



ÉLELMISZERMIKROBIOLÓGIA

Gyakorlatok

**Okleveles Élelmiszermérnök és Okleveles
Élelmiszerbiztonsági és Minőségi Mérnökök részére**
című tananyag

Boross Nikoletta, mesteroktató; Dr. Vidács Anita, adjunktus

Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar

Élelmiszermérnöki Intézet Mikrobiológia Tanszék

2018.

SZÉCHENYI 



MAGYARORSZÁG
KORMÁNYA

Európai Unió
Európai Szociális
Alap



BEFEKTETÉS A JÖVŐBE

Tartalomjegyzék

Bevezetés.....	4
A mikrobiológiai gyakorlatok különleges óvórendszabályai	5
1. A mikrobiológiai laboratórium felépítése	6
1.2. Mikrobiológiai laboratórium főbb munkafolyamatait.....	6
1.3. Mikrobiológiai laboratórium berendezései.....	7
1.3.1. A táptalajkészítés és -tárolás berendezései.....	7
1.3.2. Az inkubálás berendezései	7
1.3.3. Mintaelőkészítés berendezései	8
1.3.4. A steril munkavégzés berendezései (Biológiai biztonsági szekrények).....	9
1.3.5. A mikrobiológiai műveletek eszközei.....	11
1.3.6. A mikroszkópos vizsgálat eszközei.....	12
1.4. Sterilizés.....	13
1.5. Önellenőrző feladatok.....	14
2. Tenyésztési vizsgálati módszerek	17
2.1. Tápközegek	17
2.1.1. A táptalajok összetétele	17
2.1.2. A táptalajok csoportosítása.....	18
2.3. A táptalajok és hígítófolyadékok készítése és tárolása	20
2.4. Gyakorlat: Átoltások gyakorlása	21
2.4.1. Oltás ferde agarra	21
2.4.2. Oltás kémcsőből folyékony táptalajba	22
2.4.3. Tisztatenyészet előállítása	22
2.4.4. Eredmények és értékelés	23
2.5. Önellenőrző feladatok	24
3. Az élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatok végzésével kapcsolatos alapfogalmak.....	26
3.1. Élelmiszerhigiénia szempontjából fontosabb vizsgálati eljárások	26
3.2. Mintavételi és -kezelési eljárások	27
3.2.1. Alapfogalmak	27
3.2.2. Mintavétel mikrobiológiai vizsgálat céljára	28
3.2.3. A mintavétel és eszközei	29
3.2.4. A mintavétel jellege alapján lehet	31
3.2.5. A mintavétel módja	32
3.2.6. Mintavétel formái	32
3.2.7. Mintavétel végrehajtásának alapvető szabályai	33
3.3. Önellenőrző feladatok.....	36
4. Élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések vizsgálata	38
4.1. Mintaelőkészítés	38
4.2. Táptalajok beoltása	38
4.3. Azonosítás	39
4.4. Mikrobaszám-meghatározási módszerek	39
4.5. Fontosabb indikátor mikrobák.....	40

4.5.1.	Mikrobaszám (összes élő, aerob és fakultatív anaerob, mezofil és fakultatív psichrotrof mikrobák száma, összcsíraszám)	41
4.5.2.	<i>Staphylococcus aureus</i> kimutatása	41
4.5.3.	Kóliform baktériumok és az <i>Escherichia coli</i> kimutatása	43
4.5.4.	Enterobaktériumok kimutatása.....	47
4.5.5.	Az enterokokkuszok kimutatása.....	48
4.5.6.	Mezofil szulfitredukáló összes klosztridium és klosztridiumspóra kimutatása .	50
4.5.7.	Penész-élesztő szám kimutatása.....	51
4.5.	Önellenőrző feladatok	53
5.	Fontosabb patogén mikrobák	55
5.1.	<i>Salmonella</i> kimutatása	55
5.1.1.	Salmonellák kimutatása hagyományos tenyésztéses eljárással.....	55
5.2.	<i>Listeria monocytogenes</i> kimutatása	59
5.2.1.	<i>Listeria monocytogenes</i> kimutatása hagyományos tenyésztéses eljárással.....	60
5.3.	Gyakorlat: Élelmiszervizsgálat tervezése (előkészületek, táptalajok készítése, eszközök sterilizése)	65
5.6.	Önellenőrző feladatok.....	68
6.	Higiéniai kontroll vizsgálatok az élelmiszeriparban	72
6.1.	Az élelmiszer (nyersanyag) és a vele kontaktusba kerülő eszközök, személyek mikrobiológiai terheltségének vizsgálata	72
6.2.	Személyi és felületi mintavétel gyakorlat.....	75
6.3.	Önellenőrző feladatok.....	76
7.	Levegő és víz mikrobiológiai vizsgálata.....	78
7.1.	Levegő mikrobiológia vizsgálata.....	78
7.2.	Vízvizsgálat	79
7.2.1.	Ivóvíz minősítése mikrobiológiai vizsgálat alapján	79
7.3.	Gyakorlat: Kontroll vizsgálatok	82
7.4.	Önellenőrző feladatok.....	83
	Irodalomjegyzék.....	85

Bevezetés

A jegyzet célja, hogy a mikrobiológia gyakorlatokra való felkészülést elősegítse, a kísérlet menetének leírása segítséget nyújtson a végrehajtáshoz. A gyakorlatos jegyzet egyben jegyzőkönyvként is szolgál, kísérletek kiértékelése rögzíthető benne.

A jegyzet elején a laboratóriumi munkavédelmi rendszabályok, az általános anyag- és eszközismeret ismertetése történik meg.

Az egyes gyakorlatokat az elméleti tudnivalók összefoglalásával kezdjük, majd a kísérlet anyag- és eszközigényét adjuk meg.

„Ne mondd, hogy nincs időd semmire!
A Te napod sem rövidebb,
mint Michelangelo, Pasteur, Teréz anya,
Leonardo da Vinci, Albert Einstein vagy
Jézus napja!”

A mikrobiológiai gyakorlatok különleges óvórendszabályai

A mikrobiológiai gyakorlatok során a laboratóriumokra vonatkozó általános rendszabályokat kell követni (savak, lúgok, mérgezőanyagok használata, elektromos- és gázkészülékek kezelése). A fennálló fertőzésveszély miatt azonban egyéb (az alább felsorolt) rendszabályokat is kötelező betartani. Ha a gyakorlat során mikroorganizmusokkal dolgozunk a fertőzésveszély miatt az általános mikrobiológiai rendszabályokat is szigorúan be kell tartani, ügyeljünk a megfelelő védőfelszerelés használatára és az anyagok előírás szerű kezelésére. A gyakorlatokon tartsuk be a gyakorlatvezető utasításait és csak a jelenlétében lehet tartózkodni a laboratóriumban!

- A baktérium tenyészeteket mindig kórokozóként kell kezelni.
- A mikrobiológiai gyakorlatokon védőköpenyt kell viselni. A köpeny tisztítását (95 °C-os főzőmosás) célszerű a mikrobiológiai gyakorlatot követően beütemezni.
- A gyakorlatok során a hosszú haját fel kell tűzni, mivel balesetveszélyes (gázlágnál könnyen meggyullad).
- A laboratóriumban enni, inni, dohányozni, fészüklödni, a laboratóriumi tárgyakat, eszközöket, berendezéseket az előírtól eltérő célra felhasználni tilos. Csak kifogástalanállapotú eszközöket szabad használni.
- A mikrobatenyészetekkel érintkezett eszközöket (pipetták, tárgylemezek, fedőlemezek, stb.) használat után azonnal fertőtlenítőoldatot tartalmazó edénybe kell tenni. Élő mikroorganizmusok kiömlése (pl. kémcsötörés) során a szennyezött területet fertőtleníteni kell. Az esetről a gyakorlatvezetőt informáljuk.
- A munka végeztével az asztalon rendet kell rakni, és az asztalt fertőtlenítő oldattal le kell törölni.
- Oltóeszközök leégetését előírás szerűen végezzük; nagy mennyiségű oltóanyag rátapadása esetén, a láng közepén szárítsuk, utána égessük, különben szétfröccsenhet a mikrobátömeg.
- Tilos a lefolyóba önteni élő mikrobák tenyészetét vagy szuszpenzióját! Elpusztításuk hővel vagy vegyszerrel történik. Tilos továbbá bármilyen vegyszert a lefolyóba önteni!
- Ne öntsünk a lefolyóba megolvasztott agaros táptalajt, mert a csövek eltömödnek! A laboratóriumból való távozáskor fertőtlenítő oldattal kell kezdet mosni.
- A mikrobiológiai gyakorlatok alatt csak a gyakorlatvezető engedélyével lehet szellöztetni.

1. A mikrobiológiai laboratórium felépítése

Mikrobiológiai laboratórium alatt nemcsak szűken azt a helyiséget kell érteni, ahol a mikroorganizmusokkal kapcsolatos vizsgálatok zajlanak, hanem a vele szerves egységet képező járulékos helyiségeket is, mint az előkészítő, a mérlegszoba, a mosogató és a sterilizáló.

1.2. *Mikrobiológiai laboratórium főbb munkafolyamatait*

- **Táptalajfőzés és sterilizálás:** a vizsgálatokhoz szükséges táptalajok és hígítófolyadékok elkészítése és a bennük lévő eredeti mikroflóra elpusztítása.
- **Mintaelőkészítés:** a lezárt minták – szennyezés és fertőzésmentes (aszéptikus) felnyitása, mikrobiológiai minta vétele, aprítás, homogenizálás, alaphígítás elkészítése stb.
- **Leoltás:** az előkészített mikrobiológiai mintából illetve annak megfelelő hígításaiból előírt mennyiség különböző mikrobacsoportok meghatározása érdekében történő megfelelő tápközegekbe való oltása.
- **Inkubálás:** a beoltott táptalajok a mikroba számára optimális hőmérsékleten történő tárolása a mikroorganizmus elszaporodásáig.
- **Kiértékelés:** az elszaporodott tenyészetek vizsgálata alapján a mikroorganizmusok számának, vagy jelenlétének megállapítása.
- **Identifikálás:** a kitenyésztett baktériumok azonosítása morfológiai, biokémiai, szerológiai stb. vizsgálatokkal.
- **Sterilizálás:** A kiértékelt tenyészetekben és a vizsgálathoz felhasznált eszközökön lévő mikrobák elpusztítása (121 °C, 30 perc).
- **Mosogatás:** Az előzetes használat után már sterilizált edényzet elmosása, új edényzet és eszközök előkészítése.
- **Eszközök sterilizálása:** száraz üvegedények és eszközök felületén levő mikroorganizmusok elpusztítása.
- **Törzsfenntartás:** a különböző célokat szolgáló mikroorganizmusok szintenyészeinek folyamatos fenntartása, szükség esetén elszaporítása.

1.3. Mikrobiológiai laboratórium berendezései

1.3.1. A táptalajkészítés és -tárolás berendezései

- Mérlegek: a táptalajkomponensek bemérésére szolgálnak
- Desztilláló berendezés vagy ioncserélő gyantát tartalmazó patron
- pH mérő
- Főzőlap, vagy vízfürdő
- Automataadagoló: több, azonos mennyiségű folyadék kiadagolására szolgáló berendezések



1. kép Adagoló

- Hűtőszekrény: az elkészített steril táptalajok, hűtendő reagensek és fenntartandó törzsek, valamint a beérkezett minták tárolására. A fenntartandó törzseket és a beérkezett mintákat mindig külön hűtőszekrényben kell tárolni.

1.3.2. Az inkubálás berendezései

- **Inkubátor:** a mikroorganizmusok tenyésztésére szolgáló, kívánt hőmérsékletre beállítható szekrények. A régebbi típusoknál a hőmérséklettartást egy szabályozott hőfokú külső vízköpeny biztosítja. A modernebb berendezések állandó légcirkulációval egyenletes belső légeloszlást tesznek lehetővé.



2. kép Inkubátor

https://www.tablázat.hu/labsystem_kereskedelmi_kft./laboratoriumi_inkubator_memmert_in30_inkubator.html

- **Vízfürdő:** a légtermosztátoknál sokkal jobb hőátadás révén gyorsabb hőkiegyenlítődést és pontosabb hőmérséklettartást tesznek lehetővé.



3. kép Több férőhelyes vízfürdő

<http://www.dialab.hu/vizfurdok>

- **Rázógépek:** folyadéktenyészetek folyamatos oxigénellátását is biztosítják a rázatás révén. Főleg aerob mikroorganizmusok tenyésztésénél használják. Kialakításuktól függően egyszerre több lombik rázatását is lehetővé teszik. Vízfürdős változatban, vagy légtermosztáttal egybeépítetten elterjedten alkalmazzák mikroorganizmusok laboratóriumi léptékű szaporítására

1.3.3. Mintaelőkészítés berendezései

- **Homogenizáló berendezés:** régebben un. forgókéses homogenizáló berendezéseket használtak, ma már főleg az élelmiszer-mikrobiológiában - a Stomacher-készülék alkalmazása az általános, amely a sugársterilezett polietilén zsákba tett mintát

mechanikusan homogenizálja. Ez a módszer különösen előnyös, ha a baktériumok kvantitatív meghatározására van szükség.



4. kép Stomacher-készülék

<http://www.applestory.biz/stomacher.html>

- **Rázókeverő:** folyékony minták és a minták hígításainak homogenizálására szolgáló berendezés
- **Fagyasztó:** a bevizsgált mintából minden esetben le kell fagyasztani ($-75 - -80\text{ }^{\circ}\text{C}$) annyit, hogy szükség esetén a vizsgálat újra elvégezhető legyen.

1.3.4. A steril munkavégzés berendezései (Biológiai biztonsági szekrények)

Cél: **mikrobamentes** környezet biztosítása.

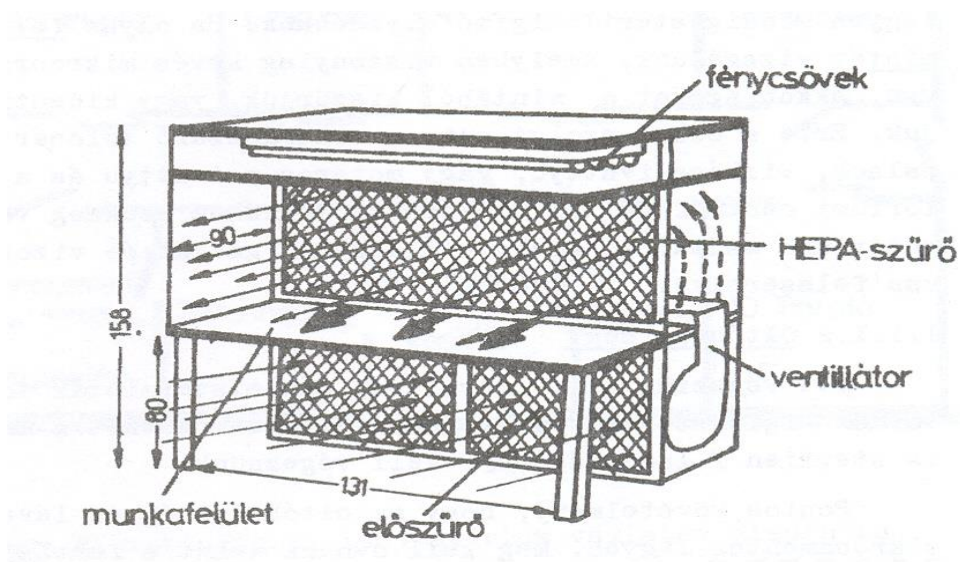
- **Lamináris fülke (box):** A levegő szűrése révén mikrobamentes légteret biztosít a berendezés munkaterében. Elnevezését a lamináris (turbulenciamentes) légáramlás megvalósítása alapján nyerte. Előnye, hogy kis helyigényű, munkatere lehetővé teszi a steril munkát.



5. kép Lamináris fülkék

E szekrénytípus gyakorlati megvalósításához az a megfigyelés vezetett, miszerint a HEPA szűrőn keresztül megközelítően 0,5 m/s-el át hajtott levegő a folyás irányában egy bizonyos távolságra részecskementes levegőjű környezetet tud biztosítani. Ezt a szűrt, rétegezett, nem keveredő légáramlást nevezik „laminar flow”-nak.

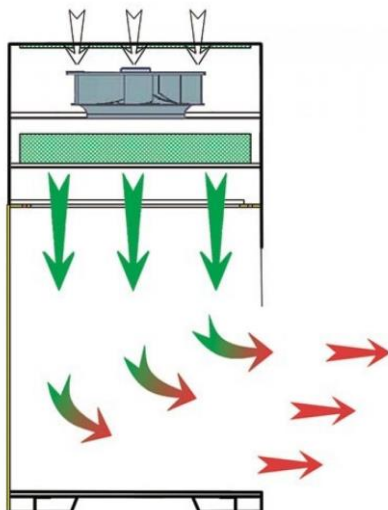
A légáramlás iránya szerint megkülönböztetünk függőleges (vertikális) és vízszintes (horizontális) légáramlású lamináris boxokat.



6. kép Horizontális légáramlású lamináris box

A horizontális légáramlású szekrények közel steril munkakörülményeket nyújtanak, de nem védik meg a dolgozót, mely ki van téve aeroszolok hatásának. Az ilyen szekrények

mikrobiológiai laboratóriumi munkára nem alkalmasak. Használata a táptalajoknak steril edényekbe való kifejtésekor, Petri-csészékbe történő lemez készítésekor, ezek leszárításakor



7. kép Vertikális légáramlású lamináris fülke

<https://www.laboreszkozkatalogus.hu/mikrobiologia/laminaris-biztonsagi-es-elszivo-keszulekek/biobase-vertikalis-aramlasu-laminaris-fulke.html>

A vertikális áramlású fülkékben (lamináris box) a steril levegő fentről lefelé áramlik – megvédve a mintákat a külső szennyeződésektől – majd a munkafelület felett a kezelő felé eltávozik a fülkéből. A fülkében csak a kezelőre nem veszélyes mintákkal szabad dolgozni.

1.3.5. A mikrobiológiai műveletek eszközei

Tenyésztőedények: A mikroorganizmusok szaporítására szolgáló üvegedények. Folyékony tenyészetek készítése céljából általában **Erlenmeyer-lombikokat** vagy **kémcsöveket** használunk. A tenyésztés során ezeket fém-, műanyag- vagy papírdugóval le kell zárni. Szilárd tenyészetek esetén kémcsöveket vagy **Petri-csészéket** alkalmazunk.

A tenyésztőedények jelölése:

1. A mikroorganizmus neve

2. Az oltás dátuma
3. A táptalaj típusa
4. A kivitelező neve

Oltóeszközök: Mikroorganizmusok tenyészeinek, telepeinek továbboltására, tápközegbe vitelére, vagy felületi szélesztésre szolgáló eszközök.

1. Oltókacs: Hőszigetelt végű, leégethető fémnyelű tűzálló fémtüvel vagy hurokkal ellátott eszköz. Sterilizése lángban, leégetéssel történik.

2. Pipetták: Folyadéktenyészetek ismert térfogatának átoltására használhatóak az üvegpipetták, amelyeket fémdobozban száraz hővel sterilizünk.

3. Szélesztőbot segítségével történik a szilárd táptalajra felvitt minta egyenletes eloszlása, ezt a segédeszközt 70%-os alkohollal és lánggal sterilizzuk le.

4. Biopipetták (automata pipetták): Különböző térfogat adagolására alkalmas, cserélhető, sterilizálható műanyag pipetta hegygel



8. kép Laboratóriumi eszközök

1.3.6. A mikroszkópos vizsgálat eszközei

- tárgylemezek (preparátum készítés)
- fedőlemezek

- festőkádat (rögzített preparátumok festésére)
- számlálókamrák

A mikroszkópi preparátumot 75 x 25 mm oldalhosszúságú, általában 1,5 mm vastagságú **tárgylemezek** felületén készítjük. Ezek lefedésére szolgálnak a 18-26 mm élhosszúságú négyzet alakú, 0,16-0,18 mm vastagságú **fedőlemez**ek. A tárgylemezek megfogására szolgál a **tárgylemez-csipesz**. A rögzített preparátumok festésére **festőkádat** vagy festőtálcát használunk. Folyadéktenyészetekben lévő mikroorganizmusok megszámlálását teszik lehetővé az ismert térfogatú osztással ellátott számlálókamrák, mint pl. a **Bürker-kamra**.



9. kép Mikroszkóp

1.4. Sterilizés

Sterilizés alatt értjük a használt anyagok, eszközök teljes csíra- és spóramentesítését. A tiszta tenyészetekkel végzett munkák előtt az eszközökön, tenyésztőedényekben, tápközegben lévő mikrobákat el kell pusztítani. Sterilizés során minden mikróbat elpusztítunk. A dezinficiálás pedig csak a kórokozó mikroorganizmusok elpusztítását jelenti.

Sterilizési eljárások:

1. Fizikai úton:

a.) Sugárzással:

- **UV fény:** (nem ionizáló) (260-265 nm) Az UV (germicid)-lámpákat elterjedten alkalmazzák kórházakban, laboratóriumokban a légtér és felületek csírámentesítésére. Mindemellett tekintettel kell lenni arra, hogy az UV-sugárzás károsítja a szemet, és karcinogén hatása van, ezért az UV-lámpa üzemeltetésekor lehetőség szerint a helyiséget el kell hagyni. Amennyiben erre nincs mód, UV-fényt szűrő szemüveget kell viselni.
- **radióaktív sugárzás:** (ionizáló) ipari méretekben a jó áthatolóképességű, rendszerint kobalt-izotópból származó gamma-sugárzást használják injekciós tűk, fecskendők, kötszerek, gyógyszerek és egyes élelmiszerek (fűszerek) sterilizálására.

b.) Hővel

- **leégetés nyílt lánggal:** oltótű, oltókacs esetében alkalmazzuk átoltások során
- **száraz hővel:** üveg, fémeszközöket, pl. pipettákat, Petri-csészéket sterilizálunk így
- **nedves hővel:** nedves hővel való sterilizálásakor rövidebb idő alatt és alacsonyabb hőmérsékleten érünk el ugyanolyan eredményt, mint száraz hővel történő sterilizálásakor. Táptalajok csak nedves hőben sterilizálhatók. Ezen kívül minden olyan esetben ezt a módszert kell alkalmazni, amikor a sterilizandó eszközök vagy anyagok magasabb hőmérsékleten károsodnak.
 - Pasztörizálás: 60-96 °C 1 óra 40 perc
 - Arnoldozás: áramló gőzben, 100 °C 20-30 perc, vegetatív sejtek elpusztulnak
 - Tyndallozás: 3 egymás utáni napon arnoldoznak. Spórák is elpusztulnak. A *Bacillus* és *Clostridium* nemzetségbe tartozó baktériumok igen nagy ellenállóképességgel rendelkező endospóráinak elpusztítására szolgál.
 - Autoklávozás: nyomás alatt 121 °C-on

2. Kémiai úton:

Kémiai anyagokat hatásuk alapján két csoportba sorolhatjuk: bakteriosztatikus és baktericid hatású. Ezen szerek hatása függ a koncentrációtól, behatási időtől is az anyagi minőségen kívül. A sterilizálás során a baktericid hatást kell elérni. A kémiai szerekkel kapcsolatban az alapvető követelmények, hogy széles spektrumú legyen, környezetre ne legyen káros, könnyen kezelhető és gazdaságos legyen. Fertőtlenítőszerként például a halogének (jód, klór), 70% etanol, peracetsav, kvaterner ammónium vegyületek, oxidálószer (hidrogénperoxid), stb.,

1.5. Önellenőrző feladatok

1. Feladat:

Sorolja fel a mikrobiológia laboratórium főbb munkafolyamatait!

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

A légáramlás iránya szerint milyen steril fülkéket különböztetünk meg?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

Mit értünk sterilizálás alatt?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat

Milyen sterilizációs eljárásokat ismer?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Mire használjuk a Germicid lámpákat? Milyen hullámhosszon működnek?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Tenyésztési vizsgálati módszerek

A tenyésztési módszerek egyrészt lehetőséget teremtenek mikroorganizmusok különböző célra történő fenntartására és elszaporítására, másrészt ezen eljárások segítségével megoldható egyes mikrobacsoportok vagy fajok jelenlétének kimutatása. Ugyancsak ezen módszerek képezik az élősejtszám-meghatározás alapját.

A mikroorganizmusok szaporodásának feltétele a megfelelő tápanyagellátás és környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, redoxpotenciál, vízaktivitás) biztosítása. Laboratóriumi körülmények között ezt a célt szolgálják a különböző összetételű tápközegek, amelyekkel a vizsgált mikrobák tápanyag-, pH-, vízaktivitás- és redoxpotenciál-igénye kielégíthető. A szükséges hőmérséklet termosztátokkal állítható be.

A mikrobák vizsgálata tenyésztés közben vagy tenyésztés után történik. Tenyésztésre táptalajokat használunk. A mikroorganizmusok tápanyagszükségletüket a táptalajból fedezik. A mikroorganizmusok tenyésztése megfelelő tápközegekben történhet, melyeknek tartalmazniuk kell az esszenciális tápanyagokat megfelelő mennyiségben, minőségben és a sejt számára metabolizálható formában. A különböző mikrobák tápanyagigénye rendkívül változatos lehet, de vannak olyan táptalaj összetevők, amelyek alapvetően szükségesek.

2.1. Tápközegek

2.1.1. A táptalajok összetétele

A táptalajoknak tartalmazniuk kell mindazokat az anyagokat, amelyekre a mikroorganizmusoknak szüksége van, és amelyeket maguk szintetizálni nem képesek.

Feltétlenül szükséges táptalajkomponensek: (esszenciális)

- **Víz:** A víz az élő szervezet alapvető komponense, szerepet játszik minden élőlény anyagcsere-folyamataiban. Emellett a táptalajokban a mikroorganizmusok számára, mint környezeti tényező is nélkülözhetetlen. A táptalajok készítéséhez általában egyszer desztillált vizet kell használni.
- **Szén- és energiaforrás:** A táptalajokban a redukált széntartalmú vegyületek kettős célt szolgálnak: egyrészt asszimilatív oxidációs folyamataik révén energiát nyernek belőle, másrészt ezekből építik fel a mikroorganizmusok saját széntartalmú anyagaikat.

Az autotróf mikroorganizmusok képesek a levegő szén-dioxid tartalmát is hasznosítani, a mikrobák döntő többsége azonban a kemoheterotróf csoportba tartozik. A számukra hasznosítható szerves szénforrások igen széles skálája mikrobafajonként eltér, s ez a tulajdonság vizsgálata a mikroorganizmusok azonosításának igen fontos lépése.

A leggyakrabban használt szén- és energiaforrások az egyszerű cukrok (glükóz).

- **Nitrogénforrás:** Az élő anyag bioszintéziséhez szükséges, a leggyakrabban használt szervetlen nitrogénforrások az ammónium-, nitrit- és nitrátsók, szervesek pedig a húskivonat, természetes fehérjék, peptonok, triptonok és az aminosavak.
- **Ásványi anyagok:** Fontos szerepet játszanak egyrészt a sejt ozmotikus nyomásának kialakításában. A mikroorganizmusok ásványianyag-igényét gyakran a csapvíz is kielégíti.

Feltételeken szükséges táptalajkomponensek: (járulékos)

- **Vitaminok, biosz anyagok:** Különböző anyagcsere-folyamatokban - igen kis mennyiségben - szükséges anyagok, amelyeket a mikroorganizmus nem képes előállítani. A baktériumoknak zsírban oldódó vitaminokra és C-vitaminra nincs szükségük. A legtöbbjük a B-vitaminokat is szintetizálni képes, azonban amelyek nem, azoknak ezeket készen kell kapniuk. A laboratóriumi gyakorlatban legáltalánosabban használt komplex vitaminforrás az élesztőkivonat.

2.1.2. A táptalajok csoportosítása

A táptalajok csoportosítása eredet szerint

- **Természetes táptalajok:** Természetes anyagok (növényi vagy állati szövetek kivonatai csapvízzel elkeverve) felhasználásával készülnek. Hátrányuk, hogy összetételük változó, nem pontosan ismert. Pl.: húslé, malátalé, gyümölcscefrék, steril tej.
- **Szintetikus táptalajok:** Minden összetevőjét kvantitatíve és kvalitatíve is ismerjük. Tiszta anyagok desztillált vagy ioncserélt vízben készített oldatai. Ehhez a bioszanyagokat vitamin, vagy természetes táptalaj (élesztőkivonat) formájában adagolják. Szénforrásként tartalmazhatnak egyszerű, vagy összetett szénhidrátokat, alkoholokat, szerves savak sóit. Nitrogénforrásként szerves nitrogénvegyületek (fehérjék, peptonok, aminosavak) vagy szervetlen nitrogénvegyületeket

(ammóniumsók, nitrátok) szerepelhetnek. Az ásványi anyagokat só formájában adagolják a tápközegekhez.

A táptalajok csoportosítása halmazállapot szerint

- **Folyékony táptalajok:** a tápoldat komponensek összemérése során a szilárdító anyagot kihagyjuk (táplevesek, tápoldatok).
- **Szilárd táptalajok:** A folyékony táptalajokból származtathatók szilárdító anyagok (agar-agar, zselatin, szilikagél) hozzáadásával.
 - Agar-agar: poliszacharid, 1-3%-ban használatos tengeri moszatokból (vörösalgából vonják ki) készítik, csak igen kevés mikroorganizmus hidrolizálja. Mivel az agar természetes anyag, összetétele nem definiálható pontosan, csak természetes és félszintetikus táptalajokhoz használható.
 - Zselatin: (polipeptid) Régebben a zselatin volt a legelterjedtebb szilárdítóanyag, ma egyre inkább háttérbe szorul, ami egyrészt igen alacsony olvadáspontjával (35 °C) magyarázható, másrészt azzal a ténnyel, hogy a zselatint számos baktériumfaj elfolyósítja zselatináz enzimje révén.
 - Szilikagél: Előnye, hogy szerves anyagokat nem tartalmaz. A táptalaj készítése időigényes. Szintetikus táptalajokban alkalmazzák.

A táptalajok csoportosítása a felhasználás/funkció szerint

- **Alaptáptalajok:** A szaporodáshoz szükséges tápanyagokon kívül más speciális anyagot nem tartalmaznak.
- **Szelektív táptalajok:** *alaptáptalaj + szelektív gátlóanyag.* A szelektív táptalajok olyan kiegészítő komponenst tartalmaznak, amelyek egyes mikrobacsoportok szaporodását gátolják (pl. antibiotikumok, festékek). A szelektív táptalajok közé tartoznak a módosított pH-jú (erősen savas vagy lúgos) médiumok is.
- **Differenciáló vagy indikátor táptalajok:** *alaptáptalaj + indikátor anyag.* A mikroorganizmusok differenciálására, azonosítására szolgáló táptalajok, amelyek kémiai indikátort, vagy egyéb jelzőrendszert (pl.: Durham-féle fermentációs cső) tartalmaznak, amely speciális reakciókat (pl. savtermelést) jelez. Jellemzőjük, hogy egyes komponenseik szabad szemmel is látható reakciót adnak.

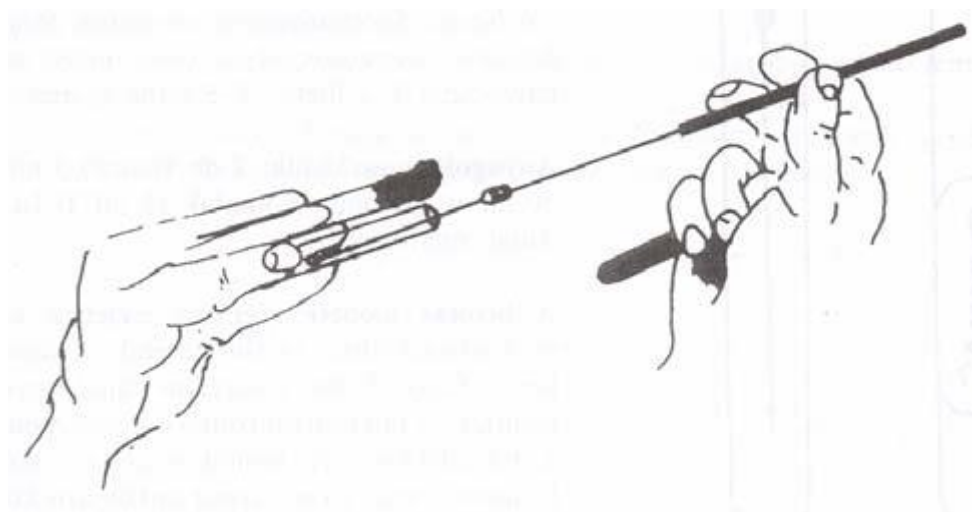
2.3. A táptalajok és hígítófolyadékok készítése és tárolása

1. Először a szilárd alkotókat mérjük be, majd feloldjuk nem teljes térfogatban. Az oldást desztillált vízzel végezzük. Oldódás után állítjuk be a végleges térfogatot. A pH érték beállítása 5%-os HCl ill. 5%-os NaOH-dal történik, finomskálás indikátor papírral vagy műszerrel történő ellenőrzés mellett, majd autoklávozunk/kuktázzuk telített túlnyomásos gőzzel 121°C-on 15 percig. Agar tartalmú táptalajok nyomás alatt sterilizálhatók, zselatin tartalmúak csak áramló gőzben.
2. A hőérzékeny táptalaj komponenseket szűréssel való sterilizálás után adjuk az autoklávozott és megfelelően lehűtött alaptáptalajhoz.
3. A vizsgálat céljától függően a tápközegeket rendszerint a megfelelő tenyésztőedénybe szét kell adagolni. Dolgozhatunk táptalaj lemezen, a felolvasztott táptalajt 15-20 ml steril Petri-csészébe öntjük és vízszintes helyzetben hagyjuk megdermedni. Alkalmazhatunk ferde-agarokat, felolvasztott táptalajt k. 5 ml-ként adagoljuk kémcsőbe, majd ferdére fektetve hagyjuk megdermedni. Speciális vizsgálatokhoz készíthetünk magas-agart 10-15 ml táptalajt adagolunk kémcsőbe és függőleges helyzetben hagyjuk megdermedni. Készíthetünk tápoldatokat amelyeket kémcsővekbe adagolva 5-10 ml mennyiségben.
4. A táptalajokat általában hűtőszekrényekben, 4-8°C-on kell tárolni. A Petri-csészébe fejtett szilárd táptalajokat fordított helyzetben, kell a hűtőszekrénybe helyezni. Kiszáradt, elszíneződött, vagy baktériumos szennyeződés jeleit mutató táptalajokat nem szabad felhasználni. A táptalaj készítésének napját a gyűjtőkosáron, ill. az egyedi táptalajedényen fel kell tüntetni. A hűtőszekrényben tárolt táptalajokat beoltás előtt szobahőmérsékletre kell felmelegíteni

2.4. Gyakorlat: Átoltások gyakorlása

Az elkészített táptalajokat (TGE, LB), melyek különböző tenyésztő edénybe vannak, kiöntve a kiosztott mikroorganizmusokkal le kell oltani.

2.4.1. Oltás ferde agarra



10. kép Ferde agarra történő oltás egy lehetséges módja

A leoltás menete:

1. Bal kézbe fogjuk a leoltandó tenyészetet tartalmazó és az "üres " kémcsövet (10. kép). A csövek helyzete közel vízszintes legyen. Hüvelykujjunkkal a tenyerünkhöz szorítjuk a csöveket. (Rögzíthetjük a csöveket az ujjak közé szorítással is.) Az agar oltandó felülete mindig felénk legyen fordítva.
2. Az üres cső vattadugóját megforgatjuk, hogy könnyen kiemelhető legyen, ha a belefejtett táptalajtól beragadt volna.
3. Az oltóeszközt úgy fogjuk jobb kézzel, mintha íróeszközt fognánk. Közel függőleges helyzetben a gázlángba tartva, felizzítjuk az oltókacsot, majd a nyél fém részét lángoljuk le.

4. Jobb kezünk gyűrűs- és kisujjával kiemeljük a tenyészetes cső dugóját úgy, hogy a kiemelés után a dugó szabad része ne érintkezzen semmivel. Lángoljuk le a kémcső száját.
5. A kaccsal benyúlunk a kémcsőbe, lehűtjük üres agarfelületen. A tenyészetből inokulumot veszünk ki. (Inokulum = az a mikrobamennyiség, amellyel be/le/oltjuk az új táptalajt.) A kacs nem érhet a cső oldalához. Lelángoljuk a kémcső száját, a dugót visszahelyezzük a tenyészetes csőbe.
6. A beoltandó kémcső dugóját kivesszük, lelángoljuk a kémcső száját (vigyázzunk, az inokulum ne érjen a lángba!). Beoltjuk a táptalaj felületét zezgugos vonal mentén lángoljuk a frissen leoltott cső száját, visszahelyezzük a vattadugót. Leégetjük az oltókacsot (először szárítva, majd izzítva), állványba állítjuk, majd állványba helyezzük a kémcsőveket is.

Figyelem! Az egész műveletet a gázláng közvetlen közelében végezzük, ügyelve arra, hogy a beoltás folyamata kellő ütemű legyen, ugyanakkor nagy levegőmozgást széles mozdulatokkal, kapkodással ne keltsünk. A tenyésztőedényeket oltás előtt lássuk el jelöléssel.

2.4.2. Oltás kémcsőből folyékony táptalajba

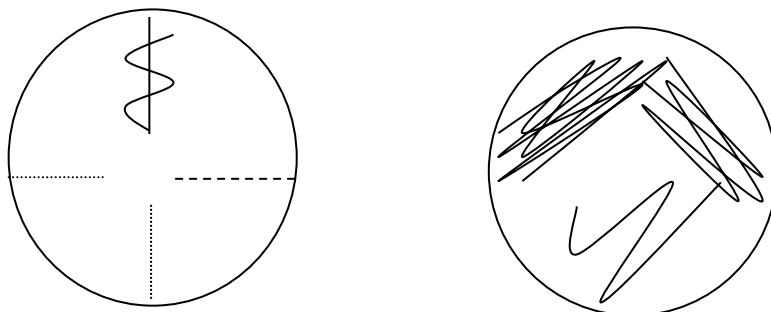
A beoltás menete: az 2.4.1. gyakorlatnál leírtak szerint történik. A mikroorganizmusokat szuszpendáljuk a folyadékban.

2.4.3. Tisztatenyészet előállítása

A szelektív és differenciáló táptalajok alkalmazásával csak a mikroorganizmusok egy-egy szűkebb csoportját tudjuk elkülöníteni, de ezek teljes körű azonosításra nem alkalmasak, ezt a célt a különböző diagnosztikai vizsgálatok (biokémiai, szerológiai stb.) szolgálják. Az azonosíthatóságnak, a mikrobafaj meghatározásának minden esetben előfeltétele a tiszta tenyészet előállítása.

A tiszta tenyészet készítése során egyetlen sejt elszaporodásából származó telepből kell kiindulni. Az átoltás során a vizsgálandó mikroorganizmusokat tartalmazó tenyészetből egysejt eredetű mikroorganizmusokat viszünk át friss, steril táptalajra. A tiszta tenyészet készítésének számos formája használatos a kiindulási és a készítendő táptalaj típusának függvényében. A legelterjedtebb forma a szelektív vagy, differenciáló, folyékony, vagy szilárd táptalajból alaptáptalajra történő átoltás ritkító szélesztéssel. A ritkító szélesztés célja

olyan "vonáskultúra" készítése, melynek eredményeként az inkubálást követően szoliter telepeket is kapunk. A ritkító szélesztés technikáját az alábbi rajz mutatja:



11. kép Különböző szélesztési technikák

2.4.4. Eredmények és értékelés

- ✓ Ellenőrizzük az átvétel eredményességét.
- ✓ Figyeljük meg az átvett mikroorganizmusok színét, telepmorfológiai (fénye-matt felszín) tulajdonságait. Ábrázoljuk megjelenési formájukat.
- ✓ Rögzítsük hogy folyadéktenyészetben milyen a különböző mikrobák tenyésztete (egyformán zavarosít, felületen úszik, kiülekszik, milyen a színük)?

<i>Mikroorganizmus</i>	<i>Tisztatenyészet</i>	<i>Ferde agar</i>	<i>Folyékony tenyészet</i>	
			<i>Keverés előtt</i>	<i>Keverés után</i>

2.5. Önellenőrző feladatok

1. Feladat:

Sorolja fel a feltétlenül szükséges táptalajkomponenseket!

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

Milyen táptalaj-szilárdító anyagokat ismer?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

Csoportosítsa a táptalajokat felhasználás/funkció szerint!

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat

Táptalaj készítése során mivel állítja be a kívánt pH értéket?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Mit nevezünk ritkító szélesztéses oltásnak?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Az élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatok végzésével kapcsolatos alapfogalmak

Az élelmiszerek gyártása során elengedhetetlen a minőség-ellenőrzés az egész munkafolyamaton keresztül. De mit is jelent a minőség, és a minőség-ellenőrzés? Az élelmiszerekre vonatkozóan a minőség fogalmának általános definícióját a Magyar Élelmiszerkönyv határozza meg. Eszerint a minőség az élelmiszer azon tulajdonságainak összessége, amely biztosítja a jogszabályban előírt és a fogyasztók által elvárt követelmények kielégítését. Az élelmiszerekkel kapcsolatos alapvető elvárás, hogy egészségügyi szempontból biztonságos legyen, az emberi szervezetre semmilyen káros hatást ne gyakoroljon. Ez az elvárás a fogyasztó számára annyira természetes, hogy a hétköznapi életben ez nem is kerül általa megfigyelésre. A fogyasztó erről nem is tud meggyőződni, a vásárlás során feltételezi, hogy a megvételre felkínált élelmiszer biztonságos.

A minőségszabályozás a vállalat valamennyi dolgozójának a feladata. A minőségszabályozás alapvetően két fő módon valósul meg, az egyik a helyszíni inspekció (felügyelet), a másik a mintavétel és vizsgálat. A helyszíni inspekció szemrevételezéses ellenőrzés, bizonylatok, dokumentációk átvizsgálásának eredménye alapján feltárni a problémákat és a helyesbítő intézkedéseket meghatározni. A mintavétel és vizsgálat, az előírás szerint vett minták laboratóriumi vizsgálatának eredménye alapján a termék elfogadása, vagy szükség szerint a helyesbítő intézkedések meghozatala. Ez a két tevékenység kiegészíti egymást, hatással vannak egymásra. Fontos, hogy a minőségszabályozással kapcsolatban végzett érdemi tevékenységről minden esetben készüljön dokumentum, jegyzőkönyv. Erre szükség lehet a problémák utólagos azonosítására, az elvégzett ellenőrzések igazolására, a hosszabb távú vállalati elemzések elvégezhetősége érdekében. A minőségszabályozás keretébe tartozó főbb tevékenységek: felhasznált anyagok átvétele, anyagok raktározási körülményeinek ellenőrzése, gyártásközi ellenőrzés, késztermék ellenőrzés, higiéniai ellenőrzés.

3.1. Élelmiszerhigiénia szempontjából fontosabb vizsgálati eljárások

Általános tudnivalók

- Üzemi mikrobiológiai laboratórium feladata:
 - Termék tisztasági fokának, esetleges szennyezettségének meghatározása
 - Indikátor-flóra kimutatása és a termék eltarthatóságának vizsgálata

- Egészségügyi mikrobiológiai vizsgálatok:
- Élelmiszerekben előforduló, emberben betegséget vagy mérgezést okozó csírák kimutatása

3.2. *Mintavételi és –kezelési eljárások*

Az élelmiszerek minőségének, és mikrobiológiai állapotának meghatározása fontos élelmiszer-biztonsági előírás. Mivel sok esetben nincs lehetőség a gyártott termékek összességének elemzésére, szükséges a mintavétel. A mintavételezés során elengedhetetlen a reprezentatív mintavétel. A reprezentatív minta olyan minta, amely egy vagy több szempontból nagy pontossággal megfelel a termék összességének, hűen képviseli a vizsgálni kívánt tétel összességét

Az élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatok végzésének alapvető feltételeit és fogalmait a 4/1998. (XI. 11.) „Az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről” című EüM rendelet határozza meg.

Ezen rendelet szerint kell mikrobiológiai élelmiszer-biztonság szempontjából vizsgálni és elbírálni az: élelmiszer (alapanyag, félkész- és késztermék) termelési és technológiai eszközök (munkafelületek, csomagolóanyagok) az élelmiszerekkel kapcsolatos tevékenységet végző személy tisztaságát.

3.2.1. Alapfogalmak

- **Mikrobiológiai élelmiszer-biztonság (microbiological food safety):** az élelmiszerben előforduló mikroorganizmusok olyan jellemző és mérhető értékei, melyek teljesülése esetén az adott élelmiszer az elfogadható mértéket meg nem haladó kockázat nélkül fogyasztható és eltartható;
- **Elemi minta (mintaelem) (sample):** az élelmiszernek a laboratóriumi vizsgálathoz megfelelő módon elkülönített legkisebb mennyisége;
- **Fogyaszthatóság (best before):** az élelmiszer azon tulajdonsága, amelynek hiányában élelmiszer-biztonsági ok miatt emberi fogyasztásra alkalmatlan;
- **Kórokozó mikroorganizmus (pathogen):** olyan baktérium, vírus, fonális vagy sarjadzó gomba, egysejtű vagy féreg, amely az élelmiszerben való jelenléte, illetve elszaporodása révén, toxinja vagy egyéb káros anyagcsereterméke útján az élelmiszert elfogyasztó személy egészségkárosodását, illetve betegségét okozhatja;

- **Minta (specimen):** meghatározott fajtájú, általában nagyobb mennyiségű élelmiszerből elkülönített, meghatározott számú elemi minták összessége, amely a vizsgálat tárgyát képező élelmiszer élelmiszer-biztonsági mikrobiológiai vizsgálatához és megítéléséhez (minősítéséhez) szükséges;
- **Mintavétel (sampling):** gyártási tételből, kereskedelmi árukészletből a vizsgálat mindenkor céljának megfelelő számú, egy vagy több azonos mennyiségű minta vagy elemi minta elkülönítése laboratóriumi vizsgálat céljára;
- **Tételnek (batch/lot)** nevezzük a termék minősítésére kijelölt minták mennyiségét, melynek két fajtája van: gyártási tétel és kereskedelmi árukészlet;
- **Laboratóriumi minta (laboratory sample):** az a minta, mely laboratóriumba van küldve ellenőrzés vagy vizsgálata miatt;
- **Vizsgálati mintarész (test portion):** megmért reprezentatív minta, amelyet a laboratóriumi mintából az alapsuszpenzió készítéséhez vettünk ki (10 v 25 g (ml));
- **Alapsuszpenzió/első hígítás (initial suspension/ primary dilution):** a vizsgálati mintának szabályosan 9x-es mennyiségű hígítófolyadékkal való elkeverésével kapott szuszpenzió;
- **További decimális hígítások (further decimal dilutions):** az alapsuszpenzió hígítása 1:9 arányban, ez a hígítás addig folytatódik, míg a megfelelő decimális hígítási sort megkapjuk;
- **Hígítófolyadékok (dilution liquid):** peptonos sóoldat; pufferolt peptonvíz; peptonos sóoldat brómkrezolbíborral (0,1ml) (egyes savas termékekhez); foszfátpufferoldat (zselatinhoz).

3.2.2. Mintavétel mikrobiológiai vizsgálat céljára

Az élelmiszer-mikrobiológiai laboratórium fő feladata az élelmiszerekben jelenlevő mikroorganizmusok milyenségének és mennyiségének megállapítása.

A mintavétel módját, kezelését szabvány írja elő.

A mintavétel az a művelet, aminek során valamilyen nagyobb egységből azzal azonos összetételű, tulajdonságú és állapotú, de kisebb mennyiségű, a vizsgálat mindenkor céljának megfelelő részt, a mintát elkülönítik. Azt a nagyobb egységet, amelyből a mintát elkülönítették, mintavételi alapnak nevezzük. A mintavételt megfelelő szakmai képesítéssel és gyakorlattal rendelkező szakembernek kell végeznie. A mintavételezést rendkívül körültekintően kell elvégezni. Víz- és ételminták esetében is ügyelnünk kell a sterilitásra. A

minták számát a körülmények és a célkitűzés határozzák meg. Érdemes minden mintavételi helyről két (párhuzamos) mintát venni. Ez az átlagolást elősegíti, illetve a biztonságot növeli.

3.2.3. A mintavétel és eszközei

A mintaelőkészítés során a mintából aseptikus körülmények között vesszük ki a vizsgálandó mintarészt (lángban sterilizett fém eszközökkel, pipetta). A fém eszközöket használat előtt 70%-os etilalkoholba mártás után lelángoljuk, majd szobahőmérsékletre hűtjük. A szilárd halmazállapotú mintát fel kell aprítani és összekeverni (elektromos meghajtású homogénezők). A beküldött folyékony mintát a vizsgálati minta kivétele előtt alaposan át kell keverni, majd rövid ideig állni hagyni, hogy a légbuborékok felszállhassanak. Sűrűn folyó minta esetén azt előre sterilizett, vagy alkoholban zsírtalanított és alaposan lelángolt, majd lehűlt fém spatulával vagy kanállal meg kell keverni.

Indikátor mikroba-k esetében a vizsgálati anyag a minta 10 g illetve 10 ml, patogén mikroorganizmusok jelenlétének vizsgálatakor (*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*) 25g/25ml.

Mintavételi szabvány előírásai:

- Fagyasztott termékek: 18-27 °C-on max 3 h keresztül tárolni vagy 0-4 °C-on max 24 h át tárolva;
- Porokat a tárolóedényükben kell még jól összekeverni;
- Kemény és száraz termékek: forgó homogenizátorban max 2,5 percig; darálás v őrlés esetén max 1 perc az aprítás a felmelegedés elkerülése miatt;
- Folyékony és nem viszkózus anyagok: többszöri rázását (kb 25x) követően vegyük le a mintát a laboratóriumi tételből;
- Heterogén termék: minden összetevőből olyan mennyiséget vegyünk ki, mely a terméket jellemzi eredeti arányban (töltelék 40%, akkor a mintában is 40% körül legyen), ha darálni kell, akkor itt is figyeljünk a max 1 perc-re;
- Savas termékek esetén az alapszuspenzió pH-ját állítsuk vissza pH semlegesre, célszerű pH indikátor szuszpenziót használni (brómkrezolbíboros peptonos sóoldat), melyet NaOH-dal tudunk beállítani a hígítófolyadék eredeti színére;
- 20% feletti zsírtartalmú élelmiszerek (kiv. margarin és krémek): az emulzióképzés segíthetjük 1-10g/l szorbit-monooleát (Tween 80) adagolással, mely arányos a zsírtartalomhoz (40% zst.-> 4g/l);
- Margarinok és krémek: 3-5 mm-t leszedünk a tetejéről és ezután veszünk mintát több helyről (1 kg-nál nagyobb a csomagolt termék), 1 kg-nál kisebb csomagolású termék

esetén a csomagolást kibontva a tetejéről távolítsuk el egy 3 mm vastagságú részt és ezután vegyünk mintát; ha van kérés a felületről is vegyünk mintát. Vizes fázis előkészítése: 40 g minta + 33 ml hígítófolyadék (függ a zsírtartalomtól: 82% -> $40 \times 0,82 = 33$) -> 45°C-os vízfürdőbe helyezzük, hogy felolvadjon (max 20 min), homogenizátorban keverjük össze, majd hagyjuk állni, hogy szétváljon a vizes-zsíros rész és ezután a vizes fázissal dolgozunk tovább;

- Mag vagy szem alapú termék esetén: 40 g minta+ 360 g hígítófolyadék
- Malomipari termék esetén: 20 g minta+ 180 g hígítófolyadék; figyeljünk, hogy ne ülepedjen le keverés után, nem lesz homogén
- Kemény termékek: steril zacskóban apró darabokra törni pl. kalapáccsal, 20 percig hagyjuk állni a hígítófolyadékban 18-27°C-on, majd homogenizáljuk
- Zselatin: 20 g minta + 180 ml puszfátpuffer hígítófolyadékkal való keverése, 60 percig szobahőmérsékleten állni hagyjuk, 30 min 45 °C-os vízfürdőbe helyezzük és keverjük
- Vízben duzzadó termék esetén (zselésítők, poliszacharidok, dehidratált termékek): hígítófolyadékkal további hígítások készítése (1:20, 1:50, 1:100), hogy használható szuszpenziót kapjunk (kicsi számokat fogunk kapni)
- Gátló hatású termékek esetén: hagymapor, bors, tea, kávé: nagyobb hígítás alkalmazása, vagy K_2SO_3 -mal pufferolt peptonvíz (0,5%)
- Csokoládés és csokoládés édesség: 40°C-os hígítófolyadékba mérjük bele a terméket, keverjük össze, majd hagyjuk állni 20-30 percig és keverjük össze
- Tojás: tojáshéjat fertőtleníteni kell feltörés előtt: papírtörővel és vízzel a felületi szennyeződés eltávolítása, 70%-os ipari denaturált szesszel vagy izopropanollal átitatott gézzel áttörés; tojásfehérje vizsgálata esetén az alaphígítás 1:40 arányú a lizozim gátló hatása miatt
- Fermentált termékek: peptonos sóoldat brómkrezolbíborral, 40 g/l NaOH-val semlegesíteni a hígítófolyadékot, élesztő esetén használjunk gombaellenes szert (cikloheximidet 50 mg/kg vagy nystatin 50 mg/kg vagy amfotericin 10 mg/kg), más termékben lévő mikroflóra esetén használjuk annak gátlására szolgáló antibiotikumot (jegyzőkönyvbe megjegyezni a nevét és a koncentrációját)

Minden mintavételkor mintavételi jegyzőkönyvet kell készíteni, mely felvilágosítást ad a minta eredetére. A mintavétel nem csak az alapanyagok, félkész-, és késztermékekre vonatkozhatnak, hanem a környezet higiéniájának ellenőrzésére is. Környezeti higiénia

ellenőrzésének szempontjából a mintavételezés történhet az élelmiszer előállító berendezésről, gépekről, eszközökről, falakról, padozatról, szociális helyiségek felületéről, illetve ide tartozik az élelmiszer előállítását végző személy higiéniai ellenőrzése.

A mintavételi jegyzőkönyvnek tartalmaznia kell:

- ✓ a mintavétel helyét, pontos dátumát és időpontját;
- ✓ a mintavételi eljárás pontos leírását, illetve a vonatkozó szabvány hivatkozását;
- ✓ a mintavevő személy és a tanúk nevét;
- ✓ annak a tételnek, amiből a mintát vették az azonosító adatai, kódja;
- ✓ az előállító, gyártó, állattenyésztő szervezet elnevezését, címét;
- ✓ a laboratórium elnevezését, címét, ahová a mintákat vizsgálat céljából szállítják;
- ✓ szükség esetén a jegyzőkönyv különböző kiegészítő adatokat is tartalmazhat pl.: a mintavétel környezetére vonatkozó adatok, a mintavétel sajátos módjai eszközei, tárolás, pártartalom, konzerválószer esetleges hozzáadása, homogenitási jellemzők stb.;
- ✓ aláírásokat melyek a mintavételi jegyzőkönyv kitöltését igazolják.

3.2.4. A mintavétel jellege alapján lehet

- **Hatósági mintavétel:** hatósági mintavétel az, amit a hatósági jogkörrel rendelkező szerv, vagy intézmény végez élelmezés-egészségügyi ellenőrzés, felderítés, fogyasztói érdekvédelem, vagy élelmiszer-tétel exportra való alkalmasságának megítélése céljából. (ételmérgezés esetén)
- **Üzemi mintavétel:** Az üzemi mintavételt az élelmiszer előállító üzem minőségellenőrző osztálya vagy üzemi mikrobiológiai laboratóriuma végez abból a célból, hogy gyártásközi, vagy az előállított termék ellenőrzését végezze, illetve mikrobiológiai vizsgálatokat végezzen.
- **Kereskedelmi mintavétel:** Kereskedelmi mintavételt mikrobiológiai feltételek ellenőrzése céljából végeznek, valamilyen kereskedelmi ügyletből kifolyólag.

A mintavételt a felek megbízottjai közösen, vagy csak az egyik fél tanúk jelenlétében végezi, hatósági vagy üzemi tételminősítő mikrobiológiai vizsgálathoz. Hatósági ellenőrzéshez a hivatalos mintavételt csak hivatalos szerv által megbízott személy végezheti.

3.2.5. A mintavétel módja

A kiválasztás módja többféle lehet:

- véletlenszerű (torzítás- véletlen kiválasztás, mikrobák véletlen eloszlása)
- rétegezett (rész-súlyozás)
- többlépcsős (alegységek)

A mintavétel során biztosítani kell, hogy a mintaelemek között azonos valószínűséggel forduljanak elő a higiéniai szempontból aggályos és aggálymentes részek, mert csak így biztosítható az átlagminta vétele. Az ilyen minta jól tükrözi a tétel egészének mikrobiológiai állapotát, ezért reprezentatív mintának nevezik.

A hivatalos mintavételt hatósági rendeletre hivatalos személy végzi. Első minta a laboratóriumi vizsgálatra vett minta. A tétel tulajdonosának kívánságára az első mintával azonos összetételű ellenmintát is venni kell. Ez a tétel tulajdonosánál marad.

3.2.6. Mintavétel formái

A mintavétel formái szerint megkülönböztetünk:

- hatósági felderítő mintavételt (ételfertőzési, ételmérgezési esetek kivizsgálására),
- szűrőpróbaszerű végtermék ellenőrző hatósági, vagy üzemi mintavételt,
- adatgyűjtő, felmérő hatósági vagy üzemi mintavételt,
- hatósági vagy üzemi higiénia ellenőrzésre végzett mintavételt (termelés vagy személyi higiéniai ellenőrzés),
- mikrobiológiai tételminősítő mintavételt (mikrobiológiai feltételek teljesítésének ellenőrzésére).

Az élelmiszer mikrobiológiai minősítéséhez felhasznált tulajdonságok lehetnek:

- Mérési jellemzők, az élelmiszer olyan tulajdonsága, mely adott mértékegységű skálán mérhető (pl. enterobaktériumok száma 1 g vizsgálati anyagban) vagy
- Minősítési jellemzők, az élelmiszer olyan tulajdonsága, melyre nézve csak két besorolási lehetőség van, megfelelő vagy nem megfelelő (pl. tartalmaz-e az élelmiszer szalmonellákat).

3.2.7. Mintavétel végrehajtásának alapvető szabályai

Az elemi minta mennyisége csomagolt élelmisznél általában egy csomagolási egység, egyéb élelmisznél általában 100-250 g vagy ml.

Felületek tisztaságának vizsgálatánál az elemi mintát általában 100 cm² felületről kell venni (tamponminta).

Mikrobiológiai vizsgálathoz az élelmiszermintát aszeptikus körülmények között kell venni, hogy ne kerülhessenek bele külvilágból származó mikrobák. A mintavételnél használt eszközöknek (kanál, kés, vajfűró, csipesz, pipetta)-sima felületűeknek és jól sterilizálhatóknek kell lenni.

A mintát olyan steril edényzetbe tesszük, amely lehetővé teszi a biztonságos szállítást, tárolást. Oldalára címkét ragasztunk az alábbi adatokat megadva:

- A mintavétel időpontja
- A mintavételi jegyzőkönyv sorszáma
- A minta jelzése (száma)

A mintát olyan módon (pl. hűtés biztosításával) kell a vizsgáló laboratóriumba szállítani, hogy a mintavétel időpontjára jellemző állapota megmaradjon, szállítás közbeni sérülése, zárásának megnyitása a laboratóriumba érkezéskor észlelhető legyen. A mintát a laboratóriumba szállítást követően sürgősséggel kell feldolgozni. (A csomagolás megbontása után 30 percen belül.) Ha a mintát feldolgozásig tárolni kell (legfeljebb másnapig 0-4 °C-on, kivétel: nem romlandó minta pl. konzerv, szárított), a tárolás idejére olyan feltételeket kell biztosítani (pl. hűtés, mélyhűtés), hogy a minta állapota lényegesen ne változzon meg.

4/1998 Egészségügyi Minisztériumi rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről

A rendelet magában foglalja azon kórokozókat, melyek nem lehetnek az élelmiszerekben (*Salmonella* sp., *L. monocytogenes*) és az egyéb mikroorganizmusoknak a megengedhető sejtszámát különböző élelmiszerek esetén.

Mintavételi terv

A mintavételi terv egy vagy több mikrobiológiai jellemző elfogadási követelményeit állapítja meg, egy meghatározott tételre vonatkozólag, adott számú elemi mintának, vagy csomagolási egységnek a szabványokban előírt vizsgálati eljárásokkal történő kiértékelése alapján. A mintavételi terv az alábbi elemekből áll:

- **N** = a vizsgált tétel teljes mennyisége vagy a csomagolási egységek száma
- **n** = az N nagyságú, vagy számú egységből elkülönítendő elemi minták száma
- **m** = a megfelelő mikrobiológiai határérték, mely esetében az élelmiszer aggálymentesen fogyasztható.
- **M** = a visszautasítás határértéke
- **c** = tűréshatár vagy tolerancia, az „m” és „M” érték közé eső, azaz még elfogadható elemi minták eltűrhető száma., megengedett „selejt” száma

1. táblázat 4/1998 EüM rendelet alapján előírt vizsgálatok egyes nyershúsok esetén

Megnevezés	Vizsgálat	n	c	m	M
Nyershús, hústermékek					
Dabarbolt hús, belsőség, darált hús, baromfi- egész és darabolt	<i>Salmonella</i>	5	-	-	0/25g
	<i>S. aureus</i>	5	2	10^2	10^3
	<i>E. coli</i>	5	2	50/g	5×10^2
	<i>Mikrobaszám</i>	5	2	10^6	10^7

Ha meghatározott mennyiségű élelmiszerben mikroba nem lehet jelen ezt tört szám fejezi ki, amelynek számlálója 0 (mikroba), nevezője a vizsgálandó élelmiszer g vagy ml mennyisége (pl. 0/25 = 25 g-ban vagy ml-ben mikroba nem lehet jelen)

Az élelmiszerek élelmiszer-biztonság mikrobiológiai megítélése

Szűrőpróbaszerű mintavétel esetén

- **Megfelelő** a vizsgált minta, ha a II. részben megadott „m” értéket nem éri el és a 2. számú mellékletben szereplő kórokozóval nem szennyezett.
- **Tűrhető** a vizsgált minta, ha a mikrobák száma a II. rész szerinti „m,” értéket eléri, vagy meghaladja, de az „M” értéket nem éri el és a 2. számú mellékletben szereplő kórokozóval nem szennyezett.
- **Kifogásolt** a vizsgált minta, ha tiltott kórokozó, illetve határértéken felüli kórokozó mutatható ki benne, illetőleg a II. részben felsorolt mikroorganizmusok száma meghaladja az „M” értéket, illetve nem elfogadható rovar és rágcsáló szennyezettség állapítható meg.

Ha a minta kórokozó miatt kifogásolt az eredmény a még fellelhető mintavételi alapra is vonatkozik. Ilyen esetben a még fellelhető termékeket tételnek, illetőleg árukészletnek kell tekinteni, és tétel, illetőleg árukészlet minősítő vizsgálatnak kell alávetni.

Tétel vagy árukészlet vizsgálata esetén

- **Megfelelő** az élelmiszer, ha a megvizsgált elemi minták megfelelnek a II. rész előírásainak és a 2. számú mellékletben szereplő kórokozóval nem szennyezettek.
- **Tűrhető** az élelmiszer, amely az „M” értékre előírt követelményeket ugyan kielégíti, de a még megengedett „c” értéket a szennyezett minták száma meghaladja.
- **Kifogásolt** az élelmiszer, ha a minta nem tesz eleget a 2. számú melléklet előírásainak, illetve ha a II. részben megadott „M” értéket egy elemi minta mikroorganizmus száma meghaladja, továbbá ha nem elfogadható mértékű rovar és rágcsáló szennyezettség állapítható meg.

Mintavételi tervek fajtái

- **Kétrendszerű (egyhatáros) mintavételi terv**, amelyet általában kórokozó mikrobák vizsgálata esetében alkalmaznak, és csak egyetlen határértéket az "M"-t állapítják meg minősítés céljából.

2. táblázat 4/1998 EüM rendelet: a tojáspor szalmonella vizsgálatának mintavételi terve

Megnevezés	Vizsgálat	n	c	m	M
Tojás és tojáskészítmények					
Tojáspor	<i>Salmonella</i>	10	-	-	0/25g

- **Háromrendszerű (kéthatáros) mintavételi terv**, mely szennyező, indikátor vagy minőségkárosodást előidéző mikrobák vizsgálata esetén alkalmazható értékelés. Ebben az esetben az adott számú "n" elemi mintára nézve az "m" értéket elérő vagy meghaladó elemi minták eltűrhető számát "c"-t - ez a tolerancia érték -, továbbá az "m" és az "M" határértéket használják.

3. táblázat 4/1998 EüM rendelet: a tojáspor *S. aureus* vizsgálatának mintavételi terve

Megnevezés	Vizsgálat	n	c	m	M
Tojás és tojáskészítmények					
Tojáspor	<i>S. aureus</i>	5	2	10 ²	10 ³

3.3. Önellenőrző feladatok

1. Feladat:

Mi az üzemi mikrobiológiai laboratórium fő feladata?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

Mit nevezünk reprezentatív mintának? Hány gramm élelmiszer mintát kell bemérni patogén illetve szennyező mikroorganizmusok esetén?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

A mintavétel jellege alapján lehet:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat

Az élelmiszer mikrobiológiai minősítéséhez felhasznált tulajdonságok lehetnek:

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Mit állapít meg a mintavételi terv?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések vizsgálata

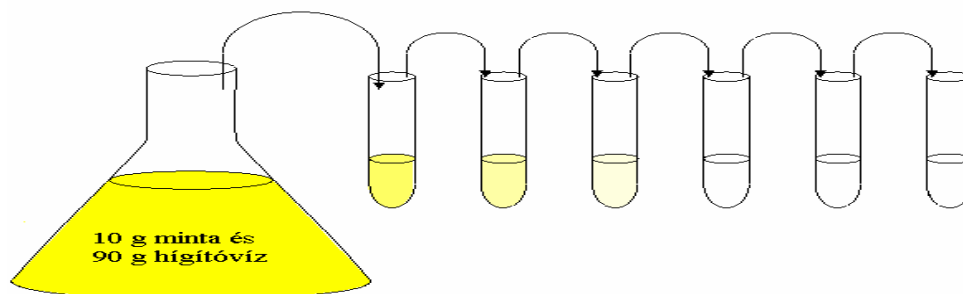
4.1. Mintaelőkészítés

1. Mintaelőkészítés: szintén aseptikus-steril legyen.

- Homogénezés (törzssuszpenzió előállítás)
 - Folyékony minta- összerázás, keverés habzás elkerülésével
 - Szilárd minta- oldás és/vagy aprítás hígítófolyadékban (üveggyöngyök, dörzsmozsár, mixer, Stomacher)

2. Hígítási sorozat készítés

- Hígítófolyadék- steril csapvíz, peptonvíz, fiziológias só oldat
- Aseptikus, homogén manipuláció- lelángolás, összerázás
 - Első decimális hígítás = a vizsgálandó minta adott bemért mennyiségének 9-szeres mennyiségű hígítófolyadékkal való összekeverése után előálló oldat, illetve szuszpenzió. Leggyakrabban 10:90, illetve 25:225 arányú beméréseket használunk.
 - További decimális hígítás



12. kép Hígítás eljárás menete

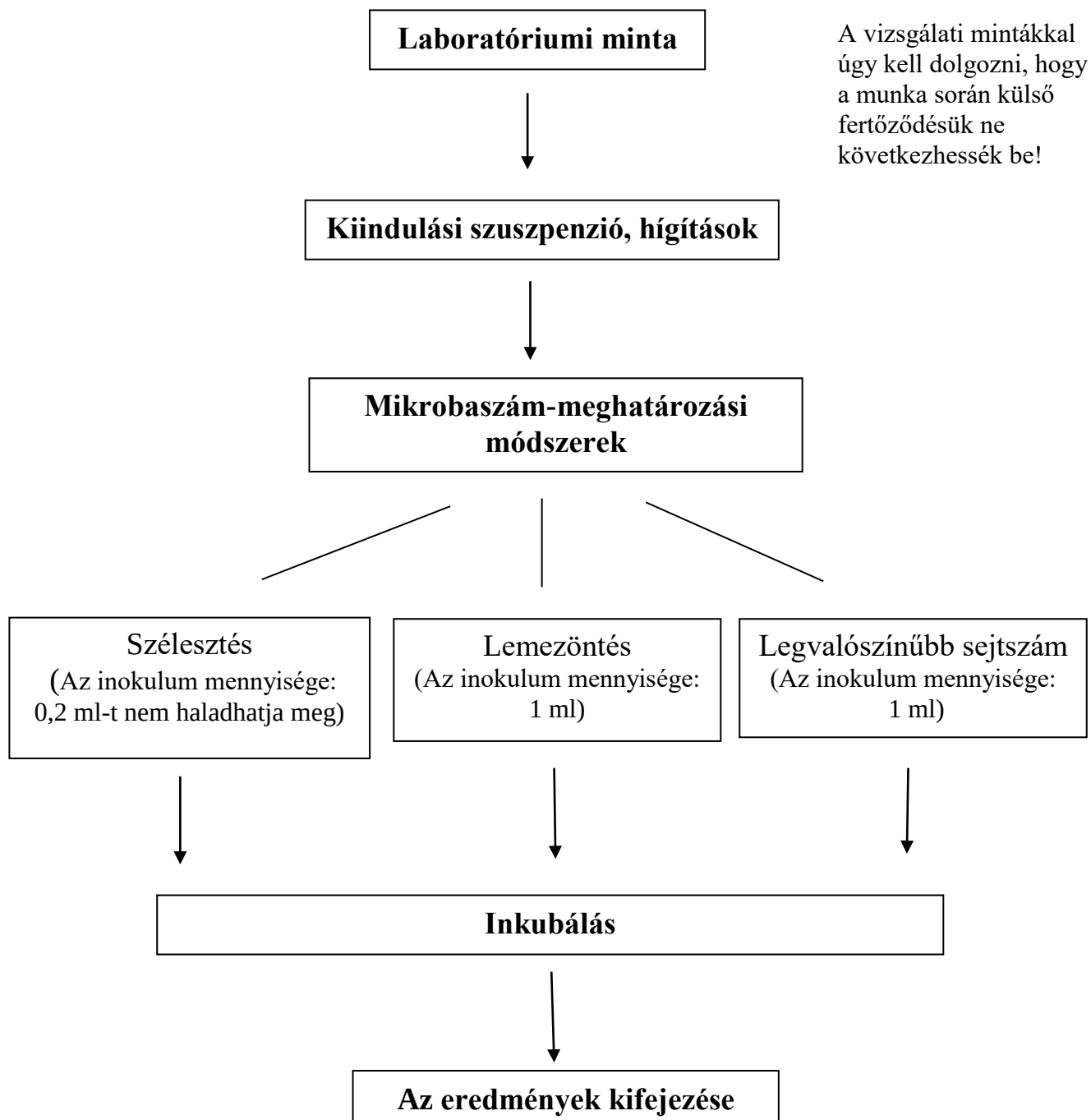
4.2. Táptalajok beoltása

A táptalajok beoltása során célszerűen úgy járunk el, hogy a legnagyobb mértékű hígításból (pl. 10^5) kiindulva és fokozatosan a csökkenő hígítások (növekvő sejtkoncentrációk) irányába haladva a pipetta tartalmát (alapos összekeverés céljából) minden tagban háromszor felszívjuk, majd visszaengedjük, mielőtt átvisszük a mennyiségeket a táptalajokba. -> A beoltott táptalajokat megfelelő hőmérsékleten és ideig inkubáljuk. Inkubált tenyészetek elbírálása és azonosítása.

4.3. Azonosítás

Az egyes elemi mintákat - *Salmonella* és *Listeria* kimutatást kivéve - külön-külön kell feldolgozni és értékelni. *Salmonella* fajok és *L. monocytogenes* kimutatására végzett dúsítási vizsgálatokban megengedett több elemi minta együttes feldolgozása is.

4.4. Mikrobaszám-meghatározási módszerek



Szélesztés, lemezöntés esetén a sejtszám meghatározás

$$\bar{C} = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) * V * d}$$

C =telepszám súlyozott középértéke

$\sum c$ =a számításba bevont valamennyi lemezen számolt telepek összes száma (az első értékelhető és az azt következő hígítási fokok)

n_1 =az első értékelhető hígítási fokhoz tartozó lemezek száma

n_2 =a második értékelhető hígítási fokhoz tartozó lemezek száma

d =az első értékelt hígítási szint hígítási foka (pl. 10⁻²)

V =a lemezekre vitt kultúra mennyisége

(lemezöntésnél esetben 1 ml, szélesztésnél 0,1 ml)

MPN módszer esetén a sejtszám meghatározás

Az elbírálás első lépése az előírt inkubálás után a kulcsszám meghatározása. A kulcsszám egy háromjegyű szám, amelyet három egymást követő hígítási szinten a mikrobaszaporodást mutató pozitív csövek számából határozzuk meg. Ezt követően az un. Hoskins-féle táblázatból ki kell keresni a kapott kulcsszámhoz tartozó alapértéket, majd ezt meg kell szorozni a kulcsszám első tagjához tartozó hígítási fokkal. Az így kapott értéket normál alakba hozva adjuk meg a vizsgálat eredményét (211 → 13 x 10¹ = 1,3 x 10² sejt/ml).

4.5. Fontosabb indikátor mikrobák

A korokozó, az ételfertőzést illetve ételmérgezést okozó baktériumok kimutatása bonyolult és hosszadalmas eljárás, különösen akkor problematikus, ha az élelmiszerekben nagyon elszaporodott a kísérő mikroflóra. Ebben az esetben a rendszerint kis számban és egyenlőtlen megoszlásban jelenlévő kórokozók csak nehezen tenyésztethők ki. Ennek a problémának kiküszöbölésére az élelmiszerből a környezetben nagy számban előforduló nem kórokozó, meghatározott mikroba csoportba tartozó könnyen és viszonylag gyorsan kitenyésztethető baktériumok meghatározását veszik igénybe. Ezeket jelző, vagy más néven indikátor mikrobáknak nevezik, jelenlétükből következtetni lehet az élelmiszert ért szennyezés tényére, illetve ennek mértékére. Az indikátor mikroorganizmusok megengedettnél nagyobb számban való előfordulása esetében fokozottan kell számolni patogén mikrobák jelenlétével vagy az

általuk termelt toxinok felhalmozódásával. Az indikátor mikrobák jelentősége abban is kifejezésre jut, hogy fejlődésükhöz ugyanolyan mikroökológiai feltételeket igényelnek, mint a kórokozók, ezenkívül a vizsgálati anyagban általában nagy mennyiségben fordulnak elő és eloszlásuk viszonylag egyenletes.

Az indikátor mikroorganizmusok kimutatásának célja az, hogy segítségével könnyen és gyorsan fel lehessen tárni egy gyártási folyamat azon körülményeit, amelyek egészségügyi kockázatot jelentenek a fogyasztó számára.

4.5.1. Mikrobaszám (összes élő, aerob és fakultatív anaerob, mezofil és fakultatív pszichrotrof mikrobák száma, összcsíraszám)

Az élelmiszerek többsége fogyasztásra alkalmatlan, ha nagyszámú nem kórokozó mikroorganizmust tartalmaz. Ez jelezheti a gyártásnál felhasznált nyersanyag rossz minőségét, vagy pedig azt, hogy a nem felelő módon való feldolgozás, vagy tárolás során volt meg a lehetőség a mikroorganizmusok elszaporodására. Ezáltal jelzi a nem megfelelő gyártástechnológiát (rossz hőkezelés).

Ha magas az élelmiszerben levő élő mikrobák száma, akkor az csak korlátozott ideig tárolható, vagy tartósító eljárás után is nagy lesz benne a maradék mikroflóra.

Az összes élő mikrobák kimutatásakor 30°C hőmérsékletű inkubálást alkalmazunk aerob körülmények között.

Aerob és fakultatív anaerob mikrobák számának meghatározása (telepszámlálás)

Nem szelektív tápagar felületén illetve belsejében 30 °C-on 48-72 órán inkubálva:

- Felületi szélesztés módszer (0,1 ml-t mérünk az agar felületre);
- Lemezőntéses módszer (1 ml-t mérünk üres, steril csészébe, majd tápagart öntünk rá).

Aerob mikrobák számának meghatározása folyékony táptalajban

A hígításokból 1 ml mennyiséget mérünk kiadagolt nem szelektív tápoldatokhoz 3-3 párhuzamos felhasználásával (Hoskins) 48 órán inkubáljuk.

4.5.2. *Staphylococcus aureus* kimutatása

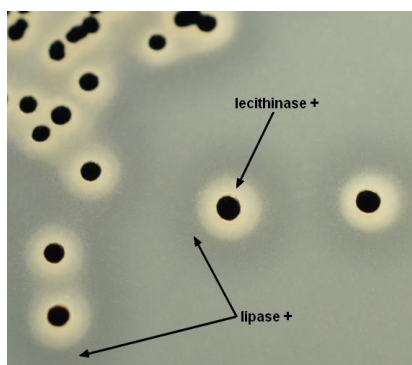
A *Staphylococcus* nemzetségbe tartozó, Gram-pozitív, fakultatív anaerob gömb alakú baktérium *S. aureus* általánosan elterjedt a környezetben, legtöbb háziállatunk is hordozója. Az egészséges emberek több mint 50%-ában is megtalálható, főként a bőrfelszínen és a

légutak nyálkahártyáján. Többnyire ártalmatlan szaprofita. Élelmiszerbiztonsági jelentőségüket a törzsek egy része által termelt hőálló enterotoxinok adják, melyek megfelelő mennyiségben a fogyasztó szervezetébe jutva ételmérgezést okoznak. A *Staphylococcus aureus* ha 10^6 CFU/g mennyiségben fordul elő az élelmiszerekben, akkor enterotoxin termelése következtében ételmérgezést képes előidézni. Lényeges tudni, hogy az élelmiszerekben található mikrobák száma nem feltétlenül arányos a toxin mennyiségével, mivel ez a mikrobák pusztulása után is hatékony marad. Ellenálló mikroba, amely 6 és 47 °C közötti hőmérsékleten is képes osztódni, 20 és 45 °C között pedig toxint termelni. Szaporodik 4,3–8,0 pH-intervallumban, és 0,86-os vízaktivitási értékig, viszont enterotoxin termelése már 0,92-es a_w -értéknél leáll.

Staphylococcus aureus kimutatása telepszámlálás módszerrel

- Hígításokból 0,1 ml mennyiséget szélesztünk litium-kloridot, kálium-telluritos tojássárgája emulziót tartalmazó Baird-Parker-féle agar felszínére,
- A leoltásokat 37°C-on, 24-48 órán át inkubáljuk,
- 24 óra múlva: gombostűfejnyi, szénfekete színű, kerek, domború, sima szélű, csillogó telepek fehér szegéllyel, melyet feltisztult udvar vesz körül,
- 48 óra múlva: a telepek kölesszem nagyságúak, a feltisztult udvar megnövekszik illetve a telepek egy részénél széles opálos zóna is megjelenik.

A Baird-Parker táptalaj litium-kloridot és telluritot tartalmaz, mely a kísérő mikroflóra gátlására szolgál. A piruvát és glicin szelektíven erősíti a *Staphylococcus* fajok növekedését. A táptalajhoz tojássárgája is hozzá van adva, mely a táptalajt opálössé teszi, így a lipolízis és proteolízis következtében jellegzetes zóna/udvar keletkezik a telepek körül. A *S. aureus* telepek színe fekete, mely a tellurit redukciója során alakul ki telluriummá.



13. kép *S. aureus* telepek Baird-Parker agaron

http://www.bacteriainphotos.com/staphylococcus_aureus_colonies_on_baird_parker_agar.ht

Jellegzetes telepek azonosítása

Az eredeti lemezeken kifejlődött feltételezetten pozitív telepekből azonosításra kiválasztunk n számú, de legalább 5 kolóniát.

- Gram-festés: A Gram-féle festésnél legalább 2 telepből készítünk kenetet, majd mikroszkópban, immerziós nagyítással vizsgáljuk meg. A kékes-feketére színeződött, szőlőfürtszerűen elrendeződött mikrobák jellemzőknek minősülnek.
- Koaguláz-próba: Tárgylemez próbánál a vizsgálandó telepet tárgylemezen egy csepp vízben elkeverjük, majd hozzáadunk egy csepp előzetesen 37 °C hőmérsékletű termosztátban felmelegített házinyúl vérplazmát és összekeverjük. Pozitív esetben 5 másodpercen belül makroszkóposan is látható csapadékképződés jelentkezik. (Használjunk pozitív kontrollként *Staphylococcus aureus*, negatív kontrollként pedig *Staphylococcus epidermidis* törzseket.)

4.5.3. Kóliform baktériumok és az *Escherichia coli* kimutatása

Az Enterobacteriaceae családnak a laktózt 30°C-on bontó nemzetségeit (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Escherichia*) Kóliformoknak (Coliformok) nevezzük. Állati és emberi normál bélflórájának tagjai, ahol lényeges a vitamintermelésük és a korokozó mikrobák antagonizálása. Az élelmiszerekben való előfordulásuk bélsár kontamináció lehetősége vetődik fel.

Kóliform baktériumok számának meghatározása folyékony táptalajban

A kóliform baktériumokra jellemző, hogy epét vagy epesót tartalmazó szelektív táptalajban 30 °C-on a laktózt gázképződés mellett bontják.

- Hígításból 3-3 párhuzamos Brillantzöld-laktóz-epe (BBL) folyékony tápközebe viszünk 1-1 ml folyadék mennyiséget,
- A leoltásokat 30 °C-on 24-48 órán át inkubáljuk,
- Kóliform gyanús a zavarosodást mutató illetve a Durham-féle erjesztési csőben legalább egytized részét kitevő gázképződés mutatkozik. Kóliform negatívnak azok a szubkultúrák tekinthetők, amelyekben gázképződés egyáltalán nem figyelhető meg, vagy az erjesztési cső térfogatának egytized részénél kevesebb gáz termelődött.

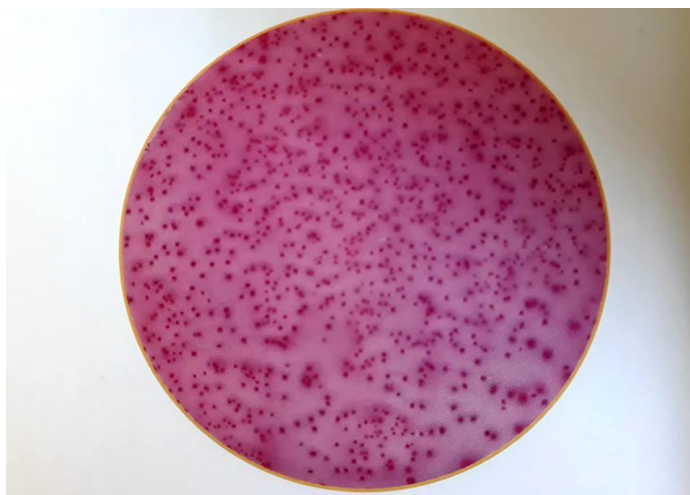


14. kép Kontroll, Negatív, Pozitív BBL tápközeg

Kóliform baktériumok számának meghatározása 30 °C hőmérsékleten telepszámlálással

Kóliform baktériumoknak minősülnek a telepszámlálós módszernél a laktózt, epét, vagy epesót tartalmazó szilárd szelektív és differenciáló táptalajok belsejében vagy felületén 30°C hőmérsékleten a tejcukrot savképződés mellett bontó, jellegzetes telepeket adó mikroorganizmusok.

- A hígítási sorozat megfelelő csöveiből 1–1 ml-t mérünk steril Petri-csészékbe, majd felolvasztott és 45 °C-ra lehűtött VRBL-agarral lemezeket öntünk,
- A lemezek megszilárdulása után ugyanebből a folyékony agarból még kb. 4 ml mennyiséget azok felületére öntünk,
- A megszilárdult tenyészeteket 30 °C hőmérsékletű termosztátban 24 órán keresztül inkubáljuk, majd megszámoljuk a jellegzetes telepeket azokban a lemezekben, amelyekben számuk 15 és 150 közé esik. A jellegzetes telepek ennél a módszernél sötétpiros színűek és legalább 0,5 mm átmérőjűek.



15. kép *E. coli* VRBL agaron (Merck)

Escherichia coli számának meghatározása szilárd táptalajon

- A kóliform pozitívnak minősített telepekből indulunk ki, úgy hogy kolóniát oltótűvel 2–2 brillantzöld-laktóz-epe (BBL) folyékony tápközegbe oltunk, majd egyiket 30 °C-os termosztátban, a másikat pedig 44,5 °C hőmérsékletű vízfürdőben inkubáljuk 48 órán át,
- *Escherichia coli* gyanúsak minősítjük a mindkét hőfokon zavarosodást és az erjesztési csőnek legalább egytized részét kitevő mennyiségű gázképződést mutató csöveket,
- A gyanús tenyészet 44,5 °C hőmérsékleten inkubált tagjaiból VRBL-agarra szélesztünk, majd a lemezeket 37 °C hőmérsékleten egy napig inkubáljuk,
- A VRBL-agaron kifejlődött jellegzetes telepekkel elvégezzük az IMVIC-próbákat (IMV(E)C-próbák).

IMVIC-próbák

- Az indolképzési-próba során az *E. coli* képes a triptofánt indollá és pirosszőlősavvá bontani, mely izoamil alkohollal történő reakció során meggypiros rozindol gyűrűt képez. A kimutatás során triptonvízbe oltott és 24 órán át 44,5±0,1 °C hőmérsékletű vízfürdőn inkubált tenyészethez 0,5 ml Kovács-reagenst adunk, összerázzuk, majd egy perc múlva értékeljük. Pozitív esetben a felszínen meggypiros elszíneződés keletkezik.
(+)
- Metilvörös-próba során, ha a baktérium a szénhidrátot kevertsavas úton bontja el, akkor metilvörös indikátor színe vörösre változik a keletkezett különböző savak

hatására. A kísérlet során a telepet pufferolt glükózlevesbe oltjuk, majd 24 órás, 37 °C-on való inkubálás után 1–2 csepp metilvörös reagenst teszünk hozzá. Pozitív esetben az egész leves színe élénkpirosra, negatív esetben pedig sárgára változik. (+)

- A Voges-Proskauer próbával tudjuk kimutatni, ha a baktérium a szénhidrátot butándiolos erjedés útján bontotta le, mely során acetoin köztermék keletkezik, amely naftolt tartalmazó, lúgos kémhatású közegben piros színű vegyületté alakul. A kimutatás során felhasználhatjuk a metilvörös próbánál igénybe vett glükóz-leves egy részét. Ehhez 0,6 ml Barrit A, 0,2 ml Barrit B, majd jól összerázzuk. Pozitív esetben 2 óra múlva a tenyészet felső részén rózsaszínű elszíneződés keletkezik. (-)
- A citráthasznosítási próba elvégzése megmutatja, mely baktérium képes a citrátot szénforrásként felhasználni, a kísérlet során a citrát bontás következtében a táptalajban lévő brómtimolkék indikátor kékké változik, mivel a citrát hasznosítás közben a közeg enyhén lúgosodik. A vizsgálandó tenyészetet alaplevesbe oltjuk, 4-6 órán keresztül 37 °C-on inkubáljuk, majd belőle oltótűvel citrátos magas-ferde agarba szúrunk és felületén is szélesztünk. 24-48 órás 37 °C-on végzett inkubáció után elbíráljuk. Pozitív reakció esetében a táptalaj eredeti zöldes színe kékre vagy sárgára változik, negatív esetben a táptalaj színe változatlan, és baktériumnövekedés sem figyelhető meg. (-)

Escherichia coli kimutatása folyékony táptalajban

- A kóliform pozitív tenyészetek mindegyikéből egy-egy normál kacsnyi mennyiséget oltunk át brillantzöld-laktóz-epe (BBL) folyékony tápközegbe, majd ezeket 44,5±0,1 °C hőmérsékleten 48 órán át vízfürdőben inkubáljuk (Eijkman-próba).
- Az elbírálásnál gyanúsnak tekintjük a zavarosodást mutató, valamint a Durham-cső legalább egytized részéig gázt termelt tenyészeteket. Ezekből a csövekből kioltást végzünk VRBL-agar felületére, majd 37 °C-on 24 órán át inkubáljuk azt.
- Feltételezetten *Escherichia coli*-nak tekintjük a 2 mm átmérőjű, kerek, tejcukorbontó, tehát élénk piros színű telepeket. Ezek közül lemezenként 5–5 telepet kiválasztunk, majd zselatinos agarra szélesztünk, és az előzőkhöz hasonló körülmények között inkubáljuk, majd elvégezzük velük az IMVIC-próbákat.

4.5.4. Enterobaktériumok kimutatása

Az enterobaktériumok az Enterobacteriaceae-családba tartozó, rövid pálcika alakú mikroorganizmusok. Általában körkörös csillókkal rendelkeznek, a nitrátot nitráttá redukálják, a glukózt sav vagy sav és egyidejű gázképzéssel fermentálják, oxidáz negatívak. Az emberi és állati béltraktusban, a felszíni vizekben és a talaj mikroflórában gyakoriak.

Enterobaktériumok kimutatása folyékony tápközegben

- A hígítási sorból 1–1 ml-t oltunk brillantzöld-glukóz-epe folyékony tápközegbe 3–3 párhuzamossal, majd a csöveket 37 °C hőmérsékleten 24 órán át inkubáljuk. Ezután minden leoltott csőből kristályibolya-neutrálvörös-glukóz epe (VRBG) agarra végzünk kiszélesztést. VRBG-agaron a jellegzetes telepek sötétvörös színűek, ugyanilyen csapadékos udvarral övezettek és legalább 0,5, de általában 2–3 mm átmérőjűek.
- Biokémiai azonosításra lemezenként legalább kettőt választunk ki, majd a telepekből nutritív agarra szélesztünk és egyidejűleg szőlőcukros magasagarba is leoltunk.
- A leoltásokat 24 óráig 37 °C-on inkubáljuk. A nutritív agaron kinőtt telepekből kaccsal vagy üvegpálcával kis mennyiséget leveszünk, majd oxidáz-reagenssel előzetesen átitatott szűrőpapírra kenünk, majd 10 mp múlva elbíráljuk. Pozitív esetben a szűrőpapír sötétlila színűre változik. Enterobaktérium esetén a reakció mindig negatív.
- A szőlőcukros magasagarba oltott baktérium szaporodásakor pozitív esetben, – ha a mikroba csillós, akkor a táptalaj egészére, nem mozgó törzs esetén pedig a szűrési csatorna teljes hosszára kiterjedő sárga színváltozás mellett – általában gázképződés jelei is megfigyelhetők. Negatív esetben a táptalaj eredeti színe nem változik meg, enterobaktérium esetén pedig a reakció pozitív.

Enterobaktériumok számának meghatározása telepszámlálással

- A hígítási sorból 1–1 ml mennyiséget steril Petri-csészékbe mérünk, majd VRBG-agarral lemezeket öntünk.
- Megszilárdulás után még kb. 4 ml-nyi táptalajt öntünk a felszínükre, majd a fedőréteg megdermedését követően 37 °C-on 24 órán át inkubáljuk a lemezeket.

- Az értékelés során azokat a tenyészeteket vesszük figyelembe, amelyeken a jellegzetes telepek száma 15 és 150 közötti. Jellegzetesnek tekintjük a sötétvörös színű, és ugyanilyen csapadékkal körülvett, legalább 0,5 mm átmérőjű telepeket.
- Az azonosításkor a VRBG-lemezekről $\sqrt{n}$ számú, de legalább 5 – ennél kevesebb kolónia esetén mindet – jellegzetes telepet veszünk, majd ezeket egy másik VRBG-agarra szélesztjük, illetve egyidejűleg szőlőcukros magasagarba oltjuk.
- A leoltott táptalajokat 24 órán át 37 °C-on inkubáljuk, majd a kifejlődött telepek egyikével elvégezzük az oxidáz-próbát. Az oxidáz- és a glukózbontási próbát a már ismertetett elvek szerint bíráljuk el.



16. kép *Enterobacter* sp. VRBG agaron

4.5.5. Az enterokokkuszok kimutatása

Az enterokokkuszok egyrészt, mint indikátor mikrobák, másrészt, pedig mint ételmérgezést előidéző baktériumok egyaránt jelentősek. Származhatnak friss bélsár-szennyezettségből, de a külvilágban hosszabb időn át is életképesek maradhatnak, ezért nem feltétlenül bizonyítják a friss fekáliás kontaminációt. Élelmiszer-mikrobiológiai szempontból fontos *Enterococcus faecalis* a nem spórák baktériumok közül igen ellenálló a környezeti behatásokkal szemben, így a fertőtlenítőszerrel szemben is, ezért jó indikátora az eszközök és felületek tisztításának, fertőtlenítésének. Hőkezelt élelmiszerekben termorezisztenciája következtében előfordulhat, ezért jelezheti a hőkezelés elégtelenségét vagy az utószennyezést. Ha mennyisége élelmiszerben eléri a 10^6 nagyságrendet, akkor ételmérgezést is okozhat.

Enterokokkuszok jellemzői:

- Képesek fejlődni +10 és +45 °C közötti hőfokon;
- túlélnek a 60 °C hőmérsékleten végzett 30 perces hőkezelést;
- 6,5% konyhasót tartalmazó tápoldatban, illetve

- pH 9,6 mellett, továbbá
- 0,1% metilénkéket tartalmazó tejben, valamint
- 40% epét tartalmazó véres agaron jól fejlődnek.

A vizsgálat történhet MPN-módszerrel, vagy telepszámlálással.

- Az MPN-módszernél hígításonként 1–1 ml mennyiségeket oltunk 3–3 nátrium-azidot tartalmazó enterococcus dúsító táptalajba, majd a csöveket 37 °C hőmérsékleten 48 órán át inkubáljuk. Pozitívnak értékeljük a zavarosodást, illetve a sárga színátcsapást mutató tenyészeteket.
- Telepszámlálásnál a hígításokból 0,1-0,1 ml mennyiséget szélesztünk nátrium-azidos színváltozással jelző Chromocult Enterococci lemez felületére, majd 37 °C-on 48 órán át inkubáljuk azokat. Enterokokkusz gyanúsak tekintjük a lemezek felületén kifejlődött 0,5–1,0 mm átmérőjű, kerek, kissé elődomborodó felszínű, sima, piros színű telepeket.



17. kép *Enterococcus* sp. *Chromocult Enterococci* agaron

Jellegzetes telepek azonosítása

- Gram-festés: Azonosítás során első lépésben a Gram-festést kell elvégezni, MPN-módszer esetén közvetlenül a zavarosodást illetve sárga színátcsapást mutató levestáptalajokból, szilárd táptalajok esetén pedig minden gyanús teleppel.
- Kataláz-próba: A kataláz-próbát úgy végezzük, hogy 10%-os hidrogén-peroxidot cseppentünk közvetlenül a gyanús levestenyészetbe. Pozitív esetben élénk pezsgés vagy habzás figyelhető meg, negatív esetben pedig – legfeljebb a hidrogén-peroxid önbomlása következtében – kismértékű buborékképződés látható. Szilárd táptalajokról

levett telepekkel – lemezenként ötten – tárgylemez-próbát végzünk. Ennek során tárgylemezre cseppentett 10%-os hidrogén-peroxidba a vizsgálandó telepről levett mákszemnyi tenyészetet keverjük, majd az elbírálást a már ismert módon végezzük. Az enterokokkusok mindig kataláz negatívak.

- Hőtűrőképesség vizsgálata: A Gram-festéssel és a kataláz-próbával gyanúsnak bizonyult tenyészetekből kicsinyi mennyiséget oltunk át 1–1 húslevesbe, majd 37 °C-on 24–48 órán át tartó inkubáció után a leveseket 30 percen át 60°C-os vízfürdőben hőkezeljük, majd belőlük alapos összekeverést követően újabb levesekbe végzünk leoltást, melyeket az eredetihez hasonló körülmények között inkubálunk. Inkubálás után a zavarosodást mutató tenyészetekkel ismét elvégezzük a kataláz-próbát és ennek negatív eredménye alapján a tenyészetet enterokokkusnak minősítjük. Az enterokokkusnak minősített csövek számának alakulását a Hoskins-féle táblázat alapján értékeljük. Telepszámláláskor megszámoljuk a lemezeken kifejlődött 10 és 300 közötti jellegzetes kolóniákat, majd az 5 azonosításnak alávetett telep eredményének arányában adjuk meg az enterokokkusok számát.

4.5.6. Mezofil szulfitredukáló összes klosztridium és klosztridiumspóra kimutatása

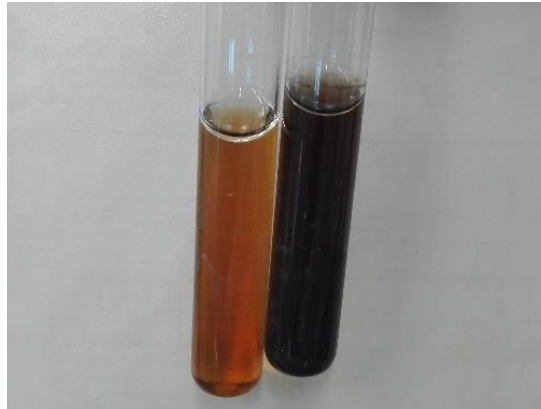
Bacillaceae-család *Clostridium* nemzetségébe tartozó, 37 °C hőmérsékleten anaerob körülmények között fejlődő baktériumok, csillókkal rendelkeznek kivéve (*C. perfringens*), jól mozgó Gram-pozitív pálcák. Spóráik tojás vagy gömb alakúak, centrikusak, szubterminális vagy terminális elhelyezkedésűek. Általában erős szénhidrát és fehérjebontó sajátossággal rendelkeznek. Az emberi és állati béltraktusban, a talajban, vizek üledékében gyakran fordulnak elő. A szulfit-ionokat szulfiddá redukálják

A *C. botulinum* és a *C. perfringens* élelmiszerek fogyasztása következtében jellemző tünetekkel járó megbetegedést, más fajok pedig az élelmiszerek káros szennyeződését okozhatják.

Szulfitredukáló összes klosztridium kimutatása folyékony tápközegben

- A hígításból 1–1 ml mennyiséget viszünk RCM féle cisztein tartalmú szulfitredukációs folyékony tápközegbe, 3–3 párhuzamos készítésével,
- A csöveket 80 °C hőmérsékleten 20 percig hőkezeljük, végül áramló vízben 37 °C-ra hűtjük le azokat,

- Hűtés után a beoltott tápközegekhez hozzá mérünk 1 ml vas-citrátot oldat formájában, majd paraffinolajjal zárjuk le,
- 37 °C-on 48 órán át inkubálunk,
- Feltételezeten pozitívnak tekintjük azokat a csöveket, ahol fekete csapadék keletkezett.



18. kép Negatív, H_2S képződés RCM folyékony tápoldat

4.5.7. Penész-élesztő szám kimutatása

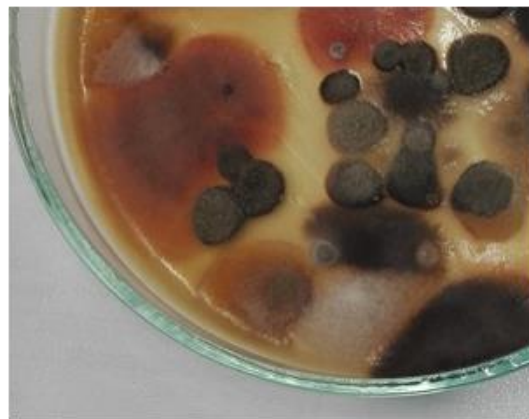
Élesztőgombák

Az élesztőknek köszönhető a kenyér kelesztése, a sör és a bor erjesztése, sok más anyagcseretermék ipari méretű termelése. A nagy gazdasági haszon mellett azonban az élesztők jelentős kárt okoznak az élelmiszerek romlásával; kórokozó csak kevés van köztük.

Az élesztőgombák heterotróf aerob szervezetek, a fajok mintegy fele fakultatív anaerob és jellegzetes alkoholos erjesztést végez.



19. kép *Saccharomyces cerevisiae*



20. kép Penészgomba telepek Malátás agaron

Penészgombák

A penészgombák megjelenése mindennapi életünkben többnyire káros tevékenységként jelentkezik. Jelentős gazdasági és egészségügyi probléma a növénytermesztésben, az állattenyésztésben és az élelmiszeriparban. Növényi nyersanyagokon elszaporodva és azok tápanyagait felhasználva, egyrészt élelmiszerként emberi fogyasztásra alkalmatlanná teszik őket, másrészt takarmányként csökkentik energia- és tápértéküket.

Élelmiszerek vonatkozásában különös jelentőségre tettek szert a mikotoxinokat képző és a fogyasztók egészségét súlyosan veszélyeztető penészgombák. Ezért az élelmiszer-tartósításnak mindig célja a penészgombák elleni védekezés. A romlást okozó és toxintermelő penészekkel szemben sok faj értékes anyagokat képez, iparilag hasznosított biokémiai átalakításokat végez (antibiotikumok, szerves savak, enzimek).

Penész-élesztő szám meghatározása telepszámlálásos módszerrel

- Szelektív tápagar (Malátás agar) felületén illetve belsejében 30 °C-on 48-72 órán inkubálva,
- Felületi szélesztés módszer (penészgombák),
- Lemezöntéses módszer (élesztőgombák).

4.5. Önellenőrző feladatok

1. Feladat:

Mit nevezünk első decimális hígításnak?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

Milyen hígítófolyadékot lehet alkalmazni élelmiszer vizsgálat esetén?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

Mikrobaszám meghatározásnál mely mikroorganizmusokat tudjuk kimutatni?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat

Baird-Parker-féle agar melyik mikroba kimutatására szolgál? Jellemezze a táptalajt!

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Mi jellemző a Coliformikra?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Fontosabb patogén mikrobák

5.1. *Salmonella* kimutatása

Salmonella nemzettség

A *Salmonella* genusz az Enterobacteriaceae családba tartozik. A szalmonellák fakultatív anaerob, Gram-negatív baktériumok, 2-5 µm hosszú pálcikák és csillózzal rendelkeznek. Biokémiai tulajdonságuk, hogy a laktózt, a szacharózt nem bontják, indolt nem termelnek. A Voges-Proskauer próba negatív. Kén-hidrogént képeznek (feketedés).

A szalmonellák ürülékkel kerülnek a környezetbe (vízbe, talajba, növényzetre), ahol hosszú ideig túlélhetnek, bár nem szaporodnak. Emberben a fertőzés kétféle megbetegedést okozhat. Az egyik a hastífusz, amely enterális lázzal jár, és emberről emberre terjedhet, a másik a szalmonellózis (gasztroenteritisz), amely élelmiszerfertőzés útján kerül be a szervezetbe. A tojás fertőződhet germinatív (ovogen) úton, illetve bélsárral történő kontamináció révén. A tojás belsejébe a meszes héj pórusain keresztül juthatnak be.

A szalmonellák élelmiszerekben való előfordulására vonatkozó előírás az, hogy 25 g-ból ne legyen kimutathatóak.

5.1.1. Salmonellák kimutatása hagyományos tenyésztési eljárással

A Bizottság 2073-2005/EK rendelete az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól

- Kimutatási protokoll: MSZ EN ISO 6579 szerint
- Mintavétel:
 - 25g (vagy egyes esetekben 10 g) minta
 - 100 cm² lemosásával vagy ismert mennyiségű
- Minta előkészítése: homogenizálni, majd azonnal leoltani. Szükség esetén 0-5°C-on 1 órát lehet várakozni.

1. Elődúsítással kombinált dúsítás

A szalmonellák gyakran olyan kevés számban találhatók az élelmiszerekben, ezért közvetlen leoltás nem biztos. A kimutatás biztonsága érdekében a vizsgálati anyagot pufferolt peptonvízzel homogenizáljuk (225 ml), 1 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, ha szükséges, akkor a pH-értéket semlegesre korrigáljuk, majd 36±1 °C hőmérsékleten 6–16 órán át inkubáljuk. Az elődúsító nem szelektív hatású tápközeg, a technológiai folyamatokban sérült szalmonellák felfrissítéséhez szükséges.

2. Szelektív dúsítás

A szelektív dúsító (Rappaport 90 ml) a kísérő mikroflóra visszaszorítását végzi, és a salmonellák biztonságosabb kimutatását segítik elő. Az inkubálás után az elődúsítóból 10 ml mennyiséget oltunk a közvetlen dúsítás céljából.

Rappaport (Rappaport-Vassiliadis Soya Peptone broth): A malachitzöld és a magnézium-klorid gátolja a bélben található mikroorganizmusok növekedését, de a legtöbb *Salmonella* szaporodását nem befolyásolja. A malachitzöld visszaszorítja a *Shigella* fajok növekedését is. Majd 24 órán át $36\pm 1^\circ\text{C}$ hőmérsékleten inkubáljuk.

3. Kioltása szelektív és differenciáló agarlemezre

A differenciáló lemezeken (Rambach, XLD) a *Salmonella* gyanús telepeket biokémiai reakciókkal azonosítják. Erre a célra alkalmas az ún. politróp tápközegek, amelyeknél egy kémcsőben több biokémiai folyamat eredménye figyelhető meg. (TSI)

- Rambach agar: A Rambach-agar a propilén-glikol bontás és a β -galaktozidáz enzim kimutatása alapján differenciál. Ezen a táptalajon a gyanús telepek piros színűek, de egyes fajok esetében színtelen telepek kialakulása tapasztalható (*S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. typhi-suis*, *S. gallinarum*). A kóliformok ezen a táptalajon kékeszöldek, míg a *Proteus* és a *Shigella* nemzetségbe tartozó baktériumok pedig színtelenek.
- XLD (Xylose-Lysine-Desoxycholate) Agar: Az agarban lévő nátrium-dezoxikolát gátolja a nem kívánatos mikroflórát, A táptalaj mind a *Shigella* és *Salmonella* fajok azonosítására alkalmas, a táptalajon lévő megkülönböztetés a xilóz fermentációja miatt lehet, a *Shigella* fajok nem képesek bontani (vörös telep). A benne lévő lizin a *Salmonella* fajok elkülönítése miatt van hozzáadva a táptalajhoz. A *Salmonella*-gyanús telep színe megegyezik a táptalaj színével (piros-bíbor) és fekete közepe van (H_2S képződés miatt).
- Hektoen-agar esetén a benne lévő epesó gátolja a nem kívánatos mikroflórát. A táptalajban lévő laktóz, szalicin, szacharóz bontása alapján a bélbaktériumokat lehet megkülönböztetni. A vas-ammónium-citrát bontása hatására fekete színváltozás (hidrogén-szulfid) lesz, mely esetén a *Salmonella*-telepek közepe fekete, a táptalajban lévő indikátorok miatt a telep széle kékes-zöldes színű.



21. kép *Salmonella* sp. XLD agaron (Merck)

4. Azonosítás

A differenciáló lemezekben a *Salmonella* gyanús telepeket biokémiai reakciókkal azonosítják. Erre a célra alkalmas az ún. politróp tápközegek, amelyeknél egy kémcsőben több biokémiai folyamat eredménye figyelhető meg. (TSI)

- TSI (Triple Sugar Iron agar): A „politróp”, többféle vizsgálat elvégzésére alkalmas táptalajokat széleskörűen alkalmazzák a baktérium diagnosztikában. A TSI agar teszt általánosan használt az enterobaktériumok (bélbaktériumok) jellemzésére.

A táptalaj glükózt alacsony (0,1%), szacharózt és laktózt magas (1,0%) koncentrációban tartalmaz. Beoltás után a baktériumok a glükózt kezdik bontani, emiatt a közeg pH-ja csökken, a fenolvörös indikátor színe sárga lesz a ferde felületen és a magas részen egyaránt. Kb. 8-10 óra inkubálás után a mikrobák elhasználják a glükózt. A laktózt vagy szacharózt hasznosítani képes fajok folytatják a savtermelést. Az említett cukrokat hasznosítani nem tudó fajok a táptalaj fehérjéit kezdik el bontani, ami az aminosavak felszabadulása miatt lúgosítja a közeget. Mivel ez utóbbi folyamat csak aerob körülmények között megy végbe, csak a ferde felület színe változik vissza vörösre. (Ha nem-fermentatív mikroorganizmus kerül a TSI táptalajra, a táptalaj színe mindenhol vörös marad.) Az erjesztés alatt néhány faj kénhidrogént szabadít fel. Ez a gáz a táptalaj vas-szulfát tartalmával reagálva fekete csapadékot hoz létre a kémcső alsó részén. Más mikroorganizmusok gázt termelhetnek, amit buborékok, szakadások jelenléte mutat vagy néhány esetben a teljes táptalaj a kémcső aljától a dugó irányába mozdul.



22. kép *Salmonella* sp. TSI agaron

5. További biokémiai azonosítás

Valamennyi telepet ún. rövid biokémiai sorra oltjuk. Ezt a rövid biokémiai sort még kiegészítik egy ferde agarral, egy húslevesrel és a Nógrády-Ródlér-féle politróp táptalajjal is. Ez utóbbi táptalaj felhasználásával egyidejűleg vizsgálható a kérdéses baktérium-törzs kénhidrogén termelése, karbamid hidrolízise, valamint a laktóz, a szaharóz és a dextróz aerob és fermentatív bontása.

Biokémiai sor

- TSI
- Karbamid-bontás (-)
- Indol-próba (-)
- Lizin leves (+)
- ONPG (-)
- V-P-próba (-)
- Savképzés (+)
- Gázképzés (+, -)

A fentiekben leírtak alapján a TSI politróp tápközegben egyszerre vizsgáljuk a szénhidrát bontási képességet, kén-hidrogén képződést és a gáztermelést is.

A biokémiai sor vizsgálata esetén a karbamid bontás során (ureáz enzim aktivitás) esetén a gyanús telepből szuszpenziót készítünk, majd karbamid tápoldatba oltunk, melyet 37 °C-on

inkubálunk 24 órahosszáig. Ha ureáz enzim aktivitás volt, a karbamidból ammónia fejlődött, mely a közegben lévő fenolvörös indikátor jelenléte miatt az oldat színe rózsaszínes lilásra változik a lúgosodás következtében.

Indol-próba során baktérium képességét vizsgáljuk, hogy a triptofánt képes-e bontani (4.5.3. fejezet IMVIC próba – indol-próba).

VP- próba során a szénhidrát bontást útját vizsgáljuk, mely során butándiol útvonalon képes bontani a baktérium a tápoldatban lévő szénhidrátot (glükóz) (4.5.3. fejezet IMVIC próba – indol-próba).

Lizin dekarboxilálás próba során lizin tartalmú tápközegbe oltjuk le a baktériumot, inkubáció után (24 óra, 37 °C), ha a lizin bontódik CO₂ szabadul fel és kadaverin keletkezik. E folyamatot a tápközegben lévő brómkrezol-bíbor indikátor jelez, mely során a tápközeg az enyhén lúgosodás miatt rózsaszínre változik és zavaros lesz a tápközeg.

ONPG (orto-nitrofenil-galaktozid-piranozid) reakció során a béta-galaktozidáz enzim kimutatása történik, mely például *E. coli*, *Klebsiella* sp. esetén pozitív, *Salmonella*, *Shigella* sp. esetén negatív. ONPG tartalmú tápoldatba oltjuk az előre felszaporított telepről vett mintát, majd 24 órahosszáig inkubáljuk 37°C-on. Ha a baktérium rendelkezett béta-galaktozidáz enzimmal, akkor pozitív a minta, melyet a sárga színváltozás mutat. Egyes baktériumok a laktózt képesek pár percen belül (5-10 percen) fermentálni, így az ONPG teszt alapján meg tudjuk határozni a gyors vagy lassú laktóz fermentációt is.

5.2. *Listeria monocytogenes* kimutatása

Listeria* nemzetség és *Listeria monocytogenes

A nemzetségbe jelenleg 10 faj tartozik. A fajok közül a *L. monocytogenes* (emberek és állatok esetén), a *L. ivanovii* és a *L. seeligeri* fajok (elsősorban állatok esetén) patogének.

A *Listeria monocytogenes* Gram-pozitív, rövid pálca alakú, csillós baktérium. Az 1-2 µm vaskos pálca, 25°C-on csillós, jellegzetes bukfencező mozgást végez, amely alapján könnyen beazonosítható a baktérium. Tokkal nem rendelkezik, spórát nem képez, és a vörösvértestek pusztulását okozó béta-hemolizint termel. Kataláz pozitív és oxidáz negatív baktérium. Spórát nem képez. Az eszkulint hidrolizálja, a glukózból, maltózból és a szalicinből savat képez, míg a mannitot és a xilózt nem bontja. Indolt nem termel, az ureumot nem hidrolizálja és nem képez kénhidrogént. A metilvörös és Voges-Proskauer próba pozitív, a nitrátot nem redukálja nitráttá. A fagyasztást többnyire túléli, a felületeken biofilmet képezhet. 10% NaCl-ot

tartalmazó közegben a *L. monocytogenes* még szaporodik, így a páclevekben érlelődő készítmények sem tekinthetők biztonságosnak.

Kimutatása élelmiszerek esetén a 4/1998 EüM rendelet értelmében 25 g vagy ml-ben nem lehet kimutatható.

5.2.1. *Listeria monocytogenes* kimutatása hagyományos tenyésztési eljárással

MSZ EN ISO 11929-1:1998, 11929-2:1998

Figyelmeztetés

- A laboratóriumban dolgozó személyek egészségének védelme szempontjából fontos, hogy a *Listeria monocytogenes* kimutatását megfelelően felszerelt laboratóriumban, képzett mikrobiológus irányítása alatt végezzék, nagy gondot fordítva a tenyészetek megsemmisítésére.
- Különösen fontos, hogy terhes nő ne dolgozzon *Listeria monocytogenes* tenyészetekkel

1. Első dúsítás (Csökkentett hatóanyagtartalmú, szelektív dúsító)

- 1 térfogatrész lítium-klorid
- Fél-fél térfogatrész akriflavin és nalidixsav

Fraser- leves fele mennyiségű hatóanyaggal: Az általa biztosított optimális növekedési feltételek, a nagy tápanyag-koncentráció és a nagy puffer kapacitás kedvező a *Listeria* fajok számára.

A kísérő mikrobiótát alkotó baktériumok szaporodását a benne lévő lítium-klorid és egyéb antimikrobás anyagok gátolják. Inkubálás 24 óra 30 °C.

2. Második dúsítás (teljes hatóanyag tartalmú, szelektív dúsító)

Az első dúsításból nyert tenyészetből (10 ml) a teljes hatóanyag tartalmú szelektív dúsító beoltása (0,1 ml). Inkubálás 35 vagy 37°C-on 48 órán át.

3. Kioltás (szélesztés)

- PALCAM-agar: Egy szelektív és differenciáló tápközeg *Listeria monocytogenes* törzsek székletből, biológiai anyagokból, élelmiszerekből és erősen szennyezett környezeti anyagokból való kimutatására és izolálására. Az agar, amely szelektivitását a lítium-klorid és egyéb gátló komponens tartalmának köszönheti, gátolja a Gram-negatív és a Gram-pozitív baktériumok többségének növekedését. A *L. monocytogenes*

a táptalajban lévő eszkulint glükózzá és eszkuletinné alakítja. Mint az előzőekben már említettük, az eszkuletin a vas(III) ionokkal olajzöld-fekete komplexet képezve megfesti a telepeket. A mannit-pozitív, esetlegesen jelenlévő baktériumok - mint például a különböző *Staphylococcus* fajok - növekedésük során sárga telepeket hoznak létre. A mikroaerofil körülmények között 48 órán át 30-37 °C-on inkubálni kell a lemezeket. Majd 1 órán keresztül állni hagyjuk a szabad levegőn, hogy a táptalaj visszanyerje rózsaszín-bíbor színét. A 24 óra inkubálás után kicsi vagy nagyon kicsi, szürkés-zöldes vagy olívazöld színű 1,5-2 mm átmérőjű telepeket képeznek fekete középponttal, de mindig fekete udvarral. 48 óra után a telepek zöldek, közepük bemélyed és fekete udvar veszi körül őket.



23. kép *Listeria monocytogenes* PALCAM agaron

- ALOA agar: Agar for *Listeria* Ottavani and Agosti *L. monocytogenes* kimutatására alkalmas, melyen a *L. monocytogenes* telepek a táptalajban lévő kromogén komponens következtében zöldes színűek és opálos udvar veszi körbe a telepeket a baktérium foszfatidilinozitol specifikus foszfolipáz enzim aktivitása miatt.



24. kép *Listeria monocytogenes* ALOA agaron

- Oxford-agar: Egy alternatív szelektív táptalaj a *Listeria monocytogenes* törzsek izolálásához és kimutatásához. Az agart lítium-kloriddal, antimikrobás anyagokkal és egy festékkal egészítik ki, ezért a Gram-negatív és a Gram-pozitív baktériumok többségének növekedése visszaszorul. A *Listeria monocytogenes* az eszkulinból eszkületint szabadít fel, amely fekete komplexet alkot a vas (III) ionokkal, ezért a *Listeria monocytogenes* törzsek fekete udvarú, barnás-zöld telepeket hoznak létre az aerob körülmények között inkubált lemezeken. A beoltott Oxford-agar 30°C-on történő inkubálása olyan élelmiszerek esetében alkalmazható, amelyek kis mértékben szennyezettek kísérő mikroflórával.

A táptalajokat 30, 35 vagy 37 °C-on 24 órás (szükség esetén 48 órás) inkubálás után megvizsgáljuk. Amennyiben fejlődtek feltehetően *Listeria monocytogenes*-re jellemző telepek az eredményt további vizsgálatokkal erősítjük meg.

Megerősítés - *Listeria* fajok

1. Telepek kiválasztása

- 5-5 *Listeria*-gyanús telep kiválasztása (ha nincs 5 akkor a maximális számút).
- Szélesszük a kiválasztott telepeket száraz felületű tripton szója élesztőkivonat agarlemez (TSYEA) táptalajra.
- Helyezzük a lemezeket 35 vagy 37 °C-os termosztátba 18-24 órára vagy amíg kielégítő fejlődést nem tapasztalunk.
- A jellegzetes telepek domborúak, színtelenek, nem átlátszóak, átmérőjük 1-2 mm, ép szélűek.

2. Kataláz reakció

- Szuszpendáljunk tárgylemezen egy izolált telepet egy csepp hidrogén-peroxid-oldatban.
- Az azonnali buborékképződés pozitív reakciót jelez.

3. Gram-festés

- Az egyik izolált telepen végezzük el a Gram-festést.
- Gram-pozitív, rövid, karcsú pálcát kell kapnunk.

4. (szükség esetén) Mozgásvizsgálat

- Egy izolált telepet szuszpendáljunk TSYEB tápoldatot tartalmazó kémcsőben.

- Inkubáljuk 25 °C-os termosztátban 8-24 órán át amíg a tápoldat zavarossá nem válik. Ennél magasabb hőmérséklet esetén a mozgás hiányozhat.
- A *Listeria* fajokra jellemző, hogy mozognak és esernyő formájú növekedést mutatnak.

Megerősítés – *Listeria monocytogenes*

1. Hemolízisvizsgálat

- Juhvéres agar lemezre oltunk
- Miután jól kiszáritottuk az agar felületét az izolált telepből valamint pozitív (*L. monocytogenes*) és negatív (*L. innocua*) kontrolltenyészetéből szűrőkacccsal oltunk le a lemez különböző részeire.
- 35 vagy 37 °C-on végzett inkubálás után vizsgáljuk meg a vizsgálati- és a kontrolltörzseket.
- A *Listeria monocytogenes* esetén keskeny, világos, fényes zóna (β -hemolízis) mutatkozik.

2. Szénhidrátlebontás vizsgálata

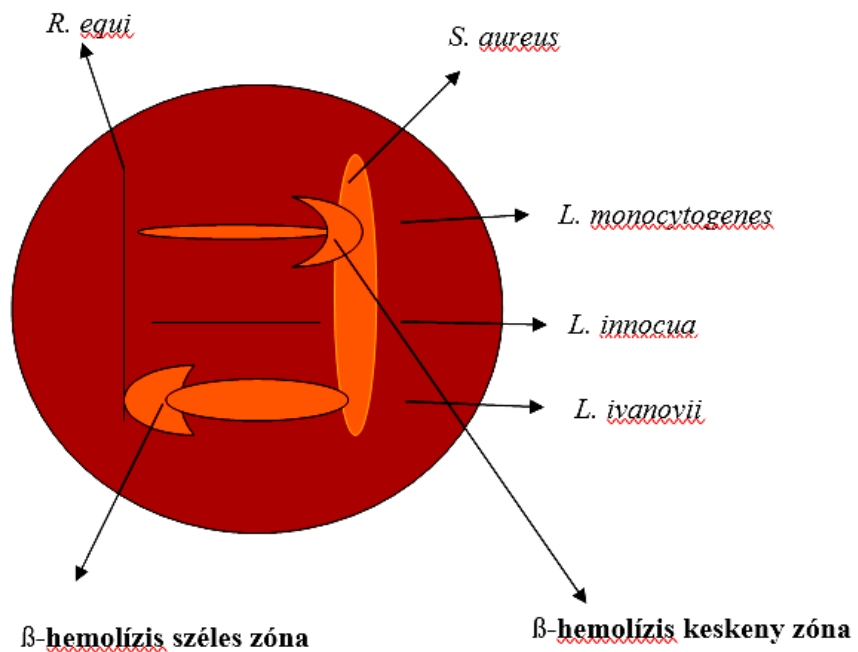
- A TSYEB- tenyészetből oltókacccsal oltunk be tápoldatba.
- Inkubáljuk 35 vagy 37 °C-on 5 napig.
- Az esetek többségében már 24-48 óra elteltével kialakuló sárga szín pozitív reakciót jelent (savtermelés)

3. CAMP-próba

- Juhvéres agarlemez felületére *Staphylococcus aureus* és *Rhodococcus equi* tenyészetből egy-egy csíkot húzunk úgy, hogy a két tenyészet párhuzamosan, egymással szemben helyezkedjen el. Az elkülönített törzseket azonos módon derékszögben leoltjuk úgy, hogy a vizsgált tenyészet ne érintkezzen a *S. aureus* és a *R. equi* tenyszzettel, de 1-2 mm távolságra legyen. Egyidejűleg a *L. monocytogenes*, *L. innouca* és *L. ivanovii* kontrolltenyészetekből is csíkot húzunk a lemezre.
- Az inkubálást 35 vagy 37 °C-on 12-18 órán át folytatjuk.
- Pozitív a reakció, ha a *S. aureus* és *R. equi* törzsek illetve a vizsgált törzsek találkozásánál felerősödött β -hemolíziszóna jelentkezik.
- Az *R. equi*-vel adott pozitív reakciót egy 5-10 mm széles, nyílhegy alakú hemolíziszóna jelzi. Negatív a reakció ha az *R. equi* diffúziós zóna és a vizsgált

törzs(ek) találkozásánál csak kb 1 mm nagyságú, gyenge hemolíziszóna jelentkezik.

- A *S. aureus*-szal adott pozitív reakció keskeny, felerősített hemolíziszóna jellemzi, amelynek kiterjedése mindössze 2 mm, a *S. aureus* enyhe hemolitikus zónáján belül. Nagy felerősödő hemolizáló zóna a *S. aureus* és a *L. monocytogenes* találkozásánál nem fordul elő.



25. kép CAMP-próba

Végleges megerősítés

A *Listeria monocytogenes*-nek minősített fajokat végleges megerősítő vizsgálatra elismert lisztéria referencialaboratóriumba kell elküldeni szerológiai vagy lizogén vizsgálatra.

5.3. Gyakorlat: Élelmiszervizsgálat tervezése (előkészületek, táptalajok készítése, eszközök sterilizése)

Minden hallgató kiválaszt egy tetszőleges élelmiszert és megtervezi annak mikrobiológiai vizsgálatát a 4/1998 egészségügyi minisztériumi rendelet szerint.

- Szükséges táptalajok, hígító folyadékok eszközök előkészítése.
- Sterilizés.

5.4. Élelmiszervizsgálat gyakorlat

Minden hallgató egyéni munkával vizsgálja meg az előzőleg kiválasztott élelmiszert a 4/1998 egészségügyi minisztériumi rendelet szerint.

- Jegyzőkönyvkészítés.

5.5. Biokémiai megerősítő vizsgálatok

Az élelmiszervizsgálathoz köthető biokémiai vizsgálatok elvégzése, a vizsgálatoknak ki kell terjednie az IMVIC és a *Salmonella* és *L. monocytogenes* megerősítő vizsgálatokra.

A. IMVIC próba esetén az általunk vizsgált élelmiszer során a pozitív BBL-tápoldattal dolgozunk tovább, ha nincs pozitív eredményünk, a gyakorlatvezető által kiadott mintával dolgozunk tovább (4.5.3. fejezet).

B. *Salmonella* biokémiai sor (5.1.1. fejezet)

- TSI,
- Karbamid-bontás,
- Indol-próba,
- Lizin leves,
- ONPG,
- V-P-próba,
- Savképzés,
- Gázképzés.

C. *L. monocytogenes* megerősítő vizsgálatok (5.2.1. fejezet)

- Hemolízisvizsgálat,
- Szénhidrátlebontás vizsgálata,
- CAMP-próba.

5.6. *Önellenőrző feladatok*

1. Feladat:

Miért szükséges a korokozó mikrobák esetében a dúsítási eljárás?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

Jellemezze a TSI agart! Milyen folyamatok játszódnak le tenyésztés alatt, illetve mikor feltételezhetjük hogy Salmonella pozitív az agar?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

A Palcam agaron milyen jellegzetes telepeket képez a *Listeria monocytogenes*?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat

Milyen megerősítéssel vizsgálatok szükségesek a *Listeria* fajok kimutatásánál?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Mit jelent, ha egy baktérium hemolizáló? Milyen agaron végezzük *Listeria monocytogenes* vizsgálatkor?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....



Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar
6724 Szeged, Mars tér 7.
Élelmiszermérnöki Intézet
Mikrobiológiai Laboratórium

Vizsgálati jegyzőkönyv

Vizsgálati jegyzőkönyv
száma: 2018/07/20

Mintaegyed azonosítója:
RL/0720

Megrendelő neve/címe:	GoodMills Magyarország Malomipari Kft. 2900 Komárom, Klapka Gy. Út 40.
Munkaazonosító jele:	Gabonaipari termék 2018/RL/0720
Minta megnevezése	VitaMill Teljes kiőrlésű Rozsliszt
Gyártó:	GoodMills Magyarország Malomipari Kft
Minta jellege:	Gabonaipari termék
Mintavevő:	Kaktusz Kálmán
Minta vétel ideje/ Mintavétel helye:	2018. július 20. Vegaboltocska Szeged, Hold u. 7.
Csomagolás/Mennyiség	Csomag/1 kg
Beszállítás ideje:	2018. július 20. 8:00
Vizsgálat kezdete/vége:	2018. július 20-2018. július 24.
Megjegyzés:	

Összegző véleményezés

A minta az összes vizsgált jellemző tekintetében **megfelelt** a feltüntetett előírások követelményeinek. Nem akkreditált véleményezés.

Vizsgált paraméter (mértékegység)	Alkalmazott módszer	Mért érték	Véleményezés		
			Előírt érték	Előírás azonosító száma	Értékelés
Salmonella jelenlét/25g		Negatív	M=0/25g	4/1998. (XI.11) EüM 4. mellék 8.2 pont	Megfelelt
Enterobacteriaceae szám/g		<10	m<10 ² M<10 ³	4/1998. (XI.11) EüM 4. mellék 8.2 pont	Megfelelt
Penészgomba szám/g		<10	m<10 ² M<10 ³	4/1998. (XI.11) EüM 4. mellék 8.2 pont	Megfelelt

A mérési eredmények csak a laboratórium rendelkezésére bocsátott mintákra vonatkozik.

2018. július 25.

Virág Rózsa
laboratóriumi vezető





Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar

6724 Szeged, Mars tér 7.

Élelmiszermérnöki Intézet

Mikrobiológiai Laboratórium

Vizsgálati jegyzőkönyv

Vizsgálati jegyzőkönyv
száma:

Mintaegyed azonosítója:

Megrendelő neve/címe:	
Munkaazonosító jele:	
Minta megnevezése	
Gyártó:	
Minta jellege:	
Mintavevő:	
Minta vétel ideje/ Mintavétel helye:	
Csomagolás/Mennyiség	
Beszállítás ideje:	
Vizsgálat kezdete/vége:	
Megjegyzés:	

Összegző véleményezés

A minta az összes vizsgált jellemző tekintetében a feltüntetett előírások követelményeinek. Nem akkreditált véleményezés.

Vizsgált paraméter (mértékegység)	Alkalmazott módszer	Mért érték	Véleményezés		
			Előírt érték	Előírás azonosító száma	Értékelés

A mérési eredmények csak a laboratórium rendelkezésére bocsátott mintákra vonatkozik.

Dátum:

laboratóriumi vezető



6. Higiéniai kontroll vizsgálatok az élelmiszeriparban

Rendeleti háttér

4/1998. (XI.11.) EüM rendelet 3. Számú melléklete: Az élelmiszerekkel kapcsolatos tevékenység során használt berendezés, felszerelés, gép, munkaeszköz, élelmiszerrel közvetlenül érintkező munkafelület és csomagolóanyag, valamint a személyi tisztaság élelmiszerbiztonsági mikrobiológiai vizsgálata.

1. Mintavétel
2. Megítélés
 - 2.1. Csomagolóanyag
 - 2.2. Felszerelés, munkaeszköz, edényzet, munkafelület
 - 2.3. Személyi tisztaság

6.1. *Az élelmiszer (nyersanyag) és a vele kontaktusba kerülő eszközök, személyek mikrobiológiai terheltségének vizsgálata*

A./nyersanyag: → mintavétel

→ laboratóriumi vizsgálat

→ eredmény ... mikrobaszám/mintaegység

B./feldolgozás körülményei:

1. Berendezések felülete (tisztítás-fertőtlenítés után, gyártás előtt...)
2. Levegő (folyamatosan...)
3. Dolgozók (folyamatosan... bőrfelület, ruházat felülete, stb.)

C./tárolási feltételek:

1. Csomagolóanyagok felülete (csomagolás előtt...)
2. Makro- és mikroklíma (folyamatosan...)
3. Levegő (folyamatosan...)

Mintavétel higiéniai kontrollhoz, mikrobaszám detektálásához (Felületek esetén)

Indirekt –Kencés (tamponos):

→ lemosás

→ szuszpendálás

→ laboratóriumi vizsgálat

→ eredmény...mikrobaszám/felületegység

A személyi higiénia, a munkaeszközök, a belső munkahelyi környezet, valamint a csomagolóanyagok tisztaságát ellenőrző vizsgálatoknál elemi minta minden egyes tamponos törléssel, lenyomati, kaparékvételi stb. eljárással vett minta, valamint vizsgált eszköz, amelyek pontos azonosíthatóságát megfelelő jelzésekkel kell biztosítani.

Megítélés

- Megfelelő a csomagolóanyag tisztasága, ha kórokozót nem tartalmaz és az élelmiszer csomagolásához használt anyag 10x10 cm felületen vizsgálva nem tartalmaz az 1. számú mellékletben felsorolt, Enterobacteriaceae családba tartozó mikroorganizmust, *Enterococcus faecalis*, sarjadzó vagy fonalas gombát.
- A mikrobaszám 1 cm² felületen 1-3, 100 cm² felületre számítva 250 lehet.
- Munkavégzés előtt vizsgálva a felület kórokozó mikroorganizmussal nem lehet szennyezett. A munkavégzés közben vett minta szennyezettségének értékelésénél figyelembe kell venni a végzett munka jellegét.

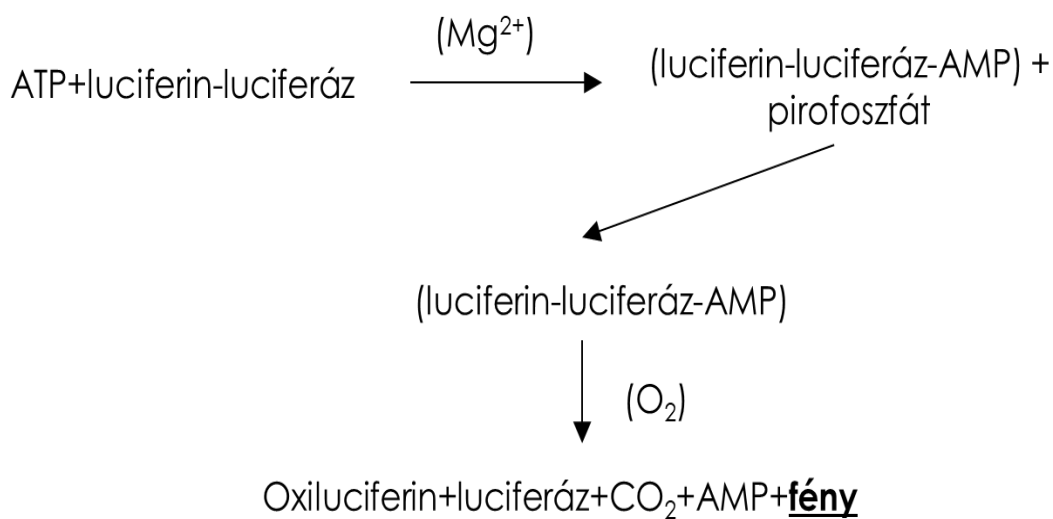
Speciális higiéniai kontroll nem mikrobaszám alapján:

→ Szennyezés maradványok vizsgálata: ATP kimutatás (biolumineszcencia)

- Baktériumok és más mikroorganizmusok kimutatása
- Mikrobiális fertőzés, élelmiszer maradvány, állati termék maradvány az öblítővízben, a felületeken, vagy a személyzeten
- Tisztítás-fertőtlenítés előtt és után
- Rövid idő alatt eredmény (60mp.)
- Gyors adatkezelés
- Jó érzékenység

Az **ATP-luminometria** egy olyan gyors biokémia módszer, mely a szentjánosbogár fénykibocsátásában is működő luciferin-luciferáz enzimrendszert alkalmazza. Az eljárás lényege, hogy a vizsgált mintához luciferáz enzimet adnak, az enzim reakcióba lép az élő szervezetek (mikroorganizmusok, állati sejtek) energiatároló komponensével (az ATP-vel) és világítani kezd.





1. ábra Az ATP mérés elve

A mérés az ATP (adenozin-trifoszfát) Luciferáz enzim közreműködésével történő bontását kísérő fényjelenség intenzitásának (lumineszcencia) meghatározásán alapul. Az ATP minden növényi és állati eredetű anyagban, élelmiszerekben, italokban, élő és élettelen mikroorganizmusok sejtjeiben megtalálhatóak. A módszer és a készülék ennek megfelelően alkalmas élelmiszeripari feldolgozó helyek munkafelületeinek, munkaeszközeinek, gyártósorok felületi tisztaságának ellenőrzésére, biológiai eredetű szennyeződések kimutatására. Az ATP bontás során keletkező fény intenzitása arányos az ATP, azaz a szerves anyag mennyiségével. Az ATP mérés eredményei közvetlenül nem vethetők össze a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok eredményeivel, mivel azok csak az élő mikroorganizmusokat mutatják ki.

6.2. Személyi és felületi mintavétel gyakorlat

1. Steril mintavevőpálcával 10x10 cm-es felületről, kézről, munkaruházatról mintavétel, majd szuszpendálás (1 perc vortex) steril peptonvízben.
2. Hígítási sor készítése.
3. Megfelelő tápközegbe oltás (csomagolóanyag, berendezések, személyi higiénia: TGE tápoldat, Enterobacter tápoldat, Enterococcus tápoldat, Salmonella, Fraser/ALOA agar, Malátás agar).

6.3. *Önellenőrző feladatok*

1. Feladat:

Miért van szükség higiéniai kontroll vizsgálatokra az élelmiszeriparban?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

Hogyan végzik a higiéniai kontroll során a felületi indirekt mintavételt?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

Milyen módszerrel ellenőrizhetjük az esetleges szennyezés maradványokat?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat

Mi a ATP-luminometria eljárás lényege? Mikor és hol alkalmazhatjuk?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Az ATP mérés eredményei miért nem vethetők össze a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok eredményeivel?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

7. Levegő és víz mikrobiológiai vizsgálata

7.1. *Levegő mikrobiológia vizsgálata*

Szedimentációs (passzív módszer)

Koch-féle mintavétel: Meghatározott ideig nyitva tartott Petri-csésze lemezek felületére történő levegő ülepités.

- Idő (nyitva) → várható csíratartalom függvénye (kb. 20 perc)
- Inkubáció → tápközegnek megfelelően
- Eredmény → mikrobaszám/kb. 60 cm² + a nyitva tartás ideje

Volumetrikus (beágyazásos aktív módszer)

Erre alkalmas készülékkel (pl.: MAS 100) alkalmas tápközegek használatával, előírt levegő mennyiség beszívásával.



26. kép MAS 100 levegőmintavételi készülék

MAS 100 Eco:

- A könnyű készülék standard 90 mm átmérőjű Petri-csészével befogásos módszerrel dolgozik.
- A levegő áramlási sebessége tetszőlegesen beállítható. (100 l/s)
- Az egység és a fedél galvanizált alumíniumból készült.
- Újratölthető elemekkel működik.

Mérés folyamata

- Petricsésze (standard méret) előkészítése
- Táptalaj készülékbe helyezése
- Levegőátszívás beindítása
- Inkubálás
- Értékelés a paraméterek alapján (idő áramlási seb. Stb.)

7.2. Vízvizsgálat

7.2.1. Ivóvíz minősítése mikrobiológiai vizsgálat alapján

A vízben található baktériumok 3 csoportba oszthatók:

1. Természetes baktériumflóra
2. Talajbaktériumok
3. Fekális szennyeződés esetén bélbaktériumok

Higiéniai és technológiai szempontú mikrobiológiai vizsgálatok

Tárgya: a víznyerés módjától és helyétől függetlenül- minden ivásra; háztartási célra, vagy emberi fogyasztásra kerülő termék előállításához, kezeléséhez használható vagy, ilyen termékkel közvetlen kontaktusba kerülő vízféleség.

Vízmintavétel

A nem megfelelő mintavétel során a vízminta baktériummal külső forrásból (mintavételi edény, csaptelep) szennyeződhet, így nem lesz reprezentatív jellegű, ezért fontos a szabványszerű előírások pontos betartása:

- A vezetéki vizet először 5-10 percig folytatjuk,
- Mintavételi csap fertőtlenítése:
 - égetéssel
 - alkoholos áztatással (70% etanol),
- Friss hálózati vizet kell begyűjteni,
- Steril mintavevő üvegedény + klórmegkötő anyag,
- Klórmegkötés nátrim-tioszulfáttal,
- Hűtve szállítás, tárolás, feldolgozás 24 óra alatt.

A mintavételi pont kiválasztása attól függ, hogy a vizsgálat mire irányul: A teljes vízhalózat vagy csak egy szakasz vízminőségére, vagy valamely víztisztító technológia hatékonyságának ellenőrzésére.

Jogszabály által megállapított egészségügyi határértékek

A 201/2001-es rendelet által ivóvízre meghatározott bakteriológiai paraméterek és határértékek:

Összcsíraszám (22 °C)	500 CFU / ml
Összcsíraszám (37 °C)	100 CFU / ml
Coliform szám	0 CFU / 100 ml
<i>Escherichia coli</i> szám	0 CFU / 100 ml
Enterococcusok száma	0 CFU / 100 ml
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 CFU / 100 ml
Clostridiumok száma	0 CFU / 100 ml
Salmonella spp.	Negatív /liter

Vízvizsgálat membránszűrési végrehajtással

A membránszűrés elve, hogy a meghatározott mennyiségű folyadékot egy jól definiált pórusátmérőjű membránszűrőn átszívadjuk, miközben a folyadékban található csírák a szűrő felületén visszamaradnak. A szűrőlapot ezután táptalaj felszínére fektetjük. A táptalaj tápanyagai a szűrőlapba diffundálnak, lehetővé téve a különálló mikroorganizmus-sejtek növekedését melyek megfelelő inkubációs idő után megszámlálhatók. Eredményként a telepkepző egységek számát adjuk meg az átszívott mintamennyiségre vonatkoztatva.

Szűrőberendezés

Egy tölcészerű feltétből áll, amelynek anyaga lehet rozsdamentes acél, műanyag vagy üveg, befertőződés ellen fedéllel zárható. A feltét a szűrőtartó ülékéhez, légmentesen záró gumitömítéssel kapcsolódik a szívópalackhoz. A szűrés során a membránszűrő átszakadásának megakadályozására az ülékben egy acél szita vagy durva pórusú kerámia vagy fém betét található, amelyre a szűrőlap fekszik. A szívópalack egyrészt a vákuumot közvetíti a szűrő felé, másrészt az átszívott folyadékot összegyűjti. A szívópalackhoz vákuumszivattyút csatlakoztatva működtetjük a készüléket a gyorsabb átszívás érdekében.

Használat előtt a tölcsért és a membránszűrővel érintkező alátétet autoklávban sterilizálni kell

Membránszűrők

A membránok- a szűrőpapírokkal ellentétben - felületi szűrők. A jellemző pórusméterek mikrométer alattiak. A membrán anyaga határozza meg a vegyszerállóságot, a hidrofíl-hidrofób jelleget ill. a fehérje-kötőképességet.

Steril membránok (S-Pak):

- Keverék cellulóz-észterből készülnek
- Víz, alkoholos italok és más folyadékok mikroszűrési módszerrel végzett mikrobiológiai vizsgálatokhoz használhatók.
- A membránok rácsozott kivitelben, 47 mm-es átmérővel, 0,22; 0,45; 0,7; 0,8 és 1,2 µm-es pórusméretekkel rendelkeznek egyenként sterilen csomagolva.

7.3. *Gyakorlat: Kontroll vizsgálatok*

A. Vízvizsgálat:

- a. A készülék összeszerelése (szivattyú, tölcseértartó, steril adagoló, steril membránszűrő, steril membránszűrőtartó).
- b. Membránok behelyezése a membrántartóba, a vízminta töltése az adagolóba, szivattyú elindítása
- c. Átszívott mennyiség után, a membránt steril eszközzel kivesszük és a megfelelő táptalaj felületére tesszük (Cetrimid agar, VRBL, EMB, Chromocult Enterococci agar, Hekteen-agar, XLD agar)

- B. Levegővizsgálat:** Malátás és TGE táptalaj behelyezése a készülékbe, készülék elindítása, majd a berendezésből a csésze eltávolítása, amint a gép jelzett.

Inkubálás a tápközegeknek megfelelően.

7.4. Önellenőrző feladatok

1. Feladat:

Milyen módszerek vannak a levegő mikrobiológiai vizsgálatára?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

2. Feladat

Mely csoportokra oszthatjuk a vízben lévő baktériumokat?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

3. Feladat

Jellemezze a víz mintavétel menetét!

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

4. Feladat:

Mely mikroorganizmusokra terjed ki a vízvizsgálata?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

5. Feladat

Hogyan történik a vízminta feldolgozása?

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

Irodalomjegyzék

- 2073/2005 Európai Közöségi rendelet az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól.
- 4/1998 Egészségügyi Minisztériumi Rendelet Az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető kritériumairól
- Ádám Éva: Mikrobiológia gyógyszerész és fogorvostan hallgatóknak. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2006.
- Bíró Sándor, Hornok László, Kevei Ferenc, Kucsera Judit, Maráz Anna, Pesti Miklós, Szűcs György, Vágvölgyi Csaba: Általános mikrobiológia. Dialógus Campus Kiadó, Budapest-Pécs, 2001.
- Deák Tibor, Kiskó Gabriella, Maráz Anna, Mohácsiné Farkas Csilla: Élelmiszer-mikrobiológia. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2006.
- Dr. Bíró Géza, Kovács Ferenc (szerk.): Élelmiszer-biztonság - EU-szabályozás. Agroinform Nyomda és Kiadó Kft., Budapest, 2003.
- Dr. Bíró Géza: Élelmiszer-higiénia. Agroinform Kiadó és nyomda Kft., Budapest, 2002.
- Dr. Czákó Mihály, Dr. Cséfalvay Ignácné: Élelmiszeripari mikrobiológia és higiénia Gyakorlatok II. Élelmiszeripari Főiskola, Szeged, 1985.
- Dr. Szita Géza, Dr. Bíró Géza: Élelmiszer-mikrobiológia, élelmiszer-higiénia. Agrárszakoktatási Intézet, Budapest, 1998.
- ISO 4831:2006 Coliform szám
- Kiss István (szerk.) Mikrobiológiai vizsgálati módszerek élelmiszeriparban. Mezőgazdasági Kiadó, 1974.
- Laczay Péter: Élelmiszer-higiénia, Élelmiszerlánc-biztonság. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 2008.
- Martin R. Adams, Maurice O. Moss (ed.): Food Microbiology, 3. edition. RSC Publishing, UK, 2008.
- MSZ EN ISO 4833-1:2014 Mikrobaszám telepszámlálásos, lemezöntés
- MSZ EN ISO 4833-2:2014 Mikrobaszám telepszámlálásos, felületi szélesztés
- MSZ EN ISO 6579:2006 *Salmonella* spp. jelenléte kimutatás dúsitással
- MSZ EN ISO 6888-1:2008 Koagulázpozitív sztafilokokkuszok száma (*Staphylococcus aureus* és más fajok) telepszámlálás, felületi szélesztés
- MSZ ISO 21428-2:2007 Enterobacteriaceae száma telepszámlálás, lemezöntés
- Szladecskó Györgyné: Mikrobiológia és táplálkozásélettan. FVM Vidékfejlesztési, Képzési és Szaktanácsadási Intézet, Budapest, 2008.