

Application of synthetic solid culture medium to improve the detection of antimicrobial drug residues in foodstuffs

(secondary publication)

Szita Géza<sup>1</sup>, Bernáth Sándor<sup>2\*</sup>, Szili Zsuzsanna<sup>1</sup>, Szita János<sup>3</sup>, Hullár István<sup>4</sup>, Erdősi Orsolya<sup>1</sup>

G. Szita<sup>1</sup>, S. Bernáth<sup>2\*</sup>, Zs. Szili<sup>1</sup>, J. Szita<sup>3</sup>, I. Hullár<sup>4</sup>, O. Erdősi<sup>1</sup>

1. Állatorvostudományi Egyetem  
Élelmiszer-higiéniai Tanszék  
H-1078 Budapest, István u. 2.

\* e-mail: szili.zsuzsanna@univet.hu

2. Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági  
Hivatal Állatgyógyászati Termékek  
Igazgatósága

3. Országos Baleseti és Sürgősségi Intézet

4. Állatorvostudományi Egyetem  
Állattenyésztési, Takarmányozástani  
és Laborállat-tudományi Intézet

# *Bacillus subtilis* tenyésztésére alkalmas szintetikus táptalaj kifejlesztése antimikrobiális maradékanyagok hatékonyabb kimutatására (másodközlés: Acta Alimentaria)

## ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők jelen tanulmányukban bemutatják a *Bacillus subtilis* tenyésztésére kifejlesztett szelektív táptalajukat az élelmiszerekben lévő antimikrobiális maradékanyagok érzékeny kimutatására. Nitrogénforrásként ammóniumsót, szénforrásként glukózt, ill. nátrium-piruvát tartalmaz. Az új táptalajt mikrobiológiai vizsgálatokban alkalmazva antimikrobiális hatóanyagok kimutatásakor a gátlási zóna átmérők 1,4–4-szer szélesebbek voltak, mint a Müller–Hinton-agaron. Az új agar előnye a nagy érzékenységen kívül a standard összetétel, a gátlóanyagok hiánya, a reprodukálható minőség és az alacsony ár.

## SUMMARY

**Background:** Recent laboratory tests being in use in Europe to detect antibiotic residues in human food are either based on the so called Four Plate Test (UE4pt) employing *Bacillus subtilis* as test organism, or on direct chemical test procedures. The Four Plate Test is widely utilized as a scanning method due to simplicity and low cost, however, sensitivity of the chemical detection methods has been about a magnitude higher.

**Objectives:** Purpose of this study was to increase the sensitivity of the biological testing, using *B. subtilis* as test organism, through restricting nitrogen and carbon supply in the culture media. It was hoped that an effective, portable test tool with low lab technology requirement could be developed.

**Materials and Methods:** Growth and antibiotic sensitivity characteristics of *B. subtilis* were compared using Mueller-Hinton Agar and our two limited nutrient supply semisolid media. Ammonium sulphate was combined either with glucose or sodium pyruvate in buffered agar. Each composed medium was tested at both pH 6.0 and pH 8.0. Growth inhibition was measured around commercial antibiotic resistance test disks containing 21 respective antibiotics.

**Results and Discussion:** The medium based on ammonium sulphate and sodium pyruvate, pH 6.0 proved to be most suitable as a replacement of Mueller Hinton Agar in the Four Plate Test. Growth inhibition, indicating sensitivity, improved by 1.4 to 4.0-fold, depending on the antibiotic. This allows the detection of levels up to a magnitude smaller amount of antibiotics than the original Four Plate Test. Unlike Mueller Hinton Agar, our artificial medium does not contain any accidental inhibitor substances. Moreover, the medium is superselective for *B. subtilis*, cheap and highly consistent in composition, as well as results.

Az élelmiszerek antibiotikum-, ill. xenobiotikum-tartalma veszélyes lehet a fogyasztóra azáltal, hogy allergiás reakciókat okoz, vagy növeli a terápiás céllal használt antibiotikumok alkalmazásakor a bakteriális rezisztencia gyakoriságát. Az állatorvoslásban alkalmazott antibiotikumok és antibakteriális hatóanyagok szermaradványainak állati eredetű élelmiszerekből való kimutatására az alapvető szűrő módszerek a mikrobiológiai vizsgáló eljárások, az ELISA és a vékonyréteg-kromatográfia használatosak (1). A mikrobiológiai vizsgálatokat szilárd táptalajon végzik, alapelvük a baktériumnövekedés gátlási zónáinak mérése és értékelése (7). Standard feltételek mellett a gátlás mérete egyenesen arányos a szer koncentrációjának logaritmusával (10).

*Az élelmiszerek antibiotikum-, ill. xenobiotikum-tartalma allergiát és terápia-hatékonyság csökkenést okozhat*

*Az utóbbi évtizedben kifejlesztettek egy hatlemezes módszert*

A mikrobiológiai módszerek olcsók és széles körben alkalmazhatók, mivel potenciálisan fedik majdnem a teljes antibiotikum-spektrumot egy vizsgálattal, szemben az immunológiai vagy receptor alapú próbákkal (9). A négycsésés módszer (EU4pt) általánosan használt és nagyra értékelt vizsgáló eljárás a rutinmunkában, a módszer legnagyobb előnye a gyorsaság és az egyszerűség (5, 6). Egyaránt hatékony nagyszámú fagyasztott-felengedett vagy a friss minta vizsgálatára (2). Mindazonáltal ezen módszerek kevésbé specifikusak és érzékenyek, összehasonlítva a költséges és időigényes kémiai analízissel.

Az antimikrobiális maradékanyagok kimutatása olyan módszereket igényel, amelyek megfelelően érzékenyek a maximálisan engedélyezett maradékanyag-mennyiségek (maximum residue limit, MRL) észlelésére (3). Az MRL-értékek megállapítása az eredeti mikrobiológiai szűrő eljárások újragondolására készítette a kutatókat (2, 8). Említhetők itt a négycsésés módszer (EU4pt) és a *Bacillus subtilis* egycsésés eljárás, amelyeket a korábbi időszakban használtak, mivel úgy értékelték, hogy ezek a módszerek több maradék anyag esetében nem elég érzékenyek (9, 4). Az utóbbi évtizedben a már javított módszerek fejlesztése felgyorsult. Kifejlesztettek egy hatlemezes módszert (combined plate microbial assay, CPMA), amely alapvetően a négycsésés módszer (EU4pt) kiegészítése *Bacillus cereus* és *Escherichia coli* lemezekkel.

*Az antimikrobiális hatóanyagok jobb diffúzióját biztosító, új táptalaj fejlesztését tűzték ki célul*

A hatlemezes agardiffúziós módszernél (CPMA) háromnál a *Bacillus subtilis* a vizsgálatban használt mikroorganizmus. Ezért határoztunk úgy, hogy kifejlesztünk egy új táptalajt, amely lehetővé teszi az antimikrobiális hatóanyagok jobb diffúzióját. A vizsgálatokhoz a laboratóriumunkban indikátormikrobák tenyésztésére korábban kifejlesztett szintetikus táptalajok szolgáltak alapul, mivel megfigyelhető volt, hogy ezek a táptalajok lehetővé teszik a baktériumok anyagcseretermékeinek (pl. szerves savak) nagyon gyors diffúzióját. Feltételeztük, hogy az antibakteriális hatóanyagok élelmiszer-maradékanyagai hasonló módon viselkednek, vagyis kifejezettebben és intenzívebben diffundálnak, mint a hagyományos agarlemezekben.

Az irodalomban nem volt adat azokról a legegyszerűbb nitrogénvegyületekről, amelyeket kizárólag a *Bacillus subtilis* tud hasznosítani. Figyelembe véve ezt a tényt, először különböző szerves és szervetlen N-vegyületeket vizsgáltunk, és azt találtuk, hogy az ammónia kiválóan alkalmas erre a célra. Ez a legegyszerűbb molekula, amely alkalmas Gram-negatív baktériumok tenyésztésére. Kiegészítve glükózzal és piruváttal, mint szénforrásokkal, foszfátpufferben a táptalaj nitrogénforrásul szolgálhat. A további vizsgálatokban a *Bacillus subtilis* négy új szintetikus táptalajra, és összehasonlításként a hagyományos Müller-Hinton-táptalajra lett oltva.

## ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### A TÁPTALAJOK ÖSSZETÉTELE ÉS ELKÉSZÍTÉSE

Müller-Hinton-agar: húskivonat (2,0 g/l), kazeinhidrolizátum (17,5 g/l), keményítő (1,5 g/l), agaragar (16,0 g/l). A hőkezelés 121 °C hőmérsékleten 20 percen át történt.

B<sub>Sg</sub>-agar: ammónium-szulfát (1 g/l), glükóz (4 g/l), dikálium-hidrogén-foszfát (4 g/l), kálium-dihidrogén-foszfát (1 g/l), agaragar (16,0 g/l). A hőkezelés 121 °C hőmérsékleten 20 percig tartott.

B<sub>Sp</sub>-agar: ammónium-szulfát (1 g/l), nátrium-piruvát (4 g/l), dikálium-hidrogén-foszfát (4 g/l), kálium-dihidrogén-foszfát (1 g/l), agaragar (16,0 g/l). A hőkezelés 121 °C hőmérsékleten 20 percen át történt. A B<sub>Sg</sub>- és B<sub>Sp</sub>-agarokból pH 6 és pH 8 vegyhatású táptalajok készültek.

### BAKTÉRIUMTÖRZS ÉS A SPÓRASZUSZPENZIÓ KÉSZÍTÉSE

A *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (BGA) törzset 7,0 pH-értékű agarra szélesztettük, majd 26 °C hőmérsékleten 10 napon át tartó inkubálás után a főleg spórákat tartalmazó telepeket fiziológias sóoldattal lemostuk (0,85% nátrium-klorid-oldat). Ezt a szuszpenziót 3024 g értéknél 10 percen át centrifugáltuk, háromszor mostuk, majd az üledéket újra szuszpendáltuk fiziológias sóoldattal, és 70 °C hőmérsékleten 30 percig hőkezeltük. A spóraszám meghatározására az MPN-módszert használtuk, a végső szuszpenzió spóratartalma 10<sup>7</sup> spóra/ml volt. A szuszpenziót 4 °C alatti hőmérsékleten tároltuk.

A 10<sup>4</sup> spóra/ml végső koncentráció eléréséhez 0,1 ml *B. subtilis* BGA-spóraszuszpenziót adtunk 100 ml pH 6,0 vagy pH 8,0 vegyhatású táptalajhoz. A táptalajok összehasonlítása hatóanyag-tartalmú papírkorongokkal történt (Resistest HUMAN Co.), öt párhuzamos mérésel. Az eljárás ugyanolyan érzékeny, mint az agarlyukasztással végzett hatóanyag-diffúziós módszer.

## EREDMÉNYEK

A kísérlet során 21 antibakteriális hatóanyagot vizsgáltunk. Az új táptalajok ellenőrzésekor a hatóanyagok Müller-Hinton- (MH-) táptalajon kapott gátlási zónáinak átmérője volt a viszonyítási alap (100%). A vizsgált 4 aminoglikozid közül a neomycin gátlási zónája 144–164%, a gentamyciné 167–200% volt az új táptalajokon (1. táblázat). A kanamycin a B<sub>Sg</sub> pH 6 táptalaj alkalmazásakor ugyanakkora átmérőben gátolta a *B. subtilis* fejlődését, mint a MH-táptalajon vizsgálva. A B<sub>Sg</sub> pH 8 táptalajon és a B<sub>Sp</sub> pH 6 és pH 8 táptalajokon viszont nagyobbak, 191–211% voltak az átmérők viszonyított értékei. A streptomycin a B<sub>Sg</sub> pH 8 és a B<sub>Sp</sub> pH 8 táptalajokon nem eredményezett nagyobb gátlási zónát, mint a MH-táptalajon vizsgálva. Ezzel szemben a B<sub>Sg</sub> pH 6 és a B<sub>Sp</sub> pH 6 új táptalajokon nagyobb gátlási zónák alakultak ki (163%). Az aminoglikozid hatóanyagok esetén tehát a vizsgált táptalajok összetétele jelentősen befolyásolta a gátlási zóna átmérőjét.

A vizsgálatba vont 5 penicillin (methicillin, oxacillin, ampicillin, penicillin G, cloxacillin) valamennyi új táptalajon nagyobb átmérőben gátolta a *B. subtilis* fejlődését (129–260%), mint a MH-táptalajon (2. táblázat). Ugyanez mondható el a további 12 antibakteriális hatóanyag esetén is, ahol az értékek 118–400% között voltak.

Bakteriális kontamináció esetén a zavaró telepek csak a MH-táptalajon voltak kimutathatók, a szintetikus táptalajokon nem.

**A *Bacillus subtilis* törzset 26 °C-on, 10 napon át indukálták, majd meghatározták a spóraszámot**

**A kísérletben 21 antibakteriális hatóanyagot vizsgáltak**

**1. TÁBLÁZAT.** Aminoglikozidok mikrobiológiai vizsgálata. A gátlási zónák mérete 24 órás *B. subtilis* tenyészetet tartalmazó táptalajon (mm)

**TABLE 1.** Microbiological assay of aminoglycosides. Size of the inhibitory zones on the medium containing *B. subtilis* after 24 h incubation (mm)

Aminoglikozidok	Aminoglikozidok					Aminoglikozidok				
	MH	BSg	% <sub>1</sub>	BSp	2%	MH	BSg	1%	BSp	% <sub>2</sub>
1. Kanamycin	9	9	100	19	211	11	21	191	22	200
2. Neomycin	9	13	144	14	156	11	18	164	18	164
3. Streptomycin	8	13	163	13	163	11	11	100	10	91
4. Gentamycin	7	14	200	14	200	9	15	167	15	167

MH: Müller–Hinton agar, %<sub>1</sub> a BSg agaron mért gátlási zóna átmérője a Müller–Hinton-agaron mért gátlási zónához viszonyítva %-ban; %<sub>2</sub>; a BSp-agaron mért gátlási zóna átmérője a Müller–Hinton-agaragaron mért gátlási zónához viszonyítva %-ban.

**2. TÁBLÁZAT.** Nem aminoglikozid antimikrobiális hatóanyagok mikrobiológiai vizsgálata

**TABLE 2.** Microbiological assay of antimicrobials other than aminoglycosides

Antimikrobiális szerek	pH 6,0					pH 8,0				
	MH	BSg	% <sub>1</sub>	BSp	% <sub>2</sub>	MH	BSg	% <sub>1</sub>	BSp	% <sub>2</sub>
1. Methicillin	4	8	200	6	150	4	10	250	8	200
2. Oxacillin	11	16	146	16	145	8	16	200	16	200
3. Ampicillin	17	22	129	24	141	16	22	138	25	156
4. Penicillin	10	18	180	22	220	11	15	136	22	200
5. Cloxacillin	10	25	250	26	260	10	20	200	20	200
6. Erythromycin	3	10	333	12	400	8	14	175	14	175
7. Chlortetracyclin	8	26	325	31	388	8	16	200	18	225
8. Chloramphenicol	11	19	173	23	209	13	19	146	18	138
9. Polymixin B	3	6	200	6	200	4	7	175	7	175
10. Cefalexin	11	13	118	23	209	9	20	222	13	144
11. Lincomycin	5	7	140	7	140	6	7	117	9	150
12. Nitrofurantoin	13	21	162	29	223	12	19	158	21	175
13. Sulfadimidin	6	19	317	19	317	8	25	313	25	313
14. Cefoperazon	12	17	142	20	167	9	17	189	18	200
15. Tetracyclin	10	21	210	21	210	10	19	190	20	200
16. Nalidixsav	14	21	150	23	164	10	20	200	20	200
17. Ampicillin és Oxacillin	11	18	164	20	182	10	15	150	16	160

MH: Müller–Hinton agar, %<sub>1</sub> a BSg agaron mért gátlási zóna átmérője a Müller–Hinton-agaron mért gátlási zónához viszonyítva %-ban; %<sub>2</sub>; a BSp-agaron mért gátlási zóna átmérője a Müller–Hinton-agaragaron mért gátlási zónához viszonyítva %-ban.

## MEGVITATÁS

Az antimikrobiális maradékanyagok kimutatására alkalmas agarlemez-módszerek a baktérium gátlási zóna mérésén és értékelésén alapulnak. A módszer hatékonyságának növelése céljából négy szintetikus táptalaj előállítására és vizsgálatára került sor, amelyek ammóniumsót mint nitrogénforrást, glükózt és nátrium-piruvátot mint szénforrást tartalmaztak. A kísérleti táptalajok az antimikrobiális anyagok jobb diffúzióját tették lehetővé, ezért a gátlási zónák szignifikánsan nagyobbak voltak.

A vizsgált szintetikus táptalajok közül a BSp pH 6,0 ajánlható leginkább az antimikrobiális hatóanyagok kimutatására. Ezt a táptalajt használva mind a 21 vizsgált hatóanyag szignifikánsan nagyobb gátlási zónát adott *B. subtilis*

*A kísérleti táptalajok az antimikrobiális anyagok jobb diffúzióját tették lehetővé*

esetén, mint a hagyományos MH-táptalaj. A gátlás átmérőjének viszonyított értéke a BSp pH 6.0 esetén 140–400% voltak. Összefoglalva ez a tápközeg nagyobb érzékenységűnek bizonyult az antibiotikum korongdiffúziós tesztben, mint az MH-agar. További előnye az új táptalajnak, hogy erősen szelektív tulajdonsága miatt a szennyező baktériumok kevésbé ronthatják a vizsgálatokat, mint a Müller-Hinton-agar esetében.

## IRODALOM

1. BOGAERTS, R. – WOLF, F.: A standardised method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. *Fleischwirtschaft*, 60, 672–673. (1980)
2. CURRIE, D. – LYNAS, L. et al.: Evaluation of a modified EC Four Plate Method to detect antimicrobial drugs. *Fd Addit. Contam.*, 15, 651–660. (1998)
3. EU(2010): Commission Regulation No. 37/2010 of 22<sup>nd</sup> December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
4. FERRINI, A.M. – MANNONI, V. – AURELI, P.: Combined Plate Microbial Assay (CPMA): a 6-plate-method for simultaneous first and second level screening of antibacterial residues in meat. *Fd Addit. Contam.*, 23, 16–24. (2006)
5. HUSSEIN, K.: Experimental design for the microbiological four plate method test for the detection of sulphonamidine residues at the level of concern. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 48, 403–407. (2004)
6. KILINC, B. – CAKLI, S.: Screening for antibiotic residues in the trout by the Four Plate test, Premi test and ELISA test. *Eur. Fd Res. Technol.*, 226, 795–799. (2008)
7. KIRBIS, A.: Microbiological 5-plate screening method for detection of tetracyclines, aminoglycosides, cephalosporins and macrolides in milk. *Slovenian Vet Res.*, 43, 161–168. (2006)
8. OKERMAN, L. – VAN HOOF, J. – DEBEUCKELAERE, W.: Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *J AOAC Int.*, 81, 51–56. (1998)
9. PIKKEMAAT, M.G.: Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal. Bioanal. Chem.*, 395, 893–905. (2009)
10. SCHOEVERS, E.J. – TERLOU, M. et al.: An image analysis system: an objective and accurate alternative for reading the agar diffusion test. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 17, 38–42. (1994)

Közlésre érke.: 2015. jan. 21.