

ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN — POLONIA

VOL. XVI, 35

SECTIO D

1961

Z Katedry i Zakładu Nauki o Środkach Spożywczych i Higieny Żywnienia
Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. dr Alfred Trawiński

Jadwiga ZAWADZKA

Badanie mleka rynkowego w Lublinie na zawartość drobnoustrojów

**Исследования над количеством микроорганизмов в молоке
продаваемом на базарах Люблина**

Bacteriological Examination of Milk Put on the Market in Lublin

Mleko dzięki swemu składowi chemicznemu stanowi dobre podłoże dla rozwoju drobnoustrojów (bakterii, pleśni). Zakażenie mleka zależy w dużej mierze od sanitarno-higienicznych warunków produkcji; przeważnie nie otrzymuje się mleka zupełnie wolnego od drobnoustrojów (1). Już w wymieniu krowy mleko zostaje zakażone bakteriami saprofitycznymi, toteż nawet przy aseptycznym udoju zdrowych krów 1 ml mleka może zawierać do 3 000 bakterii (2). Mleko ulega większemu zakażeniu w czasie niehigienicznego udoju oraz w obrocie handlowym, tj. w okresie do chwili spożycia, zależnie od transportu i przechowywania (2). Pewien wpływ na zakażenie mleka mają sezonowe wahania klimatyczne, jak temperatura, nasłonecznienie, ciśnienie powietrza, długotrwałe opady i burze. Największe ilości bakterii w mleku zanotowano latem, mniejsze jesienią i wiosną; w zimie następuje spadek ilości drobnoustrojów w mleku (2, 3, 4). Suche burze i wiatry sprzyjają zanieczyszczeniu mleka, w związku z czym wzrasta ilość bakterii (3).

W poszczególnych krajach są ustalone normy bakteriologiczne, określające dopuszczalną ilość drobnoustrojów w 1 ml mleka. W Anglii uznaje się jako pierwszej kategorii mleko, zawierające w 1 ml nie więcej niż 30 000 drobnoustrojów, mleko drugiej kategorii — 200 000. W Stanach Zjednoczonych ustalono skalę norm w granicach od 10 000—200 000 drobnoustrojów w 1 ml mleka, w Niemczech 150 000, w Meksyku — 50 000. W Polsce ustawa o dozorze nad mlekiem i jego przetworami z 9 XII 1932 r. przyjmuje za górną granicę ilości bakterii w jednym ml 250 000 (3).

O ujemnym wpływie transportu i przechowywania w warunkach nie zawsze zgodnych z wymogami higieny, świadczy mleko rynkowe i dostarczane przez rolników do zlewni zarówno w miesiącach letnich, jak i zimowych, które zawiera o wiele mniej drobnoustrojów, niż mleko przywożone ze zlewni do spółdzielni mleczarskich (2).

Badania mleka dostarczanego przez poszczególne zlewnie do okręgowej spółdzielni mleczarskiej w Lublinie wykazały w większości przypadków bardzo wy-

soką liczbę drobnoustrojów, szczególnie w miesiącach letnich i jesiennych, dochodzącą nawet do 3 miliardów w 1 ml mleka. Stan ten spowodowany jest wieloma czynnikami, jak niehigieniczne utrzymanie inwentarza, nieodpowiednie warunki udoju i transportu mleka, brak urządzeń chłodniczych w zlewniach, w wyniku czego mleko dostarczane przez zlewnie nie odpowiada normom polskim ani też międzynarodowym (4). W braku urządzeń chłodniczych, można mleko zakażone bakteriami w nieznacznym stopniu przechowywać w temperaturze pokojowej (+ 15 do + 20°C) przez około 7 godzin, mleko znacznie zakażone nadaje się do natychmiastowego spożycia po uprzedniej pasteryzacji (6).

Do ilościowego oznaczania drobnoustrojów w mleku służą liczne metody. W mleczarstwie stosuje się przeważnie metodę reduktazową, polegającą na czasie odbarwienia błękitu metylenowego przez zawarte w mleku drobnoustroje. W mleku jako doskonałym środowisku dla rozwoju drobnoustrojów, następuje szereg procesów pozwalających na określenie za pomocą odpowiedniego odczynnika w przybliżeniu liczby zawartych drobnoustrojów (2). Chodzi szczególnie o rozwój bakterii fermentacji mlekowej, które powodują obniżenie potencjału redukcyjno-oksydacyjnego w mleku. Wraz z intensywnym rozwojem bakterii wzrasta zapotrzebowanie na akceptory wytworzonego wodoru. Normalnie wodór jest wiązany przez tlen cząsteczkowy rozpuszczony w mleku. Jako sztuczny akceptor najczęściej stosowany jest błękit metylenowy, który po zużyciu przez bakterie tlenu zawartego w mleku, wiąże wodór i przechodzi w zredukowaną formę bezbarwną (1). Proces odbarwienia błękitu metylenowego pozostaje w związku z ilością drobnoustrojów i intensywnością ich rozwoju: im większa jest ilość drobnoustrojów i ich aktywność, tym szybciej następuje odbarwienie.

Oprócz błękitu metylenowego w próbie reduktazowej mogą być użyte również inne barwniki. W r. 1929 Paesch i Simmert wprowadzili do mleczarstwa barwnik resazuryne (1), której początkowa barwa pastelowoniebieska przechodzi w trakcie redukcji przez rozmaite stadia barw pośrednich w różową i w końcu znika.

Wobec tego, że poziom potencjału redukcyjno-oksydacyjnego, przy którym zachodzi redukcja barwnika, nie zawsze jest zgodny z potencjałem właściwym dla błękitu metylenowego, również interpretacja czasów odbarwienia w odniesieniu do wartości higienicznej mleka musi być odpowiednio zmodyfikowana (1). Przy użyciu do próby reduktazowej resazuryny, w warunkach laboratoryjnych, bada się zmianę zabarwienia po upływie jednej godziny, a w praktyce mleczarskiej czas trwania próby skraca się nawet do 10 minut (5). Pomimo jednak, że próba ta ze względu na szybkość jest dogodniejsza do celów mleczarskich, nie jest zupełnie miarodajna, daje bowiem z bardzo dobrymi próbami mleka wyniki mniej dokładne, niż próba z błękitem metylenowym. Również temperatura mleka, nie mająca wielkiego wpływu na próbę z błękitem metylenowym, wpływa znacznie na próbę z resazuryną.

Inną, klasyczną metodą oznaczania ilości drobnoustrojów w mleku jest próba płytowa, polegająca na wysiewaniu na podłoże agarowe, o odpowiednim składzie, roztworów mleka i obliczaniu wyrosłych kolonii.

Obliczanie drobnoustrojów w mleku umożliwia także metoda bezpośredniego mikroskopowania, którą wykonuje się następująco: do 5 ml mleka dodaje się 0,18 ml 2% roztworu karbolowego błękitu metylenowego oraz 0,02 ml 30% roztworu ługu sodowego. Całość wstrząsa się i ogrzewa przez kilkanaście sekund w temperaturze +70°C, po czym pobiera jałową, kalibrowaną pipetą 20 mm³ otrzymanego roztworu, wylewa na szkiełko przedmiotowe z oznaczoną powierzchnią

500 mm² i dokładnie rozciera eż. Pod mikroskopem oblicza się ilość drobnoustrojów zawartych na pewnej określonej powierzchni, następnie przelicza się na 1 ml mleka (3). Przy użyciu tej metody otrzymuje się wyniki lepsze niż przy metodzie płytowej.

BADANIA WŁASNE

Celem niniejszej pracy było badanie mleka dostarczanego przez rolników na rynki lubelskie. Próby (każdorazowo 10 różnych) pobierano do wyjałowionych, szczelnie zamkniętych probówek ze wszystkich miejsc sprzedaży na terenie miasta Lublina. Badania przeprowadzano bezpośrednio po pobraniu prób. W celu uwzględnienia wpływu sezonowych wahań temperatury na stopień zakażenia mleka, wykonano badania równocześnie metodą reduktazową i płytową ze 100 próbami mleka w okresie od 15 lutego do 25 marca oraz z tą samą ilością prób w okresie od 15 kwietnia do 10 czerwca.

W metodzie reduktazowej jako odczynnika używałam roztworu błękitu metylenowego (195 ml wody destylowanej + 5 ml nasyconego, alkoholowego roztworu błękitu metylenowego), przygotowywanego co tydzień świeżo. Sposób wykonania próby: do 10 jałowych probówek wlewano po 10 ml badanego mleka (do każdej probówki mleko z innej próby), po czym dodawano po 0,5 ml roztworu błękitu metylenowego (przygotowanego jak wyżej) i natychmiast zamykano wyjałowionym, gumowym korkiem oraz dokładnie mieszano przez kilkakrotne przewracanie probówki. Następnie bezpośrednio sprawdzano co kilkanaście minut wystąpienie odbarwienia oraz umieszczano równocześnie probówki z mlekiem i błękitem metylenowym na 30 minut w ciemnym miejscu w łaźni wodnej w temperaturze +37°C, przy czym odbarwienie błękitu metylenowego następowało szybciej i uzyskiwano wyniki wyższe w porównaniu z wynikami metody płytowej.

Ze względu na długość okresu, po jakim błękit metylenowy ulegał odbarwieniu podzielono mleko na 4 klasy:

I — mleko dobre, odbarwiające błękit metylenowy po 5 godzinach, co odpowiadało zawartości ok. 500 tysięcy drobnoustrojów w 1 ml mleka.

II — mleko średnie, odbarwiające błękit metylenowy w ciągu 2—5 godzin; zawartość bakterii wynosiła od 500 tysięcy do 4 milionów w 1 ml mleka.

III — mleko miernej jakości, w którym odbarwienie błękitu metylenowego następowało w ciągu 20 minut do 2 godzin, zawierało 4 miliony do 20 milionów bakterii w 1 ml mleka.

IV — mleko bardzo złe, odbarwiające błękit metylenowy w okresie krótszym niż 20 minut, zawierało ponad 20 milionów drobnoustrojów w 1 ml mleka (2).

Mleko wyjątkowo dobrej jakości, zawierające mniej niż 100 tysięcy bakterii w 1 ml, odbarwia się po czasie dłuższym niż 7 godzin.

Dla dokładniejszego ustalenia czasu odbarwienia prób mleka wykonywano jednocześnie, w warunkach jak wyżej, próby kontrolne z 10 ml mleka w jałowej probówce bez dodatku roztworu błękitu metylenowego. Mleko uważano za odbarwione, gdy ono odbarwiło się w całości, lub gdy niebieskie zabarwienie utrzymywało się jedynie w cienkiej, wierzchniej warstwie.

Każdą próbę mleka badałam jednocześnie metodą płytową, polegającą na bezpośrednim posiewie odpowiednich roztworów mleka na podłożu agarowym o następującym składzie: bulion odżywczy — 92,0 ml, agar — 2,0 g, pepton — 5,0 g, glukoza — 1,0 g.

W celu obliczenia ilości drobnoustrojów w 1 ml mleka przygotowywano z każdej próby mleka rozcieńczenia 1/1000, 1/10 000, 1/100 000 i 1/200 000, z których pobierano jałową pipetą po 1 ml, przenoszono do 9 ml 2% podłoża agarowego rozpuszczonego w probówce i ogrzanego do temperatury ok. +40°C i po zmieszaniu wylewano do płytek Petriego, które po zestaleniu podłoża umieszczano w cieplarni w temperaturze +37°C na 48 godzin, po czym obliczano ilość wyrosłych kolonii i porównywano z wynikami próby reduktazowej.

Procentową ilość prób zaliczonych na podstawie otrzymanych wyników do poszczególnych czterech kategorii, podanych wyżej, uwzględnia poniższe zestawienie:

Kategoria mleka	Ilość bakterii	Okres redukcji	15II — 25III (ilość prób w %)	15IV — 10VI (ilość prób w %)	Średnia ilość prób w %
I	do 500 tys. w 1 ml	ponad 5h30'	67%	20%	43,5%
II	500 tys. do 4 milion.	2h—5h30'	25%	51%	38 %
III	4 miliony do 20 milion.	20'—2h	6%	20%	13 %
IV	ponad 20 milion.	do 20'	2%	9%	5,5%

Wyniki otrzymane przy badaniu prób mleka rynkowego w Lublinie okazały się w dość dużej mierze zgodne co do ilościowej zawartości drobnoustrojów, oznaczonej metodą płytową i metodą reduktazową.

Wyrosłe na podłożu agarowym kolonie bakterii oznaczono w przeważającej ilości prób jako gronkowce białe i żółte (*Staphylococcus*

albus et aureus), laseczki sienne (*B. subtilis*) i ziemniaczane (*B. mesentericus*) oraz w dwu próbach pałeczki krwiste (*Chromobacterium prodigiosum*), nadto laseczki zarodnikujące, Gram dodatnie. Drobnoustrojów chorobotwórczych nie wyosobniono.

Próby mleka pobrane w okresie wiosennym (od 15 IV do 10 VI) wykazują większą zawartość drobnoustrojów niż próby pobrane porą zimową (od 15 II do 25 III), co jest spowodowane wzrostem temperatury.

Zgodność wyników otrzymanych podczas badania metodami reduktazową i płytową wskazuje, że obydwie metody są dość miarodajne. Metoda reduktazowa jest bardziej praktyczna ze względu na krótszy czas badania. Na 200 wykonanych prób mleko zawierało: w 1 ml 43,5% do 500 tys., 38% do 4 milionów, 13% do 20 milionów i 5,5% ponad 20 milionów bakterii.

PIŚMIENNICTWO

1. Pijanowski E.: Chemia i higiena mleka, 113, 115, 1948.
2. Leopold J.: Podział mleka na klasy na podstawie oznaczenia zdolności reduktazowej w odniesieniu do mleka mleczarnianego i rynkowego. Roczniki P. Z. H. 1, 283—290, 1950.
3. Skrzyńska J.: Mikrobiologiczna statystyka z rocznej produkcji mleka rynkowego (Krakowa i Balic) w odniesieniu do wpływów meteorologicznych. Med. Wet. 5, 532—536, 1949.
4. Horubała A., Król-Zuchowska B., Obal J.: Ocena mikrobiologiczna mleka dostarczanego do okręgowej spółdzielni mleczarskiej w Lublinie. Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska Sec. E. Agricultura, 238—301, 1951.
5. Weber M.: Oznaczanie świeżości mleka za pomocą resazuryny i błękitu metylenowego. Roczniki P. Z. H., 3, 185—196, 1952.
6. Szember A.: Wpływ temperatury na psucie się mleka. Przemysł rolny i spożywczy, 7, 272—275, 1953.

РЕЗЮМЕ

Автором для качественного и количественного определения микроорганизмов брались пробы молока на базарах в районе г. Люблина. Исследования проводились редуктазным методом при использовании в качестве реактива соответствующего раствора метиленблау, а также пластиночным методом, заключающемся в высеивании на агаровый субстрат разведенного молока. В общей сумме обследовано 200 проб молока, причем 100 проб за время с 15.II по 25.III, а остальных 100 проб — с 15.IV по 10.VI. Из общего числа 200 проб 43,5% содержало в 1 мл молока до 500.000 бактерий, 38% — до 4.000.000; 13% — до 20.000.000 и 5,5% — свыше

20.000.000 бактерий. В пробах молока, взятых зимой для исследований, бактерий оказалось меньшее количество, чем в пробах, которые брались весной. Болезнетворные бактерии не были обнаружены.

S U M M A R Y

Samples of market milk collected in the town of Lublin were examined bacteriologically. The examination was conducted by the reducatase method with the use of a suitable solution of methylene blue as reagent, and by the plate method, consisting in inoculating diluted samples of milk into agar medium. Altogether 200 samples were examined; 100 samples were collected in the period from 15.II. to 25.III., the remaining 100 from 15.IV. to 10.VI. Out of these 200 samples, 43.5 per cent contained up to 500.000 bacteria, 38 per cent — up to 4.000.000, 13 per cent — up to 20.000.000, and 5.5 per cent — more than 20.000.000 bacteria. Samples collected in the winter season contained less microorganisms than those collected in spring. No pathogenic microorganisms were found.