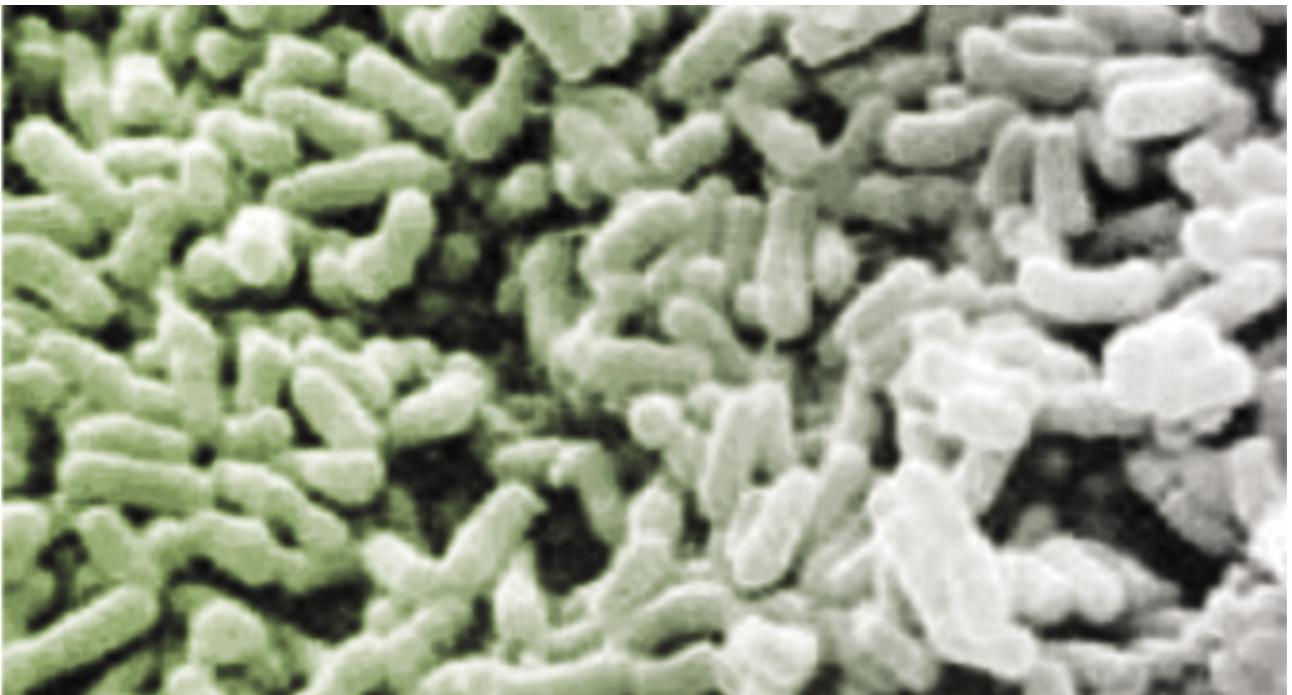


ALP science 2004, Nr. 475

NACHWEIS UND ZÄHLUNG DER PROPIONSÄURE-BAKTERIEN IN ROHMILCH

Technisch-wissenschaftliche Informationen



Inhalt

1. Zusammenfassung	3
2. Experimenteller Teil	3
3. Resultate	5
4. Diskussion	12
5. Anhang	13

ALP science
(vormals FAM Info)

Titelbild

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Propionsäure-Bakterien

Erstveröffentlichung

Autoren

Marc Dalla Torre und Thomas Berger

Herausgeber

Agroscope Liebefeld-Posieux

Eidg. Forschungsanstalt

für Nutztiere und Milchwirtschaft (ALP)

Schwarzenburgstrasse 161

CH-3003 Bern

Telefon +41 (0)31 323 84 18

Fax +41 (0)31 323 82 27

http: www.alp.admin.ch

e-mail: science@alp.admin.ch

Kontakt Rückfragen

Marc Dalla Torre

e-mail marc.dalla-torre@alp.admin.ch

Telefon +41 (0)31 323 82 56

Fax +41 (0)31 322 86 16

Gestaltung

Helena Hemmi (Konzept), Müge Yildirim (Layout)

Erscheinung

Mehrmals jährlich in unregelmässiger Folge

ISBN 3-905667-18-5

ISSN 1660-7856 (online)

NACHWEIS UND ZÄHLUNG DER PROPIONSÄURE- BAKTERIEN IN ROHMILCH

PROFICIENCY TESTING 2003

Ergebnisse der statistischen Auswertung

1. Zusammenfassung

Es nahmen 11 Laboratorien aus 9 Betrieben daran teil. Die Ergebnisse sind deutlich besser als diejenigen vom PT 1995 (R: 1.09 → 0.46 log KBE/mL, r: 0.79 → 0.29 log KBE/mL). Der Schwerpunkt des PT's lag bei der Ermittlung der Vergleichbarkeit R. Das Proficiency Testing (PT) zum Nachweis von Propionsäurebakterien ist erfolgreich verlaufen.

Jedem Labor wurden 5 Milchproben zugestellt, die als Doppelproben zu prüfen waren. Alle teilnehmenden Labors haben ihre Ergebnisse zurückgesandt.

Als gut wurden die Ergebnisse bezeichnet, die nicht mehr als ± 0.30 log KBE/mL vom jeweiligen Log des Mittelwerts (MW) aller Laboratorien abwichen. Mit wenigen Ausnahmen haben sämtliche Labors diesem Kriterium entsprochen. Kein einziges Resultat wurde als Ausreisser identifiziert. Für die Wiederholbarkeit wurde ein Wert von 0.29 log KBE/mL und für die Vergleichbarkeit R ein Wert von 0.46 log KBE/mL ermittelt.

2. Experimenteller Teil

2.1 Ziel und Problemstellung

Erstmals seit 1995 wurde wieder ein PT zum Nachweis und zur Zählung von Propionsäurebakterien durchgeführt.

Ziel des PT's war die Überprüfung der Leistungsfähigkeit der teilnehmenden Labors.

2.2. Teilnehmende Labors

Am Proficiency Testing beteiligten sich 9 Betriebe mit 11 Laboratorien. Die Namen der Laboratorien wurden den Teilnehmern in anonymisierter Form zugestellt.

2.3 Probenmaterial und Vorbereitung

Jedes Labor erhielt 5 Milchproben, gekennzeichnet mit den Nummern 1 bis 5. Die Rohmilchproben wurden mit Propionsäurebakterien gespiked. Jede Probe enthielt eine andere Konzentration. Die Propionsäurebakterien bestanden aus einem Gemisch von Käse- und Kulturenstämmen.

Die Proben mit den Nummern 1 bis 5 wurden so vorbereitet, dass sie etwa nachfolgend aufgeführte Keimzahlen an Propionsäurebakterien enthalten sollten.

Milchprobe 1	ca. 10'000 /mL
Milchprobe 2	ca. 2'000 /mL
Milchprobe 3	ca. 1'000 /mL
Milchprobe 4	ca. 500 /mL
Milchprobe 5	ca. 250 /mL

Die gekühlte Milch (4°C) wurde am Vormittag vor dem Versuchstag mit den entsprechenden Konzentrationen an Propionsäurebakterien inokuliert und anschliessend gründlich durchmischt. Danach wurden ca. 10mL der beimpften Milch in verschraubbare sterile Reagenzgläser pipettiert. Die Probenmenge ermöglichte eine doppelte Untersuchung der Proben.

2.4 Probentransport

Die Zustellung der Versandboxen erfolgte durch die Post. Den Boxen wurden zwei tiefgefrorene Kühlelemente beigegeben und am Vortag des Versuches, um 16 Uhr mittels A-Post verschickt. Sie sind weitgehend rechtzeitig und gekühlt in den verschiedenen Laboratorien eingetroffen.

2.5 Untersuchungsmethoden

Den Laboratorien wurde empfohlen, die Untersuchung nach der FAM-Methode mit Lactat-Agar durchzuführen.

2.6 Statistik

Die Auswertung des Proficiency Testings wurde mit der parametrischen Auswertung (ISO); FAM RINGTEST Version 2.2, Januar 2000, durchgeführt.

2.6.1 Standardabweichung der Wiederholbarkeit (repeatability) s_r

Die Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r ist die mittlere Standardabweichung, die man erhält, wenn eine Probe am gleichen Tag, unter gleichen Bedingungen, **von der gleichen Person** mehrfach bestimmt wird; s_r ist somit ein durchschnittliches Mass für die Streuung, die man in **einem Labor** erhält. Die Standardabweichung s_r kann nur ermittelt werden, wenn eine Probe mindestens 2-fach angesetzt wird (oder 2 Proben mit derselben Keimkonzentration). Sie wird mit zunehmender Anzahl Ansätze sicherer ermittelt. In den meisten Proficiency Testings arbeitet man nur mit Doppelbestimmungen.

Mit dem Ringtestprogramm (COCHRAN-Test) wurde bei der Wiederholbarkeit nach Ausreissern gesucht.

2.6.2 Standardabweichung der Vergleichbarkeit (reproducibility) s_R

Die Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R ist die mittlere Standardabweichung **zwischen** den Laboratorien. Die Bestimmungen können von verschiedenen Personen, mit verschiedenen Geräten und verschiedenen Methoden, in verschiedenen Laboratorien, an unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden. s_R ist somit ein durchschnittliches Mass für die Streuung der Ergebnisse zwischen verschiedenen Laboratorien.

Mit dem Ringtestprogramm wurde nach Ausreissern bei der Vergleichbarkeit (Grubbs-Test) gesucht.

3. Resultate

Die Labors wurden anonymisiert und mit Nummern versehen.

3.1 Verwendete Nährmedien und Inkubationsbedingungen

Labor Nr.	Medium	Inokulation und Inkubation der Petrischalen
1	Casein Peptone von Oxoid L42 Hefeextrakt von Merck 03753	Guss, 5 Tag 30°C
2	Casein Peptone von Merck Hefeextrakt von BBL	Spatel, 10 Tage 30°C
3	Casein Peptone von Merck Hefeextrakt von BBL	Spatel, 10 Tage 30°C
4	Casein Peptone von Merck Hefeextrakt von BBL	Spatel, 10 Tage 30°C
5	Casein Peptone von BD Hefeextrakt von Biolife	Spatel, 10 Tage 30°C
6	Casein Peptone von Merck Hefeextrakt von Merck	Spatel, 10 Tage 30°C
7	Casein Peptone von Biolife Hefeextrakt von Biolife	Spatel, 10 Tage 30°C
8	Casein Peptone von Merck Hefeextrakt von Biolife	Spatel, 10 Tage 30°C
9	Casein Peptone von Merck Hefeextrakt von Merck	Spatel, 10 Tage 30°C
10	Casein Peptone von Biolife Hefeextrakt von Biolife	Guss, 10 Tage 30°C
11	Keine Angaben	Keine Angaben, bzw. 6 Tage 30°C

Tab. 1: Verwendete Medien

3.2 Auswertung

Die Resultate wurden in Anzahl Propionsäurebakterien pro mL (KBE/mL) angegeben. Für die statistischen Berechnungen wurden in der Regel die beiden Werte der Parallelproben, welche aus den Verdünnungen 10^{-2} resultieren, berücksichtigt. Werte zwischen 20–300 Kolonien pro Platte wurden bevorzugt. Wo dies nicht möglich war, wurden auch tiefere Werte in die Berechnungen einbezogen.

Für die Berechnung der Wiederholbarkeit wurden pro Probe mindestens zwei Werte, wenn möglich aus der gleichen Verdünnung, benötigt. Leider haben zwei Labors jeweils nur

ein Resultat pro Probe eingesandt. Hier war es nicht möglich, die korrekte Wiederholbarkeit zu bestimmen. In einzelnen Fällen wo nur ein Wert pro Verdünnung vorlag, wurde, um doch die Wiederholbarkeit r zu ermitteln, noch ein zweiter Wert, aus der nächst höheren oder tieferen Verdünnung mitberücksichtigt. Dieses Vorgehen entspricht allerdings nicht den statistischen Regeln.

Um eine bessere Annäherung an eine Normalverteilung zu erhalten, wurden die Keimzahlen in ihre logarithmische Form transformiert.

3.2.1 Mittelwerte der Doppelproben

Labor Nr.	Mittelwerte log KBE/mL				
	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	3.94	3.36	3.10	2.93	2.48
2	4.16	3.24	3.07	2.78	2.31
3	4.10	3.55	3.12	2.75	2.30
4	4.07	3.36	2.84	2.79	2.31
5	3.60	3.09	2.84	2.54	k.W.
6	3.96	3.41	3.92	2.67	3.17
7 ¹⁾	3.93	3.10	3.06	2.91	2.34
8	3.97	3.28	3.57	2.74	2.43
9 ¹⁾	3.87	3.14	3.01	2.67	2.75
10	3.72	3.35	3.27	2.62	2.23
11	3.95	3.44	3.02	2.78	2.11
MW	3.93	3.30	3.17	2.74	2.44

k.W.: kein Wert

¹⁾nur ein Wert pro Verdünnung

Tab. 2: Ergebnisse der Keimzahlbestimmungen

3.2.2 Standardabweichungen der Doppelproben

Labor Nr.	Standardabweichungen der Doppelproben				
	log KBE/mL				
	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	0.004	0.054	0.025	0.036	0.000
2	0.064	0.088	0.157	0.030	0.045
3	0.025	0.213	0.115	0.065	0.093
4	0.231	0.054	0.337	0.000	0.234
5	0.008	0.195	0.128	0.035	k.W.
6	0.037	0.024	0.044	0.020	0.082
7 ¹⁾	0.127	0.223	0.209	0.069	0.19
8	0.059	0.065	0.746	0.084	0.09
9 ¹⁾	0.189	0.042	0.021	0.046	0.13
10	0.012	0.096	0.017	0.088	0.213
11	0.088	0.088	0.003	0.005	0.095

k.W.: kein verwendbarer Wert

¹⁾Werte aus 2 Verdünnungen

Tab. 3: Standardabweichungen der Doppelproben (log MW)

3.2.3 Abweichungen zum Mittelwert

log KBE					
Labor Nr.	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5
1	0.02	0.03	0.02	0.10	0.15
2	0.23	-0.06	0.07	0.05	-0.03
3	0.17	0.25	0.13	0.02	-0.05
4	0.05	0.06	-0.16	0.05	-0.03
5	-0.33	-0.22	-0.16	-0.19	k.W.
6	0.03	0.11	-0.07	-0.07	-0.17
7	0.01	-0.20	0.00	0.17	0.00
8	0.05	0.02	0.11	0.01	0.08
9	-0.05	-0.16	0.02	-0.07	0.41
10	-0.21	0.04	0.03	-0.12	-0.12
11	0.03	0.14	0.03	0.05	-0.24

k.W.: kein verwendbarer Wert

Tab. 4: Abweichungen des Labormittelwertes vom Gesamtmittelwert

3.3 Toleranzen

Ergebnisse, welche weniger als 0.30 log vom ausreisserbereinigten Mittelwert aller Laboratorien abweichen, gelten als gut. Dasselbe gilt auch für die Streuung (± 0.30 log). Dies entspricht dem Vorgehen von CECALAIT, Poligny (F).



Abmessen der Proben im Labor (Foto: ALP)

3.4 Rankinglist der Laboratorien, Abweichungen zum Mittelwert

Milch 1	
Lab. Nr.	log KBE
7	0.01
1	0.02
11	0.03
6	0.03
8	0.05
4	0.05
9	0.05
3	0.17
10	0.21
2	0.23
5	0.33

Tab. 5

Milch 2	
Lab. Nr.	log KBE
8	0.02
1	0.03
10	0.04
4	0.06
2	0.06
6	0.11
11	0.14
9	0.16
7	0.20
5	0.22
3	0.25

Tab. 6

Milch 3	
Lab. Nr.	log KBE
7	0.00
1	0.02
9	0.02
10	0.03
11	0.03
2	0.07
6	0.07
8	0.11
3	0.13
4	0.16
5	0.16

Tab. 7

Milch 4	
Lab. Nr.	log KBE
8	0.01
3	0.02
11	0.05
2	0.05
4	0.05
6	0.07
9	0.07
1	0.10
10	0.12
7	0.17
5	0.19

Tab. 8

Milch 5	
Lab. Nr.	log KBE
7	0.00
4	0.03
2	0.03
3	0.05
8	0.08
10	0.12
1	0.15
6	0.17
11	0.24
9	0.41

Tab. 9

Milch 1 - 5	
Lab. Nr.	log KBE
8	0.05
1	0.06
4	0.07
7	0.08
2	0.09
6	0.09
11	0.10
10	0.10
3	0.12
9	0.14
5	0.18

Tab. 10

3.5 Eckdaten der Wiederholbarkeit und der Vergleichbarkeit

Eckdaten 2003 (ohne Lab 14) (11 Labors, 5 Milchen) (Werte in log KBE/mL)	Milch 1	Milch 2	Milch 3	Milch 4	Milch 5	Milch 1 – 5 MW
Mittelwert MW	3.93	3.30	3.00	2.74	2.35	
Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r	0.05	0.12	0.16	0.05	0.14	0.10
Wiederholbarkeit r	0.13	0.34	0.44	0.14	0.39	0.29
Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R	0.17	0.17	0.16	0.11	0.21	0.16
Vergleichbarkeit R	0.45	0.48	0.44	0.31	0.59	0.46
Präzision R/r	3.89	1.41	1.00	2.17	1.50	1.99

Tab. 11: Eckdaten der Wiederholbarkeit r und der Vergleichbarkeit R 2003 und 1995

Eckdaten 1995 (13 Labors, 2 Milchen) (Werte in log KBE/mL)	Milch A	Milch B	Milch A+B MW
Mittelwert MW	2.15	1.69	1.92
Standardabweichung der Wiederholbarkeit s_r	0.28	0.27	0.28
Wiederholbarkeit r	0.80	0.77	0.79
Standardabweichung der Vergleichbarkeit s_R	0.41	0.36	0.39
Vergleichbarkeit R	1.16	1.01	1.09
Präzision R/r	1.45	1.31	1.38

Milch 1
Propionsäurebakterien

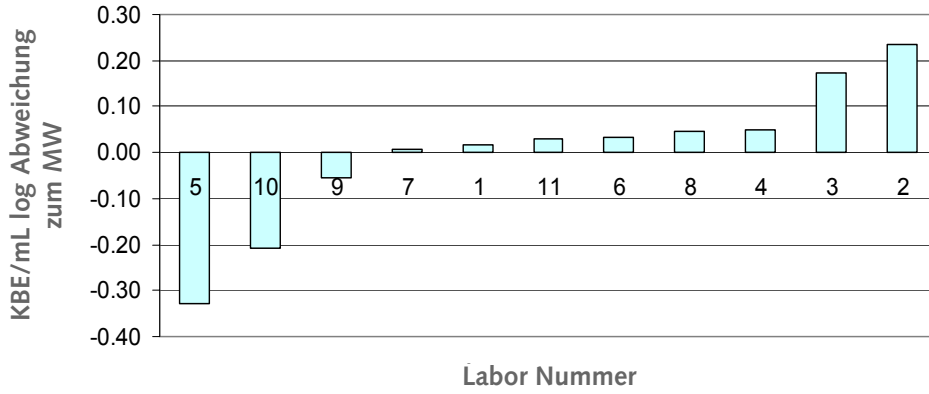


Abb. 1: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 1

Milch 2
Propionsäurebakterien

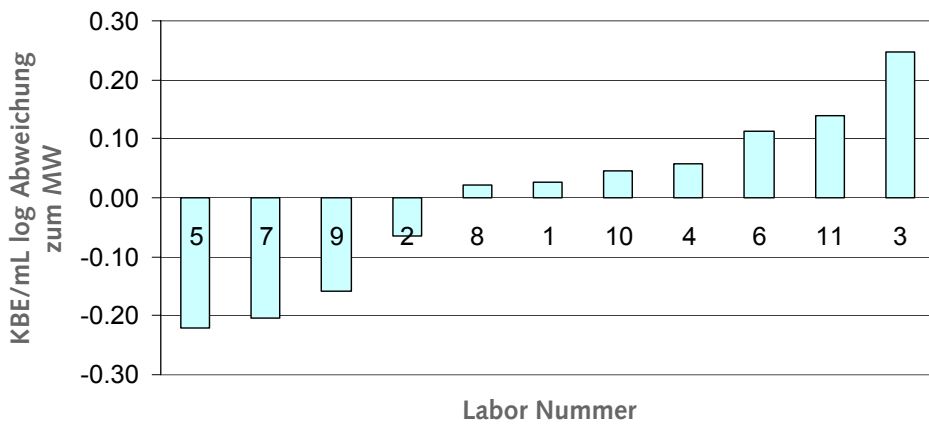


Abb. 2: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 2

Milch 3
Propionsäurebakterien



Abb. 3: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 3

Milch 4
Propionsäurebakterien

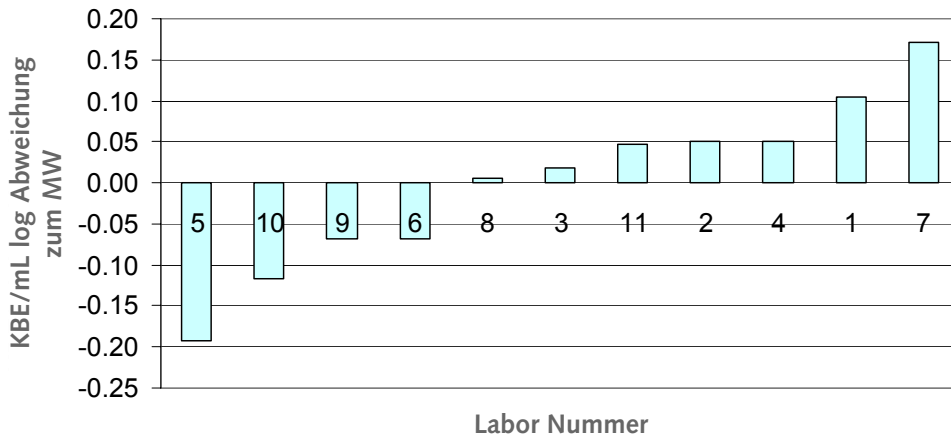


Abb. 4: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 4

Milch 5
Propionsäurebakterien

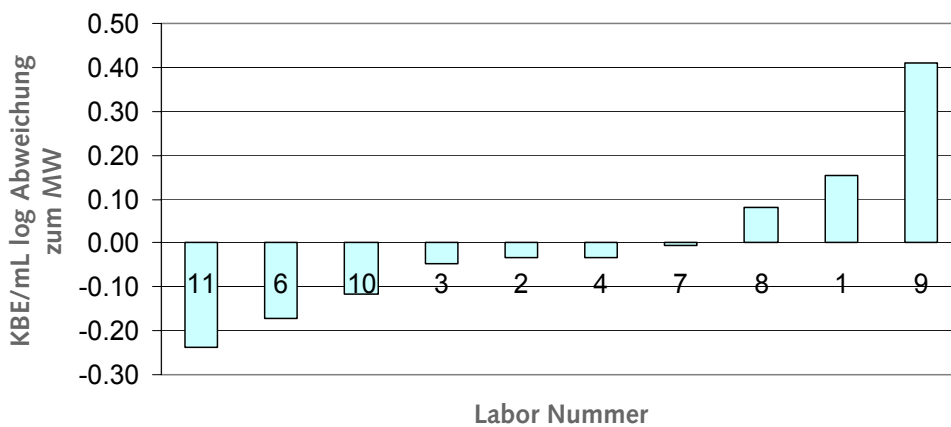


Abb. 5: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 5

Milch 6
Propionsäurebakterien

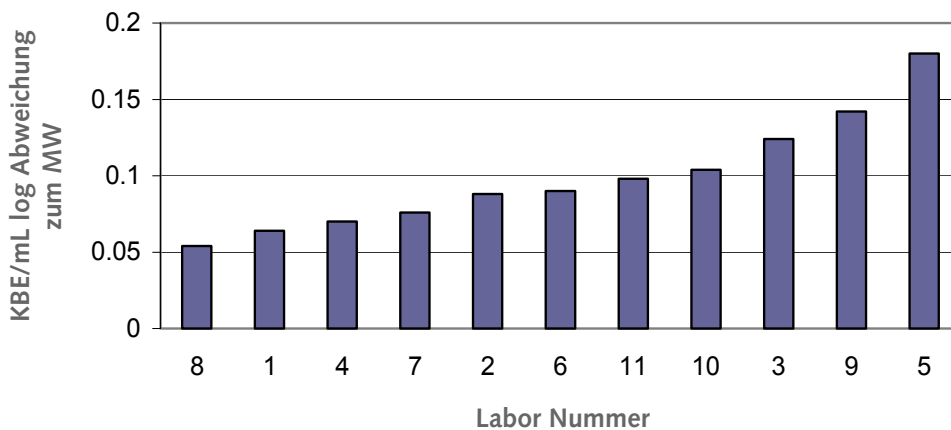


Abb. 6: Graphische Darstellung der Abweichungen zum Mittelwert für Milch 1-5

4. Diskussion

Die Abweichungen der Labormittelwerte zum Gesamtmittelwert sind sehr gering (siehe Tabellen 5 bis 10), die Ergebnisse sind deutlich besser als beim früheren Versuch. Die mittlere Abweichung aller fünf Proben liegt für jedes Labor unter $0.30 \log \text{ KBE/mL}$; ein systematischer Fehler kann ausgeschlossen werden.

- Milch 1** Die Ergebnisse der Laboratorien 1, 6, 7 und 11 liegen sehr nahe am Mittelwert. Am weitesten entfernt liegen die Ergebnisse von Labor 5.
- Milch 2** Die Ergebnisse der Laboratorien 1, 8 und 10 liegen sehr nahe am Mittelwert.
- Milch 3** Die Ergebnisse der Laboratorien 1, 7, 9, 10 und 11 liegen beim oder sehr nahe am Mittelwert.
- Milch 4** Die Ergebnisse der Laboratorien 2, 3, 4, 8 und 11 liegen sehr nahe am Mittelwert.
- Milch 5** Die Ergebnisse der Laboratorien 2, 3, 4 und 7 liegen beim oder sehr nahe am Mittelwert.

5. Anhang

Tabelle 12: Rohdaten (KBE/mL Rohmilch gespiked)

Labor	Milch 1		Milch 2		Milch 3		Milch 4		Milch 5	
	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert
1	8700	8800	2275	2000	1080	990	680	700	330	300
2	13000	16000	1500	2000	1500	900	640	580	190	220
3	13000	12000	2500	5000	1600	1100	510	630	170	230
4	9900	9000	2100	2500	400	1200	610	610	300	140
5	3900	4000	970	1500	560	840	330	370	k.W.	k.W.
6	8500	9600	2700	2500	780	900	480	450	170	130
7 ¹⁾	8600	k.W.	1800	870	1600	610	900	720	300	160
8	10300	8500	1700	2600	1410	1180	630	480	230	310
9 ¹⁾	7400	k.W.	1300	1490	1000	1070	500	430	700	460
10	5300	5100	2600	1900	935	1190	360	480	120	240
11	10400	7800	2400	3200	1060	1050	610	600	110	150

k.W.: kein verwendbarer Wert vorhanden

¹⁾ Werte aus 2 Verdünnungen