

Primjerenost automatske epifluorescentne mikroskopije za određivanje bakteriološke kakvoće sirovog mlijeka*

Slavica Golc Teger

Izvorni znanstveni rad - Original scientific paper

UDK: 579.678

Sažetak

Primjerenost metode automatske epifluorescentne mikroskopije (instrumentom BactoScan 8000) za određivanje ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku provjerena je kao metoda za određivanje kvalitete mlijeka proizvođača u svrhu plaćanja po higijenskoj kakvoći. Rezultati određeni BactoScan-om uspoređeni su rezultatima brojanja kolonija na pločama metodom IDF Standard 100 B : 1991.

Nakon pretvorbe broja pulsova BactoScana (y) i broja kolonija na pločama (x) u dekadске logaritme izračunata je jednadžba pravca regresije $y = 0,916 x + 0,714$ i standardna devijacija ostatka $s_{y/x} = 0,26$ log jedinica. Koeficijent korelacije između dviju metoda bio je $r = 0,95$ ($n = 701$). Ponovljivost (preciznost, s_p) instrumenta na različitim razinama impulsa varirala je od 0,02 log jedinica do 0,11 log jedinica uz broj kolonija < 100.000 m.o./ml. Granica pouzdanosti za $P = 0,95$ bila je $\pm 0,517$ log BSC/impulsa/ml.

Riječi natuknice: automatska epifluorescentna mikroskopija, BactoScan 8000, sirovo mlijeko, ukupan broj bakterija, plaćanje mlijeka

Uvod

U Sloveniji su odlučili da uvedu suvremenu metodu određivanja ukupnog broja bakterija u sirovom mlijeku BactoScanom, jer omogućava brzu i objektivnu analizu većeg broja uzoraka mlijeka. Tako će se moći kontrolirati bakteriološka kakvoća mlijeka svih proizvođača što predstavlja osnovu za poboljšanje kvalitete mlijeka u cjelini.

Metoda BactoScan je službeno priznata u mnogim državama svijeta. U više od 20 država koriste preko 300 instrumenata. Pomoću te metode je analizirano više od 50% uzoraka mlijeka, namijenjenih kontroli kakvoće u svrhu plaćanja mlijeka u Europskoj uniji.

U prilogu koji slijedi prikazane su značajke instrumentalne metode BactoScan 8000 (Foss Electric, Hillerod, Danska), kao i njena usporedba s klasičnom

* Rad iznijen na XXXI. hrvatskom simpoziju mljekarskih stručnjaka, održanom u Opatiji, 16-18.11.1994.

referentnom metodom brojanja kolonija na pločama, koja je propisana IDF standardom 100 B : 1991.

Materijali i metode

BactoScan 8000

BactoScan je instrument za automatsko određivanje bakteriološke kakvoće sirovog mlijeka. Ta metoda se temelji na brojanju pojedinih bakterijskih stanica u uzorku mlijeka. Vrijeme potrebno za analizu iznosi 5 minuta, dok je standardnom metodom brojanja za analizu potrebno 48 - 72 sati.

Princip djelovanja instrumentalne metode BactoScanom je kontinuirana epifluorescentna mikroskopija. Pomoću bojila instrument broji direktno bakterije obojene narančasto (acridine orange). Suspenzija obojenih bakterija nanosi se na rotirajući disk. Nakon zračenja s ksenonovom žaruljom obojene bakterije fluoresciraju crvenonarančastu svjetlost koju očitava fotometar. Odbrojavaju se impulsi, a rezultat je prikazan kao broj bakterija/ μ l mlijeka. Instrument automatski izračunava na osnovi regresije.

Konverzija

Istraživanje započinje pripremom konverzijske tabele za pretvaranje impulsa u broj kolonija/ μ l mlijeka. Točke konverzijske tabele izračunate su posebnim postupkom na temelju rezultata paralelnih analiza 2.555 uzoraka sirovog miješanog mlijeka, metodom brojanja individualnih bakterija BactoScanom i klasičnom metodom brojanja kolonija na pločama kao i razvrstavanjem vrijednosti u skupine, s obzirom na broj prebrojavanja kolonija.

Mlijeko

Bakteriološka kakvoća uzoraka mlijeka se kretala u rasponu: manje od 10.000 mikroorganizama/ml mlijeka do preko 3 milijuna mikroorganizama/ml mlijeka, tj. u okviru razreda kakvoće mlijeka koji vrijede u Sloveniji za plaćanje mlijeka po kakvoći.

Metode brojanja na pločama

Metoda brojanja kolonija na pločama realizirana je u skladu s međunarodnim IDF standardom 100 B : 1991.

Upotrijebljena hranljiva podloga: Trypton - yeast glucose-monohydrate agar, s 0,1% dodatkom obranog mlijeka u prahu (firma BIOLIFE).

Inkubacija: 72 sata (30°C).

Upravljanje BactoScanom

Analize i svakodnevno provjeravanje djelovanja BactoScana se odvijalo u skladu s naputcima proizvođačke opreme i automatski su kontrolirane vlastitim kontrolnim programom (kontrola pritiska, kemikalija, usmjeravanje mikroskopa, upotreba upravljača uzorka). Prije početka analize uzorci su bili zagrijani do 40°C.

Statistika

Obe metode su uspoređene regresijskom analizom (program Quattro). Određena je i točnost (komparabilnost sa standardnom metodom), ponovljivost metode i granica detekcije instrumentalne metode.

Statistička obrada rezultata analitičkih determinanti provedena IDF standardom 128:1985.

Analizom BactoScanom prema naputcima proizvođača opreme, testiran je utjecaj prethodnog uzorka na točnost rezultata uzorka koji mu slijedi.

Prije statističke obrade podataka sve su analitički određene vrijednosti pretvorene u logaritamske vrijednosti.

Rezultati i diskusija

Uspješnost konverzijske pretvorbe dokazana je izračunavanjem standardne devijacije razlika između rezultata klasične metode brojanja kolonija na pločama i konverzijom određenog broja kolonija na pločama te konverzijom određenog broja kolonija BactoScanom. Utvrđene vrijednosti standardne devijacije (s_d) bile su niže od 0,4 log jedinica što predstavlja gornju dozvoljenu granicu specifikacije proizvođača instrumenata.

U tabeli 1. navedene su standardne devijacije razlika (s_d), s obzirom na klase po kojima se ocjenjuje bakteriološka kakvoća mlijeka u Sloveniji.

Tabela 1. Standardna devijacija razlika (s_d) prosječnih vrijednosti (\bar{x}) ukupnog broja bakterija/ml mlijeka (UBB/ml) u pojedinim klasama kvalitete

Table 1 The standard deviation of differences (s_d) for different classes and their mean number (\bar{x}) of CFU/ml

Klasa Class	Raspon (UBB/ml) Class limit (CFU/ml)	s_d (log)	\bar{x} (UBB/ml) \bar{x} (CFU/ml)
E	do 50.000	0,36	11.376
I	50.001 - 100.000	0,26	59.566
II	100.001 - 400.000	0,24	164.059
III	400.001 - 800.000	0,31	518.800
IV	800.001 - 3.000.000	0,24	1.671.090

Rezultati prosječno 93% uzoraka mlijeka određeni metodom brojanja mikroorganizama na ploči i metodom BactoScan razvrstani su u istu ili višu klasu.

Povezanost instrumentalne metode direktnog brojanja bakterija u mlijeku s BactoScanom i klasičnom referentnom metodom brojanja kolonija na pločama ustanovljena je metodom regresijske analize.

Ukupno 701 uzorak mlijeka uzet je iz redovite kontrole namijenjene plaćanju mlijeka po kakvoći.

Mikrobiološka vrijednost je bila u okviru razreda na osnovi kojih se u Sloveniji mlijeko plaća tj. u rasponu manje od 10.000 mikroorganizama/ml mlijeka do preko 3 milijuna mikroorganizama/ml mlijeka. (Službeni list RS br. 72/93). Pojedine klase su bile zastupljene s približno jednakim brojem uzoraka.

Regresijska veza između metoda se može prikazati slijedećom jednadžbom:

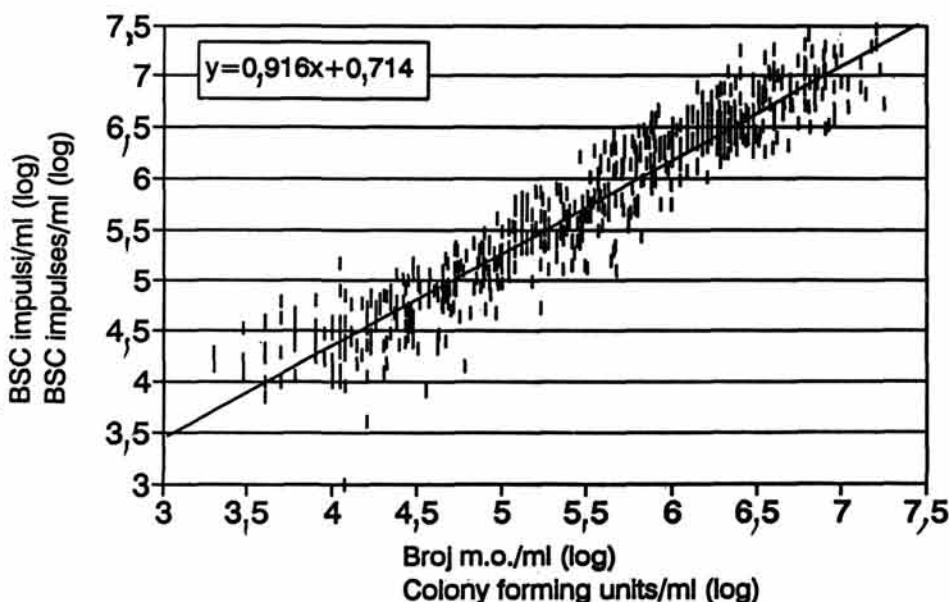
$$y = 0,916 x + 0,714$$

Kao neovisnu seriju podataka (os x) uzeli smo u obzir rezultate metode brojanja kolonija na pločama (broj mikroorganizama/ml mlijeka) i instrumentalne metode BactoScan (BSC impulsi/ml) kao ovisnu seriju podataka (os y).

Na slici 1. prikazana je regresijska krivulja povezanosti testiranih metoda.

Slika 1: Regresijska krivulja

Fig. 1: Regression curve



Podaci regresijske analize su navedeni u tabeli 2.

Tabela 2. Podaci regresije

Table 2. Regression analysis

— Broj zavisnih podataka, n Number of observation, n	701
— Konstanta regresijskog pravca, a Constant of regression, a	0,714
— Koeficijent regresije, b Regression coefficient, b	0,916
— Koeficijent determinacije, r^2 Determination coefficient, r^2	0,909
— Koeficijent korelacije, r Correlation coefficient, r	0,953
— Standardna greška ocjene, $s_{y/x}$ Standard error of estimation, $s_{y/x}$	0,264

Uska povezanost ocijenjena je koeficijentom korelacije (r) koji je iznosio 0,953. Do sličnih rezultata su došli i neki drugi autori:

Grappin (1985.) $r = 0,841$, Saarinen (1984.) $r = 0,93$, Kielwein (1981.) $r = 0,91$, Winterer (1983.) $r = 0,787$, Bonato (1990.) $r = 0,916$, Zangerl (1992.) $r = 0,81$.

Uzroci tih razlika mogu biti i stariji tipovi instrumenata BactoScan, koji jednostavno ne mogu zajamčiti kakvoću analitičkih determinanti kao što to može treća generacija, tj. BactoScan 8000. Ti instrumenti spriječavaju greške u radu vlastitim kontrolnim programima (kontrolni software) i omogućavaju veću preciznost pri mjerenju.

Standardna pogreška ocjenjivanja ($s_{y/x}$), ili standardna devijacija regresije predstavlja točnost metode BactoScana a iznosila je 0,264 (log BSC impulsa/ml) što se slaže s podacima navedenim u literaturi: Dasen (1991.) $s_{y/x} = 0,303$, Bonato $s_{y/x} = 0,262$, Suhren (1992.) $s_{y/x} = 0,30$, Andersson $s_{y/x} = 0,25$.

Izračunavanjem granice pouzdanosti može se utvrditi točna ocjena povezanosti obiju metoda pomoću linearne regresije. Naš rezultat je uz 95% vjerojatnosti ($P = 0,95$) u granicama $\pm 0,517$ log BSC impulsa/ml. Do sličnog zaključka su došli također i Bonato (1990.) i Dasen (1991.) $\pm 0,542$.

Ponovljivost metode BactoScan smo utvrdili provodeći 20 uzastopnih mjerenja istog uzorka.

Rezultati o različitoj kontaminaciji uzoraka mlijeka su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Ponovljivost (s_r) instrumentalne metode BactoScan
 Table 3. Repeatability (s_r) of the BactoScan estimation

BSC impulsi/ml obim BSC impulses/ml Level	BSC impulsi/ml prosjek BSC impulses/ml mean value	s_r (log)	KV (%) CV (%)
< 100.000	24.500	0,107	27,69
< 225.000	151.200	0,052	11,96
< 920.000	826.100	0,027	6,19
< 1.700.000	1.077.100	0,023	5,12
> 1.700.000	6.677.300	0,022	5,14

Utvrđena je vrlo dobra ponovljivost u skladu s tehničkom specifikacijom instrumenta koju navodi i proizvođač opreme $s_r = 0,05 - 0,10$ log jedinica kao i neki drugi autori (Nieuwenhof, 1988.; $s_r = 0,03$ log jedinica).

Kontrola utjecaja prethodnog uzorka na točnost rezultata uzorka koji slijedi tzv. "carry over check" omogućava točnost analitičkog određivanja.

Prilikom višekratnog ponavljanja u najmanje 10 uzoraka mlijeka ustanovljen je malen utjecaj, do 0,1%. Dasen i suradnici su 1991. na 33 uzorka ustanovili utjecaj manji od 0,16%.

Instrument utvrđenu vrijednost manju od 1% automatski uzima u obzir kao korekciju prilikom interpretacije rezultata.

Zaključak

Na temelju testa primjerenosti automatske epifluorescentne mikroskopije instrumentom BactoScan 8000 može se utvrditi:

- dobru usporedljivost metode epifluorescentne mikroskopije direktnog brojanja bakterija s klasičnom referentnom metodom brojanja kolonija na pločama,
- dobru točnost metode $s_{y/x} = 0,264$ (log BSC impulsa/ml),
- dobru ponovljivost rezultata analiza $s_r = 0,02 - 0,05$ (log BSC impulsa/ml),
- osiguranu kvalitetu rada prilikom upravljanja instrumentom što omogućava točan rezultat,
- da je upotreba metode BactoScan primjerena za određivanje bakteriološke kakvoće mlijeka u svrhu njegovog plaćanja u okviru razreda kakvoće mlijeka koji vrijede u Republici Sloveniji.

STUDY OF AUTOMATED EPIFLUORESCENT MICROSCOPY FOR EVALUATION OF RAW MILK BACTERIOLOGICAL QUALITY

Summary

The applicability of BactoScan 8000, instrument for automated total bacteria count determination was tested as method of evaluation raw milk if supplier's price

was dependent on hygienic quality. The BactoScan estimates were compared to colonies number determined using standard plate count method (IDF Standard 100 B : 1991). After logarithms transformation, between BactoScan (y) and CFU method (x) the regression equation $y = 0.916x + 0.714$ and the residual standard deviation $s_{y/x} = 0.26$ log units were calculated. The correlation coefficient between two methods was 0.95 ($n = 701$). The repeatability of the instrument (precision, s_p) at different impulse levels varied from 0.02 log units to 0.11 log units when colonies' number was $< 100,000$ CFU/ml. The established limit of detection for $P = 0.95$ was ± 0.517 log BSC impulses/ml.

Key words: automated epifluorescent microscopy, BactoScan 8000, raw milk, total bacterial count, payment of milk.

Literatura

- ANDERSSON, I., BRENNÉ, E., JOHANSSON, G., KAEREBY, F., MONGOSTEN, T., (1993): Joint suitability study of BactoScan 800 in Norway and Sweden. **Scandinavian Dairy Information** 1.
- BONATO, P., ROSSI, G., ZANATTA, P., (1990): Impiego del BactoScan nella conta automatica dei batteri in latte crudo. **Il Latte** 15, 53-57.
- DAESEN, A., OLID, R. M., PITON, C., GRAPPIN, R. (1991): Assessment of the BactoScan 8000 for rapid and automatic enumeration of total flora in raw milk. **Lait** 71, 661-670.
- GRAPPIN, R., DASEN, A., FAVENNEC, P. (1985): Numeration automatique et rapide des bactéries du lait cru à l'aide du BactoScan. **Le Lait** 65, 123-147.
- IDF 128: Milk-Definition and evaluation of the overall accuracy of indirect methods of milk analysis, 1985, 1-10.
- IDF 100 B: Milk and Mild products - Enumeration of microorganisms, 1991, 1-3.
- KILWEIN, G., DAUN, U. (1981): Das BactoScan Verfahren zur automatischen Bakterien Zählung in der Anlieferungsmilch. **Deutsche Molkerei-Zeitung** 102, 874-878.
- NIEUWENHOF, F.F.J., HCOLWERT, J.D. (1988): Suitability of BactoScan for the estimation of the bacteriological quality of raw milk. **Milchwissenschaft** 43, 577-586.
- Pravilnik o določanju odkupne cene kravjega mleka. Uradni list Republike Slovenije 72 (1993), 3826.
- SAARINEN, K., (1984): The suitability of the BactoScan method for grading raw milk samples. **Meijeritieteellinen Aikakauskirja** 42, 33-43.
- SUHREN, G., REICHMUTH, J., HEESCHEN, W. (1992): Relative detection of pure cultures by various methods relating to macrocolony count as reference method. **Milchwissenschaft** 47, 231-236.
- ZANGERL, R., GINZINGER, W., KAEREBY, F. (1992): Unspecific increase in Bacto Scan counts during the storage of milk samples. **Milchwissenschaft** 47, 773-776.
- WINTERER, H., GRUBER, V. (1983): Adaptation du procédé BactoScan de dénombrement des germes totaux du lait cru. **Österreich Milch** 58, 373-384.

Adresa avtorja - Authors address:

Doc. dr. Slavica Golc - Teger
Biotehniška fakultata
Institut za mlekarstvo
SLO - 61230 Domžale

Primljeno - Received:

10.3.1995.