

## DETERMINAREA RAPIDĂ A BACILILOR COLI DIN LAPTE ȘI PRODUSE LACTATE, CU UTILIZAREA BIOSTIMULA- TORULUI TIMIC

C. Bedő, Viorica L. Losonczy, N. Horváth, A. Szöllösi

Laptele fiind un mediu nutritiv deosebit de favorabil dezvoltării microorganismelor variate al căror număr se înmulțește considerabil în câteva ore, influențând chiar și însușirile fizico-chimice și organoleptice ale laptelui, este necesară punerea lui în consum într-o perioadă cât mai scurtă.

Mai trebuie relevat și faptul că laptele poate deveni un factor în transmiterea mai multor îmbolnăviri (18, 5) și o sursă a toxiinfecțiilor alimentare (9, 30).

Aceste considerente impun determinarea rapidă a *b. coli* din lapte și din produsele lactate, metoda constituind un indicator igienico-sanitar, introdusă pentru controlul laptelui de Wyss în 1899 (14).

Se cunosc încercări anterioare referitoare la reducerea duratei timpului necesar determinării *b. coli* din lapte și derivate. Astfel amintim printre metodele folosite: A) *frotiuri*, recomandate de R.S. *Breed* în 1911 (15); procedeul este modificat de *Newman*, apoi de G. *Proca* și mai târziu de *Knaysi*, *Ford* și alții, toate fiind descrise de C. *Ieniștea* (15) și K. J. *Demeter* (10). B) *Metoda cutiilor Petri* (preconizată de *Koch*) în care se folosesc diferite medii solide selective, de ex. a) geloză cu violet-roșu-bilă (VRB) (13) unde coloniile germeților din grupul *coli* au o culoare roșie-purpurie, b) mediul cu manitol (CNBLM) (21), introdus de *Mossel* și c) medii cu indicatorul 2, 3, 5-triphenyl-tetrazolium clorid (TTC), care este incolor, însă este redus de către unele microorganisme, în special de *b. coli*, la colorantul roșu formazan (16, 31, 25). C) *Metoda benzilor de hirtie bacteriologică* denumită „Bacto-strip“ (20) și „Patho-Tec“ (17), folosindu-se benzi de hirtii imbibate cu medii nutritive și cu indicator. D) *Metoda probei reductazei*, se bazează pe reducerea albastrului de metilen de către fermenții microbieni (7, 24, 19). E) „*Proba rezazurinei*“ se bazează pe decolorarea indicatorului sub acțiunea microorganismelor. *Resazurina* albastră, se reduce în resorufină de culoare roșie-roz, și apoi în dihidroresorufină incoloră (19, 27).

Metodele amintite au unele dezavantaje, ca de ex. — rezultatele nu corespund numărului existent al *b. coli* în proba respectivă de lapte, ci ne dau o cifră aproximativă — reducerea diferitelor indicatoare nu este specifică numai pentru *b. coli*, ci și pentru alte microorganisme.

Afară de metodele arătate, se folosește metoda „ridicării titrului fag“ și metoda „imunofluorescenței“, însă numai de unele laboratoare specializate și înzestrate pentru aceste procedee.

În cadrul încercărilor anterioare de a reduce durata timpului de determinare a *b. coli* se notează și metodele îmbogățirii mediilor cu acizi aminați (26, 8) cu acizi nucleici (28), cu vitamine (22, 1, 11), care favorizează dezvoltarea microorganismelor. Cercetătorii n-au reușit însă prin utilizarea acestor substanțe nutritive să reducă durata determinărilor în mod considerabil.

În urma cercetărilor noastre precedente, în care am demonstrat efectul accelerator al biostimulatorului extractului timic (2) asupra dezvoltării diferitelor bacterii, am procedat la aplicarea în practică a acestor rezultate, adică am încercat elaborarea procedeelor de determinare rapidă a *b. coli* din lapte prin utilizarea biostimulatorului izolat de noi (4).

**Material și metodă:**

Probele pentru analiza de lapte, de iaurt, de brinză, și de caș fermentat au fost luate conform STAS-ului, din magazinele de desfacere „Alimentara“ ale orașului Tg.-Mureș. S-a determinat numărul total de germeni, numărul probabil de *b. coli* și numărul microorganismelor reducătoare de TTC (coliformi).

Pentru determinarea numărului total de germeni am aplicat metoda Koch, folosind geloză (2%), lactoză (1%) încorporând cite 1 ml de lapte din diluțiile  $10^{-3}$  până la  $10^{-6}$ , într-o cutie Petri

În scopul aprecierii numărului probabil de *b. coli* am aplicat metoda tuburilor multiple cu mediul Kessler-Swenarton (29), citind rezultatele după incubarea de 12—24 de ore la 37°C, și determinând astfel cifra coli cu ajutorul tabelului Mac-Crady, bazat pe teoria probabilităților (12). Confirmarea prezenței *b. coli* din eprubetele pozitive s-a făcut prin treceri pe mediile endo și eozină-albastru de metilen (23).

Am utilizat și mediul „Bacto-diag“ descris anterior (3), folosind cantități de 0.1 ml din diluțiile de lapte  $10^{-1}$ — $10^{-4}$ . Apariția punctelor colorate în roz-violaceu, indică numărul de *b. coli*. Înmulțind acest număr cu 50, obținem numărul *b. coli* la 1 ml din laptele respectiv.

Concomitent am însămânțat cite 0.1 ml din diluțiile de lapte pe medii solide preparate după următoarea rețetă proprie: geloză (2%) 100 ml, lactoză 2 g și TTC 20 mg.

Utilizarea unor grupe de medii a fost precedată de adăugarea a cite două picături din fracțiunea cu biostimulator timic.

Tabelul nr. 1.

Alimente analizate		Lapte pasteurizat	Lapte past. și contaminat cu <i>b. coli</i>	Iaurt	Iaurt contaminat cu <i>b. coli</i>
Numărul probelor		20	20	20	20
Numărul total de germeni/ml		223.400	2.900.000	300.000.000	301.950.000
nr. <i>b. coli</i> /ml*** după 12 <sup>h</sup>	S*	0	7,5	0	4,5
	+ bios.**	0	200	0	110
nr. <i>b. coli</i> /ml după 14 <sup>h</sup>	S	0	150	0	16
	+ bios.	0	1.600	0	1.100
nr. <i>b. coli</i> /ml după 16 <sup>h</sup>	S	0	3.000	0	150
	+ bios.	0	140.000	0	45.000
nr. <i>b. coli</i> /ml după 18 <sup>h</sup>	S	0	140.000	0	30.000
	+ bios.	1,1	140.000	0,5	140.000
nr. <i>b. coli</i> /ml după 24 <sup>h</sup>	S	1,5	140.000	1,1	140.000
	+ bios.	2,5	140.000	2,0	140.000

S\* — mediu simplu, adică Kessler-Swenarton

+ bios\*\* — mediu simplu îmbogățit cu biostimulator

\*\*\* — se înțelege numărul probabil al bacteriilor coli la 1 ml de aliment.

Paralel cu analizele probelor de lapte și de produse, au fost puși în evidență b. coli și din probe asemănătoare, contaminate experimental cu un număr cunoscut (1.500.000/ml la cele aflate în medii lichide și 30—40.000 la cele solide) de Escherichia coli O<sub>111</sub> B<sub>4</sub>.

Rezultatele obținute cu metoda tuburilor multiple, folosind mediul Kessler-Swenarton, sînt trecute în tabelele 1. 2. care reprezintă valorile medii calculate atît

Tabelul nr. 2.

Alimente analizate		Brînză de vacă	Brînză contaminată cu b. coli	Cașcaval „Dobrogea”	Cașcaval „Dobrogea” contaminat cu b. coli
Numărul probelor		10	10	10	10
Numărul total de germeni/g		350.000.000	350.850.000	1.755.000	1.960.000
nr. b. coli/ml după 12 <sup>h</sup>	S	0	1,3	0	4,5
	+bios.	3,5	110	0	110
nr. b. coli/ml după 14 <sup>h</sup>	S	0	30	0	20
	+bios.	60	1.600	4,5	45.000
nr. b. coli/ml după 16 <sup>h</sup>	S	4,5	110	0	600
	+bios.	200	140.000	9,5	140.000
nr. b. coli/ml după 18 <sup>h</sup>	S	16	45.000	0,5	95.000
	+bios.	200	140.000	9,5	140.000
nr. b. coli/ml după 24 <sup>h</sup>	S	110	140.000	4,5	140.000
	+bios.	200	140.000	9,5	140.000

Rezultatele obținute prin determinarea prezenței b. coli, și a bacteriilor reducătoare de TTC cu folosirea „Bacto-diag”-ului, din alimentele amintite sînt consemnate în tabelul nr. 3.

Tabelul nr. 3.

Denumirea alimentelor analizate	Media numărului de germeni (b. coli)/0,1 ml reducători de tetrazolină, după o incubare							
	de 5—7 ore				de 24 de ore			
	mediu simplu + biostim.				mediu simplu + biostim.			
	min.	max.	min.	max.	min.	max.		
Lapte pasteurizat	0	0	0	2	0	4	2	6
Lapte crud	0	0	2	26	12	24	17	36
Iaurt	0	6	8	34	0	28	28	54
Brînză de vacă	0	5	7	30	13	30	22	50
Cașcaval „Dobrogea”	0	3	7	32	8	29	20	44

C. BEDÓ ŞI COLAB.: DETERMINAREA RAPIDĂ A BACILOR COLI DIN LAPTE  
ŞI PRODUSE LACTATE, CU UTILIZAREA BIOTIMULATORULUI TIMIC

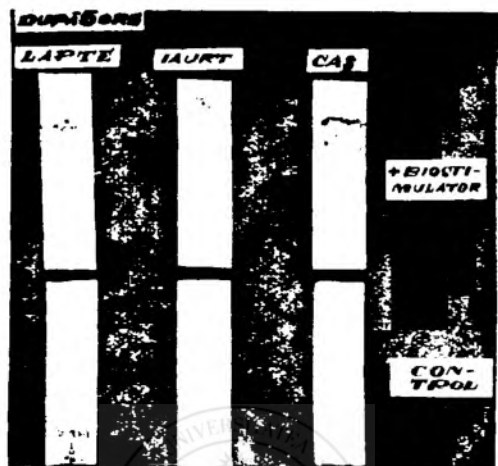


Fig. nr. 1.



Fig. nr. 2.

C. BEDÓ ŞI COLAB.: DETERMINAREA RAPIDĂ A BACILILOR COLI DIN LAPTE  
ŞI PRODUSE LACTATE, CU UTILIZAREA BIOSTIMULATORULUI TIMIC

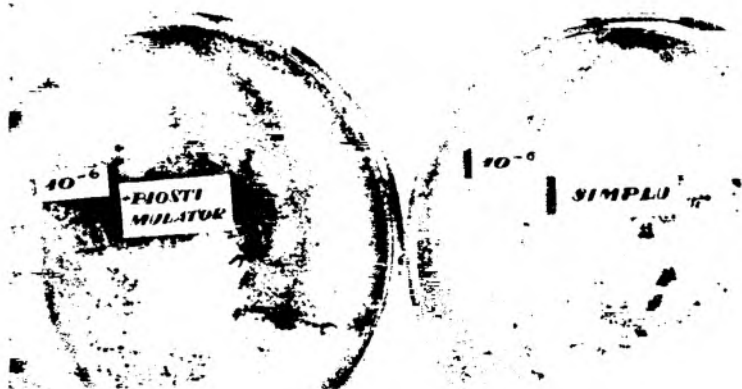


Fig. nr. 3.



Fig. nr. 4.

În urma analizelor alimentelor procurate din comerț cît și ale celor contaminate în mod experimental, arătînd concomitent și pe acelea obținute în urma încorporării biostimulatorului timid.

Unele rezultate sînt demonstrate în figura nr. 1, în care se poate observa diferența semnificativă între rezultatele obținute în urma încorporării biostimulatorului și acelea fără acest adaos, care servesc drept control. Se pot număra pe fotografia alăturată, petele care reprezintă cîte o colonie. Astfel, în cazul în care s-a în-sămîntat 0,1 ml lapte contaminat cu b. coli, după o incubare de 5 ore se pot observa pe „Bacto-diag“ 64 pete violete, la iaurt 168 colonii și la caș 84 colonii, față de cele de control (vezi fig. nr. 1).

Înainte de a da numărul cifric al celor rezultate în urma însămîntărilor pe mediu solid, demonstrăm aspectul coloniilor care apar pe mediul (cu TTC) amintit. De ex. în figura nr. 2. se pot număra coloniile, adică germeii apăruiți în mediul amintit. (Vezi fig. nr. 2).

Acest tablou apare în mediu după o incubare de 8—16 ore, iar în cele care conțin și biostimulator rezultatele se citesc după 3 ore de la însămîntare.

Pentru demonstrarea eficienței biostimulatorului reproducem unele rezultate în fotografia nr. 3.

Perioada de incubare la aceste însămîntări a durat 8 ore, timp necesar pentru a se dezvolta și coloniile fără biostimulator.

Mediile datelor calculate din rezultatele obținute după însămîntarea probelor de alimente crude, sînt redată în tabelul nr. 4.

Tabelul nr. 4.

Alimente analizate	Numărul probelor	Mediul nutritiv	Media numărului de germeni (b. coli/ml) reducători de tetracolină după o perioadă de incubare		
			de 5 ore	de 8 ore	de 24 ore
Lapte pasteurizat	20	g.l.t.*	0	6	2 234
	20	g.l.t. + bios.	120	176	4 660
Iaurt	20	g.l.t.	80	180	15 400
	20	g.l.t. + bios.	322	442	42 600
Brînză de vacă	10	g.l.t.	27	580	9 240
	10	g.l.t. + bios.	370	1.465	13.400
Cașcaval „Dobrogea“	10	g.l.t.	11	48	4 210
	10	g.l.t. + bios.	1.280	3.650	6.750

\* geloză + lactoză + TTC.

#### Discuții:

Rezultatele obținute cu ajutorul acestor medii noi nutritive arată o eficiență superioară față de cele cunoscute, obișnuit și frecvent utilizate. Aceasta se datorește substanței bioactive, adică a biostimulatorului prezent în fracțiunea extractului de timus. Faptul se reflectă cifric atît la utilizarea mediilor nutritive lichide cît și la „Bacto-diag“ și la mediile solide.

Folosind mediul nutritiv obișnuit Kessler-Swenarton plus biostimulator, citirea rezultatelor are loc după 12—16 ore, față de 48 de ore, necesare în cazurile incubăției însămîntărilor în mediu simplu. În urma formării gazelor se poate deduce, că b. coli s-au dezvoltat mai favorabil în lapte în care ga-

zele apar după 12 ore de la însămînțare, față de mediile cu iaurt, unde înmulțirea bacililor a fost mai lentă. Microflora brinzei și a cașcavalului n-au avut nici o acțiune negativă asupra formării gazelor.

Se poate observa superioritatea „Bacto-diag”-ului față de alte medii cu benzi de hîrtie. Se obțin rezultate chiar și după 3 ore de incubare, în cazul contaminărilor masive. Importanța deosebită a „Bacto-diag”-ului se observă mai ales, dacă se ia în considerare faptul, că în alimentele contaminate numărul de *b. coli* (și coliformi) atinge cifre de sute de mii și chiar milioane/g, fapt despre care ne putem orienta într-un interval de 3—6 ore.

Mediile solide au dat rezultate foarte favorabile. Coloniile apar după o incubare de 3—5 ore, sînt clar vizibile și ușor de numărat.

Sînt autori (31) care au descris variate grupe de microorganisme reductoare de TTC, și care se pun în evidență în cadrul determinărilor de *b. coli*. Acestea însă pot fi diferențiate, coloniile unora chiar și macroscopic, după nuanțele culorii, care derivă îndeosebi din varietatea ritmului activității reductoare. Unii autori (6) utilizează TTC-ul chiar în medii selective pentru diferențierea *E. coli* de alte microorganisme.

#### Concluzii:

1. Folosirea biostimulatorului timic în diferite medii nutritive conduce la obținerea rapidă a rezultatelor bacteriologice,

2. Punerea în evidență a *b. coli* din lapte și produse lactate este posibilă în curs de 12 ore, dacă se utilizează mediul Kessler-Swenarton plus biostimulator, durează 3—5 ore cu mediile solide care conțin biostimulator și 3—6 ore cu „Bacto-diag”.

Sosit la redacție: 14 iunie 1968.

#### Bibliografie

1. ARLOING F., MOREL A., JOSSERAND A., PERROL L.: C. R. Soc. Biol. (1937), 126, 5; 2. BEDÓ K., HORVÁTH N.: Rev. Med. (1963), 3, 301; 3. BEDÓ K.: Rev. Med. (1964), 2, 169; 4. BEDÓ K.: Rev. Med. (1965), 2, 133; 5. BIRZU ALEXANDRINA, MOROȘANU VALERIA, HUȚU I.: Igiena (1966), 15, 2, 107; 6. CHAPMAN G. H.: Am. J. Publ. Health. (1951), 41, 1381; 7. CHAVANNES D., DEMONT P.: Contrôle du lait et des principaux produits laitiers, Libr. F. Rouge et Cie Lausanne 1945; 8. COHEN G. N., RICKENBERG H. V.: Ann. Inst. Pasteur (1956), 91, 693; 9. DACK GAIL M.: Am. J. Publ. Health (1955), 45, 1151; 10. DEMETER K. J.: Bakteriologische Untersuchungsmethoden der Milchwirtschaft, E. ULMER, Stuttgart 1952, 118; 11. EHRISMANN O.: Ztschr. Hyg. Infect. (1936), 118, 544; 12. GONTEA I.: Controlul alimentelor, București, 1956, 375; 13. HARTMANN P. A.: J. Milk Food. Technol. (1960), 23, 2, 45; 14. IENIȘTEA C.: Microbiologia alimentelor, Ed. Med. Buc. 1958, 43; 15. IENIȘTEA C.: Microbiologia alimentelor, Ed. Med. Buc., 1958, 25; 16. JANICEK I.: Ind. cărnii. Caiet select. (1958), 2, 51; 17. KARASIUK E. I.: Gig. i. sanit. (1960), 1, 62; 18. LIMMER H. D.: Dtsch. Milchwirtschaft (1957), 4, 5, 100; 19. LIMMER H. D.: Dtsch. Milchwirtschaft (1958), 5, 101; 20. MELEGHI ECATERINA: Cerc. ASIT-ICA 1960; 21. MOSSEL D.A.A.: App. Microbiol. (1957), 5, 379; 22. NESTORESCU N.: Bacteriologie medicală, Ed. Med. Buc. 1965, 141; 23. NESTORESCU N.: Bacteriologie medicală, Ed. Med. Buc., 1965, 513; 24. PITZ P.: Dtsch. Milchwirtschaft (1958), 3, 54; 25. RHODES K., SCHERER S.: Appl. Microbiol. (1966), 14, 2, 152; 26. STANIER R. Y.: Bact. Rev. (1950), 14, 3, 179; 27. STAS: Culeg. Stan. Ind. Alim. (1962), 386; 28. STEPHENSON M.: Metabolizm Bakterii, Med. Lit. Moscova, 1951, 179; 29. VLĂDESCU R.: Controlul igienic al laptelui și derivatelor sale, Ed. Agro-Silv. Buc., 1959, 110; 30. VOICULESCU M., RUSS M., TOMESCU C., COMONESCU VICTORIA, ADLESSBERG R.: Microbiol. (1957), 6, 510; 31. WUNDT W.: Dtsch. Med. Wschr. (1950), 75, 1471.