

Hodnotenie mikrobiologickej kvality nakupovaného mlieka

JARMILA PREKOPPOVÁ — ZDENĚK KRČÁL

Súhrn. Porovnáva sa resazurínový test používaný na hodnotenie mikrobiologickej kvality nakupovaného mlieka s inými redukčnými testami a s klasickými platňovými metódami stanovenia počtov mikroorganizmov.

Z porovnávaných testov bol najpresnejší a najobjektívnejší resazurínový test s predinkubáciou 3 h pri 30 °C a s následnou inkubáciou 2 h pri 37 °C.

Zo sledovaných redukčných testov bol najmenej vhodný bežne používaný resazurínový test, napriek tomu, že vyhodnocovanie sa uskutočňovalo po predĺženom čase inkubácie (120 min).

Mikrobiologická kvalita mlieka je jedným z hlavných ukazovateľov, podľa ktorých sa mlieko zatrieďuje do kvalitatívnych tried. Tento ukazovateľ sa berie do úvahy aj pri novelizácii normy pre surové mlieko a jeho hodnotenie.

Na sledovanie a hodnotenie tohto kritéria (mikrobiologickej kvality) sa stále hľadajú nové metódy, ktoré by objektívnejšie, najmä zo stránky technologickej, vyjadrili kvalitatívne znaky nakupovaného mlieka.

Okrem platňových metód sa na hodnotenie mikrobiologickej kvality mlieka používajú aj redukčné testy. Z najjednoduchších testov sa využívajú redukčné testy s metylénovou modrou, resazurínom a nitrátovým redukčným testom. Inkubačná teplota 30 °C, ako ju odporúčajú niektorí autori, namiesto 37 °C pre tieto metabolické testy, sa zakladá na tom, že psychrotrofné baktérie, dominujúca zložka mikroflóry vychladeného surového mlieka horšej kvality, sú neschopné rozmnožovať sa alebo vyvinúť redukčnú aktivitu pri 37 °C.

Ako ukázali pozorovania mnohých domácich [1—3] i zahraničných autorov [4], resazurínový test, používaný u nás na hodnotenie mikrobiologickej kvality surového mlieka, nie je dostatočne objektívny a mlieko všeobecne nadhodnocuje, a to aj vtedy, ak sa hodnotenie uskutočňuje po predĺženom čase inkubácie na 120 minút, aj keď sa v tomto prípade počet vzoriek zaradených do

Ing. Jarmila Prekopková, Ing. Zdeněk Krčál, CSc., Výskumný ústav mliekárenský, Ražecká cesta, 010 00 Žilina.

I. kvalitatívnej triedy znižuje približne o 25 % [3], čiže hodnotenie sa viac približuje skutočnej mikrobiologickej kvalite.

V predloženej práci sa zaoberáme porovnaním doteraz používaného resazurínového testu s inými redukčnými testami, ako aj s platňovými metódami stanovenia počtov mikroorganizmov.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Vo všetkých prípadoch sa porovnával resazurínový test s predĺženým časom inkubácie (2 h/37 °C), pretože pri predchádzajúcich pozorovania [3] sa zistili objektívnejšie výsledky pri zaradení mlieka do jednotlivých kvalitatívnych tried pri predĺženom čase inkubácie, v porovnaní s celkovým počtom zárodkov zisťovaným platňovou metódou. Celá práca sa rozdelila na tri etapy.

Porovnávané redukčné testy

V prvej etape sa porovnával resazurínový test s redukčným testom s metylénovou modrou (inkubácia pri 30 a 37 °C) a s nitrátovým redukčným testom za použitia kvasničnej vody (inkubácia 2 h/37 °C) alebo zjednodušeným testom za použitia KNO_3 (inkubácia 2 h/37 °C) a s resazurínovým testom s predinkubáciou 16 hodín pri 15 °C (inkubácia 2 h/27 °C).

V druhej etape sa porovnával resazurínový test s nitrátovým redukčným testom s kvasničnou vodou, ktorý sa javil citlivejší ako test s KNO_3 , a s resazurínovým testom s predinkubáciou 1 a 3 h pri teplote 30 °C bez predbežného zahriatia na uvedenú teplotu. Vlastná inkubácia sa uskutočňovala pri teplote 30 a 37 °C 1 a 2 hodiny.

V tretej etape sa do pozorovania zahrnul resazurínový test s predinkubáciou 1 a 2 h pri 37 °C, s následnou inkubáciou 1 a 2 h pri teplote 30 a 37 °C. Pritom sa vzorky mlieka rozdelili na dve časti, z ktorých jedna sa zahrievala na 30 °C a až potom predinkubovala pri uvedenej teplote, aby sa zistilo, k akým rozdielom dôjde pri zatriedovaní mlieka do jednotlivých tried, keď sa mlieko predhreje, resp. nepredhreje na teplotu predinkubácie. Porovnanie sa uskutočnilo s resazurínovým testom, pričom sa odpočet robil po 90 a 120 minútach inkubácie pri 37 °C. Celkove sa vo všetkých troch etapách vyšetrilo 268 vzoriek mlieka.

Použité platňové metódy

Pre objektivnosť sa mikrobiologická kvalita mlieka vo všetkých troch etapách zisťovala aj klasickými platňovými metódami, pričom sa zisťoval celkový počet zárodkov na MPAL, 30 °C, 72 hodín (ČSN 56 0100), koliformné zárodky na MPAL s brómtymolovou modrou a trypaflavínom, 37 °C, 48 hodín (ČSN 56 0100). Súčasne sa určoval aj počet psychrotrofných zárodkov na MPAL, 7 °C, 7 dní, ktoré sa v súčasnosti dostávajú do popredia v súvislosti s chladením mlieka v prvovýrobe.

Zatriedovanie vzoriek mlieka do tried podľa výsledkov redukčných testov a platňových metód

Na základe výsledkov redukčných testov i podľa výsledkov platňových počtov sa mlieka zaraďovali do troch tried.

Pri resazurínovom teste:

- I. trieda — zafarbenie modré, modré s fialovým nádychom,
- II. trieda — fialové až ružovonačervenaté,
- III. trieda — ružové až biele.

Pri teste s metylénovou modrou — I. trieda po 4 hodinách odfarbenia, II. trieda 1—4 hodiny a III. trieda menej ako 1 hodina.

Pri nitrátovom redukčnom teste s kvasničnou vodou sa vzorky hodnotili takto: v I. triede nezmenené, bezfarebné mlieko, v II. triede začínajúce ružové zafarbenie až zreteľné ružové zafarbenie (0,5—1,5 μg dusitanov), v III. triede intenzívna ružová až červená farba (viac ako 2 μg dusitanov, intenzívne červená 50 μg dusitanov).

Pri nitrátovom redukčnom teste s KNO_3 + I. trieda — nezmenená biela farba, II. trieda — slabý až zreteľný ružový odtieň, III. trieda — sýtoružový až červený odtieň.

Rovnako sa mlieka zaraďovali do troch tried podľa celkového počtu zárodkov a podľa počtu koliformných zárodkov takto: I. trieda 500 000 ml^{-1} do 30 000 ml^{-1} , II. trieda do 2,5 mil a do 40 000 ml^{-1} a III. trieda nad 2,5 mil a nad 40 000 ml^{-1} . Podľa počtu psychrotrofných zárodkov sa mlieka do tried nezaraďovali.

Vyhodnotenie výsledkov

Zistené výsledky sa vyhodnotili matematickoštatisticky. Vzťah medzi log celkového počtu zárodkov, log počtu koliformných zárodkov a log počtu psychrotrofných zárodkov a medzi triedou, do ktorej bola príslušná vzorka mlieka

zaradená podľa výsledkov redukčných testov, zisťoval sa pomocou korelačného koeficienta.

Rozdiely medzi triedou, do ktorej bolo mlieko zaradené na základe platňového počtu (celkový počet zárodkov, počet koliformných zárodkov, ako aj podľa obidvoch týchto skupín mikroorganizmov spolu), a medzi triedou vyhodnotenou na základe výsledkov redukčných testov sa vyhodnotili *t*-testom pre párované hodnoty [5].

Výsledky a diskusia

Vo všetkých troch etapách sledovania sa zistil vysoký celkový počet zárodkov, a to najnižší v tretej etape $5\,585\,000\text{ ml}^{-1}$ a najvyšší v prvej etape $8\,557\,000\text{ ml}^{-1}$. Možno teda povedať, že vo väčšine prípadov išlo o mlieka horšej mikrobiologickej kvality. Svedčí o tom aj to, že iba jedna vzorka (0,37%) s počtom $500\,000\text{ ml}^{-1}$ bola zaradená do I. triedy. Do II. triedy bolo zaradených 18 vzoriek, t. j. 6,72 %. Všetky ostatné vzorky boli zaradené do III. triedy.

Korelácia medzi log celkového počtu zárodkov a jednotlivými redukčnými testami bola rôzna (tab. 1). Najužšia korelácia (0,995) sa zistila medzi log celkového počtu zárodkov a medzi redukčným testom s predinkubáciou 3 h/30 °C a s následnou inkubáciou 2 h/37 °C. Štatisticky nevýznamná korelácia sa zistila iba pri sledovaní resazurinovým testom s predinkubáciou 1 h/30 °C. Korelačný koeficient (0,379) zistený pri použití bežného resazurinového testu, aj keď bol štatisticky významný, bol podstatne nižší.

Najvyššie zistené počty koliformných zárodkov boli v I. etape, keď sa v priemere zistilo až 77 260 zárodkov v 1 ml. Lepšie výsledky v počte koliformných zárodkov sa dosiahli v druhých dvoch etapách, keď priemerné počty boli pod 30 000, čiže dosahovali hodnoty pre zaradenie do I. triedy. I v tomto prípade sa najlepšia korelácia dosiahla pri resazurinovom teste s predinkubáciou 3 h/30 °C a s následnou inkubáciou 2 h/37 °C.

Tretou skupinou mikroorganizmov, ktorú sme sledovali, aj keď sa jej stanovenie nevyžaduje pri štandardnom mlieku, boli psychrotrofné zárodky. I v tomto prípade sa najužší korelačný koeficient (0,987) zistil pri porovnaní s resazurinovým testom s predinkubáciou 3 h/30 °C, s následnou inkubáciou 2 h/37 °C.

Počty psychrotrofných zárodkov, ktoré sme zistili, boli vysoké a dosahovali hodnoty 10^5 – $10^7\text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$. Takéto vysoké počty psychrotrofných zárodkov sú v mlieku neželateľné a produkty vyrobené z takéhoto mlieka môžu mať nevítané senzorické vlastnosti.

Tabuľka 1. Matematicko-štatistické vyhodnotenie korelácie medzi počtami mikroorganizmov v triedach podľa klasickej platňovej metódy a podľa redukčných testov

Table 1. A mathematic-statistical evaluation of correlation between the counts of microorganisms in classes according to the standard plate method and reduction tests

Skupina mikroorganizmov ⁽¹⁾	Počet meraní ⁽²⁾	Hodnoty korelačného koeficientu ⁽³⁾							Tabulková hodnota ⁽⁶⁾ $\alpha = 0,01$	
		Resazur. test ⁽⁴⁾	NRT-test s kvasnicami vo- dov ⁽⁵⁾	Resazurin. test s predinkub. 1 h/30 °C ⁽⁶⁾		Resazurinový test s predinkubáciou 3h/30 °C ⁽⁷⁾				
				37 °C	30 °C	37 °C/1 h	30 °C/2 h	30 °C/1 h		30 °C/2 h
Celkový počet zárodkov ⁽⁸⁾ Psychrotrofné zárodky ⁽¹⁰⁾ Koliformné zárodky ⁽¹¹⁾	108	0,379	0,464	0,290	0,244	0,564	0,995	0,446	0,400	0,250
	108	0,464	0,480	0,520	0,455	0,429	0,987	0,438	0,410	0,250
	108	0,410	0,348	0,368	0,346	0,222	0,508	0,380	0,280	0,250

⁽¹⁾Group of microorganisms; ⁽²⁾Number of measurements; ⁽³⁾Values of correlation coefficient; ⁽⁴⁾Resazurin test; ⁽⁵⁾NRT-test with yeast water; ⁽⁶⁾Resazurin test with preincubation of 1 h at 30 °C; ⁽⁷⁾Resazurin test with preincubation of 3 h at 30 °C; ⁽⁸⁾Table value; ⁽⁹⁾Total count of germs; ⁽¹⁰⁾Psychrotrophic germs; ⁽¹¹⁾Coliform germs.

Počty psychrotrofných zárodkov sa neuvádzajú v požiadavkách na hodnotenie štandardného mlieka. V návrhu normy pre surové mlieko sa však stanovovanie počtov psychrotrofných zárodkov vyžaduje pri hodnotení výberového mlieka, kde sú zvýšené požiadavky na mikrobiologickú kvalitu. Pri výberovom mlieku sa vyžaduje počet psychrotrofných zárodkov max. 50 000 ml⁻¹. Ani jedna zo sledovaných vzoriek mlieka nezodpovedala požiadavkám na výberové mlieko a pod 1 ml psychrotrofných zárodkov malo iba 30 % všetkých vyšetrovaných vzoriek. To znamená, že až 70 % sledovaných vzoriek malo hodnoty 10⁶ ml⁻¹ a vyššie, čo poukazuje na nedostatočné čistenie a dekontamináciu v prvovýrobe, pretože pri získavaní a ošetrovaní mlieka za dobrých hygienických podmienok sa do neho nedostane viac ako okolo desiatky psychrotrofných mikroorganizmov na 1 ml.

Vhodnosť použitých redukčných testov a skutočnosť, či sú lepšie alebo horšie ako doteraz používaný resazurínový test, zhodnotila sa na základe vzoriek zaradených do jednotlivých tried, pričom rozdiely medzi zaradením do tried na základe platňových metód a redukčných testov sa vyhodnotili matematicko štatisticky (tab. 2).

Na základe zistených výsledkov sa ako najpresnejší javí resazurínový test s predinkubáciou 3 h/30 °C a s následnou inkubáciou 2 h/37 °C. Výsledky tohto testu najlepšie korelovali s výsledkami zistenými platňovými metódami. Rovnako zaradenie mliek do kvalitatívnych tried na základe tohto testu a výsledkov platňových počtov bolo najpresnejšie. Zistené rozdiely boli štatisticky nevýznamné.

Z ďalších testov sa ako dostatočne citlivý javil test s predinkubáciou 2 h/30 °C s predhriatím a bez predhriatia a s následnou inkubáciou 2 h/37 °C. Aj keď korelácia s platňovými počtami bola nižšia, zaradenie mliek do kvalitatívnych tried na základe týchto testov sa približovalo zaradeniu podľa platňových počtov. Zistené rozdiely medzi zaradením vzoriek do tried na základe platňových počtov a uvedených redukčných testov bolo štatisticky nevýznamné.

Z iných porovnávaných redukčných testov sa javil vhodnejší nitrátový redukčný test s kvasničnou vodou ako test s KNO₃ a ako test s metylénovou modrou. Aj keď korelácia zistená nitrátovým redukčným estom s kvasničnou vodou nebola vyššia ako ďalšími uvedenými dvoma testami, rozdiely pri zaradení vzoriek mliek do kvalitatívnych tried na základe tohto testu boli podstatne nižšie ako pri zaradení spomínanými dvoma testami. Zistené rozdiely boli štatisticky významné pri všetkých týchto testoch.

Najväčšie rozdiely sa zistili pri zaradení vzoriek mliek do kvalitatívnych tried medzi bežne používaným resazurínovým testom a platňovými metódami, i napriek tomu, že vyhodnocovanie sa uskutočňovalo po 120 minútach inkubácie, keď sa všeobecne dosahujú objektívnejšie výsledky.

Tabuľka 2. Matematickoštatistické vyhodnotenie rozdielov medzi triedou podľa platňovej metódy a medzi triedami zistenými redukčnými testami

Table 2. A mathematic-statistical evaluation of differences between a class according to the plate method and classes obtained by reduction tests

Skupina mikroorganizmov ⁽¹⁾	Počet meraní ⁽²⁾	Hodnoty <i>t</i> -testu ⁽³⁾								Tabuľková hodnota ⁽⁴⁾ α = 0,01
		Resazur. test ⁽⁴⁾	NRT-test s kvasničnou vodou ⁽⁵⁾	Resazurin. test s predinkub. 1 h/30 °C ⁽⁶⁾		Resazurinový test s predinkubáciou 3h/30 °C				
				37 °C	30 °C	37 °C/1 h	37 °C/2 h	30 °C/1 h	30 °C/2 h	
Celkový počet zárodkov ⁽⁹⁾	108	16,532	12,353	12,071	15,283	4,479	1,069	6,638	6,896	2,617
Koliformné zárodky ⁽¹⁰⁾	108	1,501	3,386	7,044	2,810	8,966	11,672	7,599	10,249	2,617
Celkový počet zárodkov + koliformné zárodky ⁽¹¹⁾	108	16,513	12,571	7,574	11,678	4,462	1,215	6,614	3,473	2,617

⁽¹⁾Group of microorganisms; ⁽²⁾Number of measurements; ⁽³⁾Values of *t*-test; ⁽⁴⁾Resazurin test; ⁽⁵⁾NRT-test with yeast water;

⁽⁶⁾Resazurin test with preincubation of 1 h at 30 °C; ⁽⁷⁾Resazurin test with preincubation of 3 h at 30 °C; ⁽⁸⁾Tabuľková hodnota; ⁽⁹⁾Total

Ako sme zistili pri našich predchádzajúcich pozorovaniach [3] a ako zistili aj iní autori [2], nedostatkom resazurínového testu sú veľké rozdiely medzi minimálnym a maximálnym počtom zárodkov v jednotlivých triedach, takže sa stáva, že v nižšej kvalitatívnej triede sú mlieka s vyšším počtom zárodkov ako vo vyššej triede. Okrem toho resazurínový test mlieko všeobecne nadhodnocuje a zaradenie do kvalitatívnych tried na základe výsledkov tohto testu je podstatne lepšie ako na základe výsledkov platňových metód.

Pretože v mikroflóre surového mlieka sa vo veľkom počte nachádzajú psychrotrofné zárodky, ktoré pri niektorých vzorkách dosahujú viac ako 70 %, majú slabé redukčné schopnosti a pri teplote 37 °C sa iba slabo rozmnožujú, prípadne niektoré druhy sa nerozmnožujú vôbec, neodráža resazurínový test bez predinkubácie dostatočne mikrobiologickú kvalitu mlieka. Preto na objektívnejšie zistenie mikrobiologickej kvality odporúčame používať resazurínový test s predinkubáciou pri teplote 30 °C, ktorá umožňuje rozmnoženie psychrotrofnej i ostatnej mikroflóry nachádzajúcej sa v mlieku, a tým aj zvýšenie redukčnej aktivity a rýchlejšiu redukcii farbiva, čím sa výsledky redukčných testov priblížia výsledkom klasických platňových metód, a tak sa dosiahne objektívnejšie zaradenie mliek do kvalitatívnych tried.

V prípade hodnotenia mikrobiologickej kvality nakupovaného mlieka platňovými metódami perspektívne odporúčame hodnotiť štandardné mlieko iba na základe výsledkov celkového počtu zárodkov, pretože všeobecne zisťované počty zárodkov sú horšie ako počty koliformných zárodkov, v dôsledku čoho je celkový počet zárodkov rozhodujúci pre zaradenie mlieka do kvalitatívnych tried.

Literatúra

1. POLÁK, M.: Náš chov, 42, 1982, č. 2, príloha Mlék. Prům., s. 1.
2. ŠEBELA, F. — GAJDŮŠEK, S. — KLÍČNÍK, V.: Studium hodnotících kritérií. kvality syrového mléka pro výrobu zakvašených výrobků a sýrů. Dílčí zpráva. Brno, VŠZ 1982.
3. PREKOPPOVÁ, J. — BOROŠ, V.: Zhodnotenie niektorých súčasných kvalitatívnych kritérií nakupovaného mlieka a celého systému hodnotenia. Výskumná správa. Žilina, VÚM 1981.
4. LÜCK, M.: Dairy Sci. Abstr., 34, 1972, s. 101.
5. ECKSCHLAGER, K. — HORSÁK, I. — KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha, SNTL 1980.

Оценка микробиологического качества закупаемого молока

Резюме

Сравнивается резазуриновый тест, применяемый для оценки микробиологического качества закупаемого молока, с другими тестами восстановления и с классическими методами определения количества микроорганизмов на пластинках.

Наиболее точным и объективным из сравниваемых тестов был резазуриновый тест с предварительной инкубацией в течение 3 часов при 30 °C и с последующей инкубацией в течение 2 часов при 37 °C.

Наименее подходящим из рассматриваемых восстановительных тестов оказался обычно используемый резазуриновый тест, несмотря на то что оценка производилась после увеличенного периода инкубации (120 мин).

An evaluation of microbiological quality of commercial milk

Summary

A resazurin test used for evaluation of the microbiological quality of commercial milk was compared with other reduction tests and with standard plates' methods for determining counts of microorganisms.

From among the compared tests the resazurin test with a preincubation of 3 h at 30 °C and a following incubation of 2 h at 37 °C appeared the most accurate and objective.

The least suitable among the investigated reduction tests there was found the currently used resazurin test, despite the fact that the evaluation was done after prolonged incubation time — 120 min.