

# UTICAJ RAZNIH FAKTORA NA ODREĐIVANJE BROJA BAKTERIJA U MLEKU \*

Višeslava MILJKOVIĆ i Lazar STOJANOVIĆ  
Veterinarski fakultet, Beograd

## Sadržaj

Ispitivan je uticaj raznih spoljnih faktora na određivanje broja bakterija u mleku. Ustanovljeno je da podloga predviđena domaćim propisima nije podesna za određivanje broja bakterija u mleku jer na njoj izrasta znatno manji broj bakterija nego na podlogama koje se u iste svrhe koriste u drugim zemljama. Najveći broj bakterija izrasta na podlozi predloženoj od strane Međunarodne mlekarske federacije (F. I. L.) i podlozi predviđenoj američkim standardnim metodama za ispitivanje mleka.

Međunarodna mlekarska federacija predlaže više načina za pripremu mleka za zasejavanje. Ukoliko se pripremanje vrši tačno prema tim uputstvima nema značajnih razlika u broju bakterija u mleku pripremljenom po različitim postupcima. Naši propisi nedovoljno preciziraju postupak pripreme uzorka za zasejavanje pa bi to trebalo učiniti.

Razlika u temperaturi inkubiranja zasejanih podloga na 30°C i 35°C ne uslovljava značajne razlike u dobijenom broju bakterija.

Razlike u rezultatima ispitivanja raznih laboratorija izvedenim na istim uzorcima, mogu se izbeći striktnim pridržavanjem metodike u radu, jer je dokazano da razlika u rezultatima brojanja bakterija u mleku izvršenom od strane dva stručnjaka na istim uzorcima nije bila značajna.

Broj bakterija u mleku, određen na istim uzorcima pod različitim uslovima, često se međusobno razlikuje. Uzrok tome su neki faktori spoljne sredine od kojih su najbitniji: način uzimanja i dopremanja uzoraka na analizu, priprema uzoraka za ispitivanje u laboratoriji, način zasejavanja, vrsta upotrebijene podloge, vreme i temperatura inkubiranja zasejanih Petrijevih šolja, način brojanja izraslih kolonija i individualne razlike u radu pojedinih stručnjaka. Prema Kellermann-u (7), Keller-u (6) i Brandl-u (2), poreklo pojedinih

\* Referat sa IX Seminara za mljekarsku industriju, veljača 1971, Tehnološki fakultet, Zagreb.

sastojaka u podlozi (pepton, šećer), način sterilizacije i pH podloge utiču na broj izraslih kolonija. Frank i Buchmayer (4) su ispitivanjem uticaja agara različitog porekla u sastavu standard laktoza agara utvrdili da nema značajnih razlika u dobijenim rezultatima. Povećanje koncentracije kina plavog u istoj podlozi od 375 mg do 800 mg/l prema Brandl-u takođe ne izaziva značajne razlike.

Grupa stručnjaka koja se u SR Nemačkoj bavila ispitivanjem uticaja faktora na broj bakterija u mleku ustanovila je da je na optimalnoj podlozi vreme inkubacije od dva dana dovoljno za porast svih kolonija. Rast bakterija posle ovog termina zapaža se samo kod upotrebe nepodesnih podloga, pa je to uzrok zahteva izvesnih stručnjaka da se vreme inkubiranja produži (Kellerman).

Prema ispitivanjima grupe stručnjaka Nacionalnog centra za naučna ispitivanja u Parizu broj bakterija u mleku dobijen na oficijelnoj francuskoj i standardnoj američkoj podlozi je ekvivalentan (3).

U cilju dobijanja što približnijih rezultata ispitivanja mleka i drugih životnih namirnica, u većini zemalja se propisuje način bakterioloških analiza. Određivanje broja bakterija u mleku, definisano našim propisima u »Pravilniku o bakteriološkim uslovima kojima moraju da odgovaraju životne namirnice u prometu« razlikuje se od mnogih metoda u svetu, a prvenstveno od postupka predviđenog od strane Međunarodne mlekarske federacije (F. I. L.). Osnovna razlika je u hranljivoj podlozi. Način pripremanja uzoraka, pravljenje razblaženja, zasejavanje, temperatura i vreme inkubiranja zasejanih podloga takođe se međusobno razlikuju u pojedinim propisima.

Da bi utvrdili u kolikoj meri razlike u metodici rada utiču na određivanje broja bakterija u mleku na hranljivim podlogama, odlučili smo da ispitamo neke faktore za koje smo smatrali da bi mogli da imaju veći uticaj na rezultat rada. Obuhvatili smo određivanje uticaja podloge, načina pripreme razblaženja, temperature inkubacije, razlike pri zasejavanju u dva paralelna niza kao i uticaj rada pojedinih stručnjaka na dobijeni broj bakterija.

### Materijal i metode rada

Mleko za ispitivanje je dobijeno od Gradskog mlekarstva u Beogradu ili je uzeto iz prometa u Beogradu. Uzorke smo podelili u 4 grupe. Prvu je činilo sirovo mleko s malim brojem bakterija (u 1 ml mleka), drugu sirovo mleko s velikim brojem bakterija, treću pasterizovano s malim brojem bakterija i četvrtu pasterizovano s velikim brojem bakterija. U svim uzorcima pre ispitivanja vršeno je dokazivanje fosfataze. Neposredno pre ispitivanja mleko je zagrejano na 20°C i dobro izmešano.

Od podloga koje su uporedno ispitivane odabrali smo sledeće:

1. standard laktoza agar (9) (u daljem tekstu označena s brojem 1)
2. standardnu podlogu koju preporučuje FIL (5) (označena s brojem 2)
3. američku standardu (1) (označena s brojem 3)
4. agar za određivanje ukupnog broja bakterija predviđen domaćim propisima (10), (označena s brojem 4).

Sve podloge su pripremane u laboratoriji našeg instituta a zasejavanja su uporedno vršila uvek dva ista lica pod istim uslovima. Tako je stvorena mogućnost za realno procenjivanje uticaja rada različitih lica na rezultat ispitivanja.

Pripremanje i zasejavanje uzoraka vršili smo prema standardu FIL-a na dva načina:

1. dodavanjem 1 ml mleka u 9 ml razblaženog Ringerovog rastvora;
2. dodavanjem 10 ml mleka u 90 ml razblaženog Ringerovog rastvora.

Razblaženi Ringerov rastvor se pravi prema međunarodnom standardu s destilovanom vodom u odnosu 1:3.

Za razblaženje 1:10, koje se priprema prvim postupkom, sipa se u epruvete pre sterilizacije razblaženi Ringerov rastvor toliko da posle sterilizacije ostane 9 ml. Prema uputstvu u navedenom standardu ovu količinu treba empirijski odrediti, pa smo to prethodno učinili i utvrdili da pre sterilizacije treba sipati u epruvete 9,2 ml. Pri uzimanju mleka za razblaženje 1:10 vrh pipete se zaroni u mleko za 1—2 cm, usisa do oznake 1 ml i prenese u epruvetu sa 9 ml razblaženog Ringerovog rastvora, gde se pusti da lagano iskaplje, ne dotičući nivo Ringerovog rastvora. Tečnost iz epruvete se zatim usisa do oznake 1 ml i pusti da iskaplje. Ovo se ponovi 10 puta, pa se novom sterilnom pipetom prenese 1 ml u sledećih 9 ml Ringerovog rastvora da bi se pripremilo razblaženje 1:100. Dalji postupak je isti kao u prethodnom razblaženju. Sva ostala razblaženja spremaju se na isti način. Za zasejavanje po drugom postupku prethodno se razlije razblaženi Ringerov rastvor u bočice od 150 ml toliko da posle sterilizacije ostane 90 ml. Empirijski određena količina pre sterilizacije iznosila je 92 ml. Za pripremanje razblaženja 1:10 uzme se sterilnom pipetom 10 ml mleka i prenese u bočicu sa 90 ml rastvora. Bočica se dobro zatvori gumenim zatvaračem pa se zatim 25 puta okrene radi ravnomernog mešanja sadržaja. Za svako novo razblaženje uzima se 10 ml prethodnog i postupak ponovi kao kod pripreme prvog razblaženja.

Zasejavanje Petrijevih šolja se vrši uzimanjem 1 ml iz svakog razblaženja koji se prenese u Petrijevu šolju pri čemu se vrh napunjene pipete drži na oko 1 sm iznad dna Petrijeve šolje. Zatim se sadržaj izduva, pusti 3 sekunde da isteče, vrh pipete stavi na suvo mesto Petrijeve šolje i poslednje kapi izduvaju. Zasejavanje pojedinačnih razblaženja vrši se posebnim sterilnim pipetama. Na odmerenu količinu razblaženja u Petrijevoj šolji, sipa se 10 ml otopljene podloge čija temperatura ne sme da bude veća od 45°C. Neposredno posle razlivanja podloge sadržaj u Petrijevoj šolji se izmeša kretanjem Petrijeve šolje pet puta u pravo ravni, zatim pet puta kružnim pokretima u pravcu kazaljke na časovniku, pet puta u pravo ravni koja je pod pravim uglom prema prvobitno odabranom pravcu i najzad pet puta kružnim okretanjem suprotno od pravca kretanja kazaljke na časovniku. Ovako zasejane Petrijeve šolje inkubirali smo na 30°C i 35°C 48 časova. Za brojanje odabrali smo one čiji se broj kolonija nalazio između 30 i 500.

### Rezultati i diskusija

Pri prosuđivanju uticaja pojedinih faktora na broj bakterija u mleku uzimali smo srednje vrednosti dobijenog broja kolonija odnosno bakterija kao merilo za međusobno upoređivanje. Pored toga analizom varijensa statistički smo obradili dobijene podatke u svim slučajevima gde je broj bakterija u mleku bio približan, tj. gde je brojna homogenost izraslih kolonija dozvoljavala stati-

stičku obradu. Upoređivanjem pojedinačnih i srednjih vrednosti broja bakterija dobijenih na 4 podloge zapažaju se razlike (Tablica 1). Najveći broj kolonija izrasta na podlozi 2 i 3 a najmanji na podlozi 4. Analizom varijanse utvrđene su značajne razlike među pojedinim podlogama. Kod pasterizovanog mleka s velikim brojem bakterija statistički nije utvrđena razlika jer je broj bakterija u pojedinim uzorcima mnogo odstupao od srednje vrednosti pa statistička obrada nije mogućna.

Tablica 1

SREDNJE VREDNOSTI BROJA BAKTERIJA NA RAZNIM PODLOGAMA

Vrsta mleka	Vrsta podloge				Statistička ocena
	1	2	3	4	
sirovo mleko s malim brojem bakterija u .0000/ml	131	143,1	115,62	65,5	vrlo značajna
sirovo mleko s velikim brojem bakterija u .000.000/l ml	148,2	150,62	173,0	43,87	vrlo značajna
pasterizovano mleko s malim brojem bakterija u .000/l ml	110,8	284,5	253,7	81,1	vrlo značajna
pasterizovano mleko s velikim brojem bakterija u .0000/l ml	565,7	1023,2	844,5	518,5	nije značajna

Kod upoređivanja srednjih vrednosti na osnovu Tukey testa utvrđena je razlika između podloge 2 i podloge 1 i 4. Isto tako ovaj test pokazuje značajne razlike i između podloge 3 i podloge 1 i 4, dok između podloge 2 i 3 nema značajnih razlika (Tablica 2).

Tablica 2

POJEDINAČNO OCENJIVANJE RAZLIKE BROJA BAKTERIJA NA PODLOGAMA

$D_{0,01} = 190,08$        $K = 4$   
 $D_{0,05} = 142,0$        $StSl = 28$

Podloge	$\bar{x}$	$\bar{x} - 81,1$	$\bar{x} - 110,8$	$\bar{x} - 253,7$
2.	284,5	203,4**	173,7*	30,8
3.	253,7	172,6*	142,9*	—
1.	110,8	29,5	—	—
4.	81,1	—	—	—

Na osnovu ovako dobijenih rezultata se vidi da podloge 2 i 3 kod određivanja broja bakterija u mleku imaju sličnu vrednost. Podloga 4 daje osetno manji broj izraslih kolonija, a zapaža se i visoka signifikantnost u razlici između nje i podloge 2 i 3 u svim slučajevima a u odnosu na podlogu 1 u većem broju slučajeva.

Prí određivanju uticaja načina pripreme razblaženja uzoraka ustanovili smo da se srednje vrednosti dobijenih bakterija na dva opisana načina među-

sobno razlikuju. Iz tablice 2 se vidi da se kod pripreme razblaženja u epruvetama dobija veći broj kolonija na hranljivoj podlozi, međutim statističkim testiranjem dobijenih rezultata nisu ustanovljene značajne razlike.

Tablica 3

SREDNJE VREDNOSTI BROJA BAKTERIJA DOBIJENE KOD RAZLIČITE  
PRIPREME RAZBLAŽENJA UZORAKA

Vrsta mleka	Epruvete	Bočice	Statistička ocena razlike
sirovo mleko s malim brojem bakterija u .0000 / 1 ml	87,16	76,66	nije značajna
sirovo mleko s velikim brojem bakterija u .000.000 / 1 ml	145,25	119,58	nije značajna
pasterizovano mleko s malim brojem bakterija u 000 / 1 ml	320,6	248,7	nije značajna
pasterizovano mleko s velikim brojem bakterija u .0000 / 1 ml	844,5	687	nije značajna

Srednje vrednosti broja bakterija dobijene na temperaturi od 30 i 35°C pokazuju male razlike, pa je to i statističkom obradom potvrđeno.

Tablica 4

SREDNJE VREDNOSTI BROJA BAKTERIJA DOBIJENE  
NA RAZNIM TEMPERATURAMA

Vrsta mleka	30°C	35°C	Statistička ocena razlike
sirovo mleko s malim brojem bakterija u .0000 / 1 ml	69	87,16	nije značajna
sirovo mleko s velikim brojem bakterija u .000.000 / 1 ml	119,58	137,08	nije značajna
pasterizovano mleko s malim brojem bakterija u 000 / 1 ml	248,5	248,7	nije značajna
pasterizovano mleko s velikim brojem bakterija u .0000 / 1 ml	611,1	687,0	nije značajna

Broj bakterija u ispitivanim uzorcima dobijen odvojenim radom dvaju stručnjaka kao i kod paralelnog zasejavanja u dva niza ne pokazuje veće razlike (Tablice 5 i 6). Statističkom analizom ova razlika je takođe ocenjena kao neznčajna.

Tablica 5

**SREDNJE VREDNOSTI BROJA BAKTERIJA DOBIJENE RADOM  
DVAJU STRUČNJAKA**

Vrsta mleka			Statistička ocena razlike
	I	II	
sirovo mleko s malim brojem bakterija u .0000 / 1 ml	81,16	93,16	nije značajna
sirovo mleko s velikim brojem bakterija u .000.000 / 1 ml	123,16	167,33	nije značajna
pasterizovano mleko s malim brojem bakte- rija u 000 / 1 ml	361,33	393,66	nije značajna
pasterizovano mleko s velikim brojem bak- terija u .0000 / 1 ml	963,25	725,74	nije značajna

Tablica 6

**SREDNJE VREDNOSTI BROJA BAKTERIJA DOBIJENE ZASEJAVANJEM  
U DVA PARALELNA NIZA**

Vrsta mleka			Statistička ocena razlike
	I	II	
sirovo mleko s malim brojem bakterija u .0000 / 1 ml	82,66	91,66	nije značajna
sirovo mleko s velikim brojem bakterija u .000.000 / 1 ml	127,66	143,33	nije značajna
pasterizovano mleko s malim brojem bakte- rija u 000 / 1 ml	270,25	237,25	nije značajna
pasterizovano mleko s velikim brojem bak- terija u .0000 / 1 ml	836,5	832,5	nije značajna

Dobijeni rezultati jasno pokazuju da podloga predviđena našim propisima nije podesna za određivanje broja bakterija u mleku. Istovremeno se vidi da način pripreme uzorka za zasejavanje ne uslovljava značajne razlike u broju bakterija mleka, ukoliko se pripremanje izvrši tačno prema uputstvu Međunarodne mlekarske federacije. U našim propisima priprema uzorka nije dovoljno precizirana, pa bi to trebalo učiniti.

Činjenica da u radu dvaju stručnjaka, kao i kod zasejavanja u dva niza, nisu utvrđene značajne razlike, ukazuje da se pridržavanjem uputstava u radu razlike u rezultatima mogu svesti na najmanju meru. Stoga smatramo da zasejavanje u dva niza tj. dve ili tri Petrijeve šolje iz istog razblaženja nije neophodno iako FIL takav postupak predlaže u cilju povećavanja tačnosti rezultata.

## Zaključak

1. Pri određivanju broja bakterija u mleku najbolje rezultate daju podloge predviđene od strane Međunarodne mlekarske federacije i američkim standardnim metodama;

2. podloga predviđena našim propisima za određivanje broja bakterija u mleku pokazuje značajnu razliku prema ostalim podlogama, jer na njoj izrasta znatno manji broj bakterija, pa stoga nije podesna za određivanje broja bakterija u mleku;

3. način pripreme razblaženja mleka za zasejavanje i razlike u temperaturi inkubiranja između 30 i 35°C ne uslovljavaju značajne razlike kod određivanja broja bakterija;

4. zasejavanje u dva niza tj. po dve Petrijeve šolje iz istog razblaženja nije neophodno, jer razlike u broju bakterija kod paralelnih nizova nisu bile značajne;

5. tačnim pridržavanjem uputstava u radu mogu se izbeći razlike koje nastaju pri ispitivanjima u raznim laboratorijama.

## Literatura

1. American public health association, 1967, New York. Standard methods for the examination of dairy products.
2. Brandl E., Sobeck Skal (1963.): Milchwissenschaftl. Berichte Wien 13/1.
3. Centre national de la recherche scientifique Paris 1961. Technique de détection et de dénombrement des microorganismes du lait.
4. Frank Hanns, F. Buchmayer (1961.): Milchwissenschaft 16, 6.
5. Internationaler Standard FIL/IDF/IMV 3, 1958. Bestimmung des Keimgehaltes von flüssiger und getrockneter Milch. Milchwissenschaft 16, 12, 1961.
6. Keller W. (1966.): F. B. N. Milchstandard 8 (4).
7. Kellermann R. (1964.): Milchwissenschaft 19, 3.
8. Schönherr W. (1965.): Tierärztliche Milchuntersuchung, Leipzig.
9. Schönberg F. (1956.): Milchkunde und Milchhygiene, Hannover.
10. Službeni list SFRJ, broj 4, 1966. Pravilnik o bakteriološkim uslovima kojima moraju odgovarati životne namirnice u prometu.
11. Snedecor W. (1957.): Statistical Methods.
12. Thieulin G., Vuillaume R. (1967.): Éléments pratiques d'analyse et d'inspection du lait de produits laitiers et des oeufs, Paris.

## ISPITIVANJE KVALITETA MLIJEKA KRAVA HRANJENIH SA I BEZ UREJE \*

Natalija DOZET

Poljoprivredni fakultet, Sarajevo

Sve šira upotreba sintetskih azotnih supstancu u ishrani krava muzara, dovodi do neophodnosti ispitivanja njihovog djelovanja na sastav, kvalitet i tehnološko svojstvo mlijeka. Sve je više autora koji se bave ispitivanjem uticaja ishrane krava s urejom koja ulazi u sastav obroka. Rezultati ispitivanja pokazuju da kod ishrane krava muzara sa sintetskim azotnim materijama rastvorljivim u vodi one lako prodiru u krv, a iz krvi u mlijeko.

\* Zadatak finansira Savezni fond za naučni rad. Nosilac zadatka prof. dr Dušan Maksimović.

Referat sa IX Seminara za mlekarsku industriju, veljača 1971, Tehnološki fakultet, Zagreb.