

AUTOMATIZIRANA METODA ZA RUTINSKO ODREĐIVANJE ZAOSTATAKA ANTIBIOTIKA U MLIJEKU*

Ljerka KRŠEV
Zagrebačka mljekara, Zagreb

Uvod

Mljekarski laboratoriji imaju velik posao kada žele odrediti kvalitetu mlijeka svakog svog proizvođača, pa im svakako nije na odmet kada se bilo koja od različitih operacija koju moraju izvršiti automatizira. Svaka analiza na prisutnost antibiotika u uzorku mlijeka traži poprilično velik utrošak radnog vremena jednog analitičara-bakteriologa (npr. metoda kolutića filter-papira na agarnoj ploči u Petrijevoj zdjelici). Uostalom, naći metodu koja će isključiti mnoge pogreške, napose manipulativne, od velike je koristi za mljekarske stručnjake koji rade u proizvodnji fermentiranih mlječnih proizvoda.

S obzirom da je potrebno analizirati svaki uzorak, a proizvođača ima mnogo, može se dnevno nakupiti i preko 1000 uzoraka mlijeka za analizu. Dakle, treba izraditi brzu »rutinsku« metodu s pomoću koje se može analizirati velik broj uzoraka, a istovremeno, takva metoda mora biti dovoljno osjetljiva, precizna (to je nadasve važno kod analize skupnog mlijeka neposredno pred početak proizvodnje fermentiranih proizvoda). U skladu s tim zahtjevima u laboratoriju Jouy-en-Josas, Centre National de Recherche Zootechniques (Francuska) razradili su turbidimetrijsku metodu za otkrivanje antibiotika — za brzo odabiranje mlijeka — slijedeći, naravno, koncentracije koje se mogu otkriti (0,01 i. j. penicilina/ml).

Princip metode

Turbidimetrijske metode temelje se na rastu test-mikroorganizma u tekućoj podlozi; to su vrlo brze i osjetljive metode, a takva je i biofotometrijska metoda od JAQUET-a i CHARTON-a (1964). Oni su u hranjivu podlogu jednog, prema antibioticima vrlo osjetljivog mikroorganizma dodavali serum mlijeka što su ga ispitivali. Pri upotrebi bakterije *Bacillus stearothermophilus* (kao test-organizma) moguće je otkriti 0,0001 i. j. penicilina/ml mlijeka.

U bakteriološkim laboratorijima Jouy-en-Josas upotrijebljena je biofotometrijska metoda s motom: »Odgovorite što prije«. Radi toga je tamo posebna pažnja obraćena na to da se što više skрати trajanje pojedinih operacija kao što je:

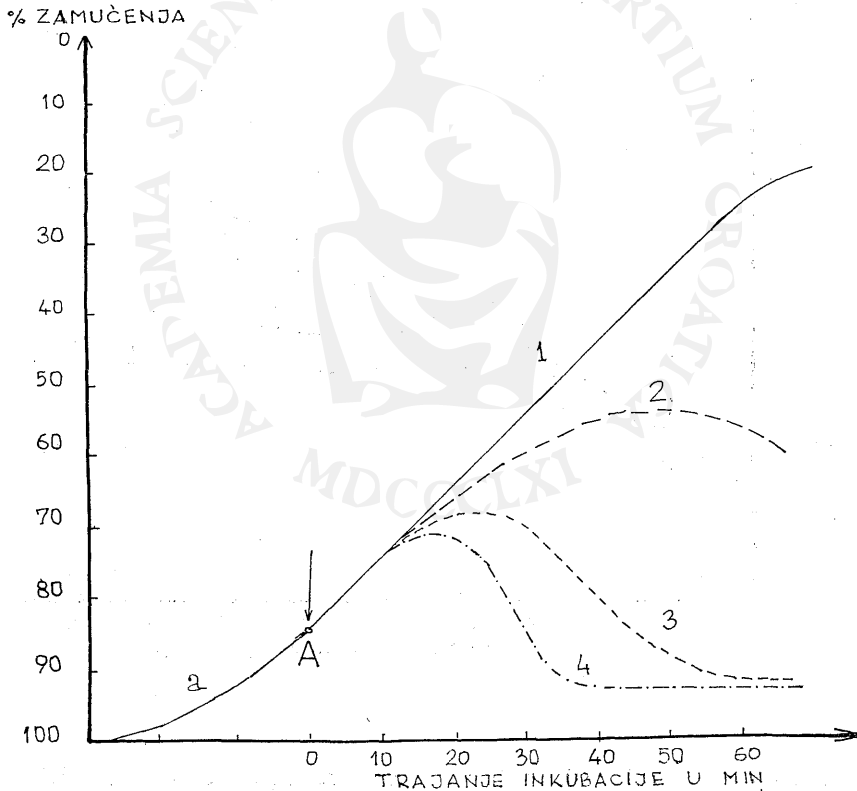
- 1) koagulacija mlijeka radi dobivanja mlječnog seruma;
- 2) filtracija mlječnog seruma potrebnog za analizu;
- 3) dodavanje mlječnog seruma u kulturu test-organizma u času eksponencijalne faze rasta i usporedno dodavanje kontrolnog mlječnog seruma u kulturu istog test-organizma;
- 4) inkubacija kulture s dodatkom mlječnog seruma uzorka mlijeka kojeg se ispituje i kulture s kontrolnim mlječnim serumom; i

* Referat sa XIV. naučnog sastanka mikrobiologa i epidemiologa Jugoslavije, 5—10. 6. 1972., Pula.

5) mjerenje zamućenosti (fotometar-registrator) s obzirom na krivulju rasta. I, konačno, interpretacija rezultata.

Iz priloženih dijagrama, koji služe i kao baždarni dijagrami, može se uočiti utjecaj nekih ispitivanih antibiotika na rast dvaju test-organizma (sl. 1 i 2).

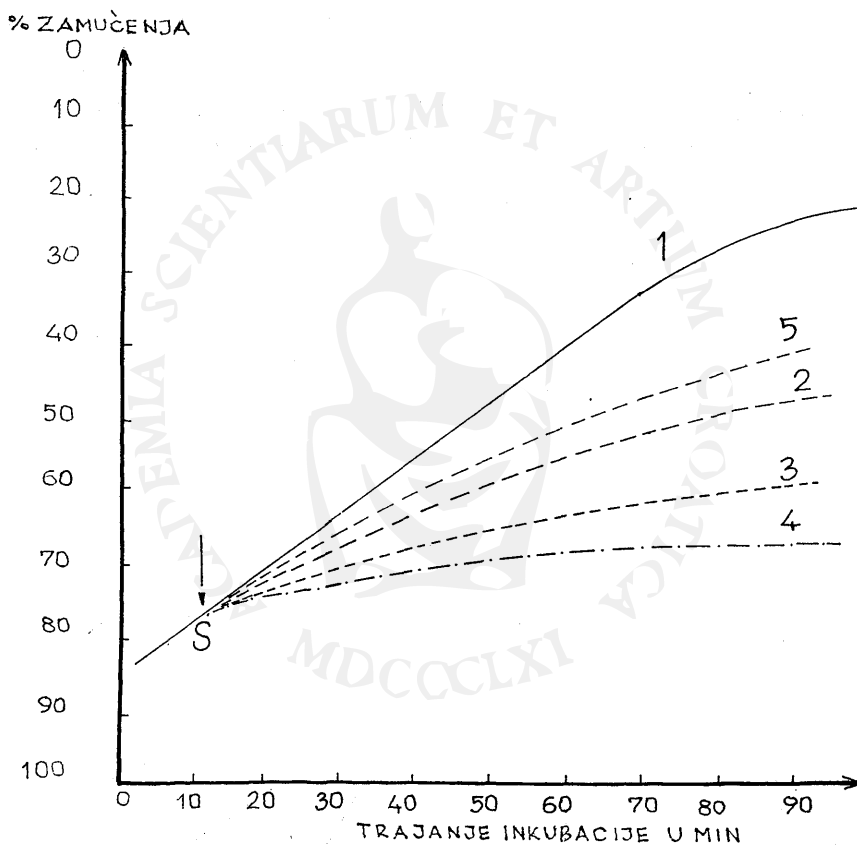
Slika 1. — Utjecaj određenih koncentracija penicilina na rast test-organizma *Bacillus stearothermophilus* (inkubacija pri 55° C).



Krivulja a = rast test-organizma prije dodavanja antibiotika; točka A = trenutak dodavanja antibiotika u kulturu; krivulje: 1 = uzorak mlijeka bez dodatka antibiotika; 2 = dodan antibiotik u koncentraciji od 0,01 i. j.; 3 = dodan antibiotik u koncentraciji od 0,1 i. j.; 4 = dodan antibiotik u koncentraciji od 1,0 i. j.

Prva faza tj. priprema mlječnog seruma (koagulacija mlijeka i filtracija mlječnog seruma) ne traje više od nekoliko minuta. Potrebno je u uzorak dodati koncentrirano sirilo i brzo ga staviti u termostatsku vodenu kupelj ugrijanu do 40°C. Ako se radi o mlijeku s usporenom koagulacijom treba mu dodati CaCl₂. Da bi se dobio bistar serum potrebno je serum filtrirati pod vakuumom preko celulozne membrane (3μ). Tako izbistren serum sadrži 60—80% antibiotika prisutnog u neobrađenom uzorku mlijeka.

Slika 2. — Utjecaj antibiotikâ na rast test-organizma *Streptococcus thermophilus* (inkubacija pri 45°C).



Točka S = trenutak dodavanja uzorka mlječnog seruma koji sadrži određenu koncentraciju antibiotika i kvašćev ekstrakt u bakterijsku kulturu koja se nalazi u eksponencijalnoj fazi rasta; krivulje: 1 = uzorak mlijeka bez dodatka antibiotika; 2 = dodan antibiotik u koncentraciji od 0,12 µg aureomicina/ml; 3 = dodan antibiotik u koncentraciji od 0,25 µg aureomicina/ml; 4 = dodan antibiotik u koncentraciji od 0,5 µg aureomicina/ml; 5 = dodan antibiotik u koncentraciji od 0,01 i. j. penicilina/ml.

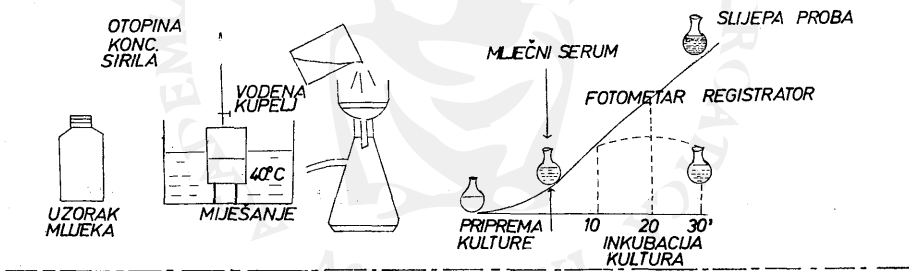
Serum se dodaje test-organizmu u eksponencijalnoj fazi rasta. Dva su test-organizma izabrana za analize radi njihove velike osjetljivosti prema zastacima antibiotika u mlijeku i radi njihovog vrlo brzog rasta (množenja), a to su: *Bacillus stearothermophilus* (optimalna temperatura rasta 55°C) i *Streptococcus thermophilus* (optimalna temperatura rasta 45°C). Ako se upotrijebi jedan od ova dva test-organizma i ako se pri-

država uputa za izvođenje analize, može se u vremenu od 30 minuta odrediti npr. 0,01 i. j. penicilina ili 0,15 μg aureomicina/ml mlijeka.

Tako opisanu metodu (shema metode je prikazana u sl. 3) koja je naročito osjetljiva na nivou inkubacije, autori su automatizirali.

Ponajprije da bi se dobili vjerodostojniji rezultati, potrebno je upotrijebiti kulture spomenutih bakterija u posve jednakim uvjetima rasta za sve uzorke koji se ispituju. Na osnovi provedenih pokusa došlo se do zaključka da bi za takvo dokazivanje antibiotika bio veoma prikladan analitički sistem »Tehnicon« koji se temelji na »kontinuiranom protoku«. S druge strane, autori koji su opisali metode dodavanja antibiotika u farmaceutske proizvode dobili su, upotrebljavajući »Autoanalizator«, vrlo reproducibilne rezultate.

Slika 3. — Shema turbidimetrijske metode od JAQUET-a i CHARTON-a (gornji dio slike) i automatizacije te metode (donji dio slike).



Dakle, autori su pokušali primjenom »Autoanalizatora« manuelnu metodu prevesti u automatiziranu metodu. Pojedine operacije koje čine sastavne dijelove metode, proučavali su odvojeno:

— koagulacija mlijeka provodi se u toku samo jedne minute tako, da mlijeko s dodatkom sirila i CaCl_2 cirkulira kroz termostatsku vodenu kupelj od 40°C;

— kontinuirana filtracija mlječnog seruma još nije u potpunosti riješena.

Rast kulture s uzorkom mlijeka provodi se u spiralnoj staklenoj cijevi, a put kroz nju traje pola sata. Spirala je uronjena u vodenoj kupelji. Tako vođenim rastom kulture test-organizma može se zapaziti određen rast koji je manje uočljiv od rasta kada se kultura miješa.

Napravljeni su pokusi s različitim otopinama antibiotika uz primjenu kultura. Razlike u rastu su dosta slabe, ali su reproducibilne.

Posve je sigurno, da će za svakoga tko želi primjenjivati ovu metodu biti potrebno određeno vrijeme da se ona uvede i sinkronizira. Naravno, uz takvu automatizaciju javljaju se i određeni novi problemi kao: kontaminacija sistema s termofilnim mikroorganizmima koji nisu test-organizmi, ili kako izoprati cijelu aparaturu nakon svakog uzorka, i u kojoj mjeri to utječe na točnost rezultata.

Literatura

1. Muller, M.: »Journée d' Information sur l'Apport de l'Automatisation au Laboratoire de Contrôle et de Recherche en Produits Laitiers« — à Paris, le Juin 1970.
2. Dairy Sci. Abstr. 28 (2540).
3. Dairy Sci. Abstr. 26 (200), 26 (201), 26 (202).
4. Galesloot, TH. E. & Hassing, F. (1962): A rapid and sensitive paper disc method for the detection of penicillin in milk. Ned. Melk-Zuivel 16, 89—95.
5. J. Dairy Sci. 50 (9) 1390 (1967)

KONTINUIRANA OBRADA MLIJEKA ZA PROIZVODNJU JOGURTA

Nebojša ŽIVIĆ

»Mljekara« Banja Luka

Potrošnja mlječno-kiselih napitaka iz godine u godinu je u stalnom porastu, a usporo se razvija i usavršava tehnologija i oprema za preradu mlijeka u fermentirane proizvode.

Tehnološki proces proizvodnje jogurta je kod nas većim dijelom još uvijek konzervativan, diskontinuiran. Termička obrada mlijeka se vrši u duplikatorima, što za povećanje proizvodnje i kvalitet proizvoda predstavlja nepremostivi problem.

Većina naših mljekara nema u svojim tehnološkim linijama određeni broj strojeva kao homogenizator, dezodorizator što je važno za poboljšanje kvalitete jogurta.

Namjera mi je da iznesem zapažanja u odabiranju jedne kontinuirane linije za pripremu i obradu mlijeka za proizvodnju jogurta, koja se može prilagodavati u našim uslovima kako za manje, tako i za veće mljekare. »Mljekara« u Banja Luci je u svom proizvodnom programu kod izgradnje nove mljekare dala najveći naglasak na povećanje i odabiranje linije za proizvodnju kvalitetnih mlječno-fermentiranih proizvoda. Obilazeći Austriju, Švajcarsku, Italiju, Švedsku i Bugarsku, došao sam do saznanja da je za veliku proizvodnju jogurta i bolji kvalitet neophodno obezbijediti kontinuirani način obrade mlijeka. Sagledavši iskustva gore spomenutih zemalja koje imaju razvijenu mljekarsku industriju sa savremenim tehnološkim rješenjima kod obrade mlijeka, a i na osnovu našeg iskustva sa stručnjacima iz »Alfa-Laval« iz Švedske, našli smo odgovarajuće rješenje koje je prilagođeno našim uslovima i u tim zahtjevima odgovaraće i ukusu našeg potrošača.