

MEDYCYNA WETERYNARYJNA

D A W N I E J

PRZEGLĄD WETERYNARYJNY 1886 I WIADOMOŚCI WETERYNARYJNE 1919

Z Zakładu Higieny i Technologii Środków Spożywczych Wyższej Szkoły Weterynaryjnej w Brnie. (C.S.R.)
Kierownik: Doc. MVDr. i RNVDr. JAN HOKL.

JAN HOKL, JOZEF SVOBODA

Ustalanie ilości bakterii w mleku metodą wysiewania

The determination of the number of bacteria present in the milk by the artificial cultivation method.

(Standardowa czechosłowacka metoda)

Rozwój mikrobiologii, pociąga za sobą konieczność standaryzacji i normalizacji metod badania.

W Czechosłowacji z inicjatywy Państwowego Zakładu Zdrowia są opracowywane standardowe metody dla bieżących badań mikrobiologicznych i serologicznych. Jedną z nich przedkładamy obecnie polskim fachowcom.

Niewątpliwie byłoby bardzo pożądanym, aby tak Polacy, jak i Czechosłowacy uzupełnili nawzajem i ujednoliciili swe metody badawcze.

Mleko jest bardzo często przedmiotem badań mikrobiologicznych, dlatego należy dążyć do opracowania jednolitych metod badawczych.

Jeden z nas, na zjeździe czechosłowackich mikrobiologów, który odbył się 27 listopada 1948 roku w Bratisławie, podał projekt najprostszego badania bakteriologicznego mleka, oparty na zasadzie obliczania bakterii i ustalania miana coli.

Projekt ten został opracowany na podstawie wspólnych badań nadradcy dr Klauze z Państwowego Zakładu Zdrowia w Pradze, radcy dr K. Rychleho, z Państwowego Zakładu Zdrowia w Pradze, prof. dr R. Harnacha z Brna i autora niniejszego artykułu.

W części matematyczno-statystycznej współpracował również prof. dr J. Novak, z Zakładu Matematycznego Czeskiej Akademii Nauk i Umiejętności w Pradze.

Projekt został przyjęty w tej postaci jak tu został przedstawiony.

Zagadnienie obliczania bakterii w mleku ma bogatą literaturę tak światową, jak i czechosłowacką, gdzie były już na ten temat wykonane poważne prace. Wskażemy tu np. Demetera, który b. głęboko opracował stronę mikrobiologiczną, a z prac przeprowadzonych w Czechosłowacji wspomniemy jedynie Juranica (pierwsza metoda obliczania), Klementa (miano coli) i Vintiku (obliczanie średnie wszystkich bakterii).

Jeżeli chodzi o obliczanie bakterii w mleku, to należy z góry powiedzieć, iż powinna to być metoda, która mogłaby być przeprowadzana obecnymi środkami technicznymi, metoda musi zapewniać szybkość badania, aby otrzymywane wyniki nie były opóźnione tj. wyniki muszą być znane najpóźniej w kilka dni po rozpoczęciu badań i zatrzymaniu mleka.

Proponowana metoda wysiewania może więc pod tym względem uchodzić za metodę klasyczną, gdyż przy posiewach otrzymujemy rozdzielenie kolonii, co ułatwia identyfikację bakterii, a co przy ustalaniu zdrowotności mleka ma niekiedy podstawowe znaczenie.

Technika badania jest o tyle dobra, iż znamy też jej usterki stąd wiemy np. ile równoczesnych badań należy przeprowadzić aby z wyników można było wyciągnąć dostatecznie pewne wnioski. Ma to przede wszystkim duże znaczenie przy klasyfikacji mleka, gdyż obliczenie bakterii wykazuje nam odrazu ich ilość, która ściśle ograniczoną jest odpowiednimi przepisami.

Wspomnieć jednak należy, iż standardowa metoda wysiewania nie wykazuje absolutnie wszystkich bakterii (dość znaczny procent nie wyrasta), poza tym wyrastają kolonie połączone i złożone, a wreszcie już samo starzenie się mleka wpływa na przemianę materii mikroorganizmów.

Dawne metody podliczania (Skar, Breed) mają również swoje wady i zalety, toteż mimo wszystko należy jednak dać pierwszeństwo proponowanej metodzie obliczania przez wysiewy.

Należy tu nadmienić, iż dla badania mleka trzeba mieć pewne doświadczenie, a co ważniejsze przy ustalaniu wyników należy postępować z dużą ostrożnością i rozważą, zwłaszcza w tych przypadkach, które mogą doprowadzić do postępowania karnego. Przy badaniach należy się zawsze trzymać tych samych metod, chcąc mieć porównywalne i zbliżone wyniki. Praktyka wymaga niekiedy orientacyjnych badań, które mogą być potem, oczywiście upro-

szczone. Trzeba jednak pamiętać, że tylko przy dobrze i sumiennie wykonanej pracy możemy oczekiwać dobrych wyników.

Podany projekt badania mleka ustala następujący sposób postępowania:

Pożywki:

- a) Agar z laktozą:
- | | |
|------------------------------|----------|
| wody mięsnej | 1000 ccm |
| peptonu (Whitte lub Fragner) | 10 g |
| laktozy | 5 g |
| NaCl | 5 g |
| agaru | 20 g |
| pH 6,6—6,8 | |
- b) Agar z trypaflawiną (miano coli)
- | | |
|---------------------------|----------|
| wody mięsnej | 1000 ccm |
| peptonu | 5 g |
| agaru | 25 g |
| alkohol. roztw. | |
| bielk. bromthymol. (1,5%) | 10 ccm |
| laktozy | 10 g |
| pH 6,8 | |

Przed użyciem dodaje się na 100 ccm rozpuszczonej pożywki 0,5 ccm 1% roztworu trypaflawiny.

- c) Agar Gassnera (miano coli)
- | | |
|---|----------|
| agar zwykły (pH. 7,2) | 1000 ccm |
| metachrom gelb rozpuszczony w 98 ccm gorącej wody | 2 g |
| bielkitu wodnego | 1 g |
| laktozy | 50 g |

(bielkit wodny z laktozą rozpuszczamy w 90 ccm gorącej wody)

- d) Bulion z trypaflawiną: (miano coli):

wody mięsnej	300 ccm
peptonu	5 g
laktozy	10 g
(1,5% alkohol. roztw. bi. bromthymol.)	10 ccm
1% roztw. trypaflawiny.	5 ccm

Dopełniamy do 1 litra wodą destylowaną; pH przed dodaniem trypaflawiny 6,8 (zabarwienie trawiasto-zielone).

Pobieranie próbek.

Próbki winny być starannie pobierane, i wysyłane do zakładu dokładnie według podanych wskazówek, ponieważ od tego w znacznej mierze zależy wynik badania. Do badania surowego zdrowotnie niepodjezranego mleka próbki pobiera się do oryginalnych butelek. Z pasteryzowanego mleka próbkę pobieramy do wyjałowionej próbki (wydaje z reguły zakład), po uprzednim dokładnym wymieszaniu. Jeżeli chodzi o mleko butelkowe, to do badania bierzemy całą butelkę. Temperaturę ustalamy termometrem w rezerwuarze, w innej butelce itp., przed pobraniem próbki.

Próbkę (ochłodzoną) wysyłamy jak najprędzej i najkrótszą drogą do zakładu w izolowanym opakowaniu (w skrzynce). W zakładzie,

po dokładnym wymieszaniu próbki w próbówce lub butelce osiągamy jej jednolitość, po czym przestrzegając zasad jałowości wyjałowioną pipetą pobieramy potrzebną ilość (najmniej 10 ccm mleka) i po rozcieńczeniu w odpowiednim stosunku z wodą sporządzamy zasadnicze rozcieńczenia do zasiewów. Mierzmy dokładnie ciepłotę pozostałego mleka i oznaczamy czas rozpoczęcia badania. Jeżeli z jakiegokolwiek powodów badania nie możemy rozpocząć natychmiast, to próbkę przechowujemy w lodówce, co w każdym wypadku należy zaznaczyć w protokole badania. Badania przeprowadzane w 6 godzin po otrzymaniu próbki przechowywanej w ciepłocie wyższej niż 4—5° nie można uważać za miarodajne. Najlepiej jest przeprowadzać posiewy na miejscu pobierania próbek np. w mleczarni itp.; płytki z posiewami zabieramy wówczas bezpośrednio do Zakładów do inkubacji.

Oznaczanie ilości bakterii metodą posiewów (pośrednio).

Mleko rozcieńczamy ochłodzonym roztworem fizjologicznym tak, aby na płytkach kolonie wyrosły rzadko i mogły być łatwo zliczone. (Ilość wyrosłych kolonii na płytkach winna być zawarta między 50 a 300). Stopień rozcieńczenia ustalamy przy pomocy bakteriologicznego preparatu (do tego trzeba mieć pewną wprawę). Rozcieńczenie przeprowadzamy w szeregu kolbek lub butelek zawierających każda po 90 ccm ochłodzonego (w lodówce) roztworu fizjologicznego. Po dodaniu pipetą 10 ccm mleka i dokładnym zmieszaniu otrzymujemy w pierwszej kolbce rozcieńczenie 1:10. Pobierając następnie z tej kolbki 10 ccm rozcieńczonego mleka i dodając do następnej otrzymujemy rozcieńczenie wyższe. Do rozcieńczeń należy brać ściśle 10 ccm mleka i 90 ccm roztworu fizjologicznego by uniknąć w ten sposób o ile możności wpływu czynnika ciepłoty (większe pojemności w większym stopniu utrzymują niską temperaturę), następnie po to, aby mieć dokładniejsze wyniki, gdyż pobranie większej ilości mleka do badania zmniejsza prawdopodobieństwo błędu. Zasiewamy co najmniej 5 płytek w następujący sposób: unosimy lekko pokrywkę płytki i nakrapiamy pipetą odmierzoną poprzednio ilość dowolnie rozcieńczonego mleka, po czym pokrywkę opuszczamy. Następnie w zwykłe przyjęty sposób wlewamy rozpuszczoną, a następnie ochłodzoną (40°) pożywkę agarową. Przechylając teraz ostrożnie ruchem kołowym płytkę osiągamy dokładne wymieszanie pożywki z mlekiem. W ten sposób zasiane płytki wstawiamy do cieplarki o temp. 30°C. na tak długo aż wyrosłe kolonie będzie można policzyć (48 godz.). Kolonie obliczamy przy pomocy lupy lub też bez niej, względnie pomagamy sobie podziałką naniesioną na płytkę (kratka). Przy obliczaniu płytkę umieszczamy na ciemnym tle, a zliczone kolonie zakreślamy piórem. Z ilości wyrosłych kolonii na poszczególnych

plytkach obliczamy średnią, a jeżeli trzeba to również przypuszczalny błąd.

Ustalenie miana coli.

Miano coli ustalamy na pożywkach wybiórczych. Przy ustaleniu miana surowego zdrowotnie niepodejrzanego mleka używa się rozcieńczeń 1:5; 1:10 i 1:20; przy mleku pochodzącym z mleczarni odpowiednie rozcieńczenia będą wynosiły: 1:100, 1:200, 1:400. Z każdego z tych rozcieńczeń wysiewamy w sposób opisany powyżej 5 płytek i wstawiamy je do ciepłarki o temp. 30°C. na 24 godz.

Wyniki i ocena badań.

Przy ocenie mleka na podstawie określenia ilości mikroorganizmów musimy przestrzegać następujących zasad:

1. Chcąc określić czystość wyrobów i sprzedanego mleka na podstawie ilości mikroorganizmów w 1 ccm — musimy przeprowadzać badania systematycznie i prawidłowo, gdyż w ten sposób uzyskamy prawdziwy i dokładny wynik.

2. W każdym wypadku należy zrobić co najmniej 5 posiewów; a rozcieńczenie winno być zastosowane takie by na płytce wyrosła odpowiednia ilość kolonii (od 50 do 300). Badania przeprowadzać należy możliwie szybko.

3. Przy pobieraniu próbek należy przestrzegać zasad aseptyki i przysyłać je w izolowanym opakowaniu możliwie najszybszą drogą do Zakładu, gdzie natychmiast po nadesłaniu będzie zbadaną. Posiewy o ile możności dobrze jest przeprowadzać na miejscu pobierania próbek, które do inkubacji zabieramy do Zakładu. Natomiast badania nie możemy uważać za miarodajne: a) jeżeli pobrana próbka była zbyt małą lub nienależycie pobraną (np. przy dojeniu do próbówki), b) jeżeli badamy mleko po dłuższym czasie od chwili otrzymania próbki, c) jeżeli ciepłota próbki była wyższą od 15°C, a badanie przeprowadzamy więcej niż o dobę po pobraniu, d) jeżeli rozcieńczenie dokonane zostało nieochłodzonym roztworem fizjologicznym, e) jeżeli małe ilości mleka przygotowane do rozrzedzenia pozostawały w próbówce dłużej niż dobę (w pobliżu pieca), f) jeżeli posiadaliśmy zbyt małą ilość płytek, g) jeżeli wreszcie nie uwzględniamy w pewnych przypadkach możliwego błędu itp.

Właściwa ocena wyniku.

Surowe zdrowotnie niepodejrzane mleko może zawierać wg czechosłowackich przepisów najwyżej 50.000 bakterii w 1 ccm, a miano coli dodatnie najwyżej przy rozcieńczeniu 1:10.

Gwarantowane mleko mleczarniane zgodnie z przepisami może wykazywać dodatnie miano coli najwyżej w rozcieńczeniu 1:200, a ilość bakterii w 1 ccm. może wynosić w lecie najwyższej 300 tys., a w zimie 150 tys.

Jeżeli zawartość bakterii w 1 ccm jest tylko niewiele wyższą od wskazanej przepisem,

a musimy zdecydować o ewentualnym ściąganiu dostawcy na zasadzie przeciętnych obliczeń standartowych, to wówczas musimy jeszcze uwzględnić ewentualny błąd, co wyłącza prawdopodobieństwo niedokładności metody badania.

Jeżeli w wyniku badań otrzymamy najwyższą dopuszczalną ilość bakterii w 1 ccm (u surowego zdrowotnie niepodejrzanego mleka 50 tys.) to do otrzymanej cyfry dodajemy z jednej strony trzykrotną wartość wyliczonego błędu, z drugiej zaś odejmujemy tę samą trzykrotną wartość błędu, jeżeli teraz wyliczona na podstawie tych dwóch cyfr przeciętna mieści się w tych granicach, to wytwórca nie może być pociągany do odpowiedzialności, a mleko zostaje dopuszczone do obrotu.

Obliczanie błędu przeprowadzamy wg następującego wzoru:

$$m = \sqrt{\frac{S^2}{n(n-1)}}$$

We wzorze tym n — oznacza ilość płytek. S — we wzorach matematycznych symbolizuje sumę, a oznacza sumę wszystkich podliczonych sum z poszczególnych płytek; d — jest odchyleniem (różnicą) obliczonych sum od arytmetycznej przeciętnej, a w naszym przypadku różnicą ilości znalezionych na poszczególnych płytkach kolonii od wyliczonej przeciętnej arytmetycznej, bez względu na to czy różnice te będą dodatnie czy ujemne.

Przykład obliczania:

Surowe, zdrowotnie niepodejrzane mleko może zawierać najwyżej 50 tysięcy bakterii w 1 ccm. Obliczona przeciętna ilość bakterii w 1 ccm, na podstawie obliczeń kolonii na pięciu płytkach wyniosła 52 tys. Ponieważ posiewy zrobiono na 5-ciu płytkach i przy badaniach mógł być popełniony błąd, który spowodował, iż badane mleko wydaje się być gorsze niż jest w rzeczywistości, zachodzi kwestia czy należy na podstawie tego wyniku dostawcę ściągać.

Z badanego mleka zrobiono 5 posiewów na płytkach dając po 0,5 ccm mleka w rozcieńczeniu 1:100. Po inkubacji stwierdzono następującą ilość bakterii na poszczególnych płytkach:

	d	d^2
220	-40	1600
300	+40	1600
240	-20	400
280	+20	400
260	0	0
1300	--	4000 = Sd^2

Arytmetyczna przeciętna $M = \frac{1300}{5} = 260$ kolonii

$$m = \frac{S_d^2}{n(n-1)} = \frac{4000}{5 \cdot 4} = 14,4$$

Średnia arytmetyczna wynosi 260 kolonii. Ponieważ dawaliśmy 0,5 ccm rozcieńczonego 1:100 mleka musimy liczbę 260 pomnożyć przez 200, aby w ten sposób obliczyć przeciętną ilość bakterii przypadającą na 1 ccm badanego mleka, co wyniesie 52 tys. bakterii. Błąd $m = 14,4$. Ilość ta przeliczona ustalonym sposobem na 1 ccm daje 2820 bakterii.

Obliczony błąd ma następujące znaczenie: jeżeli przeprowadzimy kilka pomiarów tej próbki mleka wtedy średnia arytmetyczna będzie w 66 proc. w granicach \pm jednokrotnego błędu, a 99,7 proc. w granicach trójrotnego błędu. Trzykrotny błąd wynosi 8460. Rzeczywista więc średnia arytmetyczna znajdzie się, że tak powiem z 100 proc. pewnością, w granicach 52 tys. — 8460 a 52 tys. + 8460, to jest w granicach między 43540 a 60460. Ponieważ przepis dopuszcza najwyższą ilość bakterii 50 tys. w 1 ccm, co również zawarte jest w tych granicach, a więc mleko należy uznać za zdadne do spożycia.

Ocena na podstawie miana coli.

Przy ustalaniu miana coli przeprowadzamy posiewy przy surowym zdrowotnie niepodejrzanym mleku w następujących rozcieńczeniach:

1:5, 1:10 i 1:20 z każdego z nich zasiewamy 5 płytek, które wstawiamy do ciepłarki przy 37°C. na 24 godz. po czym obliczamy ilość wyrosłych kolonii z poszczególnych rozcieńczeń. Jeżeli najwyższa z tych liczb jest 8 lub wyżej mleko uznajemy za niezdatne. Przy mleku targowym (rynkowym) ilość ta nie może być wyższą od 160, przy czym posiewy robimy z rozcieńczeń 1:100, 1:200, 1:400, również po 5 płytek z każdego. Prawdopodobną ilość bakterii w pewnym rozcieńczeniu wyliczamy w ten sposób, iż mnożymy odwrotną wartość rozcieńczenia przez ilość dodatnich wyników i dzielimy

przez ilość wszystkich płytek użytych przy danym rozcieńczeniu.

Przykład:

Rozcieńczenia:

	1:5	1:10	1:20
1	+	—	+
2	—	+	+
3	+	—	—
4	+	—	+
5	+	+	—

Przy rozcieńczeniu 1:5 pozytywny wynik otrzymano w 4-ch posiewach, przy rozcieńczeniu 1:10 były 2 pozytywne wyniki, przy 1:20—3. Odwrotna wartość rozcieńczenia przy 1:5 jest 5:1, czyli 5, przy 1/10—10, przy 1/20—20. Wartości te (5, 10, 20) mnożymy przez zależoną ilość dodatnich wyników, a więc: 5×4 , 10×2 , 20×3 , dzielimy przez ilość wszystkich posiewów. Otrzymamy wówczas:

$$\frac{5 \times 4}{5} = 4; \quad \frac{10 \times 2}{5} = 4; \quad \frac{20 \times 3}{5} = 12$$

Z obliczonych w ten sposób ilości (4, 4, 12) największą cyfrą jest 12. Cyfra 12 jest większa od dopuszczalnej ilości 8, a więc ze względu na miano coli mleko należy uznać za niezdatne. Z przykładu tego widać, iż miano coli surowego zdrowotnie niepodejrzanego mleka jest pozytywne jeżeli przy rozcieńczeniu 1:10 wynik dodatni otrzymamy co najmniej w 4-ch posiewach z 5-ciu, lub też przy rozcieńczeniu 1:20 najmniej w dwóch posiewach z 5-ciu.

U przeciętnego rynkowego mleka miano coli jest pozytywne jeżeli w rozcieńczeniu 1:200 wynik dodatni otrzymamy co najmniej na 4 z 5-ciu zasianych płytek lub w rozcieńczeniu 1:400 najmniej na dwóch z 5-ciu posiewów.

Rozcieńczenie 1:5 lub 1:100 jest rozcieńczeniem raczej kontrolnym przy badaniach. Jeżeli przy tym rozcieńczeniu otrzymamy wynik zupełnie negatywny, lub tylko w jednym z 5-ciu posiewów pozytywny to nie bierzemy pod uwagę pozytywnych wzrostów przy innych rozcieńczeniach, a miano coli uważamy za negatywne.

Z Zakładu Weterynarii Rolniczej Uniwersytetu Poznańskiego.

Kierownik: Prof. dr STANISŁAW RUNGE.

S. RUNGE, A. OHIWOJNOWSKI

Przyczynę do gruźlicy u psów

Contribution to the tuberculosis in dogs.

Samoistna gruźlica u psów nie jest zjawiskiem zbyt częstym, jakkolwiek występuje, zdaje się, częściej niż to się na ogół przyjmuje.

Dane statystyczne dotyczące gruźlicy psów

są skąpe z powodu mniej uchwytnej materiału badawczego, zdobywanego dorywczo, zwykle przy okazji wykonywania sekcji psów padłych z innych przyczyn.