

Použití luminometru při stanovení celkového počtu mikroorganismů v syrovém mléce

JARMILA VYTŘASOVÁ – MARTINA LENĐÁKOVÁ

SOUHRN. Bylo sledováno celkové množství mikroorganismů v syrovém mléce pomocí luminometrické metody měřením intenzity světla, které je úměrné koncentraci intracelulárního ATP. Po odstranění ATP nemikrobiálního původu bylo množství ATP uvolněné z bakteriálních buněk indikováno enzymovým komplexem luciferin-luciferáza, jehož přídavek vyvolal luminiscenci. Získané výsledky byly porovnávány s výsledky souběžně získanými na přístroji Bactoscan a klasickou kultivační metodou. Pro daný typ luminometru byla provedena optimalizace stanovení ATP a eliminovány vlivy nepříznivě působící na stanovení. Ve výsledcích všech tří metod nebyly zjištěny výrazné rozdíly.

KLÍČOVÁ SLOVA: celkový počet mikroorganismů, mléko, luminometrie, optimalizace, Bactoscan, ATP

Sledování mikrobiologické jakosti syrového mléka je jedním ze základních kritérií jeho hodnocení i finančního ocenění. Klasické kultivační metody však poskytují výsledky až za 24 - 48 h, použití přístrojových metod typu Bactoscan je zas ekonomicky příliš náročné. Proto byly hledány další rychlé metody stanovení mikroorganismů, k nimž patří i metody luminometrické. Biochemie luminiscenční reakce byla poprvé popsána McElroyem [1] a podrobný mechanismus této rychlé reakce byl detailně rozpracován v přehledové práci De Lucy a McElroye [2]. V podstatě jde o reakci ATP s enzymovým komplexem luciferin-luciferáza, při němž se uvolňuje světlo, jehož intenzita je přímo úměrná množství ATP. Tato lineární závislost existuje v širokém rozmezí koncentrací ATP [3] a stanovení celulárního ATP se tak stává vhodným indikátorem množství buněk.

Při stanovení počtu mikroorganismů v syrovém mléce je jedním z hlavních problémů fakt, že mléko obsahuje vždy velké množství nemikrobiálního ATP a to v různých formách - jako volný ATP, ATP asociovaný s micelami

Ing. Jarmila VYTŘASOVÁ, CSc., Ing. Martina LENĐÁKOVÁ, Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Štrossova 57, 530 03 Pardubice, Česká republika.

kaseinu a jako ATP v somatických buňkách pocházejících z vemene [4]. První metody vyvinuté na principu ATP bioluminiscence [5] využívající k odstranění ATP nemikrobiálního původu slabých detergentů a následně hydrolytického enzymu apyrázy nebyly dostatečně citlivé a navíc byly i pracné. Důležitý krok ke zvýšení citlivosti stanovení byl učiněn Pettipherem [6], který navrhl enzymové předzpracování vzorku s použitím epifluorescenční filtrační techniky, aby se usnadnila filtrace mléka. Tuto metodu zdokonalili Webster a kol. [7] a na stejném principu byl zkonstruován přístroj Lumac BV s komerčně dostupným ATP-F testem. Waes a kol. [8] popsali vynikající korelaci mezi touto ATP metodou a standardní plotnovou metodou (korelační faktor $r = 0,865$, počet stanovení $n = 247$) s detekčním limitem $2 \cdot 10^4$ KTJ.ml⁻¹. Podobné výsledky byly dosaženy i na jiných pracovištích, avšak s použitím širších filtrů a dalšího nezbytného příslušenství [9], což bylo pro laboratorní praxi málo použitelné.

Pozoruhodný ATP bioluminiscenční systém pro zjišťování počtu bakterií v syrovém mléce vyvinuli Griffith a spol. [10]. Tento systém byl následně modifikován a vylepšen jako Milk Microbial ATP Kit (Biotrace Ltd.).

Místo filtrace lze ke koncentraci mikroorganismů použít i centrifugaci [11], kde autoři dosáhli stejné citlivosti jako u metod s filtrací a korelačního faktoru $r = 0,9$ při $n = 80$, avšak tento postup nenašel zatím v laboratorní praxi širší uplatnění.

Metody využívající luminiscenčních technik ke stanovení počtu mikroorganismů v potravinách včetně dalších aplikací jsou podrobně diskutovány v přehledovém příspěvku Kyriakidese a Patela [12].

Cílem této práce bylo ověřit funkci daného typu luminometru při kontrole jakosti syrového mléka, optimalizovat stanovení ATP při zjišťování mikrobiální kontaminace a zjistit případné rozdíly ve výsledcích mezi ostatními používanými metodami.

Materiál a metody

Ke stanovení celkového počtu mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů klasickou plotnovou metodou dle ČSN ISO 4833 [13] byla použita živná půda GTK (glukóza, trypton, kvasničný extrakt), výrobce Milcom a. s. Laktoflóra, Praha 6 - Vokovice, Česká republika.

Automatizované stanovení počtu mikroorganismů bylo provedeno na přístroji Bactoscan 8000 typ 27000 firmy Foss Electric (Dánsko) se sadou komerčně připravených roztoků.

Pro luminometrické stanovení byl použit přístroj Luminometr 1250 (BioOrbit, Finsko), zapisovač Line recorder TZ 4620 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika) a sada komerčně připravených roztoků:

- extrakční roztok Somalyse,
- BioOrbit 1243-208 ATP Releasing Reagent (ARR) - detergentový roztok pro extrakci ATP z mikrobiálních buněk, obsahuje inhibitory ATPas, které by po uvolnění hydrolyzovaly ATP,
- BioOrbit ATP Monitoring Kit (AMK) obsahující: ATP Monitoring Reagent (AMR) s komplexem luciferin-luciferáza, ATP standard a acétátový pufr.

Promývací roztok byl připraven rozpuštěním 2,125 g NaCl (Lachema Brno, Česká republika) v 1000 ml redestilované vody, sterilován při 121 °C po dobu 15 min a uchováván při 5 °C.

Byl použit membránový filtr Sartorius Germany o průměru 0,8 cm a porozitě 0,65 µm.

Jako materiál bylo použito syrové kravské mléko a vzorky byly dodávány ve sterilních vzorkovnicích s Heschenovým konzervačním činidlem (100 g kyseliny borité, 1,5 g glycerolu a 2 ml 1 % vodného roztoku methylenové modři na 1 l činidla).

Jednotlivé vzorky mléka byly analyzovány všemi třemi uvedenými metodami současně. Po analýze vzorku na přístroji Bactoscan bylo z lahvičky se vzorkem odebíráno inokulum v množství 1 ml pro klasické kultivační vyšetření a následně bylo provedeno měření na luminometru. Toto stanovení využívá zkoncentrování přítomného ATP filtrem, na němž se zachytí bakteriální i somatické buňky. Aby byl somatický ATP odstraněn, byl přidán extrakční roztok, který rozrušil pouze somatické buňky, nikoliv však bakteriální. Poté byl filtr promýván, aby se odstranil zbývající ATP v roztoku. Pomocí účinnějšího extrakčního činidla byly bakteriální buňky rozrušeny a uvolněný ATP byl stanoven po reakci s komplexem luciferin-luciferáza bezprostředním měřením emise světla. Obsah ATP byl vypočten z kalibrační křivky.

Vlastní provedení

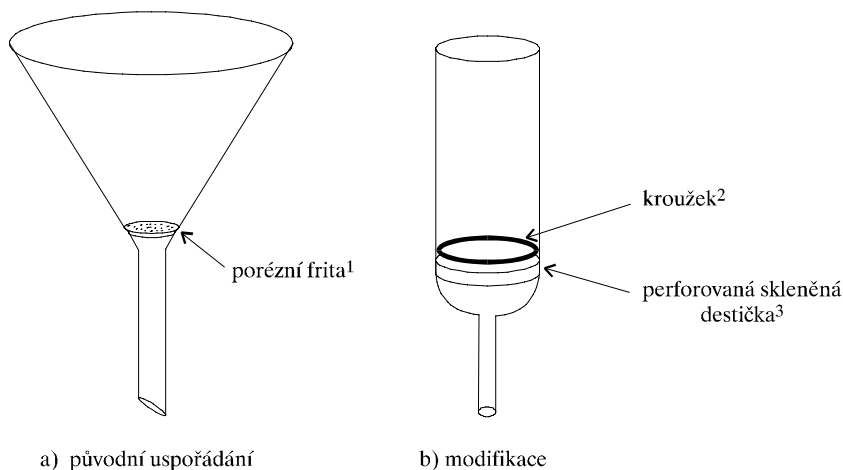
K 0,5 ml vzorku mléka bylo přidáno 0,5 ml roztoku Somalyse a směs byla inkubována ve vodní lázni 10 min při 40 °C. Poté bylo odebráno 100 µl a zfiltrováno přes membránový filtr vakuovou filtrací. Po následném promytí 100 µl promývacího roztoku byl filtr umístěn na dno zkumavky luminometru a bylo přidáno 200 µl roztoku ARR. Následovala krátká inkubace (2 min) při laboratorní teplotě, dále bylo přidáno 100 µl roztoku AMR a ihned byl odečten signál luminometru.

Výsledky a diskuse

Pro optimalizaci stanovení ATP bylo nutno zjistit správnou dobu a teplotu inkubace. Na základě odezvy luminometru zaznamenané na zapisovači při citlivosti 10 mV byla stanovena optimální doba inkubace 10 min při 40 °C.

Následným krokem bylo ověřování optimálního množství vzorku pro filtraci. Jako filtrační zařízení byla nejprve použita skleněná nálevka se zatavenou fritou o pórovitosti č. 1, na kterou byl přikládán membránový filtr. Naměřené hodnoty ATP však byly nízké a vypočtené množství buněk nesouhlasilo s výsledky získané Bactoscanem. Hlavní příčinou bylo nedostatečné přilnutí filtru k fritě, což mělo za následek podtékání vzorku a deformaci filtru vlivem podtlaku. Proto byla použita modifikovaná metoda filtrace přes nálevku vyrobenou ze skleněné trubice s vloženým kroužkem a zatavenou fritou (obr. 1). Vložením kroužku do filtrační nálevky bylo zabráněno přílišnému přilnutí filtru k fritě. Toto řešení však lze považovat pouze za provizorní, pro rutinní používání luminometru v praxi by bylo vhodnější vyřešit tento problém stabilním zabudováním filtru.

V obou případech filtrace byly použity membránové filtry o velikosti pórů 0,65 μm . U některých vzorků syrového mléka však docházelo k zanášení pórů filtru částicemi tuků a bílkovin, což vedlo k nežádoucímu prodlužování



OBR. 1. Filtrační zařízení.

FIG. 1. Filtering device.

a) original arrangement, b) modification. 1 - porous frit, 2 - o-ring, 3 - perforated glass disc.

doby filtrace. Pokud by byl použit filtr s větší porozitou, byl by zřejmě problém zanášení filtru částečně zmírněn, avšak získaná odezva luminometru by byla nižší.

Co se týče objemu vzorku mléka určeného k filtraci, bylo zjištěno, že optimální odezva luminometru (ve srovnání s výsledky stanovení počtu buněk na Bactoscanu) je ještě při použití 100 μ l vzorku. Vyšší objemy už nelze doporučit pro určité obtíže při filtraci.

Bylo též vyzkoušeno použití jak vodní, tak olejové vývěvy. Použití vodní vývěvy se neosvědčilo, neboť kolísavý tlak vody měl opět nepříznivý vliv na filtraci.

Značný vliv na stanovení má taky míchání, proto je vždy nutno každý vzorek řádně rozmíchat, aby došlo k homogenizaci tuku a zabránilo se tak shlukování bakterií.

K ověření vlivu konzervace vzorku na luminometrické stanovení byly použity vzorky syrového mléka ve vzorkovnicích s konzervačním činidlem mikrobiálním (Heschenovo činidlo), chemickým (dichroman draselný) a vzorky bez konzervace. Ze shodných hodnot odezvy luminometru vyplynulo, že konzervace neměla na stanovení žádný vliv.

Pro ověření správnosti chodu přístroje a kvality použitých reagentů byla jedenkrát měsíčně prováděna kalibrace (tab. 1). Funkčnost přístroje byla ověřována až do rozsahu 400 mV. Jak vyplývá z odhadů směrodatných odchylek v tabulce, jsou tyto kalibrace téměř identické a lišily se jen v rámci náhodných chyb. Příklad kalibračního grafu je uveden na obr. 2.

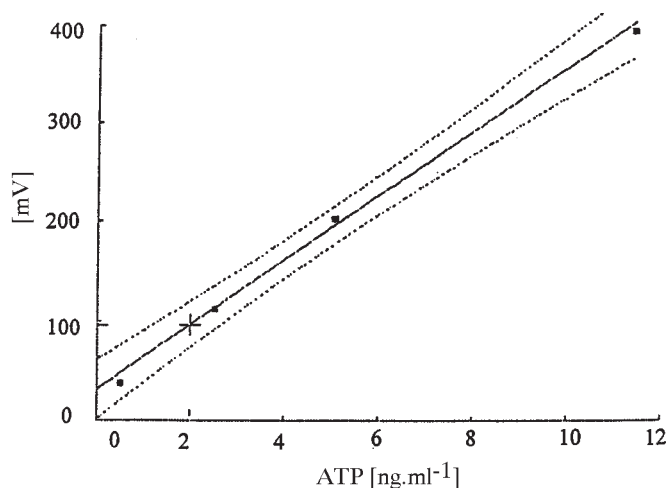
TABULKA 1. Reprodukovatelnost kalibračních křivek na přístroji Luminometr 1250 v různých časových obdobích.

TABLE 1. Reproducibility of the calibration curves using Luminometer 1250 apparatus in different time periods.

datum ¹	b	s _b	a	s _a	r
25.3.1997	3,17	0,15	3,67	0,97	0,998
7.4.1997	3,08	0,29	2,36	1,84	0,991
21.4.1997	3,26	0,11	3,10	0,69	0,999
6.5.1997	3,18	0,15	3,16	0,95	0,998

Pro všechny kalibrace $n = 4$, parametry regresní přímky $y = bx + a$, kde b - směrnice, s_b - směrodatná odchylka směrnice, a - posunutí regresní přímky, s_a - směrodatná odchylka posunutí, r - korelační koeficient.

For all calibrations, $n = 4$; regression line, $y = bx + a$; the parameters of which are b - slope, s_b - slope deviation, a - shift of the regression line, s_a - shift deviation, r - correlation coefficient. 1 - date.



OBR. 2. Kalibrační křivka pro bioluminiscenční stanovení ATP ze dne 21.4.1997.

Statistické parametry: $y = 3,26x + 3,10$, $r = 0,999$, $n = 4$.

FIG. 2. Calibration curve for the bioluminescent determination of ATP (April 21, 1997).

Statistical parameters: $y = 3.26x + 3.10$, $r = 0.999$, $n = 4$.

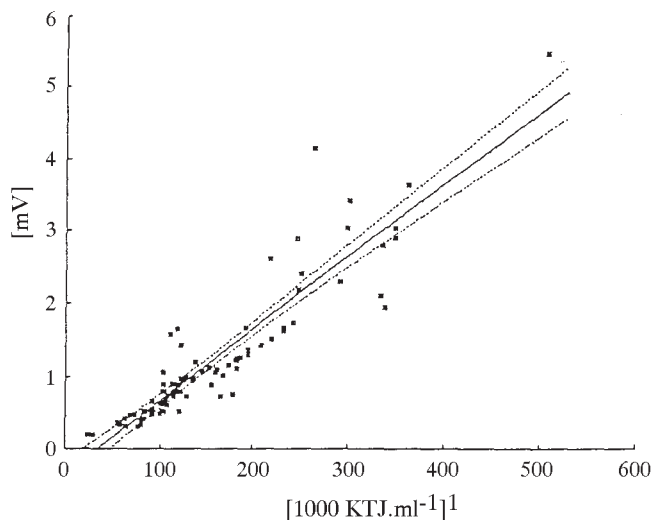
Celkem bylo zpracováno 109 vzorků a to jak luminometricky, tak pomocí přístroje Bactoscan. Přibližně polovina vzorků byla vyšetřena klasickou kultivační plotnovou metodou. Účinnost všech tří metod byla vyjádřena grafy a rovnicemi s nenulovými úseky a směnicemi (obr. 3 a 4). Jak vyplývá z uvedených výsledků, jednotlivé metody se významně neliší. Vezmeme-li v úvahu ještě jednoduchost a rychlost luminometrické metody, lze ji doporučit jako vhodnou metodu pro stanovení mikrobiální kontaminace syrového mléka.

Seznam zkratk

- KTJ - počet kolonie tvořících jednotek (CFU - Colony Forming Unit)
- ATP - adenosin-5'-trifosfát
- ARR - ATP Releasing Reagent
- AMR - ATP Monitoring Reagent
- AMK - ATP Monitoring Kit

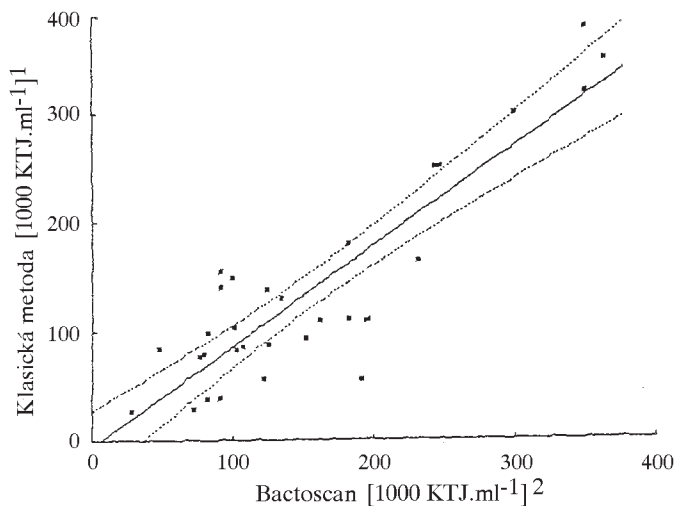
Poděkování

Veškerá měření byla prováděna v Centrální laboratoři na syrové mléko v Černé za Bory a ve spolupráci s VÚM Praha 6 - Vokovice.



OBR. 3. Porovnání odezvy luminometru v mV s KTJ stanovenými pomocí Bactoscanu.
Statistické parametry: $y = 0,01x - 0,33$, $r = 0,915$, $n = 109$.

FIG. 3. Luminometer response in mV compared with CFU determined by Bactoscan.
Statistical parameters: $y = 0.01x - 0.33$, $r = 0.915$, $n = 109$.
1 - [1000 CFU.ml⁻¹].



OBR. 4. Korelace mezi KTJ stanovenými klasickou metodou a KTJ stanovenými Bactoscanem. Statistické parametry: $y = 0,932x - 5,41$, $r = 0,888$, $n = 47$.

FIG. 4. Comparison between CFU determined by the standard plating method and CFU determined by Bactoscan. Statistical parameters: $y = 0.932x - 5.41$, $r = 0.888$, $n = 47$.
1 - standard plating method [1000 CFU.ml⁻¹], 2 - Bactoscan [1000 CFU.ml⁻¹].

Literatura

1. MCELROY, W. D.: The energy source for bioluminescence in an isolated system. *Zoology*, 33, 1947, s. 342-345.
2. DELUCA, M. - MCELROY, W. D.: Purification and properties of firefly luciferase. In: *Methods in Enzymology*. Ed. M. DeLuca. London, Academic Press 1978, s. 3-15.
3. STANLEY, P. E.: Rapid measurements of bacteria by ATP assay. *Laboratory Equipment Digest*, February, 1982, s. 62-67.
4. GRIFFITHS, M. V.: ATP to detect bacteria in dairy products. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 42, 1989, s. 61-62.
5. BOSSUYT, R.: Determination of bacteriological quality of raw milk by an ATP assay technique. *Milchwissenschaft*, 36, 1981, s. 257-262.
6. PETTIPHER, G. L.: Direct epifluorescent filter technique for the rapid enumeration of microorganisms. *Lechtworth, Research Studies Press Ltd.* 1983. 193 s.
7. WEBSTER, J. J. - HALL, M. S. - RICH, C. N. et al.: Improved sensitivity of the bioluminescent determination of number of bacteria in milk samples. *Journal of Food Protection*, 51, 1988, s. 949-954.
8. WAES, G. - VAN CROMBRUGGE, J. - REYBROECK, W.: The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. In: *Modern microbiological methods for dairy products*. Brussels, International Dairy Federation 1989, s. 279-286.
9. VAN CROMBRUGGE, J.: The ATP-F test for estimation of bacteriological quality of raw milk. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 43, 1989, s. 347-354.
10. GRIFFITHS, M. W. - MCINTYRE, L. - SULLY, M. - JOHNSON, I.: Enumeration of bacteria in milk. In: *Bioluminescence and chemiluminescence: current status*. Ed. P. E. Stanley - L. J. Kricka. Chichester, Wiley 1991, s. 479-481.
11. PAHUSKI, E. - MARTIN, L. - STEBNITZ, K. - PRIEST, J. - DIMOND, R.: Rapid concentration procedure for microorganisms in raw milk. *Journal of Food Protection*, 54, 1991, s. 813.
12. KYRIAKIDES, A. L. - PATEL, P. D.: Luminescence techniques for microbiological analysis of foods. In: *Rapid analysis techniques in food microbiology*. Ed. P. Patel. London, Blackie Academic and Professional 1994, s. 196-231.
13. ČSN ISO 4833:1991. Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Praha 1994.

Do redakcie došlo 18.9.1998.

Bioluminescence assay in determination of total number of microorganisms in raw milk

VYTRASOVÁ, J. - LENÁKOVÁ, M.: *Bull. potrav. Výsk.*, 37, 1998, p. 219-227.

SUMMARY. Total number of microorganisms in raw milk was followed by means of the luminescent method by measuring of the light emission, proportional to the concentration of intracellular ATP. Having removed non-microbial ATP, the amount of ATP released from bacterial cells was indicated using the enzyme/co-enzyme complex, luciferase-luciferin, the addition of which initiated the luminescence. The results obtained were compared with those measured simultaneously using both the automatic method (Bactoscan) and

the standard plating method. For the given type of the luminometer, the ATP determination was optimized and interferences were eliminated. The differences in results of these three methods were statistically insignificant.

KEYWORDS: total number of microorganisms, milk, luminometry, optimization, Bactoscan, ATP