

УДК 628.356

**А. П. Олиферчик**, студентка (БГТУ);  
**Н. М. Аль-Хаммаш**, аспирант (БГТУ); **А. С. Кучминская**, студентка (БГТУ);  
**А. В. Игнатенко**, кандидат биологических наук, доцент (БГТУ)

## МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИБИОТИКОВ И ИНГИБИРУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ В МОЛОКЕ

Статья посвящена проблемам определения остаточных количеств антибиотиков и ингибирующих веществ в сыром молоке. В работе рассмотрены микробиологические методы определения антибиотиков в молоке: метод диффузии веществ в агар, метод редуктазной пробы, метод биотестирования подвижности микроорганизмов и метод биокалориметрии. Показано, что методы биокалориметрии и подвижности микроорганизмов *Euglena gracilis* позволяют повысить чувствительность обнаружения антибиотиков и сократить длительность и трудоемкость анализов. Методы могут быть рекомендованы для практического использования на молочных фермах и молокоперерабатывающих предприятиях.

The article is devoted to the problems of remain quantities of antibiotics and inhibitors detection in raw milk. It was analyzed microbiological methods: substances diffusion into agar, reductase probe, bio-calorimetry and bioassay of cells mobility for antibiotics testing in milk. It was shown that methods of bio-calorimetry and mobility of microalgae *Euglena gracilis* are rather sensitive and made it possible to decrease expenditures of time and labor for analyses. These methods may be recommended for practical application at dairy farms and dairy processing enterprises.

**Введение.** Своевременное обнаружение молочного сырья, содержащего ингибирующие вещества, представляет большой интерес для молокоперерабатывающих предприятий. Присутствие ингибиторов в молоке нарушает биотехнологические процессы переработки молока и наносит значительный экономический ущерб маслодельным и сыродельным заводам, предприятиям, производящим кисломолочные продукты, детское и лечебное питание.

К ингибирующим веществам принадлежат: антибиотики, консервирующие, нейтрализующие вещества; моющие и дезинфицирующие средства; нитраты; тяжелые металлы и др. Основными источниками их появления в молоке являются: лечение коров (антибиотики); кормление животных (пестициды, консерванты, кормовые антибиотики, нитраты, тяжелые металлы и др.); обработка доильного и другого молочного оборудования для поддержания санитарии и гигиены (моюще-дезинфицирующие вещества, нейтрализаторы).

Одним из биологически опасных и часто обнаруживаемых видов загрязнения молока являются антибиотики. Особенность действия данных веществ – высокая биологическая активность в малых концентрациях (ПДК 0,01–0,10 мг/кг) и высокая специфичность по отношению к отдельным функциям жизнедеятельности организмов [1].

В Республике Беларусь контроль за остаточными количествами антибиотиков в молоке осуществляется на трех этапах: 1) в хозяйствах, на животноводческих комплексах и молочно-товарных фермах (МТФ); 2) на перерабаты-

вающих предприятиях; 3) в испытательных лабораториях и ветеринарных центрах.

Основное место контроля ингибирующих веществ и наиболее узкое его звено – МТФ, которые не имеют достаточных ресурсов и измерительных средств для осуществления непрерывного контроля за содержанием чужеродных веществ в молоке.

МТФ и перерабатывающие предприятия нуждаются в простых, быстрых и дешевых методах анализа остаточных количеств антибиотиков и ингибиторов в молоке.

**Основная часть.** Цель работы – анализ существующих методов определения остаточных количеств ингибирующих веществ и антибиотиков в молоке, поиск и разработка экспресс-методов их биотестирования.

При анализе проблемы определения остаточных количеств чужеродных веществ в анализируемой среде в общем случае необходимо решить 3 вида задач: обнаружение присутствия ингибирующих веществ; установление их природы; количественное определение веществ.

Не все методы способны одновременно решать все три аналитические задачи, но в ряде случаев, как для МТФ, этого и не требуется, поскольку используемые антибиотики известны.

Низкие значения ПДК антибиотиков предполагают применение высокочувствительных методов анализа.

Наиболее чувствительным и высокоточным подтверждающим методом контроля антибиотиков в молоке и готовой продукции является метод ВЭЖХ с хроматомасс-детекцией. Однако это дорогостоящий метод, который требует вы-

сокого уровня квалификации персонала, поэтому находит ограниченное применение и используется только в крупных центрах для мониторинга общей ситуации.

Большой доступностью, низкой стоимостью при высокой чувствительности обладают биологические методы анализа. Широкое распространение получили микробиологические методы контроля с помощью чувствительных штаммов микроорганизмов [2]. Методы отличаются простотой и высокой производительностью, однако имеют большую длительность анализа; нуждаются в микробиологической лаборатории и обеспечении стерильности, что делает их недоступным для МТФ.

Более быстрым и приемлемым для МТФ микробиологическим методом обнаружения антибиотиков в молоке является редуктазная проба с молочнокислыми бактериями (МКБ) или споровыми формами микроорганизмов, позволяющая провести анализ в течение нескольких часов [3].

Одними из высокочувствительных и наиболее селективных методов анализа являются иммунологические, иммунохимические, иммуноферментные методы анализа [4]. На рынке предлагается большой ассортимент этих тест-систем для обнаружения антибиотиков в молоке. К их недостаткам относятся большие текущие затраты, а также непродолжительность сроков их хранения.

Для определения антибиотиков и ингибиторов в молоке в данной работе использовали методы: биотестирования подвижности микроорганизмов [5, 6]; биокалориметрии [7]; диффузии веществ в агар [2], а также определения ингибирующих веществ в молоке по ГОСТ 23454–79 [3].

Тест-объектами в работе служили клетки микроводоросли *E. gracilis*, суточные культуры мезофильных и термофильных МКБ из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ, приготовленных в соответствии с [6].

В качестве антибиотиков и ингибирующих веществ использовали препараты: бензилпенициллина натриевую соль, стрептомицин сульфат, тетрациклин, эритромицин, левомецетин, ампициллин, низин, соли тяжелых металлов  $Fe^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ , нитриты и нитраты в концентрациях  $10^{-3}$ – $10^{-9}$  М.

Исследования проводились на водных средах, а также образцах молока, искусственно загрязненных антибиотиками и ингибирующими веществами до необходимой концентрации.

Подготовку образцов молока, измерение подвижности клеток *E. gracilis* в анализируемых средах и обработку результатов наблюдений проводили как описано в [6].

Влияние ингибиторов на клетки характеризовали изменением величины  $B$ :

$$B = (V_k / V) \cdot 100\%, \quad (1)$$

где  $V_k$ ,  $V$  – средние скорости движения клеток в контрольном и рабочем образцах.

Порогом обнаружения антибиотиков ( $C_{min}$ ) служила концентрация веществ, вызывавшая изменение значения  $B$  на 20%.

Регистрацию теплопродукции образцов молока без и с ингибирующими веществами осуществляли с помощью микрокалориметра МКМ-Ц [7].

О содержании ингибирующих веществ в молоке судили по степени подавления физиологической активности молочнокислых бактерий, которую определяли по мощности теплопродукции клеток в отсутствие ( $q_0$ ) и в присутствии ( $q$ ) ингибирующих веществ или по количеству выделенного ими тепла ( $Q_0$  и  $Q$ ).

Полученные данные обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Результаты исследований подвижности микроорганизмов *E. gracilis* в молочной сыворотке в присутствии отдельных ингибиторов и антибиотиков представлены на рис. 1, 2.

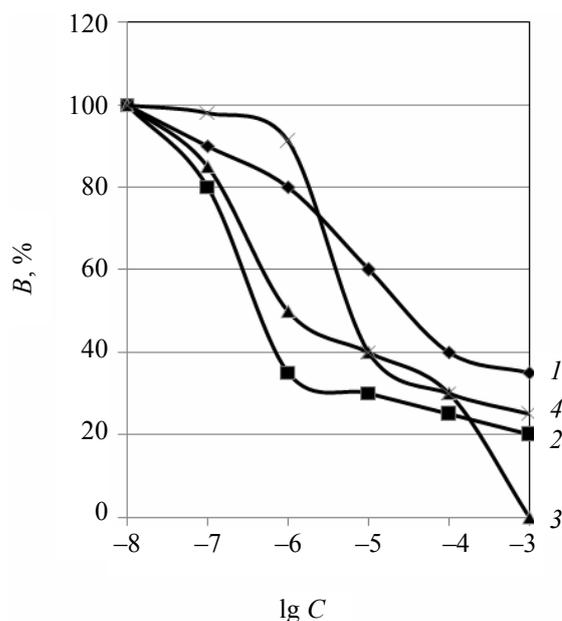


Рис. 1. Изменение относительной скорости движения клеток *E. gracilis* от концентрации ингибиторов ( $C$ , моль/л) в полулогарифмической системе координат. Среда Лозино-Лозинского,  $T = 20^\circ C$ : 1 – фенол; 2 – нитробензол; 3 –  $Cd^{2+}$ ; 4 –  $Cr^{6+}$

Как видно из рис. 1, 2, для ингибирующих веществ зависимость носит нелинейный характер, тогда как для антибиотиков может быть описана выражением

$$B = -a \cdot \lg C + b, \quad (2)$$

где  $a$ ,  $b$  – экспериментально найденные константы.

## Сравнительный анализ методов определения антибиотиков в молоке

Наименование	$C_{\min}$ , мкг/мл				
	Редуктазная проба по ГОСТ 23454-79	Биокалориметрия		Подвижность клеток <i>E. gracilis</i>	Метод диффузии веществ в агар по ГОСТ Р 51600-2010
		<i>L. lactis</i>	<i>Str. thermophilus</i>		
Бензилпенициллин	0,01	0,042	0,002	0,0005	0,005
Стрептомицин	30,0	1,0	5,0	0,003	0,5
Окситетрациклин	1,0	0,2	0,1	0,01	0,1
Эритромицин	0,1	–	–	0,0002	0,05

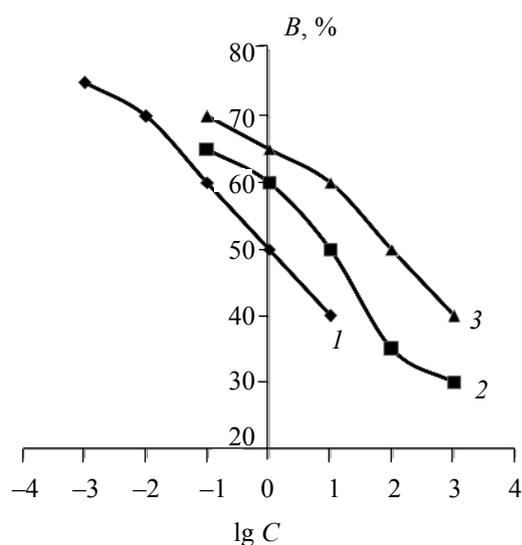


Рис. 2. Зависимость относительной подвижности клеток *E. gracilis* от концентрации антибиотиков в полулогарифмической системе координат.

Среда Лозино-Лозинского,  $T = 20^{\circ}\text{C}$ :

1 – бензилпенициллин; 2 – стрептомицин;

3 – тетрациклин

Это позволило рассчитать для них значения  $C_{\min}$  (таблица).

Наибольшей активностью обладали антибиотики эритромицин и бензилпенициллин, которые оказывали ингибирующее действие на клетки *E. gracilis* при концентрациях в 20–40 раз ниже, чем в редуктазном методе по ГОСТ 23454-79 и методе диффузии веществ в агар по ГОСТ Р 51600-2010.

Высокая чувствительность позволяет использовать данный метод для биотестирования содержания остаточных количеств антибиотиков в молоке.

На рис. 3, 4 приведена кинетика изменения параметров тепловыделения клеток *E. coli*, МКБ от вида и концентрации антимикробных веществ. Из рис. 3, 4 видно, что чем более сильное ингибирующее действие оказывали вещества при одних и тех же концентрациях, тем сильнее снижался уровень тепловыделения микроорганизмов и увеличивалась длительность лаг-фазы задержки роста метаболической активности клеток.

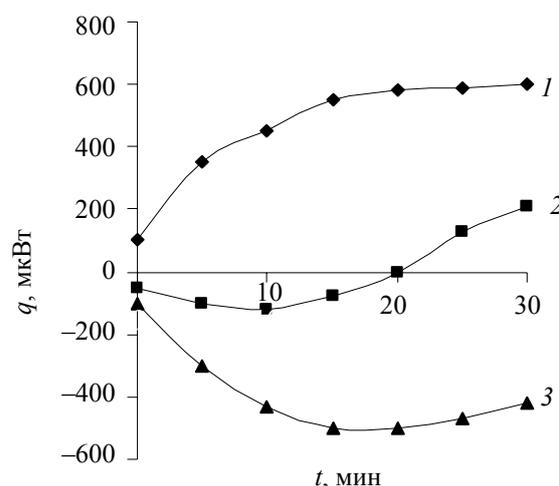


Рис. 3 Кинетика изменения мощности тепловыделения клеток *E. coli* в присутствии антимикробных веществ ( $C = 0,05\%$ ): 1 – контроль; 2 – гефал; 3 – хлоргексидин

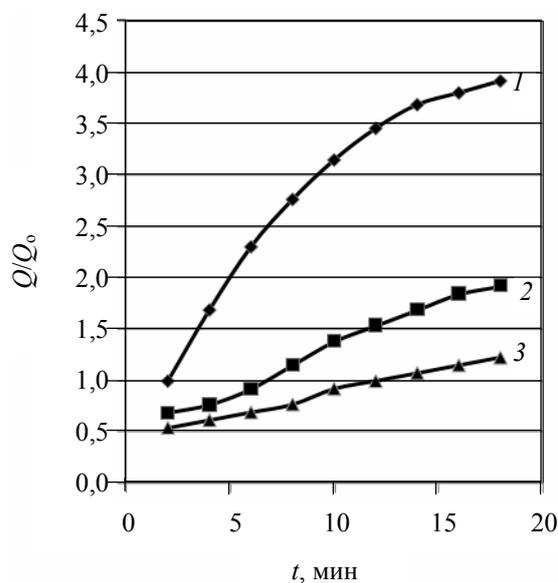


Рис. 4 Кинетика изменения показателя  $Q/Q_0$  клеток МКБ в присутствии антибиотика низина: 1 – контроль; 2 – 0,05% антибиотик; 3 – 0,1% антибиотик

Уменьшение уровня тепловыделения микроорганизмов от концентрации антибиотиков описывается экспоненциальной зависимостью,

что позволяет быстро определять содержание остаточных количеств ингибирующих веществ.

Сравнительный анализ использованных методов определения антибиотиков в молоке показывает (таблица), что разные микроорганизмы имеют свой спектр чувствительности к отдельным антибиотикам, который следует учитывать при подборе тест-культур для анализа.

Чувствительность клеток *E. gracilis* к изученным антибиотикам различалась в десятки раз, но оставалась значительно выше, чем для известных методов микробиологического анализа. Особенно высокую чувствительность они проявляли к бензилпенициллину и эритромицину.

Полученные результаты указывают на то, что поведенческие реакции микроорганизмов, основанные на рецепции веществ и хемотаксисе, весьма чувствительны к антибиотикам и ингибиторам.

Метод тестирования антибиотиков в молоке по подвижности клеток *E. gracilis* прост, высокочувствителен, не требует расходных материалов, высокой квалификации персонала, может быть осуществлен на простых и дешевых микроскопах с небольшим увеличением.

Другим удобным методом биотестирования содержания антибиотиков в молоке, рекомендуемым для молокоперерабатывающих предприятий, является метод биокалориметрии. Изменение теплопродукции клеток в ответ на действие ингибирующих веществ проявляется на ранних стадиях их воздействия на микроорганизмы.

Метод биокалориметрии позволяет регистрировать низкие концентрации антибиотиков и ингибирующих веществ в молоке и молочных

продуктах в течение 10–20 мин с относительной погрешностью, не превышающей 10%.

**Заключение.** В работе предложены экспресс-методы определения остаточных количеств антибиотиков в молоке на основе подвижности микроорганизмов *Euglena gracilis* и биокалориметрии, которые могут быть рекомендованы для использования в условиях МТФ и на молокоперерабатывающих предприятиях.

### Литература

1. Егоров, Н. С. Основы учения об антибиотиках / Н. С. Егоров. – 3-е изд., пер. и доп. – М.: Высш. школа, 1979. – 455 с.
2. Молоко и молочные продукты. Микробиологические методы определения наличия антибиотиков: ГОСТ Р 51600–2010. – Введ. 01.01.2011. – М.: Стандартинформ, 2010. – 11 с.
3. Молоко. Методы определения ингибирующих веществ: ГОСТ 23454–79. – Введ. 01.01.1980. – М.: Стандарты, 1989. – 6 с.
4. Розанцев, Э. Г. Биотестирование или биологическая оценка безопасности в настоящем и будущем / Э. Г. Розанцев, Е. Г. Черемных // Экология и промышленность России. – 2003. – Т. 13, № 3. – С. 44–56.
5. Игнатенко, А. В. Биотестирование антибиотиков в мясомолочной продукции / А. В. Игнатенко // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология орган. в-в. – 2005. – Вып. XIII. – С. 87–89.
6. Игнатенко, А. В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия. Лабораторный практикум / А. В. Игнатенко, Н. В. Гриц. – Минск: БГТУ, 2003. – 114 с.

Поступила 17.03.2012