

REDUKTAZNA PROBA U OCENJIVANJU BAKTERIOLOŠKOG STANJA SIROVOG MLEKA

Živojin A. MILOJEVIĆ

Agroekonomski institut Poljoprivredni Kombinat »Beograd«

Kvalitet sirovog mleka uslovljava njegovu tehnološku obradu. Poznato je da pri ocenjivanju kvaliteta sirovog mleka najveću ulogu igra higijenska procena, koja zavisi od tri faktora: uslova proizvodnje, obrade i transporta mleka. Ovo pitanje je zakonski regulisano postavljanjem normi o dozvoljenom broju kontaminenata u sirovom mleku (8). Prema navodima RAŠIĆA (11) ova odredba Pravilnika se retko sprovodi u praksi. Saveznim (9) i republičkim propisima (7) predviđena je reduktazna proba kao jedan od elemenata prilikom ocenjivanja kvaliteta mleka, iako neki tehnički detalji u radu sa njom nisu predviđeni. Za svoje potrebe mlekare koriste reduktaznu probu kao eliminatorni postupak pri ocenjivanju cene sirovog mleka.

S pomoću reduktazne probe se mogu dobiti samo orijentacioni podaci o broju bakterija u sirovom mleku. Pravu sliku o broju bakterija u mleku može samo da pruži brojanje bakterija.

Mlekarskoj industriji je potrebna praktična, dovoljno tačna, jeftina, brza i lako izvodljiva metoda za dokazivanje, tj. određivanje higijenskog kvaliteta sirovog mleka. Reduktazna proba, na osnovu mišljenja većeg broja autora, ispunjava većinu postavljenih uslova. Pitanje je samo da li se ovom metodom dobijaju realni podaci o ukupnom broju bakterija u sirovom mleku.

Cilj ovog rada je da se kod većeg broja uzoraka sirovog mleka uporedo ispita ukupan broj bakterija i reduktazna proba. Ovo iz razloga da bi se mogla dati ocena reduktazne probe kao metode za ocenjivanje higijenskog kvaliteta sirovog mleka.

Materijal i metod rada

Sirovo mleko za ispitivanje uzimali smo sa prijemne rampe mlekare Poljoprivrednog Kombinata »Beograd«, po slučajnom izboru. Mleko je uzimano u sterilne posude shodno postojećim propisima za bakteriološko ispitivanje, a uzorci mleka su poticali sa više gazdinstava Kombinata »Beograd«, kao i od kooperanata.

U sirovom mleku reduktazna proba je ispitivana s pomoću standardnih tableta metilenskog plavila, proizvedenih u Engleskoj (Standards Methylene blue Tablets, British Drug Houses LTD Laboratory Chemical Division, skraćeno BDH). Rastvor metilenskog plavila i samo izvođenje probe vršeno je prema uputstvu, datom od strane proizvođača. Posle dodavanja reagensa uzorci su držani u vodenom kupatilu na 37°C, dok je procena vršena svakih 15 minuta. Kraj reakcije označava potpuni gubitak boje u uzorku (obezbojenje metilenskog plavila) izraženo u najmanje dve trećine sadržaja epruvete. idući od dna prema vrhu epruvete.

Ukupan broj bakterija u sirovom mleku određivan je direktnom i indirektnom metodom. Direktna ili mikroskopska metoda zasniva se na brojanju bakterija u mleku. Primenili smo postupak po BREED-u, po kome se broj bakterija u 1 ml. mleka dobija množenjem tri vrednosti (srednjeg broja ustanovljenih bakterija u jednom vidnom polju, količine mleka uzete za ispitivanje, ol ml., i broja vidnih polja na površini jednog sm^2).

Na bakteriološkoj podlozi indirektno smo određivali ukupan broj bakterija u sirovom mleku. »Hranjivi agar S« (proizvod Instituta za imunologiju i virusologiju »Torlak«) je upotrebljen za ova ispitivanja. Izrada iste vršena je prema uputstvu datom od strane proizvođača (12). Ukupan broj bakterija u 1 ml. mleka određen indirektnim putem dobija se množenjem dveju vrednosti (broja kolonija na podlozi i upotrebljenog razređenja mleka).

Ispitivanja izneta u ovom radu obavljena su u god. 1973.

Rezultati rada i diskusija

Ispitivanjima su obuhvaćena 174 uzorka sirovog mleka. BARTHEL i ORLA-JENSEN su ustanovili izvesnu vezu između broja bakterija u sirovom mleku i vremena redukcije metilenskog plavila kod reduktazne probe. Na osnovu svojih ispitivanja sirovo mleko su podelili u četiri klase, kao što je izneto u tabeli 1.

Tabela 1

Klasiranje mleka po BARTHEL i ORLA-JENSEN-u

| Klasa | Kvalitet | Vreme redukcije metilenskog plavila | Broj bakterija u 1 ml. |
|-------|---------------|-------------------------------------|------------------------|
| I | Vrlo dobar | 5 1/2 časa | < 500.000 |
| II | Dobar | 2—5 1/2 časa | 500.000—4.000.000 |
| III | Srednji | 20 minuta — 2 časa | 4.000.000—20.000.000 |
| IV | Loš, jako loš | do 20 minuta | > 20.000.000 |

Ispitivani uzorci sirovih mleka su prema reduktaznoj probi pokazali sledeće: u I klasu je bilo 19 uzoraka mleka (10,9%), u II 112 (64,4%), u III 29 (16,7%), i u IV klasu 14 uzoraka sirovih mleka (8,0%).

Ustanovljene su i razlike u rezultatima o ukupnom broju bakterija u mleku dobijenih direktnom i indirektnom metodom. Tako se s pomoću direktne metode dobijaju vrednosti koje su u proseku za 30,6% veće od vrednosti koje se dobijaju indirektnim putem. Objašnjenje leži u činjenici da se mikroskopskim određivanjem bakterija u mleku registruju svi prisutni mikroorganizmi u mleku, bez obzira na njihovu vitalnost (»total count«), dok se indirektnim određivanjem broja bakterija u mleku ustanovljava broj samo biološki aktivnih mikroorganizama, sposobnih da se razmnožavaju i da stvaraju kolonije, tj. samo broj živih bakterija (»viable count«). Zbog toga smo u daljem radu uzimali u obzir samo rezultate dobijene za ukupan broj bakterija u mleku primenom indirektno metode.

Na osnovu rezultata o ukupnom broju bakterija, a prema tabeli BARTHEL i ORLA-JENSEN-a, ispitivani uzorci mleka pripadali su pojedinim klasama i to: I klasi mleka 33 uzorka (18,96%), II 97 (55,75%), III 35 (20,12%) i IV klasi mleka 9 uzoraka (5,17%).

Tabela 2

Klasiranje sirovog mleka na osnovu broja bakterija i slaganje sa reduktaznom probom

| Klasa mleka | Broj bakterija | Reduktazna proba i broj bakterija u mleku | | | |
|-------------|----------------|---|--------|------------------|-------|
| | | N | Isti % | Razlikuju se N+— | + — % |
| I | 33 | 10 | 30,30 | 23 | 69,70 |
| II | 97 | 70 | 72,16 | 27 | 27,84 |
| III | 35 | 12 | 34,29 | 23 | 65,71 |
| IV | 9 | 5 | 55,56 | 4 | 44,44 |
| Svega | 174 | 97 | 55,75 | 77 | 44,25 |

U tabeli 2 se vidi da su se rezultati, dobijeni za reduktaznu probu slagali sa rezultatima ukupnog broja bakterija kod 97 uzoraka mleka ili u 55,75% slučajeva. Najveće slaganje rezultata ovih dveju metoda je bilo u II klasi mleka (70 uzoraka ili 72,16%), a najmanje kod mleka I klase (10 uzoraka ili 30,30%).

Poređenja radi iznećemo podatke ispitivanja drugih autora. Upoređujući rezultate dobijene za ukupan broj bakterija sa rezultatima reduktazne probe kod 174 uzorka sirovih mleka, RANISAVLJEVIĆ (10) je ustanovio da se ove dve metode slažu kod 78 uzoraka mleka ili 45,45%. Po klasama je bilo: u I klasi 70,6%, u II klasi 28,0%, u III klasi 57,6% i u IV klasi 56,0% i u IV klasi 56,0% slučajeva.

Mikrofloru u ispitivanim uzorcima sirovog mleka smo razvrstali u dve grupe na osnovu: a) izgleda kolonija, b) fermenta katalaze i c) mikroskopskog posmatranja. U prvoj grupi su se nalazile bakterije mlečne kiseline (streptokoke su bile pretežno zastupljene), dok su svi ostali mikroorganizmi svrstani u drugu grupu, gde su ustanovljeni približni brojni odnosi između mikrokoka i gram negativnih štapića, dok je nalaz gram pozitivnih štapića bio neznan.

Prema ukupnom broju bakterija u pojedinim uzorcima mleka, bakterije mlečne kiseline su predstavljale 15—100% celokupnu mikrofloru, sa srednjom vrednošću od 72,63%. Druga grupa bakterija u proseku je bila zastupljena u svim ispitivanim uzorcima u 27,37%.

BUSSE (3,4) je ustanovio da u mleku koje sadrži 1,000.000 bakterija/ml., su pojedine grupe mikroorganizama približno zastupljene u sledećem odnosu: mlečno kiselinske streptokoke od 50 do 95%, koliformne bakterije u 10%, mikrokoke u 10%, korinebakterije u 10% i sporogeni aerobni i anaerobni štapići u 10%. Tokom inkubiranja mleka pojedine vrste mikroorganizama se različito razmnožavaju, tako da se mlečno kiselinske streptokoke i koliformne bakterije najbrže razmnožavaju, mikrokoke imaju usporen rast, dok se korinebakterije uopšte ne razmnožavaju.

HAMMER (5) iznosi iskustvo do kojeg je HOBBS-ova došla proučavajući redukcionu moć pojedinih vrsta bakterija. Ona je ustanovila da bakterije koliformne grupe i *Streptococcus lactis* brzo redukuju metilensko plavilo, fekalne streptokoke nešto sporije, dok je redukciona sposobnost prema metilenskom plavilu kod drugih vrsta mikroorganizama bila slabije izražena.

Proučavajući redukcionu sposobnost metilenskog plavila kod pojedinih vrsta bakterija RANISAVLJEVIĆ (10) je ustanovio da najjače redukciono delovanje ispoljavaju gram negativni štapići, a nešto slabiju moć imaju mikrokokke. Zaključak do koga je došao na osnovu ispitivanja je bio da je brzina reduktazne probe zavisna od sastava mikroflore i redukcionih sposobnosti pojedinih vrsta mikroorganizama koji se u mleku nalaze.

BROGMUS (2) zastupa isto gledište, tj. da je redukcija metilenskog plavila uslovljena inicijalnim brojem bakterija u mleku i redukcijom moći pojedinih vrsta bakterija.

Na osnovu naših ispitivanja ustanovljeno je slaganje reduktazne probe sa ukupnim brojem bakterija u mleku u nešto više od polovine ispitanih uzoraka (u 55,74% slučajeva). To je u saglasnosti sa nalazima KÄSTLY-a (6) i BAUMGARTEL-a (1), a takode i sa njihovim primedbama da se rezultati dobijeni reduktaznom probom ne podudaraju uvek sa rezultatima dobijenim za ukupan broj bakterija u mleku.

Iz napred uzetog proizlazi da je reduktazna proba izgubila svoj prvobitni smisao, tj. da se putem reduktazne probe može sa puno osnova odrediti i ukupan broj bakterija u sirovom mleku.

ZAKLJUČAK

Kod 174 zbirnih uzoraka sirovih mleka uporedo su ispitivane dve vrednosti: reduktazna proba i ukupan broj bakterija. Reduktazna proba je izvedena s pomoću tableta metilenskog plavila engleske proizvodnje (British Drug Houses LTD Laboratory Chemical Division, skraćeno BDH). Rezultati reduktazne probe i ukupnog broja bakterija slagali su se kod 97 uzoraka mleka ili u 55,75% slučajevima. To slaganje kod pojedinih klasa mleka (klasiranje vršeno prema podeli BARTHEL i ORLA-JENSEN-a) je bilo sledeće: u I klasi mleka kod 10 uzoraka (30,30%), u II kod 70 (72,16%), u III kod 12 (34,29%) i u IV klasi mleka kod 5 uzoraka ili u 55,56% slučajeva.

Reduktazna proba se koristi kao jedan od elemenata u ocenjivanju kvaliteta sirovog mleka (svežina i trajnost mleka). Međutim, reduktazna proba ne daje pravu i tačnu sliku o broju bakterija u sirovom mleku.

Literatura

1. BAUMGARTEL T. (1927): Bemerkungen zur Reduktaseprobe. *Sudd. Mol. Zeit. Zg. Ig.*, 48, 38, 1118—1120, Ref. Bd. 5,3—4,69
2. BROGMUS H. (1950): Über die Beeinflussung der Reduktaseprobe in Milch durch besondere Bakterienarten bei Anwendung der Methylenblauprobe der Janusgrünprobe der Resazurinprobe und Resazurinatziumprobe. *Inaug. Dissert. Hannover*
3. BUSSE M. (1960): Über die Reduktionsprobe zur Qualitätsbestimmung von Milch. I Mitteilung *Zeitsch. für Lebensmittel. Unter. und Forsch.*, 113, Bd. 64, H. 6,455—462