

Podłoże mikrobiologiczne VRBG do identyfikacji Enterobacteriaceae w formie tabletek i sposób jego wytwarzania.

Wynalazek dotyczy podłoża mikrobiologicznego VRBG do identyfikacji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae w formie tabletek i sposobu jego wytwarzania.

Podłoże VRBG jest selektywnym podłożem do identyfikacji i oznaczania liczby bakterii z rodziny Enterobacteriaceae w próbkach żywności, farmaceutykach i innych. Podłoże zawiera w swoim składzie pepton mięśny, ekstrakt drożdżowy, glukozę, chlorek sodu, sole żółciowe, czerwień obojętną, fiolet krystaliczny oraz agar bakteriologiczny. Obecny w podłożu fiolet krystaliczny hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich, natomiast glukoza jest czynnikiem różnicującym, fermentowanym przez wszystkie bakterie z rodziny Enterobacteriaceae. Podłoże jest zgodne z normą ISO 21528.

Z opisu patentu EP0155427 znane jest podłoże mikrobiologiczne w formie tabletek, umożliwiające szybką dezintegrację w wodzie dzięki mieszaninie kwasu winowego i wodorowęglanu sodu i/lub węglanu lizyny w ilości między 5 a 50% wagowych, korzystnie między 13 a 22% wagowych.

Z opisu JP02057175 znane jest podłoże mikrobiologiczne do hodowania komórek zwierzęcych, roślinnych lub bakteryjnych. Podłoże jest ukształtowane w formę granulek poprzez zwilżenie wodą, zawierającą rozpuszczalnik organiczny, np. alkohol etylowy oraz zastosowanie granulatora celem otrzymania granulek o średnicy 0,5-2 mm i długości 1-5 mm.

Celem wynalazku było opracowanie procesu formowania podłoża mikrobiologicznego VRBG w postaci tabletki, służącego do identyfikacji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae. Badania wykonano w oparciu o wdrożony System Zarządzania Jakością według norm PN-EN ISO

9001:2009 i PN-EN ISO 13485:2005 oraz zasady Dobrej Praktyki Wytwarzania, z ukierunkowaniem na wymagania higieniczno-sanitarne.

5 Podłoże mikrobiologiczne VRBG do identyfikacji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae według wynalazku występuje w formie tabletek zawierających 0,5% wag makroglu.

10 Sposób wytwarzania podłoża mikrobiologicznego VRBG do identyfikacji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae według wynalazku polega na zmieszaniu 99,5 części wagowych podłoża VRBG w formie sypkiej i 0,5 części wagowych makroglu i uformowaniu tabletek w tabletkarce. Korzystnie, wielkość stempla wynosi 25 mm, a siła nacisku 123 kN.

15 Zaletą podłoża mikrobiologicznego VRBG do identyfikacji Enterobacteriaceae w formie tabletek i sposobu jego wytwarzania jest możliwość szybkiego przygotowania podłoża, bez konieczności zastosowania wagi oraz bez ryzyka strat podłoża w wyniku rozsypania materiału. Ponieważ przygotowanie podłoża nie wymaga odważania formy sypkiej, ryzyko zanieczyszczenia podłoża jest mniejsze. Podłoże w formie tabletki ogranicza pylenie, minimalizuje kontakt ze skórą i oczami laboranta oraz chroni środowisko przed skażeniem. Dodatkowo forma tabletki jest 20 bardziej ekonomiczna dla laboratorium, gdyż pozwala na zakup i przygotowanie minimalnej objętości pożywki wymaganej do analiz bez konieczności jej przechowywania. Taka forma szczególnie może być wykorzystana przez małe laboratoria o ograniczonej powierzchni zwłaszcza magazynowej.

25

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania

Przykład 1. Dobór lubrykantów i ocena jakości pożywki VRBG.

30 W celu doboru lubrykantów użyto pożywki VRBG, produkowanej przez firmę BTL Sp. z o.o. Zakład Enzymów i Peptonów. Ponieważ składniki pożywki powodowały zacieranie się stempli tabletkarki, dodano

do nich dodatkowe składniki tzw. lubrykanty - substancje „poślizgowe”.
Najczęściej stosowaną substancją poślizgową jest stearynian sodu, który w
przypadku pożywki VRBG nie mógł być zastosowany, gdyż powodował
zmętnienie pożywki, ponieważ jest to substancja nierozpuszczalna w
5 wodzie. Wykluczono również krzemionkę koloidalną i stearynian
magnezu z uwagi na nierozpuszczalność w wodzie i tworzenie mętnej
zawiesiny. W efekcie badań wybrano poli(tlenek etylenu) PEG czyli tzw.
Makrogol 6000, dobrze rozpuszczalny w wodzie, nie wpływający na
klarowność pożywki, równocześnie zwiększający jej lepkość.

10

Przykład 2. Ocena żywności podłoża VRBG z różnymi stężeniami
makrogolu 6000 wg PN-EN ISO11133:2014 (E).

Sprawdzono wpływ makrogolu w różnych stężeniach na jakość
15 mikrobiologiczną pożywki. W tym celu zawiesiny szczepów wzorcowych
E. coli i Salmonella sp. zostały posiane w ilości po 0,1 ml z
dziesięciokrotnych rozcieńczeń (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) na podłoża VRBG z
dodatkiem makrogolu w stężeniu 0,5% i 1%. Kontrolę stanowiło podłoże
VRBG bez lubrykantu produkcji BTL Sp. z o.o. Zakład Enzymów i
20 Peptonów. Współczynnik żywności PR został oceniony wg wzoru:

$$PR = N_s / N_o,$$

gdzie:

N_s - całkowita liczba jednostek tworzących kolonie (jtk) danego szczepu
bakterii na pożywce testowanej VRBG z lubrykantem lub bez

25 N_o - całkowita liczba jednostek tworzących kolonie (jtk) danego
drobnoustroju na pożywce referencyjnej TSA

30

Tabela 1. Jakość mikrobiologiczna pożywki VRBG w formie wyjściowej-sypkiej oraz w formie tabletek z różnym stężeniem makroglu 6000

Szczep kontrolny	Charakterystyka i kryteria	Wyniki żywność PR		
		Podłoże 1	Podłoże 2	
			0,5% PEG	1,0% PEG
E.coli ATCC 25922 Salmonella Typhimurium ATCC 14028 Salmonella Enteritidis ATCC 13076	Różowe do czerwonych kolonie z lub bez strefy zmętnienia PR $\geq 0,5$	1,0	1,1	0,97

10

Uzyskane wyniki żywności spełniały kryteria w/w normy (PR \geq 0,5).

Przykład 3. Ocena selektywności wg PN-EN ISO11133:2014 (E)-jakościowa metoda posiewu powierzchniowego przy pomocy ezy.

15

Zawiesiny robocze bakterii E. coli ATCC 25922, Salmonella typhimurium ATCC 14028, Salmonella enteritidis ATCC 13076 i Enterococcus faecalis ATCC 29212 o gęstości 10^7 jtk/ml zostały posiane liniowo przy użyciu ezy o pojemności oczka 1 μ l. Ocena była prowadzona w sposób wizualny z zastosowaniem skali punktowej: 0 - brak wzrostu; 1- wzrost słaby, <10 jtk; 2- wzrost dobry, ok.1000 jtk.

20

Uzyskano dobry wzrost tj. skala 2 dla drobnoustrojów specyficznych: E. coli ATCC 25922, Salmonella typhimurium ATCC 14028 i Salmonella enteritidis ATCC 13076 oraz całkowite zahamowanie wzrostu drobnoustroju niespecyficznego E. faecalis ATCC 29212. Dodatek lubrykantu nie miał wpływu na jakość mikrobiologiczną pożywki VRBG.

25

Przykład 4. Dobór parametrów formułacji tabletek z sypkiego podłoża VRBG

30

Do wytworzenia tabletek wybrano pożywkę VRBG z dodatkiem 0,5% makroglu, ponieważ takie stężenie było wystarczające do eliminacji

zacierania stempla. Wytworzono tabletki o masie ok. 4,15g. Badania wykonano na stemplu o średnicy 25 mm. Wychodząc z wytrzymałości stempla na ściskanie, wynoszącej $500\text{N}/\text{mm}^2$, przy powierzchni tabletek 490mm^2 siła nacisku wynosiła maksymalnie 245kN. Przy tej sile następowały trudności wypychania z matrycy. Zastosowanie siły nacisku 123 kN zmniejszyło efekt zacierania stempla przy odpowiedniej formulacji. Użycie mniejszej siły nacisku obniżyło twardość tabletki, a tym samym zwiększyło jej rozpuszczalność w wodzie. Siła nacisku jest niezależna od masy tabletek.

10 Tabletkowanie prowadzono przy użyciu tabletkarki mimośrodowej, a składniki masy tabletkowej dozowane były grawitacyjnie. Proces formowania tabletek inicjowany był przez sporządzenie w odpowiednich proporcjach naważek recepturowych sypkiego podłoża VRBG oraz 0,5% 15 lubrykantu, a następnie dokładne wymieszanie składników. Tabletkowanie polegało na zgnieceniu odmierzonej ilości masy tabletkowej, w tym przypadku 4,15 g, we wnętrzu matrycy za pomocą stempli górnego i dolnego, do których za pośrednictwem kół ciśnieniowych przyłożona była siła prasująca. Objętość matrycy decydowała o masie tabletki i regulowana 20 była wysokością początkowego ustawienia dolnego stempla. Po napełnieniu matrycy i kompresji masy tabletkowej następowało wypchnięcie tabletki z matrycy. Podłoże VRBG w formie tabletki przedstawiono na rysunku Fig 1.

Ciśnienie prasowania, regulowane odległością pomiędzy stemplami, decydowało o parametrach tabletek: twardości, grubości, odporności 25 mechanicznej, a także o czasie ich rozpadu. Ustalono optymalny efekt formulacji na stemplu o średnicy 25 mm przy sile nacisku 123 kN.

Przykład 5. Ocena parametrów fizykochemicznych tabletek

Podłoża VRBG, sypkie i w formie tabletek, porównywano poprzez 30 zestawienie parametrów po upłynnieniu oraz wylaniu na płytce Petriego, które zaszczerpiono odpowiednimi mikroorganizmami i inkubowano w

odpowiednich warunkach czasu i temperatury.

- Podłoże VRBG po upłynięciu było klarowne, a wzrost drobnoustrojów specyficznych z rodzaju Enterobacteriaceae był typowy, w postaci różowo-czerwonych kolonii ze strefą zmętnienia. Dodatek lubrykantu, w stężeniu 0,5% nie wpłynął na jakość pożywki, tj. żywność i selektywność.
- 5 Parametry fizykochemiczne tabletek zestawiono w Tabeli 2.

Tabela 2. Podstawowe wielkości fizykochemiczne badanych tabletek

Wielkości fizykochemiczne	Wyniki
Średnia masa, g	4,15
Średnia wysokość, cm	0,5
Średnia średnica, cm	2,50
Gęstość rzeczywista, g/cm ³	1,69
Średnia rzeczywista powierzchnia, cm	4,90
Postać i właściwości	Postać stała, powierzchnia matowa, bez plam, przebarwień, koloru beżowego.

- Podłoże VRBG, do identyfikacji bakterii z rodziny Enterobacteriaceae, w formie tabletek, charakteryzuje się takimi samymi parametrami fizykochemicznymi i jakością mikrobiologiczną jak podłoże sypkie, jak przedstawiono w tabelach 2 i 3.

- W celu zbadania rozpuszczalności, tabletkę rozpuszczono w 100 ml wody destylowanej. Mieszając, ogrzewano do temp. 100°C, nie dłużej niż 30 min lub sterylizowano 117°C, 10 min. Po wystudzeniu określono pH roztworu, które wynosiło 7,4±0,2. Po rozpuszczeniu tabletek i wylaniu na płytki, podłoże było przezroczyste o barwie czerwonej.

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono brak różnic w cechach fizykochemicznych pożywek otrzymanych z tabletek w stosunku

do pożywki uzyskanej z produktu w postaci sypkiej.

Przykład 6. Analiza mikrobiologiczna, badanie żywności i selektywności zgodnie z ISO 11133:2014.

5 Badanie dotyczyło pożywki VRBG w formie sypkiej – próbka Nr 1, oraz formie tabletek o masie 4,15g, próbka Nr 2. W celu oceny żywności zostały sporządzone zawiesiny szczepów wzorcowych *E. coli* i *Salmonella* sp.. Następnie posiano po 0,1 ml zawiesin szczepów wzorcowych z dziesięciokrotnych rozcieńczeń (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}) na podłoża VRBG Nr 1 i 10 Nr 2 oraz podłoże referencyjne TSA produkcji BTL Sp. z o.o. Zakład Enzymów i Peptonów.

W celu określenia selektywności, na dwie próbki pożywki VRBG, posiano 0,001 ml *E. faecalis* z rozcieńczenia 10^{-2} . Podłoża inkubowano przez 24h w temperaturze 37°C.

15

20

Tabela 3. Wyniki jakości mikrobiologicznej żywności w formie
wyściowej- sypkiej oraz w formie tabletek

Norma	Właściwości	Szczep kontrolny	Kryteria	Charakterystyczna reakcja	Numer próbki	Wynik
ISO2152-8	żywność	a/E.coli ATCC 25922 b/Salmonella Typhimurium ATCC 14028 c/Salmonella Enteritidis ATCC 13076	PR \geq 0,5	Różowe do czerwonych kolonie z lub bez strefy zmętnienia	Nr 1	PR=1,0
					Nr 2	PR=1,1
	selektywność	E. faecalis ATCC 29212	Całkowite hamowanie (0)	-	Nr 1	Całkowite hamowanie (0)
					Nr 2	Całkowite hamowanie (0)

- 5 Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono brak różnic w cechach mikrobiologicznych żywności, otrzymanych z tabletek w stosunku do żywności uzyskanej z produktu w postaci sypkiej.