

LITERATURA:

1. Baković D.: Prinos poznavanju osobina i proizvodnje ovčjih sireva Dalmacije (disertacija, Zagreb, 1957).
2. Baković D.: Analiza rada Ovčarsko-mljekarske zadruge u Silbi. — Stočarstvo 11—12, 1954.
3. Pesana C.: Il caseificio pecorino. Lodi 1953.
4. Izvještaj Zadružne Matice u Splitu o stanju i poslovanju u god. 1937. Split 1938.

Dr Ivan Bach, Zagreb

Tehnološki fakultet*

Osnovna bakteriološka analitika u kontroli higijenske kvalitete mlijeka i mlječnih proizvoda

(nastavak)

Prilikom uzimanja uzorka, kako na mjestu proizvodnje odnosno prodaje, tako i u laboratoriju, mlijeko moramo prethodno dobro promiješati. Od kolike je to važnosti za dobivanje ispravnih i stvarnih rezultata izvršenog ispitivanja mlijeka, najbolje će nam ilustrirati ovi podaci:

Koncentracija bakterija i mlječne masti u površinskom sloju mlijeka

| | Starost mlijeka | Temperatura držanja | Bakterija u 1 ml | Postotak masti |
|---------------------------------|-----------------|---------------------|------------------|----------------|
| Promiješano mlijeko, | svježe | 10,0°C | 53.000 | 5,0 |
| Površinski sloj mlijeka, nakon | 1 sat | 10,0°C | 108.000 | 7,7 |
| Površinski sloj mlijeka, nakon | 2 sata | 10,0°C | 167.000 | 15,3 |
| Površinski sloj mlijeka, nakon | 5 sati | 10,0°C | 262.000 | 16,4 |
| Novo promiješano mlijeko, nakon | 6 sati | 10,0°C | 53.000 | 5,0 |

Podaci iz američke literature:

Ukoliko mlijeko dulje miruje, kapljice masti, zbog toga što su specifički najlakši sastavni dio mlijeka, u sve većoj mjeri nakupljaju se u površinskom sloju, noseći sa sobom bakterije. Prema tome, što je uzorak uzet bliže površinskom sloju nepromiješanog mlijeka, to će i broj bakterija u takvom »uzorku« biti veći, odnosno u obratnom slučaju manji.

Uzorke mlijeka uzimamo u posebne sterilne boce za uzimanje uzoraka, koje potom čepimo sterilnim gumenim ili ubrušenim staklenim čepom, ili zatvaramo nekorozivnim metalnim zatvaračem na vijak. Ako se radi o maloj količini, najbolji je uzorak — originalno napunjena i zatvorena boca s mlijekom, vrhnjem, jogurtom i sl.

O načinu uzimanja uzoraka, kao i o svim ostalim pojedinostima u vezi s time, postoji kod nas službeni propis, koji je Savezni sanitarni inspektorat izdao pod br. 977 od 26. VIII 1957. i naslovom: »Obavezno uputstvo (instrukcija) o postupku organa sanitarne inspekcije prilikom uzimanja uzoraka živ. namirnica za analizu«.

Također je od presudne važnosti za ispravnost rezultata, da mlijeko odmah po uzimanju uzorka ohladimo na temp. od 0—04,5°C i tako ohlađeno šaljemo u

* prije Centralni higijenski zavod u Zagrebu

laboratorij na pretragu. To je naročito potrebno učiniti u toplo godišnje doba, kada je temperatura okoline visoka. Ukoliko ne možemo odmah izvršiti analizu, uzorak mlijeka čuvamo u laboratorijskom hladioniku na temp. do 4,5°C, i to kroz najdulje 24 sata.

Uzorak miješamo ili homogeniziramo u laboratoriju pred samu bakterio-lošku pretragu tako, da rukom uhvatimo grlić boce u kojoj se nalazi mlijeko (palcem pritisnemo čep odnosno zatvarač) i 25 puta brzo okrenemo bocu u smjeru: dno gore — grlić dolje i obrnuto. Nakon toga sterilnom pipetom od 1 ml navučemo i prenesemo na sterilan način (opaljujući na plamenu grlić boce i otvor epruvete) 1 ml tako homogeniziranog mlijeka u već pripremljenu epruvetu s 9 ml fiziološke otopine. Pipetu zatim odbacimo u cilindar s dezinfekcionom tekućinom. Osnovno je pravilo, da kod toga pipetu ne smijemo uroniti u otopinu, već vršak pipete, prislonjen uz stijenku epruvete moramo postaviti povrh nje. U protivnom slučaju, količina prenijetog mlijeka neće iznositi tačno 1 ml, već će biti nešto veća, jer je u otopinu za pravljenje razrjeđenja dospjelo i mlijeko, koje se nalazi na vanjskoj strani pipete. To naročito dolazi do izražaja kod viskoznijih tekućina, poput vrhnja, sladoleda, jogurta i sl.

Ujednačivanje (homogeniziranje) prvog decimalnog razrjeđenja mlijeka izvodimo na taj način, da ga u novu pipetu od 1 ml uvlačimo i ispuhujemo dva-desetak puta, pomičući pritom pipetu od vrha prema dnu epruvete i nazad. Kod toga pazimo, da nam razrijeđeno mlijeko ne prelazi gornju, početnu kalibracionu oznaku pipete. Navučemo tada u pipetu 1 ml deseterostruko razrijeđenog mlijeka (1:10) i prenesemo ga u slijedeću epruvetu s 9 ml fiziološke otopine, ne uranjajući vršak pipete u otopinu.

Upotrebljenu pipetu odbacimo i s novom pipetom od 1 ml, na već opisani način, ujednačimo u epruveti ovo stostruko razrijeđeno mlijeko (1:100) i odatle prenesemo najprije 1 ml u epruvetu s 9 ml fiziološke otopine, a zatim 1 ml u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu.

Pošto smo na isti način ujednačili i posljednje predviđeno razrjeđenje mlijeka (1:1.000) i prenijeli 1 ml u preostalu praznu Petrijevu zdjelicu ostaje nam još, da u obje zdjelice nalijemo hranjivu podlogu. Zbog toga ohladimo u vodenoj kupelji otopljeni laktoza agar na 43—45°C, otčepimo i opalimo na plamenu grlić boce i, drugom rukom, odignemo na jednom kraju poklopac Petrijeve zdjelice samo toliko, da iz boce možemo uliti u zdjelicu 12—15 ml podloge. Zdjelicu odmah poklopimo i u ruci je lagano naginjemo u svim pravcima kružno, kako bi što bolje izmiješali hranjivu podlogu i razrijeđeno mlijeko. Pritom moramo pripaziti, da nam se sadržina ne prelije preko ruba zdjelice ili na poklopac, jer tada moramo uzeti novu zdjelicu i ponoviti postupak nacepljivanja za dotično, neuspjelo promiješano razrjeđenje mlijeka.

Kada smo u obje zdjelice dodali i izmiješali laktoza agar, ostavimo ih na hladnoj horizontalnoj podlozi dok se u njima agar ne skrutne. Pravilo je, da između pripreme prvog razrjeđenja i ulijevanja agara u zdjelicu s posljednjim razrjeđenjem mlijeka ne smije proteći više od 20 minuta. U protivnom, može već doći do umnažanja (dijeljenja) bakterija u razrijeđenom mlijeku, koje stoji na sobnoj temperaturi (!) u Petrijevim zdjelicama, i time do pogrešnog rezultata o većem broju bakterija u ispitivanom uzorku.

Potrebno je istaknuti, da je temeljito ujednačivanje svakog razrjeđenja mlijeka vrlo važna operacija, kojoj se često ne pridaje dovoljno pažnje. Nije izlišno da se podsjetimo, kako se bakterijske stanice u mlijeku ne nalaze samo pojedinačno, već i povezane međusobno u kraćim ili dužim nizovima (lancima), odnosno nakupinama različitog oblika. Stoga je i te kako nužno, da temeljitim ujednačavanjem u što većoj mjeri razdvojimo bakterije iz takvih nakupina da bi nam se u hranjivoj podlozi svaka kolonija razvila iz jedne jedine bakterijske stanice, a ne iz više njih. U protivnom slučaju dobit ćemo manji broj kolonija, a time i niže vrijednosti za broj bakterija, od onih stvarnih.

Inkubacija naciepljenih podloga

Pošto se u Petrijevim zdjelicama laktoza agar, naciepljen odabranim decimalnim razrjeđenjima mlijeka, skrutnuo preokrenemo zdjelice tako, da nam se dno s hranjivom podlogom nalazi okrenuto prema gore, a poklopac prema dolje. U tom položaju uložimo ove zdjelice radi razvijanja bakterija odnosno njihovih kolonija u inkubator (laboratorijski termostat) na 35°C kroz 48 sati. Dozvoljeno je odstupanje od propisanog vremena inkubacije, i to najviše do ± 3 sata.

Čitanje rezultata (brojenje kolonija)

Nakon završene inkubacije izvadimo sve zdjelice iz inkubatora radi brojenja kolonija, koje treba izvršiti odmah. Ukoliko to nije moguće treba zdjelice pohraniti u hladionik na neko 5°C, najdulje kroz 24 sata.

Brojimo sve kolonije bakterija, pa i one najsitnije (na površini kao i u dubini agara), koje vidimo prostim okom, odnosno s ručnom lupom malog povećanja (6×). Postoje i posebne naprave za brojenje kolonija, tzv. brojači kolonija, kod kojih se iznad ležišta za Petrijevu zdjelicu (okrugla staklena ploča s ucrtanom kvadratnom centimetarskom mrežom, koja pokriva otvor istog oblika) nalazi pomična lupa u veličini same zdjelice, a ispod otvora izvor svijetla (Quebec colony counter, Dr Hannay's colony counting illuminator i dr.).

Ako nemamo ovakvih pomagala, olakšat ćemo si brojenje kolonija na taj način, da olovkom za staklo povučemo preko sredine dna zdjelice nekoliko poteza, kojima podijelimo ukupnu površinu zdjelice na 4 ili 6 sektora. Radi boljeg uočavanja kolonija uklonimo poklopac, a dno zdjelice s otvorom okrenutim prema dolje stavimo na crnu podlogu (crni karbon papir ili sl.). Tintom za staklo obilježimo svaku izbrojenu koloniju, kako je ne bismo dvaput brojili.

Prije smo kazali, da određivanje broja bakterija izvodimo indirektnom metodom agar ploča. Ovaj naziv »agar ploča« potiče odatle, što skrutnuti agar u Petrijevoj zdjelici zaista ima izgled ploče okruglog oblika. Zato i govorimo, da nam za brojenje prvenstveno dolaze u obzir one ploče, na kojima je poraslo između 30 do 300 bakterijskih kolonija. No, ponekad se dešava, da se prevarimo u procjeni bakteriološke kvalitete ispitivanog uzorka i ne dobijemo nijednu ploču, na kojoj bi se broj kolonija nalazio u spomenutim granicama.

Da bismo znali kako ćemo postupiti u takvim i inim slučajevima iznijet ćemo neka od pravila za izračunavanje broja kolonija, koja propisuju američke »Standardne metode za ispitivanje mlječnih proizvoda*«, a kojima se i mi služimo:

* American public health association: Standard methods for the examination of dairy products — Microbiological and chemical, 10th edition, New York, 1953.

1.00 Odabiranje razrjeđenja

Za rutinska kontrolna ispitivanja naciepi najmanje 2 ploče po uzorku, i odaberi decimalna razrjeđenja tako, da ukupan broj kolonija barem na jednoj ploči bude između 30 i 300.

1.01 Odabiranje i brojenje ploča

a) Jedna ploča s 30–300 kolonija — Odaberi ploču s 30–300 kolonija na kojoj nema »prekrivača« (engleski: »spreaders«) (vidi 1.01, c). Izbroj sve kolonije uključivši i one najsitnije (veličine vrha igle) na odabranoj ploči, pomnoži s upotrebljenim razrjeđenjem i izvijesti o ukupnom broju kolonija prema ovim pravilima (kao: »Standard Plate Count/ml«). Vidi u tablici, 1.02, uzorak br. 1001.

b) Obje ploče s 30–300 kolonija. — Ako se u svakoj od dviju ploča naciepljenih s 2 uzastopna decimalna razrjeđenja razvilo između 30 i 300 kolonija izbroj svaku ploču, pomnoži broj kolonija s upotrebljenim razrjeđenjem i izrazi kao aritmetičku sredinu, ukoliko veći broj nije dvaput veći od manjeg. U tom slučaju za konačan rezultat uzima se samo manji broj i daje takav izvještaj. Vidi u tablici, 1.02, uzorke br. 1002 i 1003.

c) Ploče s »prekrivačima« — Ako se na odabranoj ploči nalaze »prekrivači« (vidi 1.04) izbroj kolonije na odgovarajućem (reprezentativnom) dijelu ploče (vidi 1.03) samo onda, kada (1) su kolonije podjednako raspoređene na dijelu ploče bez »prekrivača«, i (2) ako »prekrivači« ne pokrivaju više od $\frac{1}{2}$ ploče.

d) Nijedna ploča s 30–300 kolonija — Ako nema nijedne ploče s 30–300 kolonija, a 1 ili više ploča imaju više od 300 kolonija, uzmi onu ploču na kojoj je broj kolonija najbliži broju 300, izbroj kolonije i izvijesti o rezultatu prema uputama navedenim pod 1.03. Vidi u tablici, 1.02, uzorke br. 1006 i 1010.

e) Sve ploče s manje od 30 kolonija — Ako se na pločama sa svim naciepljenim razrjeđenjima razvilo manje od 30 kolonija, zabilježi nađeni broj kolonija na najslabijem razrjeđenju (ukoliko se ne radi o slučajevima pod 1.01, c, ili 1.01, f), a o rezultatu izvijesti ovako: »manje od $30 \times$ odgovarajuće razrjeđenje«, tj. ako je najslabije razrjeđenje bilo 1:100 izvještava se kao: »manje od 3.000« (ili < 3.000). Vidi u tablici, 1.02, uzorak br. 1007.

f) Laboratorijske nezgode — Ako sve ploče bilo kojeg naciepljenog uzorka (1) ne pokazuju nijednu koloniju, ili (2) su se »prekrivači« prekomjerno razvili (vidi 1.01, c), ili (3) je poznato da su ploče onečišćene (inficirane), ili (4) one ne zadovoljavaju zbog bilo kojeg drugog razloga treba kao rezultat izvijestiti: »laboratorijska nezgoda«. Vidi u tablici, 1.02, uzorke br. 1008 i 1009.

g) Izražavanje brojeva — Pri izražavanju brojeva upotrijebi samo prve dvije znamenke (vidi 1.05). Usporedi s primjercima u tablici 1.02.

1.02 Primjeri za izračunavanje broja bakterija u 1 ml (Standard Plate Counts/ml)

| Broj uzorka | Broj kolonija u razrjeđenjima | | Brojni omjer* | Broj bakterija u 1 ml kod 35°C** |
|-------------|-------------------------------|---------|---------------|----------------------------------|
| | 1:100 | 1:1.000 | | |
| 1001 | 234 | 28 | — | 23.000 |
| 1002 | 293 | 41 | 1,4 | 35.000 |
| 1003 | 140 | 32 | 2,3 | 14.000 |
| 1004 | P*** | 31 | — | 31.000 |
| 1005 | 1365 | P*** | — | 140.000 |
| 1006 | — | 355 | — | 360.000 |
| 1007 | 18 | — | — | < 3.000 |
| 1008 | 0 | 0 | — | LN**** |
| 1009 | P*** | 5 | — | LN**** |
| 1010 | 325 | 25 | — | 33.000 |

* Brojni omjer je omjer između većeg i manjeg broja kolonija, o kojem se mora voditi računa, kada ploče s oba uzastopna decimalna razrjeđenja imaju između 30–300 kolonija.

** U originalu je taj broj izražen kao: »Standard Plate Count at 35°C«.

*** »prekrivač«

**** »laboratorijska nezgoda«

1.03 Izbrojavanje ploča s više od 300 kolonija

Kada broj kolonija znatno premašuje 300, broji kolonije na reprezentativnim dijelovima ploče na kojima su kolonije jednako raspoređene.

Ako ima manje od 10 kolonija u 1 cm² ploče, izbroj kolonije u 13 takvih polja i, ukoliko su reprezentativna, odaberi 6 (ili 7) uzastopnih kvadrata položenih dijagonalno preko ploče i 6 (ili 7) okomito na njih. Pritom treba pripaziti, da isti kvadrat ne brojimo dvaput. Zbroj kolonija izbrojenih u 13 reprezentativnih kvadrata pomnožen s 5 daje broj kolonija po ploči.

Ako ima više od 10 kolonija u 1 cm² ploče, izbroj kolonije u četiri takva reprezentativna kvadrata. Pomnoži dobivenu srednju vrijednost za 1 cm² s odgovarajućim faktorom, da dobiješ broj kolonija na ploči. Budući da unutarnji promjer Petrijeve zdjelice standardne veličine (100×15 mm) mjeri prosječno 91 mm, pomnoži srednju vrijednost broja kolonija u 1 cm² sa 65.

1.04 Brojenje kolonija »prekrivača«

Razlikujemo tri raznovrsna tipa »prekrivačkih« kolonija (engleski: »spreading colonies«).

Prvi tip je lanac kolonija, koje nijesu baš potpuno odvojene, a izgleda da nastaje uslijed razdvajanja bakterijskih nakupina prilikom miješanja agara s razrijeđenim mlijekom. Ako postoji samo jedan takav lanac, broji ga kao jednu jedinu koloniju. Ako jedan ili više takvih lanaca polaze iz odvojenih žarišta (izvora), broji svako žarište kao jednu koloniju. Ne broji svaku pojedinačnu koloniju u takvom lancu (ili lancima) kao odvojenu, posebnu koloniju.

Drugi tip je »prekrivač«, koji se razvija u tankom sloju vode između agara i dna zdjelice, dok se treći tip razvija u tankom sloju vode uz gornju ivicu agara ili preko površine agara. Kada razrijeđeno mlijeko jednolično izmiješamo s hranjivom podlogom, spomenuta bakterijska žarišta rijetko kada se razvijaju u »prekrivačke« kolonije.

Ako »prekrivač« (ili »prekrivači«) pokriva preko 1/2 ploče, izvjesti o rezultatu kao: »laboratorijska nezgoda« (vidi 1.01, c).

1.05 Izražavanje brojeva

Prilikom izvještavanja o broju bakterija uzmi u račun samo prve 2 znamenke (vidi 1.01 g) s time, da drugu znamenku povećaš na slijedeći veći broj, ako je treća znamenka 5, 6, 7, 8 ili 9, a ne promijeniš je, ako je treća znamenka manja od 5. Usporedi s primjerima u tablici, 1.02.

Davanje izvještaja

Pošto kod nas ne postoje službeni propisi za bakteriološke analitičke metode uobičajeno je, da se o broju bakterija izvještava kao: »broj bakterija u 1 ml (ili 1 g)«, bez obzira kojom je metodom određen. Zbog bliže i tačnije informacije pismeni izvještaj o izvršenoj kvantitativnoj bakteriološkoj pretrazi CHZa u Zagrebu formulira se ovako: »ukupan broj bakterija u 1 ml (1 g) — 35°C/48^h«.

Nije nam namjera, da baš ovu metodiku i način rada, prikazanu u članku, smatramo najboljom i najpreporučljivijom. Razumljivo je da ona nije bez prigovora, jer se i bakteriološke analitičke metode stalno usavršavaju i poboljšavaju. Najvažnije je od svega, da je ta analitika u jednoj zemlji jedinstvena, obavezna za sve laboratorije, jer se samo tada mogu dobivati identični rezultati i donositi pravilni zaključci o aktualnoj bakteriološkoj kvaliteti mlijeka i mliječnih prerađevina u proizvodnji i prometu.