

ZNAČAJ POZNAVANJA REZISTENCIJE TEHNOLOŠKE MIKROFLORE PREMA ANTIBIOTICIMA I HIGIJENSKOJ KONTROLI KISELO-MLEČNIH PROIZVODA*

Miroslav ZEMANOVIĆ
Veterinarski fakultet, Beograd

Uvod

Od prvih dana primene antibiotika poznate su različite posledice njihove upotrebe. Pored toksičnog delovanja, pojave alergije, poremećaja u ekologiji mikroorganizama, hipo- i avitaminoza — veliki problem predstavlja i rezistencija bakterija prema jednom ili više antibiotika.

Nepravilno korišćenje antibiotika u praksi uslovljava pojavu antibiotika u animalnim proizvodima namenjenim ishrani ljudi. Stoga je relativno čest slučaj da se antibiotici nalaze u mleku iako zakonski propisi definišu postupak sa mlekom lečenih životinja kao i kontrolu mleka na prisustvo antibiotika. U vezi sa ovim može se pretpostaviti da bakterije koje čine tehnološku mikrofloru mlečnih proizvoda mogu da steknu rezistenciju prema antibioticima. Poznato je da su bakterije mlečne kiseline, a naročito *Streptococcus thermophilus* osetljive prema antibioticima, pa se usled toga pri kišeljenu mleka prisustvo antibiotika ispoljava u delimičnoj ili potpunoj inhibiciji fermentativnog procesa. Međutim, ako bi tehnološka mikroflora zbog bilo kojih razloga bila rezistentna prema antibioticima moglo bi se dogoditi da u promet dospeju proizvodi od mleka koji sadrže antibiotike.

Da bismo bliže upoznali mehanizam sticanja rezistencije prema antibioticima tehnološke mikroflore kiselomlečnih proizvoda, istraživali smo kojom dinamikom odabrani sojevi stiču rezistenciju, da li dolazi do promena u osnovnim osobinama i koliko dugo i pod kojim uslovima odabrane bakterijske vrste održavaju stečenu rezistenciju.

Materijal i metode rada

Za rad smo odabrali jogurtnu kulturu sastavljenu od vrsta *Lactobacillus bulgaricus* i *Str. thermophilus*, a od antibiotika streptomistreptomycin.

Prvo smo proverili osjetljivost odabranih jogurtnih kultura prema streptomycinu zasijavanjem u sterilno mleko u kome se nalazio streptomycin u koncentraciji od 5 mikrograma u ml mleka. Mada smo utvrdili da su odabrani sojevi osjetljivi prema streptomycinu, budući nije dolazilo do grušanja mleka i pored produžene inkubacije, pristupili smo privikavanju sojeva na veće koncentracije streptomicina u hranljivoj podlozi.

Radi lakšeg praćenja razvoja rezistencije, odlučili smo da radimo sa odvojenim kulturama vrste *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus* u odgovarajućim hranljivim podlogama. Kao najpodesniju hranljivu podlogu za vrstu *Lb. bulgaricus* izabrali smo specijalnu hranljivu podlogu za uzgoj laktobacila MRS (De Man, Rogosa, Sharpe), a za *Str. thermophilus* glukozni bujon.

Referat sa XIII. Seminara za mljekarsku industriju, održan 5—7. II. na Tehnološkom fakultetu u Zagrebu

Odabrane sojeve vrste *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus* privikavali smo na veće koncentracije streptomocina, postepenim povećavanjem koncentracije streptomocina u osnovnim podlogama. Zasejane podloge držali smo pri 37°C 24—48 časova, pa ukoliko je u MRS bujonu ili glukoznom bujonu nastajalo zamućenje sa talogom značilo je da su sojevi bili sposobni da rastu u toj koncentraciji streptomocina, odnosno da je postignut određeni stepen rezistencije.

Povećanje rezistencije vrsta *Lb. bulgaricus* i *thermophilus*, postizano je daljim presejavanjem u iste podloge, ali sa većim koncentracijama streptomocina. Presejavanja su vršena iz podloga u kojima je bilo rasta pri najvećim koncentracijama streptomocina.

Rezultati i diskusija

Rezultati istraživanja su pokazali da je odabrani soj vrste *Lb. bulgaricus* u prvoj pasaži bio u stanju da raste u prisustvu od 0,5 mikrograma u 1 ml podloge nakon inkubacije od 24 časa.

Već posle druge pasaže postignuta je rezistencija prema 5 mikrograma streptomocina u ml podloge, u trećoj prema 5.000 mikrograma/ml, a u četvrtoj prema 500.000 mikrograma/ml (0,5 g/ml). U trećoj i četvrtoj pasaži rast u podlogama s povećanim koncentracijama antibiotika dokazan je tek nakon 48 časova. U petoj pasaži pri koncentraciji od 0,5 g/ml rast je dokazan nakon 24 časa.

U tab. 1. dat je pregled dinamike postizanja rezistencije prema streptomocinu odabranog soja vrste *Lb. bulgaricus*.

Dinamika sticanja rezistencije prema streptomocinu odabranog soja bakterije *Lactobacillus bulgaricus* nakon pet pasaža.

Tablica 1.

Koncentracija streptomocina u mikrogr./ml	redosled pasaža				
	1.	2.	3.	4.	5.
0,5	+	+	+	+	+
5	—	+	+	+	+
50	—	+	+	+	+
500	—	—	+	+	+
50.000	—	—	—	+	+
500.000	—	—	—	+	+

Rezultati istraživanja rasta vrste *Str. thermophilus* u prisustvu antibiotika, pokazali su da se ove bakterije mogu razmnožavati u prisustvu od 0,5 mikrograma streptomocina u 1 ml podloge. U drugoj pasaži bilo je rasta pri koncentraciji od 50 mikrograma u 1 ml, u trećoj pri 0,5 g/ml, ali je vreme inkubacije bilo produženo na 40 časova. U četvrtoj pasaži ponovljena je koncentracija od 0,5 g/ml, samo je bilo skraćeno vreme inkubacije. Svaka naredna inkubacija trajala je po 24 časa, posle koje se mogao uočiti bogat rast bakterija u hranjivim podlogama.

U tab. 2 dat je pregled dinamike postizanja rezistencije prema streptomocinu odabranog soja vrste *Str. thermophilus*.

**Dinamika sticanja rezistencije prema streptomycinu soja bakterije
Streptococcus thermophilus nakon pet pasaža.**

Tablica 2.

Konzentracija streptomicina u mikrogram./ml	redosled pasaža				
	1.	2.	3.	4.	5.
0,5	+	+	+	+	+
5	—	+	+	+	+
50	—	—	+	+	+
500	—	—	+	+	+
5.000	—	—	+	+	+
50.000	—	—	—	+	+
500.000	—	—	—	+	+

Nakon postizanja rezistencije prema streptomycinu, pomešali smo oba rezistentna soja bakterija *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus* i izvršili zasejavanje sterilnog mleka sa dodatkom antibiotika u koncentracijama od 50, 500, 5.000 i 50.000 mikrograma u ml. Posle tri časa inkubacije pojavilo se grušanje mleka u svim epruvetama.

Interesantno je da smo kod obe vrste bakterija prilikom povećanja količine antibiotika u podlogama, morali da produžimo vreme inkubacije do 48 časova, da bi tek tada mogli da utvrdimo bogat rast bakterija. Razlog za ovu pojavu tražili smo u mehanizmima nastajanja rezistencije. Saglasno s podacima iz literature možemo pretpostaviti da su naše bakterijske populacije bile heterogene u svom sastavu tako, da su nakon delovanja antibiotika pokazale različita svojstva. Jedne su bile odmah ubijene, druge devitalizovane, treće su ostale u životu ali se nisu mogle razmnožavati i, najzad, preostale su bile žive i dalje se razmnožavale uprkos visokim koncentracijama antibiotika. Javlja se, dakle, selekcija koja favorizira nadživljavanje prirodnih »varijanti«. Pored selekcije, koja je posledica privremene promenljivosti, rezistencija se može manifestovati mutacijom. U jednoj populaciji dotle homogenoj mogu se pod određenim uslovima u jednom momentu stvoriti novi tipovi. Ove promene su uvek spontane i nagle, mada je potrebno više časova pre nego što se ispolje.

Ove mutacije mikroorganizama mogu biti izazvane raznim mutagenim sredstvima. U literaturi ima podataka da je i streptomycin jedno od takvih sredstava koje može izazvati mutagene promene u bakterijama.

Iz toga ne treba zaključiti da su uzroci rezistencije prema streptomycinu mnogih vrsta bakterija samo ove prirode.

Kada smo jednom dobili bogat rast rezistentnih sojeva vrsta *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus* u podlogama sa visokim koncentracijama streptomicina posle duže inkubacije, svaka naredna pasaža trajala je kraće vreme tako, da smo na kraju oglada spajanjem obe vrste bakterija dobili jogurt posle 3 sata inkubacije.

Na ovaj smo način utvrdili da se nakon sticanja rezistencije vrsta *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus* nisu ispitivane, ali će predstavljati predmet naših daljih istraživanja niza svojstava koja se pripisuju ovim bakterijama pri ishrani ljudi.

Održavanje stečene rezistencije jogurtne kulture proveravali smo svaka 24 časa u toku 7 dana zasejavanjem hranjivih podloga sa dodatkom visokih

koncentracija streptomicina i uvek smo uspevali da dokažemo rast, što nije bilo moguće postići sa kontrolnim sojevima nepriviknutim na streptomicin. Zahvaljujući ovoj osobini da se stečena rezistencija prema streptomicinu ne gubi stajanjem, može se prisustvo rezistentnih sojeva prema streptomicinu dokazati u jogurtu u onom terminu koji se predviđa kao rok upotrebe.

Zaključak

- 1) Rezistencija bakterija *Lb. bulgaricus* i *Str. thermophilus* prema streptomicinu i laboratorijskim uslovima postignuta je za 7 dana.
- 2) Rezistentni sojevi prema streptomicinu nisu izgubili osobinu da kisele i grušaju mleko za isto vreme kao i kontrolni sojevi istih bakterija.
- 3) Stečena osobina rezistencije nije se izgubila ni u kulturama starim 7 dana.

OBAVIJEST ČLANOVIMA UDRUŽENJA

GLAVNA GODIŠNJA SKUPŠTINA UDRUŽENJA MLJEKARSKIH RADNIKA SRH ODRŽAT ĆE SE DNE 12. LIPNJA 1975. S POČETKOM U 10 SATI U »PIONIR« MLJEKARSKA INDUSTRIJA — ŽUPANJA