

# A penésztartalom meghatározására alkalmas módszerek I. Tenyésztéses mikrobiológiai és mikroszkópos módszerek

*Kiskó Gabriella*

Kertészeti és Élelmiszeripari Egyetem, Mikrobiológia és  
Biotechnológia Tanszék, Budapest

Érkezett: 1998. október 11.

Az élő penészek detektálására és számolására a lemezöntéses számolási technikát használják penész szelektív vagy nem szelektív agaron. Egyes termékekben penészek jelenlétét mikroszkóp segítségével határozzák meg, látható fényt vagy fluoreszcens módszert alkalmazva. Bár ezeket a módszereket sikeresen használták évekig, szükség van az élelmiszerek penésztartalmának detektálására alkalmas újabb gyors módszerek fejlesztésére. Ennek számos oka van, mivel

- a rendelkezésre álló módszerek nem teszik lehetővé a nyersanyagok minősítése és a gyártásközi ellenőrzés során vett minták penésztartalmának gyors meghatározását,
- nem adaptálhatók az „on-line” detektáláshoz, ami pedig kívánatos az élelmiszerek feldolgozás során,
- az élelmiszerek biztonságához elengedhetetlen az élelmiszerek feldolgozás előtti vizsgálata mikrobiológiai szempontból,
- a fermentáció és más biotechnológiai alkalmazás esetén is kívánatos lehet az élő penész gombák számának állandó ellenőrzése a gyártási folyamat során,
- a penészek gyors kimutatására alkalmas módszerekkel sok idő, munka, anyag és pénz takarítható meg.

A penészek kimutatására többféle módszer is alkalmas (1. ábra). Ezek közé sorolhatók a lemezöntéses módszerek, a hőstabil enzimek vagy más hőstabil penészkomponensek, mint pl. a kitin detektálása, különböző mikroszkópos módszerek stb.

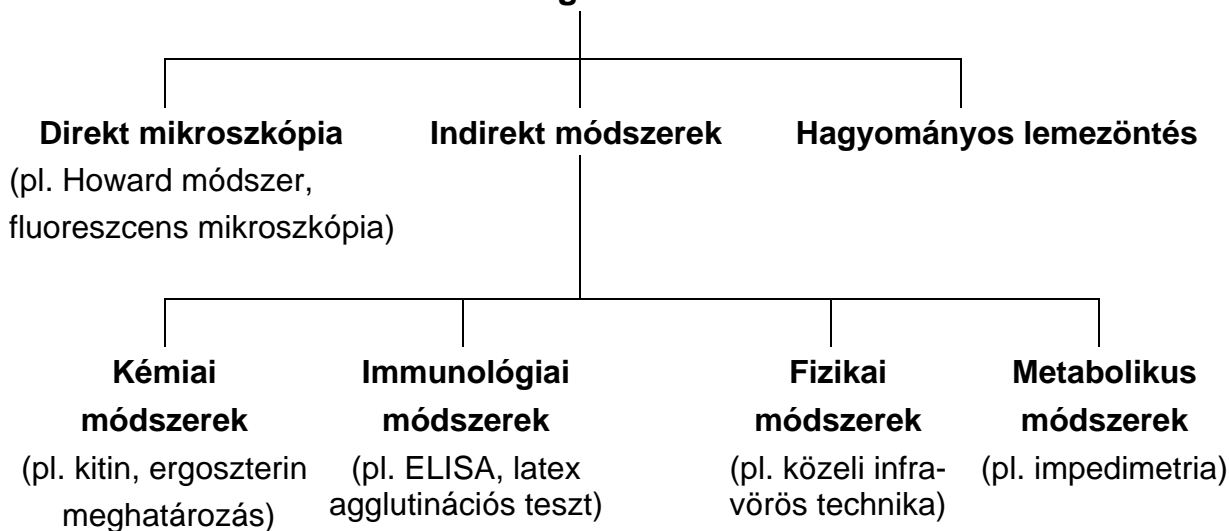
Más megközelítésből a módszereket két nagy csoportba oszthatjuk, az élő penész szám meghatározásra alkalmas (pl. lemezöntés, mikrokolóniás mikroszkópia, impedimetria) és a teljes penészbiomassza detektálására alkalmas (pl. Howard módszer, kémiai, immunológiai és fizikai vizsgálatok) módszerekre.

Az élelmiszerekből penészgombák kimutatására szolgáló gyors módszerek a következők:

- specifikus penész-sejtfal- vagy más gomba-komponensek kémiai analízise;
- penészek által képzett anyagcseretermékek detektálása;
- mikroszkópos vizsgálatok, felhasználva mind a látható, mind az ultraibolya fényt;
- a lemezöntéses módszer tökéletesítése: spirál-lemez módszer és a hidrofób rács-membrán rendszer;
- impedancia-mérés;
- sejtfal-komponensek, extracelluláris termékek vagy más, penészek által képzett metabolitok immunológiai meghatározása,
- DNS és RNS analízis a penészek nemzetség, faj vagy törzs-szerinti meghatározásához.

Ezen módszerek közül a penész kolónia szám és a Howard penész szám használatosak számos országban, mint a minőségellenőrzés szabványosított módszerei. A legtöbb elterjedt módszernek vannak azonban hátrányai.

### Penésztartalom meghatározási módszerek



**1. ábra: A penészgombák vizsgálatára alkalmas módszerek**

#### 1. Hagyományos mikrobiológiai módszerek és ezek továbbfejlesztése

A hagyományos lemezöntéses módszer az élő penész szám meghatározására alkalmas. Az élő penész szám különösen fontos száraz élelmiszer-adalékok, mint pl. a fűszerek minőségvizsgálata esetén, mivel

ezek jelentik a legfőbb szennyező forrást a továbbiakban nem hőkezelt termékeknél. Amellett, hogy a módszer tápanyag- és időigényes (4-5 nap, pszichrofil gombáknál az alacsony inkubálási hőmérséklet miatt ennél is hosszabb, néhány hét), más kifogások is felmerültek ellene. Ha aktív penésznövekedés figyelhető meg egy élelmiszeren, a magas élő penész számot nem csak a magas spóra szám, hanem a micéliumok széttöredezése is okozza. A széttöredezés mértéke függ a homogenizálás típusától és körülményeitől. Ezen túl a különböző penészfajok spórázása is különböző fokú, ami szintén nehezíti a meghatározást. Gyakran figyelhető meg az is, hogy a penésztartalmú élelmiszer hígítási tagjai nem követik a decimális hígítást (pl. a penészsám 90/g a  $10^{-2}$  hígítási tagnál és 20/g a  $10^{-3}$ -nál). Ennek lehetséges magyarázata lehet a micéliumok darabolódása és az összetapadt spórák csomóinak szétesése a hígítás alatt, valamint a homogenizálás után is összetapadt spórák. A felhasznált tápközeg minősége is befolyásolja az élő penész számot. Továbbá nem utolsó sorban a csíraszegényített termékek esetén irreális képet mutat a termék mikrobiológiai minőségéről, mivel nem képes az elpusztult sejtek kimutatására.

Az élő penész szám meghatározására más módszerek is ismeretesek, melyek megpróbálják kiküszöbölni a hagyományos mikrobiológiai módszer hibáit. Ilyenek a spirál-lemez módszer, a tápközegben végbemenő kapacitás-változás mérésén alapuló meghatározások (Watson-Craik et al., 1990) és a hidrofób rács-membrán rendszer (HGMR), amely 48 órán belül lehetővé teszi az élelmiszer-minta élő penész számának meghatározását (Brodsky et al., 1982; Hart et al., 1991). A rendszer hidrofób rácsokkal részekre osztott membrán alkalmazásán alapszik, ahol a HGMR számot MPN módszerrel határozzák meg. A számolást automata számoló egység segíti. A HGMR rendszerrel meghatározott penész számok egyenlőek vagy magasabbak voltak, mint a lemezöntéssel kapottak. A Petrifilm módszer (Beuchat et al., 1991) bizonyos élelmiszerekre megbízhatóbb eredményt szolgáltat, mint a hagyományos módszer, míg más élelmiszereknél kölcsönhatás léphet fel az élelmiszer-részek és a táptalaj komponensei között, ami nehezíti a meghatározást.

## **2. Mikroszkópos meghatározási módszerek**

A mikroszkópos vizsgálatok az élelmiszer penésztartalmának gyors becslését teszik lehetővé. Magas propagula szám általában az analízist megelőző jelentős penész-növekedésre utal. A mikroszkópos vizsgálat különösen alkalmas a dekontaminációs hatásnak kitett, valamint

fungicideket tartalmazó élelmiszerek vizsgálatára, de csak relatíve magas szennyeződési szintek detektálására használható.

## **2.1. Howard módszer**

Az élelmiszerek penész-szennyezettségének ellenőrzésére leggyakrabban használt direkt mikroszkópos módszert Howard dolgozta ki (1911), eredetileg paradicsom készítmények nyersanyag minőségének és a gyártás higiéniai szintjének utólagos ellenőrzése céljából. A módszer egy standardizált mikroszkópmező vizsgálatán alapszik, mely a penész-szennyeződés mértékének becslésére szolgál. Pozitív a látómező, ha 3-nál nem több penészfonal darab egyesített hossza a látótér átmérőjének 1/6 részét meghaladja. A termék osztályozására a pozitív mezők arányát használják. A nemzetközi áruforgalomban jelenleg is ez a módszer képezi a készáru penész-szennyezettség szerinti átvételének alapját. A vizsgálati módszer leírását paradicsomkészítményekre az MSZ 3643-87 számú szabvány tartalmazza, amely alapvetően megegyezik az AOAC (1984) 44.194 pontjában a Howard módszer kivitelezésére megadott irányelvekkel. Az AOAC kiadvány (1984) 44.213 pontjában őrlött fűszerek Howard számának meghatározását is rögzítik, melyhez hasonlót a magyar szabványban nem találunk. A Howard módszer nagy gyakorlattal rendelkező, morfológiában jártas szakembert igényel. A vizsgálat a szemet erősen igénybe veszi, és a vizsgáló fáradása a kimutatás bizonytalanságát idézheti elő. A módszer variációs koefficiense 15% vagy annál is nagyobb (Jarvis, 1977). Ha a meghatározást homogenizált termékekhez használjuk, a pontosság még kisebb. Továbbá a különböző feldolgozási folyamatok (pl. homogenizáció, koncentráció) is hatással vannak a Howard számra, melynek következtében a módszer nem alkalmazható zúzott, tört gyümölcs termékeknél. Mindezen hibák mellett, alkalmazása kétségtelen javulást okozott a paradicsom és különböző gyümölcsfélék minőségében.

## **2.2. DEFT**

A Howard módszer jelentős szubjektív hibával terhelt. Az utóbbi időben egyre több kritika éri, megkérdőjelezi objektivitását. Hibáinak kiküszöbölésére egyre több nem-mikroszkópos módszert dolgoztak ki. Mindezek mellett a mikroszkópos vizsgálatok területén is próbálkozások folynak a Howard szám felváltására irányuló módszerfejlesztő tevékenységben. Ilyen törekvés a szűréssel összekötött epifluoreszcens mikroszkópos technika (direct epifluorescent filter technique, DEFT) alkalmazása a penész-tartalom kimutatására, valamint a mikroszkópizálást segítő új festési technikák kialakítása. Ezen technikák célja a preparátumok

atlátszóságának növelése, valamint a penészfonalaknak a növényi részekről való jobb megkülönböztetése.

A szűréssel összekötött epifluoreszcens mikroszkópos technikát eredetileg a nyers tej mikroorganizmusainak gyors számlálására fejlesztették ki Pettipher és munkatársai (1980). A módszer a minta előkezelését követő membránszűrésen alapszik, amely felfogja a mikroorganizmusokat. A szűrést a membrán festése követi fluoreszkáló festékekkel (pl. akridin narancs), majd az öblítést követően - a membrán mikroszkóp tárgylemezre helyezése után - fluoreszcens mikroszkópizálást végeznek. Ultraibolyafény fényhatására bizonyos festékek fluoreszkálnak, ami mikroszkóp segítségével megfigyelhető. Az acridin orange (AO) nukleinsavhoz (RNS, DNS) kötődik a mikroba sejten belül, így a mikrobák a membrán-felületen jól láthatóvá válnak és így könnyen megszámlálhatók. Az előkezelés és a számlálás együttesen 30 percet vesz igénybe.

A DEFT módszerrel vizsgálható élelmiszerek körét nagy mértékben kiterjesztették. A vizsgált élelmiszerek skálája a fagyasztott hústól és zöldségfélétől az alkoholos italokig terjed, és a módszert ma már higiéniai vizsgálatokra is alkalmazzák. A számlálás megkönnyítésére a manuális DEFT módszer helyett TV kamerával és képanalizátorral összekapcsolt félautomatizált rendszert alakítottak ki (Pettipher et al., 1982a). Ez kivédi a mikroszkopizáló személy fáradását és növeli a manuális módszernél elérhető 30-40 minta/nap/operator teljesítményt.

Pettipher és munkatársai (1985) paradicsom-készítmények vizsgálatához alkalmazták a DEFT módszert a Howard módszer alternatívájaként.

### **2.3. Mikroszkópos festési technikák**

Fluoreszkáló festékek, mint pl. az acridin orange (AO), fluoreszcein-diacetát (FDA) stb. nagy mértékben megkönnyítheti a vizsgáló feladatát, amennyiben lehetővé teszi a mintában levő organizmusok szelektív festését. Az AO-ot, amely nukleinsavakhoz kapcsolódik (Hobbie et al., 1977), eredetileg élő és holt sejtek differenciáló festésére javasolták, de a technika nem bizonyult mindig megbízhatónak. Többen tudósítottak arról, hogy az élő élesztő és baktérium sejtek zölden fluoreszkálnak AO-al történő festés után, míg a holt sejtek narancs-vörös fluoreszcenciát mutatnak (Jones, 1974), de mások fordított festési reakcióról számoltak be (Hobbie et al., 1977; Pettipher et al., 1980). Pettipher és munkatársai (1985) úgy találták, hogy a festék alkalmas penészgombák festésére is.

Számos tanulmányban tudósítottak arról, hogy fluoreszcein-diacetátot (FDA) élesztők, gombák és a legtöbb baktérium képes akkumulálni és azt belső enzimeikkel hasítani (Söderström, 1977; Bjurman, 1993). Fox (1979) fluoreszcens technikát fejlesztett ki paradicsompüré penésztartalmának vizsgálatára fluoreszcein-diacetátot alkalmazva. A fluoreszcein-diacetát poláris, nem fluoreszkáló észter, amely a sejtbe jutva proteázok, észterázok és lipázok hatására hidrolizálódik nem poláris fluoreszceinné, amely visszamarad a sejtben. Így csak az FDA hidrolízisére képes aktív organizmusok fluoreszkálni. Fox a Howard módszert használta kontrollként. A vizsgálat a Howard módszerrel egyenértékű, de annál megbízhatóbb eredményeket szolgáltatott, s időigénye mindössze 5 perc mintánként. Söderström (1977) új módszert dolgozott ki a talaj gombabiomassza tartalmának mérésére, amely FDA-s festésből és epifluoreszcens mikroszkóp használatából áll. A minta homogenizációja nagy mértékben befolyásolta az FDA festődött hifák számát. A hifák roncsolása ugyanis a citoplazma elvesztéséhez vezethet, amely lehetetlenné teszi a festődést. Ez a roncsoló hatás a hifák valódi számának 20 %-os alábecslését is eredményezheti. Ezért meghatározta a homogenizálás optimális idejét. Tapasztalatai azt mutatják, hogy hátrányai ellenére az FDA módszer jól reprodukálható eredményeket nyújt a talajminták kvantitatív vizsgálata esetén. Olsen és Schmidt (1994) *Phanerochaete chrysosporium* micélium tömegének becslését végezte el fafelületen. Azt tapasztalták, hogy az inokulált minta abszorbanciája kisebb volt, mint a kontrollé, s a *Phanerochaete chrysosporium* szemmel látható növekedése negatívan befolyásolta az abszorbanciát, melynek eredményeként arra következtettek, hogy a módszer nem megfelelő a gomba mennyiségi meghatározására fenyőfa chipsen. Yang és munkatársai (1995) *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium oxysporum* és *Penicillium citrinum* spóráinak életképességi vizsgálatát végezték el. NaCl-ot, KCl-ot vagy MgCl<sub>2</sub>-ot keverve a festék-oldatba növelni tudták a fluoreszcens intenzitást. A sók adagolása megkönnyítette az élő és az élettelen sejtek megkülönböztetését is.

Matsuoka és munkatársai (1995) a kongóvörös festéket ajánlották a hifa növekedés lehetséges fluoreszcens indikátoraként. A kongóvörös a  $\beta$ -poliszacharidokkal lép kapcsolatba, így kötődik a kitin-lánchoz is. Vizsgálva a minták fluoreszcens intenzitását a növekedési rátával összefüggésben, azt tapasztalták, hogy a kongóvörös alkalmas a nem növekedő és növekedésben levő hifák megkülönböztetésére gyors fluoreszcens mikroszkópiával.

Blaser (1978) nem fluoreszkáló festési technikákat és direkt mikroszkópi módszereket hasonlított össze különböző élelmiszerminták penész

tartalmának kvantitatív meghatározására. Az eredmények azt mutatták, hogy a csekély fehérjetartalmú termékeknél (pl. fűszerek, dió) a Pianese procedúra (festés malachitzöld, fukszin valamint martius-sárga keverékével) volt a legkedvezőbb. A kis poliszacharid tartalmú élelmiszereknél (pl. tej, hús) a perjódsav Shiff reakció (festés perjódsavval és pararozanilinnel) adott jó eredményeket. A Pianese festésnél a hifák és vékonyfalú spórák, a vékonyfalú nem fásodott növényi sejtek, valamint a fehérjék vörösek; a fásodott, vastagfalú növényi sejtek és a keményítő szemcsék zöldre színeződtek.

A „calcofluor white” (CW) a kongóvöröshöz hasonlóan specifikusan kötődik a  $\beta$ -konfigurációjú poliszacharidokhoz, így a gombasejtek falában található kitinhez is. Fluoreszcens fényben vizsgálva a nem kötött állapotú festék fluoreszcenciája másodpercek alatt eltűnik, a gombasejtek pedig kékeszölden világítanak. A módszer rendkívül megbízhatónak bizonyult a gombás bőrbetegségek diagnosztizálása területén (Kiss et al., 1995).

Abban az esetben, ha a mikroszkópos módszerek további fejlesztéssel alkalmassá tehetők gyártásközi-, illetve végtermék-ellenőrzésre, a vizsgálatok gyorsasága és minimális anyagigénye miatt a mikrobiológiai ellenőrzés egyik leghatékonyabb módszerét jelenthetnék.

## Irodalomjegyzék

- AOAC (1984) Official Methods of Analysis 14th Ed. AOAC Arlington, VA.
- BEUCHAT, L.R., NAIL, B.V., BRACKETT, R.E. és FOX, T.L. (1991): Comparison of the petrifilm yeast and mold culture film method to conventional methods for enumerating yeasts and molds in foods. *J. Food Prot.* 54, (6), 443-447.
- BJURMAN, J. (1993): Determination of microbial activity in moulded wood by the use of fluorescein diacetate. *Material und Organismen.* 28, (1), 1-16.
- BLASER, P. (1978): Comparison of methods for quantitative detection of moulds in foods. I. Selective staining procedures for direct microscopic mould count. *Zbl. Bakt. Hyg.* 166, 45-62.
- BRODSKY, M.H., ENTIS, P., SHARPE, A.N. és JARVIS, G.A. (1982): Determination of aerobic plate and yeast and mold counts in foods using an automated hydrophobic grid-membrane filter technique. *J. Food Prot.* 45, (4), 301-304.
- HOBBIE, J. E., DALEY, R. J., és JASPER, S. (1977): Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 1225-1228.
- HOWARD, B.J. (1911): Tomato ketchup under the microscope with practical suggestions to ensure a cleanly product. U.S. Department of Agriculture, Bureau of Chemistry, Circular No. 68.

- JARVIS, B. (1977): A chemical method for estimation of mould in tomato products. *J. Food Technol.* 12, 581-591.
- JONES, J. G. (1974): Some observations on direct counts of fresh-water bacteria obtained with a fluorescence microscope. *Limnology and Oceanography* 17, 540-543.
- KISS G., RADVÁNYI SZ. és SZIGETY G. (1995): Gombás bőrbetegségek laboratóriumi diagnosztikája. *Kisállatorvoslás*, 5, 256-264.
- MATSUOKA, H., YANG, H.-C., HOMMA, T., NEMOTO, Y., YAMADA, S., SUMITA, O., TAKATORI, K. és KURATA, H. (1995): Use of congo red as a microscopic fluorescence indicator of hyphal growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 102-108.
- OLSEN, K.K. és SCHMIDT, E.L. (1994): An attempt to quantify relative mycelial development of *Phanerochaete chrysosporium* using the fluorescein diacetate spectrophotometric assay. *Mycologica* 86, (6), 741-742.
- PETTIPHER, G. L., MANSELL, R., MCKINNON, C. H. és COUSINS, C. M. (1980): Rapid membran filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 39, 423-429.
- PETTIPHER, G. L., UBALDINA, M. és RODRIGUES, U.M. (1982): Semi-automated counting of bacteria and somatic cells in milk using epifluorescence microscopy and television image analysis. *J. Appl. Bacteriol.* 53, 323-329.
- PETTIPHER, G.L., WILLIAMS, R.A. és GUTTERIDGE, G.S. (1985): An evaluation of possible alternative methods to the Howard Mould Count. *Lett. Appl. Microbiol.* 1, 49-51.
- SÖDERSTRÖM, B.E. (1977): Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil. Biol. Biochem.* 9, 59-63.
- WATSON-CRAIK, I.A., AIDOO, K.E. és ANDERSON, J.G. (1990): Development and evaluation of a medium for monitoring of food-borne moulds by capacitance changes. *Food Microbiol.* 7, 129-145.
- YANG, H.C., NEMOTO, Y., HOMMA, T., MATSUOKA, H., YAMADA, S., SUMITA, O., TAKATORI, K. és KURATA, H. (1995): Rapid viability assessment of spores of several fungi by an ionic intensified fluorescein diacetate method. *Current Microbiol.*, 30, (3), 173-176.

A munka a Lánzos Kornél - Szekfű Gyula Alapítvány támogatásával készült.