

Piśmiennictwo

1. Clausen H., Thomsen R. N.: Rep. Nat. Res. Inst. Anim. Husb. Copenhagen, 1956.
2. Janicki M. A.: Zesz. problem. Post. Nauk rol.: 103, 13, 1970.
3. Gilland S. E., Speck M. L.: J. Fd Protect. 40, 820, 1977.
4. Grau R., Hamm R.: Fleischwirtschaft, 32, 210, 1952.
5. Kao C. T., Frazier W. C.: Appl. Microbiol. 14, 251, 1966.
6. Lawrie R. A., Gatherum D. P., Hale H. P.: Nature 182, 807, 1958.
7. Pohja M. L., Nünivaara F. P.: Fleischwirtschaft 37, 193, 1957.
8. Prost E.: Medycyna Wet. 37, 193, 1981.
9. Rey C. R., Kraft A. A., Topel D. G., Parrish JR. F. C., Hotchkiss D. K.: J Fd Sci. 41, 111, 1976.
10. Speck M. L.: J. Dairy Sci. 55, 1019, 1972.
11. Sporn P., Losert U., Baumgartner W., Glawisching E., Herkner H.: Wien. tierärztl. Mschr. 64, 318, 1977.
12. Tyszkiewicz S.: Badanie fizycznych właściwości mięsa. WNT, 1969, s. 94.

Adres autora: prof. dr habil. Stanisław J. Zaleski, ul. Canaletta 16/5, 51-650 Wrocław

Залеский С., Лавик Б., Кежковский М., Янишевский А. — Оценка бактериологического состояния свинины с изменениями PSE.

Провели сравнительное микробиологическое исследование свинины нормальной и показывающей изменения PSE разной интенсивности. В мясе, свободном от изъяна PSE, психротрофные и мезофильные бактерии достигают раньше пика роста популяции чем в мясе с изменениями PSE. Пики роста популяций этих бактерий в нормальном мясе

находятся на низшем уровне. В мясе с продвинутыми изменениями PSE бактерии молочнокислого брожения обладают положительными условиями развития, отрицательными же бактерии, растущие на культуре Берд-Паркера. Мясо PSE, хранимое в темп. 0—4°C, отличается той же или несколько большей устойчивостью по сравнению с мышечной тканью, свободной от PSE. О потребительной пригодности мяса PSE должны решать совместно сенсорные свойства, технологическая пригодность и санитарное качество.

Zaleski S. J., Lawik B., Kierzkowski M., Janiszewski A. — Evaluation of a bacteriological state of PSE swine meat.

Comparative microbiological examinations were performed with normal and PSE swine meat of various degree of changes. In normal meat psychrophilic and mesophilic bacteria reached earlier a peak of growth in comparison to PSE meat. The peaks of growth of these bacteria in normal meat were on a lower level. Bacteria of lactic fermentation have profitable and these growing on Baird Parker medium have unprofitable conditions for development on PSE meat. PSE meat has at 0—4°C the same or a little higher stability than a normal one. About consumptive value of PSE meat should decide sensoric features, technological usefulness and a sanitary quality.

CZESŁAW KUREK, KRZYSTYNA MILKO

Szybki test dyfuzyjny do wykrywania substancji hamujących w mleku

Zakład Higieny Weterynaryjnej, ul. Kaprów 10, 80-316 Gdańsk 5

Wśród metod służących do wykrywania pozostałości antybiotyków w artykułach pochodzenia zwierzęcego największe zastosowanie znalazły metody mikrobiologiczne wykorzystujące wrażliwość drobnoustrojów w stosunku do określonych związków chemicznych. Należą tu metody dyfuzyjne (cylinderkowo-płytkowa, studzienkowa, krążkowa), turbidymetryczne i redukcyjne (9).

Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 zastosowany przez Galesloota i Hassinga (2) jest obecnie powszechnie używany jako szczep testowy przy wykrywaniu pozostałości antybiotyków i innych substancji hamujących w mleku (4, 7, 8, 10). Kraack i Tolle (4, 5) wykorzystując właściwości redukujące *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* wobec czerni brylantowej, opracowali 2,5-godzinną metodę redukcyjną wykrywania antybiotyków w mleku, uzyskując wrażliwość mikroorganizmu na 0,007 j/cm³ penicyliny. Właściwości kwaszące szczepu były punktem wyjścia w metodzie wykrywania antybiotyków proponowanej przez Van Osa i wsp. (11), gdzie badana próbka mleka w ciągu 2,5 godz. inkubowana jest w probówce zawierającej żel

agarowy z przetrwalnikami oraz tabletkę z substancjami odżywczymi i wskaźnikiem zmian pH środowiska — purpurą bromokrezolową. Kiełkujące przetrwalniki wykazują wrażliwość na 0,006 j/cm³ penicyliny.

Wysoka czułość drobnoustroju testowego, krótki czas metody oraz uproszczony schemat postępowania sprawia, iż w niektórych krajach produkowane są specjalne gotowe zestawy do wykrywania pozostałości antybiotyków przy użyciu metod redukcyjnych z *Bacillus stearothermophilus* i czernią brylantową (5, 6), lub purpurą bromokrezolową (11) jako wskaźnikami. Podobny preparat produkowany jest również w Polsce (2), lecz ze względu na wysokie koszty produkcji dostępny jest jedynie niektórym laboratoriom przemysłu mleczarskiego.

Celem niniejszych badań było opracowanie sposobu wykonania, a następnie stosowania w warunkach laboratoryjnych podłoża testowego do szybkiego wykrywania pozostałości substancji hamujących w mleku. Podłoże takie, przedstawione przez Van Osa i wsp. (11) jest produkowane w niektórych krajach w postaci dwóch gotowych preparatów i stosowane w badaniach rutynowych.

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 30 prób mleka spożywczo homogenizowanego, wolnego od substancji hamujących. Do prób mleka dodano sól potasową penicyliny G w rozcieńczeniach: 0,01 j/cm³, 0,008 j/cm³, 0,006 j/cm³, 0,005 j/cm³, 0,004 j/cm³, 0,003 j/cm³, 0,002 j/cm³.

W badaniach stosowano metodę dyfuzyjno-wskaznikową wykrywania antybiotyków w mleku opracowaną przez Van Osa i wsp. (11). Jednakże, ze względu na brak możliwości dokładnego powtórzenia proponowanego przez autorów schematu postępowania, którzy korzystali z gotowych komponentów wchodzących w skład podłoża, metodykę badań własnych uzupełniono głównie o fragmenty dotyczące otrzymywania przetrwalników drobnoustroju testowego, bazując na doniesieniach innych autorów (1, 2, 7, 8, 10, 11).

Szkló i aparatura: próbki serologiczne z korkami gumowymi, kolbki Erlenmeijera o poj. 100 cm³, pipety miarowe, wirówka WE-6, cieplarka lub łaźnia wodna. Szkló po umyciu dokładnie płukano w wodzie destylowanej o pH=7,0±0,1.

Odczyniki:

1. 1% bufor fosforowy o pH=6,0 (8 g KH₂PO₄+2 g K₂HPO₄ rozpuszczono w H₂O destylowanej i dopełniono do 1000 cm³). Wyjaławianie — 121°C przez 20 min.
2. roztwory wzorcowe penicyliny
 - a) celem uzyskania roztworów podstawowych rozpuszczano zawartość ampulki soli potasowej penicyliny G (*Penicillinum cryst.*) o aktywności 600 000 j/m, lub 100 000 j/m (lub podobnej) w buforze fosforanowym o pH=6,0 w celu otrzymania antybiotyku w stężeniach: 1000 j/cm³, 100 j/cm³, 1 j/cm³;
 - b) roztwory robocze przyrządzano w oparciu o roztwory podstawowe penicyliny przygotowując kolejne rozcieńczenia antybiotyku w mleku wolnym od penicyliny w taki sposób, aby otrzymać m.in. stężenia 0,005—0,004 j/cm³.
3. Podłoża
 - a) podłoża do hodowli i przechowywania szczepu testowego (skosy, butle Roux)

suchy bulion mięsny	— 15,0 g
glukoza	— 0,5 g
MnCl ₂ ×H ₂ O	— 30,0 mg
agar	— 20,0 g
woda destylowana	— 1000,0 cm ³
pH końcowe = 6,8±0,1. Wyjaławianie — 121°C	
15 min.	
 - b) podłoża do oznaczania obecności substancji hamujących w mleku

pepton (tryptone, względnie peptobak)	— 125,0 mg
glukoza	— 125,0 mg
mleko w proszku (wolne od substancji hamujących)	— 150,0 mg
purpura bromokrezolowa	— 62,0 mg
woda destylowana	— 250,0 cm ³
Wyjaławianie — 121°C przez 15 min.	
agar wodny 0,9%	— 1000,0 cm ³
pH końcowe = 7,7±0,1. Wyjaławianie — 121°C	
przez 15 min.	

Mleko zawierające substancji hamujących przygotowywano jako 10% roztwór mleka odtłuszczonego w proszku w wodzie destylowanej, ogrzewany w temp. 100°C przez okres 1 godz. Mleko takie przechowywano nie dłużej jak 1 tydzień w temp. 5°C.

Do badań używano szczep *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 z Kolekcji Szczepów Instytutu Inżynierii i Biotechnologii Żywności ART w Olsztynie, który przechowywano na skosach w temp. 4°C i przesiewano raz w tygodniu.

Otrzymywanie zawiesiny przetrwalników. Hodowlę macierzystą przesiewano na 6 skosów z takim sa-

mym podłożem, a po 48-godzinnej inkubacji w temp. 66°C każdy skos zmywano 1 cm³ jałowego roztworu fizjologicznego soli. Następnie zawiesinę bakteryjną rozprowadzano na powierzchni podłoża namnażającego w trzech butlach Roux (po 300 cm³) w ten sposób, by po 2 cm³ spłuczyny komórek przenieść do każdej butli. Po 72-godzinnej inkubacji w temp. 66°C zmywano wyrosłe kolonie stosując jałowe pereki szklane i roztwór fizjologiczny soli (około 20 cm³ na każdą butlę), następnie przenoszono do próbek wirówkowych i wirowano przez 10 min. przy 3 tys. obrotów. Płyn z nad osadu zlewano, osad przemywano płynem fizjologicznym i ponownie odwirowywano. Czynność tę powtarzano 3-krotnie. Do osadu powstałego w wyniku ostatniego wirowania dodawano 2—3 cm³ płynu fizjologicznego, dokładnie mieszano, przelewano do jałowych próbek i szczelnie zamknięto. Podobnie postępowano w przypadku wszystkich butli Roux. Następnie sprawdzano czystość mikrobiologiczną otrzymywanych zawiesin bakteryjnych, ich właściwości kwaszące na podłożu z purpurą bromokrezolową używaną do badań oraz gęstość metodą Prescott-Breeda.

Drobnoustrój testowy przechowywano w postaci zawiesiny przetrwalników w płynie fizjologicznym w temp. 4°C nie dłużej niż 1 miesiąc.

Przygotowanie podłoża do badań. Uplynniony 0,9% agar wodny rozlewano do kolbek Erlenmeijera po 15 cm³, po czym do każdej dodawano 2,0—2,5 cm³ podłoża z purpurą bromokrezolową celem uzyskania fioletowego zabarwienia agaru. Następnie do schłodzonego do temperatury około 55°C podłoża dodawano 0,1—0,3 cm³ zawiesiny przetrwalników dokładnie mieszając. Ilość przetrwalników powinna wynosić 2,0—3,0×10⁸/cm³ podłoża. Przygotowane w ten sposób podłoża testowe rozlewano po 0,3 cm³ do próbek serologicznych i pozostawiano do zastygnięcia. Podłoża zabezpieczano przed wyschnięciem zamykając próbki korkami i przechowując je w temp. 4°C przez okres około 2 tygodni.

Wykonanie badań w kierunku pozostałości antybiotyków i innych substancji hamujących. Badanie mleka przeprowadzano najpóźniej w ciągu 10 godzin od udoju, przechowując próby w temp. 4°C. Mleko nadkwaszone nie nadawało się do badania, bowiem w ciągu 5 min. powodowało zmianę barwy indykatora w podłożu testowym na żółtą.

Do próbek z podłożem testowym dodawano 0,1 cm³ badanego mleka w dwóch powtórzeniach, zaś do próbek kontrolnych: 0,1 cm³ mleka wolnego od substancji hamujących oraz 0,1 cm³ penicyliny w stężeniu 0,004 j/cm³, a następnie inkubowano w cieplarni lub łaźni w temp. 66°C przez okres około 2,5 godzin. Po okresie inkubacji oceniano barwę podłoża z mlekiem badanym w porównaniu do próbki z penicyliną i z mlekiem wolnym od substancji hamujących.

Drobnoustrój testowy *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 posiada właściwości kwaszące, stąd poddawany inkubacji w optymalnych warunkach zakwasza środowisko wywołując zmianę barwy wskaźnika — purpury bromokrezolowej z fioletowej na żółtą. Tym samym, w przypadku braku pozostałości antybiotyków i innych substancji hamujących w badanym mleku, podłoża testowe po około 2,5 godz. inkubacji zmienia zabarwienie z fioletowego na żółte. Obecność substancji hamujących w mleku hamuje rozwój szczepu testowego i nie powoduje zmiany barwy podłoża.

Wyniki i omówienie

Jak wynika z przeprowadzonych badań oznaczenia prowadzono w warunkach proponowanych przez Van Osa i wsp. (11), uzyskując podobne wyniki, po 2,5 godz. inkubacji

Tab. 1. Próg wrażliwości STD na obecność penicyliny w mleku w stężeniach od 0,01 do 0,002 j/ml

0,1 ml mleka z dodatkiem penicyliny: j/ml	0,01	0,008	0,006	0,005	0,004	0,003	0,002
0,3 ml podłoża STD	zabarwienie	niebiesko-fioletowe					
	czas inkubacji	2,5 godziny w temp. 66°C					
zmiana zabarwienia podłoża STD	28 próbek	-	-	-	-	+	+
	2 próbki	-	-	-	+	+	+

Objaśnienia: STD — szybki test dyfuzyjny, — = odczyn ujemny (zabarwienie podłoża niezmiennione), + = odczyn dodatni (zażółcenie podłoża).

podłoża w temp. 66°C, przy optymalnej dla drobnoustroju gęstości wynoszącej średnio $2,2 \times 10^8/\text{cm}^3$ podłoża. Po przebadaniu kolejnych rozcieńczeń soli potasowej penicyliny G: 0,01 j/cm³, 0,008 j/cm³, 0,006 j/cm³, 0,005 j/cm³, 0,004 j/cm³, 0,003 j/cm³, 0,002 j/cm³ uzyskano w 28 próbkach zbliżone wartości określające czułość metody. Wielkość ta wynosiła dla soli potasowej penicyliny G 0,004 j/cm³, podczas gdy Van Os (11) podaje wartość 0,006 j/cm³. Równocześnie stwierdzono, że próbki z podłożem zabezpieczone przed wyschnięciem zaszczerpione *Bacillus stearo-thermophilus var. calidolactis* mogą być przechowywane w temp. 4°C przez okres 2 tygodni bez wpływu na szybkość oznaczania oraz czułość metody. Poszczególne komponenty podłoża testowego: agar wodny, podłoże odżywcze z purpurą bromokrezolową, zawieszona przetrwalnikowa w roztworze fizjologicznym soli, mogą być przechowywane w temp. 4°C przez okres około 1 miesiąca i nie tracą właściwości. Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki wydaje się, iż opracowana metoda może znacznie ułatwić i uprościć przeprowadzenie oznaczeń pozostałości substancji hamujących w mleku, przy zachowaniu zbliżonego stopnia dokładności i precyzji wyników, jaki osiąga się przy metodach dyfuzyjnych, cylindrowo-płytkowej, krążkowej czy studzienkowej. Z uwagi na łatwość przygotowania podłoża testowego, dostępność poszczególnych odczynników, ich niski koszt jednostkowy oraz łatwość w równoległym przeprowadzeniu dużej ilości oznaczeń, wydaje się, iż istnieje realna możliwość wprowadzenia powyższej metody do badań rutynowych.

Warunki te spełniać ma również podłoże do wykrywania antybiotyków w mleku w opracowaniu Fetlińskiego i wsp. (2). Zastrzeżenia jednak budzą informacje zawarte zarówno w PN-77/A-86031, jak i w ulotce dołączonej do produkowanego podłoża, a dotyczące głównie interpretacji wyników przy oznaczaniu pozostałości antybiotyków w mleku. Autorzy określają precyzyjnie wartości stref hamowania drobnoustroju testowego dla badanych antybiotyków nie wyjaśniając jednak, czy w wypadku penicyliny możliwe jest

jej rozróżnienie od innych antybiotyków bez zastosowania penicylinyazy. Nie tłumaczą również jak różnicować inne antybiotyki i substancje hamujące nie będące antybiotykami. Brak informacji metodycznych nie pozwala na powtórzenie wyników w odniesieniu do podanych i najniższych wykrywalnych ilości antybiotyków w mleku. Ponadto autorzy nie wyjaśniają, jak należy interpretować zasadę neutralizacji badanego mleka 1% ługiem sodowym, względnie 1% kwasem solnym. Komponenty te w obecności substancji hamujących innych jak antybiotyki poprzez zmianę pH badanego mleka mogą zmniejszać lub zupełnie eliminować działanie hamujące na drobnoustroj testowy substancji o odczynie kwaśnym bądź zasadowym. W efekcie uzyskane wyniki badań będą fałszywie ujemne. Ewentualna próba neutralizacji mleka przy zastosowaniu 1% ługu sodowego, względnie zakwaszenia 1% kwasem solnym wydaje się być nieuzasadniona w metodzie biologicznej, która generalnie służy do wykrywania substancji hamujących w mleku, bez możliwości różnicowania określonych komponentów. Niebagatelna jest również różnica w kosztach 1 próby, która w wykonaniu szybkiego testu dyfuzyjnego jest znacznie niższa aniżeli przy zastosowaniu podłoża zalecanego przez Fetlińskiego i wsp. (2) i wprowadzona do Polskiej Normy (PN 77/A-87031).

Badania nad zastosowaniem szybkiego testu dyfuzyjnego do wykrywania obecności syntarpenu, streptomycyny, chloramfenikolu, środków myjących i myjąco-odkażających są przedmiotem osobnego opracowania.

Pismienictwo

1. Atkinson A., Evans C. G. T., Yeo R. G.: J. appl. Bact. 38, 301, 1975.
2. Fetliński A., Kornacki K., Rybicka Z., Stepaniak L.: Przegląd mlecz. 25, 8, 1976.
3. Galesloot Th. E., Hassing F.: Neth. Milk Dairy J. 16, 93, 1962.
4. IDF 57, Brussels, 1970.
5. Kraack J., Tolle A.: Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145, 1969.
6. Kraack J., Reichmuth J.: Arch. Lebensmittelhyg. 21, 82, 1971.
7. Ouderkirk L. A.: J. Ass. off. Anal. Chem. 60, 1116, 1977.
8. Ouderkirk L. A.: J. Ass. of. Anal. Chem. 62, 985, 1979.
9. Stepaniak L., Kornacki K., Fetliński A.: Medycyna Wet. 34, 232, 1978.
10. Winterer A.: Ost. Milchw. 30, 237, 1975.
11. Van Os J. L., Lameris S. A., Doodewaard J., Oostendrop J. G.: Neth. Milk Dairy J. 29, 16, 1975.

Adres autora: doc. dr hab. Czesław Kurek, ul. Batorego 37
c/34, 80-258 Gdańsk 6

Курек Ч., Милько К. — Быстрый диффузионный тест для обнаруживания тормозящих веществ в молоке.

В результате собственных исследований модифицировали диффузионно-показательный метод Ван-Оса и сотр. для быстрого обнаруживания антибиотиков и тормозящих веществ в молоке. Модификация заключается в применении отечественных и доступных компонентов, применяемых в тесте, а также способа получения спор микроорганизма тестового штамма *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953. Принципы действия быстрого диффузионного теста заключается в цветной реакции питательной среды, происходящей под влиянием тестового микроорганизма с квасящими свойствами в среде, свободной от тормозящих веществ. Наличие тормозящих веществ в молоке тормозит развитие тестового штамма и не вызывает изменения цвета питательной среды. Наименьшая концентрация пенициллина, которую можно определить, составляла 0,004 е/см² с продолжительностью реакции не выше 25 часа. Легкость подготовки тестовой питательной среды, возможность одновременного

проведения крупного количества определений и хранения готовых компонентов даже 14 дней в темп. 4°C и низкие затраты на питательную среду создают реальную возможность введения упомянутого метода в массовые рутинные исследования молока на присутствие тормозящих веществ.

Kurek C., Milko K. — Rapid diffusion test to discover inhibiting substances in milk.

On the basis of own examinations the diffusion technique elaborated by Van Osa et al. was modified using easy access components, and besides, the way to receive spores of *Bac. stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 was altered as well. The principle of the test is based on colour reaction of the medium which takes place under the influence of the test strain the environment free from inhibiting substances. The presence of antibiotics in milk unables the development of the test strain and the change of the colour of the medium. The lowest concentration of penicillin discovered was 0.004 units per 1 cm³ within 2.5 hours. Easiness of media preparing and their storage for 14 days at 4°C, the possibility of carrying out plenty of examinations and low cost enable the use of this method as a routine technique for milk examinations.

FIZJOLOGIA ZWIERZĄT

JANUSZ GILL

Dwuletnie badania sezonowych zmian wskaźników hematologicznych i białkowych krwi koni arabskich

Zakład Fizjologii Zwierząt Kręgowych Uniwersytetu Warszawskiego, ul. Zwirki i Wigury 93,
02-089 Warszawa

Mimo udomowienia przed około 8 tysiącami lat dzisiejszy koń nie utracił wrażliwości na czynniki oddziaływujące ze środowiska. Wykonane dotąd badania w różnych ośrodkach naukowych wskazują, że w metabolizmie i czynnościach organizmu konia przejawiają się zarówno zmiany związane z sezonem, jak i rytm dobowy (3). Zmiany sezonowe są silnie wyrażone niż dobowe. Wyraźne zmiany sezonowe wykazano dotąd we wszystkich elementach składowych nasienia ogiera (1, 6), w czynności jajnika klaczy (2), w produkcji hormonu melatoniny przez szyszynkę mózgową konia (8) i inne. Dotychczasowe badania wskaźników metabolicznych wykazują na ogół zgodnie, że maksima ich przypadają na okres lata, a minima — zimy (4). Jednakże przeważnie badano pojedyncze lub po kilka wskaźników równocześnie i to na ogół przez jeden rok lub sezon.

Postanowiono zatem określić czy istnieją odpowiadające sobie zmiany sezonowe we wskaźnikach tzw. funkcjonalnych, jak poziom hemoglobiny, liczba erytrocytów, inne wskaźniki hematologiczne, ilość białka ogólnego, zmiany frakcji białkowych i glikoproteido-

wych, a ponadto — czy zmiany te są identyczne w ciągu 2 kolejnych lat, przy uwzględnieniu zmian niektórych czynników środowiska.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na hodowlanych koniach arabskich, które nie wykonują żadnej pracy fizycznej, a więc nie są poddawane żadnym obciążeniom fizycznym i stresowym, poza związanymi z rozrodem. Natomiast większość dotychczasowych badań była wykonywana na koniach wyścigowych lub sportowych. Badania wykonano w Stadninie Koni w Janowie Podlaskim, na 5 ogierach w wieku 4—11 lat i 21 klaczach w wieku 4—17 lat, na przełomach pół roku, tj. ok. 21 marca, czerwca, września i grudnia 1977 i 1978 r. z wyjątkiem pierwszego — styczeń 1977 r.

W pełnej krwi oznaczano liczbę i średnicę erytrocytów, liczbę leukocytów, ilość hemoglobiny i szereg innych wskaźników. W surowicy krwi oznaczano: poziom białka całkowitego, elektroforetyczne frakcje białek i glikoproteidów, poziom heksoz związanych z białkami i poziom kwasów sjalinowych.

Wyniki i omówienie

Wszystkie badane wskaźniki wykazały cykliczność o wzorach w zasadzie powtarzających się w ciągu obydwu badanych lat. Wy-