

# HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

LESZEK STEPANIAK, KAZIMIERZ KORNACKI, ANDRZEJ FETLIŃSKI

## Charakterystyka metod wykrywania i oznaczania resztek antybiotyków w żywności

Z Zakładu Produkcji Biopreparatów Mleczarskich w Olsztynie

Produkcja światowa penicyliny wzrosła w ciągu ostatnich 25 lat z 25 kg do 1000 ton, lub  $0,6 \times 10^{16}$  j.m. rocznie. Jest to więcej niż potrzeba do leczenia wszystkich ludzi na świecie niezależnie czy takie leczenie jest potrzebne, czy nie (40). Masowa produkcja przyczyniła się do upowszechnienia zastosowania antybiotyków w profilaktyce hodowlanej oraz konserwacji żywności.

Resztki antybiotyków w żywności mogą w dwojaki sposób zagrażać zdrowiu człowieka (21, 40, 44, 45, 60):

- antybiotyki lub produkty ich metabolicznego rozpadu mogą wywoływać bezpośrednio objawy toksyczne od poważnych anafilaktycznych szoków do reakcji hiperalergiczyńskich.
- mogą uodporniać mikroflorę przewodu pokarmowego i zmieniać jej ekologię, przez co leczenie antybiotykami staje się mniej skuteczne.

Do pozamedycznych problemów występowania antybiotyków w żywności można zaliczyć następujące czynniki (40):

- poważne zaburzenia w procesach fermentacyjnych przemysłu spożywczego i wynikię stąd straty ekonomiczne,
- fałszywe wyniki testów mikrobiologicznych przy ocenie higienicznej jakości produktów spożywczych.

Dopuszczalne dla zdrowia pozostałości antybiotyków w mięsie, mleku i jajach zostały ustalone przez Światową Organizację Zdrowia oraz ustawodawstwa niektórych krajów (4, 40, 60).

Wcześniejsze badania amerykańskie przeprowadzone przez Deana i wsp. (7) wykazały, że dominującym antybiotykiem występującym w żywności była penicylina, natomiast późniejsze wyniki (43) uwiarydowiły, że w mięsie zwierząt najczęściej występują tetracyklina, streptomycyna i penicylina. Wenzel (59) wykrył, że w RFN antybiotyki występują w 84,4% badanych próbek cielęciny. Stwierdził on przy tym występowanie takich antybiotyków jak chloramfenikol, tetracyklina i bacytracyna.

Badania krajowe wykonane przez Kulczakiewiczą (33) nie wykazały obecności antybiotyków w mięśniach 500 sztuk przebadanych świń.

Ze szczegółowych informacji zebranych przez Mola (40) w latach 1965 — 70 wynika, że w kilku krajach zachodnioeuropejskich zawartość antybiotyków w mleku surowym wahała się od kilku setnych do 2% ogółem przebadanych prób. Wyniki tych badań przeprowadzonych w układzie wieloletnim, wskazują dla niektórych krajów spadek procentowego udziału mleka z antybiotykami co należy tłumaczyć skutecznym rozwiniętym tam programem kontroli.

Z teoretycznego punktu widzenia wykrycie i identyfikacja określonego antybiotyku występującego w mieszaninie z innymi może odbyć się następującymi metodami (1, 17, 21):

— zastosowanie mikroorganizmu testowego czułego na antybiotyki wykrywany i wysoce odpornego na inne antybiotyki.

— inaktywacja przeszkadzających antybiotyków metodami chemicznymi lub biochemicznymi.

— sztuczne wzbudzenie u mikroorganizmów testowych odporności na przeszkadzające antybiotyki.

— rozdział mieszaniny antybiotyków za pomocą ekstrakcji rozpuszczalnikami selektywnymi, przy użyciu metod chromatografii oraz elektroforyzy, a następnie ich lokalizacja i identyfikacja metodami mikrobiologicznymi lub chemicznymi.

### Czułość i selektywność metod mikrobiologicznych

Oficjalnie uznane metody wykrywania pozostałości antybiotyków polegają na pomiarze stopnia zahamowania wzrostu wybranych mikroorganizmów testowych. Należą tu metody dyfuzyjne płytkowe z cylinderkami, studzienkami lub krążkami, metody turbimetryczne i metody redukcyjne. Szerokie opracowanie w zakresie metody dyfuzyjnych przedstawili Grove i Randal (16).

Metody stosowane do wykrywania resztek antybiotyków w żywności muszą mieć czułość pozwalającą na określenie od ułamka do milionowej części badanej substancji. Ustalone granice tolerancji są w wielu przypadkach takie same jak zakres wykrywalności antybiotyku najczulszą ze znanych metod (32, 62).

Arret i inni (1) ustalili próg interferencji antybiotyków, to jest maksymalną tolerancję antybiotyku przeszkadzającego, na którą nie reaguje jeszcze mikroorganizm testowy używany do identyfikacji i oznaczenia poszukiwanego antybiotyku. Przykładowo *Bacillus cereus* (ATCC 11778) jest specyficzny w stosunku do tetracyklin dopóki nie jest obecna penicylina w ilości większej niż 0,9 j/ml, a streptomycyna i bacytracyna w ilości większej niż 1 µg/ml.

Ponieważ nie można osiągnąć pełnej selektywności, tylko przy pomocy szczepu testowego, stosuje się kombinację szczepów i różnych roztworów buforowych oraz rozpuszczalników, celem osiągnięcia względnie selektywnej analizy próbki. Mimo ograniczonej liczby czynników selektywnych, ilościowe metody są czasochłonne i skomplikowane.

Do oznaczania stężenia 83 antybiotyków i ich preparatów obowiązujące w USA metody przewidują stosowanie 21 różnych mikroorganizmów testowych, 6 metod przygotowywania ich inokulum, 33 typy podłoża testowych, 8 różnych roztworów buforowych (4). Schothorst (53) opracował metodę wykrywania i identyfikacji 4 najpowszechniej stosowanych antybiotyków na drodze czysto biologicznej. Średnice stref hamowania uzyskano na płytkach z trzema mikroorganizmami testowymi (*B. cereus*, *B. subtilis* i *S. lutea*) oraz na podłożu o zróżnicowanym pH, wyniki naniesione na diagram dawały krzywe charakterystyczne dla każdego z badanych antybiotyków, którymi były penicylina, streptomycyna, tetracyklina i neomycyna.

Badacze francuscy (11, 12) analizowali możliwość identyfikacji antybiotyków w próbkach mięsa stosując kombinację 4 różnych mikroorganizmów testowych i 3 różnych płynów ekstrakcyjnych. Ustalili oni dla każdego z antybiotyków granice wykrywalności, przy wszystkich możliwych wariantach mikroorganizmów testowych i rozpuszczalników ekstrakcyjnych.

Opierając się o uzyskane wyniki ze wszystkich kombinacji można było zidentyfikować dodane pojedynczo do próbki penicylinę, chloramfenikol, oleandomycynę, erytromycynę, tylozynę, streptomycynę, bacytracynę.

Rutczyńska-Skonieczna i Rybińska (50) wykazały, że w tkankach jadalnych można wykryć występowanie streptomycyny, bacytracyny i penicyliny stosując jako szczepy testowe *S. lutea*, *B. subtilis* i *M. flavus* pod warunkiem, że nie występuje jednocześnie oksytetracyklina, lub też, że występuje ona w ilościach poniżej progu wrażliwości na wymienione mikroorganizmy. W badaniach rutynowych, w pierwszym etapie stosuje się test na ogólne hamowanie wzrostu, który powinien określić, czy badana próbka zawiera substancje hamujące typu antybiotyków. Do takiego testu nadają się mikroorganizmy mające stosunkowo dużą czułość, a możliwie najmniejszą specyficzność. Zastoso-

wany mikroorganizm powinien reagować na niskie stężenia możliwie wielu antybiotyków. Za mikroorganizmy charakteryzujące się taką cechą uważa się *Bacillus subtilis* i *Bacillus stearothermophilus* (31, 34, 46, 52).

Schaal i Wenzel (52) badali przydatność kilku szczepów *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. lutea* i *Flavobacter* sp. do wykrywania 8 najpowszechniej występujących w mięsie antybiotyków. 4 szczepy *B. subtilis* miały czułość uznaną za wystarczającą do wykrywania wszystkich 8 antybiotyków. Uzyskane wyniki ograniczały zastosowanie *B. cereus* do wykrywania tetracykliny, *S. lutea* do bacytracyny, penicyliny i chloramfenikolu, *Flavobacter* do chloramfenikolu. *B. subtilis* stosowano do wykrywania penicyliny w mleku, krwi, moczu i mięsie metodami dyfuzyjnymi, bądź redukcyjnymi (19, 28, 48). Wyznaczona dla tego mikroorganizmu wrażliwość na penicylinę wynosiła 0,02 do 0,05 j/ml.

Liczne publikowane metody z *B. stearothermophilus* (10, 14, 23, 35, 41, 49) wykazują brak jednolitości w poszczególnych etapach wykonawczych, dotyczących składu i pH podłoża, temperatury i czasu inkubacji, ilości zarodników w podłożu i sposobu przygotowania *inoculum*. Równocześnie stwierdzono, że stosunkowo wysoka koncentracja detergentów i niektórych środków konserwujących nie hamuje wzrostu *B. stearothermophilus* (10). *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953 opisany przez Gallesloota i Hassinga (14) znalazł zastosowanie w spopularyzowanej przez Kracka i Tolle (29, 30) 2,5 godzinnej metodzie redukcyjnej wykrywania antybiotyków w mleku. W proponowanej przez nich metodzie, próbki mleka nanoszone są na podłoże z czernią brylantową wypełniając część studzienki tabliczki do mikromiareczkowania. Kiełkujące zarodniki mikroorganizmu, redukujące czerń brylantową, wykazują wrażliwość na 0,001 j.m/ml penicyliny, 10 µg/ml streptomycyny i 0,7 µg/ml chlorotetracykliny.

W metodzie wykrywania antybiotyków opracowanej przez Van Osa i wsp. (47), badaną próbkę inkubuje się w fiolce zawierającej żel agarowy z przetrwalnikami *B. stearothermophilus* oraz tabletkę z substancjami odżywczymi i wskaźnikiem. Autorzy tej metody sugerują, że może ona być również przydatna do wykrywania antybiotyków w mięsie.

Murakami i wsp. (41) stwierdzili, że *B. subtilis* (ATCC6633) i *B. stearothermophilus* C-953 są jednakowo czułe na tetracyklinę, streptomycynę i chloramfenikol, przy czym szczep *B. stearothermophilus* był wyraźnie wrażliwy na penicylinę, w mniejszym stopniu wrażliwy na erytromycynę i znacznie mniej wrażliwy na nowobiocynę.

W niektórych krajach produkowane są specjalne gotowe zestawy do wykrywania pozostałości antybiotyków przy użyciu metod redukcyjnych z *B. stearothermophilus* i czernią bry-

lantową, lub purpurą bromokrezolową (21) jako wskaźnikami.

Ponieważ zastosowanie wysoko termicznie opornych zarodników jest wygodniejsze niż wykorzystanie organizmów testowych w formie komórek wegetatywnych, Zakład Produkcji Biopreparatów Mleczarskich w Olsztynie produkuje preparat do wykrywania antybiotyków, w którym liofilizowane zarodniki *B. stearothermophilus* są dodawane do suchych składników podłoża. Preparat w miarę potrzeby przygotowywany jest poprzez rozpuszczenie w 100°C, co maksymalnie upraszcza metodykę (9). W opracowanej przez nas metodzie dyfuzyjno-wskaźnikowej (9) z *B. stearothermophilus* wykrywalność antybiotyków w mleku wynosi: 0,003 j.m./ml penicyliny, 1 µg/ml streptomycyny, 0,1 µg/ml chloroteracykliny, 0,2 µg/ml neomycyny, 0,6 µg/ml tetracykliny, 1,0 µg/ml chloramfenikolu, 0,3 µg/ml erytromycyny.

Metoda ta została wprowadzona do Polskiej Normy jako obowiązująca w zakresie wykrywania antybiotyków w mleku i produktach mleczarskich.

#### Czynniki decydujące o szybkości, precyzji i czułości metod mikrobiologicznych

Dyfuzyjne metody ilościowe z mikroorganizmami mezofilnymi wymagają 16 — 18 godzinnej inkubacji (4, 16). Pozwala to na uzyskanie wyraźnego wzrostu mikroorganizmów testowych w drugim dniu od zaszczepienia.

Kunrad (35) dzięki zastosowaniu wstępnej preinkubacji płytek uzyskał w metodzie z *B. stearothermophilus* widoczne strefy hamowania po 45 minutach inkubacji. Tak krótki czas metody pozwala nie tylko na stwierdzenie obecności substancji hamujących, ale również na podjęcie w porę przedsięwzięć zapobiegawczych.

Zasady techniki oraz czynniki wpływające na dokładność metod dyfuzyjnych z cylinderkami i krążkami bibułowymi zostały przedstawione w pracach Gavina (15) oraz Davisa i Stouta (5, 6). Stosując cylinderki można osiągnąć większą czułość metody na niższe stężenie antybiotyków (50). Stwierdzono również, że zarówno stosowanie cylinderków jak i krążków papierowych, pozwala na uzyskanie prostej zależności logarytmicznej pomiędzy uzyskanymi rezultatami, a stężeniem antybiotyków (15, 56). Strefy hamowania powstające wokół krążków są lepiej wykształcone z uwagi na lepszy kontakt próby z powierzchnią agaru. Ostrość strefy hamowania zależy również od takich czynników jak typ mikroorganizmu testowego, skład podłoża, ilość drobnoustrojów w podłożu, czasu inkubacji. Niektóre antybiotyki na pojedynczej warstwie podłoża testowego wykazują tendencję do tworzenia podwójnych stref hamowania. W metodach ilościowych, w których próbkę nanosi się do cylinderka, stosuje się podwójną warstwę

podłoża — podstawową wyrównującą i testową zaszczepioną mikroorganizmem testowym (16).

Katz i Fassbender (25) uprościli oznaczanie ilościowe chloroteracykliny, stosując pojedynczą warstwę podłoża, przy zachowaniu niezmięnionej czułości i dokładności metody. W metodach dyfuzyjnych krążkowych stosuje się jedną warstwę podłoża, które jest wylewane na płaskodenne płytki o średnicy 100 mm w ilościach 8—10 ml, co daje grubość warstwy 1,25—1,5 mm. Przy bardzo cienkiej warstwie osiąga się gorszą dokładność oznaczeń. Większość metod poleca, aby próbki były nanoszone w czasie od 30 minut do kilku godzin od momentu zestalenia się podłoża ze względu na ujemny wpływ przechowywania na czułość i średnicę stref hamowania (5, 6, 26, 32).

Kunrad (35) oraz Witter i Tuckey (61) zaobserwowali, że płytki z podłożem zaszczepione *B. subtilis* oraz *B. stearothermophilus* mogą być przechowywane w temperaturze 2—5°C przez okres do 5—7 dni bez wpływu na szybkość oznaczania oraz czułość i średnicę stref hamowania.

Do czynników wpływających na czułość i precyzję metody można zaliczyć również: pH i właściwości buforowe podłoża, zawartość agaru w podłożu, nierówności i odkształcenia dna płytek Petriego. Dokładność metody jest bezpośrednio zależna od dokładności próby. Nanoszenie ściśle odmierzonej ilości do cylinderka lub na krążek za pomocą mikropipety pozwala na uzyskanie większej dokładności przy oznaczeniach ilościowych (6, 56).

#### Przygotowanie materiału do oznaczenia zawartości antybiotyków

Rozmieszczenie antybiotyków w tkankach zwierzęcych jest niejednolite. Niektóre antybiotyki są wiązane przez białka, inne są rozpuszczalne w tłuszczach i koncentrują się w tkankach zapasowych. Tetracykliny są wiązane i odkładane w kościach i zębach (18, 40). Wenzel (59) podaje, że koncentracja antybiotyków w organizmie zwierzęcym jest największa w nerwach, a następnie w wątrobie i mięśniach.

Ebrecht i Seifert (8) uważają, że wątroba jest organem, który najdłużej zatrzymuje większość antybiotyków i biopsja wątroby jest najbardziej obiektywnym odzwierciedleniem poziomu antybiotyków w organizmie zwierzęcym. Sugestie odnośnie sposobu pobierania próbek zwierząt po uboju, celem oszacowania poziomu i rozmieszczenia antybiotyków, podane zostały przez Kramera i wsp. (32).

Antybiotyki wykazują zróżnicowaną odporność na wysokie temperatury i warunki przechowywania (24).

W większości metod mikrobiologicznych próby nanoszone są na krążek bibułowy lub do cylinderka umieszczonego na powierzchni podłoża testowego. W metodach redukcyjnych często mleko jest jednocześnie próbką i podłożem, do

którego wprowadza się mikroorganizm testowy (51, 54, 58).

Freres i wsp. (11, 12) zwiększali koncentrację antybiotyków w ekstraktach wodnych lub metanolowych, uzyskanych z mięsa w ten sposób, że nanosili na krążek umieszczony na siatce po kilka lub kilkanaście kropli próby w odstępach czasu pozwalających na wyschnięcie każdej kolejno nanoszonej porcji. W metodach zaproponowanych przez Kramera i wsp. (32) do ekstrakcji większości antybiotyków z mięsa oraz produktów mleczarskich stosuje się bufor fosforanowe:

- pH 1,5 i 8,0 do ekstrakcji streptomycyny
- pH 4,5 do ekstrakcji tetracyklin
- pH 6,0 do ekstrakcji penicyliny i polimiksyny
- pH 8,0 do ekstrakcji erytromycyny i neomycyny.

Freres i wsp. (11, 12, 13) uważają, że czysty metanol jest najlepszym rozpuszczalnikiem do ekstrakcji bacytracyny, tetracyklin i chloramfenikolu, metanol z buforem węglanowym o pH 8,0 do ekstrakcji erytromycyny i tyozyny, bufor węglanowy o pH 8,0, do ekstrakcji penicyliny i streptomycyny. Smither (57) wykazał, że najczęściej występujące w mięsie antybiotyki dają się wyekstrahować acetonitrylem. Pozostałość po odparowaniu acetonitrylu i rozpuszczeniu w wodzie stanowi skoncentrowaną próbkę. Hamman i wsp. (17) opracowali metodę ekstrakcji izoaktylowych penicylin z mleka. Antybiotyk jest odzyskiwany za pomocą specyficznej wielostopniowej ekstrakcji cieczą — cieczą. Uzyskiwane ekstrakty są atestowane jako prawie całkowicie wolne od innych substancji.

#### Wpływ rodzaju próbki na rozwój mikroorganizmu testowego

Substancje biologiczne zawierają naturalne składniki, które mogą zarówno stymulować jak i hamować wzrost mikroorganizmów testowych. Substancje te mogą mieć wpływ na średnicę stref hamowania, wytwarzać fałszywe strefy lub dawać fałszywe pozytywne wyniki w metodach redukcyjnych. Biorąc powyższe pod uwagę wskazanym jest stosowanie prób kontrolnych wolnych od antybiotyków. Pierścienie ograniczonego wzrostu mikroorganizmu testowego mniejsze niż 1 mm otrzymywane w metodach dyfuzyjnych są często interpretowane jako wynik negatywny (32). Kraack i Reichmuth (31) stwierdzili, że pewne gatunki mikroflory, obecnej w mleku w dużych ilościach hamują rozwój *B. stearothermophilus*. Gatunek ten jest również bardzo wrażliwy na lizozym. Schuler (55) wnioskuje, że tylko pozostałości antybiotyków i sulfamidów obecne w wątrobie i nerkach mogą dawać definitywnie wykształcone strefy hamowania, gdy organizmem testowym jest *Sarcina lutea*, przy czym strefy utworzone wcześniej niż po 24 godzinach mogą

być strefami fałszywymi. Freres i wsp. (13) stwierdzili, że niektóre próbki cielęciny i wołowiny wolne od antybiotyków hamowały rozwój *M. flavus*. Równocześnie wykazano, że aktywność inhibująca była większa w mięśni wołowym i zanikała, gdy ekstrakty metanolowe mięśni poddawano neutralizacji. Stosunkowo duży procent rozpuszczalników organicznych nie wpływa na wyniki metody dyfuzyjnej, ale stężone bufor mogą hamować rozwój mikroorganizmów testowych (15).

#### Metody turbidymetryczne

Najbardziej obiecującą cechą metod turbidymetrycznych jest możliwość automatyzacji. Kuzel i Kawanagh (36) opracowali automatyczny system „autoturb” do oznaczania antybiotyków i witamin. Hussein i wsp. (20) zastosowali ten system do oznaczania stężenia chlorotetracykliny w paszy. Oznaczenia turbidymetryczne charakteryzują się gorszą precyzją, jednak wyniki otrzymywane są w ciągu tego samego dnia.

#### Kombinowane, chemiczne i mikrobiologiczne metody wykrywania i identyfikacji antybiotyków

W praktyce analitycznej wykorzystywana jest możliwość wybiórczego oznaczania i neutralizacji penicyliny za pomocą penicylinazy. Enzym ten może być dodawany do próbki lub do podłoża testowego (10, 51, 56). Natomiast streptomycynę zinktywować można hydroksylaminą (21).

Mieszaninę antybiotyków można również rozdzielać za pomocą chromatografii bibułowej, cienkowarstwowej lub elektroforezy. Metody te pozwalają na rozdział antybiotyków o podobnej budowie strukturalnej takich jak tetracykliny lub penicyliny (2, 13, 27, 42). Rozdzielone chromatograficznie antybiotyki mogą być identyfikowane metodami fizycznymi lub chemicznymi. Wywołanie chromatogramów następuje poprzez rozpylenie na ich powierzchni specyficznych związków chemicznych. Niektóre antybiotyki dają fluorescencję w świetle UV (37). Opracowano również szereg kombinowanych metod chromatograficzno-mikrobiologicznych rozdziału i wykrywania antybiotyków. Różnice pomiędzy nimi polegają na stosowanych nośnikach chromatograficznych, kompozycji faz rozdzielczych, technice chromatograficznej oraz rodzaju stosowanych mikroorganizmów testowych. Po rozdziale antybiotyków, na bibułę lub inny nośnik nakłada się agaryzowane podłoże zaszczepione czułym mikroorganizmem. W miejscach dyfuzji antybiotyków tworzą się po odpowiedniej inkubacji strefy hamowania, co pozwala zarówno na identyfikację, jak i ilościową interpretację wyników otrzymanego bioautogramu.

Langner i Tafel (38) zaprezentowali bioautogramy z rozdziałem 9 antybiotyków. Do roz-

działu używano płytki celulozowe oraz jako fazę rozdzielczą butanol, metanol, kwas octowy i wodę odpowiednio w stosunku 45:30:9:36. Stosując *B. subtilis* jako organizm testowy granica wykrywalności dla tetracykliny wynosiła 0,1 µg, a dla penicyliny 0,001 j.m.

Murakawa i wsp. (42) ekstrahowali z krwi i moczu penicylinę, ampicylinę i cloxacylinę przy użyciu etanolu. Uzyskane ekstrakty rozdzielano chromatograficznie i oznaczano metodą bioautografii. Błąd oznaczenia nie przekraczał 10%. Lightbown i De Rossi (39) przedstawiają aparat oraz technikę rozdzielania antybiotyków metodą elektroforezy na żelu agarowym. Testowali oni 21 antybiotyków rozpuszczalnych w wodzie lub płynach tkankowych. Zależnie od właściwości jonowych antybiotyki wędrowały do anody lub katody. Langner i Taufel (38) również do rozdzielania elektroforetycznego antybiotyków zastosowali żel agarowy naniesiony na zwykłe szkiełko podstawowe mikroskopu. Antybiotyki różniły się znacznie czasem migracji i tę właściwość wykorzystano do ich różnicowania.

Zaprezentowane tu informacje skłaniają nas do wyciągnięcia następujących wniosków:

Występowanie pozostałości antybiotyków w żywności stanowi ryzyko ze zdrowotnego punktu widzenia, jak również ogranicza przydatność surowców zwierzęcych w technologii żywności. Fakt ten jest nierozłącznie związany z intensyfikacją metod hodowlanych i rozwojem lecznictwa weterynaryjnego. Dla przeciwdziałania tym zjawiskom niezbędne jest opracowanie programu kontroli zawartości substancji hamujących typu antybiotyków w mięsie, mleku i innych produktach żywnościowych przy pomocy skutecznych i szybkich metod. Metody mikrobiologiczne z *B. stearotherophilus* są wystarczające, szybkie i dokładne i wydaje się, że powinny być upowszechnione w celach rutynowej kontroli pozostałości antybiotyków. Identyfikacja rodzaju antybiotyku w nieznanej próbce wymaga skomplikowanych metod postępowania oraz efektywnego sposobu ekstrakcji i koncentracji pozostałości antybiotyków z próbki.

#### Piśmiennictwo

- Arret B., Eckert J.: J. Pharm. Sci. 57, 871, 1968.
- Billow J., Speaker T. J.: J. Chromat. 67, 191, 1972.
- Bozzi F., Valdebouze P.: J. Chromat. 72, 426, 1972.
- Code of Federal Regulations. Title 21, USA, 1975.
- Davis W. W., Stout T. R.: Appl. Microbiol. 22, 659, 1971.
- Davis W. W., Stout T. R.: Appl. Microbiol. 22, 666, 1971.
- Dean D., Bennet J. K., Breazeale E. L.: S. West Med. 45, 352, 1964.
- Ebrecht A., Seltfert H.: Arch. Lebensmittelhyg. 23, 216, 1972.
- Feliński A., Kornacki K., Rybicka Z., Stepaniak L.: Przem. Miec. 10, 8, 1976.
- Forschner E.: Arch. Lebensmittelhyg. 22, 101, 1972.
- Freres D., Valdebouze P., Bailad F., Jacquet M. L.: Bull. Acad. Vet. Fr. 42, 833, 1969.
- Freres D., Valdebouze P.: Bull. Acad. Vet. Fr. 42, 847, 1969.
- Freres D., Valdebouze P., Delort-Lavan J.: Bull. Acad. Vet. Fr. 44, 123, 1971.
- Galesloot Th. E., Hassing F.: Neth. Milk Dairy J. 16, 93, 1962.
- Gavin J. J.: Appl. Microbiol. 5, 235, 1956.
- Grove D. C., Randall W. A.: Medical Encyclopedia. New York, 1955.
- Hamman J., Tolle A., Blüthgen A., Heschen W.: Milchwissenschaft 30, 1, 1975.
- Huber W. G.: Adv. vet. Sci. comp. Med. 15, 101, 1971.
- Huber W. G., Garlson M. B., Lepper M. H.: J. Am. vet. med. Ass. 154, 1590, 1969.
- Hussein S. R., Cumings A. M., Browning M.: J. Ass. off. analyt. Chem. 56, 23, 1973.
- IDF 59 Ann. Session, Salzburg, 1975.
- Igarashi T. R., Baughman R. W., Nelson F. E., Hartman F. A.: J. Milk Fd. Techn. 24, 143, 1961.
- Kabay A.: Appl. Microbiol. 22, 752, 1971.
- Katz S. E., Fassbender C. A.: Ass. off. analyt. Chem. 50, 821, 1969.
- Katz S. E., Fassbender C. A.: Bull. envir. contam. Toxic. 6, 11, 1971.
- Kirshbaum A., Arret B.: J. Pharm. Sci. 56, 511, 1967.
- Kline R. M., Golab T.: J. Chromat. 18, 409, 1965.
- Kosikowski F. A., Ledford R. R.: J. Am. vet. med. Ass. 136, 297, 1960.
- Kraack J., Tolle A.: Milchwissenschaft 22, 669, 1967.
- Kraack J., Tolle A.: Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145, 1969.
- Kraack J., Reichmuth J.: Arch. Lebensmittelhyg. 21, 82, 1971.
- Kramer J., Carter G., Arret B., Wilner J., Wright W. W., Kirshbaum A.: Bull. Nat. Cent for Antibiotics Insulin Analysts. F.D.A. USA, 1969.
- Kulczakiewicz J.: Medycyna Wet. 30, 585, 1974.
- Kunard W.: Z. Anal. Chemie. 243, 624, 1968.
- Kunard W.: Fleischwirtschaft 52, 465, 1972.
- Kuzel N. R., Kawanagh F. W.: J. Pharm. 60, 767, 1971.
- Lakata G. D.: J. Ass. off. analyt. Chem. 53, 224, 1970.
- Langner H. J., Taufel U.: Chemical Microbiol. Technol. Lebensmittel. 2, 71, 1973.
- Lightbown J. W., De Rossi P.: Analyst. Lond. 90, 89, 1965.
- Mol H.: Antibiotics and Milk. A.A. Balkema. Rotterdam 1975.
- Murakami H., Kanzaki M., Fujimoto Ch., Haruta M.: Fd. Sanitation Tokio 12, 86, 1972.
- Murakawa T., Wakai Y., Nishida M., Fujii R., Okada K., Goto S., Kuwahara D.: J. Antibiotics, Tokio 23, 250, 1971.
- Mussman H. G.: Feder Proc. 34, 197, 1975.
- Obiger D.: Arch. Lebensmittelhyg. 21, 209, 1970.
- Oehme F. W.: Toxicology, 1, 205, 1973.
- Official Method of Analysis, Ass. off. analyt. Chem. 16, 119, 1975.
- van Os J. L., Lameris S. A., Doodeward J., Oostendorp J. G.: Neth. Milk Dairy J. 29, 16, 1975.
- Palmer J. A., Kosikowski F. V.: J. Dairy Sci. 50, 1390, 1967.
- Picmarova B., Cerna E., Havlova J.: Prumysl. Potravin 25, 351, 1974.
- Rutczyńska-Skonieczna E. M., Rybińska K.: Roczniki PZH 25, 565, 1974.
- Rutczyńska-Skonieczna E. M.: Roczniki PZH 22, 449, 1971.
- Schaal M., Wenzel S.: Arch. Lebensmittelhyg. 23, 189, 1972.
- Schothorst M.: Fleischwirtschaft 50, 1085, 1970.
- Schraudy E., Ruascher W.: Archiv. Lebensmittelhyg. 32, 117, 1972.
- Schuler A.: Schweizer Archiv. Tierheilkunde 14, 413, 1972.
- Simon H. J.: Appl. Microbiol. 19, 573, 1969.
- Smither R.: Appl. Bact. 38, 235, 1975.
- Tacobs T., Klasens M., Pennings A.: Tijdschr. Diergeneesk. 97, 548, 1972.
- Wenzel S.: Dt. tierarztl. Wschr. 79, 145, 1972.
- WHO Rap. Ser. no. 430, 1969.
- Witter L. D., Tuckey S. L.: J. Milk Food Tech. 23, 230, 1960.
- Wright W. W.: J. Ass. off. analyt. Chem. 53, 219, 1970.

Adres autora: Leszek Stepaniak, ul. Zwycięstwa 1/49, 10-575 Olsztyn.

**VAN VLEET J. F., RUTH G. R.: Efektywność wzbogacania paszy w zapobieganiu niedoborowi seleno-witaminy E u świń. (Efficacy of supplement in prevention of selenium-vitamin E deficiency in swine).** Amer. J. vet. Res. 38, 1299—1305, 1977 (9).

Efektywność paszy wzbogaconej w zapobieganiu niedoborowi seleno-witaminy E przesłedzono na 5 tygodniowych prosiętach. Prosięta z 12 grup po 5 tygodniach żywienia dietą niedoborową otrzymywały z paszą względnie w iniekcjach witaminę E i preparaty zawierające selen. U prosiąt otrzymujących dietę podstawową zmiany w wątrobie występowały u 92%, w sercu u 79%, w mięśniach u 63%. Częściowe działanie ochronne wywierała pasza wzbogacona w 0,03 ppm selenometioniny, 15 jm witaminy E/kg; 0,02 ppm selenometioniny i 15 jm witaminy E/kg; 0,1 ppm seleninu sodowego, małe dawki preparatu Se-E w iniekcjach (0,06 mg SE i 4 jm alfa tokoferolu/kg wagi ciała), oraz dodatek do paszy 0,5% dl-metioniny. Występowaniu niedoboru zapobiegało podawanie 30 jm wit. E/kg paszy, 0,6 ppm selenometioniny, 200 jm witaminy E oraz iniekcje 0,22 mg Se i 15 jm alfa tokoferolu/kg względnie 1,1 mg Se i 75 jm alfa tokoferolu/kg. Preparaty te nie zapobiegały jednakże powstawaniu owrzodzeń w przewodzie pokarmowym.

G.