

## Įvairių veiksnių įtaka preparato su *Geobacillus stearothermophilus* sporomis kokybei

---

**Joana Šalomskienė**

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

**Dovilė Jurkšaitė**

*KTU Cheminės technologijos fakultetas, Radvilėnų pl. 19, LT-50270 Kaunas; dovjurk@one.lt*

**Renata Žvirdauskienė**

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

---

Ištirta galimybė pagerinti preparato *MaI-1* inhibitoriams piene nustatyti kokybę. Ištirtas medžiagų, skatinančių sporų išaugimą, poveikis terpės spalvos keitimuisi preparato inkubavimo su pieno mėginiu metu. Nustatyta, kad papildžius preparato *MaI-1* terpės sudėtį 1 % tirpau krakmolo (10 g/1000 ml terpės) ir vartojant šviežią, ką tik pagamintą *Geobacillus stearothermophilus* sporų suspensiją, jo spalvos intensyvumas po inkubavimo termostate pagerėjo. Modifikuotos sudėties preparato inkubavimo trukmė gali būti sutrumpinta nuo 4 h 15 min–5 h iki 3 h–3 h 15 min. Tokios trukmės pakako, kad nesant piene inhibitorių preparato terpės spalva pasikeistų į geltoną. Toliau buvo tiriama kitų veiksnių – išankstinio inkubavimo vieną valandą kambario temperatūroje, mėginio nupylimo nuo preparato terpės paviršiaus po tokio inkubavimo įtaka terpės spalvos keitimuisi preparato inkubavimo termostate metu. Nustatyta, kad išankstinė inkubacija teigiamos įtakos preparato spalvos keitimuisi inkubavimo metu neturėjo, be to, viena valanda pailgino analizės trukmę (iki 4,0–4,5 h). Mėginio nupylimo nuo preparato terpės paviršiaus po difuzijos kambario temperatūroje poveikis preparato spalvos keitimuisi inkubavimo metu taipogi neturėjo teigiamos įtakos preparato terpės spalvai, priešingai, nupylus mėginius nuo pagamintų preparatų, jie visi likdavo violetinės spalvos net ir po ilgesnio kaip 4 h inkubavimo termostate. Modifikuotos sudėties preparatas buvo jautrus tokiems antibiotikų kiekiams piene: 0,003 µg/ml penicilino, 0,004 µg/ml ampicilino, 0,03 µg/ml oksacilino, 0,1 µg/ml oksitetraciklino ir išlaikė tą jautrumą 3 mėn. (ilgiau nebuvo laikytas). Modifikuotos sudėties preparato *MaI-1* palyginimas su importiniu analogu *Delvotest-SP-NT* (DSM, Nyderlandai) tiriant pieno mėginius su inhibitoriais ir be jų parodė, kad tyrimų rezultatai sutapo 100 % atvejų.

**Raktažodžiai:** preparatas, *Geobacillus stearothermophilus*, sporos, tirpus krakmolas, šviežia suspensija, išankstinis inkubavimas, jautrumas, palyginimas, *Delvotest-SP-NT*.

### Įvadas

Inhibitoriams piene nustatyti dažnai taikomi mikrobiologiniai metodai, kurių jautrumas atitinka ES reikalavimus (ne daugiau 0,004 µg/ml penicilino) [1]. Mikrobiologiniuose metoduose naudojamos jautrios kultūros, dažniausiai sporinių bakterijų – *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* – ir kai kurių nesporinių, pvz. *Micrococcus luteus* [2, 3]. Šių metodų principas toks, kad naudojami preparatai, į kurių terpės sudėtį įeina jautrios kultūros sporos, agaras, maisto medžiagos ir pH indikatorius. Kambario temperatūroje sporos yra labai stabilios ir joms reikia maisto medžiagų bei šilumos, kad galėtų sudygti ir vystytis vegetatyvinėje formoje.

Ant agaro paviršiaus užpylus pieno mėginį, jis difunduoja į terpę kartu su visomis piene

ištirpusiomis medžiagomis. Termostatuojant preparatus su mėginiais optimalioje temperatūroje, jautrių bakterijų sporos sudygsta, suvartoja terpėje esantį cukrų ir kaip metabolitą išskiria rūgštį. Dėl to sumažėja terpės pH, ir indikatoriaus spalva pasikeičia iš violetinės į geltoną. Jeigu pieno mėginyje yra inhibitorių, jos stabdo vegetatyvinių ląstelių augimą ir terpės su indikatoriumi spalva nepakinta. *G. stearothermophilus* yra labai jautrios penicilinui (aptinkama 0,003 µg/kg), tačiau jos palyginti mažai jautrios aminoglikozidams (aptinkama 1,0–4,0 µg/kg). Todėl, jeigu yra streptomicino likučių, inhibitorių nebus rasta. Atvirkštinė situacija susidaro naudojant *B. subtilis*. Makrolidams abiejų kultūrų jautris panašus. Mikrobiologiniais metodais gali būti nustatyti ne tik

$\beta$ -laktamų grupės antibiotikai, bet ir tetraciklinai bei sulfonamidai. Skirtingiems inhibitoriams tirti naudojamos terpės su skirtingu pH [4, 5]. Metodo jautris priklauso nuo pasirinktos kultūros, jos kiekio terpėje, terpės sudėties, pH ir jos sluoksniu storio Petri lėkštelėje ar preparate.

Sukurta daug mikrobiologinių preparatų, į kurių sudėtį įeina *G. stearothermophilus* sporos. Tai *Delvotest* [6], *Copan Test* [7], *BRT Test* [8], *Premi-Test*, *EclipseTest* [9], *MiRa Test* [10], *LPT*<sup>1</sup>, *MaI-1*<sup>2</sup> ir kt. Šie preparatai pakankamai jautrūs, nebrangūs, patogūs vartoti. Lietuviški preparatai *LPT* (plokštelių tipo, 96 mėginiams) ir *MaI-1* (kiuvečių tipo) buvo sukurti kaip alternatyva importiniams, siekiant sumažinti importuojamų preparatų kainą ir pasiūlyti vietinės gamybos analogą.

Lietuviškas kiuvečių tipo preparatas *MaI-1* buvo sukurtas per palyginti trumpą laiką (vienesius metus) remiant Valstybiniam mokslo ir studijų fondui [11]. Keičiant preparatų parametrus, tai yra sporų koncentraciją, mitybos terpę, termostataavimo temperatūrą ir trukmę, pridedamo mėginio kiekį ir kt., galima suderinti spalvos pasikeitimą taip, kad būtų galima aptikti tam tikrą inhibitorinių medžiagų kiekį tiriamame pavyzdyje. Testui yra būdinga tam tikra šių medžiagų aptikimo riba (testo jautrumas). Jeigu pieno mėginyje nors vienos medžiagos koncentracija yra didesnė negu testo jautrumo riba, tokiu atveju yra stabdomas (inhibuojamas) *G. stearothermophilus* sporų išaugimas bei dauginimasis ir tuo pačiu nepakinta testo spalva, ji lieka violetinė. Nesant inhibitorinių medžiagų testo spalva pakinta į geltoną. Vartotojai pripratę prie ryškiai geltonos preparato spalvos po termostataavimo, todėl preparato *MaI-1*, kurio spalva pasikeisdavo į žalsvai geltoną, kokybę numatyta pagerinti. Be to, preparato vartojimo instrukcijoje buvo nurodyta inkubavimo trukmė 4,5 valandos.

Darbo tikslas – pagerinti preparato *MaI-1* su *G. stearothermophilus* sporomis kokybę, optimizuojant jo terpės sudėtį ir sutrumpinant analizės trukmę.

### Tyrimų objektai ir metodai

Darbas atliktas KTU Maisto instituto Mikrobiologijos laboratorijoje.

Tyrimo objektai – *G. stearothermophilus* B 469 kultūra, preparatas *MaI-1*.

*G. stearothermophilus* B 469 padermė gauta iš NIZO (Nyderlandai) mėgintuvėliuose ant nuožulniai sustanginto mitybos agaro. Tyrimams naudota sporų

suspensija ruošta pagal ĮST 1195612-99:2000<sup>3</sup>. Gauta kultūra kilpele perkelta į naują mėgintuvėlį ir inkubuota 18 h (63,5±0,5) °C temperatūroje aerobinėmis sąlygomis. Po inkubacijos į mėgintuvėlį su šviežia kultūra ant nuožulniai sustanginto agaro įpilta 5 ml fiziologinio tirpalo, kultūra suspenduota kilpele. Į Petri lėkštelę su sporuliacijos terpe įpilta 0,2 ml suspensijos pipete ir išskirstyta glaistikliu. Lėkštelės inkubuotos 18 h (63,5±0,5) °C temperatūroje. Gauta suspensija pasėta iš naujo, ir ši procedūra kartota dar kartą, kad kultūra augtų pakankamai gerai. Tada kultūra persėta į 5–10 Petri lėkštelių tam, kad būtų gauta pakankamai suspensijos, ir lėkštelės inkubuotos 72 h (63,5±0,5) °C temperatūroje. Po inkubavimo ant kiekvienos lėkštelės užpilta po 10 ml fiziologinio tirpalo, nuplautos išaugusios kolonijos ir surinkta visa gauta bakterinė medžiaga nuo visų užsėtų lėkštelių. Sporų suspensija du kartus centrifuguota nuo 2000 iki 3000 min<sup>-1</sup> greičiu, praplaunant fiziologiniu tirpalu. Gauta sporų suspensija kaitinta (80±1) °C vandens vonelėje 10 min ir atvėsinta.

Paruošta *G. stearothermophilus* sporų suspensija išpilstyta į kiuvetes po 1 ml ir laikyta minus 18 °C temperatūroje. Reikalingas tyrimams suspensijos kiekis atšildytas 20 °C temperatūros vandens vonelėje. Išaugusių sporų skaičius nustatytas lėkštelių metodu, sėjant į terpę bendram mikroorganizmų skaičiui nustatyti, į kurios sudėtį įeina mielių ekstraktas, gliukozė ir triptonas (pagal LST EN ISO 4833:2003<sup>4</sup>).

*G. stearothermophilus* sporų sudygimo stimuliavimo galimybei nustatyti panaudotos cheminės medžiagos. Mūsų ankstesniame darbe [12] nustatyta, kad sporų sudygimą skatino 1 % krakmolo, 1 % laktozės, 0,5–1 % sacharozės, 0,2 % DL-alanino ir L-alanino, 0,4 % KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ir 0,2 % K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (nuo terpės kiekio). Cheminių medžiagų tirpalai ruošti steriliame distiliuotame vandenyje 50–100 kartų didesnės koncentracijos už jų reikiamo dydžio koncentraciją terpėje, kad ši neprasiskiestų per daug (į terpę buvo pilama ne daugiau kaip 1–2 ml tirpalo). Tirpalai supilti į iki 50–55 °C temperatūros atvėsintą terpę po sterilizavimo.

Etaloniniai antibiotikų tirpalai ruošti: pirmieji skiediniai – steriliame vandenyje (išskyrus oksitetraciklino – fosfatiniame buferyje pH 4,5 ir eritromicino – 20 % etanolio tirpale), pora paskutiniųjų skiedinių – nugriebtame piene,

<sup>1</sup> ĮST 3381629-01:2000 *Preparatas LPT inhibitoriams piene nustatyti. Bendrieji reikalavimai.*

<sup>2</sup> ĮST 1195612-102:2001 *Preparatas MaI-1 inhibitoriams piene nustatyti. Bendrieji reikalavimai.*

<sup>3</sup> ĮST 1195612-99:2000 *Bacillus stearothermophilus varietas calidolactis sporų suspensija. Bendrieji reikalavimai.*

<sup>4</sup> LST EN ISO 4833:2003 *Maisto ir pašarų mikrobiologija. Bendrasis metodas. Kolonijų skaičiavimo 30 °C temperatūroje metodas (ISO 4833:2003).*

pagamintame iš pieno miltelių (be inhibitorių) (Merck firmos, kat. Nr. 1.15363). *Delvotest-SP-NT* (DSM, Nyderlandai) vartotas pagal firmos-gamintojos instrukciją [13]. Tyrimų kartotinumumas – 5.

### Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

2001 m. KTU Maisto institute paruoštas IST 1195612-102:2001 „Preparatas *Mal-1* inhibitoriams piene nustatyti. Bendrieji reikalavimai ir Technologijos instrukcija“. *Mal-1* – bespalvės netoksiškos polimerinės medžiagos kiuvetės, į kurias po 300 µl išpilstyta ir sustanginta standi violetinės spalvos mitybos terpė su jautrios antibiotikams ir sulfamidams kultūros *G. stearothermophilus* sporomis. Kiuvetės uždamos dangteliais. Kadangi preparato terpės spalva po inkubavimo su pienu nebuvo pakankamo intensyvumo ir analizės trukmė buvo ilgesnė už geriausių užsienio analogų apie 1 h, buvo pabandyta pagerinti preparato kokybę, papildant terpės sudėtį sporų augimo stimulatoriais.

Nustačius *G. stearothermophilus* sporų išaugimą stimuliuojančias medžiagas bei jų koncentraciją [12], buvo bandyta jomis papildyti preparato *Mal-1* terpės sudėtį ir ištirti jų poveikį preparato spalvinei reakcijai po inkubavimo. Pastebėta, kad kai terpės pH 8,0, preparato spalva liko nepakitusi, todėl kiti visi preparatai gaminti nustačius terpės pH 7,0. Tyrimo rezultatai pateikti 1 lentelėje.

Tyrimų rezultatai parodė, kad 1 % tirpus krakmolo, 1 % sacharozės, 0,03 % NaNO<sub>2</sub>, 0,05 % L-alanino bei 0,02 % Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> turėjo teigiamos įtakos preparato spalvinei reakcijai, nes po inkubavimo su šiais priedais preparatų spalva buvo geltona. Kiti priedai teigiamos įtakos rezultatų vertinimui neturėjo.

Kadangi vienas iš darbo uždavinių buvo sutrumpinti analizės trukmę, į preparato terpės sudėtį buvo bandyta įtraukti po kelias sporų išaugimą stimuliuojančias medžiagas tikintis, kad sporų išaugimas preparato agarizuotoje terpėje bus greitesnis. Tyrimų rezultatai pateikti 2 lentelėje.

Nustatyta, kad preparato terpės sudėtį papildžius keliomis sporų išaugimą stimuliuojančiomis medžiagomis, preparato inkubavimo trukmė nesutrumpėjo. 1 % sacharozės, 0,2 % DL-alanino ir 0,02 % Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> priedų dėka buvo galima sutrumpinti inkubavimo trukmę viena valanda, nes po 4 h inkubavimo terpės spalva buvo šviesiai geltona. Inkubuojant 5 h, terpės spalvos intensyvumas nepadidėjo. Pastebėta, kad terpės sudėtį papildžius 1 % sacharozės ir 1 % gliukozės, terpės spalva buvo ryškiai geltonos spalvos (2 lentelė), o su 0,1 % tirpus krakmolo priedu preparato analizės trukmė nesutrumpėjo. Todėl tolimesni tyrimai buvo atlikti koreguojant tirpus krakmolo ir indikatorius

bromkrezolio purpurinio koncentracijas bei papildant terpės sudėtį kitomis sporų išauginimą stimuliuojančiomis medžiagomis. Tyrimo rezultatai pateikti 3 lentelėje.

Atlikus tyrimus pastebėta, kad preparato terpės sudėtį papildžius 1 % krakmolo priedu bei sumažinus bromkrezolio purpurinio koncentraciją nuo 2,5 mg/ml iki 0,6–1,5 mg/ml, preparato inkubavimo termostate trukmė sutrumpėjo iki 3 h. Tačiau tokių preparatų terpės spalva buvo šviesiai geltonos spalvos (į žalsvumą), kuri nėra tinkama nustatant inhibitorius. Preparatus su 1 % krakmolo ir mažesne bromkrezolio koncentracija inkubuojant ilgiau, terpės spalva nekito – ji išliko šviesiai geltonos spalvos. Tuo tarpu agarizuotą preparato terpę papildžius 1,25 % ar 1,75 % tirpus krakmolo ir atitinkamai padidinus bromkrezolio koncentraciją iki 3,75 mg/ml, preparato spalva buvo tinkamo intensyvumo, t. y., ryškiai geltonos spalvos, bet rezultatų vertinimo laikas jau ilgesnis – 4,5 valandos. Preparato terpę papildžius ne tik krakmolo, bet ir gliukozės ar sacharozės priedais, jie teigiamos įtakos preparato spalvinei reakcijai neturėjo.

Ištyrus įvairių medžiagų įtaką preparato terpės spalvinei reakcijai buvo nustatyta, kad intensyviausia geltona spalva po preparato inkubavimo buvo gauta, papildžius preparato terpę 1,25 % tirpus krakmolo, kai bromkrezolio koncentracija 2,5 µg/ml arba 1 % tirpus krakmolo, kai bromkrezolio koncentracija 3,75 µg/ml, inkubuojant preparatą 4,5 h (63±0,5) °C temperatūroje. Modifikuojant preparato gamybą buvo tikimasi dar labiau sutrumpinti analizės trukmę.

Visų pirma buvo bandyta sumažinti sporų suspensijos gamybos temperatūrą nuo (63,5±0,5) °C iki 55 °C. Pagaminus sporų suspensiją, kurios koncentracija 7,9×10<sup>6</sup> KSV esant 55 °C temperatūrai, ji supilta į preparato terpę su kitais papildomais priedais, kurie parinkti pagal trumpiausią preparato inkubavimo laiką bei tinkamą terpės spalvą. Tyrimo rezultatai pateikti 4 lentelėje. Remiantis literatūros duomenimis [14], gaminantis sporoms aukštesnėje temperatūroje jų atsparumas karščiui būna padidėjęs. Žemesnėje temperatūroje susidariusios sporos turėtų būti mažiau atsparios aukštesnei temperatūrai ir greičiau sudygti. To priežastis yra ta, kad sporų, susidariusių žemesnėje temperatūroje, šerdyse būna daugiau vandens, nes jos nespėja visiškai dehidratuotis, todėl aukštesnėje temperatūroje sporos turėtų sudygti greičiau, kadangi veikiant aukštesnei temperatūrai sporų šerdyse esantis vanduo skatina fermentų denatūraciją, priešingai negu šerdyse esant mažesniame vandens kiekiui. Tačiau atlikus tyrimus nustatyta, kad sporos, susidariusios 55 °C temperatūroje, greičiau nesudygsta. Tam galėjo turėti įtakos preparato *Mal-1* terpėje esančios medžiagos

(bromkrezolio purpurinis, trimetoprimas), kurios gali slopinti sporų sudygimą.

Sumaišius sudygusias sporas su metaboliškai neaktyviomis, pastarosios sudygsta greičiau [14]. Modifikuojant preparato *Mal-1* gamybą, buvo

pabandyta į preparato agarą terpę įterpti ne atšildytą, o šviežią sporų suspensiją. Tyrimo rezultatai pateikti 5 lentelėje.

**1 lentelė.** Papildytos preparato terpės sudėties įtaka jo spalvinei reakcijai po inkubavimo su pieno mėginiu

Nr.	Terpės priedas		Preparato spalva po inkubavimo 5 h (63,5 ± 0,5) °C (terpės pH 7,0)
	Pavadinimas	Koncentracija	
1.	Tirpus krakmolas	1 %	Šviesiai geltona
2.	Laktozė	1 %	Violetinė
3.	Sacharozė	1 %	Geltona
4.	DL-alaninas	0,2 %	Šviesiai violetinė
5.	L-alaninas	0,05 %	Geltona
6.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,4 %	Violetinė
7.	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 %	Violetinė
8.	NaNO <sub>2</sub>	0,03 %	Šviesiai geltona
9.	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,02 %	Geltona
10.	CoCl <sub>2</sub>	0,05 %	Violetinė
11.	Adenozinas	0,01 M	Šviesiai violetinė
12.	Lizocimas	5 µg/ml	Violetinė

**2 lentelė.** Papildytos preparato terpės sudėties (įtraukiant iškart po kelias sporų sudygimą stimuliuojančias medžiagas) įtaka jo spalvinei reakcijai po inkubavimo

Nr.	Terpės priedas		Spalva	Preparato inkubavimo trukmė, h
	Pavadinimas	Koncentracija		
1.	Sacharozė gliukozė	1,0 % 1,0 %	Geltona	5
2.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,01 % 0,02 %	Šviesiai violetinė	5
3.	Sacharozė DL-alaninas Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 % 0,2 % 0,02 %	Šviesiai geltona	4
4.	Sacharozė L-alaninas Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 % 0,02 % 0,02 %	Žaliai geltona	5
5.	L-alaninas lizocimas	0,02 % 5 µg/ml	Violetinė	5
6.	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,4 % 0,2 %	Violetinė	5
7.	NaHCO <sub>3</sub> sacharozė	0,05 % 1,0 %	Violetinė	5
8.	Sacharozė laktozė	1,0 % 1,0 %	Violetinė	5
9.	MnSO <sub>4</sub> tirpus krakmolas gliukozė	0,005 % 0,1 % 1,0 %	Žaliai geltona	5

**3 lentelė.** Preparato terpės sudėties įtaka jo spalvinei reakcijai po inkubavimo, naudojant tirpų krakmolą

Nr.	Terpės priedas		Bromkrezolio koncentracija, µg/ml	Spalva	Inkubavimo laikas, h	Terpės pH
	Pavadinimas	Koncentracija, proc.				
1.	Tirpus krakmolą	1,0	2,5	Šviesiai violetinė	5	7,0
2.	Tirpus krakmolą	1,0	0,6	Šviesiai geltona	3	7,0
3.	Tirpus krakmolą	1,0	0,5	Šviesiai geltona	3	7,0
4.	Tirpus krakmolą	1,0	0,75	Violetinė	5	7,0
5.	Tirpus krakmolą Gliukozė	1,0 1,0	0,6	Violetinė	5	7,0
6.	Tirpus krakmolą Gliukozė	1,0 1,0	0,4	Violetinė	5	7,0
7.	Tirpus krakmolą Gliukozė	1,0 0,1	0,6	Šviesiai geltona	3	7,0
8.	Tirpus krakmolą Gliukozė	1,0 0,1	1,2	Šviesiai geltona	3	7,0
9.	Tirpus krakmolą	0,1	0,6	Šviesiai geltona	3	7,0
10.	Tirpus krakmolą	0,1	1,2	Šviesiai geltona	3	7,0
11.	Tirpus krakmolą	0,5	1,5	Šviesiai geltona	3,5	7,0
12.	Tirpus krakmolą L-alaninas	0,25 0,05	1,5	Žaliai geltona	5	7,0
13.	Tirpus krakmolą Sacharozė	1,0 1,0	1,5	Šviesiai geltona	3,5	7,0
14.	Tirpus krakmolą	0,5	2,25	Žalsva	5	7,0
15.	Tirpus krakmolą L-alaninas	0,25 0,5	1,5	Žaliai geltona	5	7,0
16.	Tirpus krakmolą	1,25	2,5	Geltona	4,5	7,0
17.	Tirpus krakmolą	1,0	3,75	Geltona	4,5	7,0
18.	Tirpus krakmolą	1,75	2,5	Geltona	4	7,0
19.	Tirpus krakmolą	1,75	3,75	Geltona	4	7,0
20.	Tirpus krakmolą	0,1	2,5	Violetinė	5	8,0
21.	Tirpus krakmolą Gliukozė	1,0 0,1	2,5	Violetinė	5	7,5
22.	Tirpus krakmolą Sacharozė	1,0 0,1	2,5	Violetinė	5	7,5

**4 lentelė.** Preparato terpės sudėties įtaka jo spalvinei reakcijai po inkubavimo, naudojant 55 °C temperatūroje pagamintą sporų suspensiją

Nr.	Terpės priedas		Preparato spalva po inkubavimo 5 h (63±0,5) °C	
	Pavadinimas	Koncentracija	Terpės pH	
			7	8
1.	Kontrolė (su įprasta sporų suspensija)	–	Žaliai geltona	Violetinė
2.	Sacharozė	1 %	Žaliai violetinė	Violetinė
3.	Sacharozė DL-alaninas Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1 % 0,2 % 0,02 %	Žaliai geltona	Violetinė
4.	Lizocimas	5 µg/ml	Violetinė	Violetinė
5.	Tirpus krakmolą	1,25 %	Geltona	Žaliai geltona

**5 lentelė.** Preparato terpės sudėties įtaka jo spalvinei reakcijai po inkubavimo, naudojant šviežią sporų suspensiją

Nr.	Terpės priedas		Preparato spalva	Terpės pH	Inkubavimo trukmė, h
	Pavadinimas	Koncentracija, proc.			
1.	Kontrolė	–	Geltona	7	5
			Geltona	8	6
2.	Sacharozė gliukozė	1,0 0,1	Geltona	7	4
			Geltona	8	5
3.	Tirpus krakmolas	1,0	Geltona	7,0	3,0
			Geltona	7,5	3,5
4.	Tirpus krakmolas	1,25	Geltona	7,0	3,0
			Geltona	7,5	3,5
5.	Sacharozė	1,0	Geltona	7,0	4,0
			Geltona	8	5,0
6.	Gliukozė	0,1	Geltona	7	4,0
			Geltona	8	5,0

Tyrimų rezultatai parodė, kad naudojant šviežią sporų suspensiją, preparato spalva būna ryškios geltonos spalvos. Papildžius terpę priedais, lyginant su kontroliniu preparatu sutrumpėjo analizės trukmė. Papildžius preparato sudėtį 1 % arba 1,25 % tirpaus krakmolo, preparato spalva iš violetinės į geltoną pasikeitė po 3,0 h inkubacijos termostate, kai terpės pH 7,0.

Inkubuojant preparatą, pagamintą su šviežia sporų suspensija ir tirpiu krakmolu, sporos sudygo greičiau, nes tik ką pagamintos sporos yra jautresnės, jų žievė lengviau suyra ir, paveikus jas šiluma, greičiau vyksta metabolinės reakcijos. Gali būti, kad tirpų krakmolą *G. stearothermophilus* ląstelės naudojo kaip anglies šaltinį, kuris skatino ląstelių diferenciaciją ir rūgšties gamybą, todėl preparato terpės spalva pasikeitė jau po 3 h (nesant mėginyje inhibitorių). Papildžius *Mal-1* kontrolinio preparato terpės sudėtį 1 % tirpaus krakmolo ir naudojant šviežią sporų suspensiją, buvo optimizuota preparato terpės sudėtis.

Atliekant antibakterinių medžiagų likučių tyrimus mikrobiologiniais metodais, kai kurie

autoriai rekomenduoja iš anksto preparatus su tiriamaisiais mėginiais išlaikyti kambario temperatūroje prieš inkubavimą termostate. Išankstinis laikymas reikalingas tam, kad antibakterinė medžiaga difunduotų į terpę greičiau, negu spėja pradėti augti jautri bakterijų kultūra. Tačiau taikant 1 h išankstinį laikymą kambario temperatūroje su pagamintais preparatais (tyrimas atliktas lygiagrečiai su visais gamintais preparatais), toks laikymas teigiamos įtakos preparato spalvos keitimuisi neturėjo (6 lentelė). 1 h kambario temperatūroje išlaikytų preparatų rezultatus buvo galima vertinti valanda vėliau negu preparatų be išankstinio laikymo.

Įvertintas ir mėginio nupylimo nuo preparato terpės paviršiaus po difuzijos 1 h kambario temperatūroje poveikis preparato spalvos keitimuisi inkubavimo metu. Tačiau tai neturėjo teigiamos įtakos terpės spalvai, priešingai, nupylus mėginius nuo pagamintų preparatų jie visi likdavo violetinės spalvos net ir po 5 h inkubavimo termostate (6 lentelė).

**6 lentelė.** Išankstinio laikymo kambario temperatūroje ir mėginio nupylimo nuo preparato paviršiaus įtaka terpės spalvai

Preparatas	Terpės spalva										
	netaikant išankstinio laikymo 1 h kambario temperatūroje				iš anksto laikant 1 h kambario temperatūroje			nupylus mėginį po 1 h išankstinio laikymo			
	po 3,5 h	po 4 h	po 5 h	po 6 h	po 4 h	po 5 h	po 6 h	po 3,5 h	po 4 h	po 5 h	po 6 h
<i>Mal-1</i> (kontrolė)	v*	v	šv <sup>2*</sup>	šv	v	šv	šv	v	v	v	v
<i>Mal-1</i> patikslintos sudėties	G <sup>3*</sup>	g	g	g	žg	g	g	g	g	g	g

\*– violetinė;

<sup>2\*</sup>– šviesiai violetinė;

<sup>3\*</sup>– žaliai geltona.

Modifikuotos gamybos preparatą su šviežia sporų suspensija ir 1 % tirpaus krakmolo inkubuojant 1 h kambario temperatūroje, o paskui inkubuojant termostate, geri rezultatai gauti po 5 h inkubavimo termostate – mėginys su pienu be inhibitorių pageltonavo. Tuo tarpu nupylus mėginį nuo preparato ir inkubuojant termostate, preparato spalva iš violetinės į geltoną pasikeitė jau po 3,5 h. Visa inkubavimo trukmė tokiu atveju – 4,5 h, t.y. per ilga.

Siekiant įvertinti modifikuotos sudėties preparato jautrumą inhibitoriams, buvo paruošti etaloniniai antibiotikų tirpalai piene be inhibitorių. Gauti rezultatai pateikti 7 lentelėje.

Nustatyta, kad esant mėginiuose inhibitorių, modifikuotos sudėties preparato spalva nepakito po 4 h inkubavimo termostate – ji liko violetinė, o tai reiškia, kad preparato gamybai naudota šviežia sporų suspensija yra jautri etaloninėms antibiotikų

koncentracijoms ir toks preparatas gali būti naudojamas tyrimams.

Ištirtas modifikuotos sudėties preparato jautrumas laikymo metu. Tyrimo rezultatai pateikti 8 lentelėje.

Nustatyta, kad modifikuotos sudėties preparatas buvo jautrus ES reikalavimus atitinkančioms antibiotikų koncentracijoms piene, tiriant kontrolinius mėginius po 3 h ar 3 h 15 min inkubavimo termostate ( $63 \pm 0,5$ ) °C preparato spalva pasikeisdavo į geltoną.

Modifikuotos sudėties preparatas palygintas su analogu – *Delvotest-SP-NT*. Ištirta 20 „teigiamų“ žalio pieno mėginių (su inhibitoriais), gautų iš pieno perdirbimo įmonių, atrinktų *Delvo-X-Press* metodu, ir 10 pieno mėginių iš prekybos tinklo. Tyrimų rezultatai pateikti 9 lentelėje.

**7 lentelė.** Modifikuoto preparato jautrumo antibiotikams nustatymas.

Mėginys	Preparato spalva po inkubavimo ( $63,5 \pm 0,5$ ) °C		
	po 3 h	po 3,5 h	po 4,0 h
Regeneruotas pienas be inhibitorių	geltona	geltona	geltona
Pienas su 0,003 µg/ml penicilino	violetinė	violetinė	violetinė
Pienas su 0,004 µg/ml ampicilino	violetinė	violetinė	violetinė
Pienas su 0,03 µg/ml oksacilino	violetinė	violetinė	violetinė
Pienas su 0,1 µg/ml oksitetraciklino	violetinė	violetinė	violetinė

**8 lentelė.** Modifikuotos sudėties preparato *Mal-1* laikymo trukmės įtaka jo jautrumui

Mėginys	2006-10-04 gaminto preparato tyrimo data							
	2006-10-04		2006-10-30		2006-12-11		2006-12-29	
	Preparato inkubavimo termostate trukmė							
	3 h	3 h 15 min	3 h	3 h 15 min	3 h	3 h 15 min	3 h	3 h 15 min
1 kontrolinis	g <sup>*</sup>	g	g	g	g	g	g	g
2 kontrolinis	ž <sup>2*</sup>	g	ž	g	ž	g	ž	g
Penicilinas 0,003 µg/ml	v <sup>3*</sup>	v	v	v	v	v	v	v
Ampicilinas 0,004 µg/ml	v	v	v	v	v	v	v	v
Oksacilinas 0,03 µg/ml	v	v	v	v	v	v	v	v
Oksitetraciklinas 0,1 µg/ml	v	v	v	v	v	v	v	v

\* – geltona;

<sup>2\*</sup> – žalia;

<sup>3\*</sup> – violetinė.

**9 lentelė.** Modifikuotos sudėties *MaI-1* palyginimo su *Delvotest-SP-NT* rezultatai

Nr.	Mėginys	<i>Delvotest-SP-NT</i>	Modifikuotos sudėties <i>MaI-1</i>
1.	Žalias pienas	Rasta inhibitorių	Rasta inhibitorių
2.	- „ -	- „ -	- „ -
3.	- „ -	- „ -	- „ -
4.	- „ -	- „ -	- „ -
5.	- „ -	- „ -	- „ -
6.	- „ -	- „ -	- „ -
7.	- „ -	- „ -	- „ -
8.	- „ -	- „ -	- „ -
9.	- „ -	- „ -	- „ -
10.	- „ -	- „ -	- „ -
11.	- „ -	- „ -	- „ -
12.	- „ -	- „ -	- „ -
13.	- „ -	- „ -	- „ -
14.	- „ -	- „ -	- „ -
15.	- „ -	- „ -	- „ -
16.	- „ -	- „ -	- „ -
17.	- „ -	- „ -	- „ -
18.	- „ -	- „ -	- „ -
19.	- „ -	- „ -	- „ -
20.	- „ -	- „ -	- „ -
21.	Pienas „Margė“ 1 l pak.	Nerasta inhibitorių	Nerasta inhibitorių
22.	- „ -	- „ -	- „ -
23.	- „ -	- „ -	- „ -
24.	- „ -	- „ -	- „ -
25.	- „ -	- „ -	- „ -
26.	- „ -	- „ -	- „ -
27.	- „ -	- „ -	- „ -
28.	- „ -	- „ -	- „ -
29.	- „ -	- „ -	- „ -
30.	- „ -	- „ -	- „ -

Modifikuotos sudėties preparato *MaI-1* palyginimas su importiniu analogu *Delvotest-SP-NT* (DSM, Nyderlandai), ištyrus 20 pieno mėginių su inhibitoriais ir 10 mėginių – be inhibitorių, parodė, kad tyrimų rezultatai sutapo 100 % atvejų.

#### Išvados

1. Nustatyta, kad papildžius preparato *MaI-1* terpės sudėtį 1 % tirpau krakmolo ir naudojant šviežią, ką tik pagamintą sporų suspensiją, jo spalvos intensyvumas po inkubavimo termostate pagerėjo.
2. Modifikuotos sudėties preparato *MaI-1* inkubavimo trukmė gali būti sutrumpinta iki 3 h–3 h 15 min. Tokios trukmės pakanka, kad nesant piene inhibitorių preparato terpės spalva pakistų į geltoną.

3. Išankstinis laikymas 1 h kambario temperatūroje ir po to mėginio nupylimas neturėjo teigiamos įtakos greitesniam preparato spalvos pasikeitimui nesant mėginyje inhibitorių, t. y. greitesniam rezultatų gavimui.
4. Modifikuotos sudėties preparatas buvo jautrus 0,003 µg/ml penicilino, 0,004 µg/ml ampicilino, 0,03 µg/ml oksacilino ir 0,1 µg/ml oksitetraciklino (atitiko ES reikalavimus), ir išlaikė tą jautrį 3 mėn. (ilgiau nebuvo laikytas).
5. Modifikuotos sudėties preparato *MaI-1* palyginimas su importiniu analogu *Delvotest-SP-NT* (DSM, Nyderlandai) tiriant pieno mėginius su inhibitoriais ir be jų parodė, kad tyrimų rezultatai sutapo 100 % atvejų.

#### Literatūra

1. 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 L 224, 18. 8. 1990. P. 1–8.
2. **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.
3. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.5500 Bacterial DNA Damage or Repair Tests. US. 1998. P. 1–5.
4. **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.
5. **Ellerbroek L., Schramm G., Weise E., Reuter G.** Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis in Fleisch // Fleischwirtschaft 1994. Vol. 74, No. 4. S. 413–416.
6. Delvotest. Standard diffusion tests for the detection on antibacterial substances in milk. Firmos prospektas.
7. CMT – Copan Milk Test for the detection of antibiotics and sulphonamides in milk and milk products. Firmos prospektas.
8. **Adriany A., Märthlbauer, E., Zaadhof K.-J.** A modified Brilliant Black-Reduction Test (BRT) with improved sensitivity for Tetracyclines and Sulfonamides // Proceedings of Symposium on Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk. Kiel, Germany, 28–31 August, 1995. P. 172–176.
9. www.goodfood-project.org.
10. MiRa Test. Microbiological test with spores *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* for the detection of antibiotic and sulphamide residues in milk. Liofilchem Bacteriology Products. Prospect.
11. **Šalomskienė J., Oržekauskienė R., Žvirdauskienė R.** Naujo preparato inhibitoriams piene nustatyti kūrimas ir jo palyginimas su analogais // Maisto chemija ir technologija. 2002. T. 36. P. 199–206.



12. Šalomskienė J., Jurkšaitė D. *Geobacillus stearothermophilus* sporų sudygimo stimuliatorių įvertinimas // Maisto chemija ir technologija. 2006. T. 40, Nr. 2. P. 49–56.
13. Delvotest-SP-NT. Standard diffusion test for the detection of antibacterial substances in milk. DSM Food Specialties. www.dsm-dairy.com. Firmos prospektas.
14. Grahame W. Gould. Bacterial Endospores // Encyclopedia of Food Microbiology. Ed. by Richard K. Robinson, Carl A. Batt, Pradip D. Ratel. Volume I, Academic press, 2000. P. 124–126.

Pateikta spaudai 2007-04

J. Šalomskienė, D. Jurkšaitė, R. Žvirdauskienė

### IMPACT OF DIFFERENT FACTORS ON THE QUALITY OF A PREPARATION CONTAINING SPORES OF *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

#### Summary

The possibility of improving the quality of *Mal-1* test used for determining inhibitors in milk was investigated. The impact of different chemical agents on the changes of color of the preparation during incubation with milk sample was investigated. It was found that addition of a 1% soluble starch and freshly prepared spores of *Geobacillus stearothermophilus* to the composition of the medium of the preparation caused the required intensity of color after incubation at (63±0,5) °C. The duration of incubation of the modified preparation could be shortened from 4 h 15 min–5 h until 3 h–3 h 15 min. It was sufficient to change the color from purple to yellow when the samples turned negative for inhibitors. Other factors were also investigated: pre-incubation of the preparation with a sample for 1 h at a room temperature and taking off the remains of the sample from the surface of the preparation medium. These factors did not show any positive impact on the changes in the medium color. The modified preparation was sensitive to 0.003 µg/ml of penicillin, 0.004 µg/ml of ampicillin, 0.03 µg/ml oxacillin and 0.1 µg/ml of oxytetracycline, and retained sensitivity for 3 months (a longer duration of the shelf life was not investigated). The comparison of the modified preparation with an imported analogue – *Delvotest–SP-NT* (DSM, Netherlands) in examining of milk samples with inhibitors („positive“ samples) and samples without inhibitors

(„negative“ samples) showed that the conformity of the results was 100%.

**Keywords:** preparation, *Geobacillus stearothermophilus*, spores, soluble starch, freshly prepared spore suspension, pre-incubation, sensitivity, *Delvotest-SP-NT*.

Й. Шаломскене, Д. Юркштайте, Р. Жвирдаускене

### ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРОВ НА КАЧЕСТВО ПРЕПАРАТА СО СПОРАМИ *GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS*

#### Резюме

Исследована возможность улучшения качества препарата *Mal-1*. В статье представлены данные по изучению влияния химических веществ, активизирующих прорастание спор, на изменение цвета препарата во время его инкубации с образцом молока. Установлено, что включение в состав среды препарата 1%-ного растворимого крахмала и использование свежей суспензии спор *Geobacillus stearothermophilus* способствовало улучшению интенсивности его цвета после инкубирования в термостате при (63±0,5) °C. Продолжительность инкубирования препарата может быть уменьшена с 4 час 15 мин–5 час до 3 час–3 час 15 мин. Такой продолжительности достаточно, чтобы при исследовании молока без ингибиторов цвет среды изменился с фиолетового на желтый. Далее исследовано влияние других факторов – предварительной выдержки препарата с пробой молока при комнатной температуре в течение 1 часа и слития остатков молока с поверхности среды после такой выдержки на изменение цвета препарата во время дальнейшей инкубации в термостате. Установлено, что предварительная выдержка препарата и слитие остатков молока с поверхности препарата не оказали положительного влияния на скорость изменения цвета среды во время дальнейшего термостатирования.

Модифицированный препарат был чувствителен к 0,003 µг/мл пеницилина, 0,004 µг/мл ампицилина, 0,03 µг/мл оксацилина, 0,1 µг/мл окситетрациклина и выдержал такую чувствительность в течение 3 месяцев (дольше он не хранился). Сравнение модифицированного препарата *Mal-1* с импортным аналогом *Delvotest-SP-NT* (DSM, Нидерланды) при исследовании проб молока с ингибиторами и без них показало 100%-ную совпадаемость результатов.