

BARBARA HUTNIKIEWICZ, EWA OSUCHOWSKA*, ZDZISŁAWA MADEJ

Ocena liczbowa mikroflory surowca mlecznego przy użyciu testu Lactocult

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Warszawska 108, 10-957 Olsztyn
 * Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego ART,
 10-957 Olsztyn-Kortowo

Niezadowalająca jakość mikrobiologiczna mleka jest sprawą wciąż sygnalizowaną w piśmiennictwie (2, 4, 5, 6, 7, 10, 11), a istotną przyczyną tej sytuacji są zaniedbania higieniczne podczas jego pozyskiwania i transportu. Uzasadnione więc wydawałoby się wprowadzenie częstej kontroli mikrobiologicznej surowca mlecznego dostarczanego do zlewni.

Obowiązująca obecnie metodyka badań bakteriologicznych mleka (8) jest pracochłonna i długotrwała, co utrudnia wprowadzenie stałej bieżącej kontroli i jest — być może — jedną z przyczyn braku wymogów mikrobiologicznych dla surowca mlecznego. Celowe i potrzebne wydają się zatem wszelkie próby upraszczania i skracania tej metodyki. Adamczyk i wsp. (1) wykazali dużą przydatność coliwskazów produkcji krajowej i NRD określających stopień skażenia mleka drobnoustrojami z grupy *E. coli*. Liczba tych bakterii uzyskana przy użyciu wymienionych coliwskazów odpowiadała mianu *coli* wykazanemu metodą fermentacyjną.

Wszechstronniejszy jest test firmy fińskiej ORION o nazwie „Lactocult”. Jest to płytka wkrecona szczelnie do tuby i pokryta z dwu stron podłożami. Po jednej stronie znajduje się podłoże odżywcze do oceny wzrostu ogólnej liczby jednostek wzrostowych bakterii tlenowych oraz oksydazo-dodatnich, a po drugiej stronie podłoże EMB-agar (Eosin Methylene Blue agar), na którym odczytuje się liczbę jednostek wzrostowych pałeczek z grupy okrężnicy. Do podłoża odżywczego dodany jest wskaźnik barwny, który ponadto pozwala na zorientowanie się o liczbie bakterii kwaszących. „Lactocult” może być przechowywany w temperaturze pokojowej przez okres pół roku. Przeprowadzanie posiewów polega na chwilowym zanurzeniu płytki z podłożami do badanego mleka. Przed właściwą inkubacją można płytki przetrzymać przez kilka godzin w temperaturze pokojowej bez ujemnego wpływu na wyniki końcowe. Odczyt wyników polega na wzrokowym porównaniu gęstości jednostek wzrostowych na powierzchni podłoża (bez ich liczenia) z odpowiednimi wzorcami zawartymi w instrukcji.

Polska Norma — PN-81/A-86002 — nie stawia obecnie warunku oceny mikrobiologicznej surowca mlecznego. Należy się jednak liczyć z wprowadzeniem w niedalekiej przyszłości obowiązku ilościowych oznaczeń mikroflory tego surowca, a więc i z koniecznością dostosowania

odpowiedniej metodyki badań. Propozycją takiej metody jest test Lactocult. Podjęto zatem badania, których celem było porównanie wyników uzyskanych przy użyciu tego testu z wynikami otrzymywanymi metodą tradycyjną.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 50 próbkach surowca mlecznego z 5 ferm bydła mlecznego. Próbkę laboratoryjną w ilości 200 ml pobierano w sposób jałowy, bezpośrednio po udoju, z konwi lub tanków. Przewożono ją następnie w warunkach chłodzonych, w czasie do 40 min., do laboratorium, gdzie niezwłocznie wykonywano badania.

W celu określenia metodą tradycyjną ogólnej liczby bakterii tlenowych oraz miana pałeczek z grupy okrężnicy wykonano posiewy ilościowe zgodnie z obowiązującą metodyką (8). Liczbę drobnoustrojów oksydazo-dodatnich oznaczono pokrywając jednostki wzrostowe znajdujące się na podłożu agarowym odczynnikiem do wykrywania obecności oksydazy cytochromowej metodą Gaby i Hadleya (3), uwzględniając przy odczycie te, które zabarwiły się na niebiesko.

Przy oznaczaniu testem „Lactocult” ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby pałeczek z grupy okrężnicy oraz bakterii oksydazo-dodatnich, posługiwano się dołączoną instrukcją firmy Orion. Najpierw zanurzono płytkę z podłożami w uprzednio dokładnie wymieszanym mleku tak, żeby obie powierzchnie płytki były zwilżone. Następnie płytkę wkrecono do tuby i inkubowano w temperaturze 30°C przez 16—24 godz., po czym odczytywano wyniki w sposób podany we wstępie, posługując się odpowiednimi wzorcami testu Lactocult (ryc. 1, 2, 3).

Przy określaniu ogólnej liczby bakterii tlenowych brano pod uwagę wszystkie jednostki wzrostowe, niezależnie od barwy i rodzaju, po tej stronie płytki, gdzie znajduje się podłoże odżywcze do oceny wzrostu bakterii tlenowych oraz oksydazo-dodatnich.

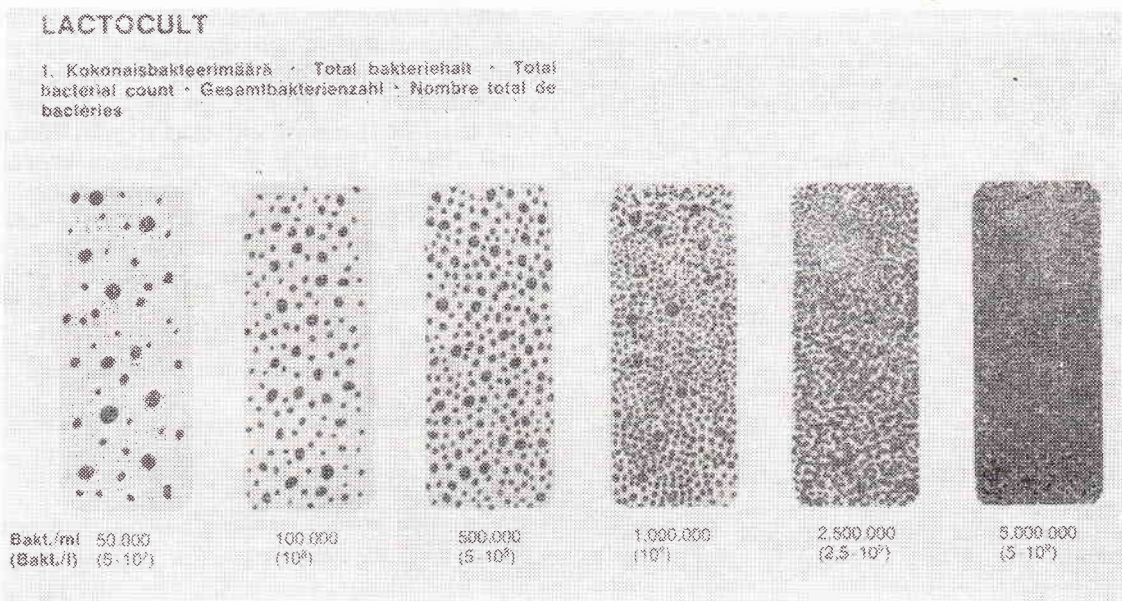
Aby oznaczyć liczbę pałeczek z grupy okrężnicy, uwzględniano gęstość jednostek wzrostowych ciemnych (brązowe, fioletowe) na powierzchni drugiego podłoża, czyli po drugiej stronie płytki. Szare lub bezbarwne kolonie pomijano.

W celu oszacowania liczby bakterii oksydazo-dodatnich, zwilżano po inkubacji wymienionym wyżej odczynnikiem powierzchnię podłoża odżywczego. Jednostki wzrostowe drobnoustrojów oksydazo-dodatnich stawały się niebiesko-czarne i one były uwzględniane przy porównywaniu z wzorcami.

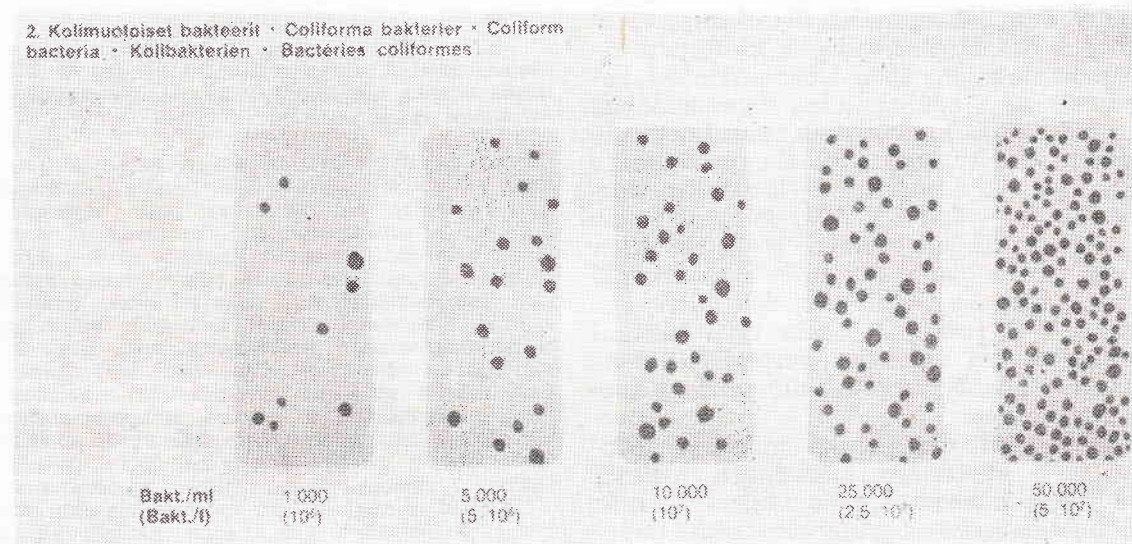
Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej metodą regresji liniowej według testu t-Studenta (9). Otrzymane współczynniki korelacji między wynikami obu porównywanych metod obliczono przy liczbie stopni swobody $r=48$ i przy wartości krytycznej rozkładu $t=2,01$ dla poziomu istotności $\alpha \leq 0,05$.

Wyniki i omówienie

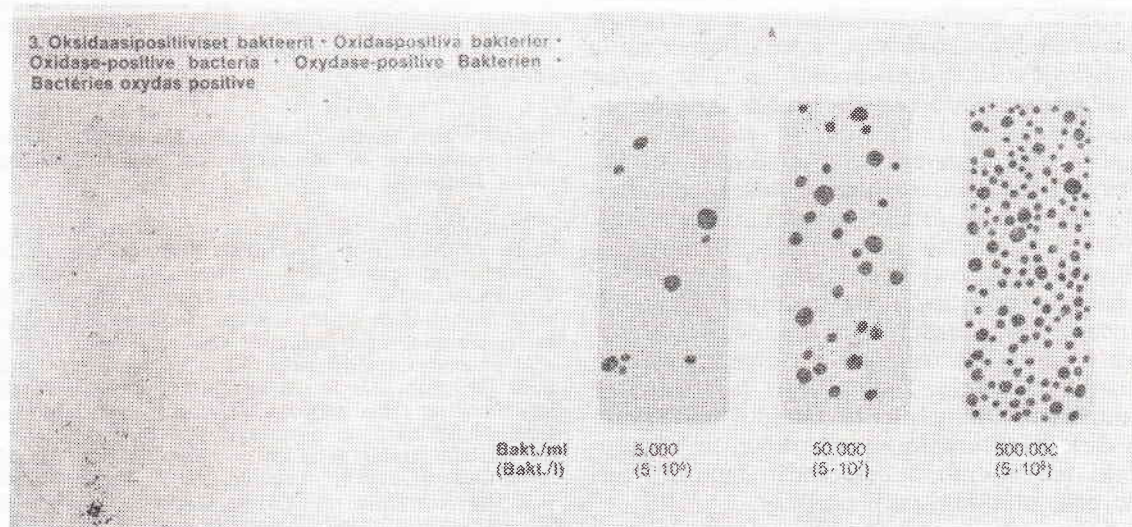
Porównanie wyników otrzymanych przy użyciu testu Lactocult z danymi uzyskanymi metodą tradycyjną przedstawiono w tabeli 1.



Ryc. 1. Lactocult. Ogólna liczba bakterii tlenowych



Ryc. 2. Lactocult. Liczba pałeczek z grupy okrężnicy



Ryc. 3. Lactocult. Liczba bakterii oksydazo-dodatnich

Tab. 1. Porównanie wyników badań bakteriologicznych 50 próbek surowca mlecznego uzyskanych testem Lactocult oraz metodą tradycyjną

Kierunek badania	Liczba wyników			Współczynnik korelacji
	jednakowych	wyrażonych tą samą potęgą	różniących się o jeden rząd wielkości	
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych	6	31	13	0,769
Liczba, miano pałeczek z grupy okrężnicy	—	30	12	0,822
Liczba drobnoustrojów oksydazododatnich	—	33	17	0,574

W przypadku oznaczania pałeczek z grupy okrężnicy, aby nie zmieniać obowiązującej w rutynowych badaniach metody, która przewiduje określanie miana tych drobnoustrojów, zestawiono miano z ogólną liczbą wymienionych bakterii, odczytaną na wzorcach testu Lactocult. Zakres wzorców w instrukcji dla omawianego kierunku badania odpowiadał tylko dwom wartościom miana — 0,01 i 0,0001, co zmniejszyło ilość porównywanych próbek. W 6 próbkach liczba pałeczek z grupy okrężnicy przekroczyła najwyższą wartość (50 000) uwzględnioną na wzorcu, a w 2 próbkach liczba tych bakterii była mniejsza, niż najniższa wartość (1000) na wzorcu. Wyników tych próbek nie poddano analizie statystycznej.

W zasadniczych dla jakości mikrobiologicznej surowca mlecznego kierunkach badania (ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych oraz miano, liczba pałeczek z grupy okrężnicy) otrzymane porównywanymi metodami wyniki można uznać za odpowiadające sobie, o czym świadczą współczynniki korelacji. Zaznacza się większe zróżnicowanie wyników w przypadku oznaczania drobnoustrojów oksydazo-dodatnich. Przyczyną tego jest prawdopodobnie zbyt mała ilość wzorców w instrukcji Lactocult w stosunku do uwzględnionego tam zakresu wielkości, dla tego kierunku badania. Różnica gęstości jednostek wzrostu między sąsiednimi wzorcami instrukcji jest duża i optyczne porównanie wyników z wzorcem mogło prowadzić do błędnej oceny.

Trudno na podstawie wykonanych badań c pełną ocenę dokładności testu Lactocult, ale jest on godny uwagi ze względu na swoją prostotę i łatwość stosowania. Zaletą jego jest również mała możliwość popełnienia błędów metodycznych i duża powtarzalność wyników, uzyskiwana dzięki znacznemu uproszczeniu techniki posiewów oraz standaryzacji podłoży.

Test Lactocult może być szczególnie przydatny do badań rutynowych, których celem było-

by stwierdzenie czy liczba badanych bakterii nie przekracza określonego wymogami poziomu, a zatem po wprowadzeniu norm mikrobiologicznych dla surowca mlecznego. Dużą zaletą testu Lactocult jest także krótki czas uzyskiwania wyników (16—24 godz.). W przypadku szerokiego zastosowania tego testu w naszym kraju, można ewentualnie dostosować wymogi mikrobiologiczne dla surowca mlecznego do możliwości diagnostycznych omawianego testu.

Piśmiennictwo

1. Adamczyk E., Chmielowski W.: *Medycyna Wet.* 31, 633, 1975.
2. Barnard S. E.: *J. Dairy Sci.* 62, 34, 1979.
3. Burbianka M., Płużka A.: *Mikrobiologia żywności. PZWL* 1977, s. 74.
4. Ducate R. I., Gongh R. M.: *J. Dairy Sci.* 62, 196, 1972.
5. Kafel S., Radkowski M.: *Medycyna Wet.* 42, 606, 1986.
6. Kurek C.: *Medycyna Wet.* 41, 17, 1985.
7. Majewski T.: *Medycyna Wet.* 41, 21, 1985.
8. PN-77/A-86931 Mleko i przetwory mleczne. Badania mikrobiologiczne.
9. Seber G. A. F.: *Linear Regression Analysis.* John Wiley, London 1977.
10. Sukren G., Meeschen W.: *Dt. Milchwirtschaft* 30, 1128, 1979
11. Trawńska I., Kryńska E.: *Medycyna Wet.* 38, 600, 1982.

Adres autora: lek. wet. Barbara Hutnikiewicz, ul. Kołobrzaska 13H m. 76, 10-445 Olsztyn

Гутникевич Б., Осуховская Э., Мадей З. — Числовая оценка микрофлоры молочного сыра с применением теста Lactocult

Cel pracy polegał na porównaniu wyników, otrzymanych z zastosowaniem testu „Lactocult”, z rezultatami, otrzymanymi przy pomocy mikrobiologicznych metod, obowiązujących w настоящее время. Исследования провели на 50 пробах молочного сыра, определяя общее число кислородных микроорганизмов, титр и число палочек из группы ободочной кишки, а также число оксидаза-положительных микроорганизмов. Тест „Lactocult”, из-за простоты применения и значительного сокращения времени исследований кажется особенно пригодным в случае микробиологических рутинных исследований, целью которых было бы обнаружение, не превысило ли число исследуемых бактерий уровня, определенного требованиями.

Сравнивая полученные результаты при помощи теста t-Стюдента, получили следующие коэффициенты корреляции: для общего числа кислородных микроорганизмов — 0,769, в случае палочек из группы ободочной кишки — 0,822, а также в случае оксидазо-положительных микроорганизмов — 0,574. Полученные результаты статистически существенны.

Hutnikiewicz B., Osuchowska E., Madaj Z. — Quantitative evaluation of microflora of milk raw material using Lactocult test

The objective of the work was to compare the results obtained in the Lactocult test and these obtained during commonly used microbiological examinations. The examinations were done with 50 samples of raw milk material in which a total number of aerobic bacteria, number and index of bacteria from Coli group and number of oxidase-positive bacteria was determined. The test due to its simplicity and shortening of examination time may be especially useful in the routine microbiological examinations to find if the number of bacteria in a examined sample is in normal limits. Comparing the obtained results by the T-Student test the following correlation coefficients were found: for a general number of aerobes — 0.769 for Coli group — 0.822, for oxidase-positive bacteria — 0.574. These results differ statistically significantly.