



Szőlészeti és Borászati Intézet

Élelmiszer és borászati mikrobiológia

- Segédlet a laboratóriumi gyakorlatokhoz –



Eger

2024.

Tartalomjegyzék

1. Általános alapismeretek	3
2. Mikrobák izolálási módszerei, mikrobák mikroszkópos vizsgálata különböző fermentált élelmiszerekből.....	8
3. Élelmiszerhigiéniai mikrobiológiai vizsgálatok (DipContact-slide).....	9
4. Ecetsav- és tejsavbaktérium tenyészetek vizsgálata	11
5. Mezofil aerob élőcsíraszám meghatározási módszerek	13
6. Különféle élesztőtörzsek tenyésztése és mikroszkópos vizsgálata, fenológiai megjelenése	16
7. Különböző penészgomba törzsek tenyésztése és mikroszkópos vizsgálata.....	19
8. Tejsav- és ecetsavbaktériumok tenyésztése, mikroszkópos vizsgálata	21
9. Almasavbontó kultúra felszaporítása és Thoma-cell eljárással sejtszám szaporulat nyomonkövetése	23
Ismeretellenőrző kérdéssor	26

1. Általános alapismeretek

Mikroorganizmusok: nincs szöveti differenciálódás, szabad szemmel nem látható élőlények; baktériumok, gombák (élesztő- és penészgombák), algák, protozoonok (egysejtű véglények) és vírusok.

Prokarióták és eukarióták

1. táblázat: A pro- és eukarióták összehasonlítása (Forrás: Réczey-Sipos, 2008)

	Valódi baktériumok	Eukarióta sejtek
méret	~1 μm → nagy fajlagos felület	~10 μm → kisebb fajlagos felület
sejtmembrán	foszfolipidek, proteinek	foszfolipidek, proteinek, szterinek
belső membránok	általában nincsenek	kiterjedt struktúrák (ER), membrán határolt organellek (sejtmag, mitokondrium)
genom	osztatlan: 1 cirkuláris DNS a nukleoid régióban, hisztonok nincsenek	osztott genom: lineáris kromoszómák a sejtmagban, hisztonok vannak
egyéb örökítő anyag	plazmidok	mitokondrium és kloroplasztisz DNS-e, primitívebb eukariótáknál plazmidok is
légzési enzimek	sejtmembránban	mitokondriumban
citoszkeleton	nincs (!)	van: mikrotubulusok, mikrofilamentumok
riboszóma	70 S, szabad	80 S, szabad vagy kötött (DER)
sejtfal	murein	ha van, akkor kitin (gombák), cellulóz (növények, algák), illetve egyéb
mozgásszerv	ha van, ostor = csilló (flagellum)	ha van, ostor (flagellum) ≠ csilló (cilium)
pílus	van	nincs
sejtosztódás	hasadás	hasadás vagy sarjadzás (mitózisos ciklus)
szaporodás	csak ivartalanul	ivartalanul vagy ivaroson (meiózis)

Prokarióta sejtek:

- kis méret (0,5 – 4 μm) → nagy fajlagos felület → gyors tápanyagtranszport
→ rövid generációs idő (~1 h) ↔ egyszerű struktúra
- Alakja (egysejtűek): coccus (gömb), coccobacillus (ovális), bacillus (pálca), vibrio (vessző), spirillum (merev csavart), spirochaeta (flexibilis csavart). Egyes baktériumok alakja a változó külső körülmények hatására meg is változhat (pleomorfizmus).
- Sejtszerkezet: felszín (sejtfal, sejtmembrán); belső szerkezet (citoplazma, nukleoid,

riboszóma, zárvány, plazmid, endospóra); külső szerkezet (tok, pílus, ostor).

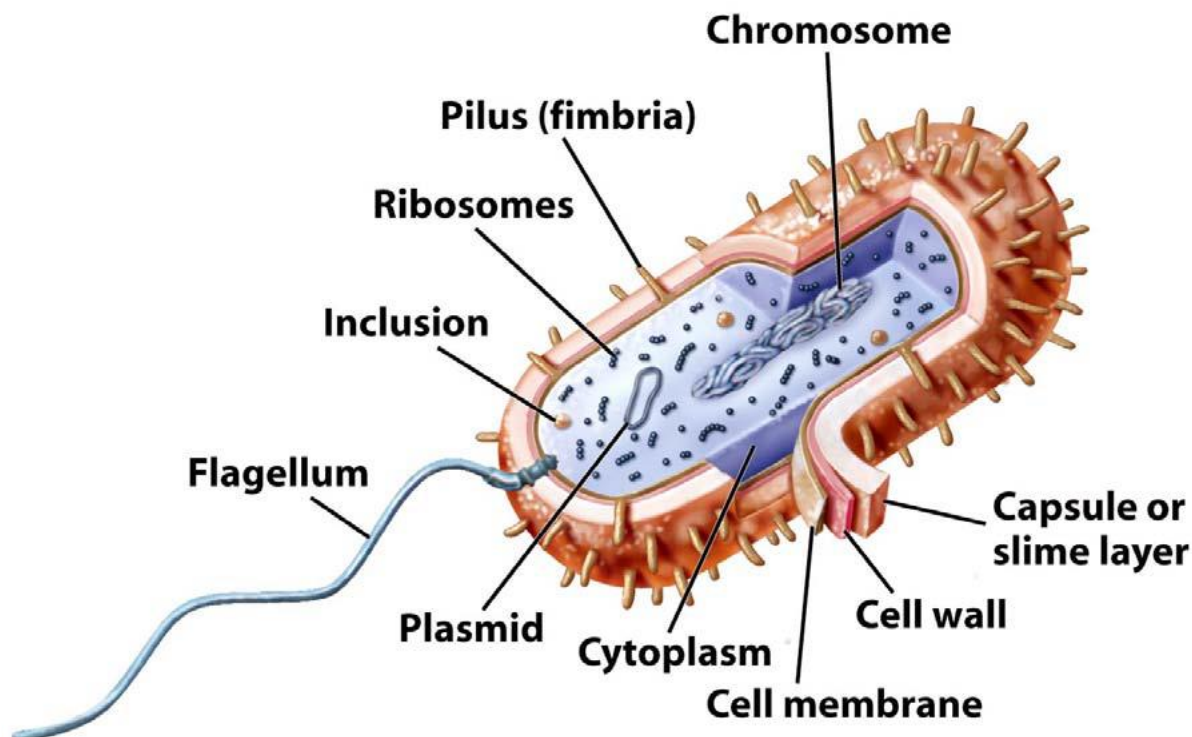


Figure 4-3 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

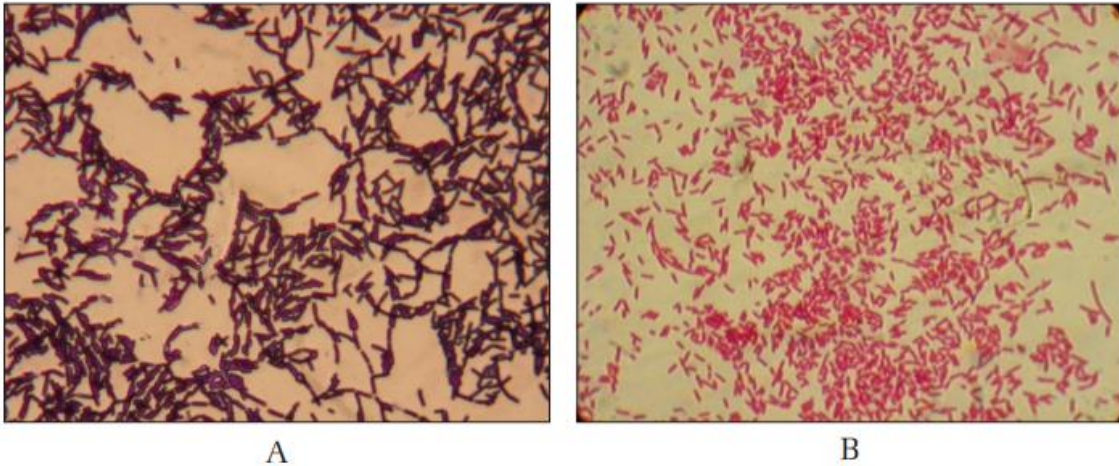
1. ábra: A prokarióta sejt felépítése (Forrás: Black, 2005)

- a sejtfal a sejtmembránon kívül található; nagyon ellenálló, murein a fő alkotórésze: N-acetil-glükózaminból (NAG) és N-acetilmuraminsavból (NAM) álló lineáris heteropoliszacharid β -1,4 kötéssel; a NAM-okhoz tetrapeptid kapcsolódik (benne D-aminosavak is), köztük keresztkötések a diaminosavon keresztül $\rightarrow$ 2D hálózat, de egymásra több réteg épülhet. A rétegeket teichonsav tartja össze: glicerinnél, ribitnből és foszforsavból álló polimer.

Gram-pozitív és -negatív sejtfal összehasonlítása

Gram-festés: kristályibolyával lilára festjük a rögzített sejteket, majd I2-oldatot cseppentünk rá, ami erősíti a kristályibolya kötődését a mureinhez (Gram-pozitív és -negatív baktérium egyaránt adja). Alkoholos mosás következik, ami differenciál: a Gram-negatív baktérium elszíntelenedik, -pozitív lila marad (a mureinréteg vastagsága számít!). Végül szafarinnal kontrasztfestést végzünk, ami az elszíntelenedett Gram-negatív baktériumot pirosra festi (míg a -pozitív továbbra is lila marad). Friss tenyésztettel célszerű a festést megcsinálni! Bizonyos baktériumokat a kristályibolya nem festi meg, ezek az ún. „saválló” baktériumok (viaszos sejtfaluk fuchsinnal festhető, amit utána savas-alkoholos kezelésre sem ad le a sejtfal). A murein lizozimmal oldató (a könny ettől baktericid hatású!) $\rightarrow$ a Gram-pozitív baktérium sejtfal nélküli protoplasztta válik (gömb alakú és nagyon érzékeny), a Gram-

negatívból pedig ún. szferoplaszt lesz (nem az egész sejtfalát veszíti el, alakja megmarad és kevésbé érzékeny).



2. ábra: Sejtfal festést követően: A- Gram+ (pl. *Bacillus cereus*); B – Gram- (pl. *Escherichia coli*) (Forrás: György, 2020)

Eukarióta sejtek:

- Az eukarióta sejtek nagyobb mérete bonyolultabb struktúrát tesz lehetővé (pl. belső membránnal határolt orgánellumok), illetve differenciáltabb működést $\leftrightarrow$ a nagyobb méret miatt viszont lassabb a szaporodás.
- Nincs feltétlenül sejtfaluk, mert van citoszkeletonjuk, továbbá a sejtmembránt szteránvázas vegyületek (állatok, protozoonok: koleszterin; növények, algák: fitoszterin; gombák: ergoszterin) merevítik.
- A plazmamembránban kevesebb anyagcsere-folyamat játszódik le, mint a prokariótákéban $\rightarrow$ kevesebb enzim $\leftrightarrow$ bonyolultabb szignalizáció $\rightarrow$ több receptor fehérje.

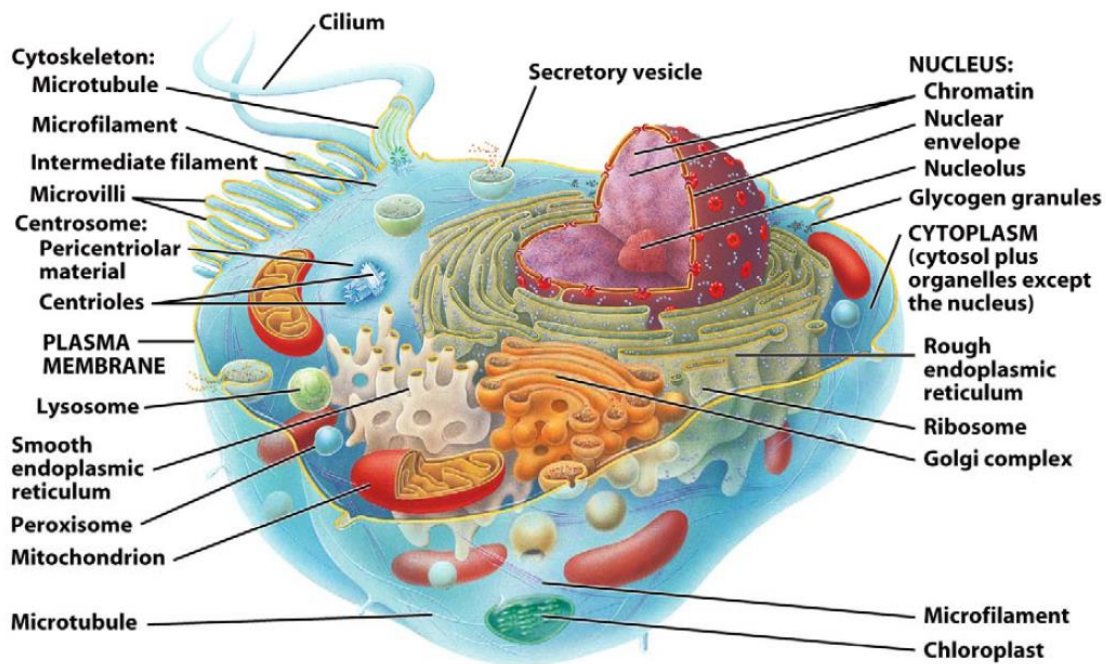


Figure 4-18 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

3. ábra: Az eukarióta sejt szerkezete (Forrás: Black, 2005)

Metabolizmus = katabolizmus + anabolizmus

- A metabolizmus (anyagcsere) a sejtben lejátszódó biokémiai folyamatok összessége. Az anabolizmus a felépítő folyamatok, a katabolizmus pedig a lebontó folyamatok összefoglaló neve.

- Katabolizmus: polimerek hidrolízise monomerekké, illetve utóbbiak oxidációja (ATP termelés) ↔ anabolizmus: monomerek szintézise, illetve azok kondenzációja polimerekké (ATP felhasználás, esetleg redukció).

- A biokémiai utak enzimmatalizált elemi lépésekből állnak; minden enzim átalakítja a szubsztrátját a megfelelő terméké, ami egyben a következő enzim szubsztrátja lesz.

Intermedierek: a biokémiai út köztes termékei (egyben köztes szubsztrátjai).

- Az élőlények anyagcseréjét a szén- és energiaforrás iránti igényük szerint lehet csoportosítani.

szénforrás igény: heterotróf (= organotróf): kész szerves anyagot kell felvennie ↔ autotróf (= litotróf): szervetlen anyagból (légköri CO₂) szerves anyag előállítására képes

energiaforrás igény: kemotróf: kémiai energia átalakításával állít elő ATP-t ↔ fototróf: fényenergia átalakításával állít elő ATP-t

- C- és E-igény alapján négyféle anyagcseretípust különböztetünk meg: fotoautotróf, kemoautotróf, fotoheterotróf, kemoheterotróf.

Fermentatív anyagcsere

A piroszólósav oxigén nélkül (anaerob úton, de nem feltétlenül (!) anaerob körülmények között) alakul tovább.

A fermentációnak az alábbi lehetséges útjai vannak.

- **tejsavas erjedés:** a koenzimek egy lépésben tejsavvá redukálják a piroszólósavat; homofermentatív a folyamat, ha >90%-ban tejsav keletkezik, ekkor nincs gázképződés; heterofermentatív, ha tejsav csak <90%-ban keletkezik (mellette egyéb termékek, köztük gázok); tejsavbaktériumok → tejipar, tartósítóipar, normál humán mikroflóra.

- **alkoholos erjedés:** a piroszólósav dekarboxileződése (CO₂ vesztes) után képződő acetaldehidből redukcióval etanol képződik; élesztőgombák → sör-, szesz-, boripar.

- **propionsavas erjedés:** a piroszólósav koenzimes oxidációja és dekarboxileződése után ecetsav és CO₂ keletkezik, miközben egy másik piroszólósav molekula propionsavvá redukálódik; propionsavbaktériumok → sajtgyártás (aroma!).

- **butándiolos erjedés:** két piroszólósav kondenzációja, majd dekarboxileződése és redukciója eredményezi a négyszénatomos diolt; intermedierje, az acetoin könnyen kimutatható → bizonyos tüdőgyulladást okozó baktériumok diagnosztikájában fontos.

- **vajsavas-butanolos erjedés:** szintén kondenzáció és dekarboxileződés eredményez négyszénatomos termékeket: vajsav, butanol, de emellett izopropil-alkohol, aceton, CO₂ is keletkezik; bizonyos anaerob baktériumok → oldószergyártás.

- **kevert savas erjedés:** bonyolult reakciók hálózata során borostyánkősav, ecetsav, etanol, hangyasav képződik, utóbbi esetleges bomlása H₂ és CO₂ gázokat eredményez; főleg az ún. bélbaktériumokra jellemző.

Mikrobák szaporodási formái (egysejtűek ivartalan, vegetatív szaporodása)

- **hasadás:** ha a növekvő sejt eléri születéskori méretének kb. a kétszeresét, a megduplázódott örökítőanyag kettéválik, köztük szeptum képződik centripetális irányban, majd annak részleges hidrolízise révén a két utódsejt elválik → szimmetrikus osztódás: az anyasejt két majdnem azonos leánysejtté osztódik szét, melyek a következő ciklusban majdnem azonosan viselkedve kezdik előlről az „anyasejt életét”; baktériumok, protozoonok, egysejtű algák jellegzetes osztódási módja.

- **sarjadzás:** aszimmetrikus osztódás: az anyasejtről lefűződik a nála jóval kisebb leánysejt (más néven sarjsejt), és az utódok a következő ciklusban eltérően viselkednek (pl. az anyasejt hamar újabb sarjadzásba kezdhet, a sarjsejtnak növekednie kell); az anyasejt öregedését ún. sarjadzási hegek jelzik; élesztőgombák jellegzetes osztódási módja.

2. Mikrobák izolálási módszerei, mikrobák mikroszkópos vizsgálata különböző fermentált élelmiszerekből

feladat: folyadék mintákban sejtkoncentráció (sejt/cm³) meghatározása

hígítási sor: 10-es alapú → egymás utáni lépésekben mindig 1 cm³ minta + 9 cm³ steril víz

Telepszámlálás agarlemezen

kitenyésztési módszer → CFU (colony forming unit): telepképző egység (csak élő sejtek)

kétféle technika: szélesztés ill. lemezöntés

szélesztés: ráöntjük a hígított mintát az előre elkészített agaros tápközeg tetejére, steril üvegbottal (szélesztőbot) szélesztjük, megfelelő inkubálás után a képződött telepeket megszámláljuk.

lemezöntés: a hígított mintát belekeverjük a folyékony agaros tápközegbe, együtt öntjük ki azzal a Petri csészére → megdermed, majd innen kezdve nagyjából ugyanaz az eljárás.

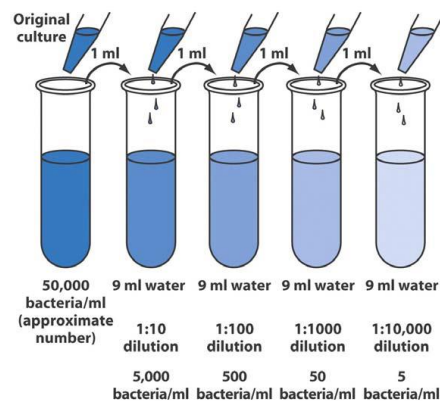


Figure 6-6 Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

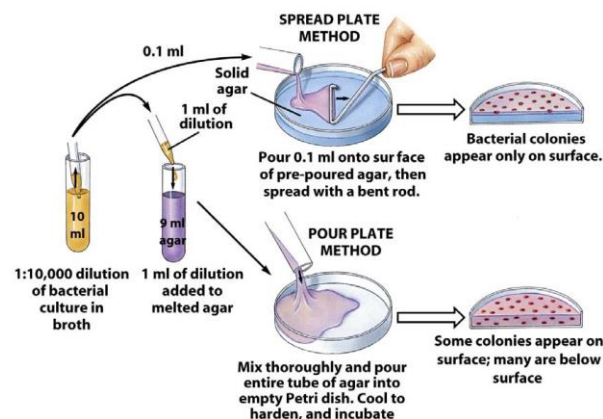


Figure 6-7a Microbiology, 6/e
© 2005 John Wiley & Sons

4. ábra: Baktérium sejtkoncentráció meghatározása (Forrás: Black, 2005)

- Minták: tej, tejföl, joghurt (tejsavbaktériumok); eceteszenca (ecetsavbaktérium) táptalajon való számlálás és a különböző hígításokban mikroszkópos számlálás, telepmorfológia

3. Élelmiszerhigiéniai mikrobiológiai vizsgálatok (DipContact-slide)

Contact Slide 2 - Bengál Rózsa CAF Agar + Semlegesítő /PCA + TTC + Semlegesítő

Rugalmas Dip-Slide szelektív táptalajjal élesztő-, és penészgombák kimutatására és nem szelektív táptalajjal összmikróbaszám meghatározására

A Contact Slide 2 egy használatra kész eszköz, amely műanyag hordozóra felvitt két különböző táptalajt tartalmaz, és felületek, valamint folyadékok mikrobiológiai vizsgálatára használják, még fertőtlenítőszer maradványának jelenlétében is.

A szelektív táptalaj lehetővé teszi az élesztő-, és a penészgombák izolálását és számának meghatározását. A másik táptalajt a baktériumok számlálására használható.

2. táblázat: A DipContact Slide összetétele

ÖSSZETÉTEL	
Bengálrózsa CAF Agar + Semlegesítő 1. oldal (g/l)	PCA + TTC + Semlegesítő 2. oldal (g/l)
Szójabab enzimes emésztése 5,0	Kazein enzimes emésztése 5,0
Glükóz 10,0	Élesztőkivonat 2,5
Monokálium-foszfát 1,0	Glükóz 1,0
Magnézium-szulfát 0,5	Trifenil-tetrazólium-klorid 0,1
Bengálrózsa 0,05	Semlegesítő *
Kloramfenikol 0,1	Agar 15,0
Agar 15,0	Végső pH 7,0 ± 0,2
Semlegesítő *	
Végső pH 7,2 ± 0,2	

* Hisztidin, 1,0 Lecitin, 0,7 Tween 80, 5,0 Nátrium-tioszulfát, 0,5

A MÓDSZER ELVE

A Rose Bengal CAF Agar + Neutralizing (Bengálrózsa CAF Agar + Semlegesítő) a Bengálrózsát és a Klóramfenikolt szelektív hatóanyagként tartalmazza a bakteriális növekedés gátlására, ugyanakkor a gyorsan növekvő penészgomba kolóniák méretének korlátozására. A Bengálrózsa festék is, és az élesztők és penészek sejtjeibe épül be, rózsaszínűvé téve ezeket a telepeket.

A PCA + TTC + Neutralizing (PCA + TTC + Semlegesítő) növekedés-indikátorként trifenil-tetrazólium-kloridot tartalmaz, amely könnyen megfigyelhető piros, oldhatatlan vegyületet képez.

VIZSGÁLATI ELJÁRÁS

1. Vegyen ki egy tárgylemezt a hűtőszekrényből, és hagyjuk szobahőmérsékleten kb. 5 percig.
2. Csavarja ki és húzza ki a tárgylemezt a hengeres tartályból. Ne érintkezzen az agar felületével.
3. Felületek vizsgálatához hajlítsa meg a tesztet, hogy a kupak 90 °-os szöget zárjon be a lemezzel, és a tárgylemez mindegyik oldalát nyomja erősen 10 másodpercig a vizsgálandó felülethez. Alternatív megoldásként használjon egy mintavevő pálcát a terület mintavételéhez, majd a pálcát óvatosan forgassa át az agar felszínén.

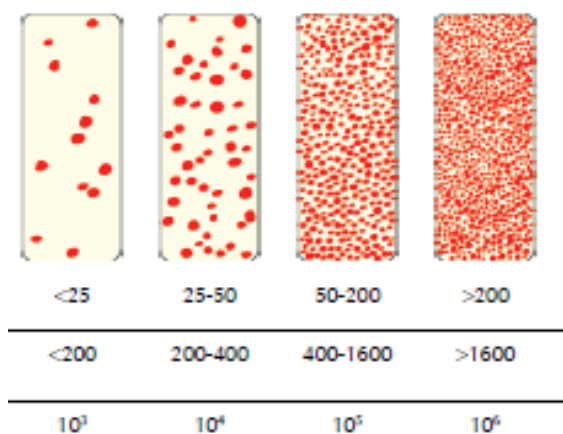
Folyadékok vizsgálatához fogja meg a tárgylemez a kupaknál, és teljesen merítse bele a vizsgált folyadékba.

4. Tegye vissza a tárgylemezt a csőbe, csavarja be szorosan és 30 ± 1 ° C-on 5 napig inkubálja (jegyezze fel a számot a PCA + TTC + Semlegesítő esetében 72 órás inkubálás után).

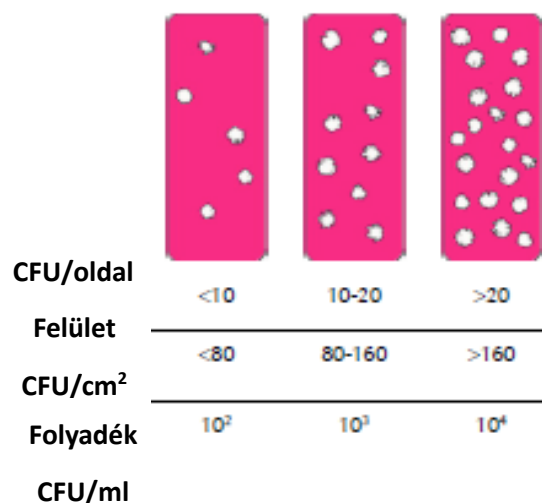
AZ EREDMÉNYEK ÉRTELMEZÉSE

A PCA + TTC + Semlegesítő (**2. oldal**) felületén az összes telepet számolja meg, hogy megkapja a teljes baktériumszámot. A Bengálrózsa CAF Agar + Semlegesítő (**1. oldal**) felületén növekvő összes kolónia száma kiértékeli a gombás fertőzést.

Baktérium / élesztő



Penész



5.ábra: Kiértékelési útmutató

KÜLLEM

1. oldal Enyhén opálos, világos rózsaszín.
2. oldal Enyhén opálos, halvány borostyánszínű.

Inkubációs körülmények: 30 ± 1 ° C 3-5 napig.

4. Ecetsav- és tejsavbaktérium tenyészetek vizsgálata

A mikroorganizmusok természetes élőhelyeiken vegyesen fordulnak elő, ezért laboratóriumi kitenyésztésük kevert tenyészeteket eredményez → egy adott mikrobafaj (vagy -törzs) vizsgálatához azt tisztán kell előállítani → feladat: a kevert tenyészetből színtenyészet előállítása.

Az alkalmazott technika szélesztés vagy lemezöntés lehet, előbbinek szilárd fázisú, mikroorganizmusokban dús minta esetén egy olyan speciális technikája ismeretes, ami eltér a telepszámlálás során alkalmazott azonos nevű megoldástól.



6.ábra: Szélesztési eljárás (Forrás: Black, 2005)

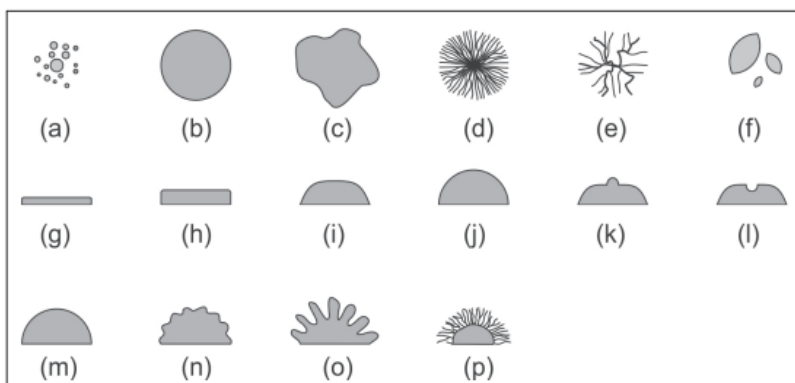
A tejsav- és ecetsavbaktériumok nyomon követésére 3 féle táptalaj kerül felhasználásra:

1. **MRS** (Man, Rogosa & Sharpe): pepton 10g, élesztőkivonat 4g, húskivonat 8g, glükóz 20g, nátrium-acetát 2g, triammónium-citrát 5g, magnézium-szulfát 0,05g, mangán-szulfát 0,05g, aktidion 0,05g, paradicsomlé 250 ml, Tween-80 1ml, desztillált víz 1000 ml-ig
2. **MYP** (Mannitol-Élesztőkivonat-Pepton): mannitol 25g, élesztőkivonat 5g, pepton 3g, agar 12g, desztillált víz 1000 ml-ig
3. **GYP** (Glükóz-Élesztőkivonat-Pepton): glükóz 30g, élesztőkivonat 5g, pepton 2g, agar 15g, desztillált víz 1000 ml-ig

Az MRS tápagar a tejsavbaktériumok vizsgálatára szolgál, míg az MYP és GYP az ecetsavbaktériumokra, az *Acetobacter* törzsek glükóz jelenlétében nem nőnek, így nagy valószínűséggel a *Gluconobacter* törzshöz tartoznak.

A gyakorlat értékelése a kifejlődött baktériumtelepek megfigyelése és számlálása. A baktériumtelepek morfológiai sajátosságainak vizsgálata során a következő jellemzőket értékeljük: a telep mérete (átmérő mm-ben), alakja (pontszerű, kör, szabálytalan, fonálszerű, rizoid, orsó), a telep kiemelkedése (lapos, domború, párnaszerűen feldomborodó, csúcsos, bemélyedő), szegélye (ép, hullámos, lebenyes-

karéjos, csipkézett, fonalas), színe. A telep felülete, denzitása és konzisztenciája szintén értékelhető jellemzők (7. ábra).



7.ábra: A baktériumok morfológiai tulajdonságai (György, 2020)

Alak: (a) pontszerű, (b) kör alakú, (c) szabálytalan, (d) fonálszerű, (e) rizoid, (f) orsó alakú.

Telepkiemelkedés: (g) lapos, (k) lapos kiemelkedő, (i) domború, (j) párnaszerűen

feldomborodó, (k) csúcsos, (l) bemélyedő. Telepszegély: (m) ép, (n) hullámos, (o) karéjos, (p) fonalas

5. Mezofil aerob élőcsíraszám meghatározási módszerek

A mezofil aerob mikrobák száma adja az egyik leghasznosabb tájékoztatást az élelmiszer mikrobiológiai állapotáról. Ebben a mikrobaszámban tükröződik a nyersanyag, a feldolgozási mód vagy a késztermék mikrobiológiai-higiéniai minősége. A nagy élősejtszám gyakran azt jelzi, hogy a nyersanyag már nem friss, erősen szennyezett volt, vagy a technológiában nem tartották be az előírt hőmérséklet, idő- és más értékeket, vagy a feldolgozás elhanyagolt higiéniai körülmények között folyt. A mezofil aerob mikrobaszám bizonyos esetekben az egészségügyi minőség megítélésére is alkalmas, főleg olyan élelmiszereknél, amelyekben normális tárolási körülmények között a mikroorganizmusok nem szaporodhatnak (pl. szárított termékek, fagyasztott termékek).

Az élesztők savanyú közeget jól toleráló, vegetatív úton sarjadzással vagy hasadással szaporodó egysejtű gombák. Egyes fajaik obligát aerobok, mások a cukrokat erjesztéssel is hasznosítják (fakultatív anaerobok). Az erjesztésben és egyes speciális borászati technológiákban kiemelt pozitív szerepük van, másrészt romlásokozók és a palackos borokban utóerjedést, üledékképződést okozhatnak.

A penészgombák savtűrő, konidiumokkal vagy sporangiospórákkal szaporodó, obligát aerob fonális gombák. Borászati szerepük kevés kivétellel negatív. A késztermékek minőségét az élesztőknél kevésbé veszélyeztetik, de dugóízt okozhatnak és jelzik a palackozás mikrobiológiai hiányosságait.

A savképző baktériumok a must vagy a bor pH-ján szaporodásra képes baktériumok, amelyek a cukrokból tejsavat és/vagy ecetsavat és egyéb káros anyagokat képeznek. Rendszertanilag két nagy csoportba sorolhatók. - A tejsavbaktériumok a savképző baktériumokon belül olyan Gram-pozitív pálcák vagy kokkusok, amelyek a cukrokat tejsavas erjedéssel bontják. Aerotoleráns anaerob szervezetek, katalázpróbájuk negatív. Általában romlásokozók, de egyes fajok szerepe a biológiai almasavbomlás során hasznos is lehet. - Az ecetsavbaktériumok a savképző baktériumokon belül obligát aerob, Gram- negatív, kataláz pozitív pálcák. Súlyos romlásokozók, mert alkoholból és cukrokból ecetsavat képeznek.

A MÓDSZER ELVE:

Az élesztő- és penészgombákat egyszerű összetételű komplett táptalajokon tenyésztjük, amelyeken a baktériumok szaporodását savanyítással vagy antibiotikummal gátoljuk. Az élesztő- és penészgombatelepek egymástól szemmel jól megkülönböztethetők és egymás mellett számolhatók.

TÁPTALAJOK:

A tenyésztés során összehasonlítható eredményt ad az élesztőkivonat-glükóz agar, az élesztőkivonat-pepton-glükóz agar (YEPD), valamint a sörcefre agar (Würze- vagy Wort-agar). A táptalajok készen vagy poralakú táptalajként is beszerezhetők.

1. Élesztőkivonat -glükóz agar

glükóz 20 g

élesztőkivonat 5 g

agar 20 g

desztillált víz 1000 ml

Sterilezés: 121 °C-on 20 percig

2. Élesztőkivonat - pepton - glükóz agar (YEPD)

glükóz 20 g

élesztőkivonat 10 g

pepton 10 g

agar 20 g

desztillált víz 1000 ml

Sterilezés: 121 °C-on 20 percig

3. A táptalajok szelektivitása

A táptalajok szelektivitása kétféle módszerrel biztosítható:

A. módszer: Savanyítás 10%-os steril borkősavoldattal 3,5-4 pH érték közé. A savanyítást az agar felolvasztása után, közvetlenül a lemezöntés előtt végezzük. A savanyított agartáptalaj már nem sterilizálható, mert az agar savanyú közegben elhidrolizál és a táptalaj nem szilárdul meg.

B. módszer: Antibiotikum adagolása 100 mg/l klóramfenikol, amely autoklávozás előtt is a táptalajhoz adható. Helyettesíthető 100 mg/l oxitetraciklinnel, amelyet steril vízben oldva, felhasználás előtt adunk a táptalajhoz. Az élesztőkivonat-glükóz agar többféle szelektív, antibiotikus változata is készen kapható (pl. OGYE, Chloramfenicol Agar, RoseBengal Chloramfenicol Agar stb.)

A VIZSGÁLAT MENETE:

Késztermék, dugó, palack vizsgálatát membránszűréssel végezzük. Késztermékből legalább 100 ml-t, az öblítéssel vizsgálatok esetén az öblítővíz teljes mennyiségét leszűrjük. A szűrőmembrán pórusmérete ne legyen nagyobb 0,8 µm-nél. Az inkubálást szelektív táptalajon, 28 °C-on végezzük. Ha a vizsgálat célja

az élesztőszám meghatározása, akkor az inkubációs idő 48-72 óra. A penészszám egyidejű meghatározása esetén az értékelést 2 nap múlva megismételjük.

ÉRTÉKELÉS:

Az élesztőszámot és a penészszámot külön-külön adjuk meg a telepek eltérő alaktani tulajdonságai alapján. Az élesztőtelepek felülete sima vagy enyhén ráncos, fényes, tompa fényű vagy matt, színe többnyire fehér vagy krémszínű, de lehet barnás, rózsaszín vagy piros. A penésztelepek felülete jellegzetesen "bolyhos", gyepszerű, színe kezdetben fehér, majd széles skálán változik, többnyire zöld, szürke vagy barna.

Megjegyzés: Ha a táptalaj szelektivitását antibiotikum nélkül, savanyítással biztosítjuk, néhány savképző (ennélfogva savtűrő) baktériumfaj három nap alatt gyenge növekedést mutathat a táptalajon, különösen akkor, ha a minta élesztőre és penészgombára negatív. A baktériumtelepek azonban ezeken a táptalajokon három nap után sem nagyobbak 1 mm-nél, általában jellegzetesen áttetszők, esetleg barnák és savanyú vagy kifejezetten ecetes szagúak. Ilyenkor a gyanús telepekből mikroszkópos vizsgálatot kell végezni.

6. Különféle élesztőtörzsek tenyésztése és mikroszkópos vizsgálata, fenológiai megjelenése

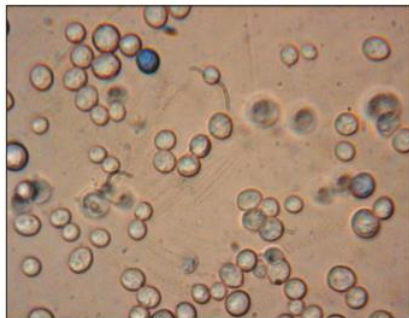
Az élesztőgombák vizsgálata natív preparátum segítségével

Natív mikroszkópi preparátum segítségével megfigyelhetjük az élő élesztőgombasejteket, azok morfológiáját és a sarjadzó sejteket. Erre a célra mintát veszünk olyan élelmiszerekből, melyek az élesztőgombák okozta romlás jeleit mutatják, mint például dzsemekből, befőttekből, gyümölcslevekből. Egy csepp mintát cseppentünk a tárgylemezre és fedőlemezrel lefedjük. Mikroszkóp alatt 40x-es nagyítású objektívvel megvizsgáljuk a preparátumot, és megfigyeljük az élesztőgombákat.

Élesztőgombák vizsgálata élő festett készítményekkel (vitális festés)

Élő sejtek festésére azok a kis koncentrációjú festékkoldatok alkalmasak, amelyek a sejtek membránján áthatolnak. Bejutva a citoplazmába és a különböző sejtszervecskébe, megfestik azokat anélkül, hogy a sejtek szerkezetét károsítanák.

A metilénkék festékkoldattal történő vitális festés esetén az élettelen és élő sejtek megkülönböztetését az teszi lehetővé, hogy az élő sejt citoplazmájába kevés metilénkék tud behatolni, és a dehidrogenáz enzim hatására az is szintelen leuko-metilénkékké redukálódik. Az elhalt sejtek membránja azonban fokozott mértékben áteresztővé válik a festékkel szemben, ezért a sejtek rövid idő alatt kékre színeződnek. Az élő és elhalt sejtek aránya alapján gyorsan és egyszerűen képet kaphatunk arról, hogy a tenyésztés vagy bizonyos folyamatok (például fermentáció) során hogyan változik a mikroorganizmusok életképessége.



8.ábra: *Saccharomyces cerevisiae* élesztősejtek élő és holt összehasonlítása metilénkék festéssel (Forrás: György, 2020)

7. táblázat: Élesztőgombák azonosítására alkalmazható tulajdonságok (Forrás: Péter, 2020)

Alaktani tulajdonságok - Ivaros szaporodás - Konjugáció - Spóráképzés - Bazídium típusa Ivartalan szaporodás - Sarjadzás - Hasadás - Konídiumképzés Mikromorfológia - Sejt alak - Valódi és álhifa Makromorfológia - Agartenyészet - Folyadéktenyészet Biokémiai tulajdonságok - Urea bontás - Diazonium Blue B reakció - Koenzim Q típus - Keményítőképzés - Ecetsavképzés	Élettani tulajdonságok - Erjesztés - Szénforrás-asszimiláció - Nitrogénforrás-asszimiláció - Vitaminigény - Szaporodás különböző hőmérsékleteken - Szaporodás kis vízáktivitású tápközegekben - Gátlószertűrés - Killertoxin termelés/tűrés Molekuláris tulajdonságok - Sejtfalösszetétel - Fehérjemintázat - Izoenzimek - Zsírsavösszetétel - DNS bázisösszetétel - DNS homológia - DNS ujjlenyomatok - Kariotípus - DNS vonalkód szekvenciák
---	---

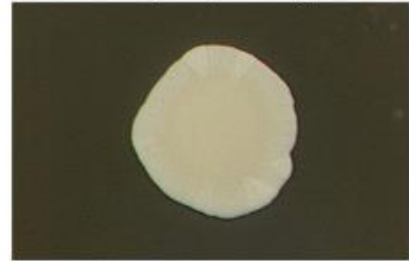
Saccharomyces spp.



Candida spp.



Debaryomyces spp.



Zygosaccharomyces spp.



Brettanomyces spp.



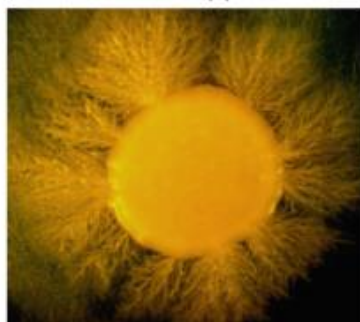
Schizosaccharomyces spp.



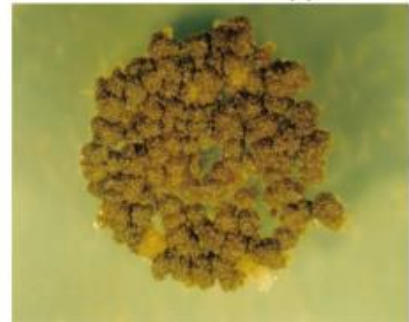
Dekkera spp.



Pichia spp.



Yarrowia spp.

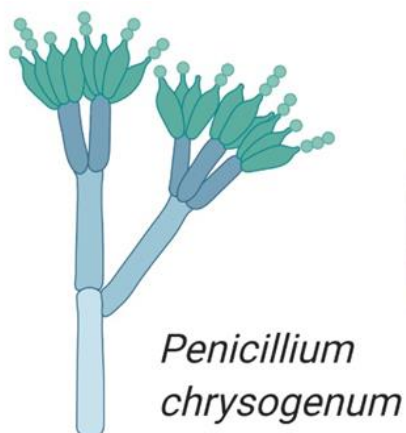


9.ábra: Különböző élesztőgombák fenológiai megjelenése (Forrás:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-0716-1932-2_12)

7. Különböző penészgomba törzsek tenyésztése és mikroszkópos vizsgálata

A mikroszkopikus gombák sejt- és telepmorfológiájukat tekintve igen változatos élőlénycsoportot képviselnek. A legtöbb mikroszkopikus gomba telepet alkot. A gombatelep általában hifákból áll, a gombákra jellemző, fonalas, csőszerű képződményekből. A hifák gyakran elágaznak, egymással összeköttetéseket létesíthetnek, és így bonyolult hálózatot formálnak, amelyet micéliumnak nevezünk. Mind az ivartalan, mind pedig az ivaros szaporodásuk változatos sejttypusokat foglal magába, és az egyes gombacsoportok morfológiailag és genetikailag jól jellemezhető életciklussal rendelkeznek. A spóráképződést környezeti tényezők indukálják (például a tápanyagforrások kimerülése, a hőmérséklet, a szén-dioxid- és a páratartalom változásai). A penészgombák konídiumai, spórái a levegővel terjednek, így könnyen szennyezhetik az élelmiszerek nyersanyagait és a csomagolatlan késztermékeket. A penészgombák általában aerob, heterotróf szervezetek. Szénforrásként különböző szerves vegyületeket tudnak hasznosítani, köztük a cellulózt és más összetett szénhidrátokat, valamint a fehérjéket is, mivel sokféle extracelluláris enzimet termelnek. A környezeti tényezők széles határai között tudnak szaporodni. Az oxigénen kívül leginkább a nedvességet igénylik, de többségüknek a szubsztrátum néhány százalékos víztartalma, a levegő szokásos páratartalma elegendő. A penészgombák közé számos, igen kis vízaktivitást elviselő faj tartozik (például a *Monascus bisporus*, *Aspergillus glaucus*). A hőmérsékleti igény szerint általában mezofilek, de vannak köztük pszichrofilek is, amelyek a hűtőházban tárolt élelmiszereinken is elszaporodnak (például a *Penicillium expansum*). Kedvelik a savas pH-t, de széles pH-tartományban tudnak szaporodni.

A vizsgált mintákból kifejlődött penészgombatelepekből natív mikroszkópi preparátumokat készítünk és megvizsgáljuk mikroszkóppal. A sejt- és telepmorfológiai tulajdonságok, valamint a konídiumok elhelyezkedése, elrendeződése alapján vizsgáljuk a penészgombákat.





9.ábra: A nemesrothadáson átesett alapanyagok jellemző penészgomba törzsei; A – *P.chrysogenum*, B – *Botrytis cinerea* (Forrás: Bene, 2004)

8. Tejsav- és ecetsavbaktériumok tenyésztése, mikroszkópos vizsgálata

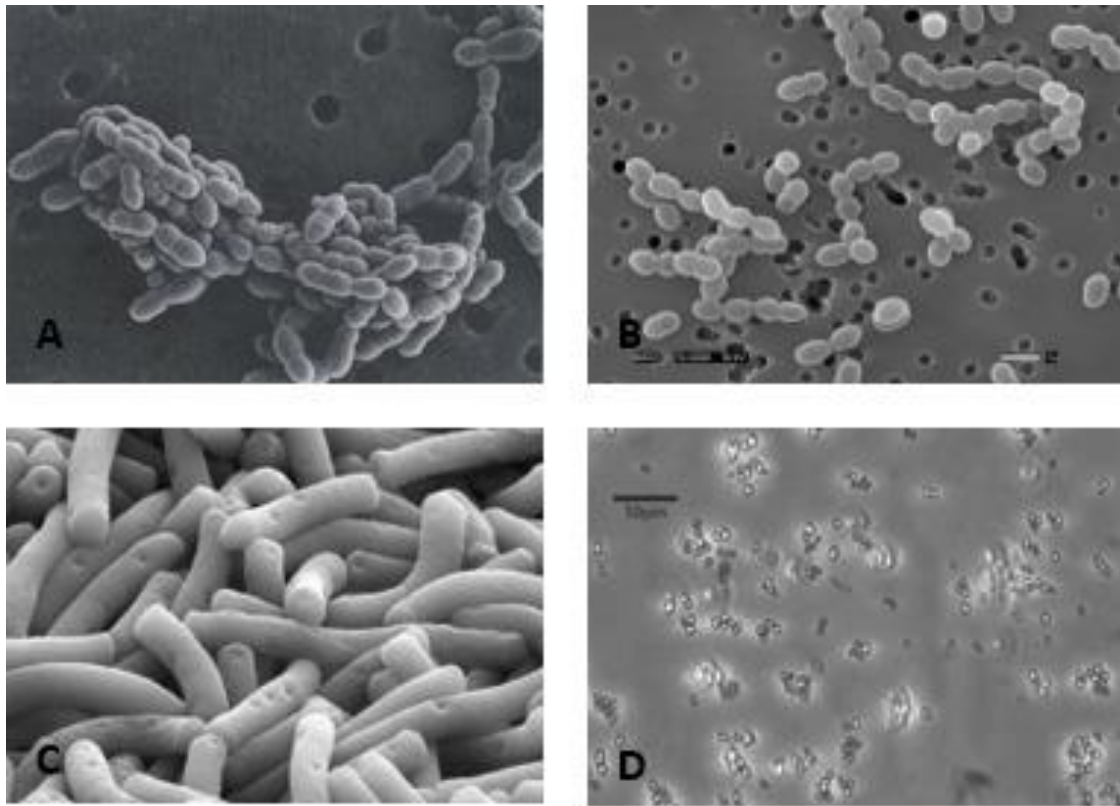
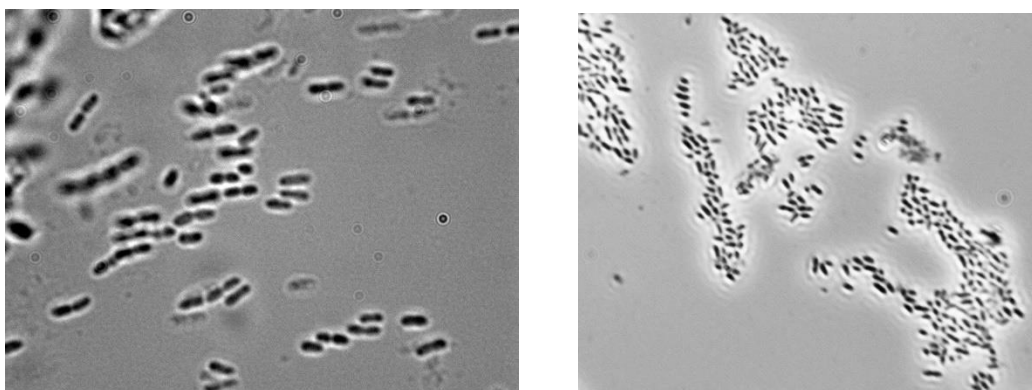


Fig 1: A *Oenococcus oeni*, B *Leuconostoc*, C *Lactobacillus*, D *Pediococcus*

11. ábra: A – *Oenococcus oeni*; B – *Leuconostoc* spp.; C – *Lactobacillus* spp.; D – *Pediococcus* spp.
(Forrás: <https://www.pressebox.com/pressrelease/tentamus-group-gmbh/Malolactic-Biogenic-Amines-Organoleptic-alterations-of-wine/boxid/1116017>)



12. ábra: *Acetobacter aceti* és *Gluconobacter oxydans* (Forrás: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/bacteria/acetobacter-aceti>)

A szoliter savképző telepből vagy feltételezetten savképző tútelepből lelángolt oltókaccsal vagy tűvel mintát veszünk, és tárgylemezre cseppentett vízben szuszpendáljuk. A fedőlemezzel lezárt preparátumot mikroszkóppal, immerziós lencsével (immerziós olajjal lefedve 100-szoros nagyítású objektívvel) vagy fáziskontraszt megvilágításban 40-szeres nagyítású Ph-objektívvel vizsgáljuk.

- A *tejsavbaktériumok* önálló mozgást nem végző pálca vagy gömb (kokkus) alakú baktériumok, gyakran szabályos sejthalmazokba (pár, tetrad, lánc) rendeződve.
- Az *ecetsavbaktériumok* többnyire vaskos rövid pálcák egyesével, párban vagy láncban. A hosszabb sejtláncokban szabálytalan, nagyméretű sejtek is előfordulhatnak. A borokban előforduló törzsek általában mozdulatlanok, de ritkán önálló mozgás is megfigyelhető.

9. Almasavbontó kultúra felszaporítása és Thoma-cell eljárással sejtszám szaporulat nyomonkövetése

Bürker kamrás eljárás

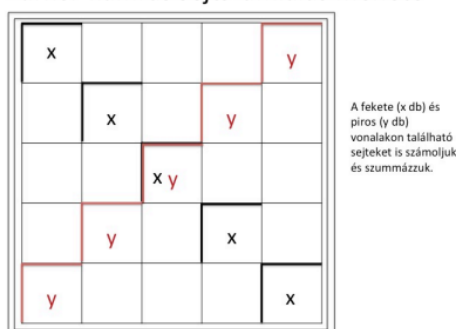
A mikroszkóp beállítása: Objektív 1,4x nagyítás, a mikroszkópon tízszeres nagyításban látszik a hajszál. A Bürker kamra rácsozata 40-szeres nagyításban látszik.

Elsősorban élesztők és penész-spórák számlálására használják.

A Bürker-kamra két négyzethálós beosztású teret tartalmaz. A kislakú négyzetek területe $1/400 \text{ mm}^2$, a nagyalakúak területe $1/25 \text{ mm}^2$. Mélységük fedőlemezrel való lefedésnél 0,1 mm. Az 1 milliliterben lévő sejtszámot úgy számíthatjuk ki, hogy a kislakú négyzetekhez tartozó átlagos sejtszámot 4×10^6 -nal, a nagy négyzetekhez tartozót $2,5 \times 10^5$ -nel megszorozzuk.

A Bürker-kamra két egymástól vágattal elválasztott négyzetes beosztást tartalmaz, így két különböző szuszpenzió vizsgálatára alkalmas. Eredeti elgondolás szerint a megszámlálendő négyzeteket a számlálókamra egész felületéről véletlenszerűen választjuk ki, de a nyomon követhetőség érdekében a dupla (vagy tripla) vonalak által határolt négyzet egyik sarkából indulva az átlón haladva számoljuk meg a sejteket. Ez után a másik átlóval hasonlóképpen járunk el, így az átlók keresztezési pontját jelentő négyzetet kétszer számoljuk. A számlálásnál célszerű következetesen a bal oldali és a felső pici négyzetet határoló vonalon lévő sejteket a négyzetbe tartozóként számolni, a jobb szélén és az alsó vonalon lévő sejteket pedig kihagyni a számolásból. Egy-egy sejtsuszpenzió sejtszámának meghatározása során legalább 500 sejtet kell megszámlálni. A sejtszámokat és sarjadzó élesztő sejteket egynek kell számolni és ebben az esetben sejthalmaz számot adunk meg. Amennyiben nagyon sűrű a tenyészet, számlálás előtt a mintát hígítani kell. Az érzékenység alsó határa 10^6 sejt/ml. Ezek alapján kiszámoljuk az egy pici négyzetre vonatkozó átlagos sejtszámot, majd felszorozzuk a megfelelő faktorról (4×10^6 -nal).

Bürker-kamrás sejtszámlálás menete



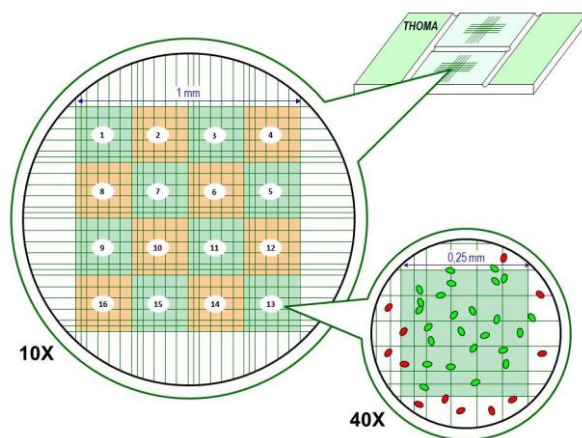
10. ábra: Bürker kamrás sejtszámlálás (Forrás: [https://ofkd2014.ttk.pte.hu/doc/alk-kem-labor-leiratok-osszefuzve-2018_\(1578\).pdf](https://ofkd2014.ttk.pte.hu/doc/alk-kem-labor-leiratok-osszefuzve-2018_(1578).pdf))

Thoma cell

Meghatározott folyadéktérfogatban szuszpedált részecskék (pl. sejtek, gombaspórák) mennyiségének meghatározásához számláló kamrákat szoktak használni. Ezek olyan tárgylemezek, amikre négyzethálósan csatornákat marnak. Ezeken a helyeken a tárgylemez vékonyabb, így ismert a lefedett folyadékoszlop magassága. Mivel a négyzetháló osztásainak mérete is ismert, pontosan definiált térfogatú tereket kapunk a fedőlemez és a tárgylemez között. Az ilyen fedőlemez általában a szokásosnál vastagabbak, a deformálódás (és az alatta lévő víz térfogatváltozásának) elkerülése

érdekében. A számláló kamrába bevitt folyadék feleslege kis csatornákon keresztül távozhat. A kamrák négyzethálójának mérete és alakja sokféle lehet és a számlálandó részecskék nagyságához illeszthető. A Thoma-féle osztásnál egy nagy négyzet területe 1 mm^2 , ezek mindegyike 16 kisebb négyzetből áll, így ezek területe $1/16 \text{ mm}^2$, további osztással pedig a legkisebb négyzet területe $1/400 \text{ mm}^2$. Az általánosabban ismert Bürker-kamraesetében a mintaterek magassága $0,1 \text{ mm}$, a nagy négyzet alapú egység mérete $1/5 \text{ mm} \times 1/5 \text{ mm} = 1/25 \text{ mm}^2$, a téglalap alakú egységé pedig $1/5 \text{ mm} \times 1/20 \text{ mm} = 1/100 \text{ mm}^2$.

Számolás Thoma cell-el: sejtszám $\times 16 \times 15625$



10. ábra: Sejtszámlálás Thoma cell-el (Forrás: http://insilico.ehu.eus/counting_chamber/thoma.php)

Felhasznált irodalom

Bene, Zs. (2004): Aszúbogyók élesztő- és penészbiotájának tanulmányozása Tokaj-hegyalján, PhD-dolgozat, BCE, Budapest

Black, J.G. (2005): Microbiology. Principles and Explorations. 6th Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York

György, É. (2020): Élelmiszer mikrobiológia, laboratóriumi gyakorlatok. Scientia Kiadó, Kolozsvár ISBN 978-606-975-038-4. http://real.mtak.hu/118351/1/GyorgyEva_ElelmiszerMikrobiologia_REAL.pdf

Péter, G. (2020): Élesztőgombák jelentősége az élelmiszeriparban, régi és új fajok. PhD-értekezés, SZIE

Ismeretellenőrző kérdéssor

1. Melyek az egészséges szőlő, must és a bor mikrobiotájának összetevői?
2. Mik a tejsavbaktériumok és borászati jelentőségük?
3. Mik az ecetsavbaktériumok és borászati jelentőségük?
4. Melyek a borélesztő törzsek?
5. Melyek a *Saccharomyces* nemzetség *sensu stricto* fajai?
6. Mit takar a vadélesztő megnevezés?
7. Mit jelent a hártvaképző élesztőtörzs borászati célú felhasználása?
8. Melyek a legfontosabb fonalas gombák a borászatban?
9. Mikotoxinok megnevezés mit jelent és melyek fordulnak elő a borkészítés során?
10. Apikulátusz élesztőket sorolja fel!
11. Aszúsodás fogalma
12. *Botrytis cinerea* pozitív és negatív szerepe a borkészítésben
13. Mit jelent az asszimilálható nitrogén fogalom?
14. A borok mikrobiológiai okokra visszavezethető rendellenes elváltozásai (borbetegségek)
15. *Brettanomyces* élesztőtörzsek borászati szerepe
16. TCA jelentése, előfordulása, okozói
17. Mi a borászati fajélesztő fogalma, jellemzői?
18. Nemesrothadás fogalma
19. Szürkerothadás fogalma
20. Homofermentatív és heterofermentatív tejsavas erjedés közti különbség
21. Biológiai almasavbontás fogalma
22. Mi a Brett jelleg?
23. Mi az ecetsavbaktérium káros borászati hatása?
24. Mi a tejsavas illósodás?
25. Mutassa be a mikrobapopuláció szaporodási görbét!
26. Mit jelent az utóerjedés?
27. Mi a biológiai stabilizáció?
28. Mi a palackozás szerepe a mikrobiológiai borstabilizálásban?
29. Mely baktériumok tudnak a borban szaporodni?
30. Milyen technológiai művelet a csíráatlanítás?
31. Jellemezze a csíráatlanító szűrést!
32. Mi a bidül?
33. Mit jelent a degorzsálás?
34. Ételmérgezés fogalma
35. Étfelfertőzés fogalma
36. Milyen mikrobiológiai táptalajokat ismer?
37. Mi a Bürker kamra?
38. Mi a ThomaCell?
39. Hogyan kell mikrobiológiai sejtszámlálást végezni?
40. Mi a zoonózis?
41. Mit jelent a salmonellózis?
42. Mi a botulotoxin?
43. Mi a liszterózis?
44. Melyek az élelmiszerek útján terjedő vírusos megbetegedések?
45. Ochratoxin jelentése

46. Aflatoxin jelentése
47. Patulin jelentése
48. Sorolja fel a fizikai tartósítási eljárásokat!
49. Mi a hőkezelés?
50. Mi a hőelvonás?
51. Mi a besűrités?
52. Mi a dehidráció?
53. Mi a liofilizálás?
54. Mit jelent az anyagoldat készítés élesztőzésénél?
55. Melyek a fajélesztő dehidratálás lépései?
56. Melyek a kémiai tartósítási módszerek?
57. Melyek a biológiai tartósítás jellemzői?
58. Mi a mesterséges savanyítás?
59. Mi a különbség a természetes és a mesterséges savanyítás között?
60. Hogyan változnak az élesztőfajok az erjedés során?
61. Melyek a Gram+ baktériumok?
62. Melyek a Gram- baktériumok?
63. Mit jelent a mannitos erjedés?
64. Hogyan kerül „egéríz” a borba?
65. Mit jelent a borok nyúlósodása?
66. Hogyan tudnak a borok megkeseredni?
67. Melyek az ecetsavbaktériumok borokban előforduló nemzetségei?
68. Melyek a tejsavbaktériumok borokban előforduló nemzetségei?
69. Milyen fonális gombákkal kell számolni a borkészítés során?
70. Mi a vegyes rothadás?
71. Milyen vadélesztők fordulnak elő a szőlőbogyó felületén?
72. Melyek a mustok, borok jellemző élesztőfajai az erjesztés kezdetén?
73. Mely élesztőtörzsek vesznek részt a borok intenzív erjedési fázisában?
74. Mely élesztőtörzsek a jellemzőek a borérlelés, tárolás során?
75. Mit jelent a sarjadzás?
76. Melyek a hártaképző élesztőtörzsek legfontosabb tulajdonságai?
77. Mi a flor?
78. Mi a solera?
79. Mit jelent a sherrizálás?
80. Mi az autolízis?
81. Mi a másodlagos erjesztés a pezsgőkészítésnél?
82. Melyek a pezsgőélesztőkkel szemben támasztott legfontosabb követelmények?
83. Mi a killeraktivitás?
84. Mit jelent az élesztő flokkuláció?
85. Mit jelent az élesztő autolízis?
86. Mi a remuage?
87. Milyen tevékenységet lehet végezni a giropalettázóval?
88. Mi az ecetesedés?
89. Mit takar az élesztőkultúra fogalma?
90. Mi a biológiai borérlelés?
91. Melyek az élesztőfelszaporítás lépései?
92. Mi a pied de cuve?
93. Mit takar a palackozási fázisvizsgálat?

- 94. Mi a maszkképződés jelenség?
- 95. Mi a bioprotekció?
- 96. Mit jelent a pincepenész elnevezés?
- 97. Mi a sárga bor?
- 98. Mit jelent a szamorodni megnevezés?
- 99. Mi a szalmabor?
- 100. Mi a spontán almasavbomlás?