

## **Metode pripremanja uzoraka sira za bakteriološku analizu**

Zapaženo je da se rezultati bakteriološkog pregleda životnih namirnica izvršenih u raznim laboratorijama često razlikuju. Ovo se naročito odnosi na određivanje ukupnog broja bakterija. Pored ostalih činilaca koji uslovljavaju pomenute razlike kod bakteriološkog pregleda sira, način pripremanja uzoraka predstavlja jedan od vrlo važnih faktora. U literaturi su opisane razne metode za obradu uzoraka sira pre bakteriološkog pregleda ali uporedna ispitivanja njihovih vrednosti uglavnom nisu vršena. S obzirom na važnost problema, smatramo da bi ovakva ispitivanja bila neophodna naročito sada kada se mnogo piše i govori o bakteriološkim normama za većinu animalnih proizvoda, pa i sira. Zbog toga smo odlučili da istovremenom primenom različitih metoda pripremanja uzoraka utvrdimo u kom slučaju se dobijaju najrealniji rezultati, odnosno najveći broj prisutnih bakterija.

### **Način rada**

Ovim radom obuhvatili smo uglavnom više poznatih metoda pripremanja sira za bakteriološku analizu. Materijal za ispitivanje uzimali smo s više raznih mesta uzorka sira, a zatim smo odmerili potrebnu količinu koja se predviđa svakom metodom.

### **Opis primenjenih metoda**

**1. Metoda po Demeter-u.** Odmeri se 10 gr. sira i 90 ml 1% sterilnog rastvora natrijumcitrata. Odmeren sir se stavi u sterilni tarionik a zatim postepeno dodaje natrijumcitrata zagrejan na 40°C pri čemu se sir tučkom rastrljava da bi se dobila homogena suspenzija. Kada se u toj suspenziji se sterilno prenese u Erlenmajerov sud od 100 ml u koji se preostalom količinom natrijumcitrata ispere tarionik i tučak. Ovako razblaženi sir u odnosu 1:10 služi za pravljenje većih razblaženja za zasejavanje na hranljive podloge u cilju utvrđivanja broja i vrsta prisutnih bakterija.

**2. Metoda po Sahli-u i Löhmann-u:** Na 3 grama sira stavljenog u sterilan i na 45°C zagrejan porcelanski tarionik postepeno se dodaje rastvor koji se sastoji od 2 ml 20% rastvora natrijumcitrata i 24 ml pepton surutke (40—50°C). Od toga se prave veća desetostruka razblaženja od kojih se zasejava po 1 ml u odgovarajuću hranljivu podlogu.

Sastav pepton surutke na jedan litar nekuvanog mleka doda se 15 grama natrijum hlorida, sterilise u autoklavu 1 čas na 105°C. Posle 24 časa se filtrira, filtratu se doda 10 grama peptona i sterilise u autoklavu 10 minuta na istoj temperaturi.

**3. Metoda po Kurmann-u:** Potrebna količina sira se uzima specijalnom sondom (borer) sa više mesta po 1 gr. Autor preporučuje da se uzima sa 3, 6 do 10 mesta jer ukoliko se uzme veća količina smanjuju se greške koje nastaju zbog nehomogene raspodele bakterija u siru. Mi smo kod provera ove metode uzeli 10 gr tj. po 1 gr sa 10 raznih mesta. Kao sredstvo za emulgiranje služi tečnost koja se sastoji od 5 ml 20% rastvora natrijumcitrata u 40 ml fiziološkog rastvora. Sir se prethodno rastrlja u sterilnom tarioniku a zatim

se postepeno dodaje gore navedena tečnost koja je prethodno zagrejane na 40°C. Kada se dobije homogena emulzija sipa se u bocu zapremine 100 ml u kojoj se nalazi 20 staklenih perlica prečnika 4 mm. Perlice potpomažu razbijanju grudvica sira i bolje homogenizovanje mase. Da bi se u tome uspelo boca se drži u vodenom kupatilu na 40°C 15 minuta, s tim da se sadržaj na svakih 4—5 minuta dobro promućka.

4. **Metoda po Hendrickx-u i Vleeschauwer-u:** Odmeri se 1 gram sira u Erlenmajerovu bocu od 300 ml u kojoj se nalazi 80—160 gr staklenih perlica prečnika 3 mm. U bocu se sipa 100 ml sterilne destilovane vode tako da perlice budu potopljene. Homogeniziranje sira vrši se mućkanjem rukom ili mućkalicom. Autori su ustanovili da se homogenizovanje rukom postiže za kraće vreme jer se kod mućkanja mućkalicom pokretanje vrši samo u jednom pravcu, a rukom u svim pravcima. Osim toga dokazano je eksperimentalno kod kojih vrsta sireva i za koji vremenski interval obrade uzorka na opisani način se dobija najveći broj bakterija.

Suspenzije sira dobijene opisanim metodama smo dalje razređivali sterilnom vodom u odnosu 1:10 do 1:10.milion. Iz svakog razređenja zasejavali smo po dve Petrijeve šolje a kod preračunavanja broja bakterija uzimali srednju vrednost. Kao hranljivu podlogu upotrebili smo agar sa surutkom po Demontu i Dornery (3). Inkubiranje smo vršili 4 dana na 30°C.

### Rezultati rada

U našem radu orijentisali smo se na pregled belih sireva, trapista i kačkavalja. Ove vrste sireva izabrali smo zbog toga što se njihova konzistencija razlikuje, pa se normalno moraju očekivati i razlike kod homogenizovanja uzorka u fazi pripremanja za bakteriološki pregled. Ispitivanja smo izvršili kod 12 uzoraka belog sira, 6 kačkavalja i 6 trapista, pri čemu smo primenili navedene metode. Rezultati ovih ispitivanja koji su prikazani u prosečnim vrednostima u tablici 1 jasno pokazuju uticaj načina pripremanja uzoraka za bakteriološki pregled na dobijanje ukupnog broja bakterija. Najveći broj smo uspeli uvek da dokažemo kod primene metode po Kurmann-u.

Tablica 1

Vrsta sira	Br. uzoraka	Broj bakterija u 1 g sira (u hiljadama) pripremljenog:			
		Po Demeter-u	Po Sali-u i Lehmann-u	Po Kurmann-u	Po Hendrickx-u i Vleeschauweru
Beli sir	12	1,400.000	400.000	3,100.000	1,800.000
Kačkavalj	6	80.700	17.000	94.000	78.000
Trapist	6	306.000	82.000	927.000	700.000

Naveli smo da je Hendrickx ukazao na činjenicu da vreme i način mućkanja kod pripremanja uzoraka utiču na broj bakterija u siru. Autor je takođe istakao da to vreme kod svih vrsta sireva nije jednako. Na osnovu toga mi smo želeli da utvrdimo kod primene metode po Kurmann-u za koju smo utvrdili da daje najbolje rezultate, koje je vreme mućkanja potrebno za potpuno homogenizovanje pojedinih vrsta sireva. Takođe smo hteli da utvrdimo

da li su razlike u broju bakterija kod mućkanja rukom i mućkalicom toliko značajne da se moramo odlučiti na mućkanje rukom kako misli Hendrickx. Da bi odredili potrebno vreme i način mehaničkog obrađivanja sira za postizanje potpune homogenizacije uzorka, na svakih 10 minuta sterilnom pipetom zasejavali smo po 1 ml iz suspenzije sira razređene do 1:10 ml. Pri tome smo mućkanje vršili uporedo rukom i mućkalicom. Rezultati ovih ispitivanja su pokazali da se posle mućkanja od 20 minuta dobija najveći broj bakterija kod svih vrsta sireva (tablica 2). Pri dužem mućkanju nastaje opadanje broja bakterija tako da smo posle 60 min. dobijali najmanje vrednosti.

Tablica 2

BROJ BAKTERIJA U 1 g SIRA ZASEJANOM U RAZLIČITIM VREMENSKIM INTERVALIMA (u hiljadama)

Vrsta sira	Način obrade	Vreme mućkanja u minutima				
		10	20	30	40	60
Beli sir	Rukom	920.000	2.100.000	1.050.000	750.000	550.000
	Mućkalicom	790.000	1.450.000	870.000	570.000	350.000
Kačkavalj	Rukom	37.332	185.000	99.280	14.000	11.000
	Mućkalicom	32.766	180.000	97.200	13.000	11.000
Trapist	Rukom	126.000	483.000	312.200	112.000	63.000
	Mućkalicom	98.360	396.000	206.320	92.600	46.200

Iz tablice se takođe vidi da je broj bakterija veći kod mućkanja rukom nego mućkalicom, što se naročito vidi kod obrade belog sira. Pri obradi kačkavalja mućkanjem rukom i mućkalicom razlika u dobijenom broju bakterija nije tako izražena, svakako radi konzistencije sira koji se lakše homogenizuje. Verovatno da je na ovakvu razliku uticala i temperatura od 40°C na kojoj se suspenzija održava u toku mućkanja rukom.

Na osnovu naših oglada smatramo da se najbolji rezultati dobijaju kod primene metode po Kurmannu, pod uslovom da ukupno vreme mućkanja rukom ne prelazi 20 minuta, jer posle toga broj bakterija naglo opada kod svih vrsta sireva.

#### LITERATURA

- Demeter, K. J.: Bakteriologische Untersuchungsmethoden von Milch, Milcherzeugnissen, Molkereihilfsstoffen und Versandmaterial, 2. Aufl. Verlag Urban und Schwarzenbach, Berlin und Wien, 1943.
- Hendrickx und Vleeschauwer: Préparation des échantillons de fromage pour l'analyse bactériologique. Extrait du compte rendu du XXVIIe Congrès International de Chimie Industrielle Bruxelles 11—20 sept. 1954.
- Sahli K. W. und Lehmann W.: Bakteriologisch-chemische Untersuchungen an qualitativ gut bewerteten handels und konsumreifen Export Emmentalerkäsen. Separatabdruck aus der Schweiz Milchzeitung, Schaffhausen, Nr. 10 (Wissenschaftliche Beilage Nr. 64, 1959).
- Kurmann J.: Zur Methodik der quantitativen bakteriologischen Käseuntersuchung »Milchwissenschaft«, 13. 174—177 (1958).