

Adatok mikroorganizmusok sugárérzékenységének meghatározásához

KISS ISTVÁN

Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet, Budapest

Érkezett: 1971. június 22.

Az élelmiszerek sugártartósítási dózisszükségletét az élelmiszer mikroflórájában előforduló legsugártűrőbb mikroorganizmus elpusztításához szükséges sugárdózis határozza meg. A mikroorganizmusok sugártűrését a különböző dózisokat túlélő és kolóniát képző sejtek számának ismeretében állapítjuk meg. A kolóniaképző tulajdonságot, illetve annak alakulását nagyon sok tényező befolyásolja. A besugárzás mint új faktor, ezt tovább módosítja, illetve a besugárzott mikroba telepkepző tulajdonsága sok tényező függvénye. A túlélési görbe ismeretében meg tudjuk határozni a 90%-os pusztulást okozó, illetve a 10% túlélést biztosító dózist (D_{10}). A D_{10} érték és a sejtszám ismeretében az egyszerű mechanikus beszorzással kapott dózissal besugározva viszont nem minden esetben érjük el a kívánt csíraszámcsökkenést. Féllogaritmikus rendszerben ábrázolva ugyanis a túlélés sok esetben nem ad egyenest, egyszeres vagy kétszeres sigmoid görbét kapunk, néhány esetben a túlélési görbék több szakaszra is oszthatók. Ezeknek a görbéknek egyenessel való megközelítésével, illetve a csíraszám-extrapolálással a ténylegesen szükséges dózistól eltérő értéket kapunk. Ennek birtokában viszont sokszor a sugárkezelés hatása mikrobiológiai szempontból nem kielégítő vagy az alkalmazott dózis olyan nagy, hogy nem kívánatos érzékszervi elváltozást okoz.

A mikroorganizmusok sugárérzékenységének vizsgálatánál a tiszta tenyészetek azonos fejlődési szakaszú sejtjeinek makrokolóniaképző tulajdonságát állapítják meg a dózis függvényében. A besugárzott mikroba-szuspenzió valamilyen pufferben vagy tápoldatban készül, aminek összetétele általában jól definiált és reprodukálható. A túlélési görbék nagyon sok esetben eltérnek az egyenestől. Általában a váll-, az exponenciális és a farok-részt említik meg. Ezeknek egymáshoz viszonyított aránya, valamint a meredekségük határozza meg a túlélési görbe alakját és ennek alapján minősítjük a vizsgált mikrobat sugárérzékénynek vagy sugárrezisztensnek, a besugárzást hatásosnak vagy kevésbé eredményesnek. A mikroorganizmusok sugártűrését külső és belső tényezők egyaránt befolyásolják. Néhány közülük: a szubsztrátum kémiai összetétele, szabadvíz-tartalma, oxigénkoncentráció, a fiziológiai állapot (más-más az érzékenység), a ploiditás, a populáción belüli esetleges rezisztencia-megoszlás, a sejtek regenerálódási kapacitása. A sejtet ért károsodások lehetnek reverzibilisek a kezelés nagyságától, illetve természetétől függően. Ennek következtében a kevésbé sérült sejtek regenerálódhatnak és a helyes enzimműködés következtében a sejt szintézise tovább folyhat (Howard – Flanders, 1).

A vegetatív baktériumokkal és a *Clostridium botulinum* spóráival kapcsolatban nagyon sok eredmény ismeretes. Ismertetésemben néhány olyan ténye-

zöre szeretném felhívni a figyelmet, amit élesztőkkel végzett kísérleteinkben észleltünk és ezeket kiegészíteni baktériummal és baktériumspórákkal szerzett tapasztalatainkkal.

Vizsgálati módszerek

Vizsgálati mikroorganizmusok

Az élesztők egy részét almaléből és almalé-sűrítmenyből izoláltuk, más része pedig az intézeti törzsgyűjteményből származott. Az izolátumokból Lindner-módszerrel egysejt-tenyészeteket állítottunk elő, majd felszintetikus tápoldatban (Kiss és Clarke, 2) 20 órát szaporítottuk, majd citrát-foszfát pufferben ($\text{pH} = 3,6$) mostuk, s ebből készítettünk szuszpenziót.

A kevert hús-mikroflórát (túlnyomórészt baktériumból tevődött össze) feldarabolt, sovány sertéshús természetes mikroflórájának szaporításával állítottuk elő. A húst 28°C hőmérsékleten 2 napig állni hagytuk, majd citrát-foszfát puffert ($\text{pH} = 7,0$) adtunk hozzá, s a mikroorganizmusokat lemostuk.

Az így kapott szuszpenziót lecentrifugáltuk, a biomasszát pufferrel háromszor kimostuk, s ezt használtuk fel a vizsgálatokhoz.

Az élesztővel végzett kísérleteknél a szuszpenziót citrát-foszfát pufferben ($\text{pH} = 3,6$) és 10% fruktózt, 0,1% élesztő-extraktot (Difco) és 0,1% peptont (Difco) tartalmazó tápoldatban (citrát-foszfát puffer) készítettük ($\text{pH} = 4,1$).

A kevert baktériumtenyészetből készített szuszpenzió aliquot részét $\text{pH} = 7,0$ -es citrát-foszfát pufferben, illetve friss, sovány, darált sertéshúsból ($\text{pH} = 6,2$) kevertük, illetve az eredeti mikroflórát vele dúsítottuk.

A szuszpenziókat 5 ml-enként a húspépet 1 g-onként üvegfóliába szétadagoltuk és besugároztuk. A csíraszám-meghatározásokhoz mindig felhasználtuk a minták teljes mennyiségét. A leoltásokhoz maláta- és univerzál-tápagart használtunk Koch-féle lemezöntéses technikával. A kifejlődött telepek számát 4 és 6 nap után olvastuk le.

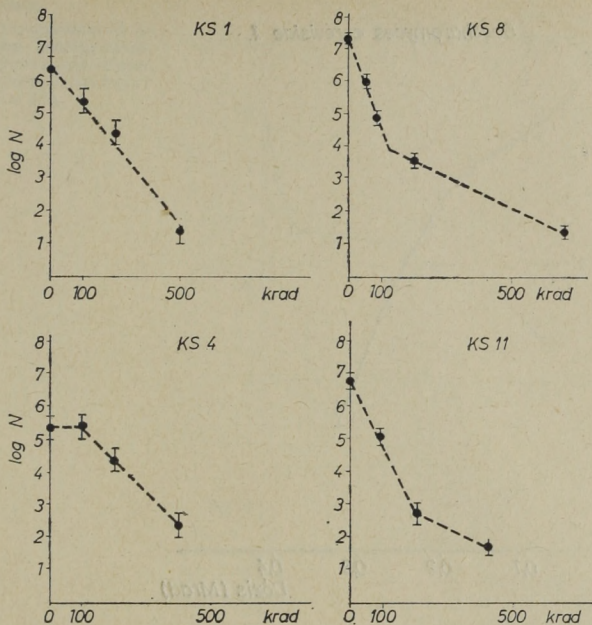
A túlélési görbék meghatározásánál ^{60}Co (Gamma-Cell-200) sugárforrást használtunk, a dózisteljesítmény $0,26$ Mrad/óra volt. A regenerálódási vizsgálatoknál ^{137}Cs (LMB- γ -1M) sugárforrást alkalmaztunk, dózisteljesítménye $0,285$ Mrad/óra volt. A dózisteljesítményt ferroszulfátos (Weiss et al, 3) módszerrel határoztuk meg.

Eredmények

Kísérleteink során 16 élesztő túlélési görbéjét határoztuk meg. Ezek közül az alábbi néhány jellegzeteset mutatjuk be (1. ábra).

A legtöbb élesztő túlélési görbéje két részre, egy meredekebb és egy laposabb szakaszra osztható. A túlélési görbék exponenciális szakaszából számított tizedrecsökkenési dózisok (D_{10}) a különböző élesztőtörzseknél $0,035$ és $0,115$ Mrad között voltak. Egyes törzsek túlélési görbéje nem követte az exponenciális törvényszerűséget, hanem ellaposodó jellegű volt. A túlélési görbéknek ez az ellaposodása érthetővé teszi, hogy a gyümölcslevek mikrobiológiai stabilizálásához nagyobb sugárdózisok szükségesek, mint a D_{10} érték alapján számítható értékek.

Kísérleteket végeztünk a nem-exponenciális túlélési görbe kezdeti szakaszának vizsgálatára is. Táptalajként itt már többkomponensű, felszintetikus tápoldatot használtunk. Ezeknél a vizsgálatoknál sugárdózisonként az élőcsíraszám-meghatározások párhuzamosainak száma 6 és 9 között változott, és a kísérleteket 4–5 ismétlésben végeztük el. Így egy-egy kezelési szint túlélési arányának a megállapítására átlagosan 30–40 adat állt rendelkezésre.



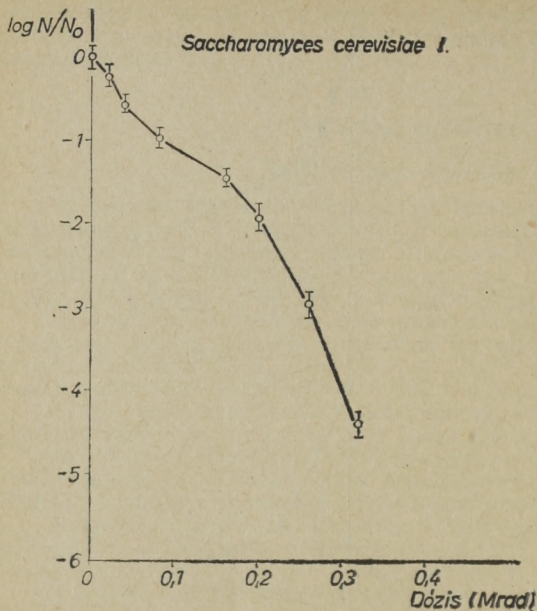
1. ábra

Almaléből izolált élesztők túlélési görbéje a besugárzási dózis függvényében (besugározva citrát-foszfát pufferben, pH = 3,6)

A túlélési görbéken jól látható, hogy viszonylag már kis dózisonál, 0,1 Mrad alatt, 90%-os sejtszám-csökkenés következik be, további változások viszont már lassabban mennek végbe, nagyobb dózisek szükségesek. A kis dózis-értékeknél tapasztalt kezdeti gyors csíraszám-csökkenés adatainak hiányában a kezdeti és a nagyobb dózisonál kapott csíraszám-adatok, összeköttetésével egy erősebben ívelt hosszabb vállrész adódik. A vállrész hossza extrapoláláskor elsősorban a kis csíraszám esetén jelent problémát. Itt dózis-igény-túlméretezés történhet. Vizsgálatainknál három esetben a túlélési görbék adataiból a regressziós egyenes egyenletét kiszámítottuk és ennek alapján meghatároztuk a D_{10} értékeket. Az I. és II. törzsnél 0,085, 0,090 Mrad, a KS5 törzsnél pedig 0,160 Mrad-nak adódott. A tényleges görbéből számított értékek természetesen ettől eltérnek. Az ellaposodó túlélési görbe, a „völgy”-rész ugyancsak problémát jelent. A túlélési görbék többségükben az exponenciális résszel befejeződnek. A 10^1 /ml-nél kisebb élősejtszámú szuszpenziók vizsgálata már membránszűrős eljárást kíván. Szükségesnek látszik megvizsgálni, hogy mi az a minimális maradék csíraszám, amely még romlást idéz elő az élelmiszerben.

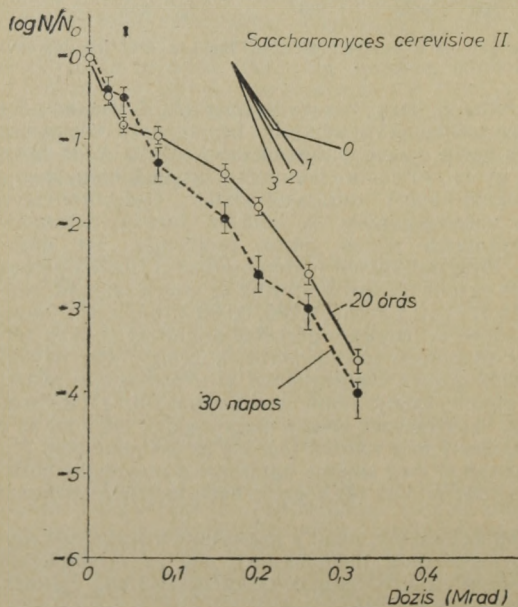
Ennek ismeretében biztosabban meg lehetne határozni a maximális dózis-igényt. Baktériumspórákkal Proszl és Vas (4) végeztet ilyen kísérletet hőkezelt zöldborsó-konzervvel.

Jelentős szerepe van mind az élesztők, mind a baktériumok sugárérzékenységében a *vízaktivitásnak* (ozmotoleráns, halotoleráns), míg az ozmotoleráns élesztő sugárérzékenysége a közeg vízaktivitásának csökkenésével alig változik, addig az ozmoszenzitív nagymértékben nő.



2. ábr

A *Saccharomyces cerevisiae* I. törzs túlélési görbéje a sugárdózis függvényében (besugárzva citrát-foszfát pufferben, pH = 3,6)

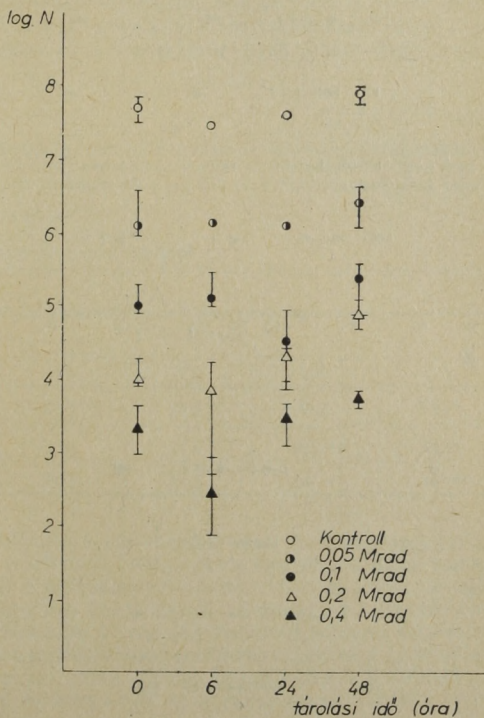
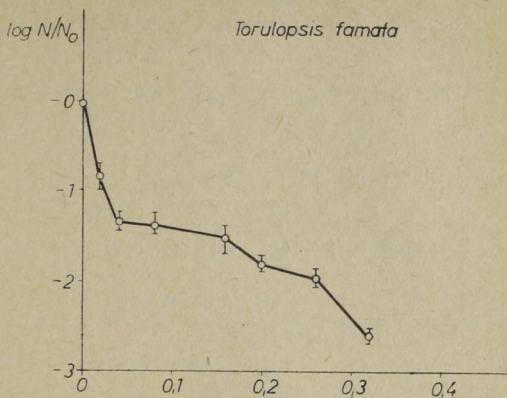


3. ábra

A *Saccharomyces cerevisiae* II. törzs túlélési görbéje a sugárdózis függvényében. A világos körök a 20 órás tenyészet besugárzás után közvetlenül meghatározott túlélését, a sötét körök a besugárzást követő 30. napon meghatározott csiraszámértékeket jelzik. A besugárzás citrát-foszfát pufferben (pH = 3,6) volt, a szuszpenziót + 4 °C hőmérsékleten tároltuk

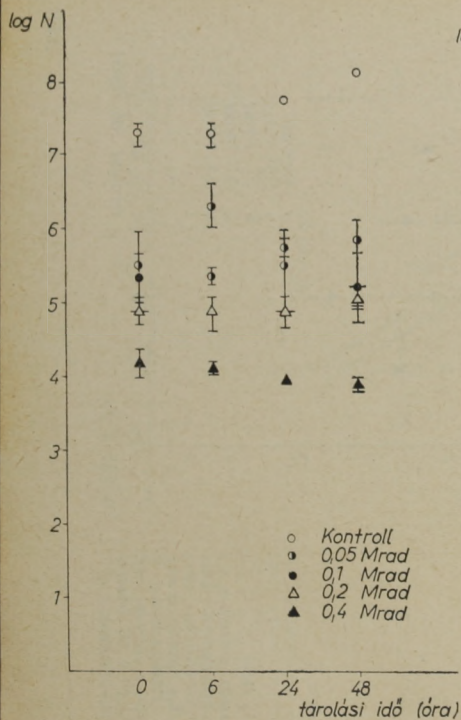
4. ábra

A *Torulopsis famata* törzs túlélési görbéje a sugárdózis függvényében (besugározva citrát-foszfát pufferben, pH=3,6)

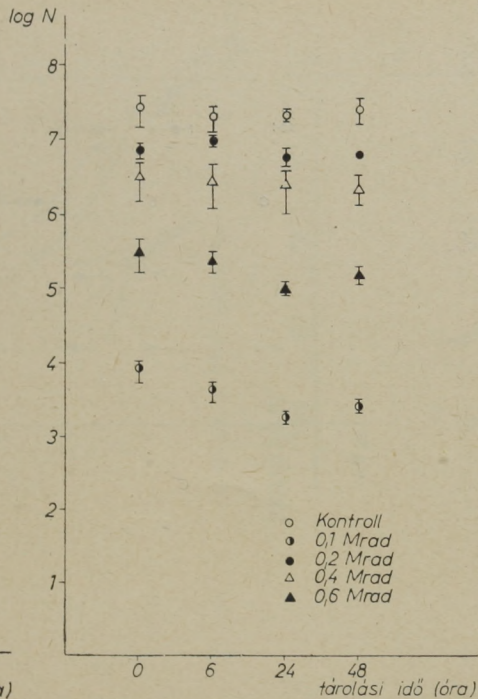


5. ábra

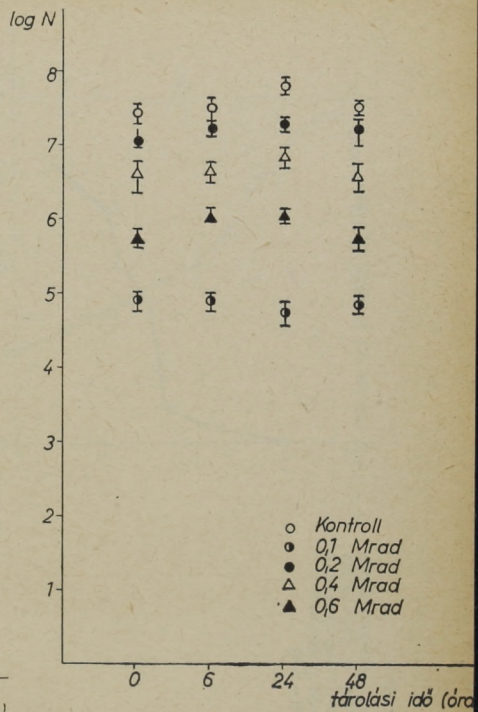
Citrát-foszfát pufferben (pH = 3,6) besugárzott *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T₂₂ élesztő szuszpenziójának élőcsiraszáma a sugárdózis és a tárolási idő függvényében (+4 °C hőmérsékleten tárolva)



6. ábra 10%-os fruktóz-tartalmú tápoldatban (pH = 4,2) besugárzott *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* T₂₂ élesztő szuszpenziójának élőcsíraszama a sugárdózis és a tárolási idő (+4 °C hőmérsékleten tárolva) függvényében



7. ábra Citrát-foszfát pufferben (pH = 7,0) besugárzott sertéshúsról izolált kevert mikroflóra szuszpenziójának élőcsíraszama a sugárdózis és a tárolási idő (+4 °C hőmérsékleten tárolva) függvényében



8. ábra Húspépben (pH = 6,2) besugárzott sertéshúsról izolált kevert mikroflóra túlélése a sugárdózis és a tárolási idő (+4 °C hőmérsékleten tárolva) függvényében

Tájékoztató vizsgálatok alapján a besugárzott közeg pH-ja is hatással van az élesztők sugárérzékenységére. *Bacillus cereus* spóráinál azt észleltük, hogy a sugárérzékenység pH = 5 alatt a semlegeshez viszonyítva növekedett (Farkas et al., 5).

Néhány élesztőnél megállapítottuk azt is, hogy pH = 3,6-os pufferban 4 °C hőmérsékleten tárolva sugárérzékenységük csökkent. Ezt már korábbi vizsgálatainknál is tapasztaltuk [Farkas et al. (6); Kiss és Clarke (2); 1969; Zehnder et al. (7)].

Megállapítottuk, hogy mind a besugárzás és a leoltás között eltelt idő, mind pedig az inkubálási idő befolyásolhatja az eredményt.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a besugárzás pufferben hatékonyabbnak bizonyul, mint 10%-os fruktózooldatban. Korábbi vizsgálatainkkal Kiss és Farkas, (8) megegyezően, ugyanazok a dózisos ugyanannak az élesztő-szuszpenzióknak egy aliquot részére a besugárzási közeg összetételétől függően másként hatnak. A kísérleteket két ismétlésben végeztük, azonos eredménnyel.

A besugárzás után közvetlenül leoltott szuszpenzió élőcsíraszámával, összehasonlítva a 6, 24 és 48 óra múlva leoltott szuszpenzió élőcsíraszámával, elsősorban csak a 0,4 és 0,6 Mrad dózissal kezeltnél ad szignifikáns különbséget. Ezeknél a dózisosknál az élőcsíraszám 24 és 48 óra után kisebbnek adódik pufferben tárolva, mint amikor 24 órán belül történik a leoltás. A fruktózooldatban történt besugárzás esetén ez a tendencia nem érvényesül ilyen határozottan. 24 órás állás után inkább növekedés észlelhető. Feltehetően a sérült sejtek regenerálódása a jelenlevő tápközeg következtében gyorsabban megy végbe és így az élőcsíraszám-meghatározás a besugárzás után közvetlenül kapott értékkel közel azonos lesz.

1. táblázat

A besugárzástól a csíraszám-meghatározásig eltelt idők hatásának összehasonlítása különböző dózisosknál a csíraszám-különbségek alapján a T-próba segítségével. A táblázatban levő számok a különbségek valószínűségi szintjét, az aláhúzottak a pozitív és a nemaláhúzottak a negatív eltérést jelzik.

Valószínűségi szint: P = 95 % szignifikáns*
 P = 99 % erősen szignifikáns**
 P = 99,9 % igen erősen szignifikáns***

(Citrát-foszfát pufferben (pH = 3,6) besugárzott és + 4 °C hőmérsékleten tárolt *Saccharomyces cerevisiae* T₂₂)

Összehasonlított tárolási időpontok/óra	Dózis (Mrad)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,6
0-6	73,6	<u>99,8**</u>	75,9	70,3	97,7*
0-24	77,4	65,9	55,9	99,5**	98,7*
0-48	23,0	81,4	78,3	97,7*	99,7**

A húsról izolált kevert mikroflóra esetében az élesztőnél tapasztaltakhoz hasonlóan azt észleltük, hogy pufferben besugározva ugyanaz a dózis hatásosabbnak bizonyul, mint húsban. A csíraszám növekedése húsban a nem besugárzott mintánál feltehetően a hidegtűrő baktériumok szaporodása következtében lép fel. A besugárzottaknál a csíraszám viszonylag konstans értéken való maradása a kezelés után talán a gyors regenerálódás eredménye, illetve a húsban levő védőhatás érvényesülése, ami a pufferban történt besugárzásnál lassabban jut érvényre. A besugárzást követő 24 órán belül itt is célszerűnek látszik a minta csíraszámának meghatározása.

A besugárzástól a csiraszám-meghatározásig eltelt idők hatásának összehasonlítása különböző dózisoknál a csiraszám-különbségek alapján a t-próba segítségével. A táblázatban levő számok a különbségek valószínűségi szintjét, az aláhúzottak a pozitív, a nem aláhúzottak a negatív eltérést jelzik.

Valószínűségi szint: P = 95% szignifikáns*

P = 99% erősen szignifikáns**

P = 99,9% igen erősen szignifikáns***

(10%-os fruktóz-oldatban (pH = 4,2) (pH = 3,6-es citrát-foszfát pufferben oldva) besugárzott és +4 °C hőmérsékleten tárolt *Saccharomyces cerevisiae* T₂₂)

Összehasonlított tárolási időpontok (óra)	Dózis (Mrad)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,6
0–6	<u>55,7</u>	<u>92,6</u>	<u>37,2</u>	<u>98,9*</u>	<u>15,9</u>
0–24	>99,9***	<u>97,4</u>	<u>98,1*</u>	>99,9***	<u>92,7</u>
0–48	<u>55,9</u>	<u>55,1</u>	15,9	<u>8,0</u>	50,0

3. táblázat

A besugárzástól a csiraszám-meghatározásig eltelt idők hatásának összehasonlítása különböző dózisoknál a csiraszám-különbségek alapján, a t-próba segítségével. A táblázatban levő számok a különbségek valószínűségi szintjét, az aláhúzottak a pozitív, a nem aláhúzottak a negatív eltérést jelzik.

Valószínűségi szint: P = 95% szignifikáns*

P = 99% erősen szignifikáns**

P = 99,9% igen erősen szignifikáns***

[Citrát-foszfát pufferben (pH = 7,0) besugárzott és +4 °C hőmérsékleten tárolt, kevert baktériumtenyészet]

	Dózis (Mrad)				
	0	0,05	0,1	0,2	0,4
0–6	91,5	0	<u>22,1</u>	28,9	81,5
0–24	65,0	0	62,5	<u>70,3</u>	<u>35,6</u>
0–48	<u>96,3*</u>	<u>58,1</u>	<u>70,3</u>	<u>97,2*</u>	<u>97,7*</u>

4. táblázat

A besugárzástól a csiraszám-meghatározásig eltelt idők hatásának összehasonlítása különböző dózisoknál a csiraszám-különbségek alapján, a t-próba segítségével. A táblázatban levő számok a különbségek valószínűségi szintjét, az aláhúzottak a pozitív, a nem aláhúzottak a negatív eltérést jelzik.

Valószínűségi szint: P = 95% szignifikáns*

P = 99% erősen szignifikáns**

P = 99,9% igen erősen szignifikáns***

(Húspépben (pH = 6,2) besugárzott és +4 °C hőmérsékleten tárolt kevert baktériumtenyészet]

	Dózis (Mrad)				
	0	0,05	0,1	0,2	0,4
0–6	0	<u>73,7</u>	0	<u>7,5</u>	35,5
0–24	<u>99,7**</u>	0	<u>89,6</u>	0	83,6
0–48	>99,9***	<u>47,6</u>	0	<u>53,0</u>	98,0*

Mazokhina-Porsnyakova és Ladukhina (9) (1967) *Clostridium botulinum* csíraszám-meghatározásánál a leoltást a besugárzást követő 24 óra után javasolja. Vizsgálataink szerint az élesztő- és a viszonylag sugárérzékeny baktérium-élőcsíraszámhoz a leoltást célszerű 24 órán belül elvégezni. Az inkubálási időt illetően pedig elmondható, hogy 0,4 Mrad-nál nagyobb dózissal kezelt élelmiszerek élőcsíraszám-meghatározásánál (lemezöntéses) a kolóniaképző sejtek száma 6–7 nap után nagyobb biztonsággal állapítható meg, mint rövidebb időn belül.

I R O D A L O M

- (1) *Howard-Flanders, P.*: J. Genetics, Suppl., 40, 256, 1964.
- (2) *Kiss I. és Clarke I. D.*: Élelmiszertudomány, 3, 3, 1969.
- (3) *Weiss, I., Allen, A. O. és Schwarz, H. A.*: Use of the Fricke ferrous sulfate dosimeter for gamma ray doses in the range 4–50 kr. Int. Conf. Peaceful Uses of Atomic Energy, Geneva, A/Conf. 8/p/155, 1955.
- (4) *Prosz, G. és Vas K.*: Konzerv- és Paprikaipar 2, 69, 1960.
- (5) *Farkas, J., Kiss, I. és Andrassy, É.*: The survival and recovery of irradiated bacterial spores as affected by population density and some external factors. 343. Radiosterilization of Medical Products. Proc. of a symposium, Budapest, 5–9 June 1967, IAEA, Vienna, 1967.
- (6) *Farkas, J., Vas K. és Kiss I.* 1963.: Az élelmiszeriparban szerepet játszó élesztők sugártűrési viszonyainak vizsgálata. Központi Élelmiszeripari Kutató Intézet Közleményei, (1–2) 7, 1963.
- (7) *Zehnder, J., Kiss I., Balkay, A. M. és Clarke, I. D.*: Microbiological aspects of the preservation of apple juice by a combined heat and radiation treatment. 1. Factors influencing the radiation and heat sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae*. SGAE BL–37/1969. SPR–27, 1969.
- (8) *Kiss J. és Farkas J.*: Élelmiszertudomány, 3, 93, 1969.
- (9) *Mazokhina-Porsnyakova, N. N. és Ladukhina, G. V.*: The effect of ionizing radiation on *Cl. Botulinum* spores. p. 27–35. Microbiological problems in food preservation by irradiation. Proc. of a Panel, Vienna, 27 June – 1 July 1966, FAO/IAEA, Vienna, 1967.

О ДАННЫХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛУЧЕЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

И. Кушиш

Автор установил, что пережитие микроорганизмов необходимо определить при относительно многих величинах доз, особенно при величинах доз ниже 0,1 Mrad и выше 0,5 Mrad. Прививства целесообразно поводить в течении 24 часов после облучения. Для точного определения числа мелких микроб применять способ мембранной фильтрации, необходимо тоже испытать самое меньшее число микроб способствующее порче в самых меньших и самых больших упакованных единицах пищевых продуктов.

При сообщениях результатов испытаний необходимо указать на балансовое относительное паросодержание субстрата или суспендирующей среды содержащих испытуемых микроорганизмов, указать также и активность воды и рН, возраст культуры и суспензии микроб. Количество данных обеспечивает осуществление статистической оценки.

ANGABEN ZUR BESTIMMUNG DER STRAHLENEMPFINDLICHKEIT DER MIKROORGANISMEN

I. Kiss

Es konnte festgestellt werden, dass das Überleben der Mikroorganismen bei verhältnismässig vielen Dosenwerten bestimmt werden muss, mit besonderer Rücksicht auf Dosen unter 0,1 Mrad und über 0,5 Mrad. Es ist zweckmässig die Impfungen binnen 24 Stunden nach der Einstrahlung vorzunehmen. Zur genauen Bestimmung der geringen Keimzahlen muss die Membranfiltermethode angewendet werden, man muss die geringste Keimzahl bestimmen, welche den Verderb der kleinsten und grössten verpackten Einheit der Lebensmittel verursacht. Unter den Prüfungsergebnissen muss der relative Gleichgewichts-Dampfgehalt, bzw. die Wasseraktivität, sowie das pH des den zu prüfenden Mikroorganismus enthaltenden Substrates oder suspendierenden Milieus, sowie das Alter der Kultur bzw. Mikrobensuspension angeführt werden. Die Anzahl der Angaben sichert die statistische Auswertbarkeit.

CONTRIBUTIONS TO THE DETERMINATION OF THE SENSITIVITY TO RADIATION OF MICROORGANISM

I. Kiss

Survival data of microorganism are to be determined at a relatively great number of radiation doses, with particular respect to doses below 0.1 Mrad and over 0.5 Mrad. It is advisable to carry out inoculations within 24 hours after irradiation. For the accurate determination of low germ counts, the membrane filter method must be applied, and the minimum germ counts causing deterioration in the smallest and the greatest unit packages of foods must be established. The data of investigation must comprise also the equilibrium relative humidity, water activity and pH value of the substrate of suspending medium containing the microorganism to be tested, and the age of the culture or microbe suspension. The number of test data must be sufficient to attain the limit of statistical evaluation.

CONTRIBUTIONS À LA DÉTERMINATION DE LA SUSCEPTIBILITÉ AUX RADIATIONS DES MICROORGANISMES

I. Kiss

La survivance des microorganismes doit être déterminée en employant de différentes doses de radiations, avec considération particulière des doses audehors de 0,1 Mrad et au-dessus de 0,5 Mrad. Il est recommandable d'effectuer les inoculations dans les 24 heures suivant l'irradiation. Afin de déterminer exactement des nombres de germes faibles, il faut employer le procédé aux filtres-membranes et il faut faire l'examen des nombres minimum qui causent encore de la détérioration dans les emballages maximales, respectivement minimales des denrées. Les résultats des examens doivent s'étendre à la teneur relative d'équilibre en vapeur ou bien à l'activité de l'eau et au pH du substrat ou du milieu de suspension qui contient le microorganisme en question. Il faut indiquer de même l'âge de la culture ou de la suspension de microbes. Le nombre des données doit être suffisant pour l'évaluation statistique.