül egyértelmű, hogy:

- A fiatal biofilmek esetén az eredmények szórása rendre nagy, majd az érett biofilmnél jelentősen csökken. Ez a jelenség a fiatal biofilm inhomogenitásával magyarázható. Ilyenkor a sejtek felületre való kitapadása felhőszerű képletekben, egymástól független „szigeteket” alkotva kezdődik meg, a véletlenszerűen vett minták között jelentős eltérés tapasztalható.
- Szintén kicsi a szórás a minták eredményei között azokon a mintavételi napokon, amikor a sejtek felülethez való kitapadása még csekély. Ez a jelenség arra mutat rá, hogy itt a teljes felületen kevés a kitapadt kimutatható sejt szám, elvéve sem található egy-egy masszívabb biofilm sziget.
- A BHI táplevesben modellezett biofilmek esetében a rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületre való kitapadás és a biofilm növekedési kinetikája a vizsgált 28 nap intervallumban mind a vizsgált *Ps. aeruginosa* ATCC 9027, mind pedig a *Ps. stutzeri* CC B 21 esetében telítési görbével jellemezhető.
- A tápanyagban szegény szénsavmentes ásványvízben modellezett biofilmek esetében a festés eredményeire telítési görbe egyik vizsgált *Pseudomonas* törzs esetében sem illeszthető.

A BHI táplevesben illetve ásványvízben képzett biofilmeknél jelentkező különbségeknek az oka lehet az, hogy az ásványvíz erősen limitált tápanyagtartalma miatt a biofilm képződés jelentősen lassabb, mint az ideális, tápanyagban dús BHI táplevesben. Így az általunk végzett kísérletek időtartama alatt ásványvízben a biofilm növekedés kinetikájának csak egy korábbi szakaszát

sikerült megfigyelni, ahol a sejtek kitapadása még inhomogén felületet ad, így értelemszerűen a szórás magas, telítési görbe pedig nem állítható fel. Az eredmények alátámasztják azt a biofilm növekedést magyarázó elméletet, mely szerint a biofilm képződés első lépése a felület polaritásának megváltozása és a tápanyagok kitapadása a felületre, így a tápanyagban dúsabb környezetben a biofilm képződés erőteljesebb és gyorsabb (Kumar & Anand, 1998; Hood & Zottola, 1997)

Ezzel szemben a *Pseudomonas* törzsek közötti különbségek azzal magyarázhatóak, hogy az általam használt *Ps. stutzeri* CC B 21 törzs víznyerőhelyi izolátum, mely már adaptálódott a tápanyaghiányos környezethez, illetve eredeténél fogva hajlamosabb a biofilm képződésre.



10. ábra: Különböző közegben képzett biofilmekről készített képek piros szín összetevőinek intenzitás átlagértékei az idő függvényében

PAB= *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 BHI táplevesben képzett biofilmje, PSB= *Ps. stutzeri* CC B 21 BHI táplevesben képzett biofilmje; PAA= *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 szénsavmentes ásványvízben képzett biofilmje; PSA= *Ps. stutzeri* CC B 21 szénsavmentes ásványvízben képzett biofilmje



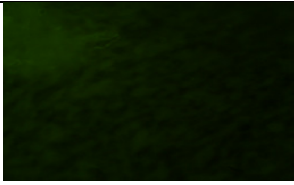
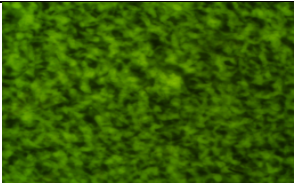

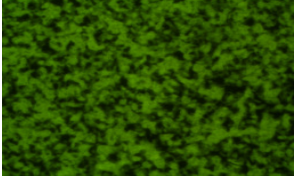

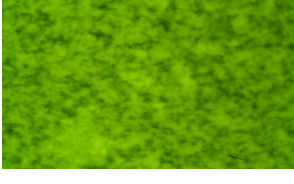

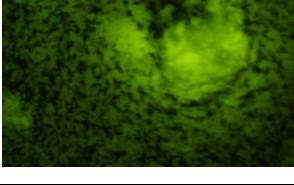
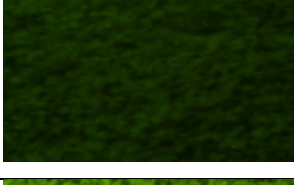
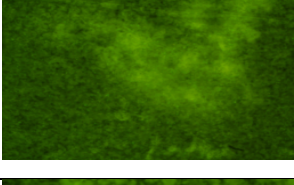
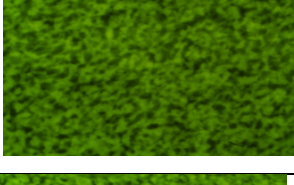
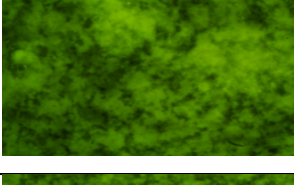

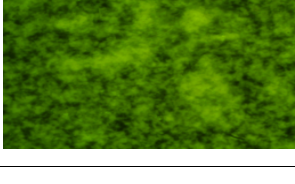
5.1.4. A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által BHI táplevesben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei FITC festéssel

A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által ásványvízben képzett statikus biofilmek vizuális kiértékelését az akridin narancs festés mellett FITC festést követően is elvégeztem. Míg az akridin narancs a felületre kitapadt majd ott szaporodó sejtek vizualizálásában és számszerű kiértékelésében nyújt segítséget, addig a FITC festék a benne található lektin a D-(+)-glükózhoz illetve D-(+)-mannózhhoz való jó kötődése révén a biofilm képzés során jellemző extracelluláris polimer (extracellular polymeric substance, későbbiekben EPS) termelést hivatott megjeleníteni.

Az akridin narancs eredményekhez hasonlóan a 9. táblázatban foglaltam össze 1-1 jellemző, FITC festést követő mikroszkópos fényképet a BHI táplevesben modellezett *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 illetve *Ps. stutzeri* CC B 21 biofilmekről.

A képek vizuális kiértékelésekor az akridin narancssal való festés alapján várt eredményre jutottam, azaz a megtapadt sejtek számához hasonlóan a kimutatható EPS mennyisége minkét törzsnél az idő függvényében növekedő tendenciát mutat. A *Ps. stutzeri* CC B 21 BHI táplevesben modellezett statikus biofilmjénél jóval intenzívebb EPS termelést tudtam kimutatni, mint a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 esetében. Részletes elemzéseket doboz diagramok segítségével a következő alfejezetekben végeztem.

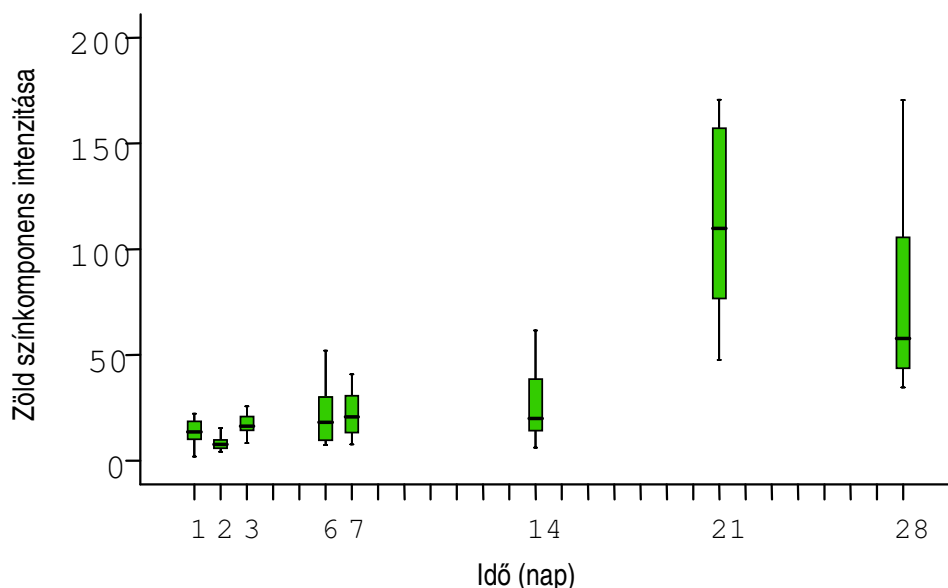
9. táblázat: BHI táplevesben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, FITC-cel festett különböző korú *Pseudomonas* biofilmek mikroszkópikus fényképei

Idő (nap)	<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>Ps. stutzeri</i> CC B 21
1.		
2.		
3.		
6.		
7.		
14.		
21.		
28.		

5.1.4.1. *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 BHI táplevesben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel

A *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 BHI táplevesben képzett statikus biofilm modelljénél a kimutatható EPS már az első napokban megjelenik néhány mintánál kis mértékben. Nagyobb mennyiségben egy-két minta esetében a 6., de jellemzően a 21. naptól kimutatható. Az eredmények doboz diagramban (11. ábra) való megjelenítésekor szembeötlő nagy szórása az EPS felhő-szerű megjelenésére utal, melyre több szakirodalom (Strathman et al, 2002; Sutherland 2001) is hivatkozik, és amely az egyes mikroszkópos fényképeken is jól látható (9. táblázat).

Az akridin narancs eredményekkel ellentétben a FITC eredményekre telítési görbe nem illeszthető.

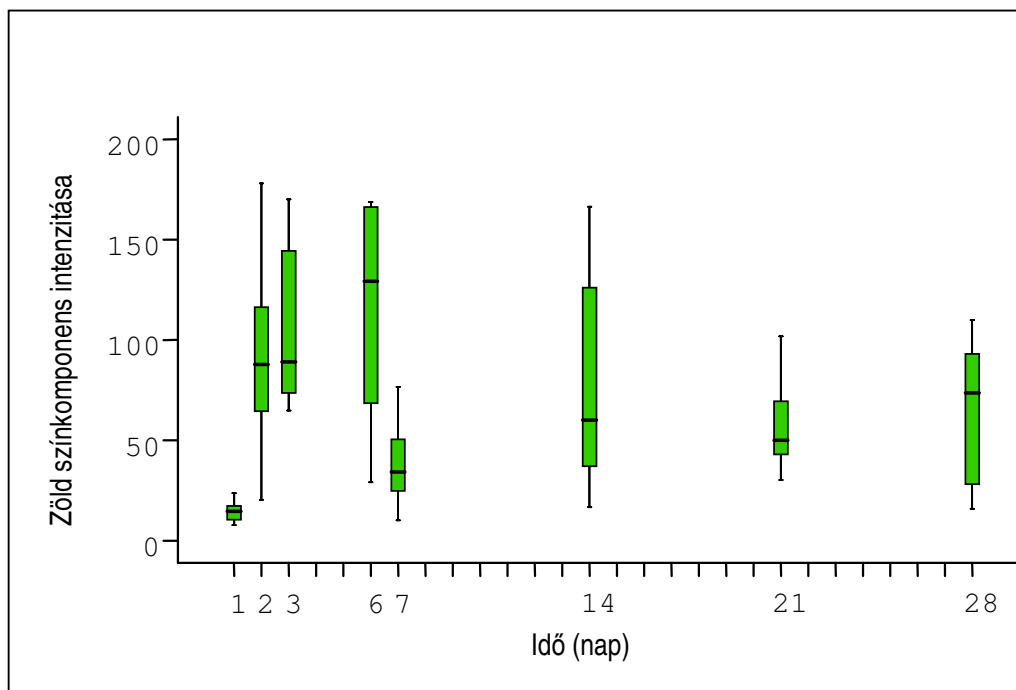


11. ábra: FITC-cel festett, BHI-ban képzett *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 biofilmről készített képek zöld szín összetevőinek intenzitás értékei doboz diagramban ábrázolva az idő függvényében

5.1.4.2. *Ps. stutzeri* CC B 21 BHI táplevesben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel

BHI táplevesben a *Ps. stutzeri* CC B 21 által képzett statikus biofilm esetében a kimutatható EPS képzés intenzívebb, mint a *Ps. aeruginosa*-nál, az extracelluláris poliszacharid mátrix az alkalmazott módszerrel hamarabb, már az első napokban is kimutatható nagyobb mennyiségben. A doboz diagramban (12. ábra) ábrázolt eredmények itt is nagy szórást mutatnak, mely szintén az EPS felhő-szerű megjelenésére utal és a mikroszkópos fényképeken is szépen látszik (9. táblázat).

Ps. stutzeri CC B 21 BHI táplevesben való statikus biofilm modelljénél a *Ps. aeruginosa*-hoz hasonlóan a FITC eredményekre telítési görbe itt sem illeszthető.



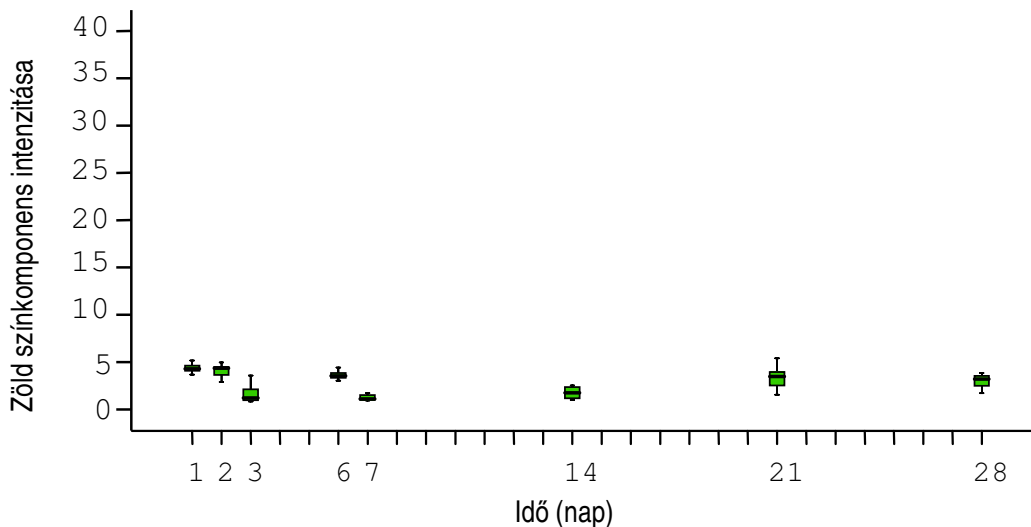
12. ábra: FITC-cel festett, BHI-ban képzett *Ps. stutzeri* CC B 21 biofilmről készített képek zöld szín összetevőinek intenzitás értékei doboz diagramban ábrázolva az idő függvényében

5.1.5. A vizsgált *Pseudomonas* törzsek által ásványvízben képzett statikus biofilmek mikroszkópos vizsgálatainak eredményei FITC festéssel

Az alábbi fejezetekben látható eredmények rávilágítanak arra, hogy a vizsgált *Pseudomonas* törzsek szénsavmentes ásványvízben végzett biofilm modellezései során a FITC festéssel kimutatható EPS mennyisége mind a BHI táplevesben végzett modellekhez képest mind abszolút értelemben igen csekély. Ennek oka lehet a szénsavmentes ásványvíz limitált tápanyag tartalma. Az ideálisnak tekinthető tápanyagdús környezetben a biofilmet alkotó sejtek könnyebben jutnak az EPS felépítéséhez szükséges tápanyagokhoz.

5.1.5.1. *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 ásványvízben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel

A *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 ásványvízben képzett statikus biofilm modelljénél szemben a BHI tápvelesben végzett modellezéssel EPS a minták igen kis számában és mértékben mutatható ki (13. ábra). Az eredményekre telítési görbe most sem illeszthető.

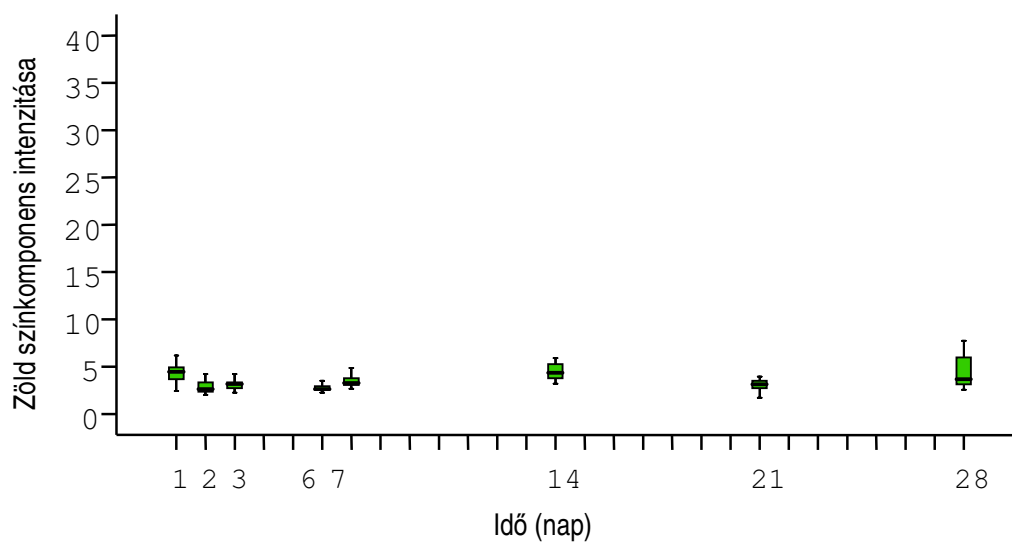


13. ábra: Szénsavmentes ásványvízben képzett, FITC-el festett *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 biofilmről készült digitális fényképek zöld színtkomponenseinek színintenzitás értékei doboz diagramban ábrázolva az idő függvényében.

5.1.5.2. *Ps. stutzeri* CC B 21 ásványvízben képzett statikus biofilm EPS-ének mikroszkópos vizsgálata FITC festéssel

A *Ps. stutzeri* CC B 21 ásványvízben képzett statikus biofilm modelljénél EPS csak elvétve mutatható ki (14. ábra) Az eredményekre telítési görbe most sem illeszthető.

A két festés eredményét összevetve megállapítható tehát, hogy a víznyerő helyről izolált, a tápanyag szegény környezethez adaptálódott *Ps stutzeri* törzs biofilm képzése a sejtek kitapadása szempontjából intenzívebb, mint a törzsgyűjteményi *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 törzsé, azonban kimutatható extracelluláris poliszacharidot a vizsgált időtartam alatt gyakorlatilag nem képez.



14. ábra: Szénsavmentes ásványvízben képzett, FITC-el festett *Ps. stutzeri* CC B 21 biofilmről készült digitális fényképek zöld színkomponenseinek színintenzitás értékei doboz diagramban ábrázolva az idő függvényében.

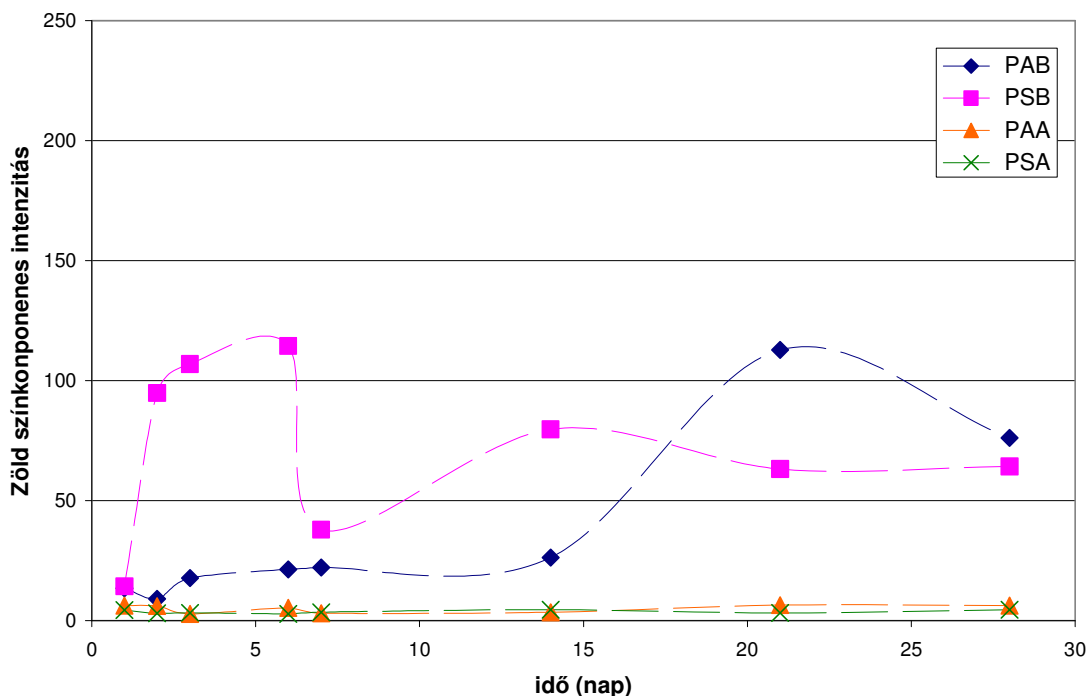
5.1.6. A FITC festés eredményeinek összehasonlítása a vizsgált *Pseudomonas* törzsekkel modellezett biofilmeknél ideális és tápanyag szegény közegben

Az eredmények összehasonlíthatóságának érdekében az akridin narancs eredményeknél bemutatotthoz hasonlóan a 15. ábrán a két baktériumtörzs FITC-el festett, BHI táplevesben és ásványvízben képzett biofilmjeiről készített képek zöld szín összetevőinek intenzitás átlagértékeit ábrázoltam az idő függvényében. Az itt bemutatott ábra valamint a fentiekben részletezett doboz diagramok és a szemléltetett mikroszkópos fényképek alapján elmondható, hogy:

- Ásványvízben mindkét baktériumtörzs esetében jóval gyengébb EPS képződés volt tapasztalható, mint az ideális környezetet modellező BHI táplevesben. Strathmann és munkatársai (2002) valamint Sutherland (2001) publikációjukban szintén arról számolnak be, hogy a tápközeg összetétele nagyban befolyásolja az EPS termelődését és annak összetételét. Az általam használt szénsavmentes ásványvíz illetve BHI tápleves tápanyagtartalma közötti nagy különbség magyarázza, hogy az ásványvízben sem a *Ps. stutzeri* CC B 21 sem a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 nem volt képes jelentős mennyiségű EPS-t termelni.
- Az eredmények szórása rendre nagy, mely jelenség az EPS felhőszerű képletekben való megjelenésével magyarázható. Mérési eredményeinket alátámasztja, hogy Strathmann és

munkatársai (2002) szintén felhőszerű, heterogén EPS-ről számolnak be FITC festést alkalmazva.

- Sem a tápanyagban szegény szénsavmentes ásványvízben-, sem az ideális, tápanyagban dús BHI táplevesben modellezett biofilmek esetében a FITC festés eredményeire telítési görbe nem illeszthető egyik vizsgált *Pseudomonas* törzsesetében sem. Az EPS képzés tehát egyik esetben sem érte el a maximumát a vizsgált idő alatt.



15. ábra: *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 és *Ps. stutzeri* CC B 21 baktériumtörzsek által BHI táplevesben és ásványvízben képzett, FITC-vel festett biofilmekről készített képek zöld szín összetevőinek átlagértékei az idő függvényében.

PAB= *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 BHI táplevesben képzett biofilmje, PSB= *Ps. stutzeri* BHI táplevesben képzett biofilmje; PAA= *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 szénsavmentes ásványvízben képzett biofilmje; PSA= *Ps. stutzeri* CC B 21 szénsavmentes ásványvízben képzett biofilmje

5.2. *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 biofilm eltávolítása különböző fertőtlenítőkkel

A felhasznált fertőtlenítőszereket úgy válogattam ki, hogy azok reprezentálják az élelmiszeripari gépek és berendezések környezetének tisztításakor, illetve fertőtlenítésekor, valamint a fertőtlenítő takarításban használt főbb hatóanyagokat.

5.2.1. A vizsgált fertőtlenítő eljárások biofilm inaktiválásának vizsgálata telepszámlálással és RABIT impedimetriás berendezéssel

10. táblázat: A vizsgált fertőtlenítők biofilm inaktiváló hatás vizsgálatainak eredményei

Tisztító-fertőtlenítőszerszer	Telepszámlálás –			RABIT –detektálási idő (óra)		
	log TKE / kupon					
	3 napos biofilm	7 napos biofilm	14 napos biofilm	3 napos biofilm	7 napos biofilm	14 napos biofilm
Kontroll	5,09	5,34	4,83	4:00	7:00	5:54
Domestos 2 %	NK	NK	NK	>48:00	>48:00	20:36
Descosal 1%	-0,3	NK	0,6	36:45	19:30	11:42
Biguanid Fläche 1%	NK	NK	NK	>48:00	37:36	30:42
Innofluid TF klór 2%	0,18	NK	NK	29:33	>48:00	19:54
Disquat L 1%	0,54	-0,3	0,92	36:08	34:03	29:30
Cleanisept 2 %	-0,3	NK	0,54	34:12	>48:00	23:00

NK=nem kimutatható

A fertőtlenítő eljárások eredményeit összehasonlítva (10. táblázat) egyértelműen megállapítható, hogy a vizsgált tisztító-fertőtlenítők közül a Domestos 2%-os oldata volt a leghatékonyabb, a kezelés után telepszámlálással nem volt kimutatható túlélő telepképző egység, az impedimetriás mérések pedig a 3 és 7 napos biofilm esetében teljes eltávolítást, a 14 napos biofilmnél jelentős inaktiválást jeleztek. Tuncan (1993), Helander és munkatársai (1997) valamint Wirtanen és munkatársai (1992, 2001) szintén arról számolnak be, hogy igen jó hatékonysággal használtak klór hatóanyagú fertőtlenítőszereket. A Biguanid Fläche esetében telepszámlálás eredményei szintén teljes csíraszám csökkentést mutatnak, azonban az impedimetriás mérések itt már a 3 napos biofilmnél is mutatnak túlélést. A Domestos és Biguanid Fläche kivételével a többi tisztító-fertőtlenítőszerrel mind a telepszámlálás mind a RABIT impedimetriás berendezés eredményei pozitívak. Az impedimetriás módszerrel mért detektálási idő az idősebb biofilmeknél rövidebb, amely a fertőtlenítő eljárással szembeni rezisztencia növekedésére utal. E tendenciában mindössze 2

kiugró eredmény figyelhető meg, az Innofluid TF Klór és a Cleanisept 7 napos biofilmje esetében, ahol a RABIT berendezés 48 óra alatt nem mutatott ki anyagcsere tevékenységet. A 14 napos biofilmek azonban ezen esetekben is nagyobb rezisztenciát mutatnak, mint a 3 napos, fiatal biofilm. Eredményeink összhangban vannak számos szerző szakirodalmi mérési eredményeivel (Holah et al., 1990; Frank & Koffi, 1990; Wright et al., 1991; Dhaliwal et al., 1992), akik szintén arról számolnak be, hogy minél öregebb biofilmet vizsgáltak, annál nagyobb rezisztenciát tapasztaltak a biofilm inaktiválási kísérleteikben.

A RABIT berendezéssel ellentétben a telepszámlálás eredményei nem mutatnak a vizsgált fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztencia emelkedésére utaló tendenciát, és az impedimetriás eredményektől sok esetben eltérőek. Ennek oka lehet az, hogy a sejtek a fertőtlenítő eljárás sokkhatására ún. „élő, de nem tenyészhető” (VNC) állapotba kerültek, a sejtek a fertőtlenítő eljárással járó stresszt túlélnek, és minimális anyagcserét folytatnak, mely a táptalaj impedimetriájának változása miatt RABIT berendezéssel detektálható, de hagyományos módszerrel szaporodás nem mutatható ki (Leclerc & da Costa, 1998; Leclerc & Moreau, 2002; Bischofsberger et al., 1990; Zottola & Sasahara, 1994; Hood & Zottola, 1995). Az egyes fertőtlenítő eljárások során élő, de nem tenyészhető állapotba jutott sejtek ipari jelentősége nagy, mindenképpen potenciális mikrobiológiai veszélyforrásnak számítanak, mivel a fertőtlenítés stressz hatása után idővel regenerálódhatnak, és szaporodásnak indulhatnak. A felületen maradt élő, de nem tenyészhető sejtek tápanyagul, megtapadási felületül is szolgálhatnak újabb biofilmek kialakulásához. A RABIT berendezés illetve telepszámlálás eredményeinek összevetése alapján az is megállapítható, hogy a biofilmek rezisztenciájának nyomon követésére épp a fent említett élő de nem tenyészhető sejtek detektálása miatt az impedimetriás módszer érzékenyebb, mint a hagyományos telepszámlálás. Hasonló következtetésre jutottak többek között Mosteller és Bishop (1993), Flint és munkatársai (1997) valamint Wirtanen és munkatársai (2001).

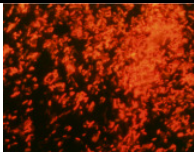
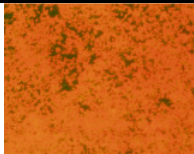
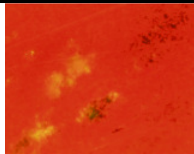
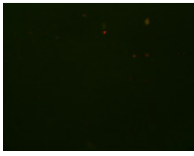


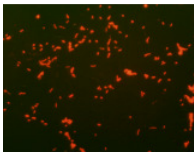
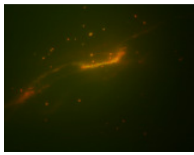
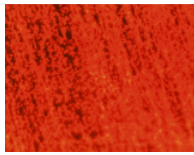

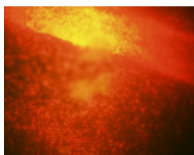
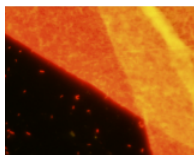
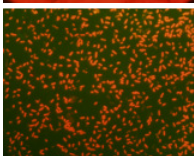

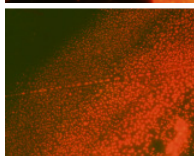
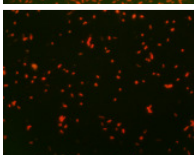
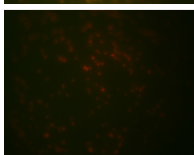
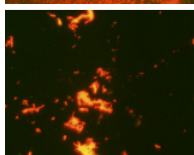
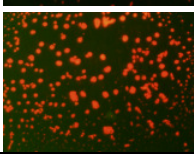
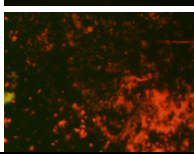
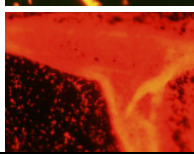
A tisztító-fertőtlenítőszer hatóanyagát tekintve eltérő eredményeket kaptunk a hasonló kémiai összetételű szerek esetében. Erre példa a Domestos illetve az Innofluid TF Klór szerek, melyek bár egyaránt klór bázisú tisztító-fertőtlenítőszer, azonban a Domestos jóval hatékonyabbnak bizonyult. Ez arra utal, hogy a hatóanyag mellett igen nagy jelentősége van a segédanyagoknak, azok tisztító hatásának. A segédanyagként felhasznált tenzidok szerepet játszhatnak a biofilm felületről való leválasztásában, a poliszacharid védőréteg inaktiválásában. Szakirodalmi adatok szintén alátámasztják a kombinált fertőtlenítő eljárások nagyobb hatékonyságát az egy fázisú fertőtlenítéssel szemben (Oh és Marshall, 1995; Antoniou és Frank, 2005; Cloete és Jacobs 2001, Wirtanen et al., 1996).

5.2.2. A vizsgált fertőtlenítő eljárások biofilm inaktiválása – akridin narancs festéssel végzett sejt eltávolító hatás vizsgálatok eredményei

Az akridin narancs festés eredményei megerősítik a telepszámlálás és impedimetriás mérések eredményeit, melyek szerint a leghatékonyabb fertőtlenítő eljárásnak a Domestos 2 %-os oldata bizonyult. A mikroszkópos fényképek alapján elmondható, hogy a Domestos nem csupán előlte a biofilmben található *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 sejteket, de a biofilmet a felületről el is távolította. Hoyle és munkatársai (1992) arról számolnak be, hogy a biofilm térbeli szerkezetének megbontásával a fertőtlenítőszerrel szemben tapasztalt emelkedett rezisztencia is megszűnt. A Domestos esetében hasonlóan, a jó biofilm eltávolító hatást a segédanyagként használt nem ionos tenzidek felületaktív hatásának tudható be, melyek a biofilm 3 dimenziós szerkezetét lerombolták, így adva szabad teret a fertőtlenítőszernek. Cloete és Jacobs (2001) szintén a nem-ionos felületaktív anyagok biofilm eltávolító hatásáról számolnak be. A többi kombinált hatóanyagú, tisztításra is alkalmas szer esetében azonban a kezelés után készült fényképeken egyértelműen megtalálhatóak a vizsgált rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen maradt baktérium sejtek. Ezek az eredmények arra hívják fel a figyelmet, hogy az élelmiszeripari körülmények között igen nagy jelentősége lehet a megfelelő fertőtlenítő eljárás kísérletes eredmények alapján való kiválasztásának, hiszen nem megfelelő biofilm eltávolítás során felületen maradt biofilm elhalt sejtjei is szerves anyagok, melyek egyrészt a felület érdességét, polarizáltságát megváltoztatva, másrészt tápanyagot szolgáltatva segítik elő a következő biofilm kialakulását.

A mikroszkópos fényképek megerősítik azt a következtetést is, mely szerint az idősebb biofilmek nagyobb rezisztenciát mutatnak a fertőtlenítő eljárásokkal szemben. A 7 illetve 14 napos biofilmek tisztító-fertőtlenítőszerrel való kezelés utáni fényképein rendre több felületen maradt sejt található, mint a fiatalabb, 3 napos biofilm esetében. Ez az idősebb biofilm masszívabb 3 dimenziós szerkezetével magyarázható, mely a fertőtlenítő szerekkel szemben fizikai védelmet nyújt, így a felületről való eltávolítást megnehezíti.

11. táblázat: A vizsgált fertőtlenítőszeres biofilm eltávolító hatás vizsgálatának eredményei – BHI táplevesben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, akridin narancssal festett különböző korú *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 biofilmek digitális fényképei fertőtlenítőszerrel való kezelés előtt és után

Fertőtlenítő eljárás	A biofilm kora		
	3. nap	7. nap	14. nap
Kontroll			
Domestos 2 %			
Descosal 1%			
Biguanid Fläche 1%			
Innofluid TF klór 2%			
Disquat L 1%			
Cleanisept 2 %			

5.3. Penészgombák szemmel látható termékkárosításának vizsgálata különböző, kereskedelemben kapható palackozott forrás- és ásványvizekben

5.3.1. A vizuális nyomon követés eredményei a szénsavas palackozott vízmintákban

Az általunk vizsgált 216 minta (Európa 4 országából származó, 6 különböző, kereskedelmi forgalomban kapható palackozott **szénsavas** forrás- és ásványvíz) **egyik mintájában sem** volt kimutatható szemmel látható termékkárosítás, a vizsgált penészgombával való beoltást követő 26 hét alatt. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az általunk vizsgált 4 különböző, palackozott szénsavas forrás- és ásványvízből izolált fonalgomba esetében palackozott szénsavas forrás- illetve ásványvizekben a jellemző minőség megőrzési idő (26 hét) alatt szabad szemmel látható micélium képződés okozta termékkárosításra és ezzel összefüggő fogyasztói panaszra nem kell számítani.

5.3.2. A vizuális nyomon követés eredményei a szénsavmentes palackozott vízmintákban

A szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvíz mintákban észlelt termékkárosítás időpontját részletesen az 12. táblázat szemlélteti. A szénsavas termékmintákkal ellentétben a vizsgálatunk alatt a **szénsavmentes** palackozott forrás- és ásványvizek **mindegyikében** észlelhető volt szabad szemmel látható micélium képződés.

A palackozott szénsavmentes ásványvíz mintákat vizsgálva szembeötlő, hogy minden esetben a FV2 kódjelű forrásvíznél jelentkezett a legkésőbbi időpontban szabad szemmel látható micélium képződés, ez a különbség azonban a statisztikai analízis alapján nem tekinthető szignifikánsnak. A szénsavmentes termékmintáinkban kimutatható szabad szemmel látható termékromlás eredményeivel elvégzett varianciaanalízis nem mutatott ki szignifikáns eltérést sem a különböző penészgombák, sem a felhasznált forrás- illetve ásványvizek között.

A vizsgált penészgombák az alábbi sorrendben mutattak micéliumképzést a 6 különböző palackozott szénsavmentes termékben:

- Az első szabad szemmel látható termékkárosítást az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében, a beoltott AV5 és FV1 vízmintákban észleltük a beoltást követő 12. héten mindhárom kiindulási koncentráció esetében.
- A 14. héten a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében, szintén a beoltott AV5 és FV1 valamint az AV4 vízmintákban mindhárom kiindulási koncentrációnál.
- A 18. héten az AV4 kódú vízmintánk *A. fumigatus* NCAIM F 00673 és *F. oxysporum* CC F 36 törzsekkel beoltott palackjainál is jelentkezett szabad szemmel látható termékkárosítás.
- A 20. héten termékkárosítást észleltünk:

- a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzssel beoltott AV3 mintákban,
- a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott AV5 és AV6
- valamint a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott AV4 kódjelű palackozott forrás- és ásványvízmintákban.
- A 24. héten
 - az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzssel beoltott AV6, AV3 és FV2;
 - a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzssel beoltott AV6, FV2
 - a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott FV1, AV3
 - a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott AV5 valamint FV1 mintákban észleltünk termékkárosítást.
- Végül a 26. héten jelent meg szemmel látható termékkárosítás
 - a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott FV2 kódjelű,
 - valamint a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott AV6, AV3, FV2 termékmintákban.

12. táblázat: A szabad szemmel látható termékkárosítás megjelenésének időpontjai a vizsgált penészgombákkal beoltott, 25°C-os hőmérsékleten inkubált palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvizeknél

Termékminta kódja	A beoltástól eltelt idő (hét)											
	<i>F. oxysporum</i> CC F 36			<i>C. cladosporoides</i> CC F 50			<i>A. fumigatus</i> NCAIM F 00673			<i>P. chrysogenum</i> NCAIM F 00837		
	K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3	K1	K2	K3
FV1	24	24	24	24	24	24	12	12	12	14	14	14
FV2	26	26	26	26	26	26	24	24	24	24	24	24
AV3	24	24	24	26	26	26	24	24	24	20	20	20
AV4	18	18	18	20	20	20	18	18	18	14	14	14
AV5	20	20	20	24	24	24	12	12	12	14	14	14
AV6	20	20	20	26	26	26	24	24	24	24	24	24

K1 = kiindulási koncentráció < 10 TKE/100 ml;

K2 = kiindulási koncentráció 10-50 TKE/100 ml;

K3 = kiindulási koncentráció 100-500 TKE/100 ml

FV= palackozott forrásvíz

AV= palackozott ásványvíz

5.3.3. A vizuális nyomon követés eredményei a beoltáshoz felhasznált különböző penészgomba fajok esetében a szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvíz termékmintáknál

A szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvíz termékminták esetében a szabad szemmel látható termékkárosítás eredményeit vizsgálva megállapíthatjuk, hogy:

- A termékkárosítás megjelenésének időpontja a vizsgált fonalagomba fajok kiindulási (beoltási) telepkepző egység számtól nem függött, az minden azonos szénsavmentes termékmintánál vizsgált fonalagombaként egy időben jelentkezett. (lásd 12 táblázat)
- A szénsavmentes termékminták esetében a szabad szemmel látható mértékű termékkárosítás 95% - os konfidencia szinten szignifikáns eltérést nem mutatott sem a vizsgált fonalagomba fajok, sem a különböző palackozott forrás- és ásványvizek között.

Az alábbiakban részletezett tapasztalati sorrendet jól szemlélteti a 16. ábra.

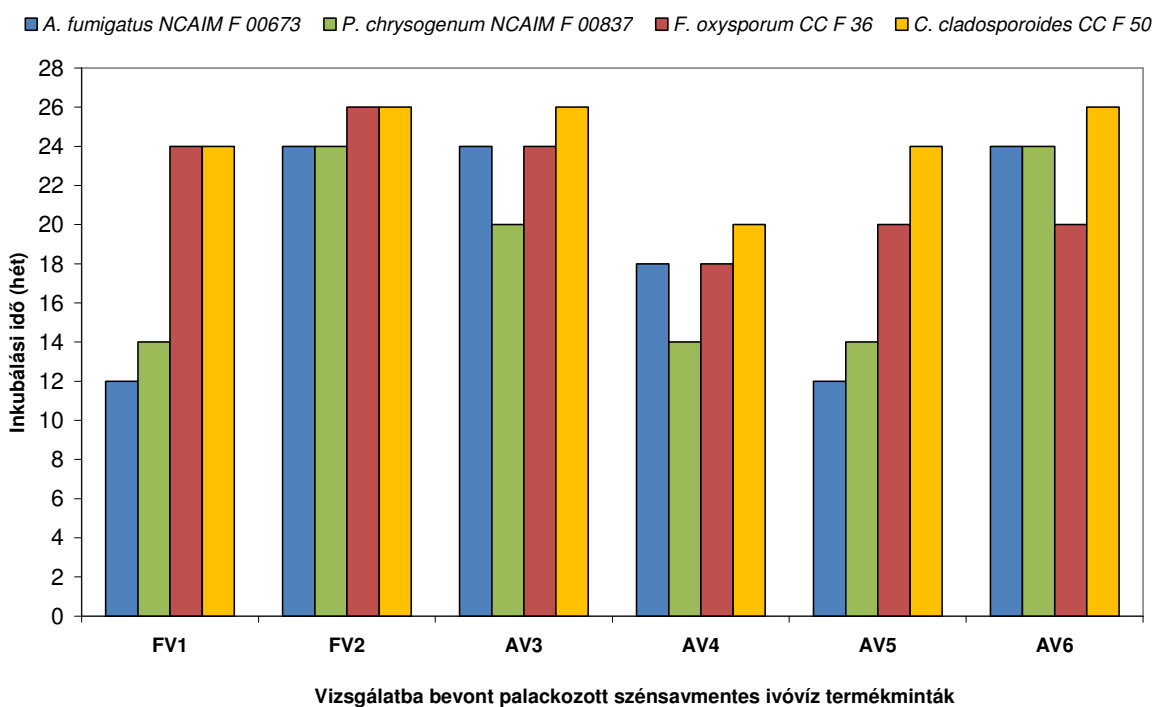
- A szabad szemmel látható termékkárosítás bár változó időpontban, de jellemzően először az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 vagy a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében jelentkezett. Ez alól egyedül az AV6 kódjelű ásványvíz a kivétel, ahol a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott mintáknál jelentkezett először szabad szemmel észlelhető termékkárosítás
- Minden vizsgálatunkba bevont szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvízmintánál jellemzően sorrendben harmadikként a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott mintáknál jelentkezett szabad szemmel észlelhető termékkárosítás (kivétel a fent említett AV6 kódjelű termékminta) és végül a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott minták esetében volt a legkésőbb tapasztalható a termékkárosítás (20-26. hét).

Fujikawa (1999) és munkatársai azonos nemzetségű fonalagomba fajokkal végzett hasonló kísérletiben a beoltás előtt sterilizált palackozott ásványvizekben 1 hónap elteltével tapasztalt szemmel látható termékkárosítást *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 és *C. cladosporoides* CC F 50 esetében. A párhuzamosan végzett, nem elősterilizált palackozott ásványvizekkel végzett kísérleteiben azonban egyáltalán nem tapasztalt szemmel látható micélium növekedést. Fujikawa a jelenséget a kísérő baktériumflóra gátló hatásával magyarázza. Az említett szakirodalmi eredményeknek ellentmondanak az általunk tapasztaltak. A termékmintáinkban elősterilizálás nélkül, a kísérő baktériumflóra ellenére is minden egyes szénsavmentes palackban minden vizsgált fonalagomba törzs esetében tapasztaltunk szemmel látható micélium fejlődést a vizsgált időszak alatt.

Az általam leírtakhoz hasonló eredményekről számolnak be Criado (2005) és munkatársai. Szénsavmentes palackozott ásványvízbe oltott *Penicillium citrinum* esetében 20 hét,

Cladosporium citrinum esetében 23 hét elteltével tapasztaltak szemmel látható termékkárosítást, míg a mi mérési eredményeink *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében már a 14. héttől, *C. cladosporoides* CC F 50 esetében azonban a szakirodalmi eredményeknél valamivel később, a 24-26. héten mutatták a micéliumok megjelenését. Criado kísérleteiben a beoltást megelőzően 5 hónapon keresztül előinkubált PET palackos ásványvizek esetében jóval hamarabb, 1 hónap elteltével is tapasztalt szemmel látható termékkárosítást, melyet a PET palackból kioldódó szerves anyagokkal magyaráz. Mi a kísérleteink során előinkubálást nem alkalmaztunk.

Más szakirodalmi adatok (Cabral & Pinto, 2002) szerint a legtöbb esetben *Penicillium* spp. illetve *C. cladosporioides* fajok felelősek a kereskedelemben kapható szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvizek szemmel látható termékkárosításáért. Ezek az a megfigyelések szintén alátámasztják azon eredményeinket, melyek szerint a fonalgombák potenciális termékkárosítók a szénsavmentes forrás- és ásványvizek esetén.



16. ábra: A szemmel látható termékkárosítás megjelenésének legkorábbi észlelése a vizsgált penészgombákkal beoltott, 25°C-os hőmérsékleten inkubált palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvizeknél

FV= palackozott forrásvíz; AV= palackozott ásványvíz

5.3.4. A vizuális nyomon követés eredményeinek összefoglalása

A vizuális nyomon követés során szignifikáns eltérést találtunk a szénsavas (beleértve az enyhén szénsavas termékmintákat is) és a szénsavmentes minták között. A szénsavas termékminták esetében a vizsgált időtartam (26 hét) alatt egyetlen termékmintában sem alakult ki szabad szemmel észlelhető termékkárosítás. Ezzel szemben a szénsavmentes termékmintáknál bár különböző időpontokban, de végül minden egyes beoltott palacknál észleltünk szemmel látható micéliumokat, még azoknál a palackoknál is, ahol a kiindulási konídium koncentráció igen kicsi (10 konídium/100 ml) volt. A szabad szemmel látható termékkárosodás megjelenési időpontjai között 95% - os konfidencia szinten sem a vizsgált forrás- és ásványvizek esetében, sem a beoltott fonalgombák esetében nincs kimutatható különbség. A termékkárosítás megjelenésének időpontja nem függ a vizsgált fonalgomba fajok kiindulási (beoltási) telepképző egység számától sem.

Eredmények arra mutatnak rá, hogy a palackozott szénsavmentes forrás- illetve ásványvizekben a fonalgombák igen kis kiindulási koncentráció esetén is a minőség megőrzési idő alatt szabad szemmel látható micélium képződést okozhat, így az ezzel összefüggő fogyasztói panaszok veszélye nagy. A szabad szemmel látható micélium képződés veszélyét fokozza, hogy a szénsavmentes forrás- illetve ásványvizek eltarthatósági ideje általában hosszabb, mint az általunk nyomon követett 26 hét, az jellemzően 52 hét.

5.4. Túlélő telepkepző egység szám meghatározás eredményei

A telepkepző egység szám meghatározás részletes eredményeit a szénsavas forrás- és ásványvizek esetében a 13.-16. táblázatok, szénsavas termékminták esetében pedig a 17.-20. táblázatok tartalmazzák, a tendenciákat a szemléletesség kedvéért fonalagomba fajonként egy-egy jellemző oszlop diagramokkal is szemléltetem a következő alfejezetekben (17.-24. ábrák).

5.4.1. Túlélő telepkepző egység száma szénsavas palackozott vízmintákban

A vizuális nyomon követés mellett az élő telepkepző egység vizsgálatokat is elvégeztük. A 6 különböző szénsavas forrás- és ásványvízzel (összesen 216 db palack) egy időben végzett kísérletek eredményei alapján egyértelműen megállapítható, hogy a szénsavas palackozott forrás- és ásványvízmintákban a kiindulási élő telepkepző egység a vizsgált időtartam alatt az összes vizsgált fonalagomba törzsnél csökkenést mutat. A kimutatható telepkepző egység szám csökkenés mértéke penészgomba törzsenként eltérő volt, a statisztikai analízis 95% - os konfidencia szinten szignifikáns eltérést mutatott ki az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében, ahol a túlélés jelentősen hosszabb volt, mint az összes többi vizsgálatba vont penészgomba törzsnél. A részletes eredményeket a 13.-16. táblázatok tartalmazzák.

13. táblázat: Túlélő *F. oxysporum* CC F 36 telepszám a vizsgált palackozott szénsavas forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	log TKE/100ml																	
	AV7			FV8			FV9			AV10			AV11			AV12		
0	1.00	1.49	2.51	0.85	1.51	2.46	0.90	1.49	2.46	0.90	1.56	2.50	0.95	1.46	2.45	1.00	1.46	2.49
1	0.85	1.28	2.41	0.60	1.34	2.02	0.70	1.30	2.31	0.30	1.43	2.48	0.70	1.20	1.30	0.78	1.34	2.38
2	0.48	1.00	1.26	0.30	1.04	1.91	0.48	1.11	1.97	NK	1.15	1.99	0.30	0.78	1.08	0.60	1.23	1.61
3	NK	0.85	1.15	NK	0.90	1.45	0.30	0.48	1.38	0.08	0.90	1.38	NK	NK	0.85	0.48	1.08	1.38
4	0.08	0.30	0.90	0.08	NK	1.04	NK	NK	1.20	-0.70	NK	0.85	0.08	0.20	NK	NK	0.60	1.04
6	NK	NK	NK	NK	-0.10	NK	0.08	-0.40	0.60	NK	0.30	NK	NK	-0.70	0.08	0.30	NK	0.30
8		0.08	0.20		NK	-0.10	NK	-0.40	NK		-0.40	0.51		NK	NK	NK	0.20	NK
10		NK	NK			NK		NK	0.38		NK	-0.40					NK	0.20
12									NK			NK						NK

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; NK = nem kimutatható; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz; Színek: piros = 500 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények; kék = 250 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények

14. táblázat: Túlélő *C. cladosporoides* CC F 50 telepszám a vizsgált palackozott szénsavas forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	log TKE/100ml																	
	AV7			FV8			FV9			AV10			AV11			AV12		
0	0.85	1.48	2.50	0.95	1.51	2.44	0.90	1.48	2.49	0.78	1.49	2.49	0.85	1.46	2.49	0.90	1.46	2.51
1	0.70	1.15	2.14	0.30	1.08	2.15	0.60	1.28	2.21	0.30	1.15	2.28	0.60	1.34	2.34	0.70	1.26	2.05
2	0.30	1.04	1.88	0.00	0.70	1.76	0.70	0.95	1.54	0.00	0.90	1.53	0.48	1.15	1.86	0.48	1.04	1.66
3	NK	0.95	1.34	NK	NK	1.26	0.30	0.70	1.08	NK	0.48	1.08	NK	0.60	1.59	0.30	0.78	1.38
4	0.08	NK	1.00	0.08	0.08	0.70	NK	NK	0.85	0.08	NK	0.85	-0.10	NK	0.95	NK	0.30	1.11
6	NK	0.30	NK	NK	NK	NK	0.08	-0.10	NK	-0.40	0.20	NK	-0.10	0.30	NK	0.08	NK	0.48
8		NK	0.20			0.56	NK	NK	0.20	NK	-0.40	0.38	NK	NK	0.20	NK	0.45	NK
10			-0.70			NK			NK		NK	-0.40			NK		NK	0.20
12			NK									NK						NK

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; NK = nem kimutatható; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz; Színek: piros = 500 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények; kék = 250 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények

15. táblázat: Túlélő *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 telepszám a vizsgált palackozott szénsavas forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	log TKE/100ml																	
	AV7			FV8			FV9			AV10			AV11			AV12		
0	0.85	1.59	2.59	0.95	1.58	2.56	1.00	1.58	2.57	0.78	1.58	2.60	0.90	1.57	2.59	0.90	1.58	2.56
1	0.60	1.48	2.25	0.78	1.40	2.14	0.85	1.30	2.41	0.48	1.40	1.95	0.60	1.85	2.03	0.30	1.18	2.32
2	0.30	1.00	1.99	0.48	1.20	1.89	0.48	1.04	2.30	0.30	1.04	1.76	0.48	1.91	1.89	0.48	0.85	1.79
3	NK	0.48	1.49	NK	0.95	1.51	NK	0.70	1.23	NK	0.95	1.26	NK	0.95	1.40	NK	0.30	1.32
4	0.08	NK	1.08	NK	NK	1.00	0.08	NK	0.90	0.20	NK	0.85	0.08	0.60	1.23	0.30	NK	1.15
6	-0.40	0.20	0.85	0.08	0.30	0.78	-0.40	0.45	NK	-0.70	0.20	NK	-0.40	NK	0.95	-0.70	0.30	0.85
8	NK	-0.40	NK	-0.70	-0.10	NK	NK	-0.22	0.45	NK	NK	0.56	NK	0.08	NK	NK	-0.40	NK
10		NK	0.20	NK	NK	0.30		NK	-0.40			-0.40		NK	0.30		NK	0.38
12			NK			NK		NK	NK			NK		NK	NK			NK

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; NK = nem kimutatható; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz; Színek: piros = 500 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények; kék = 250 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények

16. táblázat: Túlélő *A. fumigatus* NCAIM F 00673 telepszám a vizsgált palackozott szénsavas forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

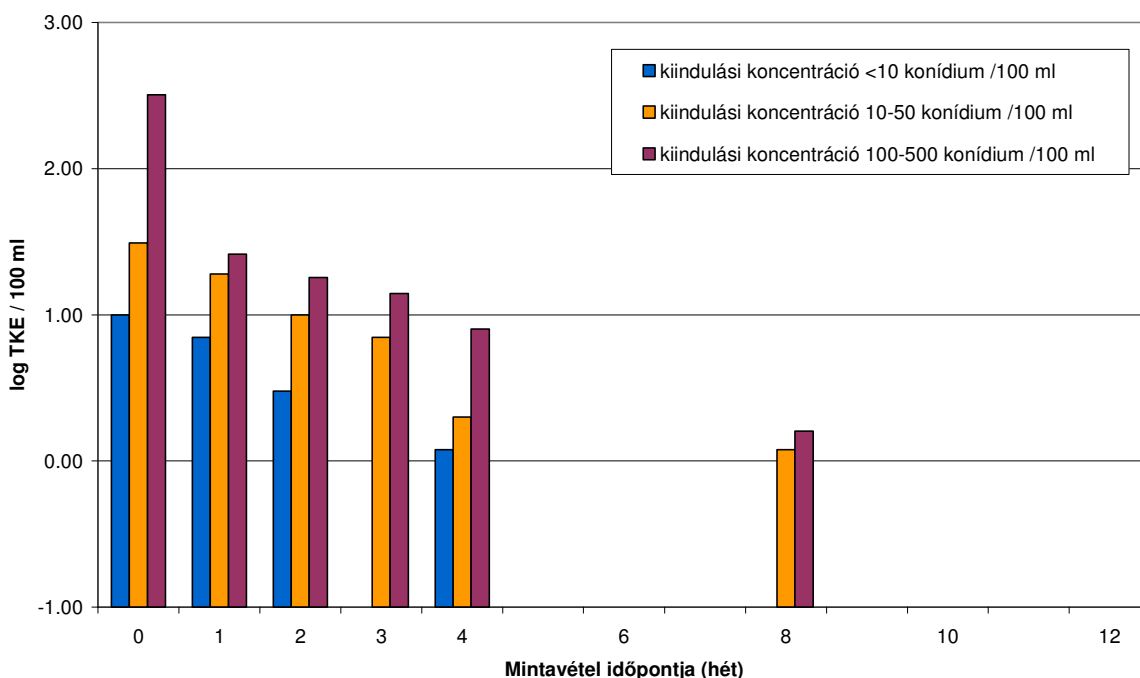
H	log TKE/100ml																	
	AV7			FV8			FV9			AV10			AV11			AV12		
0	0.95	1.62	2.61	0.90	1.62	2.62	0.85	1.59	2.61	0.90	1.60	2.61	0.95	1.62	2.63	0.90	1.62	2.61
1	0.90	1.56	2.59	1.00	1.58	2.60	0.90	1.53	2.56	0.85	1.57	2.58	1.04	1.66	2.61	0.78	1.57	2.61
2	1.00	1.58	2.57	0.95	1.60	2.51	0.70	1.48	2.51	0.90	1.54	2.59	0.90	1.77	2.60	0.90	1.58	2.58
3	0.85	1.53	2.46	1.00	1.45	2.49	0.78	1.49	2.49	0.78	1.51	2.57	1.00	1.70	2.59	0.70	1.54	2.54
4	0.78	1.49	2.53	0.90	1.51	2.54	0.60	1.46	2.38	0.90	1.53	2.56	0.90	1.66	2.56	0.60	1.49	2.51
6	0.70	1.45	2.45	0.78	1.45	2.47	0.48	1.48	2.36	0.78	1.49	2.53	0.85	1.62	2.37	0.85	1.43	2.49
8	0.78	1.56	2.41	0.70	1.48	2.25	0.70	1.43	2.23	0.85	1.48	2.51	0.90	1.58	2.43	0.78	1.40	2.45
10	0.90	1.38	2.34	0.60	1.26	2.26	0.60	1.30	2.08	0.70	1.43	2.47	0.70	1.52	2.35	0.70	1.41	2.41
12	0.70	1.45	2.34	0.70	1.08	2.23	0.30	1.36	1.93	0.78	1.30	2.48	0.78	1.38	2.27	0.60	1.34	2.33
26	0.15	0.62	1.00	0.15	0.51	0.91	0.34	0.58	1.06	0.20	0.38	0.94	-0.70	-0.10	0.20	0.34	0.88	1.09

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz; Színek: piros = 500 ml minta membránszűrés eredményéből számolt eredmények

5.4.1.1. Túlélő telepképző egység szám a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott szénsavas mintáknál

Minden *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott szénsavas mintákban egyértelmű csökkenő tendencia volt kimutatható a telepképző egységek számában. A telepképző egység eredmények gyakorlatilag minden szénsavas termékmintában hasonlóan alakultak, 95% - os konfidencia szinten szignifikáns különbség nem volt kimutatható, ezért oszlop diagramban egy példán keresztül (17. ábra) szemléltetem a lent részletezett tendenciát:

- A kimutatható telepképző egység szám a legkisebb konídium koncentrációval (<10 konídium/100 ml) beoltott termékmintákban jellemzően a 6., két esetben (FV9, AV12) pedig a 8. hét alatt nullára csökkent.
- 10-50 konídium/100 ml kiindulási koncentráció esetén a membránszűréssel kimutatható telepképző egység 2-3 hét alatt egy nagyságrenddel csökkent, majd 10 hét múlva (FV8 esetén a 8. héten) már nem volt kimutatható telepképző egység az 500 ml-re emelt térfogatú mintában sem.
- 100-500 konídium/100 ml kiindulási koncentrációnál a membránszűréssel kimutatható telepképző egység hasonlóan, 2-4 hetenként csökkent egy-egy nagyságrenddel, így az 500 ml-ben kimutatott telepképző egység a mérések 8-12. hetében érte el a nullát.

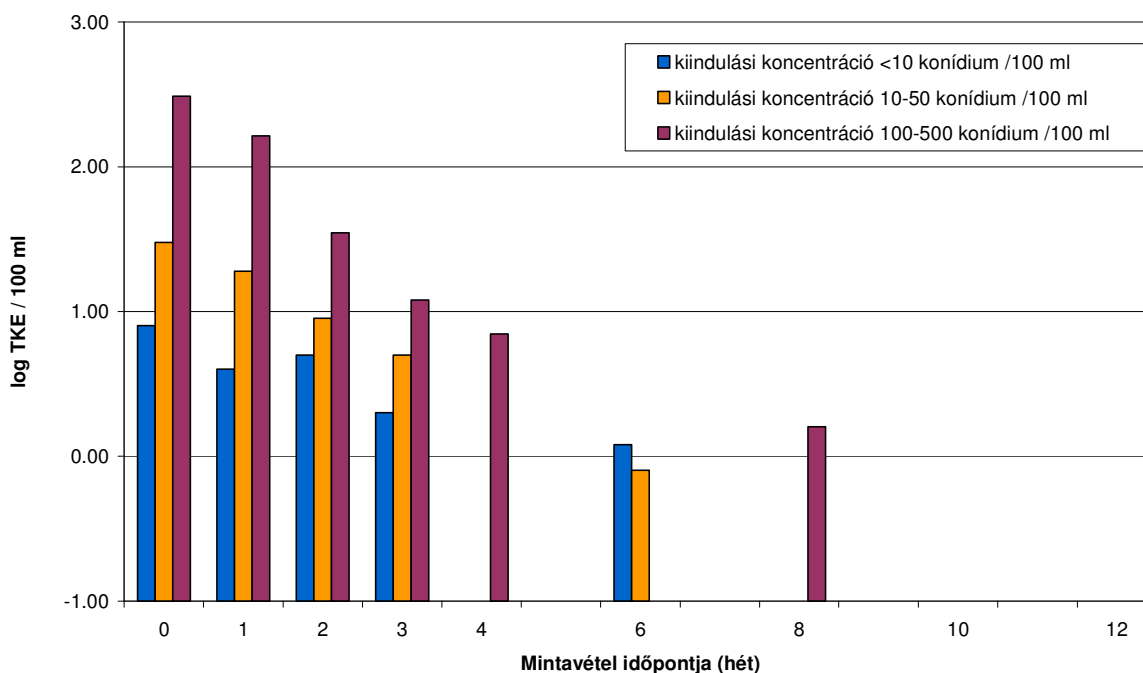


17. ábra: Túlélő *F. oxysporum* CC F 36 telepképző egységek száma az AV7 kódszámú szénsavas ásványvíz mintába való beoltás után. TKE = telepképző egység

5.4.1.2. Túlélő telepképző egység szám a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott szénsavas mintáknál

A telepképző egység eredményeket oszlop diagramban egy példán keresztül (18. ábra) szemléltetem. Minden, a vizsgált *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott szénsavas mintában, a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott mintákhoz hasonlóan egyértelmű csökkenő telepképző egység tendenciát mértünk, a különböző termékminták eredményei között 95% - os konfidencia szinten szignifikáns különbség nem mutatható ki. A túlélő telepképző egység szám az alábbiak szerint alakult:

- A kimutatható telepképző egység a legkisebb konídium koncentrációval (<10 konídium/100 ml) beoltott termékmintáknál az AV7, FV8 kódjelű termékminták esetében 6-, az összes többi vizsgált palackozott szénsavas forrás- és ásványvíz esetében 8 hét alatt csökkent nullára
- 10-50 konídium/100 ml kiindulási koncentráció esetén a membránszűréssel kimutatható telepképző egység 2-3 hét alatt egy nagyságrenddel csökkent, majd jellemzően a 8. héten már nem volt kimutatható telepképző egység az 500 ml-re emelt térfogatú mintában sem.
- 100-500 konídium/100 ml kiindulási koncentrációnál a membránszűréssel kimutatható telepképző egység hasonlóan, 2-4 hetenként csökkent egy-egy nagyságrenddel. Az 500 ml-ben kimutatott élő telepképző egység a mérések 10-12. hetében érte el a nullát.



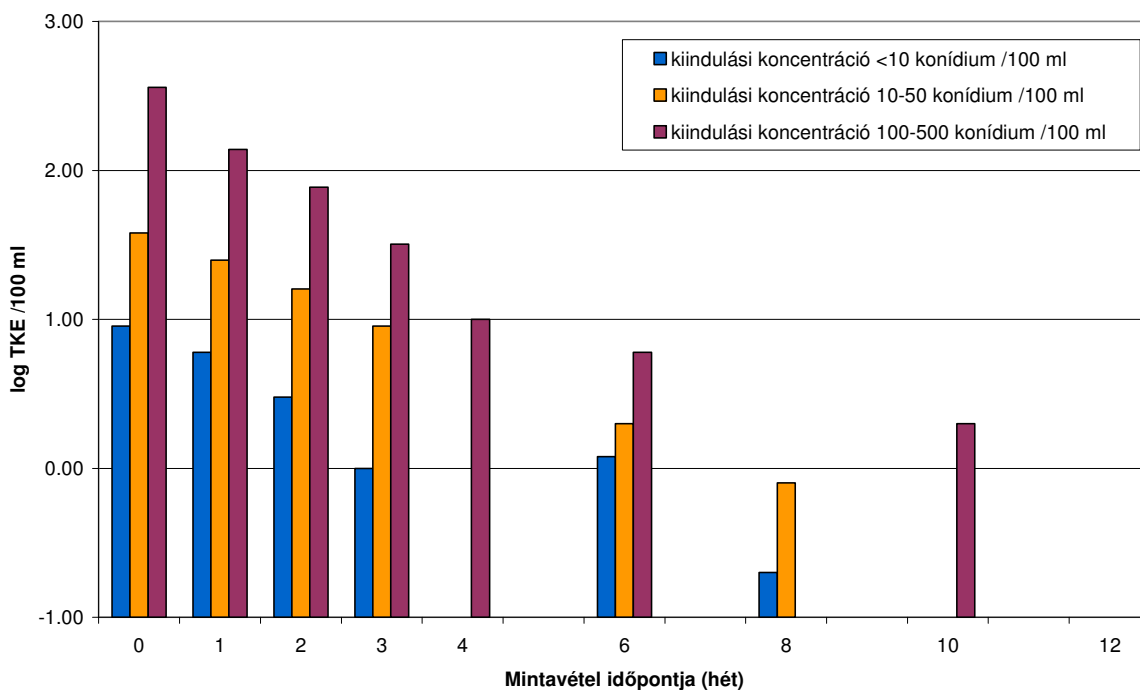
18. ábra: Túlélő *C. cladosporoides* CC F 50 telepképző egységek száma az FV9 kódszámú szénsavas forrásvíz mintába való beoltás után. TKE = telepképző egység

5.4.1.3. Túlélő telepképző egység szám a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzssel beoltott szénsavas mintáknál

A *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében az előzőekben tárgyalt két fonalgombba törzsnél valamivel nagyobb rezisztenciát tapasztaltunk a termékminták szénsavtartalmával szemben, de ezt a különbséget a statisztikai vizsgálataink 95%-os konfidenciaszinten nem támasztották alá. A membránszűrt mintákban a kimutatható telepképző egység szám nullára csökkent a következőképpen:

- A legkisebb beoltási koncentráció (<10 konídium/100 ml) esetében a 8. héttől (kivétel az FV8 kódjelű minta, ahol csak a 10. héten)
- 10-50 konídium /100 ml esetében a 10. héttől (kivétel az AV10 kódjelű minta, ahol már a 8. héten sem tudtunk kimutatni túlélő telepképző egységet)
- a legnagyobb kiindulási telepszámnál (100-500 konídium/100 ml) minden esetben a 12. héten

A telepképző egység eredmények a különböző szénsavas termékmintáknál nem mutatott szignifikáns különbséget, így azt oszlop diagramban itt is egy példán keresztül (19. ábra) szemléltetem.



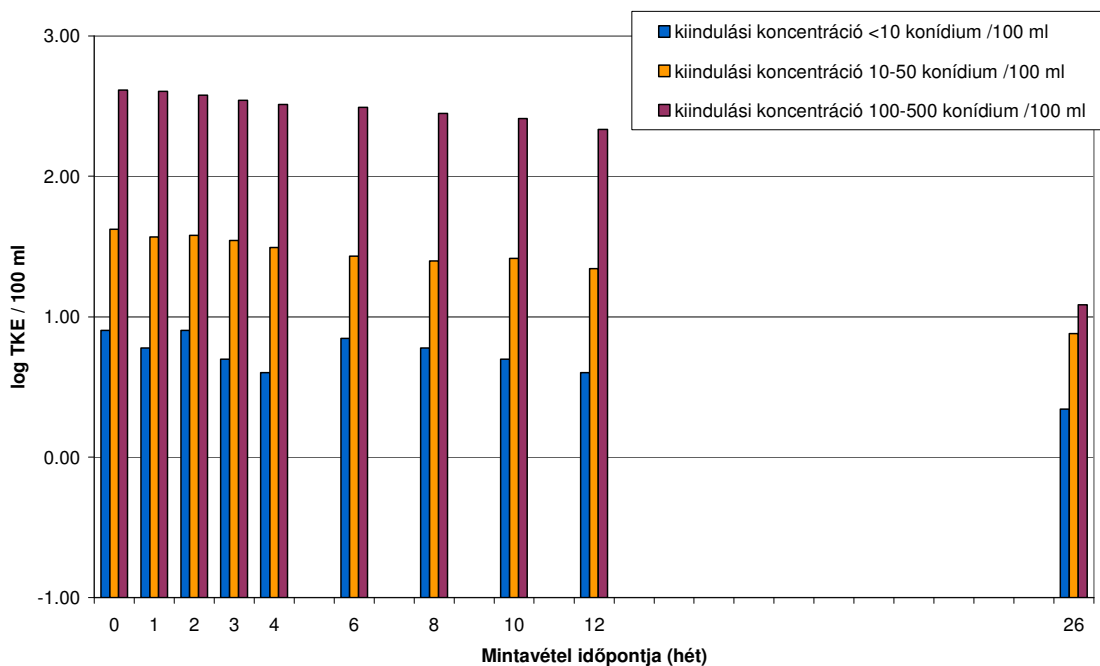
19. ábra: Túlélő *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 telepképző egységek száma az FV8 kódszámú szénsavas forrásvíz mintába való beoltás után. TKE = telepképző egység

5.4.1.4. Túlélő telepképző egység szám az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzssel beoltott szénsavas mintáknál

Az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében az előzőekben tárgyalt 3 fonalagomba törzsnél szignifikánsan erősebb rezisztencia volt tapasztalható a vizsgált termékminták szénsvartartalmával szemben. A beoltott palackokban a tervezett 12 hét vizsgálati időtartam elteltével is mértünk túlélő telepképző egységet. Az eredmények tükrében egy kiegészítő vizsgálatot végeztünk a beoltást követő 26. héten. Kimutatható telepképző egységet, még ekkor is találtunk. A telepképző egység szám csökkenés tendenciája a következőképpen alakult:

- <10 konídium/100 ml kiindulási telepszám esetében az első 12 hétben igen gyengén csökkenő illetve stagnáló telepképző egység számot tapasztaltunk. A 26. héten az 500 ml-re megemelt mintamennyiségben 0,2-2,2 TKE/100 ml túlélő telepképző egységet mutattunk ki.
- 10-50 konídium/100 ml kiindulási telepszám esetében az első 12 hétben enyhén csökkent a túlélő telepképző egység. A 26. héten 0,8-7,6 TKE/100 ml túlélő telepképző egység volt tapasztalható. A minta mennyiségét itt is 500 ml-re emeltük.
- A 100-500 konídium/100 ml kiindulási koncentrációjú mintáknál az előzőekhez hasonlóan csekély telepképző egység szám csökkenést tapasztaltunk. A 26. héten megismételt, 500 ml-re emelt térfogatú membránszűrés eredményei 1,6-11,6 TKE/100 ml -t mutattak.

A telepképző egység eredményeket oszlop diagramban itt is egy példán keresztül (20. ábra) szemléltetem.



20. ábra: Túlélő *A. fumigatus* telepképző egységek száma az AV12 kódszámú szénsavas ásványvíz mintába való beoltás után. TKE = telepképző egység

5.4.2. Túlélő telepkepző egység szám a szénsavmentes palackozott vízmintákban

A szénsavmentes palackozott vízminták túlélő telepkepző egység szám eredményeinek értékelésénél mindenképpen figyelembe kell venni azt a tényt, hogy a vizsgálat során ameddig a palack térfogata ezt lehetővé tette, ugyanazt a palackot mintáztuk az egymást követő mintavételi időpontokban. Minden mintavétel előtt a homogén minta előállítása érdekében a palackokat erőteljesen felráztuk, így a hifák töredezése miatt idővel nagyobb számú élő telepkepző egységet tudunk kimutatni, mint ha rázás nélkül, nyugalomban inkubáltuk volna a palackokat. Ez a körülmény rávilágít arra a tényre, hogy a fonalagombák telepkepző egység meghatározása folyékony közegből nem mindig ad egyértelmű eredményt. A fonalagombák telepkepző egység szám meghatározásának részletes eredményeit a 17.-20. táblázatok tartalmazzák. A telepszám meghatározás említett nehézségeit jól szemléltetik a következő alfejezetekben bemutatott oszlopdiagramok (17.-24. ábrák).

17. táblázat: Túlélő *F. oxysporum* CC F 36 telepszám a vizsgált palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	log TKE / 100 ml																	
	FV1			FV2			AV3			AV4			AV5			AV6		
0	0.60	1.51	2.46	0.90	1.51	2.52	0.78	1.51	2.51	0.78	1.51	2.49	0.78	1.51	2.45	0.78	1.51	2.49
1	1.00	1.48	2.46	1.00	1.48	2.63	0.70	1.48	2.63	0.70	1.48	2.52	1.00	1.95	2.51	0.70	1.60	2.51
2	1.00	1.48	2.48	1.00	1.30	2.71	1.00	1.60	2.76	1.00	1.60	2.53	1.30	2.32	2.54	1.00	2.65	2.38
3	0.70	1.60	2.56	1.30	1.65	2.87	1.18	1.78	2.82	1.30	1.74	2.62	1.78	2.62	2.59	1.30	2.71	2.54
4	1.00	1.70	2.57	1.30	1.70	2.91	1.54	1.78	2.86	1.60	1.78	2.76	1.95	2.90	2.63	2.28	2.63	2.54
6	1.48	1.78	2.60	1.78	1.74	2.99	1.60	1.85	2.91	1.48	1.81	2.83	1.78	2.81	2.52	2.38	2.84	2.28
8	1.88	1.85	2.64	1.60	1.78	3.26	1.95	1.95	2.98	1.65	1.88	2.99	2.30	3.15	2.65	2.78	2.88	2.60
10	1.95	2.11	2.62	1.95	1.95	3.36	1.78	0.48	3.08	2.15	2.15	3.04	2.26	3.32	2.69	2.83	2.92	2.59
12	2.34	2.28	2.68	1.30	1.40	3.62	2.15	0.90	3.30	2.40	2.43	3.15	2.45	3.32	2.52	2.88	2.95	2.67
14	2.15	1.92	2.60	1.95	2.30	2.94	2.04	1.92	2.98	1.95	2.30	2.91	2.08	3.32	2.28	2.34	2.62	2.23
16	2.30	1.95	2.32	1.88	2.00	2.85	2.30	1.95	2.79	1.88	1.00	3.15	2.30	3.15	2.65	2.85	2.58	2.32
18	2.15	2.11	2.57	1.78	2.00	2.82	2.08	2.11	2.91	2.08	2.85	2.80	2.51	3.32	2.61	2.90	2.40	2.41
20	1.95	2.08	2.68	1.60	1.78	2.51	1.95	2.08	2.68	2.04	3.04	2.34	2.26	3.32	2.69	2.60	2.51	2.34

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz

18. táblázat: Túlélő *C. cladosporoides* CC F 50 telepszám a vizsgált palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	LOG TKE / 100 ml																	
	FV1			FV2			AV3			AV4			AV5			AV6		
0	0.90	1.51	2.50	0.78	1.48	2.50	0.90	1.30	2.47	0.90	1.48	2.49	0.70	1.48	2.50	0.70	1.48	2.48
1	1.00	1.48	2.53	1.00	1.40	2.48	0.70	1.40	2.48	1.00	1.48	2.48	0.70	1.48	2.48	1.00	1.54	2.60
2	0.70	1.00	2.40	1.18	1.60	2.38	1.00	1.00	2.40	1.18	1.40	2.51	1.00	1.65	2.18	1.00	1.65	2.51
3	1.00	1.00	2.41	0.70	1.78	2.41	1.00	1.30	2.49	0.70	2.30	2.49	1.00	1.78	2.52	1.18	1.88	2.86
4	1.00	1.40	2.46	1.00	1.88	2.30	1.30	1.00	2.43	1.00	1.18	2.46	0.70	1.88	2.32	1.30	1.65	2.78
6	0.70	1.30	2.43	0.70	1.78	2.38	1.40	1.18	2.08	1.40	1.18	2.20	1.18	2.00	2.40	1.60	1.78	2.64
8	1.30	1.30	2.30	1.00	1.95	2.48	1.40	1.30	2.38	0.70	1.54	2.48	1.00	1.95	2.30	1.48	1.95	2.48
10	1.48	1.54	2.23	1.18	1.65	2.95	1.18	1.00	2.04	1.18	1.18	2.38	1.40	2.20	2.08	1.78	1.97	2.20
12	1.78	1.48	2.08	1.00	1.30	2.85	1.00	0.70	2.11	1.00	1.18	2.32	1.65	2.08	2.54	1.88	2.11	1.90
14	1.00	1.00	2.43	0.70	1.78	2.38	0.70	1.00	2.08	0.70	1.18	2.04	1.18	2.00	2.40	1.40	1.78	2.64
16	1.40	1.30	2.40	1.00	1.95	2.08	1.30	0.70	2.38	NK	1.00	2.41	1.00	1.95	2.34	1.48	1.88	2.48
18	1.00	1.18	2.04	1.18	1.60	2.53	NK	1.18	2.04	0.70	0.70	2.48	0.70	2.20	2.08	1.78	1.95	2.20
20	1.00	1.48	2.34	1.00	1.30	1.95	0.70	NK	2.11	NK	NK	2.15	1.65	2.00	2.18	1.40	2.04	1.90

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; NK = nem kimutatható; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz

19. táblázat: Túlélő *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 telepszám a vizsgált palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	log TKE / 100 ml																	
	FV1			FV2			AV3			AV4			AV5			AV6		
0	0.95	1.58	2.57	0.90	1.48	2.58	0.90	1.60	2.60	1.00	1.60	2.59	0.90	1.60	2.60	0.90	1.58	2.58
1	1.00	1.95	2.86	1.00	1.60	2.73	1.00	1.81	2.76	1.30	1.90	3.03	1.00	1.88	2.76	1.30	2.26	2.72
2	1.30	2.18	2.94	1.30	1.70	2.86	1.00	1.78	2.83	1.60	2.32	3.44	1.00	2.46	2.94	1.95	2.72	2.83
3	1.60	2.36	3.20	1.30	1.70	2.93	1.48	1.88	2.97	2.48	2.46	3.61	1.30	2.91	3.46	2.20	2.81	3.03
4	2.85	2.71	3.52	1.95	1.78	3.20	1.88	1.45	3.15	2.60	2.61	3.69	1.60	2.96	3.62	2.34	2.92	3.26
6	2.78	2.76	3.61	2.30	2.08	3.51	2.48	1.70	3.20	2.85	2.76	3.68	2.78	3.15	3.83	2.46	3.01	3.91
8	3.26	2.91	3.83	2.60	2.20	3.69	2.78	1.86	3.26	2.90	2.85	3.86	2.90	3.23	3.92	2.52	2.93	3.67
10	3.46	2.90	3.15	2.78	3.41	3.54	2.95	3.32	3.45	3.08	2.92	4.32	2.87	2.95	4.38	2.84	2.95	3.97
12	3.76	3.15	3.46	3.58	3.23	3.34	3.11	3.63	3.69	3.32	2.58	4.27	2.95	3.34	4.60	2.62	2.94	3.58
14	3.32	3.30	3.79	2.89	3.60	3.61	2.91	3.60	3.71	2.96	2.95	4.04	2.90	3.30	3.82	3.08	3.60	3.83
16	3.76	3.20	3.87	3.23	3.28	3.64	2.83	3.59	3.73	3.23	3.08	3.87	2.99	3.18	3.67	3.11	3.59	3.56
18	3.51	2.95	3.72	3.15	3.78	3.36	2.72	3.45	3.66	2.91	2.85	3.92	2.86	2.85	3.62	3.08	3.62	3.45
20	3.71	2.78	3.79	2.85	3.56	3.08	2.71	3.41	3.34	2.85	3.20	3.83	2.96	3.08	3.71	3.00	3.56	3.72

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz; Színek: zöld = 1 ml minta lemezöntés eredményéből számolt eredmények

20. táblázat: Túlélő *A. fumigatus* NCAIM F 00673 telepszám a vizsgált palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvíz mintába való beoltás után

H	log TKE / 100 ml																	
	FV1			FV2			AV3			AV4			AV5			AV6		
0	0.90	1.60	2.63	0.90	1.60	2.62	1.00	1.60	2.63	0.90	1.61	2.61	0.78	1.62	2.66	0.90	1.64	2.70
1	1.00	1.95	2.79	1.30	1.88	2.90	1.30	1.70	2.76	1.00	1.95	2.78	1.00	1.60	2.88	1.00	1.85	2.78
2	1.30	2.30	2.86	1.60	1.95	3.23	1.70	1.90	2.91	1.40	2.18	2.94	1.48	1.96	3.11	1.30	1.95	3.23
3	1.78	2.82	3.20	1.78	2.45	3.38	1.78	2.28	3.08	1.48	2.56	3.40	1.60	1.97	3.30	1.60	2.04	2.96
4	2.38	2.77	3.67	1.95	2.63	3.83	1.85	2.71	3.32	1.78	2.26	3.70	1.88	2.30	3.34	1.78	2.34	3.62
6	2.34	2.90	3.08	1.88	2.72	3.86	1.95	2.72	3.71	1.88	2.60	3.85	1.95	3.30	3.34	2.20	3.00	4.30
8	2.48	3.08	3.98	2.20	2.86	3.59	2.32	2.67	3.76	1.95	3.00	3.76	2.15	3.65	3.59	2.85	2.85	3.93
10	3.36	3.46	3.91	2.61	2.92	3.98	2.83	2.91	3.59	2.08	2.95	3.63	2.30	3.62	3.83	2.46	2.99	4.28
12	3.23	3.70	3.34	2.49	3.66	3.00	2.00	2.30	3.34	2.18	2.75	3.83	2.23	3.86	3.89	2.30	3.45	3.15
14	3.92	3.87	3.78	2.32	3.61	3.32	2.95	2.86	3.67	1.95	2.60	3.79	2.32	3.61	3.80	1.95	2.85	3.91
16	3.43	3.84	3.67	2.23	3.46	3.38	2.18	2.32	3.65	2.18	3.28	3.64	2.26	3.51	3.64	2.40	3.11	3.80
18	3.89	3.89	3.76	2.08	2.85	2.85	2.04	2.86	3.79	2.08	2.85	3.36	2.04	3.36	2.78	2.08	2.85	3.77
20	3.81	3.82	3.72	2.04	2.90	2.95	2.08	2.61	3.69	2.04	3.56	3.79	2.11	2.78	2.95	2.04	3.41	3.79

H= mintavétel időpontja (hét); TKE = telepképző egység; AV= Ásványvíz; FV= Forrásvíz; Színkód: zöld = 1 ml minta lemezöntés eredményéből számolt eredmények

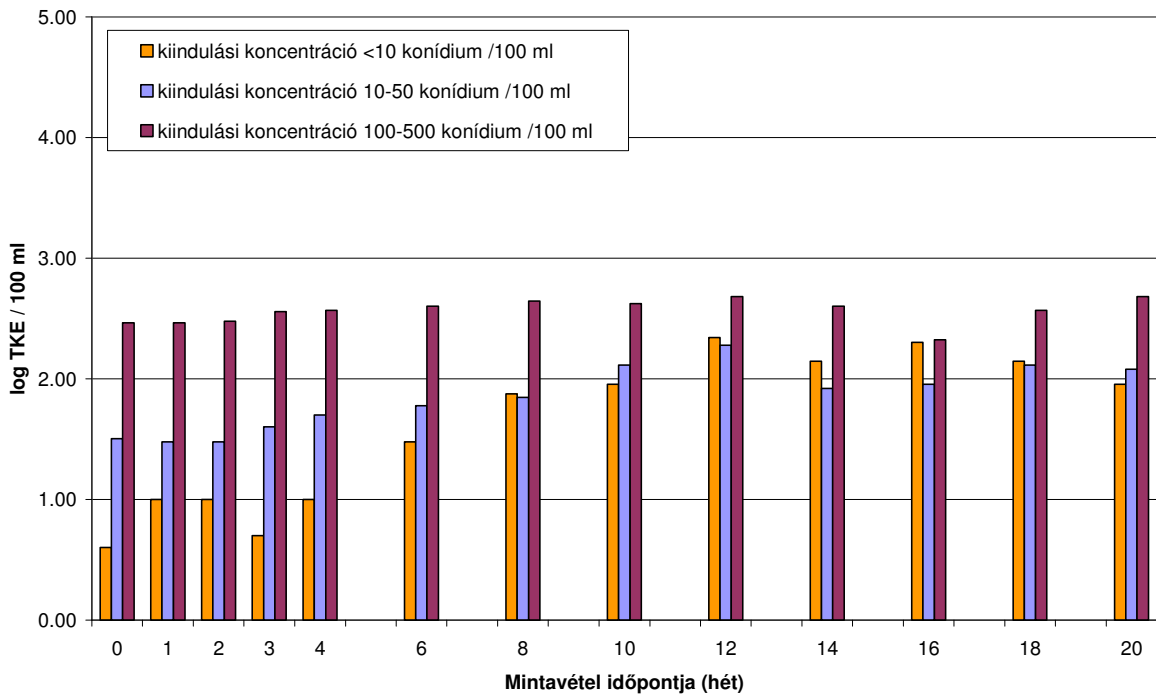
5.4.2.1. Túlélő telepképző egység szám a *F. oxysporum* CC F 36 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál

A vizsgált *F. oxysporum* CC F 36 törzs a kísérleteink ideje alatt túlélő telepképző egység száma ingadozó. Tendenciáját tekintve csak a két kisebb beoltási koncentrációjú mintáknál mutat növekedő élő telepképző egység eredményeket. A kimutatható telepképző egység szám növekedés az esetek nagy részében itt sem jelentős, a legnagyobb növekedést az AV5 kódjelű ásványvíz >10 TKE/100 ml kiindulási koncentrációjánál tapasztaltunk. Itt közel 2 logaritmus növekedés volt mérhető a 12. hét végén. Ezzel szemben a 10-50 konídium/100 ml beoltási koncentrációjú mintáknál az élő telepképző egység növekedés maximum 1 nagyságrendet tesz ki és a telepképző egység eredmények a kísérletek végére a kiindulási tartomány közelébe csökkentek.

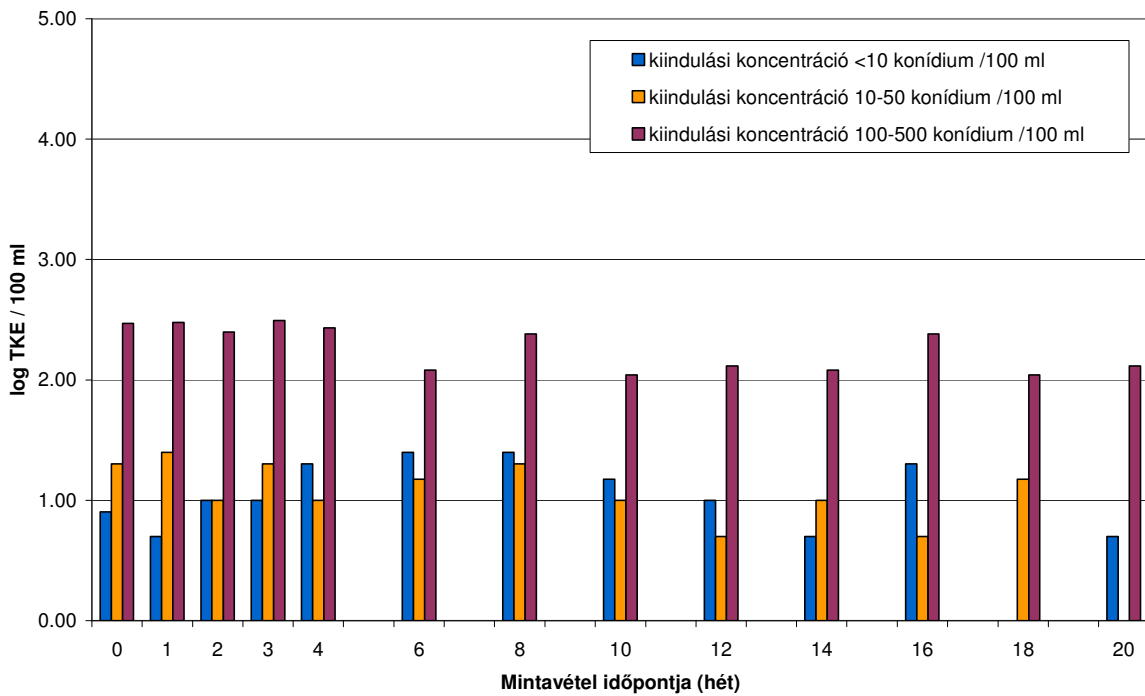
- A legkisebb beoltási koncentrációjú mintáknál (<10 konídium/100 ml) a telepképző egység szám erős ingadozás mellett csekély mértékű (maximum 2 logaritmus) emelkedést mutatott a vizsgált időszakban. A 20. héten mért élő telepképző egység minden esetben nagyobb volt a kiindulási értéknél
- A 10-50 TKE/100 ml beoltási koncentrációjú mintáknál az élő telepképző egység szám növekedés kisebb mértékű volt, de szintén minden mintánál emelkedő tendenciát mutat.
- Ezzel szemben a nagy kiindulási koncentrációjú mintáknál (100-500 konídium/100 ml) az ingadozó élő telepképző egység érték stagnált, esetenként a kiindulási érték közelébe illetve alá is süllyedt a vizsgálatok utolsó hetében.

A telepképző egység eredményeket oszlop diagramban a szénsavas forrás- és ásványvíz minták eseményeit tárgyaló fejezetekhez hasonlóan itt is egy példán keresztül (21. ábra) szemléltetem

A statisztikai elemzések 95%-os konfidencia szinten rámutatnak, hogy a *F. oxysporum* CC F 36 kimutatható túlélő telepképző egység száma a kísérleteink során a *C. cladosporoides* CC F 50 törzsnél szignifikánsan nagyobb, a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 illetve *A. fumigatus* NCAIM F 00673 penészgombákénál szignifikánsan kisebb.



21. ábra: Túlélő *F. oxysporum* CC F 36 telepképző egységek száma az FV1 kódszámú szénsavmentes forrásvíz mintába való beoltás után. TKE = telepképző egység



22. ábra: Túlélő *C. cladosporoides* CC F 50 telepképző egységek száma az AV3 kódszámú szénsavmentes ásványvíz mintába való beoltás után. TKE = telepképző egység

5.4.2.2. Túlélő telepképző egység szám a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál

A telepképző egységek száma a vizsgált *C. cladosporoides* CC F 50 törzs esetében csak igen kis mértékben emelkedett, majd a vizsgált időtartam végére kisebb ingadozással jellemzően a kiindulási érték alá csökkent. Ezek az eredmények egybevágóan a vizuális nyomon követés során tapasztaltakkal, ahol a vizsgált fonalagomba törzsek közül *C. cladosporoides* CC F 50 esetén észleltünk legkésőbb szemmel látható termékkárosítást.

- A <10 és a 10-50 konídium/100 ml kiindulási koncentrációjú mintáknál a vizsgált időszakban élő telepképző egység szám ingadozás mellett tendenciáját tekintve stagnáló értékeket mértünk. Csak elvétve tapasztalható egy-egy kiugró 0,5-1 nagyságrendű telepképző egység szám emelkedést.
- A legnagyobb beoltási koncentrációjú mintáknál (100-500 konídium/100 ml) szintén ingadozó telepképző egység számot tapasztaltunk, itt azonban minden mintánál csökkent a kimutatható élő telepképző egység szám a vizsgált időszak (20 hét) végére.

Tapasztalható volt a *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál, hogy a különböző koncentrációban beoltott azonos terméket tartalmazó palackok a kísérlet során többségükben végig megtartották a kiinduláskor jellemző élő telepképző egység szám különbséget. Ezt a többi vizsgált fonalagomba törzsnél nem tűnt konzekvensnek. Az előző alfejezetben tárgyalt *F. oxysporum* CC F 36 esetében például többször tapasztalható volt, hogy a 10-50/100 ml nagyságrenddel beoltott minták telepképző egység száma már akár a 3. vizsgálati héten meghaladta az egy nagyságrenddel nagyobb beoltási koncentrációjú párhuzamos mintáét. A statisztikai elemzések 95%-os konfidencia szinten rámutatnak, hogy a kimutatható túlélő telepképző egység száma a kísérleteink során a *C. cladosporoides* CC F 50 törzsnél szignifikánsan kisebb, mint a többi vizsgált penészgomba esetében.

Szintén *C. cladosporoides* CC F 50 törzssel beoltott palackozott szénsavmentes ásványvizekkel végeztek megfigyeléseket Fujikawa és munkatársai (1999). Azokban a mintákban, amelyeket a beoltás előtt sterilizáltak, a beoltást követő harmadik hónaptól jelentős növekedést tapasztaltak a telepképző egység számban, míg a nem elősterilizett mintáknál a mi eredményeinkhez hasonlóan telepképző egység szám stagnálásról számolnak be. Ezek az eredmények a feltételezett kísérő baktériumflóra gátló hatásával magyarázhatóak.

A kereskedelemben kapható palackozott szénsavmentes forrás- és ásványvizek mikrobiológiai vizsgálati eredményeiről beszámoló szakirodalom szerint (Cabral & Pinto, 2002) *C. cladosporoides* CC F 50 található a minták 50%-ban, amennyiben a palackban szabad szemmel észlelhető,

fonalasgombák okozta termékkárosítás is észlelhető, és a termékminták 32 %-ban, amennyiben azokban szabad szemmel nem észlelhető a fonalagomba micélium növekedése.

A telepkepző egység eredményeket oszlop diagramban ismét egy példán keresztül (22. ábra) szemléltetem

5.4.2.3. Túlélő telepkepző egység szám a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál

A *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében szintén tapasztaltunk ingadozást a szénsavmentes minták túlélő telepkepző egység eredményeiben, azonban az előzőekben tárgyalt két fonalagomba törzssel ellentétben a tendencia egyértelműen emelkedést mutat minden kiindulási koncentrációnál és minden termékmintánál.

- A legkisebb beoltási koncentrációjú (<10 / 100 ml) mintáknál az élő telepkepző egység szám növekedés a vizsgált időszak végére elérte a 2-3 nagyságrendet. A legerőteljesebben az FV1-, a leggyengébben az AV4 kódjelű mintában szaporodott a vizsgált *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzs.
- A 10-50 /100 ml nagyságrenddel beoltott mintákban a telepkepző egység növekedés valamivel mérsékeltebb (1-2 logaritmus), de egyértelműen kimutatható.
- A legnagyobb beoltási koncentrációval rendelkező mintáknál (100-500 /100 ml) volt a legcsekélyebb intenzitású (jellemzően 1 logaritmus) a kimutatható telepkepző egység szám növekedés.

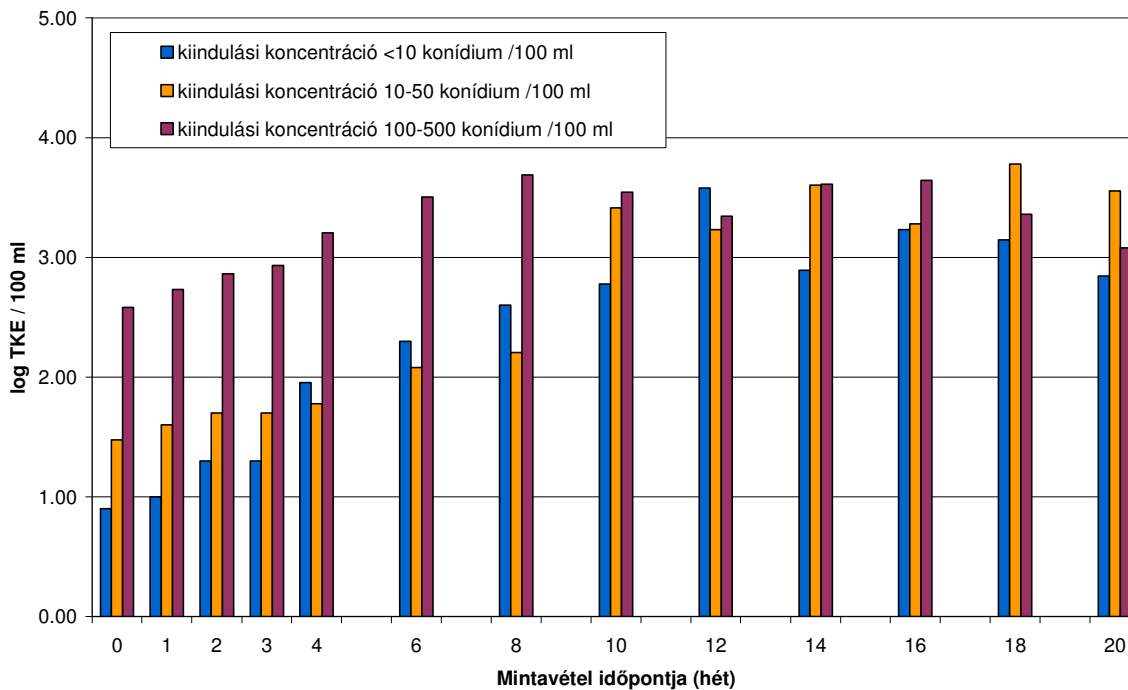
A statisztikai elemzések 95%-os konfidencia szinten rámutatnak, hogy a kimutatható túlélő telepkepző egység szám a kísérleteink során a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzsnél szignifikánsan nagyobb, mint a *C. cladosporoides* CC F 50 és a *F. oxysporum* CC F 36 penészgomba esetében, de nem mutatható ki szignifikáns különbség az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzs eredményeivel szemben.

A telepkepző egység kimutatások eredményei itt is összhangban állnak a vizuális nyomon követésnél tapasztaltakkal, ahol a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál mind a *F. oxysporum* CC F 36 mind pedig a *C. cladosporoides* CC F 50 törzsekkel beoltott szénsavmentes mintákénál hamarabb jelentkezett szabad szemmel látható termékkárosítás.

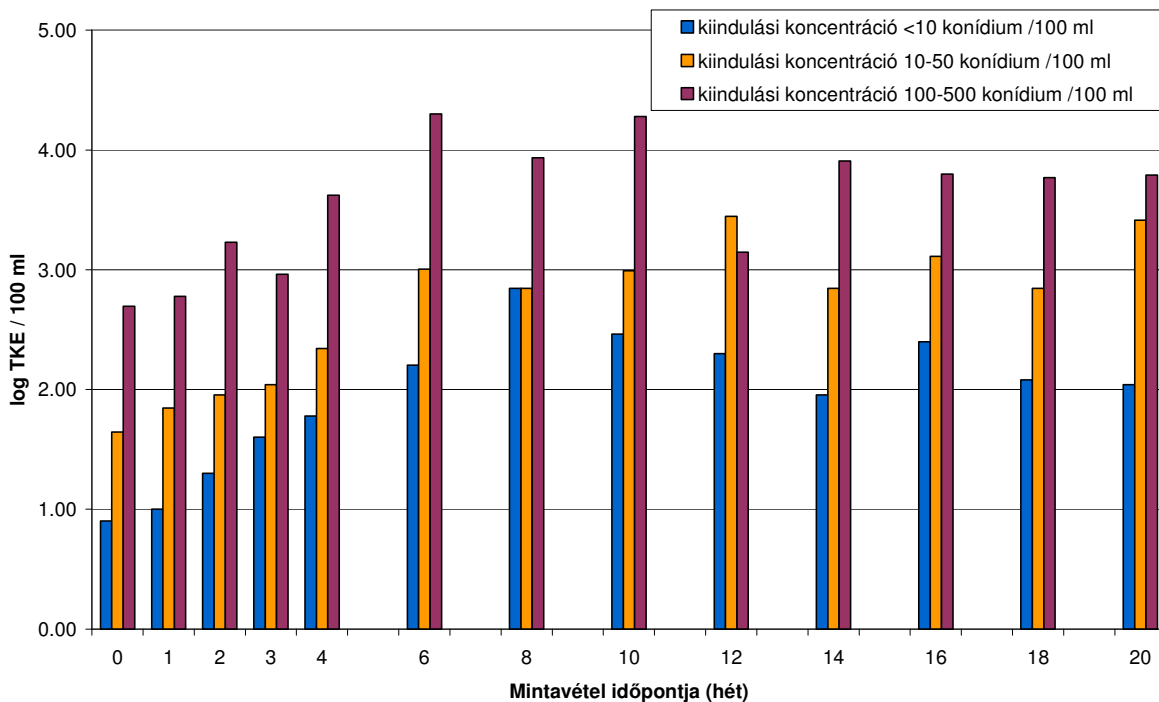
Fujikawa és munkatársai (1999) *Penicillium* fajok esetében szintén erőteljes telepkepző egység növekedésről számolnak be a beoltott szénsavmentes palackozott ásványvizekben, abban az esetben, amikor a termékmintát a beoltás előtt sterilizték. A nem sterilizett termékminták esetén növekedést nem, csak stagnálást tapasztaltak. Ezek az eredmények a kísérő baktériumflóra gátló hatására utalnak, melyet a mi eredményeink nem erősítenek meg. A *Penicillium* fajok jó szaporodóképességéről számol be Cabral és Pinto, (2002) is, akik az általuk vizsgált, mind a

szemmel látható fonalgomba micéliumot tartalmazó mind szabad szemmel észlelhető fonalgomba fonalat nem tartalmazó minták 46-46%-ban identifikáltak *Penicillium* fajokat.

A telepkepző egység eredményeket oszlop diagramban az előzőekhez hasonlóan, itt is egy példán keresztül (23. ábra) szemléltetem



23. ábra: Túlélő *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 telepkepző egységek száma az FV2 kódszámú szénsavmentes forrásvíz mintába való beoltás után. TKE = telepkepző egység



24. ábra: Túlélő *A. fumigatus* NCAIM F 00673 telepkepző egységek száma az AV6 kódszámú szénsavmentes ásványvíz mintába való beoltás után. TKE = telepkepző egység

5.4.2.4. Túlélő telepkepző egység szám az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál

Az általunk vizsgált *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzssel beoltott szénsavmentes mintáknál hasonló tendenciákat tapasztaltunk, mint a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében. Ezen eredményekkel szintén jól egyeznek a vizuális nyomon követésnél tapasztaltak, ahol a vizsgált szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvizeknél két terméknel az *A. fumigatus* (FV1, AV5), két esetben a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 (AV3, AV4) okozott először szabad szemmel észlelhető termékkárosítást két esetben pedig mindkét fonalagomba törzssel beoltott mintáknál egy időben jelentkezett a szemmel látható termékkromlás.

- A legkisebb beoltási koncentrációjú minták (<10 konídium /100 ml) esetében telepkepző egység szám növekedés változó mértékű (1-3 logaritmus), de minden mintánál kimutatható.
- A közepes beoltási koncentrációjú mintáknál (10-50 konídium /100 ml) az előzőekhez hasonló nagyságrendű telepkepző egység szám emelkedés tapasztalható a vizsgált időtartamban.
- A legvisszafogottabb telepkepző egység növekedést itt is a legnagyobb kiindulási koncentrációjú (100-500 konídium/100 ml) mintáknál tapasztaltuk.

A statisztikai elemzések 95%-os konfidencia szinten rámutatnak, hogy a kimutatható telepképző egység száma a kísérleteink során a *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzsnél szignifikánsan nagyobb, mint a *C. cladosporoides* CC F 50 és a *F. oxysporum* CC F 36 penészgomba esetében, de nem mutatható ki szignifikáns különbség az *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 törzs eredményeivel szemben.

A telepképző egység eredményeket oszlop diagramban ismét egy példán keresztül (24. ábra) szemléltetem.

5.4.3. A túlélő telepképző egység szám meghatározás eredményeinek összefoglalása

A **szénsavas termékmintáknál** a membránszűréssel illetve lemezöntéssel meghatározott túlélő telepképző egység szám alapján megállapítható, hogy a vizsgált penészgomba fajok túlélése egyrészt a vizsgált fonalgomba törzstől függöt, másrészt attól, hogy a vizsgált palackozott forrás- és ásványvízminták szénsavat tartalmaztak-e. Nem volt kimutatható szignifikáns különbség a különböző kiindulási koncentrációk illetve a különböző palackozott forrás- és ásványvizek (eltekintve a szénsavtartalomtól) között.

A túlélő telepképző egység meghatározás eredményei a szénsavas palackozott forrás- és ásványvízmintákban egyértelmű csökkenést mutattak, az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 kivételével a vizsgált időtartam végén nem mutattunk ki túlélő telepképző egységet. Ezzel szemben a szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvíz mintáknál egyes esetekben kimutatható volt lassú csökkenés, stagnálás és jelentős szaporodás is a kimutatott túlélő telepképző egységek száma alapján.

A szénsavtartalommal szemben a legellenállóbb az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 volt, és ez a különbség szignifikánsnak mutatkozott az összes többi vizsgált penészgombával szemben. Az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 törzssel beoltott termékmintákban is tapasztalható lassú telepképző egység szám csökkenés az idő függvényében, azonban még a 26. héten megismételt mintázás alkalmával is kimutatható volt túlélő telepképző egység az összes szénsavas termékmintában. A *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 a *F. oxysporum* CC F 36 és *C. cladosporoides* CC F 50 nem élte túl a szénsavas termékmintákba való beoltást követő 12 hetes vizsgálati időtartamot.

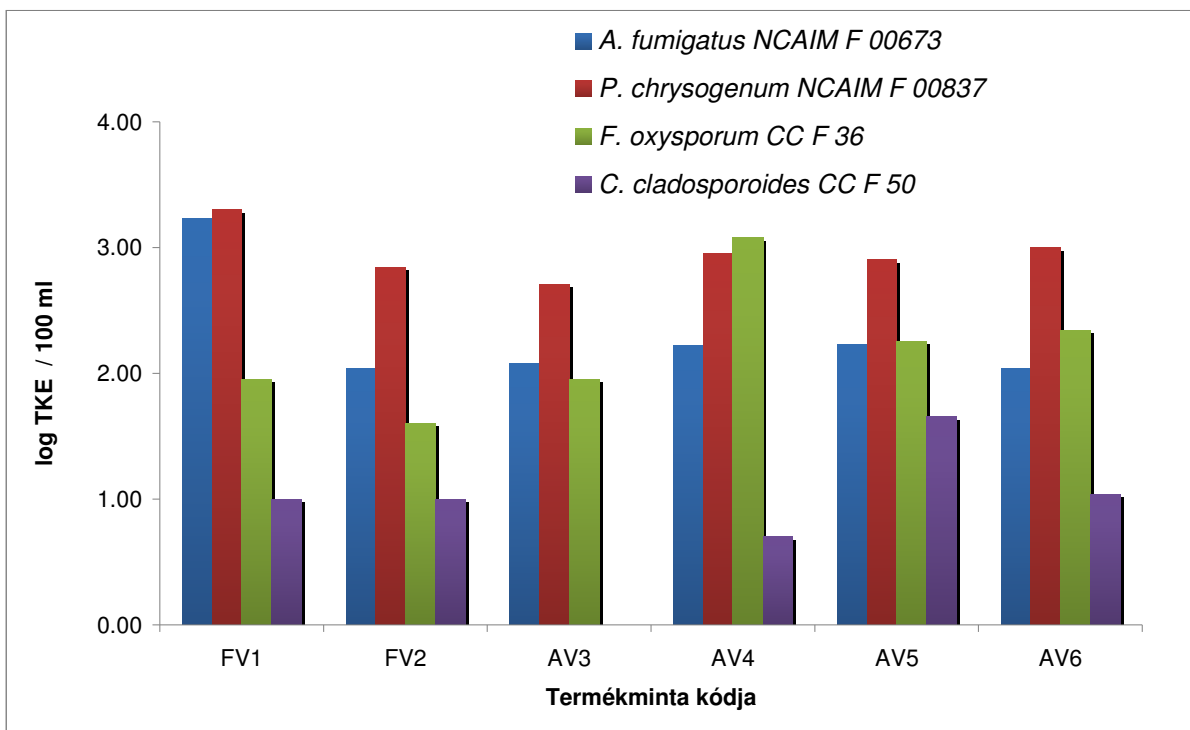
Összességében megállapítható hogy ez utóbbi három fonalgomba törzs esetén az összes szénsavas termékmintában a kimutatható telepképző egység szám kis beoltási koncentráció (<10 konídium/100 ml) esetében 6-8, közepes beoltási koncentráció (10-50 konídium/100 ml) esetén 8-10, míg magas kiindulási koncentráció (100-500 konídium/100 ml) esetén 10-12 hét alatt a kimutathatósi határ alá csökkent. Az enyhén szénsavas termékmintákban (szénsavtartalom < 4,5 g/l) a telepképző egység csökkenés lassabban ment végbe, mint a nagyobb szénsavtartalmú termékmintáknál, azonban ez az eltérés nem mutatkozott szignifikánsnak.

A kimutatható telepképző egység csökkenés mértéke tehát fonalgombba törzsenként eltérő, de minden szénsavas termékmintánál kimutatható volt, mely eredmény alátámasztja a vizuális nyomon követésnél tapasztaltakat.

A **szénsavmentes** termékmintákban a beoltást követően a kimutatott telepképző egységek számában növekedést tapasztaltunk, mely egyes mintákban erőteljessé vált, más esetekben csekély maradt, sőt a vizsgált *C. cladosporoides* CC F 50 törzs esetében a vizsgált időszak végén telepképző egység csökkenés is előfordult. Összehasonlítva a felhasznált fonalgomba törzseket, elkülöníthető tendenciákat állapíthattunk meg. Nem volt kimutatható szignifikáns különbség a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 és az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében a kimutatható telepképző egység számban, a *F. oxysporum* CC F 36 és a *C. cladosporoides* CC F 50 penészgomba törzsek kimutatható telepképző egység száma ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabbnak mutatkoztak.

5.5. A vizuális nyomon követés és a telepképző egység meghatározás eredményeinek összevetése

A szabad szemmel látható termékkárosítás időpontjában vizsgált fonalgombák telepképző egység száma és a termékkárosítás megjelenésének időpontja között a nagyszámú (432 palack) mintánk vizsgálata alapján nem mutatatható ki összefüggés. Az eredményeket ebből a szempontból a 25. ábra szemlélteti. A diagram alapján az állapítható meg, hogy a szemmel látható termékkárosítás megjelenésének pillanatában a *C. cladosporoides* CC F 50 esetén volt a legkisebb, a *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetén pedig a legnagyobb a kimutatható telepképző egység szám. Itt kell azonban megemlíteni azt a körülményt, hogy a vizuális nyomon követés és a telepképző egység meghatározás nem azonos palackokból történt, és a minták kezelése is némileg eltért. A vizuális nyomon követéshez használt palackokat hetente átforgattuk ugyan, de erős mechanikai rázkódásnak nem tettük ki, míg az élő telepképző egység meghatározásánál minden alkalommal erősen felráztuk a palackokat a homogén mintavétel céljából, ami a hifák töredezésével járhatott, így relatíve nagyobb telepképző egység számot eredményezhetett. Szintén említésre érdemes az a tény is, hogy több esetben (jellemzően a *C. cladosporoides* CC F 50 esetében) a kimutatható telepképző egységek száma az idő haladtával a szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvízmintákban is csökkent, így előfordult olyan eset is, hogy a szemmel látható termékkárosodás időpontjában nem az abszolút értelemben vett legnagyobb élő telepképző egység számot mértük. A mintában ez esetben már a csökkenő telepképző egység számot mutattunk ki. Szakirodalmi adatok (Cabral & Pinto 2002) alátámasztják azon megfigyelésünket, mely szerint az aktuálisan kimutatható élő telepképző egység és a szemmel látható fonalgomba okozta termékkárosítás nem feltétlen van egymással összhangban.



25. ábra: Telepképző egységek száma a szemmel látható termékmroslás megjelenésének észlelésekor a vizsgált szénsavmentes palackozott forrás- és ásványvíz termékmintákban

5.6. Új tudományos eredmények

1. A törzsgyűjteményi *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 a vizsgált rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, szénsavmentes ásványvízben kisebb mértékű megtapadást mutat, mint a víznyerőhelyről izolált *Ps. stutzeri* CC B 21.
2. Mindkét vizsgált törzsnél (víznyerőhelyről izolált *Ps. stutzeri* CC B 21 valamint törzsgyűjteményből származó *Ps. aeruginosa* ATCC 9027) megállapítottam, hogy a rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen való megtapadás kezdetben inhomogén, majd később homogén biofilmet eredményez, mely szénsavmentes ásványvízben jóval gyengébb EPS képződést mutat, mint az ideális környezetet modellező BHI táplevesben.
3. A RABIT impedimetriás berendezés illetve telepszámlálás eredményeinek összevetése alapján megállapítottam, hogy a biofilmek fertőtlenítőszerrel szembeni rezisztenciájának nyomon követésére az impedimetriás módszer érzékenyebb, mint a hagyományos telepszámlálás.
4. **A szénsavmentes** palackozott forrás és ásványvizeknél megállapítottam, hogy a vizsgált 26 hét alatt a beoltott termékmintákban a fonalagombák (*F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837, *A. fumigatus* NCAIM F 00673) túlélést, egyes esetekben telepképző egység szám növekedést mutatnak. A vizsgált fonalagombák a 26 hét alatt még igen csekély kiindulási koncentráció esetén is (<10 konídium/100 ml) micéliumképzés révén szabad szemmel látható termékkárosítást okoznak, így a teljes minőség megőrzési idő alatt (52 hét) a micélium növekedés kockázata jelentős, a termék minősége megnyugtatóan nem biztosítható.
5. Megállapítottam, hogy a szabad szemmel látható termékkárosodás megjelenési időpontjai között 95% - os konfidencia szinten sem a vizsgált szénsavmentes forrás- és ásványvizek esetében, sem a beoltott fonalagombák esetében nincs kimutatható különbség. A termékkárosítás megjelenésének időpontja nem függ a vizsgált fonalagomba fajok kiindulási (beoltási) telepképző egység számtól sem.
6. **A szénsavas** palackozott forrás és ásványvizek esetében kimutattam, hogy szignifikáns különbség mutatkozik az *A. fumigatus* NCAIM F 00673 és a többi vizsgált penészgomba törzs túlélése között. A *F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum*

NCAIM F 00837 fonalagombák 12 hét elteltével nem mutatnak túlélést, a feltételesen humánpatogén *A. fumigatus* NCAIM F 00673 esetében viszont még 26 hét elteltével is kimutatható túlélő telepképző egység. A vizsgált penészgombák esetében a szénsavas termékmintáknál a jellemző minőség megőrzési idő (26 hét) alatt nem alakul ki szabad szemmel észlelhető micélium növekedés, azaz szabad szemmel látható termékkárosítás.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

- Rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 és *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 által képzett biofilmek kialakulásának vizsgálata során a felület közvetlen megfestésével és mikroszkópos képanalízissel vizsgáltam a kialakult biofilmeket. Mindkét vizsgált *Pseudomonas* törzsnél jól kirajzolódó telítési görbét sikerült felállítani. Ezek az eredmények arra mutatnak rá, hogy **a biofilmek kialakulását közvetlenül a felületen vizsgáló módszerek képet adhatnak a biofilm kialakulás kinetikájáról.** A méréseim során kidolgozott festési eljárás számos előnye (archiválható digitális képek, számszerűsíthető eredmények, a felület közvetlen vizsgálata és vizualizálás lehetősége) mellett hátránya, hogy az élelmiszeripari gyakorlatban csak igen nehezen használható fel. Javasolt tehát a jövőben olyan módszerek kidolgozása, amely a felületek közvetlen vizsgálatát úgy teszi lehetővé, hogy az a mindennapos gyártási gyakorlatba jól illeszthető legyen, abból rendszeres mikrobiológiai monitoring módszer legyen kidolgozható.

- Eredményeim arra mutatnak rá, hogy vízszintes rozsdamentes acél felületen a vizsgált *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 illetve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 törzsek biofilm képző tulajdonsága mind az optimálisnak tekinthető BHI táplevesben, mind a tápanyagszegény szénsavmentes ásványvízben jelentős. A *Pseudomonas* törzsek jelenléte tehát az ásvány- illetve forrásvíz palackozással foglalkozó üzemek esetében éppen olyan jelentős, mint más élelmiszeripari termelő területeken.

A vízszintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen való biofilm képzés akridin narancsos festést követő képanalízis eredményei arra is rámutatnak, hogy **a vizsgált, víznyerőhelyről izolált *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 felülethez való tapadása BHI táplevesben gyorsabb, szénsavmentes ásványvízben pedig jóval intenzívebb, mint az a törzsgyűjteményből származó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 törzs esetében tapasztalható volt.** Ez az eredmény arra világít rá, hogy az élelmiszeriparban nem csak a *Pseudomonas aeruginosa* jelenléte esetén kell számolni a biofilmek kialakulásának kockázatával. Más *Pseudomonas* törzsek, melyek a rendszeres mikrobiológiai monitoring során esetleg nem kerülnek azonosításra, szintén potenciális veszélyforrást jelenthetnek. Javasolt tehát az élelmiszer előállító üzemek saját „házi” *Pseudomonas* törzseit feltérképezni, a *Pseudomonas aeruginosa*-ra irányuló mikrobiológiai vizsgálatokat más *Pseudomonas* törzsekre is kiterjeszteni, valamint figyelmeztetési határértéket ezekre a törzsekre is felállítani. A figyelmeztetési határértéket meghaladó mikrobiológiai

eredmények esetén javasolt egy megelőző, biofilm eltávolítását megcélzó fertőtlenítő tisztítás, CIP beiktatása.

- Vízsintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen BHI táplevesben képzett 3, 7 és 14 napos *Pseudomonas aeruginosa* biofilmek kombinált hatóanyagú fertőtlenítőszerrel való inaktiválását vizsgálva megállapítottam, hogy **a fiatalabb (3 napos) biofilmek inaktiválása azonos fertőtlenítőszer használatával hatékonyabb, illetve a biofilmet alkotó élő- vagy akár holt sejtek a felületről könnyebben eltávolíthatóak**, mint az egy- vagy két hetes biofilmek. Ezek az eredmények rámutatnak a biofilm kialakulásának megakadályozását célzó rendszeres fertőtlenítés és tisztítás fontosságára. Javasolt az élelmiszer előállító üzemekben előforduló, a biofilm kialakulása szempontjából veszélyes felületek rendszeres, palackozott forrás- és ásványvíz gyártás során is minimum 72 óránként történő tisztítása, fertőtlenítése. Ezen felül javasolt a biofilm kialakulását figyelő rendszeres mikrobiológiai monitoring bevezetése.
- A biofilm eltávolítás hatékonyságát célzó kísérletek során a telepszámlálással illetve RABIT berendezéssel történt vizsgálatok mellett a vizsgált rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületet akridin narancssal festettem, és így detektáltam a fertőtlenítés után a felületen maradt sejteket. A kísérletek eredményei arra is rámutatnak, hogy **a biofilmet alkotó sejtek inaktiválása nem jelenti feltétlen a holt sejtek felületről való eltávolítását**. Az élelmiszeripari gyakorlatban ez arra a potenciális veszélyre mutat rá, amelyet a tisztítás és fertőtlenítés után a felületeken maradt holt sejtek jelentenek. Ezek, a biofilmből maradt szerves anyagok a felületeken való sejtek megtapadását segítik, valamint tápanyagul is szolgálnak egy következő kialakuló biofilmnek. Javasolt tehát egyrészt (a fentiekben már említett) az élelmiszeripari felületek közvetlen monitorozását megcélzó módszerek kidolgozása, másrészt a felületek fertőtlenítéssel egybekötött mechanikai tisztítása is, a maradék szerves anyag eltávolítása céljából.
- Vízsintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen BHI táplevesben képzett 3, 7 és 14 napos *Pseudomonas aeruginosa* biofilmek kombinált hatóanyagú fertőtlenítőszerrel való inaktiválását vizsgálva megállapítottam, hogy a vizsgált 5 különböző fertőtlenítőszer (Biguanid Fläche, Descosal, DisquatL, Domestos, Innofluid TF Klór) hatékonyságában jelentős eltérések mutatkoznak. Egyes fertőtlenítőszer már a 3 napos biofilm ellen is hatástalannak bizonyulnak, míg a leghatékonyabbnak bizonyult **Domestos 2 % -os oldata** a 3 és 7 napos biofilmeknél teljes eltávolítást, a 14 napos biofilmnél pedig jelentős

inaktiválást eredményez. Javasolt tehát az élelmiszeriparban használatos fertőtlenítőszeres esetében a gyakorlatban használatos hatékonyság vizsgálatokat - melyek legtöbb esetben a tesztmikrobák ellen oldatban, esetenként felületi tesztekkel kiegészítve történnek,- biofilmek elleni hatékonysági vizsgálatokkal is kiegészíteni.

- A vízszintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett *Pseudomonas aeruginosa* biofilm inaktiválási kísérleteim során telepszámlálással illetve az impedimetriás mérésén alapuló (RABIT berendezéssel) meghatározást is végeztem. Az eredményeimből megállapítható, hogy **a biofilmek fertőtlenítő szerekkel szembeni rezisztenciájának megállapítására a RABIT berendezés érzékenyebb**. Ennek oka lehet az, hogy a sejtek a fertőtlenítő eljárás sokkhatására ún. „élő, de nem tenyészthető” (VNC) állapotba kerültek, a sejtek a fertőtlenítő eljárással járó stresszt túléltek, és minimális anyagcserét folytatnak, mely a táptalaj impedimetriájának változása miatt RABIT berendezéssel detektálható, de hagyományos módszerrel szaporodás nem mutatható ki. Az „élő, de nem tenyészthető” állapotban lévő sejtek azonban az újabb biofilm kialakulásának szempontjából potenciális veszélyt jelenthetnek, mivel a fertőtlenítés stressz hatása után idővel regenerálódhatnak, és szaporodásnak indulhatnak. A felületen maradt élő, de nem tenyészthető sejtek tápanyagul, megtapadási felületül is szolgálhatnak újabb biofilmek kialakulásához. Javasolt tehát az élelmiszeriparban olyan mikrobiológiai mérési módszerek bevezetése, melyek az élő, de nem tenyészthető sejtek kimutatását is megcélozzák.
- Az általunk vizsgált, 4 különböző, korábban palackozott ivóvizekből izolált fonalgombával (*F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 és *A. fumigatus* NCAIM F 00673) beoltott, Európa 4 országából származó, összesen 6 féle **szénsavmentes** palackozott forrás- illetve ásványvíz esetében minden egyes beoltott palacknál észleltünk szemmel látható micélium növekedés okozta termékkárosítást, még azoknál a palackoknál is, ahol a kiindulási konídium koncentráció igen kicsi (10 konídium / 100 ml) volt. Eredmények tehát arra mutatnak rá, hogy a palackozott szénsavmentes forrás- illetve ásványvizekben a fonalgombák igen kis kiindulási koncentráció esetén is a szavatossági minőség megőrzési idő alatt szabad szemmel látható micélium képződést okozhatnak, így az ezzel összefüggő fogyasztói panaszok veszélye nagy. A szabad szemmel látható micélium képződés veszélyét fokozza, hogy a szénsavmentes forrás- illetve ásványvizek eltarthatósági ideje az általunk nyomon követett 26 hétnél általában hosszabb, jellemzően 52 hét.

A 6 különböző palackozott szénsavmentes forrás- illetve ásványvíz a vizsgált

fonalaszombákkal való beoltását követő telepkepző egység szám nyomon követés eredményei arra mutatnak rá, hogy a penészsombák a tápanyagszegény szénsavmentes forrás- illetve ásványvízben is képesek túlélni, szaporodni. Ezek az eredmények megerősítik a vizuális nyomon követés eredményeiből levont következtetést, mely szerint **a penészsombák jelenléte szénsavmentes forrás- illetve ásványvízben potenciális veszély.** Mindezek tekintetbe vételével az ipari gyakorlatban javasolt rendszeres mikrobiológiai monitoring bevezetése, amely a fonalaszombák jelenlétét hivatott kimutatni a víznyerőhelyen valamint a feldolgozás során gyártási környezetben. Szintén javasolt a végtermék mikrobiológiai monitoringját és felszabadítási határértékeit penészsombákra is kiterjeszteni.

- Az általunk vizsgált, Európa 4 országából származó, 6 különböző, kereskedelmi forgalomban kapható palackozott **szénsavas** forrás- és ásványvíz egyik mintájában sem volt kimutatható szemmel látható termékkárosítás a vizsgált, korábban palackozott ivóvizekből izolált fonalaszombával (*F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 és *A. fumigatus* NCAIM F 00673) való beoltást követő 26 hét alatt. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy szemben a szénsavmentes palackozott forrás- illetve ásványvizeknél tapasztaltakkal, a palackozott **szénsavas forrás- illetve ásványvizekben a jellemző minőség megőrzési idő (26 hét) alatt szabad szemmel látható micélium képződés okozta termékkárosításra és ezzel összefüggő fogyasztói panaszra nem kell számítani.** Mivel azonban a szénsavas forrás- illetve ásványvizet a gyakorlatban ugyanazon a palackozó gépsoron palackozzák, mint a penészsombákra érzékeny szénsavmentes forrás- illetve ásványvizet, itt is javasolt rendszeres monitoring bevezetése és figyelmeztetési határérték felállítása.
- Az általunk vizsgált, korábban palackozott ivóvízből izolált *A. fumigatus* NCAIM F 00673 a **szénsavas palackozott forrás- illetve ásványvízben 26 hét után is túlélést,** a szénsavmentes palackozott forrás és ásványvizekben szaporodást és szabad szemmel látható micéliumképzést mutat. Az *A. fumigatus* fakultatív patogén volta miatt javasolt a penészsombákra irányuló rendszeres mikrobiológiai monitoring bevezetése a forrás- illetve ásványvíz palackozó üzemekben, kiterjesztve azt a víznyerő hely, vízkezelő helyiségek, termelési terület környezetére, levegőjére, valamint a csomagolóanyagokra és természetesen a kinyert, a kezelt és a palackozott forrás- illetve ásványvízre is. Javasolt ezen felül pozitív eredmény esetén azonosítás, és *A. fumigatus* vagy más fakultatív patogén penészsomba bizonyított jelenléte esetén azonnali fertőtlenítés, illetve fertőtlenítő takarítás.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Előzmények, célkitűzések

A palackozott forrás- és ásványvízgyártás élelmiszer mikrobiológiai szempontból jelentős terület. Az érvényes magyar jogszabály (65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet) a természetes forrás –illetve ásványvizeknél semmiféle kezelést nem engedélyez, mely a termék összetételére hatással van, így az antimikrobás kezeléseket sem. Szénsavmentes termékek esetében a végtermék összetétele nem bír gátló hatással a mikrobák szaporodására, de számos szakirodalmi adat beszámol különböző mikrobák szénsavas ivóvizekben való túléléséről is. A természetes forrás- illetve ásványvizek gyártása során tehát kiemelt fontossággal bír az élelmiszerhigiéna és az élelmiszer mikrobiológiai rizikófaktorok ismerete.

A vízrendszerek mikrobiológiájának egy viszonylag sokat vizsgált területe a biofilmek előfordulásának tanulmányozása. A fentiekben említett FVM-ESzCsM-GKM rendelet jogszabályilag is előírja, hogy a fakultatív *Pseudomonas aeruginosa* nem lehet jelen a palackozott forrás- és ásványvizekben. Ugyanakkor közismert, hogy az igen jó biofilm képző tulajdonsággal rendelkező *Pseudomonas* fajok elterjedtek a felszín alatti vízrendszerekben. Az élelmiszeripari gyakorlatban leggyakrabban használatos anyagok kiváló felületek a biofilmek kialakulásához. A *Pseudomonas* fajok gyártóterületeken, berendezésekben való megjelenése, biofilm képzése tehát súlyos higiénés problémát okozhat. Az általuk képzett biofilmekbe más, patogén mikroorganizmusok is beépülhetnek, így az üzemhigiéniai problémák mellett akár az élelmiszerbiztonságot is fenyegethetik. Jelentős rizikófaktor a termelő környezetben a mindennapi tisztító-fertőtlenítő takarítás ellenére is sokszor jelen levő biofilm is. Romlást okozó *Pseudomonas* fajokat izoláltak élelmiszer feldolgozó környezetben lefolyókon, padlókon is.

A kialakult biofilmek inaktiválása igen nehéz az antimikrobás szerekkel szemben kialakult nagyfokú rezisztencia valamint a biofilmet alkotó sejtek által termelt poliszacharidok (EPS) felülethez való erős tapadása miatt. A nem kellően hatékony fertőtlenítő és tisztító eljárások után az elpusztított sejtek illetve az EPS a felületeken maradva kiváló táptalajt és könnyű megtapadási felületet nyújtanak a planktonikus sejteknek, ezzel elősegítve az újabb biofilm gyors kialakulását. A hatástalan fertőtlenítő eljárás után a felületen maradt vékony biofilm rétegben található élő, de nem tenyésztendő sejtek idővel regenerálódhatnak, és a felületen található tápanyagokat hasznosítva újabb biofilm képződése indulhat el.

A palackozott forrás- és ásványvíz gyártás másik, keveset vizsgált területe a penészgombák előfordulása a palackozott ivóvizekben. A fonalas illetve sarjadzó gombák felszíni, valamint felszín

alatti vizekben való előfordulásáról szakirodalmi publikációk számolnak be. E penészgomba fajok bár számos alkalommal kimutathatók a vezetékes és a palackozott ivóvizekben egyaránt, jelenlétük mindenképpen környezeti kontaminációra utal.

A fonalgombák szénsavmentes ásvány- vagy forrásvízben szaporodni képesek, esetleges toxintermelésük illetve patogén, allergén penészgomba esetén pusztá jelenlétük is egészségügyi, élelmiszerbiztonsági kockázatot jelent. Az ivóvízben jelenlévő fonalgombák az egészségkárosító hatás mellett az ivóvíz érzékszervi elváltozását is okozhatják. Az esetenként szemmel látható telepek megjelenése a nagy számú fogyasztói panaszt okoz. A vizuális problémák mellett a kedvezőtlen aromaanyagok termelésével, dohos, fanyar, keserű illetve „sár íz” jellegű ízhibát okozhatnak.

A fentieket alapul véve a dolgozat célkitűzései a következők:

(1) Törzsgyűjteményből származó *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 és víznyerőhelyről izolált *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 vízszintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, tápanyagban gazdag illetve tápanyagszegény közegben való biofilmképzésének nyomon követése különböző módszerekkel.

(2) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 által vízszínes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen, tápanyagban gazdag közegben képzett biofilmjének különböző, kereskedelemben kapható fertőtlenítőszerrel való inaktiválásának illetve eltávolításának vizsgálata.

(3) Palackozott forrás- illetve ásványvízből izolált penészgomba törzsek (*Fusarium oxysporum* CC F 36; *ladosporium cladosporoides* CC F 50; *Penicillium chrysogenum* NCAIM F 00837; *Aspergillus fumigatus* NCAIM F 00673) túlélésének, szaporodásának nyomon követése.

(4) Szabad szemmel is látható micéliumképzés (szabad szemmel észlelhető termékkárosítás) nyomon követése 26 héten keresztül, 12, ásványi anyag- és szénsavtartalmában különböző (6 szénsavas és 6 szénsavmentes), kereskedelemben kapható palackozott forrás- és ásványvízben

Kísérleti eredmények

A rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületek közvetlen mikroszkópos vizsgálata alapján megállapítottam, hogy mindkét vizsgált törzs igen jelentős tapadást mutatott rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felülethez BHI táptalajban, vízszintes helyzetben. A *Ps. stutzeri* CC B 21 felülethez való tapadása gyorsabb volt. Mindkét *Pseudomonas* törzs kezdetben inhomogén, a vizsgálati idő végén masszív, homogén biofilmet képzett. Az epifluoreszcens mikroszkóppal vizsgált felületekről készített digitális fényképek képelemzésének eredményei alapján telítési görbe vehető fel.

Eredményeink szerint mindkét vizsgált törzs rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felülethez való tapadása jelentősen kisebb volt ásványvízben, mint az ideális közegnek tekinthető BHI táptalajban. A felülethez való kitapadás az idő függvényében itt is növekedő tendenciát mutatott, azonban telítési görbék nem állíthatók fel. A *Ps. stutzeri* CC B 21 felülethez való tapadása ásványvízben jóval intenzívebb volt, mint az a *Ps. aeruginosa* esetében tapasztalt, de a vizsgált időtartamban egyik törzs sem érte el a BHI táplevesben tapasztalt homogén biofilm állapotot. Az eredmények szórása végig nagy marad.

A FITC festéssel kimutatható EPS mennyisége a megtapadt sejtek számához hasonlóan mindkét törzsnél az idő függvényében növekedő tendenciát mutat. A *Ps. stutzeri* CC B 21 BHI táplevesben modellezett statikus biofilmjénél jóval intenzívebb EPS termelést tudtam kimutatni, mint a *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 esetében. Az eredmények szembeötlő nagy szórása az EPS felhő-szerű megjelenésére utal, amely a mikroszkópos fényképeken is jól látható volt. Az akridin narancsos festés eredményeivel ellentétben a FITC-cel végzett festés eredményekire telítési görbe nem volt illeszthető.

A vizsgált *Pseudomonas* törzsek szénsavmentes ásványvízben képzett biofilmjének a FITC festéssel kimutatható EPS mennyisége a BHI táplevesben képzett biofilmekéhez képest mind abszolút értelemben igen csekély volt. A *Ps. stutzeri* törzs szénsavmentes ásványvízben való biofilm képzése során kimutatható EPS-t a vizsgált időtartam alatt gyakorlatilag nem képzett.

A fertőtlenítő eljárások eredményeit összehasonlítva egyértelműen megállapítható, hogy a vizsgált tisztító-fertőtlenítőszeresek közül a Domestos 2%-os oldata volt a leghatékonyabb. A mikroszkópos fényképek alapján elmondható, hogy a Domestos nem csupán előlte a biofilmben található *Ps. aeruginosa* ATCC 9027 sejteket, de a biofilmet a felületről el is távolította.

Az impedimetriás módszert alkalmazó RABIT berendezés illetve telepszámlálás eredményeinek összevetése alapján megállapítható, hogy a biofilmek rezisztenciájának nyomon követésére az élő de nem tenyészhető sejtek detektálása miatt az impedimetriás módszer érzékenyebb, mint a hagyományos telepszámlálás.

A vizsgált fonalgombákkal (*F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 és *A. fumigatus* NCAIM F 00673) beoltott összesen 215 palack (4 országból származó 6 féle, különböző ásványi anyag összetételű termék) **szénsavmentes** palackozott forrás- illetve ásványvíz vizsgálata alapján megállapítható volt, hogy a vizsgált

penészgombák igen kis kiindulási koncentráció esetén (<10 konídium/100 ml) szemmel látható micélium növekedést és ezzel termékkárosítást okoznak, így ezzel összefüggő fogyasztói panaszokkal kell számolnunk.

A micélium képződés vizuális nyomonkövetése mellett a 6 különböző palackozott szénsavmentes forrás- illetve ásványvíznél a vizsgált fonalagombákkal való beoltását követően a túlélő telepkepző egységek számát is nyomon követtem. A nagyszámú minták (összesen 84 palack) eredményei arra mutatnak rá, hogy a penészgombák a tápanyagszegény szénsavmentes forrás- illetve ásványvízben a legkisebb beoltási koncentráció (<10konídium/100 ml) esetén is képesek túlélni, szaporodni.

A vizsgált, összesen 216 palack (4 országból származó 6 féle, különböző ásványi anyag összetételű és különböző szénsavtartalmú termék) kereskedelmi forgalomban kapható palackozott **szénsavas** forrás- és ásványvízben szabad szemmel látható micélium képződés a beoltást követő 26 hét alatt nem volt tapasztalható.

A vizsgált fonalagombákkal való beoltást követően a 648 palack szénsavas termékmintánál szintén nyomon követtük a vizsgált fonalagombákkal való beoltását követően a telepkepző egységek számának túlélését. Itt összesen 648 palackot oltottunk be és követtünk nyomon. Eredményeink a *F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 esetében nem tapasztaltam túlélést a beoltást követő 12 hétben, azonban a feltételesen humánpatogén *A. fumigatus* NCAIM F 00673 a szénsavas palackozott forrás- illetve ásványvízben 26 hét után is kimutatható volt.

Következtetések és javaslatok

A biofilm képzés vizsgálatának eredményei rávilágítanak arra, hogy az élelmiszeriparban egyes „házi” *Pseudomonas* törzsek potenciális veszélyforrást jelenthetnek. **Javasolt** tehát az élelmiszer előállító üzemek saját „házi” *Pseudomonas* törzseit feltérképezni, a *Pseudomonas aeruginosa* vizsgálatokat más *Pseudomonas* törzsekre is kiterjeszteni, valamint figyelmeztetési határértéket ezekre a törzsekre is felállítani. A figyelmeztetési határértéket meghaladó mikrobiológiai eredmények esetén javasolt egy megelőző, biofilm eltávolítását megcélzó fertőtlenítő tisztítás, CIP beiktatása.

A biofilm eltávolítási kísérletek eredményei rámutatnak arra, hogy jelentős eltérés tapasztalható a fertőtlenítőszeres biofilm inaktiváló hatékonyságában. **Javasolt** tehát az élelmiszer előállító üzemekben előforduló, a biofilm kialakulása szempontjából veszélyes felületek rendszeres

tisztítása, fertőtlenítése olyan fertőtlenítő szerek alkalmazásával, melyek biofilm inaktiváló hatása igazolt. Ezen felül javasolt a biofilm kialakulását figyelő rendszeres mikrobiológiai monitoring bevezetése.

Az eredményeimből megállapítható, hogy a biofilmek fertőtlenítőszerekkel szembeni rezisztenciájának megállapítására az ún. „élő, de nem tenyészthető” (VNC) sejtek detektálása miatt a RABIT berendezés érzékenyebb, valamint, az, hogy a biofilm képzés kinetikájának nyomon követésére a felületeket közvetlenül vizsgáló mikroszkópos eljárások alkalmasabbak, mint a hagyományos telepszámlálás módszere. **Javasolt** tehát az élelmiszeriparban olyan mikrobiológiai mérési módszerek bevezetése, melyek egyrészt az élő, de nem tenyészthető sejtek kimutatását is megcélözzák, másrészt a felületek közvetlen vizsgálatát teszik lehetővé.

Szénsavmentes ásványvizeknél a penészgombák igen kis kiindulási koncentráció esetén szemmel látható micélium növekedést és ezzel termékkárosítást okoznak, így ezzel összefüggő fogyasztói panaszokkal kell számolnunk. A szabad szemmel látható micélium képződés veszélyét fokozza, hogy a szénsavmentes forrás- illetve ásványvizek szavatossági ideje az általunk nyomon követett 26 hétnél általában hosszabb, jellemzően 52 hét. A beoltásos vizsgálatok eredményei arra mutatnak rá, hogy a penészgombák a tápanyagszegény szénsavmentes forrás- illetve ásványvízben is képesek túlélni, szaporodni, azaz a penészgombák jelenléte szénsavmentes forrás- illetve ásványvízben potenciális veszélyt jelent.

A vizsgált **szénsavas** forrás- és ásványvizekben szabad szemmel látható micélium képződés a beoltást követő 26 hét alatt nem volt tapasztalható, így ezeknél a termékeknél fogyasztói panaszra nem kell számítani. Azonban az módon humánpatogén *A. fumigatus* NCAIM F 00673 a szénsavas palackozott forrás- illetve ásványvízben 26 hét után is mutatott túlélést. Egyes obligát módon humánpatogén penészgombák tehát a szénsavas forrás- és ásványvizekben is potenciális veszélyt jelentenek.

Mindezek tekintetbe vételével a palackozott forrás- és ásványvíz előállítás során **javasolt** rendszeres, fonalgombák jelenlétét kimutatni hivatott környezeti-, valamint végtermékre vonatkozó mikrobiológiai monitor bevezetése. Fontos lehet továbbá termék felszabadítási és figyelmeztetési határértékek felállítására is. Javasolt ezen felül pozitív eredmény esetén elvégezni a romlási jelenséget okozó penészgomba fajszerinti azonosítását. (identifikálás) *A. fumigatus*, vagy más obligát módon patogén penészgomba bizonyított jelenléte esetén azonnali fertőtlenítést, illetve fertőtlenítő takarítást beiktatni.

8. SUMMARY

Preface and goals

The bottled spring and mineral water production is an important area of food microbiology.

According to valid Hungarian law (65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM) no treatment - including any microbiological -, is allowed for such products which could cause any change of their product composition. In case of non-carbonated products, their final composition has no inhibitory effect on any possible bacterial contaminant and even though several sources reported surviving microbes in naturally carbonated waters. Therefore, food hygiene and the knowledge of microbial risks are particularly important during production of bottled spring and mineral water.

Biofilms are a rather well-studied segments of water system' microbiology. The above mentioned law requires that no *Pseudomonas aeruginosa* can be present in bottled spring and mineral water products. Nevertheless, it is well known, that excellent biofilm forming *Pseudomonas* species are well spread in underground water-systems and in case of a weak protection of the water-base, the penetration of surface or sewage waters can happen too. Frequently used material of food industry, like steel, aluminium, glass, Teflon, nylon are good fundamentals for biofilm build up. The presence and the capability of biofilm formation of *Pseudomonas* species inside of production areas and equipment is a serious hygienic problem. Several other pathogenic microbes can be built into such biofilms risking food safety along hygienic problems. Moreover, biofilms can be linked to significant financial losses through inefficient heat exchange, decreased circulation speed, shorter filter usage-time or even causing material damages through their metabolic products. It is important to state, that not only the closed production systems are vulnerable for biofilms.

Inactivation of well established biofilms is generally difficult since they have high resistance against antimicrobial agents strengthened with cell surface polysaccharides (EPS). Due to inefficient disinfectants and cleaning agents, surface sticking destroyed cells and EPS are very good medium and entrance ways for planktonic cells, embracing the fast formation of newer biofilms. After inefficient disinfectant treatments, surviving particles of such biofilms can regenerate rapidly and form new, more resistant biofilms by reutilizing the just released nutrients. Therefore, a good biofilm inactivation must mean both the destruction and the complete removal of the biofilm at the same time.

An other poorly examined area of spring and mineral water production is the occurrence of moulds in bottled waters. Publications report the presence of filamentous or budding moulds in surface and

underground waters. Such mould species can be detected in both tap-water and bottled waters, referring their environmental contamination.

Filamentous mould can grow in non-carbonated or spring waters and even just their presence can rise health and food safety risks or simply can destroy product value together with numerous customer complains.

Based on all that, the following targets were set:

(1) Examination of biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and isolated *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 with several different methods in nutrient rich and poor medium on stainless steel surface.

(2) Examination of biofilm inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 by several, commercial disinfectant in nutrient rich and poor medium on stainless steel surface.

(3) Follow-up of survival and multiplication of several isolated moulds (*F. oxysporum* CC F 36; *C. cladosporoides* CC F 50; *P. chrysogenum* NCAIM F 00837; *A. fumigatus* NCAIM F 00673),

(4) Follow-up of mycelium formation of mould through 26 weeks, in 12 different, commercial spring and mineral waters.

Results

Based on the surfaces direct microscopic investigation it was found that both *Pseudomonas* species represent intense biofilm formation. The results of the Acridin Orange staining showed typical saturation curves for both test species. The biofilm formation of *Ps. stutzeri* CC B 21 was more intense and faster. All biofilms were inhomogeneous at the beginning and become a homogenous robust biofilm at the end of the test period. Biofilm formation of both investigated *Pseudomonas* species was significantly weaker in mineral water than in the nutrition-rich BHI broth.

The EPS secretion of all investigated *Pseudomonas* biofilms did increased by time. The EPS secretion in biofilm of *Ps. stutzeri* CC B 21 in BHI broth was higher than in case of *Ps. aeruginosa* ATCC 9027. Meanwhile, *Ps. stutzeri* CC B 21 did not show any EPS secretion in mineral water.

According to the results of biofilm inactivation tests Domestos 2% was the most effective disinfectant against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. In all other cases, older biofilms did show resistance against the tested disinfectant agents.

Comparing the traditional pour plating and impedimetric method the RABIT instrument was more effective to detect viable but not cultivable cells after disinfection.

During mould challenge study 12 different natural spring-and mineral water were inoculated with moulds previously identified from packaged waters (*F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 and *A. fumigatus* NCAIM F 00673). The visual monitoring results did show no visual growth in carbonated samples, however, all together 216 bottles were investigated (6 different carbonated water inoculated with 4 different moulds). On the other hand, visual growth was detected in all (216 bottles - 6 different still water inoculated with 4 different moulds) non-carbonated water samples.

The membrane filtration and pour plating results of the inoculated spring- and mineral waters did show that the investigated moulds can survive even multiply in still natural spring- and mineral waters. Despite of the results of still waters the investigated *F. oxysporum* CC F 36, *C. cladosporoides* CC F 50, *P. chrysogenum* NCAIM F 00837 did not survive the first 12 weeks in the carbonated samples. Only the facultative human-pathogen *A. fumigatus* NCAIM F 00673 was detected after 26 weeks of incubation in carbonated spring- and mineral water.

The inoculated mould species had an effect on the detected surviving CFU numbers, meanwhile no correlation was found between the survival CFUs and the type of the spring- and mineral water or the packaging material

Conclusions and proposals

The biofilm formation of *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is robust both in the nutrition-rich BHI broth and in nutrition-poor natural mineral water. The biofilm formation of *Ps. stutzeri* CC B 21 identified from a water source is quicker than in case of *Ps. aeruginosa* ATCC 9027. These results show that the significance of environmental *Pseudomonas* species is high. Therefore for mineral- and spring water bottling factories it is proposed to extend microbiological monitoring to environmental *Pseudomonas* species to top of *Ps. aeruginosa* monitoring.

Older biofilms has higher resistance against disinfectant agents than young biofilms. Non-viable biofilm cells and trace of EPS can remain on the surfaces after an inefficient cleaning and disinfection. These remaining materials can help the next coming planctonic cells to build a robust antibiotic-resistance biofilm formation. For closed pipeline systems it is proposed to set up regular

preventive cleaning, sanitation to avoid biofilm formation. It is also proposed to validate disinfectant agents efficiency against biofilms.

Based on the visual monitoring results of spring and mineral waters inoculated with moulds it is clear that moulds can survive and multiply in non-carbonated mineral- and spring water and can create visual growth in final product. In the industrial practice it means that the risk of consumer complains related to mould growth exists for these products. In carbonated water moulds can not create visual growth; however, the facultative pathogen *A. fumigatus* can survive even 26 weeks in carbonated packaged water. For spring- and mineral water bottling factories it is proposed therefore, to set a microbiological monitoring system against mould and declare product release criteria as well as alert limits. It is also proposed to identify the moulds detected in final products or in environmental samples to be able to apply disinfection and sanitation procedure in case of facultative pathogen moulds are detected.

9. MELLÉKLETEK

M.1. FELHASZNÁLT IRODALOM

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

Allison, D. G., Sutherland, I.W., 1987. The role of exopolysacharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 133, 1319–1327.

Al-Makhlafi, H., Nasir, A., McGuire, J., Daeschel, M. A., 1995. Adhesion of *Listeria monocytogenes* to silica surfaces after sequential and competitive adsorption of bovine serum albumin and b-lactoglobulin. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 2013–2015.

Armon, R., Starosvetzky J., Arbel, T., Green, M., 1997. Survival of *Legionella pneumophila* and *Salmonella typhimurium* in biofilm systems. *Water Sci. Technol.* 35, (11/12)293-300.

Ammor, S., Chevalier, I., Laguet, A., Labadie, J., Talon, R., Dufour, E., 2004. Investigation of the selective bactericidal effect of several decontaminating solutions on bacterial biofilms including useful, spoilage and / or pathogenic bacteria. *Food Microbiology* 21, 11-17.

Anaïssie E. J., Kuchar R. T., Rex J. H., Francesconi A., Kasai M., Muller F. M., Lozano-Chiu M., Summerbell R. C., Dignani M. C., Chanock S. J., Walsh T. J., 2001. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical Infectious Diseases* 33, 1871–1878.

Anaïssie E. J., Stratton S. L., Dignani M. C., Lee C., Summerbell R. C., Rex J. H., Monson T. P., Walsh T. J., 2003. Pathogenic molds (including *Aspergillus* species) in hospital water distribution systems: a 3-year prospective study and clinical implications for patients with hematologic malignancies. *Blood* 101, 2542–2546.

Anaïssie E. J., Stratton S. L., Dignani M. C., Summerbell R.C., Rex J. H., Monson T. P., Spencer T., Kasai M., Francesconi A., Walsh T. J., 2002. Pathogenic *Aspergillus* species recovered from a hospital water system: a 3-year prospective study. *Clinical Infectious Diseases* 34, 780–789.

Antoniou, K., Frank, J. F., 2005. Removal of *Pseudomonas putida* Biofilm and Associated Extracellular Polymeric Substances from Stainless Steel by Alkali Cleaning. *J. Food Prot.* 68, 277-281.

Applegate, D. H., Bryers, J. D., 1991. Effects of carbon and oxygen limitation and calcium concentrations on biofilm recovery processes. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 17–25.

Arvanitidou M., Kanellou K., Constantinides T. C., Katsouyannopoulos V., 1999. The occurrence of fungi in hospital and community potable waters. *Letters in Applied Microbiology* 29, 81–84.

Arvanitidou M., Spaia S., Velegraki A., Pezaroglou M., Kanetidis D., Pangidis P., Askepidis N., Katsinas Ch., Vayonas G., Katsouyannopoulos V., 2000. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. *Journal of Hospital Infection* 45, 225–230.

- Bakke, R., Trulear, M. G., Robinson, J.A., Characklis, W.G., 1984. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: steady state. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 1418–1424.
- Blackman, I. C., Frank, J. F., 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *J. Food Prot.* 59, 827–831.
- Balkwill, D. L., 1989. Numbers, diversity, and morphological characterization of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiol J.* 7, 33-51
- Bischofberger T., Cha S. K., Schmitt R., König B., Schmidt-Lorenz W., 1990 The bacterial flora of non-carbonated, natural mineral water from the springs to reservoir and glass and plastic bottles. *Int. J. Food Microbiol.* 11(1), 51-71.
- Blenkinsopp, S. A., Costerton, J.W., 1991. Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol.* 9, 138–143.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., Call, D. R. (2003): Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Env. Microbiol.* 69 (12), 7336-7342. p.
- Bower, C. K., McGuire, J., Daeschel, M. A., 1995. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Appl. Env. Microbiol.* 61, 992–997.
- Burke, V., Robinson, J., Gracey, M., Petersen, D., Partridge, K., 1984. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: Seasonal correlation with clinical isolates. *Appl. Env. Microbiol.* 48, 361-366.
- Brackett, R. E., 1992. Shelf stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *J. Food Prot.* 55, 808–814.
- Bryers, J. D., 1984. Biofilm formation and chemostat dynamics: pure and mixed culture considerations. *Biotechnol. Bioeng.* 26, 948–958.
- Buswell C. M., Herlihy, Y. M., Lawrence L. M., et al. 1998. Extended survival and persistence of *Campylobacter* spp. In water and aquatic biofilms and their detection by immunofluorescence-antibody and rRNA staining. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 733-741.
- Cabral D., Fernández Pinto V. E., 2002. Fungal spoilage of bottled mineral water. *International Journal of Food Microbiology* 72, 73–76.
- Camper, A., Burr, M., Ellis, B., Butterfield, P., Abernathy, C., 1999. Development and structure of drinking water biofilms and techniques for the study. *J. Appl. Microbiol. Symposium Supplement* 85, 1S-12S.
- Castro, A. J., Barbosa-Canovas, G. V., Swanson, B.G., 1993. Microbial inactivation of foods by pulsed electrical fields. *J. Food Process. Preservat.* 17, 47–73.
- Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F., 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:1, 22–32
- Christensen, B. E., 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J. Biotechnol.* 10, 181–202.

- Cloete, T. E., Jacobs L., 2001. Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to +CR12 stainless steel and glass. *Water S. A.* 27 (1), 21-26.
- Costerton, J. W., Lappin-Scott, H. M., 1989. Behavior of bacteria in biofilms. *Am. Soc. Microbiol. News* 55, 650–654.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M., Marrie, T. J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 435–464.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., deBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G., 1994. Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137–2142.
- Criado, M. V., Pinto, V. E. F., Badessari, A., Cabral, D., 2005. Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water. *International Journal of Food Microbiology* 99, 343–349.
- Daeschel, M. A., McGuire, J., Al-Makhlafi, H., 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *J. Food Prot.* 55, 731–735.
- Delille, A., Quilés, F., Humbert, F., 2007. In Situ Monitoring of the Nascent *Pseudomonas fluorescens* Biofilm Response to Variations in the Dissolved Organic Carbon Level in Low-Nutrient Water by Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscop. *Appl. Env. Microbiol.* 73, 5782–5788.
- Demirci, A., Pometto, III A. L., Johnson, K. E., 1993a. Evaluation of biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 728–733.
- Demirci, A., Pometto, III A. L., Johnson, K. E., 1993b. Lactic acid production in a mixed-culture biofilm reactor. *Appl. Env. Microbiol.* 59, 203–207.
- Demirci, A., Pometto, III A. L., 1995. Repeated batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 585–590.
- Denning D. W., O’Driscoll B. R., Hogaboam C. M., Bowyer P., Niven R. M., 2006. The link between fungi and severe asthma: a summary of the evidence. *European Respiratory Journal* 27, 615–626.
- Dhaliwal, D. S., Cordier, J. L., Cox, L. J., 1992. Impedimetric evaluation of the efficiency of disinfectants against biofilms. *Letters in Appl. Microbiol.* 15, 217-221.
- Dunsmore, D. G., Twomey, A., Whittlestone, W.G., Morgan, H.W., 1981. Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review. *J. Food Prot.* 44, 220–240.
- Egmond H. P., Speijers G. J. A., 1999 Natural Toxins I. Mycotoxins. In: (ed) Kees van der Heiden et al. *International Food Safety Handbook: Science, international reputation and control.* Marel Dekker INC. New York. 341-355.
- Evans D. J., Allison, D. G., Brown, M. R., Gilbert, P., 1991. Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms toward ciprofloxacin: effect of specific growth rate. *J. Antimicrobiol. Chemoter.* 27, 177-184.

- Ezeonu I. M., Price D. L., Simmons R. B., Crow S. A., Ahearn D. G., 1994. Fungal production of volatiles during growth on fiberglass. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 4172–4173.
- Firstenberg-Eden, R., Notermans, S., Thiel, F., Henstra, S., Kampelmacher, E.H., 1979. Scanning electron microscopic investigations into attachment of bacteria to teats of cows. *J. Food Prot.* 42, 305–309.
- Flint, S. H., Brooks, J. D., Bremer P. J., 1997. Use of the Malthus conductance growth analyser to determine number of thermophilic streptococci on stainless steel. *J. Appl. Microb.* 83, 335-339.
- Frank, J. F., Koffi, R. A., 1990. Surface adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *J. Food Prot.* 53, 550–554.
- Franková, E., Horecka, M., 1995. Filamentous soil fungi and unidentified bacteria in drinking water from wells and water mains near Bratislava. *Microbiological Research* 150, 311–313.
- Fredrickson, J. K., Garland, T. R., Hicks, R. J., Thomas, J. M., Li, S. W., 1989. Lithotrophic and Heterotrophic Bacteria in Deep Subsurface Sediments and their Relation to Sediment Properties. *Geomicrobiology Journal* 7, (1/2) 53-66.
- Fuchs, S., Haritopoulou, T., Wilhelmi, M., 1996. Biofilms freshwater ecosystems and their use as a pollutant monitor. *Water Sci. Technol.* 37, 137–140.
- Fujikawa, H., Aketagawa, J., Nakazato, T., Tamura, H., Moruzmi, S., Itoh, T., 1999. Growth of moulds inoculated into commercial mineral water. *Letters in Appl. Microb.* 28., 211-215.
- Fujikawa H., Wauke T., Kusunoki J., Noguchi Y., Takahashi Y., Ohta K., Itoh T., 1997. Contamination of microbial foreign bodies in bottled mineral water in Tokyo, Japan. *J. Appl. Microb.* 82, 287–291.
- Fuller, R., 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365–378.
- Goncalves A. B., Paterson R. R. M., Lima N., 2006. Survey and significance of filamentous fungi from tap water. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 209, 257–264.
- González C., Gutiérrez C., Grande T., 1987. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Can J Microbiol.* 33, 1120-1125
- Göttlich E., van der Lubbe W., Lange B., Fiedler S., Melchert I., Reifenrath M., Flemming H. C., de Hoog S., 2002. Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int. J. Hygiene Env. Health* 205, 269–279.
- Hageskal G., Gaustad P., Heier B. T., Skaar I., 2007. Occurrence of moulds in drinking water. *J. Appl. Microb.* 102, 774–780.
- Hageskal G., Knutsen A. K., Gaustad P., de Hoog G. S., Skaar I., 2006. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7586–7593.
- Hageskal G., Lima, N., Skaar I., 2009. The study of fungi in drinking water. *Mycological research* 113, 165–172

- Hageskal G., Vrålstad T., Knutsen A. K., Skaar I., 2008. Exploring the species diversity of *Trichoderma* in Norwegian drinking water systems by DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources* 8, 1178–1188.
- Hamilton, W. A., Sale, A. J. H., 1967. Effects of high electrical fields on microorganisms. II. Mechanism of action of the lethal effect. *Biochim. Biophys. Acta* 148, 789–800.
- Hapcioglu B., Yegenoglu Y., Erturan Z., Nakipoglu Y., Issever H., 2005. Heterotrophic bacteria and filamentous fungi isolated from a hospital distribution system. *Indoor and Built Environment* 14, 487–493.
- Hassan, A. N., Frank, J. F., Karsten, B. Q., 2002. Direct observation of Bacterial Exopolysaccharides in Dairy Products Using Confocal scanning Laser Microscopy. *J. Dairy Sci.* 85, 1705-1708.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L. & Latva-Kala, K. (1997): Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of gram-negative bacteria. *Microbiology*, 143, 3193–3199.
- Helke, D. M., Somers, E. B., Wong, A. C. L., 1993. Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stain-less steel and Buna-N in the presence of milk and milk components. *J. Food Prot.* 56, 479–484.
- Helmi, K., Skraber, S., Gantzer, C., Willame, R., Hoffmann, L., Cauchie, H. M., 2008. Interactions of *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, Vaccinal Poliovirus Type 1 and Bacteriophages ΦX164 and MS2 with a Drinking Water Biofilm and Wastewater Biofilm. *Appl. Env. Microbiol.* 74 (7), 2079-2088.
- Herald, P. J., Zottola, E.A., 1988a. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. *J. Food Prot.* 51, 445–448.
- Herald, P. J., Zottola, E.A., 1988b. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J. Food Prot.* 53, 1549–1552, 1562.
- Hinzelin F., Block J. C., 1985. Yeasts and filamentous fungi in drinking water. *Environmental Technology Letters* 6, 101–106.
- Holah, J. T., Higgs, C., Robinson, S., Worthington, D., Spenceley, H., 1990. A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Lett. Appl. Microbiol.* 11, 255–259.
- Hood, S. K., Zottola, E.A., 1995. Biofilms in food processing. *Food Control* 6, 9–18.
- Hood, S. K., Zottola, E.A., 1997. Growth media and surface influence the adherence of *Pseudomonas fragi*, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* cells to stainless steel. *J. Food Prot.* 60, 1034–1037.
- Hoyle, B. D., Alcantara, J., Costerton, J. W., 1992. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm as a Diffusion Barrier to Piperacillin. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Sept., 2054-2056
- Hunter, P. R., Burge, S. H., 1987. The Bacteriological Quality of Bottled Natural Mineral Waters. *Epidemiology and Infection*, 99, 439-443

- Hunter, P. R., Burge, S. H., Hornby H., 1990. An assessment of the microbiological safety of bottled mineral waters *Rivista Italiana d'Igiene*, 50, 394-400
- Jaakkola M. S., Nordman H., Piipari R., Uitti J., Laitinen J., Karjalainen A., Hahtola P., Jaakkola J. K., 2002. Indoor dampness and molds and development of adult-onset asthma: a population-based incident case-control study. *Environmental Health Perspectives* 110, 543-547.
- Jelenik-Nikolics M., Lévai T., 2000. Biofilmek vízellátó rendszerekben. *Gyógyszerészet* 44: 621-624
- Jelenik-Nikolics, M., 2001. Parenterális oldatok készítésére alkalmas víz minőségének biztosítása. *Képzés egy életen át* 1:4 – 11
- Johansen, C., Falholt, P., Gram, L., 1997. Enzymatic Removal and Disinfection of Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (9): 3724-3728.
- Jones, G. W., Isaacson, R.E., 1983. Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 10, 229-260.
- Jones, R. E., Beeman, R. E., Suflita, J. M., 1989. Anaerobic metabolic processes in the deep terrestrial subsurface. *Geomicrobiology Journal*. 7, 117-130.
- Juven, B. J., Pierson, M.D., 1996. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. *J. Food Prot.* 59, 1233-1241.
- Kaminski E., Stawicki S., Wasowicz E., 1974. Volatile flavor compounds produced by molds of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fungi imperfecti*. *Appl. Env. Microbiol.* 27, 1001-1004.
- Kanzler D., Buzina W., Paulitsch A., Haas D., Platzer S., Marth E., Mascher F., 2007. Occurrence and hygienic relevance of fungi in drinking water. *Mycoses* 51, 165-169.
- Karapinar M., Gönül S. A., 1991. Survival of *Yersinia enterocolitica* and *Escherichia coli* in spring water. *Int J Food Microbiol.* ;13, 315-319.
- Karpanen, T. J., Worthington, T., Hendry, E. R., Conway, B. R., Lambert, P. A., 2008, Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 62, 1031-1036.
- Kikuchi T., Kadota S., Suehara H., Nishi A., Tsubaki K., 1981. Odorous metabolites of a fungus, *Chaetomium globosum* KINZE ex FR. Identification of geosmin, a musty-smelling compound. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 29, 1782-1784.
- Kim, J., Cho, M., Oh, B., Choi, S., Yoon, J., 2004. Control of bacterial growth in water using synthesized inorganic disinfectant. *Chemosphere*, 55, 775-780.
- Kim, H., Ryu, J. H., Beuchat, L. R., 2007. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel, and in a Biofilm. *Appl. Env. Microbiol.* 73 (4), 1256-1265
- Kool, J. L., Carpenter, J. C., Fields, B. S., 1999. Effect on monochloramine disinfection of municipal drinking water on risk of nosocomial Legionnaires' disease. *The Lancet*, 353, 272-277.

- Kose, M., Ozturk, M., Kuyucu, T., Gunes, T., Akcakus, M., Sumerkan., B., 2004. Community-acquired pneumonia and empyema caused by *Pseudomonas stutzeri*: a case report. *Turk. J. Pediatr.* 46, 177–178.
- Kumar, C. G., Anand, S. K., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International J. of Food Microbiology* 42, 9 –27
- Krysinski, E. P., Brown, L. J., Marchisello, T. J., 1992. Effect of Cleaners and Sanitizers on *Listeria monocytogenes* Attached to Product Contact Surfaces. *J. Food Prot.* 55, 246-251.
- Lahti K., 1993. Microbial quality of drinking water in some Finnish distribution systems. *Water Science and Technology* 27, 151–154.
- Lalucat, J., Bennasar, A., Bosch, R., Valdes, E. G., Palleroni, N. J., 2006. Biology of *Pseudomonas stutzeri*. *Microb. Molec. Biolog. Reviews.* 70 (2), 510–547
- Lebowitz, D., Gurses-Ozden, R., Rothman, R. F., Liebmann, J. M., Tello, C., Ritch., R., 2001. Late-onset bleb-related panophthalmitis with orbital abscess caused by *Pseudomonas stutzeri*. *Arch. Ophthalmol.* 119, 1723–1725.
- Leclerc, H., da Costa M. S., 1998. Microbiology of Bottled Natural Mineral Water. In: *Technology of bottled water - Sheffield Food Technology*, Vol. 3 (eds. Dorothy A. G. Senior, P. R. Ashurst), Sheffield Academic Press Ltd. England 223-273.
- Leclerc, H., Moreau, A., 2002. Microbiological safety of natural mineral water, *FEMS Microbiology Reviews* 26, 207-222.
- LeClercq-Perlat, M. N., Lalande, M., 1994. Cleanibility in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. *J. Food Eng.* 23, 501-517.
- Lehmann, F. L., Russell, P. S., Solomon, L. S., Murphy, K. D., 1992. Bacterial growth during continuous milk pasteurization. *Aust. J. Dairy Technol.* 47, 28–32.
- Le Chevallier, M. W., Cawtohn, C. D., Lee, R. G., 1988. Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 54, 2492-2499.
- Lugauskas A., Krikstaponis A., Sveityt L., 2004. Airborne fungi in industrial environments d potential agents of respiratory diseases. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 11, 19–25.
- Macaskie, L. E., Empson, R. M., Lin, F., Tollet, M. R., 1995. Enzymatically-mediated uranium accumulation and uranium recovery using a *Citrobacter* sp. immobilized as a biofilm within a plug-flow reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 63, 1–16.
- Mackay, W. G., Gribbon, L. T., Barer, M. R., Reid D. C., 1999. Biofilms in drinking water systems: a possible reservoir for *Helicobacter pylori*. *J. Appl. Microbiol.* 85. 52S-59S.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., Hagny, P., 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J. Food Prot.* 53, 742–746.

- Marshall, K. C., 1992. Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activity and control at surfaces. *Am. Soc. Microbiol. News* 58, 202–207.
- Massol-Deyá, A. A., Whallon, J., Hickey, R. F., Tiedje, J. M., 1995. Channel Structures in Aerobic Biofilms in Fixed-Film Reactors Treating Contaminated Groundwater. *Appl. Env. Microbiol.* 61 (2), 769-777.
- Mattheis J. P., Roberts R. G., 1992. Identification of geosmin as a volatile metabolite of *Penicillium expansum*. *Appl. Env. Microbiol.* 58, 3170–3172.
- Mavridou, A. 1992. Study of the bacterial flora of a non-carbonated natural mineral water. *J. Appl. Bact.* 73, 355-361.
- Meiller, T. F., Depaola, L. G., Kelley, J. I., Baqui, A. A. M. A., Touring, B. F., Falkler, W. A., 1999. Dental Unit Waterlines: biofilms, disinfection and recurrence. *JADA* 130, 65-72.
- Ming, X. T., Weber, G. H., Ayres, J. W., Sandine, W. E., 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *J. Food Sci.* 62, 413–415.
- Momba, M. N. B., Kfir, R., Venter, S. N., Cloete, T. E., 2000. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality. *Water SA.* 26, (1), 59-66.
- Momba, M. N. B., Binda, M. A., 2002. Combining chlorination and chloramination processes for the inhibition of biofilm formation in drinking surface water system models. *J. Applied Microbiology* 92, 641-648.
- Montiel A., Rigal S., Welté B., 1999. Study of the origine of musty taste in the drinking water supply. *Water Science and Technology* 40, 171–177.
- Morais P., da Costa M. S., 1990. Alterations in the major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. *J. Appl. Bact.* 69, 750-757
- Moreira, L., Agostinho, P., Vasconcelos M. P., da Costa M. S., 1994 Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. *J. Appl. Bact.* 77, 334-339.
- Mosteller T. M., Bishop J. R., 1993. Sanitizer Efficacy Against Attached Bacteria in a Milk Biofilm. *J. Food Protect.* 56, 34-41.
- Moyer C. L., Morita R. Y., 1989. Effect of Growth Rate and Starvation-Survival on the Viability and Stability of a Psychrophilic Marine Bacterium. *Appl. Env. Microb.* 55, 1122-1127.
- Nagy L. A., Olson B. H., 1982. The occurrence of filamentous fungi in drinking water distribution systems. *Canadian Journal of Microbiology* 28, 667–671.
- Niemi R. M., Knuth S., Lundström K., 1982. Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Appl. Env. Microb.* 43, 378–388.
- Nyström A., Grimvall A., Krantz-Rülcker C., Sävenhed R., Åkerstrand K., 1992. Drinking water off-flavour caused by 2,4,6-trichloroanisole. *Water Science and Technology* 25, 241–249.

- Oh, D.H., Marshall, D. L., 1995. Destruction of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel using monolaurin and heat. *J. Food Prot.* 58, 251–255.
- Okuno, K., Tsuchiya, K., Ano, T., Shoda, M., 1993. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperatures. *J. Ferment. Bioeng.* 75, 103–106.
- Pakula, R., Freeman, A., 1996. A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil-degrading filamentous fungi. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 20–25.
- Panagopoulou P., Filioti J., Petrikkos G., Giakouppi P., Anatoliotaki M., Farmaki E., Kanta A., Apostolakou H., Avlami A., Samonis G., Roilides E., 2002. Environmental surveillance of filamentous fungi in three tertiary care hospitals in Greece. *Journal of Hospital Infection* 52, 185–191.
- Paterson, R. R. M. , Kelleyl, J., Gallagher M., 1997. Natural occurrence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* (Link) in water. *Letters Appl. Microb.* 25, 435-436
- Park, S. R., Mackay W. G., Reid, D. C., 2001. Helicobacter sp. recovered from drinking water biofilm sampled from a water distribution system. *Wat. Res.* 35. (6) 1624-1626.
- Pedro-Botet M. L., Sanchez I., Sabria M., Sopena N., Mateu L., García-Núñez M., Rey-Joly C., 2007. Impact of copper and silver ionization of fungal colonization of the water supply in health care centers: implications for immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases* 45, 84–86.
- Pires-Goncalves R. H., Sartori F. G., Montanari L.B., Zaia J.E., Melhem M. S. C., Mendes-Giannini M. J. S., Martins C. H. G., 2008. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. *Letters Appl. Microb.* 46: 542–547.
- Pothakamury, U. R., Barbosa-Canovas, G.V., Swanson, B.G., 1993. Magnetic-field inactivation of microorganisms and generation of biological changes. *Food Technol.* 47, 85–93.
- Potvliege, C., Jonckheer, J., Lenclud, C., Hansen W., 1987. Pseudomonas stutzeri Pneumonia and Septicemia in a Patient with Multiple Myeloma. *J. Clin. Microb.* 25 (2), 458-459.
- Poulsen, L. V., 1999. Microbial biofilm in food processing, *Lebensm.-Wiss. U-Technol.* 32: 321-326.
- Quilès F., Humbert F., Delille A., 2010. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* Volume 75, Issue 2, 610-616
- Riberio, A., Machado, A. P., Kozakiewicz, Z., Ryan, M., Luke B., Buddie, A. G., Venancio, A., Lima, N., Kelley, J., 2006. Fungi in bottled water: a case stud of a production plant. *Rev Iberoam Micol.* 23, 139-144.
- Ronner, A. B., Wong A. C. L., 1993. Biofilm development and Sanitizer Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel and Buna-n Rubber. *J. Food Prot.* 56, 750-758.

- Russel R., Patterson M., 2007. Zearalenone production and growth in drinking water inoculated with *Fusarium graminearum*. *Mycol. Progress* 6, 109–113.
- Sasahara, K., Zottola, E.A., 1993. Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *J. Food Prot.* 56, 1022–1028.
- Schwab C. J., Straus D. C., 2004. The roles of *Penicillium* and *Aspergillus* in sick buildings syndrome. *Advances in Applied Microbiology* 55, 215–237.
- Siebel, M.A., Characklis, W.G., 1991. Observations of binary population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 37, 778–789.
- Silvestry-Rodriguez, N., Bright, K. R., Slack, D. C., Uhlmann, D. R., Gerba, C. P., 2008. *Appl. Env. Microbiol.* 74 (5), 1639-1641.
- Sinclair J. L, Ghiorse, W. C., 1989. Distribution of aerobic bacteria, protozoa, algae, and fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology Journa.* 7, 15-31.
- Speers, J. G. S., Gilmour, A., 1985. The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 59, 325–332.
- Stanley, P. M., 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Can. J. Microbiol.* 29, 1493–1499.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M., Costerton, J. W., 2001. Growth and Detachment of Cell Clusters from Mature Mixed-Species Biofilms ., *Appl. Env. Microbiol.* 67 (12), 5608–5613.
- Strathmann, M., Wingender, J., Flemming, H.C., 2002. Application of fluorescently labelled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microb. Methods* 50, 237-248.
- Surman, G. B., Walker, J. T., et al. 1996. Comparison of microscope techniques for the examination of biofilms. *J. Microb. Methods* 25, 57-70.
- Sutherland, I. W., 2001. The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology.* 9 (5), 222-227.
- Telgmann, U., Horn H., Morgenroth E., 2004. Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms. *Water Research* 38, (17) 3671-3684.
- Tuncan, E. U., 1993. Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor, and chlorine on *Listeria*. *J. Food Prot.*, 56, 1029–1033.
- Uhlinger, D. J., White, D. C., 1983. Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. *Appl. Env.. Microb.* 45, 64–70.
- Van der Kooij, D., Visser, A., Hijnen, W. A. M., 1982. Determining the concentration of easily assimilable organic carbon in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.* 74, 540-545.
- Vandevivere, P., Kirchman, D. L., 1993. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Env. Microb.* 59, 3280–3286.

Wadowsky R. M., Yee, R. B., Mezmar, L., Wing, E. J., Dowling, N. J., 1982. Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and non-hospital plumbing fixtures. *Appl. Env. Microbiol.* 43, 1104-1110.

Warburton D. W., 1993. A Review of the Microbiological Quality of Bottled Water Sold in Canada. Part 2. The Need for More Stringent Standards and Regulations. *Canadian Journal of Microbiology* 39, 158-168.

Warris A., Gaustad P., Meis J. F. G. M., Voss A., Verweij P. E., Abrahamsen T. G., 2001. Recovery of filamentous fungi from water in a paediatric bone marrow transplantation unit. *Journal of Hospital Infection* 47, 143-148.

Warris A., Voss A., Abrahamsen T. G., Verweij P. E., 2002. Contamination of hospital water with *Aspergillus fumigatus* and other moulds. *Clinical Infectious Diseases* 34, 1159-1160.

Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., Flemming, H. C., 2001. Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in Enzymology* 336, 302-314.

Wirtanen, G., Mattila-Sandholm, T., 1992. Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to a chlorine sanitizer. Part II. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 25, 50-54.

Wirtanen, G., Husmark, U., Mattila-Sandholm, T., 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J. Food Prot.* 59, 727-733.

Wirtanen, G., Mattila-Sandholm, T., 1993. Epifluorescence image analysis and cultivation of foodborne bacteria grown on stainless steel surfaces. *J. Food Prot.* 56, 678-683.

Wirtanen, G., Mattila-Sandholm, T., 1994. Measurement of biofilm of *Pediococcus pentosaceus* and *Pseudomonas fragi* on stainless steel surfaces. *Coll. Surf. B: Biointerfaces* 2, 33-39.

Wirtanen, G., Salo S., Helander, I. M., Mattila-Sandholm, T., 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 20, 37-50.

Wright, J. B., Ruseska, I. & Costerton, J.W. (1991): Decreased biocide susceptibility of adherent *Legionella pneumophila*. *J. appl. Bact.* 71, 531-538.

www.erc.montana.edu

Zottola, E.A., Sasahara, K.C., 1994. Microbial biofilms in the foodindustry—Should they be a concern?. *Int. J. Food Microbiol.* 23, 125-148.

M. 2. FELHASZNÁLT TÁPTALAJOK ÉS ANYAGOK RECEPTJEI

TGE Agar

tripton	5,0 g
glükóz	1,0 g
élesztő kivonat	2,5 g
agar-agar	18,0 g
desztillált víz	1000 ml

BHI agar MERCK 113825

tápanyag szubsztrát (agykivonat, szív kivonat és peptonok)	27,5 g
D(+)-glükóz	2,0 g
nátrium-klorid	5,0 g
dinátriumhidrogén-foszfát	2,5 g
agar-agar	15,0 g
desztillált víz	1000 ml

BHI tápleves MERCK 1.10493

tápanyag szubsztrát (agykivonat, szív kivonat és peptonok)	27,5 g
D(+)-glükóz	2,0 g
nátrium-klorid	5,0 g
dinátriumhidrogén-foszfát	2,5 g
desztillált víz	1000 ml

Malt Extract Agar-. (MEA; Merck 1.05398)

Maltóz	12,75 g
Dextrin	2,75 g
Glicerin	2,35 g
Pepton	0,78 g
agar-agar	15,00 g
desztillált víz	1000 ml

pepton hígító:

Pepton	1 g
NaCl	8,5 g
desztillált víz foszfát pufferben (7,5)	1000 ml

foszfát puffer (pH 7,5)

dinátrium-hidrogénfoszfát x 12H ₂ O	9,0 g
kálium-dihidrogén-foszfát	1,5 g
desztillált víz	1000 ml

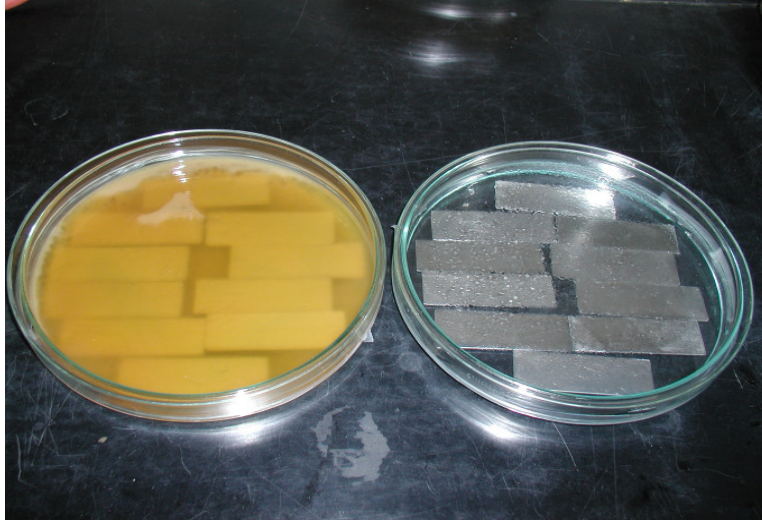
M. 3. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**A dolgozatban használt mikroba faj nevek rövidítései:**

<i>Ps.</i>	<i>Pseudomonas</i>
<i>P.</i>	<i>Penicillium</i>
<i>A.</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>C.</i>	<i>Cladosporium</i>
<i>F.</i>	<i>Fusarium</i>

Egyéb rövidítések:

FITC	fluorescein isothiocyánát festékkel jelölt Concavalin A lectin
TKE	telepképző egység
EPS	extracelluláris polimer „extracellular polymeric substance”

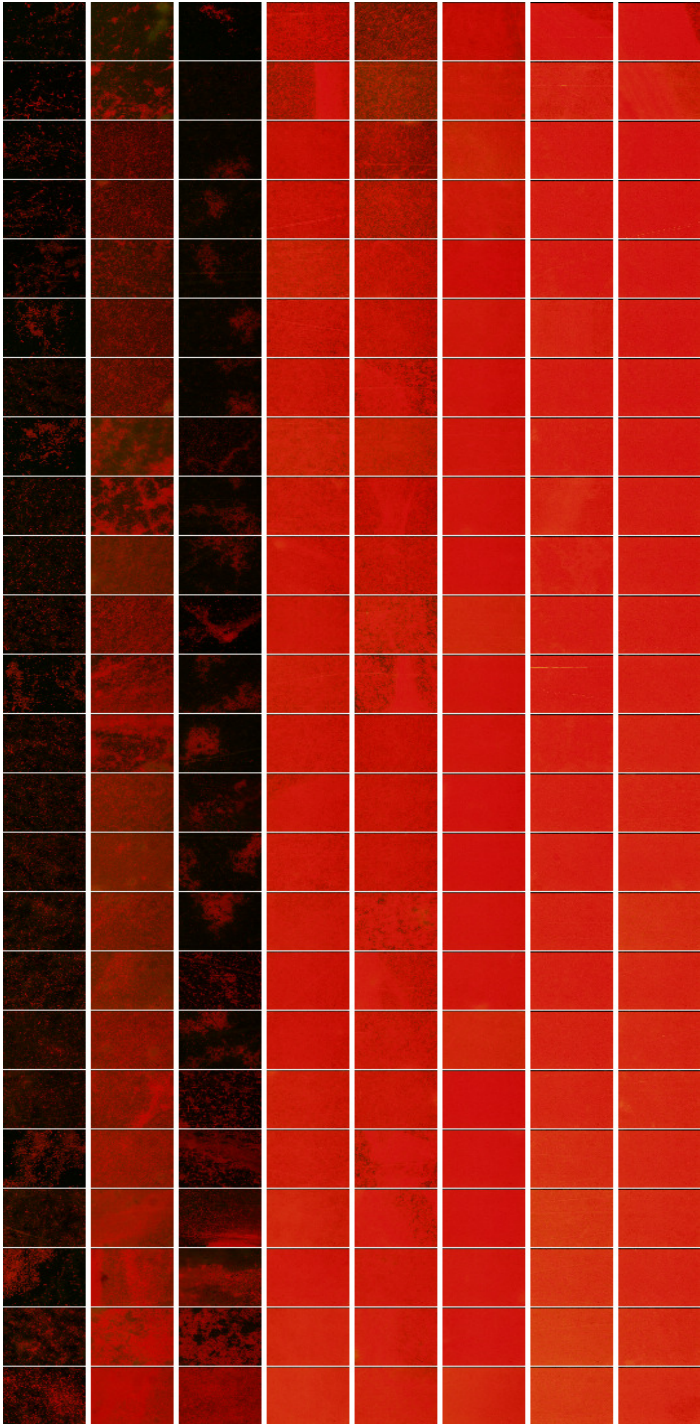
M. 4.FÉNYKÉPEK:



26. ábra: Statikus biofilm képzés vízszintes rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen - *Ps. stutzeri* CC B 21 BHI levesben (balra), és szénsavmentes ásványvízben (jobbra) a beoltást követő 2. héten

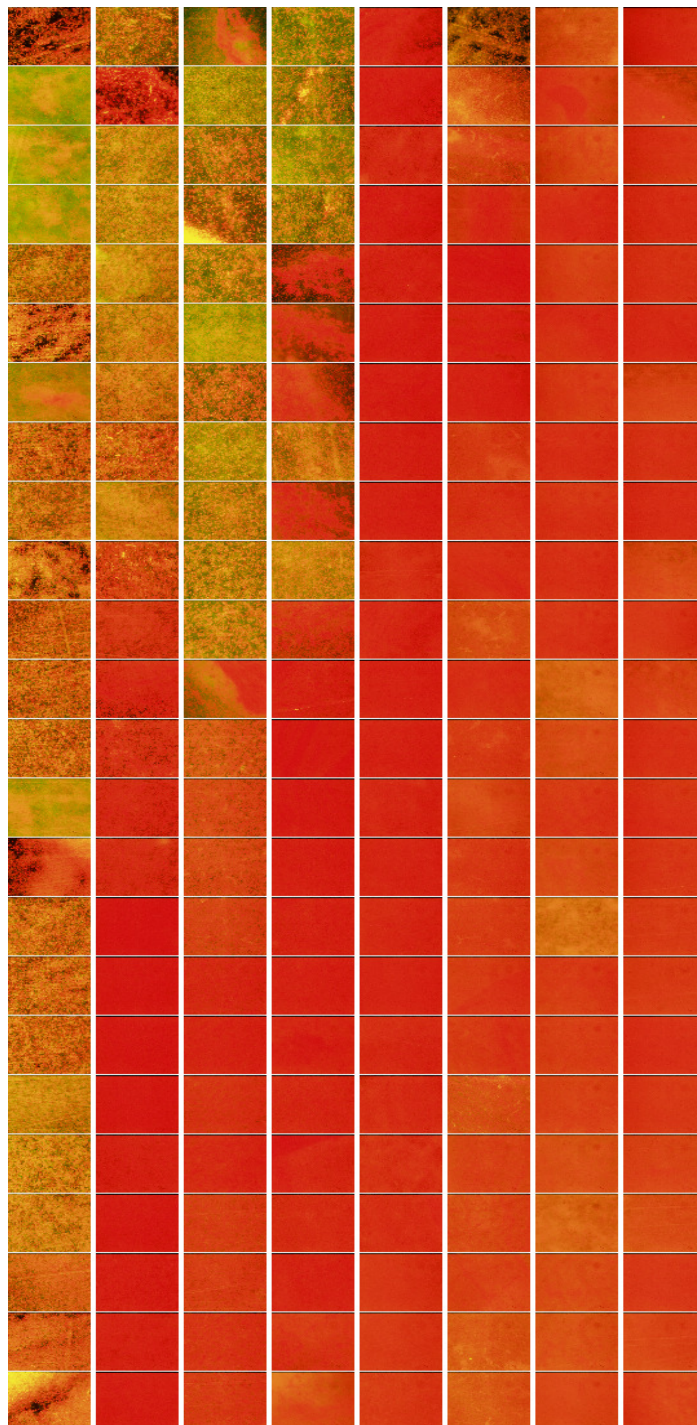
21. táblázat: BHI táptalajban, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, akridin narancssal festett *Pseudomonas aeruginosa* biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



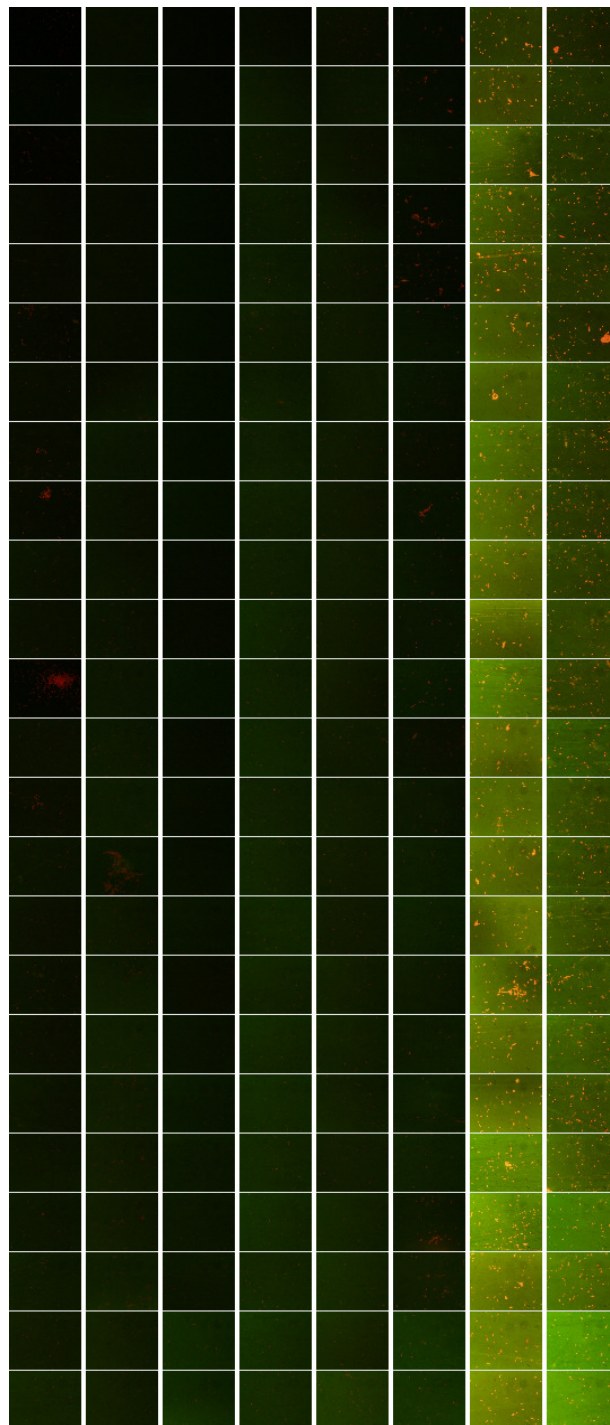
22. táblázat: BHI táptalajban, rozsdamentes acél (Wnr1.4301)felületen képzett, akridin narancssal festett *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve.

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



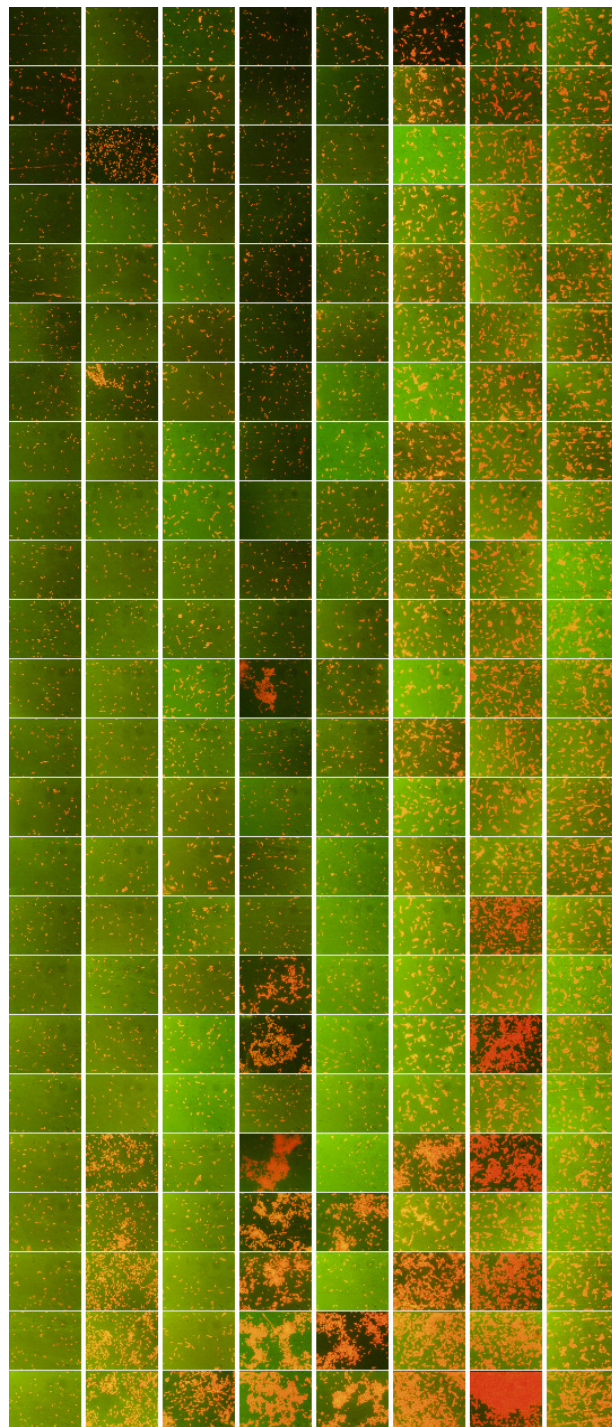
23. táblázat: Szénsavmentes átványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, akridin narancssal festett *Pseudomonas aeruginosa* biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28



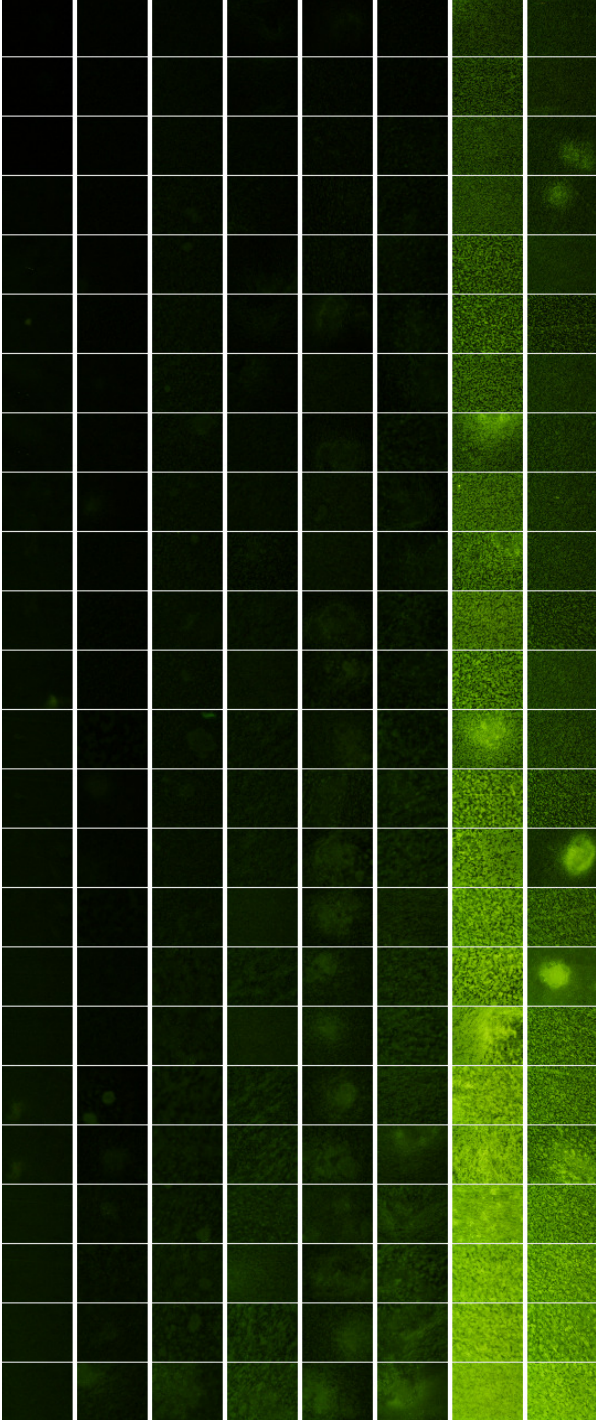
24. táblázat: Szénsavmentes átványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, akridin narancssal festett *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



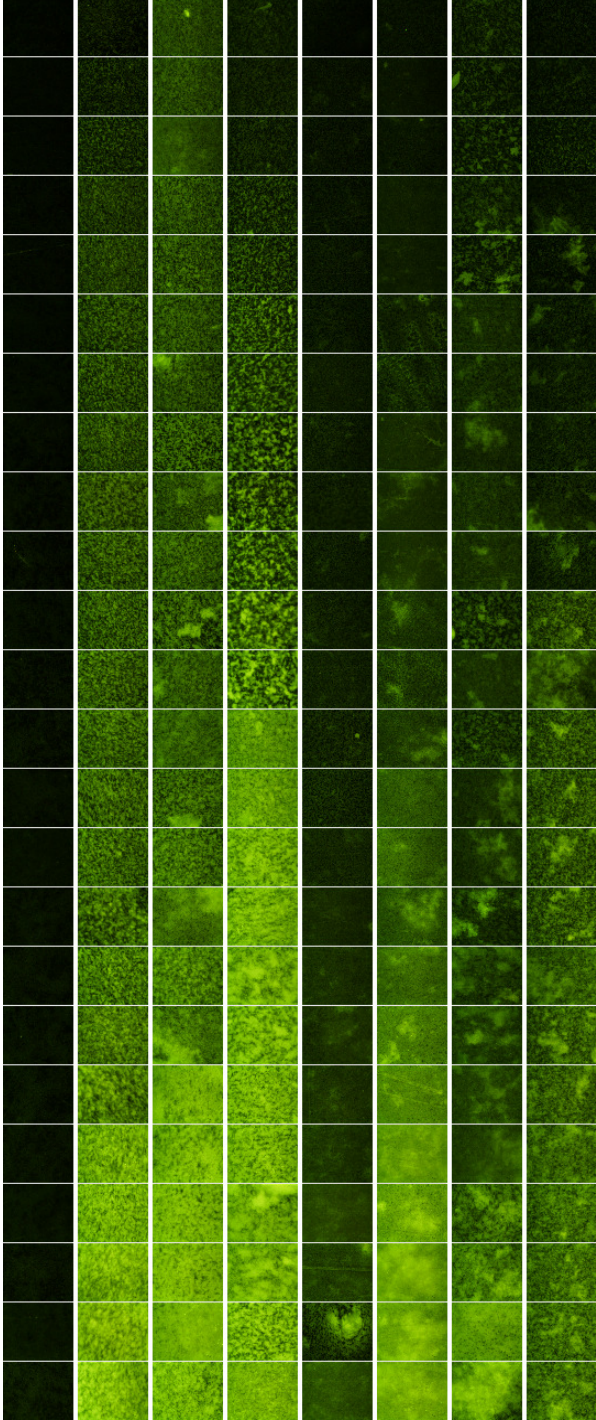
25. táblázat: BHI táplevesben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, FITC-vel festett *Pseudomonas aeruginosa* biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



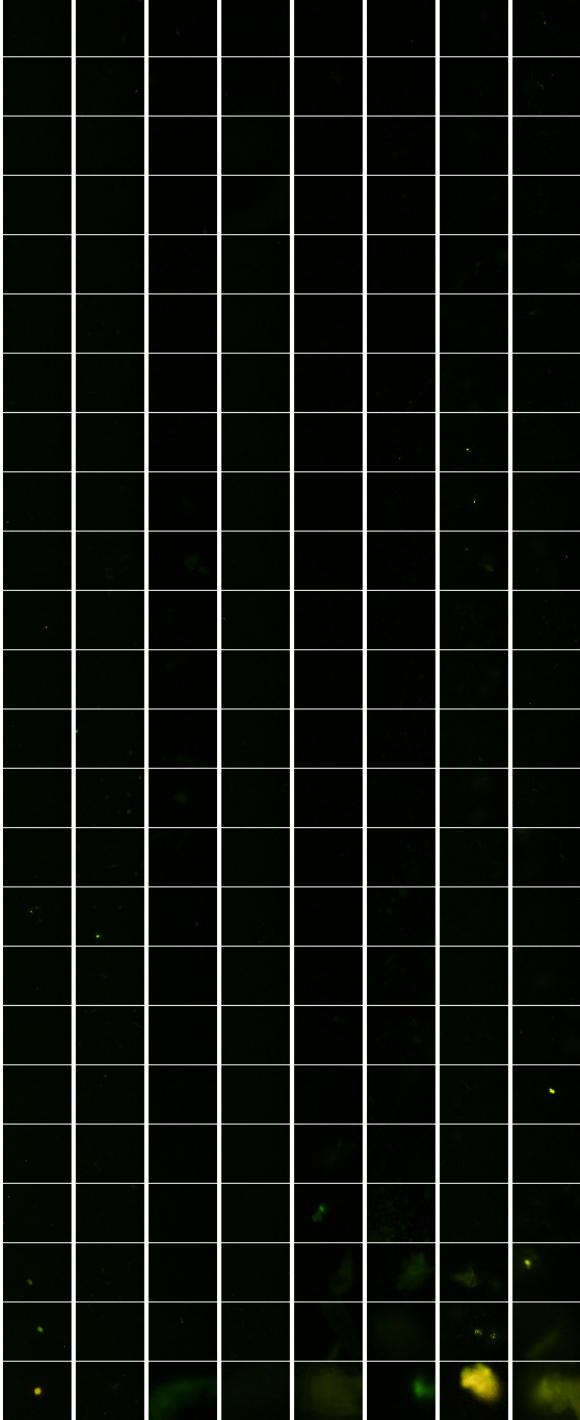
26. táblázat: BHI táplevesben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, FITC-vel festett *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



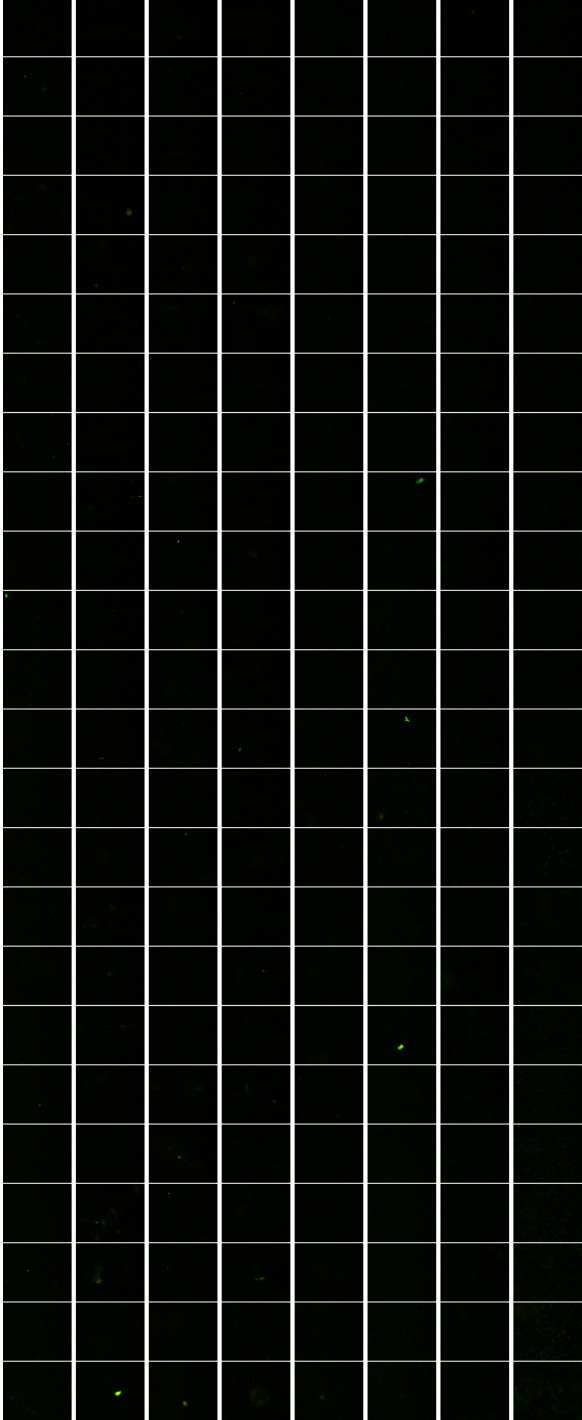
27. táblázat: Szénsavmentes ásványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, FITC-vel festett *Pseudomonas aeruginosa* biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



28. táblázat: Szénsavmentes ásványvízben, rozsdamentes acél (Wnr1.4301) felületen képzett, FITC-vel festett *Pseudomonas stutzeri* CC B 21 biofilmről készített összes fénykép *Mathcad* programmal színintenzitás szerint sorba rendezve

Nap: 1. 2. 3. 6. 7. 14. 21. 28.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm témavezetőmnek, Mohácsiné dr. Farkas Csillának, hogy munkám során mind emberileg, mind szakmailag támogatott és tanácsaival, meglátásaival átsegített a nehézségeken.

Köszönet illeti meg dr. Kiskó Gabriellát, a biofilmekkel kapcsolatos kísérleteinkben nyújtott segítségeiért és tanácsaiért. Köszönöm továbbá Lehoczkiné dr. Tornai Juditnak és dr. Syposs Zoltánnak a penészgombákkal kapcsolatos kísérletek összeállításában nyújtott segítségét, tanácsait és támogatásáért.

Köszönöm tanácsait és segítségét dr. Ágoston Rékának, szekvenálásnál nyújtott segítségét dr. Belák Ágnesnek.

Köszönöm dr. Gillay Zoltánnak a digitális mikroszkópos fényképek elemzésében nyújtott, mindig készséges, önzetlen és kreatív segítségét, tanácsait.

Ez úton szeretném megköszönni munkáját a Mikrobiológia és Biotechnológia tanszék diplomázóinak, Sipos Anitának és Paupera Eszternek, akik munkájukkal hozzájárultak a nagyszámú kísérletsorozatok megvalósításához.

Szeretnék köszönetet mondani a türelmükért és támogatásukért volt kollégáimnak a Richter Gedeon Rt.-nél és a Coca Cola Magyarország Szolgáltató Kft.-nél, valamint a jelenlegi kollégáimnak Danone Magyarország Kft.-nél.

Végül de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Családom, Kisfiam megértő és végtelen türelmét, támogatását.