

STANOVENÍ REZIDUÍ INHIBIČNÍCH LÁTEK V MLÉCE

DAVID ŠILHA
IVETA BROŽKOVÁ

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko–technologická
Katedra biologických a biochemických věd

*Centralizovaný rozvojový projekt MŠMT č. C29:
„Integrovaný systém vzdělávání v oblasti výskytu a eliminace reziduí léčiv v
životním prostředí“*



Vyučující:

Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

Ing. David Šilha

Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko–technologická, Univerzita Pardubice

Teoretická část práce a princip úlohy:

Jakost syrového mléka ovlivňuje také jeho technologickou zpracovatelnost. Kromě mikroskopického hodnocení mikroflóry syrového mléka se sledují i produkty metabolismu mikroorganismů (pomocí enzymatických zkoušek). U syrového mléka se tedy hodnotí mikrobiologická jakost (celkový počet mikroorganismů; příp. koliformních mikroorganismů; aj.), analytická jakost (chemické složení, bod mrznutí, atd.), obsah inhibičních látek a množství somatických buněk (buněčné elementy jsou určitým ukazatelem zdravotního stavu dojnice).

Pro orientační vyšetřování mikrobiologické kvality syrového mléka lze využít enzymatické zkoušky, které jsou založeny na aktivitě látkové přeměny přítomných mikroorganismů. Enzymy vyprodukované mikroflórou v syrovém mléce způsobí určité změny, jejichž rozsah je úměrný počtu vyskytujících se mikroorganismů. Nejčastěji se sledují změny kyselosti mléka, redox–potenciálu, vodivosti, produkce důležitých metabolitů, popř. změny v konzistenci vzorku.

Důležitým parametrem syrového mléka je případný obsah inhibičních látek, které se vyskytují v mléce v důsledku chemizace zemědělství, užívání antibiotik, používání desinfekčních prostředků a detergentů v prvovýrobě. Inhibiční látku můžeme definovat jako sloučeninu omezující nebo zastavující růst mikroorganismů. Tyto látky mají následně negativní vliv na technologické procesy. Rezidua inhibičních látek (RIL) můžeme stanovit pomocí tzv. plotnových metodik, popř. komerčními širokospektrálními testy a rychlotesty.

Enzymatické zkoušky – *reduktázová zkouška*

Princip:

Bakterie v mléce produkují enzymy – *reduktázy*, které jsou schopny odbarvovat methylenovou modř na bezbarvou leukoformu (oxidačně redukční indikátor reaguje na změnu redox–potenciálu, ke které dochází tím, že přítomné bakterie spotřebovávají rozpuštěný

kyslík). Rychlost odbarvení indikátoru závisí na metabolické aktivitě bakterií a je tedy v přímém vztahu k jejich počtu ve zkoušeném vzorku mléka.

Postup práce:

Do sterilní zkumavky pipetujeme 10 ml vzorku syrového mléka, vytemperujeme na 37 °C a přidáme 250 µl roztoku methylenové modři. Důkladně promícháme a inkubujeme při 37 °C do odbarvení. Je-li mléko odbarveno ze dvou třetin, pokládáme test za skončený (povrchová vrstva zůstává modrá proto, že redukováná modř je opět oxidována vzdušným kyslíkem). Doba do odbarvení methylenové modři vyjadřuje kvalitu mléka.

Enzymatické zkoušky – kvasná zkouška

Princip:

Vzorek mléka se nechá srazit při 37 °C a dle doby potřebné ke sražení mléka a vzhledu výsledné sraženiny usuzujeme počet a popř. i složení mikroflóry. Tato zkouška se používá hl. pro zjištění kvality při výrobě tvrdých sýrů.

Postup práce:

Test se provádí současně s reduktázovou zkouškou v jedné zkumavce. Po inkubaci při 37 °C se průběžně hodnotí i typ vzniklé sraženiny, dle čehož se usuzuje na kvalitu mléka.

Stanovení RIL v mléce – jogurtový test

Princip:

Tento test se týká nejen obsahu cizorodých inhibičních látek, ale i ostatních faktorů ovlivňujících růst čistých mlékárenských kultur. Lze jím tedy posoudit (orientačně) technologickou zpracovatelnost mléka.

Postup práce:

Do sterilní baňky se pipetuje 50 ml zkoušeného syrového mléka, které se zahřeje na teplotu 85 °C po dobu 5 minut. Následně se ochladí na 43 °C a zaočkuje se 2 ml směsí jogurtové kultury ve sterilním mléce prostým inhibičních látek (smíchání se provede asepticky v poměru 1:1). Baňka se uzavře, opatrně promíchá a nechá se inkubovat při 43 °C po dobu 3,5 h. Současně se stejným způsobem provede tzv. slepý pokus s mlékem bez přítomných

inhibičních látek. Po inkubaci se stanoví titračně kyselost mléka v obou baňkách dle Soxhlet–Henkela (tj. titrací 0,25M NaOH na fenolftalein do pleťově růžového zbarvení).

Stanovení RIL v mléce – papírková metoda

Princip:

Papírky na zjištění inhibičních látek v mléce se nazývají *antibiotesty* a používají se především ve 2 typech:

***Antibiotest I – pro stanovení všech inhibičních látek v mléce.** Testační papírek obsahuje vysušenou živnou půdu, kulturu sporulujících mikroorganismů (spory *B. subtilis*) citlivých na penicilin a další antibiotika a indikátor triphenyltetrazolium chlorid (TTC).

Pokud vzorek mléka obsahuje inhibiční látky, testovací spory *B. subtilis* nevyklíčí a buňky se nepomnoží, TTC se neredukuje a papírek zůstane bez zbarvení. V nepřítomnosti inhibičních látek se papírek zbarví růžově (TTC se redukuje na červený formazan) v důsledku rozvoje bakterie *B. subtilis*.

***Antibiotest II – k určení, zda je inhibiční látkou konkrétně penicilin.** Obsahuje navíc enzym penicilinásu.

Penicilin je penicilinásou přítomnou v papírku II rozložen, testovací kmen se začne rozmnožovat, a tak i redukovat TTC.

Postup práce:

Vzorek mléka se zahřeje na 85 °C po dobu 2 minut (inaktivace všech mikroorganismů) a ochladí se na pokojovou teplotu. Ze sáčku se asepticky vyjme pinzetou Antibiotest I a ponoří se do zkoušeného inaktivovaného mléka na 5 vteřin. Po nasátí mléka se papírek vloží zpět do sáčku, který se zataví a nechá inkubovat v termostatu při 37 °C 12–14 h. Po této době posoudíme zbarvení papírku, stejným postupem pracujeme i s Antibiotestem II. Současně se pro kontrolu provede i test s mlékem prostým inhibičních látek.

Stanovení RIL v mléce – plotnová metoda

Princip:

Zkoušení je založeno na principu agarové difúzní metodiky, kdy se na inokulované agarové médium umísťují disky s jednotlivými vzorky. Metodiku lze využít pro screening mnoha látek. Po kultivaci je povrch agarového média porostlý daným mikroorganismem a okolo testovaných vzorků se objevuje/neobjevuje zóna inhibice.

Agarové půdy se naočkují testovacím mikroblem citlivým vůči inhibičním látkám (antibiotikům) a na povrch půdy se položí papírové disky nasycené zkoušeným vzorkem. Růst testovacího mikroorganismu se projeví zákalem agarové půdy. Obsahuje-li mléko inhibiční látky, je růst testovacího mikroorganismu inhibován, což se projeví čirou zónou v okolí disku s testovaným vzorkem.

V současné době se používá tzv. **metoda šesti ploten**, s využitím několik mikroorganismů pro testování RIL. Základem je několik ploten s kmeny *Bacillus subtilis* BGA CCM 4062 a *Kocuria rhizophila* CCM 552. Na těchto plotnách se využívá odlišného pH agarů, teploty inkubace i přidavku dalších látek. Metoda umožňuje skupinovou identifikaci tetracyklinových, aminoglykosidových, makrolidových antibiotik a sulfonamidů. Dále se používá plotna s *Geobacillus stearothermophilus* v.c. C 953 CCM 5965 a *Escherichia coli* CCM 7372 (viz **Tabulka 2**).

Tabulka 2 Referenční plotnová difuzní metoda v ČR – přehled ploten, testovacích kmenů, pH půd a kultivačních podmínek.

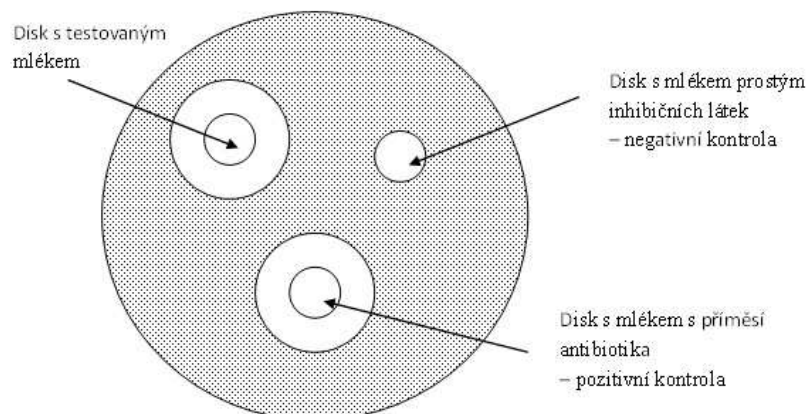
Plotna	Použitý kmen	pH půdy	Detekce	Inkubace	Vyhodnocení inhibiční zóny
1	<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062	6,0	tetracykliny	30 °C, 18–24 h	negativní < 2mm pozitivní ≥ 2mm
2	<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062	8,0	aminoglykosidy	30 °C, 18–24 h	negativní < 2mm pozitivní ≥ 2mm
3	<i>Kocuria rhizophila</i> CCM 552	8,0	makrolidy, beta-laktamy	37 °C, 18–24 h	negativní < 2mm pozitivní ≥ 2mm
4	<i>Bacillus subtilis</i> BGA CCM 4062+TMP*	7,2	sulfonamidy	30 °C, 18–24 h	negativní < 2mm pozitivní ≥ 2mm
5	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> v.c. C 953 CCM 5965	8,0	beta-laktamy, aminoglykosidy	64 °C, 5 h	negativní < 1mm pozitivní ≥ 1mm
6	<i>Escherichia coli</i> CCM 7372	8,0	chinolony	37 °C, 18–24 h	negativní < 2mm pozitivní ≥ 2mm

* TMP – trimethoprim

Postup práce:

Vzorek mléka se zahřeje na 85 °C po dobu 2 minut (inaktivace vegetativních buněk) a ochladí se na pokojovou teplotu. Disky z filtračního papíru se napustí testovaným mlékem, přebytek vzorku se nechá okapat a disk se přiloží na půdu se spory testovacího mikroorganismu. Inkubace se provádí dle podmínek uvedených v **Tabulce 2**. Současně se provede kontrolní

test se vzorkem pozitivním a negativním na obsah RIL. Pracuje se dle uspořádání, které je znázorněno na **Obrázku 1**.



Obrázek 1 Referenční plotnová difuzní metoda v ČR – přehled ploten, testovacích kmenů, pH půd a kultivačních podmínek.

Likvidace odpadů:

Likvidace mikrobiologického odpadu podléhá specifickým pravidlům. Veškerý odpad v průběhu práce likvidujte v souladu s instrukcemi vyučujících.

Literatura:

Vytřasová J., Bílková Z. (2014): Laboratorní cvičení z obecné mikrobiologie, Pardubice, 3. vydání, Univerzita Pardubice, ISBN 978–80–7395–747–6

Navrátilová P., Vyhnálková J., Jeřábková J. (2014): Plotnová difuzní metoda pro stanovení reziduí inhibičních látek v mléce, Mlékařské listy, 146, str. 4–7.