

METODE MIKROBIOLOŠKE ANALIZE KRATKOTRAJNO STERILIZIRANIH PROIZVODA

Marin CINDRIĆ, dipl. inž., RO »KIM«, Karlovac

Uvod

U naslovu ove teme postoji prividni paradoks, pa odmah treba reći da se radi o bakteriološkoj analizi nesterilnih pakovanja kratkotrajno steriliziranog mlijeka, dakle onih, u kojima je došlo do umnožavanja bakterija, a s time i do kvarenja proizvoda.

Problemi bakteriologije kratkotrajno steriliziranog mlijeka kod kojeg nije došlo do povećanja broja bakterija, odnosno problemi letalnog i subletalnog oštećenja bakterijskih stanica su svakako vrlo interesantni i znanstveno važni, ali za praktične svrhe svakodnevne proizvodnje je bitno poznavanje bakteriologije kontaminiranih paketića.

Cilj i svrha bakteriološke analize je u ovom slučaju određivanje uzroka nesterilnosti.

Bakteriologija bi naime morala dati premise koje dovode do konačnog zaključka o uzroku ili uzrocima nesterilnosti. Rezultat bakteriološke analize mora biti slika uzroka nesterilnosti, a metode da se to postigne tako koncipirane da u najmanjem broju zahvata daju željeni rezultat.

Podjela nesterilnosti

Nesterilnost se u praksi može klasificirati na više različitih načina.

Prema izvoru i načinu kontaminacije razlikuju se dvije grupe nesterilnosti:

1. Bakterije su ušle u pakovanje zajedno s mlijekom tokom samog punjenja,
2. Bakterije su prodrle u pakovanje iz vanjske sredine kroz nehermetički zatvoren paketić.

Prema tome da li je nesterilnost zahvatila cijelu proizvodnju ili samo dio, možemo razlikovati opću i djelomičnu nesterilnost.

Na temelju učestalosti, odnosno rasporeda nesterilnih paketa u šarži razlikujemo prema B. von Bockelmann-u (1)

1. konstantnu, 2. uzlaznu, 3. silaznu i 4. sporadičnu nesterilnost.

Odmah možemo reći da se nećemo baviti onom nesterilnošću koja je nastala prodorom bakterija u prethodno aseptički napunjen i zatvoren paketić.

Takvi problemi se rješavaju pomoću defektoskopije iako je bakteriološka analiza takvih paketa vrlo poučna i korisna.

Primarna nesterilnost

Pokušat ćemo nešto više reći o prvom tipu nesterilnosti a to je ona kod koje su bakterije ušle sa proizvodom ili materijalom za pakovanje u kasnije besprijeckorno zatvoreno pakovanje.

Putevi i mjesta preko kojih bakterije mogu prodrijeti u sistem za sterilizaciju i punjenje mlijeka su različiti i mnogobrojni.

To je prije svega uređaj za sterilizaciju sa homogenizatorom, cjevovodi od sterilizatora od punilice, hladnjak i napokon sama punilica.

Svaki od ovih dijelova sistema za sterilizaciju i punjenje ima naravno niz potencijalnih ulaza za mikroorganizme.

Da bi se rezultati bakteriološke analize doveli u vezu sa dijelom sistema odgovornim za nesterilnost, potrebno je vrlo dobro poznavati sve važne tehničke karakteristike sistema. Za to je potrebno određeno iskustvo.

Bez takvog pristupa ostaje bakteriološka analiza usamljena i neiskorištena, pa konačna svrha neće biti postignuta.

Bakteriološka analiza

Naša praktična iskustva stečena na nesterilnim proizvodnjama nam govore da je dobro ako se postupuje po određenom rasporedu.

Ovaj rad nema pretenziju da propisuje sheme po kojima se obavezno mora raditi. Želi se samo ukazati na neke mogućnosti koje stoje na raspolaganju pri pokušaju rješavanja slučajeva nesterilnosti.

Svaki konkretni, pojedini slučaj traži odgovarajući pristup, a metode bakteriološke analize su samo sredstvo da se što prije dođe do cilja.

To, da li će se izvesti sve ovdje opisane analize, pa i sam način izvođenja, zavisit će od stručnjaka koji vodi postupak, odnosno od realnih potreba.

Metode

1. Pripremiti obojeni mikroskopski preparat

Mikroskop je prvo sredstvo pomoću kojega možemo stupiti u kontakt s mikroorganizmima koji su uzrokovali naše probleme.

On nam može reći i puno i malo, ovisno o tome sa kakvim mikroskopom raspoložemo i koliko poznajemo tehniku bojenja i mikroskopiranja. Iako se radovi o tome objavljuju od otkrića mikroskopa, dobar istraživač će pogledom kroz mikroskop steći važna saznanja o uzročniku kontaminacije.

Razne tehnike diferencijalnog bojenja, te fazno kontrastna mikroskopija će dati odgovor na pitanje o morfološkim karakteristikama bakterija, o eventualnoj prisutnosti spora, te o tome da li se radi o monokulturi ili o više različitih vrsta.

Definitivni odgovor na pitanje da li se radi o monokulturi ili o više različitih vrsta bakterija daje čitav niz ostalih testova pomoću kojih se determiniraju bakterije.

Za praktične svrhe je dovoljan mikroskopski preparat i morfologija kolonija na čvrstoj podlozi.

Nadalje, preparat daje prvi uvid u gustoću populacije što je važno za slijedeće zahvate što su npr. određivanje broja potrebnih razrjeđenja i izolacija čistih kultura.

2. Napraviti niz razrjeđenja osnovnog uzorka

Razrjeđenja su potrebna da bi se pomoću njih odredio ukupan broj živih bakterija metodom brojenja na čvrstoj podlozi, te za izolaciju čistih kultura bakterija.

Iz gustoće populacije mikroskopskog preparata može se zaključiti koliko razrjeđenja treba pripremiti da bi se »uhvatio« broj kolonija između 30 i 300 na jednoj ploči koje se broje za rezultat.

3. Odrediti broj živih bakterija po standardnoj metodi brojenja na čvrstoj podlozi

Sama metoda je dobro poznata, pa o tome ne bi trebalo posebno govoriti. Treba međutim, upozoriti na činjenicu da pojava anaerobnih bakterija nije isključena iako se rijetko dešava.

Zbog toga treba biti pažljiv pri interpretaciji rezultata eksperimenata, pogotovo ako mikroskopski preparat stoji u suprotnosti sa pokusom na pločama, tj. ako se na mikroskopskom preparatu originalnog uzorka vidi veliki broj bakterija, a na pločama ih nema ili je rast vrlo slab. Zbog toga bi bilo dobro barem jednu ploču ostaviti na inkubaciji pod anaerobnim uvjetima.

4. Odrediti ukupan broj živih bakterija metodom razmazivanja 0,1 ml svakog razrjeđenja

Tom metodom se postiže jasan uvid u morfologiju kolonije svih prisutnih aerobnih bakterija što može biti također važan podatak za stvaranje kompletne slike o kontaminaciji, naročito ako se kontinuirano prati mikrobiološka situacija u pogonu, tj. mikroflora zraka i površina koje su u kontaktu s materijalom za pakovanje, te mikroflora sirovina.

5. Izolirati čiste kulture bakterija metodom naciepljivanja na čvrstim podlogama

Za izolaciju čistih kultura bakterija koristi se jedno od niza razrjeđenja. Mikroskopski preparat originalnog uzorka daje orijentaciju koje razrjeđenje treba naciepiti. Treba voditi računa i o tome da je gustoća populacije u epruveti sa fiziološkom otopinom takva da su kolonije kada porastu na čvrstoj podlozi u Petrijevoj zdjelici lijepo razvijene, ali da se zbog premalog broja bakterijskih stanica ne dogodi da se koja vrsta izgubi.

To je jednostavan pokus, a može služiti kao informacija ili kao baza za daljnji rad.

6. Izvesti pokus na termorezistenciju

Pokus na termorezistenciju se provodi sa originalnim materijalom ili sa izoliranim kulturama. Eksperiment se izvodi na dvije temperaturne razine, odnosno pri uvjetima $80^{\circ}\text{C}/10'$ i $100^{\circ}\text{C}/10'$.

Tako saznajemo da li se radi o termolabilnim ili termorezistentnim sporama.

To nam pruža dragocjene podatke pod uvjetom da poznamo tehničke karakteristike pogonskog uređaja za sterilizaciju i punjenje.

Sam pokus se izvodi tako da se po 1 ml sadržine kontaminiranog pakovanja prenese u sterilnim uvjetima u dvije epruvete sa po 9 ml sterilne fiziološke otopine.

Jedna epruveta se zatim stavi u vodenu kupelj zagrijanu na 80°C , a druga u kupelj sa 100°C .

Nakon 10 minuta se zagrijavanje prekine. Nešto materijala iz svake epruvete se prenese pomoću mikrobiološke ušice na Petrijeve ploče s čvrstom podlogom, te stavi na inkubaciju.

Dobro je ako se radi sa podlogama koje stimuliraju germinaciju, odnosno rast spora.

7. Diferencijalna bojenja

a) Bojenje po Gram-u

Na biološkom materijalu dobivenom u raznim fazama rada mogu se izvršiti razni testovi u svrhu pobliže determinacije prisutnih bakterija.

Svakako treba izvesti bojenje po Gram-u. Pri tome se mora obratiti pažnja na pojavu Gram varijabilnosti kod nekih Gram pozitivnih bakterija.

Zbog toga se bojenje vrši na svježim kulturama starim između 12 i 24 sata, a u bakteriološkom laboratoriju bi trebalo imati svježije test kulture Gram pozitivnih bakterija.

Postoje i jednostavnije metode za razlikovanje Gram pozitivnih od Gram negativnih bakterija. Jednu od tih daju H. Kleberger i M. Busse (2).

To je postupak s kalijevom lužinom. S tim postupkom nemamo iskustva.

b) Bojenje po Ziehl-Neelsen u

Ova tehnika diferencijalnog bojenja spora je jednostavnija i tu uglavnom nema problema.

Na preparatu obojenom na ovaj način vidi se oblik i veličina, te smještaj spore unutar bakterijske stanice.

Daljnji rad na određivanju svojstava bakterija u smislu bliže determinacije, zavisi o opremljenosti laboratorija i afinitetima mikrobiologa. To može dati vrijedne podatke o mikroflori i o uzrocima nesterilnosti, ali treba voditi računa o tome da se ne gubi vrijeme koje je ponekad vrlo dragocjeno i da je granica do koje treba ići određena krajnjom svrhom ispitivanja.

8. Odrediti intenzitet kontaminacije po paletama

Veoma je važno znati kada je nesterilnost započela, da li prema kraju šarže ostaje konstantna, da li raste, pada ili se pak javlja sporadično.

To se postiže određivanjem broja nesterilnih pakovanja u svakoj paleti.

Ovakav posao zna po svom obimu biti veoma velik, ali se dogodi i to da se može procijeniti samim pogledom na niz paleta u šarži.

Primjer iz prakse

U jednom primjeru nesterilne proizvodnje raspored jačine kontaminacije unutar proizvodnje lijepo se vidio kada su sve palete poredane jedna do druge onim redom kojim su proizvedene.

Uzročnici kontaminacije su bile bakterije koje velikom brzinom fermentiraju laktozu stvarajući kiselinu i plin. To je uzrokovalo brzo pucaanje paketa.

Što je više paketića u jednoj paleti eksplodiralo, to se ona više slijegala i bivala niža.

Prva paleta u nizu je imala svoju punu visinu, a posljednja jedva četrdeset centimetara.

Očito je da je posljednja paleta bila najjače kontaminirana i da je kontaminacija postepeno rasla prema kraju proizvodnje.

U ovom slučaju su najvažniji podaci o uzroku nesterilnosti bili tip bakterija koje su uzrokovale kontaminaciju i raspored, odnosno stupanj kontaminacije unutar proizvodnje.

Na kakve se sve probleme u praksi može naići neka nam posluži primjer jedne nesterilne proizvodnje »brika«.

Pri redovnoj laboratorijskoj kontroli pronađeni su nesterilni uzorci vrlo neugodnog mirisa. Prije otvaranja se na pakovanjima nisu mogli primijetiti nikakvi vanjski znakovi kvarenja.

Kiselost se kretala od pH = 5,4 do pH = 6,25. Mikroskopska slika je pokazala da se radi o mješovitoj kulturi u kojoj su dominirale kratke, debele, štapičaste i kuglaste bakterije.

Na ploče je naciyepljen osnovni materijal, a odmah je napravljen i pokus na termorezistenciju.

U oba slučaja se nakon 48 sati inkubacije pri 30°C pokazao rast jedva zamjetljiv prostim okom.

Očito se radilo o anaerobnim bakterijama. U uzorcima koji su naknadno uzeti iz skladišta pronađene su bakterije karakterističnog kijačastog oblika, sa terminalno smještenim sporama, dakle radilo se o klostridijama.

U takvom slučaju je sa standardnom opremom, predviđenom za uzgoj aerobnih bakterija, bilo dosta teško stvoriti određenu sliku o kontaminaciji.

Odlučujuće činjenice su međutim, bile da se radi o sporogenim, dijelom termorezistentnim i anaerobnim bakterijama.

Posredna iskustva

Dragocjena iskustva sa nesterilnošću su stečena i nizom eksperimenata u kojima su »zdrava« pakovanja naciyepljena aseptički pomoću sterilne injekcije igle sa različitim biološkim materijalom.

Prije inkubacije je površina paketa premazana alkoholom koji je zatim zapaljen i opaljena plamenikom.

Otvor od injekcije igle je zatvoren gorućim pečatnim voskom.

Pakovanja su stavljena na inkubaciju i kasnije otvorena, te analizirana kemijski i bakteriološki.

Biološki materijal, kojim su naciyepljeni paketi, je dobiven izolacijom mikroflora iz zraka, bakterija s površine stroja za punjenje na kojima dolazi do kontakta sa materijalom za punjenje, iz lokvice vode u pogonu, te sa bakterijama izoliranim iz sirovine.

Određen broj takvih pokusa je izveden i sa čistim kulturama bakterija.

Autori koji se bave ovom problematikom opisuju detaljnije vezu mikroflora koja je uzrokovala kontaminaciju proizvoda i izvora kontaminacije odnosno dijela sistema preko kojega su bakterije prodrle u proizvod (1), (2), (3) i (4).

Treba međutim naglasiti da su svi ti primjeri vrlo dobri sa edukativnog stajališta, ali u svakom konkretnom slučaju je najvažnije sakupiti što više mjerodavnih podataka, a onda ih na temelju iskustva i zdravog razuma analizirati i pokušati riješiti problem.

Literatura

1. B. VON BOCKELMANN (1976): Quality control of long-life milk, **The World Galaxy** 6, 48—53.
2. KLEBERGER A., BUSSE M. (1979): Die bakteriologische Kontrolle von H Milch, **Deutsche Milchwirtschaft** 37, 1337—1342.
3. BUSSE M. (1975): Mikrobiologische Aspekte der H-Milch-Herstellung, **Deutsche Milchwirtschaft** 50, 1800—1802.
4. VÖGELE P. (1980): Mikrobiologische Kontrolle der H-Milch, **Die Molkerei-Zeitung Welt der Milch** 22, 582—590.