



Úskalí referenčního a instrumentálního stanovení CPM v syrovém mléce při kontrole kvality

Oto Hanuš, Radoslava Jedelská, Zdeňka Hegedúšová, Pavel Kopunecz,
Zdeňka Klímová, Romana Tučková, Jan Zlatníček, Miloš Klimeš
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha
3.11.2016 Hustopeče (ČMSCH a.s.)

V rámci projektů: OPVK MŠMT–CZ.1.07/2.3.00/09.0081; NAZV
KUS QJ1210301. Aktivita OŽV ČAZV.



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM
SOCIÁLNÍM FONDEM A STÁTNÍM ROZPOČTEM
ČESKÉ REPUBLIKY

Vzdělávací projekt MŠMT - CZ.1.07/2.3.00/09.0081

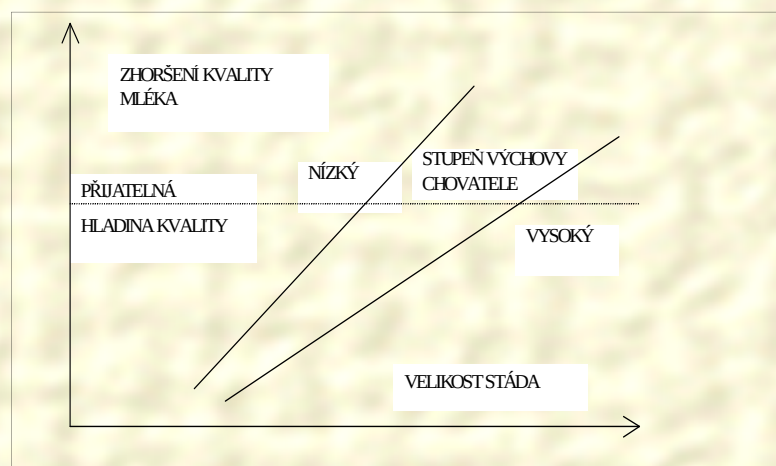
„Komplexní vzdělávání lidských zdrojů v mlékařství“

Partneři projektu:

- ❖ Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Agronomická fakulta,
koordinátor, nositel (řešitel) projektu
- ❖ Výzkumný ústav mlékárenský, Praha,
partner projektu
- ❖ Výzkumný ústav pro chov skotu, Rapotín,
partner projektu
- ❖ Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice,
partner projektu

Obsah sdělení (ve zpracování potravin v mlékařství roste podíl
přidané hodnoty a tím význam hygienické kvality syrového mléka):

- Význam CPM v syrovém mléce
- Definice CPM, zdroje a vlastnosti
- CPM, charakteristika metod stanovení a některé metodické problémy
- Provedení aktualizace přepočtové rovnice pro FC z BEI na CPM v tis.CFU/ml pro současné podmínky ČR

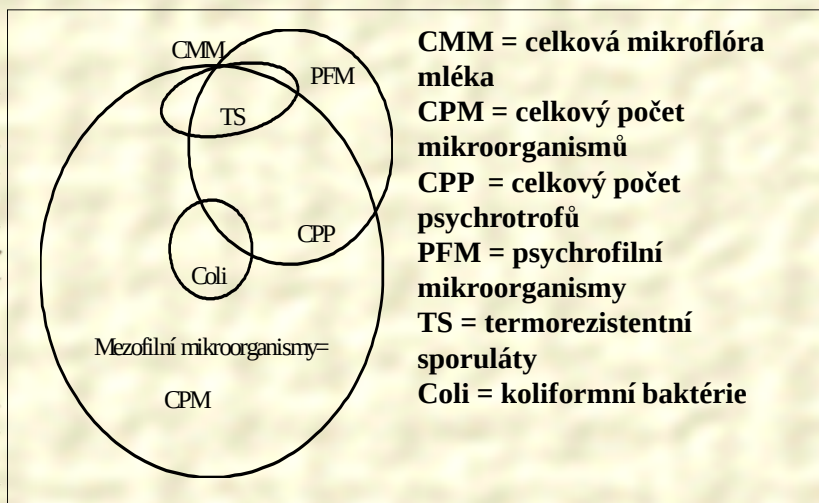


- **Jakost syrového mléka** je důležitým faktorem kvality následných mléčných výrobků. Musí být pravidelně kontrolována, protože mléko, pro svůj vysoký obsah vody a živin, je ideálním prostředím pro rozvoj mikroorganismů, a tudíž od momentu nadojení je materiálem, který je vysoce ohrožen kažením.
- **Otázka jeho uložení a transportu je citlivým technologickým procesem.** Kvalita mléka ovlivňuje trvanlivost mléčných výrobků. Dobrá jakost syrového mléka vytváří a zajišťuje provozní jistotu pro farmáře (dobrá farmářská cena), pro zpracovatele mléka (prodejnost a trvanlivost mléčných výrobků) a podmiňuje bezpečnost potravinového řetězce pro konzumenty.
- **Celkový počet mezofilních mikroorganismů (CPM) je hlavním hygienickým ukazatelem kvality syrového mléka.** V EU je určeno, že standardní syrové kravské mléko může obsahovat (při 30 °C kultivace) $\leq 100 \times 10^3$ KTJ $\times$ ml⁻¹. V praxi se stanovuje kultivačními mikrobiologickými metodami nebo jako CPM včetně mrtvých bakterií na zařízení průtočného cytometru.

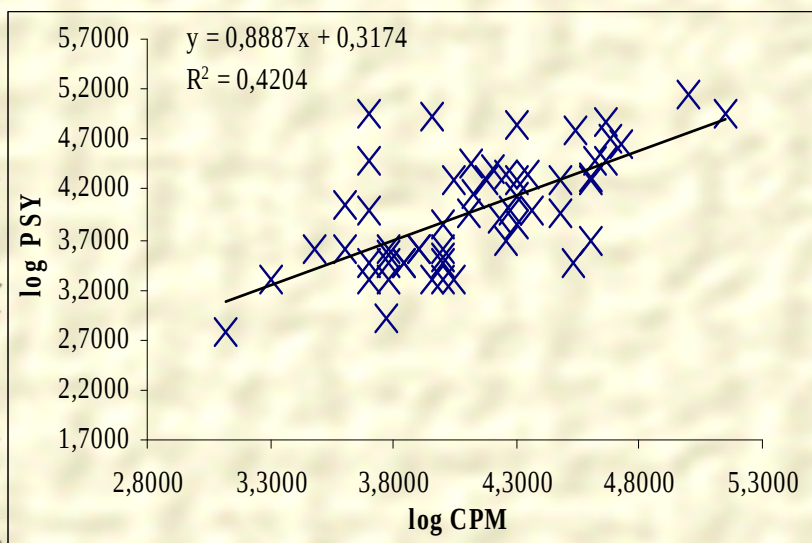


Jaký by mohl být symbol mléčné laboratoře?

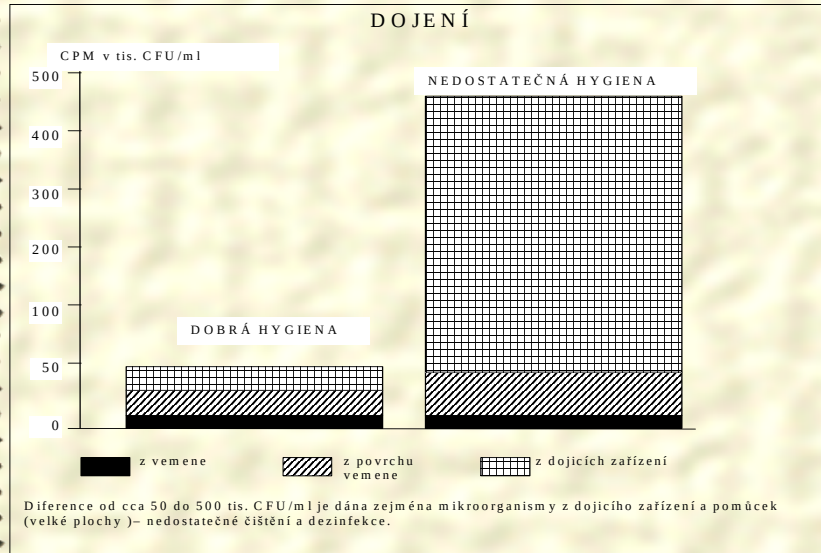
Obr. Schéma možného technologicko-fyziologického dělení základní případně normované (ČSN 57 0529) kontaminující mléčné mikroflóry.



Obr. Vztah mezi hygienickou kontaminací bazénového mléka v CPM a PSY (Holštýn, n = 57; $r = 0,6484^{*}$).**



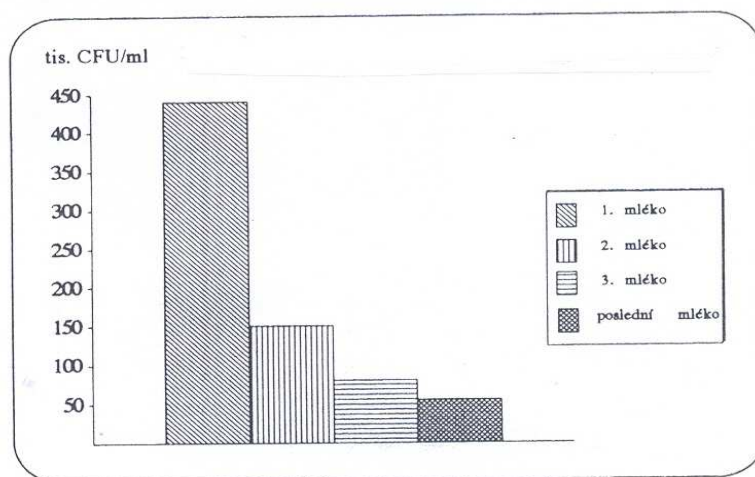
Obr. Původ celkového počtu mikroorganismů (CPM) v mléce (podle ROSICKÝ et al., 1990).



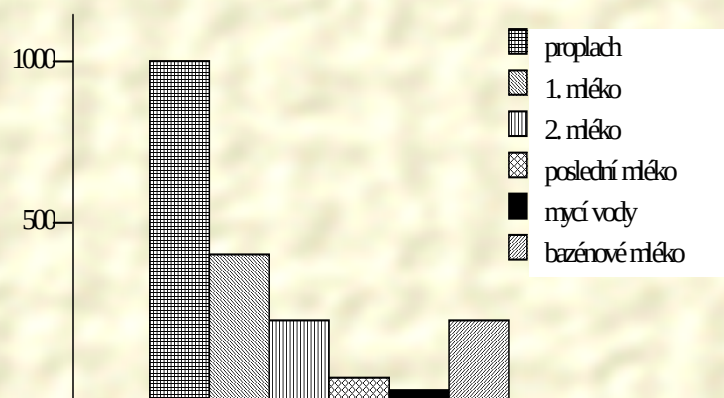
Rozmnožování zárodků v syrovém mléce při různých teplotách



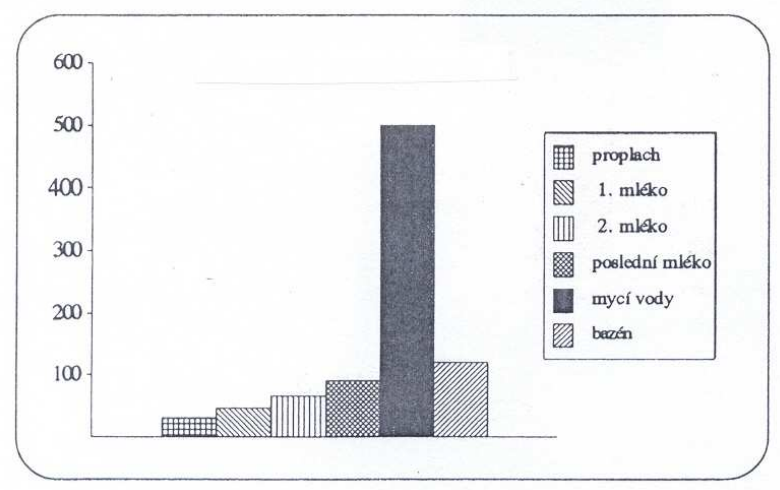
Ukázka příkladu nejčastějších hodnot CPM
ve fázových vzorcích mléka (tis. CFU/ml).



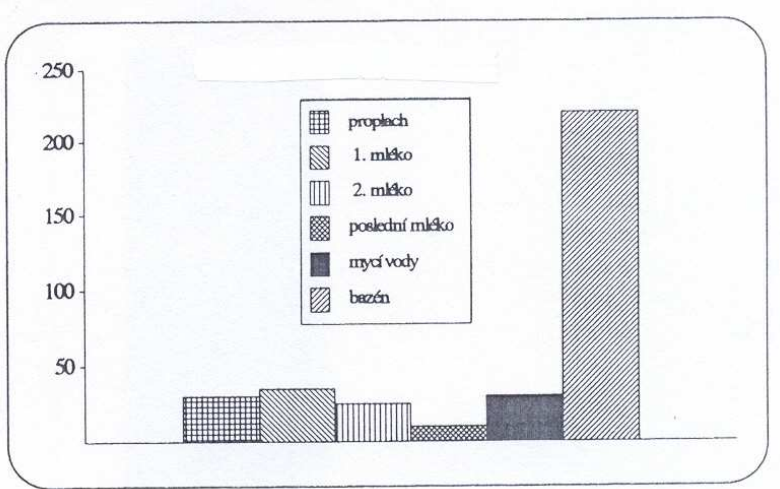
Ukázka příkladu nevyhovující sanitace dojícího zařízení
podle celkového počtu mikroorganismů (tis. CFU/ml) –
fázovka (Ticháček et al., 1995).



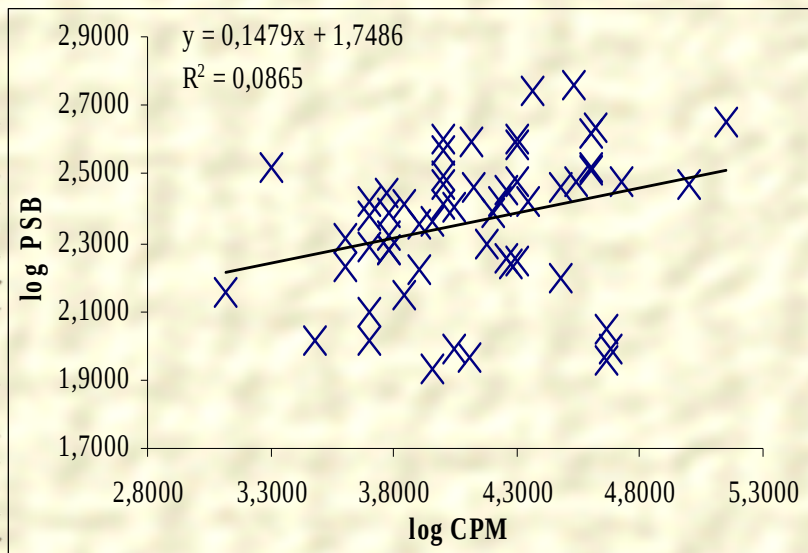
Ukázka příkladu vlivu znečištěných mycích vod podle CPM (tis. CFU/ml) - fázovka.



Ukázka příkladu vlivu chybného chlazení v tanku podle CPM (tis. CFU/ml) - fázovka.



Obr. Vztah mezi hygienickou kontaminací bazénového mléka v CPM a zdravotním ukazatelem stáda PSB (mastitidní stav; Holštýn, n = 57; r = 0,2941*).

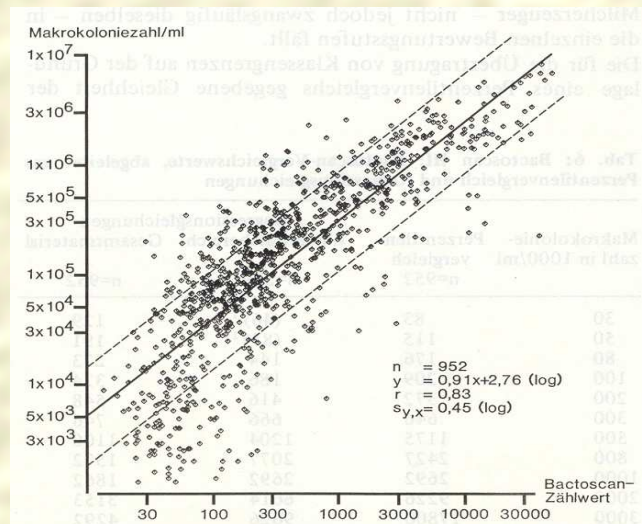


- Výchozí norma je ČSN EN ISO 4833-1. Mikrobiologie potravinového řetězce - **Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika přelivem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.** Vzorek nebo jeho ředění se pečlivě promíchá pipetou (opakovaným nasáváním) nebo 25násobným převrácením vzorkovnice nebo zkumavky.
- Očkuje se sterilní pipetou po 1 ml zkoušeného vzorku nebo jeho ředění vždy po dvou sériích Petriho misek. Inokulum se nejpozději do 15 min od promíchání zalévá cca 12 až 15 ml agarem s kvasničním extraktem (GTK, Milcom), který je předem vychlazený na 45 °C ve vodní lázni, a po utuhnutí média jsou misky inkubovány dnem vzhůru při 30 °C po dobu 72 ± 3 h. Po kultivaci jsou hodnoceny misky, které obsahují počet kolonií 10 – 300 v 1 ml.

- Dalším způsobem je nepřímé **stanovení CPM metodou průtočné cytometrie**. Ta mívá často automatickou formu v provedení různých výrobců (IBC a Bactocount, Bentley Instruments; Bactoscan, Foss Electric; atd.). Fluoro-opto-elektronická metoda průtočné cytometrie (FC) pro stanovení CPM musí být kalibrována na velkých souborech výsledků referenční kultivační plotnové metody. Nejdříve se specifickou enzymatickou hydrolyzou a centrifugací v gradientu (mechanicky) odstraní ze vzorku tukové kuličky a somatické buňky, aby nevytvářely interferenční efekty. Bakteriální buňka je za podmínek metody obarvena barvivem (nejčastěji akridinoranž). Buňka po osvětlení emituje specifické záření, které je osciloskopicky registrováno jako elektronický impuls, tedy mikrob. Proud vzorku teče v laminárním proudu pufrovacích roztoků pod fluoro-optickým mikroskopem. Výsledky bakteriálních elektronických impulsů (BEI) se přepočítávají faktory nebo rovnicemi na výsledky kultivačních metod, tedy na počet mikroorganismů (kolonie formujících (tvořících) jednotek, KTJ) v 1 ml mléka. Pro syrové mléko bývají třeba specifické kalibrace na různé biologické druhy mléka. Dříve se, se stejným principem, využívala i metoda stanovení CPM v nekonečném pásu vzorkového filmu na rotujícím disku.

- **V principu tedy tyto metody nepřímého stanovení CPM musejí být kalibrovány přepočtovou rovnicí na hodnoty výše popsané metody referenční, tedy kultivační (plotnové), i když jsou známy rovněž systémy mikrobiologického hodnocení kvality syrového mléka podle kvantity elektronických impulsů vzorku (bez kalibrace na přímou metodu), kde je kontrolován jejich počet na zvláštních vzorcích a rovněž opakovatelnost stanovení počtu BEI.**

Obr. Bactoscan III: Vztah mezi výsledky Bactoscanové hodnoty (nápočtu, BEI) a určením počtu bakteriálních makrokolonií v syrovém mléce (podle SUHREN et al., 1988).



- **Vývoj hygienických režimů dojení a mastitidní léčby krav** může změnit druhové spektrum celkového počtu mikroorganismů (CPM). To může interferovat do vztahu mezi referenční a rutinní metodou stanovení CPM při kontrole kvality mléka.
- Cílem bylo přepočíst kalibrační rovnici transformace z bakteriálních elektronických impulsů (BEI) průtočné cytometrie (IBC, Bentley) na výsledky referenční metody stanovení CPM. Tato validace je významná pro výběr nejvhodnější varianty rovnice podle výsledků referenční kultivační metody ($n = 1\,651$ párů referenčních a rutinních měření CPM).
- Data CPM a BEI byla použita v původních a logaritmičtě transformovaných hodnotách. Databáze byla korigována uříznutím dat a testy odlehlosti. Provedeny byly základní statistické metody a lineární regrese. Byla vypočtena sada relevantních konverzních rovnic podle praktických laboratorních prostředkových podmínek.

- **Korelační koeficienty** ($P < 0,001$) mezi metodami byly: 0,872 pro všechny hodnoty původní; 0,911 pro hodnoty logaritmicky transformované.
- Uříznutím (≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml) dat klesla logicky těsnost těchto závislostí a byly redukovány směrodatné odchylky průměrného rozdílu (sdD): z 350 (360 a 352) na 70 až 100 (98 až 104 a 73 až 77) tis.CFU/ml pro ≤ 1000 a ≤ 500 tis.CFU/ml.
- Testy odlehlosti redukovaly sdD na 28 až 36 tis.CFU/ml.
- Hlavní model lineární rovnice pro modifikaci přístrojové transformační rovnice byl: $\log \text{BEI} \times \log \text{CPM}$ referenčně $y = 1,0302x - 3,6565$ ($r = 0,859$; $P \leq 0,001$).
- Nové transformační rovnice jsou součástí softwarového portfolia systému kontroly hygienické a zdravotní kvality mléka.

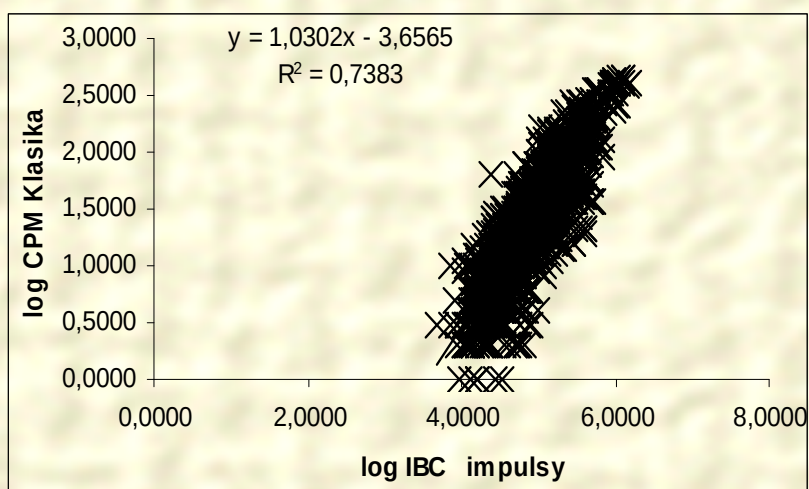
Tab. Vybrané kombinace lineárních regresních vztahů výsledků metod pro přepočet BEI (10^3) na CPM (tis.CFU/ml) a výběr modelu pro modifikaci transformační rovnice (Všechny vztahy, $P \leq 0,001$; n = počet případů; r = korelační koeficient; PTR-IBC = původní transformační rovnice IBC).

Soubor	Kombinace	Rovnice	r	n	BEI	BEI	BEI	BEI	BEI
					10	50	100	200	1 000
	BEI×CPM	PTR-IBC			6	25	47	89	381
A1	BEI×CPM	$y = 0,0002x + 29,0678$	0,667	1 543	31	39	49	69	229
A1	$\log \text{BEI} \times \log \text{CPM}$	$y = 0,9885x - 3,454$	0,849	1 543	3	16	31	61	300
B1	BEI×CPM	$y = 0,003x + 1,9336$	0,881	1 517	5	17	32	62	302
B1	$\log \text{BEI} \times \log \text{CPM}$	$y = 1,0302x - 3,6565$	0,859	1 517	3	15	31	64	335
B	$\log \text{BEI} \times \log \text{CPM}$	$y = 1,028x - 3,6457$	0,885	1 551	3	15	31	64	333
B1	$\log \text{BEI} \times \text{CPM}$	$y = 118,4107x - 533,8312$	0,736	1 517	-60	23	58	94	177
B	$\log \text{BEI} \times \text{CPM}$	$y = 272,6255x - 1281,9143$	0,635	1 551	-191	-1	81	163	354

Tab. Přiblížení nové transformační rovnice IBC ke vztahu $\log \text{BEI (IBC)} \times \log \text{CPM}$ referenčně z Tab. 2 (B1, $n = 1\,517$), přepočet BEI (10^3) na CPM (tis.CFU/ml). (NTR-IBC = nová transformační rovnice IBC, přepsaná a modifikovaná.)

Kombinace	Rovnice	BEI	BEI	BEI	BEI	BEI
		10	50	100	200	1 000
BEI×CPM	PTR-IBC	6	25	47	89	381
logBEI×logCPM	$y=1,0302x-3,6565$ NTR-IBC	3	15	31	64	335
BEI×CPM	NTR-IBC	3	15,7	31,9	64,8	335,2

Obr. Varianta v souboru B1 s lineární kombinací vztahu $\log \text{BEI (IBC)} \times \log \text{CPM}$ referenčně (kultivačně). (B1; $n = 1\,517$; $r = 0,859$; $P \leq 0,001$.)



„Děkuji za pozornost“

