Badanie bakteriologiczne mleka rynkowego w Krakowie

Bacteriological grading of Kraków market milk

Napisała

Kazimiera Ratajówna

(Wpłynęło do redakcji dnia 9 lipca 1938 — Received for publication July 9, 1938)
(Z jednym wykresem w tekście — With one diagram in the text)

Badanie mleka przeprowadzono w czasie od 27 kwietnia do 27 czerwca 1936. Zbadano 350 prób, przy czym ilość bakterii zawartych w 1 cm³ mleka liczono:

- 1) metodą mikroskopową Breeda,
- 2) metodą posiewów na agarze,

przy równoczesnym zastosowaniu w większości wypadków próby reduktazy, próby fermentacyjnej i próby katalazy.

Badanie to miało na celu:

- 1) wykazać ilość bakterii w mleku rynkowym,
- 2) wykazać wpływ zastosowanych metod na jakość wyników,
- 3) zbadać zależność między ilością drobnoustrojów w mleku, a stanem ciepłoty atmosferycznej w danym okresie.

W Polsce istnieje ustawa o dozorze nad mlekiem i jego przetworami z dnia 9 XII 1932, która przewiduje granicę maksymalną ilości bakterii w 1 cm³ mleka wyborowego na 250.000. W jakim jednak stopniu odpowiadają normy ustawy prawdziwemu stanowi rzeczy istniejącemu na krakowskim rynku mlecznym, przedstawiono poniżej.

Próbki mleka do badania pobierano najpierw z mleczarni krakowskich, ewentualnie kupowano drobne ilości mleka od wieśniaczek na rynku.

Przeważająca jednak ilość prób była pobrana przez kontrolerów Filii Państwowego Zakładu Higieny i Badania Środków Spożywczych w Krakowie¹.

¹ Za bardzo życzliwą pomoc udzieloną mi w pracy przez dostarczanie materiału do badania składam na tym miejscu najgorętsze podziękowanie p. doc. drowi J. Hellerowi, kierownikowi Filii Państwowego Zakładu Higieny w Krakowie.

Bezpośrednio po otrzymaniu próbek, to jest koło godziny 9 rano, przeprowadzono, względnie nastawiono wszystkie wymienione próby. Przy przeprowadzaniu prób opierano się przede wszystkim na technice stosowanej w Stanach Zjednoczonych Ameryki Północnej (9).

Z zestawień liczbowych widać, że ilość bakterii zawarta w mleku sięga niekiedy setek milionów w 1 cm^3 , odbiegając tym samym tak bardzo od przyjętych norm ustawy mleczarskiej. W badanych 350 próbkach mleka rynkowego krakowskiego stwierdzono przeciętnie w 1 cm^3 według metody mikroskopowej 50—100 milionów bakterii, a według metody posiewów 20—50 milionów. Wyniki procentowo przedstawiają się następująco (tabela I):

TABELA (TABLE) I
Ilość bakterii — Bacterial counts

	Metoda mikroskopowa Microscopic count		Metoda płytkowa Plate count	
	Ilość prób Nr. of samples	%	Ilość prób Nr. of samples	%
1. Do 1 miliona w 1 cm^3 To one million in 1 c. c.	13	3.7	30	9
2. Do 10 milionów w 1 cm^3 To 10 millions in 1 c. c.	61	17.4	63	18.5
3. Do 20 milionów w 1 cm^3 To 20 millions in 1 c. c.	36	10.3	74	21
4. Do 50 milionów w 1 cm^3 To 50 millions in 1 c. c.	102	30	106	30.6
5. Do 100 milionów w 1 cm^3 To 100 millions in 1 c. c.	76	22	47	14
6. Do 200 milionów w 1 cm^3 To 200 millions in 1 c. c.	46	13	23	6.7
7. Do 300 milionów w 1 cm^3 i ponad To 300 millions in 1 c. c. and over	12	3.4	3	0.9

Najwyższa ilość bakterii ze wszystkich tych prób wynosiła 364 milionów w 1 cm^3 wg metody mikroskopowej, a 256 milionów

wg metody posiewów; najniższa 424 tysiące w 1 cm³ obliczona metodą mikroskopową, obliczona zaś metoda płytkową 200 tysięcy. Dane te dają wyobrażenie o szerokości granic, w jakich waha się liczba bakterii w 1 cm³ mleka rynkowego. Ponieważ ilość bakterii w mleku świeżo i czysto udojonym pochodzącym od zdrowej krowy jest stosunkowo nieznaczna, więc wyniki badania świadczą o tym, że mleko jest uzyskiwane i przechowywane w warunkach korzystnych dla rozwoju drobnoustrojów.

Obliczając ilość mikroorganizmów metodą mikroskopową i metodą posiewów, porównano zgodność między tymi metodami. Stwierdzono, że liczenie mikroskopowe daje zawsze wyższe liczby od liczenia płytkowego, a to dlatego, że pod mikroskopem liczono wszystkie poszczególne bakterie. W powyższych badaniach 54% prób wykazało, że liczenie mikroskopowe jest wyższe o 50% od liczenia płytkowego, natomiast 3·7% wykazuje wyższy wynik w liczeniu płytkowym (tabela II). Ten ostateczny wynik mógł być spowodowany niewystarczającą dokładnością samych metod.

TABELA (TABLE) II

Zależność pomiędzy liczeniem płytkowym a mikroskopowym — The relation between the plate and microscopic counts

	Ilość prób Nr. of samples	%
1. % prób, gdzie liczenie płytkowe jest wyższe od mikrosk. % of samples with higher plate counts	13	3·7
2. % prób, gdzie liczenie mikrosk. jest wyższe o 50% od płytk. % of samples with 50% higher microscopic counts	191	54
3. % prób, gdzie liczenie mikrosk. jest wyższe o 100% od płytk. % of samples with 100% higher microscopic counts	97	27·7
4. % prób, gdzie liczenie mikrosk. jest wyższe o 200% od płytk. % of samples with 200% higher microscopic counts	25	7·14
5. % prób, gdzie liczenie mikrosk. jest wyższe o 300% od płytk. % of samples with 300% higher microscopic counts	24	6·85

Stwierdzono również stosunek, jaki zachodzi między ilością kolonii na płytce z rozcieńczenia wyższego (1:1,000.000) do niższego (1:100.000) stosowanego przy liczeniu płytkowym, a mianowicie liczba kolonii z rozcieńczenia wyższego w 66% (207) prób była wyższa o 100% od ilości kolonii na płytce z rozcieńczenia niższego, a tylko w 6.45% ilość ta była równa w obu rozcieńczeniach (tabela III).

TABELA (TABLE) III

Liczenie płytkowe w dwu różnych rozcieńczeniach — Plate counts in two different dillutions

	Ilość prób Nr. of samples	%
1. Na płytkach 1:1,000.000 i 1:100.000 równo Equal counts in dillutions 1:1,000.000 and 1:100.000	20	6.45
2. Na płytkach 1:1,000.000 więcej o 25—50% niż na płytce 1:100.000 In dillution 1:1,000.000 25—50% higher as in 1:100.000	47	15.16
3. Na płytkach 1:1,000.000 więcej o 50—100% niż na płytce 1:100.000 In dillution 1:1,000.000 50—100% higher as in 1:100.000	36	11.61
4. Na płytkach 1:1,000.000 więcej niż 100% niż na płytce 1:100.000 In dillution 1:1,000.000 more than 100% higher as in 1:100.000	207	66.8

Próba reduktazy służyła tylko do pierwszego zorientowania się w ilości bakterii w danej próbce. W kilkunastu wypadkach otrzymano, stosując próbę reduktazy, wyniki niezgodne z liczeniem mikroskopowym i płytkowym, jak np. dnia 9 VI 1936 jedna próba wykazała w liczeniu mikroskopowym 60 milionów bakterii w 1 cm³, a w płytkowym 22 miliony, lub dnia 18 V 1936 inna próba wykazała mikroskopowo 62 miliony bakterii w 1 cm³, płytkowo 4 miliony w 1 cm³ przy próbie reduktazy trwającej ponad 5½ godzin. Istoty tej niezgodności dalej nie badano.

Szczegółowy przebieg próby reduktazy przedstawiono w tabeli IV.

TABELA (TABLE) IV
Próba reduktazy — Reductase test

	Ilość prób Nr. of samples	%
a) Reduktaza dodatnio do 20 minut Positive in 20 minutes	90	25·93
b) Reduktaza dodatnio od 20 minut do 2 godzin Positive between 20 min. and 2 hours	134	38·9
c) Reduktaza od 2 godzin do 5½ godzin Positive between 2 hours and 5½ hours	83	23·91
d) Reduktaza ujemnie ponad 5½ godzin Negative in time over 5½ hours	40	11·52

Wyniki próby fermentacyjnej (tabela V) otrzymano na podstawie wyglądu skrzepu ujmując je w 4 grupy, a mianowicie:

- 1) skrzep jednolity — brak lub ślad serwatki,
- 2) skrzep jednolity — nieliczne pęcherzyki gazu,
- 3) skrzep niejednolity — nieco więcej gazu i serwatki,
- 4) skrzep porozrywany, strzępiasty — dużo serwatki.

TABELA (TABLE) V
Próba fermentacyjna — Fermentation test

	Ilość prób Nr. of samples	%
1. Skrzep jednolity — brak lub ślad serwatki Firm, solid curd — little or no whey	118	48·2
2. Skrzep jednolity — nieliczne pęcherzyki gazu i nieco serwatki Firm, solid curd — few gas holes, some whey	20	8·2
3. Skrzep niejednolity — nieco więcej gazu i serwatki Curd soft — more gas — more whey	37	15
4. Skrzep porozrywany, strzępiasty — dużo serwatki Curd shrunken, ragged and gassy	70	28·6

Miedzy próbą reduktazy, a stanem skrzepu (met. fermentacyjna) istnieje stały związek, np. jeżeli próba reduktazy trwa bardzo krótko, tzn. odbarwienie błękitu metylenowego nastąpi w ciągu kilku lub najwyżej kilkunastu minut, skrzep jest bardzo silny, jednolity bez serwatki. To szybkie odbarwienie i otrzymanie jednolitego skrzepu pochodzi od dużej ilości typowych bakterii powodujących kwaśnienie mleka, a zawartych w danej próbce. Przy reduktazie trwającej do 20 minut 69·5% daje skrzep silny, jednolity; są to próbki, które wykazały przeciętną ilość bakterii wg metody mikroskopowej 50—100 milionów w 1 cm³, a met. posiewów 20—50 milionów w 1 cm³. Natomiast te próbki mleka, w których próba reduktazy wskazywała na małą liczbę bakterii, wykazywały w próbie fermentacyjnej obfitość gazu (75% prób), co świadczyło o obecności dużej liczby drobnoustrojów z grupy *Bacterium coli* — *aërogenes*.

Z częścią próbek mleka (110) przeprowadzono również próbę katalazy. Próba ta ma na celu zorientowanie co do ilości komórek ustrojowych głównie leukocytów pochodzących z wymienia. Im więcej leukocytów w mleku, tym więcej zostaje wytworzonego tlenu z wody utlenionej. Nadmiar leukocytów w mleku, tj. ponad 500.000 w 1 cm³, oraz wydzielenie tlenu więcej niż 16% w stosunku do objętości mieszaniny mleka z wodą utlenioną, wskazują przede wszystkim na zapalenie wymion (*mastitis*) u krów, od których mleko pochodzi. We wielu z badanych próbek stwierdzono przy liczeniu mikroskopowym metodą Breeda bardzo liczne leukocyty, oraz łańcuszki paciorkowców, typowych dla *mastitis*. Wyniki próby katalazy zestawione są w tabeli VI.

TABELA (TABLE) VI
Próba katalazy — Catalase test

	Ilość prób Nr. of samples	%
1. Metoda katalazy wykazała do 16% gazu 16% of gas or less	42	38
2. Metoda katalazy wykazała od 16—50% gazu 16—50% of gas	59	53·6
3. Metoda katalazy wykazała ponad 50% gazu Over 50% of gas	9	8

Charakterystyczna jest zależność między metodami np. metodą reduktazy, fermentacyjną i katalazy, a ilością bakterii w 1 cm^3 mleka. Jeżeli z obliczeń metodą Breeda w 1 cm^3 znajduje się 50—100 milionów bakterii, a metodą płytkową 20—50 milionów, to próba reduktazy trwa do 20 minut, skrzep (próba fermentacyjna) jest na ogół jednolity, bez serwatki, a metoda katalazy daje ponad 16—50% gazu w stosunku do mleka. Również metodą mikroskopową wykazać można zawartość leukocytów w próbkach mleka, a ponieważ wynik próby katalazy zależy przede wszystkim od zawartości komórek ustrojowych w mleku, dlatego już przy liczeniu bakterii metodą mikroskopową można było wnosić o wyniku próby katalazy na podstawie ilości znalezionych ciałek ropnych.

Jednym z czynników, który wpływa wybitnie na rozwój bakterii mleka, obok czystości i czasu jaki upłynął od chwili udoju, a którego przy mleku targowym nie można sprawdzić, jest bezwątpienia ciepłota otoczenia, bowiem z podwyższeniem jej zwiększa się znacznie zawartość bakterii, o czym świadczy następujący przykład: w dniu 27 IV 1936 ciepłota (średnia dzienna z P. I. M. dla okręgu krakowskiego) wynosiła 6.4°C , a średnia ilość bakterii, jaką otrzymano 5,250.000 w 1 cm^3 , zaś w dniu 27 VI 1936 przy ciepłocie 20.4°C średnia ilość bakterii równała się 204,400.000 w 1 cm^3 . Stała zależność pomiędzy średnią dzienną ciepłotą a ilością drobnoustrojów obliczonych metodą mikroskopową Breeda została graficznie przedstawiona na wykresie 1.

STRESZCZENIE

1. Do badań stosowano w przeważającej ilości wypadków: a) metodę mikroskopową Breeda — b) metodą posiewów na agarze — c) próbę reduktazy — d) próbę fermentacyjną — e) próbę katalazy.

2. W badanych 350 próbkach mleka rynkowego krakowskiego stwierdzono przeciętnie w 1 cm^3 wg metody mikroskopowej 50—100 milionów bakterii, a wg metody posiewów 20—50 milionów.

3. Stwierdzono zależność między metodą mikroskopową a metodą płytkową, z której to zależności wynika, że liczenie mikroskopowe daje zawsze liczby wyższe od liczenia płytkowego, a to dlatego, że pod mikroskopem liczono wszystkie bakterie, podczas gdy na płytce tylko te, które były zdolne do rozwoju na danym podłożu. Również na płytce uzyskuje się pojedyncze kolonie ze skupień bakterii.

4. Stwierdzono zależność między metodą reduktazy, fermenta-

cyjną, katalazy, a ilością bakterii w 1 cm³, oraz stały związek, jaki zachodzi między próbą reduktazy a fermentacyjną.

5. Liczba bakterii w mleku ulega wahaniom w dużych granicach zależnie od a) czasu, jaki upłynął od chwili udoju i b) średniej ciepłoty dziennej, z podwyższeniem której zwiększa się wybitnie wartość bakterii w mleku.

Z Zakładu Mikrobiologii Rolniczej Uniw. Jagiell. w Krakowie

Literatura

1. Niemczycki S., Pasteuryzacja i stassanizacja mleka. Roczniki Nauk Rolniczych i Leśnych 1931, IX.
2. Niemczycki S., Oceny konkursowe czystości mleka. Rozprawy biologiczne 1933, XI, zeszyt 2.
3. Burbiana M., Badania nad mikroflorą mleka polskich. Acta Societatis Botanicorum Poloniae 1931, VIII, str. 197—211.
4. Ławrynów J., Badanie bakteriologiczne mleka. „Medycyna“ r. 1934, nr 18.
5. Löhnis F., Allgemeine Bakteriologie und Mykologie der Milch. Nichtpathogene Mikroorganismen in der Milch. Handbuch der Milchwirtschaft 1930, str. 139—95.
6. Ustawa o mleczarstwie w opracowaniu S. Błonarowicza i S. Terleckiego, Warszawa 1937.
7. Pijanowski E., Mleczarstwo (zebrane piśmiennictwo za ostatnich 25 lat). Księgarnia rolnicza, Warszawa 1938.
8. Ratajówna K., Bakteriologiczne badania mleka rynkowego w Krakowie. Medycyna Doświadczalna i Społeczna 1938, 23, str. 85.
9. Standard Methods of Milk Analysis. Fifth Edition. American Public Health Association, New York 1929.

Summary

The following methods were applied simultaneously to nearly all of the 350 samples of milk tested: 1) Breed's microscopic counting, 2) agar plate method, 3) reductase test, 4) fermentation test and 5) catalase test.

It has been found that the largest group of samples (52 per cent) contained 50 to 100 millions of bacteria in 1 c. c. of milk according to microscopic method, and 20 to 50 millions (50 per cent) according to the plate method.

In 54 per cent of cases, the microscopic counts gave 50 per cent larger numbers of bacteria, than the plate method. The constant relation has been found between the applied methods. Especially it has been demonstrated that the milks which had great reducing power to the methylene blue test, gave favorable results

Srednia cieplota dzienna a ilość bakterii w mleku
The relation between the daily average temperature
and the number of bacteria in milk

--- ilość bakterii w 1 cm³ w milionach
millions of bacteria in 1 c.c. of milk
— średnia cieplota dnia
daily average temperature

in the fermentation test. From the 245 samples of milk tested according to the fermentation method 48 per cent gave uniform curd without whey or gas bubbles; those were chiefly the samples with the highest bacterial counts.

The counts were made during the months of June and July. A considerable correlation has been found between the average daily temperature and the numbers of bacteria in milk. When the daily temperature averaged 6.4°C , the average number of bacteria in milk was 5,250.000 in 1 c. c. On the day of the highest average temperature i. e. 20.4°C , the average number of bacteria rose to 204,000.000 in 1 c. c. This has shown that as a result of bad storage conditions of the milk, the number of bacteria in it was highly affected by the spontaneous changes of temperature (s. diagram — p. 259).

Department of Agricultural Microbiology of the Jagellonian University, Kraków, Poland.