

Biometrické hodnotenie stanovenia počtu baktérií v sušenom odstredenom mlieku

MÁRIA VALLUŠOVÁ — FRIDRICH GÖRNER

Súhrn. Príslušné mikrobiologické analytické metódy pre požívatinu sú štandardizované a posudzovanie nimi získaných výsledkov vyžaduje znalosť matematicko-štatisticky odôvodnených tolerancií.

Pri 244-násobnom vyšetrení troch vzoriek sušeného odstredeného mlieka sa zistilo, že pri zriadení vyšetrovaných vzoriek 10^{-1} (počet KTJ na Petriho miske medzi 24 až 264) bola presnosť určenia vyjadrená relatívnou smerodajnou odchýlkou (s_r) pri $\pm 2 s_x \pm 34,8$ %. Táto hodnota je podobná ± 30 %, ktorú pre takéto vyšetrenia udáva ČSN 56 0100 [1]. Pri menšom počte KTJ na Petriho miske (< 30) treba počítať s relatívnou smerodajnou odchýlkou ± 60 %.

Najstaršou, ale doteraz nenahraditeľnou metódou stanovenia počtu baktérií v mlieku a iných potravinách je Kochova kultivačná metóda na agarových živných pôdach alebo v nich na Petriho miskách (PM). Je to metóda značne empirická. Bakteriálne bunky sa vo vyšetrovaných produktoch vyskytujú izolované, v pároch, v retiazkach a v rozličných zhlukoch. Preto počty kolónií, ktoré na živnej pôde alebo v živnej pôde narastú, nereprezentujú počet jednotlivých buniek. Okrem toho niektoré baktérie na použitej živnej pôde nevytvoria viditeľné kolónie, lebo im nevyhovuje jej zloženie, prístup vzdušného kyslíka, kultivačná teplota, kultivačný čas a iné podmienky [8]. Z uvedených dôvodov sa namiesto udávania tzv. „celkového počtu baktérií“ v hmotnostnej alebo objemovej jednotke ujal v literatúre pojem „kolónie tvoriace jednotky“ (KTJ); je to počet na polotuhej živnej pôde viditeľných kolónií, prepočítaný na ml alebo g vyšetrovaného produktu.

Na dosiahnutie porovnateľných výsledkov musia byť analytické metódy slúžiace pre kontrolné a hospodárske organizácie štandardizované. Túto požiadavku u nás zabezpečujú československé štátne normy [1].

Ing. Mária Vallušová, Prof. Ing. dr. Fridrich Görner, DrSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

Vedľa vhodných štandardných analytických metód sú dôležité aj jednotné spôsoby posudzovania výsledkov mikrobiologických analýz, a to pre kontrolné orgány i pre základný a aplikovaný výskum. Pri posudzovaní výsledkov sa musí vychádzať z heterogenosti distribúcie mikroorganizmov vo vyšetrovanej vzorke, partii alebo z denného kolísania obsahu sledovaných mikroorganizmov vo vyšetrovanom produkte a z *presnosti a zhodnosti*, resp. *spoľahlivosti* výsledkov vyšetrení určitou metódou. Na to sa svojím spôsobom pamätá aj v ČSN 56 0100. Pri každej metóde sa tu uvádza odstavec s nadpisom „Presnosť“, „Zhodnosť“ resp. „Spoľahlivosť skúšky“.

Presnosť je rozdiel vo výsledkoch vyšetrení tej istej vzorky v tom istom laboratóriu, za rovnakých podmienok.

Zhodnosť je rozdiel vo výsledkoch vyšetrení tej istej vzorky dvoma laboratóriami za rovnakých podmienok.

Spoľahlivosť skúšky je súhrn presnosti a zhodnosti [1, 9].

Určité nedorozumenie v kruhoch potravinárskych mikrobiológov vyvolalo vydanie ČSN 56 0082 „Potravinárske výrobky. Zásady kultivácie mikroorganizmov a spôsob spracovania výsledkov pri mikrobiologickom vyšetrovaní“, platnej od r. 1984. V nej sa uvádza: „Táto norma nahrádza články 23, 48 až 56 až 68 v ČSN 56 0100“. V týchto článkoch (napr. 66) sa uvádzajú aj poučenia o najvyšších prístupných odchýlkach výsledkov mikrobiologického vyšetrenia vzoriek s odkazom na jednotlivé metódy (variačná šírka). V dôsledku vydania tejto normy zrušila u nás Štátna inšpekcia akosti v Bratislave „pri vyhodnocovaní mikrobiologických výsledkov mliekárenských výrobkov zohľadňovanie 30 % tolerancie prekročenia koliformných baktérií vo výrobkoch“ (ŠIA, 5154/84-Ko, zo dňa 19. 12. 1984).

V tejto súvislosti a v snahe na experimentálne získaných výsledkoch znázorniť problematiku presnosti výsledkov kvantitatívnych mikrobiologických vyšetrení, ako aj ich hodnotení v kontrolnej a výskumnej praxi, zamerali sme sa v tomto príspevku na určenie „celkového počtu baktérií“ vyjadrených ako KTJ vyrastené z príslušného zriedenia sušeného odstredeného mlieka, prepočítané na 1 g produktu a urobili sme jeho matematickoštatistické zhodnotenie.

Materiál a metóda

Na vyšetrenie sa použili vzorky sušeného odstredeného mlieka (SOM) vyrobeného v sušiarenských závodoch n. p. MILEX.

Pri mikrobiologickom vyšetrovaní sa pokračovalo zásadne podľa ČSN 56 0100. Ako živná pôda sa použil mäsopeptónový agar, výrobok n. p. Imuna, Šariš-

ské Michaľany, zloženia: peptón pre bakteriologiu 10 g, NaCl 5 g, agar 15 g, destilovaná voda 1000 ml; pH po rozplnení $7,2 \pm 0,2$. Pri vyhodnocovaní kolónií vyrastených na živnej pôde sme pokračovali podľa ČSN 56 0082 [4].

Vyšetřili sme tri vzorky SOM. Počet vyšetření jednej vzorky sa volil vysoký 8 až 28 razy, aby sa čo najviac kompenzovali náhodné chyby jednotlivých vyšetření a brala do úvahy aj nerovnomerná distribúcia baktérií vo vzorke. Vzorka sa vyšetřovala v ten istý deň 3—4-krát v dvoch paralelných radoch počnúc od návážku. Ďalšie vyšetřenia sa robili do piatich dní, vždy rovnakou metódou, v rovnakom laboratóriu a rovnakými pracovníkmi. Zvlášť sa hodnotili výsledky získané počítaním vyrastených kolónií za 24 h a za 48 h a výsledky získané z misiek s nízkym počtom kolónií a s vyšším počtom kolónií.

Kvantitatívnym mikrobiologickým vyšetřením získané výsledky sme podrobili matematickoštatistickej analýze, pričom sme vypočítali ich aritmetický priemer (\bar{x}), smerodajnú odchýlku (s_x) a relatívnu smerodajnú odchýlku (s_r) [5, 7].

Výsledky a diskusia

Výsledky mikrobiologického vyšetřenia SOM na celkový počet KTJ. g^{-1} a ich matematickoštatistické hodnotenie zhŕňa tabuľka 1.

Pri porovnaní aritmetických priemerov výsledkov stanovenia celkového počtu KTJ. g^{-1} v SOM nachádzame zdanlivé nezrovnalosti. Príčinu veľkého rozdielu priemerných výsledkov B_1 a B_2 (2775 KTJ. g^{-1} a 4250 KTJ. g^{-1}) pri odčítaní za 24 h vidíme vo vysokej relatívnej smerodajnej odchýlke (s_r pre $\pm 2 s_x \pm 121,4 \%$), ktorú najpravdepodobnejšie spôsobil nízky počet KTJ na PM (2 až 9). Pri odčítaní výsledkov za 48 h boli priemery počtov KTJ. g^{-1} spravidla väčšie ako za 24 h, ale nie úmerne. To bolo zjavné najmä pri priemerných výsledkoch A_2 a A_4 (15 976 KTJ. g^{-1} a 25 661 KTJ. g^{-1}), ako aj pri B_2 a B_4 (4250 KTJ. g^{-1} a 7375 KTJ. g^{-1}). Príčinu tohto javu možno pravdepodobne vysvetliť rozličnými rýchlosťami rastu kolónií rozličných baktérií. Podľa Hattoriho [6] je priemer kolónií (d) lineárne úmerný špecifickej rastovej rýchlosti príslušných buniek. Na obrázku 1 vidieť, že priemery kolónií na PM boli asi v pomere 1 : 10 a viac.

Ak sa opýtame, či vzorky SOM, ktoré sme vyšetřili, vyhovovali požiadavke ČSN 57 0803 [3], ktorá určuje, aby „celkový počet baktérií“ z 1 g SOM nebol vyšší ako 50 000 KTJ. g^{-1} , môžeme povedať áno, lebo určené počty KTJ. g^{-1} v SOM boli v rozmedzí 2670 až 25 661. Toto rozmedzie zahŕňa určenie aj pri nepriaznivých podmienkach, t. j. pri vyššom zriedení (10^{-2}) a v dôsledku toho nízkom počte KTJ na Petriho miskách, ako aj odčítanie za 48 h.

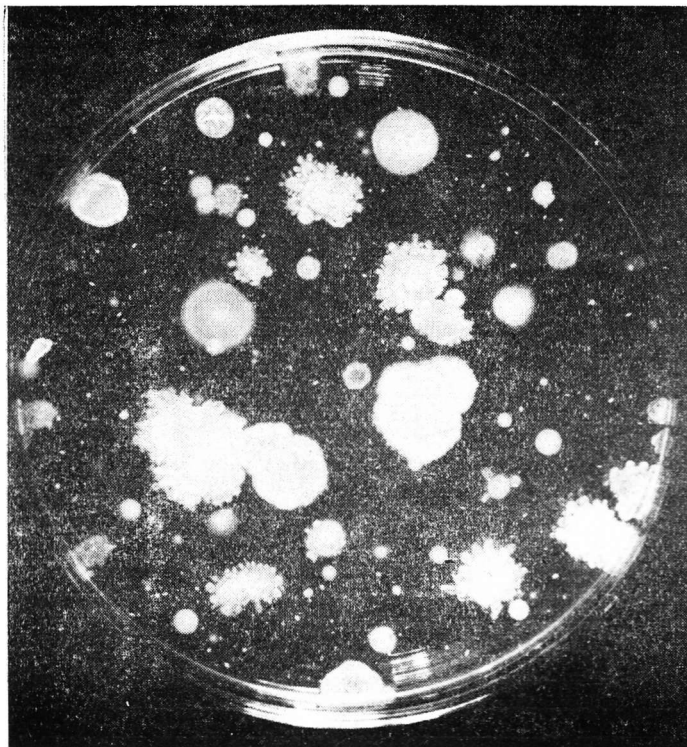
Tabuľka 1. Výsledky vyšetrovni počtu KTJ .g⁻¹ v sušenom odstredenom mlieku
 Table 1. The results of the investigation of the KTJ g⁻¹ count in dried skim milk

Vzorka ¹	Vyšetrenie ²	Počet vyšetrovni ³ <i>n</i>	Čas kultivácie ⁴ [h]	Zriedenie ⁵	Počet ⁶ [KTJ/PM]	\bar{x} [KTJ .g ⁻¹]	Rozdiel ⁷ [%]	$s_{\bar{x}}$ [KTJ .g ⁻¹]	<i>s_r</i> [%]		
									$\pm 1s_{\bar{x}}$	$\pm 1,5s_{\bar{x}}$	$\pm 2s_{\bar{x}}$
A	1	24	24	10 ⁻¹	102—219	15 704	1,7	2 925	18,6	27,9	37,2
	2	24	24	10 ⁻²	6—25	15 976		3 878	24,3	36,5	48,5
	3	28	48	10 ⁻¹	128—264	19 057	35	3 403	17,9	26,8	35,8
	4	28	48	10 ⁻²	11—39	25 661		5 652	22,0	33,0	44,0
B	1	8	24	10 ⁻¹	24—33	2 775	53	369	13,3	19,9	26,6
	2	12	24	10 ⁻²	2—9	4 250		2 580	60,7	91,1	121,4
	3	20	48	10 ⁻¹	7—45	2 670	176	1 032	38,6	57,9	77,2
	4	20	48	10 ⁻²	2—12	7 375		2 986	40,5	60,8	81,0
	1	20	24	10 ⁻¹	47—60	5 220	2,9	386	7,4	11,1	14,3

Z tohto môžeme usudzovať, že pri určení limitu $50\,000\text{ KTJ}\cdot\text{g}^{-1}$ sa brala do úvahy variačná šírka výsledkov stanovenia CPB spôsobená chybou metódy, i nerovnomernou distribúciou baktérií vo vyšetrovaných vzorkách SOM. V ČSN 56 0100 [1] sa pre tieto vyšetrenia určuje presnosť $\pm 30\%$.

My sme matematickoštatistickým hodnotením všetkých výsledkov (pri zriedení 10^{-1} a 10^{-2} a odčítaní za 24 a 48 h) zistili priemernú relatívnu smerodajnú odchýlku s_r pri $\pm 2 s_x \pm 48,3\%$, zaokrúhlene $\pm 50\%$, pravdepodobnosť omylu $p = 5\%$. Táto je vyššia ako $\pm 30\%$ podľa ČSN 56 0100 [1]. Ak ale vypočítame priemernú s_r zvlášť pre výsledky získané zo zriedenia vzorky 10^{-1} , čo je vzhľadom na väčší počet KTJ na miskách pre presnosť určenia výhodnejšie, obdržíme $s_r \pm 34,8\%$. Pre vyššie zriedenie 10^{-2} , pre menší počet kolónií, pre presnosť nevýhodnejší, obdržíme priemernú $s_r \pm 61,7\%$.

Z tejto úvahy vyplýva, že pri vhodnom zriedení vzoriek (v našom prípade 10^{-1}) bola variačná šírka určenia CPB v SOM, ktorú sme zistili, $\pm 34,8\%$, teda



Obr. 1. Kolónie (KTJ) zo sušeného odstredeného mlieka vyrastené na MPA.

Fig. 1. Colonies forming units (KTJ) from dried skim milk grown at the agar meat infusion.

podobná ako ± 30 %, ktorú udáva ČSN 56 0100 [1]. Weiss a Arndtová [10] zistili pre presnosť určenia CPB v SOM variačnú šírku $\pm 25,9$ až $\pm 41,3$ % ($p = 5$ %). Možno preto potvrdiť, že $s_r \pm 30$ % pre presnosť určenia CPB v ČSN 56 0100 [1] je reálna. Pri numerickom limite 50 000 KTJ.g⁻¹ a presnosti určenia CPB ± 30 % by nemal byť priemerný skutočný obsah KTJ.g⁻¹ v SOM vyšší ako približne 38 400 KTJ.g⁻¹. V praxi sa však pri nízkom počte KTJ.g⁻¹ v produkte a vyššom zriedení vzorky stáva, že na Petriho miskách narastie málo kolónií (<30). V takomto prípade musíme uvažovať s vyššou priemernou s_r , podľa tu prezentovaných výsledkov $\pm 61,7$ %, zaokrúhlene ± 60 % ($p = 5$ %). Potom pri numerickom limite 50 000 KTJ.g⁻¹ by nesmel skutočný priemerný obsah KTJ.g⁻¹ v SOM prekročiť približne 31 500 KTJ.g⁻¹.

Uvedená úvaha je platná pre stanovenie a posudzovanie obsahu CPB v SOM z hľadiska kontrolnej praxe. Pri výskumných úlohách, napr. pri sledovaní dynamiky odumierania baktérií v SOM počas jeho skladovania treba vždy počítať s presnosťou stanovenia ± 30 % alebo inou, zistenou experimentálne. Takto treba posudzovať aj pomerné zastúpenie rodov a druhov baktérií pri kvalitatívnej mikrobiologickej analýze v porovnaní s CPB.

Pre pracovníkov, ktorí sa zaoberajú posudzovaním výsledkov kvantitatívneho i kvalitatívneho mikrobiologického vyšetrovania požívatin, by malo byť samozrejmé, aby ovládali základné matematickoštatistické metódy ich vyhodnocovania. Tieto im dávajú možnosť získané výsledky hodnotiť objektívne a robiť zovšeobecňujúce závery, resp. vydávať odôvodnené závažné rozhodnutia.

Literatúra

1. ČSN 56 0100. Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven. 1968.
2. ČSN 57 0101. Mikrobiologické zkoušení mléka a mléčných výrobků. 1963.
3. ČSN 57 0803. Sušené mléko. Technické požadavky. 1980.
4. ČSN 56 0082. Potravinářské výrobky. Zásady kultivace mikroorganismů a způsob zpracování výsledků při mikrobiologickém zkoušení. 1984.
5. ECKSCHLAGER, K. — HORSÁK, I. — KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL 1980, 224 s.
6. HATTORI, T., Kinetics of Colony Formation of Bacteria. Report of the Institute for Agricultural Research. 34. 1985, s. 36.
7. LOKVENC, F. A.: Matematicko-statistické metody hodnocení. In: Kočková-Kratochvílová, A.: Praktikum technické mikrobiologie. Praha, SNTL 1954, s. 377.
8. MARTH, E. H.: Standard Methods for Examination of Dairy Products. 14. vyd. Washington D. C., American Public Health Association 1978, s. 416.
9. VACOVÁ, T., Bulletin PV, 16, 1977, s. 39.
10. WEISS, H. — ARNDT, G., Dtsch. tierärztl. Wschr., 92, 1985, s. 64.

Биометрическая оценка определения количества бактерий в сушеном сепарированном молоке

Резюме

Соответствующие микробиологические аналитические методы для продуктов питания стандартизованы и оценка ими полученных результатов требует знаний математическо-статистически обоснованных допусков.

При 244-кратном исследовании трех проб сушеного сепарированного молока было установлено, что при разбавлении исследованных проб 10^{-1} (количество КПЕ — „колоний представляющие единицы“ — в чашке Петри между 24 и 264) была точность определения выражена относительным стандартным отклонением (S_r) при $\pm s_x \pm 34,8\%$. Это значение имеет сходство с $\pm 30\%$, которое для таких исследований назначает ЧСН 56 0100. При меньшем количестве КПЕ в чашке Петри (<30) необходимо учитывать относительное стандартное отклонение $\pm 60\%$.

Biometric evaluation of bacteria quantity in dried skim milk

Summary

The respective microbiological analytical methods for foodstuffs are standardized. The evaluation of obtained results demands the knowledge of mathematic and statistic admissible tolerances.

At 244 times repeated investigations of three samples of dried skim milk, it was determined that the evaluation's accuracy of investigated samples diluted on 10^{-1} was expressed as relative standard deviation (s_r) at $\pm 2s_r \pm 34.8\%$ (count of colony forming units on Petri dish ranged with 24—264). This value is the similar one ($\pm 30\%$) to the Czechoslovak standard No. 56 0100 [1] recommended for those investigations. It is necessary to calculate with relative standard deviation $\pm 60\%$ in case of the lower count of colony forming units (CFU) on Petri dish (<30).