

## Vrednotenje metod ugotavljanja prisotnosti kemoterapevtikov v pitni in površinskih vodah

Karmen Godič Torkar  
Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta

### IZVLEČEK

V preglednem članku skušamo osvetliti problem prisotnosti kemoterapevtikov, zlasti antibiotikov, v pitni in površinskih vodah, ki postaja v svetu in tudi pri nas pereč problem. Kemoterapevtiki prehajajo z odpadnimi vodami iz bolnišnic, farmacevtske industrije, kmetijskih obratov, ribogojnic, čistilnih naprav, itd. v podtalnico in površinske vode ter od tod v zajetja pitne vode. Posledično se razvijejo za kemoterapevtike odporni mikroorganizmi, nižje razviti organizmi v okolju propadajo, poveča se število alergij pri prebivalstvu, pojavijo se ekonomske izgube v živilski industriji, itd. Za ugotavljanje zdravil v vodi se uporabljajo različne metode ekstrakcije, kromatografije, masne spektrometrije, itd., s katerimi lahko določimo vrsto in koncentracijo substance v preiskanem vzorcu. Te metode so drage, dolgotrajne, za njihovo izvajanje so potrebni dobro opremljeni laboratoriji in izobraženi analitiki. Za preiskovanje večjega števila vzorcev niso primerne. Po drugi strani pa se za rutinsko ugotavljanje antibiotikov v živilih že vrsto let uporabljajo preproste in dokaj hitre presejalne mikrobiološke, receptorske ali encimske metode. Z njimi lahko ugotovimo le prisotnost določenih substanc v mejah občutljivosti uporabljenih metod. Ugotovili smo, da bi bile nekatere mikrobiološke difuzijske metode ob primerni prilagoditvi in pripravi vzorcev, ustrezne tudi za testiranje vode, s katerimi bi lahko zaznali določene skupine kemoterapevtikov v koncentracijah, ki so predpisane kot najvišje dovoljene vrednosti (MRL) na enoto živila ali vode.

### IZHODIŠČA

Proizvodnja antibiotikov, oziroma kemoterapevtikov je v svetu zelo velika. V letu 1999 so po podatkih Evropske federacije za zdravje živali (FEDESA) v EU in Švici porabili 13 288 ton antibiotikov, od tega jih je bilo 65 % porabljenih v humani medicini, 29 % v veterinarski medicini in 6 % v obliki rastnih faktorjev pri reji živali ter v akvakulturi (1). V okolje, zlasti v površinske vode in v podtalnico, pa preidejo z izplakami iz bolnišnic, farmacevtskih tovarn, živinorejskih farm, ribogojnic pri nepravilnem odlaganju zdravil iz gospodinjestev ali kot posledica nepopolnega odstranjevanja ostankov zdravil v komunalnih in industrijskih čistilnih napravah (2 – 4). Huang s sodelavci (5) ocenjuje, da se v ZDA koncentracije antibiotikov v odpadnih vodah gibljejo od 3,9 do 27000 ng/l.

Biološke čistilne naprave pri odstranjevanju ostankov antibiotikov v večini primerov niso učinkovite, še več, antibiotiki zavirajo delovanje mikroorganizmov kot delovnih agensov. (6).

V odpadnih in površinskih vodah so najpogostejši sulfonamidi, fluorokinoloni in makrolidi, saj se ti v vodnem okolju najtežje in najpočasneje razgradijo (6 – 7). Ker so antibiotiki večinoma slabo topni v vodi, imajo visoke biokoncentracijske faktorje (500 - 1000) ter za akumulacijo ugoden faktor ( $K_{ow} > 3$ ) in se po vstopu v okolje pogosto akumulirajo v organizmih (8 – 9). Farmacevtski izdelki v ekoloških sistemih delujejo na žive organizme, vključno na človeka. V okolju lahko antibiotiki toksično delujejo na evkariontske organizme, npr. na alge ali vodne bolhe iz družine rakov že v koncentracijah od 5 – 100 µg/l (10 – 11). Pri kroženju vode v ekosistemih preidejo ostanki antibiotikov preko podtalnice v pitno vodo ter posredno v surovine in nato v živila, namenjena za splošno prehrano ljudi. Pri potrošnikih lahko pride do alergijskih reakcij, povzročenih z antibiotiki, do porušenega ravnotežja v njihovi črevesni mikroflori, zaradi razvoja za antibiotike odpornejših patogenih bakterij pa do večjega števila z živili povzročenih težko ozdravljivih infekcij in intoksikacij (12 – 15).

Prisotnost kemoterapevtikov povzroča tudi tehnološke probleme. V predelovalni živilski industriji in različnih biotehnoških procesih lahko prisotnost ostankov antibiotikov v vodi in surovinah negativno vpliva na procese, vodene z delovnimi mikroorganizmi (fermentacije, proizvodnja piva, vina, organskih kislin, biološke čistilne naprave, itd.). Npr. v mleku njihova prisotnost povzroči slabšo aktivnost starterskih kultur pri izdelavi fermentiranih mlečnih izdelkov, nezadostno tvorbo arome, kisline, nepravilno zorenje sirov, itd. (15 – 16).

Moderna živilska industrija se zato zavzema za čim manjšo uporabo antibiotikov v kmetijstvu, živinoreji in ribogojništvu. Članice EU so se dogovorile, da z januarjem 2006 ne bo več dovoljena uporaba antibiotikov na živinorejskih farmah za pospeševanje rasti živali, namenjenih za hrano ljudi (17).

V prihodnje bo zato potrebno njihovo prisotnost sistematično ugotavljati, čeprav za enkrat nobena od substanc, ki spada v skupino antibiotikov, v smernicah Water Framework Directive of the European Union (18) še ni na seznamu nevarnih substanc. Sistematično ali presejalno izvajanje ugotavljanja antibiotikov v pitnih in površinskih vodah se v okviru EU za enkrat tudi ne izvaja.

Antibiotiki v okolju pospešijo razvoj nanje odpornih mikroorganizmov in voda je zaradi njenega univerzalnega kroženja potencialni zbirnik za njihovo razširjanje. Odporne patogene vrste, ki so nosilci in prenašalci genov za rezistenco proti antibiotikom, se prenašajo iz vode posredno ali neposredno na človeka (4, 19 – 21). Genetski zapisi, ki kodirajo rezistenco za antibiotike se med bakterijskimi vrstami zlahka prenašajo tudi iz saprofitnih ali oportunističnih na patogene vrste in obratno. Zaskrbljujoče naraščanje bakterijskih vrst z multiplo rezistenco torej ni le posledica povečane uporabe kemoterapevtikov v humani in veterinarski medicini, ampak tudi prenosa odpornosti med bakterijami v celotnem okolju (12, 22).

Zato je sledenje prisotnosti antibiotikov in istočasno zanje rezistentnih bakterij v okolju izrednega pomena (4, 21, 23).

Metode za ugotavljanje prisotnosti antibiotikov v vodi, zemlji, v živilih, itd., so različne. Največkrat se razlikujejo med seboj po načinu delovanja, namenu in njihovi občutljivosti. Poznamo mikrobiološke, encimske, receptorske, imunološke, kemijske metode.

### **Pregled uporabljenih metod za ugotavljanje zaviralnih snovi v živilstvu**

Pri nadzoru vsebnosti ostankov v živilih se uporabljajo različne tehnike in metode, ki so na splošno razdeljene v tri skupine:

*Orientacijske ali dokazovalne metode*, s katerimi ugotovimo prisotnost različnih kemoterapevtikov. To so t.i. presejalne metode (screening), ki so relativno hitre, enostavne in poceni ter omogočajo pregled večjega števila vzorcev. V to skupino spadajo mikrobiološke, encimske, imunološke in receptorske metode. Največkrat z njimi ne moremo določiti vrste in natančne koncentracije kemoterapevtika v vzorcu, občutljive pa so za lahko za različne vrste antibiotikov. Veliko takih metod uporabljajo v živilski industriji že vrsto let za rutinsko preverjanje ostankov antibiotikov v surovinah in živilih (24). Mejne vrednosti občutljivosti teh metod so primerljive z mednarodnimi mejnimi vrednostmi dovoljenih koncentracij za posamezne antibiotike v živilih (angl. Maximum Residue Limits – MRL), ki so navedene tudi v mednarodnih smernicah Codex Alimentarius Commission (25 – 26), določa pa jih komisija Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Food v okviru FAO in WHO.

Najvišje mejne vrednosti (MRL) so definirane kot najvišje koncentracije posameznih substanc ali njihovih metabolitov, ki se uporabljajo v veterini in kmetijstvu ter so dovoljene ali spoznane za sprejemljive v ali na enoti živila, živalske krme ali kmetijskem pridelku. MRL temelji na vrednostih, ki jih lahko človek z določeno telesno maso dobi dnevno v svoj organizem v svojem življenju, ne da bi te snovi vplivale na njegovo zdravje. Vrednosti MRL so izražene v enotah na utežno enoto (mg ali µg/kg, mg/l v tekočinah), oziroma ppm (parts per milion) ali ppb (parts per billion) (27).

*Potrditvene ali konfirmacijske metode* združujejo kombinacijo več metod ali pa so to encimske, receptorske ali imunološke metode, ki se uporabljajo za ugotavljanje specifičnih skupin kemoterapevtikov oziroma antibiotikov (npr. β-laktamskih antibiotikov, tetraciklinov, sulfonamidov, itd.). Imajo ožji spekter občutljivosti.

*Identifikacijske metode*: so specifične, dolgotrajne, natančne in drage metode, s katerimi preskušamo samo malo število vzorcev, kjer določamo vrsto antibiotika in njegovo koncentracijo. Te metode so HPLC, plinska kromatografija, visokovoltazna elektroforeza, tankoplastna kromatografija, fluorescenčna tekočinska kromatografija, imunske metode (ELISA) ionska izmenjava, izoelektrično fokusiranje, masna spektrometrija, itd. (28 – 29).

#### *Mikrobiološke metode*

Tradicionalne mikrobiološke metode za ugotavljanje prisotnosti zaviralnih snovi (antibiotikov) v mleku, serumu, mesu, itd. temeljijo na inkubaciji občutljivega testnega mikroorganizma v prisotnosti vzorca, ki prehaja (difundira) v gojišče. Če antibiotik v vzorcu ni prisoten, mikroorganizem v gojišču raste in se razmnožuje, kar lahko opazimo vizualno kot motnost ali spremembo barve mikrobiološkega gojišča. Če je v dodanem vzorcu prisoten antibiotik ali kakšna druga zaviralna snov, se mikroorganizem v gojišču ne razmnožuje, pojavi se inhibicijska cona rasti ali pa ne pride do spremembe barve gojišča. Takšni testi so občutljivi za različne skupine antibiotikov, sulfonamide ali druge

protimikrobne snovi, so zanesljivi in cenovno ugodni, vendar lahko inkubacija traja od 2 do 24 ur. Mikrobiološke metode v grobem delimo na difuzijske metode z diski in metode z difuzijo vzorca v gojišče.

#### *Difuzijske metode z diski*

Kot testni organizmi se uporabljajo *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus thermophilus*, itd. (30). Testno bakterijo s koncentracijo od  $10^4$  do  $10^8$  KE/ml, ki ima točno določeno definirano občutljivost za posamezne vrste antibiotikov, vcepimo v trdno gojišče. Na površino trdnega gojišča dodamo vzorec. Če testiramo trdni vzorec, ga razrežemo na koščke določene velikosti, če je vzorec tekoč (npr. mleko, serum), uporabimo kovinske cilindre ali papirnate sterilne diske premera 6 mm, katere omočimo z vzorcem. Diske z vzorcem namestimo na površino gojišča. Vzorec z antibiotikom med inkubacijo prehaja v gojišče in zaviralno deluje na rast testne bakterije v gojišču. Prisotnost antibiotika v vzorcu se pokaže kot inhibicijska cona (cona brez rasti) okrog diska. Če dodamo v gojišče še barvni indikator, ki spremeni barvo ob rasti testne bakterije, je inhibicijska cona vidnejša. Tak primer je metoda po Kundratu (Merck), ki je uporabna za kvalitativno ugotavljanje antibiotikov, sulfonamidov in drugih zaviralnih snovi v mleku, mesu in drugih živilih živalskega izvora (31). Metoda ni občutljiva na prisotna čistila, razkužila ali konzervanse v vzorcu. Kot testni mikroorganizem se uporablja *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 7953 (Merck, Nemčija). Bakterija v gojišču razgrajuje glukozo in tvori kislino. Ta sprememba vrednosti pH povzroči spremembo barve indikatorja bromkrezol purpur iz vijolične v rumeno. Pozitivni rezultat je, če je premer inhibicijske cone okrog diskov z vzorcem najmanj 10 mm.

Na podobni osnovi deluje difuzijska metoda z diski, kjer se kot testni mikroorganizem uporablja *Bacillus subtilis* BGA (DSM 618, Merck, Nemčija). Odčitavamo le premer inhibicijske cone okrog diskov z vzorci, ni pa spremembe barve gojišča. Prisotnost zaviralnih snovi v vzorcu je dokazana, če je premer inhibicijske cone okrog 6 mm diska 10 mm ali več (32).

#### *Metode difuzije vzorca v gojišču*

temeljijo na podobnem principu kot difuzijske metode z diski, s to razliko, da dodamo vzorec neposredno v (na) gojišče. Antibiotik prehaja na osnovi difuzije iz vzorca v gojišče in zavira rast bakterije, kar se kaže v nespremenjeni barvi indikatorja (28 – 29).

Komercialno dostopnih je kar nekaj izvedb mikrobioloških testov, npr. Delvotest, Copan, BRT, Premitest, Eclipse, Blue-Yellow II, CowSide, AIM-96, STAR-five plate, itd. Nekateri so validirani in ustrezajo mednarodnim normativom (15).

Pri nas se zlasti za testiranje surovega mleka pogosto uporablja Delvotest SP-NT (DSM, Nizozemska), ki je občutljiv za različne vrste antibiotikov in sulfonamide in za višje koncentracije razkužil ter detergentov. Testni komplet vsebuje epruvetke s trdnim hranljivim gojiščem, v katerem so spore *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* var. *calidolactis* v koncentraciji  $5 \cdot 10^6$  KE/ml, hranljive snovi, potrebne za rast mikroorganizma ter barvni indikator bromkrezol purpur. Po dodatku vzorca ampule zapremo in inkubiramo pri temperaturi  $64 \pm 1$  °C/2,5 do 3 ure. Gojišče je zaradi barvnega indikatorja na začetku inkubacije vijolične barve. Če spore testne bakterije med inkubacijo germinirajo, tvorijo kislino. Zaradi spremembe vrednosti pH v gojišču se barvni indikator spremeni iz vijolične v rumeno. Če je v vzorcu prisoten antibiotik, zavira germinacijo, rasti bakterijske

populacije ni in barva ostane vijolična. Delvotest lahko uporabljamo za testiranje različnih vrst mleka, mlečnih izdelkov, tkiv, jajc, medu, seruma, urina, rib, itd.

Tudi BR-test (AIM GmbH, Nemčija) temelji na difuziji vzorca z antibiotikom v gojišče. Barvni indikator se spremeni ob spremembi redoks potenciala, ki ga povzroči razmnoževanje iste testne bakterije. Tudi ta test je občutljiv za različne skupine antibiotikov, sulfonamide, nekatere naravne inhibitorje, inhibitorje iz krme, celo čistilna sredstva in razkužila. Mikrobiološke metode so dokaj občutljive, saj pokažejo prisotnost nekaterih antibiotikov v koncentracijah, ki so enake ali celo nižje MRL. (15, 18 – 19).

#### *Receptorske metode*

so specifični testi za posamezne skupine antibiotikov. Obstaja več vrst, oziroma principov testov, osnova je vezava antibiotika oziroma kemoterapevtika na receptor v testnem kitu, na katerega se lahko veže kompetitivna snov. Receptorji ali biosenzorji so lahko določene molekule, celotne celice, encimi (npr. luciferaza, DD-karboksipeptidaza), protitelesa, nukleinske kisline, itd. Kompleks receptor – kompetitivna snov reagira z dodanimi substancami v kitu, rezultat je razvoj barvne reakcije, luminiscenca, tvorba CO<sub>2</sub>, itd., ki ga kvalitativno ali kvantitativno ovrednotimo (Navrátilová, 2008; Kantiani in sod., 2009). Takšen princip delovanja je značilen za teste Beta Star, SNAP, Charm MRL Test (ROSA), Penzym, Delvo-X-Press, itd. (15, 29 – 30).

Pri testu Beta Star se  $\beta$ -laktamski antibiotik v vzorcu veže na konjugat receptorja in nosilca (največkrat je to delček zlata). Celoten kompleks v raztopini potuje po testnem lističu (imunokromatografskem mediju) do mesta, kjer je nanešen antibiotik z barvilom. Če v vzorcu ni antibiotika, so vezna mesta na receptorju konjugata še prosta in se antibiotik z lističa veže nanj. Rezultat se pokaže kot rdeča črta na lističu. Intenziteta obarvanosti je torej obratno sorazmerna s prisotnostjo antibiotika v vzorcu. Če rdeče črte ni, so v vzorcu  $\beta$ -laktamski antibiotiki, ki so se vezali na receptor (28, 33).

#### *Imunokemijske in encimsko - imunske metode*

temeljijo na reakciji in vezavi antigena s specifičnim protitelesom. Najpogostejši tipi imunskih testov, ki se uporabljajo za testiranje antibiotikov v živilih in krmi so encimsko-immunski testi EIA (angl.: enzyme-immunoassay) in ELISA (angl.: enzyme-linked immunosorbent assay), imunski testi s fluorescenčno polarizacijo FPIA (angl.: fluorescence-polarization immunoassay) ter testi z imunosenzorji, ki delujejo na osnovi elektrokemijske, optične in masne transdukcije (15, 34). Kompleks antigen – protitelo postane viden, ker je protitelo označeno z encimom. Vezava encima s substratom pokaže obarvano reakcijo, ki jo zaznamo s prostim očesom ali s spektrofotometrom. Intenziteta barve je premo sorazmerna koncentraciji iskanega antibiotika v vzorcu (sendvič ELISA) ali obratno sorazmerna njegovi koncentraciji (kompetitivna ELISA). Najpogostejša uporabljena encima sta alkalna fosfataza ali hrenova peroksidaza. Metodo najpogosteje uporabljajo za ugotavljanje  $\beta$ -laktamskih antibiotikov v koncentracijah od 0,05 do 0,1  $\mu$ g/l (15, 35). Test ELISA je danes pogosto uporabljen, saj je avtomatiziran, enostaven, primeren za veliko število vzorcev, z njim lahko ugotavljamo določene skupine antibiotikov in njihove koncentracije v vzorcu. Primeri imunski testov so Parallax, LacTec, Fluorophos Beta Screen E.U., itd. (30). Napredne tehnologije testov uporabljajo t.i. imunosenzorje, ki tudi temeljijo na principu specifične vezave protiteles. To so kombinacije imunskih in receptorskih testov, kjer uporabljajo tudi napredne principe nanotehnologije in biotehnologije. Rezultate ovrednotimo na osnovi elektrokemijskih ali

optičnih razlik, kot so npr. fotometrija, fluorometrija, refleksna fluorescenca, spektroskopija, itd. (15).

#### *Kromatografske in druge kemijske metode*

Za potrditev rezultatov vseh do sedaj opisanih metod ter za določitev vrste in koncentracije antibiotikov v vzorcih pa se največkrat uporabljajo kemijske metode, ki temeljijo na različnih vrstah kromatografij, dopolnjenih z masno spektrometrijo ali drugimi metodami določitve substance. Naslednje možnosti so tudi ločevanje antibiotikov z gelsko kromatografijo in ugotavljanjem njihove prisotnosti z bioavtografijo, ki temelji na potovanju molekul antibiotikov v pufriranem gelu v različnem električnem potencialu. Na voljo je tudi več izvedb kapilarne elektroforeze, integrirana pulzna amperometrična določitev z žarki UV, različne izvedbe tekočinske kromatografije (visoko zmogljiva tekočinska kromatografija ali angl. Ultra performance liquid chromatography – UPLC), kot alternativa tekočinska kromatografija pri visokih tlakih (angl.: High pressure liquid chromatography – HPLC), itd. Za koncentriranje vzorca se uporablja zlasti ekstrakcija na trdni fazi ali pospešena ekstrakcija z vodo (15). Te metode so natančnejše, z njimi pa lahko določimo koncentracije kemoterapevtikov v območju nekaj deset ng/l (8, 15, 36 – 37).

Namen raziskave:

V našem prispevku želimo povzeti uporabljene metode pri ugotavljanju prisotnosti zdravil v vodah in ugotoviti ali so presejalne metode za ugotavljanje kemoterapevtikov v živilih primerne in dovolj občutljive tudi za testiranje vzorcev vode. Želeli smo preveriti ali je občutljivost teh metod pri preverjanju vzorcev vode enaka, kot pri ostalih živilih.

## **METODE**

### **Material**

Priprava raztopin preskušanih antibiotikov:

$\beta$  – laktamski antibiotiki:

- Benzil-penicilin G (Biochemie, Avstrija), koncentracije: 2,5  $\mu$ g/l, 25  $\mu$ g/l, 250  $\mu$ g/l, 10-kratno koncentriranje raztopine 2,5  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 25  $\mu$ g/l;

- Ampicilin, SR0136 (Oxoid, Velika Britanija), koncentracije: 2,5  $\mu$ g/l, 16  $\mu$ g/l, 25  $\mu$ g/l, 250  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 2,5  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 25  $\mu$ g/l;

- Kloksacilin, natrijeva sol, monohidrat C9393 (Sigma Aldrich, ZDA), koncentracije: 1  $\mu$ g/l, 10  $\mu$ g/l, 20  $\mu$ g/l, 40  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 10  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 20  $\mu$ g/l, antibiotični disk CX 1  $\mu$ g/disk (Becton Dickinson, ZDA);

- Cefpirom CPO 30  $\mu$ g/disk (Becton Dickinson, ZDA), koncentracije: 3  $\mu$ g/l, 30  $\mu$ g/l, 300  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 3  $\mu$ g/l;

Makrolidi:

- Eritromicin E 15  $\mu$ g/disk (Becton Dickinson, ZDA), koncentracije: 75  $\mu$ g/l, 150  $\mu$ g/l, 300  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 75  $\mu$ g/l in 150  $\mu$ g/l;

Kinoloni:

- Pefloksacin PEF 5  $\mu$ g/disk (Becton Dickinson, ZDA), koncentracije: 50  $\mu$ g/l, 500  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopine 50  $\mu$ g/l;

Ostali antibiotiki:

- Kloramfenikol SR0078 (Oxoid, Velika Britanija), 2500  $\mu$ g/l, 5000  $\mu$ g/l, 10 x koncentriranje raztopin 2500 in 5000  $\mu$ g/l.

Raztopine smo pripravili z razredčevanjem antibiotikov v sterilni destilirani vodi. Pri difuzijskih metodah z diski smo uporabili še komercialno pripravljene papirnate diske z

znanimi koncentracijami antibiotikov. Sterilna destilirana voda je predstavljala negativno kontrolo. Za kontrolo pravilne priprave gojišča po Kundratu s sporami *G. stearothermophilus* in gojišča s sporami *B. subtilis*, smo uporabili standardne diske z gentamicinom GM 10 µg/disk, penicilinom G P 10 IU/disk in streptomycinom S 10 µg/disk po navodilih (32).

Raztopine antibiotikov smo koncentrirali tako, da smo po 10 ml vsakega vzorca prenesli v sterilno petrijevo posodico, nato pa na pol odprte petrijeve posodice namestili v brezprašni komori ob zaprtem varnostnem steklu in delujočem ventilatorju toliko časa, da se je količina raztopine zmanjšala za 10 x (do 1 ml).

Pri difuzijski metodi z diski smo uporabili sterilne papirnate diske premera 6 mm (Becton Dickinson, ZDA).

Uporabljene metode v poskusu:

V poskusu smo uporabili naslednje mikrobiološke teste za ugotavljanje prisotnosti kemoterapevtikov:

Difuzijski metodi s testno bakterijo *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, Delvotest SP-NT (DSM, Nizozemska) in Brilliant Black Reduction (BR) test (AIM, Nemčija). Postopek smo izvajali po navodilih proizvajalcev in epruvetke z gojišči, kamor smo dodali vzorce, inkubirali pri temperaturi 64 °C za 2 uri 45 minut, oziroma 3 ure. Pri metodi BR smo po priporočilih Smitha in sod. (2007) v drugo serijo epruvetk z gojiščem in testno bakterijo dodali še 0,1 ml 2 x koncentriranega hranljivega bujona (401815, Biolife, Italija). Ko se je bujon absorbiral v gojišče, smo dodali vzorec. Na ta način smo z dodatkom hranil vzpodbudili germinacijo testne bakterije (24).

Difuzijski metodi z diski: metodo po Kundratu (Merck, Nemčija) s testno bakterijo *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 7953 (1.11499, Merck, Nemčija), ki smo jo dodali gojišču po Kundratu (Test agar acc. to Kundrat, 1.10662, Merck, Nemčija) ter metodo s testno bakterijo *Bacillus subtilis* BGA (DSM 618, 1.10649, Merck, Nemčija), ki smo jo dodali gojišču po navodilih proizvajalca (Test agar pH 7.2 for the inhibitor test, 1.15787, Merck, Nemčija) (32). Papirnate diske smo pomakali v raztopine antibiotikov in položili na površino gojišča. Po inkubaciji pri temperaturi 64 °C/ 3 ure (metoda po Kundratu), oziroma pri temperaturi 30 °C/ 18-24 ur (metoda z bakterijo *B. subtilis*), smo merili premere inhibicijskih con okrog diskov. Rezultat je bil pozitiven, če je bil premer inhibicijske cone okrog diska 10 mm ali več (31 – 32).

Receptorsko metodo Beta star (Chr. Hansen, Danska) za ugotavljanje prisotnosti β – laktamskih antibiotikov smo izvajali po navodilih proizvajalca (33).

## REZULTATI

V tabeli 1 so predstavljeni rezultati občutljivosti preskušanih koncentracij antibiotikov z mikrobiološkimi difuzijskimi metodami Delvotest SP-NT in testom BR, metodami difuzije z diski po Kundratu in s testno bakterijo *B. subtilis*. Te metode so občutljive za širši spekter antibiotikov in sulfonamidov. Receptorski test Beta star je občutljiv samo za β-laktamske antibiotike.

Tabela 1. Rezultati občutljivosti uporabljenih metod pri ugotavljanju prisotnosti različnih koncentracij antibiotikov

Antibiotik	Koncentracija (µg/l)	Delvotest SP-NT	BRT <sup>(2)</sup>	Diski Kundrať v mm <sup>(3)</sup>	Diski <i>B. subtilis</i> v mm <sup>(3)</sup>	Beta Star
Benzil penicilin G	2,5	+	+	6	6	-
	25	+	+	37	6	+
	250	+	+	40	6	+
	2,5 (K) <sup>(1)</sup>	+	+	6	6	±
	25 (K)	+	+	6	6	+
	Disk P10 IE	/	/	38	36	/
Ampicilin	2,5	+	+	6	6	-
	16	+	+	6	6	+
	25	+	+	34	6	+
	250	+	+	16	6	+
	2,5 (K)	+	+	6	6	±
	25 (K)	+	+	12	6	+
Kloksacilin	1	-	+	6	6	-
	10	-	+	6	6	±
	20	-	+	6	6	+
	40	-	+	6	6	+
	10 (K)	±	+	6	6	±
	20 (K)	±	+	6	6	+
	Disk CX 1 µg	/	/	15	6	/
Cefpirom	3	+	+	6	6	+
	30	±	+	6	6	+
	300	+	+	8	6	+
	3 (K)	-	+	6	6	+
		Disk CPO 30 µg	/	/	30	42
Eritromicin	75	-	+	6	6	-
	150	+	+	16	6	-
	300	+	+	16	6	-
	75 (K)	+	+	6	6	-
	150 (K)	-	+	6	12	-
		Disk E 15 µg	/	/	24	38
Pefloksacin	50	-	+	6	6	-
	500	±	+	6	6	-
	50 (K)	±	+	6	6	-
		Disk PEF 5 µg	/	/	16	24
Kloramfenikol	2500		+	6	6	-
	5000	±	+	6	6	-
	2500 (K)	+	+	6	6	-
	5000 (K)	+	+	6	6	-
Destilirana voda		-	+	6	6	-
Kontrolni diski	GM 10µg/disk	/	/	24	32	/
	S 10µg/disk	/	/	18	29	/

Legenda:

<sup>(1)</sup>(K): koncentracija, dobljena po koncentriranju raztopine antibiotika; <sup>(2)</sup>BRT: Brilliant Black Redution Test

<sup>(3)</sup>v mm: premer inhibicijske cone okrog 6 mm diskov z antibiotiki;

+: pozitiven rezultat: koncentracija antibiotika v vzorcu je višja od mejne vrednosti občutljivosti uporabljene metode; ±: koncentracija antibiotika v vzorcu je na meji občutljivosti uporabljene metode;

-: negativen rezultat: antibiotika v vzorcu ni ali je njegova koncentracija v vzorcu nižja od mejne vrednosti občutljivosti uporabljene metode.



Najbolj občutljiva metoda za vse preskušene antibiotike je bil Delvotest SP-NT. Najnižje koncentracije antibiotikov, ki smo jih zaznali z metodo Delvotest SP-NT so bile 2,5 µg/l penicilina in ampicilina, nad 40 µg/l kloksacilina, 3 µg/l cefpiroma, 150 µg/l eritromicina, 500 µg/l pefloksacina in 5000 µg/l kloramfenikola. Zanimivo je, da približno 10 x koncentriranje raztopine eritromicina 150 µg/l pri Delvotestu ni pokazalo pozitivne reakcije.

Pri testu BR v epruvtkah ni prišlo do spremembe barve, kar bi lahko ovrednotili kot pozitiven rezultat pri vseh preskušeni raztopinah antibiotikov. Vendar se sprememba barve ni pojavila niti pri negativni kontroli z destilirano vodo, ne glede na to ali smo predhodno v epruvtke z gojiščem in testno bakterijo dodali hranljivi bujon ali ne.

Z metodo po Kundratu smo zaznali penicilin in ampicilin v koncentracijah 25 µg/l in več, cefpirom v koncentracijah 300 µg/l in več, eritromicin pa v koncentraciji 150 µg/l, vendar ne pri 300 µg/l. Pri testiranju raztopin kloksacilina, pefloksacina in kloramfenikola nismo dobili pozitivne reakcije pri nobeni koncentraciji, razen pri standardiziranih diskih z znatno višjo koncentracijo antibiotika. Pri difuzijski metodi z diski z bakterijo *Bacillus subtilis* smo le pri teh diskih dobili pozitiven rezultat, pri testnih raztopinah ni bilo reakcije.

Penicilin smo z metodo Beta star zaznali v koncentraciji 25 µg/l ter tudi v koncentrirani raztopini s koncentracijo 2,5 µg/l. Predpostavljamo lahko, da so mejne vrednosti občutljivosti te metode za vodo malo pod 25 µg/l, saj smo tudi pri ampicilinu opazili pozitiven rezultat že pri testni raztopini s koncentracijo 16 µg/l. Kloksacilin smo s to metodo zaznali pri 10 µg/l, cefpirom pa že pri 3 µg/l. Metoda Beta star je občutljiva samo za β-laktamske antibiotike, zato z njo eritromicina, pefloksacina in kloramfenikola v vzorcih nismo ugotavljali (Tabela 1).

## RAZPRAVA

V tabeli 2 so prikazane minimalne meje občutljivosti metod Delvotest SP-NT, BRT, difuzijske metode z diski po Kundratu, metode z bakterijo *Bacillus subtilis* in Beta star pri preskušanju vzorcev mleka ter najvišje dovoljene vrednosti ostankov antibiotikov (MRL) v kravjem mleku, ki so podane v literaturi in standardih. Metode so občutljive zlasti na nizke koncentracije β-laktamskih antibiotikov, to je penicilinov in cefalosporinov zato, ker se še vedno najpogosteje uporabljajo pri zdravljenju v humani in veterinarski medicini. Mejne vrednosti občutljivosti omenjenih metod predvsem za β-laktamske antibiotike so podobne koncentracijam, ki jih predpisujejo mednarodni standardi kot najvišje dovoljene vrednosti MRL (27). Te mejne vrednosti veljajo ob preiskavi vzorcev mleka in nekaterih drugih živil. Najvišjih dovoljenih mejnih vrednosti ostankov antibiotikov v vodi še ni predpisanih. Teoretično bi lahko predpostavljali, da bi te koncentracije smele biti enake ali še nižje vrednostim, ki veljajo za mleko.

Če primerjamo mejne vrednosti občutljivosti posameznih metod z našimi rezultati ugotovimo, da je bila metoda po Kundratu za ampicilin in kloksacilin v vodi manj občutljiva in neobčutljiva za kloramfenikol. Minimalna meja občutljivosti za ampicilin v mleku je 5 µg/l in za kloksacilin 35 µg/l (40, tabela 2), v našem poskusu pa smo premere inhibicijskih con dobili šele pri koncentraciji ampicilina 25 µg/l in koncentraciji kloksacilina nad 40 µg/l. Tudi z difuzijsko metodo z diski s testno bakterijo *B. subtilis* smo

Tabela 2. Minimalne meje občutljivosti metod Delvotest SP-NT, BRT, difuzijske metode z diski po Kundratu (*Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*), metode z bakterijo *Bacillus subtilis*, Beta star in najvišje dovoljene vrednosti ostankov antibiotikov (MRL) v kravjem mleku (v ppb – parts per billion ali v µg/l)

Antibiotik	Delvotest kontrolni čas <sup>(1)</sup>	Delvotest 3 ure <sup>(1)</sup>	BRT <sup>(2)</sup>	Diski Kundrat <sup>(3)</sup>	Diski <i>B. subtilis</i> <sup>(3)</sup>	Beta Star <sup>(4)</sup>	MRL <sup>(5)</sup>
<b>Penicilini</b>							
Benzil-penicilin	2	2,5	2-3	6	18	3	4
Ampicilin	2-3	3,5	2-3	5	-	4	4
Amoksicilin	2	3-5	2-3	-	-	4	4
Nafcilin	5	5-10	10-15	11	-	14	30
Kloksacilin	15	15-25	20-30	35	-	6	30
Dikloksacilin	10	10-15	10-20	-	-	-	30
Oksacilin	5	10	10-20	-	-	-	30
<b>Cefalosporini</b>							
Cefapirin	5	5-10	5	-	-	12	60
Cefazolin	-	-	25	-	-	60	50
Cefoperazon	40	60-100	20-30	-	-	6	50
Cefalexin	40-60	60-100	300	-	-	>1000	100
Cefalonium	50-10	10-25	10	-	-	4	20
Cefquinom	5-10	10-25	-	-	-	10	20
Ceftiofur	<50	50-70	-	-	-	110	100
Cefuroksim	-	-	100-200	-	-	-	-
<b>Sulfonamidi</b>				100	100000	-	-
Sulfadiazin	25-50	100-150	500-750	-	-	-	100
Sulfametazin	25-100	100-250	500-750	-	-	-	100
Sulfatiazol	50	50-150	200-400	-	-	-	100
Sulfadimetoksin	25	50-150	500-750	-	-	-	100
<b>Tetraciklini</b>							
Tetraciklin	100	800	200-400	400	5000	-	100
Oksitetraciklin	100	800	500-750	-	-	-	100
Klortetraciklin	100-150	200-600	-	450	-	-	-
<b>Makrolidi</b>							
Tilozin	10-20	300-100	25-50	-	-	-	50
Spiramicin	200	350 in>	200-400	-	-	-	200
Eritromicin	200	350 in>	40-60	225	100	-	-
<b>Ostali</b>							
Kloramfenikol	2500	7500-10000	-	-	-	-	-
Trimetoprim	50	100-500	-	-	-	-	-
Dapson	1	1-8	-	-	-	-	-
<b>Aminoglikozidi</b>							
Gentamicin	100-300	200-500	200-300	-	-	-	200
Neomicin	100-200	300-2000	500-750	22000	-	-	1500
Streptomycin	300-500	1500-10000	1000	-	300	-	200
Kanamycin	2500	7500	-	28000	-	-	-
<b>Linkozamidi</b>							
Linkomicin	100	200-400	75-150	-	-	-	150

Legenda: <sup>(1)</sup> Delvotest SP-NT, kontrolni čas: meja občutljivosti metode, ko se negativna kontrola obarva rumeno; čas 3 ure: čas inkubacije, ki jo predpisuje proizvajalec (38); <sup>(2)</sup> BR-AIM test, navodila proizvajalca (39); <sup>(3)</sup> (40); <sup>(4)</sup> (28); <sup>(5)</sup> Maximal Residue Limits (največja dovoljena vrednost ostankov antibiotikov) za mleko (29).

zasledili nižje koncentracije eritromicina, na ostale testirane antibiotike pa ta metoda ni bila občutljiva. Občutljivost Delvotesta na penicilin in ampicilin je primerljiva s podatki za mleko v navodilih proizvajalca in tudi z najvišjimi dovoljenimi vrednostmi (MRL). Na kloksacilin je uporabljen testobčutljiv v višjih koncentracijah, kot je navedeno za mleko in za najvišje dovoljene vrednosti, nasprotno pa je občutljivejši na eritromicin, kot so navedene vrednosti za mleko. Tudi cefpirom smo s to metodo zaznali pri nižji koncentraciji, kot veljajo za cefalosporine najvišje dovoljene vrednosti in predvidena občutljivost za mleko. Kloramfenikol smo zaznali v podobni koncentraciji, ki je predpisana za mleko v navodilih proizvajalca (29, 38). Verjetno je občutljivost metod odvisna od vrste vzorca, saj nanjo lahko vplivajo tudi sestavine v njem (npr. maščobe, beljakovine, sladkorji, vrednosti pH, itd.).

Rezultati difuzijske metode po Kundratu in Delvotesta se zelo razlikujejo, čeprav se v obeh primerih uporablja enaka testna bakterija. Rezultati primerjave obeh metod pri analiziranju vzorcev mleka so namreč pokazali med njima statistično značilno ujemanje (41).

S testom BR nismo dobili zaželenih rezultatov, saj ni bilo reakcije pri nobeni izmed različnih koncentracij antibiotikov, niti pri negativnem vzorcu z destilirano vodo. V poskus smo ga vključili zato, ker sprememba barve indikatorja temelji na spremembi redoks potenciala in ne na spremembi vrednosti pH. Vrednosti pH pri vzorcih vode različnega izvora se namreč lahko razlikujejo glede na vsebnost raztopljenih soli predvsem, če skušamo vzorec še skoncentrirati. Pri testu BR in Delvotestu SP-NT smo dodali v gojišče 100 µl vzorca. Vendar je količina gojišča v epruvetkah pri testu BR manjša, kot pri Delvotestu. Žal tudi ob priporočenem dodajanju hranljivega bujona (24) nismo uspeli dobiti zadovoljivih rezultatov.

Penicilin in ampicilin smo z metodo Beta star zaznali v višjih koncentracijah, kot je predpisana za mleko in kot so vrednosti MRL, bila pa je občutljivejša za kloksacilin in cefpirom (28 – 29). Vendar je ta metoda uporabna samo za ugotavljanje β-laktamskih antibiotikov.

Za predstavnika druge generacije kinolonov pefloksacilin, ni navedenih najvišjih dovoljenih vrednosti v mleku. V testiranje smo ga vključili zato, ker kinoloni v vodnem okolju poleg makrolidov najdlje ostanejo v aktivni obliki (42). Najvišje dovoljene vrednosti predstavnikov kinolonov, kot so danofloxacin in sarafloxacin, so v tkivih od 80 do 400 µg/kg, vendar te koncentracije težko primerjamo z najvišjimi dovoljenimi koncentracijami v vodi (29). Njihove najvišje koncentracije v površinskih vodah so od 0,3 do 1,3 µg/l, medtem ko se povprečne koncentracije β-laktamskih antibiotikov gibljejo le okrog 0,25 µg/l, aminoglikozidov pa okrog 0,04 µg/l (42, 43). Feitosa-Felizzola in Chiron (44) poročata o koncentracijah klaritromicina in oksitetraciklina v rečnih vodah okrog 0,02 in 0,08 µg/l, sulfometoksazola pa do 0,1 µg/l. Avtorja nista zasledila razlik v koncentracijah med zimskimi in poletnimi vzorčenji. V odpadnih vodah iz bolnišnic so koncentracije antibiotikov celo od 0,01 do 14,5 µg/l, v čistilnih napravah se koncentracija poveča do 64 µg/l, vendar so antibiotiki prisotni tudi v izhodni vodi iz čistilne naprave v koncentracijah do 3,4 µg/l in v površinskih vodah do 2 µg/l. V izplakah iz bolnišnic in čistilnih napravah prevladujejo β-laktamski antibiotiki, kinoloni in sulfonamidi. V izhodnih vodah iz čistilnih naprav in v površinskih vodah pa še vedno ostajajo kinoloni in sulfonamidi, precej je tudi makrolidov (42). Če je bilo narejenih kar nekaj preverjanj površinskih voda in sedimentov, pa imamo zelo malo podatkov o prisotnosti ostankov

antibiotikov v pitnih vodah. Tudi podatki o razširjenosti ostankov zdravilnih učinkovin, zlasti antibiotikov, v vodnih okoljih v Sloveniji, so še zelo skopi (8).

Da bi s preskušeni presejalni metodami lahko zaznali tudi nižje koncentracije kemoterapevtikov v vodi, bomo morali v nadaljnjem eksperimentalnem delu poiskati ustrežnejše metode za koncentracijo vzorcev. Ker so nekateri antibiotiki občutljivi za visoke temperature (45, 46), za koncentracijo vzorcev evaporacija ne pride v poštev, preverjamo pa uporabnost liofilizacije.

## SKLEP

1. Za ugotavljanje prisotnosti ostankov antibiotikov v vodi bi po rezultatih naših poskusov lahko z določenimi prilagoditvami uporabili tudi nekatere presejalne mikrobiološke metode, ki jih uporabljajo v živilstvu.
2. Delvotest SP-NT je bil v našem poskusu najprimernejši, saj je bil občutljiv v koncentracijah, primerljivih z najvišjimi dovoljenimi vrednostmi antibiotikov v mleku. Občutljiv je bil tudi za širok spekter različnih skupin antibiotikov in sulfonamidov.
3. Za povečanje občutljivosti metod, s katerimi bi lahko zaznali tudi nižje koncentracije ostankov antibiotikov, bi morali najti drug in učinkovitejši postopek koncentriranja, ki ne bi vplival na občutljivost metode, aktivnost testne bakterije, spremembo pH in sestavo vzorcev vode.

## SEZNAM OKRAJŠAV:

KE/ml: angl.: CFU/ml: colony forming units per ml (število kolonijskih enot na ml vzorca);

MRL: angl.: Maximum Residue Limits (najvišje dovoljene vrednosti ostankov antibiotika), izražene v  $\mu\text{g/l}$ ,  $\mu\text{g/kg}$  ali ppb;

$\mu\text{g/l}$ : mikrogrami na liter;

FEDESA: angl.: European Federation of Animal Health (Evropska federacija za zdravje živali);

EU: Evropska unija;

$K_{ow}$ : porazdelitveni koeficient med oktanolom in vodo, ki je kemijski približek bioakumulacije, oz. biokoncentracije, če gre za prevzem spojina iz vode;

FAO: angl.: Food and Agriculture Organization (Organizacija za hrano in kmetijstvo);

WHO: angl.: World Health Organization (Svetovna zdravstvena organizacija);

Ppb: parts per billion (delci na milijardo); število masnih ali volumskih delov izbrane snovi v drugi snovi (v milijardinkah  $10^{-9}$ );

Ppm: parts per million (delci na milijon); število masnih ali volumskih delov izbrane snovi v drugi snovi (v milijoninkah,  $10^{-6}$ );

ATCC: angl.: American Type Culture Collection (Zbirka standardnih referenčnih mikroorganizmov in celičnih kultur);

EIA: angl.: enzyme immunoassay (encimsko imunski test);

ELISA: angl.: enzyme-linked immunosorbent assay (encimsko vezan imunski test);

FPIA: angl.: fluorescence-polarization immunoassay (imunski testi s fluorescenčno polarizacijo);

UPLC: angl.: Ultra-performance – liquid chromatography (visoko zmogljiva tekočinska kromatografija);

HPLC: angl.: High pressure – liquid chromatography (tekočinska kromatografijavisoke ločljivosti);

BRT: angl.: Brillant Black Reduction test (test z redukcijo briljantnega črnila).

## LITERATURA

1. Kümmerer, K (2003). Significance of antibiotics in the environment. *J Antimicrobial Chemotherapy* 52: 5 – 7.
2. Conboy MJ, Goss MJ (2001). Identification of an assemblage of indicator organisms to assess timing and source of bacterial contamination in groundwater. *Water, Air and Soil Pollution*, 129(1-4): 101 - 118.
3. Lalumera GM, Calamari D, Galli P, Castiglione S, Crosa G, Fanelli R (2004). Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* 54(5): 661 - 668.
4. Teuber M (1999). Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 56: 755 - 763.
5. Huang C-H, Renew JE, Smeby KL, Pinkston K, Sedlak DL (2002). Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. [http://www.ucowr.siu.edu/updates/pdf/V120\\_A4.pdf](http://www.ucowr.siu.edu/updates/pdf/V120_A4.pdf), <03.08.2009>.
6. Hirsch R, Ternes T, Haberer K, Kratz K-L (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Science Total Environment* 225 (1-2): 109 - 118.
7. Hartmann A, Alder AC, Koller T, Widmer RM (1998). Identification of antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. *Environmental Toxicology Chemistry* 17: 377-382.
8. Heath E., Kosjek T (2007). Ostanki zdravilnih učinkovin v okolju. V: Raspor P, Kuščer E (Ur.). *Pomen biotehnologije in mikrobiologije za prihodnost, Voda*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Ljubljana: 158 - 168.
9. Kemper N (2007). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators* 8(1): 1 - 13.
10. Holten-Lutzhof HC, Halling-Sorensen B, Jorgensen SE (1999). Algal toxicity of antibacterial agents applied in Danish fish farming. *Archives Environmental Contamination Toxicology* 36 (1): 1 - 6.
11. Wollenberger L, Halling-Sorensen B, Kusk KO (2000). Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. *Chemosphere* 40(7): 723 – 730.
12. Tsen HY, Kg Y, Wang KC, Wanf SJ, Chang MY, Lin LY (1998). Comparison of the enterotoxigenic types, toxic shock syndrome toxin 1 (TSST-1) strains and antibiotic susceptibilities for enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains isolated from food and clinical samples. *J food Microbiol.* 15: 33 – 41.
13. Banerjee M, Sarkar PK (2004). Antibiotic resistance and susceptibility to some food preservative measures of spoilage and pathogenic micro-organisms from spices. *Food Microbiology* 21(3): 335 - 342.
14. Roveta S, Schito AM, Marchese A, Schito GC (2005). Microbiological rationale for the utilisation of prulofloxacin, a new fluoroquinolone, in the eradication of serious infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Internat J Antimicrobial Agents* 26: 366-372.

15. Kantiani L, Farré M, Barceló D (2009). Analytical methodologies for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and feed samples. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (6): 729-744.
16. Mathur S, Singh R (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Internat J Food Microbiol* 105(3): 281 - 295.
17. Wegener H (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion Microbiol* 5: 439 - 445.
18. Water Framework Directive of the European Union (2000) 2000/60/EC, European Union, Brussels.
19. Jensen LB, Baloda S, Boye M (2001). Antimicrobial resistance among *Pseudomonas* spp. and the *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environmental International* 26: 581 - 587.
20. Göttlich E, Lubbe W, Lange B, Fiedler S, Melchert I, Reifenrath M, Flemming H-C, Hoog S (2002). Fungal flora in groundwater-derived public drinking water. *Int J Hygiene Environ Health* 205(4): 269 - 279.
21. Kiessling CR, Cutting JH, Loftis M, Kiessling WM, Datta AR, Sofos JN (2002). Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999-2000. *J Food Prot* 65: 603 - 608.
22. Sörum H, Lund TM (2002). Antibiotic resistance in food related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol* 78 (1-2): 43 - 56.
23. Dubouix A, Bonnet E., Alvarez M (2005). *Bacillus cereus* infections in traumatology. In: Edberg SC et al (Eds): *Symposium Series Society Appl. Bacteriol.*, 2000(29): 106S-116S.
24. Smith AJ, Balaam JL, Ward A (2007). The development of a rapid screening technique to measure antibiotic activity in effluents and surface water samples. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1940 – 1946.
25. Maximum residue limits for veterinary drugs in foods (2008). Codex Alimentarius Commission, 31<sup>th</sup> Session of the CAC/MRL 02-2008: 1 – 32, [http://www.codexalimentarius.net/download/standards/45/MRL\\_e.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/standards/45/MRL_e.pdf), <31.07.2009>
26. Methods of Analysis for Veterinary Drug Residues (2007). Codex Alimentarius Commission, Food and agriculture organization of the United Nations, CL 2007/04-RVDF, Annex 1: 1 – 33, [ftp://ftp.fao.org/Codex/Circular Letters/CxCL2007/cl07\\_04e.pdf](ftp://ftp.fao.org/Codex/Circular_Letters/CxCL2007/cl07_04e.pdf), <31.07.2009>
27. Maximum Residue Limits in Food and Animal Feedstuffs: Preface, explanatory notes and definitions (2009). Australian Government, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, July 2009: 1 – 6, <http://www.apvma.gov.au/residues/mrl.shtml>, <28.07.2009>.
28. Reybroeck W (1995). Evaluation of screening tests for the detection of antimicrobial residues in milk – Residues of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. *Proceedings, International Dairy Federation, Kiel, Germany, 28 – 31. avgust, 182 - 186.*
29. Mitchell JM, Griffiths MW, McEwen SA, McNab WB, Yee AJ (1998). Antimicrobial drug residues in milk and meat: Causes, concerns, prevalence, regulations, tests and test performance. *J Food Prot* 61 (6): 742 - 756.

30. Navrátilová P (2008). Screening methods for the detection of veterinary drug residues in raw cow milk – a review. *Czech J Food Sci* 26(6): 393 – 401.
31. Kundrat W (1972). 45-minuten-Schnellmethode zum mikrobiologischen Nachweis von Hemmstoffen in tierischen Produkten. *Fleischwirtschaft* 52: 485 - 487.
32. Merck Microbiology Manual, 12. <sup>th</sup> edition (2007), 233 – 235, 459 – 460.
33. Beta Star US (2006). Dairy Analysis for  $\beta$ -lactam antibiotics, navodila proizvajalca Neogen, 8 – 2006: 90 – 90,  
[http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/Page\\_90.pdf](http://www.neogen.com/FoodSafety/pdf/ProdInfo/Page_90.pdf), <31.07.2009>
34. Roeder AM, Roeder M (2000). Antibiotics in foods of animal origin. In: Francis F (Ed): *Encyclopedia of Food Science and Technology*, vol. 1, 2. <sup>nd</sup> edition, John Wiley and Sons Inc. New York: 54 – 63.
35. Grubelnik A, Padeste C, Tiefenauer L (2001). Highly sensitive enzyme immunoassay for the detection of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Food Agricult Immunol*, 13 (3):161 - 169.
36. Conley JM, Symes SJ, Kindelberger SA, Richards SM (2008). Rapid liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water. *J of chromatography A*, 1185: 206 – 215.
37. Grujić S, Vasiljević T, Laušević M (2009). Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J Chromatography A*, 1216: 4989 – 5000.
38. Delvotest SP-NT, Technical bulletin,  
[www.dsm.com/le/en\\_US/delvotest/html/home.htm](http://www.dsm.com/le/en_US/delvotest/html/home.htm), <31.07.2009>
39. BRT-AIM test (2009). Navodila proizvajalca,  
[http://www.aimbavaria.com/pdf/BRT\\_Background\\_Basic\\_information.pdf](http://www.aimbavaria.com/pdf/BRT_Background_Basic_information.pdf),  
<31.07.2009>
40. Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products (1991). Bulletin IDF No.: 258/1991, International Dairy Federation, Brussels, Belgija, 4 – 24, 48 – 61.
41. Godič Torkar K, Golc Teger S (2000). Comparison of the sensitivity of certain methods of detecting inhibitory substances in raw milk. 3rd Conference of Practical Application of European Legislation on Foodstuffs. Conference proceedings. Slovenian Chemical Society, Slovenian Microbiological association, FM&I-Dutch Foundation for Food and Micro Innovation, EC-JRC-IRMM Institute for Reference Materials and measurements, Bled, November, 16 – 17., 2000: 101 – 109.
42. Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Constanzo SD (2009). The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water. *Sci Total Environm* XX, članek v tisku, 13 strani.
43. Khalaf H, Salste L, Karlsson P, Ivarsson P, Jass J, Olsson P-E (2009). In vitro analysis of inflammatory responses following environmental exposure to pharmaceuticals and inland waters. *Science Total Environm* 407: 1452 – 1460.
44. Feitosa-Felizzola J, Chiron S (2009). Occurrence and distribution of selected antibiotics in a small Mediterranean stream (Arc River, Southern France). *J Hydrology*, (364): 50 – 57.
45. Rose MD (1997). The effect of cooking on veterinary drug residues in food. 8. Benzylpenicillin. *Analyst*, 122 (10): 1095 – 1099.
46. Moats WA (1988). Inactivation of antibiotics by heating in foods and other substrates – a review. *J Food Prot.*, 51 (6): 491 – 497.

