

## Literatura

1. Stavić B. — Tehnološka mikrobiologija stočnih proizvoda i ishrana stoke, Naučna knjiga, 1962
2. Pankova A. — Kultiviranje kefirnih grybkov, Moločnaja promyšlennost No 1/1957.
3. Bogdanov V., Bannikoval — Podbor Moločnokislih bakterij dlja proizvodstva kiselomoločnih produktov, Moločnaja promyšlennost No 10/1957.
4. Bavina N. A. — Wlijanije promivki sefirnih grybkov na mikrofloru zakvaski, Moločnaja promyšlennost No 5/1973.
5. Veisseyre R. — Techniques laitières modernes, Paris, La maison Rustique, 1967.

## NOVA METODA ZA DOKAZIVANJE ANTIBIOTIKA U MLEKU

Zora MIJAČEVIĆ

Veterinarski fakultet, Beograd

Dokazivanje antibiotika u mleku je neophodan način kontrole ispravnosti mleka, a prema našim propisima ovaj postupak je i obavezan. Nedostatak jednostavnih i brzih metoda za dokazivanje antibiotika u mleku predstavlja glavnu prepreku za redovnu i pravilnu kontrolu mleka na prisustvo antibiotika. Stoga smo odlučili da koristeći iskustvo u radu sa više poznatih metoda napravimo takvu koja bi mogla da se primenjuje u svim uslovima prakse. Metoda koju smo nazvali »novom« predstavlja kombinaciju metode po Galesloot-u i Hassing-u (1) i metode po Kraack-u i Tolle-u (5). Kod primene prve neposredno pred rad mora da se priprema kultura *B. stearothermophilusa*, koja se zatim dodaje agaru pomoću koga se dokazuju antibiotici u mleku. Ovakva priprema zahteva određeno vreme i laboratorijske uslove pa se metode može da koristi samo u dobro opremljenim laboratorijama. Kod metoda po Kraack-u se koriste pločice sa 96 udubljenja u koje se razliva agar. Prema tome metoda je predviđena za istovremeno ispitivanje velikog broja uzoraka, zbog čega nije praktična za ispitivanje pojedinačnih uzoraka mleka. Podlogu smo u našoj metodi razlili u male epruvetice sa zatvaračem i čuvali ih do upotrebe u frižideru.

### MATERIJAL I NAČIN ISPITIVANJA

Kao hranljivu podlogu upotreбили smo tripton agar po Galesloot-u kome smo dodavali briljantcrno u istoj koncentraciji koju koriste Kraack i Tolle u svojim ispitivanjima antibiotika u mleku. Podlozi se pre razlivanja u epruvetice dodaje *B. stearothermophilus*. Da bi se vreme potrebno za dokazivanje antibiotika skratilo mora se obezbediti i intenzivno rastenje ovog mikroorganizma. S obzirom da rast *B. stearothermophilusa* zavisi od načina kultivisanja, pri pravljenju podloge za »novu metodu« koristili smo kulturu *B. stearothermophilusa* na agaru i u bujonu.

Za kultivisanje *B. stearothermophilusa* var. *calidolactis* na kosom agaru, koristili smo podlogu sledećeg sastava:

|                  |         |
|------------------|---------|
| Ekstrakt mesa    | 1 g     |
| Ekstrakt kvasca  | 1 g     |
| Pepton           | 5 g     |
| Natrijumhlorid   | 5 g     |
| Agar             | 15 g    |
| Destilovana voda | 1000 ml |

pH 7,4. Sterilizacija u autoklavu 20 min. na 120° C.

\* Rad saopšten na XVII Sastanku mikrobiologa i epidemiologa Jugoslavije, Pula 1975

Kulturu staru 24 časa spirali smo sa fiziološkim rastvorom i ovu suspenziju inaktivisali na 80° C 10 minuta. Ovako inaktivisanu kulturu čiju smo gustinu podesili dodavanjem fiziološkog rastvora na  $5,5 \times 10^6$  mikroorganizam/ml izmešali smo sa tripton agarom sledećeg sastava u odnosu 1 : 4.

|                  |         |
|------------------|---------|
| Ekstrakt kvasca  | 2,5 g   |
| Glukoza          | 1 g     |
| Tripton          | 5 g     |
| Agar             | 15 g    |
| Destilovana voda | 1000 ml |

pH 7. Sterilizacija u autoklavu 15 min. na 120° C.

Pripremljenoj podlozi se dodaje 8 mg<sup>0</sup>/o briljantnog rastvorenog u 10 ml fiziološkog rastvora, dobro izmeša i podloga sterilno razlije u prethodno sterilisane epruvetice po 0,2 ml. Pripremljene epruvetice se sterilišu u Kohovom loncu 5 min. a posle toga se drže na temperaturi frižidera. Ovako pripremljena podloga označena je kao podloga I.

Drugi način pripremanja epruvetice je bio sa bujonskom kulturom test mikroorganizma. Bujonska kultura dobije se na taj način što se sa kosog agara (opisanog u prvom slučaju) *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* zaseje u bujon sledećeg sastava:

|                  |        |
|------------------|--------|
| Ekstrakt kvasca  | 1 g    |
| Tripton          | 2 g    |
| Glukoza          | 0,05 g |
| Destilovana voda | 100 ml |

pH 7.

Bujon se razlije po 10 ml u Erlenmajerove boce od 100 ml i sterilise 15 min. na 120° C u autoklavu. Zasejani mikroorganizam se inkubira 18 časova na temperaturi od 55° C i posle inkubacije 1 ml ovako pripremljene kulture izmeša se sa 5—6 ml tripton agara (opisanog u prvom slučaju), i sterilno razlije u epruvetice. Podloga za dokazivanje antibiotika pripremljena na ovaj način označena je u daljem tekstu kao podloga II. Pripremljene podloge su razliveno po 0,2 ml u epruvetice. Od uzorka koji se ispituje se sterilnom pipetom sipa 0,1 ml na površinu agara i epruvetice stave u termostat na 55° C. Promena boje podloge od ljubačiste do žute označava redukciju briljantnog nastalo rastenjem *Bac. stearothermophilus*. Ako redukcija izostane znači da mleko sadrži antibiotik.

Ispitivanja smo podelili u tri dela: u prvom delu smo ispitivali vreme redukcije briljantnog, u drugom delu osetljivost »nove« metode koju smo upoređivali sa poznatim metodama za dokazivanje antibiotika a u trećem delu ispitivali smo održivost pripremljenih epruvetice.

## REZULTATI I DISKUSIJA

U prvom delu ispitivanja upoređivali smo vreme redukcije briljantnog i osetljivost metode da bismo na taj način utvrdili koliko je vremena potrebno za dokazivanje antibiotika u mleku. Rezultati ispitivanja prikazani su u tablici 1.

Tablica 1.

**Redukcija brilijanternog**

| Metode ispitivanja | Koncentracija antibiotika/ml |              |   |   |       |           |      | Vreme redukcije kontrolnih epruvetica |
|--------------------|------------------------------|--------------|---|---|-------|-----------|------|---------------------------------------|
|                    | 1                            | Streptomycin |   |   |       | Penicilin |      |                                       |
|                    |                              | 2            | 3 | 4 | 0,004 | 0,006     | 0,01 |                                       |
| Podloga I          | +                            | +            | + | + | —     | +         | +    | 2,30 <sup>h</sup>                     |
| Podloga II         | +                            | +            | + | + | +     | +         | +    | 2 <sup>h</sup>                        |

U epruveticama sa podlogom I na temperaturi od 55°C redukovalo se brilijanternog za 2,30 časova u epruveticama sa podlogom II za 2 časa.

Rezultati ispitivanja osetljivosti ove metode prikazani su u tablici 1. Iz tablice se vidi da se streptomycin može da dokaže u koncentraciji od 1 gama/ml u obe podloge a penicilin u podlozi I u koncentraciji od 0,006 IJ/ml a u podlozi II u koncentraciji od 0,004 IJ/ml.

Upoređivanjem »nove« metode sa poznatim metodama (po Galesloot-u i Hassingu, modifikovanu metodu po Galesloot-u i Hassingu-u i po Galesloot-u sa metilenskim plavim) za dokazivanje antibiotika (penicilina i streptomicina) dobili smo rezultate prikazane tablicom 2.

Tablica 2.

**Uspoređivanje nove metode sa drugim metodama**

| Metode ispitivanja po Galeslootu i Hassingu modifikovana metoda po Galeslootu i Hassingu po Galeslootu sa metilenskim plavim | Koncentracija antibiotika/ml |       |      |      |      |                     |     |     |     |     |     |   |   |   |   |    |
|--|------------------------------|-------|------|------|------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|---|---|---|---|----|
|  | Penicilin (IJ)               |       |      |      |      | Streptomycin (gama) |     |     |     |     |     |   |   |   |   |    |
|  | 0,004                        | 0,006 | 0,01 | 0,02 | 0,03 | 0,05                | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 1   | 2   | 3 | 4 | 5 | 8 | 10 |
| Podloga I  | —                            | —     | +    | +    | +    | —                   | +   | +   | +   | +   | +   | + | + | + | + | +  |
| Podloga II   | +                            | +     | +    | +    | +    | (1)*                | +   | +   | +   | +   | +   | + | + | + | + | +  |
|  | —                            | (1)   | +    | +    | +    | —                   | —   | —   | (1) | (2) | (2) | + | + | + | + | +  |
|  | —                            | (1)   | (2)  | +    | +    | +                   | +   | +   | +   | +   | +   | + | + | + | + | +  |
|  | (1)                          | +     | +    | +    | +    | +                   | +   | +   | +   | +   | +   | + | + | + | + | +  |

Iz tablice 2 se vidi da je podloga II davala najbolje rezultate. Podloga I davala je sigurno pozitivnu reakciju kod 0,01 IJ/ml penicilina i kod 0,05 gama/ml streptomicina. Ispitivanja po Galesloot-u i Hassingu-u dala su pozitivne rezultate kod koncentracije od 0,01 IJ/ml penicilina i 0,1 gama/ml streptomicina. Modifikovana metoda po Galesloot-u i Hassingu-u davala je pozitivne rezultate u koncentraciji od 0,004 IJ/ml penicilina i 0,1 gama/ml streptomicina. Metoda

LEGENDA: + označava dokazanu koncentraciju antibiotika u sva tri oglada izvedena sa tom koncentracijom

\* broj u zagradi označava koliko je puta odgovarajuća koncentracija antibiotika dokazana u tri oglada

— označava da nije dokazan antibiotik u toj koncentraciji

po Galesloot-u sa metilenskim plavim davala je najslabije rezultate i ovom metodom može se dokazati 0,02 IJ/ml penicilina i 4 gama/ml streptomocina.

Pošto nas je u toku naših ispitivanja interesovala i održivost epruvetica sa pripremljenim podlogama ispitivanje osetljivosti »nove« metode ponovili smo posle 5, 10 i 15 dana od razlivanja podloga. Epruvetice sa podlogom držali smo na temperaturi frižidera. Rezultati 5 i 10 dana su bili isti kao i sa sveže pripremljenom podlogom.

Posle 15 dana ponovili smo isti postupak i tada smo kao što je prikazano u tablici 3. imali sledeće rezultate.

### Osetljivost metode posle 15 dana čuvanja podloge u frižideru

Tablica 3.

| Metode ispitivanja | Koncentracija antibiotika/ml |     |     |     |   |   |   |
|--------------------|------------------------------|-----|-----|-----|---|---|---|
|                    | Streptomicin                 |     |     |     |   |   |   |
|                    | 0,05                         | 0,1 | 0,4 | 0,5 | 1 | 2 | 3 |
| Podloga I          | (8)*                         | +   | +   | +   | + | + | + |
| Podloga II         | (7)                          | (8) | +   | +   | + | + | + |

Legenda: + označava dokazanu koncentraciju antibiotika u svih 10 ogleđa

\* broj u zagradi označava koliko je puta dokazana koncentracija antibiotika u 10 ogleđa

Dokazano je 0,05 gama/ml streptomocina od 10 epruvetica u 8, a 0,1 gama/ml streptomocina u svih 10 epruvetica, u prvom načinu rada tj. sa podlogom I. Sa podlogom II dokazano je 0,05 gama/ml streptomocina u 7 epruvetica i 0,1 gama/ml streptomocina u 8 epruvetica. U svih 10 epruvetica dokazana je koncentracija od 0,4 gama/ml streptomocina. U toku našeg rada podloga I je davala bolje rezultate pa predlažemo da se ona koristi za dokazivanje antibiotika u mleku.

### Z a k l j u č a k

1. »Nova metoda« za dokazivanje antibiotika u mleku je podesna za svakodnevnu praksu jer je jednostavna i brza.

2. Metoda je vrlo osetljiva i pomoću nje se može dokazati 0,05 gama/ml streptomocina i 0,006 IJ/ml penicilina.

3. Pripremljene epruvetice sa podlogom za »novu metodu« mogu se koristiti 10 dana pod uslovom da se drže u frižideru.

4. Radne organizacije koje nemaju uslova za pripremanje podloge za »novu metodu« mogle bi da se snabdevaju iz opremljenih laboratorija što ovoj metodi daje posebnu prednost.

### L i t e r a t u r a

1. Galesloot i Hassing cit. Theieulin i Wuillaume R.: Elements pratiques d'analyse et d'inspection du lait et de produits laitieres, Paris, 48.
2. Scgraudy E., Raucher W.: Ein Beitrag zum Nachweis von Antibiotika in der Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest, Archiv für Lebensmittel-hygiene 6/117—121, 1972.

3. Laboratorium Enterotox D-4152 Kempten 2 Gebrauchsaweisung für der Brilliant-schwarz-Reduktionstest zum Nachweis antibiotisch wirksamer Substanzen.
4. Kraack J., Tolle A.: Brillantschwarz-Reduktionstest mit *Bac. steurothermophilus* var. *calidolactis* zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch. *Milchwissenschaft* 22 (669—673), 1967.
5. Višeslava Miljković, Nadežda Jakimovi S. Vasić: Antibiotici u mleku, *Mljekarstvo* 8, str. 170, 1970.

## Vijesti

### POSTDIPLOMSKI STUDIJ ZA USAVRŠAVANJE U TEHNOLOGIJI MLIJEKA

Tehnološki fakultet u Zagrebu raspisao je natječaj za upis polaznika na studij iz područja prehrambenih tehnologija.

Postdiplomski studij (III stupanj) mogu polaziti kandidati koji su završili tehnološki, poljoprivredni, veterinarski i farmaceutski fakultet. Nastava traje 4 semestra a počinje 15. 10. 1975 godine.

Ovaj studij je namijenjen i onim kandidatima koji se žele usavršiti u tehnologiji mlijeka i mlječnih proizvoda.

Nastavni plan obuhvaća ove predmete:

- I Semestar: nauka o namirnicama, izabrana poglavlja iz matematike, izabrana poglavlja iz prehrambeno-tehnološkog inženjerstva.
- II Semestar: metode i tehnika u istraživanju namirnica i eksperimentalna statistika. Izabrana poglavlja iz prehrambene tehnologije za koju se kandidat opredjelio.
- III i IV Semestar: kolokvij iz prehrambeno tehnološkog inženjerstva, kemije namirnica ili odabrane prehrambene tehnologije, magistarski rad (iz područja odabrane tehnologije).

U I i II Semestru kandidat odabire i jedan predmet po izboru između ovih kolegija: Izabrana poglavlja iz mikrobiologije namirnica, Izabrana poglavlja iz kemije koloida i površinski aktivnih tvari. Biopolimeri. Komparativna histologija (animalna). Kemija i tehnologija tvari arome. Sanitacija u prehrambenoj industriji. Metode rukovođenja istraživanjem i razvojem u prehrambenoj industriji. Primjena računara u istraživanju i rukovođenju. Ambalaža.

Trošak studija iznosi po jednom semestru 6.000 Din., a prijave se podnose Dekanatu Tehnološkog fakulteta u Zagrebu (Pierottijeva ul. 6).

**A. P.**