

Howard-vizsgálatra alkalmas, állandósított paradicsompüré-készítmények előállítására

FÁBRI ILONA és VAS KÁROLY

Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet, Paradicsomkészítmények Minősítő Allomása, Budapest

Erkezett: 1957. január 16.

Paradicsomkészítmények penésztartalmának mikroszkópos vizsgálatára általánosan elterjedt a Howard-féle módszer (1, 2, 3). Az eljárás legkényesebb, legszubjektívebb, a legtöbb szakismeretet követelő része a penészfonal-törmelékek megkülönböztetése a paradicsomsejtek alkotóelemeinek törmelékeitől, aminek a dolog természetében rejlő nehézségeit a szükségszerűen gyenge nagyítás ($80\times$ – $120\times$) még csak fokozza. Az eljárásnak ezt a részét leírások alapján, könyvből nem lehet megtanulni, hanem csak megfelelő szakember vezetésével végzett mikroszkópi gyakorlatok révén. Ezért van az, hogy fejlett paradicsomiparral rendelkező államokban nagyszámú „Howard-iskola” működik a konzerviparban alkalmazandó mikroszkópos analitikusok számára. Ezekben az iskolákban az oktatás munkáját nagyban elősegíti úgynevezett permanens mikroszkópi preparátumok használata (4, 5). Ilyen preparátumok úgy készülnek, hogy megfelelő sablonnal rendelkező tárgylemezre kenjük fel a glicerinkocsonyával vagy ágárral kevert paradicsomlevet és azt lezárva tartósítjuk. Ily módon helyhez rögzített állapotban és megjelölt látóterekben lehet tanulmányozni a penészfonalakat és a látóterek „feltérképezése” révén kétség esetén bármikor elő lehet venni ezeket a készítményeket felvilágosítás céljából.

Az Intézetünkben folyó oktatási munka során mi is dolgoztunk ilyen preparátumokkal, vizsgálatuknál azonban többször didaktikai nehézséget okozott az a tény, hogy itt a paradicsomréteg vastagságát nem lehet kellőképpen szabályozni. Ez azzal az eredménnyel jár, hogy a permanens preparátum, mikroszkópon nézve, nem olyan fedettségű, mint a normális Howard-féle készítmények: vékonyabb, vagy tömöttebb azoknál. Az előbbi esetben túlkönnyű a penészfonal-törmelékek felismerése, az utóbbi esetben túlnehéz, gyakran majdnem lehetetlen.

A kérdés megoldását úgy képzeltük el, hogy ágárral megszilárdított 0,1 mm rétegvastagságú, 90% paradicsom-szárazanyag-tartalmú lemezkét állítunk elő Howard-kamrában és ezt tartósítjuk sablonnal ellátott tárgylemezen. Az adott rétegvastagságú ágárlemezke előállításának elvét Jones és Mollison

(6), továbbá Williams (7) leírásaiból vettük, akik (*Neubauer*-haemocytométerben) ilymódon készült, majd beszárított ágárlemezkeket alkalmaztak talajok, ill. baktériumszuszpenziók csíraszámának mikroszkópos mérésére.

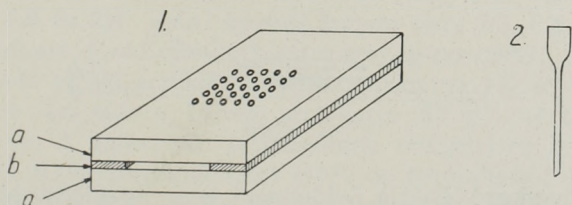
A módszer leírása

A sablon-tárgylemez elkészítése

Közönséges (25 × 75 mm) tárgylemezre, fedőlemez alá színes celofánpapír-darabot ragasztunk, melyen 5 egymás alatti sorban 5—5 db 1,38 mm átmérőjű kerek lyuk van fúrva a mikroszkópi látóterek helyzetének rögzítésére. A lyukak középpontjainak sor- és távköze 2,5 mm. (A Howard-eljárásnál a látótér átmérője 1,382 mm-re állítandó be.)

A celofánpapír színe lehetőleg kék legyen.

A celofándarab perforálását célszerűen erre szolgáló lyukasztóval végezzük (1. ábra).

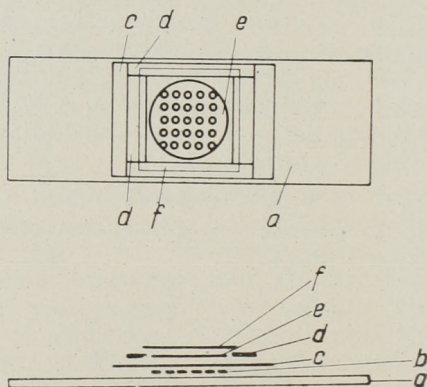


1. ábra

A lyukasztóberendezés két vastagabb vaslapból (1. ábra, 1a) áll (35 × 50 × 5 mm), melyek közé a két hosszanti oldalon két vékony (1,5 mm), keskeny (8 × 50 mm) fémlapot erősítünk (1. ábra, 1b). Az így keletkezett résbe kell beledugni a perforálandó celofánpapírt. A két vastagabb vaslemez közepén 1,38 mm-es fúróval át van fúrva 25 helyen: 5 sorban, 5—5 lyuk, egymástól — függőleges és vízszintes irányban egyaránt — 2,5—2,5 mm-re. A celofánpapír perforálása, a résbe való behúzás és az elmozdulás elleni rögzítés után, úgy történik, hogy egy pontosan a fúrónak megfelelő vastagságú, élesre köszörült végű acél-szöggel vagy fúróval (1. ábra, 2) végig lyukasztjuk a papírt a 25 helyen.

Az így elkészült, négyzetesre vágott celofánsablont (2. ábra, b) tárgylemez (2. ábra, a) közepére ragasztjuk 65%-os, etilace-

tátban oldott kanadabalzsammal, majd 24×32 mm-es fedőlemezzel (2. ábra, c) buborékmentesen lezárjuk. A tárgylemezt teljesen kiszáradni hagyjuk, ami szobahőn 3—4 hetet vesz igénybe. $80\text{—}90\text{ C}^\circ$ -os szárítószekrényben 6 óra alatt annyira megszilárdul a ragasztás, hogy tovább lehet folytatni a tárgylemez készítését. (Szárítás közben az esetleg keletkező buborékokat többszöri nyomogatással eltávolítjuk.)



2. ábra

A következő lépés a fedőlemezt tartó üveglécek (2. ábra, d) felragasztása a sablon-tárgylemezre. Erre azért van szükség, hogy a paradicsomos ágárlemezkét az esetleges összenyomódás ellen megvédjük.

Az üvegléc-keretet fedőlemezből (0,25 mm vastagság) vágjuk, 4—5 mm szélesre és olyan hosszúra, hogy a celofánsablont az üvegléckeret közrezárja. A ragasztást a fenti kanadabalzsammal végezzük oly módon, hogy az teljesen légmentes legyen. A szárítás a buborékképződés elkerülése céljából szobahőn történik kb. 2 napig. Ebbe a keretbe helyezük aztán bele az ágáros paradicsomlemezkét.

A paradicsomos ágárlemezké elkészítése

A kérdéses paradicsomkészítmény pH-ját lúggal 6 körülire állítjuk be, majd annyi vizet adunk hozzá, amennyivel — a kiindulási anyag szárazanyag-tartalmából számítva — a paradicsom szárazanyag-tartalom 17° Brix-nek megfelelő értékre (tö-

résmutató, $n_D^{20} = 1,3589$) áll be. Ezután pohárban vízfürdőn felmelegítve, azonos súlyú 6%-os, vizes ágároldatot adunk hozzá úgy, hogy a keverék számított *paradicsom* szárazanyag-tartalma kb. 8,5° Brix-nek megfelelő (törésmutató, $n_D^{20} = 1,3454$), ágártartalma pedig kb. 3% legyen.

Ha pl. a vizsgálandó püré kipréselt levének szárazanyag-tartalma cukorrefraktométerrel mérve, 28° Brix (azaz 28% cukoroldatnak megfelelő refrakciójú, tehát $n_D^{20} = 1,3776$) volt, akkor 30,4 g püréhez adjuk a szükséges mennyiségű 4%-os lúgot (ez nagyságrendileg 8 ml körül szokott lenni) és a keverék súlyát vízzel 50 g-ra egészítjük ki. Ehhez adjuk aztán hozzá a 6%-os ágároldatot úgy, hogy az összes súly 100 g legyen. Így $(30,4 \cdot 28,0/100 =)$ 8,5° Brixnek megfelelő *paradicsom* szárazanyagot és emellett 3% ágárt tartalmazó, 6 pH-s keveréket kapunk. Miután a nemzetközi előírások szerint a *Howard*-vizsgálatra kerülő püré szárazanyag-tartalmát úgy kell beállítani, hogy a szérum törésmutatója 1,3447 és 1,3460 (vagyis az oldható szárazanyag 7,9 és 8,8° Brix) közötti legyen (ami kb. 8,5 és 9,5% összes [oldható + oldhatatlan] szárazanyag-tartalmat jelent), a megengedett szélső értékeken belül maradunk akkor is, ha az ágároldatot nem súlyra, hanem térfogatra (50 ml) mérjük a *paradicsom*hoz. A mikróbák fejlődésének meggátlása céljából a keverékhez 0,1% formaldehidet (40%-os formalinból 0,25 ml-t 100 g-onként) adunk. — Az ágárnak teljesen tisztának, mikroszkópon látható nagyságú szennyeződésektől teljesen mentesnek kell lennie, hogy a penészfelismerést ne zavarja.

A forró, megolvasztott ágáros *paradicsom*léből a vízfürdő lapján előmelegített *Howard*-kamra kiemelkedésére 1—2 cseppet üvegbottal felkenünk és ugyanúgy előmelegített, vastag, plánpáralel, *Howard*-féle fedőlemezzel lefedjük, enyhe nyomást alkalmazva a fedőlemez két szélén. A kamrát a vízfürdő lapjáról levéve, kihűlni hagyjuk. A fedőlemez óvatos lecsúsztatása után 18 mm belső átmérőjű dugófúróval (kerek kiemelkedésű *Howard*-kamra esetén; egyébként szikével) a szélső vastagabb rétegeket az ágárlemezkeről eltávolítjuk, majd vízzel telt tálba rakjuk a *Howard*-tárgylemezt és megvárjuk, míg az ágárlemezke (2. ábra, e) fellazul. Ekkor a sablon-tárgylemezt a vízbe mártva, az ágárlemezket óvatosan a tárgylemez közepére juttatjuk. A vízből való kiemelés után a léceket itatóspapírral gondosan megtisztítjuk a víztől. Kanadabalzsam-oldattal kitöltve az ágárle-

mezke és a lécek közti teret, a léceket és az ágárlemezkét is bekenjük kanadabalzsammal és 20×20 mm-es száraz fedőlemezzel (2. ábra, f) résmentesen lezárjuk a preparátumot, melynek széleire további kanadabalzsam-réteget kenünk. Az ágárlemezke és a lécek közötti teret kanadabalzsam helyett vízzel is megtölthetjük. A fedőlemez buborékmentes ráhelyezése után a fedőlemezt kanadabalzsammal résmentesen lezárjuk. A szárítást szobahőmérsékleten, sötét helyen célszerű végezni. Időtartama 3—4 hét.

A tökéletes leragasztásra nagy figyelmet kell fordítani, mert ellenkező esetben a preparátum összezsugorodik. Ennek elkerülésére leragasztás előtt az üvegléc-keretnek és a fedőlemeznek teljesen száraznak kell lennie.

A módszer értékelése

A közölt eljárás a rendes *Howard*-vizsgálatokkal teljesen megegyező fedettségű mikroszkópi képet ad, biztosítja a preparátum teljes mozdulatlanságát és azt, hogy ugyanazt a látóteret minden nehézség nélkül, bármikor reprodukálhatóan beállíthassuk.

Ily módon az oktatási munkához nagyon jól felhasználhatók a készítmények. A celofánsablon nyílásainak megfelelő helyekre beállított, szabványos látótér-átmérőre kalibrált mikroszkóppal végigvizsgálva a preparátumot, a 25 látótér penészfonalait feltérképezhetjük (minden preparátumról külön ívet fektetünk fel rajzokkal) és így egy-egy látótérre demonstrálás céljából bármikor visszatérhetünk.

Az oktatás munkájának ilyen megkönnyítésén, eredményesebbé tételén túl a vázolt módon készült preparátumok *szabványos Howard-számolásra* is alkalmasak, miután paracicsom-szárazanyag-tartalmuk és rétegvastagságuk a hivatalos *Howard*-féle előírásoknak megfelelő. Elképzelhető ezért, hogy gyárakban, vagy ellenőrző laboratóriumokban *torlódások esetén* csak az ilyen preparátumokat készítenék el az analitikusok; a mikroszkópos-munkát ezáltal későbbre halaszthatjuk. További alkalmazási lehetősége a fenti eljárásnak, hogy kényes vizsgálatok esetén *utólagos ellenőrzésre*, a látóterek pozitív vagy negatív voltának bizottsági újraértékelésére, távol fekvő laboratóriumoknak való megküldésére is alkalmat nyújt.

IRODALOM

- (1) Howard, B. J.: U. S. Dept. Agr., Bureau of Chem., Cir. 68, 1911
- (2) Howard, B. J., Stephenson, C. H.: U. S. Dept. Agr., Bull. 581 és 569, 1917.
- (3) A.O.A.C. Methods of Analysis, Washington, 1950.
- (4) Wildman, J. D.: Science, 77, 170, 1954.
- (5) Smith, H. R.: J.A.O.A.C., 37, 170, 1954.
- (6) Jones, P. C. T., Mollison, J. E.: J. Gen. Microbiol., 2, 54, 1948.
- (7) Williams, R. E. O.: J. Gen. Microbiol., 7, 89, 1952.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ СТАНДАРТНЫХ ОБРАЗЦОВ ИЗ ТОМАТНОЙ ПАСТЫ ПРИГОДНЫХ ДЛЯ СПРЕДЕЛЕНИЯ „ГОВАРДОВОГО“ ЧИСЛА

И. Фабри и К. Ваш

Авторы описывают способ приготовления стандартных образцов томатного сока для микроскопического исследования. Эти образцы можно лучше использовать для обучения, чем до сих пор существовавшие, и кроме этого возможно применить также и для стандартного исследования Говардного числа, ввиду того, что имеют одно и тоже содержание сухих веществ и одну и ту же толщину слоя. Основа способа заключается в том, что из томатного сока с содержанием сухих веществ 9%-ов, с pH 6, при добавлении 3% агара и 0,1% формальдегида, готовится пластинка толщины 0,1 м/м в Говардной камере. Пластинка помещается на предметное стекло с шаблоном, покрывается покровым стеклом и заливается канадским бальзамом.

HERSTELLUNG VON ZUR HOWARD-PRÜFUNG GEEIGNETEN PARADEISBREIDAUERPRÄPARATEN

I. Fábri und K. Vas

Verfasser beschreiben die Herstellung von zu mikroskopischen Zwecken geeigneten fixierten Paradeissaft-präparaten; dieselben sind mit den bisherigen verglichen aus didaktischem Gesichtspunkte vorteilhafter und ausserdem nicht nur zu Lehrzwecken, sondern — infolge ihres vorschriftmässigen Inhaltes an Paradeistrockensubstanz und ihrer Schichtdicke — auch zur normentsprechenden Howardzahlbestimmung geeignet. Das Wesentliche des Verfahrens besteht darin, dass von dem cca. auf pH = 6 eingestellten, 9% Paradeistrockensubstanz, 3% Agar und 0,1% Formaldehyd enthaltenden Paradeissaft in der Howard Kammer eine Lamelle von 0,1 mm Schichtdicke hergestellt und dieselbe auf einem mit Schablon versehenen Objektträger unter dem Deckglas in Kanadabalsam eingebettet wird.

PREPARATION OF PERMANENT MOULD COUNT SLIDES SUITABLE FOR MAKING STANDARD HOWARD COUNTS

I. Fábri and K. Vas

Preparation of a new type of permanent mould count slide has been developed which not only is of superior didactical value, but also has the advantage of being directly applicable to *standard* Howard counting, due to the prescribed *tomato* solids content ($n_D^{50} = 1,3447 - 1,3460$) and to the standard thickness (0,1 mm.) of the tomato layer contained in it.

The method essentially consists in preparing a disc from tomato juice of pH 6 and of tomato solids content as stated above, preserved by 0,1% formaldehyde (CH₂O), and solidified with 3% agar in a regular Howard chamber. This tomato agar disc is embedded in Canada balsam on a microscopic slide provided with a perforated cellophane pattern (4, 5). The preparation is then covered by a cover-plate.

LA PRODUCTION DES PURÉES DE TOMATE PROPRES POUR L'ANALYSE SELON HOWARD

I. Fábri et K. Vas

Les auteurs décrivent la production des préparations microscopiques de jus de tomate conservées, laquelle, en vue didactique, semblent d'être supérieures aux précédentes, et, de plus, ne sont pas uniquement convenables à enseigner, mais, grâce à leur contenus en tomates secs prescrits ainsi qu'à leur épaisseur de couche, sont aussi propres au dénombrement régulier selon Howard. L'essentiel de cette méthode consiste dans la production d'une lamelle de l'épaisseur de 0,1 mm et d'un pH égal à 6 environ, consistante d'un jus de tomates qui contient 9% de secs, 3% d'agar et 0,1% de formaldéhyde; la production est effectuée dans une chambre Howard. Le produit est mis en baume de Canada posé sur l'objectif et observé par une plaque de couverture à une échelle d'observation.