Mikrobiológia módszerösszehasonlító vizsgálatok I.

Lisztek penész-számának meghatározására alkalmazott módszerek összehasonlító vizsgálata

TABAJDINÉ PINTÉR VERONIKA, NAGEL VILMOS és FÁBRI ILONA

Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Központ, Budapest

Az élelmiszerek minőségét, tartósságát befolyásoló termékspecifikus mikroflóra domináns csoportjai vizsgálatának korszerűsítése, egységesítése és szabványosítása a 70-es években nagy lendülettel indult el. A különböző nemzetközi iparági szervezetek, az ICMSF (International Committee of Microbiological Specifications for Foods), valamint az ISO által javasolt módszerek figyelembevételével, a hazai alkalmazás lehetőségeinek szem előtt tartásával az élelmiszerellenőrző és iparági mikrobiológiai laboratóriumok bevonásával módszerösszehasonlító körvizsgálatok szervezésére és végrehajtására került sor. Az értékelést követően kialakított egységes módszerek teszik lehetővé többek között a készitermékeket gyártó és felhasználó iparág minősítő eljárásainak egységesítését is.

A gabona és a gabonaipari termékek mikrobiológiai vizsgálatainak korszerűsítését – nemzetközi szinten – az ICC (International Association for Cereal Chemistry) koordinálja. Az egyesület munkájában hazánk is aktívan vesz részt, egyrészt az általuk szervezett nemzetközi körvizsgálatokba való bekapcsolódással, másrészt egyes témák országon belüli kidolgozásával.

Az elmúlt években a lisztekben előforduló penészgombák kimutatására szolgáló módszerek összehasonlítására került sor az élelmiszerellenőrző laboratóriumokban végzett körvizsgálatokkal.

A vizsgálatsorozat célja olyan egységes meghatározási módszer kiválasztása, amely mind a hazai gyakorlatot, mind pedig a nemzetközi ajánlásokat is figyelembe veszi. Ennek érdekében a következő feladatok megoldására került sor: 1. az alapszuszpenzió készítés különböző módjainak összehasonlítása, 2. a hazai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott „klóramfenikol – glükóz – élesztőkivonat – agar" (OGA) táptalaj és az ICC ajánlásában szereplő „klóramfenikol – Rose – Bengal" táptalaj összehasonlítása és a homogenizált alapszuszpenzió optimális ülepedési idejének meghatározása.

Az egyes körvizsgálatokban a legmegfelelőbb módszer kiválasztására matematikai statisztikai értékelés után került sor. A figyelembe vett szempontok az érzékenység, az ismételhetőség, az összehasonlíthatóság, a gyorsaság és a gazdaságosság voltak.

Alapszuszpenzió készítési eljárások összehasonlítása

Az első vizsgálati sorozatban az alapszuszpenzió készítési eljárások összehasonlítására került sor.

Anyag és módszer

A körvizsgálatokban 12 laboratórium vett részt, egy-egy laboratórium 4 mintából végezte el a penész-szám meghatározást. A 4 mintából 2–2 minta azonos penész-számú volt (rejtett párhuzamos). Minden egyes mintából 3 szuszpenziót készítettek, amelyeket különböző homogenizálási eljárással egyneműsítettek: 1) forgókéses kezelés. 3 perc; 2) kézi rázás, 3 perc; 3) gépi rázás, 10 perc. Egy laboratóriumban ezen kívül Stomacher készülékkel történő homogenizálásra is sor került. A homogenizálások utáni leoltás egységesen a következő volt: az alapszuszpenzió 30 perces ülepedése után a felülúszóból (1 cm^3-rel), OGA táptalajjal vékony lemezöntés (10–12 cm^3 táptalaj Petri-csészénként), a tenyésztés hőmérséklete 25 °C, időtartama 3 nap. Az OGA táptalaj összetétele: glükóz 20,0 g; élesztőkivonat 5,0 g; agar-agar 15,0 g; desztillált vízzel 1000 cm^3-re töltve; pH = 7,0±0,1; sterilezés 115 °C hőmérsékleten 30 percig; a lemezöntés előtt 100 mg klóramfenikolt adunk 1000 cm^3 táptalajhoz.

A körvizsgálat során kapott és összesített vizsgálati adatokat matematikai statisztikai módszerekkel értékeltük. Az alkalmazott statisztikai próbák a Dixon-próba, a Bartlett-próba, az egy- és kétszempontos varianciaanalízis, valamint az ismételhetőség (r) és az összehasonlíthatóság (R) meghatározása voltak (1, 2).

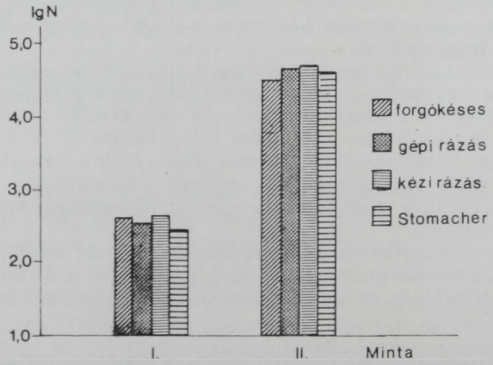
Értékelés

Bartlett-próbával megállapítottuk, hogy a vizsgálati adatok szórás szempontjából homogén sokaságot képeznek, ami a további értékelés alapfeltétele.

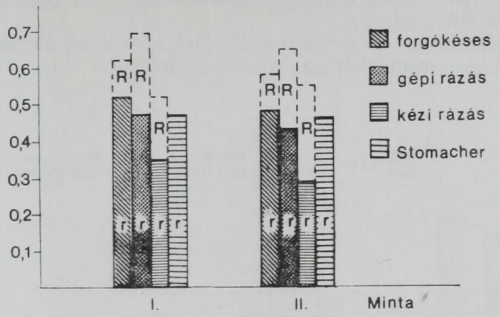
Dixon-próbával megállapítottuk, hogy – két laboratórium kivételével – az egyes vizsgálati módszerek esetében átlag szempontjából nincs szignifikáns eltérés. A statisztikai próbák elvégzése után az összehasonlító elemzés 10 laboratórium 124 adata alapján történt.

A különböző homogenizálási eljárásokkal előkészített minták penész-számának alakulását az *1. ábra* szemlélteti.

Kétszempontos variancianalízissel megállapítottuk, hogy az egyes módszerek között érzékenység szempontjából, 95%-os biztonsággal számolva, nem mutatható ki eltérés egyik minta esetében sem.



1. ábra
Különböző homogenizálási eljárásokkal előkészített minták penészszámának alakulása. Egy-egy oszlop 10 laboratórium, két párhuzamos minta eredményeinek átlagát jelenti, kivéve a Stomacher homogenizálási módot, ahol egy laboratórium vizsgált



2. ábra
Az egyes előkészítési módszerek megbízhatósága. Az ismételhetőség (r) és a megbízhatóság (R) különböző penész-számú minták esetében, ISO 5725 szerint meghatározva.

A különböző módszereket ezután megbízhatóság szempontjából elemeztük. Mintánként és módszerenként az ISO 5725 alapján meghatároztuk az ismételhetőséget, azaz azt a véletlen hibát, amely megengedhető két egymást követő mérés között akkor, ha egyetlen személy, egy laboratóriumban, ugyanazon felszerelésekkel és anyagokkal, ugyanazon homogén mintából mér, és az összehasonlíthatóságot azaz azt a véletlen hibát, amely megengedhető bármely két különböző laboratóriumban, különböző felszerelésekkel és anyagokkal, ugyanazon homogén mintából mért értékek között.

A kapott eredményeket a 2. *ábra* szemlélteti.

A Stomacherrel történő homogenizálás esetében az *r* értéket egy laboratórium vizsgálata alapján határoztuk meg, így ez csupán közelítő értéknek tekinthető.

Az adatok alapján a következőket állapíthatjuk meg:

- a laboratóriumok valamennyi módszert megbízhatóan jól alkalmazták, hiszen a *r* érték kétszeresénél jóval kisebb *R* értéket kaptunk;
- a módszerek véletlen hibája nem függ a nagyságrendtől, azaz a kis penész-számú minta esetében ugyanolyan értékeket kaptunk, mint a nagyobb penész-számú minták esetében;
- az ismételhetőség és az összehasonlíthatóság alapján a legmegbízhatóbb módszernek a 3 perces kézi rázással történő homogenizálás és az azt követő penész-szám meghatározás bizonyult.

Különböző táptalajokon és eltérő alapszuszpenzió ülepedési idők után meghatározott penész-számok összehasonlítása

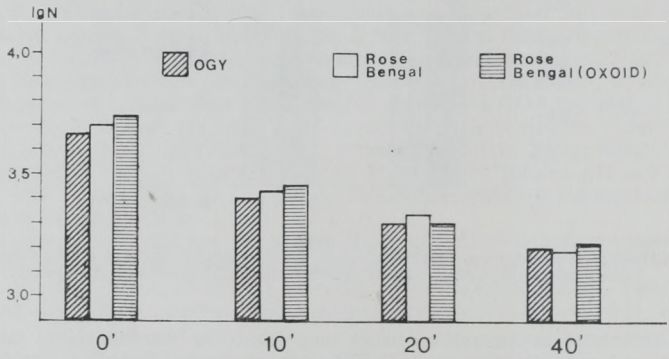
Anyag és módszer

A körvizsgálatban 12 laboratórium vett részt és vizsgálta meg két liszt minta penész-számának alakulását három táptalajon (OGA, „klóramfenikol – Rose Bengal" OXOID kész portáptalajból (CM 549) és „klóramfenikol – Rose Bengal" hazai komponensekből összeállítva) és négy ülepedési idő függvényében.

A „klóramfenikol – Rose Bengal" táptalaj összetétele: mikológiai pepton 5,0 g; glükóz 10,0 g; Na_2PO_5 1, 0 g; $MgSO_4$, 0,5 g; Rose Bengal 0,05 g; agar-agar 15,5 g; desztillált vízzel 1000 cm^3-re töltve, pH = 7,2±0,1; sterilezés 121 °C

hőmérsékleten 15 perc időtartamig; klóramfenikolból 0,1 g-ot 3 cm^3 acetonban oldunk és a táptalajhoz adjuk.

Az egyes módszereket ez esetben is az előző fejezetben megadott szempontok szerint érzékenység és megbízhatóság szerint vizsgáltuk.



3. ábra

Különböző táptalajokon mért penész-számok átlagainak alakulása az alapszuszpenzió ülepedési idejének függvényében. Oszloponként 12 laboratórium, 2 mintából (azonos) meghatározott eredményeinek átlaga. OGA – klóramfenikol-glükóz-élesztőkivonat-agar táptalaj, RB – klóramfenikol-Rose Bengal táptalaj hazai komponensekből készítve, RB (OXOID) – klóramfenikol-Rose Bengal táptalaj gyári készítésű, kész por alakú.

Értékelés

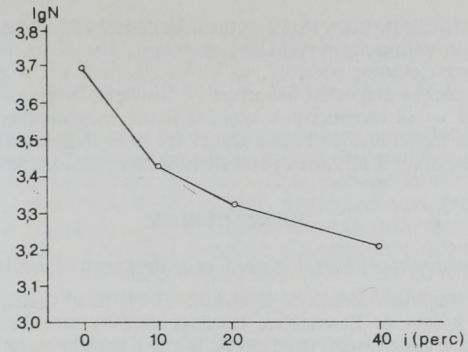
A statisztikai próbák segítségével (Dixon- és Bartlett-próba) megállapítottuk, hogy az adatok – módszerenként – átlag és szórás szempontjából homogénnek tekinthetők, azaz nincs kieső adat, illetve laboratórium.

A módszerenkénti 24 vizsgálati adat átlagait a *3. ábrán* tüntettük fel.

Kétszempontos varianciaanalízissel megállapítottuk, hogy azonos ülepedési idő eltelte után a különböző táptalajokon mért penész-szám értékek között nincs szignifikáns eltérés, azaz 5%-os tévedési valószínűség mellett állíthatjuk, hogy érzékenységük megegyezik, ami az ábrán is jól látható. A leoltást megelőző ülepedési idők között azonban jelentős eltérés tapasztalható, a penész-szám az ülepedési idő növekedésével csökken, amint az már a *3. ábrán* is jól követhető. A különböző táptalajokon meghatározott értékek között nem tudtunk kimutatni eltérést, ezért – a még jobb érzékelhetőség kedvéért – a *4. ábrán* az egyesített átlagokat rajzoltuk fel.

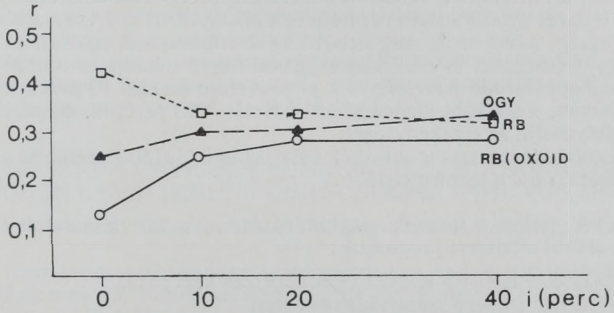
Az egyes ülepedési időknél mért átlagértékeket varianciaanalízissel hasonlítottuk össze és megállapítottuk, hogy a nulla perces ülepedési idő után meghatározott penész-szám értékek szignifikánsan nagyobbak a többi ülepedési idő utáni értékeknél. A 10, a 20 és a 40 perces ülepedési idő meghatározott penész-szám értékek között 5%-os tévedési valószínűség mellett nem tudtunk kimutatni különbséget.

A módszerek érzékenységének vizsgálata után megvizsgáltuk, hogy melyik előkészítési mód (ülepedési idő) esetén a legmegbízhatóbbak az eredmények. Módszerenként és táptalajonként meghatároztuk az ismételhetőség (r) és az összehasonlíthatóság (R) értékeket, amelyeket az *5.* és *6. ábra* tartalmaz.



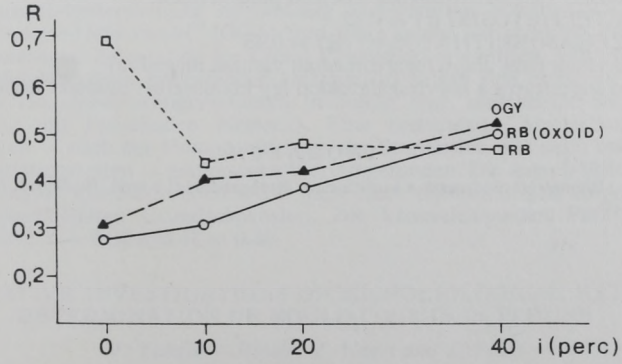
4. ábra

Penész-szám alakulása az ülepedési idő függvényében. A felvett pontok 12 laboratórium, 2 mintájának, 3 táptalajon mért értékeinek átlagát jelentik (összesen 72 adat)



5. ábra

A különböző táptalajokon mért penész-számok ismételhetőségének alakulása az ülepedési idő függvényében. A felvett pontok 12 laboratórium, 2 mintájából mért értékeinek átlagát jelentik (összesen 24 adat).



6. ábra

A különböző táptalajokon mért penész-számok összehasonlíthatóságának alakulása az ülepedési idő függvényében. A felvett pontok 12 laboratórium, 2 mintájából mért értékeinek átlagát jelentik (összesen 24 adat)

Az ábrákból kitűnik, hogy a 10 perces ülepedési idő után mért eredmények már megbízhatóak valamennyi táptalaj esetében. Ennél az ülepedési időnél az érzékenység is megfelelőnek adódott, az előkészítésnek ezt a módszerét célszerű alkalmazni. A 40 perces ülepedési idő után – amellett, hogy az érzékenység a legkevésbé megfelelő – az eredmények szórása ismét megnövekedett (lásd 0 perces ülepedés), mivel a nagyfokú szétválás miatt itt már nagymértékben befolyásolja az eredményt az is, hogy a folyadék fázis melyik rétegéből történik a mintavétel.

Következtetések

Eddigi eredményeinket összefoglalva az alábbi megállapításokat tehetjük:

a) Az alapszuszpenzió készítési eljárások között (kézi rázás, 3 perc; gépi rázás, 10 perc; késes- és Stomacher homogenizálás) nincs szignifikáns eltérés. Az azonos érzékenységű módszerek közül a legmegbízhatóbbnak a *3 perces kézi rázás* bizonyult.

b) Az ICC által javasolt „klóramfenikol – Rose Bengal" táptalajok (OXOID kész portáptalajból, valamint hazai komponensekből összeállított táptalaj) és a hazai gyakorlatban rutinszerűen alkalmazott *OGA táptalaj* mind érzékenység, mind pedig megbízhatóság szempontjából egyformán megfelelő. Egyszerűségénél és gazdaságosságánál fogva inkább az utóbbi ajánlható.

c) Az ülepedési idő növelésével a penész-szám az első 10 percben jelentősen csökken, a további ülepedési idő növelése (20 perc, ill. 40 perc) már nem befolyásolja az érzékenységet.

d) Megbízhatóság szempontjából valamennyi táptalaj esetében a *10 perces ülepedési idő* a legmegfelelőbb.

A lisztek penész-számának meghatározására, a körvizsgálatok eredményei alapján az alábbi módszert javasoljuk:

ALAPSZUSZPENZIÓ KÉSZÍTÉS: 3 perces kézi rázás
ÜLEPEDÉS: 10 perc szobahőmérsékleten
LEOLTÁSI MÓD: vékony lemezöntés
TÁPTALAJ: klóramfenikol – glükóz – élesztőkivonat – agar (OGA)
TENYÉSZTÉS: 22 ± 1 °C hőmérsékleten, 3 – 5 nap
A módszer megbízhatóságára jellemző paraméterek:
ISMÉTELHETŐSÉG (r) = 0,32
ÖSSZEHASONLÍTHATÓSÁG (R) = 0,45
(Az értékek tizes alapú logaritmusban vannak megadva)
Szabványosításra a körvizsgálatokkal így kiválasztott módszer került.

IRODALOM

(1) *Sváb J.:* Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 1981.
(2) ISO 5725

СРАВНЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА I. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА ПЛЕСЕНЕЙ В МУКЕ

В. Табайди – Пинтер, В. Нагель, И. Фабри

На основе круговых анализов, проведенных в отраслевых лабораториях и лабораториях по контролю, было сделано сравнение методов исследования плесеней, встечающихся в муке. При выборе метода были учтены: чувствительность, воспроизводимость (R), повторяемость (r), простота, продолжительность и затраты. Не установлена разница между питательной средной, применяемой в рутинном порядке в практике анализа пищевых продуктов «хлорамфеникол-глюкоза-дрожжевой экстракт» (ОДА) и и питательной средой Розе-бенгаль, данной в предложении scc (International Association for Great Chemistry).

Не установлено значительного расхождения между различными методами гомогенизации анализируемых продуктов: ручная гомогенизация, механическое встряхивание, гомогенизация с помощью вращающихся ножей.

Устанвлено, что имеются сигнификантные отклонения между значениями, мзмеряемыми после различной продолжительности осаждения, следуюющего после гомогенизации исходной суспензии.

Выбранный метод – это метод глубинного посева в питательную среду ОДИ после ручного встряхивания и 10 минутного осаждения. Характерные параметры выбранного метода: r = 0,32 и R = 0,45

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER MIKROBIOLOGISCHE METHODEN I. BESTIMMUNG DER SCHIMMELZAHL VON MEHLEN

V. Tabajdi – Pintér, V. Nagel und I. Fábri

Auf Grund von umfassenden Untersuchungen in Laboratorien für Lebensmittelkontroll und für Industriezweige wurde ein Vergleich der Untersuchungsmethoden der in den Mehlen vorkommenden Schimmel durchgeführt. Bei der Auswahl der Methode wurden die folgenden Gesichtspunkte berücksichtigt: Empfindlichkeit, Vergleichbarkeit (R), Wiederholbarkeit (r), Einfachheit, Schnellheit und der Kostaufwand. Kein Unterschied wurde zwischen dem in der Praxis der Lebensmitteluntersuchung rutinmässig angewandten Nährboden „Chloramphenicol-Glykose-Hefeextrakt" (OGA) und dem in der Empfehlung des Vereins ICC (International Association for Cereal Chemistry) erwähnten Nährboden Rose Bengal gefunden. Kein bedeutender Unterschied zeigte sich zwischen den verschiedenen Homogenisierungsverfahren (manuelle bzw. maschinelle Schüttelung, Behandlung mit rotierenden Messern). Eine bedeutende Abweichung wurde zwischen den – nach der Homogenisierung der Suspension und nach unterschiedlichen Absetzungszeiten – gemessenen Werten gefunden. Die auserwählte Methode war Plattenguss mit Nährboden OGY nach einer zehnminutigen Absetzung der manuell geschüttelten Grundsuspension. Die kennzeichnenden Parameter der Methode sind: r = 0,32 und R = 0,45.

COMPARATIVE INVESTIGATIONS OF MICROBIOLOGICAL METHODS I. DETERMINATION OF MOULD-COUNTS IN FLOURS

V. Tabajdi – Pintér, V. Nagel and I. Fábri

On the basis of survey tests carried out in food control and industrial laboratories the comparison of the methods of investigation of moulds occurring in flours

became necessary. The aspects taken into account at the selection of the method included the sensitivity, reproducibility (R), repeatability (r), simplicity, speed and costs. No difference could be found between the culture-medium „chloramphenicol-glucose-yeast extract" (OGY) and the culture-medium Rose Bengal mentioned in the recommendation of the ICC (International Association for Cereal Chemistry). No significant deviations were observable between the various procedures of homogenization: manual or mechanical shaking, treatment with rotating blender. However, significant differences were found between the values measured after various sedimantation periods following the homogenization of the suspension, The method selected for application is plate pouring with the nutrient OGY after a manual shaking of the basic suspension, and sedimentation for ten minutes. The characteristic parameters of this method are: r = 0.32 and R = 0.45.

DES ESSAIS INTERLABORATOIRES MICROBIOLOGIQUES. I. LA DÉTERMINATION DU NOMBRE DE MOISI DES FARINES

V. Tabajdi – Pintér, V. Nagel et I. Fábri

Les auteurs font entrer en comparaison les méthodes d'essai pour la détermination du numbre de moisi des farines à la base des données des groupes d'industrie et des laboratoires pour le contrôle alimentaire.

Á la sélection d'une méthode on tient compte de la précision, la reproductibilité (R), la répétabilité (r), la simplicité, la rapidité et les frais.

Il n'y a pas de différence entre les milieus employés souvent comme les milieus chloramphenicol-glucose-extrait de levain (OGY) et Rose Bengal préconisé par ICC (International Association for Cereal Chemistry).

Il n'y a aucune différence entre les voies différentes d'homogénisation.

Entre les values obtenues après les temps de sédimentation differents il y a une déviation significante.

L'usage du milieu OGY après l'homogénisation à la main et sédimentation de 10 minutes c'est la méthode préconisée. La répétabilité est 0,32, la reproductibilité est 0,45.