

Vrednovanje primjene metode Petrifilm™ Escherichia coli za brojanje bakterije Escherichia coli u sirovom mlijeku*

Karmen Godić Torkar, Slavica Golc Teger

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 579.842.11

Sažetak

Pokusima smo utvrđivali prisutnost i broj bakterija Escherichia coli u stajskim uzorcima sirovog mlijeka te uzorcima iz mljekara i transportnih cisterni. Primijenili smo četiri metode: Petrifilm™ E.coli ploče, metode uz uporabu selektivnih gojišta Coli ID te VRB s pridodanom fluorescentnom komponentom 4-methyl-umbellipheryl-beta-D-glucuronida (MUG) što se temelje na standardnom principu brojanja kolonija na petrijevkama. Kao standard je služila metoda najvjerojatnijeg broja (MPN) uz uporabu lauril-sulfatnog bujona s MUG-om. Od 100 uzoraka sirovog mlijeka, u 31 smo uzorku (31%) zabilježili manje od 30 bakterija u 100 ml. Statističkom smo obradom logaritmiranih rezultata preostalih 69 uzoraka utvrdili, da je korelacijski koeficijent najbolji primjenom metoda s Petrifilmom i MPN ($r = 0,83$), da je nešto manji usporedbom metode Coli ID i navedene standardne metode ($r = 0,80$) te da primjenom metode sa VRB-MUG iznosi $r =$ samo $0,65$. Usporedba metoda s Petrifilmom i Coli ID pokazuje dobru korelaciju ($r = 0,90$). Rezultati analize varijance pokazuju statistički karakterističnu razliku ($P < 0,05$) primjenom standardne (MPN) metode i ostalih triju metoda koje se temelje na brojanju kolonija na tvrdim gojištima. Uzročnik statistički karakteristične razlike jest u prvom redu velika varijabilnost rezultata unutar pojedinih metoda (0 do 3000 bakterija u ml mlijeka), u drugačijoj ocjeni rezultata metode najvjerojatnijeg broja te ostalih metoda. Duncanov test naimo pokazuje statistički karakterističnu sukladnost metoda Coli ID, Petrifilm i standardne metode MPN; metoda Coli ID sukladna je u 68% primjera sa standardnom metodom, metoda sa Petrifilmom u 65% a metoda uporabom gojišta VRB-MUG samo u 55% primjera - pri čemu je upotrijebljen interval provjere prema MPN tabelama u intervalu 95%. Metodom s Petrifilmom standardna je devijacija za opetovanje (S_p) iznosila $0,029$ log jedinica a samo opetovanje (r) $0,082$ log jedinica.

Ključne riječi: mlijeko, Petrifilm™ E.coli, Escherichia coli, metode.

* Rad je izložen na 32. hrvatskom simpoziju mljekarskih stručnjaka, Opatija, 1996.

Uvod

Escherichia coli jest kratka, gibljiva štapićasta Gram-negativna bakterija koja se unutar porodice *Enterobacteriaceae* uvrštava u skupinu koliformnih bakterija budući da je sposobna razgraditi i laktozu i saharozu u kiseline i plin. Mnogo sojeva je izolirano iz probavnih organa toplokrvnih životinja: neki od njih su i enteropatogeni te uzrokuju gastroenterološka oboljenja. Enterotoksini, koje tvore ti sojevi, su često rezistentni prema toplini te ostaju aktivni i nakon pasterizacije mlijeka. U mikrobiologiji prehrambenih proizvoda često se utvrđuju količina i broj enterobakterija u hrani, u njezinim pojedinim supstancijama i sirovinama. Plodovi ne smiju sadržavati patogene mikroorganizme; njihova prisutnost u hrani ukazuje na pogreške u procesu njihova uzgoja i prerade ili pak na post-procesnu kontaminaciju (L a n y i, 1987; R o b i n s o n, 1990).

U industriji mliječnih proizvoda je količina koliformnih mikroorganizama, odnosno *Escherichiae coli* u svježem mlijeku znak izravne kontaminacije fekalna izvora, nedovoljnog čišćenja vimena pred mužnju kao i nedovoljnog čišćenja muzne i mljekarske opreme. Ako je fosfatarni test pozitivan, prisutnost koliformnih bakterija i *E.coli* u pasteziranu mlijeku ukazuje na neučinkovitost pasterizacije. Kada je fosfatarni test negativan ukazuje na kontaminaciju poslije pasterizacije (R o b i n s o n, 1990).

Utvrđivanje prisutnosti bakterije *E.coli* može biti kriterij za procjenu higijenske (sanitarne) kakvoće proizvoda i vode. Ako uzorak sadržava *E.coli*, možemo uz veliku mjeru vjerojatnosti zaključiti da su prisutni i neki drugi fekalni kontaminanti (primjerice *Salmonella*). Utvrđivanje njihove prisutnosti je međutim dugotrajnije i nešto teže nego li utvrđivanje prisutnosti *E.coli* (B l o o d, C u r t i s, 1995; R o b i n s o n, 1990).

Postupak za utvrđivanje prisutnosti *E.coli* u mlijeku i mliječnim proizvodima (prema još važećem Službenom listu SFRJ broj 14, 1983. g.) sastoji se od 24-48 satnog prethodnog pokusa u briljantno-zelenu žučnomu laktoznom bujonu, nakon čega slijedi 24-48 satni potvrdbeni pokus na ljubičasto-crvenu žučnomu čvrstom gojilištu; tomu slijedi još identificiranje *E.coli* pokusom IMViC (prisutnost indola, razgrađivanje glukoze u gojilištu sa metil crvenim, Voges Proskaver test, test na Simmons citratu).

Postupak i vrijeme utvrđivanja prisutnosti i broja *E.coli* u uzorcima mlijeka i mliječnih proizvoda skraćen je provedbom novijih, usavršenijih metoda. Jedna od nadopuna toga postupka jest uporaba fluorogene komponente 4-methyl-umbellipheryl-beta-D-glucuronida (MUG). MUG jest

supstrat enzima beta-glukuronidaze koju među Gram-negativnim enterobakterijama tvori cijelih 97% sojeva *E.coli* i tek nekoliko sojeva rodova *Salmonellae*, *Shigellae* i *Yarsiniae*. Hidrolizom MUG-a nastaje 4-methylumbeliferon koji pod utjecajem UL svjetlosti valne duljine 360-366 nm fluorescira. Dodavanjem MUG-a u selekcijsko gojilište koliformnih mikroorganizama može se već nakon 24 sata utvrditi prisutnost *E.coli* (Blood, Curtis, 1995).

Tržište nudi već komercijalno pripremljene komplete ili komplete za utvrđivanje prisutnosti i broja *E.coli*. Neki od njih omogućuju brže i lakše provođenje klasičnih odnosno standardnih metoda, dok drugi sadrže standardna ili preporučena gojilišta s različitim novim dodacima što olakšava rad i omogućuje da se brže dostignu posve točni rezultati.

Namjera

Naša je namjera u prvom redu usporediti primjerenost i preciznost metoda s gojilištima Coli ID, VRB-MUG, metode Petrifilm *E.coli* te metode najvjerojatnijeg broja u lauryl-sulfatnom bujonu za utvrđivanje prisutnosti i broja bakterija vrste *E.coli*.

Materijal i metodika

Priprema uzoraka:

Prisutnost i broj bakterija *E.coli* utvrđivali smo u 100 uzoraka sirovog mlijeka: u stajskim uzorcima, uzorcima iz pojedinih mljekara te iz transportnih cisterni. Uzorke smo pripremali prema propisanim standardima (ISO Standard 707:1985).

Selektivna gojilišta i razrjeđivači:

Uzroke smo razrjeđivali Ringerovom otopinom 1/4 (IDF standard 122B:1992). Selektivna smo gojilišta Coli ID (BioMerieux), VRB-MUG (Biolife), Petrifilm™ *E.coli* (3M) pripremili prema uputama proizvođača. Sve tri metode temelje se na načelu standardnog brojanja kolonija na čvrstim hranjivim gojilištima (IDF standard 100 B:1991). Epruvete s laurilsulfatnim bujonom, uz dodatak MUG-a (Biolife) za utvrđivanje najvjerojatnija broja mikroorganizama (MPN=engl. Most Probable Number) pripremili smo također, prema uputama proizvođača, odnosno prema međunarodnim standardnim propisima. Za utvrđivanje prisutnosti indola u tekućem gojilištu upotrijebili smo Kovačev reagens (Biolife) (ISO/DIS standard 11866-2, 1993).

Coli ID (BioMerieux)

Coli ID je već pripremljeno selektivno gojilište koje se može koristiti u industrijskoj mikrobiologiji; namijenjeno je utvrđivanju, brojanju i međusobnu razdvajanju koliformnih mikroorganizama te identificiranju *E.coli* u uzorcima hrane. Gojilište sadrži dva kromogena supstrata: jednoga za enzim beta-glukuronidazu (što ga tvori *E.coli*) te jednoga za enzim beta-galaktosidazu, koju tvore ostali koliformni mikroorganizmi. Konačna pH vrijednost gojilišta jest 7,2.

Boce sa po 200 ml pripremljena gojilišta čuvaju se u tamnoj prostoriji temperature 2-8°C. Prije uporabe gojilište se otopi u vodenoj kupelji ohladi se do temperature 45-50°C te se u količini od po 15 ml nalije u petrijeve zdjelice, opremljene uzorkom ili decimalno razrijeđenim uzorkom. Zatim se gojilište pomiješa i ostavi da stvrdne. Preko njega prelije se i drugi sloj gojilišta (pribl. 5 ml). Inkubacija pri 35-37°C traje 24 ili 48 sati.

Kolonije što ih tvore sojevi *E.coli* su ružičasto-ljubičaste boje, promjera 0,5 do 2,0 mm. Preostali koliformni mikroorganizmi tvore modro-sive, 0,5 do 2,0 mm velike kolonije. Preostale Gram-negativne bakterije tvore nebojene kolonije promjera 0,1 do 1,0 mm. Na tom gojilištu ne rastu Gram-pozitivne bakterije niti gljivice i plijesni. Broj kolonija se izračuna na 1 g ili 1 ml uzorka.

Ljubičasto crveno žučno laktosno gojilište s MUG-om (VRB-MUG) (Biolife, Oxoid)

Za utvrđivanje koliformnih mikroorganizama kao i *E.coli* u vodi ili hrani primijenimo metodu neposredna brojanja kolonija na čvrstom selektivnom gojilištu VRB (IDF standard 73A:1985), kojemu valja dodati i fluorogenu komponentu 4-methyl-umbellipheryl-beta-d-glucuronid (MUG) što se koristi i kao dodatak lauril-sulfatnu bujonu za utvrđivanje prisutnosti *E.coli* prema metodi najvjerojatnijeg broja. Fluorescencija u gojilištu vidljiva je nakon inkubacije 4-24 sata. Gojilište i postupak inokulacije su identični kao pri utvrđivanju broja enterobakterija na VRB gojilištu bez dodavanja MUG-a. Neposredno pred uporabu u gojilište valja pridodati otopinu MUG-a i to 50 mg/l nebojena i 100 mg/l u obojena gojilišta (Blood, Curtis, 1995).

Petrifilm™ *E. Coli* (3M™) metoda brojanja kolonija na pločama jest sustav pripremljenih gojilišta za brojanje kolonija bakterije *E.coli* i ostalih koliformnih bakterija.

Na sterilne listiće nanese se specifično selektivno gojište VRB, u hladnoj vodi topljiva želirna tvar, indikator aktivnosti enzima glukuronidaze za identificiranje *E.coli* i tetrazolium boje. Plohu sa gojištem inokulira se s 1 ml originalna ili decimalno razrijeđena uzorka. Nakon inkubacije 24 +/-2 sata prebroje se narasle kolonije što su - zbog posebnih indikatorskih boja - obojene kontrastno. Pojedini sojevi trebaju još 24 sata da se oko njihovih kolonija stvori modra precipitacijska zona. Organizacija AOAC preporučuje temperaturu inkubacije 35 +/-1°C, a organizacija AFNOR 44,5+/-0,5°C.

Za brojanje kolonija Petrifilm™ *E.coli* sadrži specifičnu indikatorsku boju koja uzrokuje tvorbu modre zone oko kolonija *E.coli*, okruženih mjehurićima plina. Ostali koliformni mikroorganizmi tvore crvene kolonije s mjehurićima plina. Crvene i bez mjehurića su kolonije koje tvore nekoliformni mikroorganizmi. Želimo li polučiti ukupne koliformne mikroorganizme, moramo prebrojati i crvene i modre kolonije s mjehurićima. Zastupljenost kolonija na plohi Petrifilma za utvrđivanje *E. coli* jest 15 do 150 kolonija. Ako je broj kolonija veći, prebrojimo kolonije u jednomu kvadratiću polja s gojištem (1 cm²) te broj pomnožimo sa 20, kako bismo polučili ukupne kolonije na ploči; potom izračunamo i broj CFU/ml uzorka (Vlaemynck, 1994; 3 M-Microbial products).

Standardna metoda utvrđivanja najvjerojatnijeg broja bakterija *E. coli* u lauril sulfatnom bujonu sa MUG-om (ISO/DIS standard 11866-2:1993; IDF standard 170:1994).

Metoda se temelji na činjenici da je *E. coli* tokom inkubacije u selektivnu gojištu s lauril sulfatom, pri temperaturi 30°C, sposobna razgrađivati 4-methyl-umbellipheryl-beta-D-glucuronid (MUG), što se očituje u razvoju fluorescencije, te da je također sposobna razgrađivati triptofan do indola. Koliformne bakterije su međutim pri jednakoj temperaturi inkubacije sposobne razgrađivati laktozu, što se očituje u proizvodnji plina.

Metoda je primjerena za utvrđivanje prisutnosti *E. coli* i koliformne skupine bakterija u mlijeku i tekućim mliječnim proizvodima, mlijeku u prahu, kiselomu, sirišnom i mliječnom kazeinu, sirevima, maslacu, sirutki i mlaćenici u prahu, laktozi, želiranim mliječnim proizvodima, sladoledima, mliječnim desertima i jogurtima.

Tablica 1.: Metode primjenjene u pokusu
Table 1: Methods applied in the experiment

METODA GOJILIŠTE METHOD MEDIUM	PRINCIP METODE PRINCIPLE OF THE METHOD	DODATAK GOJILIŠTU SUPPLEMENT TO THE MEDIUM	REZULTAT RESULT	TEMPERATURA (°C) TRAJANJE INKUBACIJE (h) TEMPERATURE (°C) DURATION OF INCUBATION (h)	REZULTAT IZRAŽEN U RESULT EXPRESSED IN	IZVOR SOURCE
COLI ID	brojanje kolonija colony counting	kromogene komponente chromogenic components	crvene kolonije red colonies	35-37/ 24-48	CFU/ml	BioMerieux
VRB-MUG	brojanje kolonija colony counting	MUG	fluorescentne kolonije fluorescent colonies	37/24-48	CFU/ml	Biolife, Oxoid
PETRIFILM	brojanje kolonija colony counting	kromogene komponente chromogenic components	modre kolonije i plin blue colonies and gas	37±1.44, 5±0.5/ 24-48	CFU/ml	3M™
LSB	MPN	MUG	fluorescenca i indol fluorescence and indol	30±1/ 24-48	MPN/ml	IDF 170:1994 ISO/DIS: 11866-2

MUG 4-Methyl-Umbelliphenyl-beta-D-Glucuronide

VRB ljubičasto crveni žučni agar sa laktosom (Violet Red Bile agar)

LSB lauril-sulfat bujon (Lauryl Sulphate Broth)

MPN metoda najvjerojatnijeg broja m.o. (Most Probable Number Technique)

CFU engl. Colony Forming Units-tvorbene jedinice kolonija = broj kolonija

Postupak

U provođenju metoda brojanja kolonija na pločama s gojilištem Coli ID, Petrifilm i VRB-MUG svi su uzorci u dva, a metodom najvjerojatnijeg broja u tri decimalna razrjeđivanja. Postupak smo provodili prema propisanim standardima (Standardi IDF 73A:1985; IDF 100B:1991; ISO/DIS 11866-2:1993, IDF 170:1994) i prema uputama proizvođača pojedinačnih gojilišta odnosno kompleta za provođenje postupaka utvrđivanja prisutnosti *E. coli* (Vlaemynck, 1994).

Statističke metode

Za statističku usporedbu rezultata standardne metode najvjerojatnijeg broja (MPN) i rezultata ostalih triju metoda, koje se temelje na principu brojanja kolonija na čvrstim gojilištima, uporabili smo alternativni pomoćni kriterij - pri čemu je svakim brojanjem kolonija dobivena vrijednost, uspoređena s najnižom i najvišom graničnom vrijednošću intervala vjerojatnosti u području više od 95% prema tablici MPN. Svaka neposredna vrijednost broja kolonija, koja je ispala iz toga područja, označena je kao nesukladna rezultatima MPN. Statistička obrada je sadržavala izračunavanje korelacijskih koeficijenata, analizu varijance te Duncanov i t-test. Također se izračunavala ponovljivost metode Petrifilm™ *E. coli*. Prethodno su rezultati pretvoreni u logaritamske vrijednosti (IDF standard 128:1985; Vlaemynck, 1994).

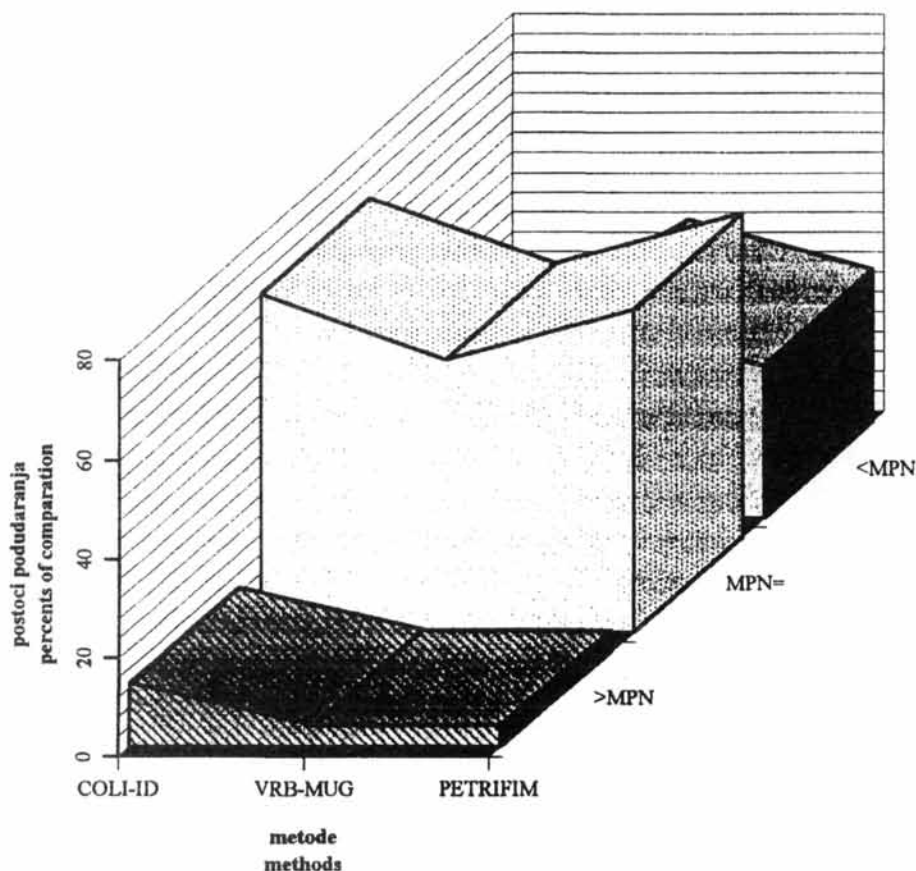
Rezultati i rasprava

Pokusom smo utvrđivali prisutnost i broj bakterije vrste *Escherichia coli* u stajskim uzorcima mlijeka, uzorcima mlijeka uzetim u mljekarama i transportnim cisternama. Analizirali smo ukupno 100 uzoraka. Uspoređivali smo četiri metode, od kojih se dvije temelje na standardnom principu brojanja kolonija na petrijevim zdjelicama: pri čemu smo uporabili selektivna gojilišta Coli ID i VRB uz pridodanu komponentu boje 4-methylumbellipheryl-beta-D-glucuronid (MUG). Provođenjem metode s uporabom papirnih pločica Petrifilm™ *E. coli* kolonije smo također brojili na obraslom čvrstom gojilištu, dok smo kao standardnu metodu uporabili metodu najvjerojatnija broja bakterija *E. coli* u lauril-sulfatnom bujonu, pridodavši MUG. Među 100 analiziranih uzoraka sirovog mlijeka, njih 31 (31%) sadržalo je manje od 30 bakterija u 100 ml. Statistička obrada logaritmiranih rezultata preostalih 69 uzoraka pokazuje dobru korelaciju metode s Petrifilmom i

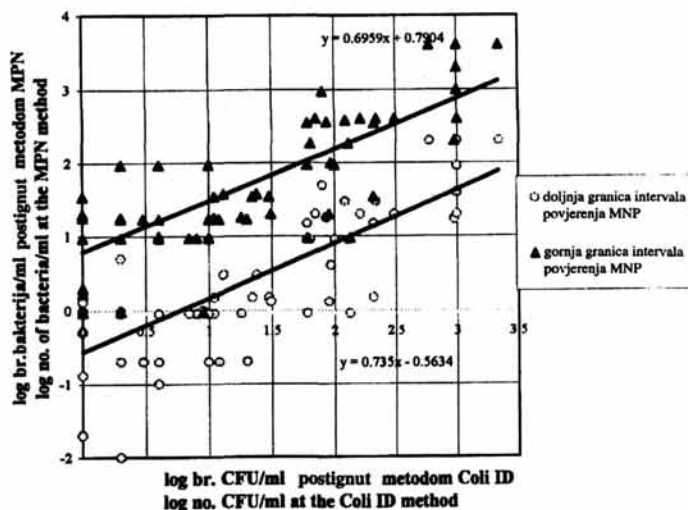
standardne metode MPN ($r=0,83$); nešto je niža pri usporedbi standardne metode sa Coli ID ($r=0,80$), odnosno sa VRB-MUG metodom ($r=\text{samo } 0,65$). Usporedba metoda s Petrifilmom i sa Coli ID pokazuje bolju korelaciju (korelacijski koeficijent $r=0,90$) (Tablica 2). Nalik na ovu sliku su regresijske krivulje usporedbe rezultata logaritamskih vrijednosti broja CFU/ml pojedinih metoda - s rezultatima metode najvjerojatnijeg broja u području od 95% intervala provjere prema tablicama MPN (Slike 2, 3, 4, 5). Korištenjem rezultata uzoraka s većim brojem bakterija, usporedba metoda je bila bolja.

Slika 1: Podudarnost testiranih metoda s metodom najvjerojatnijeg broja MPN uz uvažavanje 95% intervala povjerenja

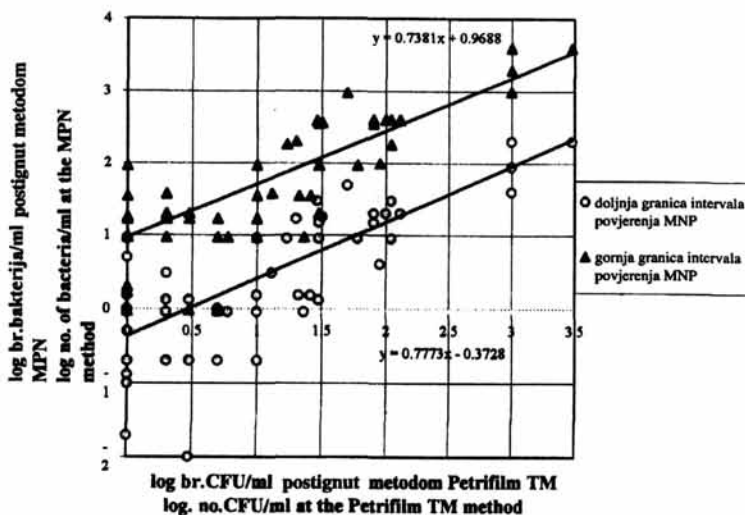
Graph 1: The comparison of accordance between applicated methods with the MPN method in accordance with 95% of confidence limit under MPN table



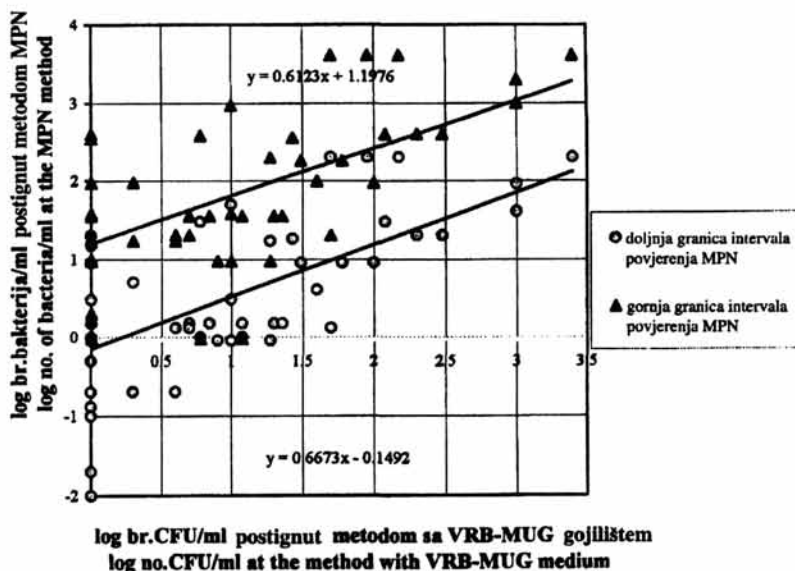
Slika 2: Usporedba sukladnosti između metode Coli ID i metode najvjerojatnijeg broja MPN uz uvažavanje 95% intervala povjerenja
 Graph 2: Relationship between method Coli ID and MPN method plotted on MPN 95% confidence interval



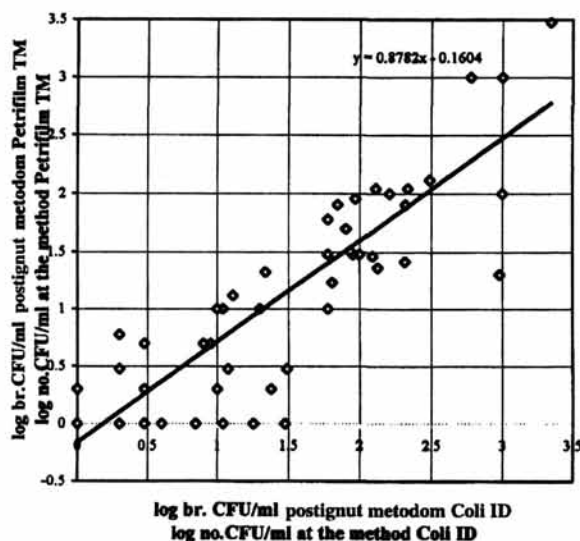
Slika 3: Usporedba sukladnosti između metode Petrifilm TM E.coli i metode najvjerojatnijeg broja MPN uz uvažavanje 95% intervala povjerenja
 Graph 3: Relationship between method Petrifilm TM E.coli and MPN method plotted on 95% confidence interval



Slika 4: Usporedba sukladnosti između metode sa VRB-MUG-om i metode najvjerojatnijeg broja MPN uz uvažavanje 95% intervala povjerenja
 Graph 4: Relationship between method with VRB-MUG medium and MPN method plotted on 95% confidence interval



Slika 5: Usporedba sukladnosti između metoda Petrifilm TM E.coli i Coli ID
 Graph 5: Relationship between methods Coli ID and Petrifilm TM E.coli



Tablica 2.: Korelacijski koeficijent logaritamskih vrijednosti rezultata primijenjenih metoda

Table 2: Correlation coefficients of logarithmic values of the results getting with the applicated methods

METODE METHODS	COLI ID	VRB-MUG	PETRIFILM	MPN
COLI ID	1,000	0,694	0,898	0,803
VRB	0,694	1,000	0,795	0,652
PETRIFILM	0,898	0,795	1,000	0,832
MPN	0,804	0,652	0,833	1,000

U uzorcima s manjim brojem bakterija (0-10/ml) Petrifilm je bio sukladan s metodom najvjerojatnijeg broja. Međutim, u uzorcima s većim brojem bakterija *E.coli*, metodi najvjerojatnijeg broja više se približila metoda sa Coli ID. Uzevši općenito, prema metodi Coli ID smo postigli nešto veće vrijednosti nego metodom s Petrifilmom i metodom najvjerojatnijeg broja; najniže rezultate postigli smo brojanjem kolonija na VRB-MUG gojilištu (Tablica 3).

Tablica 3.: Broj (%) uzoraka svrstanih prema razredima i metodama

Table 3: The number (%) of samples arranged on the classes and methods

RAZREDI CLASSES	METODE METHODS	BROJ (%) UZORAKA PREMA RAZREDIMA KOD METODA NUMBER (%) OF SAMPLES ARRANGED ON CLASSES AT METHODS			
		COLI ID	VRB-MUG	PETRIFILM	MPN
1	Broj, m.o. / ml uzoraka Number of m.o. / ml of sample 0 - 10	32 46,4%	47 68,1%	42 60,8%	41 59,4%
2	10 - 100	21 30,4%	14 20,3%	18 26,1%	15 21,7%
3	100 1000	9 13,0%	5 7,2%	3 4,3%	9 13,0%
4	> 1000	7 10,1%	3 4,3%	6 8,7%	4 5,8%

Rezultati analize varijance pokazuju razlike među standardnom metodom i ostalim trima metodama ($P < 0,05$). Ove su razlike u prvom redu posljedica različita vrednovanja rezultata standardne metode najvjerojatnijeg broja u odnosu na ostale metode brojanja kolonija na plohi čvrstih gojilišta te različita stupnja kontaminacije analiziranih uzoraka koji su sadržavali od 0-3000 bakterija/ml uzorka. Duncanov test je potvrdio dobru sukladnost standardne

metode s metodama Coli ID i Petrifilm. U području povjerenja većem od 95%, navedenom u tablicama MPN, metoda Coli ID je bila sukladna sa standardnom metodom 68%, metoda s Petrifilmom 65% a metoda sa VRB-MUG gojilištem samo 55% (Tablica 4, sl. 1). Metoda Petrifilm™ *E. coli* omogućuje dobro opetovanje rezultata ($S_d = 0,029$ log jedinica i $r = 0,082$ log jedinica).

Tablica 4.: Usporedba sukladnosti testiranih metoda sa standardnom metodom najvjerojatnijeg broja uz uvažavanje 95% i 99% intervala povjerenja prema tablici MPN

Table 4: The comparison of the accordance between tested methods and the standard most probable number method in accordance with 95% and 99% of confidence limit under the MPN table.

METODE METHODS	COLI ID		VRB-MUG		PETRIFILM	
	95% int.p. conf.l.	99% int.p. conf.l.	95% int.p. conf.l.	99% int.p. conf.l.	95% int.p. conf.l.	99% int.p. conf.l.
> MPN	9 (13,0%)	7 (10,0%)	3 (4,4%)	1 (1,5%)	3 (4,3%)	2 (2,9%)
= MPN	47 (68,1%)	51 (73,9%)	38 (55,0%)	41 (59,4%)	45 (65,2%)	50 (72,4%)
< MPN	13 (18,8%)	11 (15,9%)	28 (40,5%)	27 (39,1%)	21 (30,4%)	17 (24,6%)

int.p.: interval povjerenja
conf.l.: confidence limit

Zaključak

Temeljem izvršenih pokusa možemo zaključiti da su metode Petrifilm i Coli ID u skladu s metodom najvjerojatnijeg broja bakterija (MPN), dok je metoda s uporabom gojilišta VRB-MUG manje primjerena. Najsukladniji su rezultati polučeni prema metodama Coli ID i Petrifilm. Metoda Petrifilm™ *E. coli* s pločama osobito je prikladna za uporabu, budući da prije provođenja pokusa za utvrđivanje prisutnosti mikroorganizama u uzorku nisu potrebne nikakve predpripreme. Nanošenje uzoraka na ploče od papira Petrifilma veoma je jednostavno, a inkubacija ne zahtijeva mnogo prostora. Gojilištima pridodane selektivne i kromogene komponente omogućuje dobro razdvajanje specifičnih obraslih kolonija te njihovo brojanje, mada je ploha nanesa gojilišta nešto manja, pa je razdvajanje specifičnih kolonija slabije ako je njihov broj veći. Korištenjem Petrifilma™ *E. coli* ustanovili smo dobru ponovljivost metode. Utvrđivanje prisutnosti *E. coli* u sirovom mlijeku i u mliječnim proizvodima jest značajna spojnica u lancu kontrole mikrobiološke

kakvoće u proizvodnji i preradi mlijeka. Prisutnost onečišćenja *E. coli* i koliformnih bakterija jest pokazatelj primarnog onečišćenja fekalnim izvorima i na taj način pokazatelj moguće prisutnosti drugih, opasnijih patogenih mikroorganizama (primjerice salmonela). U vrijeme najave trenda uporabe sirovog ili samo toplinski obrađena (nepasteriziranog) mlijeka za preradu u neke mliječne proizvode (pojedine vrste sireva), kontrola sirovog mlijeka jednako je značajna kao i kontrola proizvoda nakon pasterizacije - kojom se utvrđuje uspješnost postupka pasterizacije ili opasnost post-pasterizacijske kontaminacije. Uporaba pripremljenih gojilišta za utvrđivanje mikroorganizama omogućava veću učinkovitost a u isto vrijeme i točnost rada. Metodu Petrifilm™ *E. coli* zbog svih testiranih osobina preporučujemo u svakodnevnoj mljekarskoj praksi, naročito pri provođenju analize rizika kritičnih točaka.

EVALUATION OF PETRIFILM™ ESCHERICHIA COLI METHOD FOR BACTERIAL COUNT OF ESCHERICHIA COLI IN RAW MILK

Summary

The presence and number of bacteria Escherichia coli in bulk milk from farms, samples of raw milk and samples taken from collection points and transporting tanks were stated by the experiment. Four methods were applied. Two methods based on standard principle of counting colonies on Petridishes using selective mediums called Coli ID and VRB-MUG, to which fluorescent component 4-methyl-umbellypheryl-beta-D-glucuronide (MUG) was added. There was used also Petrifilm™ E. coli plate method and the most probable number (MPN) method with lauryl-sulphate broth with MUG was taken as a standard. Among 100 samples of raw milk 31 (31%) contained less than 30 bacteria in 100 ml. Statistical proceeding of logarithmic transformation of remaining 69 samples showed, that the correlation coefficient between methods with Petrifilm and MPN method was the best ($r=0.83$) while it was slightly lower when comparing methods of Coli ID ($r=0.80$) or the method with VRB-MUG ($r=$ only 0.65) and the mentioned standard method. Comparison of methods with Petrifilm and Coli ID shows better correlation $r=0.90$). The comparison between methods was better when the results of samples with high level of contamination were calculated. The results of analysis of variance show, that the difference between the standard (MPN) and other three methods, basing on colonies count on solid mediums, was statistically significant ($P<0.05$). The statistically characteristic difference is mostly due to large variability of data within particular methods (0-3000 bacteria/ml) and various evaluation of results for the method of the most probable number

and other methods. The Duncan's test namely showed statistically significant similarity of methods Coli ID, Petrifilm and MPN method. The Coli ID method gives similar results as the standard method in 68% of cases while Petrifilm methods shows 65% and the method using VRB-MUG medium only 55%, all plotted on MPN 95% confidence intervals. For the Petrifilm method, the standard deviation for repeatability was 0.029 log units and the repeatability was 0.082 log units.

Key words: milk, Petrifilm™ *E. coli*, *Escherichia coli*, methods.

Literatura

- Blood, R. M., G. D. W. Curtis: Media for total Enetrobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. Int. J. Food Microb., 26, 1995, 93-115.
- Lanyi, B: Classical and Rapid Identification Methods for Medically Important Bacteria, in Collwell, R. R. (ed): Methods in Microbiology: Current Methods for Classification and Identification of Microorganisms, vol 19. Academic Press, London, Orlando, New York, Boston, Sidney, Tokyo, Toronto, 1987, 52-54, 88.
- Matner, R. R. s sod.: Efficiency of Petrifilm™ *E. coli* Count Plates for *E. coli* and Coliform Enumeration. J. Food Prot., 2 (53), 1990, 145-150.
- Milk and milk products: Enumeration of coliforms-colony count technique and most probable number technique, IDF standard 73A:1985.
- Milk and milk products: Enumeration of microorganisms, colony count technique at 30°C, IDF standard 100B:1991.
- Milk and milk products - Guidance on sampling, ISO standard 707:1985.
- Milk and milk products - Enumeration of presumptive *Escherichia coli*-Part 2: Most probable number technique using 4-methyl-umbelliphenyl-beta-D-glucuronide (MUG), ISO/DIS standard 11866-2, 1993.
- Milk and milk products: Preparation of samples and dilutions for microbial examination, IDF standard 122B:1992.
- Milk and milk products: Enumeration of presumptive *Escherichia coli* content by most probable number technique with the use of MUG, IDF standard 170:1994.
- Milk: Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods, IDF standard 128:1985.
- Robinson, R. K.: Dairy Microbiology: The Microbiology of Milk Products, vol. 2, Elsevier Applied Science, London, New York, 1990, 23-34, 78-90, 294-375.
- Službeni list SFRJ, br. 25, 26. kolovoz 1983, 859-867.
- Vlaemyneck, G. M.: Comparison of Petrifilm™ and Plate Count Methods for Enumerating Molds and Yeasts in Cheese and Yoghurt, J. Food Prot., 10 (57), 1994, 913-914.
- 3M™ - Microbial Products: Upute za upotrebu Petrifilma.

Adresa autora - Author's addresses:

Mr. Karmen Godič Torkar
Doc. dr. Slavica Golc Teger
Univerza v Ljubljani, Odd. za zootehniko Biotehniške fakultete,
Institut za mlekarstvo, Groblje 3,
1230 Domžale, Slovenija

Primljeno - Received:

1. 3. 1997.