

Изследване възможностите на спори *Bacillus stearothermophilus* за анализ на пеницилин

Галина Йорданова, Цонка Годжевъргова

Investigation of possibility of *Bacillus stearothermophilus* for penicillin analysis: The detection of residues of antibacterials such as antibiotics in liquids such as milk, water, serum or urine is disclosed. A test unit comprises a medium inoculated with a suitable test organism and acid-alkali or oxido-redox indicator. Many factors influence cell growth - temperature, pH, medium, type of dye, etc. The purpose of this paper is to optimize some factors for efficient flow of microbial inhibitory test based on spores of *Bacillus stearothermophilus* analysis of antibiotic residues.

Key words: *Bacillus stearothermophilus*, Penicillin G, sporulation

ВЪВЕДЕНИЕ

Микробните инхибиторни методи намират широко приложение за анализ на остатъци от антибиотици в млякото. Най-често се използват стандартни култури като *Geobacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* var. *Mycooides* or *Streptococcus thermophilus*. Предимствата на тези методи са следните: те имат широк спектър на антибиотична детекция, лесно изпълними, евтини и могат да се използват за скрининг на голям брой проби [4]. Тези методи имат и своите недостатъци – не са селективни и анализът е продължителен (4.5 часа). Те са високо-селективни спрямо β-лактамни антибиотици, но по-слабо селективни за макролиди, сулфонамиди, тетрациклини [1, 2].

Комерсиалните продуцирани микробни инхибиторни тестове се осъществяват в ампули или микроямки съдържащи голям брой клетки и киселинно-основен или окислително-редукционен индикатор. Към тях се добавя пробата мляко. След определен период на инкубиране при подходяща температура, микробните клетки се развиват в различна степен в зависимост от количеството на антибиотика в млякото и се отчита различна промяна на цвета на индикатора. Когато антибактериално съединение присъства в пробата в концентрация, достатъчна, за да потиска растежа на тест-организма изходния цвят на индикатора не се променя и обратно при отсъствие на инхибитор микроорганизмите растат, образува се киселина и тя променя цвета на индикатора. Много са факторите влияещи на растежа на клетките – температура, рН на средата, хранителна среда, вид на багрилото, концентрация на спори и др. Тези фактори директно се отразяват на продължителността на анализа.

Целта на настоящата статия е да се създаде ефективен микробно инхибиторен тест за анализ на остатъци от антибиотици на базата на спори на *Bacillus stearothermophilus* чрез оптимизиране качеството и количеството на спорите.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Микробен вид

Bacillus stearothermophilus се инокулира в течна среда (Nutrient broth 2) за 24 часа при 55°C. Поддържа се на Nutrient agar в епруветки на полегат стълб при температура 4 - 8°C.

2. Хранителни среди

Инокулираща среда: Nutrient broth 2

Спорулираща среда: 2.45 g динатриевхидроген фосфат, 0.35 g L-глутамат, 0.99 g калиев дихидроген фосфат, 0-1.35 g глюкоза, 4.95 g тетраамониев хлорид, 0.001 g железен трихлорид, 0.001 g манганов двухлорид, 0.047 g магнезиев двухлорид, 0.011 g калциев двухлорид, 0.014 g динатриев сулфат в 1000 ml дестилирана вода. Средата се стерилизира за 20 минути при 121°C.

Среда за теста: 12 g агар, 9 g натриев хлорид, 2 g глюкоза, 2 g пептон, 2 g триптон, 4 g дрождев екстракт, 0.2 g магнезиев сулфат, 0.2 g ЕДТА, 40 mg фенол ред и 50 ml фосфатен буфер (pH = 8.0) в 1000 ml дестилирана вода. Средата се стерилизира за 20 минути при 121^oC [3].

3. Получаване на спори от *Bacillus stearotherophilus* [5]

Спори на *Bacillus stearotherophilus* се получават при използването на по-горе описаната спорулираща среда. Инкубирането протича за 60 - 72 часа при температура 55^oC и 220 об/мин. Спорите се отделят от клетките чрез центрофугиране (10000 rpm.min⁻¹, при 4^oC, 10 минути), промиват се два пъти и се ресуспендират в дейонизирана стерилна вода. След това сместта от спори и клетки се подлага на ултразвук (5 минути) за допълнително третиране на останалите неразкъсани клетки. Отново центрофугираме споровата суспензия при същите условия. Супернатантата се отстранява, а освободените утаени спори се ресуспендират в дейонизирана стерилна вода. Съхраняват се 1 месец при температура 4 - 8^oC.

4. Определяне концентрацията на спорите:

Концентрацията на спорите в средата определяме по метода на броене с камера на Бюркер.

Количеството на спорите се изчисляват по следната формула:

$$x = \frac{a}{b} \cdot 4000000 \cdot c$$

x – количеството микроорганизми в 1 ml

a – сумата на изброените спори

b – броя на квадратчетата, в които са изброени спори

c – предвартелното разреждане на изследвания материал

5. Провеждане на анализа

Стерилините тубички (епруветки) с диаметър около 9 mm се запълват с 0.3 ml от разтвора на агара при асептични условия и веднага се запечатват с алуминиево фолио. Агарът в епруветките се втвърдява докато са в изправено положение. Те се съхраняват при температура 5-15^oC. Към всяка епруветка, съдържаща определена концентрация на спори на *Bacillus stearotherophilus* (10⁹ - 10¹⁰ спори.ml⁻¹) се добавя 0.1 ml антибиотик. Веднага след това епруветките се поставят в термостат при 60^oC. Следи се промяната на цвета на всеки 30 мин в продължение на 6 часа.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

1. Вариране концентрацията на глюкоза в спорулиращата среда

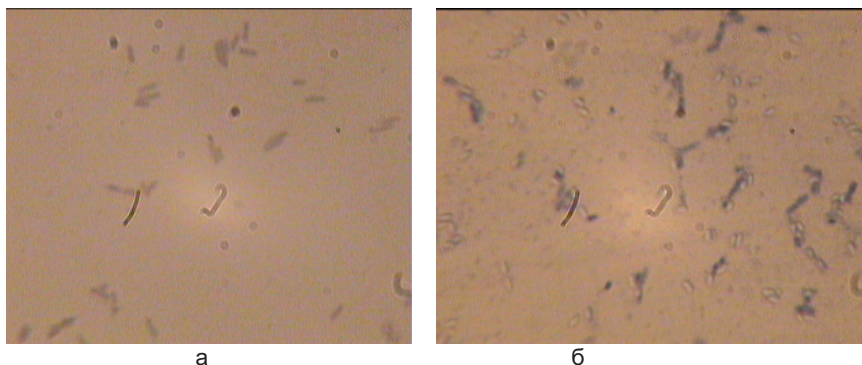
Първоначално в шест колби със спорулираща среда е добавено различно количество въглероден източник (глюкоза). Концентрацията на глюкозата варира от 0 до 1.35 g.l⁻¹ и тя е недостатъчна за интензивно развитие на клетките и предизвиква натрупване на по-голямо количество ендоспори.

Таблица 1.

Растеж на клетки (g.l⁻¹) на *Bacillus stearotherophilus* при различни концентрации на глюкоза в спорулиращата среда

Време, ч	Концентрация на глюкоза, g.l ⁻¹					
	0	0.1	0.5	0.8	1.0	1.35
0	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300	0.300
48	0.230	0.322	0.327	0.408	0.400	0.409
120	0.188	0.370	0.530	0.470	0.480	0.495
144	0.164	0.370	0.410	0.490	0.500	0.543

От табл.1 се вижда, че при концентрация на глюкоза 1.35 g l^{-1} натрупва по-голямо количество клетки и спори. Над тази концентрация не се работи, тъй като целта е да се натрупа по-голямо количество спори. Следващите ни експерименти са проведени с концентрация на глюкоза 1.35 g l^{-1} . Направени са микроскопски снимки на клетките и спорите на оптичен микроскоп. От представените снимки на фиг.1а и фиг.1б се вижда разликата между развитието на клетките на 48 и на 144 час. Очевидно е, че броят на клетките и спорите е нараснал значително на 144 час.



Фигура 1. Микроскопски снимки на клетки и спори на *Bacillus stearothermophilus* – а) на 48 час, б) на 144 час.

2. Вариране концентрацията на спорите в пробите

Един от основните фактори за ускоряване на анализа е концентрацията на спорите добавени за всеки тест. Както се вижда от таблица 2 продължителността на теста е 4 часа при добавяне на 0.1 мл спори с концентрация към агарната среда. При двойно увеличаване на концентрацията на спорите времето се редуцира до 3.5 часа. От табл. 2 се вижда, че промяна на цвета на индикатора от жълт в зелен е налице при пробите без наличие на пеницилин G и при концентрация на пеницилин G – 10 ng ml^{-1} . От получените резултати се вижда, че минималната концентрация за определяне на Пеницилин G по изследвания метод е 50 ng ml^{-1} .

Таблица 2.
Микробен инхибиторан анализ на остатъци от пеницилин в мляко

Проба №	Спори, ml	Пеницилин G, ng ml^{-1}	Време, ч	Оцветяване
1	0.1	-	4.0	+
2	0.1	10	4.0	+
3	0.1	50	4.0	-
4	0.1	100	4.0	-
5	0.1	1000	4.0	-
6	0.2	-	3.5	+
7	0.2	50	3.5	-
8	0.2	100	3.5	-
9	0.2	250	3.5	-

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изследвани са потенциалните способности на щам *Bacillus stearothermophilus* за създаване на микробен инхибиторен анализ за определяне на остатъци от антибиотици в мляко.

2. Установена е оптималната концентрация на спори при която се редуцира времето за протичане на един анализ.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Botsoglou N.A., Fletouris D.J. (2001) Drug Residues in Foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. Marcel Dekker, New York.

[2] Kang J.H., Jin J.H., Kondo F. (2005) False-positive outcome and drug residue in milk samples over withdrawal times. Journal of Dairy Science, 88: 908–913.

[3] Langeveld P.C., Beukers R., Bommele M. W., Stark J. (2005) Rapid microbiological test for the detection of antibacterial compounds. Patent US 6,867, 015 B1.

[4] Mitchell J.M., Griffiths M.W., McEwen S.A., McNab W.B., Yee A.J. (1998) Antimicrobial drug residues in milk and meat: cause, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. Journal of Food Protection, 61: 742–756.

[5] Yildiz F., Westhoff D. C. (1989) Sporulation and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in milk. Food Microbiology, 245-250.

За контакти:

Ас. Галина Йорданова – Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858335, e-mail: burdelova@abv.bg

Проф. д-р Цонка Годжевъргова – Университет “Проф. д-р Асен Златаров”, катедра Биотехнология, тел. 056/858353, e-mail: godjevargova@yahoo.com

Докладът е рецензиран.