

Mikrobiológiai fázisvizsgálatok

Célok

- 1. Boralackozó vonalak mikrobiológiai állapotának ellenőrzése
 - Rendszeres vizsgálatok: adatgyűjtés, hibaforrások „utólagos” feltárása
 - Időszakos, nagy fázisvizsgálatok: a technológia validálása
- 2. Pincei, üzemi fázisvizsgálatok szennyező források feltárására

Mintavétel

- **Alapszabályok:**
 - Csak előre sterilizált eszközökkel, aseptikus módon!
 - Leoltás lehetőleg azonnal, de max. 24 órán belül
- Borminta tartályokból, szűrőkről
 - csapok alapos kiengedése, lelágolás, bor ismételt átengedése után (folyamatosan legalább 2 db minta néhány másodperc különbséggel)
- Dugó
 - steril csipesszel a zsákból, illetve a felöntő tartályból, steril edénybe
 - dugózógépen keresztül, steril edénybe (kézi üzzemmód)
 - egy helyről min. 5 mintaelem
- Palack
 - közvetlenül a mosógép/sterilező után levéve, aseptikusan lezárva (min. 3 mintaelem)
- Borminták a töltőgépről: „addíciós minták” (ld. később)
- Felület
 - tamponos lemosás
- Levegő
 - Koch féle ülepítékes módszer

Feladatok

1. Bor (must, mustsűrítmény) élesztőszámának meghatározása tenyésztéssel

- Higítás: 2 tagú, tizes alapú 10^2 –ig
- 1 ml minta kioltása 10^2 , 10^1 és 10^0 higításból (üres petricsésze)
- Lemezöntés SÉG táptalajjal (100 ml ÉG+3 ml 10%-os borkősav)
- Eredmény megadása:
Élesztőszám (tke/ml) = $N \times \text{higítás}$ (N= telepszám)

2. Palacktisztaság vizsgálata

- Palack öblítése V (=10) ml steril vízzel
- Öblítővízből 1-1 ml minta kioltása (lemezöntés)
 - 1. TGE vagy ÉG táptalajra (mezofil aerob élőcsíraszám*)
 - 2. SÉG-táptalajra (élesztő és penészsszám**)
- Inkubálás (28 °C-on 3 nap)
- Eredmény megadása:
Mikobaszám* /**(tke / palack): $N \times V \times \text{higítás}$
N= telepszám
V öblítővíz térfogata, 10 ml, higítás=1
0 telepszám esetén: < 10 tke / palack !

3. Dugó tisztaságának vizsgálata

- N (=5) db dugó öblítése V (=50) ml steril vízben (st. mintavétel!)
- Öblítővizből 1-1 ml minta kioltása (lemezöntés)
 - 1. TGE vagy ÉG táptalajra (mezofil aerob élőcsíraszám*)
 - 2. SÉG-táptalajra (élesztő és penészszám**)
- Inkubálás (28 °C-on 3 nap)
- Eredmény megadása:
 Mikrobaszám* /**(tke / dugó): $\frac{N \times V \text{ (ml)} \times \text{hígítás}}{n \text{ (db)}}$
 N= telepszám, n =dugók száma, hígítás=1
 V öblítővíz térfogata, 50 ml
 0 telepszám esetén: < 10 tke /dugó!

4. Felület tisztaságának vizsgálata

- Ismert nagyságú felület letörése steril (nedvesített) tamponnal (st. sablon 5 x5 cm).
- Tampon bemosása st. öblítővízbe (V=10ml)
- Hígítás: 2 tagú (10²-ig)
- 10⁰, 10¹ és 10² hígításból 1-1 ml minta kioltása (lemezöntés)
 - 1. TGE vagy ÉG táptalajra (mezofil aerob élőcsíraszám*)
 - 2. SÉG-táptalajra (élesztő és penészszám**)
- Inkubálás (28 °C-on 3 nap)
- Eredmény megadása:
 Mikrobaszám* /**(tke/ 100 cm²): $\frac{N \times V \text{ (ml)} \times \text{hígítás} \times 100}{F \text{ (cm}^2\text{)}}$
 N= telepszám, F= sablon felülete (25 cm²)
 V öblítővíz térfogata (10 ml)
 0 telepszám esetén: < 40 tke /100 cm²

5. Levegő tisztaságának vizsgálata (Koch-féle üleptépes módszer)

- Lemezöntés üres petricsészébe
 - 1. TGE vagy ÉG táptalaj (mezofil aerob élőcsíraszám*)
 - 2. SÉG-táptalaj (élesztő és penészszám**)
- Lemez exponálása (fedél nélkül) 5/10 vagy 15 percig
- Inkubálás (28 °C-on 3 nap)
- Eredmény megadása:
 Mikrobaszám* /**(tke / 1 m³ levegő):
 $\frac{N \times 5 \times 10^4}{F \times t}$
 N= telepszám, F= petricsésze felülete (80 cm²)
 t= expozíciós idő (perc)
 0 telepszám és t=5 esetén: < 1,25 x 10² tke/m³

Kis sejtszámú vagy csíráatlanított borok vizsgálata – csak membránszűréssel!

- Ajánlott mintavételi helyek (palackozás)
 - Puffertartány
 - EK szűrő után
 - Membránszűrő(k) után
 - Töltőszákról- addíciós próbák:
 - Steril palackba, steril dugóval
 - gyári palackba, steril dugóval
 - gyári palackba gyári dugóval= **késztermék**

6. Készrekezelt bor/ késztermék élesztőszámának meghatározása membránszűréssel

- Membránszűrő sterilizése alkoholos lelángolással
- Szűrő lehűtése
- St. szűrőmembrán behelyezése steril csipesszel
 - (0,45-0,6-0,8 –1 um)
- Ismert térfogatú (100 ml) bor átszivattyúzása a membránon
- Membrán táptalajra helyezése st. csipesszel (ÉG)
- Inkubálás (28 °C-on 3 nap)

Eredmény megadása:

Élesztőszám (tke /100 ml): N (N= telepszám)
 0 telepszám esetén: 0/100 ml vagy < 10 /l

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Szervezeti egység

Membránszűrési gyors vizsgálatok tenyésztés nélkül

- 1. Gröpl szűrés
 - Minta átszűrése kisméretű membránszűrő készüléken, 1,3 cm átmérőjű membránnal
 - A membrán festése két lépésben
 - 1. 0,01% metilénkék + vizes mosás– holt sejtek kékre színeződnek
 - 2. **Poncaeu-S** oldattal összes sejt pirosra színeződik
 - Membrán mosása 5% ecetsavval, szárítás
 - Száraz membrán átitatása immerziós olajjal (átlátszóvá válik)
 - Vizsgálat közönséges mikroszkóppal (halogén lámpa előnyös): sok látótér pásztázása!
 - Számítás: a látótér mérete és az átlagos sejtszám/látótér alapján a teljes membrán felületre felszorozzuk a sejtszámot!
 - Munkaigényes, de azonnali eredményt ad (0,5 órán belül)

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Szervezeti egység

2. Közvetlen epifluoreszcenciás membránszűrés Direct Epifluorescence Filter Technique (DEFT)

- Minta átszűrése (kis átmérőjű?) membránszűrőn, st. vizes öblítés
- Membrán festése **akridin-orange** festékkel
- Öblítés pH 3,0 pufferrel
- Öblítés izopropanollal
- Membrán szárítása
- Membrán átitatása (nem fluoreszkáló) immerziós olajjal+fedőlemez
- Vizsgálat fluoreszcensz mikroszóppal:
 - Élő sejtek: NARANCS
 - Holt sejtek: ZÖLD
- Számolás: véletlenszerűen kiválasztott látómezőkben, majd átlagolás

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM
Szervezeti egység

