

Inhibitorių grupių nustatymas žaliame karvių piene mikrobiologiniais metodais

R. Žvirdauskienė

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; renadai@one.lt

Kauno technologijos universitetas, Radvilėnų pl. 19, LT-50270 Kaunas; renadai@one.lt

J. Šalomskienė

KTU Maisto institutas, Taikos pr. 92, LT-51180 Kaunas; mikrobjs@lmai.lt

L. Urbšienė

VĮ „Pieno tyrimai“, Tilžės g. 18, LT-47005 Kaunas; laima@pieno-tyrimai.lt

Tyrimai atlikti KTU Maisto institute ir VĮ „Pieno tyrimai“. 2003 m. ištirti žalio pieno mėginiai iš įvairių Lietuvos regionų, pristatyti į VĮ „Pieno tyrimai“. Difuzijos į agarą metodu su *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* atrinkta 1,9 % pieno mėginių su inhibitorių likučiais. Patikrinus inhibitorių buvimą skrituliukų (diskų) metodu, rasta 0,8 % užterštų pieno mėginių. Didžiausią dalį (86 %) sudarė penicilinų grupės likučiais užteršti pieno mėginiai. Tetraciklino, sulfonamidų, aminoglikozidų ir makrolidų likučiais užteršti mėginiai sudarė 24, 55, 34 ir 19 % „teigiamų mėginių“ (atitinkamai 0,19, 0,44, 0,27 ir 0,15 % bendro tirtų mėginių skaičiaus). Daugelis pieno mėginių buvo užteršti keleto inhibitorių grupių likučiais.

Raktažodžiai: inhibitoriai, pienas, mikrobiologiniai metodai.

Įvadas

Vartojant pieną su inhibitorių likučiais žmogaus organizme gali ne tik išsivystyti antibiotikams atsparios mikroorganizmų padermės [1–4], bet ir suirti natūrali mikrobinė žarnyno ekosistema [5, 6]. Seniausiai žinoma ir plačiausiai vartojama inhibitorių grupė – β -laktamai [7], kurios likučiai piene gali sukelti vartotojams alergines reakcijas [1, 8–15]. Europos direktyva EEB 2377/90 nustato didžiausią leidžiamą β -laktamų grupės likučių, nekenksmingų vartotojui, kiekį piene: penicilino G – 4 $\mu\text{g/l}$, ampicilino – 4 $\mu\text{g/l}$, oksacilino – 30 $\mu\text{g/l}$, amoksicilino – 4 $\mu\text{g/l}$, dikloksacilino – 30 $\mu\text{g/l}$, cefaleksino – 100 $\mu\text{g/l}$, cefapirino – 60 $\mu\text{g/l}$ [16].

Gydant gyvulius, antibiotikai dažnai vartojami didelėmis dozėmis, suleidžiant juos arba sugirdant su vandeniu, rečiau – sušeriant su pašarais. Kartais, kad būtų išvengta ligos kritiniu gyvuliui laikotarpiu (atjunkant veršiuokus nuo karvės, pervežant iš vienos vietos į kitą), gyvuliams duodamas mažesnis antibakterinių preparatų kiekis – tai vadinama profilaktiniu antibiotikų vartojimu. Duodant gyvuliams antibakterinių preparatų būtina laikytis konkretaus vaisto vartojimo instrukcijos, kurioje turi būti nurodytas karencijos laikas (laikas, per kurį vaistai pasišalina iš gyvulio organizmo arba jų sumažėja tiek, kad nebeįmanoma aptikti, ir jie

nedaro įtakos gyvūninės kilmės maisto produktų technologinėms savybėms bei vartotojų sveikatai) [17]. Kol nepraėjęs karencijos periodas, nei patys gyvuliai, nei jų produktai negali būti parduodami. Tačiau viena iš priežasčių, dėl ko inhibitoriai patenka į pieną, – karencijos periodo nesilaikymas.

Inhibitorių likučių kontrolė turi apsaugoti vartotojus nuo kenksmingo šių medžiagų poveikio. Lietuvai integruojantis į ES ir pasaulio rinką, būtina gerinti produktų kokybę, o tuo pačiu – griežtinti reikalavimus žaliavai. Lietuvoje didžiausi leistini veterinarinės medicinos preparatų likučių kiekiai gyvūniniuose maisto produktuose reglamentuojami [18].

Atsižvelgiant į tai, kad antibiotikų bei kitų medžiagų su antibakterinėmis savybėmis, kurios gali būti vartojamos gyvulininkystėje, sąrašas yra labai ilgas ir jame daug skirtingos cheminės sudėties junginių grupių, nėra vienos visų galimų medžiagų radimo bei identifikavimo metodikos.

Inhibitorių likučių nustatymo tyrimai paprastai atliekami dviem etapais: pirmiausiai, mikrobiologiniu ar fermentiniu metodu randami inhibitorių likučiais užteršti mėginiai („teigiami“ mėginiai), po to šie mėginiai tiriami kitais patvirtinimo metodais, kad būtų nustatyta, kokių ir kiek inhibitorių likučių rasta mėginyje. Inhibitoriams

identifikuoti reikalingi instrumentiniai metodai, tokie kaip HPLC (aukšto slėgio skysčių chromatografija), dujų chromatografija ir masių spektrometrija. Inhibitorių likučiams patvirtinti užsienyje taikoma HPLC su ultravioletiniu detektoriumi (HPLC-UV). Tačiau ši technika turi apribojimų: ji labai jautri ir sugeba atskirti inhibitorių grupes, tik ypač gerai išgryninus mėginį [19–21]. Kad šiuo metodu būtų galima tiksliai nustatyti antibakterinės medžiagos likutį (padidinti metodo jautrį), reikia žinoti inhibitoriaus kilmę [22–24]. Dar vienas šio metodo trūkumas – didelis darbo imlumas, todėl jis netinka tirti dideliems mėginių kiekiams, be to, reikia turėti specialią įrangą, kvalifikuotą personalą, kas visuomet yra susiję su finansiniais ištekliais. Todėl visame pasaulyje dažniausiai taikomi mikrobiologiniai antibiotikų ir inhibitorių nustatymo metodai, kurių esmę sudaro pieno rūgšties ar aerobinių sporinių bakterijų kai kurių metabolitinių reakcijų slopinimas. Mikrobiologiniai metodai daug kur taikomi dėl jų jautrio atitikimo ES reikalavimams, nedidelės kainos, patogaus taikymo būdo.

Dažniausiai mikrobiologiniuose metoduose taikomos testavimo kultūros yra *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* ir *Micrococcus luteus* [25, 26]. Tyrimams reikalinga *B. stearothermophilus* ar *B. subtilis* sporų suspensija gaunama šias kultūras auginant, persodinant, plaunant, centrifuguojant ir kaitinant (paprastai 30 min 70 °C temperatūroje).

Metodo jautris priklauso nuo pasirinktos jautrios kultūros, jos kiekio terpėje, terpės pH ir terpės sluoksnio storio Petri lėkštelėje. *B. stearothermophilus* yra labai jautri penicilinui (aptinkama 0,003 µg/kg), tačiau ji palyginti mažai jautri aminoglikozidams (aptinkama 1,0–4,0 µg/kg). Todėl, jeigu yra streptomicino likučių, rezultatas bus neigiamas. Atvirkštinė situacija gaunama naudojant *B. subtilis*. Makrolidams abiejų kultūrų jautris panašus. Skirtingiems inhibitoriams tirti naudojamos terpės su skirtingu pH [27, 28].

Tyrimų tikslas – nustatyti dažniausiai Lietuvos karvių piene pasitaikančias inhibitorių grupes.

Tyrimo objektas ir metodai

Darbas atliktas Kauno technologijos universiteto Maisto instituto Mikrobiologijos laboratorijoje ir VĮ „Pieno tyrimai“.

Tyrimo objektas – žalias pienas iš įvairių Lietuvos regionų (10000 mėginių).

Inhibitorių piene tyrimai buvo atlikti taikant tris mikrobiologinius inhibitorių nustatymo metodus:

1. Kokybinį difuzijos į agarą metodą su jautria testavimo kultūra *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C 953 „teigiamais“

mėginiams (su inhibitorių likučiais) atrinkti [29]. Naudotas preparatas *LPT*, pagamintas VĮ „Pieno tyrimai“ pagal ĮST 3381629-01-2000 (standi terpė su *B. stearothermophilus* ir indikatoriumi, išpilstyta į 96 duobutes plokštelėse).

2. Penicilinų aptikimo mėginyje patvirtinimo ir jų koncentracijos nustatymo metodą (skrituliukų metodą), skirtą patvirtinti penicilinų ar kitų antibiotikų aptikimą pieno mėginiuose [29].

3. Modifikuotą EEB keturių lėkštelių metodą [30], skirtą inhibitorių (benzilpenicilino, sulfanilamidų, streptomicino ir eritromicino) likučiams šviežioje mėsoje nustatyti (pritaikyta pieno tyrimams).

Pieno mėginiai nuo jų paėmimo iki tyrimo pradžios buvo laikomi šaldytuve (2±2) °C temperatūroje, bet ne ilgiau kaip 24 h.

Prieš tyrimą, skirtą penicilinui ar kitiems antibiotikams, aptiktiems pieno mėginiuose, patvirtinti, pieno mėginiai pakaitinami 10 min 80 °C temperatūroje, kad būtų sunaikinti natūralūs inhibitoriai.

Tiriant pieną preparatu *LPT* imti 2 kontroliniai mėginiai – neigiama kontrolė (liesas pienas be inhibitorių) ir teigiama kontrolė (pienas su 0,004 µg/ml penicilino). Į kiekvieną preparato *LPT* duobutę įpilta po 50 µl tiriamojo pieno, į dvi duobutes įpilta lieso pieno be inhibitorių (neigiama kontrolė), į kitas dvi duobutes – etaloninio penicilino tirpalo (teigiama kontrolė). Preparatai su tiriamaisiais mėginiais inkubuojami nuo 4 h 15 min iki 4 h 30 min (63,5±0,5) °C temperatūroje termostate. Rezultatai vertinami pagal mitybos terpės spalvą duobutėje. Jeigu mitybos terpės spalva nepakito (yra violetinė), – tiriamajame piene yra inhibitorių likučių, jeigu mitybos terpės spalva pasikeitė (yra geltona arba tarpinė tarp violetinės ir geltonos), – tiriamajame piene inhibitorių likučių nėra. Tinkama inkubavimo trukmė nustatoma pagal neigiamą kontrolę – duobučių su kontroliniais mėginiais terpės spalva turi būti geltona. Teigiamos kontrolės – duobučių su etaloniniais penicilino tirpalais – terpės spalva turi būti violetinė. Tarpinė spalva tarp violetinės ir geltonos vertinama kaip neigiamas rezultatas.

Kokybinio metodu atrinkti pieno mėginiai toliau tirti pagal metodą, skirtą patvirtinti penicilino ar kitų inhibitorių aptikimą pieno mėginiuose. Taip pat atliktas tyrimas, naudojant pieno mėginius, apdorotus penicilinaze. Į 10 ml tiriamo pieno pilama 0,4 ml penicilinazės tirpalo (1000 TV/ml) ir išmaišius palaikoma 1,5 h. Kiekviename pieno mėginyje be penicilinazės priedo ir su penicilinazės priedu sumirkoma po du 12 mm skersmens filtrinio popieriaus skrituliukus (Schleicher and Schuell Ref. Nr. 10321262), kurie priešpriešiais padedami ant

agaro terpės (pH 8,0) su jautrios kultūros *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* sporomis paviršiais.

Petri lėkštelės su tiriamaisiais mėginiais inkubuojamos (63±1) °C temperatūroje (5±1) h.

Tie patys pieno mėginiai, kokybiniu metodu įvertinti kaip teigiami (rasta inhibitorių likučių), lygiagrečiai tirti pritaikius modifikuotą EEB keturių lėkštelių metodą.

Modifikuotas EEB keturių lėkštelių metodas [31] skirtas atskiroms inhibitorių grupėms (penicilinams, sulfonamidams, aminoglikozidams ir makrolidams) šviežioje mėsoje nustatyti. Tai difuzijos į agarą metodas: filtrinio popieriaus skrituliukai sumirkomi mėsos syvuose ir išdėliojami ant standžių terpių (pH 6,0; pH 7,2 ir pH 8,0 su jautria bakterijų kultūra

B. subtilis ir pH 8,0 – su *M. luteus* ATCC 9341) paviršiais Petri lėkštelėse. Taikant šį metodą žalio pieno tyrimams, skrituliukai nuo 3 iki 5 s mirkomi piene, toliau veikiama kaip su skrituliukais, sumirkytais mėsos syvuose. Inhibitorių likučių buvimą patvirtina ne mažiau kaip 2 mm skersmens skaidri zona, susidariusi aplink popierinį skrituliuką po inkubacijos.

Nustatant inhibitorius modifikuotu EEB keturių lėkštelių metodu buvo naudojamos trys *Merck* firmos difuzijos į agarą terpės (pH 6,0 – katalogo Nr. 1.10663, pH 7,2 – Nr. 1.15787, pH 8,0 – Nr. 1.10664). 1 lentelėje pateikta inhibitorių grupių nustatymo schema.

1 lentelė. Tyrimo modifikuotu EEB keturių lėkštelių metodu schema

Lėkštelės Nr.	Nustatomos inhibitorių grupės	Terpės pH	Testavimo kultūra	Etaloninio antibiotiko tirpalo koncentracija
1	Penicilinų, tetraciklinų	6,0	<i>Bacillus subtilis</i> BGA	Penicilinas G, 1 TV/ml
2	Sulfonamidų	7,2	<i>B. subtilis</i> BGA	Sulfametazinas, 50 µg/ml
3	Aminoglikozidų	8,0	<i>B. subtilis</i> BGA	Streptomocinas, 50 µg/ml
4	Makrolidų	8,0	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	Eritromocinas, 50 µg/ml

Į kiekvieną paruoštą Petri lėkštelę ant terpės paviršiaus išdėliojami tiriamo pieno mėginiuose sumirkyti popieriniai skrituliukai (po du skrituliukus kiekvienam mėginiui). Kontrolėi į kiekvieną Petri lėkštelę su tyrimui paruoštais mėginiais ant terpės paviršiaus padedama po 6 mm skersmens popierinį skrituliuką (Schleicher and Schuell Ref. Nr. 321260), ant kurio užpilama po 10 µl atitinkamos etaloninės antibakterinės medžiagos tirpalo. Kiekvienai terpei naudojami skirtingi etaloninių antibiotikų tirpalai pagal schemą (1 lentelė).

Petri lėkštelės su *B. subtilis* BGA sporomis inkubuojamos 18–24 h 30 °C temperatūroje, o su *M. luteus* ATCC 9341 sporomis 18–24 h inkubuojamos 37 °C temperatūroje.

Rezultatai ir jų aptarimas

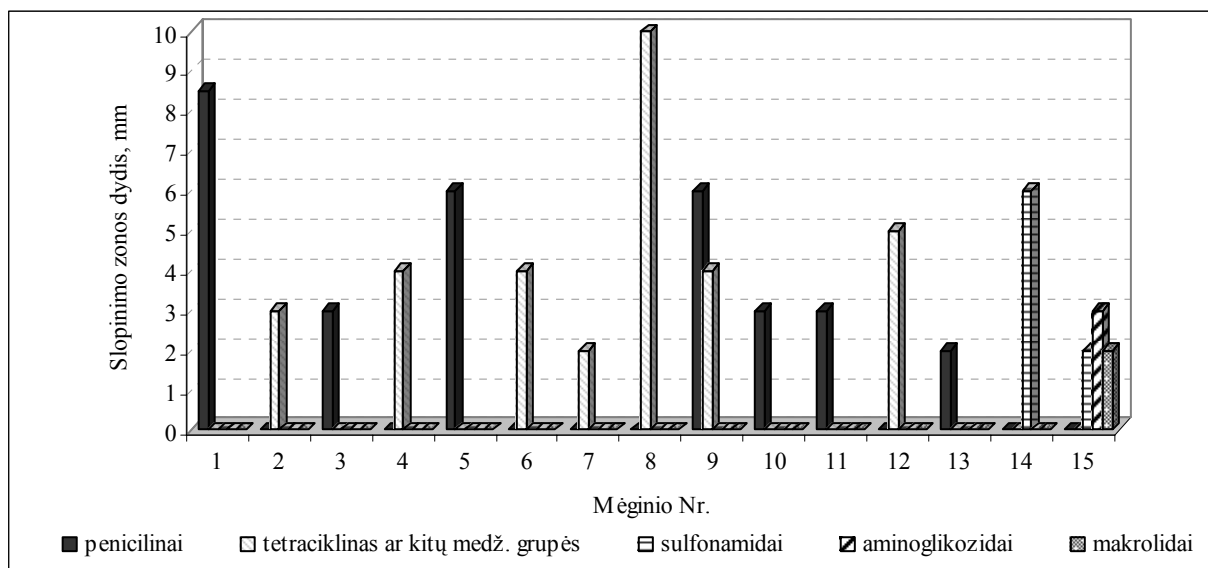
2003 m. ištirta 10000 (600 mėginių birželio mėn. ir 9400 mėginių rugsėjo–lapkričio mėn.) žalio pieno mėginių iš įvairių Lietuvos regionų. Naudojant preparatą *LPT* buvo atrinkta 190 mėginių su inhibitorių likučiais (50 – birželio mėn. ir 140 – rugsėjo–lapkričio mėn.). Šie mėginiai toliau buvo

tirti dėl penicilinų ir kitų inhibitorių likučių buvimo patvirtinimo.

Inhibitorių likučių, nustatytų žalio pieno mėginiuose, duomenys pateikti 1 ir 2 pav.

Birželio mėn. skrituliukų metodu patvirtinta 15 mėginių su inhibitorių likučiais (t. y. 30 % mikrobiologiniu kokybiniu metodu nustatytų rezultatų).

Penicilinų aptikimo mėginyje patvirtinimo ir jų koncentracijos nustatymo metodu inhibitorių likučiai patvirtinti 13 pieno mėginių. Lygiagrečiai atlikus tyrimą su penicilinaze, penicilinų grupės likučiai (ne mažiau kaip 0,004 µg/ml benzilpenicilino) patvirtinti 6 pieno mėginiuose, 6 pieno mėginiuose rasta tetraciklinų ar kitų inhibitorių grupių, 1 pieno mėginyje (Nr. 9) rasta penicilinų grupės likučių kartu su tetraciklinų ir kitų inhibitorių likučiais. Modifikuotu EEB keturių lėkštelių metodu 2 pieno mėginiuose (Nr. 14 ir 15) rasta kitų inhibitorių grupių (sulfonamidų, aminoglikozidų ir makrolidų) likučių (1 pav.).



1 pav. Inhibitorių grupės, nustatytos žaliao pieno mėginiuose (2003 m. birželio mėn.)

Rugsėjo–lapkričio mėnesiais diskų metodu buvo patvirtinti 65 mėginiai su inhibitorių likučiais (t. y. 46 % mikrobiologiniu kokybiniu metodu nustatytų rezultatų).

Penicilinų likučiai (ne mažiau kaip 0,004 µg/ml benzilpenicilino) patvirtinti 50 pieno mėginių, 1 pieno mėginyje rasta tetraciklinų ar kitų inhibitorių grupių, 11 pieno mėginių rasta penicilinų grupės likučių kartu su tetraciklinų ir kitų inhibitorių likučiais. 3 pieno mėginiuose (Nr. 21, 33 ir 44) rasta tik kitų inhibitorių grupių (ne penicilinų) likučių (2 pav.).

Tyrimų metu paaiškėjo, kad penicilinų grupei nustatyti piene jautresnis yra metodas su jautria kultūra *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*, todėl

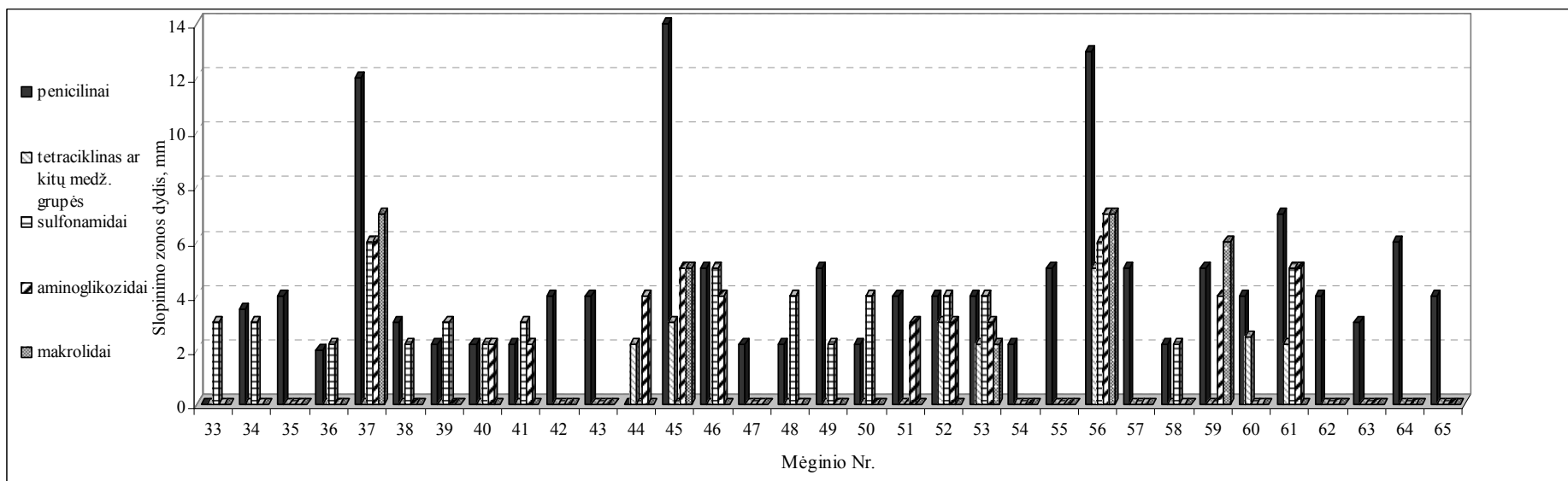
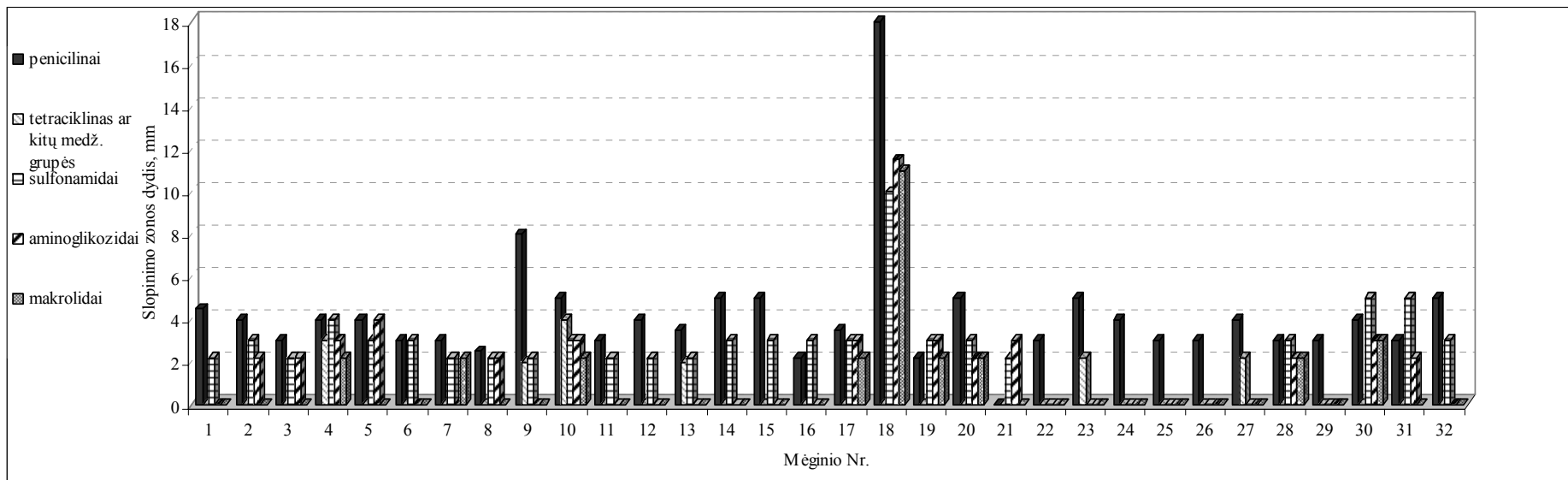
modifikuotu keturių lėkštelių metodu (jautri kultūra *B. subtilis*) gauti rezultatai nepateikiami.

Didžiausią skaičių mėginių su inhibitoriais sudarė mėginiai su penicilinų grupės antibiotikais, rasta 86 % „teigiamų“ mėginių (tai sudarė 0,86 % bendro tirtų mėginių skaičiaus). Sulfonamidų, aminoglikozidų ir makrolidų buvo rasta 55, 34 ir 19 % „teigiamų“ mėginių (tai sudarė atitinkamai 0,44, 0,27 ir 0,15 % bendro tirtų mėginių skaičiaus). Tetraciklino ar kitų medžiagų likučiai rasti 24 % „teigiamų“ mėginių, tai sudarė 0,19 % bendro tirtų mėginių skaičiaus. Daugelyje mėginių buvo rasta ne vienos, o kelių grupių inhibitorių likučių. Rugsėjo–lapkričio mėnesiais tirtuose pieno mėginiuose nustatytas didesnis inhibitorių grupių skaičius.

2 lentelė. Inhibitorių grupės karvių piene

Tyrimų periodas	Bendras mėginių su inhibitorių likučiais skaičius (atrinkta metodu su <i>B. stearothermophilus</i> var. <i>calidolactis</i>)	Bendras identifikuotų mėginių su inhibitorių likučiais skaičius (atrinkta diskų metodais)	Mėginių, užterštų inhibitorių likučiais, skaičius, proc.				
			penicilinais ¹	tetraciklinai ar kitos grupės ²	sulfonamidai ³	aminoglikozidai ⁴	makrolidai ⁵
2003 m. birželio mėn.	50	15	47	47	13	7	7
2003 m. rugsėjo–lapkričio mėn.	140	65	95	18	65	40	22
2003 m. birželio, rugsėjo–lapkričio mėn.	190	80	86	24	55	34	19

^{1,2,3,4,5} – šių skaičių suma neturi būti lygi 100 %, nes daugelyje mėginių buvo nustatyta daugiau kaip viena inhibitorių grupė.



2 pav. Inhibitorių grupės nustatytos žalio pieno mėginiuose (2003 m. rugsėjo–lapkričio mėn.)

Inhibitorių likučių piene problema aktuali visame pasaulyje. Lenkijoje 1990–1993 m. buvo randama 13,1–22,4 % inhibitorių likučiais užteršto žalio pieno [32]. Nuo 1996 m. pieno užterštumas inhibitoriais ėmė mažėti [33]. Kinijoje ištyrus 1109 žalio pieno mėginių, rasti 229 „teigiami“ mėginiai (21 %) [34]. Po identifikavimo 165 mėginiuose (14,9 %) rasta penicilino G likučių. Vokietijoje 1995 m. buvo randama 2,03 % inhibitoriais užterštų pieno mėginių. Nauji tyrimai rodo, kad iš 19518 pieno mėginių inhibitorių likučių rasta 88 (0,45 %) pieno mėginių. Identifikavus „teigiamus“ mėginius, net 98,1 % sudarė β-laktamų likučiais užteršti mėginiai [36].

Išvados

1. Mikrobiologiniu kokybiniu difuzijos į agarą metodu ištyrus 10000 pieno mėginių iš įvairių Lietuvos regionų, buvo rasta 1,9 % inhibitorių likučiais užterštų mėginių.
2. Identifikavus inhibitoriais užterštus mėginius mikrobiologiniu skrituliukų metodu, inhibitorių likučių grupės nustatytos 0,8 % mėginių.
3. Didžiausią skaičių mėginių su inhibitoriais sudarė mėginiai su penicilino grupės antibiotikais, patvirtinta 86 % „teigiamų“ (kokybiniu metodu atrinktų) mėginių, tai sudarė 0,69 % bendro tirtų mėginių skaičiaus. Kitos inhibitorių likučių grupės – sulfonamidai, aminoglikozidai ir makrolidai – rasti 55, 34 ir 19 % „teigiamų“ mėginių, tai sudarė atitinkamai 0,44, 0,27 ir 0,15 % bendro tirtų mėginių skaičiaus. Tetraciklino ar kitų medžiagų likučiai rasti 24 % (0,19 %) tirtų mėginių.

Literatūra

1. **Livingston R. C.** Antibiotic Residues in Animal Derived Food // *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1985. Vol. 68, No. 5. P. 966.
2. **Ziajka S., Dzwolak W.** Wpływ jakości mleka na proces technologiczny i cechy produktów mleczarskich // *Oplacalność produkcji mleka i przetworów mleczarskich w świetle przyjęcia Polski do Unii Europejskiej. Mat. Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej.* Łomża, 1998. S. 66–72.
3. **Brady M. S., White N., Katz S. E.** Resistance Development Potential of Antibiotic/Antimicrobial Residue Levels Designated as “Safe Levels” // *Journal of Food Protection.* 1993. Vol. 56, No. 3. P. 229–233.
4. **Cerniglia C. E.** Assessing the effects of antimicrobial residues in food on the human intestinal microflora. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives/JEFCA/, 45 Meeting. 1995.
5. **Levy S. B.** Antibiotic Disruption of Microbiological Ecology. WHO Meeting on the Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals. Berlin, Oct. 1–17, 1997.

6. **Low Ch.** Working Paper – WHO Meeting on the Medical Impact of the Use of Antimicrobials in Food Animals. Berlin, Oct. 13–17, 1997.
7. **Ghidini S., Zanardi E., Varisco G., Chizzolini R.** Prevalence of molecules of β-lactam antibiotics in bovine milk in Lombardia and Emilia Romagna (Italy) // *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma.* 2002. Vol. XXII. P. 245–252.
8. **Freeman T. R.** Milk quality // *Journal of Milk Food Technology.* 1953. Vol. 15. P. 162–166.
9. **Kindred T. P. and Hubbert W. T.** Residue prevention strategies in the U.S.A. // *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 1993. No. 202. P. 46–49.
10. **Dayan A. D.** Allergy to antimicrobial residues in food: assessment of the risk to man // *Vet. Microbiol.* 1993. No. 35. P. 213.
11. **Metcalfe D. D.** The Nature and Mechanisms of Food Allergies and Related Diseases // *Food Technology.* 1992. Vol. 46, No. 5. P. 136.
12. **Pelczyńska E.** Żywność jako czynnik alergii pokarmowych u ludzi // *Medycyna Wet.* 1995. Vol. 51, No. 5. S. 253.
13. **Rudzki E.** Właściwości uczulające skrzytych źródeł penicyliny // *Pol. Tyg. Lek.* 1983. Vol. 38, No. 24. S. 743.
14. **Taylor S. L.** Chemistry and Detection of Food Allergens // *Food Chemistry.* 1992. Vol. 46, No. 5. P. 146.
15. **Ziajka S., Dzwolak W.** Wpływ jakości mleka na proces technologiczny i cechy produktów mleczarskich // *Oplacalność produkcji mleka i przetworów mleczarskich w świetle przyjęcia Polski do Unii Europejskiej. Mat. Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej.* 1998. S. 66–72.
16. Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin Annex I // *OJ N° L 224, 18.8.1990.* P. 1–8.
17. Antibiotic Resistance in the European Union Associated with Therapeutic Use of Veterinary Medicines. Report and Qualitative Risk Assessment by the Committee for Veterinary Medicinal Products. London, 1999. P. 6–20.
18. Dėl didžiausių leistinų veterinarinės medicinos preparatų likučių kiekių gyvūniniuose maisto produktuose. LR Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2000 m. gruodžio 29 d. įsakymas Nr. 395 // *Valstybės žinios.* 2001. Nr. 13. P. 66–98.
19. **Reyes F. J. F., Cagnasso A. M. G., Salas M. E.** et. al. Extraction and quantification of penicillin G in raw milk by high performance liquid chromatography (HPLC) // *Revista Científica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia,* 2000. No. 10. P. 212–221.
20. **Taguchi S., Yoshida S., Tanaka Y.** et. al. Simple and rapid analysis of penicillins in milk by HPLC using multidimensional on-line clean-up and post-column photolysis with UV detection // *Journal of the*

- Food Hygienic Society of Japan (Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi). 1999. No. 40. P. 375–381.
21. **Sorensen L. K., Rasmussen B. M., Boison J. O.** et al. Simultaneous determination of six penicillins in cows' raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method // *Journal of Chromatography B*. 1997. No. 694. P. 383–391.
 22. **Edder P., Cominoli A., Corvi C.** Simultaneous analysis of seven penicillin residues in raw milk by liquid chromatography // *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*. 1999. No. 90. P. 291–304.
 23. **Marchetti M., Schwaiger I., Schmid E. R.** Determination of benzylpenicillin, oxacillin, cloxacillin, and dicloxacillin in cows' milk by ion-pair high-performance liquid chromatography after precolumn derivatization // *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2002. No. 371. P. 64–67.
 24. **Berger K., Petz M.** Fluorescence HPLC determination of penicillins using 4-bromomethyl-7-methoxycoumarin as pre-column labelling agent // *Deutsche Lebensmittel Rundschau*. 1991. No. 87. P. 13–141.
 25. **Gaudin V., Maris P.** Development of a biosensor-based immunoassay for screening of chloramphenicol residues in milk // *Food and Agricultural Immunology*. 2001. Vol. 13, No. 2. P. 77–86.
 26. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5500 Bacterial DNA Damage or Repair Tests. US. 1998. P. 1–5.
 27. **Bentler W., Klemm W., Mehlich A.** Ist die Beurteilung von Schlachtierkörpern nach dem negativenergebnis der allgemeinen Hemmstofftests in der muskulatur noch vertretbar // *Fleischwirtschaft*. 1994. Vol. 74, No. 10. S. 1093–1095.
 28. **Ellerbroek L., Schramm G., Weise E., Reuter G.** Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis in Fleisch // *Fleischwirtschaft*. 1994. Vol. 74 (4). S. 413–416.
 29. Žalio ir termiškai apdoroto pieno analizės metodų taikymo techninis reglamentas, patvirtintas LR Žemės ūkio ministro 2001 03 23 įsakymu Nr. 72 // *Valstybės žinios*. 2001. Nr. 28. P. 49–80.
 30. Antibakterinių medžiagų likučių šviežioje mėsoje nustatymo techninis reglamentas. Patvirtintas LR Žemės ūkio ministro 2003 m. sausio 24 d. įsakymu Nr. 3D–23 // *Valstybės žinios*. 2003. Nr. 17. P. 67–70.
 31. **Šalomskienė J., Žvirdauskienė R.** EEB keturių lėkštelių metodo inhibitorių likučiams šviežioje mėsoje nustatyti tobulinimas // *Maisto chemija ir technologija*. 2003. T. 37, Nr. 1. P. 125–133.
 32. **Rybinska K., Postupolski J., Szczesna M.** Residues of antibiotics and other inhibitory substances in milk // *Rocz Panstw Zakl Hig*. 1995. Vol. 46 (3). P. 239–241.
 33. **Maślanka T., Jaroszewski J., Gonkiewicz B., Sobczak J.** Residues of inhibitory substances in milk and antibiotics in animal tissues // *Medycyna Wet*. 2004. Vol. 60(3). P. 320–322.
 34. **Shitandi A., Sternesjo A.** Detection of antimicrobial drug residues in Kenian milk // *Journal of Food Safety*. 2001. Vol. 21(4). P. 205–214.
 35. **Suhren G.** Antibiotisch wirksame Substanzen in Milch: Bedeutung, rechtliche Aspekte und Nachweis // *DMZ, Lebensmittelindustrie und Milchwirtschaft*. 2002. Vol. 123(6). S. 22–231.

Pateikta spaudai 2004-09

R. Žvirdauskienė, J. Šalomskienė, L. Urbšienė
DETERMINING GROUPS OF INHIBITORS IN RAW COWS MILK BY MICROBIOLOGICAL METHODS

Summary

Samples of raw milk delivered to the State Laboratory “Pieno tyrimai” from different regions of Lithuania were used for determining inhibitors. 1.9 % of “positive” samples (with inhibitors) were determined using agar-diffusion test with *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Confirmation of these results by disk assay resulted in 0.8 % “positive” samples. Penicillins were found in 86 % of the “positive” samples. Penicillins were found in 47 % “positive” samples in June, and in 95 % “positive” samples in September–November. Other groups of inhibitors – tetracyclines, sulphonamides, aminoglycosides and macrolides – were found in 24, 55, 34 and 19 % samples resp. of the total number of “positive” samples and 0.19, 0.44, 0.27 and 0.15 %, of the total number of samples. In the majority of the samples several groups of inhibitors (rather than one) were identified.

Keywords: inhibitors, milk, microbiological method.

Р. Жвирдаускене, Й. Шаломскене, Л. Урбшене
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГРУПП ИНГИБИТОРОВ В СЫРОМ КОРОВЬЕМ МОЛОКЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Резюме

Исследованы образцы сырого молока, поставляемые в ГП “Pieno tyrimai” из разных регионов Литвы. С применением метода диффузии в агар с *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* было определено 1,9 % образцов, содержащих ингибиторы. После подтверждения результатов наличия ингибиторов методом дисков выявлено 0,8 % таких образцов. В 86 % образцов молока, содержащего ингибиторы, были найдены пенициллины (в 47 % образцов в июне и в 95 % образцов в сентябре–ноябре). Другие группы антибактериальных веществ – тетрациклины, сульфонамиды, аминогликозиды и макролиды – были найдены соответственно в 24, 55, 34 и 19 % образцов от общего количества образцов молока, содержащего ингибиторы, или соответственно в 0,19, 0,44, 0,27 и 0,15 % от общего количества всех исследованных образцов. В большинстве образцов было найдено не по одной, а по несколько групп ингибиторов.

