

UPOREDNA ISPITIVANJA NEKIH HRANLJIVIH PODLOGA ZA IZOLOVANJE KOLIFORMNIH BAKTERIJA IZ MLEKA

Višeslava MILJKOVIĆ i P. PEČIĆ

Katedra za higijenu i tehnologiju mleka Veterinarskog fakulteta u Beogradu

Broj koliformnih bakterija u mleku zavisi od higijenskih uslova proizvodnje i obrade mleka. Zbog toga se dokazivanje koliformnih bakterija primenjuju za kontrolu higijenske ispravnosti mleka. Danas se u praksi koriste razne metode za određivanje broja koliformnih bakterija u mleku. Zapaženo je da se broj koliformnih bakterija utvrđen različitim metodama u istom uzorku vrlo često ne slaže. Postoji više razloga ovoj pojavi, a jedan od tih može da bude i razlika u sastavu upotrebljenih podloga. Da bi utvrdili u kojoj meri hranljive podloge utiču na broj koliformnih bakterija u mleku, odlučili smo da uporedo ispitamo nekoliko čvrstih podloga koje se najčešće pri ispitivanju mleka upotrebljavaju.

S obzirom da je naš Pravilnik o bakteriološkim uslovima kojima moraju odgovarati namirnice u prometu propisivao Endo agar i agar sa dezoksiholacitratom i laktozom (DES) za dokazivanje *E. coli* u namirnicama, obadve podloge su uključene u ova ispitivanja. Pored njih odabrali smo i agar sa violetcrvenim i žuči (VCŽ) predložen od Međunarodne mlekarske federacije za standardnu podlogu pri ispitivanju koliformnih bakterija u sirovom mleku i agar sa briljantzelenim, fenolcrvenim i laktozom (BZFC) koji se u SR Nemačkoj od strane Komisije za donošenje metoda za ispitivanje mleka i mlečnih proizvoda (3) predlaže za standardnu podlogu.

NAČIN RADA

Ispitivanje podloga je urađeno na dva načina i to:

1. Uporodnim zasejavanjem čistih kultura *E. coli* na svim odabranim selektivnim podlogama i na garu koji je uzet za kontrolu;
2. Uporodnim zasejavanjem mleka koje sadrži koliformne bakterije na svim selektivnim podlogama. Agar u ova ispitivanja nije bio uključen jer na njemu iz mleka rastu i druge bakterije, što bi ometalo prosuđivanje nalaza koliformnih bakterija.

Za ispitivanje podloga zasejavanjem kultura *E. coli* uzeli smo tri soja *E. coli* koje smo označili rednim brojevima od 1 do 3. Svežu bujonsku kulturu smo razblažili fiziološkim rastvorom natrijumhlorida u odnosu $1:10^{-6}$ jer smo pri zasejavanju 0,1 ml iz tog razblaženja dobijali oko 100 kolonija na jednoj Petrijevoj šolji. Sve odabrane podloge smo zasejali na isti način po 10 puta. držali ih u termostatu 24 časa na 37°C i posle toga odredili broj kolonija. Statističkom obradom rezultata ocenili smo značajnost razlika u broju izraslih kolonija i na osnovu toga procenili uticaj podloge na rastenje koliformnih bakterija na odabranim selektivnim podlogama.

U drugom delu ispitivanja uzeli smo 42 uzorka mleka i svaki razblažili fiziološkim rastvorom natrijumhlorida u odnosu $1:10^{-2}$ do $1:10^{-6}$ i zasejavali po 0,1 ml na sve selektivne podloge. Posle inkubacije od 24 časa na 37°C odredili smo broj kolonija izraslih na pojedinim podlogama i na osnovu toga

utvrdili broj koliformnih bakterija u pojedinim uzorcima mleka dobijen na raznim podlogama. Iz svih uzoraka smo izračunali srednji broj koliformnih bakterija i usporedili dobijene vrednosti.

Pored ovih ispitivanja čiji rezultati nisu mogli statistički da se obrade zbog velikih međusobnih razlika, uzeli smo 12 uzoraka mleka sa približnim brojem koliformnih bakterija i zasejali ih na isti način kao kod prethodne grupe uzoraka. Rezultati su statistički obrađeni i ocenjene razlike, na osnovu kojih je prosuđivana svaka podloga pojedinačno. Najzad smo uzeli 6 uzoraka mleka i svaki zasejali 10 puta na isti način na sve selektivne podloge. Dobijeni broj kolonija je statistički obrađen.

REZULTATI I DISKUSIJA

Rezultati ispitivanja prikazani su u nekoliko tablica iz kojih se vide razlike u broju kolonija koliformnih bakterija izraslih na odabranim podlogama iz kulture i uzoraka mleka.

U tablici 1 dat je srednji broj kolonija izraslih na pojedinim podlogama pri zasejavanju soja *E. coli* 1. U istoj tablici je dat procenat izraslih kolonija u poređenju sa agarom za koji smo uzeli da na njemu izrastaju sve bakterije iz materijala koji se zasejava.

Tablica 1

Srednja vrednost broja i procenta kolonija *E. coli* 1 na pojedinim podlogama

	Podloga				
	Agar	Endo	DES	BZFC	VCŽ
<i>E. coli</i> 1	131,2	129	118	136	124
	100%	98,3%	89,9%	103,6%	95,2%

Analizom varijanse rezultata prikazanog u tablici 1 ustanovili smo da između ispitivanih podloga ne postoji statistički značajna razlika u broju izraslih kolonija (tablica 2), iako se srednji broj kolonija međusobno razlikuje.

Tablica 2

Analiza varijanse rasta *E. coli* 1 na podlogama

	Zbir kvadrata	St. sl.	Sredina kvadrata	F	odnos
Međugrupna tretiranja	2416,4	4	604,1	F = 1,2	
Unutargrupna greška	21866,6	45	485,9	F ₉₅ = (4,45)	2,58
Opšta greška	24283	49			

Legenda: St. sl. = stepen slobode

U tablici 3 je dat srednji broj kolonija pri ispitivanju sojeva *E. coli* 2 i 3.

Tablica 3

Srednja vrednost broja i procenta kolonija E. coli 2 i 3 na pojedinim podlogama

	Podloga				
	Agar	Endo	DES	BZFC	VCŽ
E. coli 2	162 100 ⁰ / ₀	124 76,5 ⁰ / ₀	129 79,6 ⁰ / ₀	156 96,2 ⁰ / ₀	143 88,2 ⁰ / ₀
E coli 3	120 100 ⁰ / ₀	98 81,7 ⁰ / ₀	103 85,8 ⁰ / ₀	114,2 95,1 ⁰ / ₀	106,4 88,6 ⁰ / ₀

Analiza varijanse rasta E. coli na pojedinim podlogama pri ovim ispitivanjima takođe nije pokazala statistički značajne razlike, pa ih stoga ovde nećemo posebno iznositi kao što je učinjeno za soj br. 1.

Prikazani rezultati pokazuju da sve upotrebljene podloge pružaju dobre uslove za rast E. coli.

Rezultati ispitivanja mleka su pokazali da je srednja vrednost broja izraslih kolonija iz svih uzoraka najveća na Endo agaru a najmanja na VCŽ agaru, što se vidi iz tablice 4.

Tablica 4

Srednji broj kolonija iz 42 uzorka na pojedinim podlogama

Vrsta podloge	Endo	DES	BZFC	VCŽ
Srednji broj	85	60,1	79,2	57,3

S obzirom da su razlike u broju kolonija dobijenih iz pojedinih uzoraka bile velike, statistička obrada nije mogla da se izvrši. Stoga smo kao što je već napred rečeno uzeli 12 uzoraka koji su imali približan broj koliformnih bakterija i samim tim činile skup uzoraka sa približno homogenim podacima. Srednja vrednost broja izraslih kolonija iz ovih uzoraka data je u tablici 5, a analiza varijanse broja izraslih kolonija u tablici 6.

Tablica 5

Srednja vrednost kolonija iz razblaženja uzoraka 10⁻⁵

Broj uzoraka	Podloga			
	Endo	DES	BZFC	VCŽ
12	52	27,5	41,4	26,4

Tablica 6

Analiza varijanse broja kolonija izraslih iz mleka

	Zbir kvadrata	St. sl.	Sredina kvadrata	F—odnos
Međugrupna tretiranja	5542,1	3	1847,36	F = 26,9 ^{xx}
Unutargrupna greška	2487,3	36	69,09	F ₉₅ = (3,36 - = 8,59
Opšta greška	8029,4	39		

S obzirom da smo analizom varijanse utvrdili statistički značajnu razliku između pojedinih podloga, obradili smo je s pomoću Tukey testa. (Tablica 7).

Tablica 7

Analiza rasta koliformnih bakterija iz mleka na osnovu Tukey testa

	D = QS	Q = 3,81	D = 3,81.2,62	D ₉₅ = 9,98
Podloga	Srednji broj kolonija	x = 26,4	x = 27,5	x = 41,4
Endo	52	25,6 ^x	24,5 ^x	10,6 ^x
BZFC	41,4	15 ^x	13,9 ^x	--
DES	27,5	1,1	—	
VCŽ	26,4	—		

Iz iznetih rezultata dobijenih ispitivanjem mleka vidi se da koliformne bakterije rastu u najmanjem broju na VCŽ agaru i da samo između ove podloge i DES agara nema statistički značajne razlike u broju izraslih kolonija. Ostale podloge se međusobno razlikuju.

Rezultati dobijeni ispitivanjem mleka zasejanog 10 puta na isti način prikazani su u tablici 8.

Tablica 8

Srednja vrednost broja kolonija iz mleka zasejanog u 10 ponavljanja

	Podloga			
	Endo	DES	BZFC	VCŽ
Mleko	68	49	54,6	44,4

Analizom varijanse ovih podataka koja je prikazana u tablici 9 utvrđena je statistički značajna razlika i ona je iskazana prema Tukey testu (tablica 10) iz kojeg se vidi da jedino između Endo agara i ostale tri podloge postoji značajna razlika, dok se ove tri podloge međusobno ne razlikuju u broju izraslih kolonija.

Tablica 9

Analiza varijanse za 10 ponovljenih zasejavanja mleka

	Zbir kvadrata	St. sl.	Sredina kvadrata	F = odnos
Međugrupna tretiranja	3135,2	3	1045,06	F = 11,7 ^x
Unutargrupna greška	3216,8	36	89,3	F ₉₅ = (3,36) = 8,59
Opšta greška	6352	39		

Tablica 10

Analiza rasta koliformnih bakterija iz mleka na selektivnim podlogama na osnovu Tukey testa

	D = QS	D = 3,81 . 3,9		D ₉₅ = 11,04
Podloga	Srednji broj kolonija	$\bar{x} = 44,4$	$\bar{x} = 49$	$\bar{x} = 54,6$
Endo	68	23,6 ^x	19,0 ^x	13,4 ^x
BZFC	54,6	10,2	5,6	—
DES	49	4,6	—	—
VCŽ	44,4	—	—	—

Pošto smo dokazali da na Endo agaru raste veći broj kolonija nego na ostalim podlogama, biohemijski smo ispitivali kolonije sa svih odabranih selektivnih podloga. Pri tome smo utvrdili da na Endo agaru pored koliformnih bakterija rastu grampozitivni štapići i streptokoke, dok na ostalim podlogama rastu samo koliformne bakterije. Ovakvi rezultati pokazuju da Endo agar nije dovoljno selektivan za koliformne bakterije. Biohemijska ispitivanja kolonija sa Endo agara su dalje pokazala da E. coli samo u 27,4% slučajeva raste u vidu crvenih kolonija sa metalnim sjajem, koje se prema mnogim navodima u literaturi smatraju karakterističnim za E. coli, a da u najvećem broju slučajeva raste u vidu ružičastih i sluzavih kolonija. Ponekad kolonije E. coli imaju sasvim svetloružičastu boju, pa izgledaju kao da potiču od laktoza negativnih bakterija, što nastaje zbog proteolize koju E. coli izaziva u Endo agaru. Biohemijska ispitivanja kolonija sa Endo agara su pokazala da i druge koliformne bakterije rastu slično kao E. coli. Iz toga proizlazi da izgled kolonija E. coli na Endo agaru nije karakterističan i da odabiranje crvenih kolonija sa metalnim sjajem u cilju dokaza E. coli, kako je to bilo propisano Pravilnikom o bakteriološkim uslovima kojima moraju odgovarati namirnice u prometu, ne pruža sigurnost da će se E. coli pronaći u ispitivanoj namirnici.

Pored navedenih nedostataka Endo agara za dokazivanje koliformnih bakterija u mleku, zapazili smo da na njemu često dolazi do spajanja kolonija što onemogućava brojanje kolonija i izolovanje pojedinih kolonija u cilju dalje identifikacije. Iz svega izloženog može se zaključiti da je Endo agar nepodesan za dokazivanje koliformnih bakterija u mleku i da ga pri propisivanju metoda za ispitivanje mleka svakako treba izostaviti.

Upoređivanjem svih odabranih selektivnih podloga za ispitivanje koliformnih bakterija u mleku, utvrdili smo da najveći broj koliformnih bakterija raste na agaru sa briljantzelenim fenolcrvenim i laktosom. Na ovoj podlozi ne rastu druge bakterije što znači da je selektivan za koliformne bakterije. Na osnovu ovako postignutih rezultata mišljenja smo da bi slična ispitivanja trebalo da se izvrše i u drugim laboratorijama, pa tek pošto se na takav način utvrdi koja je podloga najpodesnija za dokazivanje koliformnih bakterija u mleku da se da predlog za donošenje propisane metodike. Ovo bi trebalo da bude način rada pri donošenju svih obaveznih metoda za pregled namirnica.

ZAKLJUČAK

Uporednim ispitivanjem selektivnih podloga za dokazivanje koliformnih bakterija u mleku utvrdili smo:

1. da na Endo agaru pored koliformnih bakterija rastu i druge bakterije, što pokazuje da nije dovoljno selektivan za koliformne bakterije;

2. da na Endo agaru *E. coli* samo u 27,4% slučajeva raste u vidu crvenih kolonija sa metalnim sjajem. U najvećem broju slučajeva kolonije *E. coli* na Endo agaru su ružičaste boje i sluzave. Druge koliformne bakterije pokazuju na Endo agaru isti rast kao *E. coli*;

3. najpodesnija podloga za dokazivanje koliformnih bakterija u mleku je agar sa briljantzelenim fenolcrvenim i laktosom, jer na njemu raste najveći broj koliformnih bakterija iz mleka, a ne rastu druge bakterije;

4. pri donošenju propisa za metode ispitivanja namirnica treba prethodno izvršiti uporedna ispitivanja više metoda i to u više laboratorija, pa tek na osnovu dobijenih rezultata davati predloge za propisivanje metoda. Stoga bi i rezultate dobijene u ovom radu trebalo proveriti u drugim laboratorijama i na osnovu toga predložiti metodiku za dokazivanje koliformnih bakterija u mleku.

Literatura

1. Ciblis, E., Schwarz, S: (1960): Kieler milchwirtschaft. Forsch. Ber. 12, 109.
2. Lechner, G. (1966): Diss. Vergleichende Studien über mikrobiologische Normen bei Anlieferungsmilch sowie erhitzter und roher Trinkmilch, Hannover.
3. Methodenkommission. Milchwiss. 3, 120, 1960. Die mikrobiologischen Methoden für die Untersuchung von Milch und Milcherzeugnissen.
4. Thatcher, F. S. (1968): Microorganisms in foods, Toronto.
5. Vullers, A. (1955): Zbl. f. Bakt. 163, 85.