

Gyors módszer tejek fekális szennyeződésének megközelítő pontosságú kémiai meghatározására

KAFFEHR BÉLA

Vas megyei Közegészségügyi Járványügyi Allomás, Szombathely

Erkezett: 1956. szeptember 20.

Vizsgálataink célja olyan eljárás kidolgozása volt, melynek segítségével a tej fekális szennyezettségének mértéke rövid idő alatt — a viszonylag hosszabb időt igénybe vevő bakteriológiai eljárások megkerülésével — hozzávetőlegesen meghatározható. Ilyen módszernek a gyakorlatban számos helyen — így a kollektív ételmezések, kórházak, csecsemőotthonok, de az ipar ellenőrzésében is — jelentősége lehet.

A fekális szennyeződés indikátoraként az eddigi gyakorlat az *E. colival* való szennyezettséget alkalmazta. Bár egyes szerzők ennek az álláspontnak a helyességét vitatják, vizsgálataink során az *E. coli* biokémiai aktivitásán alapuló gyors meghatározásra törekedtünk. Az *E. coli* biokémiáját többek között *Auber* és munkatársai tanulmányozták behatóan. Számos közleményben tárgyalják az *E. coli* nitrát redukáló képességét, a folyamatért felelős enzim-rendszer összetevőit és reakció-mechanizmusát. (1, 2, 3.)

A szennyezettség mértékének megítélésére vizsgálatainkban a nitrát redukációs képességét vettük alapul. Ennek a tulajdonságnak a tejvizsgálatban való alkalmazását több szerző javasolja. (4, 5.) Az alapvető kérdés a reakció specifikitása volt. Egyes baktériumok redukációs képessége közismert és a klaszszikus tejvizsgálati módszerekben is alkalmazást talált. Meg kellett vizsgálnunk, hogy a tej normális mikroflóráját képező mikroorganizmusok (6, 7.) hogyan viselkednek adott kísérleti körülmények között nitráttal szemben. Irodalmi adatok szerint a tejben előforduló számos baktérium képes nitrátnak nitrátté való redukálására. (8, 9.) Ezeknek nagy részét azonban már eleve ki lehetett zárni. Egyrészt azért, mert a kísérlet körülményei igen távol állnak az illető mikroorganizmusok optimális életviszonyaitól, másrészt a redukció nem áll meg nitrit stádiumban, hanem ammóniáig, nitrogénoxidokig, sőt elemi nitrogénig fut le. (8, 9.) A kísérlet körülményei ideálisnak tekinthetők az *E. coli* szaporodása szempontjából. (Alacsony pH, 35—37 C°.) Így vegyes flóra esetén — a gyakorlatban mindig ilyenell kell számolnunk — az *E. coli* a szaporodás során uralkodóvá válik. A tej normális mikroflórájának nagy részét alkotó termo-

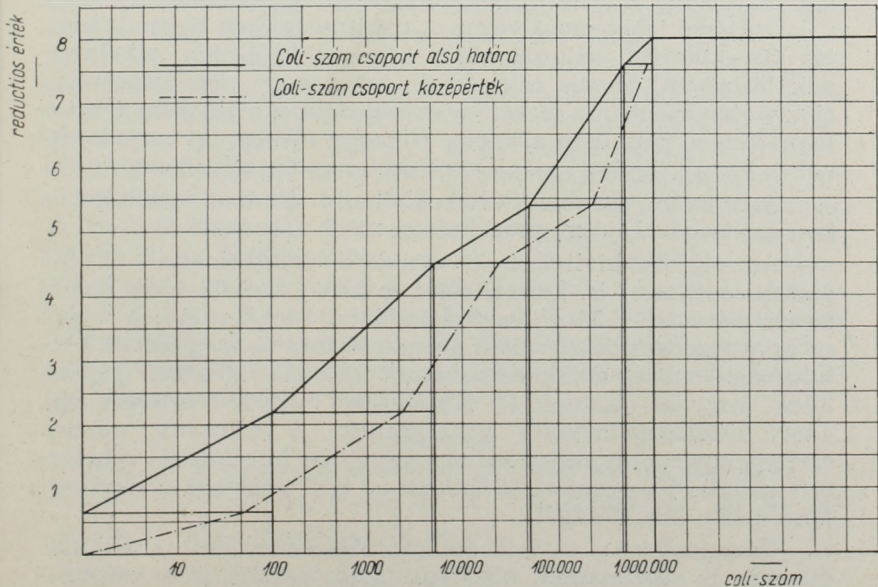
fil baktériumokat a viszonylag alacsony inkubációs hőfok miatt nem kellett tekintetbe vennünk. Ezt alacsony hőfokon kezelt tejekben végzett nitrát-redukciós kísérletek is igazolták. Más — bázikus közeget kedvelő — baktériumok, mint pl. a proteus vulgaris, a közeg alacsony pH-ja miatt estek kisebb súllyal számításba. Több szerző tárgyalja a tejekben gyakran előforduló proteus, bac. subtilis és pseudomonas csoport nitrít-redukciós képességét, melynek eredményeképpen nitrogén-oxidok és elemi nitrogén keletkeznek. (10, 11.) Vizsgálataink során proteussal, pyocianeussal és mesentericussal mesterségesen szennyezett steril tehéntejen végeztünk nitrát-redukciós próbákat. Az össz-baktérium- és coliszámokat az Állomás bakteriológiai osztályán Jándy az élelmiszerbakteriológiai gyakorlatban használt módszerrel határozta meg. Ugyancsak ő végzett kontroll-vizsgálatokat a modell szennyezésre kerülő steril tejjel is. Neki ez-után mondunk köszönetet.

Nitrát-redukciót csak a proteus vulgarissal szennyezett tejmintákban kaptunk. A proteus okozta redukció mértéke a 0—100 közötti coliszámnak megfelelő redukciós értékkel egyezett, ami tekintettel a 800 milliós proteus csíraszámra, elhanyagolható értéknek vehető.

Ilyen megfontolások alapján várható volt, hogy a reakció aspecifitása ellenére is, a gyakorlatban egyértelmű eredményeket szolgáltatson. A módszer gyakorlati kipróbálása céljából a nitrát-redukciós próbát 123 tejmintán végeztük el. A tejminták különböző nyers és hőkezelt tejek közül kerültek kiválasztásra oly módon, hogy lehetőleg a különböző szennyezettségi fokú tejek azonos arányban szerepeljenek. Az inkubációs idő kezdetén minden mintából meghatároztuk szabványos bakteriológiai vizsgálattal a coliszámot. A vizsgálatsorozat igazolta az elméleti megfontolásokat. A kapott coliszámok szerint hat csoportot alakítottunk ki. (100 alatt, 100—5000, 5000—50 000, 50 000—500 000, 500 000—1 000 000, és 1 000 000 felett.) Az egyes csoportokra eső redukciós értékek átlagát az I. táblázatban adjuk. A redukciós értékek szórása — a bakteriológiai eredményekre vonatkoztatva — nem ad egészen megbízható képet. Vonatkoztatási adatnak a meghatározása maga is nagy szórást mutat és hibája természetesen növeli a nitrát-redukciós módszer hibáját. A módszer pontossága ezenkívül a coliszámok egyes csoportokon belüli eloszlásának is a függvénye. Magának a két biológiai reakciónak egybevetése is mutat szükségképpen ingadozásokat számos, még tisztázatlan tényező következtében. Így különbségek adódnak az egyes törzsek enzim-aktivitásában, szaporodási

Coli szám	Redukciós érték	Vizsgálatok száma	Középérték középhibája
100 alatt	0,65	20	0,24
100—5000	2,23	26	0,60
5000—50 000	4,52	27	0,77
50 000—500 000	5,40	22	0,42
500 000—1 millióig	7,58	16	0,92
1 millió felett	8,02	12	0,98

sebességében stb. Befolyással lehet a redukció intenzitására egyes törzsek előregedése, milieu hatás változása és érvényesülése is stb. Élelmiszerekből kitenyésztett colitörzsekkel végzett szennyezési próbák ezeket alátámasztani látszanak. A kérdés eldöntéséhez azonban nagyobb számú kísérlet szükséges. Ha az általunk az egyes coliszám-csoportokra — önkényesen felvett nitritgörbe alapján — kapott redukciós értékeket a coliszám logaritmusával szemben ábrázoljuk, mind a csoportok alsó határára, mind azok átlagára vonatkozóan közel lineáris összefüggést kaptunk.



Első lépésben vonatkozási görbét kellett felvennünk. Erre a célra KNO_2 -ből készített 100 gammás NO_2 oldatból készítettünk sorozatot. A bemérések azonos térfogatra való kiegészítéséhez tejből, a vizsgálati eljárásnál használt módszerrel készített ólomacetát serumot használtunk. A kapott azonos térfogatú, nitrített tartalmú serumokban ecetsavas hígítás után a Griess—Ilossvay-reakciót elvégeztük és a kialakult vörös szint 20 perc múlva Pulfrich-fotometeren olvastuk le. A kapott kalibrációs görbén közvetlenül nitritmennyiségeket kaptunk meg gammában. A könnyebb kiértékelhetőség céljából önkényesen redukciós egységeket vettünk fel. Az alkalmazott hígítások mellett egy redukciós egység 5 gamma nitritnek felel meg. Tejek vizsgálatánál az irodalomban javasolt (4) kétórás inkubációs idő elégnek bizonyult. A meghatározáshoz a serumot a tej előzetes ecetsavas megsavanyítása után szilárd ólomacetáttal készítettük el. A centrifugálást kónikus végű csövekben végeztük. Nagyon fontos, hogy a serum tiszta legyen. Zavarosság esetén egyrészt magasabb extinkciót kapunk, másrészt a képződött festékanyag adszorbeálódik és így irreális eredményeket kapunk. A kapott serum egy részét 30%-os ecetsavval hígítva a Griess—Ilossvay-reakciót elvégeztük és a redukciós értéket meghatároztuk. A reakció érzékenységét a hígításvizonyok alkalmas megválasztásával lehet szabályozni. A módszerünkben használt hígítás 10—1 000 000 nagyságrendű coliszámok esetén alkalmasnak bizonyult. Magas coliszámok, tehát nagy nitritkoncentrációk esetén azonban a reakció nem engedelmeskedik a *Lambert—Beer-törvénynek*. Igen alacsony coliszám mellett így anyatejeknél és forralt tejeknél ajánlatos kisebb hígítást alkalmazni.

A coliszám, redukciós értékekből az 1. ábrában közölt grafikon segítségével, jó megközelítéssel meghatározható.

Az eljárás kivitelezhető standard festékkoldattal történő összehasonlítással is. Erre a célra savanyú fuchsin vizes oldata használható fel. 0,25 g/l-es festékkoldatot készítettünk, s ebből az egyes tagokat deszt. vízzel azonos térfogatra kiegészítve (esetünkben 9 ml-re) alkalmas sorozatot kaptunk. Meg kell jegyeznünk, hogy az általunk II. táblázatban megadott értékek egy adott festékkészítményre vonatkoznak. A sorozatot minden esetben egyeztetni kell a kalibrációs görbe felvételénél ismertetett standard sorozattal. Ajánlatos a későbbiekben is kontrollálni a szín állandóságát.

Összefoglalva: a módszer fentebb ismertetett aspecifitás ellenére is alkalmasnak bizonyult a tej fekális szennyezettség-

ml. fuchsin/9 ml.	Redukciós érték
0,05	0,60
0,10	1,00
0,20	2,10
0,30	3,20
0,40	4,00
0,50	4,50
0,60	5,00
0,70	6,20
0,80	10,30

gét jelző coliszám megközelítő meghatározására. Nem helyettesítheti teljesen a klasszikus bakteriológiai módszereket, de gyors kivitelezése folytán még a vizsgált minta által képviselt tej-mennyiség felhasználása, illetve feldolgozása előtt jelzi annak szennyezettségét.

Vizsgálati eljárás: a kalibrációs görbét 100 gamma nitrit/ml-es KNO_2 oldatból készítjük (0,1848 g KNO_2 oldva 1000 ml vízben). 0,1, 0,2, 0,3 0,8 ml oldatot steril tejből készült ólomacetát serummal 2 ml-re egészítünk ki. A serumot előzetes ecetsavas (1—2 csepp jégecet) savanyítás után 0,02 g szilárd ólomacetáttal való összerázással és centrifugálással készítjük. 7 ml 30%-os ecetsavat és 0,2 ml Griess—Ilossvay-reagenst adunk hozzá. (A oldat: 1 g szulfanilsav 100 ml 30%-os ecetsavban oldva. B oldat: 0,3 g α -naftilamin 70 ml vízben főzve és a szűrt oldat 30%-os ecetsavval 10 ml-re kiegészítve. A reagenst A és B oldat 1 : 1 arányú elegyítésével mindig frissen készítjük.) A kialakult vörös szín 20 perc múlva stabilizálódik. Az extinkciókat 1 cm-es küvetában S 53-as szűrő alkalmazásával Pulfrich-fotometeren olvassuk le. A vizsgálandó tej 5 ml-éhez 0,4 ml 1%-os NaNO_3 oldatot adunk és két óráig 37 °C-on inkubáljuk. Azután a próbából a fent leírt módon ólomacetátszérumot készítünk. A tiszta szérum 2 ml-ét 7 ml 30%-os ecetsavval felhígítjuk és az extinkcióját a kalibrációs görbénél leírt módon meghatározzuk. A nyert extinkciónak megfelelő coliszámot a kalibrációs görbéről értékeljük ki.

IRODALOM

- (1) Auber, E.—Schwarzkopf, O.—Glaser, M.: C. r. Soc. Biol. 126, 1142, 1937.
- (2) Auber, E.—Glaser, M.: C. r. Soc. Biol. 127, 473, 1938.
- (3) Auber, E.—Lubochinsky, B.—Prouvost, A.: C. r. Seances Acad. Sci. 236, 145, 1953.
- (4) Opitz, H.: Z. Kinderheilkunde 5/6, 596, 1949.
- (5) Lerche, M.—Klein, H.: Berliner-Münchener Tierärztl. Wchschr. 67, 197, 1954.
- (6) Tanner: Microbiology of Foods.
- (7) Csizsár V.: Tejtermelési higiéné, 1954.

- (8) Bergeys Manual of Determinative Bacteriology 1945.
(9) Gastinel P.: *Precis de Bacteriologie medical*, 1949.
(10) Najjar, V. A.—Allen, M. B.: *J. Biol. Chemistry* 206, 209, 1954.
(11) Rittenberg D.—Alwin I., Krasna: *J. Bacteriology* 68, 53, 1954.

БЫСТРЫЙ МЕТОД ДЛЯ ПРИБЛИЗИТЕЛЬНОГО ХИМИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ МОЛОКА ФЕКАЛИЯМИ

Б. Кафер

Использует нитрат-редукционную способность *E. Коли* для быстрого установления загрязнения молока фекалиями. В процессе определения количество нитрата, образующегося из натриumnитрата, добавленного в молоко, определяется фотометрически в сыворотке, полученной укусным свинцом. Из полученного значения экстинкции применением калибрационной кривой получается непосредственно число коли.

SCHNELLMETHODE ZUR APPROXIMATIVEN BESTIMMUNG MIT FAEKALIEN BESCHMUTZTER MILCH

B. Kaffehr

Zur raschen Feststellung der Verunreinigung der Milch können wir die nitratreduzierende Fähigkeit der Bakterien *E. coli* verwenden. Die durch Beisetzung von Natriumnitrat zur Milch elhaltene Nitritmenge kann man im Bleiacetat-serum mit photometrischer Methode bestimmen.

Aus den so gewonnenen Extinctionswerten ist der *Coli*-titer mit Hilfe einer Kalibrationskurve auf unmittelbare Weise abzuschätzen.

MODE RAPIDE POUR LA DÉTERMINATION DE POLLUTIONS D'ORIGINE FÉCALE DANS LE LAIT, À UNE EXACTITUDE APPROXIMATIVE

B. Kaffehr

La capacité réduisante de l'entérocoque *Coli* envers les nitrates peut être exploitée pour la détermination rapide de la souillure fécale du lait. Au cours de l'analyse, le dosage de la nitrite, résultante du nitrate de soude ajouté au lait, peut être vérifié dans du sérum à sous-acétate de plomb, au moyen photométrique. A base des valeurs d'extinction obtenues, le nombre des entérocoques *Coli*, à l'aide de la courbe calibrée, peut être évaluée immédiatement.

A QUICK METHOD FOR THE CHEMICAL DETERMINATION OF APPROXIMATIVE ACCURACY OF CONTAMINATION OF MILK BY FAECES

B. Kaffehr

The capability of *E. coli* to reduce nitrates proved suited for use in the quick determination of milk contamination by faeces. In this test, sodium nitrate is added to the milk sample and the quantity of nitrite formed during the test may be measured by photometry in a lead acetate serum. The *coli* number can be read directly from the extinction values obtained, applying a working curve.