

Zmodyfikowana metoda impedymetryczna w ocenie zanieczyszczeń mikrobiologicznych piwa niepasteryzowanego

Streszczenie. Zanieczyszczenie mikrobiologiczne piwa skutkuje pojawieniem się szeregu wad produktu. Celem niniejszej pracy było zastosowanie spektroskopii impedancyjnej w ocenie stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego w produkcji piwa niepasteryzowanego. Uzyskane wyniki wskazują, że pomiary impedancji mogą być szybką metodą oceny stopnia zanieczyszczenia.

Abstract. The microbiological beer contamination results in a number of product defects. The aim of this study was to use impedance spectroscopy for the microbial contamination degree assessment in the unpasteurized beer production. The results obtained indicate that impedance measurements can be used as a quick method for the contamination degree assessing. (**Modified impedimetric method in the unpasteurized beer microbiological contamination assessment**)

Słowa kluczowe: spektroskopia impedancyjna, obwód zastępczy, zanieczyszczenie mikrobiologiczne, piwo niepasteryzowane.

Keywords: impedance spectroscopy, equivalent circuit, microbiological contamination, unpasteurised beer.

Wstęp

Piwo to napój niskoalkoholowy otrzymywany w wyniku fermentacji alkoholowej brzoźki piwnej. Ze względu na skład i wysoką stabilność uznawane jest za napój bezpieczny i trwały. Czynniki hamujące rozwój mikroorganizmów w piwie są: wysokie stężenie dwutlenku węgla, obecność izo- α -kwasów z chmielu, obecność alkoholu etylowego, niskie pH, niski poziom tlenu, a także niski poziom węglowodanów i aminokwasów. Pomimo tego, zanieczyszczenia mikrobiologiczne są stałym występującym problemem w przemyśle browarniczym [1- 3].

Rozwój niepożądanych mikroorganizmów w piwie skutkuje pojawieniem się szeregu wad produktu. Są nimi: zmiana barwy piwa, lepkość, zmętnienie, wady smakowe i zapachowe, zmiany w wyglądzie, utrata stabilności koloidalnej. Dlatego szybkie wykrycie i identyfikacja drobnoustrojów jest ważnym elementem poprawy środowiska browaru i jakości piwa [4, 5].

Piwo rzemieślnicze jest dużo bardziej narażone na zanieczyszczenia mikrobiologiczne, ponieważ najczęściej nie jest pasteryzowane i/lub mikrofiltrowane, jak to ma miejsce w przypadku piw z dużych koncernów piwowarskich. Ponadto browary rzemieślnicze zazwyczaj nie są wyposażone w laboratoria mikrobiologiczne, w których można na bieżąco kontrolować proces produkcyjny. Dlatego piwa niepasteryzowane mają stosunkowo krótki termin ważności, a ich produkcja wiąże się z dużym ryzykiem niepowodzenia procesu technologicznego [6].

Metody detekcji i identyfikacji zanieczyszczeń piwa wywołanych przez drobnoustroje można podzielić na metody tradycyjne i szybkie. Metody tradycyjne, w tym posiewy na podłoża selekcyjne oraz badania mikroskopowe, są powszechnie wykorzystywane w pierwszym podejściu do wykrycia i identyfikacji mikroorganizmów. Są to jednak metody czasochłonne. Ponadto, nie istnieje uniwersalne podłoże mikrobiologiczne, które umożliwiłoby wykrycie wszystkich gatunków bakterii i grzybów, stanowiących zanieczyszczenia piwa [7, 8]. Szybkie metody detekcji to metody fizyczne, biochemiczne i molekularne, których przeprowadzenie wymaga znacznie mniej czasu, niż w przypadku metod tradycyjnych. Ponadto, charakteryzują się większą dokładnością identyfikacji mikroorganizmów oraz łatwością wykonania.

Jednym ze sposobów kontroli mikrobiologicznej produktów spożywczych, w tym piwa, jest metoda

impedymetryczna, wykorzystująca pomiary impedancji jako miary aktywności metabolicznej mikroorganizmów. Metoda ta znacznie skraca czas analiz oraz zmniejsza nakład pracy i materiałów, co jest niezwykle ważne w sytuacji, kiedy potrzebna jest szybka ocena jakości mikrobiologicznej produktu [9, 10].

Wszystkie materiały biologiczne wykazują właściwości dielektryczne. Jest to związane bezpośrednio z ich budową cząsteczkową oraz tym, że podczas wzrostu bakterie przekształcają nienaładowane lub słabo naładowane związki chemiczne (wielkocząsteczkowe związki, takie jak białka, węglowodany czy lipidy) w silnie naładowane (przede wszystkim małowcząsteczkowe aminokwasy i kwasy organiczne). Powoduje to zmianę właściwości elektrycznych środowiska hodowlanego. Następuje spadek wartości impedancji, czyli wzrost admittancji. Pomiary jednej z tych wartości lub obu, mogą być narzędziem do wykrywania obecności mikroorganizmów lub też ich aktywności metabolicznej w badanym środowisku. Na podstawie pomiaru czasu detekcji (czasu wykrycia), czyli czasu liczonego od rozpoczęcia badania do pojawienia się istotnej zmiany na wykresie impedancji, można oszacować liczbę drobnoustrojów w określonej objętości materiału [11- 12].

Metodą badawczą dedykowaną mikroorganizmom, wywodzącą się ze spektroskopii impedancyjnej, jest impedancja mikrobiologiczna. Urządzenia dedykowane impedancji mikrobiologicznej są najczęściej w pełni zautomatyzowane i dzielą się na dwa główne rodzaje: takie, gdzie bakterie wzrastają bezpośrednio w podłożu hodowlanym oraz takie, gdzie wykorzystuje się biosensory [13-14]. Sposób wykonywania pomiaru w przypadku, gdy bakterie wzrastają na podłożu dzieli się na bezpośredni i pośredni. W przypadku pomiaru bezpośredniego elektrody zanurzone są w płynnej pożywce, w której wzrastają zaszczerpione bakterie pobrane z badanego materiału. Wzrost mikroorganizmów powoduje zmianę składu pożywki, a w konsekwencji także jej zdolności do przewodzenia prądu. W przypadku metody pośredniej urządzenie pomiarowe składa się z dwóch zbiorników, połączonych w taki sposób, aby umożliwić wymianę gazową [15].

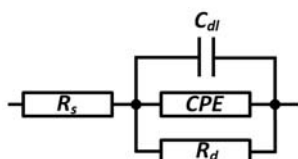
Badanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych piwa jest częstym tematem prac badawczych, jednak sprawdzenie go pod kątem właściwości elektrycznych, z wykorzystaniem analiz wartości impedancji jest podejściem niszowym.

Spektroskopia impedancyjna piwa

Spektroskopia impedancyjna polega na badaniach impedancji próbki w określonym zakresie częstotliwości. W podejściu potencjostatycznym, badana jest wartość prądu płynącego przez badaną materię (celkę pomiarową) na skutek przyłożonego napięcia sinusoidalnie zmiennego o bardzo małej amplitudzie (zazwyczaj do 20 mV). Niewielka wartość napięcia ma na celu wprowadzenie do układu zaburzeń, które nie są w stanie wywołać dodatkowych reakcji lub zjawisk w próbce. W podejściu galwanostatycznym natomiast badana jest wartość napięcia powstającego na skutek wymuszonego przepływu prądu sinusoidalnego przez układ. Pomiar impedancji powtarzane są dla każdej ze zdefiniowanych wartości częstotliwości, zazwyczaj rozpoczynając od wartości najwyższej, kończąc na najniższej [16, 17].

Zmierzone wartości impedancji mogą następnie posłużyć do wyznaczenia względnej przenikalności elektrycznej badanego materiału lub dopasowania parametrów elektrycznego obwodu zastępczego. Obwód taki modeluje zjawiska i reakcje zachodzące w próbce [18]. W przypadku badania impedancji mieszaniny o stosunkowo skomplikowanym składzie, jakiej przykładem jest piwo, analiza otrzymanych wyników jest utrudniona, lecz nie niemożliwa.

We wspomnianych badaniach mikrobiologicznych, gdzie wykonywane są pomiary impedancji próbki, szacuje się gęstość mikroorganizmów [12]. Mierzona próbka jest pożywką dla badanych drobnoustrojów, zatem jej skład jest z góry znany i stosunkowo nieskomplikowany. Stąd możliwe jest stosowanie elektrycznego obwodu zastępczego w postaci rezystora i kondensatora, połączonych szeregowo [13, 19]. Reprezentują one odpowiednio rezystancję roztworu oraz pojemność warstwy podwójnej. Próba dopasowania parametrów elementów takiego obwodu zmierzonymi wartościami impedancji mieszaniny, skutkuje nieakceptowalnie dużymi błędami. Stąd na potrzeby eksperymentu zmodyfikowano system pomiarowy impedancji mikrobiologicznej, gdzie piwo stanowi ośrodek odpowiadający płynnej pożywce. Niezbędne zatem było użycie innego elektrycznego obwodu zastępczego. Autorzy proponują nowatorski (jak na badanie właściwości piwa) obwód, składający się z rezystora R_s , pojemności warstwy podwójnej C_{dl} , elementu stałofazowego CPE (ang. *constant phase element*) i rezystora R_d (Rys. 1). Modelują one kolejno: rezystancję roztworu próbki, pojemność warstwy podwójnej oraz dyfuzję (CPE wraz z R_d).



Rys.1. Schemat elektrycznego obwodu zastępczego wykorzystanego w badaniach

Impedancja elementu CPE jest określona zależnością:

$$(1) \quad \underline{Z}_{CPE}(\omega) = \frac{1}{Q(j\omega)^n}$$

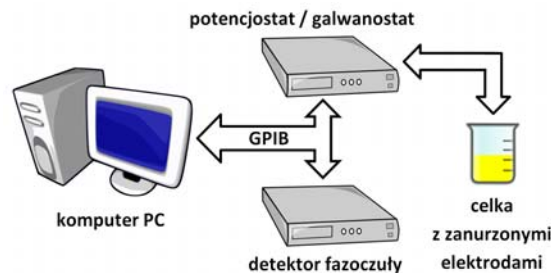
zatem impedancja całego proponowanego obwodu zastępczego jest wyrażona wzorem:

$$(2) \quad \underline{Z}(\omega) = R_s + \frac{R_d}{1 + j\omega C_{dl} R_d + Q(j\omega)^n R_d}$$

w którym Q jest wartością admittancji $1/|Z|$ elementu CPE przy $\omega = 1$ rad/s, a n jest ułamkiem zawierającym się w przedziale $0 \leq n \leq 1$. Przy $n = 1$ element CPE jest tożsamy z idealnym kondensatorem.

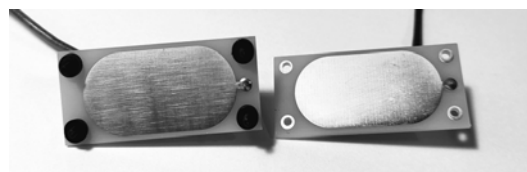
System pomiarowy

Do badań użyto skomputeryzowanego systemu do elektrochemicznej spektroskopii impedancyjnej firmy EG&G/Princeton Applied Research, składającego się z potencjostatu/galwanostatu 263A, detektora fazoczułego typu lock-in amplifier 5210 oraz oprogramowania PowerSINE. Schemat systemu zaprezentowano na rys. 2.



Rys.2. Schemat systemu pomiarowego

Impedancję próbek mierzono dwuprzewodowo przy napięciu 20 mV RMS, bez polaryzacji DC i 25 nastawach częstotliwości w przedziale 0,1–1 kHz, przy czym pomiary rozpoczynały się od najwyższej częstotliwości. Jedną tak ustawioną sekwencją pomiarową trwała około 16 minut, z uwagi na zastosowane uśrednianie trzech pomiarów dla każdej częstotliwości pomiarowej. Testy przeprowadzone w dużo szerszym zakresie częstotliwości nie wykazały potrzeby wykonywania pomiarów dla niższych wartości. Para jednakowych elektrod (rys. 3) o powierzchni 5,6 cm² każda, wykonana była z laminatu pokrytego warstwą miedzi oraz złota, w technologii znanej z produkcji obwodów drukowanych. Materiał ten był wystarczająco stabilny elektrochemicznie, uwzględniając wstępny charakter badań.



Rys.3. Elektrody wykorzystane w eksperymencie

Czas prowadzonych badań był wystarczająco krótki, by nie dopuścić do zakłamania pomiarów poprzez wprowadzenie do badanej substancji związków miedzi. Odstęp pomiędzy elektrodami wynosił 2 mm. W trakcie pomiarów elektrody zanurzone były w badanych próbkach, zawsze na jednakowej wysokości, w takiej samej objętości badanego materiału. Temperatura była stale monitorowana i stabilizowana.

Zmierzone wartości impedancji próbek zostały użyte do dopasowania parametrów elementów elektrycznego obwodu zastępczego za pomocą programu pyZwX [20].

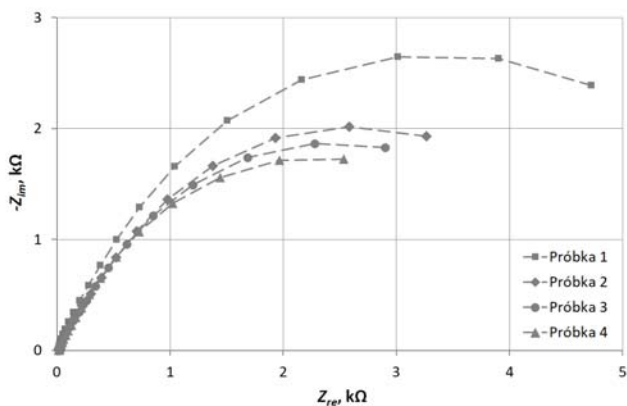
Materiał do badań

Materiał do badań stanowiły próbki piwa pszenicznego, niepasteryzowanego, niefiltrowanego typu Weizen, warzonego i poddanego leżakowaniu według receptury producenta (lokalnego browaru rzemieślniczego) oraz butelkowanego według ustalonego przez producenta schematu. Badano piwo pochodzące z jednej partii, z 4 różnych butelek, które było przechowywane w temperaturze

pokojujowej do czasu otwarcia i poddania analizom w odstępach kilkutygodniowych. Pomiarów dokonywano w dniu otwarcia butelki. Na czas badań piwo przelewane było do sterylnych kolb. Próbkę cechowały się znaczącą niejednorodnością, z czego wynikała konieczność ich mieszania w trakcie pomiarów. Użyto w tym celu mieszadła magnetycznego.

Wyniki pomiarów i dyskusja

Zmierzone wartości impedancji czterech próbek zostały ukazane na rys. 4. Próbka 2 była piwem otwartym tydzień później niż próbka 1, próbka 3 po trzech tygodniach, zaś próbka 4 dotyczy butelki otwartej sześć tygodni po pierwszej.



Rys.4. Zmierzone wartości impedancji badanych próbek

Parametry obwodu zastępczego zostały przedstawione w tabeli 1, wraz z odpowiadającymi błędami dopasowania modelu.

Tabela 1. Parametry obwodu zastępczego oraz błęd dopasowania

Parametry	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4
R_s, Ω	16,82	17,65	16,88	16,66
$R_d, k\Omega$	8,698	7,462	6,715	5,918
$Q, \mu S \cdot s^n$	126,6	218,7	259,3	297,7
n	0,665	0,648	0,681	0,715
$C_{dl}, \mu F$	29,44	33,12	27,12	18,51
Błąd χ^2	0,0010	0,0009	0,0007	0,0005

Z biegiem czasu w piwie, nawet pozostającym w zamkniętej butelce, dochodziło do namnażania się drobnoustrojów, również tych stanowiących jego mikrobiologiczne zanieczyszczenie, co zostało potwierdzone w posiewach mikrobiologicznych na podłożach hodowlanych. Widoczne na wykresie zmniejszające się średnice półokręgów mają związek z rosnącą konduktancją, czyli malejącymi wartościami rezystancji R_d w obwodzie zastępczym. Wynika to ze wzrostu liczebności mikroorganizmów oraz ich produktów przemiany materii, które znacząco zwiększają przewodność elektryczną roztworu. Zmniejszające się natomiast wartości rezystancji R_d wiążą się przeważnie ze wzrostem poziomu Q elementu CPE , co jest jednak trudniejsze do odczytania wprost z wykresu. Występowanie obu zjawisk jednocześnie potwierdzają wartości przedstawione w tabeli 1.

Wyznaczone przez program pyZwx błędy dopasowania poszczególnych elementów obwodu nie przekraczały 6%, co jest w pełni akceptowalną wartością. Widoczne na rys. 4 wartości impedancji przyjmują kształty przypominające półokręgi, których centra są obniżone względem osi części rzeczywistej impedancji (Z_{re}). Oznacza to, że próba dopasowania modelu za pomocą idealnego kondensatora, przy wykluczeniu elementu CPE , skutkowałaby nieakceptowalnie dużą wartością błęd modelowania.

Z tabeli 1 wynika, że wartości rezystancji roztworu R_s , zgodnie z oczekiwaniem, nie ulegają większej zmianie i oscylują w okolicach $16,8 \Omega$. Podobną stałością cechuje się parametr n elementu CPE , przyjmując wartości od 0,6 do 0,7. Wartość pojemności warstwy podwójnej C_{dl} początkowo wzrosła z 29 do $33 \mu F$, a następnie zaczęła maleć do wartości $18 \mu F$, co może się wiązać z obumarciem części drobnoustrojów. Najbardziej znaczące różnice, potwierdzające zmiany właściwości elektrycznych badanego materiału, widoczne są dla rezystora R_d oraz parametru Q elementu CPE . Wartości rezystora R_d malały znacząco od 8,6 (Próbka 1) do $5,9 k\Omega$ (Próbka 4). Natomiast wartości Q rosły od 126 (Próbka 1) do $298 \mu S \cdot s^n$ (Próbka 4). Tak zauważalne różnice mogą wynikać ze znacząco zmienionej względnej przenikalności elektrycznej próbek.

Na wynik pomiaru wpływ mają czynniki zewnętrzne i wewnętrzne, tj. temperatura badanej substancji, jej skład czy konsystencja. Piwo wykorzystane do badania było niefiltrowane i niepasteryzowane, zatem od początku charakteryzowało się niejednorodną strukturą. Uwiarygodnienie wyników wymagało zatem utrzymywania stałych parametrów. Mieszanie piwa w czasie badania powoduje unoszenie się materii z dna kolby i zmianę wartości mierzonej impedancji. Mieszanie próbki przez dłuższy czas sprawia, że wynik każdego kolejnego pomiaru jest bardzo zbliżony do poprzedniego. Przypadkowość zbadanego zjawiska wykluczają takie same zmiany obserwowane w kolejnych pomiarach. Do mieszania piwa zostało użyte mieszadło elektromagnetyczne. Jego zaletą był niewielki rozmiar oraz materiał niezakłócający pomiar. Jednak długotrwałe mieszanie powoduje wzrost temperatury układu, a to zaś przekłada się na wyniki samych pomiarów impedancji. Dlatego bardzo ważne w trakcie prowadzenia tego typu analiz jest utrzymywanie stałej temperatury układu.

Szereg prowadzonych równolegle przez autorów badań właściwości różnych rodzajów piw niepasteryzowanych potwierdza nieprzypadkowość opisanych w pracy wyników (dane niepublikowane). Przedstawiane spostrzeżenia nie wynikają zatem jedynie z prezentowanych wyników pomiarów jednego rodzaju piwa.

W literaturze dostępne są nieliczne dane dotyczące analiz żywności z wykorzystaniem mikrobiologii impedancyjnej, prezentują jednak odmienną metodykę i wykorzystanie aparatury komercyjnej. W badaniach Vasavada [21] czy Czajkowskiej i Witkowskiej-Gwiazdy [22] wykorzystywany był system monitorujący Bactometer firmy BioMerieux (Francja). Gotowy zestaw celek pomiarowych umożliwił dokonywanie szeregu pomiarów i potwierdzenie, że metoda impedymetryczna może z powodzeniem zastąpić konwencjonalne metody mikrobiologiczne w ocenie stopnia zanieczyszczenia żywności. Kowalik i in. [11] oraz Pompei i in. [19] w swych badaniach skupiali się na analizach z wykorzystaniem jednej częstotliwości, w założeniu charakterystycznej dla określonego drobnoustroju stanowiącego zanieczyszczenie. Tak wykonywane pomiary, analizowane w czasie, dawały informację o czasie detekcji, czyli momencie, w którym bakterie zaczynały gwałtownie wzrastać w pożywce. Metoda impedymetryczna może być także wykorzystana do określenia liczby drobnoustrojów w badanym materiale [23]. Liczba ta jest skorelowana z czasem detekcji drobnoustrojów, a sam pomiar jest porównywalny z klasycznymi metodami wykorzystującymi liczenie drobnoustrojów na podłożach mikrobiologicznych.

W prezentowanych w niniejszej pracy badaniach metoda impedymetryczna została zmodyfikowana tak, że elektrody umieszczone były bezpośrednio w badanym materiale. Dzięki takiemu podejściu możliwa była

obserwacja wszystkich zjawisk zachodzących w czasie pomiaru. Nie byłoby to możliwe gdyby zastosowano inny system pomiarowy. Samych pomiarów dokonano natomiast w dość szerokim spektrum częstotliwości (0,1 – 1000 Hz). Dało to również możliwość oceny zachowania się piwa w czasie analiz i może stanowić podstawę do modyfikacji eksperymentu w przyszłości.

Posiewy mikrobiologiczne badanego materiału, prowadzone równolegle z pomiarami impedancji, świadczą o tym, że obserwowane zmiany mierzonych wartości są wynikiem rozwoju drobnoustrojów w piwie i przemian wynikających z ich metabolizmu. Uproszczona aparatura mierząca wartość impedancji mogłaby zostać wdrożona jako urządzenie kontrolne, na przykład w browarnictwie, ze względu na stosunkowo prostą konstrukcję i łatwość w obsłudze, w stosunku do czasochłonnych i pracochłonnych metod tradycyjnych, wykorzystujących podstawowe techniki mikrobiologiczne. Przemawia za tym zwłaszcza całkowity czas pomiaru, który w przypadku badania impedancji może się ograniczyć do kilku minut, w przeciwieństwie do trwających minimum dobę badań mikrobiologicznych. Metoda impedymetryczna mogłaby zatem pełnić funkcję wstępnej, szybkiej oceny jakości piwa, które w przypadku wykrycia odstępstw od wcześniej zdefiniowanych norm, powinno być dokładniej przeanalizowane, na przykład z wykorzystaniem tradycyjnych technik laboratoryjnych. Dalsze badania nad doбором optymalnego zakresu częstotliwości pomiarowych lub nawet ograniczeniem pomiaru impedancji do tylko jednej częstotliwości, pozwoliłyby na znaczące uproszczenie budowy docelowego systemu pomiarowego.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania miały charakter wstępny i służyły określeniu możliwości użycia metody spektroskopii impedancyjnej do szacowania stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego piwa niepasteryzowanego. Uzyskane wyniki pomiarów znacząco różnią się dla próbek o różnym stopniu zanieczyszczenia. Największe różnice odnotowano dla wartości parametru Q elementu CPE oraz rezystancji R_d w obwodzie zastępczym, co było spodziewanym zjawiskiem i potwierdza celowość użycia proponowanej w pracy metody.

Dalsze planowane badania dotyczą jednoczesnego pomiaru impedancji piwa na różnych głębokościach tanku fermentacyjnego w czasie produkcji piwa. Zdaniem autorów mogłoby to zniwelować wpływ niejednorodności mieszaniny na badania, a co za tym idzie wyeliminować konieczność mieszania w trakcie pomiarów.

Autorzy: mgr inż. Łukasz Macioszek, Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Metrologii, Elektroniki i Informatyki, ul. prof. Z. Szafrana 2, 65-516 Zielona Góra, E-mail: l.macioszek@imei.uz.zgora.pl; dr Sylwia Andrzejczak-Grządka, Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Nauk Biologicznych, ul. prof. Z. Szafrana 1, 65-516 Zielona Góra, E-mail: s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl; lic. Joanna Urbaniak, Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Nauk Biologicznych, E-mail: jo.urbaniak99@gmail.com; lic. Katarzyna Dembińska, Uniwersytet Zielonogórski, Instytut Nauk Biologicznych, E-mail: katarzynadembinska6@gmail.com

LITERATURA

- [1] Satora P., Tuszyński T., Zakażenia mikrobiologiczne piwa. *Laboratorium - przegląd ogólnopolski*, 4 (2004), 13-18
- [2] Esmaeili S., Mogharrabi M., Safi F., Sohrabvandi S., Mortazavian A., Bagheripoor-Fallah N. The common spoilage microorganisms of beer: occurrence, defects and determination - a review, *Carpathian Journal of Food Science and Technology* 7 (2015), 68-73
- [3] Paradh A. D., Gram-negative spoilage bacteria in brewing: 175-194. W: *Brewing Microbiology. Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste*, Hill A. E. (2015), Elsevier
- [4] Manzano M., Lacumin L., Vendrame M., Cecchini F., Comi G., Buiatti S., Craft Beer Microflora Identification Before and After a Cleaning Process, *Journal of the Institute of Brewing*, 117 (2011), 343-351
- [5] Hill A. E., Microbiological stability of beer. W: *Beer. A Quality Perspective*, Bamforth C. W. (2009), Elsevier
- [6] Rodríguez-Saavedra M., González de Llano D., Victoria Moreno-Arribas M., Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: microbiological quality and food safety, *Food Research International*, 2020
- [7] Bokulich N. A., Bamforth C. W., The Microbiology of Malting and Brewing, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77 (2013), 157-172
- [8] Gwiazdowska D., Wykrywanie drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności za pomocą klasycznych i szybkich metod mikrobiologicznych. *Zeszyty Naukowe*, 183, (2011), 137-153
- [9] Łobacz A., Kowalik J., Ziajka S., Wykorzystanie zjawiska impedancji w mikrobiologii i higienie żywności, *Medycyna Weterynaryjna*, 64 (2008), 966-968
- [10] Chai C., Oh A.W., Electrochemical impedimetric biosensors for food safety, *Food Science and Biotechnology*, 29 (2020), 879-887
- [11] Kowalik J., Tarczyńska S., Ziajka S. Próba zastosowania impedymetrii do szacowania wzrostu drobnoustrojów, *Żywność Nauka Technologia Jakość*, 11 (2004), 145-152
- [12] Grossi M., Riccò B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review. *Journal of Sensors and Sensor Systems, Copernicus Publ.*, 6 (2017), 303 - 325
- [13] Brunauer GC, Meindl A, Rotter B, Gruber A, Slouka C. A., A case report: Electrochemical impedance spectroscopy as an Alternative for cell counting chambers of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for brewery applications, *Arch Food Nutr Sci.*, 5 (2021), 27-31
- [14] Hassan, Q., Ahmadi, S., Kerman, K., Recent Advances in Monitoring Cell Behavior Using Cell-Based Impedance Spectroscopy. *Micromachines*, 11(2020), 590
- [15] Nyhan L., Johnson N., Begley M., O'Leary P., Callanan M., Comparison of predicted and impedance determined growth of *Listeria innocua* in complex food matrices, *Food Microbiology*, 87 (2020), 103381
- [16] Barsoukov E., Macdonald J. R.: *Impedance Spectroscopy. Theory, Experiment, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2005.
- [17] Macioszek Ł., Włodarczak S., Rybski R., Mineral Oil Moisture Measurement with the Use of Impedance Spectroscopy, *IET Science, Measurement & Technology*, 13 (2019), 1158-1162
- [18] Macioszek Ł., Matuszak M., Wagner P., Włodarczak S., Zastosowanie metody spektroskopii impedancyjnej do szacowania bardzo małych zawartości wody w oleju mineralnym typu 20-70, *Przegląd Elektrotechniczny*, 12 (2018), 60-63
- [19] Pompei A., Grossi M., Lanzoni M., Perretti G., Lazzarini R., Riccò B., Matteuzzi D., Feasibility of Lactobacilli Concentration Detection in Beer by Automated Impedance Technique, *MBAA TQ*, 49 (2012), 11-18
- [20] Kobayashi K., Suzuki T. S., Free analysis and visualization programs for electrochemical impedance spectroscopy coded in Python, *Electrochem.*, 89 (2021), 218-222
- [21] Vasavada, P. C. Rapid Methods and Automation in Dairy Microbiology. *Journal Dairy Science*, 76 (1992), 3101-3113.
- [22] Czajkowska D., Witkowska-Gwiazda A., Metoda impedymetryczna w wykrywaniu drożdży i bakterii fermentacji mlekowej w sokach z owoców cytrusowych, *Przemysł Spożywczy*, 52 (1998), 12-16
- [23] Walker K., Ripandelli N., Flint S., Rapid enumeration of *Bifidobacterium lactis* in milk powders using impedance, *International Dairy Journal*, 15 (2005), 183-188