

**DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS**

**TIHANYI-KOVÁCS RENÁTA**

**MOSONMAGYARÓVÁR**

**2023**

**SZÉCHENYI ISTVÁN EGYETEM  
ALBERT KÁZMÉR MOSONMAGYARÓVÁRI KAR  
ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK**

Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi

Multidiszciplináris Doktori Iskola

Pulay Gábor Élelmiszertudományi Doktori Program

**Doktori Iskolavezető:**

**Prof. Dr. Varga László, DSc**

egyetemi tanár

**Programvezető:**

**Prof. Dr. Varga László, DSc**

egyetemi tanár

**Témavezetők:**

**Dr. habil Ásványi Balázs, PhD**

egyetemi docens

**Dr. habil Böröcz Péter, PhD**

egyetemi tanár

**AZ ELLÁTÁSI LÁNCOK FIZIKAI IGÉNYBEVÉTELÉNEK  
HATÁSA A PALACKOZOTT TERMÉSZETES  
ÁSVÁNYVIZEK MIKROBIOLÓGIAI MINŐSÉGÉRE**

**Tihanyi-Kovács Renáta**

Mosonmagyaróvár

2023

**Az ellátási láncok fizikai igénybevételének hatása az élelmiszerek  
beltartalmi paramétereire**

**Írta: Tihanyi-Kovács Renáta**

Készült

a Széchenyi István Egyetem

Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar

Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszertudományi

Multidiszciplináris Doktori Iskola

Pulay Gábor Élelmiszer-tudományi Doktori Programja keretében

Témavezetők:

Dr. Ásványi Balázs, PhD és Dr. Böröcz Péter, PhD

**Elfogadásra javaslom (igen / nem)**

**(aláírás)**

**A jelölt a doktori szigorlaton.....%-ot ért el.**

**Mosonmagyaróvár, .....**

.....

**a Szigorlati Bizottság Elnöke**

**Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen/nem)**

**Első bíráló (Dr. ....) igen/nem**

**(aláírás)**

**Második bíráló (Dr. ....) igen/nem**

**(aláírás)**

**Esetleg harmadik bíráló (Dr. ....) igen/nem**

**(aláírás)**

**A jelölt az értekezés nyilvános vitáján .....%-ot ért el.**

**Mosonmagyaróvár, .....**

**A Bírálóbizottság elnöke**

**Doktori (PhD) oklevél minősítése.....**

**Az EDT elnöke**

---

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>KIVONAT.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>8</b>
<b>1 BEVEZETÉS.....</b>	<b>10</b>
1.1 CÉLKITŰZÉS.....	11
<b>2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>13</b>
2.1 CSOMAGOLÁS .....	13
2.1.1 <i>A csomagolás fogalma és alapvető funkciói.....</i>	<i>13</i>
2.1.2 <i>Műanyag csomagolószerek .....</i>	<i>14</i>
2.1.3 <i>A palackozás technológiája egy északnyugat-magyarországi palackozónál.....</i>	<i>17</i>
2.2 A CSOMAGOLT ÁRUKAT A LOGISZTIKÁBAN ÉRŐ HATÁSOK .....	19
2.2.1 <i>A disztribúció során fellépő főbb dinamikus hatások.....</i>	<i>23</i>
2.2.2 <i>A valós rázkódások laboratóriumi szimulációja .....</i>	<i>28</i>
2.3 A RÁZKÓDÁS HATÁSA AZ ÉLELMISZEREK MINŐSÉGÉRE .....	36
2.3.1 <i>A rázkódás és a tej feldolgozhatóságának összefüggései .....</i>	<i>37</i>
2.3.2 <i>Alkoholos italokban bekövetkező minőségi változások .....</i>	<i>38</i>
2.3.3 <i>A fizikai igénybevétel mikrobiomra gyakorolt hatása .....</i>	<i>39</i>
2.4 A VÍZ ÉLETTANI HATÁSA.....	40
2.4.1 <i>A palackozott vizek csoportosítása.....</i>	<i>43</i>
2.5 ÁSVÁNYVÍZ .....	45
2.5.1 <i>Az ásványvíz fogalma .....</i>	<i>45</i>
2.5.2 <i>Az ásványvizek csoportosítása.....</i>	<i>45</i>
2.5.3 <i>Az ásványvíz fogyasztás Magyarországon.....</i>	<i>48</i>
2.5.4 <i>Az ásványvizek jogi szabályozása.....</i>	<i>52</i>
2.6 AZ ÁSVÁNYVIZEK MIKROBIÓTÁJA .....	53
2.6.1 <i>A PET palack és a mikrobiom kapcsolata .....</i>	<i>56</i>
2.6.2 <i>Az ásványvizek mikrobiótájának vizsgálata .....</i>	<i>58</i>
2.6.3 <i>A palackozás hatása a mikrobaszámra (Bottling effect) .....</i>	<i>62</i>

---

2.6.4	<i>Ásványvízfogyasztással összefüggésbe hozható megbetegedések</i> .....	62
<b>3</b>	<b>ANYAG ÉS MÓDSZER</b> .....	<b>64</b>
3.1	A VIZSGÁLATOK HELYE .....	64
3.2	VIZSGÁLT MÁTRIX .....	64
3.3	A VIZSGÁLATOK SORÁN HASZNÁLT ANYAGOK .....	67
3.3.1	<i>Vizsgált mikroorganizmusok</i> .....	67
3.3.2	<i>Az alkalmazott táptalajok összetétele</i> .....	67
3.3.3	<i>A vizsgálatok kivitelezéséhez használt eszközök</i> .....	70
3.4	VIZSGÁLATI MÓDSZEREK.....	71
3.4.1	<i>Dinamikus mechanikai rázkódás kísérlet</i> .....	71
3.4.2	<i>Mikrobiológiai vizsgálatok</i> .....	76
3.4.3	<i>Molekuláris biológiai vizsgálatok</i> .....	80
3.5	A VIZSGÁLATI ADATOK KIÉRTÉKELÉSE.....	86
3.5.1	<i>Telepszám meghatározás</i> .....	86
3.5.2	<i>A mikrobaszaporodást jellemző paraméterek meghatározása</i> .....	87
3.5.3	<i>Alkalmazott statisztikai és ábrázolási módok</i> .....	88
<b>4</b>	<b>EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK</b> .....	<b>89</b>
4.1	A PALACKOZOTT VÍZMINTÁK MIKROBIOM ÖSSZETÉTELE .....	89
4.2	A FRISSEN PALACKOZOTT MINTÁKBAN LÉVŐ MIKROBÁK SZÁMÁNAK VÁLTOZÁSA A RÁZÁS INTENZITÁSÁNAK FÜGGVÉNYÉBEN .....	89
4.3	AZ ISZOLÁLT MIKROBA AZONOSÍTÁSA.....	99
4.4	PRIMERTERVEZÉS .....	100
4.5	A BEOLTOTT MINTÁKBAN LÉVŐ MIKROBÁK SZÁMÁNAK VÁLTOZÁSA A MECHANIKAI AGITÁCIÓ INTENZITÁSÁNAK FÜGGVÉNYÉBEN .....	101
4.6	KVANTITATÍV PCR.....	104
4.6.1	<i>Frissen palackozott ásványvízminták valós idejű rázóvizsgálattal kapott eredményeinek elemzése</i> .....	104
4.6.2	<i>Frissen palackozott ásványvízminták időgyorsított rázóvizsgálattal kapott eredményeinek elemzése</i> .....	107

---

4.6.3	<i>Időgyorsított rázóvizsgálat frissen palackozott és kereskedelmi forgalomban vásárolt, eltérő palackozási helyű és idejű ásványvízzel.....</i>	108
4.6.4	<i>Frissen palackozott ásványvízminták valós idejű és időgyorsított rázóvizsgálatának elemzése.....</i>	115
<b>5</b>	<b>KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>120</b>
5.1	JAVASLATOK .....	122
<b>6</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>124</b>
<b>7</b>	<b>ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>127</b>
	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>130</b>
	<b>MELLÉKLETEK .....</b>	<b>156</b>

## KIVONAT

A globális szállítási láncok napjainkra a világ minden pontjára eljuttatják a palackozott ásványvizet, így azok már nem csak a palackozás közvetlen környezetében kerülnek értékesítésre. A rázkódás számos fiziko-kémiai változást indukál a különböző élelmiszerekben, de mindezedig szállítás alatti rázkódásnak az élelmiszerek mikrobiológiai minőségére gyakorolt hatását nem vizsgálták.

A dinamikus mechanikai rázkódás szimulációját időgyorsított és valós idejű vizsgálatokkal modelleztem. Az elvégzett vizsgálatok során frissen palackozott természetes ásványvizet, a vizsgált vízből izolált mikrobával beoltott vizet és kereskedelmi forgalomban kapható, eltérő palackozási helyű és idejű ásványvizet az ASTM D4169-es szabvány vibrációs protokollja szerinti mindhárom intenzitáson véletlenszerű rezgésnek tettem ki, modellezve a nyergesvontató-félpótkocsi szerelvényeken való közúti szállítást. Vizsgáltam a mikrobiom fajlagos szaporodási sebességét, a generációs időt, valamint az elért maximális sejtszámot. A sejtszám meghatározásához hagyományos tenyésztéses módszert és qPCR technikát alkalmaztam.

Az időgyorsított mechanikus rázkódás gyorsítja mind az autochton, mind az allochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességét, a hatás pedig függ az agitáció intenzitásától. Az allochton fajok számának növekedése a palackozott ásványvízben egyértelműen káros a fogyasztók egészségére. Különbséget tapasztaltam a természetes ásványvízben, illetve az inokulált vízben lévő mikrobák szaporodásában és az elért sejtszámokban, amire a mikroorganizmusok közötti kölcsönhatás adhat

magyarázatot. Különböző palackozási helyű és idejű vizek esetén a fajlagos szaporodási sebesség vizenként és intenzitásonként is szignifikánsan változott, ami igazolja, hogy az adott víznyerőhely mikrobiomjának összetétele, illetve a mikrobák közötti kölcsönhatás befolyásolja a mechanikai behatásra adott válaszokat.

A dinamikus mechanikai rázkódás hatással van az ásványvíz mikrobiomjára, befolyásolva annak szaporodási sebességét, illetve generációs idejét. Az általam alkalmazott vizsgálati protokoll lehetővé teszi a sejtszámban bekövetkező változások qPCR-rel való nyomkövetését. Az ASTM D-4169-16 szabvány szerint végzett, időgyorsított módszer mindhárom intenzitása alkalmas a valós időben végbemenő mechanikai agitáció mikrobiomra gyakorolt hatásának modellezésére.



**ABSTRACT****The effect of physical demands of supply chains on the microbiological quality of bottled natural mineral waters**

Microbiological status and stability are important to mineral waters due to increased global demand. An increase in distribution and supply chains has led to prolonged periods of transportation causing microbiological changes. Different types of mineral water were tested. The water samples were exposed to random vibration using ASTM (D4169) Truck Level I, II and III standard vibration protocol for truck transportation with time-accelerated and real-time tests. After agitation, their microbiological status was determined with traditional culturing and qPCR techniques.

Time-accelerated mechanical shaking increased the specific growth rate of both autochthonous and allochthonous microbes, and the effect depended on the intensity of agitation. The increase in cell number of allochthonous species in bottled mineral waters was potentially harmful to the health of consumers. In the case of waters with different bottling locations and times, the specific growth rate varied significantly for each water and for each intensity, indicating that the microbial composition of the given water source and the interaction between microbes influenced the responses to mechanical impact.

Dynamic mechanical vibration affected the microbiome of mineral waters, influencing reproduction rates and generation times. The applied test protocol enabled the monitoring of changes in cell numbers by qPCR. All three intensities of the time-accelerated method performed

---

ABSTRACT

---

according to the ASTM D-4169-16 standard were suitable for modeling the effects of real-time mechanical agitation on microbiome.

## 1 BEVEZETÉS

A globális szállítási láncok napjainkra a világ minden pontjára eljuttatják a palackozott ásványvizet, így azok már nem csak a palackozás közvetlen környezetében kerülnek értékesítésre. Az elmúlt évtizedekben szignifikáns növekedés volt megfigyelhető az ásványvízfogyasztás területén nem csak Magyarországon (Varga, 2011; Sipos, 2008), hanem az egész világon (URL<sup>1</sup>, URL<sup>2</sup>, URL<sup>3</sup>). 2014 és 2017 között a palackozott víz globális piaca évi 9%-os növekedést követően több mint 200 milliárd dollárra nőtt - derül ki a The Business Research Company palackozott víz piacáról szóló jelentéséből. (URL<sup>9</sup>) Mennyiségét tekintve a piac 100 milliárd literrel nőtt. A palackozott víz piacára vonatkozó előrejelzések az eladások értékét tekintve a piac 2021-re mintegy 350 milliárd dollárt fog elérni, 10%-os éves növekedést követően. A mennyiség növekedése valamivel alacsonyabb, de nem jelentős mértékben, 9,3 % lesz. Ez a növekvő piac valószínűleg tükrözi a lakosságnak a csapvíz minőségével kapcsolatos szkepticizmusát (Venieri et al., 2006), mely visszavezethető a városi vízellátás gyakori szennyeződésére (bár ez hazánkban nem releváns), a csapvíz kellemetlen ízére és szagára, valamint a víz fluorid- és klór-tartalmára (Bharath et al., 2003). Ugyanakkor meg kell azt is jegyeznünk, hogy sok esetben az egészségügyi dolgozók javaslatára fogyasztanak csapvíz helyett ásványvizet az emberek.

Víz nélkül nincs élet és csak az édesvíz alkalmas emberi fogyasztásra. Élelem nélkül hetekig is életben maradhat az ember, de a szervezet 15%-

os vízvesztesége néhány napon belül halált okoz. Ebből is következik, hogy a víz létfontosságú az ember számára. A felnőtt emberek testének átlagosan 60-70%-a víz (csecsemőknél kb. 80% körüli, idős korban már csak körülbelül 50%). Egy ember évente több, mint 1000 liter folyadékot megiszik, a veséken pedig naponta mintegy 2000 liter testnedv folyik át. Mindennapi körülmények között naponta átlagosan 2,4 liter folyadék távozik a felnőttek szervezetéből a verejtékezés, légzés, kiválasztás és emésztés során. A folyadékháztartás egyensúlyának fenntartásához szükséges víz mennyisége egyénenként változó, és a testmozgás, a szervezet működése, a környezeti feltételek (hőmérséklet, páratartalom) függvénye. (Maton et al., 1993)

## **1.1 CÉLKITŰZÉS**

Kutatásom célja a szállítás közben fellépő mechanikai igénybevételek ásványvízre gyakorolt hatásának vizsgálata. Már eddig is tapasztalták, hogy a rázkódás sok esetben negatívan befolyásolja az élelmiszerek fiziko-kémiai tulajdonságait, amelyek az alacsony viszkozitású mátrixok esetében (mint amilyen a víz is) fizikailag nem látható elváltozásokban nyilvánulnak meg. Ezért egy észak-nyugat magyarországi természetes ásványvizet palackozó üzem gyártósoráról lekerült termékek szállítási igénybevételektől függő mikrobiológiai státuszát vizsgáltam. Célom az, hogy az ásványvízből kimutatható mikrobaszám és a mechanikai agitáció, illetve annak intenzitása között összefüggést keressek.

Célul tűztem ki különböző palackozási helyű és idejű, kereskedelmi forgalomban kapható ásványvizeknek a mechanikai igénybevételtől függő összehasonlító vizsgálatát.

Kutatásom további célja annak feltárása volt, hogy a logisztikában általánosan elterjedt csomagolásvizsgálati szabványt alkalmazhatjuk-e az élelmiszerek mikrobiológiai tulajdonságaiban bekövetkező változások vizsgálatához. Ehhez a valós idejű és az időgyorsított vizsgálatok összehasonlítását végeztem el.

## 2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1 CSOMAGOLÁS

#### 2.1.1 A csomagolás fogalma és alapvető funkciói

A csomagolás mindig is az életünk része volt, egészen a legegyszerűbb időszámítás előtti vadászat során alkalmazott eszközöktől (például a hús védelmére alkalmazott növényi eredetű takaró-csomagoló levelektől), a mai speciális célokkal ellátott csomagolásokig. (Hook és Heimlich, 2005) A csomagolás magába foglalja a csomagoló anyagot, a csomagolás folyamatát és az elkészült struktúrát. A csomagolást a következők szerint lehet meghatározni: „a csomagolás azoknak a műveleteknek az összessége, amelyeknek alapvető célja a termékek védelme ill. szállításra, tárolásra alkalmassá tétele, egységbe fogása. Másik értelmezése szerint a csomagolás a termék és az egységbe fogó elemcsoport, ill. ideiglenes védőburkolat komplex egysége.” (Rockstroh, 1979) A csomagolás vagy a termelési folyamat befejező része (pl. vaj csomagolása), vagy a termelési folyamatától el nem határolható művelet (pl. dobozos üdítők, sör, ásványvíz). A csomagolásnak elsődleges feladata a termék befogadása, illetve a fogyasztóhoz való eljuttatása úgy, hogy az külső vagy belső károsodást ne szenvedjen és mindezt a lehető leggazdaságosabb módon. Fontos még, hogy azonosíthatóvá tegye a terméket és megkönnyítse a szállítást, illetve a tárolást. Paine (1981) a hangsúlyt az alapvető funkciók esetében a védelemre, tárolásra, állagmegőrzésre és a termékkel kapcsolatos kommunikációra helyezi. A csomagolás azonban nem csak a terméket védi a környezeti hatásoktól, hanem a környezetet is a terméktől.

A csomagolás további fontos funkciója lehet az egységképzés és a termékek kívánatos mennyiségekre való felosztása. (Hellström and Saghir, 2007)

A csomagolás a kereskedelem lényeges eleme, amely szoros egységet képez az áruval. A jó csomagolás jó minőségű és minőségvédő, megfelel az egészségvédelmi szempontoknak, alkalmas az elosztásra, a gépi árumozgatásra, megfelel az ökológiai profilnak, társadalmilag elfogadott módon újrahasznosítható vagy elhelyezhető, környezetkímélő, gazdaságos, a vásárlók számára biztosítja a termékazonosítást, megteremti a piacon az áru imázsát, problémamentesen kezelhető, vevőbarát. (Zsombik, 2011; Soroka, 2009)

A csomagolás a logisztikai rendszer jelentős eleme (Stock and Lambert, 2001), hatással van a logisztikai költségre és teljesítményre is, különösen a szállítmányozás vagy a raktározás területén. (Twede, 1992; Bowersox et al., 2012)

### **2.1.2 Műanyag csomagolószerek**

A csomagolási célú anyagokon belül a műanyagok jelentik a leggyorsabban fejlődő csoportot, felhasználásuk a fejlett országokban folyamatosan nő. Széles körű csomagolástechnikai felhasználásuk több kedvező tulajdonságukkal indokolható: kis tömegű, változatos jellemzőkkel állítható elő és mindenféle formájú és funkciójú csomagolóeszköz készíthető belőle. A műanyagok az 1800-as évek végén jelentek meg először, alapvetően két nagy csoportra oszthatók:

- természetes alapú műanyagok és
- szintetikus műanyagok.

A természetes műanyagok előállításához a természetben előforduló, nagy molekulájú (például szénhidrát, fehérje) anyagokat alakítják át kémiai eljárással. A kismolekulájú vegyületekből, a molekulák összekapcsolásával létrehozott új anyagok a szintetikus műanyagok. Napjainkban a természetes alapú műanyagok a kedvezőtlen feldolgozási jellemzőik és viszonylag magas előállítási költségük miatt folyamatosan veszítenek jelentőségükből.

A szintetikus csomagolási célú műanyagok az alábbiak:

- poliolefin
- polietilén
- polipropilén
- klórtartalmú polimerek
- poliészter
- polisztirol
- poliamid
- polivinil-alkohol
- polietilén-vinil-alkohol
- poliuretán

Dolgozatom szempontjából a poliészternek és a poliolefinnek, ezen belül a kis sűrűségű polietilénnek (LDPE) van jelentősége.

A polietilén-tereftalát (PET) egy széles körben használt palackcsomagoló polimer. A legtöbb PET-palackot vízhez és italokhoz használják, de egyéb felhasználási területek közé tartoznak az olajok, ecet, mosószerek és háztartási vegyszerek. A PET-palackok népszerűsége optikai átlátszóságuknak, mérsékelt vízgőzáteresztő képességüknek, valamint alacsony oxigén- és szén-dioxid-gázáteresztő képességüknek köszönhető. (Chacon et al., 2020) Fóliaként önmagában vagy polietilénnel társítva például sajtok, húsok, készételek esetében használják. Az egyik legheőállóbb műanyag,  $-50\text{ °C}$  és  $+160\text{ °C}$  közötti hőtűrőképességgel. A



---

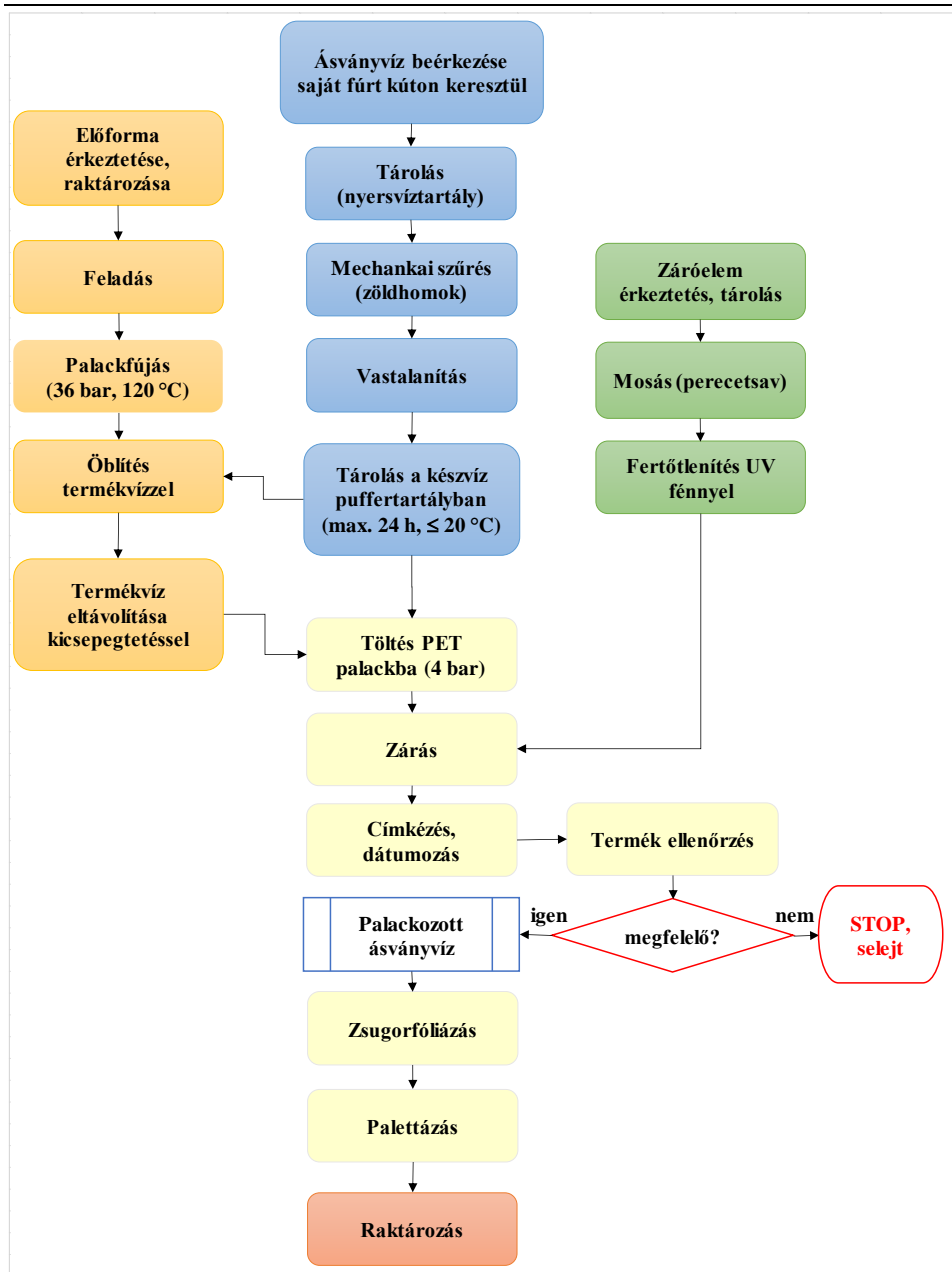
„visszaváltható vagy eldobható” kérdés egyidős a PET palackok megjelenésével. A többutas palackok magasabb követelményeket támasztanak mind a technológiával, mind az alapanyaggal szemben, mivel a visszaváltható palackok mechanikai jellemzői meg kell, hogy közelítsék az üvegpalackokét. Ez utóbbiak esetében a csomagolóeszköz élettartama legalább 15-20 újratöltésig tart, ehhez pedig megfelelő falvastagságra és rendkívüli kopásállóságra van szükség. A technológiai fejlesztések lehetővé tették a többszöri használathoz szükséges szilárdság elérését, azonban a felületen idővel megjelenő karcolások bizonytalanságot kelthetnek a fogyasztókban. Ezen kívül a szabad szemmel nem látható sérülések miatt az újratöltés előtti ellenőrzés során a palackok jelentős hányada selejtezésre kerül, mivel nem felel meg a minőségi követelményeknek. További problémát okoz annak megállapítása, hogy a visszaváltást megelőzően esetleg volt-e olyan anyag a palackban, ami az emberi egészségre ártalmas lehet (például vegyszerek, benzin, olaj, alkohol, stb.). A PET palackok rossz hatásfokú újratöltése mára oda vezetett, hogy a cégek többsége megszüntette a visszaváltható palackos termékek forgalmazását. A fejlesztés már elsősorban a csomagolóeszköz tömegének csökkentésére irányul. Ez nem csupán anyagmegtakarítást eredményez, hanem a szállítási költség mérséklését is. A poliolefiének a legjelentősebb és legnagyobb mennyiségben gyártott a hőre lágyuló műanyagok. Két csoportja van: a polietilén és a polipropilén. Kis sűrűségű polietilénből (LDPE) hajlékony falú csomagolószereket, például tasakokat, zsákokat, zsugor- és nyújtható fóliát, valamint tubusokat és merev falú flakonokat készítenek. A legdinamikusabban fejlődő felhasználási területe a zsugorfólia, amelynek

legnagyobb felhasználói az italgyártók. Ezért a PET-palackok, fém dobozok és a karton tartalmú italos dobozok gyűjtőcsomagolására jelent egyszerű és gazdaságos megoldást. (Tiefbrunner, 2010)

### **2.1.3 A palackozás technológiája egy északnyugat-magyarországi palackozónál**

A palackozás folyamatát a 1. ábra mutatja be, melynek első lépése a palackfűjás. A folyamat során az előformákat szállítószalag, valamint rendező eszköz segítségével juttatják a berendezésbe. A fűvógép nagy nyomással a szerszám falához préseli az előformát, kialakítva a kívánt formát. A fűjás 36 bar nyomáson, 120 °C-on történik, amely paraméterek egyben biztosítják a palack belső felületének mikrobiológiai, higiéniai megfelelőségét. Ezután a kifűjt palackok légpályán jutnak a palacktöltő berendezésig. A légpályán érkező üres palackok első lépcsőben egy öblítő gépbe kerülnek, amely termékvízzel öblíti ki őket az esetleges szilárd szennyeződések eltávolítására. A második szakaszban a palackok nyílással lefele helyezkednek el, így kicsepeghet belőlük az összes öblítővíz. Az öblítőgép után a szállítópálya az ellennyomásos töltő-zárógéphez szállítja a palackokat, ahol 4 bar nyomással megtörténik azok töltése. A szállítópálya rendszer automatikus, PLC (programmable logic controller – programozható logikai vezérlés) vezérlésű. A beállított térfogatnak megfelelő nivå elérésekor a szelep elzár.

Az ellennyomásos töltőgép utolsó gépeleme a zárógép, amely megfelelő nyitási nyomatékú zárást biztosító fertőtlenített (perecetsavas mosás és UV fény) műanyag kupakkal (HDPE – high density polyethylene) zárja le a palackokat.



1. ábra: A természetes, szénsavmentes ásványvíz palackozásának lehetséges technológiai megoldása

A töltés után a szállítópályán elhelyezett késztermék vizsgáló ellenőrzi a megfelelő térfogat meglétét a palackban. A selejt termékeket egy kilökö a gyűjtő asztalra továbbítja.

A megtöltött palackok száraz kenésű szállítószalagokon jut el a címkéző berendezésig. Itt magas hőmérsékletű gőzzel zsugorítják a palackokra a címkét. A címkéző gép kimeneti oldala után a palackpályán sugaras feliratozó berendezés az aktuális gyártási dátumot rögzíti a palackokon. A felcímkézett palackokat ezután az egységcsomagoló-készítő zsugorfóliázóhoz szállítják. A zsugorfóliázó berendezés először kialakítja a megfelelő palackszámú egységcsomagot, majd egy hőre zsugorodó műanyag fóliát teker a csomag köré. A körbefóliázott csomag egy hőalagúton áthaladva nyeri el végső formáját. A gépegység után egy hordfűzőbe, majd egy csomagszállító pályán a rakatok a palettákhoz jutnak. Raklapszállító pályák szállítják a targonca leszedő helyre a rakományt. Mielőtt a végső asztalhoz érne, egy sztreccs fóliázó berendezés nyújtható fóliával többszörösen körbecsévéli a palettát, így biztosítva az áru szállítás közbeni stabilitását és az esetleges apróbb sérülések elkerülését.

Egy palack gyártási idejét tekintve mintegy 6 perc telik el az előforma feladásától a késztermék palettázásáig.

## **2.2 A CSOMAGOLT ÁRUKAT A LOGISZTIKÁBAN ÉRŐ HATÁSOK**

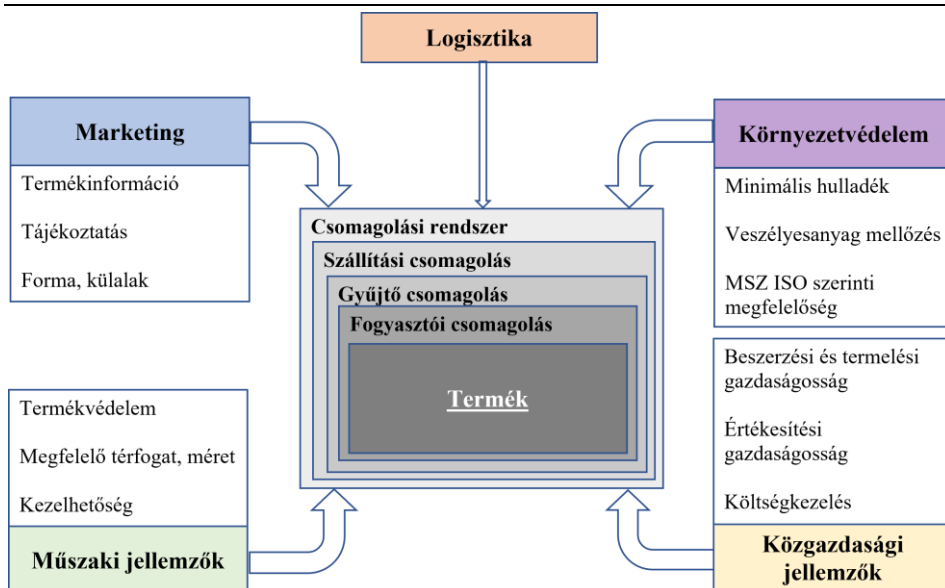
A csomagolás a logisztikai rendszerek részeként folyamatosan végig követi, segíti és kiegészíti a térben és időben lezajló folyamatokat.

A csomagolási rendszerek megtervezése - a bonyolultságára való tekintettel - „hagyományos mérnöki” eljárásokkal csak igen durva

közelítéssel lehetséges. Emiatt sokkal pontosabb eredményt ad a logisztikában fellépő hatások reprodukálható szimulálása különböző laboratóriumokban. Az integrált csomagolási rendszer az alábbi feladatokat és célokat foglalja magába a logisztikában (2. ábra):

- termékvédelem (károsodás-, dezsmálás elleni védelem, biztonság),
- termékminőség megőrzése,
- kezelhetőség (megfelelő térfogat/méret, gépesíthetőség),
- logisztikai termékinformáció, információáramlás,
- a tárolás ésszerűsítése,
- marketing feladatok (külalak, formatervezés),
- környezetvédelem (könnyű eltávolíthatóság és megsemmisíthetőség).

(Böröcz, 2010)



**2. ábra:** A logisztikai csomagolási rendszer elvi sémája (Forrás: Böröcz, 2010 alapján saját szerkesztés)

A második világháborút követő tömegtermelés és világpiaci értékesítési hálózatok megjelenése során egyre fontosabb szerepet kapott a disztribúciós folyamatok mérnöki szempontú vizsgálata is. A 1960-as évektől egyre több adat állt rendelkezésre a logisztikai szakemberek csomagolástervezési folyamatához, amely addig tisztán empirikusnak volt tekinthető. A változás oka az volt, hogy ha nem is termékenként, de ipari ágazatonként egyre több szakterület definiálta, hogy a szállított árukat milyen fizikai (mechanikai), kémiai és biológiai környezeti hatások érhetik. Később ezek számos iparági (pl. IEC - International Electrical Commission) és nemzetközi szabványban (ISO - International Organization for Standardization, ASTM - American Society for Testing and Materials) kerültek meghatározásra. Ezek a szabványok elsősorban abból indultak ki, hogy a felmerülő hatások matematikai, mechanikai és

fizikai paraméterekkel csak nagyon nehezen írhatók le, ezért a szállított árukhoz laboratóriumi tesztek definiáltak, megadva az igénybevételek nagyságrendjének lehetséges spektrumát.

A becsomagolt terméket a logisztikai folyamatok során érő külső hatásokat igénybevételeknek nevezünk. A különböző igénybevételek különféle formában, intenzitással és kombináltan érvényesülnek. Ezek a hatások a termék mennyiségi és/vagy minőségi károsodásához vezethetnek. Élelmiszerek esetén a minőségcsökkenésnek óriási jelentősége van, hiszen a termék érzékszervi, táplálkozásbiológiai tulajdonságain túl, akár annak biztonságosságát is érintheti. A csomagolást érő igénybevételek csoportosítását az 1. táblázat tartalmazza.

**1. táblázat:** A logisztikában a csomagolt terméket érő hatások

<b>Igénybevétel</b>			
<b><i>Mechanikus</i></b>		<b><i>Klimatikus</i></b>	<b><i>Biológiai</i></b>
Statikus	Dinamikus	hőmérséklet	kártevők jelenléte és
nyomás	rázás	csapadék	tevékenység
	ejtés	légnomás	mikroorganizmusok
	ütés	légmozgás	szaporodása
	ütközés	napsugárzás	
		légnedvesség	

(Forrás: Tiefbrunner, 2010 alapján saját szerk.)

A csomagolásnak jó minőségűnek és elég erősnek kell lennie ahhoz, hogy ellenálljon azoknak az igénybevételeknek, ütődéseknek, amelyeknek rendes körülmények között a szállítás során, az áruszállító

egységek közötti átrakás, az áruszállító egységekből a raktárba való berakodás során ki van téve, illetve amelyek akkor léphetnek fel, amikor további kézi vagy gépi árukezelés céljából a rakodólapról, vagy az egyesítő csomagolásból eltávolítják.

### 2.2.1 A disztribúció során fellépő főbb dinamikus hatások

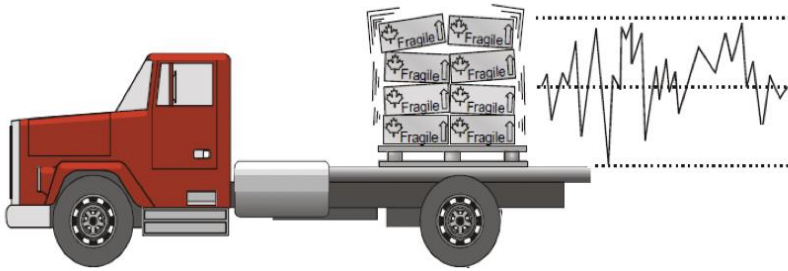
Az áruk disztribúciója során számos mechanikai igénybevétel éri a szállított termékeket. Ezek a mechanikai feltételek az 2. táblázat szerint osztályozhatók. Az értekezésemhez kötődő kutatásaim és méréseim során az egyes vizsgálatsorozatokban a véletlenszerű mechanikai rázkódást (Stacionárius rezgés, random) szimuláltam laboratóriumi körülmények között a kiválasztott termékeken.

**2. táblázat:** Mechanikus igénybevételek osztályozása

Környezeti jellemző	Mértékegység
Stacionárius rezgés, szinuszos	Kitérés és gyorsulási amplitúdó (mm, $m/s^2$ )
Stacionárius rezgés, random	Spektrális gyorsulássűrűség frekvenciasáv ( $m^2/s^4/Hz$ v. $g^2/Hz$ )
Nem stacionárius rezgés	Csúcsgyorsulás ( $m/s^2$ )
Leesés, felborulás	Esési magasság (m)
Ringás, bukdácsolás	Szög (fok), periódus (s)
Állandó gyorsulás	$m/s^2$

Az 3. ábrán egy pálya-jármű-rakomány rázkódásának leírásához szükséges rendszer elvi elemei és sémája látható. Az értekezésemben a kutatáshoz közüti szállítási láncokat feltételeztem, mivel a választott mintatermékeim elsősorban közúton, tehergépjárművel kerülnek továbbításra.





**3. ábra:** A pálya-jármű-rakomány rendszer sematikus rendszermodellje

### 2.2.1.1 A pálya, mint a rázóigénybevételt befolyásoló tényező

A közúti közlekedés során különféle úttípusokkal és burkolatokkal találkozunk, melyek jellemzői és állapota alapvetően befolyásolja a futásbiztonságot.

Az útburkolat egyenetlenségeit a 4. ábrán látható profilográf műszerrel folyamatosan mérik (McMahon, 2022). Ezen mérések eredményei alapján intézkednek a szükséges javítások ügyében. (Fi és Szentpéteri, 2014; Barbosa, 2012; Adorjáni, 2010; Maser, 2010; Bornemissza és mtsai, 2008)



**4. ábra:** Profilográf (URL<sup>6</sup>)

Az útfelület egyenetlenségeit úgy írhatjuk le, hogy a szabályos sík felülettől milyen jellemző mértékkel tér el (Karoliny és Gáspár, 2015),

---

amelyek befolyásolják a járműdinamikát, a közlekedés minőségét és a vízelvezetést. (Soós és mtsai, 2017; Tóth és Tóth, 2017; Pálfay, 2004) A jellemző paraméterek: a hosszirányú profil, a keresztirányú profil és a keresztirányú esés. A hosszirányú profilban fontos a hosszirányú eltérések hullámhossza (vízszintes távolság az eltérések között) és az eltérések függőleges magassága. Az egyenetlenség az útfelület elhasználódása során folyamatosan nő. Ezek a fáradás miatti repedések hossz- és keresztirányban, a bordázódás és feltorlódás. A profilográfus mérésekkel az útfelület elhasználódása, annak időbeli üteme nyomon követhető. (Fi és Szentpéteri, 2014; Horak, 1987; Bruscella et al., 1999) A jellemző úthibák az alábbiak lehetnek (Kamarán, 2008):

- kátyú, pontatlan kátyúzás,
- alakváltozás (deformáció, torzulás),
- egyenetlen pályafelület (hullámosság, egyenetlenség, amorf deformáció keréknyomokban) (Primusz, Tóth, 2009),
- keréknyom (vályúképződés, nyomvályú, kis sugarú keréknyom, nagy sugarú keréknyom),
- gyűrődés (hullámosodás),
- a pályaszerkezet süllyedése,
- repedés (törés),
- hajszálrepedés (hosszanti fáradásos repedés)
- mozaikos repedés,
- burkolat szélének letörése,
- keresztirányú repedés (reflexiós repedés),
- szabálytalan irányú repedés (útrepedés, vonalrepedés),
- összedolgozási hiba,

- bomlás,
- hámlás (tányérosodás),
- leválás,
- az érdesség lecsökkenése (kisimulás),
- érdesítő kipergése,
- nyitott felület (szivacsos felület),
- belterületi utakon szinthibásan kiképzett közműcsatorna fedelek.

### *2.2.1.2 A gépjármű, mint a rázóigénybevételt befolyásoló tényező*

Az európai távolsági szállításokra (fuvarozásokra) túlnyomórészt nyergesvontató-félpótkocsi szerelvényeket használnak (Röbisch, 2015), melyek jellemzően kéttengelyes vontatóból és a háromtengelyes utánfutóból (5. ábra) állnak.

Fontos tényező mind a vontató, mind a vontatott jármű esetén alkalmazott légrugó típusa. A légrugó karakterisztikája (a nyomóerő és az elmozdulás függvénye) eltér a hagyományos rugóktól és a benne lévő nyomás változtatásával akár menet közben is lehet a jellemzőit (pl. adott terheléshez tartozó kiemelést) változtatni. (Kőfalusi, 2014) A rezgést a jármű kapcsán a következő változók befolyásolják: a jármű felépítése és tömege, a lengéscsillapítók típusa, a rakomány tömege és a jármű menetsebessége.



**5. ábra:** Európai kamion: nyergesvontató és félpótkocsi (Forrás: URL<sup>7</sup>)

### *2.2.1.3 A rakomány, mint a rázóigénybevételt befolyásoló tényező*

A szállításra előkészített rakományok részben egyedi árudarabok, részben egység rakományképző eszközön mozgatható rakományegységek. A rakományok menet közbeni elmozdulását lekötéssel vagy alakzárással lehet megelőzni.

A lekötéssel való rögzítés esetén a rakomány együtt mozog a félpótkocsi rakfelületével. Rezgésvizsgálati szempontból feltételezhető, hogy az így rögzített rakomány követi a rakfelület rezgési viszonyait, az utánfutó felépítményével egy egységet képez. Elvileg a rakfelület rezgései megegyeznek a rakományegység rezgésével. A rakományegységen belül, a termékek fajtájuk és párnázásuk függvényében reagálnak erre az input gerjesztésre. Fontos megjegyezni, hogy ebben az esetben a rakományegység nem válik el a félpótkocsi rakfelületéről, azaz a rakomány nem tud „ugrálni”.

Az alakzárással történő rögzítést olyan esetben alkalmazzák, amikor a rakományegység nem tudja elviselni a függőleges leköötő erőt. Ilyen esetekben keresztrudakkal, felfűzhető köztes távtartókkal, pótfalakkal történhet az elválasztás. Rezgéstani szempontból ilyenkor szabadon

állnak a rakományok, tehát nem képeznek egy lengőrendszert a félpótkocsi felépítményével (Wang and Wang, 2017; Wang et al., 2014; Wang et al., 2012b; Wang et al., 2011; Wang and Wang, 2011)

## **2.2.2 A valós rázkódások laboratóriumi szimulációja**

A közúti járművek rezgéseinek vizsgálata több évtizedes múltra tekint vissza, és bár a kezdeti szimulációs módszereket jelentősen továbbfejlesztették, a jelenlegi módszerek is jelentős korlátokkal rendelkeznek. E hátrány ellenére a Gauss-i PSD -alapú (PSD: power spectral density) módszer széles körben alkalmazott maradt napjainkban a közúti közlekedési rezgések szimulálására, főleg azért, mert a legtöbb nemzetközi szabvány ezt javasolja.

### *2.2.2.1 Szabványosított módszerek*

Az első tesztberendezés úgy működött, hogy a tesztasztal alatt excenteres bütyköt helyeztek el, amelyet különböző fordulatszámmal forgattak és ezzel állították elő a különböző frekvenciákat. Az asztal a négy sarkán vezetve volt, hogy csak függőleges mozgást tudjon végezni. Az eszköz egyszerű volt. Ha a bütykök elég gyorsan forogtak, az asztal elvált a bütyöktől minden fordulatnál, mellyel ismétlődő ütések hozott létre, amint azt leírják az ASTM D999-08-as szabványban. A módszert napjainkban is használják, annak ellenére, hogy ismétlődő ütések hoz létre valódi vibrációk helyett. Ezért Kipp (2000a) óvatosságra int a vizsgálatból történő következtetésekkel kapcsolatban.

A mérési módszerek fejlődésének természetes útja volt, hogy egy frekvenciájú vibrációt alkalmazzanak, hogy az ütés jellegű eseményeket

elkerüljék, amint különböző szabványokban (ASTM, BSI, ISO IEC, MIL-STD) is leírtak. A gerjesztő jel ennél a módszernél a sinusos gerjesztési frekvencia pásztázásával történik. Ez a módszer nem reprodukálja a közúti gerjesztés véletlenszerűségét (Mahajerin és Burgess, 2010), ezért ezeket a szabványokat inkább vizsgálati vagy tervezési eszköznek javasolják. (Kipp, 2008; Kipp, 2000a; Kipp, 2000b; Kipp, 2001)

Ezen módszerek korlátjai vezettek a véletlenszerű vibráció alkalmazásához, mint a szabványos közúti vibrációt tesztelő módszer, az 1980-as évek elején. Ezek az eljárások véletlenszerű Gauss vibrációt alkalmaznak különböző teljesítmény-sűrűség spektrummal (PSD), amelyek a különböző járműtípusokat reprezentálják. (Charles, 1993) Ezek a PSD-k megszerezhetők a járművek mérésével, az út vizsgálatával, és dinamikus járműmodellekkel. Rouillard és Sek (2013, 2002) azonban megállapítja, hogy a jármű mérésén alapuló PSD-k jobb eredményt adnak, mivel nincs szükség hozzá modell-approximációra. A módszer előnye a vizsgálati idő lerövidítése a szimuláció intenzitásának növelésével. A kapcsolat az aktuális és a tesztbeni hossz között megadható a Basquin modellel (1)-es képlet (Basquin, 1910):

$$\frac{t_j}{t_t} = \left( \frac{a_t}{a_j} \right)^k \quad (1)$$

ahol

$t_t$ : a teszt hossza,

$t_j$ : az adott út hossza,

$a_t$ : a teszt intenzitás,

$a_j$ : az adott út intenzitása,

$k$ : a vizsgált anyagtól/terméktől függő konstans, általában  $k=2$  vagy  $k=5$ -öt használnak (Braumiller et al., 1999).

A szimulációnak reprodukálni kell a közúti jármű által okozott különböző ütések és rázásokat. Ilyenek többek között a vibrációk az út egyenetlensége miatt, az útfelület hibái miatt (repedések, kátyúk, stb.) és a jármű meghajtása miatt (kerekek, motor, hajtás, stb.). (Root, 1997)

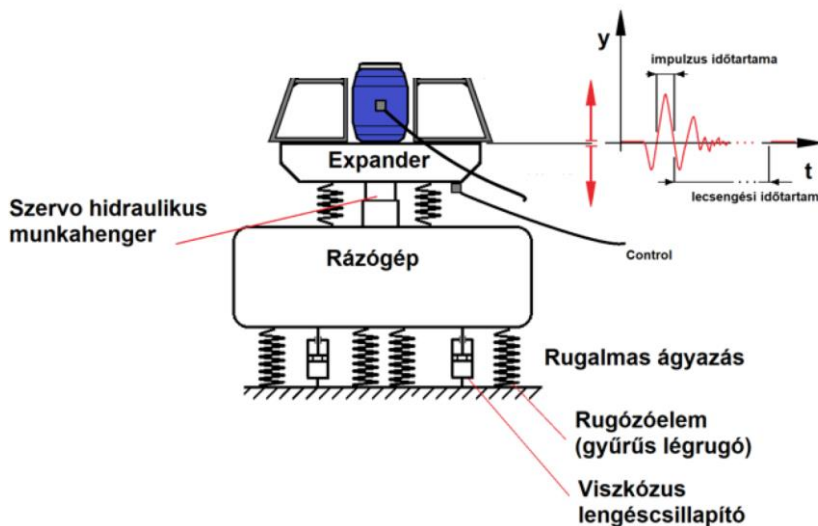
Az elmúlt 50 évben a járművek rezgésének laboratóriumi szimulációja rohamosan fejlődött az egyszerű mechanikai berendezésektől a számítógép által vezérelt rázóasztalokig. (Harris and Piersol, 2001) Ugyanakkor még a legkorszerűbb modellezésre is jellemző, hogy a jármű rakfelületét merev testnek tekintik, holott a tartós rezgések hatására a rakfelületek kisebb–nagyobb mértékben csavaró és hajlító alakváltozást is elszenved, azaz rugalmas testként viselkedik. (Kőfalusi, 2014; Lu et al., 2010) Ehhez adódnak hozzá a különböző tartós és nagyon alacsony frekvenciájú mozgások, melyek az ívben haladásból, a bólintásból, fékezésből, gyorsításból, valamint a lejtő-emelkedő átmenetekből keletkeznek (Kőfalvi, 2010), melyek szinte modellezhetetlenek. Az elméleti számítások, különösen azok, amelyeket „papíron” számítógép segítségével nélkül végzünk, általában a két szabadságfokú rezgőrendszerig terjed ki, holott a jármű rakfelülete egy hat szabadsági fokkal rendelkező rezgőrendszer. Éppen ezért az elméleti számítások mellett (ami jelentős egyszerűsítésekre kényszerül, a valós rendszerhez képest) laboratóriumi szimulációt is alkalmaznak a rakományok tervezésekor. (Böröcz et al., 2015) A dinamikai igénybevételek szimulációja azonban számos problémát felvet. Amellett, hogy merev testként kezeli a jármű

rakfelületét, a térbeli mozgásrendszert sem tudja egyidejűleg előállítani. A szuperpozíció elvét alkalmazva a függőleges-, a hossz- és keresztirányú rezgésekre viszont nem teljesen a valós mozgást kapjuk vissza. (Charles, 1993)

A disztribúció során a szállítási folyamatok közben a tartós rázási igénybevételek elkerülhetetlenek, melynek szintjeit világszerte több publikáció tanulmányozta. (Paternoster et al., 2018a) A termékcsomagolás rendszerekre ható rázási igénybevétel a pálya egyenetlenségeiből, a járművekben lévő, forgómozgást végző kiegyenlítő tömegekből, a jármű rugózási rendszeréből, és a pályántartás tulajdonságaiból együttesen adódnak. (Jarimopas et al., 2005; Lu et al., 2008; Pánczél, 2009) A rakfelületen mérhető mozgások véletlenszerűek, ami azt jelenti, hogy időben mind a rezgés frekvencia-, mind az amplitúdó-összetétele erősen változik. A rezgések nyilvánvalóan a tér három irányában (hossz, oldal és függőleges irányokban) fellépnek, de ki kell emelni, hogy ezek a közül a pályaegyenletlenség által gerjesztett függőleges irányú mozgás a legintenzívebb. (Brandenburg, Lee, 1985)

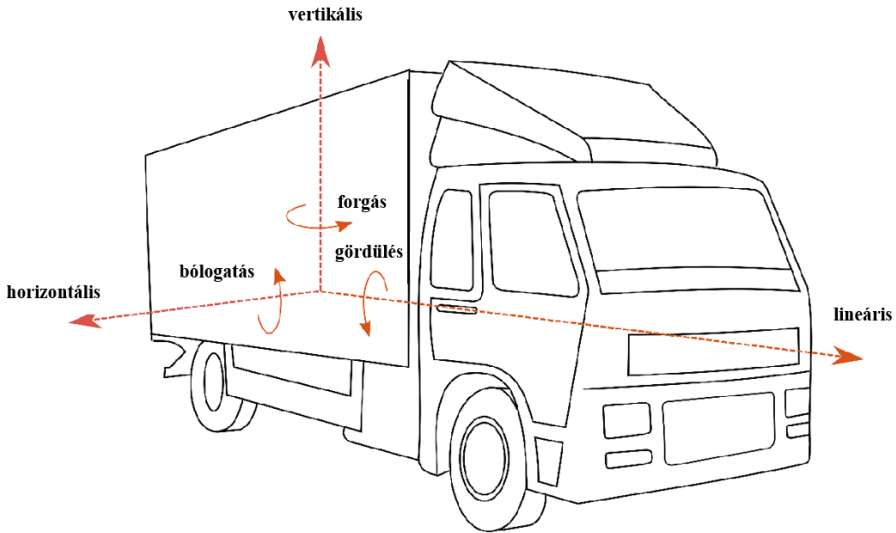
A sztochasztikus rezgések előállítására külön kontrollegység szolgál. Egy ilyen rendszer elvi sémája látható a 6. ábrán, ahol a termék az ún. expander tárgyasztalon látható.





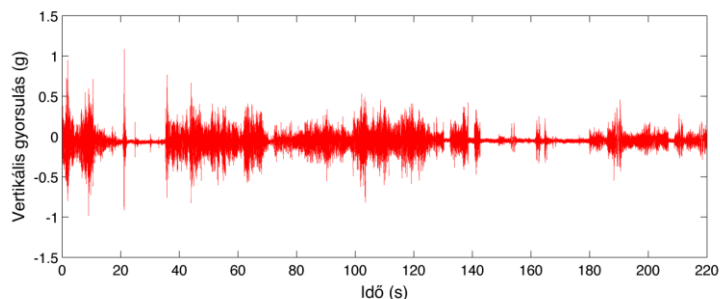
**6. ábra:** Egy szabadságfokú rázóvizsgálat elvi sémája

Ez a rázkódás alapvetően több szabadságfokú (7. ábra), melyek közül a valóságban a függőleges irányú rázkódás a legintenzívebb. A 8. ábrán egy valós szállítás során felmerülő vertikális irányban rögzített gyorsulásértékek sorozata látható az eltelt idő függvényében. Az ábrán jól megfigyelhető a jelsorozat random jellege és stacionaritása, amelyet a kiegyensúlyozatlan (jármű-rakomány) össztömeg eltérő mértékű csúcsgyorsulásai mutatnak a pályaeigenetlenség gerjesztésének válaszaként.



**7. ábra:** A rázkódások hat szabadságfokának irányai közötti tehergépkocsin (Forrás: Long, 2016. alapján saját szerkesztés)

A műszer által szolgáltatott adatok számítógéppel kiértékelhetők, mindemelllett tanulmányozható a rögzített gyorsulás-idő függvény is. A gyorsulás-idő függvényből FFT (gyors Fourier transzformáció) analízissel az egyes frekvenciasávokba eső PSD értékek is meghatározhatók. Nyilván a jármű különböző útviszonyok között halad ezért a gyorsulás-idő függvényben autókorrelációs függvény alkalmazásával a nem-stacionaritás is meghatározható.



**8. ábra:** Szállítás közben mért rezésgyorsulások a szállítási idő függvényében

### 2.2.2.2 Dinamikus mechanikai igénybevételek reprodukálása

A laboratóriumi vizsgálatok módszere, hogy a valóságban random módon lezajló mozgást szélessávú véletlenszerű rázóvizsgálattal reprodukálják a jelentős teljesítménnyel rendelkező 1-200 Hz frekvenciatartományban (Böröcz, Singh, 2017). A választott frekvenciatartomány oka, hogy itt található a jármű felfüggesztésének, kerekeinek és szerkezetének a legintenzívebb válaszrezgése. A szabványos vizsgálatok a véletlenszerű rezgések ún. spektrális teljesítménysűrűségét (PSD, power spectral density) adják meg, amely a véletlenszerűen és időben nem-stacionáriusan lezajló gyorsulásjelek (g) gyors Fourier-transzformációja (FFT) a vizsgált frekvenciatartományban. Így a PSD a mozgás jellemzőjét a mozgás teljesítményével,  $\text{g}^2/\text{Hz}$ -ben kifejezve, a frekvencia (Hz) függvényében adja meg (Brandenburg, Lee, 1985).

A spektrális sűrűségfüggvények meghatározásához gyors Fourier-transzformációt (FFT) alkalmaznak a gyakorlatban, amely azt jelenti, hogy az átlagos PD (power density, teljesítménysűrűség) szintet számolják ki, ahol RMS G (root mean square, négyzetes középérték) a

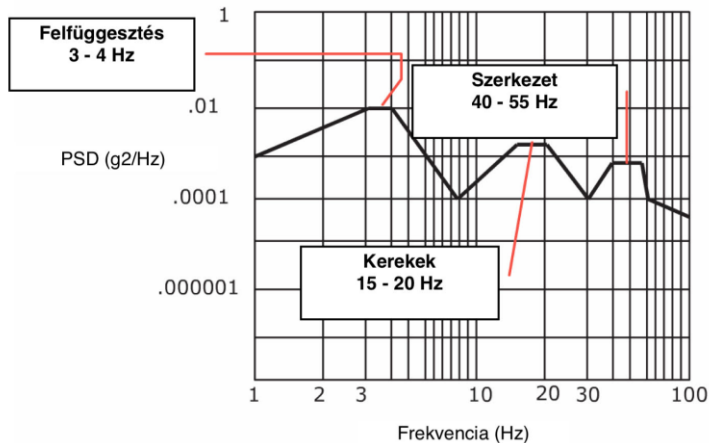
laboratóriumi szimuláció során mért gyorsulás értéke RMS-ben kifejezve, a BW (bandwidth, sáv szélesség) a vizsgált frekvenciatartomány, illetve N a felvett minták száma a mintavételezés során. Ezt követően egy zárt hurkú vezérléssel a rázóberendezés egy normális eloszlásból vett véletlenszerű következő jelre egy olyan sorozatjellel válaszol, amely RMS-ben kifejezett teljesítménye az adott frekvencián a burkológöbének megfelelő teljesítménnyel rendelkezik.

A rezgéselemzés esetében a teljesítménysűrűség (PD) szinteket a frekvencia függvényében határoztuk meg a rögzített véletlenszerű rezgés gyorsulási szintek alapján. Egy adott spektrum keskeny frekvenciasávján (BW) belüli átlagos teljesítménysűrűség az adott sáv szélesség mintáinak számán alapuló  $G_{rms}$  értékekkel határozható meg. Ily módon  $G_{rms}$ -t a gyorsulás négyzetes középértéke határozza meg  $G$ -kben az adott frekvencia-sáv szélességben, az (n) minták száma alapján:

$$PD = \frac{1}{BW} \sum_{i=1}^n (RMS G_i^2) / n \quad (\text{Yam, 2009})$$

A rezgési környezetet ezután a teljesítménysűrűség-spektrum (PSD) képviseli, amely a teljesítménysűrűségi szintek és a frekvencia ábrázolását mutatta. Egy adott frekvenciatartományon belüli energia a PSD-nek az adott frekvenciatartományba történő integrálásával nyerhető, és általában  $G_{rms}$ -ben van ábrázolva a spektrum egészére, vagy egy részére vonatkozóan. A PSD számítása közvetlenül a Fourier-transzformációnak nevezett módszerrel, vagy az autokorrelációs

függvény számításával, majd transzformálásával történik. A 9. ábra egy példát mutat a laprugós tehergépkocsi PSD-jére.



**9. ábra:** A nehéz tehergépkocsi rezgésének tipikus PSD-rajza (Singh et al., 2007 alapján saját szerkesztés)

Itt kell megjegyezni, hogy az egyes vizsgálati profilok nem csak a frekvencia-töréspontok és PD teljesítmény szintek szerint hasonlíthatók össze, hiszen nyilvánvalóan egyes közlekedési módokban használt járművek típusaitól, vagy pályaminőségtől függően ezek jelentősen eltérhetnek, hanem a teljes frekvenciatartományon kalkulálható összteljesítményértékkel is. Ez utóbbi a görbe alatti terület kalkulálásával adható meg. Ezt overall (teljes) GRMS értéknek hívja a szakirodalom.

### 2.3 A RÁZKÓDÁS HATÁSA AZ ÉLELMISZEREK MINŐSÉGÉRE

A piaci globalizáció intenzívebb élelmiszertermelést és fokozott exportot indukált. (Paternoster et al., 2017) Ennek következtében nő a szállítási igény, annak időtartama és változékonyabbak a tárolási körülmények is.

---

### 2.3.1 A rázkódás és a tej feldolgozhatóságának összefüggései

Korábbi tudományos vizsgálatok azt bizonyítják, hogy a rázkódás - mint folyadékokra ható vertikális irányú igénybevétel - negatívan befolyásolja egyes élelmiszerek fiziko-kémiai tulajdonságait. Warmińska et al. (2006) vizsgálatai arra mutatnak rá, hogy a rázkódás frekvenciája és ideje negatívan befolyásolja a friss tej felhasználhatóságát. A tej fiziko-kémiai tulajdonságaiban bekövetkező negatív változások a rázkódás frekvenciájának növekedésével fokozódtak. (Czerniewicz et al., 2006, Warmińska, Kruk, 2001; Warmińska et al. 2003a, 2003b; Palich, 1993; Jurczak, 1983) A vibráció a savfok és a vezetőképesség enyhe növekedését, valamint a termikus és etanolos stabilitás csökkenését eredményezi, valamint lerövidíti a nyers tej oltós koagulációjának idejét. (Warmińska et al., 2006) Ezek a változások viszont akadályozzák a feldolgozást és ronthatják a késztermékek minőségét és eltarthatóságát. Megfigyelték, hogy a rezgéseknek kitett tejminták savfoka növekszik a rezgésfrekvencia növekedésével és az expozíció elhúzódásával. Feltételezhető, hogy a tej savfokában bekövetkező változás oka egyrészt a fehérjemolekulák szerkezetének megváltozása, másrészt a sók alkotta kristályszerkezet rezgések által befolyásolt változásaiból is ered (Warmińska et al., 2001). A tejminőség egyik jellemzője a technológiai felhasználóság tekintetében annak elektromos vezetőképessége. (Mabrook, Petty, 2003), melynek értéke - a mechanikai agitáció hatására - növekedhet. A vezetőképességben megfigyelt változások a frekvencia növekedésével fokozódtak. A friss nyerstej hő- és etanolos stabilitását számos tényező határozza meg, többek között: ionkoncentráció ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , citrát- és foszfátionok), a nitrogénvegyületek (kazein és

---

frakciói, tejsavófehérjék, nem fehérjetartalmú vegyületek) aránya és tartalma, valamint a sók mennyisége és összetétele. Ezeket a tulajdonságokat a tej savfoka nem befolyásolja, azonban értékének bármilyen változása (különösen annak növekedése) a tej stabilitásának jelentős csökkenését eredményezi (Czerniewicz et al., 1999, 2000). A kutatások során megfigyelt etanolos és hőstabilitási változások szignifikánsan korreláltak a rezgéseknek kitett tej savfokának változásával. Úgy tűnt, hogy a tej oltós alvadásának ideje a gyakoribb és hosszabb rezgési idővel lerövidül. A tej koagulációs folyamatát számos tényező befolyásolja, főként a kalciumionok jelenléte és koncentrációja, az aktív savfok, és a kazein micellák. A tej savfokának növekedése a kalcium fokozatos ionizációját eredményezi, és lerövidíti a tej alvadási idejét (Körzendörfer et al., 2021)

### **2.3.2 Alkoholos italokban bekövetkező minőségi változások**

Borok esetében a rázás használható a bor mesterséges öregbítésére, de mivel ez a bor minőségét negatívan befolyásolja (a teljes savtartalom nő, a borkósav, borostyánkősav, valamint a tanninok mennyisége csökken, a refraktív index pedig az első 3 hónapban nő, majd állandósul), ezért vörösborok esetében minimalizálni szükséges. (Chung et al., 2008)

A sör érzékszervi minőségének csökkenését a tárolás során több szerző is leírta (Vanderhaegen et al., 2006, 2007) és ezt a szállítás negatív hatásának is tulajdonítják (Janssen et al., 2014). A piac globalizációja magasabb sörtermelést és exportmennyiséget indukált. Ennek eredményeként a sör egyre inkább ki van téve a hosszabb szállítási időknél és a változó tárolási feltételeknek. Ezek a szállítási és tárolási

---

feltételek olyan kémiai reakciókhoz vezetnek, amelyek változásokat okoznak a sör kémiai összetételében (Vanderhaegen et al., 2006). A kémiai reakciók, amelyeket többnyire oxidatív reakciók indítanak el, olyan kémiai vegyületeket hoznak létre, amelyek megváltoztatják a sör érzékszervi tulajdonságait (Jaskula-Goiris et al., 2011; Malfliet et al., 2008). Míg a borok érését néha kívánatosnak tartják - mivel bizonyos ízeket és aromákat fokoz - a sör érése nemkívánatos ízváltozásban (aldehidek mennyisége nő, a keserű anyagok mennyisége csökken), opálosodásban és színváltozásban nyilvánul meg (Paternoster et al., 2018a, 2018b, 2017) Ennek következtében a sör ízminősége és stabilitása idővel változik. Az érési jellemzők sörtípusonként eltérőek, azonban általában az édes aromák növekedése és a keserű ízek csökkenése figyelhető meg (Malfliet et al., 2008; Vanderhaegen et al., 2006). Az ízek instabilitása miatti eltarthatósági problémák fontos kérdéssé váltak a sörfőzdek számára. Annak érdekében, hogy megfeleljen a fogyasztó elvárásainak, a sörnek állandó, egységes ízűnek kell lennie. Ha a sör érik, és az íze, valamint aromája eltér a friss sörétől, az a sörmárka fogyasztó általi elutasítását és az eladások csökkenését eredményezheti (Vanderhaegen et al., 2006).

### **2.3.3 A fizikai igénybevétel mikrobiomra gyakorolt hatása**

Az előző fejezetekből jól látható, hogy a rázkódás számos fiziko-kémiai változást indukál a különböző élelmiszerekben, de mindezzel együtt szállítás alatti rázkódásnak az élelmiszerek mikrobiológiai minőségére gyakorolt hatását nem vizsgálták. Különösen igaz ez a palackozott vizek esetében, melyek vizsgálataim alapjául is szolgáltak és jelentőségük kiemelkedő,



hiszen a víz mátrix sajátos kémiai szerkezetéből adódó képlékenysége miatt a mechanikai igénybevételt az összes élelmiszer közül ezen termékcsoporthoz közvetíti a legdirektebb módon a benne található mikrobiom felé, amely változása jelentősen befolyásolhatja (és általában negatívan) a végtermék minőségét. Másik sajátossága, hogy a termékben található mikroorganizmusok ebben a mátrixban szaporodnak a leggyorsabban és a könnyű (a szállítás alatt állandóan ható) keveredés révén az egész mátrix minőségi romlásához vezethet. Mivel a leggyakrabban fogyasztott alap élelmiszereink egyike, a vásárlók a legkisebb ízváltozást is könnyen felismerik és innentől kezdve a minőségi kérdés könnyen gazdaságivá válhat. A hirtelen mikróbaszám növekmény pedig az érzékszervi elváltozásokon túl a jogi előírásoknak (pl. 65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet) való nemmegfeleléshez is vezethet, amely innentől kezdve már élelmiszerbiztonsági kérdés.

## **2.4 A VÍZ ÉLETTANI HATÁSA**

Víz nélkül nincs élet és csak az édesvíz alkalmas emberi fogyasztásra. Élelem nélkül hetekig is életben maradhat az ember, a szervezet 15%-os vízvesztése néhány napon belül halált okoz (3. táblázat). Ebből is következik, hogy a víz létfontosságú az ember számára.

**3. táblázat:** Az emberi szervezet vízhiányának tünetei

Vízvesztés (%)	Tünete
0,5	szomjúságérzet
3	szomjúságérzet növekedés, nyáleválasztás csökkenés
5	szívverés élénkülés, fáradtság, gyengeségérzet
10	testműködés, szellemi tevékenység zavara
15-20	halál

A felnőtt emberek testének átlagosan 60-70%-a víz. Születésünkkel ez az arány magasabb, a csecsemőknél úgy 80% körüli. Idővel csökken testünkben a víz aránya, idős korban már csak körülbelül 50%-os a szervezet víztartalma.

Egy ember évente több mint 1000 liter folyadékot iszik, a veséken pedig naponta mintegy 2000 liter testnedv folyik át. Mindennapi körülmények között naponta átlagosan 2,4 liter folyadék távozik a felnőttek szervezetéből a verejtékezés, légzés, kiválasztás és emésztés során. A folyadékháztartás egyensúlyának fenntartásához szükséges víz mennyisége egyénenként változó, és a testmozgás, a szervezet működése, a környezeti feltételek (hőmérséklet, páratartalom) függvénye. (Maton, 1993) A 4. táblázat korcsoportonként és nemenként mutatja be az ajánlott, napi vízfogyasztási mennyiséget.

**4. táblázat:** A naponta elfogyasztásra ajánlott víz mennyisége Európában (ml/nap)

Életkor	Nő			Férfi		
	Élelmiszer	Ital	Össz.	Élelmiszer	Ital	Össz.
2-3 év	390	910	<b>1300</b>	390	910	<b>1300</b>
4-8 év	480	1120	<b>1600</b>	480	1120	<b>1600</b>
9-13 év	570	1330	<b>1900</b>	630	1470	<b>2100</b>
14 évtől	600	1400	<b>2000</b>	750	1750	<b>2500</b>
terhesség alatt	690	1610	<b>2300</b>	-	-	-
szoptatás alatt	600	2100	<b>2700</b>	-	-	-

Forrás: European Food Safety Authority / 1 liter = 1000 milliliter

A víznek fontos szerepe van az élő szervezetben:

- biztosítja és fenntartja a vérkeringést,
- a vér ozmózis nyomásának kulcsszereplője,
- szabályozza a vérnyomást,
- mivel a vér túlnyomó része folyadék, fontos a szerepe a táplálék tápanyaggá bontásában,
- annak felszívódásában és a megfelelő helyre történő szállításában,
- a belső hőmérséklet szabályozásához, fenntartásához szintén nélkülözhetetlen.

Az elfogyasztott víz bejárja az egész szervezetünket. Az emésztőrendszerből felszívódik a vérbe, majd onnan az egész szervezetben szétáramlik és a különböző szervekben és szövetekben átmenetileg tárolódik, ahol leadja a benne oldott anyagokat, mely folyamat révén érvényesül az ásványvizek oldott anyagainak hatása is. A szervezeten belüli körforgása során a víz az anyagcsere termékeket is

---

felveszi és tovább viszi, méregtelenítve ezzel a szervezetet. (URL<sup>4</sup>)  
(Csapó és Csapóné, 2003)

Mindennapi körülmények között naponta átlagosan 2,4 liter folyadék távozik a felnőttek szervezetéből a verejtékezés, légzés, kiválasztás és emésztés során. A folyadékháztartás egyensúlyának fenntartásához szükséges víz mennyisége egyénenként változó, és a testmozgás, a szervezet működése, a környezeti feltételek (hőmérséklet, páratartalom) függvénye. (Maton et al., 1993) A folyadékszükséglet kielégítése elsősorban folyadékokkal - vízzel, ásványvízzel, lédús gyümölcsökkel, gyümölcslevekkel, üdítőitalokkal, tej és tejes italokkal, teákkal és levesekkel – történhet, melyek közül a víz a legjelentősebb.

#### **2.4.1 A palackozott vizek csoportosítása**

A palackozott víz az alábbiak szerint csoportosítható (Kline, 2008):

- ásványvíz
- forrásvíz
- szénsavas víz
- desztillált vagy tisztított víz
- csapvíz

A vízáradó réteg mélysége alapján megkülönböztetünk:

- sekély: aktív vízmozgások jellemzik, azaz a felszíni vizek és a helyi szennyeződések a talajon keresztül gyors beszűrődést mutatnak a vízáradó rétegbe;
- közepes: a felszíni vizektől és a talajvíztől vízzáró réteg választja el, de a vízáradó réteg mélysége nem haladja meg a 300 m-t;

- mély: 300 m-nél mélyebben helyezkednek el, a felszíni vizek és szennyeződések beszűrődésének mértéke csekély (Leclerc, Moreau, 2002)

Az egyes palackozott természetes ásványvizek között ásványianyag-tartalmuk, összetételük és ízük alapján is különbséget lehet tenni.

- Csekély ásványianyag-tartalmú: ásványianyag-tartalom, szárazanyag-tartalom alapján számítva, kevesebb mint 500 mg/l
- Nagyon csekély ásványianyag-tartalmú: ásványianyag-tartalom, szárazanyag-tartalom alapján számítva, kevesebb mint 50 mg/l
- Ásványi anyagban gazdag: ásványianyag-tartalom, szárazanyag-tartalom alapján számítva, több mint 1500 mg/l
- Hidrogén-karbonát-tartalmú: hidrogén-karbonát-tartalom több mint 600 mg/l
- Szulfáttartalmú: szulfáttartalom több mint 200 mg/l
- Kloridtartalmú: kloridtartalom több mint 200 mg/l
- Kalciumtartalmú: kalciumtartalom több mint 150 mg/l
- Magnéziumtartalmú: magnéziumtartalom több mint 50 mg/l
- Fluoridtartalmú: fluoridtartalom több mint 1 mg/l
- Vastartalmú: kétértékű vastartalom több mint 1 mg/l
- Savas: szabad szén-dioxid-tartalom több mint 250 mg/l
- Nátriumtartalmú: nátriumtartalom több mint 200 mg/l.
- Alkalmas nátriumszegény diétához: nátriumtartalom kevesebb, mint 20 mg/l (URL<sup>5</sup>)

## **2.5 ÁSVÁNYVÍZ**

### **2.5.1 Az ásványvíz fogalma**

A természetes ásványvíz olyan, mikrobiológiailag kifogástalan víz, amely egy földalatti vízáradó rétegből származik, és egy vagy több fűrt kúton keresztül jut a felszínre. A természetes ásványvizet nem lehet sterilizálni, pasztőrözni, vagy más módon a benne lévő mikroorganizmusokat eltávolítani, megsemmisíteni. (European Commission, 2009)

A palackozott ásványvíz az élelmiszerek egy speciális, eredetében és minőségében garantált fajtája. Csak a származási ország illetékes hatósága (Magyarországon az Országos Tisztifőorvosi Hivatal Országos Gyógyhelyi és Gyógyfürdőügyi Főigazgatóság) által hivatalosan is igazolt kémiai összetételű, mikrobiológiai tisztaságú és minőségű ásványvíz palackozható. (URL<sup>2</sup>)

### **2.5.2 Az ásványvizek csoportosítása**

A 80/777/EGK ásványvíz direktíva és annak utólagos módosításai (96/70/EK illetve a 2003/40/EK Direktívák), eredetileg három, majd utólagos módosításaiban négy alkategóriát különböztet meg. A kritérium az oldott ásványianyag-tartalom, a szélesebb körökben elfogadott TDS (total dissolved solids = összes oldott szilárd anyag):

- Csekély ásványianyag-tartalmú, TDS<500 mg/l
- Nagyon csekély ásványianyag-tartalmú, TDS<50 mg/l
- Ásványi anyagban gazdag, TDS>1500 mg/l.

---

Ezt bővítették utólag a logikusnak ítélt Közepes ásványianyag-tartalmú kategóriával, amely a kimaradt 500 mg/l<TDS<1500 mg/l intervallumot fedte le. (URL<sup>8</sup>)

Az ásványvíz olyan ivóvíz, amely legalább 500 mg/liter oldott ásványi anyagot tartalmaz, és amelyek sajátos ízt és gyakran gyógyhatást kölcsönöznek. Az ásványvíz az ivóvízzel azonos beszerzési helyről, védett artézi kútból vagy forrásból származik. A vizek döntő többsége szénsavmentes, melyet a palackozás előtt dúsítanak. A fentieknek köszönhetően a hazai vezetékes ivóvizek fele és a természetes források többsége is ásványvíznek minősülnek. Az ásványvizek fajtái alap összetétel szerint többfélék lehetnek. Az ásványi anyag összetétel szerint 10 fajtát különböztetünk meg.

- Az egyszerű termális vizek ivókúrában görcsoldó hatásúak, oldott ásványi anyagtartalma kicsi, hőmérsékletük 20-25 °C felett van.
- A savanyú vizek természetes szénsavtartalmuk miatt kedvező hatásukról ismert, savhiányos gyomorhurutok kezelésénél jól alkalmazható.
- A meszes-földes ásványvizekben kiemelkedő biológiai hatása van a magnéziumnak és a kalciumnak. A kalcium gyulladáscsökkentő hatású. A terhességnél és a szoptatásnál fellépő görcsök enyhítésében segít, illetve a szív és érrendszeri betegségek fogyasztásakor előnyös.
- Az alkalikus ásványvizekben a nátrium, kálium és a hidrogén-karbonát található meg nagy mennyiségben. A savtúltermeléssel járó gyomorbetegségeknél kedvező a hatása.

- A szulfátos ásványvizek csoportjába tartozik a glaubersós, keserűsós vizek magas szulfát és nátrium vagy magnézium tartalommal. A tömény keserű vizek megszüntetik a székrekedést, míg a hígabb keserűvizek az ivókúrában elterjedt.
- A jódos- brómos ásványvizek jódhiányos strómában fejtik ki kedvező hatásukat.
- A vasas vizek segítenek a műtét utáni felerősödésben, illetve a vashiányos emberek számára lehet kedvező hatással.
- A radon-tartalmú vizek hatására kitágulnak az erek, ennek következtében fájdalomcsillapító hatású. Rendszeres alkalmazásukkal enyhülnek az érlemeszesedési panaszok, csökken a vérnyomás. Bőrön át és légzés útján is bejuthat a szervezetbe. (URL<sup>2</sup>)

A természetes ásványvizek összes oldott ásványianyag-tartalma legalább 1000 mg/l, vagy az oldott összes szilárd ásványianyag-tartalma 1000 mg/l között van, és tartalmazza az alább felsorolt aktív biológiai anyagok valamelyikét:

- Lítium-ion legalább 5 mg/l,
- Szulfid-ion vagy titrálható kén legalább 1 mg/l,
- Metakovasav legalább 50 mg/l,
- Nátrium-ion kevesebb 200 mg/l-nél,
- Magnézium-ion legalább 20 mg/l,
- Kalcium-ion legalább 60 mg/l,
- Bromid-ion legalább 5 mg/l,
- Jodid-ion legalább 1 mg/l,



- Fluorid-ion 0,8-1,2 mg/l,
- Radonaktivitás legalább 37 Bq/l,
- Szabad szén-dioxid legalább 1000 mg/l

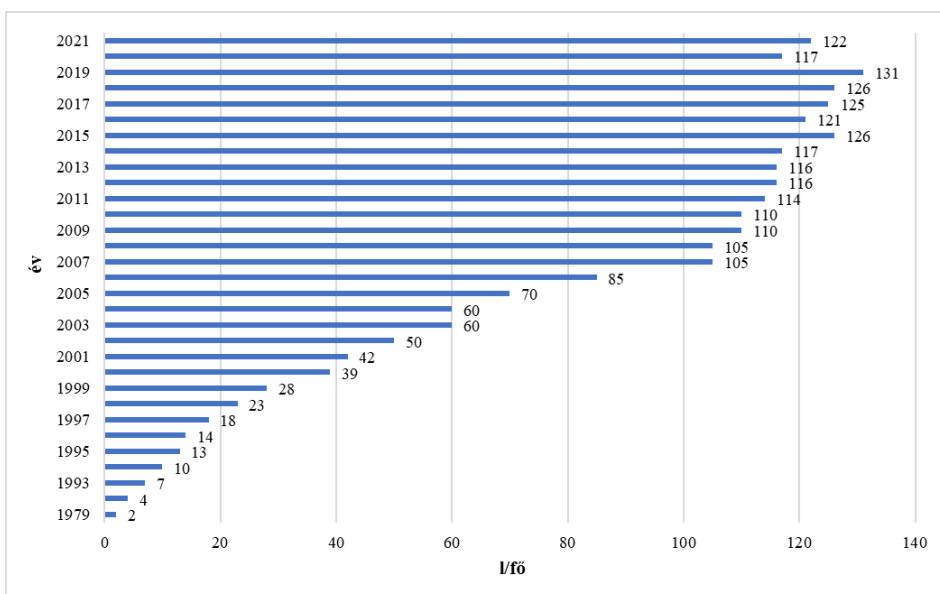
### **2.5.3 Az ásványvíz fogyasztás Magyarországon**

Ásványvizet már a rómaiak is fogyasztottak, de csak a XX. században merült fel az igény a természetes ásványvíz-ipar megteremtésére. Ezen termékek fogyasztása alternatívájává vált a csapvíznek és az alkoholmentes italoknak (Stickler, 1989). Az utóbbi években hatalmas igény mutatkozott a fogyasztók részéről a palackozott vizek iránt világszerte, beleértve Magyarországot is.

Kevés olyan élelmiszer van ma Magyarországon, amelynek az egy főre eső fogyasztása évről-évre olyan nagymértékben növekszik, mint a palackozott természetes ásványvízé. Az ásványvíz-fogyasztás kezdetben igen alacsony értékű volt, messze elmaradt a nagy ásványvíz-fogyasztással rendelkező országokhoz képest, majd lassan növekedésnek indult, és mára látványos fejlődést ért el. A nyolcvanas években, de még a kilencvenes évek elején is az egy főre eső fogyasztás stabilan 3 liter/fő/év körül volt. 1993-ban kezdett a fogyasztás dinamikusan - évente 20-30 %-kal - növekedni, és 2019-ban elérte az évi, fejenkénti 131 litert (10. ábra). Bár a fejenkénti éves ásványvízfogyasztás mennyiséges 2020-ban visszaesett, hazánk még így is az Európai Unión belül az első öt ország között van.

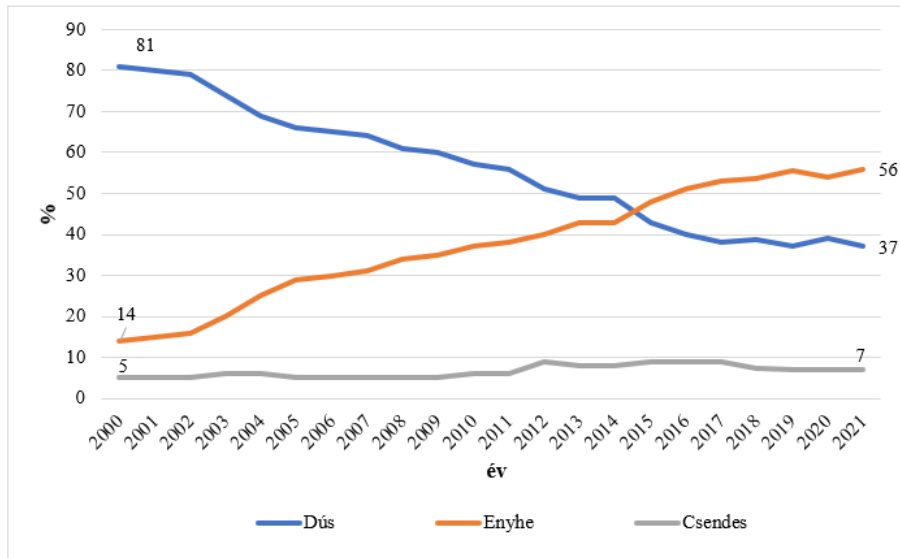
A hazai ásványvíz fogyasztás emelkedésének egyik oka az, hogy az emberek egyre inkább felismerik az egészséges táplálkozás fontosságát, értékelik az ásványvíz kedvező táplálkozás-fiziológiai tulajdonságait. Az

ásványvíz elvesztette korábbi luxus jellegét, és mindennapi fogyasztási cikk lett. Továbbá az ásványvíz palackozó cégek nagy gondot fordítanak a fogyasztók tájékoztatására. Megismertették - és teszik ezt jelenleg is, nem csak egyéni, hanem a Magyar Ásványvíz, Gyümölcslé és Üdítőital Szövetség által irányított közösségi marketing eszközeivel is - a fogyasztókkal a természetes ásványvíz egészségre gyakorolt kedvező tulajdonságait.



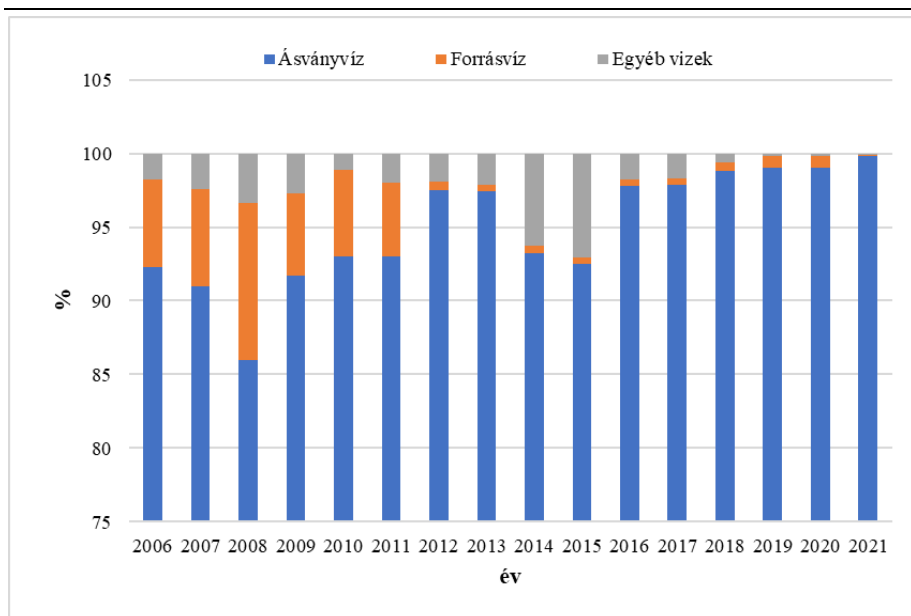
**10. ábra:** Az ásványvíz fogyasztás trendje Magyarországon 1979-2021 között (Forrás: URL<sup>4</sup> alapján saját szerkesztés)

A magyarok - az osztrákokhoz, németekhez, csehekhez hasonlóan – egészen 2016. évig a szén-dioxiddal dúsított vizeket kedvelték jobban, míg a franciák, olaszok, spanyolok a szénsavmentes ásványvizeket. 2016-ban megfordult az arány, és az összesen fogyasztott ásványvíz 51 %-a volt a szénsavmentes (11. ábra).



**11. ábra:** Az ásványvíz fogyasztás megoszlása szénsav-tartalom szerint 2000-2021 között (Forrás: URL<sup>4</sup> alapján saját szerkesztés)

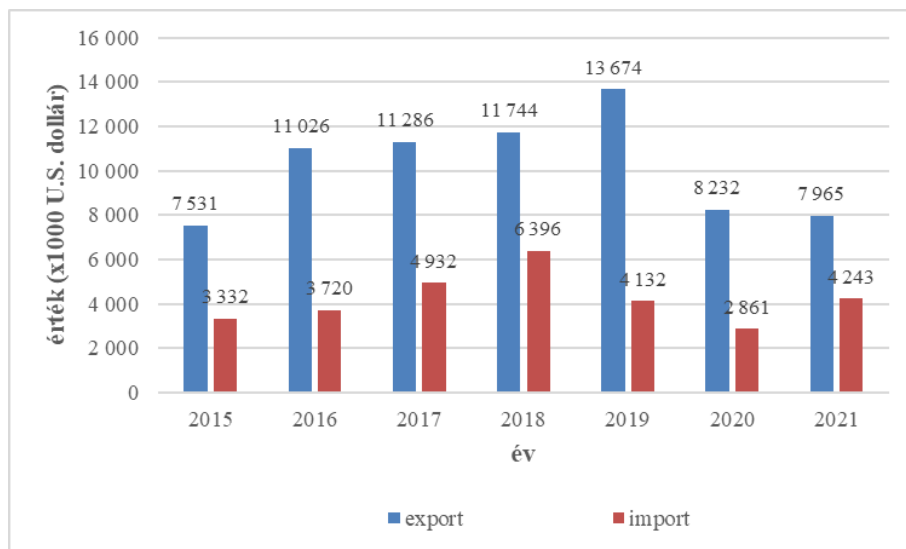
A hazai palackozott vizek döntő többsége ásványvíz, ezen kívül palackozott forrásvíz, ivóvíz, és különféle dúsított, illetve ízesített vízalapú ital van forgalomban (az ízesített vizeket 2021-től a szénsavas üdítőitalok közé soroljuk). Ezek fogyasztási megoszlását a 12. ábra mutatja.



**12. ábra:** Az egyes vízfajták fogyasztásának megoszlása 2006-2021 között (Forrás: URL<sup>4</sup> alapján saját szerkesztés)

Hazánk jelentős mennyiségű természetes ásványvizet exportál, ugyanakkor importálunk is ilyen termékeket. A 13. ábra jól szemlélteti, hogy hazánk ásványvíz exportból származó bevétele 2-3-szor több, mint amennyit az importra fordítunk. Az ásványvíz piacon jól megfér a hazai víz az import vízzel, az alacsonyabb ásványianyag-tartalmú az ásványi anyagban gazdagabb vizekkel. Az élelmiszerbolt-hálózatokban a 0,5-1,5 literes kiszerelés, a vendéglátóhelyeken a 0,25-0,33-0,5 literes kiszerelés a legkedveltebb, de ezek mellett 2,0-5,0 literes PET-palackos és 19 literes ballonos kiszereléssel is találkozhatunk. A hagyományos, nagy márkák az egész országban kaphatóak, a kevésbé ismert, új vizek pedig a palackozó vonzáskörzetében, színesítve, bővítve a választékot. Árukat befolyásolja többek között az ismertségük, a marketing- és jelentős

mértékben a szállítási költségek, amely utóbbi az ásványvizek esetében relatíve magas érték.



**13. ábra:** A Magyarországról exportált és Magyarországra importált ásványvíz értéke 2015 és 2021 között (1000 amerikai dollárban) (URL<sup>1</sup>)

#### 2.5.4 Az ásványvizek jogi szabályozása

Az ásványvizek jogi szabályozását 2 fő rendelet foglalja magába. Az egyik ilyen a 65/2004. (IV.27.) FVM-ESZCSM-GKM együttes rendelet, amely 2004 májusában lépett hatályba. E rendelet magába foglalja a természetes ásványvíz, a forrásvíz, az ivóvíz, az ásványi anyaggal dúsított ivóvíz és az ízesített víz palackozásának és forgalomba hozatalának szabályait. A 201/2001. (X. 25.) Korm. rendelet pedig az ivóvíz minőségi követelményeit írja le. A rendelet hatálya az emberi fogyasztásra szolgáló víz minőségi követelményeire és a vízminőség-ellenőrzésére terjed ki.

---

A 65/2004 (IV.27.) FVM-ESZCSM-GKM szerint: természetes ásványvíz az, ami természetes állapotában emberi fogyasztásra szánt, a 3. § szerint hivatalosan elismert víz, amely:

- Védett, felszín alatti vízáadó rétegből egy vagy több természetes, vagy mesterségesen feltárt forrásból vagy kútból származik.
- Eredendően szennyeződés mentes.
- Ásványi anyag-, és nyomelem-tartalma, valamint egyéb összetevőinek következtében egészségügyi szempontból előnyös tulajdonságokkal rendelkezik, és egyértelműen megkülönböztethető az ivóvíztől.
- Összetétele és hőmérséklete közel állandó, vagy a természetes ingadozás határain belül van.
- Az antimon, arzén, bárium, bór, kadmium, króm, réz, cián, fluorid, ólom, mangán, higany, nikkel, nitrát, nitrit, szelén mennyisége palackozáskor nem haladja meg az ott megengedett határértéket.
- Mikrobiológiai szempontból megfelel az 5. § előírásainak.

Forrás: URL<sup>5</sup>

## 2.6 AZ ÁSVÁNYVIZEK MIKROBIÓTÁJA

A fogyasztók úgy gondolják, hogy a palackozott ásványvíz nem tartalmaz mikroorganizmusokat és ezért biztonságosabb, mint a csapvíz (Armas, Sutherland, 1999; Rosenberg, 2003; Bharath et al., 2003; Hawkins, 2017). A mikrobiális fejlődés korlátjai ellenére - mint a szerves tápanyagok hiánya, vagy a magas ásványianyag-tartalom - az ásványvizeket számos, az adott víznyerő helyre jellemző

---

mikroorganizmus jellemzi (Hunter, 1993; Leclerc és Moreau, 2002; Otterholt és Charnock, 2011; Falcone-Dias et al., 2012; França et al., 2015), melyek fenó- és genotípusos diverzitással rendelkező komplex ökoszisztémák (Manaiá et al., 1990; Rosenberg, 2003; Zamberlan da Silva et al., 2008). A különböző mélységű geológiai rétegekből és helyekről származó aerob heterotróf baktériumok fiziológiai és morfológiai jellemzői nagy mértékben eltérőek a mélység függvényében és határozottan különböznek a más mélységben előforduló mikroba populációktól. (Pap, 2011)

Az ásványvizek mikrobiótáját két nagy csoportra oszthatjuk: az allochton és az autochton csoportra. Az allochton mikrobióta csoportjába a környezetből bekerülő mikroorganizmusok tartoznak, palackozott vízben való túlélésük az alacsony tápanyagtartalom miatt csekély. Ugyanakkor néhány héttel a palackozás után több szerző is patogén baktériumokat és vírusokat izolált természetes ásványvízből. (Gonzalez et al., 1987; Biziasgos et al., 1988; Geldreich, 1990; Manaiá et al., 1990; Morais és da Costa, 1990; Mavridou, 1992;) A környezetben előforduló valamennyi mikroba bekerülhet a forrásokba, kutakba, illetve ezek vezetékeikbe. Antropogén hatásoktól függően előfordulhatnak fertőző mikroorganizmusok is, mint pl. *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*.

A felszín alatti vizekben élő mikroorganizmusok többsége heterotróf baktérium. Ez a mikroorganizmusok egy olyan nagy csoportja, amely a szén-dioxid helyett szerves anyagot használ a növekedéshez és szaporodáshoz. Az őshonos (autochtonous) mikrobák, mint pl. az *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*,

---

cytophagok, *Moraxella* és *Pseudomonas* a legismertebbek és legelterjedtebb baktériumok a vízben. A heterotróf baktériumok között előfordulnak kórokozók, elsősorban kóliformok (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* és *Klebsiella*) és opportunista kórokozók. (Diduch et al., 2016). A magas heterotróf mikrobaszám csecsemőknél, időseknél, immunszuppresszált egyéneknél és várandósoknál megbetegedést okozhat. Ráadásul több esetben is antibiotikum multirezisztens baktériumokat izoláltak palackozott ásványvízből. (Falcon-Dias, Filho, 2013)

Eukarióták jelenléte csak korlátozott számban igazolódott, de nem kizárható. (Schmidt-Lorenz et al., 1990) Irodalmi adatokban több szerző (Balkwill, 1989; Sinclair, Ghiorse, 1989; Leclerc, Moreau, 2002) is beszámolt arról, hogy aerob vízbázisokban protozoák jelenléte igazolható, de számuk elenyésző a baktériumokéhoz képest.

A természetes vizek mikrobiótájában élesztőgombák (pl. *Candida*, *Rhodotorula*) is előfordulhatnak, melyek közül néhány - biofilmképző képességének köszönhetően - huzamosabb ideig is életképes maradhat. (Pontara et al., 2011) Ezek többsége nem humánpatogén, de opportunista patogéneket találhatunk közöttük, melyek jelenléte a víz fekális szennyeződésére utal. Vízből fonalas gombákat is izoláltak, melyek között potenciális patogén, allergén és toxikus fajok is voltak (pl. *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium*). (Hageskal, 2009) Nemrég olyan publikációk jelentek meg, melyekben Norwalk-vírus genom szekvenciák detektálásáról számoltak be Svájcban és más országokban. A pozitív minták esetében a vízben kóliformokat is detektáltak, mely fekális kontaminációra utal. (Lamothe, 2003)



Tian és munkatársai (2014) ivóvízből elsősorban  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -proteobaktériumokat mutattak ki, melyek közül az  $\alpha$ -,  $\beta$ -proteobaktérium volt túlsúlyban. A  $\gamma$ -proteobaktériumnak közegészségügyi jelentősége van. Ebbe a csoportba humán, állati és növényi kórokozók tartoznak, mint pl. az *Escherichia*, *Enterobacter*, *Francisella*, *Pasteurella* és a *Pseudomonas*.

Az 1. melléklet vízben előforduló mikroorganizmusokat és az általuk okozott megbetegedéseket mutatja be.

### **2.6.1 A PET palack és a mikrobiom kapcsolata**

A polietilén-tereftalát (PET) műanyag elsősorban ismétlődő etilén-glikol és tereftálsav (TPH) monomerekből áll. A PET lineáris szerkezete és az aromás komponensek magas aránya kémiaiilag inert és növeli a tartósságát, így rendkívül ellenállóvá teszi a lebomlással szemben. (Yoshida et al, 2016) A polietilén (PE) és származékai a polimerek egy olyan csoportja, amely viszonylag hidrofób, kémiaiilag inert, nagy molekulatömeggel és néha elágazó 3D szerkezettel rendelkezik. E közös tulajdonságok mindegyike csökkenti annak valószínűségét, hogy szénforrásként használják őket a mikroorganizmusok. (Hadad et al., 2005)

Ugyanakkor a HPC-ben (heterotrophic plate count = heterotróf sejtszám) jelenlévő extremofil baktériumok számos túlélési mechanizmusnak köszönhetően hosszú ideig életképesek a palackozott vízben, mikroelemek jelenlétében a PET lebomlásához vezethetnek (Gautam, 2021) Gautam et al. (2021) szoros korrelációt talált a palack típusa és a HPC, kóliform és *Pseudomonas* szám között (5. táblázat).

**5. táblázat:** A palack típusa és a mikrobiológiai paraméterek közötti összefüggés

	<b>Mikrobiológiai paraméter</b>			
	Palack típusa (PET)	HPC	Kóliform szám	<i>Pseudomonas</i> szám
Palack típusa (PET)	1	0,780 <sup>a</sup>	0,780 <sup>a</sup>	-0,441 <sup>a*</sup>
HPC		1	1	-0,525 <sup>a</sup>
Kóliform szám			1	-0,525 <sup>a</sup>
<i>Pseudomonas</i> szám				1

HPC: heterotrophic plate count = heterotróf sejtszám

<sup>a</sup>A kitevő szignifikáns korrelációt jelez ( $p < 0,01$ )

Forrás: Gautam et al. (2021) alapján saját szerkesztés

A sérült palackokban lévő vizek között 40%-kal több nem megfelelő minőségű vizet találtak, mint az ép palackú vizek között. (6. táblázat)

**6. táblázat:** Mikrobiológiai paraméterek és a palack minősége közötti összefüggés

<b>Mikrobiológiai paraméter</b>	<b>Karc- és horpadásmentes</b>	<b>Karcos és horpadt</b>	<b>Megengedett érték</b>
	nem megfelelő (%)		
HPC	6	46	<25 cfu/cm <sup>3</sup>
Kóliform szám	6	46	nem lehet
<i>Pseudomonas</i> szám	2	21	nincs adat

HPC: heterotróf sejtszám

Forrás: Gautam et al. (2021) alapján saját szerkesztés

A palackon lévő horpadás elősegíti a biofilmképződést. Vague et al. (2019) kísérletei azt mutatták, hogy a lipáz pozitív *Pseudomonas* baktériumok biofilmet képeztek a PET-en és molekuláris változásokat

---

idéztek elő a műanyag felületén, ami a műanyag lebomlás kezdeti szakaszát jelzi.

### *2.6.1.1 A mikrobaszám és a palack típusa közötti összefüggés*

Bischofberger et al. (1990) PET palackos ásványvizeknél a kimutatható telepszámra  $10^5/\text{cm}^3$ , míg üvegpalackokban  $10^3/\text{cm}^3$  nagyságrendet tapasztaltak. Ennek magyarázata lehet az üvegpalackok tisztítása során a palack felületén nyomokban megmaradó tisztítószer bakteriosztatikus hatása, míg bizonyos szakirodalmi eredmények arra engednek következtetni, hogy a műanyag palackok felületéről szerves anyagok oldódhatnak a termékbe, amit a benne lévő mikroorganizmusok hasznosítanak. (Gonzalez et al., 1987; Morais and da Costa; 1990; Mavridou, 1992). A csomagolóanyag felületi érdessége, alakja, a hidrofób/hidrofil tulajdonsága, a palackok mérete is befolyásolja a baktériumok szaporodását (Bischofberger et al., 1990; Leclerc and da Costa, 1998). Ugyanakkor Sala-Comorera et al. 2019-es publikációja arról számolt be, hogy a víznyerő helytől függ, hogy a PET palackba és az üvegbe töltött ásványvíz maximális sejtszámában lesz-e szignifikáns különbség. Nevezett publikációban 3 különböző spanyolországi palackozóból származó ásványvizet vizsgáltak, melyeket PET palackba, illetve üvegbe töltöttek. Két víz esetén nem, a harmadik ásványvíz esetén viszont szignifikáns különbséget tapasztaltak.

### **2.6.2 Az ásványvizek mikrobiótájának vizsgálata**

A vízbázisban a tápanyag korlátozott elérhetősége miatt a forrás-illetve ásványvizek természetes mikrobiótáját alkotó baktériumok gyakran

---

éhezési állapotban vannak. Ennek következtében megváltozhat a morfológiájuk, a sejtek alakja deformálódhat, tojásformát vehet fel, az átmérőjük pedig oly mértékben csökkenhet (ultramikro, vagy nano mérettartományba eshet), hogy a szokásos 0,45 µm-es, de egyes szakirodalmi adatok szerint akár a 0,2 µm-es pórusátmérőjű membránszűrőn is átjutnak. (Pap, 2011; França et al., 2015) Korábbi publikációk felhívják a figyelmet arra, hogy konvencionális módszerekkel a természetes környezetben előforduló mikrobák 0,1-1,0 %-a mutatható ki. Ugyanakkor França et. al. 2015-ben végzett tanulmánya szerint hagyományos tenyésztési eljárással kimutatható mikrobák mennyisége a tényleges mikrobatartalom 0,0002 %-a. Ennek az alacsony aránynak több oka is lehet, mint például:

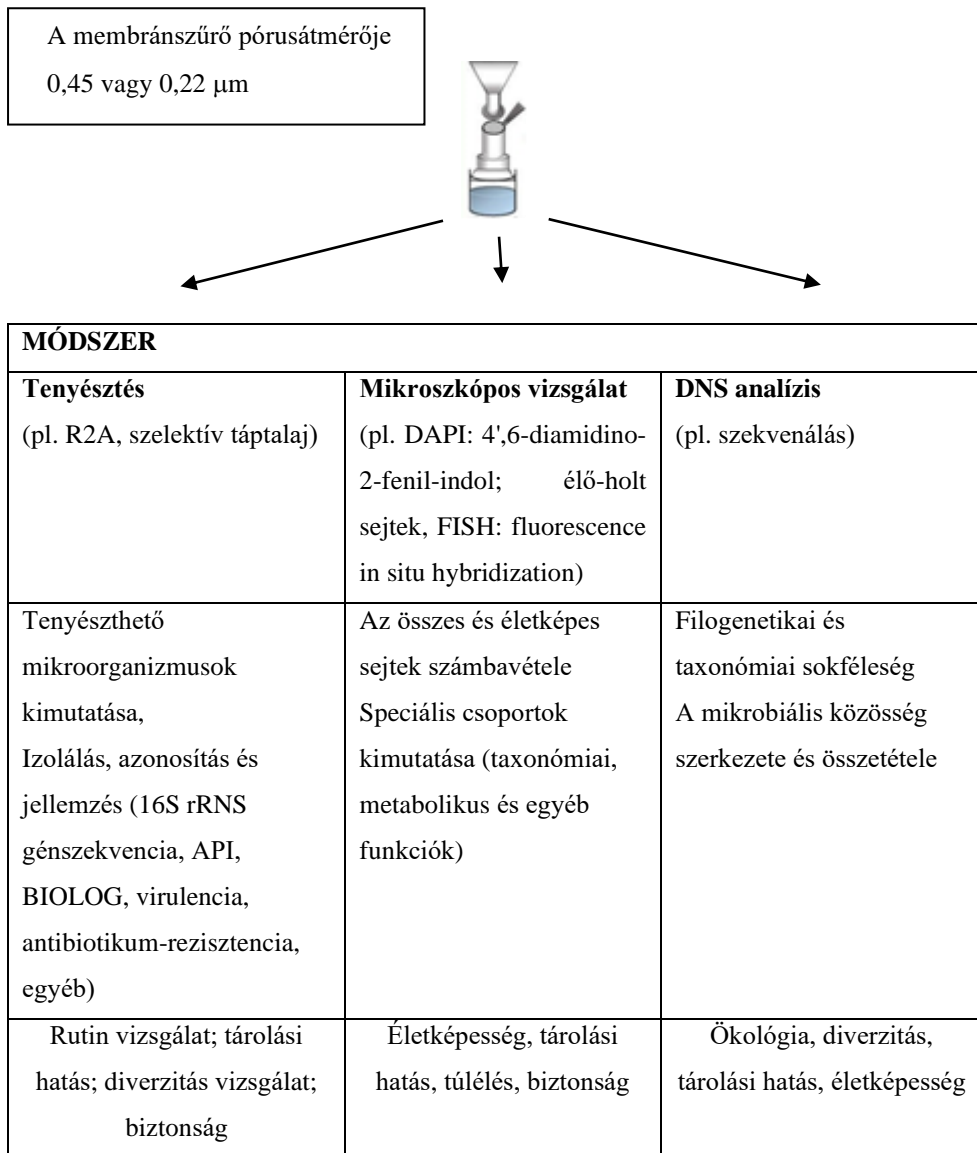
- a sejtek többsége életképes, de nem tenyészthető (viable but not culturable; VBNC) állapotban van,
- akár egy tízszeres hígítású R2A táptalaj szubsztrát-koncentrációja is túl magas lehet, hogy elősegítse a baktériumok növekedését,
- a baktériumok alkalmazkodtak a vízben lévő oligotróf állapothoz,
- a táptalaj és a körülmények szelektív hatása nem teszi lehetővé számos metabolikus típus növekedését. (França et al., 2015)

A palackozott víz mikrobiológiai vizsgálatára 3 fő módszer létezik (14. ábra), melyek alapja minden esetben a membránszűrés:

- tenyésztési vizsgálat
- mikroszkópos vizsgálat,
- DNS analízis

(Forrás: Manaia, 2017).

Tenyésztésre az összsejtszám meghatározására alkalmas nem szelektív táptalajok (R2A vagy PCA) mellett, a vízminőséget jelző indikátor mikrobák kimutatására különböző szelektív és differenciáló (m-Endo Agar, TSC, SB-agar, MacConkey-agar, TTC) táptalajok használatosak. (Mania et al., 1990; Otterholt, Charnock, 2011; Varga, 2011; Falcone-Dias et al. 2012; França et al., 2015)



Forrás: Manaia (2017) alapján saját szerkesztés

**14. ábra:** A víz mikrobiotájának jellemzésére általánosan használt, membránszűrésen alapuló módszerek

---

### 2.6.3 A palackozás hatása a mikrobaszámra (Bottling effect)

Az őshonos mikrobák kezdeti alacsony sejtszáma ( $\sim 10^1$  cfu/cm<sup>3</sup>) a palackozás után néhány nappal (Némedi, 2006; Leclerc, Moreau, 2002; Rosenberg, 2003; Tsai, Yu, 1997), más szerzők vizsgálatai alapján 1-3 héttel (Moreira et al., 1994; Armas and Southerland, 1999; Bharath et al., 2003) elérheti a  $10^4$ - $10^5$  cfu/cm<sup>3</sup>-t. A palackozás után bekövetkező sejtszám változás oka még nem tisztázott. Műanyag palackok esetén az elért maximális sejtszám  $10^5$  cfu/cm<sup>3</sup>-nél magasabb is lehet. (Sala-Comorera et al., 2019; Venieri et al., 2006) Ez a magasabb sejtszám hosszabb ideig állandósul (Messi et al, 2002; Leclerc, Moreau, 2002; Hunter, 1993) és akár 2 év tárolás után még mindig lehet  $10^3$  cfu/cm<sup>3</sup> a palackozott ásványvíz összesíra tartalma. (Bischofberger et al., 1990) A palackozás utáni gyors baktériumszám növekedés a víz oxigén ellátásának, a hőmérsékletnövekedésnek és a palackból származó tápanyagok mennyiségének tudható be (Leclerc, Moreau, 2002; Loy et al., 2005; Warburton, 2000; Warburton et al., 1992). Palackozás után a baktériumok kevésbé szaporodnak az üveg palackokban, mint a műanyagban (pl. polietilén-tereftalát, PET vagy polivinil-klorid, PVC) (Bischofberger et al., 1990).

### 2.6.4 Ásványvízfogyasztással összefüggésbe hozható megbetegedések

A palackozott víz fogyasztásának fő motivációi a minőség és a biztonság. Bár a palackozott vizet ritkán hozzák összefüggésbe akut megbetegedésekkel, néhány járvány a palackozott ásványvíz fogyasztására/használatára vezethető vissza.

1974-es portugáliai kolerajárvány. A szénsavmentes palackozott víz fogyasztása lényegesen gyakoribb volt a kolerás betegek körében, mint azon betegek között, akik nem ásványvizet fogyasztottak. Ezenkívül a *Vibrio cholerae*-t izolálták azon két forrásból, amelyek ásványvizet szállítottak a kereskedelmi palackozóüzemnek (Blake et al., 1977).

2005-ben Németországban intenzív kórházi ellátásra szoruló betegek sebfertőzéseit, tüdőgyulladását idézte elő *Pseudomonas aeruginosa*-val szennyezett, szénsavmentes ásványvíz. (Eckmanns et al., 2008)

2006-ban Spanyolországban, a Kanári szigeteken gastroenterális megbetegedéseket okozott a feltehetően *Salmonella Kottbus*-szal szennyezett palackozott víz csecsemők körében. (Palmera-Suárez et al., 2007).

*Escherichia coli*-val szennyezett palackozott víz okozott ugyancsak gastroenterális tüneteket egy kínai egyetemen, 2012-ben. (Wang et al., 2012a)

Ugyanakkor az immunszupresszált egyéneknél, mint a HIV-AIDS betegek, a coronavirus fertőzöttek, a tuberculosis-ban szenvedők vagy az alultápláltak, a magas sejtszámú palackozott víz is megbetegedést okozhat. (Gautam et al., 2021; Allen et al, 2004.; Pavlov et al., 2004)



## 3 ANYAG ÉS MÓDSZER

### 3.1 A VIZSGÁLATOK HELYE

A kutatásom során alkalmazott módszereket a kivitelezhetőség szempontjából két különböző helyszínre osztottam. A dinamikus mechanikai rázkódás szimulációját a Széchenyi István Egyetem, Audi Hungária Járműmérnöki Kar, Csomagolás és Környezetállósági Vizsgáló Laboratóriumában, míg a mikrobiológiai és egyéb kiegészítő vizsgálatokat az Albert Kázmér (korábban: Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi) Kar, Élelmiszertudományi Tanszékének Mikrobiológiai Laboratóriumában végeztem.

### 3.2 VIZSGÁLT MÁTRIX

A vizsgálatok során három modell mátrixot használtam:

- frissen palackozott természetes ásványvizet,
- a vizsgált természetes ásványvízből izolált mikrobával beoltott, előzőleg sterilizált ásványvizet, valamint
- három, kereskedelmi forgalomból vásárolt, eltérő palackozási helyű és idejű természetes ásványvizet (7. táblázat).

**7. táblázat:** A vizsgálatokhoz használt, kereskedelmi forgalomból vásárolt szénsavmentes természetes ásványvizek jellemzői

Minta jelölése	Palackozási hely/vármegye	Összetevők	
		Megnevezés	Mennyiség (mg/l)
A	Szentkirály/Bács-Kiskun	Ca <sup>2+</sup>	63
		Na <sup>+</sup>	21
		Mg <sup>2+</sup>	26
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	400
		Összes oldott ásványianyag-tartalom	520
B	Zalaszentgrót/Zala	Ca <sup>2+</sup>	82
		Na <sup>+</sup>	18
		Mg <sup>2+</sup>	41
		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	108
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	327
		Összes oldott ásványianyag-tartalom	627
C	Kereki/Somogy	Ca <sup>2+</sup>	144
		Na <sup>+</sup>	32
		Mg <sup>2+</sup>	34,4
		K <sup>+</sup>	10
		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	144
		F <sup>-</sup>	1,4
		HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	487
		Összes oldott ásványianyag-tartalom	904
Minta jelölése	A lejáratig hátralévő idő (hónap)	A palackozótól megtett távolság (km)	Átl. sebesség, nyergesvontató (km/h)
A	9	275	69
B	8	373	71
C	7,5	276	72

A frissen palackozott természetes ásványvíz egy északnyugat-magyarországi palackozóból származott, melynek kémiai összetételét az 8. táblázat tartalmazza.

**8. táblázat:** A vizsgálatokhoz használt, frissen palackozott természetes ásványvíz kémiai összetétele

Vizsgált jellemző, (mértékegység), vizsgálati módszer	Eredmények
Lúgosság (mmol/l) MSZ 448-11:1986 5.1 szakasz	5,82
Nitrition (mg/l) MSZ 1484-13:2009 6.2 szakasz	<0,02
Nitrátion (mg/l) MSZ 1484-13:2009 5.2 szakasz	<0,1
Hidrogén-karbonátion (mg/l) MSZ 448-11:1986 6.2 szakasz	355,1
Szulfátion (mg/l) MSZ 448-13:1983 5. fejezet	42
Kloridion (mg/l) MSZ 1484-15:2009	2,3
Kémiai oxigénigény KOIpS (mg/l) MSZ 448-20:1990 4. fejezet	<0,3
Fajlagos elektromos vezetőképesség (20°C) (µS/cm) MSZ EN 2788:1998	530
Összes keménység (CaO mg/l) MSZ 448-21:1986 3. fejezet	182
Összes mangán (mg/l) MSZ 1484-2:1993	<0,03
Ammóniumion (mg/l) MSZ ISO 7150-1:1992	<0,04
Szín (-) MSZ EN ISO 7887 1998 2. fejezet	színtelen
Szag (-) MSZ EN 1622-2007	szagtalan
Összes vas (mg/l) MSZ 448-4:1983 2. fejezet (visszavont szabvány)	<0,03

### 3.3 A VIZSGÁLATOK SORÁN HASZNÁLT ANYAGOK

#### 3.3.1 Vizsgált mikroorganizmusok

A mikrobiológiai vizsgálati irányokat a hatályos jogszabályi rendelkezésnek (65/2004. (IV. 27.) FVM-ESzCsM-GKM együttes rendelet) megfelelően végeztem el. Meghatároztam az összes telepszámot, *Escherichia coli* és egyéb coliformok számát, valamint az *Enterococcus*-ok (faecal *Streptococcus*-ok), spórás szulfít-redukáló anaerobok, valamint *Pseudomonas aeruginosa* számát.

#### 3.3.2 Az alkalmazott táptalajok összetétele

##### Fiziológiás sóoldat (0,85%)

Összetevő	Mennyiség (g/l)
Nátrium-klorid	8,50

Végső pH:  $7,0 \pm 0,2$  (25 °C-on)

##### Élesztőkivonat agar (YEA)

Összetevő	Mennyiség (g/l)
Pepton	7,00
Élesztőkivonat	3,00
Agar	15,00

Végső pH:  $7,0 \pm 0,2$  (25 °C-on)

**Epe-Esculin-Azid agar**

<b>Összetevő</b>	<b>Mennyiség (g/l)</b>
Pepton	25,30
Bakteriológiai epe	10,00
NaCl	5,00
Vas-citrát	0,50
Na-azid	0,15
Esculin	1,00
Agar	13,00

Végső pH:  $7,0 \pm 0,2$  (25 °C-on)

**ChromoBio Coliform agar**

<b>Összetevő</b>	<b>Mennyiség (g/l)</b>
Peptonok	3,00
Triptofán	1,00
Szorbit	1,00
NaCl	5,00
Nátrium-piruvát	2,00
Kromogén szubsztrát	0,40
Tergitol 7	0,15
Pufferek	4,90
Agar	13,55

Végső pH:  $6,8 \pm 0,2$  (25 °C-on)

**Slanetz-Bartley agar**

<b>Összetevő</b>	<b>Mennyiség (g/l)</b>
Peptonok	25,00
Glükóz	2,00
Na-azid	0,40
Pufferek	4,00
Agar	12,50

Végső pH:  $7,2 \pm 0,2$  (25 °C-on)

**Cetrimid agar**

<b>Összetevő</b>	<b>Mennyiség (g/l)</b>
Peptonok	25,40
Kálium-szulfát	10,00
Magnézium-klorid	1,40
Cetrimid	0,20
Nalidixsav	0,015
Agar	13,00

Végső pH:  $7,1 \pm 0,2$  (25 °C-on)

**TSC agar**

<b>Összetevő</b>	<b>Mennyiség (g/l)</b>
Triptóz	15,00
Szója-pepton	5,00
Élesztő kivonat	5,00
Nátrium-biszulfit	1,00
Ammónium vas(III)-citrát	1,00
Agar	12,00

Végső pH:  $7,6 \pm 0,2$  (25 °C-on)

**R2A agar**

<b>Összetevő</b>	<b>Mennyiség (g/l)</b>
Proteózpepton	0,50
Kazeinpepton	0,50
Élesztőkivonat	0,50
Glükóz	0,50
Keményítő, vízzoldható	0,50
Nátrium-piruvát	0,30
Magnézium-szulfát, vízmentes	0,024
Dikálium-hidrogén-foszfát	0,30
Agar	14,90

Végső pH:  $7,2 \pm 0,2$  (25 °C-on)

### 3.3.3 A vizsgálatok kivitelezéséhez használt eszközök

- elektrodinamikus rázóberendezés (TIRA TV59355, TIRA GmbH., Németország)
- klímaszekrény (Angelantoni AV600C, Angelantoni Spa., Spanyolország)
- klímaszekrény (ESPEC PR-3ST, Espec, Japán)
- lamináris box
- steril petricsésze (Greiner Bio-One Hungary Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország)
- steril műanyag tölcser membránszűréshez (Merck Life Science Kft., Magyarország)
- Millipore szűrőállvány, vákuum- és nyomópumpa (No. WP6122050) (Merck Life Science Kft., Magyarország)
- FilterBio Steril MCE Gridded Membrane, 0,22  $\mu\text{m}$  és 0,45 $\mu\text{m}$  (Lab-ex Kft., Budapest, Magyarország)
- csipesz
- Termosztát (Binder, Tuttlingen, Németország)
- Autokláv (Webeco, Bad Schartau, Németország)
- Analitikai mérleg (Sartorius, Göttingen, Németország)
- Densiméter (Grant bio DEN-1, Bio Science, Budapest, Magyarország)
- kémcsőrázó
- centrifuga (BioSan Microspin 12, Biocenter Kft., Szeged, Magyarország)

- Eppendorf-cső kupakkal (Greiner Bio-One Hungary Kft. Mosonmagyaróvár, Magyarország)
- Thermo-Shaker (Type: PHMT, Grant Bio, Shepreth Cambridgeshire, United Kingdom)
- Piko Real PCR (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- Piko PCR plate és öntapadós fedő (Biocenter Kft., Szeged)
- mikropipettor
- szűrős pipettahegyek PCR-műveletekhez (DNáz, RNáz, emberi DNS-mentes, nem pirogén, nem citotoxikus) (Greiner Bio-One Hungary Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország)

### 3.4 VIZSGÁLATI MÓDSZEREK

#### 3.4.1 Dinamikus mechanikai rázkódás kísérlet

##### 3.4.1.1 A mechanikai szimuláció paramétereit

A dinamikus mechanikai rázkódás szimulációját időgyorsított és valós idejű vizsgálatokkal modelleztem, teljesítményszintenként 3-3 alkalommal. A vizsgálati paramétereket a 9. táblázat tartalmazza.

**9. táblázat:** A rázóvizsgálatok felépítése

Rázás módja	Rázás ideje (óra)	Pihentetés (óra)	Ismétlés	Hőmérséklet (°C)
Időgyorsított	1	12	4	22±1
Valós idejű	5	19	4	22±1

Az elektrodinamikus rázóberendezésből kikerülő mintákat a mikrobiológiai vizsgálatokig 5±3 °C-on tároltam és ezt a hőmérsékletet a laborba történő szállítás alatt is biztosítottam, hungarocell hőtartó



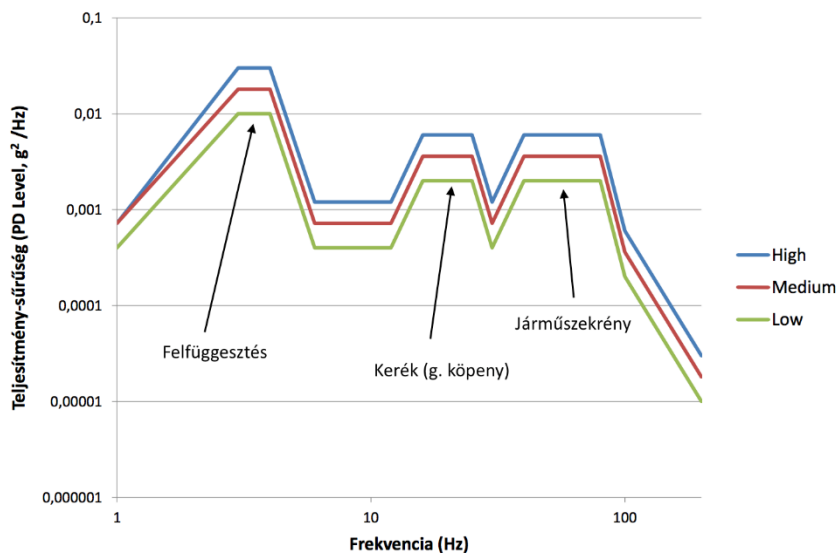
dobozzal és jégakkuval. Mintát minden rázás előtt és után, majd a továbbiakban 24 óránként vettem.

A kontroll minden esetben rázás nélküli,  $22\pm 1$  °C-on tárolt, a rázott mintával azonos palackozási idejű természetes ásványvíz volt.

#### *3.4.1.2 Időgyorsított vizsgálat*

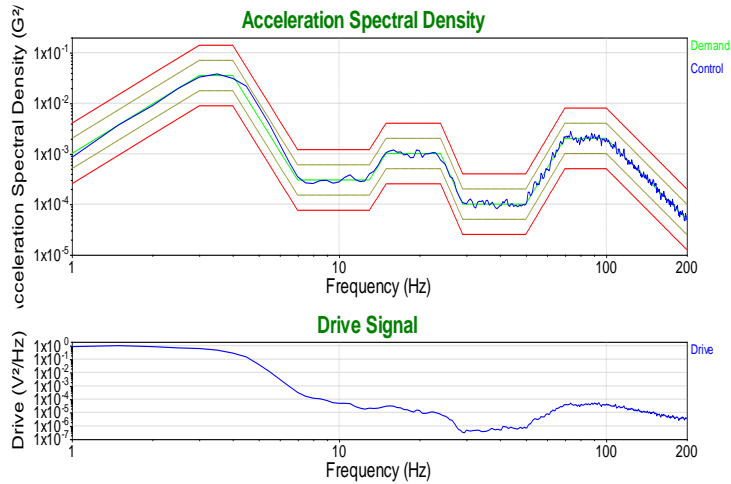
Az értekezésemben a 2.2.1. fejezetben említett környezeti hatások közül a dinamikus mechanikai események, közelebbről a szállítás közben fellépő tartós rezgés jellegű igénybevételek hatásait vizsgáltam szénsavmentes természetes ásványvizeken, abból a célból, hogy megállapítsam a mechanikai agitáció mikrobaszaporodásra gyakorolt hatását. A rázkódások szimulációja során egyszerre klimatikus kondicionálást is végeztem, hogy az ingadozó környezeti paraméterek hatásait mérsékeljem.

Kutatásom során a vizsgálatssorozathoz egy széles körben elterjedt csomagolásvizsgálati szabvány PSD görbét vettem alapul. Ez a szabvány az ASTM D4169-16 (American Society of Testing Materials) laprugóval szerelt nyerges-félpótkocsis szállítás rázómozgásának viszonyait reprodukálja (ASTM, 2016), amely a leginkább jellemző ezen palackozott termékek esetében. Az említett szabvány három eltérő teljesítményszinttel jellemezhető görbét javasol (Low, Medium és High Level). A 15. ábrán a vonatkozó ASTM szabvány PSD burkológörbéi láthatók.



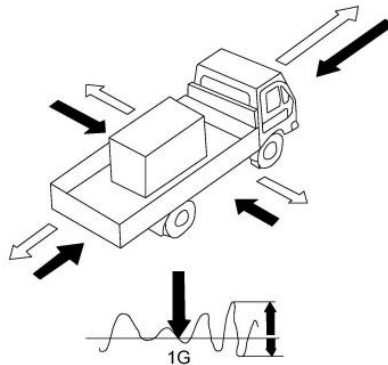
**15. ábra:** A vizsgálatok során alkalmazott ASTM D4169 szabvány PSD burkológörbéi

A 16. ábrán a választott rázóvizsgálati eljárás egy szimuláció során mentett válaszrezgéseinek PSD görbéje látható, amely azt mutatja, hogy a reprodukált rezgés folyamatosan a szabványos értékek által előírt  $\pm 3$ dB tűréshatárai között volt. Az ASTM D4169-es vizsgálati protokoll esetén ezek az értékek a következők: High level: 0,70; Medium level: 0,54; Low level: 0,40.



**16. ábra:** Egy konkrét vizsgálat alatt rögzített PSD profil értékei

Kutatásaim során a függőleges irányú rezgésviszonyt reprodukáltam. (17. ábra)



**17. ábra:** A rázkódások három szabadságfokának irányai közötti tehergépkocsin

A laboratóriumban a rázó igénybevételt szervohidraulikus elven működő rázóasztalon szimuláltam. A rázóasztal 1-200 Hz frekvenciatartományban, maximum 200 mm amplitúdójú különböző jelalakú rezgéseket végez. A rázkódási és klimatikus igénybevétel

laboratóriumi szimulációjához a 18. ábrán szereplő elektrodinamikus rázóberendezést (TIRA TV59355, Atestor Kft., Budapest, Magyarország) és VR Research 1100-as vezérlőt, valamint egy hozzá kapcsolódó klímasekkrényt (Angelantoni AV600C, Atestor Kft., Budapest, Magyarország) használtam. Utóbbi biztosította a rázóvizsgálat során a konstans  $22\pm 1$  °C-os hőmérsékletet. Rázás után a mintákat klímasekkrényben (ESPEC PR-3ST)  $5\pm 3$  °C-on tároltam, hogy a mikrobiológiai státuszuk változását elkerüljem.



**18. ábra:** Rázóberendezés és klímasekkrény

### *3.4.1.3 Rázóvizsgálat időtartama*

A rázóvizsgálatok időtartamának meghatározása során a következő körülményeket vettem figyelembe. Egy adott palack töltését követően a

---

termék a palacktöltő üzemtől számított földrajzilag közeli, illetőleg rendkívül távoli értékesítési pontra is szállításra kerülhet, ezáltal eltérő időt tölthet rázkódási igénybevételnek kitéve.

Itt kell megjegyezni, hogy a szállítás időtartama a valóságban ennél ténylegesen hosszabb időtartamú lehet, a már korábban bemutatott rázóvizsgálatok jellemző PSD görbéi mesterséges teljesítményerősítéssel ún. időgyorsított vizsgálatként funkcionálnak (Shires, 2011). Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy a vizsgálat során a rázkódás leírására alkalmas amplitúdó gyorsulások abszolút értékei nagyobbak. Bár ennek az erősítésnek a pontos arányszáma a számos változó körülmény miatt csak tág határok között adható meg, az általánosan elterjedt vizsgálati protokollok javaslata a vizsgálati időtartamra a várhatóan megtett szállítási távolság kilométer szerinti nyolcadát veszik alapul percben kifejezve (Kipp, 2008). Azaz jelen esetben 60 perc vizsgálati időtartam 480 km távolságként fogható fel.

### **3.4.2 Mikrobiológiai vizsgálatok**

#### *3.4.2.1 Tenyésztési körülmények*

A vizsgált mikroorganizmusokat és a tenyésztéshez használt táptalajokat, valamint az inkubáció körülményeit a 10. táblázatban foglaltam össze. A vizsgálatokat a 10. táblázatban bemutatott szabványok alapján végeztem. Az összes telepképző egység meghatározásához lemezöntést, míg a többi mikroba számának megállapítására membránszűrést alkalmaztam. (19. ábra) A tenyésztéses vizsgálatokat mintánként 3 párhuzamossal végeztem.



**19. ábra:** Membránszűrés

10. táblázat: Vizsgált mikroorganizmusok

Vizsgálati irány	Szabvány	Vizsgált mennyiség (cm <sup>3</sup> )	Táptalaj neve	Inkubáció körülményei		
				hőmérséklet (°C)	idő (h)	körülmény
Összcsíra-szám 22 és 37 °C-on	MSZ EN ISO 6222:2000	1	YEA (Biolab)	22±1 36±1	68±4 44±4	aerob
<i>Escherichia coli</i> és kóliform csírák	MSZ EN ISO 9308-1:2015	250	CC agar (Biolab)	36±1	21±3	aerob
<i>Enterococcus</i>	MSZ EN ISO 7899-2:2000	250	SBA (Biolab)	36±1	44	aerob
			EAA agar (Biolab)	44±0,5	2	aerob
Szulfitredukáló anaerob ( <i>Clostridium</i> ) spóraszám	MSZ EN 26461-2:1994	50	TSCA (Merck)	36±1	75±5	anaerob
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MSZ EN ISO 16266:2008	250	CN agar (Biolab)	36±1	44±4	aerob

YEA: Yeast Extract Agar; CC: ChromoBio Coliform agar; SBA: Slanetz-Bartley Agar; EAA agar: Epe-Aesculin-Azide agar;

TSCA: Tryptose sulfite cycloserine agar, CN: Cetrimid agar

Mivel az irodalmi adatok alapján jelentős eltérés lehet az összes telepképző egység számában a tenyésztéshez használt táptalaj függvényében, kiegészítettem vizsgálataimat az R2A agaron (nem szelektív táptalaj vízminták bakteriológiai vizsgálatára) végzett tenyésztéssel is. (Ramalho et al., 2001) Ebben az esetben az inkubálási idő 7 nap, míg az inkubálási hőmérséklet 30 °C volt.

A természetes ásványvizek mikrobiológiai státuszának mechanikai agitáció okozta változásainak pontosabb megismerése érdekében az eredeti mikrobiom dinamikát modell mikroorganizmussal is meg kívántam vizsgálni. Ennek érdekében az összsejtszám vizsgálatok során kinőtt jellemző telepeket szekvenáltattam és ezzel párhuzamosan az előzetesen elszaporított tiszta tenyészettel fertőztem a modell közegeimet.

#### *3.4.2.2 Tiszta tenyészet készítése*

Az összsejtszám meghatározásakor az élesztőkivonat agarlemezen (YEA) kinőtt szoliter telepekből YEA és R2A agarlemezek felületén ritkító szélesztést végeztem. A lemezeket 22 és 37 °C-on inkubáltam 5 napig. (Handsuh et al., 2017) A szekvenálási eredmények függvényében a kiválasztott telepek tenyészetéből az inokulálást megelőzően 24-48 órával ugyanazon tápközegre átoltást végeztem, hogy friss tenyészeteket kapjak.

#### *3.4.2.3 Inokulum készítése*

A beoltott ásványvízzel végzett rázóvizsgálat előtt az izolált tenyészetekből sűrű mikrobaszuszpenziót készítettem úgy, hogy 100 cm<sup>3</sup>



steril ásványvízbe mostam 2 lemeznyi mikroba tenyészetet, majd Densimeter (Grant bio DEN-1) segítségével a sejtsűrűséget 2 McFU (McFarland Unit: kb.  $6 \times 10^8$  cfu/cm<sup>3</sup>) értékre állítottam be, amiből hígítással  $10^4$  cfu/cm<sup>3</sup> koncentrációjú szuszpenziót készítettem.

#### *3.4.2.4 Mesterségesen inokulált ásványvíz minta készítése*

A frissen palackozott ásványvizet 500 cm<sup>3</sup>-es borosilicat üvegekbe töltöttem, majd 121 °C-on 15 percig autoklávban steriliztem. A szobahőmérsékletűre visszahűtött ásványvízbe üvegenként 1-1 cm<sup>3</sup>, a 3.3. fejezetben ismertetett módon elkészített mikrobaszuszpenziót pipettáztam. A rázás megkezdésekor így a hígítást figyelembe véve a vízminták összsejtszáma  $10^2$  cfu/cm<sup>3</sup> volt.

### **3.4.3 Molekuláris biológiai vizsgálatok**

A mikrobaszám agitáció hatására bekövetkező változását a továbbiakban a tenyésztéses vizsgálatok helyett kvantitatív PCR (qPCR) módszerrel követtem nyomon, melyhez a befertőzéshez használt törzsre specifikus primereket terveztem. Mivel az ásványvizek mikrobaösszetétele egy adott víznyerő helyre jellemző, szükségem volt olyan primer-ekre is, melyek a szekvenálás eredményeként kapott mikroba és a többi, élelmiszeripari szempontból releváns baktérium szekvenciájában jelentős egyezést mutattak, így összcsíra-szám meghatározására is alkalmasak lehetnek.

### *3.4.3.1 DNS tisztítás tenyészetből*

A modell kísérlethez használt mikroba rendszertani besorolásának megállapítására a kísérlet kezdetén leoltott vízminta agarlemezén kinőtt telepekből DNS-t tisztítottam Chelex-100 (Bio-Rad) microbead-ek segítségével Walsh et al. (1991) módszere szerint. Az izolálás során a telepeket fiziológiás sóoldatba tettem át, majd centrifugálás (Microspin 12, BioSan) (6 perc, 11.700 g) és a felülúszó eltávolítása után a pelletre 200 µl 10%-os Chelex-100 oldatot mértem, amit folyamatos rázás (Thermo-Shaker Type: PHMT, Grant Bio) közben 10 percig inkubáltam 100 °C-on. Az inkubációt követően 10.000 g-vel 1 percig centrifugáltam. Az így kapott felülúszót használtam később a qPCR vizsgálatokhoz.

### *3.4.3.2 Mikrobiom szekvenálás*

A tisztított DNS-t a 16S RNS-t kódoló gén felszaporítására általánosan alkalmazható primerekkel (27F/1492R) amplifikáltam, ami egy majdnem 1,5 kilobázis hosszú terméket adott és a rendszertani besorolás szempontjából fontos variábilis szakaszokat lefedte. A DNS-molekula bázissorrendjének meghatározása szolgáltató (Macrogen, Hollandia) bevonásával történt, kapilláris alapú, Sanger típusú szekvenálással (Sanger et al., 1977). Az elektroferogramok eredményét az NCBI (National Center for Biotechnology Information) adatbázis szekvenciáira „blast”-oltam. (Altschul et al., 1997)

### 3.4.3.3 Primer tervezés

A qPCR vizsgálatokhoz használt 2-2 db primer megtervezésében az NCBI adatbázisból kigyűjtöttem a 16S RNS-t kódoló baktérium génszekvenciákat, melyeket összeillesztettem az azonosságok és különbségek megállapításához. A primertervezéshez az *Acidovorax temperans* mellett a 11. táblázatban felsorolt baktériumok szekvenciáit használtam.

**11. táblázat** A primertervezéshez használt mikroorganizmusok

Mikroba	NCBI nyilvántartási szám
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain DSM 50071	NR_026078.1
<i>Escherichia coli</i> strain U 5/41	NR_024570.1
<i>Legionella pneumophila</i>	M36024.1
<i>Sphingomonas aquatilis</i> strain JSS-7	NR_024997.1
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	NR_121697.2

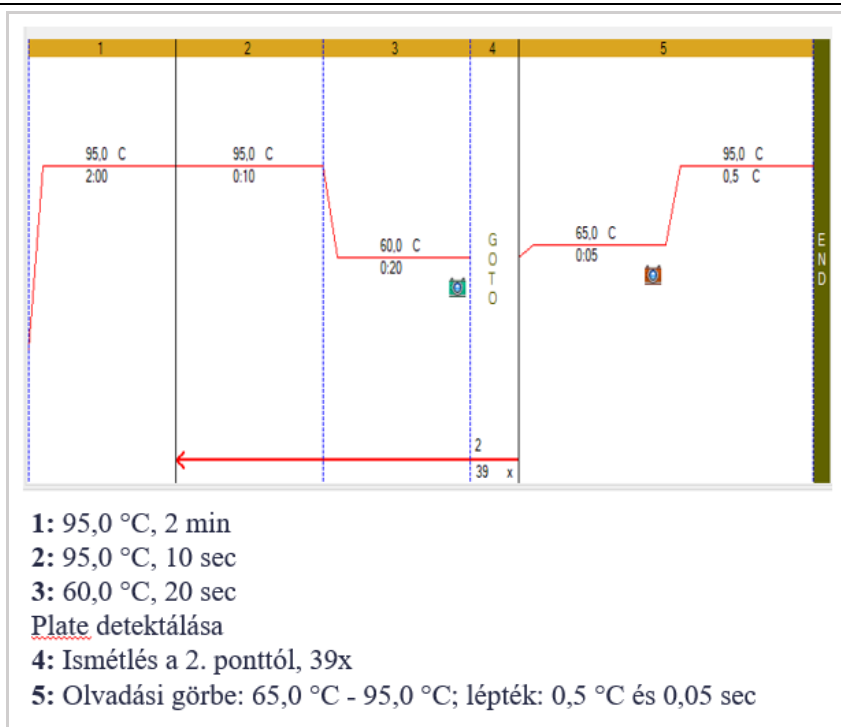
A primertervezés alapját azok a szakaszok adták, melyek az *Acidovorax* és a többi, élelmiszeripari szempontból releváns baktériumok szekvenciájában jelentős eltérést, illetve egyezést mutattak, legalább 20-25 bázis hosszúak és maximum 300 bázispárra találhatóak egymástól a hatékony és specifikus amplifikáció érdekében. A kiválogatott szekvenciák elemzését másodlagos szerkezetek, homológiák megállapítására a Primer7 nevű szoftverrel végeztem. (Dieffenbach et al., 1993; Ye et al., 2012)

#### *3.4.3.4 DNS izolálás ásványvízből*

A vizsgálni kívánt vízmintákból homogenizálás után 1 cm<sup>3</sup>-t 1,5 ml-es steril Eppendorf-csőbe mértem, majd centrifugálás (6 perc, 11.700 g) után a felülúszót eltávolítottam és a pelletre 100 µl 10%-os Chelex-100 oldatot mértem, majd folyamatos rázás közben 10 percig inkubáltam 100 °C-on. Az inkubációt követően 13.000 g-vel 1 percig centrifugáltam. A qPCR vizsgálatokig a tisztított DNS mintákat (felülúszókat) -20 °C-on tároltam.

#### *3.4.3.5 Kvantitatív PCR (qPCR)*

A vízben lévő bakteriális DNS kimutatására a Bioline SensiFAST SYBR No-Rox kitet használtam a gyártó által javasolt módon. Az anellációs hő 60 °C, a szintézis idő 20 másodperc volt (20. ábra). A kimutatás alapja egy interkalálódó festék, ami az egyre szaporodó kettős-szálú DNS termék következtében egyre nagyobb arányban kerül a DNS szálak közé, ahol a gerjesztési energiát már nem tudja mozgási energia formájában leadni, ehelyett egy valamelyest nagyobb hullámhosszú foton kibocsátására kényszerül, amit detektálni tudunk. A ciklusonként változó fényintenzitás ábrázolásával a görbe lefutásából a kezdeti DNS mennyiségek közötti különbségekre (relatív kópiaszám) lehet pontosan következtetni. Ez a módszer megfelelő körültekintéssel, szükség esetén abszolút kópiaszám meghatározásra is alkalmas lehet (Arya et al., 2005).



**20. ábra:** A modell mikroorganizmus qPCR módszerrel végzett detektálásához használt futtatási protokoll

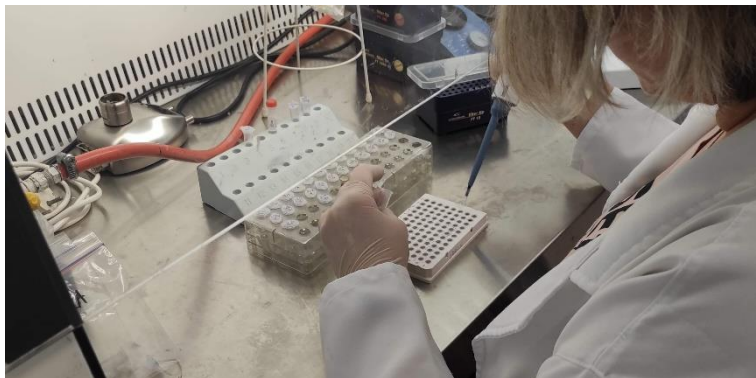
### 3.4.3.6 Mintaelőkészítés qPCR vizsgálathoz

A fagyasztva tárolt, tisztított DNS mintákat szobahőmérsékleten kiolvasztottam, majd 13000 g-val 1 percig centrifugáltam. A qPCR vizsgálathoz szükséges MIX összetételét a 12. táblázat tartalmazza.

**12. táblázat:** A PCR MIX összetétele

Összetevő	Mennyiség ( $\mu$ l/minta)
2xSensiFAST SYBR	5
dH <sub>2</sub> O	2
primer forward	1
primer reverse	1

A PCR-plate minden mintahelyébe 9  $\mu$ l MIX-et valamint a tisztított DNS minták felülúszójából mintánként 1  $\mu$ l-t pipettáztam (21. ábra).



**21. ábra:** A minták bemérése PCR vizsgálathoz

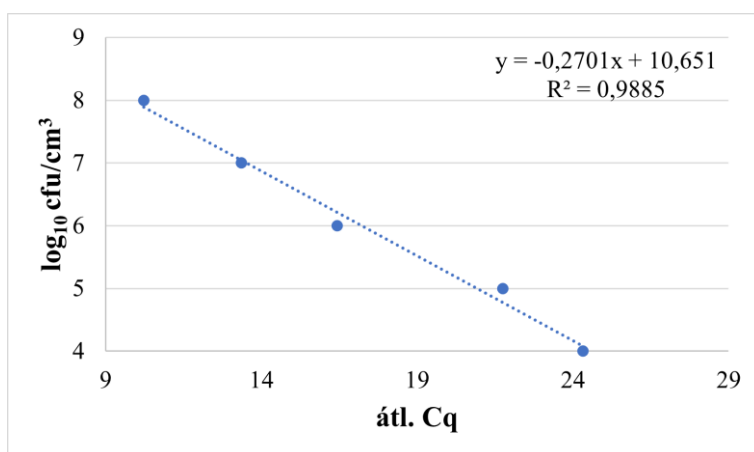
Összejtszám meghatározásához pozitív kontrollnak *E. coli* szuszpenzióból izolált DNS-t, negatív kontrollnak  $\text{dH}_2\text{O}$ -t használtam. Minden mintával 3 futtatást végeztem.

A futtatáskor kapott Cq értékeket a 3.2.3.7. fejezetben ismertetett hígítási sor egyenletét felhasználva log sejtszámra alakítottam át.

#### *3.4.3.7 Standard sor készítése összejtszám meghatározásához*

Ahhoz, hogy a vizsgálatom összejtszám változásának meghatározására alkalmas legyen, *E. coli* szuszpenzióból tízes alapú hígítási sort készítettem, a hígítási tagokból DNS-t izoláltam, amit a 3.2.3.6. fejezetben ismertetett módon qPCR vizsgálatra előkészítettem, majd a 3.2.3.5. fejezetben bemutatott protokoll szerint megfuttattam. Az utolsó 3 hígítási tagból ChromoBio Coliform agarral lemezöntést végeztem. A lemezeket  $36 \pm 1$  °C-on,  $21 \pm 3$  órát inkubáltam, majd meghatároztam az

egy-egy hígítási tagok sejtszámát a 3.6.1. fejezetben ismertetett képlet segítségével. A futtatáskor kapott Cq értékekhez hozzárendeltem az adott hígítási taghoz tartozó logaritmikusan transzformált sejtszámokat (22. ábra).



**22. ábra:** *E. coli* qPCR vizsgálatokban kapott Cq értékei log sejtszámoknak megfelelő standard görbéje

### 3.5 A VIZSGÁLATI ADATOK KIÉRTÉKELÉSE

#### 3.5.1 Telepszám meghatározás

Összsejtszám vizsgálatok esetében a kiértékelésbe csak azokat a lemezeket vontam be, amelyeken a tipikus telepek száma 10 és 300 közé esett. A telepképző egység számot az értékelésbe bevont lemezeken megszámlált telepszámok súlyozott átlagaként határoztam meg a hígítási fok figyelembevételével a (2)-es képlet alapján:

$$\bar{C} = \frac{\Sigma c}{(n_1 + 0,1n_2) \times V \times d}$$

(2)

ahol:

$\bar{C}$ : a telepszám súlyozott középértéke,

$\sum c$ : számításba bevont valamennyi lemez telepeinek összege (a legalacsonyabb és az azt követő kiértékelhető hígítási fokok),

$n_1$ : az első kiértékelhető hígítási fokhoz tartozó lemezek száma,

$n_2$ : a következő kiértékelhető hígítási fokhoz tartozó lemezek száma,

$V$ : az első kiértékelt hígítási szint hígítási foka,

$d$ : a lemezekre vitt inokulum mennyisége

Membránszűrőes vizsgálatok esetében azokat a lemezeket vontam be a számlálásba, melyeken a telepszám 1-150 közé esett. A 10. táblázatban szerepeltetett mintamennyiségekben lévő mikroorganizmusok számát a megerősítő vizsgálatok százalékos arányában adtam meg.

### 3.5.2 A mikrobaszaporodást jellemző paraméterek meghatározása

#### 3.5.2.1 Fajlagos szaporodási sebesség meghatározása

Meghatároztam az egyes mintákban lévő mikrobiom fajlagos szaporodási sebesség értékeit ( $\mu$ ), amit a logaritmizált sejtszámok alapján felvett szaporodási görbék exponenciális szakaszára a legkisebb négyzetek módszerével illesztett egyenesek meredekségéből kaptam. Mértékegysége: 1/h. (Deák és mtsai, 2006)

#### 3.5.2.2 Generációs idő

A 3.5.2.1. fejezetben leírt módszerrel meghatározott fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) és generációs idő ( $t_g$ ) között a kapcsolat függvényeszerű, így



---

ez utóbbi a  $t_g = 1/\mu$  összefüggés segítségével megadható. Mértékegysége: h. (Deák és mtsai, 2006)

### 3.5.3 Alkalmazott statisztikai és ábrázolási módok

Az eredmények feldolgozásához és statisztikai értékeléséhez a Microsoft Excel 365 programját (Microsoft Corporation, USA) használtam. A különböző intenzitáson végzett rázások közötti eltérések statisztikai értékelését F- és Student féle t-próbával végeztem, 95 %-os szignifikancia szinten ( $p < 0,05$ ). Számításaimat kiegészítettem a Mann Whitney U próbával kibővített Kruskal-Wallis teszttel (URL<sup>10</sup>; Kruskal, 1952; Ostertagová et al., 2014), szintén 95 %-os szignifikancia szinten ( $p < 0,05$ ). Az összehasonlítás során Bonferroni korrekciót alkalmaztam.

Az időgyorsított és a valós idejű modell közötti kapcsolat elemzésére regresszióanalízis végeztem.

Egyes adatok szemléltetéséhez bloxpot diagrammot használtam. (URL<sup>11</sup>)

A nagyságrendek könnyebb szemléltetése érdekében a telepszámlálás eredményeit logaritmikus transzformációnak vettem alá.

## 4 EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

### 4.1 A PALACKOZOTT VÍZMINTÁK MIKROBIOM ÖSSZETÉTELE

A telepszámlálások során kapott sejtszám eredményeket a nagyságrendek könnyebb szemléltetése érdekében logaritmikus transzformációnak vettem alá.

Vizsgálataim során sem fekális indikátor fajokat, sem *Pseudomonas aeruginosa*-t, sem pedig mezofil szulfitredukáló spórákat nem mutattam ki a mintákból. Ellentétben Varga (2011) és Molnár et al. (2020) vizsgálataival, akik közül az előbbi vizsgálataiban a szénsavmentes természetes ásványvizek 10,2%-a volt pozitív a specifikus indikátor vagy potenciálisan patogén baktériumok legalább egyikére, míg utóbbinál a vizsgált szénsavmentes ásványvizek 20%-a tartalmazott kóliform mikrobát, 10%-a pedig *Pseudomonas aeruginosa* fajt.

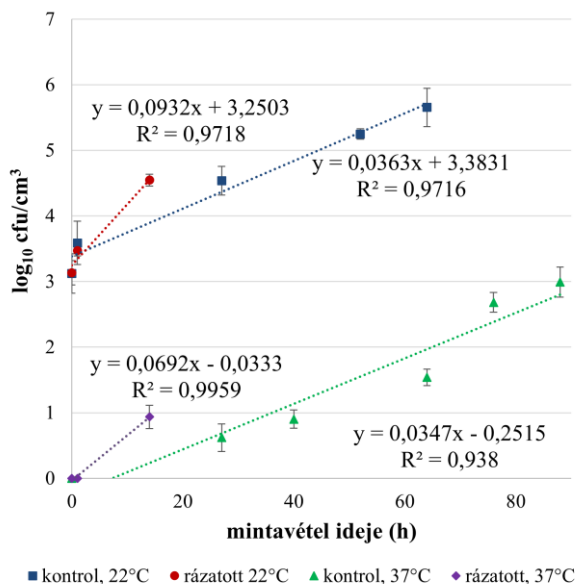
### 4.2 A FRISSEN PALACKOZOTT MINTÁKBAN LÉVŐ MIKROBÁK SZÁMÁNAK VÁLTOZÁSA A RÁZÁS INTENZITÁSÁNAK FÜGGVÉNYÉBEN

Napi termelési körülmények között a palackozóüzem 1,5 l-es PET-palackokat és 19 l-es polikarbonát (PC) ballonokat tölt. A 0,5 l-es PET-palackba kizárólag a kísérlethez palackozták az ásványvizet (alkalmanként 80-100 db palackot) kézi vezérléssel, ugyan azon az ipari gépsoron, amin a kereskedelmi mennyiségű tételek palackozása is történik.

Az alacsony intenzitással rázott mintákban már az első rázás után mikrobiális növekedés volt kimutatható mind az autochton, mind az

allochton mikrobák számát illetően, míg a kontroll minták esetében ez csak az autochton mikrobák esetében volt megfigyelhető. (23. ábra) A mechanikai hatásnak kitett mintában az autochton mikrobák 12 órával korábban érték el a maximális sejtszámot, és egy nagyságrenddel alacsonyabbat, mint a rázás nélküli kontrollban ( $\max. \log_{10} \text{cfu}_{\text{kontroll}}/\text{cm}^3 = 5,65$ ,  $\max. \log_{10} \text{cfu}_{\text{rázatott}}/\text{cm}^3 = 4,56$ ). Az allochton mikrobák esetén a szaporodás exponenciális szakasza lényegesen rövidebb volt, mint a rázás nélküli kontroll mintában. Az elért maximális sejtszámban lévő különbség pedig 2 nagyságrend volt ( $\max. \log_{10} \text{cfu}_{\text{kontroll}}/\text{cm}^3 = 2,99$ ,  $\max. \log_{10} \text{cfu}_{\text{rázatott}}/\text{cm}^3 = 0,94$ ).

Az alacsony intenzitáson rázatott minta esetében 22 °C-on a kontrollhoz viszonyítva az átlagos generációs idő ( $t_g$ ) közel harmadára csökkent ( $t_{g \text{ kontroll}}=27,54$  h;  $t_{g \text{ rázatott}}=10,72$  h). A patogén mikrobák esetében is megfigyelhető a mechanikai agitáció serkentő hatása, de a generációs idő ebben az esetben csak a felére csökkent ( $t_{g \text{ kontroll}}=28,82$  h;  $t_{g \text{ rázatott}}=14,28$  h).



cfu = telepképző egység

**23. ábra:** A kontroll és az alacsony intenzitáson rázatott, frissen palackozott ásványvízminták összcsíra számának változása a szaporodás exponenciális fázisában, 22 és 37 °C-on végzett tenyésztés esetén

Az éhezés, ami az ásványvízben is jellemzi a mikrobákat, nagymértékben befolyásolja a baktériumok DNS tartalmát. A sejtek kedvezőtlen körülmények esetén képesek a nem létfontosságú gének elvesztésére (Albert et al., 1998). Éhezési stressz esetén baktériumok génkiszórási folyamata nagy mértékben felgyorsul, melynek hatására egyes sejtek elpusztulnak, mások viszont gyorsabb szaporodási rátára tesznek szert, a “fölsleges” géntől való megszabadulás által (Morita, 1998; Bridges, 1997). A genom méret csökkentéséből adódó szaporodási előny azonban nem következik be tápanyagban gazdag, stresszmentes környezetben, ami magyarázhatja az általunk tapasztalt megnövekedett generációs időket.

A kontroll mintákhoz képest a rázott mintákban megfigyelt fajlagos szaporodási sebesség növekedése autochton és allochton mikrobák esetén is szignifikáns különbséget mutatott (13. táblázat).

**13. táblázat:** A frissen palackozott és a kontroll ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszára vonatkozó fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) a rázás intenzitásának függvényében

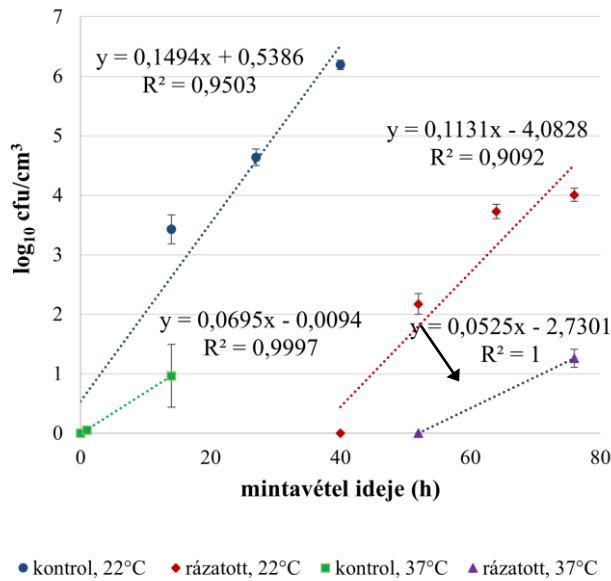
Mikrobacsoport	$\mu \pm SD$ (1/h)			
	A rázás intenzitása			Kontroll
	Alacsony	Közepes	Magas	
Autochton	0,093 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>			0,036 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>
		0,113 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>		0,149 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>
			0,045 $\pm$ 0,004	0,048 $\pm$ 0,004
Allochton	0,069 $\pm$ 0,418 <sup>a</sup>			0,035 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>
		0,053 $\pm$ 0,008		0,070 $\pm$ 0,025
			0,199 $\pm$ 0,034 <sup>a</sup>	0,102 $\pm$ 0,011 <sup>b</sup>

SD (standard deviation = szórás)

<sup>ab</sup>A különböző kitevőjű értékek a sorokon belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

A mechanikus agitáció és a mikrobák növekedésének hatását az ASTM D4169-16 szabvány szerinti közepes intenzitáson vizsgálva a mikrobák szaporodását csak a rázás megszűnte után figyeltem meg mind 22, mind 37 °C-on. (24. ábra). Az autochton mikrobák esetében a mikrobaszám növekedése a mechanikus agitáció megszűnte után 12 órával, míg a szennyező flóra esetében 24 órával később kezdődött. A rázatott mintákban nem volt szignifikáns különbség a fajlagos szaporodási sebességben a kontroll mintához képest (13. táblázat).

Az autochton mikrobák maximális sejtszáma a rázás hatására 2 nagyságrenddel alacsonyabb értéket ért el, mint a kontroll mintában (max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{kontroll}}/\text{cm}^3 = 6,19$ , max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{rázatott}}/\text{cm}^3 = 4,00$ ). Az allochton mikrobák esetében pedig nem volt szignifikáns (max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{kontroll}}/\text{cm}^3 = 0,90$ , max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{rázatott}}/\text{cm}^3 = 1,32$ ).



cfu = telepképző egység

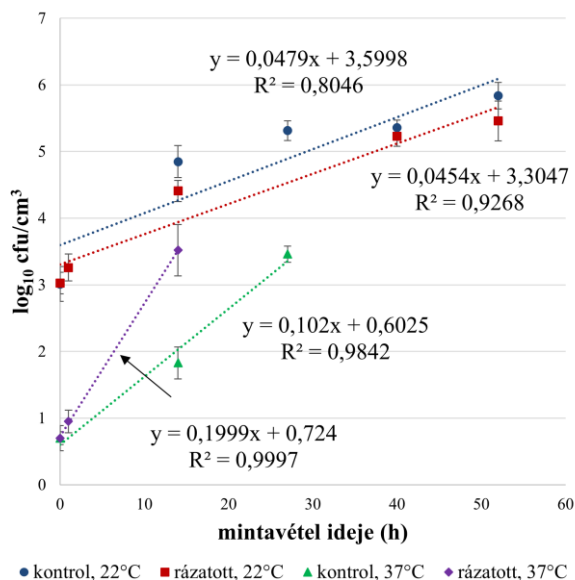
**24. ábra:** A kontroll és a közepes intenzitáson rázatott, frissen palackozott ásványvízminták összcsíra számának változása a szaporodás exponenciális fázisában, 22 és 37 °C-on végzett tenyésztés esetén

A generációs idők a rázatott mintában:  $t_g \text{ autochton} = 8,85$  h ill.  $t_g \text{ allochton} = 18,77$  h, míg a kontrollnál  $t_g \text{ autochton} = 6,7$  h ill.  $t_g \text{ allochton} = 9,1$  h. A rázás hatására az allochton mikrobák generációs ideje megduplázódott.

A magas intenzitással rázott mintában (25. ábra) nem volt különbség az autochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességében és az elért sejtszámban a kontrollhoz képest (max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{kontroll}}/\text{cm}^3 = 5,87$ , max.

$\log_{10} \text{cfu}_{\text{rázatott}}/\text{cm}^3 = 5,46$ ). Ezen az intenzitáson végezve a rázást, a szennyező flóra szaporodása jelentősen felgyorsult a kontrollhoz képest, a fajlagos szaporodási sebesség pedig megduplázódott (13. táblázat). Az allochton fajok 12 órával korábban érték el a maximális sejtszámot, mint a kontroll, azonban nagyságrendi különbség nem volt megfigyelhető (max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{kontroll}}/\text{cm}^3 = 3,46$ , max.  $\log_{10} \text{cfu}_{\text{rázatott}}/\text{cm}^3 = 3,78$ ). Az autochton mikrobák generációs ideje 21-22 h volt, míg az allochton mikrobáké 5 ill. 10 óra és az agitációnak kitett mintában szaporodtak gyorsabban a mikrobák.

Az eredmények értékelésnél figyelembe kell azonban venni, hogy néhány mintánál a tenyésztéses módszerrel kapott kezdeti  $<1,0 \times 10^0 \text{cfu}/\text{cm}^3$  nem azt jelenti, hogy a minta eredetileg nem tartalmazott élő sejteket, hanem azt, hogy azok a szabványos vizsgálat kimutatási határa alatti számban voltak jelen.



**25. ábra:** A kontroll és a magas intenzitáson rázatott, frissen palackozott ásványvízminták összcsíra számának változása a szaporodás exponenciális fázisában, 22 és 37 °C-on végzett tenyésztés esetében

Összehasonlítottam a különböző intenzitással rázott minták esetében megfigyelt fajlagos szaporodási sebességeket.

Az allochton mikrobák esetében az alacsony és magas intenzitású rázás mellett a fajlagos szaporodási sebességben jelentős különbséget találtam (14. táblázat). Ez a különbség figyelhető meg a közepes-magas intenzitások összehasonlításakor is. Hasonló eredményt kaptam az autochton mikrobák esetén (14. táblázat), azzal a különbséggel, hogy az autochton mikrobák magas intenzitásnál szignifikánsan lassabb, míg az allochton mikroorganizmusok szignifikánsan gyorsabb szaporodást mutattak.



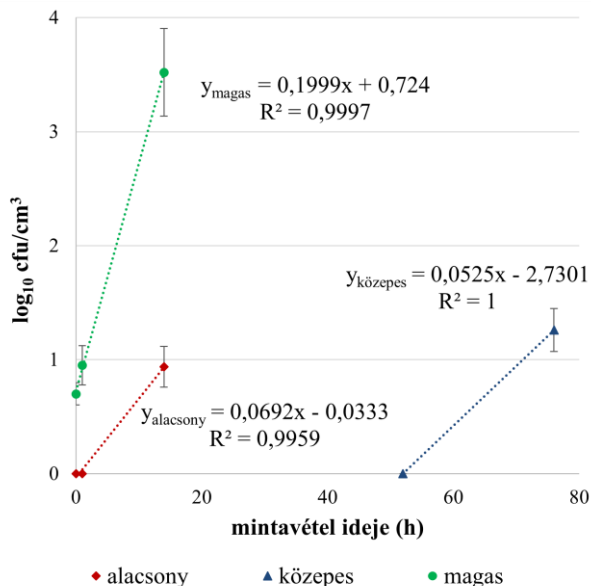
**14. táblázat:** A frissen palackozott ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszára vonatkozó fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) összehasonlítása a vizsgált mikrobacsoporton belül a rázás intenzitásának függvényében

Mikroba	$\mu \pm SD$ (1/h)		
	A rázás intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
Autochton	0,093 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,113 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,045 $\pm$ 0,004 <sup>b</sup>
Allochton	0,069 $\pm$ 0,418 <sup>a</sup>	0,053 $\pm$ 0,008 <sup>a</sup>	0,200 $\pm$ 0,034 <sup>b</sup>

SD (standard deviation = szórás)

<sup>ab</sup>A különböző kitevőjű értékek azonos soron belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

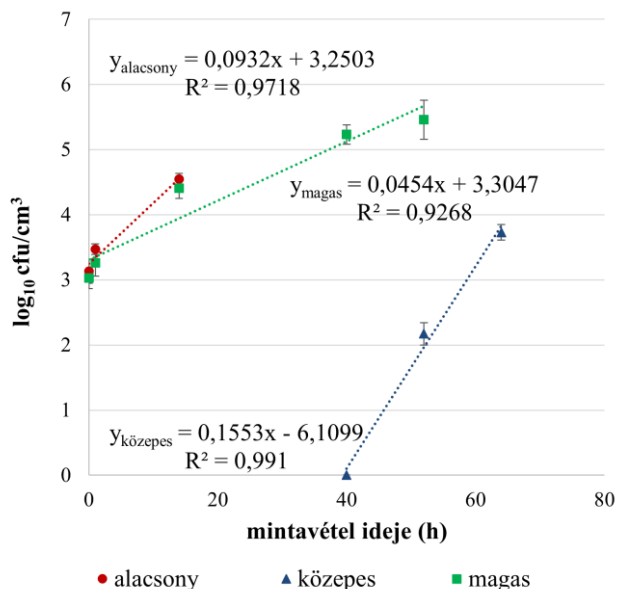
Figyelembe kell azonban venni azt is, hogy a közepes intenzitással rázott minta esetében a kezdeti alacsony sejtszám miatt a mikrobák szaporodása csak a mechanikai hatás megszűnése után kezdődött meg. (26. ábra) A rázás hatására a mikrobaszaporodás lappangási fázisa megnyúlt és a gyors mikrobaszaporodást csak a rázkódás megszűnte után tapasztaltam. A kiindulási minta eltérő értékei miatt a maximális sejtszámok esetében csak azok abszolút növekménye hasonlítható össze. Szembetűnő, hogy a közepes intenzitással rázatott mintában az allochton mikrobák a mechanikai hatás megszűnését követő 24 órán belül elérték a  $10^3/\text{cm}^3$ -es nagyságrendet. Alacsony és a közepes intenzitású rázás esetében az allochton mikrobák sejtszám növekedése egy, míg magas intenzitásnál három nagyságrendnyi volt.



cfu = telepképző egység

**26. ábra:** A frissen palackozott, különböző intenzitással rázott, ásványvíz allochton mikrobaszámában bekövetkező változások a szaporodás exponenciális szakaszában

Az autochton mikrobák szaporodása érdekesen alakult. Közepes intenzitású rázásnál szaporodtak leggyorsabban ( $t_g$  közepes = 6,45 h), amit az alacsony ( $t_g$  alacsony = 10,75 h) követett. Az allochton mikrobák pedig leggyorsabban magas intenzitású rázás mellett szaporodtak ( $t_g$  magas = 22 h) (27. ábra).



cfu = telepképző egység

**27. ábra:** A frissen palackozott, különböző intenzitással rázott ásványvízben lévő autochton mikrobaszámban bekövetkező változások a szaporodás exponenciális szakaszában

Amennyiben az autochton és az allochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességét hasonlítjuk össze a különböző intenzitásokon, akkor azt találjuk, hogy az autochton mikrobák alacsony és közepes intenzitáson szignifikánsan gyorsabban szaporodnak, mint az allochton fajok. Magas intenzitású mechanikai rázkódás hatására viszont az allochton fajok szignifikánsan gyorsabb szaporodással reagáltak, mint az autochtonok. (15. táblázat)

A generációs időkből ez a különbség alacsony intenzitású rázás mellett 1,5-szeres, közepes intenzitású agitációt követően közel kétszeres. Magas intenzitású mechanikai agitáció az autochton mikrobákhoz viszonyítva allochton mikrobák generációs idejét negyedére csökkentette. (16. táblázat)

**15. táblázat:** A frissen palackozott természetes ásványvízben lévő autochton és allochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességének ( $\mu$ ) összehasonlítása a rázási intenzitás függvényében

A rázás intenzitása	$\mu \pm \text{SD}$ (1/h)	
	Mikrobacsoport	
	Autochton	Allochton
Alacsony	0,093 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,069 $\pm$ 0,418 <sup>b</sup>
Közepes	0,113 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,053 $\pm$ 0,008 <sup>b</sup>
Magas	0,045 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,200 $\pm$ 0,034 <sup>b</sup>

SD (standard deviation = szórás)

<sup>ab</sup>A különböző expozíciójú értékek azonos sorokon belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

**16. táblázat:** A frissen palackozott természetes ásványvízben lévő autochton és allochton mikrobák generációs ideje (tg) a rázási intenzitás függvényében

A rázás intenzitása	tg (h)	
	Mikrobacsoport	
	Autochton	Allochton
Alacsony	10,75	14,50
Közepes	8,85	18,87
Magas	22,2	5,00

### 4.3 AZ IZOLÁLT MIKROBA AZONOSÍTÁSA

Az elektroferogrammmok eredményét az NCBI adatbázis szekvenciáira „blast”-oltuk, és egyértelműen, minden telep estén az *Acidovorax temperans* szekvenciájával kaptam 99-100%-os egyezést (2. melléklet). Ezt követően a qPCR alapú kimutatáshoz a szekvenálás eredményeként kapott szekvenciát használtam fel.

Az *Acidovorax* nemzetség a  $\beta$ -proteobaktériumok osztályába tartozik, a *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, 13-as és 16-os E. Falsen

(EF) csoport és számos klinikai izolátum új nemzetsége. (Willems et al., 1990). Az *Acidovorax* spp. és ezen belül az *Acidovorax temperans* szaporodási és biokémiai jellemzőit Willems et al. (2015) foglalták össze. Eddig az összes leírt faj két csoportra osztható, a növénykórokozókra, valamint a vízi és talaj élőhelyeket elfoglaló fajokra. Az *Acidovorax temperans*-t napjainkig szennyvíziszapból, csapvízből, forrásvízből és humán klinikai mintákból (pl. vizeletből) izolálták (Lee, 2013; Gesumaria, 2011; Wisplinghoff, Seifert, 2010), ásványvízből még nem mutatták ki, így az általunk kapott eredmény abszolút újdonságnak számít.

Amint azt Willems et al. (1990) megállapították, az *Acidovorax temperans* szaporodási optimuma 37-42 °C, ezért a beoltott minták rázás utáni tenyésztését 37 °C-on végeztem.

#### 4.4 PRIMERTERVEZÉS

A primertervezés eredményeként (3. melléklet) mind az *Acidovorax temperans* számának, mind az összcsíraszám változásának követésére rendelkezésemre áll 1-1 primerpár.

*Acidovorax temperans* kimutatásához:

- forward primer: 5'-GATGGCAGATTAGGTAGTTGGT-3'
- reverse primer: 5'-G-GTACGGAACGAAAAGACT-3'

Általános primerek az élelmiszeripar szempontjából releváns mikrobák kimutatásához:

- forward primer: 5'-TGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'
- reverse primer1: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAATCCT-3'
- reverse primer2: 5'-GACTACHVGGGTWTCTAATCCTGT-3'

---

#### 4.5 A BEOLTOTT MINTÁKBAN LÉVŐ MIKROBÁK SZÁMÁNAK VÁLTOZÁSA A MECHANIKAI AGITÁCIÓ INTENZITÁSÁNAK FÜGGVÉNYÉBEN

A kontrollhoz képest a rázott minták fajlagos szaporodási sebessége mindhárom intenzitásnál szignifikáns különbséget mutatott (17. táblázat). A mechanikus keverés intenzitásának növekedésével a fajlagos szaporodási sebesség csökkent (28. ábra) és ez a csökkenés az egyes intenzitások között is szignifikáns volt (17. táblázat). Ugyanez a csökkenés megfigyelhető a különböző intenzitású vizsgálatokban az elért maximális sejtszám tekintetében is (max.  $\lg \text{cfu/cm}^3_{\text{alacsony}} = 6,48$ , max.  $\lg \text{cfu/cm}^3_{\text{közepes}} = 5,4$  és max.  $\lg \text{cfu/cm}^3_{\text{magas}} = 4,83$ ). A minták a rázási expozíció során (0-50 óra) minden intenzitásnál elérték a maximális sejtszámot. A növekedés mértéke 3-4 nagyságrend volt.

Az *Acidovorax temperans* generációs ideje a különböző intenzitásokon az alábbiak szerint változott:

$$t_{\text{g alacsony}} = 7,69 \text{ h}$$

$$t_{\text{g közepes}} = 12,35 \text{ h}$$

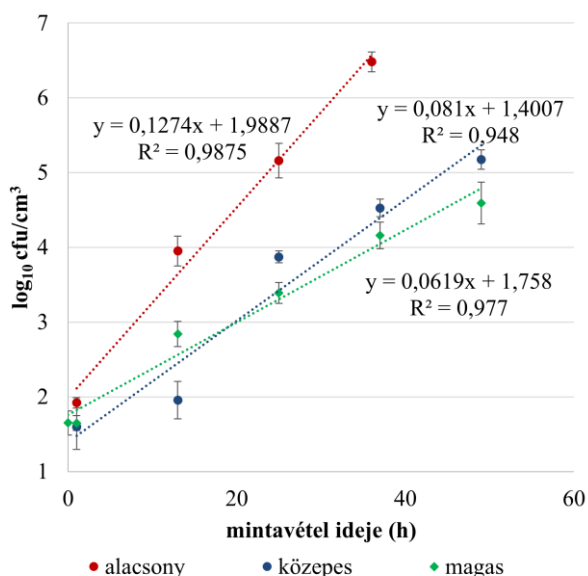
$$t_{\text{magas}} = 16,13 \text{ h}$$

**17. táblázat:** A beoltott ásványvízben a mikrobiális növekedés exponenciális fázisára vonatkozó fajlagos szaporodási sebességek ( $\mu$ ) (1/h) a mechanikai agitáció különböző szintjein

A rezgés intenzitása			Kontroll
Alacsony	Közepes	Magas	
0,130±0,003 <sup>a</sup>	0,081±0,003 <sup>b</sup>	0,062±0,006 <sup>c</sup>	0,186±0,008 <sup>d</sup>

<sup>abcd</sup>A különböző expozíciójú értékek szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

Az *Acidovorax temperans* alacsony intenzitású rázás mellett a 28. ábrán szereplő szaporodási potenciállal jellemezhető.



cfu = telepképző egység

**28. ábra:** Különböző intenzitású rázásnak kitett, beoltott vizek mikrobaszámának változása a szaporodás exponenciális fázisában

A természetes ásványvizekben vegyes mikrobapopuláció van, és mivel vizsgálatomban csak egy baktériumfajt használtam a beoltáshoz, megvizsgáltam, hogy van-e különbség a két mátrix között a rázás által kiváltott fajlagos szaporodási sebesség változásában. Az *Acidovorax*

*temperans* optimális szaporodási hőmérséklete 37 °C, ezért az összehasonlítást a frissen palackozott ásványvíz azonos hőfokon végzett tenyésztéséből kapott mikroba szám eredményeivel végeztem el.

Mindhárom intenzitásnál jelentős különbség volt megfigyelhető a fajlagos szaporodási sebességben a vegyes és a monokultúrát tartalmazó vízminták között (18. táblázat). Magas intenzitású agitáció következtében az allochton mikrobák a frissen palackozott természetes ásványvízben háromszor gyorsabban szaporodtak, mint az *Acidovorax temperans* az inokulált vízben ( $t_{g \text{ friss}} = 5,00 \text{ h}$  és  $t_{g \text{ Acidovorax}} = 16,13 \text{ h}$ ). Az ASTM-D4169 szabvány szerinti alacsony és közepes intenzitásnál az általam izolált baktérium 1,8 ill. 1,6-szor gyorsabban szaporodott ( $t_{g \text{ alacsony}} = 7,87 \text{ h}$  és  $t_{g \text{ közepes}} = 12,35 \text{ h}$ ), mint a frissen palackozott vízben lévő mikroorganizmusok ( $t_{g \text{ alacsony}} = 14,50 \text{ h}$  és  $t_{g \text{ közepes}} = 18,87 \text{ h}$ ).

**18. táblázat:** A fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) a frissen palackozott és beoltott ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában

Minta	A rezgés intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
Frissen palackozott	0,069±0,013 <sup>a</sup>	0,053±0,008 <sup>a</sup>	0,199±0,034 <sup>a</sup>
Beoltott	0,127±0,005 <sup>b</sup>	0,081±0,003 <sup>b</sup>	0,062±0,006 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>A különböző expozíciójú értékek az oszlopon belül szignifikánsan különböznek. ( $p < 0,05$ )

Az inokulált mintában az *Acidovorax temperans* már a vizsgálat kezdetén szaporodásnak indult, míg a frissen palackozott természetes ásványvíz esetében a közepes intenzitáson végzett mechanikai hatás következtében ez csak a rázás befejezése után következett. Feltételeztem, hogy ez



összefüggésben lehet a frissen palackozott víz kezdeti sejtszámával, de mivel az alacsony agitációnak kitett mintában a kezdeti sejtszám ugyanúgy a kimutathatósági határ alatt volt, mint a közepes esetén (26. ábra), arra a következtetésre jutottam, hogy a lappangási fázis ideje összefüggést mutat a kezdeti sejtszámmal és a rázás intenzitásával. Ilyen megközelítésben az alacsony intenzitású mechanikai behatás elősegíti a mikrobaszaporodást vegyes mikrobapopuláció esetén is.

A sejtszámok növekedését nagyságrendileg hasonlítottam össze. A magas intenzitású agitáció mindkét mátrixnál azonos, 3 nagyságrendnyi sejtszámnövekedést eredményezett. Az inokulált mintában alacsony és közepes intenzitású agitáció mellett 3,5 nagyságrendnyi növekedést figyeltem meg, míg ugyanez a friss víz allochton mikrobái esetén csak egy nagyságrendnyi volt.

## **4.6 KVANTITATÍV PCR**

### **4.6.1 Frissen palackozott ásványvízminták valós idejű rázóvizsgálattal kapott eredményeinek elemzése**

A rázás nélküli kontroll mintákban a mikrobaszaporodás lassabb volt, mint a mechanikai agitációknak kitett mintákban. Szignifikáns különbséget alacsony és magas intenzitás mellett tapasztaltam (19. táblázat). A kiindulási sejtszámhoz viszonyítva az exponenciális szakaszban alacsony intenzitásnál fél, magas intenzitásnál 1 nagyságrendi különbséget kaptam. A közepes intenzitású rázásnak pedig nem volt hatása az exponenciális szakaszban elért sejtszámra. Ha a vizsgálat teljes ideje alatt elért maximális sejtszám értékeket

( $\text{átlag} \pm \text{szórás}$ ) hasonlítottam össze, a kontrollhoz viszonyítva nem tapasztaltam különbséget. (20. táblázat)

**19. táblázat:** A fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) a kontroll és a frissen palackozott természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában, valós idejű rázás során

$\mu \pm \text{SD}$ (1/h)			
Kontroll	A vibráció intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
$0,005 \pm 0,001^a$	$0,013 \pm 0,001^b$	$0,006 \pm 0,001^a$	$0,008 \pm 0,003^c$

<sup>abc</sup>A különböző expozíciójú értékek szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

**20. táblázat:** A kontroll és a mechanikus agitációnak kitett, frissen palackozott mintákban elért maximális sejtszám ( $\log_{10} \text{cfu/cm}^3 \pm \text{SD}$ ), valós idejű rázás során

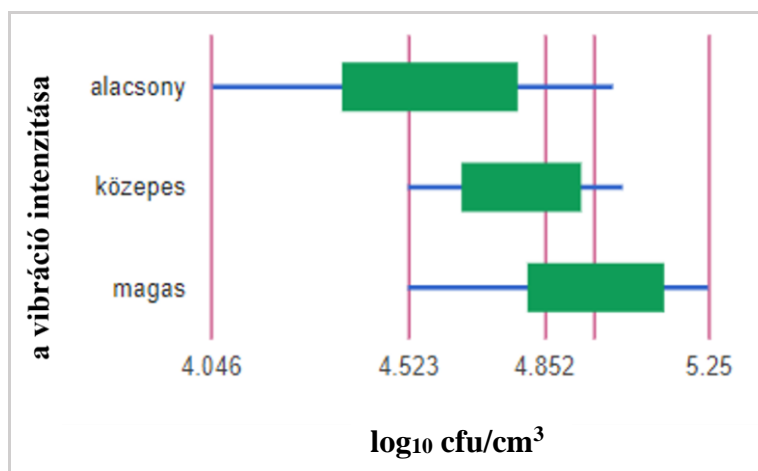
	Az agitáció intenzitása			
	Agitáció nélkül	Alacsony	Közepes	Magas
Sejtszám	$5,49 \pm 0,01$	$5,45 \pm 0,01$	$5,44 \pm 0,02$	$5,51 \pm 0,01$

SD: standard deviation (szórás)

Megvizsgáltam, hogy a különböző intenzitású rázások során a szaporodás exponenciális szakaszában kapott sejtszám értékek különböznek-e egymástól. Szignifikáns különbséget az alacsony és magas intenzitás összehasonlításakor kaptam. (21. táblázat) A legnagyobb átlagos sejtszám értéket ( $4,95 \text{cfu/cm}^3$ ) magas intenzitásnál tapasztaltam. (29. ábra)

**21. táblázat:** Frissen palackozott ásványvízminták valós idejű rázóvizsgálattal kapott sejtszámainak csoportonkénti összehasonlítása a szaporodás exponenciális szakaszában

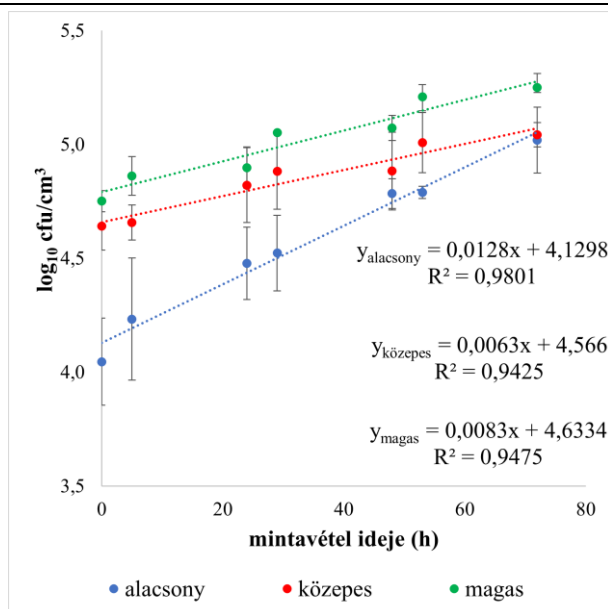
Mintapárok	Különbség	H statisztika	Kritikus érték	p-érték
alacsony-közepes	0,332	2,625	5,7308	0,1052
alacsony-magas	0,4554	4,8348	5,7308	<b>0,0279</b>
közepes-magas	0,1235	2,1618	5,7308	0,1415



cfu = telepképző egység

**29. ábra:** A különböző intenzitáson rázatott frissen palackozott minták átlagos sejtszámainak összehasonlítása

A mechanikai behatás következtében az alacsony intenzitáson rázatott mintában lévő mikrobapopuláció generációs ideje annyira lerövidült ( $t_g$  alacsony = 76,92 h,  $t_g$  közepes = 158,7 h,  $t_g$  magas = 120,5 h) hogy azonos idő alatt ugyanazt a sejtszámot kaptuk, mint a közepes intenzitás esetén, holott a kiindulási sejtszám alacsonyabb volt (30. ábra).



cfu = telepképző egység

**30. ábra:** Különböző intenzitású, valós idejű rázásnak kitett, frissen palackozott természetes ásványvíz mikroba-számának változása a szaporodás exponenciális fázisában

#### 4.6.2 Frissen palackozott ásványvízminták időgyorsított rázóvizsgálattal kapott eredményeinek elemzése

AZ ASTM D-4169-es szabvány különböző intenzitásain végezve a mechanikai behatást a kontrollhoz viszonyítva mindhárom intenzitáson szignifikáns különbséget tapasztaltam. (22. táblázat).

**22. táblázat:** A fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) a kontroll és a frissen palackozott természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában, időgyorsított rázás során

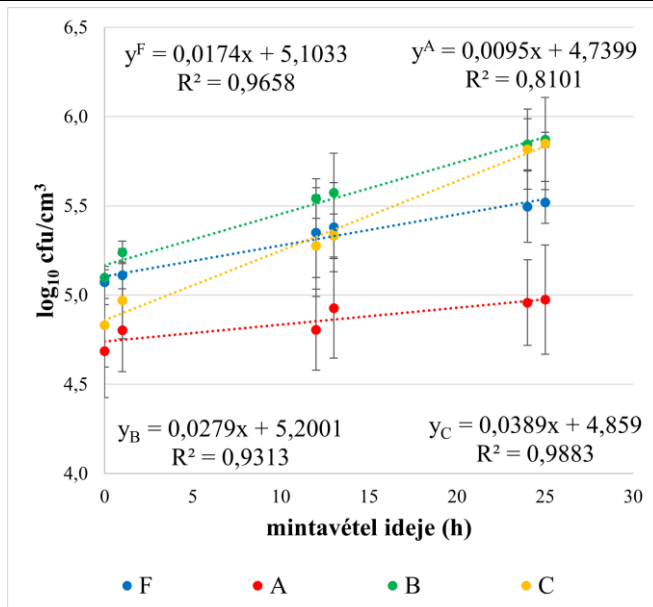
$\mu \pm SD$ (1/h)			
Kontroll	A vibráció intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
0,005 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,017 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,021 $\pm$ 0,006 <sup>b</sup>	0,024 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>A különböző expozíciójú értékek azonos soron belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

A mechanikai behatás következtében a kontrollhoz viszonyított generációs idő ötödére, harmadára csökkent ( $t_g$  kontroll = 200 h;  $t_g$  alacsony = 58,82 h,  $t_g$  közepes = 47,62 h,  $t_g$  magas = 41,67 h)

#### 4.6.3 Időgyorsított rázóvizsgálat frissen palackozott és kereskedelmi forgalomban vásárolt, eltérő palackozási helyű és idejű ásványvízzel

A 31. ábrán jól látszik, hogy a mikrobaszaporodás üteme és az exponenciális szakaszban a sejtszámban elért nagyságrendi változás mintánként eltérően alakult.

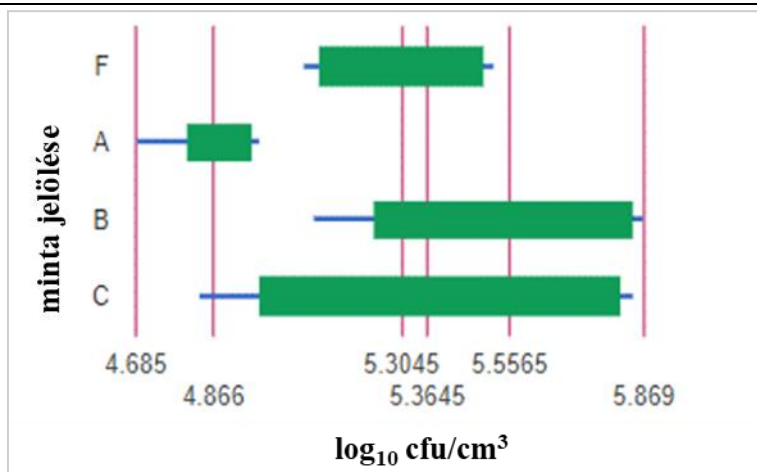


cfu = telepképző egység

**31. ábra:** Frissen palackozott (F) és kereskedelmi forgalomban vásárolt, különböző palackozási helyű és idejű (A, B, C) természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszának összehasonlítása alacsony intenzitású rázás esetén

A csoportok közötti különbségeket a 3.5.3. fejezetben leírt módszerrel összehasonlítva a 23. táblázatban foglaltam össze.

A legnagyobb átlagos sejtszám értéket a „B” és „C” minta esetében kaptam, az „A” minta átlagos sejtszáma volt a legalacsonyabb. (32. ábra)



cfu = telepképző egység

**32. ábra:** A vizsgált minták átlagos sejtszámainak összehasonlítása alacsony intenzitású mechanikai agitáció mellett (F: frissen palackozott; A, B, C: kereskedelmi forgalomban kapható)

**23. táblázat:** A vizsgált ásványvizek sejtszámainak csoportonkénti összehasonlítása alacsony intenzitású agitációnál

Mintapárok	Különbség	H statisztika	Kritikus érték	p-érték
F-A	0,499	8,3077	6,9605	<b>0,0039</b>
F-B	0,192	2,0769	6,9605	0,1495
F-C	0,06	0,1026	6,9605	0,7488
A-B	0,691	8,3077	6,9605	<b>0,0039</b>
A-C	0,439	5,0256	6,9605	<b>0,0250</b>
B-C	0,252	0,641	6,9605	0,4233

A vizsgálat során elért a maximális sejtszámokban három minta (F, B, C) esetén nem tapasztaltam nagyságrendi különbséget (max.  $\log_{10} \text{cfu}_{F,B,C}/\text{cm}^3 = 5,98-6,09$ ), ezzel szemben az „A” minta sejtszáma 1 nagyságrenddel alacsonyabb értéken maximalizálódott (max.  $\log_{10} \text{cfu}_A/\text{cm}^3 = 5,19$ ).

Az ASTM D4169-16 szabvány szerint alacsony intenzitáson végzett mechanikai behatás a fajlagos szaporodási sebességre mintánként különbözően hatott. Az értékeket és a szignifikáns különbségeket a 24. táblázatban mutatom be. Leggyorsabban a „C”, leghalványabban pedig az „A” mintában lévő mikrobapopuláció szaporodott. A frissen palackozott mintánk mikrobapopulációjának fajlagos szaporodási sebessége leginkább az „A” mintához közelített.

**24. táblázat:** Fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) a frissen palackozott és kereskedelmi forgalomban vásárolt, különböző palackozási helyű és idejű (A, B, C) természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában

Minta	$\mu \pm SD$ (1/h)		
	A vibráció intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
F	0,017 $\pm$ 0,001 <sup>ad</sup>	0,021 $\pm$ 0,006 <sup>ab</sup>	0,024 $\pm$ 0,003 <sup>bcd</sup>
A	0,010 $\pm$ 0,002 <sup>aef</sup>	0,027 $\pm$ 0,004 <sup>a</sup>	0,035 $\pm$ 0,002 <sup>be</sup>
B	0,029 $\pm$ 0,007 <sup>ad</sup>	0,032 $\pm$ 0,009 <sup>a</sup>	0,014 $\pm$ 0,005 <sup>bfg</sup>
C	0,039 $\pm$ 0,010 <sup>df</sup>	0,026 $\pm$ 0,007	0,021 $\pm$ 0,001 <sup>g</sup>

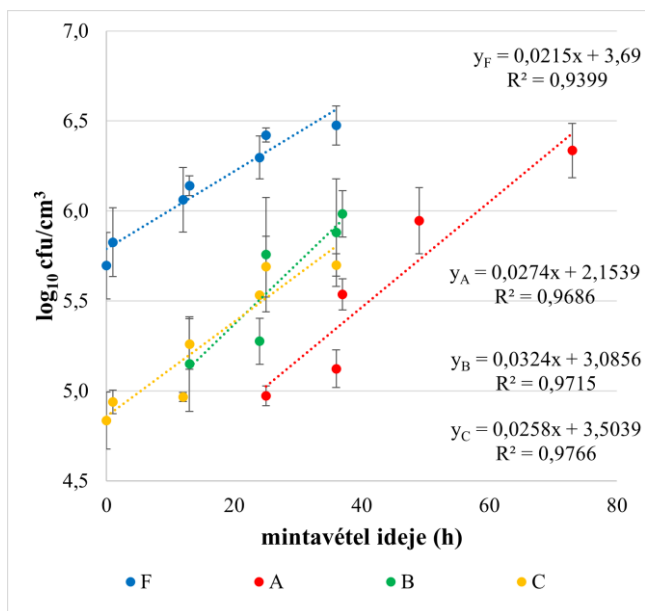
<sup>abc</sup>A különböző expozíciójú értékek azonos sorokon belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

<sup>def</sup>A különböző expozíciójú értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

Közepes intenzitású vibráció esetén a szaporodás exponenciális szakasza minden mintánál megnyúlt, a korábbi 25 óra helyett (31. ábra) 40-70 óra lett (33. ábra). Az „A” mintában a második, a „B” mintában az első 1 órás rázás után kezdtek el szaporodni a mikrobák. A 33. ábrán jól látszik, hogy a kezdeti alacsony sejtszám ellenére ezen a rázási intenzitáson az



„A” minta sejtszáma a szaporodás exponenciális szakaszában több, mint 1 nagyságrenddel magasabb lett, mint alacsony intenzitású agitáció mellett.



cfu = telepképző egység

**33. ábra:** Frissen palackozott (F) és kereskedelmi forgalomban vásárolt, különböző palackozási helyű és idejű (A, B, C) természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszának összehasonlítása közepes intenzitású rázás esetén

A fajlagos szaporodási sebességekben közepes intenzitáson nem tapasztaltam szignifikáns különbséget. (24. táblázat)

A csoportok sejtszámai közötti különbségeket a 25. táblázatban foglaltam össze.

**25. táblázat:** A vizsgált ásványvizek sejtszámainak csoportonkénti összehasonlítása közepes intenzitású agitációnál a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában

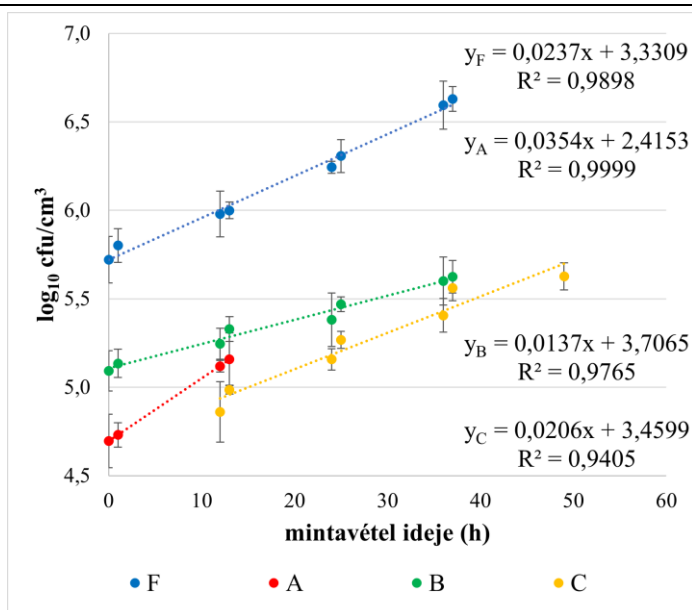
Mintapárok	Különbség	H statisztika	Kritikus érték	p-érték
F-A	0,60	2,9077	6,9605	0,088
F-B	0,38	4,1209	6,9605	0,042
F-C	0,88	9,4248	6,9605	<b>0,002</b>
A-B	0,22	0,0982	6,9605	0,754
A-C	0,28	1,2968	6,9605	0,255
F-C	0,50	2,9077	6,9605	0,088

A vizsgálat során elért a maximális sejtszámok  $\max. \log_{10} \text{cfu/cm}^3 = 6,2-6,7$  között mozogtak, valamivel magasabb értéken, mint alacsony intenzitású rázás mellett.

Magas intenzitású mechanikai agitáció esetén a szaporodásban lappangási szakaszt csak a „C” jelű mintánál figyeltem meg. A gyors mikrobaszaporodás az „A” mintánál az első 13 órában lezajlott, a másik három minta esetében ez kb. 36 óra volt. (34. ábra)

A fajlagos szaporodási sebességben az „F” és „C” mintapár kivételével minden esetben szignifikáns különbséget tapasztaltam. (25. táblázat)

A csoportok sejtszámai közötti különbségeket a 26. táblázatban foglaltam össze.



cfu = telepképző egység

**34. ábra:** Frissen palackozott (F) és kereskedelmi forgalomban vásárolt, különböző palackozási helyű és idejű (A, B, C) természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszának összehasonlítása magas intenzitású rázás esetén

**26. táblázat:** A vizsgált ásványvizek sejtszámainak csoportonkénti összehasonlítása közepes intenzitású agitációnál

Mintapárok	Különbség	H statisztika	Kritikus érték	p-érték
F-A	1,197	7,3846	6,9605	<b>0,0066</b>
F-B	0,766	11,2941	6,9605	<b>0,0008</b>
F-C	0,853	10,50	6,9605	<b>0,0012</b>
A-B	0,431	4,875	6,9605	<b>0,0273</b>
A-C	0,344	2,8929	6,9605	0,0890
B-C	0,087	0,2143	6,9605	0,6434

Megvizsgáltam az egyes mintákban is a fajlagos szaporodási sebesség és az intenzitások közötti összefüggést. A mintákon belül az egyes

intenzitásokon tapasztalt fajlagos szaporodási sebességben szinte minden esetben szignifikáns különbséget tapasztaltam, kivéve a frissen palackozott minta alacsony-közepes páros összehasonlításnál is. Egyedül a „C” mintánál figyeltem meg, hogy az agitáció intenzitásának növelésével a fajlagos szaporodási sebesség nőtt. Az „A” mintánál ennek az ellenkezőjét kaptam, az intenzitás növelésével csökkent ezen paraméter értéke.

Az exponenciális szakaszok fajlagos szaporodási sebességéből számított generációs időket a 27. táblázatban foglaltam össze.

**27. táblázat:** A generációs idő (tg) a frissen palackozott és kereskedelmi forgalomban vásárolt, különböző palackozási helyű és idejű (A, B, C) természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában

Minta	tg (h)		
	A vibráció intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
F	57,47	46,51	42,22
A	105,26	53,98	28,22
B	35,84	30,90	73,09
C	25,71	38,82	48,59

#### 4.6.4 Frissen palackozott ásványvízminták valós idejű és időgyorsított rázóvizsgálatának elemzése

A korábban bemutatott időgyorsított (4.6.1. fejezet) és valós idejű (4.6.2. fejezet) rázóvizsgálatok eredményeit összehasonlítva, elmondhatom, hogy a frissen palackozott ásványvíz esetén a fajlagos szaporodási sebesség mindhárom intenzitáson szignifikáns különbséget mutat. (28.

táblázat) Az ASTM D4169-es szabvány mindhárom intenzitásán kivitelezett időgyorsított vizsgálat szignifikánsan gyorsabb szaporodást, ebből kifolyólag rövidebb generációs időt eredményezett. (29. táblázat)

**28. táblázat:** A fajlagos szaporodási sebesség ( $\mu$ ) a valós idejű és az időgyorsított vizsgálat hatására a frissen palackozott természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában

Módszer	$\mu \pm SD$ (1/h)		
	A vibráció intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
Időgyorsított	0,017 $\pm$ 0,001 <sup>a</sup>	0,022 $\pm$ 0,006 <sup>a</sup>	0,024 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>
Valós idejű	0,013 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,006 $\pm$ 0,001 <sup>b</sup>	0,008 $\pm$ 0,003 <sup>b</sup>

SD – standard deviation (szórás)

<sup>ab</sup>A különböző expozíciójú értékek azonos oszlopon belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

**29. táblázat:** A generációs idő ( $t_g$ ) a frissen palackozott természetes ásványvízben a mikrobaszaporodás exponenciális szakaszában valós idejű és időgyorsított mechanikai agitáció esetén

Módszer	$t_g$ (h)		
	A vibráció intenzitása		
	Alacsony	Közepes	Magas
Időgyorsított	57,47	46,51	42,19
Valós idejű	78,12	158,73	120,48

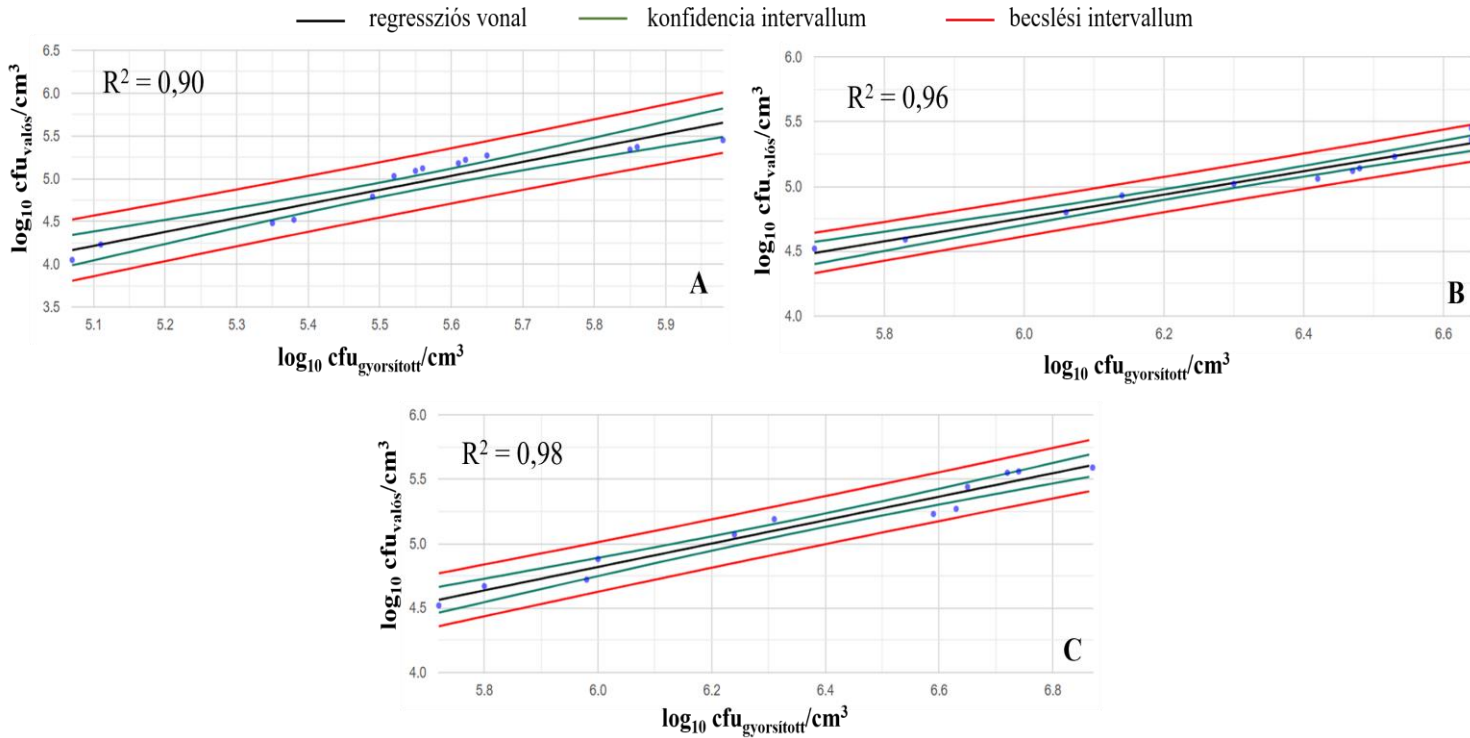
Közepes és magas intenzitásokhoz tartozó sejtszámnövekmény mértéke (30. táblázat) a valós idejű és az időgyorsított vizsgálati módszer között megegyezik. Alacsony intenzitású valós idejű rázás fél nagyságrenddel nagyobb sejtszámbeli változást idézett elő.

**30. táblázat:** A teljes időtartamra vetített sejtszámváltozás a valós idejű és az időgyorsított modellezés esetén

A mechanikai behatás intenzitása	Sejtszámváltozás ( $\log_{10}$ dcfu/cm <sup>3</sup> )	
	<i>Módszer</i>	
	Valós	Időgyorsított
Alacsony	0,90 <sup>a</sup>	1,40 <sup>b</sup>
Közepes	0,94 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>
Magas	1,15 <sup>a</sup>	1,07 <sup>a</sup>

<sup>ab</sup>A különböző expozíciójú értékek azonos soron belül szignifikánsan különböznek ( $p < 0,05$ )

A 35. ábrán jól látható, hogy az időgyorsított mechanikai agitációkkal jó közelítéssel jellemezhetők a valós idejű mechanikai rázkódások okozta sejtszámváltozások. Az intenzitás növekedésével a vizsgált változó regressziója is egyre nagyobb mértékű, melyet jól szemléltetnek az illesztett görbék  $R^2$  értékei ( $R^2_{\text{alacsony}} = 0,90$ ;  $R^2_{\text{közepes}} = 0,96$ ;  $R^2_{\text{magas}} = 0,98$ ). Mindezek alapján elmondható, hogy az alkalmazott ASTM D-4169-es szabvány a sejtszámváltozások tekintetében alkalmas a valós idejű mechanikai igénybevétel három teljesítményszintű modellezésére.



**35. ábra:** Az időgyorsított és valós idejű mechanikai agitációk okozta sejtszámváltozások regressziója és konfidencia intervalluma ( $p < 0,05$ ) a vizsgált intenzitásokon (A: alacsony; B: közepes; C: magas)

Az egyes vizsgálatok között több hét, de akár több hónap is eltelt, ami hatással lehetett a víznyerő helyek mikrobaösszetételére, mint azt Carraturo et al. (2021) is megfigyeltek a különböző évszakokban, ugyanazon helyről vett vízminták esetében. Mindez a mikrobák közötti kölcsönhatásokon keresztül a kezdeti sejtszámra is hatással lehet, amelyet a saját mintáim vizsgálati eredményei esetében is tapasztaltam.

A vizsgált frissen palackozott mintáknál minden esetben megfigyelhető a palackozás utáni mikrobaszaporodás, amelyről már más tanulmányok is beszámoltak (Falcon-Dias, Filho, 2013; Otterholt, Charnock, 2011; Varga, 2011; Leclerc, Moreau, 2002; Bischofberger and al., 1990). A maximális sejtszámot időgyorsított vizsgálat esetén a palackozás után néhány nappal detektáltam, amely megegyezik Rosenberg (2003), Némedi (2006) és Leclerc, Moreau (2002) által leírtakkal, valós idejű mechanikai agitáció esetén pedig 1-2 héten belül, ahogy azt Moreira et al. (1994), Armas and Southerland (1999) és Bharath et al. (2003) is tapasztalták. A maximális sejtszámok hagyományos tenyésztéssel vizsgálva a fenti publikációknak megfelelően  $10^4$ - $10^5$  cfu/cm<sup>3</sup> volt, míg qPCR-rel detektálva  $10^5$ - $10^7$  cfu/cm<sup>3</sup> értéket kaptam. Utóbbinál meg kell jegyezni, hogy jelen vizsgálatban az élő és holt sejtek elkülönítése nem történt meg.



---

## 5 KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálataim során sem fekális indikátor fajokat, sem *Pseudomonas aeruginosa*-t, sem pedig mezofil szulfitredukáló spórákat nem mutattam ki egyetlen mintából sem. Figyelembe kell azonban venni, hogy a tenyésztéses módszerrel a vizsgálatok elején kapott  $<1,0 \times 10^0$  cfu/cm<sup>3</sup> nem azt jelenti, hogy a minta eredetileg nem tartalmazott élő sejteket, hanem azt, hogy azok a standard vizsgálat kimutatási határértéke alatti számban, esetleg VBNC állapotban voltak jelen.

Kísérleteimben a mintákban megfigyelt fajlagos szaporodási sebesség csökkenése valószínűleg nemcsak a mechanikai hatás intenzitására, hanem az alkalmazott szimuláció időbeli felgyorsulására is visszavezethető.

Az előkísérletben végzett, tenyésztéses vizsgálatok során arra a következtetésre jutottam, hogy az időgyorsított mechanikus rázkódás gyorsítja mind az autochton, mind az allochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességét, a hatás pedig függ az agitáció intenzitásától. Bár az időgyorsított, közepes és nagy intenzitású mechanikai behatás nem okozott jelentős változást a frissen palackozott ásványvíz maximális sejtszámában, az allochton fajok fajlagos szaporodási sebessége nagy intenzitású rázásakor megduplázódott. Az allochton fajok számának növekedése a palackozott ásványvízben egyértelműen káros a fogyasztók egészségére, figyelembe véve azt is, hogy egyes fajok száma a vízben akár fél évig, vagy tovább is stabilizálódhat, mielőtt csökkenni kezd.

A második kísérletben egy a friss palackozású ásványvízből izolált mikrobával inokuláltam az előzőleg sterilizált ásványvizet. A mechanikus agitáció intenzitásának növekedésével a fajlagos szaporodási

sebesség szignifikánsan csökkent a monokultúrát tartalmazó vízben, ennek ellenére alacsony és közepes intenzitáson a vegyes mikrobiom tartalmú friss vízhez képest szignifikánsan gyorsabb volt a vizsgált mikroba fajlagos szaporodási sebessége.

A természetes ásványvízben lévő mikroorganizmusok közötti kölcsönhatások magyarázatot adhatnak a frissen palackozott és a mesterségesen inokulált ásványvíz közötti különbségekre is, melyek a különböző intenzitású sokkhatások miatt szaporodási és sejtszámbeli különbségekben manifesztálódtak.

A tenyésztéssel párhuzamosan az izolált mikroba azonosítását is elvégeztem.

Mivel az ásványvizek mikrobiomjában nem általános az *Acidovorax spp.*, qPCR vizsgálataimat a természetes ásványvízből izolált mikroba azonosítását követő primertervezés során kapott általános primerekkel végeztem. Az így felállított qPCR módszer alkalmas a vízben lévő sejtszám meghatározására, amennyiben ismert koncentrációjú pl. *E. coli* szuszpenzióból készült hígítási sort párhuzamosan futtatva meghatározzuk az egyes hígításokhoz tartozó C<sub>q</sub> értékeket.

A mechanikai agitáció intenzitására az eltérő palackozási helyű és idejű mintánk különbözőképpen reagáltak, aminek magyarázata lehet a víznyerő helyekre jellemző, eltérő geno- és fenotípusos összetételű mikrobapopuláció, valamint a palackozástól eltelt idő. Ez utóbbi függvényében változik az adott mikrobiomon belül a mikroorganizmusok aránya, ami szintén magyarázhatja a különböző természetes ásványvizek esetén a szaporodási sebességben tapasztalt különbségeket. Az elért sejtszámban nem tapasztaltam szignifikáns különbséget az egyes minták

között, az az irodalmi adatoknak megfelelően  $10^5$ - $10^6$  cfu/cm<sup>3</sup> értéken maximalizálódott.

Az általam használt general primerek alkalmasak a vízben lévő mikrobák számában bekövetkező változások monitorozására. Ugyan jelen vizsgálatsorozatban az élő és a holt sejteket együttesen vizsgáltam, de ez nem befolyásolta a mikrobaszaporodás változásának leírását és nyomkövetését.

A szaporodás exponenciális szakaszában az ASTM D-4169-16-os szabvány szerint kivitelezett időgyorsított vizsgálat során a fajlagos szaporodási sebességre minden intenzitáson szignifikánsan gyorsabb szaporodást kaptam, mint a valós időben végzett agitációkor. A sejtszámok időbeli változása a két módszer között szoros összefüggést mutatott. Mindezek alapján az időgyorsított módszer alacsony, közepes és magas intenzitáson alkalmas a valós időben végbemenő mechanikai agitáció mikrobiom változásra gyakorolt hatásának modellezésére.

## **5.1 JAVASLATOK**

A tenyésztéskor kapott kezdeti alacsony sejtszám oka lehet a VBNC állapot, aminek következtében a szaporodási sebességben különbséget tapasztaltam a tenyésztéses és a kvantitatív PCR vizsgálatokkal kapott eredményekben. A polimeráz láncreakció gyors és érzékeny technika az élelmiszerben lévő mikrobák kimutatására (Elizaquível et al., 2011), azonban nem tud különbséget tenni az életképes és az elhalt sejtek között (Elizaquível et al., 2012), így az elhalt baktériumokból származó DNS templátként szolgálhat a PCR-amplifikáció során. Ez az életképes sejtek számának túlbecslését okozza a mintákban (Masters et al. 1994; Nogva et

al., 2003). Ahhoz, hogy tényleges mikrobaszámot kapjunk, a vizsgálat során el kell különíteni az élő és a holt sejtek DNS-ét. Erre nyújt megoldást a qPCR-PMA módszer. A módszer a propidium-monoazid (PMA) használatán alapul, amely a propidium-jodid (PI) származéka, és általánosan használt az elhalt sejtek megfestésére a mikroszkópos vizsgálatok során, illetve az áramlási citometriában. A PMA behatol az integritásukat veszített membránokba, és ha a dsDNS (kettős szálú DNS)-PMA komplexet erős, látható fényt használva fotoaktiválják, a monoazid-csoport könnyen reagál bármely szénhidrogén-csoporttal, stabil kovalens kötés képződik, ami hajlamosít a térhálósodásra. (Nocker et al. 2006) A DNS ezen állandó módosítása, megakadályozza a PCR-reakció templátjaként való alkalmazását. (Álvarez et al. 2013; Loozen et al. 2011) A PCR-PMA vizsgálat eredményét ugyan az élelmiszerekben lévő PCR-gátlók befolyásolhatják (Yang et al., 2014), ami azonban víz esetében nem érvényesül.

Amennyiben a vízben lévő patogén mikrobák számát szeretnénk meghatározni, az általunk használt general primerek helyett fajspecifikus primerek használata szükséges.

A továbbiakban érdemes kiterjeszteni a vizsgálatot egyéb mátrixok – mint például a sör, a bor és a tej - mikrobiológiai státuszának nyomonkövetésére, melyeknél a szállítás hatására bekövetkező fizikai-kémiai változások bizonyítottan befolyásolják a belőlük előállított termék minőségét.

---

## 6 ÖSSZEFOGLALÁS

Dolgozatomban a szállítás közben fellépő mechanikai igénybevételek ásványvízre - elsősorban a mikrobiomra - gyakorolt hatását vizsgáltam. Már eddig is tapasztalták, hogy a rázkódás sok esetben negatívan befolyásolja az élelmiszerek fiziko-kémiai tulajdonságait, amelyek az alacsony viszkozitású mátrixok esetében (mint amilyen a víz is) fizikailag nem látható elváltozásokban nyilvánulnak meg. A szállítási igénybevételektől függő mikrobiológiai státuszt egy északnyugat-magyarországi palackozó termékével kezdtem el vizsgálni. A mechanikai behatást egyrészt valós idejű rázóvizsgálattal végeztem, másrészt az ASTM D4169-16 szabvány szerint kivitelezett időgyorsított vizsgálattal modelleztem. A mikrobaszámban bekövetkező változásokat hagyományos tenyésztéses eljárással, valamint qPCR-rel követtem. A tenyésztéses módszer rávilágított arra, hogy az időgyorsított mechanikus rázkódás gyorsítja mind az autochton, mind az allochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességét, a hatás pedig függ az agitáció intenzitásától. Az allochton fajok számának növekedése a palackozott ásványvízben egyértelműen káros a fogyasztók egészségére. Az első kísérlettel párhuzamosan azonosítottam a vízből izolált baktériumot. A szekvenáláskor kapott eredményt felhasználva 2 olyan primer párt terveztem, amivel egyrészt az azonosított baktériumot, másrészt a vízben lévő összes baktérium mennyiségét meg tudtam határozni. Optimalizáltam a qPCR vizsgálat paramétereit.

Mivel az általam azonosított baktérium, *Acidovorax temperans*, nem általános az ásványvízben, kutatásom második vizsgálatához különböző palackozási helyű és idejű, kereskedelmi forgalomban kapható

ásványvizek és a korábban már említett frissen palackozott ásványvíz mechanikai igénybevételtől függő összehasonlító vizsgálatát végeztem el. Különböző palackozási helyű és idejű vizek esetén a fajlagos szaporodási sebesség vizenként és intenzitásonként szignifikánsan változott, ami igazolja, hogy az adott víznyerőhely mikrobiomjának összetétele, illetve a mikrobák közötti kölcsönhatás befolyásolja a mechanikai behatásra adott válaszokat.

Annak meghatározására, hogy a logisztikában általánosan elterjedt csomagolásvizsgálati szabványt alkalmazhatjuk-e az élelmiszerek mikrobiológiai tulajdonságaiban bekövetkező változások vizsgálatához, elvégeztem a valós idejű és az időgyorsított vizsgálatok összehasonlítását. Az időgyorsított vizsgálat az ASTM D4169-16-os szabvány mindhárom intenzitásán szignifikánsan növelte a fajlagos szaporodási sebességet, a kezdeti és a maximális sejtszám közötti különbség azonban a valós idejű rázásnak megfelelően alakult.

Összefoglalóan megállapítható, hogy a dinamikus mechanikai rázkódás hatással van az ásványvíz mikrobiomjára, befolyásolva annak szaporodási sebességét, illetve generációs idejét. Az időgyorsított mechanikai agitációkkal jó közelítéssel jellemezhetők a valós idejű mechanikai rázkódások okozta sejtszámváltozások. Az intenzitás növekedésével a vizsgált változó regressziója is egyre nagyobb mértékű. Mindezek alapján elmondható, hogy az alkalmazott ASTM D-4169-es szabvány a sejtszámváltozások tekintetében alkalmas a valós idejű mechanikai igénybevétel három teljesítményszintű modellezésére.

Az általam alkalmazott vizsgálati protokoll lehetővé teszi a sejtszámban bekövetkező változások qPCR-rel való nyomonkövetését. Porodiu-

---

monoazid festéssel kiegészítve alkalmas lehet az élő sejtek számában bekövetkező változások vizsgálatára.

---

## 7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. *Acidovorax temperans* baktériumot izoláltam egy északnyugat-magyarországi palackozóból származó természetes ásványvízből. Az *Acidovorax temperans*-t napjainkig szennyvíziszapból, csapvízből, forrásvízből és humán klinikai mintákból (pl. vizeletből) izolálták, de természetes ásványvízből még nem mutatták ki.

2. Az északnyugat-magyarországi palackozóból származó természetes ásványvízben lévő mikrobiom generációs ideje, hagyományos tenyésztéses vizsgálattal, a szaporodás exponenciális szakaszában mechanikai agitáció nélkül 6,71-28,57 óra között változott, mely jelentősen különbözik az egyes vízben fellelhető mikrobák jellemző generációs idejétől (20-40 perc).

3. A dinamikus mechanikai agitáció intenzitástól függően befolyásolja a természetes ásványvízben lévő autochton és allochton mikrobák szaporodását. Az autochton mikrobák az ASTM D-4169-16-os szabvány alacsony és közepes intenzitásán végzett mechanikai agitáció hatására gyorsabban szaporodnak ( $\mu_{\text{alacsony}} = 0,093$  1/h és  $\mu_{\text{közepes}} = 0,113$  1/h), mint az allochton fajok ( $\mu_{\text{alacsony}} = 0,063$  1/h és  $\mu_{\text{közepes}} = 0,053$  1/h). Szabvány szerinti magas intenzitáson végzett dinamikus mechanikai rázkódás az allochton mikrobák fajlagos szaporodási sebességét ( $\mu_{\text{allochton}} = 0,200$  1/h) az autochton ( $\mu_{\text{autochton}} = 0,045$  1/h) populációéhoz képest négyszeresére növeli, mely potenciális egészségügyi kockázatot jelenthet.



4. Az általam tervezett primerek (forward primer: 5'-TGYCAGCMGCCGCGGTAA-3'; reverse primer1: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAATCCT-3'; reverse primer2: 5'-GACTACHVGGGTWTCTAATCCTGT-3') a kidolgozott qPCR metódussal együtt (Bioline SensiFAST SYBR No-Rox kit, annealációs hő 60 °C, a szintézis idő 20 másodperc) alkalmasak a vízben lévő mikrobiális DNS kvantitatív meghatározására.

5. Az ASTM D-4169-16 szabvány szerint végzett, időgyorsított módszer mindhárom intenzitása alkalmas a valós időben végbemenő mechanikai agitáció mikrobiom változásra gyakorolt hatásának modellezésére. A regresszió mértéke:  $R^2_{\text{alacsony}} = 0,90$ ;  $R^2_{\text{közepes}} = 0,96$ ;  $R^2_{\text{magas}} = 0,98$ .

---

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőimnek, Dr. Ásványi Balázsnak és Dr. Böröcz Péternek, hogy szaktudásukkal és iránymutatásukkal segítették a kutatómunkám és hozzájárultak disszertációm elkészítéséhez.

Köszönetemet fejezem ki Oppenenseimnek - Mohácsiné Prof. Dr. Farkas Csilla egyetemi tanár, Dr. Pánczél Zoltán egyetemi docens és Prof. Dr. Szigeti Jenő professzor emeritus -, akik nagyon hasznos észrevételekkel, tanácsokkal segítették a dolgozat végleges formába öntését.

Köszönettel tartozom Hanczné Dr. Lakatos Erika tanszékvezető asszonynak, aki biztosította számomra a munkavégzéshez szükséges feltételeket és segítette szakmai fejlődésemet.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Varga László egyetemi tanár úrnak, az angol nyelvű tézisfüzet elkészítésében nyújtott szakmai segítségért.

Köszönet illeti még a Széchenyi István Egyetem Albert Kázmér Mosonmagyaróvári Kar Élelmiszertudományi Tanszék, az Audi Hungária Járműmérnöki Kar Csomagolás és Környezetállósági Vizsgáló Laboratóriuma, az RT-Europe Nonprofit Kft., valamint a HO-RA Kft. (Szigetköz Quelle) munkatársait.

Szeretném megköszönni a családomnak, férjemnek, hogy mindvégig támogattak és segítettek a tanulmányaimat. Végül szeretném megköszönni gyermekeimnek - Péternek, Balázsnak és Laurának – hogy türelemmel viselték a kutatással, felkészüléssel járó távolléteimet.

## 8 IRODALOMJEGYZÉK

1. Adorjáni K. (2010): Kétlépcsős mechanikai modellek alkalmazása útpályák felújítási beavatkozásainak méretezésénél. *Közlekedési Szemle*. 60(3):5-11.
2. Albert, B., Godelle, B., Gouyon, P. H. (1998): Evolution of the Plant Mitochondrial Genome: Dynamics of Duplication and Deletion of sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 46:155-158.
3. Allen, M. J., Edberg, S. C., Reasoner, D. J. (2004): Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water? *International Journal of Food Microbiology*. 92(3):265–274. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.017
4. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17):3389–3402. doi: 10.1093/nar/25.17.3389
5. Álvarez, G., González, M., Isabal, S., Blanc, V., León, R. (2013): Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express*. 3:1. doi: 10.1186/2191-0855-3-1
6. Armas, A. B., Sutherland, J. P. (1999): A survey of the microbiological quality of bottled water sold in the UK and changes occurring during storage. *International Journal of Food Microbiology*. 48:59– 65. doi: 10.1016/s0168-1605(99)00027-6

7. Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., and Patel, H. R. H. (2005): Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 5:209–219. doi: 10.1586/14737159.5.2.209
8. Balkwill, D. L. (1989): Numbers, diversity, and morphological characteristics of aerobic, chemoheterotrophic bacteria in deep subsurface sediments from a site in South Carolina. *Geomicrobiology Journal*. 7:33-51. doi: 10.1080/01490458909377848
9. Barbosa, R. S. (2012): Vehicle Vibration Response Subjected to Longwave Measured Pavement Irregularity. *Journal of Mechanical Engineering and Automation*. 2(2):17-24. doi: 10.5923/j.jmea.20120202.04
10. Basquin, O. H. (1910): The exponential law of endurance tests. *American Society of Testing Materials*. 10:625–630.
11. Bharath, J., Mosodeen, M., Motilal, S., Sandy, S., Sharma, S., Tessaro, T., Thomas, K., Umamaheswaran, M., Simeon, D., Adesiyun, A. A. (2003): Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. *International Journal of Food Microbiology* 81:53– 62. doi: 10.1016/s0168-1605(02)00193-9
12. 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 reservoir and glass and plastic bottles. *International Journal of Food Microbiology*. 11:51-72. doi: 10.1016/0168-1605(90)90039-8

13. Biziagos, E., Passagot, J., Cance, J. M., Deloince, R. (1988): Long term survival of hepatitis a virus and poliovirus type 1 in mineral water. *Applied and Environmental Microbiology*. 54:2705-2709. doi: 10.1128/aem.54.11.2705-2710.1988
14. Blake, P. A., Rosenberg, M. L., Florencia, J., Costa, J. B., do Prado Quintino, L., Gangarosa, E. J. (1977): Cholera in Portugal, 1974. II. Transmission by bottled mineral water. *American Journal of Epidemiology*. 105:344–348. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aje.a112392
15. Bornemissza T., Gáspár L., Károly R. (2008): Útpályaszerkezetek teherbírása, hazai és külföldi eredmények, problémák. *Közúti és Mélyépítési Szemle*. 58(5-6):1-9.
16. Bowersox, D. J., Closs, D., Cooper, M. B. (2012): *Supply Chain Logistics Management*. New York: McGraw Hill. 4th Edition.
17. Böröcz P. (2010): Az egyutas és többutas csomagolás a logisztikában. Doktori Értekezés. Széchenyi István Egyetem. Győr.
18. Böröcz P., Mojzes Á., Csavajda P. (2015): Measuring and Analysing the Effect of Openings and Vibration on Reusable Pharmaceutical Insulated Boxes with Daily Distribution. *Journal of Applied Packaging Research*. 7(2):32-44. doi: 10.14448/japr.04.0002
19. Böröcz, P., Singh, P. S. (2017): Measurement and analysis of delivery van vibration levels to simulate package testing for parcel delivery in Hungary. *Packaging Technology and Science*. 1–11. doi:10.1002/pts.2327.

20. Brandenburg, R. K., Lee., J. (1985): *Fundamentals of packaging dynamics*. MTS Systems Corporation.
  21. Braumiller, U. (Editor) (1999): Source Reduction by European Testing schedules (SRETS), EC (European Commission) Standards. 1-105.
  22. Bridges, B. (1997): Hypermutation under stress. *Nature*. 387:557-558.
  23. Bruscella, B., Rouillard V., Sek M. (1999): Analysis of road surface profiles. *Journal of Transportation Engineering-Asce*. 125(1): 55-59.
  24. Carraturo, F., Del Giudice, C., Compagnone, M., Libralato, G., Toscanesi, M., Trifuoggi, M., Galdiero, E., Guida M. (2021): Evaluation of Microbial Communities of Bottled Mineral Waters and Preliminary Traceability Analysis Using NGS Microbial Fingerprints. *Water*. 13(20):2824. doi: 10.3390/w13202824
  25. Chacon, F. A., Brouwer, M. T., van Velzen, E. U. T. (2020): Effect of recycled content and rPET quality on the properties of PET bottles. part I: Optical and mechanical properties. *Packaging Technology and Science*. 33:347-357. doi: 10.1002/pts.2490
  26. Charles, D. (1993): Derivation of environment descriptions and test severities from measured road transportation data. *Journal of the IEST*. 36(1):37–42. doi: 10.17764/jiet.2.36.1.k285j24551552377
  27. Chung, H. J., Son, J. H., Park, E. Y., Kim, E. Y., Lim, S. T. (2008): Effect of vibration and storage on some physico-chemical properties of a commercial red wine. *Journal of Food Composition and Analysis*. 21:655-659. doi: 10.1016/j.jfca.2008.07.004
-

28. Curutiu, C., Iordache, F., Gurban, P., Lazar, V., Chifiriuc, M. C. (2019): Main Microbiological Pollutants of Bottled Waters and Beverages. *Bottled and Packaged Water*. 403-422. doi: 10.1016%2FB978-0-12-815272-0.00014-3
29. Czerniewicz, M., Kruk, A., Kielczewska, K. (1999): Ethanol-induced changes in proteins and some mineral compounds of milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 8(49):27–38.
30. Czerniewicz, M., Kruk, A., Kielczewska, K. (2000): Heat and ethanol stability and the urea level in raw milk. *Nature Science*. 6:95–104.
31. Czerniewicz, M., Kruk, A., Kielczewska, K. (2006): Storage stability of raw milk subjected to vibration. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 56(SI1):65-70.
32. Csapó J. - Csapóné Kiss Zs. (2003): 1. A víz és ásványi anyagok. *Élelmiszer-kémia*, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
33. Deák T., Kiskó G., Maráz A., Mohácsiné Farkas Cs. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
34. Diduch, M., Polkowska, Z., Namiesnik, J. (2016): The role of heterotrophic plate count bacteria in bottled water quality assessment. *Food Control*. 61:188-195. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.09.024
35. Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M., Dveksler, G. S. (1993): General concepts for PCR primer design. *PCR Methods and Applications*. 3(3):S30-7. doi: 10.1101/gr.3.3.s30
36. Eckmanns, T., Oppert, M., Martin, M., Amorosa, R., Zuschneid, I., Frei, U., Rüden, H., Weist, K. (2008): An outbreak of

- hospital-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated bottled water in intensive care units. *Clinical Microbiology and Infection*. 14:454–458. doi 10.1111/j.1469-0691.2008.01949.x
37. Elizaquível, P., Gabaldón, J. A., Aznar, R. (2011): Quantification of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in non-spiked food products and evaluation of real-time PCR as a diagnostic tool in routine food analysis. *Food Control*. 22(2):158-164. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.05.018
38. Elizaquível, P., Sánchez, G., Selma, M. V., Aznar, R. (2012): Application of propidium monoazide-qPCR to evaluate the ultrasonic inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-cut vegetable wash water. *Food Microbiology*. 30(1):316-320. doi: 10.1016/j.fm.2011.10.008
39. European Commission, Directive 2009/54/EC of the European Parliament and of the Council of 18 June 2009 on the exploitation and marketing of natural mineral waters (Recast). *Official Journal of the European Union*. L. 164/45-58.
40. Falcone-Dias, M. F. Vaz-Moreira, I., Manaia, C. M. (2012): Bottled mineral water as a potential source of antibiotic resistant bacteria. *Water Research*. 46:3612–3622. doi: 10.1016/j.watres.2012.04.007
41. Falcone-Dias, M. F., Filho, A. F. (2013): Quantitative variations in heterotrophic plate count and in the presence of indicator microorganisms in bottled mineral water. *Food Control*. 31:90-96. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.09.038
-



42. Fi, I., Szentpéteri, I. (2014): A mechanistic-empirical approach for asphalt overlay design of asphalt pavement structures. *Periodica Politechnica Civil Engineering*. 58(1):55-62. doi: 10.3311/PPci 7408.
43. França, L., Lopéz-Lopéz, A., Rosselló-Móra, R., da Costa, M. S. (2015): Microbial diversity and dynamics of a groundwater and a still bottled natural mineral water. *Environmental Microbiology*. 17:577–593. doi: 10.1111/1462-2920.12430.
44. Gautam, B. (2021): Microbiological quality assessment (including antibiogram and threat assessment) of bottled water. *Food Science and Nutrition*. 9:1980-1988. doi: 10.1002/fsn3.2164
45. Gautam, B., Gyanwali, G., Ussery, D. W. (2021): Assessment of Bacterial Load in Polyethylene Terephthalate (PET) Bottled Water Marketed in Kathmandu Valley, Nepal. *International Journal of Polymer Science*. doi: 10.1155/2021/6681249
46. Geldreich, E. E. (1990): Bottled water: Microbial quality of alternative water supply. Congressional Workshop on Quality and Safety of Bottled Water. Washington DC.
47. Gesumaria, R. (2011): Microbiology of bottled Water: A molecular view. University of Colorado Boulder.
48. González C., Gutiérrez C., Grande T. (1987): Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Canadian Journal of Microbiology*. 33:1120-1125. doi: 10.1139/m87-196
49. Hadad, D., Geresh, S., Sivan, A. (2005): Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus*

- borstelensis*. *Journal of Applied Microbiology* 98:1093–1100. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02553.x
50. Hageskal, G., Lima, N., Skaar, I. (2009): The study of fungi in drinking water. *Mycological Research*. 113:165-172. doi: 10.1016/j.mycres.2008.10.002
51. Handschuh, H., Ryan, M. P., O'Dwyer, J., Adley, C. C. (2017): Assessment of the Bacterial Diversity of Aircraft Water: Identification of the Frequent Fliers. *PLOS ONE*. 1-12. doi: 10.1371/journal.pone.0170567
52. Harris, C., Piersol, A. (2001): *Harris' shock and vibration handbook*. McGraw-Hill Companies. ISBN 0-07-137081-1.
53. Hawkins, G. (2017): The impacts of bottled water: an analysis of bottled water markets and their interactions with tap water provision. *WIREs Water*. Wiley Periodicals Inc. doi: 10.1002/wat2.1203
54. Hellström, D., Saghir, M. (2007): Packaging and Logistics Interactions in Retail Supply Chains. *Packaging Technology and Science*. 20:197–216. doi: 10.1002/pts.754
55. Hook, P., Heimlich, J. (2005): *A history of packaging*. Ohio State University, Ohio.
56. Horak, E. (1987): The use of surface deflection basin measurement in the mechanistic analysis of flexible pavements. 6th Conference on Structural Design of Asphalt Pavements, Michigan. USA 1987.
57. Hunter P. R. (1993): A review: the microbiology of bottled natural mineral waters. *The Journal of Applied Bacteriology*. 74:345-352. doi: 10.1111/j.1365-2672.1993.tb05137.x
-

58. Janssen, S., Pankoke, I., Klus, K., Schmitt, K., Stephan, U., & Wöllenstein, J. (2014): Two underestimated threats in food transportation: Mould and acceleration. *Philosophical Transactions. Series A. Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*. 372(2017), doi: 10.1098/rsta.2013.0312.
59. Jarimopas, B., Singh, S. P., Saengnil, W. (2005): Measurement and analysis of truck transport vibration levels and damage to packaged tangerines during transit. *Packaging Technology and Science*. 18(4):179–188., doi: 10.1002/pts. 687.
60. Jaskula-Goiris, B., De Causmaecker, B., De Rouck, G., De Cooman, L., Aerts, G. (2011): Detailed multivariate modeling of beer staling in commercial pale lagers. *BrewingScience*. 64(11–12):119–139.
61. Jurczak, M. E. (1983): Effect of shakes and vibrations of lipolysis of raw milk. *Rocznik nauk rolniczych (Agrártudományi Évkönyv), Seriea B*. 110:75-82.
62. Kamarán K. (2008): Jellemző burkolati hibák fajtái, kialakulásuk okai. Nemzeti Szakképzési és Felnőttképzési intézet. Budapest (TÁMOP 2.2.1. 08/1-2008-002)
63. Karoliny M., Gáspár L. (2015): Investigation and design of durable pavement structure rehabilitation. *The International Journal of Pavement Engineering & Asphalt Technology*. 16(2):30-54. doi: 10.1515/ijpeat-2015-0002
64. Kipp, W. I. (2008): Random Vibration Testing Of Packaged-Products: Considerations For Methodology Improvement.

- Presented June 2008 at the 16th IAPRI World Conference on Packaging – Bangkok. Thailand.
65. Kipp, W. I. (2000a): Developments in testing products for distribution. *Packaging Technology and Science*. 13(3):89-98. doi: 10.1002/1099-1522(200005)13:3<89::AID-PTS473>3.0.CO;2-4
  66. Kipp, W. I. (2000b): Vibration testing equivalence. International Safe Transit Association, East Lansing MI. USA. Paper presented at ISTACON.
  67. Kipp, W. I. (2001): Accelerated random vibration with time-history shock for improved laboratory simulation. Presented at the IoPP 2001 Annual Membership Meeting March 29, 2001 San Jose, California.
  68. Kipp, W. I. (2008): Vibration Testing Equivalence: How Many Hours of Testing Equals How Many Miles of Transport? International Safe Transit Association: East Lansing, MI. Paper originally presented at ISTA Con. 2000 updated December 2008; <http://www.wikippco.com/Vib%20Test%20Equivalence.pdf>  
Letöltés: 2020.02.16.
  69. Kline, P. (2008): Tap Water vs. Bottled Water: What's the Difference? *Opflow*. American Water Works Association. 5:8-9. doi: 10.1002/j.1551-8701.2008.tb01980.x
  70. Kőfalusi P. (2014): *Futóműrendszerek mechatronikája*, BME-MOGI, TÁMOP-4.1.2.A/1-11/1-2011-0042.
  71. Kőfalvi Gy. (2009): Tehergépjárművek biztonságos rakomány rögzítése és a közlekedési balesetek kapcsolata. Innováció és Fenntartható Felszíni Közlekedési Konferencia. Budapest.
-

72. Körzendörfer, A., Temme, P., Lodermeier A., Schlücker, E., Hinrichs, J. (2021): Vibrations as a cause of texture defects during the acid-induced coagulation of milk – Fluid dynamic effects and their impact on physical properties of stirred yogurt. *Journal of Food Engineering*. 292. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2020.110254.
73. Kruskal, W. H. (1952): A nonparametric test for the several sample problem. *The Annals of Mathematical Statistics*. 23:525-540.
74. Lamothe, G. T., Putallaz, T., Joosten, H., Marugg., J. D. (2003): Revers transcription-PCR analisis of bottled and natural mineral waters for the presence of Noroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(11):6541-6549. doi: 10.1128/AEM.69.11.6541-6549.2003
75. Leclerc, H, Moreau, A. (2002): Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiology Rewiews*. 26:207-222. doi: 10.1111/j.1574-6976.2002.tb00611.x
76. 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. doi: 10.1002/9781444393330.ch12
77. Lee, Y. (2013): An Evaluation of Microbial and Chemical Contamination Sources Related to the Deterioration of Tap Water Quality in the Household Water Supply System. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10(9):4143–4160. doi: 10.3390/ijerph10094143

78. Long, M. (2016): On the Statistical Correlation between the Heave, Pitch and Roll Motion of Road Transport Vehicles. Research Master thesis. College of Engineering and Science, Victoria University. 13.
79. Loozen, G., Boon, N., Pauwels, M., Quiryne, M., Teughels, W. (2011): Live/dead real-time polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque-related pathologies. *Molecular Oral Microbiology*. 26(4):253-61. doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00615.x.
80. Lu, F., Ishikawa, Y., Kitazawa, H., Satake, T. (2010): Effect of vehicle speed on shock and vibration levels in truck transport. *Packaging Technology and Science*. 23(2):101-109. doi: 10.1002/pts.882
81. Lu, F., Ishikawa, Y., Shiina, T. (2008): Analysis of Shock and Vibration in Truck Transport in Japan. *Packaging Technology and Science*. 21(8):479-489. doi: 10.1002/pts.841
82. Mabrook, M. F., Petty, M. C. (2003): Effect of composition on the electrical conductance of milk. *Journal of Food Engineering*. 60:321–325. doi: 10.1016/S0260-8774(03)00054-2
83. Mahajerin, E., Burgess, G. (2010): Investigation of package vibration during the repetitive shock test. in Proceedings of the World Congress on Engineering.
84. Malfliet, S., Van Opstaele, F., de Clippeleer, J., Stryn, E., Goiris, K., de Cooman, L., Aerts, G. (2008): Flavour instability of pale lager beers: Determination of analytical markers in relation to

- sensory ageing. *Journal of the Institute of Brewing*. 114(2):180–192. doi: 10.1002/j.2050-0416.2008.tb00324.x
85. Manaia, C. M., Nunes, O. C., Morais, P. V., Da Costa, M. S. (1990): Heterotrophic plate counts and the isolation of bacteria from mineral waters on selective and enrichment media. *Journal of Applied Bacteriology*. 69:871-876. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01586.x
86. Maser, K. (2010): Ground penetrating radar (GPR) for pavement condition evolution, Pavement Evolution Conference. Roanoke. Virginia.
87. Masters, C. I., Shallcross, J. A., Mackey, B. M. (1994): Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *The Journal of Applied Bacteriology*. 77:73-79. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03047.x
88. Maton, A., Hopkins, J., McLaughlin, Ch. W., Johnson, S., Warner, M. Q., LaHart, D., Jill D. (1993): *Human Biology and Health*. Englewood Cliffs. New Jersey. USA: Prentice Hall, ISBN 0-13-981176-1
89. Mavridou, A. (1992): Study of the bacterial flora of a non-carbonated natural mineral water. *Journal of Applied Bacteriology*. 73:355-361. doi: 10.1111/j.1365-2672.1992.tb04989.x
90. McMahan, M. (2022): What is a Profilograph? <https://www.aboutmechanics.com/what-is-a-profilograph.htm>
91. Messi, P., Guerrieri, E., Bondi, M. (2002): Survival of an *Aeromonas hydrophila* in an artificial mineral water microcosm.
-

- Water Research.* 36:3410-3415. doi: 10.1016/S0043-1354(02)00028-3
92. Molnár, R., Molnár, J., Beke, D., Papp, B., Kuti, R. (2020): Shelf life of bottled water – field conditions in Hungary. *Journal of Food and Nutrition Research.* 59(4):361-366.
93. Morais, P. V. and da Costa, M. S. (1990): Alterations in the major heterotrophic bacterial populations isolated from a still bottled mineral water. *Journal of Applied Bacteriology.* 69:750- 757. doi: 10.1111/j.1365-2672.1990.tb01572.x
94. Moreira, L., Agostinho, P., Morais, P. V., da Costa, M. S. (1994): Survival of allochthonous bacteria in still mineral water bottled in polyvinyl chloride (PVC) and glass. *The Journal of Applied Bacteriology.* 77(3):334-339. doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb03082.x
95. Morita, R. Y. (1998): Low-Nutrient Environments, *Encyclopedia of Microbiology*, 2:86-93.
96. Némedi, L. (2006): Az ásványvizek mikrobiológiai jellemzői II. rész, *Alkoholmentes italok.* (4):72-74.
97. Nocker, A., Cheung, C. Y., Camper, A. K. (2006): Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods.* 67:310–320. doi: 10.1016/j.mimet.2006.04.015.
98. Nogva, H. K., Drømtorp, S. M., Nissen, H., Rudi, K. (2018): Ethidium Monoazide for DNA-Based Differentiation of Viable and
-



- Dead Bacteria by 5'-Nuclease PCR. *Biotechniques*. 34(4). doi: 10.2144/03344rr02.
99. Ostertagová, E., Ostertag, O., Kováč J. (2014): Methodology and Application of the Kruskal-Wallis Test. *Applied Mechanics and Materials*. Edited by František Trebuňa. Trans Tech Publications. 611:115-120.
100. Otterholt, E., Charnock, C. (2011): Microbial quality and nutritional aspect of Norwegian brand waters. *International Journal of Food Microbiology*. 144:455-463. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.034
101. Paine, F. A. (1981): *Fundamentals of packaging*. Institute of Packaging.
102. Pálfay A. (2004): Üzemeltetői elvárások a betonburkolatú autópályákkal szemben. *Beton-szakmai havilap*. 12(5):4-6.
103. Palich, P. (1993): Effect of vibration on changes in protein fraction of milk. *Scientific Papers of Gdynia Maritime Academy*. 21–61.
104. Palmera-Suárez, R., Garcia, P., Garcia, A., Barrasa, A., Herrera, D. (2007): *Salmonella Kottbus* outbreak in infants in Gran Canaria (Spain), caused by bottled water, August–November 2006. *Eurosurveillance*. 12(28):3235.
105. Pánczél Z. (2009): A csomagolás rendszerszemléletű értelmezése a logisztikában, és – reológiai – tervezési módszer kidolgozása a viszkoelasztikus csomagolóanyagokra, Doktori értekezés, Széchenyi István Egyetem.
106. Pap K. (2011): Az élelmiszer mikrobiológia kiemelt szempontjai palackozott forrás-és ásványvíz gyártása során, Doktori értekezés,
-

- Budapesti Corvinus Egyetem, Élelmiszertudományi Kar, Mikrobiológia és Biotechnológia Tanszék.
107. Paternoster, A. Jaskula-Goiris, B., De Causmaecker, B., Vanlanduit, S., Springael, J., Braet, J., De Rouck, G., De Cooman, L. (2018a): The interaction effect between vibrations (50 Hz, 15m/s<sup>2</sup>) and temperature (5 °C, 30 °C, 45 °C), simulating truck transport, on the flavor stability of beer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 99(5). doi:10.1002/jsfa.9409.
108. Paternoster, A., Van Camp, J., Vanlanduit, S., Springael, J., Braet, J. (2017): The performance of beer packaging: Vibration damping and thermal insulation. *Food Packaging and Shelf Life*. 11:91-97. doi: 10.1016/j.fpsl.2017.01.004
109. Paternoster, A., Vanlanduit, S., Springael, J., Braet, J. (2018b): Measurement and analysis of vibration and shock levels for truck transport in Belgium with respect to packaged beer during transit. *Food Packaging and Shelf Life*. 15:134-143. doi: 10.1016/j.fpsl.2017.12.007.
110. Pavlov, D., de Wet, C. M. E., Grabow, W. O. K., Ehlers, M. M. (2004): Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *International Journal of Food Microbiology*. 92(3):275–287. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.018
111. Pontara, A. V.; de Oliveira, C. D. D.; Barbosa, A. H.; dos Santos, R. A.; Pires, R. H.; Martins, C. H. G. (2011): Microbiological monitoring of mineral water commercialized in Brazil. *Brazilian*
-

- Journal of Microbiology*. 42(2):554-559. doi: 10.1590/s1517-838220110002000020
112. Primusz P., Tóth C. (2009): A behajlási teknő geometriája. *Közlekedési Szemle*. 59(12):18-24.
113. Ramalho, R., Cunha, J., Albano, H., Teixeira, P., Gibbs, P. (2001): Improved methods for the enumeration of heterotrophic bacteria in bottled mineral waters. *Journal of Microbiological Methods*. 44:97–103. doi: 10.1016/s0167-7012(00)00237-2
114. Rockstroh, O. (1979): *Csomagolástechnikai kézikönyv*. Műszaki Könyvkiadó, Budapest.
115. Root, D. (1997): Six Step Method For Cushioned Package Development. [www.lansmont.com](http://www.lansmont.com). Letöltés: 2022.05.25.
116. Rosenberg, F. A. (2003): The microbiology of bottled water. *Clinical Microbiology Newsletter*. 25(6):41-44. doi: 10.1016/S0196-4399(03)80019-3
117. Rouillard, V., Sek, M. (2002): A statistical model for longitudinal road topography. *Road and Transport Research*. 11(3):17-23.
118. Rouillard, V., Sek, M. (2013): Creating Transport Vibration Simulation Profiles from Vehicle and Road Characteristics. *Packaging Technology and Science*. 26(2):82-95. doi: 10.1002/pts.1967
119. Röbbisch, K. (2015): Transportsicherer profitieren 2014 von geringen Schadenquoten, IUMI-Konferenz, Berlin.
120. Sala-Comorera, L., Blanch, A. R., Casanovas-Massana, A., Monleón-Getino, A., García-Aljaro, C. (2019): Traceability of different brands of bottled mineral water during shelf-life, using
-

- PCR-DGGE and next generation sequencing techniques. *Food Microbiology*. 82:1-10. doi: 10.1016/j.fm.2019.01.006
121. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of National Academy of Sciences of the U.S.A.* 74:5463–5467. doi: 10.1073/pnas.74.12.5463
122. Schmidt-Lorenz, W., Bischofberger, T., Cha, S. K. (1990): A simple nutrient-tolerance (NT) test for the characterization of the different types of oligocarbotoleant and oligocarbophile water bacteria from non-carbonated mineral water. *International Journal of Food Microbiology*. 10:157-176. doi: 10.1016/0168-1605(90)90063-b
123. Shires, D. (2011): On the time compression (test acceleration) of broadband random vibration tests. *Packaging Technology and Science*. 24(2):75-87. doi: 10.1002/pts.915.
124. Sinclair, J. L., Ghiorse W. C. (1989): Distribution of aerobic bacteria, Protozoa, Algae, and Fungi in deep subsurface sediments. *Geomicrobiology Journal*. 7:15-31. doi: 10.1080/01490458909377847
125. Singh, S. P., Sandhu, A. P. S., Singh, J., Joneson, E. (2007): Measurement and analysis of truck and rail shipping environment in India. *Packaging Technology and Science*.20(6):381-392. doi: 10.1002/pts.764.
126. Sipos, L. (2008): A hazai ásványvíz-fogyasztás mutatói. *Alkoholmentes italok*. 3:61-64.
-

127. Soós Z., Igazvölgyi Zs., Szakály F. (2017): Az aszfaltburkolatú útpályaszerkezetek megerősítésének diagnosztikai kérdései. *Ütügyi lapok*. 5(1):55-65.
  128. Soroka, W. (2009): *Fundamentals of packaging technology*. Institute of Packaging Professionals.
  129. Stickler, D. J. (1989): The microbiology of bottled natural mineral waters. *The Journal of the Royal Society for the Promotion of Health*. (109):118-124. doi: 10.1177/146642408910900404
  130. Stock, J. R., Lambert, D. M. (2001): *Strategic Logistics Management*. New York: McGraw-Hill Higher Education.
  131. Tian, J., Lu, J., Zhang, Y., Li, J. C., Sun, L. C., Hu, Z. L. (2014): Microbial community structures and dynamics in the O3/BAC drinking water treatment process. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11:6281-6290. doi: 10.3390/ijerph110606281
  132. Tiefbrunner A. (2010): *Csomagolás – Trendek és kérdések*, Wolters Kluwer Hungary Kft., Budapest.
  133. Tóth C., Tóth J. (2017): Útpályaszerkezetek roncsolásmentes diagnosztikai lehetőségei. *Közúti és Mélyépítési szemle*. 58(5-6):10-15.
  134. Tsai, G. J., Yu, S. C. (1997): Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology*. 37:137-143. doi: 10.1016/s0168-1605(97)00065-2
  135. Twede, D. (1992): The process of logistical packaging innovation. *Journal of Business Logistics*. 13:69-94.
-

136. Vague, M., Chan, G., Roberts, C., Swartz, N. A., Mellies, J. L. (2019): *Pseudomonas* isolates degrade and form biofilms on polyethylene terephthalate (PET) plastic. *BioRxiv*. doi: 10.1101/647321.
137. Vanderhaegen, B., Delvaux, F., Daenen, L., Verachtert, H., Delvaux, F.R. (2007): Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*. 103(2):404–412. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.07.062
138. Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H., Derdelinckx, G. (2006): The chemistry of beer aging – A critical review. *Food Chemistry*. 95(3):357–381.
139. Varga, L. (2011): Bacteriological quality of bottled mineral waters commercialised in Hungary. *Food Control*. 22:591-595. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.10.009
140. Venieri, D., Vantarakis, A., Komninou, G., Papapetropoulou, M. (2006): Microbiological evaluation of bottled non-carbonated (“still”) water from domestic brands in Greece. *International Journal of Food Microbiology*. 107:68-72. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.013
141. Walsh, P. S., Metzger, D. A., Higuchi, R. (1991): Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques*. 10:506–513.
142. Wang, J., Lu, L. X., Wang, Z. W. (2011): Modelling the complex interaction between packaged product and vehicle. *Advanced Science Letters*. 4(6,7):2207–2212. doi: 10.1166/asl.2011.1535
-

143. Wang, J., Sun, G., Lu, L., Lim, T. C. (2014): Indirect inverse substructuring theory for coupling dynamic stiffness identification of complex interface between packaged product and vehicle transport system. *Packaging Technology and Science*. 28:141–155. doi: 10.1002/pts.2096
144. Wang, R., Cheng, H., Zong, J., Yu, P., Fu, W., Yang, F., Shi, G., Zeng, G. (2012a): An outbreak of acute gastroenteritis associated with contaminated bottled water in a university – Jiangxi. *Western Pacific Surveillance and Response Journal*. 3:20–24. doi: 10.5365/wpsar.2012.3.4.009
145. Wang, Z. W., Wang, J., Zhang, Y. B., Hu, C. Y., Zhu, Y. (2012b): Application of the inverse substructure method in the investigation of dynamic characteristics of product transport system. *Packaging Technology and Science*. 25:351–362. doi: 10.1002/pts.986
146. Wang, Z. W., Wang, J. (2011): Inverse substructure method of three-substructures coupled system and its application in product-transport-system. *Journal of Vibration and Control*. 17:943–951. doi: 10.1177/1077546310376083
147. Wang, Z. W., Wang, L. J. (2017): On accelerated random vibration testing of product based on component acceleration RMS-life curve. *Journal of Vibration and Control*. doi: 10.1177/1077546317705555.
148. Warburton, D. W. (2000): Methodology for screening bottled water for the presence of indicator and pathogenic bacteria. *Food Microbiology*. 17:3-12. doi: 10.1006/fmic.1999.0283
-

149. Warburton, D. W., Bowen, B., Konkle, A. (1992): The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. *Canadian Journal of Microbiology*. 40:987-992. doi: 10.1139/m94-158
150. Warmińska, M., Kruk, A. (2001): Influence of vibrations on fatphase of milk. *Meded Rijksuniv. Gent. Fak. Landbouwk. Toegep. Biol. Wet.* 66(3b):643–646.
151. Warmińska, M., Kruk, A., Brandt, W. (2003a): Changes in protein fraction of milk subjected to vibration. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 68(2):543–546.
152. Warmińska, M., Kruk, A., Brandt, W. (2003b): The effect of vibration frequency on changes in the salt system of milk. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 68(2):547–550.
153. Warmińska, M., Kruk, A., Brandt, W. (2006): Effect of vibration frequency and exposure time on the technological usability of fresh milk. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 15(56), SI 1:247-251.
154. Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J. (1990): *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) group 13, EF group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *International*
-



- Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology*. 40(4):384-98. doi: 10.1099/00207713-40-4-384
155. Willems, A., Falsen, E., Pot, B., Jantzen, E., Hoste, B., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K., De Ley, J. (2015): Acidovorax. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Bergey's Manual Trust. doi: 10.1002/9781118960608.gbm00943.
156. Wisplinghoff, H., Seifert, H. (2010): *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. *Infectious Diseases*. 2:1704-1727. doi: 10.1016/B978-0-323-04579-7.00170-2.
157. Yam, K. L. (2009): *Encyclopedia of Packaging Technology*. John Wiley & Sons Inc.: Hoboken, New Jersey, USA.
158. Yang, Y., Xu, F., Xu, H., Aguilar Z.P., Niu, R., Yuan, Y., Sun J., You X., Lai W., Xiong Y., Wan C., Wei, H. (2013): Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Microbiology*. 34(2):418-424. doi: 10.1016/j.fm.2013.01.004
159. Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T. L. (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13:134.
160. Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Oda, K. (2016): A bacterium that degrades and
-

- assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*. 351:1196–1199. doi: 10.1126/science.aad6359
161. Zamberlan da Silva, M. E., Santana, R. G., Guilhermetti, M., Filho, I. C., Endo, E. H., Ueda-Nakamura, T., Nakamura, C. V., Dias Filho, B. P. (2008): Comparison of the bacteriological quality of tap water and bottled mineral water, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 211(5-6):504–509. doi: 10.1016/j.ijheh.2007.09.004
162. Zsombik L. (2011): *Logisztikai alapismeretek*. Debreceni Egyetem, Agrár és Gazdálkodástudományok Centruma.

### **Szabványok**

1. ASTM D999-08, Standard Test Methods for Vibration Testing of Shipping Containers. 2008, ASTM International: West Conshohocken, PA, doi: 10.1520/D0999-08.
2. ASTM D4169-16, Standard Practice for Performance Testing of Shipping Containers and Systems, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2016. doi:10.1520/D4169-16
3. MSZ EN ISO 6222:2000: Vízminőség. Tenyésztető mikroorganizmusok számának meghatározása. Telepszám-meghatározás agar táptalaj beoltásával (ISO 6222:1999).
4. MSZ EN 26461-2:1994: Vízminőség. A szulfitredukáló anaerobok (*Clostridium*-ok) spóráinak kimutatása és számlálása. 2. rész: Membránszűrési módszer
5. MSZ EN ISO 9308-1:2014: Vízminőség. Az *Escherichia coli* és *coliform* baktériumok kimutatása és megszámlálása. 1. rész:

Membránszűrési módszer kis háttérflórával rendelkező vizek esetében

6. MSZ EN ISO 7899-2:2000: Vízhőminőség. Az *enterokokkus* bélbaktériumok kimutatása és megszámlálása. 2. rész: Membránszűrési módszer (ISO 7899-2:2000)
7. MSZ EN ISO 16266:2008: Vízhőminőség. *Pseudomonas aeruginosa* kimutatása és megszámlálása. Membránszűrési módszer (ISO 16266:2006)

### **Jogszabályok, törvények, rendeletek**

8. 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
9. 80/777/EGK (1980. július 15.) A Tanács Irányelve a természetes ásványvizek kinyerésére és forgalmazására vonatkozó tagállami jogszabályok közelítéséről
10. 96/70/EK (1996. október 28.) AZ Európai Parlament és a Tanács Irányelve a természetes ásványvizek kinyerésére és forgalmazására vonatkozó tagállami jogszabályok közelítéséről szóló 80/777/EGK tanácsi irányelv módosításáról
11. 2003/40/EK (2003. május 16.) A Bizottság Irányelve a természetes ásványvizek jegyzékének, koncentrációs határértékeinek és címkézési követelményeinek, valamint a természetes ásványvizek és forrásvizek ózonnal dúsított levegővel való kezelésére vonatkozó feltételeknek a megállapításáról

---

12. 201/2001. (X. 25.) Korm. rendelet az ivóvíz minőségi követelményeiről és az ellenőrzés rendjéről

**Web:**

URL<sup>1</sup>: <https://www.statista.com/statistics/> Letöltés: 2022. 12. 13.

URL<sup>2</sup>: <https://www.efbw.org/index.php?id=90> Letöltés: 2021.11.23.

URL<sup>3</sup>: <https://blog.marketresearch.com/the-global-bottled-water-market-expert-insights-statistics> Letöltés: 2022.11.29.

URL<sup>4</sup>: <http://asvanyvizek.hu/> Letöltés: 2022. 12. 13.

URL<sup>5</sup>:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118743942.ch9>

Letöltés: 2020.05.04.

URL<sup>6</sup>: [http://www.innopave.com/en/pavement\\_profiler\\_profilograph.asp](http://www.innopave.com/en/pavement_profiler_profilograph.asp)

Letöltés: 2021.11.18.

URL<sup>7</sup>: <https://www.scmonitor.hu/cikk/20171220/ezert-van-enyikamion-az-utakon>, Letöltés: 2022. 11. 23.

URL<sup>8</sup>: <http://www.preventissimo.hu/tudastar/cikk/276>, Letöltés: 2022. 09. 15.

URL<sup>9</sup>: <https://blog.marketresearch.com/the-global-bottled-water-market-expert-insights-statistics>, Letöltés: 2023. 01. 02.

URL<sup>10</sup>: <https://www.statskingdom.com/kruskal-wallis-calculator.html>

URL<sup>11</sup>: <https://spssabc.hu/diagram-keszítése/doboz-abra/> letöltés: 2023.01.10.

---

**MELLÉKLETEK**

**1. melléklet**

A víz főbb mikrobiológiai és vírusos szennyezőanyagai és a hozzájuk kapcsolódó betegségek

<b>Szennyeződés</b>	<b>Faj</b>	<b>Megbetegedés</b>
Baktérium	<i>Campylobacter jejuni, Campylobacter coli</i>	gyomor-bélrendszeri betegség
	<i>Escherichia coli</i>	gastrointestinális megbetegedés, veseelégtelenség
	<i>Helicobacter pylori</i>	fekélyeket, rákot okozhat
	<i>Legionella pneumophila</i>	belélegezve tüdőbetegséget okoz
	<i>Mycobacterium spp.</i>	Tüdőfertőzés a mögöttes tüdőbetegségben szenvedőknél, és disszeminált fertőzés a súlyosan immunhiányos személyeknél
	<i>Shigella sonnei</i>	gyomor-bélrendszeri betegség és véres hasmenés
	<i>Salmonella enterica</i>	gyomor-bélrendszeri betegség
	<i>Vibrio cholera</i>	gastrointestinális megbetegedés, vizes hasmenés
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kórházi megbetegedés

Szennyeződés	Faj	Megbetegedés
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pneumonia, típusos bronchopneumonia formában
	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Gastroenteritis, vérmérgezés, traumás és vízi sebfertőzések, valamint orvosi piócaterápia utáni fertőzések
	<i>Enterobacter cloacae</i>	gastrointestinális megbetegedés
Vírus	Adenovirus	légzőszervi megbetegedés és esetenként gyomor-bélrendszeri betegségek
	Astrovirus	Gastroenteritis gyerekeknél
	Caliciviruses (rotaviruses, noroviruses)	gastrointestinális megbetegedés
	Enterovirus (polioviruses, coxsackie viruses, echoviruses)	enyhe légzőszervi megbetegedés
	Hepatitis A and E viruses	májbetegség és sárgaság
Protozoonok	<i>Cryptosporidium</i> spp.	bélbetegség
	<i>Giardia lamblia</i>	bélbetegség, hasmenés főleg gyerekeknél

Szennyeződés	Faj	Megbetegedés
	<i>Naegleria fowleri</i>	elsődleges amőbás meningoencephalitis
Élesztők és penészek	<i>Penicilium</i> spp. <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. glabrum</i>	
	<i>Aspergillus</i> spp.	
	<i>Candida</i> spp., <i>Candida glabrata</i> , and <i>Candida albicans</i>	
	<i>Cladosporium</i> spp., <i>Cladosporium cladosporioides</i>	
	<i>Alternaria alternate</i>	
	<i>Rhizopus</i> spp.	
	<i>Fusarium</i> spp.	
	<i>Trichoderma viride</i>	
	<i>Aspergillus</i> spp.	
	<i>Phoma</i> spp.	
<i>Phialophora richardsiae</i>		
Toxinok	Geosmin ( <i>Chaetomium globosum</i> )	
	Aflatoxins ( <i>Aspergillus</i> spp.)	
	Patulin ( <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.,	



---

Szennyeződés	Faj	Megbetegedés
	<i>Byssochlamys</i> spp.)	
	Zearalenone ( <i>Fusarium</i> spp.)	
	Fumonisin ( <i>Fusarium</i> spp.)	
	Neosolaniol ( <i>Fusarium</i> spp.)	
	Ochratoxin ( <i>Aspergillus</i> spp., <i>Penicillium</i> spp.)	

Forrás: Curutiu et al. (2019) alapján saját szerkesztés

2. melléklet

A vízből izolált baktérium szekvenálás után kapott eredményének összehasonlítása az NCBI adatbázissal.

Sequences producing significant alignments Download Select columns Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax sp. strain 816OP6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Acidovorax sp.</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1431	<a href="#">MK757665.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax temperans strain Ls 4-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Acidovorax temperans</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1484	<a href="#">KX622787.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax temperans strain B50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Acidovorax temperans</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1276	<a href="#">MF156925.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax sp. strain JDMASP58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Acidovorax sp.</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1392	<a href="#">KX817963.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Acidovorax sp. strain DE011 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Acidovorax sp.</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1443	<a href="#">KY883995.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Beta proteobacterium BIWA23 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">beta proteobacterium BIWA23</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1449	<a href="#">LC217410.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Beta proteobacterium BIWA22 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">beta proteobacterium BIWA22</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1464	<a href="#">LC217409.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Beta proteobacterium BIWA21 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">beta proteobacterium BIWA21</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1430	<a href="#">LC217408.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone MTWL201208-103 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1490	<a href="#">KX509129.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone MTWL201208-100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1490	<a href="#">KX509126.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone MTWL201208-93 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1490	<a href="#">KX509119.1</a>
<input checked="" type="checkbox"/> <a href="#">Uncultured bacterium clone MTWL201208-91 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">uncultured bacterium</a>	1744	1744	100%	0.0	99.07%	1490	<a href="#">KX509117.1</a>

**3. melléklet:** Primertervezés

Az *Acidovorax temperans* DNS-ének az élelmiszeriparban releváns mikrobáktól jelentősen eltérő szekvenciái a 212-es illetve a 390-es sorban; a generál primerek pedig a 445, az 503-as, illetve a 738-as sorban találhatóak.

MELLÉKLETEK

~~Acidovorax~~ project

16S rRNA

BLASTN 2.9.0+

Reference: Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, ~~Jiang~~ Zhang, Zheng Zhang, ~~Wei~~ Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a ~~new~~ generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: SN48IGSP114

Query: NR\_028715.1 ~~Acidovorax~~ ~~temporaria~~ ~~strain~~ PHL 16S ~~ribosomal~~ RNA, ~~partial~~

Length: 1512

Max	Score	E
<del>Sequences producing significant alignments:</del>	(Bits)	Value
NR_028078.1 <i>Pseudomonas</i> <del>sp</del> DSM 50071 16S <del>rdna</del> ...	1479	0.0
NR_024570.1 <i>Escherichia coli</i> <del>sp</del> U 5/41 16S <del>rdna</del> RNA, ...	1380	0.0
M36024.1 <del>Acidovorax</del> <del>sp</del> 16S <del>rdna</del> ...	1215	0.0
NR_024997.1 <del>Acidovorax</del> <del>sp</del> J53-7 16S <del>rdna</del> ...	1207	0.0
NR_121697.2 <i>Clostridium</i> <del>sp</del> ATCC 13124 16S <del>rdna</del> R...	1113	0.0

ALIGNMENTS 27F: 5'-~~AGACTTTCATCCTGGCTCAG~~, 1492R 5'-~~TACGGYIACCTTGTACGACTT~~

FC: ~~GATGCCAGATTAGCTAGTTCCT~~

CC: ~~AGACTTTCATCCTGGCTCAG~~

Query	4	<del>AGCTTTCATCCTGGCTCAG</del>	ATTGAAAGCTGGCGGCATG--CCTT--ACACATGCCAAGTCGA	59
NR_028078.1	10	.....G.....A.....G.GG....CA.....	.....G.....A.....G.GG....CA.....	69
NR_024570.1	1	.....G.....A.....A.....A.....	.....G.....A.....A.....A.....	56
M36024.1	15	...C..G.....NN.....N.....--TNA--	...C..G.....NN.....N.....--TNA--	64
NR_024997.1	4	.....G.....A.....A.....A.....	.....G.....A.....A.....A.....	38
NR_121697.2	10	.....C..G.....GA.....G.....T.R--	.....C..G.....GA.....G.....T.R--	65
Query	60	AC-----GGTAAAC-GGT-----CT---T-CGG-AT--G-CTGA--CGATGGCGAAC	AC-----GGTAAAC-GGT-----CT---T-CGG-AT--G-CTGA--CGATGGCGAAC	96
NR_028078.1	70	G.TTATGAA..G.G.T-T.C-----T-----T-----C....G....	G.TTATGAA..G.G.T-T.C-----T-----T-----C....G....	107
NR_028078.1	413	.....G.....A.....A.....A.....	.....G.....A.....A.....A.....	423
NR_024570.1	57	.....AAGCAG.....G.T.-C.TT.....G....	.....AAGCAG.....G.T.-C.TT.....G....	101
M36024.1	65	.....C..G..TW.....NGC.-N.C-TW--A.A..TG.....	.....C..G..TW.....NGC.-N.C-TW--A.A..TG.....	108
NR_024997.1	38	.....G.....A.....A.....A.....	.....G.....A.....A.....A.....	65
NR_121697.2	66	G-----A.G.-.-.T.TC---.....G.A--A-.G.-.-T.T.C....G....	G-----A.G.-.-.T.TC---.....G.A--A-.G.-.-T.T.C....G....	104
Query	97	GGGTGAGTAATACATCGG-AACGTGCCCGATCGTGGGGGATACGAGCGAAAGCCTTGGC	GGGTGAGTAATACATCGG-AACGTGCCCGATCGTGGGGGATACGAGCGAAAGCCTTGGC	155
NR_028078.1	108	.....G.C.A...TC....T.G.A.....TCCG....CGGCC...	.....G.C.A...TC....T.G.A.....TCCG....CGGCC...	166
NR_024570.1	103	.....GTC.G...AC...T...G.A.....T.CTG...CGG.A...	.....GTC.G...AC...T...G.A.....T.CTG...CGG.A...	160
M36024.1	109	.....CG.C.A...TR.....TNGAA.N.....C...TTG.C...CTMAA...	.....CG.C.A...TR.....TNGAA.N.....C...TTG.C...CTMAA...	167
NR_024997.1	56	.....C...CG.G.G...TC.....TT.G.TC.A...AGTTG...CGAC...	.....C...CG.G.G...TC.....TT.G.TC.A...AGTTG...CGAC...	124
NR_121697.2	108	.....C..G.G..T...C...TC..A.A.T.A...G.CTTC.....GAAGAT	.....C..G.G..T...C...TC..A.A.T.A...G.CTTC.....GAAGAT	164
Query	156	TARTACCCGATAAGATCTACGGATGAAAGCAGGGGACCCG--AGGG--CCTTGGCGGAAC	TARTACCCGATAAGATCTACGGATGAAAGCAGGGGACCCG--AGGG--CCTTGGCGGAAC	211
NR_028078.1	167	.....C.TC..GA..GA....TC....T.TT--CG.A--...CA...T.T...	.....C.TC..GA..GA....TC....T.TT--CG.A--...CA...T.T...	222
NR_024570.1	161	.....CG..GCA.CAC...AG.....TT...G...CTT..C.T...	.....CG..GCA.CAC...AG.....TT...G...CTT..C.T...	216
M36024.1	168	..N.....TG...GA...C...T.....TN--CG...N...TNMA	..N.....TG...GA...C...T.....TN--CG...N...TNMA	223
NR_024997.1	138	.....G.....C.....T-----CA--...A--TT.AT...C.GA	.....G.....C.....T-----CA--...A--TT.AT...C.GA	166
NR_121697.2	168	.....CG.TG.AA...GC.T..TCATT.AA.CA...AG.AA.C...T.TG	.....CG.TG.AA...GC.T..TCATT.AA.CA...AG.AA.C...T.TG	224

## MELLÉKLETEK

<b>QuRYM</b>	212	GGAGCGGCC-- <b>GAPOCCAGATTTAGCTACTTGG</b> GGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGAT	269
NR_026078.1	<u>233</u>	A..TGA...--T.G.T.G.....C.....G...G..C.....G.....	280
NR_024370.1	<u>317</u>	..TGT...CA.....C...A.....G...CG..C..T..G.....	274
M36024.1	224	<b>A...TWA</b> ...--TGC.T.C..N..C.N.....G...GG..C.....G.....	281
NR_024997.1	167	..TGA...--CGC.TAG.....C.....T.G...G..GC.....G.....	224
NR_121697.2	<u>235</u>	A..TG.A...--CGC...GC.....C.....G...CG..C.....G.....	282
			CCT
<b>QuRYM</b>	270	CTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGAC <b>TCCT</b>	329
NR_026078.1	<u>291</u>	.C...A.....T..T..T.....A.....T.....	340
NR_024370.1	275	.CC.....T.....A.....A.....T.....	334
M36024.1	282	.G.....T.....A.....T.....	341
NR_024997.1	225	.CT.....T..T.....	284
NR_121697.2	<u>283</u>	GC....C.AC.....GT..T.G.....T.....	342
		ACGGGCGGCGAG N48Ag	
<b>QuRYM</b>	330	<b>ACGGGAGGCGAGAGC</b> GGGGAATTTGGACAATGGGCGAAGCCCTGATCCAGCCATGCCGC	389
NR_026078.1	341	.....A.....C.....	400
NR_024370.1	<u>235</u>	.....A..C.....C.....G.....N.....	394
M36024.1	342	.....A.....C...G...R.....A.....	401
NR_024997.1	285	.....A.....	344
NR_121697.2	<u>243</u>	.....A..C.....G...C.....G...A..C.....	402
			T! Szekvenálás alapján
<b>QuRYM</b>	390	GTGAGGATGAAGCCCTTCGGTTGTAA--CTG-CTT <b>GGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG</b>	444
NR_026078.1	<u>401</u>	..TGT..A...T...A.....--GCA...AA..TG...--G..C.G.G.A	454
NR_024370.1	<u>295</u>	..T.T.A.....--G.A...C-AGCG..G.G...GG..G..	449
M36024.1	402	<b>TCT..A</b> .....NA...N.....--GCA...CA..GG...--G.CG.TTW	455
NR_024997.1	<u>245</u>	..GT.....A.....--GCT...T-----	384
NR_121697.2	<u>403</u>	..GT.....TT....A.C....GCT...T....-...G-----	449
			GT
<b>QuRYM</b>	445	<b>GGG</b> -GTTAATACCTGGGCTCCATGACGGTACCCTAAGGATAAGCACCCGGCTAACTAC <b>CT</b>	502
NR_026078.1	<u>455</u>	G..AA.....T.C.-GTT...T...AAC.....T...T...	512
NR_024370.1	<u>450</u>	AA-A.....TT.C..AT...T...CGC..G.....C.....	507
M36024.1	456	A.A...M..G.G..MATNAA.TN...T...CCG...G.....N...C...	514
NR_024997.1	<u>285</u>	.G...A.G.....A.....GG.....T.....C.....	432
NR_121697.2	450	-----CA.G..GG...CA.....	490
		GTCAGCMGCCCGGTAA	
		GCCAGCMGCCCGGTAA	
<b>QuRYM</b>	503	<b>GCCAGCMGCCCGGTAA</b> TAAGCTAGGCTGCAAGCGTTAATCGGATTAAGCTGGGCGTAAAGC	562
NR_026078.1	513	.....A.....	572
NR_024370.1	508	.....G.....	567
M36024.1	515	.....G.....G.....	574
NR_024997.1	<u>433</u>	.....G...A.T.....GT.....	492
NR_121697.2	<u>491</u>	.....TG..G.....TC...T.....G.....	550
<b>QuRYM</b>	563	GTGGCGAGCGGCTTATATAGACAGATGTGAAATCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCAT	622
NR_026078.1	<u>573</u>	.C...T.A.T...CAGC...CTT.....	632
NR_024370.1	<u>568</u>	.CA.....TGT...T.....	627
M36024.1	<u>575</u>	.....T..T...GAT...TW.TC.....T..TR...N.....CGGT..G	634
NR_024997.1	<u>493</u>	.CA..T.....C.T.G...TT...G.....G..TG.A.....TCCA...C...	552
NR_121697.2	<u>591</u>	.A..T.....A.GAT...TGG.....A.....T...TG.....	610
<b>QuRYM</b>	623	TT---GTGACTGTATAGCTAGAGTACGGCAGAGGGGATGGGATTCGGCTGTAGCAGT	678
NR_026078.1	<u>633</u>	CCARAA.CT.....T.....T...-A.....T.CT.....G...	688
NR_024370.1	<u>638</u>	C----AT...GCA...T...CTC.T.....G.A.....AG.....G...	683
M36024.1	635	A----NAT...NCT-CA...C...T.G.....TAG.....T.CG...G...	690
NR_024997.1	<u>593</u>	....AA...C..C...T.A.C.A.G...T.AG.....A.....AG...	608
NR_121697.2	<u>611</u>	.C----CAA...GT..T.....G.A.G...A.AG.....TA.....G...	666



## MELLÉKLETEK

<b>Q481N</b>	1177	ARGTCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACCGTCATACAAATGGCTGGTACAGAGGG	1236
NR_026078.1	<u>1181</u>	.....A.....CG.CCA.....GC.....TC.....A.....	1250
NR_024570.1	<u>1186</u>	.....A.....CGACCA.....GC.....GCA.....A.A.....	1243
M36024.1	1196	.....A.N.....N.N.CG.....A.....GC.....C.A.....	1255
NR_024997.1	<u>1113</u>	.....CGC.CT.....GC.....G.TG.....T.....	1172
NR_121697.2	<u>1168</u>	.....A.A.....C.....GT.A.....GC.....T.T.....A.....	1227
<b>Q481N</b>	1237	TTGCCAACCCCGGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAGCCAGTGTAGTCCGGATCGCAGTCT	1296
NR_026078.1	<u>1281</u>	.....G.....T.....A.....GA.....	1310
NR_024570.1	<u>1246</u>	AA..G.C.T.....A.CA..GG.C.T.....TGC.....T.G.....	1305
NR_024570.1	240	.....	229
M36024.1	<u>1256</u>	CG...G..GGG...CCTM...A.....TNA...T.G..Y..N.....T.G.....	1315
NR_024997.1	<u>1173</u>	CA..A...T.....A.T.C.....T.CA...-...TC...T...T.TTC...	1231
NR_121697.2	<u>1338</u>	A...A.TA.....T.....C.A.TT.-...A.....TC...T...T.T..G..	1286
<b>Q481N</b>	1297	GCACTCGACTCGCTGAAGTGGGATCGCTAGTAATCGGGATCGAATGTCGGCGGTGA	1356
NR_026078.1	1311	.....G.....T.A.....A.....	1370
NR_024570.1	1306	.....C.A.....T.....C.A.....	1363
M36024.1	<u>1316</u>	.....C.A.....A.....C.....	1375
NR_024997.1	<u>1333</u>	.....GA..A.....G.....C..C.....	1291
NR_121697.2	<u>1387</u>	..A...C..A.A...CT..G.TA.....A.....	1346
<b>Q481N</b>	1357	TACGTTCCCGGCTTT <b>GTACACAGCCCGCT</b> ACACCCATGGAG-CGGGTTCTGCCAGAA	1415
NR_026078.1	<u>1371</u>	.....C.....C.....-T.....GCT.....	1429
NR_024570.1	1366	.....C.....-T.....GCAAA.....	1424
M36024.1	1376	.....C.....-T.....GCA.....	1434
NR_024997.1	<u>1383</u>	.....A.C.....TT.....-A..C.....	1350
NR_121697.2	<u>1347</u>	.....A...-TT..CAA.A..C...	1405
<b>Q481N</b>	1416	GTAGTAGCCTAAC-CGTAG-GAGGGCGCTTACCAGGGCGGTTCTGACTGGGCTC	1473
NR_026078.1	<u>1430</u>	.....C...T...-..C...-G..A..G.....AGT.A..A.....	1487
NR_024570.1	<u>1438</u>	.....T...-..T.CG.-.....	1450
M36024.1	1435	.....A...T...-..T.CG.-G..A..TN.....	1471
NR_024997.1	<u>1351</u>	..GC.T.GCG...T..C...A...CA.GCG.....TG..C..A.C.....	1410
NR_121697.2	<u>1406</u>	..CC..GAG...-..C...CA..GGC.G.A..T...CA.C..T.....	1463
<b>Q481N</b>	1474	<b>AGTCGTAACAGCTAGCCCTA</b> TCCGRAGGTGCGGTTGGA	1512
NR_026078.1	<u>1488</u>	.....GG...CC.....C.....	1526
NR_024997.1	1411	.....GG.....	1437
NR_121697.2	<u>1464</u>	.....GGA...CC.....C.....	1502

**Q481N**

**CATGCCAGATTAGGTAGTTGG**GGGATAAAGCTTACCRAGCCGACGAT  
 CTGTAGCTGGTCTGAGAGGACGACCCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGARTTTTGGACATGGGGGAAAGCCCTGATCCAGCCATGCCGC  
 GTGAGGATGAGGCCCTTCGGGTTGTAACCTGCTT**GTACACAGCCCGCT**

CCTACGGGNGGCWGCAG

GACTACHVGGGTATCTAATCC

Generális gPCR primerek: Termék:290-291 bp

16S\_Gen\_fw: TGACAGCCGCCCGGCTAA (500 kb=01)

16S\_Gen\_rv1: GACTACHVGGGTATCTAATCTCT (795 kb=01)

16S\_Gen\_rv2: GGACTACHVGGGTATCTAATCTCT