

ROMANA KIELSZNIA, WACŁAW SOŁTYS

Metody wykrywania antybiotyków w mleku

Z Instytutu Przemysłu Mleczarskiego w Warszawie

O szeregu lat do zwalczania licznych schorzeń u bydła stosuje się różne antybiotyki. W związku z tym mleko od krów poddanych leczeniu może zawierać pewne ilości antybiotyków. Obecność antybiotyków w mleku i jego przetworach może szkodzić zdrowiu ludzkiemu, jak również powodować zaburzenia w procesach technologicznych przemysłu mleczarskiego.

Władze sanitarne takich państw jak: USA, Anglia, Dania, Holandia, Szwecja, Szwajcaria, Niemcy Zachodnie, gdzie leczenie krów antybiotykami jest powszechne, przywiązują duże znaczenie do występowania antybiotyków w mleku i jego przetworach. Stwierdzono, że wiele konsumentów, szczególnie w USA, cierpi z powodu antybiotyków na schorzenia alergiczne. Oblicza się, że 10% ludności jest uczulone na antybiotyki, a w szczególności penicylinę (2).

Zawartość antybiotyków w mleku przerobowym stanowi również poważne zagrożenie dla przemysłu mleczarskiego. Problem ten szczególnie ostro występuje w krajach, gdzie leczenie zapaleń wymienia antybiotykami jest powszechne. W Anglii 14% mleka wykazuje zawartość antybiotyków, ale ponieważ jest mieszane w zakładach z mlekiem czystym, skażeniu ulega wszystko mleko (1). Nieduża nawet zawartość antybiotyków w mleku serowarskim powoduje zaburzenia w procesach technologicznych, doprowadzając niejednokrotnie do zepsucia całych warów.

Waldmeier przytacza kilka przykładów dużych strat mleczarni szwajcarskich (3), ponieważ w mleku przerobowym znajdowały się antybiotyki. Na przykład w jednej z mleczarni cały war sera ementalskiego musiano przeznaczyć na paszę dla świń, ponieważ znalazło się w nim mleko od krowy, która otrzymała do wymieniowo $\frac{1}{4}$ tubki penicyliny. Z tego samego powodu w innej mleczarni uległo zepsuciu 3000 l jogurtu. Ten sam autor informuje, że w jednej z mleczarni dodano nieopatrzenie 100 l mleka od krów leczonych penicyliną do 5000 l mleka czystego, marnując w ten sposób całą partię mleka. Dzieje się to na skutek bakteriostatycznych właściwości antybiotyków. Obecność antybiotyków w mleku utrudnia przeprowadzenie próby reduktazowej i fermentacyjnej, które są stosowane do oceny jakości mleka. W związku z tym należałoby się zastanowić jakiego rodzaju antybiotyki i w jakich ilościach są używane do leczenia schorzeń bydła, oraz w jaki sposób można je wykrywać, aby uniknąć przenikania do sprzedaży mleka i produktów mleczarskich skażonych antybiotykami.

Penicylina jest pierwszym z antybiotyków, jaki został zastosowany przy leczeniu zapaleń wymienia, oraz nadal pozostaje najczęściej stosowanym lekiem (5, 7, 9). Innymi antybiotykami zalecanymi do leczenia zapaleń wymienia są: streptomycyna, chlortetracyklina, oksytetracyklina, bacitracyna, neomycyna, chloromycetyna (5,7). Próbowano również stosować przy leczeniu zapaleń wymion kombinacje różnych antybiotyków: neomycynę z penicyliną, neomycynę z bacitracyną, penicyliną lub neomycynę z bacitracyną (8).

Antybiotyki podawane są zwierzętom (4, 5, 6): dowymieniowo i domięśniowo oraz doustnie (schorzenia przewodu pokarmowego i inne, oraz wyjątkowo w celach dietetycznych).

Czynniki wpływające na zawartość antybiotyku w mleku krów leczonych uzależnione są: 1. od zaawansowania schorzenia, 2. rodzaju stężenia i ilości użytego antybiotyku, 3. częstotliwości stosowania, 4. długości okresu leczenia, 5. sposobu podawania antybiotyku, 6. ilości mleka uzyskanego z gruczołu, 7. odstępu czasu jaki upłynął pomiędzy leczeniem, a dojeniem.

Metody stosowane do określania lub wykrywania antybiotyku można podzielić na: 1) metody chemiczne, 2) metody mikrobiologiczne, 3) metody oparte na równoczesnym podawaniu barwników i antybiotyków, 4) metody oparte na znakowaniu izotopami.

Dokładność metod chemicznych w porównaniu z metodami mikrobiologicznymi jest na ogół bardzo mała. Ponieważ w mleku znajduje się małe stężenie penicyliny, metody chemiczne nie mają więc dużego zastosowania (10, 11). Z dokładniejszych metod chemicznych można podać te, które pozwalają wykryć penicylinę z dokładnością do 1 mcg na 1 ml mleka. Metoda ta polega na reakcji między penicyliną i N-etylenodwuaminą (12). Do metod bardziej czułych zaliczamy metodę fluorometryczną Scudi'ego i Jelinka (13) przy pomocy 2-metoksy-trójchloro-9-aminoakrydyny. Metoda ta pozwala ustalić zawartość penicyliny z dokładnością do 0,0625 mcg, to znaczy prawie do 0,1 JM. Metody Forda i Gaspera (14, 16) z powodu małej jej dokładności nie podajemy.

Terramycynę można wykryć przez absorpcję w ultrafiolecie w roztworze kwasu (17). Wykrycie możliwe jest przy zawartości 8 do 80 mcg terramycyny na 1 ml mleka. Chloromycetyna może być również oznaczona drogą absorpcji w nadfiolecie. W połączeniu z alfa-naftolem, chloromycetyna daje charakterystyczne zabarwienie, pozwalające na oznaczanie kolorymetryczne. Dla streptomycyny względnie czuła, jest metoda oparta na podgrzewaniu w roz-

tworze zasadowym. Powstaje maltol, który można wykryć przy użyciu fenolu (18).

Nitroprusydek i żelazocjanek potasu dają w roztworze zasadowym zabarwienie pozwalające zastosować oznaczenia fotometryczne (19). Do tej metody wymagane jest stężenie streptomycyny od 20 do 100 mcg na ml próbki. Metodę tę również można zastosować do pochodnych streptomycyny, np. do dihydrostreptomycyny. Streptomycyna „B” oznaczana jest na podstawie zawartości mannozy przy użyciu odczynnika antronu. Aureomycyna daje bardzo silną fluorescencję, która osiąga swe maksimum przy pH — 6,5. Próbkę powinna zawierać stężenie aureomycyny w granicach od 0,0025 do 0,35 mcg/ml. Kolor jest stały. Erytromycyna ogrzewana z silnym kwasem rozkłada się dając kolor żółty, umożliwiając oznaczenia kolorymetryczne.

Metody mikrobiologiczne służące do wykrywania penicyliny i innych antybiotyków w mleku oparte są na wrażliwości niektórych bakterii na antybiotyki.

Juncher (20) opisał odmianę metody płytek agarowych, stosując *Staphylococcus aureus* i *Sarcina lutea*. Jacket i Steeg (21) opracowali metodę płytkową do wykrywania penicyliny, aureomycyny i streptomycyny, stosując *Micrococcus pyogenes* dla penicyliny, *B. cereus* dla streptomycyny i *B. mycoides* do aureomycyny. „Food and Drug Administration” (FDA) zatwierdziła i wprowadziła jako metodę urzędową, metodę krążkową, przy której stosuje się *Bac. subtilis* (22). Czulość tej metody wynosi od 0,02 do 0,05 JM/ml próbki.

Szereg autorów jak Krienke (23), Sanchez i Lamensans (24), Ullberg (25), Overby (26), Fleischmann (27), Adamse (28), Hietaranta i Von Timroth (22), Galesloot (29), Neal i Calbert (30), Berrigge (31) i inni opracowali metody wykrywania penicyliny i innych antybiotyków w mleku, polegające na zmianie kwasowości lub potencjału oksydoredukcyjnego. Najprostsze metody wykrywania antybiotyków w mleku polegają na zaszczerpieniu kultur zakwaszających na próbkach mleka badanego i na materiale kontrolnym. Z używanych kultur można wymienić *Lactobacillus bulgaricus* (wyodrębniono szczepy o różnej czulości), *Str. cremoris*, *Str. lactis*, *Str. thermophilus* i in. Do miareczkowania, zależnie od metodyki używa się odpowiednich odczynników lub indykatorów. Dokładność tych metod jest różna w zależności od zastosowanego szczepu, tj. od 0,25—0,005 JM/ml.

Wśród innych metod, polegających na zastosowaniu drobnoustrojów zakwaszających można wymienić metodę Trifonova (32) polegającą na oznaczaniu penicyliny polarograficznie z dokładnością od 0,1 do 0,4 JM/ml podanej substancji. Glister (33) i Goodall (34) opracowali metodę rozdzielania chromatograficznego do określania różnych penicylin. Przy metodzie

mikrobiologicznej Gotha (35) mierzy się kolorymetrycznie azotyn, który powstaje na skutek redukcji azotanu przez *Staph. aureus*. Metodą analogiczną jest metoda opisana przez Matticha (46).

Jedną z metod wykrywania penicyliny w mleku za pomocą badania mikroskopowego jest metoda Liska (43). Kultura *Str. thermophilus* poddana jest działaniu próbki mleka przez okres 60—90 minut przy 37°. Anormalny wzrost lub wydłużenie się komórek, lub redukcja 50% ilości kolonii w stosunku do próbki kontrolnej wskazuje na istnienie antybiotyku w mleku. Minimalne stężenia różnych antybiotyków, jakie zostały wykryte tą metodą, są następujące: penicylina 0,015 JM/ml, bacitracyna 0,01 JM/ml, terramycyna 0,15 mcg/ml, aureomycyna 0,15 mcg/ml, wreszcie streptomycyna 0,75 mcg/ml.

Metody opisane powyżej, przeznaczone do wykrywania penicyliny w mleku są uciążliwe, stąd też mogą być jedynie rzadko stosowane przy codziennej kontroli zawartości w mleku antybiotyków. Z tego powodu w ostatnich czasach dąży się do wynalezienia nowych metod, bardziej prostych i szybszych, które zapobiegałyby mieszanemu w mleczarniach mleka zawierającego penicylinę z mlekiem nie zanieczyszczonym. W tym celu do antybiotyków, używanych przy leczeniu wymienia próbuje się dodawać różne substancje, które powodowałyby zabarwienie mleka zawierającego penicylinę lub inne antybiotyki. Ułatwiłoby to w dużej mierze kontrolę mleka. Aby spełnić to zadanie barwnik musi odpowiadać następującym warunkom: 1) stopień trwałości powinien odpowiadać stopniowi trwałości antybiotyku; 2) nie może być toksyczny ani dla człowieka ani dla zwierzęcia; 3) nie powinien drażnić tkanek wymienia; 4) nie powinien wywierać działania hamującego na antybiotyki; 5) powinien być wydalany do mleka w tej samej mierze co antybiotyki; 6) barwa powinna być dostatecznie intensywna, aby można było łatwo go wykryć, nawet przy dużym rozcieńczeniu.

W wielu krajach jak: Niemcy, Dania, Szwajcaria, Holandia, Anglia, USA i innych przeprowadza się w ostatnich latach próby z dodawaniem barwników do antybiotyków. Tak więc Dalgaard-Mikkelsen i Rasmussen (36) zaproponowali barwnik tzw. „Green S” (sól monosodowa 4,4 di-2-hydrozy — 6,8 disulphonaphtylcarbinolanhydrytu). Mieszała ona 25—27 mg tego barwnika na 100 000 JM penicyliny. Przy stosowaniu tak barwionej penicyliny można było stwierdzić, że zabarwienie mleka utrzymywało się 6 dni, a równocześnie zawartość penicyliny spadała do 0,1 JM/ml.

Możliwość stosowania „Green S” została następnie potwierdzona przez Rasmussena i Simmesena (37), którzy używali ten barwnik z penicyliną z dodatkiem monostearynianu glinu.

Hargrove (38), Hargrove i Plowman (39) stosowali preparat zawierający fluoresceinę. Stwierdzili oni, że barwnik ten spełnia wszystkie warunki, jakie się stawia tego rodzaju preparatom. W skład barwnika wchodzi 125 mg fluoresceiny rozpuszczonej w oleju i 125 mg uraniny na dawkę antybiotyku. Fluoresceina może być łatwo wykryta jeszcze w 48 godzin po zastosowaniu. Lampą analityczną UV można ją wykryć po 96 godz. od momentu zastosowania.

Smitasiri (41) i wsp. próbowali zastosować chlorofil rozpuszczony w oleju. Mleko miało zabarwienie zielone 5—10 godz. od chwili zastosowania.

Shahani (42) stosował barwnik „zieleń” turecką w połączeniu z penicyliną, terramycyną, aureomycyną, streptomycyną i polimycyną. Otrzymał rezultaty zadowalające.

Wg Seelemana (44) w Danii stosuje się preparat „B” z barwiącą substancją „Green S”, pozwalającą określić stężenie penicyliny z dokładnością 0,1—0,2 mg/l. W Kiel (NRF) od dwu lat prowadzi się próby z dodawaniem substancji barwiącej do antybiotyków.

Obiger (45) na podstawie własnych badań uważa, że jedyną drogą zagwarantowania dla mleczarni dobrego mleka jest stosowanie z antybiotykami, służącymi do leczenia zapaleń wymienia substancji barwiących. W Instytucie w Kiel były stosowane związki chlorofilowe, fluoresceina i uranina. Stwierdzono, że związki barwiące można było wykryć gołym okiem do 2 dni od momentu ich zastosowania. Oprócz tego pod lampą ultrafioletową fluoresceinę i uraninę można było wykryć w mleku na trzeci dzień od momentu ich zastosowania.

Próbowano również wprowadzić do preparatów penicylinowych wszelkiego rodzaju izotopy radioaktywne, które pozwoliłyby określić ilość antybiotyku w mleku od leczonych krów. Jednakże tego rodzaju kontrola wymagałaby wyposażenia laboratoryjnego o zakresie przekraczającym możliwości zwykłego laboratorium mleczarskiego.

Z powyższego wynika, iż w obecnej dobie jest rzeczą praktycznie możliwą przy zastosowaniu metod stosunkowo prostych, wykrycie obecności nawet względnie niewielkich ilości antybiotyków w mleku i tym samym uniknięcie narażenia zdrowia ludzkiego na niebezpieczeństwo, a gospodarki narodowej na straty materialne.

Piśmiennictwo

- Antibiotics in milk. The milk in industry 1963.
- Anonim J.: Milk and Food Techn., 23, I, 1960.
- Waldmeier M.: Penicillin als Ursache von Fabrikations Störungen. Schw. Milchztg 1963, nr 29.
- Thome E. E.: Wpływ leczenia mastitis penicyliną na jakość produktów mleczarskich. Międzynar. Zw. Mleczarski 1952 53. Rev.
- Overby A. J.: Wiedza mleczarska Abstr. 1961, I, 1954 Review.
- Storgards T.: Mjölkkvaliteten efter penicyl. bhd Juverinflammationer 1947 — 1948. Tidskr. för Lantman Helsingfors.
- Marth E. H.: Ellikson B. E. jak wyż. 22, 3, 241, 1959 (Review).
- Vigue F. J.: Am. Vet. Med. Assoc. 124, 377—78 (1954).
- Johnson S. D., Finchet M. G.: Cornell Vet. 36, 138—158, (1946).
- Waachmus H.: Anal. Chim. Acta 7, 3, 255, 1952.
- Hiscox D. J.: Anal. Chem. 21, 658, 1949.
- Scudi J. V.: J. Biol. Chem. 164—184, 1946.
- Scudi J. V., Jelinek V. C.: J. Biol. Chem. 164—195, 1946.
- Ford J. H.: Anal. Chem. 19, 1004, 1947.
- Del Vecchio Argenziano Bull. Soc. ital. biol. sper. 22, 1189, 1946.
- Gasper T., Kolsck J., Berpar M. Z.: Anal. Chem. 154, 98, 1957.
- Hiscox D. J.: J. Amer. Pharm. Assoc. 40, 237, 1951.
- Boxer G. E., Jelinek V. C., Leghorn P. M.: J. Biol. Chem. 169, 153, 1947.
- Monastero F.: J. Amer. Pharm. Assoc. Sci. Ed. 41, 322, 1952.
- Juncher H.: Nord. Veterinarmed 2, 765, 1950.
- Jacket J., Steeg L.: Ann. Falsif. Fraudes. Paris 46, 5, 1953.
- Arret B., Kirschbaum A.: Amer. Milk Rev. 22, 34, 1960.
- Krienke W. A.: Milk Pl. Mon. 39, 4, 32, 1950.
- Sanchez G., Lamensans A.: C. R. Acad. Sci. Paris 224, 1189, 1947.
- Ullberg S.: Nord. Veterinarmed 4, 1061, 1952.
- Overby A. J.: Maelkeritidende 66, 269, 1953.
- Fleischmann K.: Deutsche Molkerei-Ztg. 75, 534, 1954.
- Adamse A. D.: Neth. Milk and Dairy J. 9, 121, 1955.
- Galesloot Th.: E. Neth. Milk and Dairy J. 9, 159, 1955.
- Neal C. E., Calbert H. E.: J. Dairy Sci. 38, 629—633, 1955.
- Berrigge N. J.: J. Dairy Res. 23, 336, 1956.
- Trifonov A.: Coll. Czechosl. Chem. Communic. I, 3, 23, 1948.
- Glister G. A.: The Analyst. 75, 310, 1950.
- Goodall P. R.: The Analyst. 72, 277, 1946.
- Goth, Bush: Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 16, 451, 1944.
- Dalgaard-Mikkelsen S., Rasmussen F.: Nord. Vet. Med. 9, 352, 1957.
- Rasmussen F., Simesen B.: Nord. Vet. Med. 12, 120—132, (1960).
- Hargrove R. E.: J. Dairy Sci. 41, 617, 1958.
- Hargrove R. E., Plowman R. D., Wright W. W.: J. Dairy Sci. 42, 202, 1959.
- Tersten, Storgards: Wykrywanie penicyliny i innych antybiotyków w mleku. (Wyd. Międz. Narod. Zw. Mlecz. tium. z francuskiego).
- Smitasiri T. J.: Milk and Food Techn. 21, 255, 1958.
- Shahani K. M.: Antibiotics Annual 1958—59, p. 883.
- Liska B. J.: J. Milk and Food Techn. 23, 117, 1960.
- Seeleman M.: Beachtenswerte Massnahmen zur Mastitis — Bekämpfung in Dänemark. Molkerei und Käserei Zeitung 1963.
- Obiger G.: Fragen der Mastitis Behandlung und deren Auswirkung auf die hygienische Beschaffenheit der Molkereimilch, Milchwissenschaft nr 16, 1961.
- Mattick L. R., Anderson E. O., Waldasin H. L.: J. Dairy Sci. 38, 829, 1955.

KONDRACHIN J. P.: Badanie etiologii niestrawności cieląt. (Izuczenie etiologii dispiepsiji tielat). Wietierinaria 5/64.

W wyniku przeprowadzonych badań autor dochodzi do następujących wniosków:

1. Powstawanie ciężkiej toksycznej postaci niestrawności noworodków — cieląt wiąże się z zaburzeniem przemiany aminokwasów w ustroju krów-matek.

2. Obniżenie poziomu wolnych aminokwasów w surowicy krwi jest następstwem karmienia krów niepełnowartościową (niedobory witaminowe i mineralne) paszą. Przy pełnowartościowym żywieniu nie odnotowuje się w surowicy krwi krów istotnych sezonowych wahań w zawartości aminokwasów i białka.

3. Nie można sądzić o stopniu zaburzenia przemiany białkowej w zwierzęcym ustroju według poziomu ogólnego białka w surowicy krwi bez uwzględnienia zawartości wolnych aminokwasów, ponieważ przy zaburzeniu przemiany materii jest możliwa ujemna korelacja pomiędzy tymi wskaźnikami.

4. W zespole poczyniń zapobiegających powstawaniu ciężkiej postaci niestrawności cieląt należy zasadniczo zwracać uwagę na zbalansowanie racji paszowych krów pod względem zawartości aminokwasów, białka i składników witaminowo-mineralnych.

F. Klepaczko