

ANTIBIOTICI U MLEKU

Višeslava MILJKOVIĆ, Nadežda JAKIMOV i S. VASIĆ
Veterinarski fakultet, Institut za higijenu i tehnologiju mleka, Beograd

Uvod

Najefikasniji način da se spreči prisustvo antibiotika u tržišnom mleku je zabrana prometa mleka muznih grla lečenih antibioticima. Iako je postupak sa mlekom kod lečenja antibioticima propisan Pravilnikom o kvalitetu mleka i mlečnih proizvoda (Sl. list SFRJ, 15-1964) ipak ne može u potpunosti da se spreči prisustvo antibiotika u mleku namenjenom za ishranu ljudi. Poznato je da se kod mnogih krava dužina izlučivanja antibiotika unetih u organizam životinje razlikuje i da se često ne poklapa sa vremenom ograničenja upotrebe mleka. Osim toga treba računati i sa nedovoljnom disciplinom odgovornih lica od kojih zavisi dali će se mleko lečenih životinja zaista isključiti iz prometa. Najzad ima slučajeva namernog dodavanja antibiotika mleku u cilju konzervisanja.

Navedeni razlozi ukazuju da je redovna kontrola na prisustvo antibiotika kao i drugih inhibitornih materija u mleku neophodni vid nadzora nad prometom mleka. Poznato je da se kod nas takva kontrola ne sprovodi redovno, ili i kada se vrši dobijeni rezultati ne pokazuju stvarno stanje. Jedan od glavnih uzroka je nedostatak brze i jednostavne metode. Pored toga kod izvođenja pojedinih metoda javljaju se smetnje koje ometaju pravilnu interpretaciju dobijenih rezultata. Zato smo odlučili da ispitamo više metoda za dokazivanje antibiotika u mleku kako bi mogli da predložimo najpodesniju za redovnu i masovnu kontrolu. Obuhvaćene su samo biološke metode, jer se uglavnom samo one koriste za dokazivanje malih količina antibiotika u mleku koje mogu štetno da deluju na zdravlje ljudi i da izazivaju smetnje u mlekar-
skoj industriji.

Biološke metode se dele na dve grupe: **direktne i indirektne**. Kod direkt-
nih se kao hranljiva podloga za test mikroorganizme koristi agar. Na mestu gde iz ispitivanog materijala difunduju u agar eventualno prisutni antibiotici ne dolazi do razmnožavanja test mikroorganizama, pa se oko toga mesta javlja kružna zona inhibicije rasta osetljivih test mikroorganizama u vidu prosvetljenja podloge. Posebnu grupu direktnih metoda čini mikroskopsko dokazivanje morfoloških promena test mikroorganizama nastalih dejstvom antibiotika u mleku.

Najveći broj metoda za dokazivanje antibiotika i drugih inhibitornih materija u mleku spada u indirektne metode. Ispitivani uzorak mleka predstavlja hranljivu podlogu za test mikroorganizme, a biohemijske promene u njemu služe kao pokazatelj o prisustvu inhibitornih materija. Ukoliko mleko ne sadrži takve materije dolazi do povećanja kiselosti i pada redoks potencijala. Nasuprot tome ako u mleku ima materija koje sprečavaju razmnožavanje test mikroorganizama (antibiotici, dezinficiens), mleko ostaje nepromenjeno ili su promene vrlo slabo ispoljene.

* Referat sa VIII Seminara za mljekarsku industriju od 2. do 4. II 1970., Tehnološki fakultet, Zagreb.

Metode rada

Ispitivanjima je obuhvaćeno određivanje osetljivosti pojedinih metoda na niske koncentracije antibiotika. Zatim je ispitivana specifičnost metoda za dokazivanje antibiotika. Da bi to utvrdili proverili smo mogućnost diferenciranja antibiotika od dezinfekcionih sredstava. Najzad razmatran je uticaj nekih faktora koji ometaju pravilno izvođenje testova i interpretaciju rezultata.

Osetljivost metoda je ispitivana prema različitim koncentracijama penicilina i streptomocina. Antibiotici su dodavani mleku posle zagrevanja na 80—85° C predviđenog kod izvođenja svih metoda u cilju uništavanja mikroorganizama mleka i prirodnih inhibitornih materija mleka koje mogu da ometaju razmnožavanje test mikroorganizama. Rastvori antibiotika su neposredno pred rad pripremani u vodenom rastvoru i to u nekoliko osnovnih razblaženja. Od njih su zatim u mleko dodavane različite količine, pa su tako dobijene potrebne koncentracije. Kod penicilina je ispitivana osetljivost prema koncentraciji od 0,1 do 0,001 pencilina u 1 ml mleka, a kod streptomocina od 1 do 10 gama u 1 ml mleka. Oglеди su ponovljeni 10 puta.

Da bi utvrdili da li pojedine metode daju pozitivne rezultate i kada su u mleku prisutni dezinficiens, na sličan način kao kod ispitivanja osetljivosti prema antibioticima napravili smo razblaženja dezinficiensa. Odabrali smo **Tego** i **Omnisan** u koncentraciji od 0,0001 do 0,5% u mleku.

Dalji cilj rada bio je da ispitamo da li mehanizam reakcije kod pojedinih metoda može da bude izmenjen usled nekih drugih faktora. Zbog toga smo uzeli 200 uzoraka mleka iz pojedinih četvrti vimena od 50 krava koje u prethodnom periodu uopšte nisu nikad primale antibiotike ili je taj interval od lečenja do ovog pregleda iznosio više meseci. Pored pojedinačnih uzoraka ispitivali smo i 100 uzoraka mleka uzetih iz mlekare kod prijema. Svi ovi uzorci su uporedo ispitani odabranim metodama.

Metode dokazivanja inhibitornih materija

1. Metoda sa diskom po Galeslootu i Hassingu

Kao test mikroorganizam koristi se **Bacillus stearothermophilus var. calidolactis**. Kultura sa kosog agara se zasejava u tečnu podlogu (ekstrakt kvasca, 1 g; tripton, 2 g; glukoza, 0,05 g; destilovana voda, 100 ml; pH 7,0) i drži u termostatu 18 časova na 55° C. Podloga se razliva po 10 ml u Erlenmajerove posude od 100 ml da bi pristup vazduha bio veći, pošto se mikroorganizam bolje razmnožava pod aerobnim uslovima.

Od ovako dobijene kulture uzima se 1 ml na 5—6 ml tripton-agara (ekstrakt kvasca, 2,5 g; tripton, 5 g; glukoza, 1 g; agara 15 g; destilovana voda, 1000 ml; pH 7). Agar se prethodno otopi i ohladi na oko 50° C i pošto se dobro izmeša sa dodatom kulturom, razlije se u Petrijeve šolje u tankom sloju. Kada se podloga stegne, stavljaju se na površinu kružići od filter hartije prečnika oko 1 cm koji se prethodno zamoče u ispitivano mleko, pasterizovano 5 minuta na 85° C. Petrijeve šolje se stavljaju u termostat na 55° C i drže 3—4 časa. Dobro vidljiva zona oko kružića filter hartije, u kojoj nema rasta test mikroorganizama, označava prisustvo antibiotika u mleku. Širina zone zavisi od količine antibiotika u mleku. Kod negativnih uzoraka, tj. onih koji ne sadrže antibiotike inhibitorna zona se ne javlja.

Kao kontrolu treba uvek uzeti mleko koje sigurno ne sadrži antibiotike, kao i mleko kome se doda penicilin. Ako se sumnja da mleko sadrži penicilin treba dodati jednu kap pencilinaze na 5 ml mleka i izvršiti ispitivanje na pret-

hodno opisani način. Ako se radilo o prisustvu penicilina u mleku izostaće zona inhibicije, jer je penicilin pod dejstvom penicilinaze razoren.

Ista metoda može da se radi i na nešto izmenjen način pomoću tzv. rupa u agaru. U agaru pripremljenom na način kao za metodu sa diskovima samo različenom u debljem sloju, izbuše se rupe prečnika oko 1 cm. U te rupe se sipa mleko, koje se ispituje. Dalji postupak i prosuđivanje rezultata su identični kao kod metode sa diskovima.

B. stearothermophilus se čuva na kosom agaru ovog sastava: ekstrakt mesa 1 g, ekstrakt kvasca 2 g, pepton 5 g, NaCl 5 g, agar 15g, destilovana voda 1000 ml pH 7,4. Sterilizacija 20 minuta na 120° C.

2. Metoda sa metilenskim plavim po Frank-u

10 ml mleka zagreva se u vodenom kupatilu 5 minuta na 85° C, zatim ohladi i doda 2 ml reakcione smeše. Posle držanja u vodenom kupatilu na 43° C u toku 100 minuta, reakcija se čita na osnovu redukcije metilenskog plavog. Ako boja ostaje znači da mleko sadrži antibiotike, a ako nastaje redukcija nema antibiotika. Reakciona smeša se priprema neposredno pred upotrebu tako, što se u 30 ml jogurta stavi 1,2 ml 0,5% vodenog rastvora metilenskog plavog i 200 ml rastvora za razblaživanje. Posle toga se snažno protrese, a smeša se može upotrebiti u toku 30 minuta.

Rastvor za razblaživanje se sastoji od 10 g glukope i 250 mg kalcijumhlorida rastvorenih u 1000 ml destilovane vode. Gotov rastvor se razliva po 200 ml u boce sa staklenim perlicama i sterilise u autoklavu 15 minuta.

3. Metoda sa lakmus tinkturom po Welz-u

10 ml mleka se inaktivira 5 minuta na 80° C i ohladi na 40° C a zatim se doda 0,5 ml test kulture (**Streptococcus thermophilus** ili jogurtna kultura) i 0,5 ml lakmus tinkture (po Pubel Tieman-u) dobro izmeša i drži u vodenom kupatilu 3 časa na 40° C. Reakcija se čita prema tablici:

negativna (—): mleko se gruša, redukuje u crveno ili belo;

pozitivna (+): crveno-ljubičasta boja, bez grušanja ili sa samo slabim grušanjem; i

jako pozitivna (++): mleko ostaje tečno, boja plava ili plavo ljubičasta.

4. Metoda sa trifenil-tetrazoliumhloridom — TTT (Neal i Calbert)

10 ml mleka zagreva se 5 minuta na 80° C, zatim ohladi pod tekućom vodom na 40° C i doda 1 ml kulture test mikroorganizma razblažene u odnosu 1:1 sa sterilnim obranim mlekom. Posle držanja 2 časa u vodenom kupatilu na 37° C, doda 0,3 ml 4% vodenog rastvora 2, 3, 5, trifenil-tetrazoliumhlorida i posle 30 minuta čita rezultat na osnovu ove tablice:

negativno (—): intenzivno crvena boja;

pozitivno (+): crvena boja ali svetlija nego u negativnoj kontroli; i

jako pozitivna (++): ostaje bela boja mleka.

Kao test mikroorganizam koristi se **Str. thermophilus**.

5. Metoda sa metilenskim plavim (Galesoot)

Na 10 ml mleka (40—45° C) koje se prethodno inaktivira 10 minuta na 80° C dodaje se 0,2 ml test kulture (**Str. thermophilus**) i 0,5 ml rastvora metilenskog plavog, a zatim drži u vodenom kupatilu na 42° C.

Rezultat se čita posle 1, 2 i 3 časa:

negativno (—): potpuno obezbojavanje ili ostaje plavi prsten na površini širine 1 do 2 cm

pozitivno (+): ostaje plava boja u celoj epruveti ili u većem delu.

Kod mleka bez antibiotika obezbojavanje obično nastaje već za 1 čas. Ako redukcija ne nastupi ni za 200 minuta znak je da mleko sadrži inhibitorne materije.

Rastvor metilenskog plavog se pravi na ovaj način:

U 96%-tnom alkoholu napravi se zasićen rastvor metilen-plavog. Posle 48 časova rastvor se filtrira i od njega uzima 5 ml i razblažuje sa 195 ml vode. Mora se voditi računa o poreklu metilenskog plavog, pa se preporučuje da to bude metilen-plavo »medicinale«, metilen-plavo »B-extra« (Merck) ili metilen-plavo DAB-6.

Rezultat i diskusija

Ispitivanjem odabranih metoda na osetljivost prema različitim koncentracijama penicilina i streptomocina ispoljile su se međusobne razlike. Iz tab. 1 u kojoj su prikazani ovi rezultati vidi se da se kod 10 ogleda ponovljenih sa istim koncentracijama antibiotika rezultati nisu uvek slagali. Stoga smo kod prosuđivanja osetljivosti metoda uzeli kao sigurni pokazatelj samo one koncentracije koje su pri svim ispitivanjima bile dokazane. Na osnovu takvog prosuđivanja zaključili smo da su za dokazivanje penicilina u mleku najosetljivije metode na agaru pomoću rupa, metoda sa lakmus tinkturom i sa TTC. Ovim metodama može se sigurno dokazati 0,02 IJ penicilina u 1 ml mleka. Ostale metode su manje osetljive pa se sa njima sigurno može da dokaže 0,4 IJ penicilina u 1 ml mleka i veće koncentracije od toga, dok se manje koncentracije mogu ustanoviti samo ponekad, kao što se to vidi u tab. 1 gde broj u zagradi pokazuje pozitivnan nalaz od ukupno 10 izvedenih ogleda. Ispitivanja L a n g a takođe ukazuju na osetljivost metode sa lakmus tinkturom kojom je autor uspeo da dokaže 0,02 penicilina u 1 ml mleka, a metodom po Frank-u 0,04 kao mi. S c h ö n h e r r navodi da se metodom sa TTC može da dokaže 0,04 IJ penicilina u 1 ml mleka, a 0,01 IJ penicilina u 1 ml mleka metodom po Galesloot-u sa metilen plavim.

Pri ispitivanjima streptomocina svim metodama se sa sigurnošću može da dokaže 10 gama streptomocina u 1 ml mleka. Direktnim metodama na agaru i metodom po Frank-u može se dokazati i 5—6 gama streptomocina u 1 ml mleka dok se manje koncentracije mogu da dokažu sa manjom sigurnošću. Ostalim metodama uključenim u ova ispitivanja takođe se mogu dokazati manje koncentracije streptomocina od 10 gama u 1 ml mleka, ali ne uvek, pa se stoga smatraju manje osjetljivim na streptomocin od prethodnih.

Tablica 1.

Metode ispitivanja	Koncentracija antibiotika / ml mleka																
	Penicilin (IJ)						Streptomocin (gama)										
	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01	0,005	50	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Po Galesloot-u i Hasing-u (rupe)	+	+	+	+	(4)*	(2)	+	+	+	+	+	+	+	(6)	(4)	(4)	—
Po Galesloot-u i Hasing-u (diskovi)	+	+	(6)	(6)	(2)	—	+	+	+	+	+	+	(8)	(4)	(2)	(2)	—
Po Frank-u	+	+	(6)	(6)	(4)	—	+	+	+	+	+	+	(8)	(8)	(6)	(6)	—

Po Galeslo-																		
ot-u	+	+	(6)	(4)	—	—	+	+	(8)	(8)	(7)	(7)	(4)	(4)	(4)	(3)	—	
Po Welz-u																		
Po Neal-u i	+	+	+	+	(5)	—	+	+	(8)	(9)	(6)	(5)	(6)	(3)	(4)	(3)	—	
Calbert-u	+	+	+	+	(6)	(2)	+	+	(8)	(8)	(5)	(6)	(5)	(2)	(2)	(2)	—	

+ označava dokazanu koncentraciju u svih 10 ogleda izvedenih sa tom koncentracijom antibiotika.

* broj u zagradi označava koliko je puta odgovarajuća količina antibiotika dokazana kod 10 ogleda izvedenih sa tom koncentracijom.

— označava da nije dokazan antibiotik u toj koncentraciji.

Ispitivanja mogućnosti razlikovanja dezinfekcionih sredstava u mleku putem odabranih metoda pokazala su, da se kod metoda na agaru zona inhibicije ne javlja čak ni pri vrlo visokim koncentracijama tih sredstava u mleku.

Nasuprot tome kod indirektnih metoda, dezinficienski u različitim koncentracijama, zavisno od osetljivosti metode, sprečavaju rast mikroorganizama. Potpuna inhibicija nastaje kod metode po Frank-u u prisustvu 0,001% Omnisana i Tega. Istovremeno ovo znači da se ovom metodom te koncentracije dezinfekcionih sredstava mogu da dokažu u mleku. Kod ostalih indirektnih metoda test mikroorganizmi se ne razmnožavaju pri 0,005% pomenutih dezinficiensa. Iz rezultata ovih ispitivanja proizilazi da su direktne metode specifične za dokazivanje antibiotika u mleku. Ovo ističe i sam autor kao i neki drugi (Thieulin). Međutim indirektnim metodama ne može da se utvrdi o kojoj se vrsti inhibitornih materija radi, tj. da li su u pitanju antibiotici ili dezinficienski, jer se pozitivni rezultat dobija u oba slučaja.

Dalja ispitivanja na pojedinačnim i zbirnim uzorcima pokazala su još jednu prednost direktnih metoda na agaru nad indirektnim pri dokazivanju antibiotika u mleku. Nijedan od tih uzoraka nije pokazao zonu inhibicije na agaru, dok je kod indirektnih metoda proces redukcije nekada bio tako usporen da se dobijao utisak da mleko sadrži inhibitorne materije. Ovakav slučaj je zapažen kod 28 uzoraka od ukupno 200 pojedinačnih i 17 do 100 zbirnih. Usporena redukcija je zapažena kod metode po Galeslootu sa metilenskim plavim, po Franku i sa TTC, dok kod metode sa lakmus tinkturom po Velzu nije. Pošto su direktne metode na agaru pokazale da mleko ne sadrži antibiotike, a metoda po Welzu da ne sadrži ni antibiotike ni dezinficienske, smatramo da je proces redukcije bio izmenjen zbog nekih drugih razloga.

Osim toga krave od kojih su uzeti pojedinačni uzorci bile su pod stalnom veterinarskom kontrolom jednog od autora, pa se nije moglo dogoditi da u mleku bude antibiotika, dezinficiensa, konzervansa ili sličnih materija. Uzroka usporenoj redukciji koji ometaju pravilnu interpretaciju rezultata moglo bi da bude više, kao što ih uostalo ima i pri izvođenju probe reduktaze (povećan broj leukocita, prirodne inhibitorne materije mleka, metabolički procesi mikroflore mleka i s tim u vezi promene redoks potencijala mleka, prisustvo izvesnih streptokoka (*Str. saccharolactis*) koje proizvode materije sposobne da inhibiraju druge mikroorganizme i tako u kontroli mleka daju pogrešnu sliku kao da se radi o ostacima antibiotika (*Jepsen*) itd.). Stoga pri upotrebi indirektnih metoda treba biti obazriv kod davanja mišljenja. Ako ovome dodamo još i to da je pitanje odgajivanja osetljivih kultura na antibiotike veliki problem pri ispitivanju inhibitornih materija u mleku, onda je jasno sa koliko teškoća se stručnjaci sretaju pri kontroli mleka na antibiotike.

Po našim ispitivanjima najpodesniji način za dokazivanje antibiotika u mleku je direktna metoda na agaru sa rupama po Galeslootu i Hassing-u. Prednost ovoj metodi ne dajemo samo zbog njene osetljivosti prema niskim koncentracijama antibiotika i specifičnosti na antibiotike, već i zbog toga što se ne javljaju smetnje zapažene kod indirektnih metoda. Osim toga, ovom metodom mogu da se dokazuju i antibiotici u mlečnim proizvodima, potkišljenom mleku itd. što putem indirektnih metoda nije izvodljivo.

Zaključak

a) Za dokazivanje antibiotika u mleku i mlečnim proizvodima najpodesnija je direktna metoda na agaru sa rupama, gde kao test mikroorganizam služi **B. stearothermophilus var. calidolactis**. Ovom metodom sa sigurnošću može da se dokaže 0,02 IJ penicilina u 1 ml mleka i 5 gama streptomicina u 1 ml mleka.

b) Proba je specifična za dokazivanje antibiotika u mleku i njegovim proizvodima.

Literatura

1. FRANK, A. (1965): *Milchwissenschaft* 20, 361.
2. FRANK, A. & SCHRANDY E. (1965): *Milchwissenschaft* 20, 647.
3. GALESLOOT & HASSING, cit. THIEULIN, G. & VUILLAUME, R.: Elements pratiques d'analyse et d'inspection du lait et de produits laitiers, Paris 48.
4. JEPSEN, O.: Hygiène du lait, Organisation mondiale de la santé, Genève 1966.
5. LANG, K. (1967): *Milchwissenschaft* 22, 230.
6. NEAL, C. E. & GALBERT, H. E. (1955): *J. Dairy Sci.* 38, 629.
7. SCHÖNHER, W.: Tierärztliche Milchuntersuchung, Hirzel Verlag, Leipzig, 1965.
8. WELZ, W. (1961): *Archiv für Lebensmittelhygiene* 12, 196.

SASTAV I SVOJSTVA MLIJEKA KRAVA CRNOŠARE PASMINE*

Natalija DOZET i Marko STANIŠIĆ
Poljoprivredni fakultet, Sarajevo

Upoznavajući i analizirajući sastav mlijeka krava crnošare pasmine postavili smo zadatak da izučimo njegova svojstva sa nekoliko aspekata. Prateći kvalitet mlijeka kroz laktaciju (1) i izučavajući pojedine fizičke i hemijske komponente (2, 3, 4, 5) imali smo za cilj svestranije obrađivanje ove problematike. Ispitivanjem kvaliteta mlijeka individualnih krava željeli smo da dalje produbljavamo naša ispitivanja. Pri ocjeni kvaliteta mlijeka krava mora se uzeti u obzir i njihova individualna svojstva. Krave držane u jednoj štali, pod istim uslovima, proizvode mlijeko različitog sastava. Ova razlika može biti znatna i po kvalitetu i u sastavu mlijeka. U tim manifestacijama kvaliteta individualnosti postoji jedan faktor varijabilnosti koji je od velikog značaja za praksu.

Izučavanjem kvaliteta mlijeka individualnih krava bavio se čitav niz autora. A. A. Ilinjski i M. P. Kuzbalova (6) su utvrdili da su promjene na sastavu mlijeka svakodnevne, J. G. Davis i dr (7) navode radove autora koji su utvrdili da mlijeko individualnih krava može dati takve rezultate ispitivanja koja odstupaju od prosječnih uzoraka pojedine robe. Dechambre

* Rad je objavljen na prvoj jugoslavenskoj međunarodnoj konferenciji za stočarstvo, Novi Sad 9-12. lipnja god. 1970.