



Potenciometriás ionszelektív mikroelektródok fejlesztése vízminták baktériumtartalmának meghatározására

TDK dolgozat

Szerző: Kállai Balázs Zsolt¹,

¹ II. Évfolyam vegyészmérnök MSc

Témavezetők: Dr. Gyurcsányi E. Róbert¹, Dr. Papp Soma²

¹ tanszékvezető egyetemi docens, BME Szervetlen és Analitikai Kémia
Tanszék

² egyetemi adjunktus, BME Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszék

Lezárva: 2025. január 7.

Tartalmi összefoglaló

A különböző vízminták (felszíni vizek, esővizek) ionos összetételéhez számos fontos minőségi jellemző (pH, keménység, sótartalom és nitráttartalom) kapcsolható. A folyamatos monitorálás és mérés gyakorlatilag minden releváns ionra megvalósítható rendkívül költséghatékonyan és egyszerűen potenciometriásan ionszelektív elektródokkal. Ugyanakkor a vizek egyéb minőségi jellemzőit, mint például a kiemelt jelentőségű bakteriális szennyezettség vizsgálatát a helyszínen jellemzően költségesen vagy relatíve hosszabb idő alatt (~ 48 óra) lehet meghatározni, tipikusan az ún. koliform baktériumok (*pl. kólibaktérium - Escherichia coli*) mennyiségének mérésén keresztül. Különösen előnyös lenne egy olyan multiplex mérési platform kialakítása, amely lehetővé teszi az ionos összetétellel kapcsolatos tulajdonságok mérése mellett a baktériumok gyors meghatározását is potenciometriás módon ionszelektív elektródokkal. Ennek megfelelően kutatásom során célul tűztam ki az *E. coli* baktériumok potenciometriás detektálási lehetőségének vizsgálatát.

A koliform baktériumok esetén gyakran alkalmazott kimutatási technika a β -galaktozidáz (GAL) enzimtartalom mérése. Kutatómunkámban a GAL enzim méréséhez a 6,8-difluoro-4-metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid (DIFMUG) szubsztrátot választottam, amelyből az enzim hatására olyan lipofil anion keletkezik, amely szelektíven meghatározható potenciometriás anioncserélő elektróddal hidrofil szerves anionok jelenlétében is.

Első lépésben anionszelektív elektródokat fejlesztettem, hogy alkalmazhatóak legyenek az enzimreakcióban keletkezett DIFMU anionok mérésére. Az anionszelektív membrán összetételének optimalizálását követően az ionszelektív elektródok miniaturizálását dolgoztam ki, ami lehetővé tette, hogy a méréseket rendkívül kis mintatérfogatban (~ 200 μ l) végezhessem. A mikroelektródok lehetőséget adtak az enzimreakciók folyamatos időbeli nyomon követésére is és alkalmasak voltak β -galaktozidáz tartalmú oldatokban az enzim aktivitás meghatározására akár 0,02 mU szintig. Ezt követően valós baktérium mintákon teszteltem a rendszert. Az enzimaktivitás méréséhez ki kellett dolgoznom a baktériumok lizálását oly módon, hogy az megvalósítható legyen helyszíni mérés során, valamint kompatibilis legyen a potenciometriás mérési módszerrel. A lízis optimalizálását követően a mikroelektródokat sikerrel alkalmaztam baktériumok jelenlétének kimutatására valós *E. coli* mintából, valamint egy kereskedelmi forgalomban kapható probiotikumból (*LXR Mikrobiom Komplex kapszula*) is.

Köszönetnyilvánítás

Köszönöm **Témavezetőimnek**, *Dr. Gyurcsányi E. Róbertnek*, aki lehetővé tette, hogy a *BSc* tanulmányaimat követően a mesterképzés során is folytathassam munkám a Kutatócsoportban, támogatását és tanácsait a kutatómunkával kapcsolatban. Szintén köszönettel tartozom *Dr. Papp Somának*, sok segítségével, tanácsaiért és mindig támogató, motiváló hozzáállásáért.

Köszönöm a **BME Kémiai Nanoérzékelők Kutatócsoport tagjainak**, *Jágerszki Gyulának* a 3D nyomtatásban nyújtott segítségével és hasznos tanácsaiért, *Solymosi Gergelynek* tanácsaiért. Köszönöm **hallgatótársaimnak**, *Kis Tündének* és *Csönge Katalinnak* támogatásukat és a baráti légkört, akikkel nem egy hosszú napot töltöttünk el közösen.

Köszönettel tartozom az Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék **Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport** munkatársainak, *Dr. Molnár Mónika* tanszékvezető-helyettes, egyetemi docensnek tanácsaiért és útmutatásáért a baktériumminták vizsgálatával kapcsolatban, illetve *Berkl Zsófiának* az *E. coli* sejtkultúra elkészítéséért, a PBS pufferben készített *E. coli* hígítási sorért és a Bürker kamrával és szélesztéssel (lemezöntés) végzett összsejtszám meghatározásért.

Tartalomjegyzék

TARTALMI ÖSSZEFOGLALÓ	2
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	3
TARTALOMJEGYZÉK	4
1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK	6
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	8
2.1. VÍZMINTÁK BAKTÉRIUMTARTALMÁNAK VIZSGÁLATA	8
2.2. BAKTÉRIUM MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREK	14
2.2.1 A B-GALAKTOZIDÁZ ENZIM ÁLTALÁNOS JELLEMZÉSE	14
2.2.2 A B-GALAKTOZIDÁZ OPTIKAI MEGHATÁROZÁSI MÓDSZEREI	15
2.2.3 B-GALAKTOZIDÁZ ASSAY-EK	20
2.2.4 EGYÉB MÓDSZEREK	22
2.2.5 ELEKTROKÉMIAI MÓDSZEREK AZ ENZIMAKTIVITÁS MEGHATÁROZÁSÁRA	24
2.2.6 PAPÍR ALAPÚ MÓDSZEREK	26
2.3. ANIONCSERÉLŐ TÍPUSÚ IONSZELEKTÍV ELEKTRÓDOK ALKALMAZÁSA	30
3. KÍSÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	32
3.1 FELHASZNÁLT ALAPANYAGOK	32
3.2 A FELHASZNÁLT OLDATOK KÉSZÍTÉSE	33
3.2.1 MUNKA PUFFER (WORKING BUFFER – WB)	33
3.2.2 ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSÉNEK OLDATAI	33
3.2.3 DIFMU KALIBRÁCIÓS SOR KÉSZÍTÉSE	33
3.3 IONSZELEKTÍV ELEKTRÓDOK KÉSZÍTÉSE	34
3.3.1 MAKROELEKTRÓDOK KÉSZÍTÉSE	34
3.3.2 PIPETTAHEGY MIKROELEKTRÓDOK KÉSZÍTÉSE	35
3.4 POTENCIOMETRIÁS MÉRÉSEK	37
3.4.1 KALIBRÁCIÓ A MAKROELEKTRÓDOKKAL	37
3.4.2 KALIBRÁCIÓ PIPETTAHEGY - MIKROELEKTRÓDOKKAL	37
3.4.3 ENZIMREAKCIÓK MÉRÉSE	38
3.5 FLUORESZCENS KÉPALKOTÁS	38
3.6 BAKTÉRIUMOK SZAPORÍTÁSA	39
3.7 A BAKTÉRIUMMINTÁK LÍZISE	40
3.8 PROBIOTIKUM KAPSZULA MINTAELŐKÉSZÍTÉSE	41
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	42
4.1 ANIONCSERÉLŐ MAKROELEKTRÓDOKKAL KÉSZÍTETT KALIBRÁCIÓK	42
4.2 PIPETTAHEGY-MIKROELEKTRÓDOK KALIBRÁCIÓI	43
4.3 ENZIMREAKCIÓK MONITOROZÁSA KÜLÖNBÖZŐ ENZIMKONCENTRÁCIÓK ALKALMAZÁSÁVAL	46

4.4	A BAKTÉRIUM LÍZIS PUFFERÖSSZETÉTEL VIZSGÁLATA	52
4.5	MÉRÉS BAKTÉRIUM LIZÁTUMOKBÓL	57
4.6	TELJES KOLIFORM MENNYISÉG MÉRÉSE PROBIOTIKUMBÓL	62
<u>5.</u>	<u>ÖSSZEFOGLALÁS</u>	<u>63</u>
<u>6.</u>	<u>IRODALOMJEGYZÉK</u>	<u>65</u>
<u>7.</u>	<u>FÜGGELÉK</u>	<u>70</u>
7.1	A BIO RENDER ALKALMAZÁSÁVAL KÉSZÍTETT ÁBRÁK JEGYZÉKE	70
7.2	AZ LXR MIKROBIOM KAPSZULA PONTOS ÖSSZETÉTELE	71

1. Bevezetés és célkitűzések

A különböző felszíni és felszín alatti vizek, illetve esővizek ionos összetételéhez számos fontos minőségi jellemző, pl. pH, keménység, sótartalom és az esetleges műtrágya szennyezésből származó nitráttartalom kapcsolható. Mérésükre és különösen a valós idejű monitorálásukra kiválóan alkalmasak a potenciometriás ionszelektív elektródok. A folyamatos valós idejű nyomonkövetés gyakorlatilag minden releváns ionra megvalósítható az azonos, rendkívül költséghatékony és könnyen multiplexálható potenciometriás mérési elvnek köszönhetően. Ugyanakkor a vizek egyéb minőségi jellemzőit a helyszínen költségesebben vagy kevésbé gyorsan lehet meghatározni, mint például a kiemelt jelentőségű bakteriális szennyezettséget a koliform baktériumok (*pl. kólibaktérium - Escherichia coli*) mennyiségének mérésén keresztül. A patogén baktériumok detektálása fontos a fertőzések megelőzése, élelmiszeranalitikai és a vízminőség ellenőrzésének szempontjából.

A koliform baktériumok meghatározására több módszert is kidolgoztak. A leggyakrabban alkalmazott esetben a baktériumokban megtalálható enzimet, a β -galaktozidázt (β -galactosidase, *GAL*) felhasználva, színes termék képződésével járó enzimreakción keresztül határozzák meg a baktériumok mennyiségét. Az adott mintában található baktérium mennyiséget jellemzően a telepkepző egységek számával (*Colony Forming Unit - CFU*) fejezik ki. A jelenleg rendelkezésre álló módszerek jelentős része kolorimetriás detektáláson alapul, amelyek kvalitatív (jellemzően a baktérium típus jelenléte/hiánya – *absence/presence* típusú vizsgálat) és kvantitatív meghatározásra is lehetőséget adnak.

Ezeknek a módszereknek azonban számos hátránya is van, mint a jellemzően időigényes, magas hőmérsékletű inkubálás (24 óra és 35-40 °C), a baktériumok tenyésztéséhez szükséges, gyakran drága, adott típusra speciális tápközegek és a vizsgálatok elvégzéséhez szükséges szakemberek, illetve a biztonságos munkavégzéshez előírt, megfelelően akkreditált laboratórium. A hagyományos módszerekhez képest az elektrokémiai detektálási technikák alkalmas alternatívát nyújthatnak rövid válaszidejük, egyszerűbb műszerezettségük, költséghatékony gyártásuk és az eltérő szenzorplatformokkal való kompatibilitásuk miatt.

Különösen előnyös lenne egy olyan gyors baktérium meghatározási módszer kidolgozása, amely kompatibilis az ionszelektív elektródokkal és a potenciometriás mérés technikával, így lehetőséget ad egy integrált multiplex potenciometriás mérési platform kialakítására. Ennek megfelelően célul tűztem ki az *E. coli* baktériumok potenciometriás

detektálási lehetőségének vizsgálatát. Elsőként olyan anionszelektív elektródokat fejlesztését tűztem ki célul, melyek alkalmazhatóak az enzimreakcióban keletkezett anionok mérésére. Az anionszelektív membrán összetételének optimalizálását követően a hatékony, kis mintatérfogatban végezhető mérések érdekében az elektródok miniatürizálására volt szükség. Munkám során ezért ún. *pipettahegy – mikroelektródokat* készítettem ($\varnothing$ 300 μm), amelyek lehetővé tették, hogy a méréseket akár egy mikrotiter tálca 250 μl -es üregeiben végezhessem.

A miniatürizált elektródok lehetőséget adnak az enzimreakciók folyamatos időbeli nyomon követésére. Ennek megfelelően célom volt a valós minták vizsgálata előtt pufferált közegben meghatározni a β -galaktozidáz tartalmú oldatokban az enzim aktivitását, mind a fejlesztett potenciometriás kiolvasással, mind a kontroll módszerként alkalmazott fluoreszcens képalkotással. Ezt követően a potenciometriás mérőrendszert alkalmaztam *E. coli* jelenlétének kimutatására nem patogén baktérium lizátumokban és kereskedelmi forgalomban kapható probiotikumban (*LXR Mikrobiom Komplex kapszula*).

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Vízminták baktériumtartalmának vizsgálata

A lakossági vízkészletek minősítésének fontos kritériuma a baktériumtartalom vizsgálata egészségügyi, szennyvízkezelési és újra felhasználási szempontból is. A mikroorganizmusok, például baktériumok vagy kórokozók túlélhetnek, szaporodhatnak és elterjedhetnek a vízrendszerekben, aminek következtében megközelítőleg 1,7 milliárd öt év alatti gyermek halt meg a fejlődő országokban a szennyezett víz fogyasztása miatt, az Egészségügyi Világszervezet (*WHO*) jelentése alapján [1]. A bakteriális fertőzések jelentőségét már az 1890-es években is felismerték [2]. A vízminták minősítése esetén felmerült a kérdés, hogy adott specifikus patogének (kórokozók) monitorozása, vagy a szennyezés indikátorainak vizsgálata védi jobban a lakosságot. A jelenlegi technológiák az utóbbi kategóriába tartoznak.

Az ***Escherichia coli*** (*E. coli*) Gram-negatív baktérium az *Enterobacteriaceae* családban, az *Escherichia* nemzetség legismertebb faja és a legfertőzőbb baktériumként ismert [3]. A törzsei közül vannak veszélytelenek, melyek az emésztőrendszer normális flórájához tartoznak és K2-vitamint termelnek. A veszélyes, úgynevezett virulens törzsek okozhatnak súlyos megbetegedéseket, mint a gasztroenteritisz, húgyúti fertőzések és a meningitisz [4]. Nem spóráképző, pálcika alakú baktériumok, átmérőjük hozzávetőlegesen 0,5 µm és hosszuk 1,0-3,0 µm közötti [5].

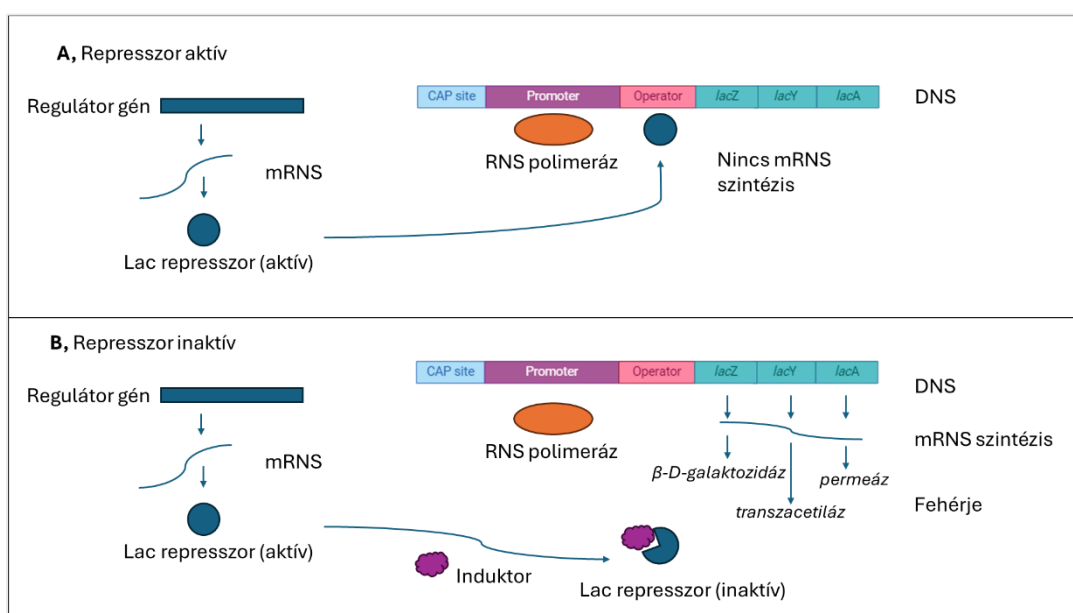
Az első, *E. coli* kimutatására irányuló tesztet 1904-ben *Eijkman* fejlesztette ki [2]. Az úgynevezett „széklet koliform teszt” (*fecal coliform test*) alapja az *E. coli* többi, a laktózt fermentáló baktériumhoz képesti magasabb hőmérséklettűrése volt. A módszert módosítva az 1900-as évek elején a magas hőmérsékletű inkubáció megszüntetésével, az *Enterobacteriaceae* minden olyan tagjára kiterjedt, amely képes volt a laktózt fermentálni. Ez a funkcionális vizsgálat, amely magában foglalta az *E. coli*-t és más baktériumokat a teljes koliform (*total coliform*) néven vált ismertté.

A **koliform baktériumok** csoportjába tehát olyan nemzetségek tartoznak, amelyek képesek a laktóz lebontására, vagy rendelkeznek a β -D-galaktozidáz enzimmel, amely képes különböző, *kromogén*¹ galaktopiranozid típusú szubsztrátot felhasználni a növekedéshez. Általánosságban igaz, hogy a törzsek nagy része nem jelent egészségügyi kockázatot, de jól

¹ szintelen kémiai vegyület, amely kémiai reakcióval színes vegyületté alakítható át

mérhetőek és indikatívak a fekális szennyezettség szempontjából, amely kiemelkedő jelentőségű a vízminták monitorozása esetén. A meghatározásnak megfelelő nemzetségek közé tartozik a *Klebsiella*, az *Enterobacter*, a *Serratia*, a *Citrobacter* és az *Escherichia*, melyek közül egyedül az *E. coli* jelenléte egészségügyi kockázat.

Az *E. coli* esetén a laktóz lebontás mechanizmusának magyarázta Jacob és Monod 1961-ben a génregulációt leíró **operon² modell** kidolgozásával [6]. Alapesetben a baktérium természetes cukorforrása a glükóz, azonban a laktóz tartalmú táptalaj esetén a laktóz hidrolízisét katalizáló, β -D-galaktozidáz enzim nagy mennyiségű (akár 1000x) termelődése figyelhető meg. A *lac* operon működését mutatja be a **1. ábra**.



1. ábra - A *lac* operon működése. **A:** aktív, a regulátor gén által termelt represszor esetén a represszor az operátorhoz kapcsolódva gátolja az mRNS szintézisét. A *lacZ*, *lacY* és *lacA* gének által kódolt fehérjék így nem termelődnek. **B:** laktóz jelenlétében olyan induktor metabolit keletkezik, mely a represszorral komplexet képez és ezzel gátolja kötődését az operátorhoz, végbemegy az mRNS szintézis és a fehérjék termelése (β -D-galaktozidáz, *permeáz* és *transzacetiláz*) [6]

A három *lac* strukturális gén expressziója két lépésben valósul meg. Elsőként a gének információi íródnak át mRNS-be, majd az RNS transzlációjával termelődik a három fehérje termék (β -D-galaktozidáz, *permeáz* és *transzacetiláz*). Az mRNS szintézisét az RNS polimeráz promóterhez kapcsolódása indítja el. Az expressziót egy represszor molekula szabályozza, melyet a regulátor gén kódol. A represszor az operátorhoz kötődve gátolja a transzkripciót az

² Az operon olyan gének csoportja, melyek aktivitását egy operátor szabályozza

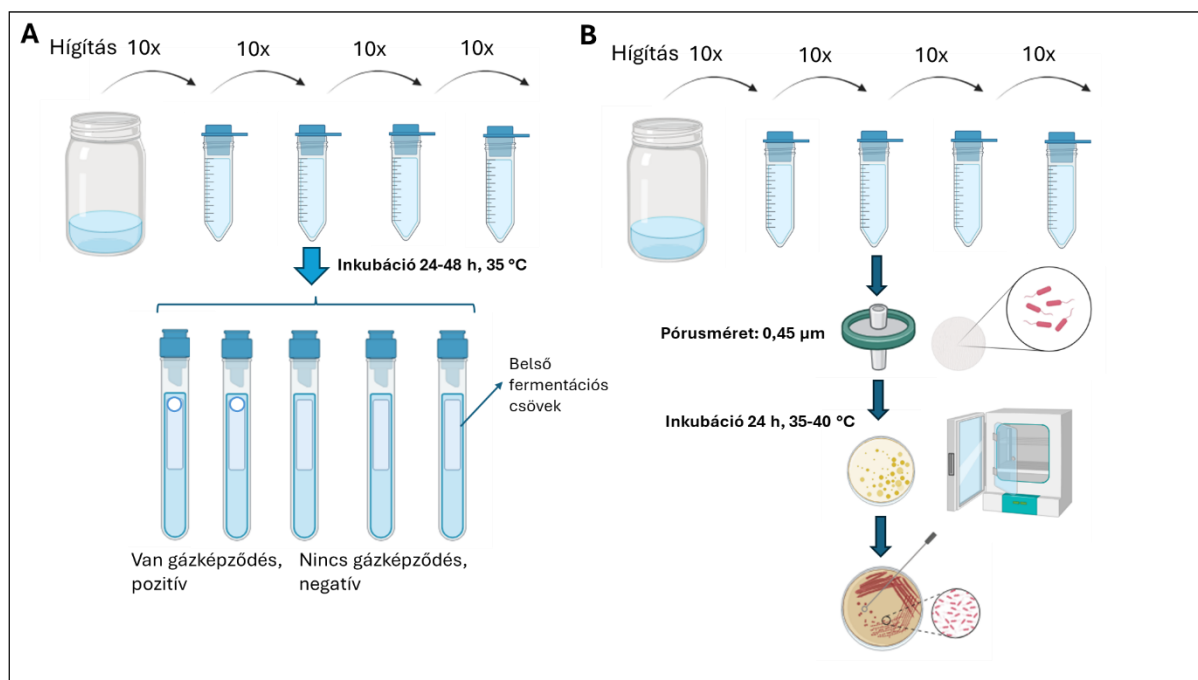
operonon. Ha a táptalaj laktóz tartalmú, egy képződő metabolit (*induktor*) a represszorhoz kötődve konformációváltozást idéz elő, leválasztva azt az operátor régióról, egyben lehetővé téve a transzkripciót.

Az 1970-es évekre világossá vált, hogy az ivóvízellátó rendszerek vizsgálata során azonosított koliform baktériumok nagy része nem *E. coli*. A „széklet koliform teszt” hátránya az érzékenysége az inkubáció alatti hőmérsékletingadozásra, illetve, hogy az *E. coli* számos törzse nem képes a laktóz fermentálására, hamis negatív eredményeket okozva [7]. Ennek hatására az 1980-as évek végén konszenzus alakult ki egy új technológia kifejlesztésére, amely alkalmas az *E. coli* közvetlen kimutatására és azonosítására az ivóvízből [8], [9].

A *Defined Substrate Technology (DST)* néven ismertté vált módszer alapja egy olyan kromogén szubsztrát, amit kizárólag az *E. coli*-ban megtalálható β -glükuronidáz enzim bont. Az enzim az *E. coli* esetében több mint 95%-ban megtalálható [10]. A módszert számos országban engedélyezték, bekerült az USA víz és szennyvízkezelési, vizsgálati szabványosított módszereinek 19. kiadásába³ [11] is. A *Colilert* néven szabadalmaztatott módszer (*Idexx Laboratories, Westbrook, ME*) lehetővé tette a teljes koliform mennyiség és 1 CFU *E. coli* szimultán meghatározását mindössze 100 ml mintából.

Az Egyesült Államokban három módszer engedélyezett az *E. coli* azonosítására [2]. A módszerek a többlépcsős fermentáció (*Multiple-Tube Fermentation – MTF*), a membránszűrés (*Membrane Filtration – MF*) és a már említett *Defined Substrate Technology*. Az *MTF* és *MF* módszer esetén az *E. coli* meghatározás előtt az összes koliform (*total coliform*) tesztet végzik el, majd ezt követően, egy második lépésben azonosítják az *E. coli*-t. A *DST* esetén az *E. coli*-t közvetlenül mutatják ki az ivóvízből, gyorsabb és költséghatékonyabb meghatározást biztosítva.

³ *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, a módszer 'Chromogenic Substrate' néven szerepel



2. ábra - A két hagyományos technológia a koliform baktériumok vizsgálatára. **A:** a többlépéses fermentáció (*Multiple-Tube Fermentation – MTF*) során a vízmintából hígítási sort készítenek egymást követő, 10x hígításokkal, majd mindegyik mintát beoltják jellemzően laktóz tartalmú tápoldattal. Az inkubációt követően a gázképződés pozitív eredményt jelent. **B:** membránszűrés (*Membrane Filtration – MF*), ekkor a hígítási sort követően a mintát 0,45 µm papírszűrőn keresztül szűrik, majd szelektív táptalajon inkubálják. [3]

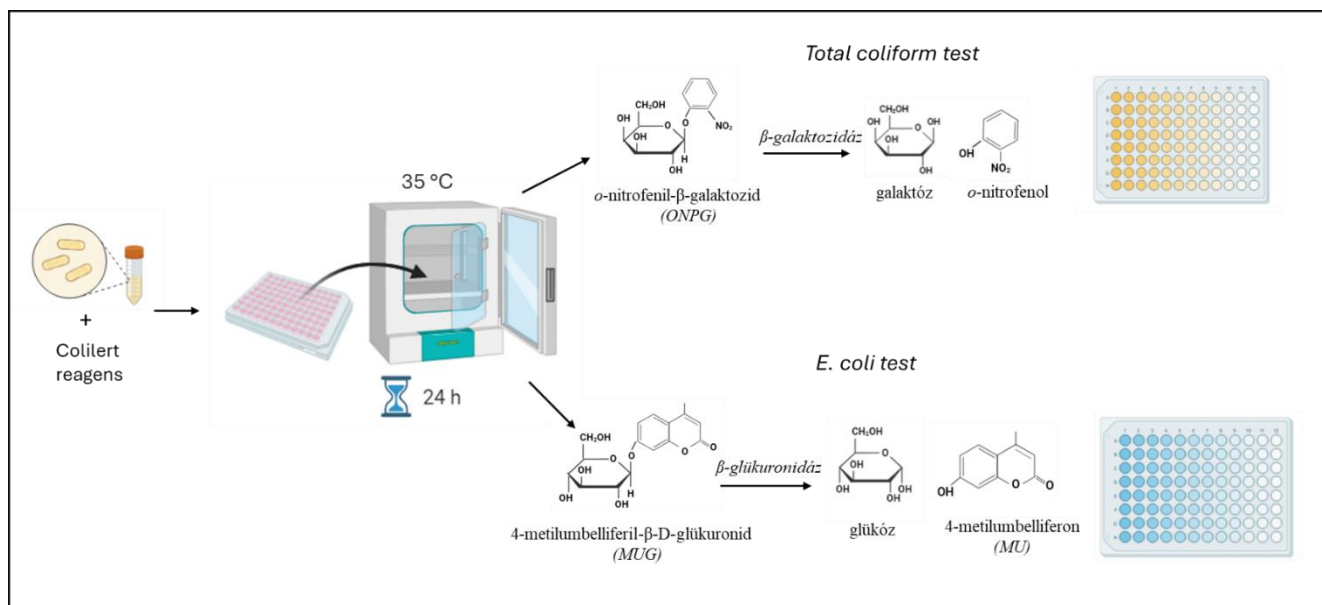
Az **MTF módszer** alapja, hogy az adott vízmintából hígítási sort készítenek egymást követő, 10x hígításokkal, majd mindegyik mintát beoltják (jellemzően laktóz tartalmú tápoldattal) [5]. Amennyiben gázképződés történik a 24-48 órás, 35 °C-on történő inkubálás után, a mintát potenciálisan szennyezettként egy második vizsgálatnak is alávetik. Ehhez általában speciális táptalajokat alkalmaznak (gyakori választás a ragyogó zöld laktóz epe táptalaj - *brilliant green lactose bile broth*⁴), vagy az indol képződés tesztelésére Kovács reagenst adnak a mintához [12]. Szintén opció a *4-metil-umbelliferil-β-D-glükuronid (MUG)* tartalmú agar használata. Az *E. coli*-ban található *β-glükuronidáz* enzim hidrolízis során bontja a *MUG*-ot, a keletkező *4-metilumbelliferon (MU)* fluoreszcens, 366 nm-en mérhető [9]. Csak abban az esetben nyilvánítják pozitívnak a mintát, ha a második teszt is alátámasztja az elsőt. A teszt eredményeit jellemzően össz-csíraszámokban (*Most Probable Number – MPN*) szokták megadni [13], amely a mintában található baktériumok átlagos számának statisztikai becslése.

⁴ A táptalaj ideális, mivel gátolja a Gram-pozitív baktériumok, például a *Lactobacillus*, a *Streptococcus*, a *Bacillus* és a *Clostridium* növekedését

A másik szintén hagyományos technika, a **membránszűrés** során a vízmintát kis pórusú (jellemzően $0,45\ \mu\text{m}$) papírszűrőn keresztül szűrik. A baktériumok méretüknél fogva nem jutnak át a pórusokon, fennmaradnak a szűrőpapír felületén. Ezt követően a szűrőpapírokat adott baktériumtípusra szelektív agarra (jellemzően *m-ENDO-LES* agar [12]) helyezik és 24 órás, $35\ ^\circ\text{C}$ -on végzett inkubációval megkezdik az *E. coli* tenyésztését.

A bemutatott két klasszikus módszer esetén a biokémiai tesztek a baktériumok lebontó reakcióin alapulnak. Emiatt nem specifikusak, sok esetben további tesztekre van szükség a pontos azonosításhoz. A baktériumokban megtalálható enzimrendszerek felhasználása alternatívát nyújt a kimutatásra, mivel az enzimatis reakciók gyorsak és érzékenyek, illetve lehetnek az adott csoportra, nemzetségre vagy fajra specifikusak, attól függően, hogy melyik enzimet használják fel [5].

A **Colilert technológiája** mind a baktérium jelenléte/hiánya (*presence/absence*) típusú vizsgálatra, mind kvantitatív meghatározásra alkalmas (**3. ábra**). A módszer két enzimreakciót használ fel a minták vizsgálatára [14]. Az *IDEXX* által szabadalmaztatott reagens hozzáadása után a vízminta 100 ml-éhez egy 24 órás inkubációs lépés következik $35\ ^\circ\text{C}$ -on. A két teszt párhuzamosan fut, a teljes koliform teszt esetén a baktériumban található β -galaktozidáz enzim az *o*-nitrofenil- β -galaktozid (*ONPG*) szubsztrátot hidrolizálja, ezáltal sárga színű *o*-nitrofenol keletkezik.



3. ábra - A Colilert technológia. A mintát a hozzáadott reagenssel együtt inkubálják $35\ ^\circ\text{C}$ -on 24 óráig. Ezt követően a sárga szín megjelenése pozitív teljes koliform tesztet jelent. A pozitív tesztek fluoreszcenciája igazolja az *E. coli* szennyezést a mintában.

Az *E. coli* azonosítására egy másik enzim által katalizált reakciót alkalmaznak, a teljes koliform teszten pozitív minták esetén fluoreszcenciát is vizsgálnak. Az *E. coli* specifikus enzimreakcióban a már említett β -glükuronidáz katalizálja a MUG hidrolízisét, a keletkező 4-metilumbelliféron (MU) fluoreszcenciáját pedig 366 nm-en mérik.

A Colilert és a hagyományos technológiák (membránszűrés és az MTF módszer) között több összehasonlítást is végeztek. Eckner [12] összesen 338 vízmintát (261 ivóvízmintát és 77 fürdővízmintát) vizsgálva hasonlította össze a membránszűrést, a többlépéses fermentáció és a Colilert tesztek eredményeit. A Colilert módszer érzékenyebbnek bizonyult, mint a hagyományos, a svéd szabályozások által engedélyezett módszerek a koliform baktériumok kimutatására, *E. coli* esetén azonos eredményeket kaptak az összes mintára nézve.

Edberg és munkatársai [8] tesztjeiből összesen 1086 volt pozitív az MTF módszer szerint és 1279 volt pozitív a Colilert módszerrel. A statisztikai kiértékelést három különböző módszerrel (t-próba, Mantel-Haenzel és Pearson féle khi négyzet statisztikák, regresszióanalízis) is elvégezték, a két módszer között nem találtak jelentős eltérést. Kinzelman [15] 2 éven át tartó vizsgálata során az IDEXX és az EPA által jóváhagyott membránszűrési módszer (*m-Tec agart* használva) között az ANOVA elemzés nem mutatott szignifikáns különbséget az *E. coli* mennyiségi meghatározása esetén édesvízi strandokról származó mintákban.

2.2. Baktérium meghatározási módszerek

2.2.1 A β -galaktozidáz enzim általános jellemzése

A β -galaktozidáz enzim három különböző funkciót is betölthet, képes a laktózt glükózzá és galaktózzá bontani (így beléphetnek a glikolízisbe), katalizálni a laktóz transzgalaktozilációját allolaktózzá, és az allolaktózt bontani monoszacharid építőegységeire [16]. Az enzim tetrameres szerkezetű, négy azonos polipeptidláncból épül fel, amelyek mindegyike 1023 aminosavból áll. A tetramer szerkezet disszociációja következhet be, ha bizonyos N-terminus közelében lévő aminosavak hiányoznak, két, inaktív dimerre. Az enzim aktív tetramer formája rekonstruálhatónak bizonyult, a jelenséget α -komplementációnak nevezik [17].

Az enzim specifikus, az oxigén glikozidos kötéssel rendelkező β -galaktopiranozidok bomlását katalizálja. A szubsztrátok esetén a galaktóz 2, 3 és 4 pozíciói különösen fontosak, a hidroxil csoportoknak megfelelő orientációban kell elhelyezkedniük. A reakció mechanizmusa szerint a galaktozid származék kötődik a szabad enzimhez, kezdetben egy külső (*shallow*) kötőhelyen, majd beljebb jutva (*deep mode*) az első átmeneti állapoton keresztül elsőként a galaktozidhoz kapcsolt csoport lép ki, a glikozidos oxigénből hidroxil csoport lesz. Egy újabb átmeneti állapoton keresztül felszabadul a második termék, a galaktóz is [16].

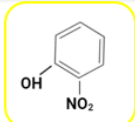
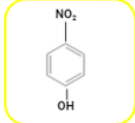
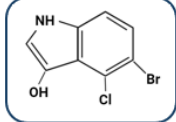
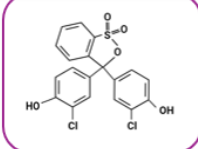
Az enzim aktivitása 6,5-7 pH között optimális, de a 6-8,5 pH tartományban stabil. A hőmérséklet esetén 60 °C-on már jelentős romlást tapasztaltak az aktivitásban. A megfelelő enzimműködéshez szükségesek a Na^+ , K^+ és Mg^{2+} ionok is. A Mg^{2+} ion emellett kofaktorként is viselkedik. A tapasztalatok alapján az említett ionokon felül a Mn^{2+} a másodlagos és negyedleges szerkezetek stabilizálásában segít. Inhibíciós hatása van a nehézfémionoknak (Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+}), a jóacetamidnak, ionos detergenseknek (*pl. Nátrium-dodecil-szulfát - SDS*) [18].

2.2.2 A β -galaktozidáz optikai meghatározási módszerei

2.2.2.1 A β -galaktozidáz színreakciókon alapuló meghatározása

A leggyakoribb módszer a β -galaktozidáz optikai meghatározására az enzim által katalizált reakció során keletkező színes termék abszorbanciájának mérése. Több, kereskedelmi forgalomban is kapható szubsztrát is elérhető, leggyakrabban azonban az *o*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid (**ONPG**) és az ebből keletkező, sárga színű *o*-nitrofenol, amit használnak a kinetikai, illetve végpont assay-ek esetén is. Az abszorbanciát jellemzően 415-420 nm-en mérik. A para szubsztituált származék (*p*-nitrofenil- β -D-galaktopiranozid, **PNPG**) használata kevésbé terjedt el [19]. A **CPRG** (klórifenol-vörös- β -D-galaktopiranozid) szintén népszerű választás, az enzim hatására keletkező lila színű termék abszorbanciáját 570 nm-en mérik [20]. A koliform baktériumok mellett az élesztő esetén is alkalmazott szubsztrát az **X-gal** (5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranozid) [21], a keletkező indol származik spontán dimerizálódik, intenzív kék színű termék képződésével, amit 615 nm-en mérnek. A jellemző szubsztrátokat foglalja össze az **1. Táblázat**.

1. Táblázat A különböző, kereskedelmi forgalomban kapható szubsztrátok és a felszabaduló színes termék bemutatása

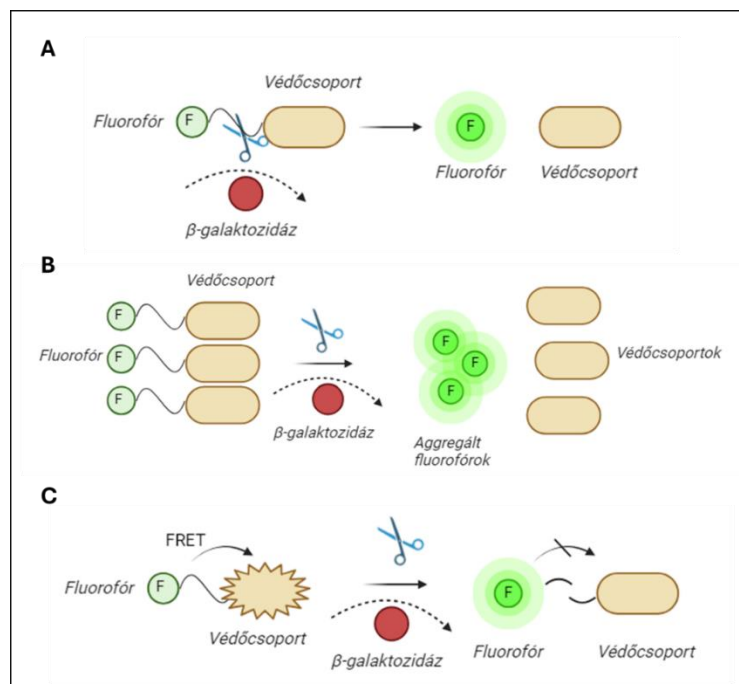
Rövidítés	Szubsztrát neve	Felszabaduló színes termék	Abszorbancia hullámhossza
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid		415-420 nm
PNPG	<i>p</i> -nitrofenil- β -D-galaktopiranozid		420 nm
X-gal	5-bromo-4-kloro-indolil- β -D-galaktopiranozid		Spontán dimerizálódik 615 nm
CPRG	klórifenol-vörös- β -D-galaktopiranozid		570 – 595 nm

A koliform baktériumok vizsgálata esetén azonban a színreakciók gyakran nem elég specifikusak a pontos baktérium típusának azonosítására, így a módszerek fejlődésével az olyan

szubsztrátok tervezése került előtérbe, melyekből fluoreszcens termék keletkezik és csak adott baktériumtípusra jellemző enzimek képesek bontani.

2.2.2.2 A β -galaktozidáz fluoreszcens mérésének lehetőségei

Az enzim aktivitásának mérésére a fluoreszcencián alapuló technikák a szelektivitás, nagy érzékenység és nagy felbontású képalkotás miatt ideális detektálási alternatívát nyújtanak [22]. Az enzimreakció szubsztrátjainak specifikus tervezése lehetővé tette az emissziós hullámhossz a közeli infravörös tartományba (*Near-Infrared Rays* -NIR) történő eltolását, javítva a jelfeldolgozást és a sejtek áteresztőképességének kihasználását. A módszerek alkalmaznak védőcsoport eltávolítását követően fluoreszcens molekulákat [23], aggregáció indukált emissziót (*aggregation-induced emission* - AIE) és Förster rezonancia energiatranszfer (FRET) is, ahogy azt a **4. ábra** is bemutatja.



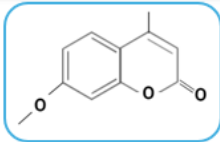
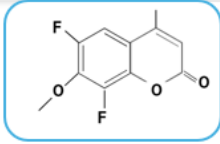
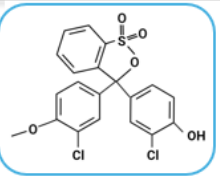
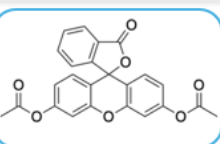
4. ábra - A különböző, β -galaktozidáz meghatározására alkalmas fluoreszcens technikák. **A:** védőcsoport lehasítása során keletkező fluoreszcens molekula, **B:** Aggregáció indukált emisszió, **C:** Förster rezonancia energiatranszfer (FRET) [22]

A baktériumok meghatározására jellemzően a legegyszerűbb módszert alkalmazzák, ekkor egy védőcsoportot (ami a β -galaktozidáz enzim esetén a galaktóz) kapcsolnak a fluorofórhoz (**4. ábra/A**). A β -galaktozidáz az enzimreakció során lehasítja a védőcsoportot, aminek hatására fluoreszcens reakciótermék keletkezik, specifikus választ biztosítva. A kereskedelmi forgalomban számos fluoreszcens termék keletkezését biztosító szubsztrát áll rendelkezésre, amit az **2. Táblázat** mutat be. A leggyakrabban alkalmazott szubsztrát a 4-

metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid (**MUG**). A gerjesztési hullámhosszuk a pH függvényében változik, 330-385 nm között (4,6-10,4 pH tartományban), emissziós maximumuk a 445-454 nm-es tartományba esik [24]. A pK_a értékük a semleges pH felett van, így a fluoreszcencia maximalizálása érdekében erősen lúgos pH-n (közel 10,4) valósítható meg hatékony kiolvasás. A monitorozás esetén ez problémát jelenthet, és az olyan enzimek esetén sem ideális, ahol az ideális aktivitás alacsonyabb pH-n érhető el (pl. foszfatáz enzimek). A fluorozott származék képzése (*6,8-difluoro-4-metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid* - **DIFMUG**) nagy mértékben csökkentette a pK_a értéket (4,7-re) és 7-es pH-n nagyobb érzékenységet is mutatott a β -galaktozidáz meghatározása során [24], [25].

A *klórfeol-vörös- β -D-galaktopiranozid* (**CPRG**) egy tipikusan a kolorimetriás assay-ek során alkalmazott szubsztrát, azonban a poli-L-argininnel (pR) olyan komplexet képez oldatban, ami intenzív fluoreszcenciát is mutat [20]. A szulfonátcsoport és a poliaminok reakciója egy töltésátviteli komplex képződését eredményezi, ami a fluoreszcencia intenzitás közel 70x-es növekedését jelenti. A módszer egyik fő előnye, hogy a gerjesztési és emissziós hullámhosszok a spektrum vörös tartományába esnek, így elkerülve a gyakori interferencia-jelenségeket, amik a MUG esetén is előfordulnak. A módszert az *E. coli* kimutatására tesztelve elérték az 1 CFU/10 ml szintet 12 óra baktériumtenyésztés és 1 órás vizsgálatot követően.

2. Táblázat A kereskedelmi forgalomban kapható fluoreszcens szubsztrátok néhány példája

Rövidítés	Szubsztrát neve	Fluoreszcens csoport	Fluoreszcencia hullámhossza
MUG	<i>4-metilumbelliferil-β-D-galaktopiranozid</i>		330-385 nm-es gerjesztési (4,6 - 10,4 pH), illetve 445-454 nm közötti emissziós maximum
DIFMUG	<i>6,8-difluoro-4-metilumbelliferil-β-D-galaktopiranozid</i>		360 $\pm$ 20 nm gerjesztés és 460 $\pm$ 20 nm emisszió
CPRG	<i>klórfeol-vörös-β-D-galaktopiranozid</i>		Komplexbépzést követően poli-L-argininnel a felszabaduló klórfeolvörös intenzív fluoreszcenciát mutat (580 nm gerjesztés, 610 nm emisszió)
-	<i>Fluorescein-diacetát</i>		gerjesztés (485 nm) és emisszió (514 nm), a látható tartományban

A **fluoreszcein-alapú szubsztrátokat** érzékenységük, biokompatibilitásuk, és a látható tartományba eső gerjesztés (485 nm) és emisszió (514 nm) köszönhetően szintén széles körben alkalmazzák [26]. Probléma viszont a pH; - és fényérzékenység, illetve a gerjesztett állapotú fluorofór oxidatív lebomlása. A fluoreszcein-diacetát származékát *M. tuberculosis* kimutatására alkalmazták nyálmintákban és szennyvízben [27], [28]. A fluoreszcein-diacetátot az élő baktériumsejtekbe jutva nem-specifikus észterázok bontják, ami fluoreszcein felszabadulásával jár. Ez a sejteken belül felhalmozódik és lehetővé teszi az élő sejtek közvetlen vizualizálását fluoreszcens mikroszkópiával.

A fluoreszcencia kialakulásának mechanizmusa lehet molekulán belüli töltés átrendeződés (*intramolecular charge transfer* - *ICT*) vagy fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (*FRET*) alapú. Az *ICT* esetén elektronküldő csoportok π -elektron rendszeren keresztül kapcsolódnak elektronszívó csoportokhoz. A molekula alapállapotban polarizált szerkezetet mutat, a gerjesztett állapot dipólusmomentuma nagymértékben eltérhet az alapállapottól. Ez fénygerjesztés hatására erősíti a polarizációt, ami hullámhossz eltolódást okoz. A hagyományos szerkezetű fluoroforok aggregált állapotban komoly intenzitás csökkenési problémákkal küzdenek, kis Stokes-eltolódással és gyenge fénystabilitással rendelkeznek [29]. Az **aggregáció indukált emissziót** (4. ábra/B) mutató fluorofórok nagy Stokes-eltolódással, jó stabilitással és kiváló jel-zaj viszonyt biztosítanak. Az alapvetően nem fluoreszcens molekulák enzimreakcióban történő hasítása során fluoreszcens termékek keletkeznek, amik aggregálódva a biológiai rendszerek hosszútávú monitorozását lehetővé tevő stabil fluoreszcenciát mutatnak [30].

A *Förster rezonancia energiatranszfer* (**FRET**) (4. ábra/C) során egy gerjesztett elektronállapotú donor molekula átadja energiáját egy akceptornak. Az energiaközlés nem jár sugárzással, dipól-dipól kölcsönhatáson keresztül történik. Amennyiben az akceptor molekula fluoreszkál, a folyamatot gyakran **fluoreszcencia rezonancia energiatranszfernek** is nevezik. A FRET a donor-akceptor távolság hatodik hatványával fordítottan arányos, ami nagy érzékenységű intra és intermolekuláris távolságok mérésre ad lehetőséget [31]. Komatsu és munkatársai a CMF β -gal nevű szubsztrát esetén használták ki a fellépő FRET-et, a molekula 7-hidroxikumarin része az energiadonor és a fluoreszcein az akceptor [32]. A szubsztrát alkalmazása a fehérjejelölés esetén lehetővé teszi jelölt célfehérje azonnali kimutatását, a nem reagált jelölőmolekulák jelenlétében is.

A NIR tartományba eső emissziós hullámhossz előnyös a szövetek áteresztőképessége, az interferencia (autofluoreszcencia) csökkentése és a biológiai szövetek fénykárosodásának csökkentése szempontjából. Ezek a szempontok leginkább az in vivo képalkotást igénylő technikák esetén kiemelkedő fontosságúak. Az emissziós hullámhossz növelhető nagy, kiterjedt konjugáció kialakulást elősegítő kromofórok alkalmazásával vagy erős elektron-szívó csoportok beépítésével [33], [34]. A TRG szubsztrát tervezése esetén a konjugáció növelésének hatására (fenetil-amin rész naftollal való cseréje) az emissziós hullámhossz elérte a vörös tartományt (638 nm), ami több mint 50 nm-es eltolást eredményez a tipikus Rodamin B-hez (~580 nm) viszonyítva [34]. Az erős elektron-szívó csoport beépítésére jó példa a hemicianin alkalmazása, magas fluoreszcencia-kvantumhatásfoka, és a nagy Stokes-eltolódás miatt, ami az emissziót a 900-1300 nm-es tartományba tolta el [35].

2.2.3 β -galaktozidáz assay-ek

Az első β -galaktozidáz alapú assay **Miller** nevéhez kapcsolódik, a módszer hagyományos, nagyobb térfogatú csöveket használ a baktériumok tenyésztésére, az *ONPG* szubsztrát átalakításával járó enzimreakció 1 M Na_2CO_3 STOP reagenssel történő leállítása után, végponti kiolvasást (*endpoint detection*) alkalmaz. Az enzimaktivitást Miller-féle aktivitási egységben (*Miller Unit*⁵) adták meg, amit a továbbfejlesztett assay-ek is alapul vettek. Hátránya, hogy időigényes, a különböző lépések nehezen automatizálhatóak (nagy mintaszám esetén probléma), így áteresztőképessége is kicsi. A Miller féle módszer adaptációjával 96 üreges (*well*) mikrotiter tálcákat alkalmazva lehetőség lenne a minták elemzési lépéseinek párhuzamos végrehajtására, illetve az automatizálhatóság javítására. Továbbá, a végponti detektálás helyett a kinetikai vizsgálatok elvégzése a reakciók folytonos időbeli követését is lehetővé tenné, a leállítási lépést eliminálva [36]. Ennek megfelelően a Miller féle módszer javítására számos különböző fejlesztés valósult meg.

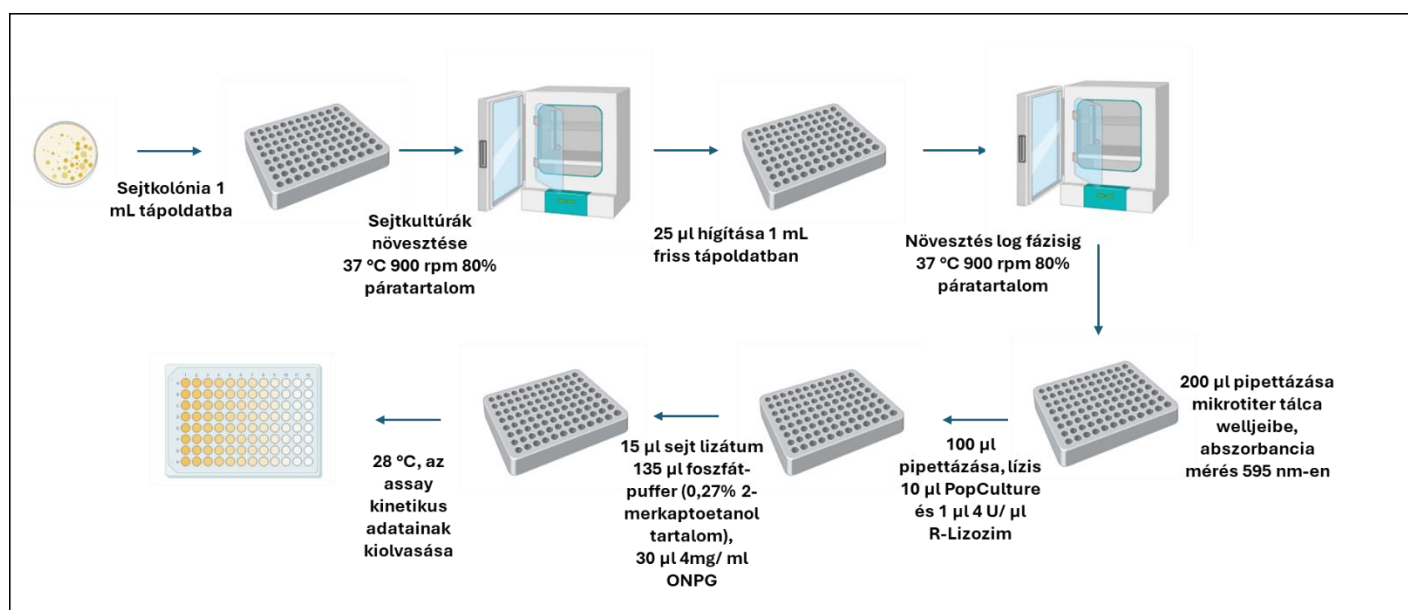
Putnam és Koch [37] módszerükben a baktériumok lízisének javításával jobb reprodukálhatóságot és az enzimaktivitás növekedését érték el. A lízishez használt reagens SDS-t, 0,02 M MnSO_4 -ot, toluolt és 2 – merkaptóetanolt tartalmaz. Az SDS a fehérjék denaturálásáért felelős, a mangánion az enzimet stabilizálja, a toluol a sejtfal komponenseit oldja, a merkaptóetanol pedig redukálja az enzimet. **Menzel** [38] a klasszikus módszer mikrotiter – tálca olvasóval (*plate reader*) és pipettázó robottal automatizált változatát valósította meg, ezzel növelve a módszer áteresztőképességét. Az automatizált rendszerek előnye továbbá a hőmérséklet kontrollálásának lehetősége és az enzimreakciók párhuzamos vizsgálata. A *Miller Unit*-ban megadott eredmények összehasonlításához egy saját, empirikus korrekciós tényezőt vezettek be.

Arvidson [39] szintén mikrotiter tálcák welljeiben végezte az *E. coli* minták lízisét, de a szerves oldószerek használata helyett T4 fág fertőzéssel bontotta az *E. coli* sejtfalát. A T4 bakteriofág egy, az *E. coli* baktériumot fertőző vírus, a sejtfalbontás hatékonyságához a bakteriofágok nagy feleslege szükséges a baktériumsejtekhez képest (több, mint 100 fág/baktérium). **Griffith és Wolf** [40] szintén a Miller-féle módszert adaptálták 96 *welles* mikrotiter tálcára, az SDS/kloroformmal lizált sejteket a klasszikus *ONPG* szubsztráttal, *endpoint* kiolvasással vizsgálták. A baktérium-sejtkultúra növesztési lépését is mikrotiter

⁵ Az előállított ONP mennyisége a reakció idő függvényében a sejtkultúra térfogatára vonatkoztatva osztva az optikai sűrűségével, specifikus enzimaktivitás – Miller Unit

tálcában végezték, 250 rpm-el rázatva 37 °C-on 10 órán át, a baktériumok logaritmikus növekedési fázisa megegyezett a hagyományos módszer esetén tapasztalttal.

Thibodeau [36] a protokollja fejlesztése során három gyakori problémát helyezett fókuszba, a baktériumok mikrotiter tálcában végzett növesztésének optimalizálását, a szerves oldószert nélküli lízis kifejlesztését és a meghatározott enzimaktivitás értékek Miller-féle aktivitási egységben történő kifejezését. A részletes protokollt mutatja be a **5. ábra**. A sejt kultúrák növesztéséhez 900 rpm-es rázást alkalmazott 37 °C-on egy éjszakán át, majd a hígítást követően a log fázisig növesztette a baktériumokat. Az 595 nm-en végzett abszorbancia mérést követően (baktériumok számának meghatározása) a lízist nem a megszokott SDS/kloroform alkalmazásával, hanem detergens alapú, kereskedelmi forgalomban kapható vegyszerekkel végezte. A *PopCulture*® és Lizozim alkalmazásával lizált baktériumminták esetén összehasonlítva a hagyományos módszerrel ugyanolyan, vagy jobb enzimaktivitás értékeket tapasztalt. A *PopCulture*® az *E. coli* sejtfalát roncsolja denaturáció nélkül, a lizozim pedig a peptidoglikán kötéseket bontja a sejtfalban, javítva a lízis hatékonyságát.



5. ábra - A Thibodeau által fejlesztett [36], detergens alapú lízist alkalmazó *E. coli* meghatározási protokoll részletes bemutatása

2.2.4 Egyéb módszerek

Az **immunológiai módszerek** szelektivitása kiemelkedő, a hagyományos módszerekhez képest gyorsnak számítanak (*E. coli* baktériumok mennyiségének meghatározása 24 órán belül). Alapja az antigén-antitest reakció, számos eltérő megvalósítással. Az **ELISA** (enzimhez kötött immunszorbens assay) esetén szendvics komplex alakul ki a wellekben rögzített antitest (*capture antitest*), az antigén (méréndő analát) és az enzimmel jelölt antitest között [41]. Az enzim a választott szubsztátot általában színreakcióval alakítja át. Gyakran szükség van a baktériumok vizsgálat előtti szaporítására, így a helyszíni elemzésekhez nem ideális módszer, illetve a kevésbé konvencionális ELISA komponensek beszerzése körülményes és költséges más módszerekhez viszonyítva.

A koliform baktériumok meghatározására lehetőség van **GC-MS módszerekkel** is. Eddig az azonosítás jellemzően vagy adott biomarkerek jelenlétének/hiányának vizsgálatával, vagy a kapott kromatogrammok ujjlenyomatszerű összehasonlításával történt. Újabban előtérbe került a baktériumok által kibocsátott illékony szerves vegyületek (*VOC*) mérése, a bakteriális szennyezettség ezen keresztüli azonosítása [42]. A *VOC*-k vizsgálatára ideális a *headspace-GC MS* technika alkalmazása, ekkor a mintát állandó hőmérsékleten termosztálják akár 24 órán keresztül, a minta és a gázfázis ezalatt egyensúlyba kerül, majd a gőztérből vett mintát injektálják a GC-MS rendszerbe. Probléma a *VOC*-k elemzésével, hogy ritka a csak adott baktériumra specifikus kibocsátott vegyület, jellemzően csak a *VOC* mintázatok vizsgálatával lehet különbséget tenni a baktériumtípusok között [43].

A nukleinsav-alapú technikák közül a legelterjedtebben alkalmazott a **polimeráz láncreakció** (*polymerase chain reaction - PCR*) [44]. A PCR során a DNS-szál rövid, jól definiált szakaszát sokszorozzák (amplifikáció) az analízist megelőzően, érzékenysége kiemelkedő. A módszer azonban magas hőmérsékletű kezelést (denaturáció során 100 °C) igényel, nem tesz különbséget az élő és elhalt sejtek között, a környezeti szennyezésekre érzékeny és speciális reagensek szükségesek hozzá.

Az **áramlási citometria** (*Flow Cytometry - FCM*) szintén lehetőség a baktériumok műszeres analizisére [45]. A módszerrel kis mintamennyiséggel is végezhető meghatározás, a lézer alapú technika lehetővé teszi az előre és oldalra irányuló fényszórás elemzését is a fluoreszcencia mellett. A mintaoldat áramlási cellán halad keresztül, majd a fókuszálással részecskénként világítják meg a lézerfényvel, mérve a különböző irányú fényszórást és fluoreszcenciát. Az elemzés során a részecskék méreteloszlása is vizsgálható.

A **Raman spektroszkópia** lehetőséget nyújt a baktériumminták roncsolásmentes, gyors és akár sejtenkénti vizsgálatára [46]. A lézerfény szóródásán alapuló spektroszkópai technika specifikus, a minta összetételének meghatározására alkalmas információt ad a molekulára jellemző rezgések elemzésével. Kombinálása mikroszkóppal kis mintatérfogatban végzett elemzéseket, akár sejtek külön-külön vizsgálatát is biztosítja. Az IR (*infravörös*) spektroszkópiával ellentétben a víz nem zavarja a meghatározást, mivel gyenge Raman szóródást mutat. A gerjesztési hullámhossz megfelelő megválasztása fontos, mivel a fluoreszcencia akadályozhatja a Raman szóródás mérését. Probléma a Raman jelek gyengesége, aminek felerősítéséhez speciális technikák szükségesek, mint a felület erősített Raman spektroszkópia (*Surface Enhanced Raman Spectroscopy - SERS*), ahol fém nanorészecskéket, vagy nanostrukturált fémfelületeket használnak a gyenge Raman-jel felerősítésére.

A **felületi plazmon-rezonancia** (*Surface plasmon resonance - SPR*) a Kretschman-geometrián alapuló elrendezés esetén a teljes belső visszaverődés jelenségén alapul, ami két különböző optikai tulajdonságú közeg határfelületén alakul ki [47]. A kísérletek során polikromatikus fénysugarat bocsátanak a chip felületére. A kialakuló plazmon rezonancia a beesési szög függvénye, amit több tényező is befolyásol, mint a fény hullámhossza és a dielektrikus közeg. A törésmutató változása így a szög változásával is jár. Az SPR chip felületén vékony aranyréteg található, amire olyan receptorokat rögzítenek, amik képesek a minta molekuláival kölcsönhatást létrehozni. Amikor interakció jön létre az analit és az immobilizált receptor között, megváltozik a törésmutató, ami az SPR szög eltolódásaként érzékelhető, amely a molekulatömeg és a koncentráció függvénye [48]. Az SPR módszer valós időben, kvantitatív és jelölésmentes detektálást biztosít. Mind fehérje és kismolekulák kimutatására alkalmazták, de alsó kimutatási határa a baktériumok esetében még elmarad a többi módszertől (előkészítés nélküli *E. coli* O157:H7 minta esetén $5 \cdot 10^7$ CFU/mL [47]).

2.2.5 Elektrokémiai módszerek az enzimaktivitás meghatározására

Az **elektrokémiai detektálási technikák** alkalmazásával számos, a hagyományos és eddig bemutatott műszeres meghatározásokra jellemző probléma kiküszöbölhető. A különböző elven működő detektálási lehetőségek az amperometria, az impedancián alapuló módszerek, a potenciometria és a konduktometria [49]. Az **amperometriás detektálás** alapján működő szenzorok gyors és érzékeny meghatározást biztosítanak, ennek megfelelően alkalmazásuk is sokrétű. A DNS alapú technikák és antitesteket alkalmazó módszerek mellett az enzimreakciókon alapuló meghatározások is előtérbe kerültek [50].

Az adott enzimreakcióban keletkező termék elektrokémiai mérése az enzimaktivitás közvetett meghatározására ad lehetőséget. A Zhang és munkatársai [51] által készített szenzor az enzimaktivitás gyors meghatározását teszi lehetővé olyan folyamatos méréstechnikával, ahol a kalibráció közvetlenül a mérés előtt történik. Négy, diagnosztikai szempontból releváns enzim esetén (*alkohol dehidrogenáz* - **ADH**, *laktát dehidrogenáz* - **LDH**, *xantin oxidáz* - **XOx**, és *glükóz oxidáz* - **GOx**) a kimutatási határok a 0,0031 – 0,2 U/L tartományban voltak. Az assay első lépése a szubsztrát háttérének felvétele, majd a kalibráció a termék spikeolásával többször egymás után, végül ismert aktivitású enzimet adtak hozzá. A kalibrációra illesztett meredekség és az enzimreakció során meghatározott meredekség hányadosával számítható az enzimaktivitás, amely meghatározása minden esetben 3%-nál kisebb relatív hibával történt. Rochelet [52] a β -glükuronidáz aktivitását a *p*-aminofenil- β -D-glükopiranozid (**PAPG**) szubsztrátból keletkező termék **ciklikus voltammetriás (CV)** mérésével határozta meg. A módszer az *E. coli* gyors és specifikus kimutatását teszi lehetővé komplex környezeti mintákban (pl. szennyvíz). Az enzimatis hidrolízis során *p*-aminofenol (**PAP**) szabadul fel. A CV-vel mért anódos csúcsáram intenzitása arányos a β -glükuronidáz-al, amin keresztül a baktériumok mennyisége is meghatározható a vizsgált mintában. A méréseket szitanyomtatott elektródokkal végezték, optimalizált pH és szubsztrát koncentráció esetén a β -glükuronidáz enzim kimutatási határértéke 10 ng/mL volt. A lízist megelőzően a koncentrációt elősegítve a minták 10 mL-ét (0,45 μ m pórus átmérőjű szűrőn) szűrték, a lízist Triton X detergenssel végezték. A módszert PCR-rel is összehasonlították a szennyvízminták vizsgálata esetén.

Az **elektrokémiai impedancia spektroszkópia (EIS)** jellemző alkalmazása biomolekulák esetén az enzimek, antigének vagy antitestek elektródokon történő immobilizációjának nyomon követése. A mért értékek és a biológiai rendszerek összekapcsolása fenomenológiai modellek segítségével, például egyenértékű áramkör

illesztésével történik. Vidakovic-Koch [53] és munkatársai a *torma-peroxidáz* enzim esetén állítottak fel három különböző matematikai modellt, ami a hidrogén-peroxid redukció mechanizmusát felhasználva definiálja az elméleti elektrokémiai impedancia értékeket. Ezzel a klasszikus egyenértékű áramköri modell illesztése helyett az enzimreakció kinetikai paraméterei alapján értelmezték az impedanciát.

Smith és munkatársai a *glükóz oxidáz* enzim reakciójának **amperometriás** és **potenciometriás** követésének lehetőségét hasonlították össze [54]. A **GOx** által katalizált reakcióban a glükóz szubsztrát glukono- δ -lakton terméké alakul, az enzim kosubsztrátjaként pedig egy redoxpárt, ferrocén-metanol/ferrocénium-metanolt ($FcMeOH/FcMeOH^+$) alkalmaztak. A reakció során a *glükóz oxidáz* elektront ad át a ferrocénium-metanolnak. A potenciometriás reakciókövetés során a redox pár arányának változása a **Nernst egyenlet** által meghatározott potenciálváltozással jár, így az időbeli lefutása követhető. Amperometriás esetben az kosubsztrát redukciója által generált áram változását ultramikroelektrodon (*UME*) követték, amely az enzimreakció előrehaladtával csökken, ahogy az enzimreakció fogyasztja a kosubsztrátot. Tesztelték a munkaelektrod anyagának hatását (arany, platina és üvegszerű szén (*glassy carbon* - *GC*)) és három különböző redox mediátor alkalmazását is. Összehasonlítva a két technikát, mindkét esetben hasonló értékeket kaptak az enzim átviteli számának (*turnover number*) meghatározásakor. Az amperometria esetén probléma, hogy a kis koncentrációtartományokban jellemzően nagyon kis áramértékek precíz mérését kell megoldani, hogy a meghatározás ne legyen nagy mérési bizonytalansággal terhelt.

A **potenciometria** előnye, hogy egyszerűen automatizálható, az áram rendkívüli kis értéken tartása (*pA* nagyságrend) nem destruktív analízist tesz lehetővé, a *Nernst egyenlet* pedig az elektród méretétől független meghatározási elvet biztosít. Az optikai meghatározáshoz képest kis mintamennyiségek is vizsgálhatóak és míg a kis úthossz ennél a technikánál jelentősen rontja a meghatározás érzékenységet, a potenciometriánál nincs ilyen jellegű korlátozás, így koncentráltabb minták is vizsgálhatóak. A jelenlegi módszerek közül azonban csak nagyon kevés, potenciometriás detektálást alkalmazó meghatározás van.

2.2.6 Papír alapú módszerek

A papír alapú szenzorok a diagnosztika új iránya, a *point of care*⁶(POC) eszközök szempontjából ideális tulajdonságokkal rendelkeznek. A WHO⁷ *REASSURED* [55] programja szerint az ideális diagnosztikai teszt képes kis mennyiségek elemzésére, hordozhatónak kell lennie és az analízis kevés feldolgozási lépéssel és minimális mintaelőkészítéssel jár. Mindezt hatékonyan, változó környezeti feltételek mellett és a megfelelő, releváns klinikai koncentrációtartományban. A vizsgált folyadék halmazállapotú minták rendkívül változatos összetétellel rendelkeznek, komplex mátrixot eredményezve a mérések végrehajtása szempontjából, ennek megfelelően számos detektálási technika elérhető (3. Táblázat).

A legelterjedtebb papír alapú szenzor típus a **laterális áramlási teszt** (*lateral flow assay* - *LFA*), kolorimetriás detektálási technikával [56]. A tesztcsík felépítése egyszerű, a minta felcseppentése során végighalad az általában nitrocellulóz membrán felületén kialakított konjugált párnán (*conjugate pad*), a teszt és kontroll területen, majd egy abszorbens köti meg. Az analát elsőként színes jelölt antitestekkel lép reakcióba, majd a tesztcsíkon rögzített antitestekkel szendvics-komplexet hoz létre, megváltoztatva a tesztcsík színét. A maradék jelölt antitest a kontroll csíkon kötődik meg. Negatív minta esetén egyedül a kontroll csíkon kötődnek meg a jelölt antitestek.

Az *LFA* technikát kidolgozták baktériumok detektálására, pl. *Salmonella* esetén szendvics-immunoassay fejlesztésével [57]. A baktériumok elválasztását a minta mátrixtól mágneses gyöngyökkel végezték, a detektálás alapja β -galaktozidáz enzim által katalizált reakció terméke. A reakció színváltozással jár, a szubsztrát a sárga színű klórifenol-vörös- β -D-galaktopiranozid (*chlorophenol red- β -D-galactopyranoside* - *CPRG*), amelyből az enzim hatására vörös termék keletkezik. A szenzorral elért LOD 440 és 640 CFU/mL a sejtkultúra közegében és tejben.

A **kolorimetriás detektálás** (*LFA*-n kívüli) alkalmazására példa a baktériumok által kibocsátott illékony szerves vegyületek (*volatile organic compounds* - *VOCs*) mérése. A különböző baktériumok eltérő összetételű *VOC* kibocsátása lehetőséget ad meghatározásukra. Bordbar és munkatársai [58] az *S.aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli* és *Proteus mirabilis*

⁶ Olyan vizsgálat, amit a gyógyítás helyszínén végeznek el a mintavételtől az eredmények kiértékeléséig. Ilyen a vércukormérés, terhességteszt, narkotikumok szűrése

⁷ World Health Organization

vizsgálata során rendre 88, 94, 89, 92 CFU/mL LOD-al a különböző VOC mintázatok alapján azonosították a baktériumokat víz és vizeletminták vizsgálata során.

3. Táblázat A papír alapú szenzorok különböző detektálási lehetőségeinek összevetése

Technológia	Technológia jellemzői	Baktérium típus	Korlátok
Kolorimetria	gyors (5-30 perc) és egyszerű szabad szemmel is látható változás hordozható alacsony LOD 10-10 ³ CFU/mL	<i>Salmonella</i> <i>S.aureus</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>E. coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Kvantitatív meghatározási problémák Zajtűrés mérésékelt
Elektrokémia	gyors (5-30 perc) alacsony LOD 10-10 ³ CFU/mL hordozható költséghatékony	<i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i>	Elektród kezelés, kalibráció, biofouling (biofilm képződés)
Fluoreszcencia	kvalitatív és kvantitatív analízis alacsony LOD 10-10 ³ CFU/mL nagy lineáris tartomány reprodukálható kis mintamennyiség	<i>S. aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>E. coli</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>Cronobacter</i>	Drága műszerezettség Fényérzékenység
Kemilumineszcencia	olcsó reagensek jó jel/zaj viszony alacsony LOD 10-10 ³ CFU/mL	<i>Bacillus anthracis</i>	Nem hordozható, Drága műszerezettség

A kolorimetriás mellett a papír alapú LFA teszteknel is alkalmazható **fluoreszcens detektálás**. A gyors analízisidőnek köszönhetően akár 15 másodperc alatt is azonosítható a szepszist okozó *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *E. coli* és *P. aeruginosa* [59]. A módszer pepszinnel, tripszinnel, ovalbuminnal és glutationnal módosított fluoreszcens arany és réz nanoklasztereket alkalmaz, alsó kimutatási határai a 20-60 CFU/mL tartományba estek. A detektálás okostelefonnal is végezhető, a módszert valós mintákon is tesztelték, a bakteriális fertőzést sikeresen azonosították 40 gyermekből álló csoportban.

A baktériumok szelektív meghatározása történhet a bennük található **enzimek reakcióinak kihasználásával**, a már említett színes termék képződésével járó szubsztrátok alkalmazásával, pl. *E. coli*, *L. monocytogenes* és *Cronobacter* esetén [60]. Az alacsony enzimaktivitási tartományban végzett mérések hosszabb inkubációs időt igényelnek. A hosszú inkubációs idő elkerülésére megoldást jelenthet az immunmágneses szeparáción alapuló, nanorészecskék által kiváltott jelerősítés, amivel az *E. coli* O157:H7 törzset vizsgálták

szennyezett tejmintákból. A folyamat során a baktériumok az antitesttel jelölt mágneses gyöngyökkel és ezüst nanorészecskékkel szendvics komplexet alkotnak. Hidrogén-peroxid (H_2O_2) hozzáadására ezüstionok (Ag^+) szabadulnak fel, ami a jel felerősödését eredményezi. Az assay eredményeinek kiolvasása egy kvantumpontokat tartalmazó papírcsík oldatba helyezésével történik, a kapilláris erő hatására a keletkezett ionok végig haladnak a papírcsíkon, kioltva a fluoreszcenciát („kvencselés”) az Ag^+ és a kvantumpontok közötti kationcsere-reakciónak köszönhetően. A kezelt papírcsík UV fény alatti vizsgálata megmutatja a kvencselt fluoreszcens sáv intenzitását, amely korrelál a baktériumok koncentrációjával. A szabad szemmel történő kiértékelés esetén az LOD 500 CFU/mL, ami összemérhető más fluoreszcens immunmágneses elválasztást alkalmazó LFA-k alsó kimutatási határával (10^3 - 10^4 CFU/mL). A módszer hátránya, hogy körülményes, sok lépéses a művelet és a fluoreszcencia miatt nem hordozható, speciális fényforrást igényel.

Egyéb alternatív detektálási technika a **kemilumineszcencia**, ami érzékeny (100 CFU/mL alsó kimutatási határ), minimális mintaelőkészítést igénylő meghatározást tesz lehetővé [61]. A módszer a papír alapú szenzorok és a 2D kromatográfiát kombinálva ad lehetőséget a *Bacillus anthracis* spórák azonosítására. Probléma azonban a drága műszerezettség és a stabilitás. Az optikai módszerek számos alkalmazásához képest az elektrokémiai módszerek előnyös tulajdonságaik ellenére, mint a gyors analízis, költséghatékony eszközelőállítás és méréstechnika, illetve a hordozhatóság jóval kevésbé elterjedtek.

Az **elektrokémiai detektálási módszerek** esetén (a hagyományos technikákhoz hasonlóan) gyakran a minta hígítása szükséges. Jelentős előny a technika kompatibilitása a multiplex szenzorplatformok kialakításával és a helyszíni mérések lehetősége. Az impedancia alapú meghatározással az *E. coli* és *P. aeruginosa* vizsgálata is lehetséges különböző vízmintákban [62]. A szenzor készítése során a *Whatman* típusú szűrőpapírra (pórusméret: 11 μm) elsőként polianilint választottak le oxidatív polimerizációval, majd két ezüst elektródot alakítottak ki a papír két szélére. Ezt követően glutáraldehiddel funkcionizálták a polianilin bevonatot. A baktériumok kikötődése a membránon megváltoztatja az elektródok között mért dielektrikus állandót, ezzel egyidőben a baktériumok metabolizmusából származó ionos termékek csökkentik az oldat ellenállását. Az ellenállás és kapacitív változások a szenzor impedanciáját módosítják. A lakossági szennyvíz és csapvíz vizsgálata során a kimutatási határ mindkét baktérium esetén 500 CFU/ml.

Karuppiyah és munkatársai [63] grafén elektródra nanostruktúrált grafén-oxidot (GO) választottak le, amit utána lektinnel (*Concanavalin A*) módosítottak. A lektin képes felismerni az *E. coli* specifikus felületi cukorstruktúráját és kötést létrehozni vele. A baktériumkoncentráció meghatározására elektrokémiai impedancia spektroszkópiát használtak (EIS), a töltésátlépési ellenállás lineárisan növekszik a baktériumkoncentrációval a 10 - 10^8 CFU/mL tartományban, a kimutatási határ 10 CFU/mL. Qin csoportja 3D origami szenzort készített szilárd belső elvezetésű elektródokkal [64]. Modell enzimként a *butirilkolin-észteráz*t választották, az enzim által katalizált reakcióban keletkező butirilkolin ionszelektív elektróddal mérhető, folyamatos monitorozást lehetővé téve. A szenzor alkalmas az organofoszfát típusú peszticid metilparation mérésére, mivel a metilparation inhibitora az alkalmazott *butirilkolin-észteráz* enzimnek.

2.3. Anioncserélő típusú ionszelektív elektródok alkalmazása

Az ionszelektív elektródokat (*ion selective electrode – ISE*) elsősorban potenciometriában alkalmaznak. **Potenciometria** esetén egy galványcella elektromotoros erejét (*electromotive force - EMF*) egy indikátorelektrod és egy referenciaelektrod között mérik. A mérések alatt az áramerősséget pA nagyságrendben tartják nagy bemeneti ellenállású feszültségmérőt használva.

Az ionszelektív elektródok potenciálválaszának leírására a fázishatár – potenciál (*phase-boundary potential - E_{PB}*) modellt alkalmazzák. Ez alapján a mért potenciál az oldat/membrán határfelületen kialakuló töltésszétválás eredménye. Az ionok membránba jutását az ioncserélő korlátozza, mely a permszelektivitásért felelős, azaz csak az ellentétes töltésű ionok juthatnak be a membránba. Az ionofor felel a mérendő ion szelektív komplexálásáért. A mért feszültség az összes fázishatár potenciál összege a galványcellában. Ha a rendszer termodinamikailag egyensúlyban van, az egyetlen változó potenciálú tag az oldat/membrán határfelületet leíró E_{PB} tag, az összes többi konstans.

Ha az elsődleges ion aktivitása (amely elsősorban meghatározza az ISE választ) változik az oldatban, az egyensúly újra helyreáll, és ennek következtében az E_{PB} is változik. A lipofil tulajdonságú anioncserélő biztosítja, hogy az I elsődleges ion aktivitása a membránon belül állandó legyen, így az E_{PB} csak az ion oldatbeli aktivitásától függ. Az E_{PB} -t leíró összefüggés így a jól ismert **Nernst-egyenlet** (1. egyenlet)

$$E_{PB} = E^0 + \frac{2,303 \cdot RT}{zF} \lg(a_{I;o}) \quad (1)$$

Ahol az o : oldat I : ion, a_I az I ion aktivitása, R az egyetemes gázállandó, z az ion töltésszáma, F a Faraday állandó, T az abszolút hőmérséklet, E^0 az indikátorelektrod standard potenciálja ($a_I = 1$ esetén).

Az egyenlet alapján az elsődleges ion aktivitás 10-szeres változása $59,2 \text{ mV}/z_I$ potenciálváltozást jelent (25°C -on). Mivel a mintában az elsődleges iontól eltérő, zavaró ionok is jelen vannak, a **Nikolsky-Eisenman** által kidolgozott potenciometriás szelektivitási tényezővel (K_{IJ}^{pot}) súlyozva vesszük figyelembe a hatásukat a potenciálválaszra. A kiegészített szemi-empirikus Nikolsky-Eisenman egyenlet (2.):

$$E_{PB} = E^0 + \frac{0,05915}{z_I} \lg(a_I + \sum_J K_{IJ}^{pot} \cdot a_J^{\frac{z_I}{z_J}}) \quad (2)$$

Ahol K_{IJ}^{pot} a potenciometriás szelektivitási tényező, I az elsődleges/mérendő ion, J pedig a zavaró iont jelöli. Jellemzően a szelektivitási tényező logaritmusát tüntetik fel.

Egy tipikus ionszelektív membrán jellemzően 30-40% polimer mátrixot, 60-70% lágyítót, 0,5 - 2%-ban ionofort és az ionoforra nézve 50 mólszázalék ioncserélőt tartalmaz. Az anioncserélő membránok esetén az ionofor hiánya miatt minden anionra válaszolnak. A szelektivitást itt a különböző jelenlévő anionok lipofilitása adja, így a legnagyobb szelektivitást a leginkább lipofil anionra kapjuk [65].

Kutatócsoportunkban korábban már alkalmaztak anioncserélő elektródokat humán prosztata specifikus antigén (*PSA*) valós szérumból történő meghatározására [66]. A mikrotiter tálcában, 150 μ l térfogatban végrehajtott ELISA (*Enzimhez kötött immunszorbens assay*), potenciometriás kiolvasására az egyszerű és olcsó, anioncserélő mikroelektródok alkalmasak. Az ELISA során hozzáadott *PSA* antitestet galaktozidáz enzimmel (*GAL*) jelölték, az enzim egy szubsztrátját, a DIFMUG-ot hozzáadva az enzim katalizálta reakcióban a galaktopiranozid anionos hidrolízis terméke keletkezik, amely potenciometriásan mérhető. Az anioncserélő elektród szelektivitása a mintában lévő anionok lipofilitásának függvénye. A keletkező DIFMU anion sokkal lipofilabb tulajdonságú ($\log P = 1,83$), mint bármelyik szervetlen anion, amely az alkalmazott pufferekben előfordulhat. A módszerrel sikeresen mutatták ki a *PSA*-t szérumban, a lineáris koncentrációtartomány 0,1-50 ng/ml volt.

A baktériumok mérésére eddig még nem alkalmaztak potenciometriás detektálást, a technika számos előnye ellenére. Munkám célja így egy olyan potenciometriás detektálási technika kifejlesztése volt, amely alternatívát nyújthat az optikai módszerek mellett is.

3. Kísérleti anyagok és módszerek

3.1 Felhasznált alapanyagok

A kísérletek során felhasznált anyagokat tartalmazza a **4. Táblázat**.

4. Táblázat A felhasznált anyagok nevük és beszállító szerint

Vegyszerek	Beszerezési cég
Ionszelektív membrán komponensek	
TDMA-NO ₃ (<i>Tridodecil-metil-ammónium-nitrát</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>
TDMA-Cl (<i>Tridodecil-metil-ammónium-klorid</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>
PVC (<i>Polivinil-klorid</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>
o-NPOE (<i>orto-nitrofenil-oktil-éter</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>
1- dekanol	<i>Sigma-Aldrich</i>
THF (<i>tetrahidrofurán</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Na ionofor X	<i>Sigma-Aldrich</i>
Na-TFPB (<i>nátrium-tetrakis[3,5-bis(trifluorometil)fenil]borát</i>)	<i>Sigma-Aldrich</i>
Enzimreakciók vegyszerei	
PBS (<i>Phosphate buffered saline</i>) tabletta	<i>Sigma-Aldrich</i>
B- galaktozidáz (<i>from E. coli 0,001 U/μl</i>)	<i>Invitrogen</i>
vízmentes MgSO₄	<i>Molar Chemicals Kft. (Halásztelek)</i>
CuSO₄ * 5 H₂O	<i>Reanal, Budapest</i>
1 M NaOH	<i>Merck, Darmstadt</i>
DIFMU (<i>6,8-difluoro-4-metilumbelliferon</i>)	<i>Invitrogen</i>
Oldatkészítéshez használt vegyszerek	
NaCl	<i>Sigma-Aldrich</i>
KCl	<i>Sigma-Aldrich</i>
NaNO₃	<i>Sigma-Aldrich</i>
Etanol	<i>Molar Chemicals Kft. (Halásztelek, Magyarország)</i>
Metanol	<i>Molar Chemicals Kft. (Halásztelek, Magyarország)</i>

A vizes oldatokhoz használt ioncserélt vizet (18,2 M Ω ·cm fajlagos ellenállás 25°C-on) *Millipore Direct-Q 3 UV* víztisztító berendezés segítségével állítottuk elő (*Merck Millipore; Billerica, MA, USA*).

3.2 A felhasznált oldatok készítése

3.2.1 Munka puffer (Working Buffer – WB)

A PBS tablettát az előírásnak megfelelő 100 ml desztillált vízben oldottam ultrahangos vízfürdő segítségével, majd desztillált vízzel átmostam 200 ml-es mérőlombikba. A homogenizálást követően az oldat összetétele 10 mM foszfát, 0,0027 M KCl és 0,137 M NaCl. A mérések során használt **munkapuffer** (*Working buffer - WB*) 1 mM PBS 1 mM MgSO₄ tartalommal. A készítéséhez 10x hígítottam a tablettá feloldásával kapott puffert, miközben hozzáadtam az analitikai mérlegen bemért szilárd MgSO₄-et. A pH-t 1 M NaOH hozzáadásával 7.7-re állítottam be.

3.2.2 Enzimaktivitás mérésének adatai

A β – galaktozidáz törzsoldatot mindig frissen készítettem, a **munkapufferben (WB)**. A bemérést UV lámpás zárható fülkében végeztem, elszívás mellett. A munkafolyamat megkezdése előtt a fülkét UV fénnel sterilizáltam 15 percig. A β – galaktozidáz enzim töményebb, fagyasztoóban tárolt oldatából (0,001U/ μ l) 100x és 1000x hígításokat készítettem *Protein LoBind®* Eppendorf csövekbe. Az oldatot 10 percig rázattam 250 rpm-el, majd vortexeltem.

A 0,5 mM DIFMUG oldat készítésekor az analitikai mérlegen bemért szilárd DIFMUG-ot a megfelelő mennyiségű **WB**-ben oldottam fel, vortexeltem, 10 percig 250 rpm-el rázattam, majd ultrahangos fürdővel segítettam a feloldódást (10 perc).

A 2mM CuSO₄ STOP reagens készítését is **WB**-ben végeztem, az analitikai mérlegen bemért szilárd CuSO₄-ből 25 mL-es mérőlombikban készítettem oldatot.

3.2.3 DIFMU kalibrációs sor készítése

A DIFMU kalibrációs sor készítését a 10^{-3} M DIFMU oldat készítésével kezdtem. Minden oldat a **WB**-ben készült. A szilárd DIFMU analitikai mérlegen történt bemérését követően és a **WB** hozzáadása után ultrahangos fürdőbe helyeztem az *Eppendorf* csövet (10 perc). A kalibrációs sor hígításakor a 10^{-3} M - 10^{-6} M tartományban a logaritmikus skálán a pontok közé félúton eső koncentrációjú oldatokat is készítettem, hogy a lineáris szakaszon több adatpontot tudjak rögzíteni.

3.3 Ionszelektív elektródok készítése

3.3.1 Makroelektródok készítése

A membrán optimalizációjának méréseit makroelektródokkal végeztem, ún. *Phillips* elektródtestbe szerelve. Több anioncserélő membránösszetétel összehasonlítása után az ideálisnak ítélt membránösszetétellel készítettem el a pipettahegy-elektrodokat. Minden membrán készítésekor azonos munkamenetet követtem. A különböző membránok összetételét mutatja be a **5. Táblázat**.

5. Táblázat A membránösszetétel optimalizálása során készített különböző anioncserélő membránok

		Kiindulási membrán (K)	M_2	M_3	Optimalizált membrán (M_4 vagy opt)
Membránkomponens		Tömegszázalék [m/m %]			
Anioncserélő	<i>TDMA-Cl</i>	3,5	3,5	7,1	
	<i>TDMA-NO₃</i>				0,6
Lágyító	<i>o - NPOE</i>	64,5	48,2	62,5	59,6
	<i>l- dekanol</i>		16,1		
Mátrix	<i>PVC</i>	32,0	32,2	30,4	39,8

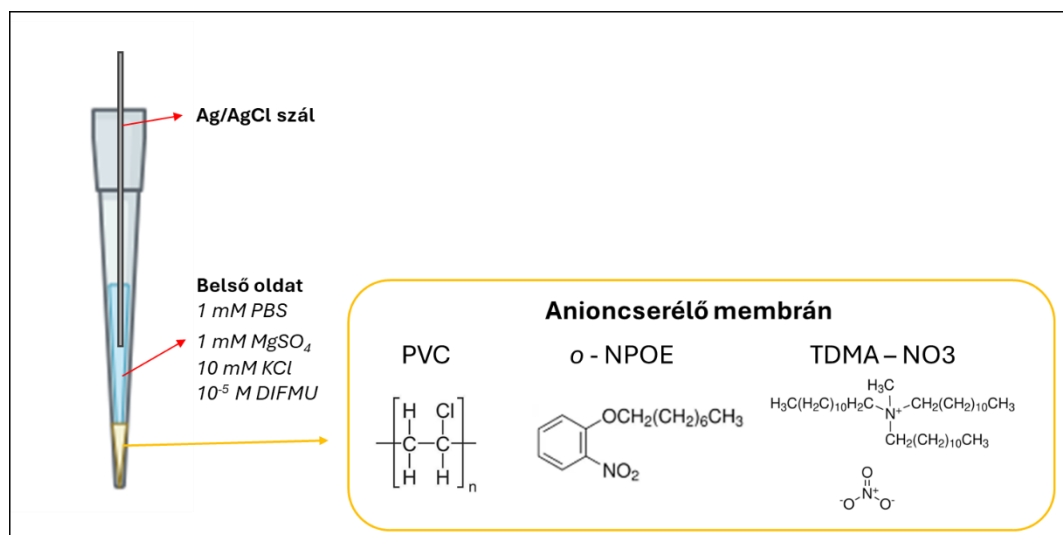
A membránkomponensek összemérését követően a keveréket 2 ml tetrahidrofuránban (*THF*) oldottam fel, majd egy napon át csigás keverőre helyezve kevertettem a membránoktól. A komponensek feloldódását követően 24 mm átmérőjű üveggyűrűbe öntöttem a membránoktól, a THF elpárolgása érdekében nagyjából egy

napot állni hagytam. A makroelektrodok összeszereléséhez 7 mm átmérőjű darabokat vágtam ki az elkészített membránokból. Belső oldatként 0,01 M KCl oldatot használtam.

3.3.2 Pipettahegy mikroelektrodok készítése

A pipettahegy elektrodok készítésekor több konstrukciót is teszteltem. Minden esetben az anioncserélő elektrodok készítését az optimalizált összetételű anionszelektív membrán THF-ban történő feloldásával kezdtem, ahol a *membrán:THF* tömegaránya 1:13 volt.

A mérések során alkalmazott konstrukció esetén 10 µl-es pipettahegyeket (*Eppendorf 1-20 µl pipettahegy*) használtam. A pipettahegyeket négyszer átmostam THF-al, a membrán jobb tapadását elősegítve. Ezt követően a pipettahegyeket pillanatszerűen a membránoktólba merítettem, majd egy éjszakára elszívó fülkében, egy pipettahegy tartóban hagytam száradni. Ezt követően a pipettahegyeket feltöltöttem a belső oldattal, ami 0,01 M KCl-t és 1 mM MgSO₄-et, 10⁻⁵ M DIFMU-t tartalmazó 1 mM PBS, majd egy *Ag/AgCl* szálát rögzítettem a pipettahegyekbe Parafilm®-mel. Az anioncserélő pipettahegy elektrodok felépítését mutatja be a **6. ábra**.



6. ábra - A pipettahegy-mikroelektrodok felépítése

Kezdetben referencia elektrodként Celgard® membránnal készített elektrodokat használtam. A későbbiekben a Na⁺ szelektív pszeudo-referencia elektrod használata mellett döntöttünk. Felépítése szerint megegyezik az anionszelektív elektrodokkal, membránösszetételét mutatja be a **6. Táblázat**.

6. Táblázat: A referencia elektródokhoz készített Na^+ szelektív membrán tömegszázalékos összetétele

Membrán komponens	Tömegszázalék [m/m%]
<i>Na ionofor X</i>	0,70
<i>Na-TFPB</i>	0,36
<i>o</i> - <i>NPOE</i>	32,96
<i>PVC</i>	65,98

3.4 Potenciometriás mérések

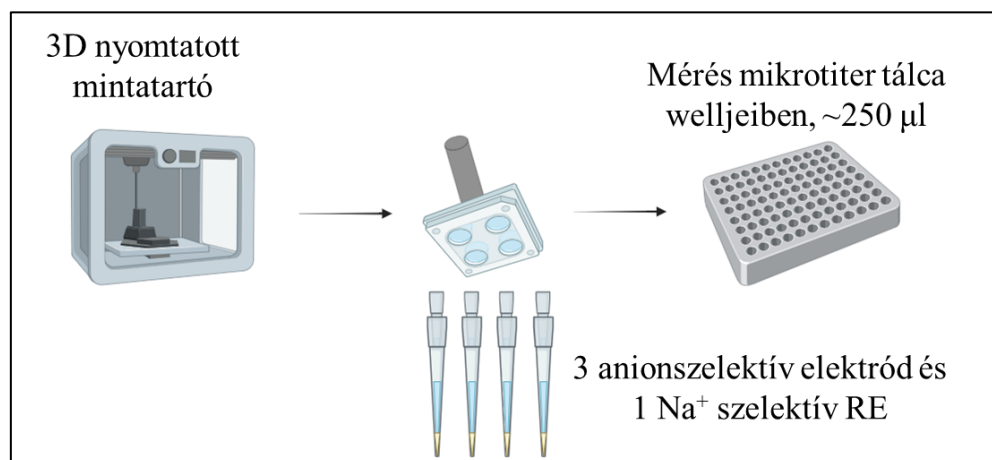
A potenciometriás mérések során az elektródokat egy 16 csatornás, nagy bemeneti ellenállású ($10^{15} \Omega$) feszültségmérőhöz csatlakoztattam (*Lawson Labs, Malvern, PA, USA*). A mérésekett Faraday-kalitkában végeztem.

3.4.1 Kalibráció a makroelektródokkal

Az elvégzett nitrát és *p* – nitrofenol kalibrációkat megelőzően az összeszerelt makroelektródokat 1 mM NaNO₃ oldatban kondicionáltuk. A *p*–nitrofenol kalibráció esetén fontos volt a pH beállítása, ami biztosítja az anionos forma jelenlétét. Ehhez a méréseket 10-es pH-n végeztük, a pH-t 1 M-os NaOH hozzáadásával állítottam be. Referencia elektródként kettős sóhidas referenciaelektródot (*No.6.0729.100, Metrohm AG, Herisau, Svájc*, belső oldat 3 M-os KCl-t, külső referencia oldat 1 M-os LiOAc) alkalmaztam.

3.4.2 Kalibráció pipettahegy - mikroelektródokkal

Az elektródokat egy estén át a munkapufferben (**WB** - 1 mM PBS, 1 mM MgSO₄) kondicionáltam. A mérésekhez egy 3D nyomtatással, általunk tervezett és készített elektródtartót használtam, ami a referencia elektród mellett három párhuzamos elektród mérését teszi lehetővé, mindössze 250 µl oldattérfogatban. A mérési elrendezést mutatja be a **7. ábra**.



7. ábra - A pipettahegy-mikroelektródokkal megvalósított mérés bemutatása

A kalibráció során minden egyes mért koncentrációt követően nagyobb térfogatú (8 ml) pufferbe helyeztem az elektródokat 2 percig. A méréseket mikrotiter tálca 250 µl-es *well*jeiben végeztem.

3.4.3 Enzimreakciók mérése

Az enzimreakciók mérését 250 µl-es *wellek*ben végeztem. A reakciók során az enzimmennyiséget 0,02 – 0,2 mU között változtattam. A reakció minden esetben 150 µl 0,5 mM DIFMUG szubsztrát oldat hozzáadásával, 30 percig tartott, ezután 2mM CuSO₄ STOP reagenssel leállítottam.

A baktériumminták mérését szintén 250 µl-es *wellek*ben végeztem, 50 µl lizátumhoz 100 µl 0,5 mM DIFMUG szubsztrátot adtam hozzá, majd a 30 perc leteltével a STOP reagenssel leállítottam a reakciót, ezt követően végeztem a potenciometriás méréseket.

3.5 Fluoreszcens képalkotás

A DIFMU kalibráció és a végzett enzimreakciók esetén a potenciometria mellett fluoreszcens képalkotással is ellenőriztem a kapott eredményeket. A használt berendezés *Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (Bio-Rad)* típusú. A készülék standard szűrővel és UV átvilágítással működik. Az eszközhöz tartozó számítógépes programban (*ChemieDoc™ MP*) saját, egy csatornás protokollt (*single channel protocol*) állítottam be, ahol gél leképezésére a *Bio-Rad Mini ReadyAgarose Gel* géltípust használtam. A megvilágítási időt a szoftver automatikusan optimalizálja, a felvételt szürke színárnyalatokban jeleníti meg. Az elkészült képen lehetőség van elemzés végrehajtására, ehhez a *Volume tools* opción keresztül a *Round* választásával azonos körterület jelölhető ki az egyes *wellek*re. Minden esetben vettem fel háttérjelet is (*background*), amit a puffert tartalmazó *well*re állítottam be. Így a többi körterület intenzitását ahhoz viszonyítva számítja a program.

3.6 Baktériumok szaporítása

Az élő baktériumokat tartalmazó minták elkészítését **Berkl Zsófia** (*Környezeti Mikrobiológia és Biotechnológia Kutatócsoport*) végezte.

Az O/N kultúra (*Escherichia coli* ATCC 11775) elkészítésének lépései:

- 100 ml LB⁸ tápoldat + 1 kacs ferde agaron fenntartott (két párhuzamos mintában)
- fenntartás: 250 ml lombikban, 150 rpm-el, 16 órán keresztül rázatva 25°C-on, sötétben

Az O/N kultúra hígításának munkafolyamata:

- 50 ml homogén minta pipettázása 50 ml-es, steril *Falcon*-csőbe
- centrifugálás (10 perc, 7000 rpm)
- tápoldat eltávolítása, sejtek szuszpendálása 50 ml PBS pufferben (vortexelés)
- 2x mosás PBS pufferben
 - o centrifuga (10 perc, 7000 rpm) – PBS le – friss PBS – szuszpendálás (vortexelés)
 - o centrifuga (10 perc, 7000 rpm) – PBS le – friss PBS – szuszpendálás (vortexelés)
- sejtek felvétele PBS pufferben (centrifuga – PBS le – friss PBS – szuszpendálás)
- összes sejtszám meghatározása (Bürker-kamrás sejtszámlálás, hígítás PBS-sel)
 - o 5 ml homogén mintát veszünk a sejtszuspenzióból
 - o legalább 10 db párhuzamos cellában számolni
- hígítási sor készítése
 - o sejtszám alapján tízes léptékű hígítási sor készítése 10 ml térfogatban, nagy kémcsőben
 - o becsült sejtszám: kb. 10^{10} db sejt/ ml → cél: 1 db/ml elérése az utolsó tagban → 10 tagú hígítási sor készítése PBS-sel → kb. 10^0 – 10^{10} db sejt/ml szuszpenziók)

O/N kultúra vizsgálata:

- élősejtszám: 10^2 , 10^3 , 10^4 sejt/ml koncentrációjú mintákból 0,1 ml mintát venni → szélesztés (LB + 3% agar) inkubáció 25°C-on → telepszámlálás (3 nap után)
- OD: SANYO spektrofotométer (600 nm, legalább 2x hígítás, LB)

⁸ LB: *Lactose Broth*

Az O/N kultúra vizsgálata igazolta, hogy az előzetes, Bürker kamrával végzett összsejtszám meghatározás (becsült darabszám) megegyezik az élősejtszámmal, amit a tenyésztési eljárással (lemezöntési eljárás) vizsgáltak.

A kapott eredményeket a **7. Táblázat** tartalmazza.

7. Táblázat A lemezöntési eljárással kapott eredmények

Minta		Telepszám [db]	Telepszám átlag [db]	Telepszám szórás	Telepszám szórás%	CFU/ml
10^4 db/ml	1	1390	$1,33E+03$	51,2	3,8	$1,33E+04$
	2	1308				
	3	1296				
10^3 db/ml	1	432	$4,76E+02$	38,8	8,1	$4,76E+03$
	2	506				
	3	489				

A baktériumminták további előkészítését, lízisét és mérését már én végeztem.

3.7 A baktériumminták lízise

Több különböző lizálási stratégiát is kipróbáltam a baktériumminták és a probiotikum minta előkészítése során. A lízist a 10^{10} db/mL - 10^0 db/mL sejtszámú hígítási soron végeztem.

Az **1. protokoll** esetén a baktérium minta vortexelését követően 1000 µl mintát *LoBind Eppendorfba* pipettáztam, 100 µl PopCulture reagenst adtam hozzá, és a vortexelés + 5 perc pihentetés ciklust kétszer ismételt meg. Ezt követően a lizátumból 50 µl-t juttattam egy mikrotiter tálca *welljeibe*.

A **2. protokoll** során 5 mL mintát használtam fel, egy szűrési lépéssel (220 nm-es szűrővel, 1 mL-es fecskendővel részletekben szűrve) koncentráltam a mintát a lízis előtt. A szűrést követően 500 µl WB tartalmú *LoBind Eppendorfba* helyeztem a használt szűrőt, majd 50 µl PopCulture reagenst adtam hozzá. Ezt követően a vortexeltem a lizátumot, majd 5 perc pihentetést követően megismételtam a vortexelést. A lizátumból 50 µl-t juttattam egy mikrotiter tálca *welljeibe*. A **3. protokoll** esetén mindent pontosan ugyanúgy végeztem, mint a 2. protokoll esetén, kivéve, hogy a lízist megelőzően 50 µl PopCulture reagens mellett 5 µl Lizozimet (4 U/µl) is adtam a mintához.

3.8 Probiotikum kapszula mintaelőkészítése

A kereskedelmi forgalomban is kapható *LXR-Mikrobiom* probiotikum készítmény mintaelőkészítésének első lépéseként 1 db kapszulát 40 mL *Lactose Broth*-t tartalmazó **WB**-ben oldottam fel. Ezt követően a kapott oldatot 16 órán át inkubáltam 37°C-on, rázatás nélkül.

Ezt egy centrifugálási lépés követte 7000 rpm-el (4602 G), 10 percig, majd a felülúszó elvétele és viaszszuszpendálása (vortex, rázás) 40 ml PBS-ben.

A következő lépésben kétszer centrifugáltam a mintát 7000 rpm-el (4602 G), 10 percig, a felülúszó elvételével és viaszszuszpendálással (vortex, rázás) 40 ml PBS-ben

Ezt követően hígítási sort készítettem **WB**-ben (100 µL+ 900 µL **WB**). A sor elemei: 10X (1), 100X (2), 1000X, 10000X, 100000X, 1000000X szoros hígítás.

A lízis során az **1. Protokoll** lépéseit követtem, eltérő térfogattal. A 900 mL oldatokhoz 90 µL PopCulture-t adtam hozzá, vortexeltem, majd 5 perc várakozást követően ismételt vortexelés után mikrotiter tálca welljeibe pipettáztam 100 µL WB-t, majd 50 µL lizátumot.

Az enzimreakció kezdetekor 100 µL DIFMUG-ot adtam a wellhez, 30 perc inkubációt követően (fedő alatt) pedig 15 µL STOP reagenst adtam hozzá a reakció megállítása érdekében.

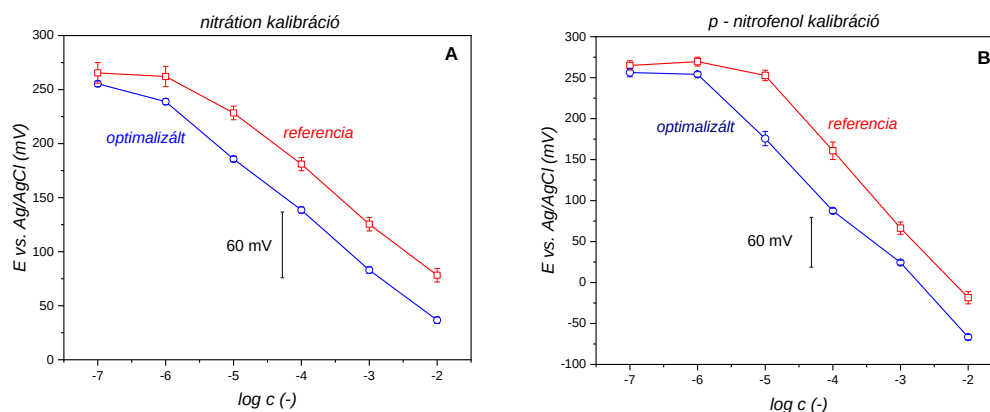
4. Eredmények és értékelésük

4.1 Anioncserélő makroelektrodokkal készített kalibrációk

Munkám céljával az *E. coli* baktérium potenciometriás detektálási lehetőségének vizsgálatát tűztem ki. Ehhez a baktérium által termelt enzim, a β -galaktozidáz által katalizált reakció során felszabaduló anion mennyiségét terveztem mérni ionszelektív elektróddal. Mivel specifikus anionokra kellően szelektív ionszelektív membránok nem ismertek az irodalomban, ezért egy ionofor nélküli, egyszerű anioncserélő membrán alkalmazása mellett döntöttem. Az ilyen membránok szelektivitását az anionok lipofilitása határozza meg, minél lipofilebb az anion, a membrán annál nagyobb jelet mér. A módszerem szelektivitását úgy kívántam biztosítani, hogy az enzim szubsztrátjaként olyan molekulát választok, amelyből a reakció során egy rendkívül lipofil anion keletkezik az enzim normál működési pH-tartományán ($\sim$ pH = 7).

Elsőként az ionszelektív membrán összetételének optimalizálását végeztem el, ehhez a különböző anioncserélő membránok kalibrációit hasonlítottam össze, makroelektrodokkal mérve. A kipróbált membránösszetételeket a korábbi vonatkozó fejezetben található, **5. Táblázat** mutatja be. Kiindulásként egy, a *Kutatócsoportunkban* már korábban anion mérésekre alkalmazott, a témavezetőm által kidolgozott membránösszetételt vettem alapul, majd változtattam az alkalmazott anioncserélőt és mennyiségét, illetve a lágyítót. Az így elkészített membránok kalibrációs görbéit vettem fel, különböző anionok hígítási sorait mérve. Anionként vizsgáltam egy hidrofilebbet, a nitrátot, valamint a *DIFMU* anion lipofilitása miatt egy hasonlóan lipofil anionon, a *p*-nitrofenolon, mint modell vegyületen (10 pH-n), hogy a különböző karakterű anionokra adott válaszokat vizsgálva találhassam meg az optimális membránösszetételt. Az előkísérletek alatt végül az optimális membránösszetételnek a 39,8% *PVC*, 59,6% *o* – *NPOE* és 0,6% *TDMA-NO₃* bizonyult (jelölése: *optimalizált*).

A **8. ábra** az optimalizált és referencia membránnal szimultán végzett két kalibrációt mutatja be. A nitrátion kalibráció során meghatározott meredekségek átlaga közel *nernsti* választ mutatott, értéke -50,3 mV/dekád ($N=3$ párhuzamos elektród) $\pm$ 0,2 mV szórás mellett, ami megfelel az irodalomban található, hasonló összetételű membránok teljesítményének [67]. A *p*-nitrofenol kalibráció során tapasztalt meredekségek átlaga és szórása -79 mV/dekád ($N=3$ párhuzamos elektród) és $\pm$ 2,4 mV. A *p*-nitrofenol mérése esetén az enyhén *szuper – nernsti* meredekség feltehetően azzal magyarázható, hogy a kondicionálás nem az elsődleges mérendő ion oldatában történt.

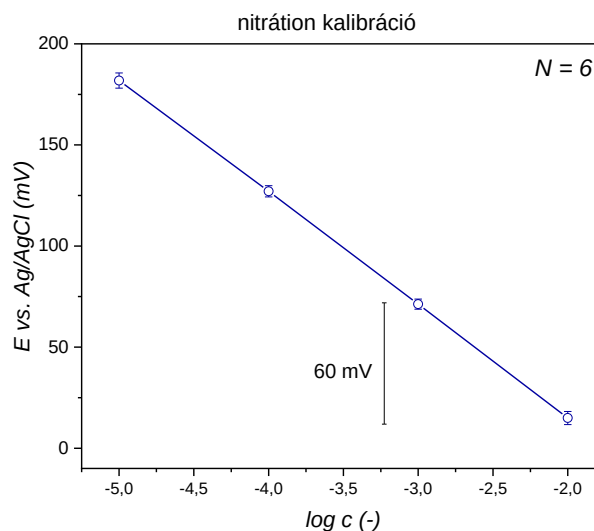


8. ábra - Az elvégzett kalibrációk nitrát (A) és p. -nitrofenol (B) tartalmú oldatok esetén. **Pirossal** a referencia membránnal, **kékkel** az optimalizált membránnal készült elektródok. (RE: kettős sóhidas $Ag/AgCl$, $3M\ KCl/1M\ LiOAc$)

4.2 Pipettahegy-mikroelektrodok kalibrációi

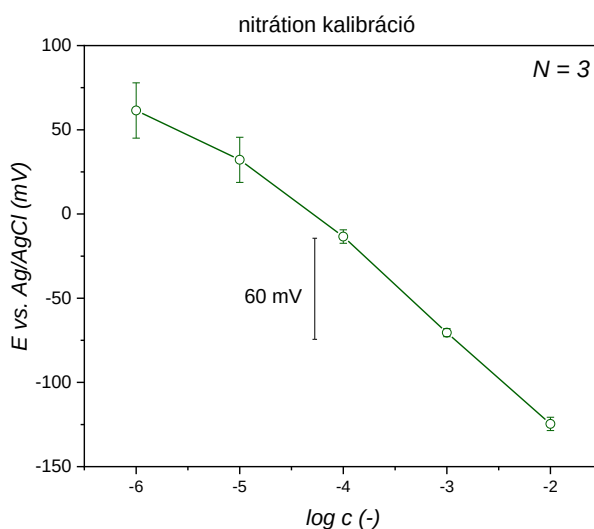
Az ideális membránösszetétel megállapítása után *pipettahegy-mikroelektrodokat* készítettem az optimálisnak talált membrán alkalmazásával. A mikroelektrodok lehetővé teszik az akár 200 mikroliteres mintatérfogatbeli mérést, így drámaian csökkenthető a módszer mintaigénye. Egy szűréssel kombinálva egy híg baktériumminta jelentősen betöményíthető, javítva a módszer alsó kimutatási határát (amit részletesen a 4.6. fejezetben mutatok be). A mikroelektrodos méréseket egy mikrotiter tálca üregeiben (*well*) végeztem.

Elsőként a pipettahegy elektródokkal ($N = 6$ párhuzamos elektród) is elvégeztem egy nitrátion kalibrációt, hogy összehasonlíthassam teljesítményüket a makroelektrodokkal kapott kalibrációs eredményekkel. A nitrátion kalibrációt a 10^{-2} és 10^{-5} M tartományban, 500 ml-es oldattérfogatban, hagyományos referencia elektródhoz ($Ag/AgCl\ 3M\ KCl, 1M\ LiOAc$) viszonyítva végeztem (9. ábra).



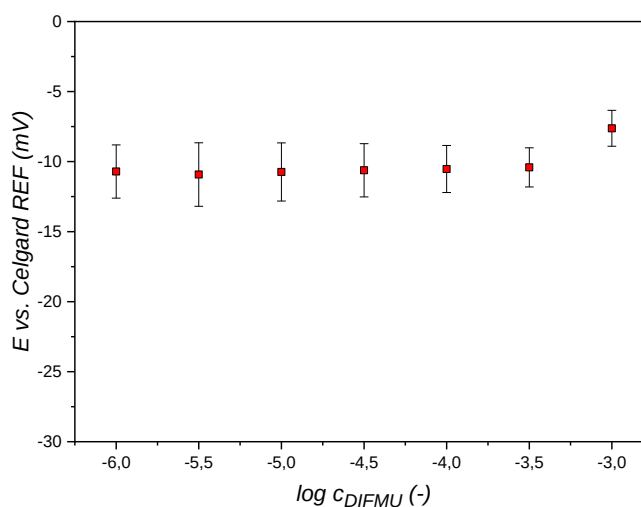
9. ábra - Pipettahegy-mikroelektrodok nitrát ion kalibrációja (RE: kettős sóhidas $Ag/AgCl$, $3M KCl/1M LiOAc$)

A meredekségek átlaga $-55,7 \text{ mV/dekád} \pm 0,5 \text{ mV}$ szórással, így a makroelektrodokhoz viszonyítva a miniatürizálás nem járt a kalibráció romlásával. Annak tesztelésére, hogy a jelentősen kisebb oldattérfogatban történő mérésnek milyen hatása van a kalibrációra, a nitrátion kalibrációt 250 mikroliteres térfogatban, mikrotiter tálca *well*jeiben is elvégeztem a 10^{-2} és 10^{-6} M koncentráció tartományban (**10. ábra**). Referencia elektródként az eddigi mérésektől eltérően az anioncserélő mikroelektrodokkal azonosan, de *Celgard®* membránnal készült pipettahegy mikroelektrodot használtam. A meghatározott meredekség átlagértéke közel *nernsti* meredekséget eredményezett $-55,6 \text{ mV/dekád}$ ($N=3$ párhuzamos elektród) $\pm 0,4 \text{ mV}$ szórással.



10. ábra - Pipettahegy-mikroelektrodok nitrát ion kalibrációja (RE: *Celgard®* pipettahegy mikroelektrod, Belső oldatok: $0,01M KCl$)

A *Celgard*® membrán esetén problémának adódott a belső oldat folyamatos kiáramlása, aminek következtében az alsó kimutatási határ egyértelműen romlott. A probléma megoldására egy új referencia elektród koncepcióra volt szükség. Mivel a méréseket pufferált közegben végeztük, amiben jelentős mennyiségű (13,7 mM) Na^+ háttér biztosított, amit a minta nem befolyásol a mérések során, így pszeudo referenciaként a Na^+ szelektív membránnal készített mikroelektród ideális választásnak tűnt. A stabilitását DIFMU kalibráció során teszteltem, a *Celgard*® membrános konstrukcióhoz képest mérve, 3 párhuzamos elektróddal (**11. ábra**).



11. ábra - A Na^+ referencia elektródok stabilitásának tesztelése a DIFMU kalibráció alatt

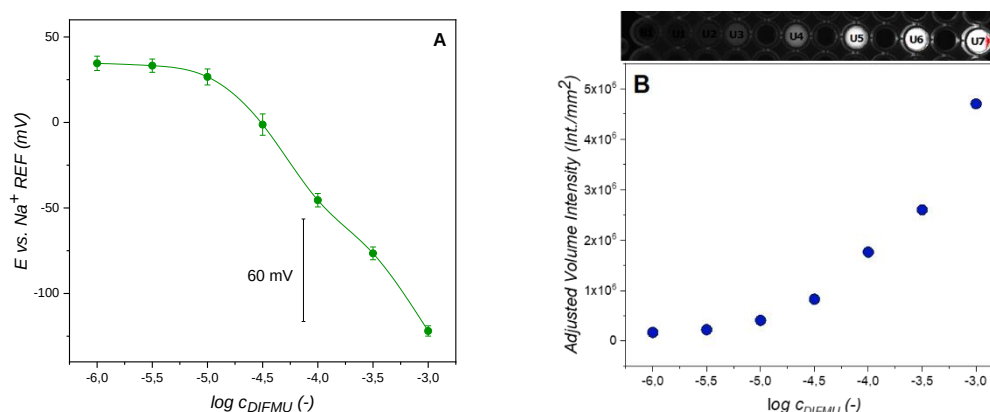
A referencia a teljes DIFMU kalibráció alatt stabilnak bizonyult, egyedül a legnagyobb DIFMU koncentrációnál emelkedett a potenciál nagyjából 2 mV értéket. A további méréseket így az új referenciaelektród konstrukcióval végeztem.

Munkám során a β -galaktozidáz enzimaktivitásának mérését a fejlesztett pipettahegy-mikroelektródokkal végeztem. Az enzim szubsztátjaként a kereskedelmi forgalomban is kapható DIFMUG-ot (6,8-difluoro-4-metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid) alkalmaztam. A szubsztátból az enzimreakció során keletkező anion (DIFMU) lipofilitása kiemelkedő ($\log P = 1,83$), ezért az alapvetően nem szelektív, anioncserélő membrán erre az anionra lesz a legszelektívebb más, szerves anionok jelenlétében is. További előny, hogy a 4,7-es pK_a érték lehetővé teszi a 7-es pH használatát a mérés során, ellentétben a nitrofenollal, ahol 10-es pH szükséges az anionos forma méréséhez. A DIFMU anion továbbá fluoreszcens, így a potenciometria mellett egy másik

módszerrel is összevethetőek a kapott eredmények. A meghatározás elvét mutatja be a **12. ábra**.

12. ábra - Az alkalmazott enzimreakció és a keletkező anion meghatározási stratégiái

Az enzimreakciók megvalósítása előtt az anion szabad formájából (DIFMU) készített kalibrációs sor mérését végeztem, a 10^{-3} M - 10^{-6} M tartományban. A potenciometria eredményeit a fluoreszcens képalkotással is összevettem (**13. ábra**).



13. ábra - A: DIFMU kalibrációs során felvett potenciometriás kalibrációs görbe (RE: Na⁺ szelektív mikroelektród) B: Fluoreszcens képalkotás

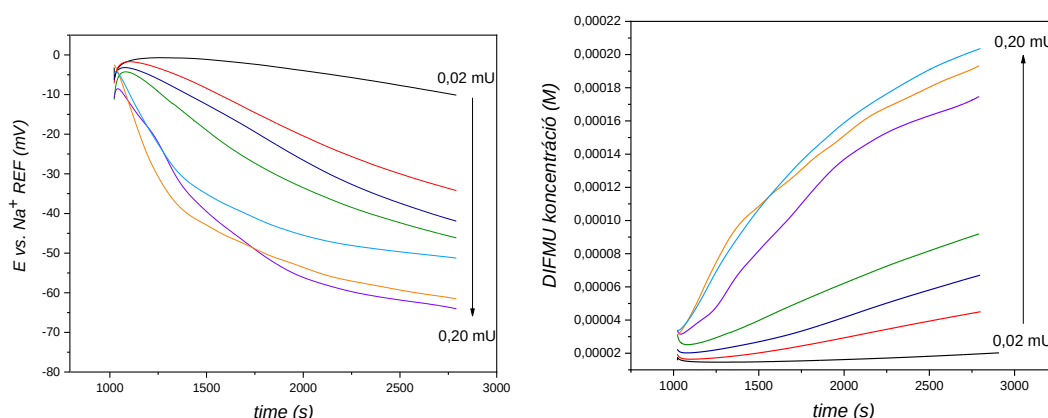
A potenciometria kalibrációra kapott enyhén szuper-Nernsti meredekségek átlaga - 72,09 mV/dekád, szórásuk 6,06 mV. A fluoreszcens képalkotás esetén is fél – logaritmikus ábrázolást alkalmaztam az Intenzitás – koncentráció összefüggés ábrázolásához. Ez alapján jól látható, hogy ugyanabban az elrendezésben a potenciometriás módszer kimutatási határa és dinamikus tartománya gyakorlatilag megegyezik a fluoreszcenciás módszerével.

4.3 Enzimreakciók monitorozása különböző enzimkoncentrációk alkalmazásával

A DIFMU kalibráció sikeres felvételét követően az enzimreakciók végrehajtásával és nyomonkövetésével teszteltem, hogy monitorozható-e az enzimaktivitás a felszabaduló DIFMU anion potenciometriás mérésével. A potenciometriával időben folyamatosan követett mérések lehetővé teszik a szükséges mérési idő csökkentését. Elképzelésünk szerint (ellentétben az irodalomban használt optikai módszerekkel) a potenciometria lehetőséget adna a kezdeti meredekségből meghatározni az adott enzimmennyiséget, így elegendő lenne néhány

percig monitorozni az enzimaktivitást a felszabaduló anion mérésén keresztül, jelentősen gyorsabban eredményt szolgáltatva. Az enzimreakciók esetén is mikrotiter tálca 250 μl -es üregeiben végeztem a méréseket. Az enzimreakciók kivitelezése előtt 1 napig kondicionáltam a pipettahegy elektródokat 10 ml pufferben (1 mM PBS, 1 mM MgSO_4), majd elvégeztem a bemutatott DIFMU kalibrációt a 10^{-6} M – 10^{-3} M tartományban. Az enzimreakciók során a 0,02 – 0,2 mU enzimkoncentráció hatását vizsgáltam a reakcióra. A reakciót 150 μl 0,5 mM DIFMUG szubsztrát oldat hozzáadásával indítottam, 30 percig monitoroztam, majd 2mM CuSO_4 STOP reagenssel leállítottam.

Az enzimreakciók leállítása után meghatároztam a végpont – potenciál értékeket, majd fluoreszcens képalkotással hasonlítottam össze a kapott eredményeket. A kísérletek során a kisebb enzimaktivitással végzett reakciók esetén az első 300 másodperc alatt meghatározott meredekség nagyobb szórást mutatott, mint az első 500 másodperc alatt készített. Az enzimreakciók kezdetén jelentkező kis felfutási szakasz bizonytalanabbá teszi a meredekség meghatározását, ami az 500 másodperc alatti mérés esetén stabilizálódik, pontosabb meghatározást biztosítva. Így a potenciometriás mérés első 500 másodperce alapján határoztam meg a kezdeti meredekségeket (mV/s és koncentrációra átalakítás után M/s). Az enzimreakció időbeli lefutását és az átszámított koncentrációidőbeli változását mutatja be a **14. ábra** különböző enzimkoncentrációk esetén.



14. ábra - Az enzimreakció potenciometriás követése, **A:** a monitorozott potenciálváltozások a kontrollal korrigálva **B:** az átszámított koncentrációváltozás időbeli profiljai

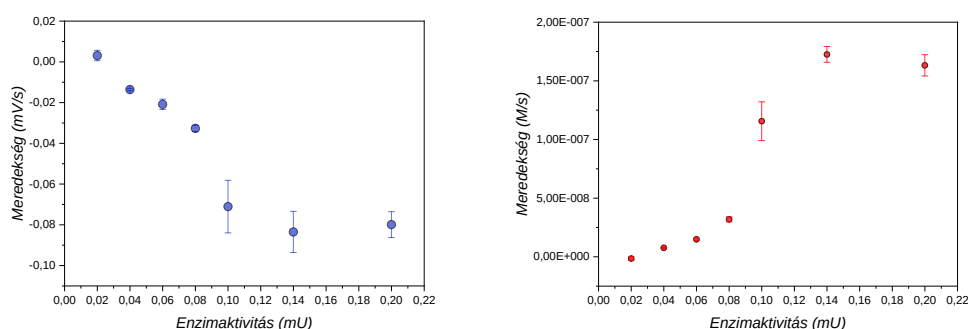
Annak érdekében, hogy az elektródoktól független dimenzióban kapjam meg a meredekség eredményeit, a potenciálértékeket koncentrációvá számítottam át. A művelet során a DIFMU kalibráció során meghatározott E^0 és meredekség (S) értékeket használtam. Mindegyik esetben a kontroll értékkel (sima WB esetén mért potenciál) korrigált feszültség-

idő görbékét alakítottam át koncentráció – idő görbékre, az alábbi összefüggések segítségével:

$$E = E^0 - S \log c_{DIFMU}$$

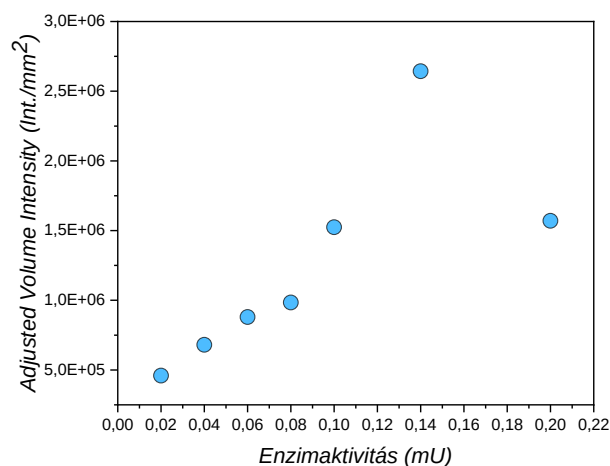
$$c_{DIFMU} = 10^{\frac{E-E^0}{S}}$$

A Feszültség – idő és a Koncentráció – idő görbék esetén is meghatároztam a reakció első 500 másodperce alapján a meredekségek értékeit (**15. ábra**).



15. ábra - Az enzimreakciók során meghatározott meredekségek (mV/s és M/s értékben is)

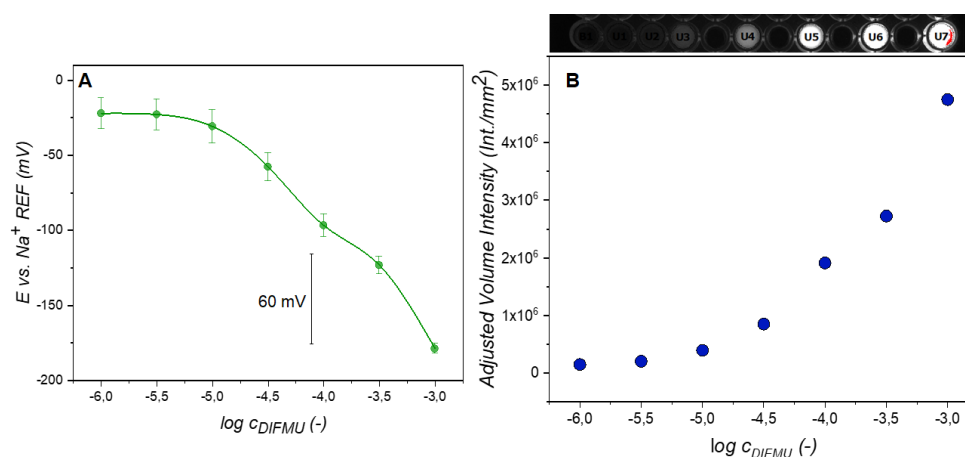
A meredekségek meghatározásának szórása az enzimkoncentráció növekedésével nő, a 0,1 mU enzimkoncentráció után egyre bizonytalanabb. A kis aktivitások esetén az összefüggés közel lineáris, utána telítésbe hajlik. Hasonló tendencia látszik a koncentráció – idő görbe alapján meghatározott meredekségek esetén is. Az enzimreakciók leállítása után megmértem a felszabadult DIFMU mennyiségét fluoreszcencián is. A fluoreszcens képalkotás összhangban volt a potenciometriával, itt is a kezdeti, kis enzimaktivitások tartományában bizonyult közel lineárisnak (**16. ábra**).



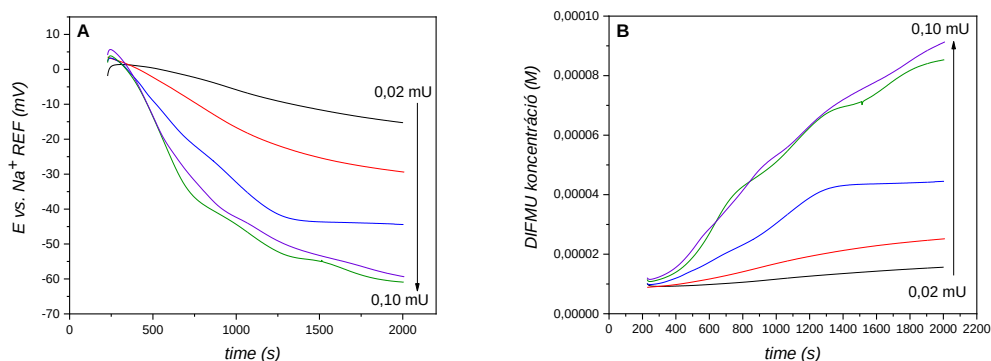
16. ábra - Az enzimreakciók leállítása után végzett fluoreszcens mérés eredménye

A fluoreszcens képalkotás hátránya, hogy a megfelelő intenzitás érdekében az enzimreakció lejátszódását meg kell várni (30 perc), csak ezt követően végezhető a meghatározás. A potenciometria esetén nincs ilyen jellegű megkötés, a kezdeti meredekségek meghatározásával akár 500 másodperc is elég a méréshez. A végrehajtott kísérlet-sorozattal sikerült igazolni, hogy a β -galaktozidáz által katalizált reakció időben folyamatosan követhető a potenciometriás mérés technikával, a keletkező lipofil anion mérésével. Ehhez viszont olyan pufferált közeget kell biztosítani, ami az enzimaktivitás szempontjából megfelelő (pH és 1 mM MgSO_4 kofaktor jelenléte) és az anion is jól mérhető.

A kisebb enzimaktivitás esetén tapasztalt eltérő eredmények további vizsgálata érdekében a kinetikai méréseket két szakaszban is elvégeztem, különválasztva a kisebb koncentrációkat (0,02 mU – 0,10 mU) a nagyobb értékektől (0,14 – 0,20 mU). A méréseket megelőzően mindkét esetben DIFMU kalibrációt vettem fel. A kisebb koncentráció értékeknél felvett kalibrációs görbéket mutatja be a **17. ábra**.

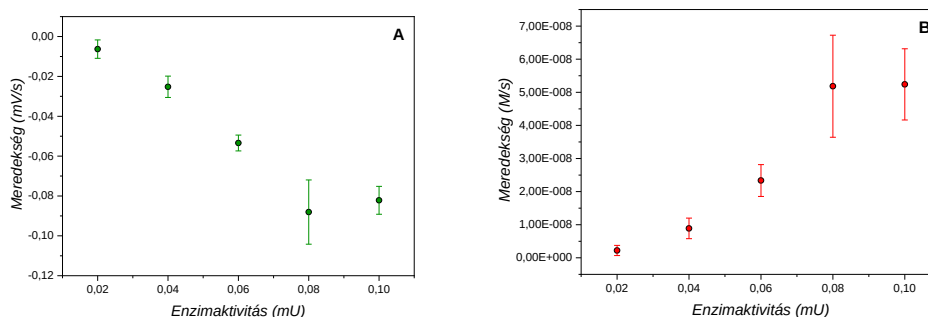
**17. ábra** - DIFMU kalibráció a 0,02-0,1 mU meghatározásához. **A:** Potenciometria **B:** Fluoreszcens képalkotás

A potenciometriás kalibráció esetén kapott meredekség az előző mérésekkel megegyezően enyhén *szuper-nernsti*, -72,30 mV, szórása 19,92 mV. A kalibrációt követően az enzim reakciók mérési eredményeit a **18. ábra** mutatja be.



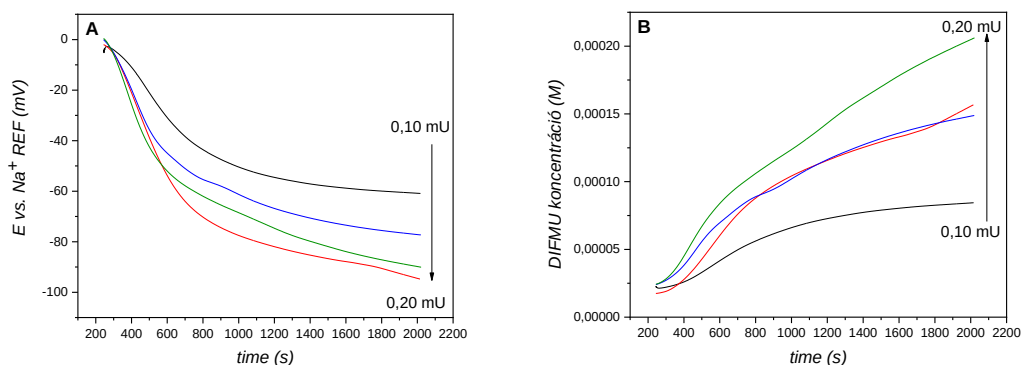
18. ábra - A 0,02 - 0,10 mU aktivitású enzimreakciók időbeli lefutása, **A:** monitorozott potenciálváltozások a kontrollal korrigálva **B:** az átszámított koncentrációváltozás időbeli profiljai

Az enzimreakciók potenciometriás időbeli követése után a fluoreszcens képalkotással is rögzítettem az eredményeket. A potenciometria esetén az első 500 másodperc során meghatározott meredekségek (**19. ábra**) mindkét esetben egyező tendenciát mutattak.



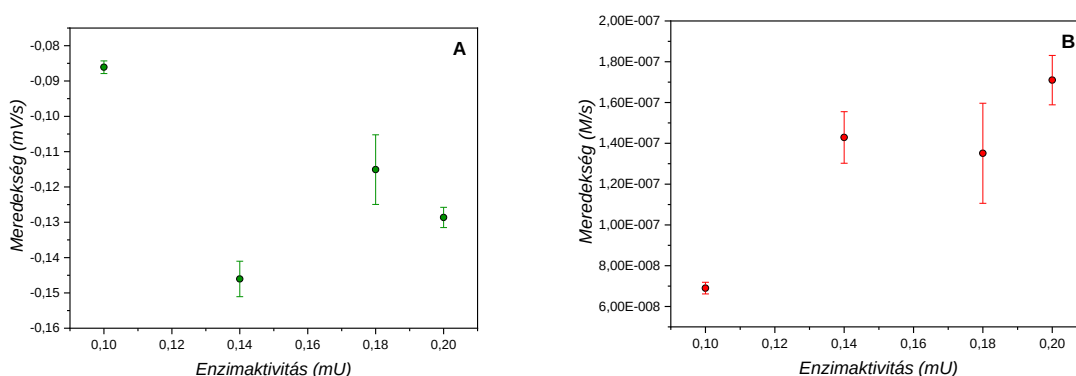
19. ábra - A 0,02-0,10 mU enzimreakciók kezdeti meghatározott meredekségei (**A:** mV/s és **B:** M/s értékben is)

A kis enzimaktivitás tartomány külön mérve is közel lineáris tendenciát mutatott. Ezt követően a nagyobb enzimaktivitás tartományban (0,14-0,20 mU) is elvégeztem a méréseket. Az enzimreakciók időbeli monitorozását követően ezúttal is meghatároztam az első 500s alapján a kezdeti lineáris szakasz meredekségeit (**20. ábra**).



20. ábra - A 0,14 - 0,20 mU aktivitású enzimreakciók időbeli lefutása **A:** monitorozott potenciálváltozások a kontrollal korrigálva **B:** az átszámított koncentrációváltozás időbeli profiljai

A meredekségek meghatározása hasonló eredményt hozott, mint a teljes enzimaktivitás tartomány mérésekor. A nagyobb aktivitások nagyobb szórást is mutatnak és bizonytalanabb a meghatározás, mint a kisebb koncentráció esetén.



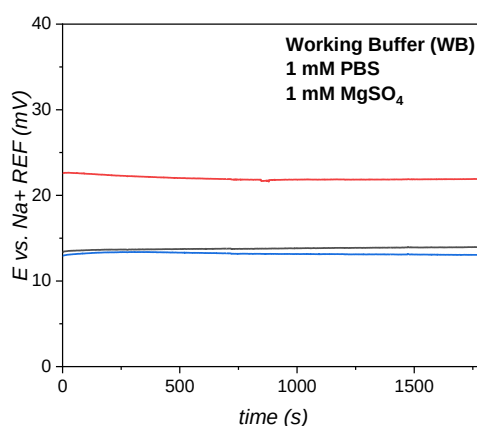
21. ábra - A 0,14-0,20 mU enzimreakciók kezdeti meghatározott meredekségei

A végrehajtott mérésekkel sikerült igazolni, hogy a β -galaktozidáz által katalizált reakció időben folyamatosan követhető potenciometriásan a keletkező, lipofil DIFMU anion mérésével, különböző enzimaktivitások esetén is. A módszer alsó kimutatási határa körülbelül 0,02 mU enzimaktivitás körülinek adódott. A kisebb enzimaktivitások esetén közel lineáris trend a nagyobb aktivitások (nagyobb, mint 0,10 mU) esetén telítésbe hajlik, az eredmények szórásának növekedésével együtt, így a 0,10 mU aktivitás tekinthető a módszer dinamikus tartománya felső értékének.

4.4 A baktérium lízis pufferösszetétel vizsgálata

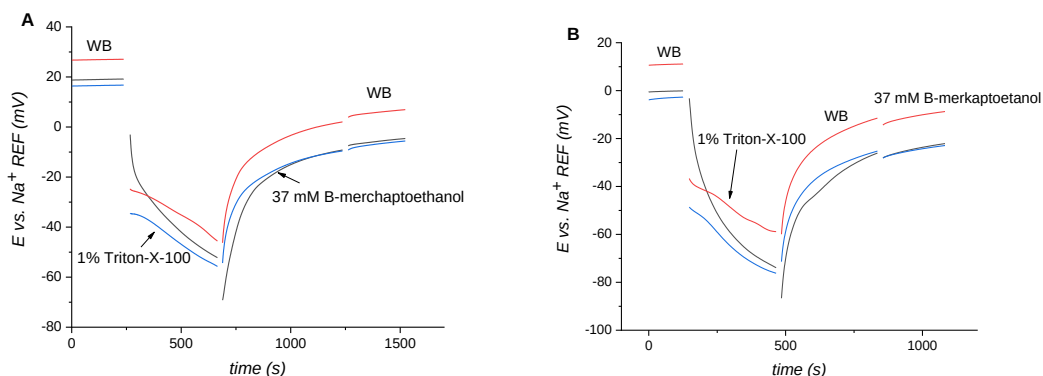
A valós baktériumminták vizsgálatához kulcsfontosságú a baktérium megfelelő lizálási módszerének kiválasztása, mivel a vizsgált enzim csak a baktérium citoplazmájában található meg. A lízis feladata a bakteriális sejtfal megbontása, a baktériumtípusra jellemző enzimapparátus szétroncsolása nélkül. Számos különböző technika áll rendelkezésre (hőkezelés fagyasztással/felmelegítéssel, ultrahangos kezelés, szerves reagensek használata (*pl. Nátrium-dodecil-szulfát (SDS)/kloroform* jellemző), vagy detergens alapú lízis). A technika kiválasztása során elsődleges szempont volt a potenciometriával való kompatibilitás, emiatt ionos tenzideket nem használtam, mivel azok tönkreteszik az ionszelektív membránt. Emellett törekedtem arra, hogy olyan módszert válasszak, ami egy helyszíni gyorsmérés esetén is megvalósítható lenne, ahol a potenciometriás szenzorok előnyei kihasználhatók. Ezért kizártam a fagyasztás/felmelegítés, valamint az ultrahangos kezelést. Az irodalomban több, detergens alapú technika is található ([19], [36], [68]), melyek hatékony, gyors lízist biztosítanak. A leggyakrabban alkalmazott detergensok a *Triton – X – 100*, *Tween-20*, β -merkaptoetanol, de különböző, kifejezetten a baktériumok lízisére fejlesztett kereskedelmi forgalomban kapható készítmények is találhatóak (*PopCulture*, *B-PER*).

Az lízis pufferösszetétel vizsgálata során célom volt azon komponensek kizárása, melyek a potenciometriás detektálás szempontjából problémát jelenthetnek. A pipettahegy elektródokat a mérések előtt az elektródokat 1 napon át ~10 mL munkapufferben (**WB** – 1 mM PBS, 1 mM MgSO_4) kondicionáltam. A mérések megkezdése előtt 8 mL WB-ben vizsgáltam az elektródok stabilitását (**22. ábra**).



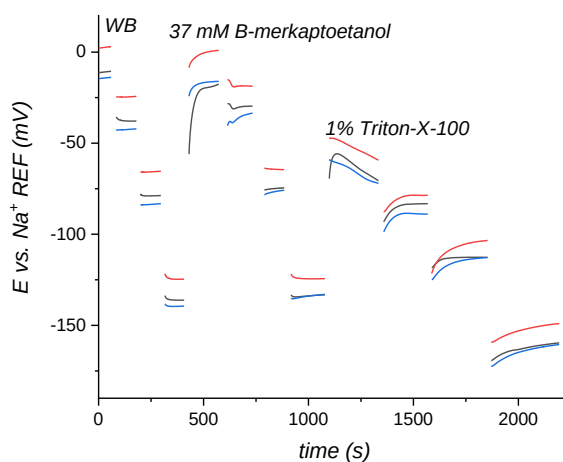
22. ábra - Az elektródok stabilitása 8 mL munkapufferben (**WB** – 1 mM PBS, 1 mM MgSO_4) mérve

Ezt követően 250 μ l-es wellekben végeztem méréseket, első esetben a WB-hez 1% *Triton-X-100* reagenst adtam, második esetben 37 mM β -merkaptóetanolt adtam hozzá. A **23. ábra** mutatja be, hogy a *Triton-X-100* tartalmú puffer esetén az elektródok potenciálja instabil, folyamatosan változik az időben (*drift*).



23. ábra - A pipettahegyek stabilitásának tesztelése *Triton-X-100* és β -merkaptóetanolt reagensek jelenlétében

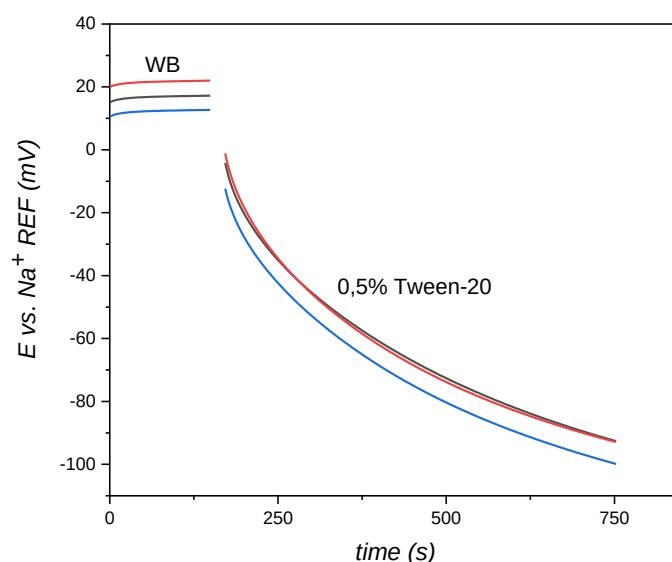
Az első mérés során a *Triton-X-100* után közvetlen mértem a β -merkaptóetanolt tartalmú puffert. A *Triton-X-100* esetén tapasztalt instabil potenciál a β -merkaptóetanolos WB esetén is intenzív potenciálváltozást eredményezett. Egy köztes pufferes átmeneti lépés beiktatásával a β -merkaptóetanolt tartalmú pufferben végzett mérés is stabil potenciált mutatott. A következő lépésben végzett három pontos NaNO_3 kalibrációt a WB-ben történő mérés után a β -merkaptóetanolt tartalmú pufferrel folytattam, utolsónak hagyva a *Triton-X-100*-as puffert. Az elvégzett nitrát kalibrációk eredményeit a mutatja be a **24. ábra**.



24. ábra - A *Triton-X-100* és β -merkaptóetanolt reagensek jelenlétében végzett nitrát-ion kalibrációk

A nitrátion kalibrációk esetén meghatároztam a meredekségek értékeit a 10^{-2} - 10^{-4} M tartományban. A sima munkapufferben felvett kalibráció átlagos meredeksége $-49,30 \pm$ mV/dekád, a β -merkaptóetanol tartalmú WB esetén ez $-51,45 \pm 1,65$ mV/dekád, míg az 1% *Triton-X-100* tartalmú puffer átlagos meredeksége $-36,48 \pm 1,59$ mV/dekád volt. A nitrátion kalibráció is igazolta, hogy a *Triton-X-100* alkalmazása jelentősen rontja az elektródok stabilitását és potenciometriás válaszát, éppen ezért a lízis során nem alkalmazható. A β -merkaptóetanol ezzel ellentétben nem volt hatásra sem a stabilitásra, sem a kalibrációs teljesítményjellemzőkre. A lízis során így alkalmazható.

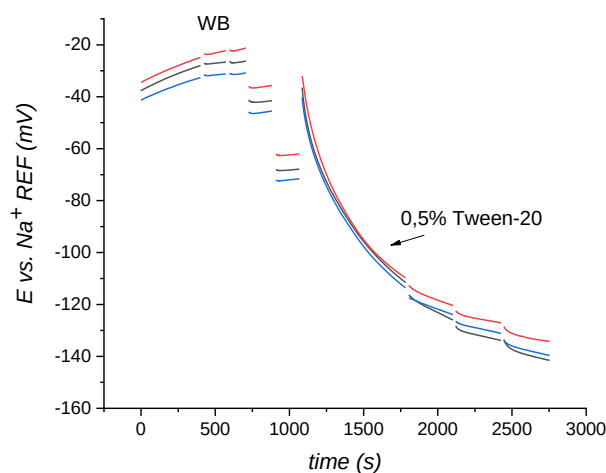
Mivel a *Triton-X-100* nem bizonyult jó választásnak a potenciometriás detektálás szempontjából, más detergens alternatívákat is kipróbáltam. Vizsgáltam a szintén gyakran alkalmazott *Tween-20* hatását. A WB-hez 0,5%-ban adtam hozzá, elsőként az elektródok stabilitására gyakorolt hatását teszteltem (25. ábra).



25. ábra - A 0,5% *Tween-20* hatásának vizsgálata a potenciálstabilitásra

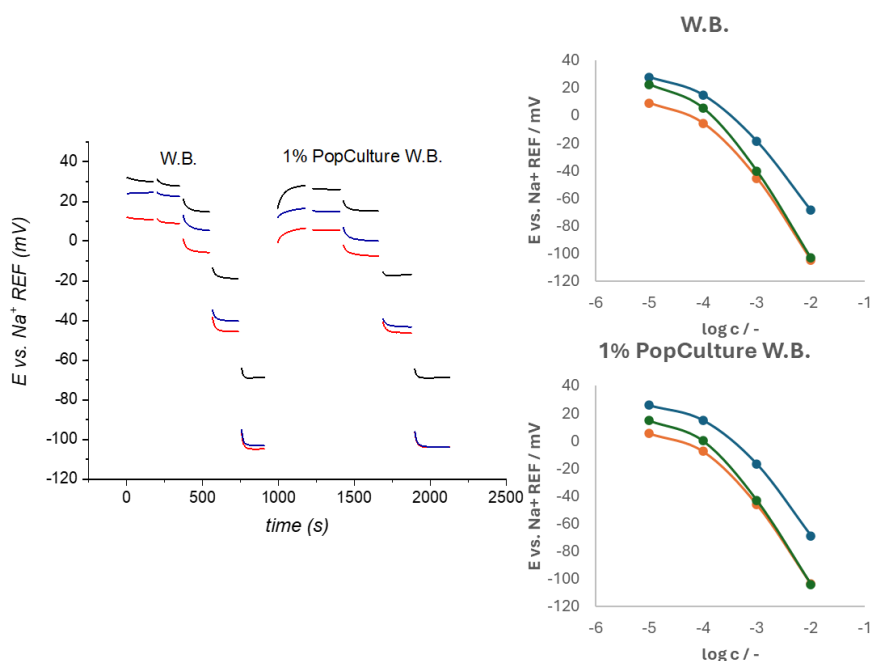
Az eredmény a *Triton-X-100* hatásához hasonló volt, a *Tween-20* esetén is jelentős potenciálváltozást tapasztaltam az idő függvényében pufferált közegben is. A potenciál 500 másodpercet követően sem állt be. Az elektródok kalibrációs jellemzőinek meghatározásához elvégeztem egy nitrátion kalibrációt is, elsőként sima pufferben (WB), majd pedig a 0,5% *Tween-20* tartalmú pufferben is a 10^{-5} – 10^{-3} M koncentrációtartományban, amit a 26. ábra mutat be. A meredekségek mérésekor már a sima pufferben végzett nitrátion kalibráció is jelentősen rosszabb ($-20,49 \pm 0,24$ mV/dekád) volt, a *Tween-20* esetén pedig $-7,59 \pm 0,52$ mV/dekád volt, a potenciometriás válasz gyakorlatilag megszűnt, és alig megkülönböztethető

a *drift*-től. Ennek megfelelően a *Tween-20* alkalmazását is kizártuk a későbbi lízis pufferben, a potenciálstabilitás és a kalibráció eredményei alapján is.



26. ábra - 0,5% *Tween-20* hatásának vizsgálata

Az előzetesen kipróbált két detergens egyike sem vált be a potenciometria szempontjából. Ezt követően egy kereskedelmi forgalomban kapható, kifejezetten *E. coli* lizálására ajánlott keveréket, a *PopCulture*®-t próbáltam ki. Az 1% *PopCulture*® reagenst tartalmazó W.B.-ben is elvégeztem a nitrátion kalibrációt, a 10^{-5} M – 10^{-2} M koncentráció tartományban (**27. ábra**).



27. ábra - Az 1% *PopCulture*® tartalmú WB nitrátkalibrációjának eredménye

A kapott meredekségeket és a tengelymetszet értékeit mutatja be részletesen a **8. Táblázat**.

8. Táblázat A WB és az 1% PopCulture® tartalmú WB nitrátkalibrációjának eredményei

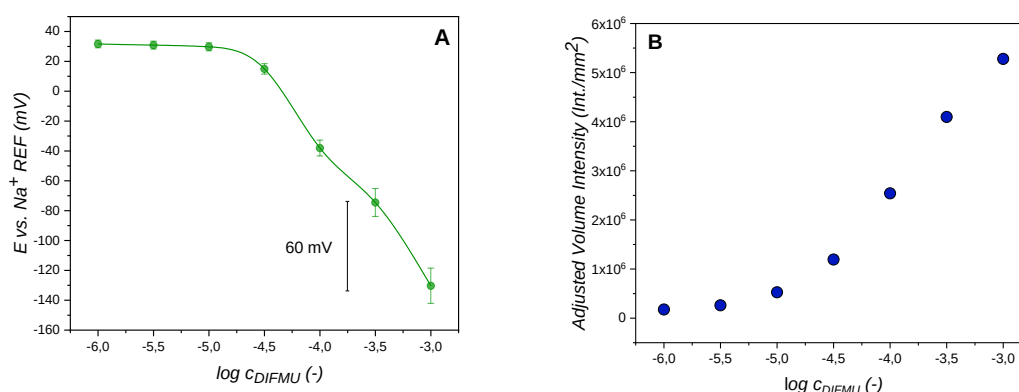
	WB			1% PopCulture		
<i>meredekség [mV/dekád]</i>	-41,77	-49,50	-54,25	-41,95	-48,09	-51,95
<i>E⁰ [mV]</i>	-149,49	-200,49	-208,72	-149,29	-196,76	-204,83

A meredekségek átlaga WB esetén -48,50 mV/dekád, 1% *PopCulture* alkalmazásakor -47,33 mV/dekád. A meredekségek meghatározása során a 10^{-4} M és 10^{-2} M között illesztettem az egyenest. A *PopCulture* használata esetén sem stabilitási, sem kalibrációs teljesítménybeli problémát nem tapasztaltam, így a későbbi lízisek során ezt alkalmaztuk.

4.5 Mérés baktérium lizátumokból

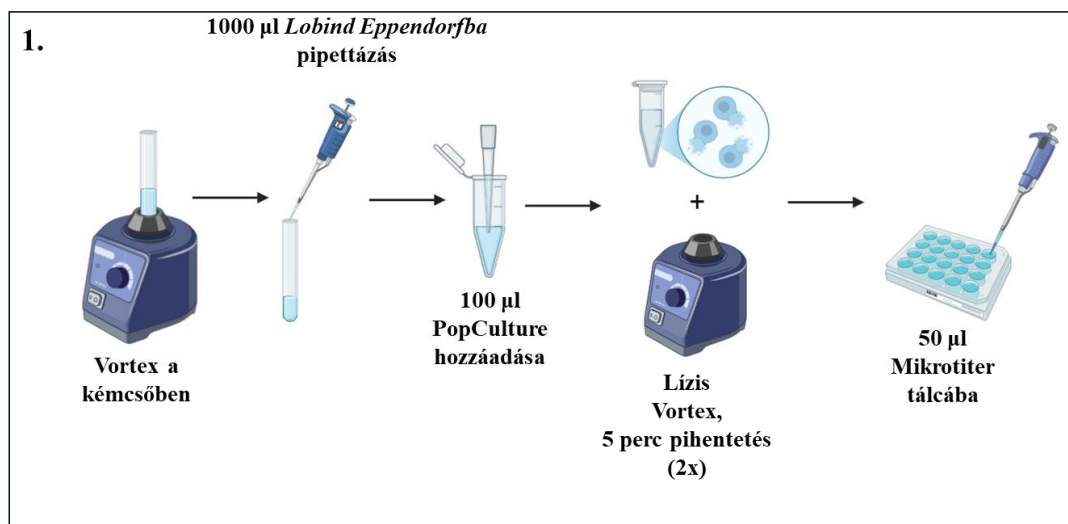
Ahhoz, hogy a fejlesztett mérőrendszert tesztelni tudjuk, az ABÉT tanszék által tenyésztett és PBS-ben szuszpendált nem patogén, *E. coli* törzset tartalmazó mintákat is vizsgáltunk. A baktériummintákat PBS-ben, több nagyságrendet átfogó baktériumszámmal (*E. coli* db/mL) kaptuk meg vizsgálatra. A kalibrációs sor nagyjából 10^{10} -tól 10^0 db *E. coli* baktérium tartalomig terjed, a becsült sejtszámokat *Bürker* – *kamrás* és szélesztéses módszerrel igazolták.

A lízis tesztelése során több protokollt is alkalmaztam, melyeket a **3.7. fejezet** részletesen bemutat. Az 1. protokoll esetén csak *PopCulture*-t alkalmaztunk a lízishez. A 10^3 – 10^{10} db *E. coli*/mL mintákból lizátumokat készítettem, melyekkel utána párhuzamos enzimreakciókat végeztem. A lízis esetén több protokollt is teszteltem. Általánosan a kapott baktériumtartalmú hígítási sorból vortexelést követően mintát vettem, amit *Lobind Eppendorf* csőbe pipettáztam, majd hozzáadtam a *PopCulture*-t, amit szünetekkel többször vortexeltem. A lizátumból 50 μ L-t juttattam egy mikrotiter tálca welljeibe, amik 100 μ L munkapuffert (WB) tartalmaztak. Az enzimreakciókat 100 μ L DIFMUG szubsztrát hozzáadásával indítottam el, 30 perc leteltével STOP reagenssel leállítottam, majd ezt követően a végponti detektálást fluoreszcens képalkotással és potenciometriával végeztem.



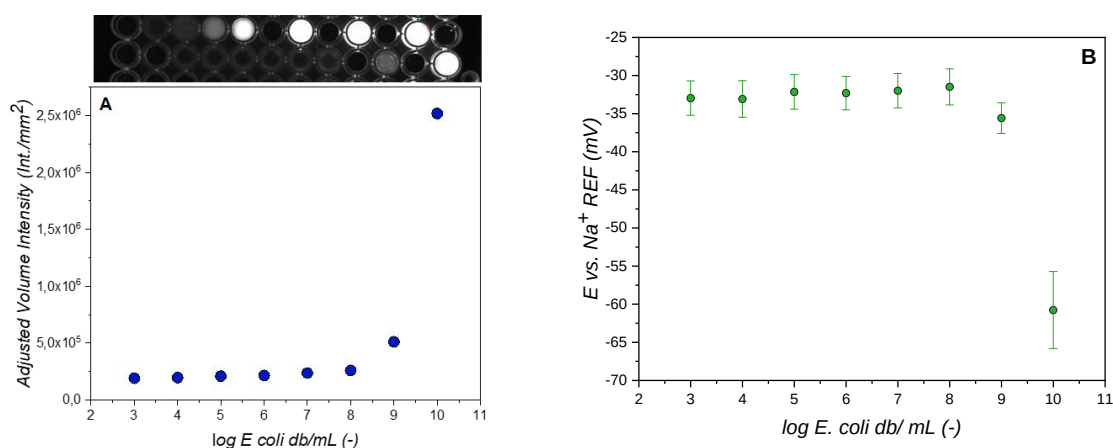
28. ábra - Az enzimreakciók előtt készített DIFMU kalibráció, **A:** potenciometria **B:** fluoreszcens kiolvasás

Az **1. Lízis protokoll** lépéseit mutatja be a **29. ábra**. A baktériummintákat itt nem koncentráltuk a lízist megelőzően, a mintavételt (1000 μ L) követően 100 μ L *PopCulture*-t adtam a baktériummintához, majd kétszer vortexeltem 5 perces szünetekkel.



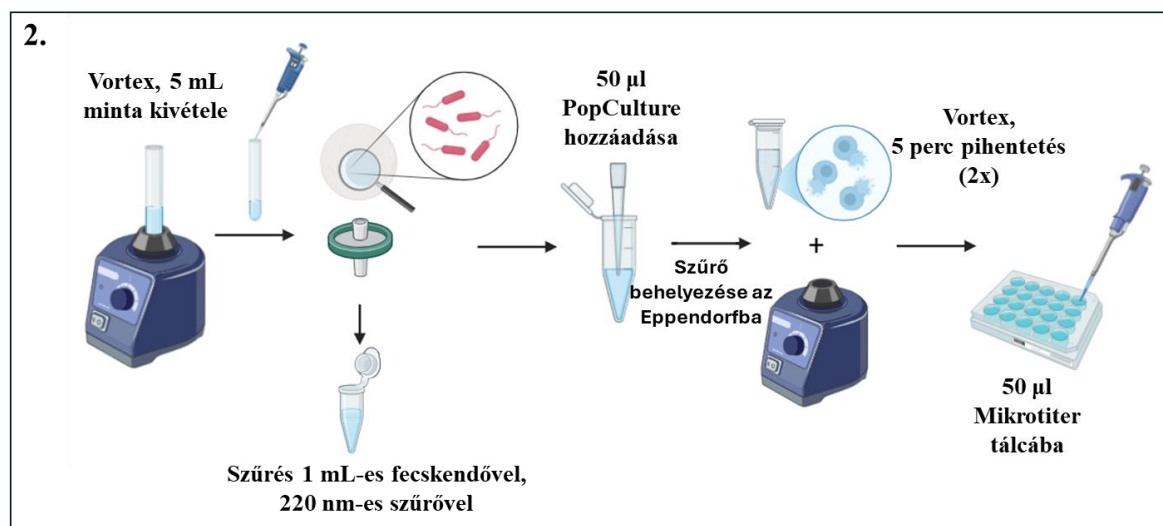
29. ábra - Az 1. lizálási protokoll lépéseinek bemutatása

A mikroelektrodokkal megvalósított potenciometriás módszer a valós baktérium minták esetén is sikeresnek bizonyult, nagy baktérium koncentrációk esetén felszabadult annyi enzim, ami mérhető mennyiségű DIFMU aniont állított elő. Ugyanakkor a kis baktérium koncentráció tartományokban nem lehetett különbséget tenni az *E. coli* koncentrációk között, ez a tendencia a fluoreszcens képalkotásnál is megfigyelhető volt (**30. ábra**). Mivel mindkét detektálási technika esetén jelentkezett a probléma, nagy valószínűséggel a lízis további optimalizálásra szorult.



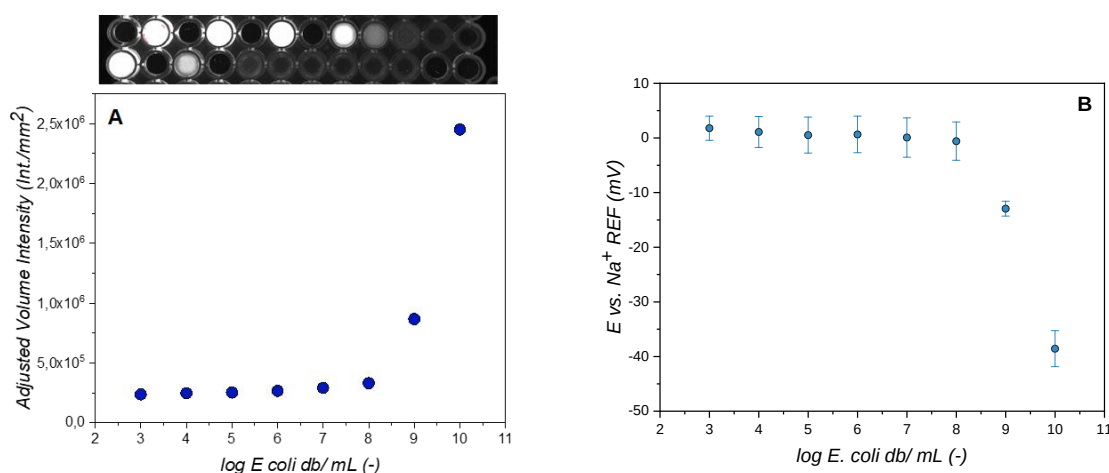
30. ábra - Az 1. Lízis protokollal végzett enzimreakciók eredményei. **A:** fluoreszcens kiolvasás, a felső sor a DIFMU kalibráció, az alsó sor a lizátumokra kapott jel és **B:** potenciometriás kiolvasás

A **2. protokoll** esetén egy szűrési lépést iktattam be a minta koncentrálnak céljából (**31. ábra**). Ehhez 220 nm-es szűrőt használtam, mivel a baktériumok méretüknél fogva nem jutnak át a szűrő pórusain, fennmaradnak rajta. A baktériummintákból 5 mL-t szűrtem le 1 mL-es részletekben, a szűrőt ezt követően 500 μ L munka pufferben inkubáltam, ezzel nagyjából 10x töményítést elérve. Elvégeztem 50 μ L *PopCulture* hozzáadásával a lízist, majd ismét potenciometriával és fluoreszcens képalkotással vizsgáltam a mintát.



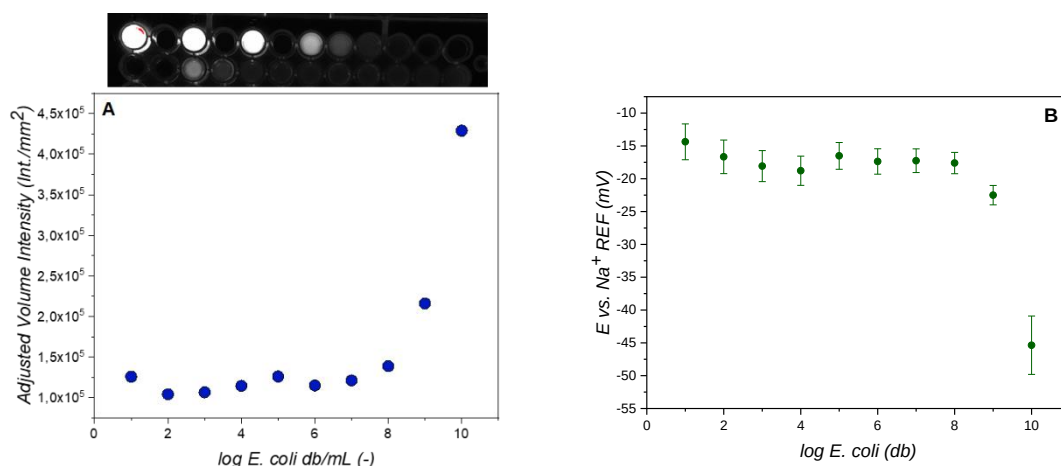
31. ábra: - A 2. lízis protokoll lépéseinek bemutatása

A szűréssel történő koncentrálnak kis mértékben segít, a nagyobb koncentrációk esetén nőtt a diszkrimináció a minták között, de ismételt mindkét kiolvasási technika esetén a kis baktériumkoncentrációk nem megkülönböztethetőek, a kapott eredmények hasonlóak az előző esethez (**32. ábra**).



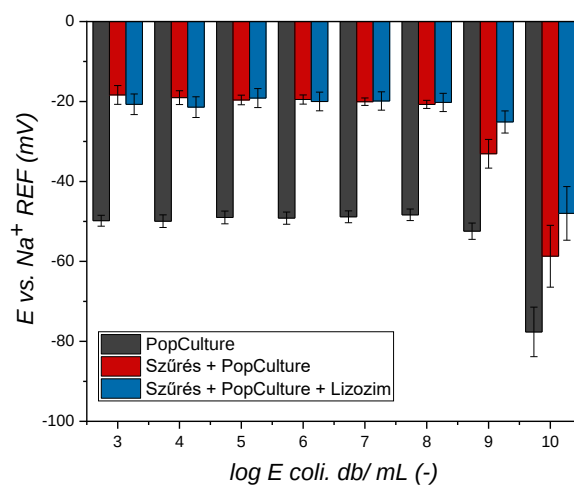
32. ábra - A 2. Lízis protokollal végzett enzimekreakciók, **A:** a felső sor a DIFMU kalibráció, az alsó sor a lizátumokra kapott jel és **B:** potenciometriás kiolvasás

Kipróbáltunk egy harmadik módszert is, ekkor a szűrést követően a lízis során *PopCulture* mellett lizozimet is ($5\ \mu\text{L}$ $4\ \text{U}/\mu\text{L}$ enzim) adtunk a lizáló pufferhez. A protokoll a többi lépésében megegyezett a **2. protokollal**. A lizozim alkalmazása a baktériumok sejtfal peptidoglikán részeinek hidrolízisével (β -1,4 kötések bontása cukoregységek között) segíti elő a hatékony lízis végrehajtását [69]. A kapott potenciometriás kiolvasás és a fluoreszcens képalkotás eredményeit mutatja be a **33. ábra**. A harmadik stratégia is az előzőekkel megegyező eredményeket hozott, a 10^8 db/mL *E. coli* koncentrációjú az utolsó biztosan megkülönböztethető minta.



33. ábra - A 3. Lízis protokollal végzett enzimreakciók, **A:** a felső sor a DIFMU kalibráció, az alsó sor a lizátumokra kapott jel és **B:** potenciometriás kiolvasás

Összehasonlítottam a három lízis protokollal kapott potenciometriás végpont értékeket, minden esetben a kontrollként felvett WB-t és STOP reagenst tartalmazó potenciál értékekkel korrigálva a mért értékeket (**34. ábra**). A szűrési lépés beiktatása javított a kapott eredményeken, így a minták koncentrációja szükséges a hatékony lízis végrehajtásához. Ennek megfelelően a **2. Protokoll** esetén különböztethető meg leginkább a minták. A szórás minden esetben nő a nagyobb koncentrációk vizsgálata esetén. A lizozim alkalmazása nem javított a lízisen.

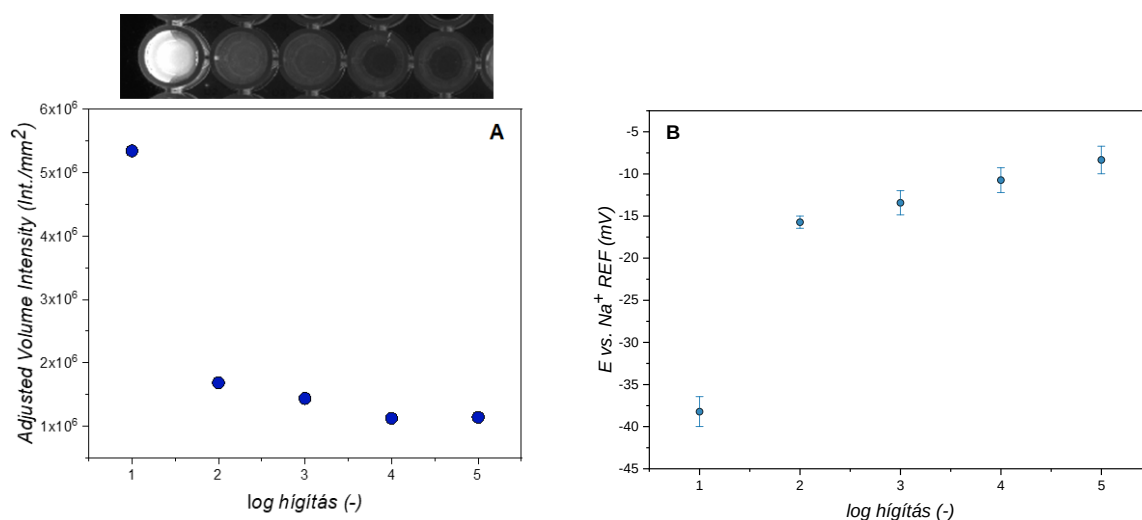


34. ábra - A három lízis protokoll során kapott potenciometriásan mért értékek, a szórásokkal feltüntetve. **Szürke:** 1. protokoll, **Piros:** 2. protokoll, **Kék:** 3. protokoll

A munka következő lépése az lesz, hogy a baktériumok lízisét tovább optimalizáljam, hogy csökkenteni tudjam a kimutatási határt és kiterjeszteni a dinamikus tartományt.

4.6 Teljes Koliform mennyiség mérése probiotikumból

Elvégeztem egy kereskedelmi forgalomban is kapható probiotikum (*LXR – Mikrobiom*) esetén a teljes koliform tesztet. A készítmény 11-féle jótékony baktériumtörzset tartalmaz, melyek megtalálhatók az emberi bélflórában (jellemzően *Bifidobacterium* és *Lactobacillus*). Mivel a kapszula nem aktív, hanem liofilizált formában tartalmazza a baktériumokat, ezért első lépésben a kapszulát fel kellett oldanom egy tápoldatban (ún. *lactose broth* - *LB*), amely szénhidrátként laktózt tartalmazott. Mivel így a laktóz az egyetlen energiaforrásuk, a baktériumok elkezdik termelni a laktóz lebontásához szükséges β -galaktozidáz enzimet, amely alapján mérni kívánjuk őket. A kapszula feloldását követően 16 órán át inkubáltuk a mintát 37°C-on, *Lactose broth* tartalmú WB-ben. A centrifugálási tisztítási lépéseket követően hígítási sort készítettem a WB-ben, 10X, 100X, 1000X, 10000X, 100000X, 1000000X hígításokkal. A lízishez az **1. Protokollt** alkalmaztuk. A detektálások eredményeit a **35. ábra** mutatja be.



35. ábra - A probiotikum lízisét követően kapott fluoreszcens (A) és potenciometriás kiolvasás (B)

A fluoreszcens képalkotás eredményei és a potenciometria azonos érzékenységgel detektálta a teljes koliform teszt során mért hígítási sort. A potenciometria potenciálértékei egyenletesebb eloszlást mutatnak a minta hígításával. A fejlesztett mérőrendszert így sikerrel alkalmaztam *E. coli* jelenlétének kimutatására a baktérium lizátumokban és a kereskedelmi forgalomban kapható *LXR Mikrobiom* probiotikumban.

5. Összefoglalás

A vízminták (felszíni és felszín alatti vizek, esővizek) ionos összetételéhez kapcsolható minőségi jellemzők meghatározására és folyamatos, valós idejű nyomonkövetésére kiválóan alkalmasak a potenciometriás ionszelektív elektródok. Ugyanakkor a helyszínen kevésbé gyorsan meghatározható, kiemelt jelentőségű bakteriális szennyezettség mérésére a jelenlegi technikák jellemzően kolorimetriás detektálást alkalmaznak. A hagyományos módszereknek számos hátránya van, mint a magas hőmérsékletű (35-40 °C), hosszú inkubáció (24-48 óra) és a speciális eszköz és labor igény. Az elektrokémiai detektálás és különösen a potenciometria alternatívát nyújthatnak rövid válaszidejük, egyszerűbb műszerezettségük, költségghatékony gyártásuk és az eltérő szenzorplatformokkal való kompatibilitásuk miatt. Céлом munkám során ezért egy olyan baktérium meghatározási módszer kidolgozása volt, amely kompatibilis az ionszelektív elektródokkal és a potenciometriás méréstechnikával, egyben lehetőséget ad egy integrált multiplex potenciometriás mérési platform kialakítására.

Munkám során elsőként makroelektródokkal végzett kalibrációk során meghatároztam az optimális membránösszetételt. A hatékony, kis mintatérfogatban végezhető mérések érdekében *pipettahegy mikroelektródokat* készítettem ($\varnothing$ 300 μm), a már optimalizált membrán felhasználásával. A *mikroelektródok* lehetővé tették, hogy a méréseket akár egy mikrotiter tálca 250 μl -es üregeiben végezhessem, nagy mértékben csökkentve a módszer mintaigényét.

A koliform baktériumokra jellemző β -galaktozidáz enzimaktivitás mérését a fejlesztett pipettahegy-mikroelektródokkal végeztem. Az enzim szubsztrátjaként a kereskedelmi forgalomban is kapható DIFMUG-ot (*6,8-difluoro-4-metilumbelliferil- β -D-galaktopiranozid*) alkalmaztam. A szubsztrátból az enzimreakció során keletkező anion (DIFMU) fluoreszcens, ezen felül lipofilitása lehetőséget ad a szelektív meghatározására akár egyéb szervetlen anionok jelenlétében is. Az anion mérésére így mind fluoreszcens képalkotással, mind potenciometriával van lehetőség. Ezt követően munkám során enzimreakciók végrehajtásával és nyomonkövetésével teszteltem, hogy monitorozható-e az enzimaktivitás a felszabaduló DIFMU anion potenciometriás mérésével. A mérésekkel sikeresen igazoltam, hogy a β -galaktozidáz által katalizált reakció monitorálható potenciometriásan a keletkező DIFMU anion mérésével, akár 0,02 mU aktivitásig. A potenciometriás mérések során meghatározott kezdeti meredekségek a kisebb enzimaktivitások esetén közel lineáris trendet mutattak, míg a nagyobb aktivitások (0,10 mU felett) esetén az eredmények szórásának növekedésével együtt telítésbe hajló trend érvényesült, a dinamikus

tartomány felső értéke így a 0,10 mU enzimaktivitás. Ugyanabban az elrendezésben a potenciometriás módszer kimutatási határa és dinamikus tartománya gyakorlatilag megegyezik a fluoreszcenciás módszerével.

Munkám folytatásaként a lizálási módszer reagenseinek kiválasztása érdekében végeztem méréseket. A lízis kulcsfontosságú lépés a valós baktériumminták vizsgálata során, így a különböző elérhető reagensek közül ki kellett választanom a potenciometriás meghatározással kompatibilis opciókat. Több detergens alapú lízis-puffer tesztelését követően a *PopCulture* használata esetén sem stabilitási, sem kalibrációs teljesítménybeli problémát nem tapasztaltam, így a baktériumminták vizsgálata során is ezt alkalmaztuk.

A fejlesztett mérőrendszer tesztelésére PBS-ben szuszpendált nem patogén, *E. coli* törzset tartalmazó mintákat vizsgáltunk. Három különböző lízis protokollt is megvalósítottam, amelyből a legjobb eredményeket a 220 nm-es szűrővel koncentrált minták PopCulture-el végzett lízise eredményezte. A mikroelektrodokkal megvalósított potenciometriás módszer a valós baktérium minták esetén is sikeresnek bizonyult, a nagy baktérium koncentrációk esetén a lízis során felszabadult annyi enzim, ami az enzimreakció végrehajtása során mérhető mennyiségű DIFMU aniont állított elő. Ezen felül elvégeztem az *LXR – Mikrobiom* (kereskedelmi forgalomban is kapható) probiotikum esetén a teljes koliform tesztet, amely során a fluoreszcens képalkotás eredményei és a potenciometria azonos érzékenységgel detektálta a teljes koliform teszt során mért hígítási sort. A kifejlesztett módszer hozzájárulhat a koliform baktériumok gyors helyszíni meghatározásához és egy integrált potenciometriás mérési platform kialakításához.

6. Irodalomjegyzék

- [1] V. K. Tyagi, A. Kumar, V. K. Tyagi, A. K. Chopra, and A. A. Kazmi, "Alternative Microbial Indicators Of Faecal Pollution: Current Perspective. ALTERNATIVE MICROBIAL INDICATORS OF FAECAL POLLUTION: CURRENT PERSPECTIVE," 2006. [Online]. Available: <https://www.researchgate.net/publication/237065547>
- [2] S. C. Edberg, E. W. Rice, R. J. Karlin, and M. J. Allen, "Escherichia coli: The best biological drinking water indicator for public health protection," 2000, *Blackwell Publishing Ltd.* doi: 10.1111/j.1365-2672.2000.tb05338.x.
- [3] M. R. Nurliyana *et al.*, "The Detection Method of Escherichia coli in Water Resources: A Review," in *Journal of Physics: Conference Series*, Institute of Physics Publishing, Apr. 2018. doi: 10.1088/1742-6596/995/1/012065.
- [4] Z. Muhammad-Tahir and E. C. Alocilja, "Fabrication of a disposable biosensor for Escherichia coli O157:H7 detection," *IEEE Sens J*, vol. 3, no. 4, pp. 345–351, Aug. 2003, doi: 10.1109/JSEN.2003.815782.
- [5] A. Rompré, P. Servais, J. Baudart, M.-R. De-Roubin, and P. Laurent, "Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches." *Journal of Microbiological Methods*, Volume 49, Issue 1, 2002, Pages 31-54, [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00351-7](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00351-7).
- [6] Jonathan R. Beckwith, "Regulation of the Lac Operon. *Science* 156, 597-604 (1967). DOI:10.1126/science.156.3775.597
- [7] G. W. Chang and R. A. Lum, 1993. METHOD FOR DETECTING COLIFORM AND E. COLI BACTERIA, US Patent, Patent Number: 5643743
- [8] S. C. Edberg, M. J. Allen, and D. B. Smith, "National Field Evaluation of a Defined Substrate Method for the Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli from Drinking Water: Comparison with the Standard Multiple Tube Fermentation Method," 1988. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aem>
- [9] E. W. Rice, M. J. Allen, and S. C. Edberg, "Efficacy of 1-Glucuronidase Assay for Identification of Escherichia coli by the Defined-Substrate Technology," 1990. [Online]. Available: <https://journals.asm.org/journal/aem>
- [10] D. Wildeboer, L. Amirat, R. G. Price, and R. A. Abuknesha, "Rapid detection of Escherichia coli in water using a hand-held fluorescence detector," *Water Res*, vol. 44, no. 8, pp. 2621–2628, 2010, doi: 10.1016/j.watres.2010.01.020.
- [11] "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater The Nineteenth and Earlier Editions," 1999.
- [12] K. F. Eckner, "Comparison of Membrane Filtration and Multiple-Tube Fermentation by the Colilert and Enterolert Methods for Detection of Waterborne Coliform Bacteria, Escherichia coli, and Enterococci Used in Drinking and Bathing Water Quality Monitoring in Southern Sweden," *Appl Environ Microbiol* 64: <https://doi.org/10.1128/AEM.64.8.3079-3083.1998> 1998.
- [13] S. Chandrapati and M. G. Williams, "Total Viable Counts: Most Probable Number (MPN)," in *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, Elsevier Inc., 2014, pp. 621–624. doi: 10.1016/B978-0-12-384730-0.00333-5.

- [14] E. Et, "Defined Substrate Technology Method for Rapid and Specific Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and Escherichia coli from Water: Collaborative Study," 1991. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/jaoac/article/74/3/526/5687499>
- [15] J. L. Kinzelman, A. Singh, C. Ng, K. R. Pond, R. C. Bagley, and S. Gradus, "Use of IDEXX colilert-18® and quanti-tray/2000 as a rapid and simple enumeration method for the implementation of recreational water monitoring and notification programs," *Lake Reserv Manag*, vol. 21, no. 1, pp. 73–77, 2005, doi: 10.1080/07438140509354414.
- [16] D. H. Juers, B. W. Matthews, and R. E. Huber, "LacZ β -galactosidase: Structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance," Dec. 2012. doi: 10.1002/pro.2165.
- [17] D. M. Sedzro, S. Bellah, H. Akbar, and S. S. Billah, "Structure, Function, Application and Modification Strategy of β –Galactosidase," 2018. J Multidis Res Rev Vol: 1, Issu: 1 (10-16). Available: www.innovationinfo.org
- [18] W. L. Wendorff and C. H. Amundson, Characterization of beta-galactosidase from *saccharomyces fragilis* J.Milk Food Technol., Vol. 34, No. 6 (1971.)
- [19] A. Hosseini and J. Mas, "The β -galactosidase assay in perspective: Critical thoughts for biosensor development," *Anal Biochem*, vol. 635, Dec. 2021, doi: 10.1016/j.ab.2021.114446.
- [20] C. Sicard, N. Shek, D. White, R. J. Bowers, R. S. Brown, and J. D. Brennan, "A rapid and sensitive fluorimetric β -galactosidase assay for coliform detection using chlorophenol red- β -d-galactopyranoside," *Anal Bioanal Chem*, vol. 406, no. 22, pp. 5395–5403, 2014, doi: 10.1007/s00216-014-7935-0.
- [21] L. Trimborn, U. Hoecker, and J. Ponnu, "A Simple Quantitative Assay for Measuring β -Galactosidase Activity Using X-Gal in Yeast-Based Interaction Analyses," *Curr Protoc*, vol. 2, no. 5, May 2022, doi: 10.1002/cpz1.421.
- [22] M. Li, M. Yang, and W. H. Zhu, "Advances in fluorescent sensors for β -galactosidase," Jan. 21, 2021, *Royal Society of Chemistry*. doi: 10.1039/d0qm00683a.
- [23] M. Eun Jun, B. Roy, and K. Han Ahn, "'Turn-on' fluorescent sensing with 'reactive' probes," *Chemical Communications*, vol. 47, no. 27, pp. 7583–7601, 2011, doi: 10.1039/c1cc00014d.
- [24] K. R. Gee *et al.*, "Fluorogenic Substrates Based on Fluorinated Umbelliferones for Continuous Assays of Phosphatases and-Galactosidases," *Analytical Biochemistry*, Volume 273, Issue 1, 1999, Pages 41-48, ISSN 0003-2697, <https://doi.org/10.1006/abio.1999.4202>.
- [25] K. Chilvers, J. Perry, A. James, and R. Reed, "Synthesis and evaluation of novel fluorogenic substrates for the detection of bacterial β -galactosidase." *Journal of Applied Microbiology*, 91: 1118-1130. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01484.x>
- [26] L. Pala, T. Sirec, and U. Spitz, "Modified enzyme substrates for the detection of bacteria: A review," Aug. 01, 2020, *MDPI AG*. doi: 10.3390/molecules25163690.
- [27] S. Datta *et al.*, "Sputum microscopy with fluorescein diacetate predicts tuberculosis infectiousness," *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 216, Issue 5, 1 September 2017, Pages 514–524, <https://doi.org/10.1093/infdis/jix229> 2017.
- [28] T. H. Chrzanowski, R. D. Crotty, J. G. Hubbard, and R. P. Welch, "MICROBIAL ECOLOGY Applicability of the Fluorescein Diacetate Method of Detecting Active Bacteria in Freshwater," *Microb Ecol* 10, 179–185 (1984). <https://doi.org/10.1007/BF02011424>

- [29] X. Gu, R. T. K. Kwok, J. W. Y. Lam, and B. Z. Tang, "AIEgens for biological process monitoring and disease theranostics," Nov. 01, 2017, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.004.
- [30] H. Li *et al.*, "An Activatable AIEgen Probe for High-Fidelity Monitoring of Overexpressed Tumor Enzyme Activity and Its Application to Surgical Tumor Excision," *Angewandte Chemie - International Edition*, vol. 59, no. 25, pp. 10186–10195, Jun. 2020, doi: 10.1002/anie.202001675.
- [31] X. Kong, M. Li, B. Dong, Y. Yin, W. Song, and W. Lin, "An Ultrasensitivity Fluorescent Probe Based on the ICT-FRET Dual Mechanisms for Imaging β -Galactosidase in Vitro and ex Vivo," *Anal Chem*, vol. 91, no. 24, pp. 15591–15598, Dec. 2019, doi: 10.1021/acs.analchem.9b03639.
- [32] T. Komatsu *et al.*, "Design and synthesis of an enzyme activity-based labeling molecule with fluorescence spectral change," *J Am Chem Soc*, vol. 128, no. 50, pp. 15946–15947, Dec. 2006, doi: 10.1021/ja0657307.
- [33] X. Li *et al.*, "Specific Near-Infrared Probe for Ultrafast Imaging of Lysosomal β -Galactosidase in Ovarian Cancer Cells," *Anal Chem*, vol. 92, no. 8, pp. 5772–5779, Apr. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b05121.
- [34] Z. Li, M. Ren, L. Wang, L. Dai, and W. Lin, "Development of a red-emissive two-photon fluorescent probe for sensitive detection of beta-galactosidase in vitro and in vivo," *Sens Actuators B Chem*, vol. 307, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2019.127643.
- [35] J. A. Chen *et al.*, "Imaging of ovarian cancers using enzyme activatable probes with second near-infrared window emission," *Chemical Communications*, vol. 56, no. 18, pp. 2731–2734, Mar. 2020, doi: 10.1039/c9cc09158k.
- [36] S. A. Thibodeau, R. Fang, and J. K. Joung, "High-throughput β -galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems," *Biotechniques*, vol. 36, no. 3, pp. 410–415, 2004, doi: 10.2144/04363bm07.
- [37] Susan L. Putnam, Arthur L. Koch: Complications in the simplest cellular enzyme assay: Lysis of *Escherichia coli* for the assay of β -galactosidase, *Analytical Biochemistry*, Volume 63, Issue 2, 1975, Pages 350-360, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(75\)90357-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(75)90357-7).
- [38] R. Menzel, "A Microtiter Plate-Based System for the Semiautomated Growth and Assay of Bacterial Cells for β -Galactosidase Activity," *Analytical Biochemistry*, Volume 181, Issue 1, 1989, Pages 40-50, ISSN 0003-2697, [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90391-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90391-6).
- [39] D. Arvidson and T. D. Schneider, "Automated kinetic assay of β galactosidase activity," *Biotechniques*, 01 Dec 1991, 11(6):733-4, 736, 738. Available: <https://www.researchgate.net/publication/21347287>
- [40] K. L. Griffith and R. E. Wolf, "Measuring β -galactosidase activity in bacteria: Cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 290, no. 1, pp. 397–402, 2002, doi: 10.1006/bbrc.2001.6152.
- [41] S. Nagaraj, S. Ramlal, J. Kingston, and H. V. Batra, "Development of IgY based sandwich ELISA for the detection of staphylococcal enterotoxin G (SEG), an egc toxin," *Int J Food Microbiol*, vol. 237, pp. 136–141, Nov. 2016, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.009.
- [42] L. G. Saptalena, A. Kuklya, and U. Telgheder, "Gas Chromatography-Differential Mobility Spectrometry and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the detection of coliform

- bacteria,” *Int J Mass Spectrom*, vol. 388, pp. 17–25, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.ijms.2015.07.022.
- [43] L. D. J. Bos, P. J. Sterk, and M. J. Schultz, “Volatile Metabolites of Pathogens: A Systematic Review,” *PLoS Pathog* 9(5): e1003311. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003311> May 2013.
- [44] J. S. Lavender and J. L. Kinzelman, “A cross comparison of QPCR to agar-based or defined substrate test methods for the determination of *Escherichia coli* and enterococci in municipal water quality monitoring programs,” *Water Res*, vol. 43, no. 19, pp. 4967–4979, 2009, doi: 10.1016/j.watres.2009.08.010.
- [45] D. Aebischer, D. Bartusik, and J. Tabarkiewicz, “Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine,” Jan. 01, 2017, *Elsevier Masson SAS*. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.048.
- [46] S. Pahlow, S. Meisel, D. Cialla-May, K. Weber, P. Rösch, and J. Popp, “Isolation and identification of bacteria by means of Raman spectroscopy,” Jul. 15, 2015, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.addr.2015.04.006.
- [47] A. D. Taylor, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, and S. Jiang, “Comparison of *E. coli* O157:H7 preparation methods used for detection with surface plasmon resonance sensor,” in *Sensors and Actuators, B: Chemical*, Elsevier, May 2005, pp. 202–208. doi: 10.1016/j.snb.2004.11.097.
- [48] R. Robelek, “Surface plasmon resonance sensors in cell biology: basics and application,” *Bioanal Rev*, vol. 1, no. 1, pp. 57–72, Dec. 2009, doi: 10.1007/s12566-009-0005-y.
- [49] M. Amiri, A. Bezaatpour, H. Jafari, R. Boukherroub, and S. Szunerits, “Electrochemical methodologies for the detection of pathogens,” *ACS Sens*, vol. 3, no. 6, pp. 1069–1086, Jun. 2018, doi: 10.1021/acssensors.8b00239.
- [50] F. McEachern, E. Harvey, and G. Merle, “Emerging Technologies for the Electrochemical Detection of Bacteria,” Sep. 01, 2020, *Wiley-VCH Verlag*. doi: 10.1002/biot.202000140.
- [51] M. Zhang, S. Karra, and W. Gorski, “Rapid electrochemical enzyme assay with enzyme-free calibration,” *Anal Chem*, vol. 85, no. 12, pp. 6026–6032, Jun. 2013, doi: 10.1021/ac4008557.
- [52] M. Rochelet, S. Solanas, L. Betelli, B. Chantemesse, F. Vienne, and A. Hartmann, “Rapid amperometric detection of *Escherichia coli* in wastewater by measuring β -D glucuronidase activity with disposable carbon sensors,” *Anal Chim Acta*, vol. 892, pp. 160–166, Sep. 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.08.023.
- [53] T. Vidaković-Koch, V. K. Mittal, T. Q. N. Do, M. Varničić, and K. Sundmacher, “Application of electrochemical impedance spectroscopy for studying of enzyme kinetics,” *Electrochim Acta*, vol. 110, pp. 94–104, 2013, doi: 10.1016/j.electacta.2013.03.026.
- [54] L. A. Smith, M. W. Glasscott, K. J. Vannoy, and J. E. Dick, “Enzyme Kinetics via Open Circuit Potentiometry,” *Anal Chem*, vol. 92, no. 2, pp. 2266–2273, Jan. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.9b04972.
- [55] K. J. Land, D. I. Boeras, X. S. Chen, A. R. Ramsay, and R. W. Peeling, “REASSURED diagnostics to inform disease control strategies, strengthen health systems and improve patient outcomes,” Jan. 01, 2019, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/s41564-018-0295-3.
- [56] F. Mazur, A. D. Tjandra, Y. Zhou, Y. Gao, and R. Chandrawati, “Paper-based sensors for bacteria detection,” *Nature Reviews Bioengineering*, vol. 1, no. 3, pp. 180–192, Feb. 2023, doi: 10.1038/s44222-023-00024-w.

- [57] M. Srisa-Art, K. E. Boehle, B. J. Geiss, and C. S. Henry, "Highly Sensitive Detection of *Salmonella typhimurium* Using a Colorimetric Paper-Based Analytical Device Coupled with Immunomagnetic Separation," *Anal Chem*, vol. 90, no. 1, pp. 1035–1043, Jan. 2018, doi: 10.1021/acs.analchem.7b04628.
- [58] M. M. Bordbar, J. Tashkhourian, A. Tavassoli, E. Bahramali, and B. Hemmateenejad, "Ultrafast detection of infectious bacteria using optoelectronic nose based on metallic nanoparticles," *Sens Actuators B Chem*, vol. 319, Sep. 2020, doi: 10.1016/j.snb.2020.128262.
- [59] A. Sheini, "A point-of-care testing sensor based on fluorescent nanoclusters for rapid detection of septicemia in children," *Sens Actuators B Chem*, vol. 328, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.snb.2020.129029.
- [60] Z. Qiao, Q. Cai, Y. Fu, C. Lei, and W. Yang, "Visual and quantitative detection of *E. coli* O157:H7 by coupling immunomagnetic separation and quantum dot-based paper strip," *Anal Bioanal Chem*, vol. 413, no. 17, pp. 4417–4426, Jul. 2021, doi: 10.1007/s00216-021-03395-4.
- [61] S. M. Han, Y. W. Kim, Y. K. Kim, J. H. Chun, H. B. Oh, and S. H. Paek, "Performance Characterization of Two-Dimensional Paper Chromatography-based Biosensors for Biodefense, Exemplified by Detection of *Bacillus anthracis* Spores," *Biochip J*, vol. 12, no. 1, pp. 59–68, Mar. 2018, doi: 10.1007/s13206-017-2108-9.
- [62] D. Mondal, R. Binish, S. Samanta, D. Paul, and S. Mukherji, "Detection of Total Bacterial Load in Water Samples Using a Disposable Impedimetric Sensor," *IEEE Sens J*, vol. 20, no. 4, pp. 1712–1720, Feb. 2020, doi: 10.1109/JSEN.2019.2950422.
- [63] S. Karuppiyah, N. C. Mishra, W. C. Tsai, W. S. Liao, and C. F. Chou, "Ultrasensitive and Low-Cost Paper-Based Graphene Oxide Nanobiosensor for Monitoring Water-Borne Bacterial Contamination," *ACS Sens*, vol. 6, no. 9, pp. 3214–3223, Sep. 2021, doi: 10.1021/acssensors.1c00851.
- [64] J. Ding, B. Li, L. Chen, and W. Qin, "A Three-Dimensional Origami Paper-Based Device for Potentiometric Biosensing," *Angewandte Chemie*, vol. 128, no. 42, pp. 13227–13231, Oct. 2016, doi: 10.1002/ange.201606268.
- [65] E. Bakker, P. Bühlmann, and E. Pretsch, "Carrier-Based Ion-Selective Electrodes and Bulk Optodes. 1. General Characteristics," *Chem. Rev.* 1997, 97, 8, 3083–3132
<https://doi.org/10.1021/cr940394a>.
- [66] J. Szucs, E. Pretsch, and R. E. Gyurcsányi, "Potentiometric enzyme immunoassay using miniaturized anion-selective electrodes for detection," *Analyst*, vol. 134, no. 8, pp. 1601–1607, 2009, doi: 10.1039/b904321g.
- [67] R. Gourishetty, A. M. Crabtree, W. M. Sanderson, and R. D. Johnson, "Anion-selective electrodes based on ionic liquid membranes: Effect of ionic liquid anion on observed response," *Anal Bioanal Chem*, vol. 400, no. 9, pp. 3025–3033, Jul. 2011, doi: 10.1007/s00216-011-4972-9.
- [68] J. P. Ramsay, "High-throughput β -Galactosidase and β -Glucuronidase Assays Using Fluorogenic Substrates," 2013. [Online]. Available: <http://www.bio-protocol.org/e827>
- [69] T. Wu *et al.*, "What is new in lysozyme research and its application in food industry? A review," Feb. 15, 2019, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.foodchem.2018.09.017.

7. Függelék

7.1 A BioRender alkalmazásával készített ábrák jegyzéke

Az alábbiakban felsorolom azokat az ábrákat, amiket a BioRender program segítségével készítettem. Az utómunkákat PowerPointban végeztem. Minden felsorolt ábrát én készítettem, de több esetben is egy adott cikk alapján dolgoztam, melynek hivatkozását feltüntettem.

Biorenderrel készített ábra	Hivatkozás
1. ábra	[6] Beckwith JR. Regulation of the lac operon. Recent studies on the regulation of lactose metabolism in <i>Escherichia coli</i> support the operon model. <i>Science</i> . 1967 May 5;156(3775):597-604. doi: 10.1126/science.156.3775.597. PMID: 5337175.
2. ábra	[3] M. R. Nurliyana et al., "The Detection Method of <i>Escherichia coli</i> in Water Resources: A Review," in <i>Journal of Physics: Conference Series</i> , Institute of Physics Publishing, Apr. 2018. doi: 10.1088/1742-6596/995/1/012065.
3. ábra	[14] E. Et, "Defined Substrate Technology Method for Rapid and Specific Simultaneous Enumeration of Total Coliforms and <i>Escherichia coli</i> from Water: Collaborative Study," 1991. [Online]. Available: https://academic.oup.com/jaoac/article/74/3/526/5687499
4. ábra	[16] M. Li, M. Yang, and W. H. Zhu, "Advances in fluorescent sensors for β -galactosidase," Jan. 21, 2021, Royal Society of Chemistry. doi: 10.1039/d0qm00683a
5. ábra	[36] S. A. Thibodeau, R. Fang, and J. K. Joung, "High-throughput β -galactosidase assay for bacterial cell-based reporter systems," <i>Biotechniques</i> , vol. 36, no. 3, pp. 410–415, 2004, doi: 10.2144/04363bm07.
6. ábra	Saját eredmény bemutatása (elektródkonstrukció)
7. ábra	Saját eredmény bemutatása (mérési elrendezés)
12. ábra	Saját eredmény bemutatása (DIFMU meghatározási stratégia)
29. ábra	Saját eredmény bemutatása (1 lízis protokoll)
31. ábra	Saját eredmény bemutatása (2 lízis protokoll)

7.2 Az LXR Mikrobiom kapszula pontos összetétele

Az összetételt az alábbi táblázat tartalmazza:

Hatóanyag	1 kapszulában található mennyiség (CFU)
<i>Bifidobacterium lactis</i>	0,5 milliárd
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	0,2 milliárd
<i>Bifidobacterium longum</i>	0,5 milliárd
<i>Bifidobacterium breve</i>	0,5 milliárd
<i>Lactobacillus casei</i>	0,5 milliárd
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0,5 milliárd
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 milliárd
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,2 milliárd
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,5 milliárd
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,4 milliárd
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	0,2 milliárd
Inulin	350 mg