

Сравнительные испытания сред для подсчета КМАФАнМ на соответствие установленным требованиям

Введение

Анализ показателя КМАФАнМ (ОМЧ) обеспечивает производственную лабораторию пищевого производства пониманием уровня микроорганизмов, присутствующих в тестируемом продукте, и может быть использовано для определения санитарного качества, органолептической приемлемости, соблюдения надлежащей производственной практики и в некоторой степени безопасности продукта.^{1 2 3} Поскольку все эти требования являются критическими для реализации продукта, анализ показателя КМАФАнМ является значительной частью ежедневной работы производственной лаборатории.

Выбор достоверного метода для подсчета КМАФАнМ (ОМЧ) является непростой задачей, поскольку существуют различные методы тестирования, от быстрых автоматизированных методов до традиционных культуральных методов. Для любой лаборатории важно понимать, какой метод наилучшим образом отвечает их потребностям. Были испытаны два метода определения КМАФАнМ: традиционный агаровый метод и тест-пластины 3M™ Petrifilm™. Существуют различия в рецептуре и производстве агаровых питательных сред, но также существует много различий в том, как эти среды используются в разных лабораториях. Традиционный агаровый метод включает добавление образца в пустую чашку Петри, за которым следует добавление расплавленного агара. Чашки могут быть размещены в один слой на лабораторном столе или уложены одна на другую перед добавлением расплавленного агара (штабелированные). Затем чашкам дают остыть, прежде чем поместить их в инкубатор. В этом исследовании оценивались чашки, сложенные в стопки, и размещенные в один слой на столе. Метод штабелирования часто используется для экономии времени и места на столе, но исследования показали, что чашки в центре не охлаждаются с той же скоростью, что и чашки в верхней и нижней частях штабеля.⁴ Это может привести к более низким показателям и в конечном счете к несопоставимым результатам. Все эти вариации могут оказать влияние на результативность метода подсчета КМАФАнМ и являться неприемлемыми для лаборатории.

Были проведены сравнительные испытания агаровых сред для подсчета КМАФАнМ трех глобальных производителей и тест-пластины 3M™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ с целью определения производительности каждой среды при условиях расположения чашек методом штабелирования и в один слой. Исследование проводилось тремя разными аналитиками в разные дни. Каждый аналитик проводил протокол от начала до конца, включая подготовку среды, пробоподготовку, посев образцов и инкубацию.

Материалы и методы

Среда и реагенты

- Пептонно-солевой раствор, приготовленный в соответствии с инструкциями производителя, 90 мл
- Фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда, 90мл, готовый
- Забуференная Пептонная вода, 90 мл, готовая
- Тест-пластина 3M™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ
- Традиционный Метод Агар А
- Традиционный Метод Агар В
- Традиционный Метод Агар С
- Смесь микроорганизмов (NSI Lab Solutions Multi-Organism CRM)
 - Escherichia coli NCTC^A 9001/ATCC^B11775
 - Klebsiella oxytoca NCTC 8167
 - Staphylococcus aureus NCTC 6571/ATCC 9144
 - Candida albicans NCPF^C 3255/ATCC 2019

^A Национальная коллекция типовых культур

^B Американская коллекция типовых культур

^C Национальная коллекция патогенных грибов

Метод

Подготовка образца

Показатель pH каждого разбавителя был проверен и установлен между 6,6 и 7,2. Смесь микроорганизмов и дрожжевой диск были доведены до комнатной температуры в течение пяти минут, затем асептически добавили к 90 мл буфера (разбавителя). Разбавитель перемешали, что позволило диску полностью раствориться, примерно в течение 15 минут.

Подготовка чашки

Агары А, В и С были подготовлены в соответствии с инструкциями изготовителя. Чашки Петри и тест-пластины 3М™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ были промаркированы наименованием разбавителя, числом копий и температурой инкубации. Для каждого варианта было установлено по 10 чашек на растворитель и соответствующую температуру инкубации (табл.1).

Таблица 1. Условия для всех типов питательных сред

Среда	Разбавитель (буфер)	Температура инкубации
Агар А, В, С, тест-пластина 3М™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ	Пептонно-солевой раствор	30 °С
Агар А, В, С, тест-пластина 3М™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ	Фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда	32 °С
Агар А, В, С, тест-пластина 3М™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ	Забуференная Пептонная вода	35 °С

Посев

Наконечник пипетки меняли перед инокуляцией каждой чашки/пластины; инокулированный буфер смешивали после каждых 10 чашек; порядок посева на тест-пластины 3М Petrifilm для подсчета КМАФАнМ и традиционные чашки был рандомизирован. На 10 тест-пластин 3М Petrifilm для подсчета КМАФАнМ⁵ были посеяны по 1 мл аликвоты образца для каждой из трех буферно-температурных комбинаций, перечисленных в Таблице 1 тремя аналитиками. На 10 чашек с агаром¹ тремя аналитиками было добавлено по 1 мл аликвоты образца. В течение 15 минут добавляли примерно 12-15 мл агара, расплавленного на водяной бане при температуре 45°C ± 1°C в течение 1-3 часов, и образцы перемешивали попеременным вращением и возвратно-поступательным движением чашек. Для добавления агара к чашкам использовались два различных подхода: либо агар добавлялся в чашки, когда они были разложены одним слоем на лабораторном столе, либо когда чашки укладывались группами по шесть штук. Детальная схема исследования приведена на Рис.1.

Инкубация

Чашки с агарами оставляли при комнатной температуре для затвердевания, а затем инкубировали в стопках не более, чем из 6 (шести) чашек. Тест-пластины 3М Petrifilm для подсчета КМАФАнМ инкубировали в стопках из не более чем 20 пластин. Инкубировали чашки и тест-пластины при температуре, указанной в Таблице 1.

Интерпретация результатов

В конце соответствующего инкубационного периода из инкубатора извлекали тест-пластины 3М Petrifilm для подсчета КМАФАнМ и чашки с агаром, и осуществляли подсчет результатов.

Во всех методах определяли колониеобразующие единицы (КОЕ/мл). Рассчитывали стандартное отклонение, Р-значение (P-Value), коэффициент вариации (%CV) и готовили индивидуальные графики подсчетов (рис.2-4, табл. 2-3) для каждой комбинации разбавитель/температура.

Результаты и обсуждения

При рассмотрении стандартных отклонений тест-пластин 3M Petrifilm по сравнению с агаром А, В и С стандартные отклонения для тест-пластин 3M Petrifilm были эквивалентными или самыми низкими для всех температур, разбавителей и методов укладки чашек. Стандартное отклонение для тест-пластин 3M Petrifilm было достоверно ниже ($P < 0,05$), чем у агара В для всех комбинаций разбавитель/температура/штабелирование. Значение стандартного отклонения для агара А, который не был уложен в стопки, инкубировался с использованием фосфатно-буферного разбавителя Баттерфилда при температуре 32°C, было статистически эквивалентно значению для тест-пластин 3M Petrifilm. За исключением агара С в комбинации пептонно-солевой буфер /30°C / не уложен в стопки, агар С имел значительно более высокое стандартное отклонение, чем тест-пластина 3M Petrifilm.

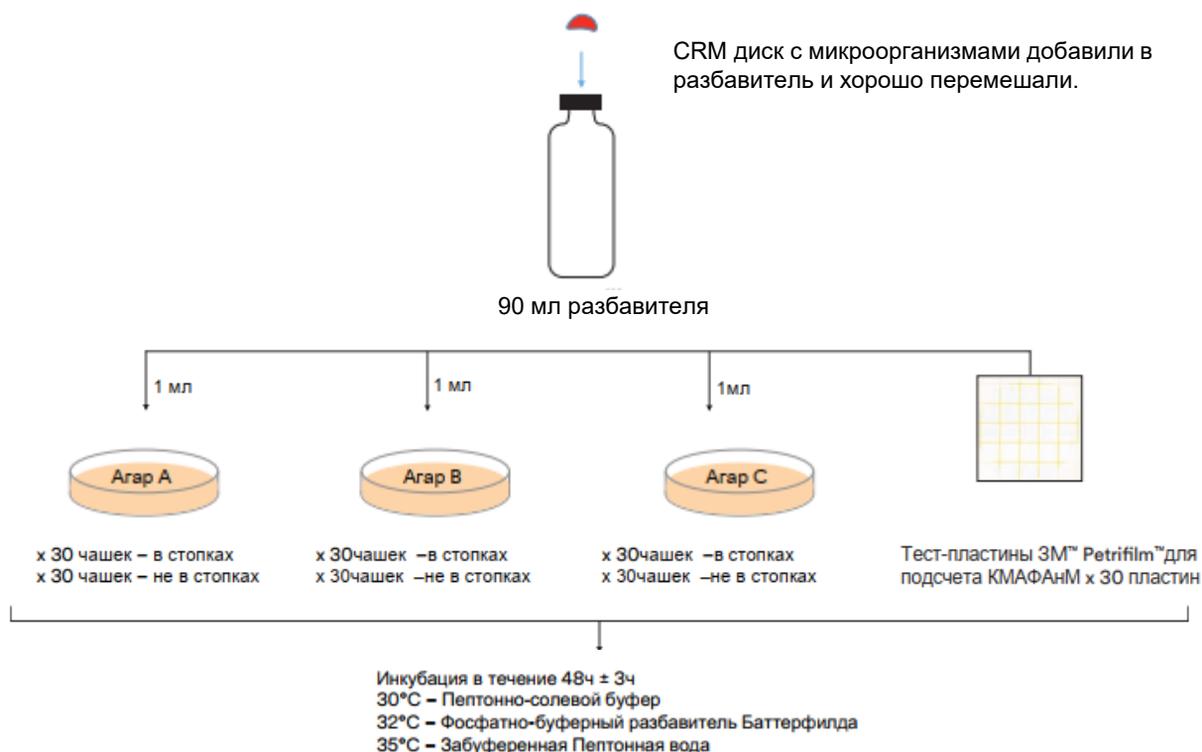
При оценке коэффициента вариации (CV) тест-пластины 3M Petrifilm приводили к наименьшему процентному показателю по сравнению с агаром. Для пептонно-солевого буфера / 30°C CV составлял 11,15% (Агары: 11,46%-21,12%); для фосфатно-буферного разбавителя Баттерфилда /32°C CV составлял 9,70% (Агары: 12,10% - 16,98%); для забуференной пептонной воды/35°C CV составлял 10,43% (Агары: 11,80% - 17,73%).

На рисунках 2-4 показано, как тест-пластины 3M Petrifilm способны обеспечить более последовательные результаты по сравнению с оцененными марками агаров. Существует четкая кластеризация с результатами тест-пластин 3M Petrifilm, в то время как результаты Агаров А, В и С более рассеяны. Это важно для производственных лабораторий на пищевых предприятиях, поскольку большинство из них участвует в тестировании качества и ежедневном контроле технологических процессов.

Несмотря на то, что в данном исследовании не было выявлено существенных различий между чашками с агаром, которые были штабелированы, по сравнению с чашками, которые разложены в один слой, эффективность метода тест-пластин 3M Petrifilm была лучше по сравнению с традиционными агаровыми методами (табл.2-3). Вполне возможно, что при большем наборе данных возникнет четкое разграничение между методами подготовки чашек с агаром.

В этом исследовании в целом были получены данные, свидетельствующие о том, что метод с использованием тест-пластин 3M Petrifilm для подсчета КМАФАнМ обеспечивает более устойчивые результаты при использовании обычных условий инкубации - пептонно-солевой буфер/30°C, фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда / 32°C и забуференная пептонная вода / 35°C.

Рисунок 1. Блок-схема анализа.



Рисунки 2а и 2б

Диаграмма сравнения показателей подсчета на чашках с агаром А, В и С и на тест-пластинах 3М™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ после нанесения культур с пептонно-солевым буфером и инкубации при 30°C. Чашки штабелировали во время разлива агара или в один слой на лабораторном столе (не в стопках).

Рис 2а.

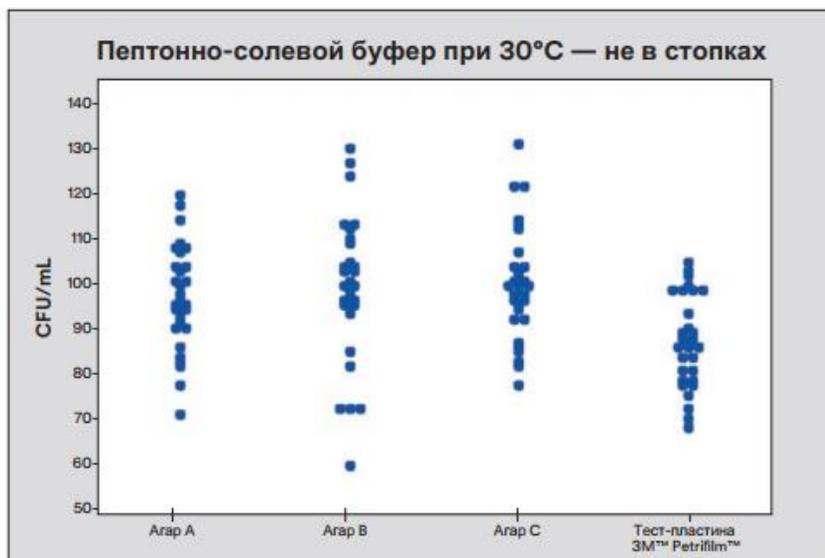
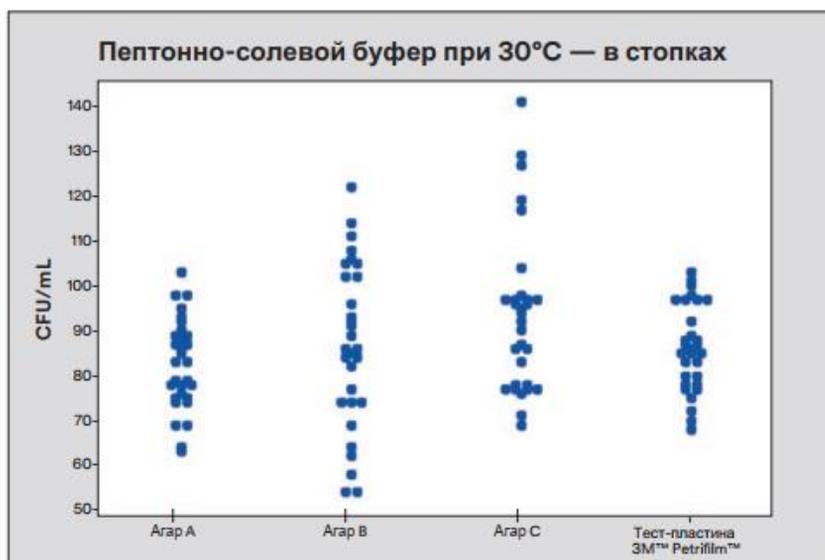


Рис 2б.



Рисунки 3а и 3б

Диаграмма сравнения показателей подсчета на чашках с агаром А, В и С и на тест-пластинах ЗМ™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ после нанесения культур с фосфатно-буферным разбавителем Баттерфилда и инкубации при 32°С. Чашки штабелировали во время разлива агара или в один слой на лабораторном столе (не в стопках).

Рис. 3а

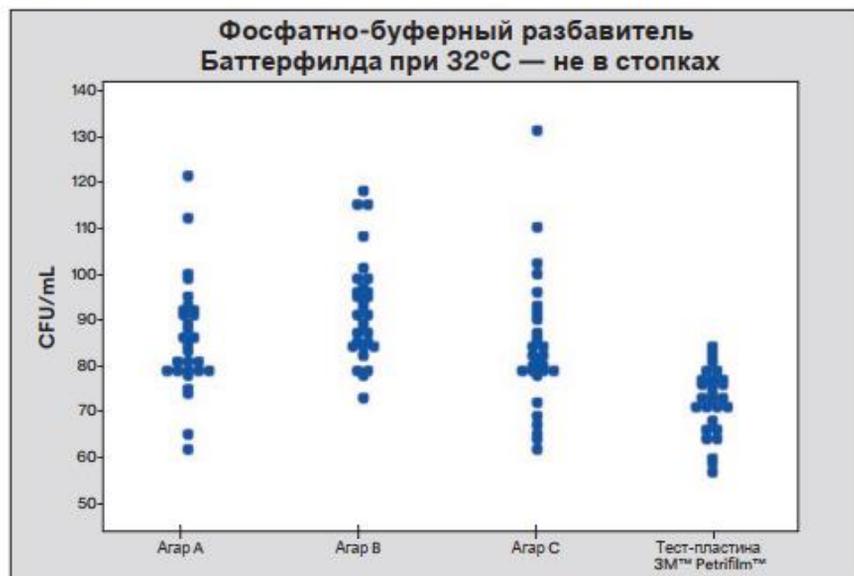
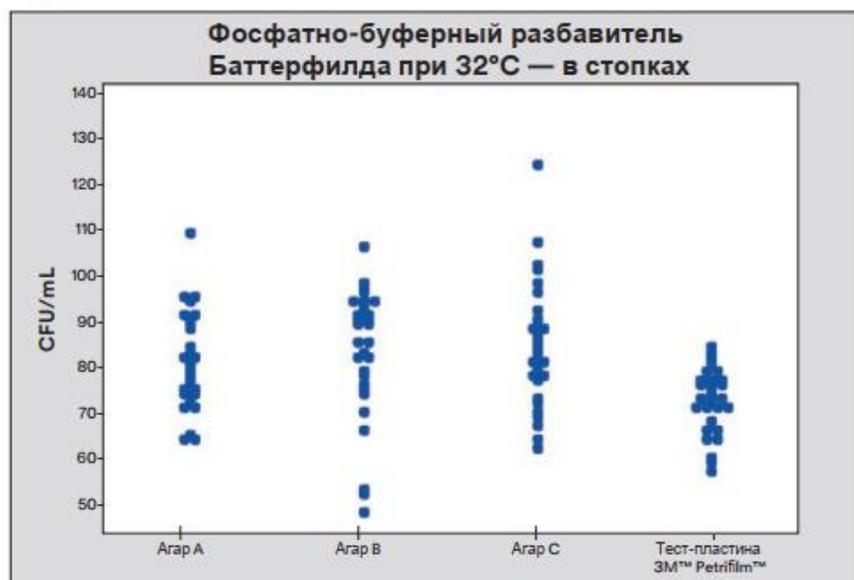


Рис. 3б



Рисунки 4а и 4б

Диаграмма сравнения показателей подсчета на чашках с агаром А, В и С и на тест-пластинах 3М™ Petrifilm™ для подсчета КМАФАнМ после нанесения культур с забуференной пептонной водой и инкубации при 35°С. Чашки штабелировали во время разлива агара или в один слой на лабораторном столе (не в стопках).

Рис. 4а

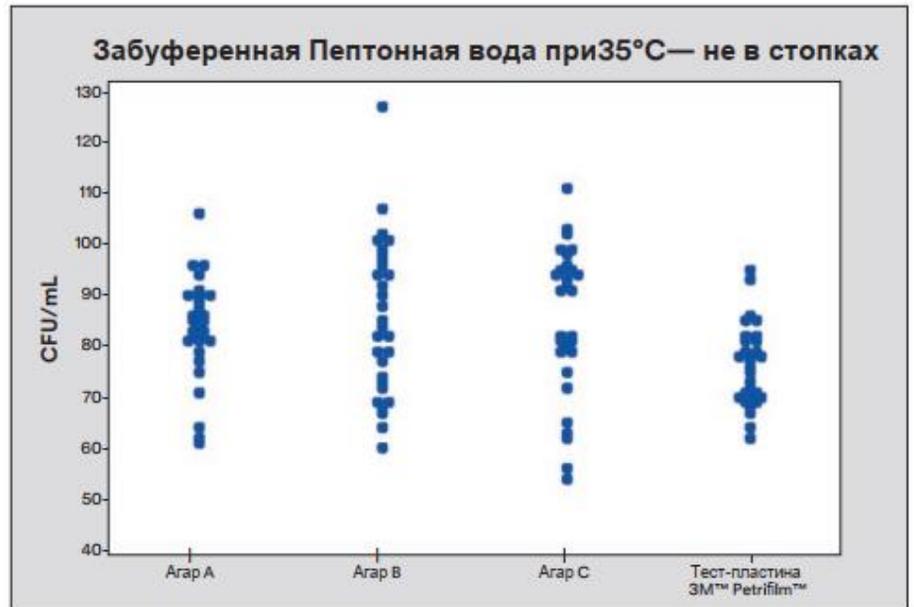


Рис. 4б

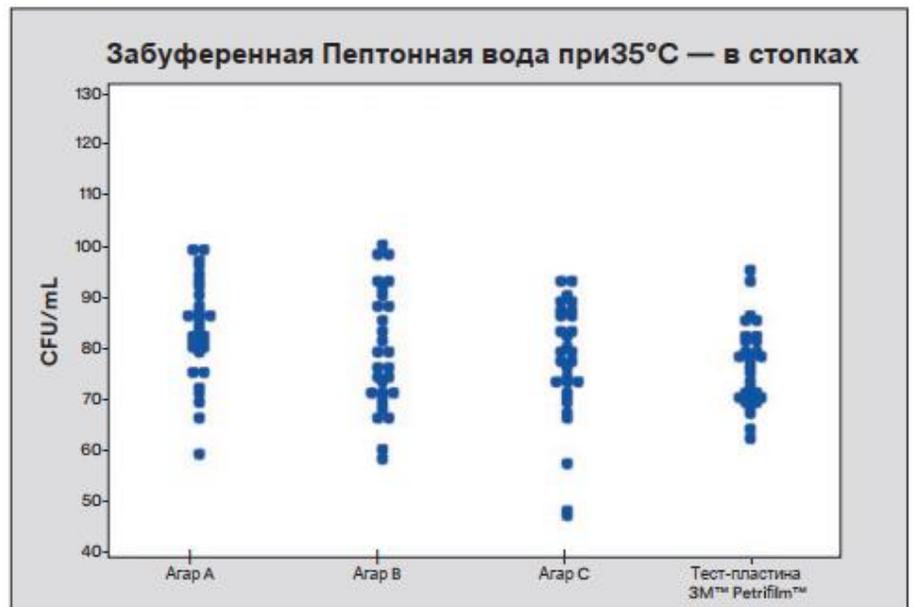


Таблица 2. Статистический анализ методов при использовании чашек с агаром, которые не укладывались в стопки во время нанесения.

Стандартное отклонение — не в стопках			
Среда	Пептонно-солевой буфер при 30°C	Фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда при 32°C	Забуференная Пептонная вода при 35°C
Агар А	11	12*	10
Агар В	15*	11*	15*
Агар С	12	14*	15*
Тест-пластина 3М™ Petrifilm™	10	7	8

Процент коэффициента вариации (%CV) — не в стопках			
Среда	Пептонно-солевой буфер при 30°C	Фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда при 32°C	Забуференная Пептонная вода при 35°C
Агар А	11.46%	14.02%	11.88%
Агар В	15.78%	12.10%	17.73%
Агар С	12.02%	16.98%	17.18%
Тест-пластина 3М™ Petrifilm™	11.15%	9.70%	10.43%

*Статистически значимая разница по сравнению с тест-пластинами 3М™ Petrifilm™

Таблица 3. Статистический анализ методов при использовании чашек с агаром, которые укладывались в стопки во время нанесения.

Стандартное отклонение — в стопках			
Среда	Пептонно-солевой буфер при 30°C	Фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда при 32°C	Забуференная Пептонная вода при 35°C
Агар А	10	10	10
Агар В	18*	14*	12*
Агар С	18*	13*	12*
Тест-пластина 3М™ Petrifilm™	10	7	8

Процент коэффициента вариации (%CV) — в стопках			
Среда	Пептонно-солевой буфер при 30°C	Фосфатно-буферный разбавитель Баттерфилда при 32°C	Забуференная Пептонная вода при 35°C
Агар А	12.23%	12.92%	11.80%
Агар В	21.12%	16.95%	14.69%
Агар С	19.13%	16.02%	15.31%
Тест-пластина 3М™ Petrifilm™	11.15%	9.70%	10.43%

*Статистически значимая разница по сравнению с тест-пластинами 3М™ Petrifilm™

Ссылки

1. USFDA Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3: Aerobic Plate Count. Authors: Larry Maturin and James T. Peeler. January 2001. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
2. USDA Microbiology Laboratory Guidebook, MLG 3.01: Quantitative Analysis of Bacteria in Foods as Sanitary Indicators. Effective Date: 01/20/11. http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/03f8ce1e-b7e7-4257-8047-dcd215d0ae49/MLG_3_01.pdf?MOD=AJPERES
3. Aerobic Plate Count, Murray-Brown Laboratories, Inc., <http://mb-labs.com/resources/aerobic-plate-count/>
4. Stack-Pouring of Petri Plates: A Potential Source of Error, J. of Food Protection, Vol. 43, No. 7, Pages 561–562 (July 1980).
5. 3М™ Petrifilm™ Aerobic Count Plate 6400/6406 Product Instructions. © 3М 2011. 34-8704-9516-4.
6. <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/food-safety-testing-market.asp>



АО «3М Россия»

Отдел «Пищевая безопасность»

Тел.: +7 (800) 250 8474 (звонок бесплатный)

Web: <http://www.3mrussia.ru/foodsafety>

E-mail: foodsafetyrussia@mmm.com

3М, логотип 3М являются зарегистрированными товарными знаками компании «3М Компани».

Авторские права на фотографии, содержание и стиль любой печатной продукции принадлежат компании «3М Компани».

© 3М 2019. Все права защищены.