



Sprawozdanie roczne

D/2018

R/8

Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

Raport cząstkowy R/8

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Określenie warunków etapów produkcyjnych w celu zminimalizowania zanieczyszczenia, które może niekorzystnie wpłynąć na działanie wskaźników biologicznych, tj.: temperatury, wilgotności, ciśnienia, czystości powietrza itp.

Spis treści

1. Opracowanie charakterystyki wytrzymałości na ekspozycję oraz warunki procesów sterylizacji opakowania pierwotnego (ampułki) oraz zaszczerpionego nośnika.....	4
2. Określenie warunków etapów produkcyjnych w celu zminimalizowania zanieczyszczenia, które może niekorzystnie wpłynąć na działanie wskaźników biologicznych, takich jak temperatury, wilgotności, ciśnienia, czystości powietrza, itp.....	5
2.1. Badanie stanu mikrobiologicznego pomieszczeń.....	5
2.2. Badanie poziomu wilgotności względnej pomieszczeń Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności.	21
3. Ocena wytrzymałości na ekspozycję oraz warunki procesów sterylizacji wskaźnika (używanego do pomiaru ilości ATP).	28
4. Spis literatury	32
5. Spis tabel	33
6. Spis rysunków	33

1. Opracowanie charakterystyki wytrzymałości na ekspozycję oraz warunki procesów sterylizacji opakowania pierwotnego (ampułki) oraz zaszczepionego nośnika.

W celu opracowania charakterystyki wytrzymałości na ekspozycję oraz warunki procesów sterylizacji zaszczepionego nośnika (spor *Geobacillus stearothermophilus*), rozszerzono badania wykonane w poprzednim etapie projektu (Raport R/7, część II, pkt 3). Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom sterylizacji parowej przeprowadzono dla autoklawu SMS (warunki sterylizacji parowej dla autoklawu to 121⁰C, czynnik jałowiący – przegrzana para wodna). Wydłużono jednak czasy ekspozycji do 120 minut (tabela 1). Próba właściwa zawierała 10⁶ jtk/g, co jest zgodne z punktem 6.3.2 normy ISO 11138-1.

Tabela 1. Liczebność spor *Geobacillus stearothermophilus* uzyskana w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy SMS).

czas ekspozycji [min]	Liczebność [jtk/g]				
	Powtórzenie				
	1	2	3	4	5
0	6,1*10 ⁶	6*10 ⁶	6,1*10 ⁶	6,2*10 ⁶	5,9*10 ⁶
5	4*10 ⁶	4,1*10 ⁶	4,3*10 ⁶	4,4*10 ⁶	4,1*10 ⁶
10	2*10 ⁶	2,1*10 ⁶	2,2*10 ⁶	2*10 ⁶	2,2*10 ⁶
15	0	1,1*10 ⁶	1,9*10 ⁶	0	0
20	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0
60	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
120	0	0	0	0	0

Czas zabicia wszystkich form przetrwalnych wynosił 20 min.

2. Określenie warunków etapów produkcyjnych w celu zminimalizowania zanieczyszczenia, które może niekorzystnie wpłynąć na działanie wskaźników biologicznych, takich jak temperatury, wilgotności, ciśnienia, czystości powietrza, itp.

Wszystkie doświadczenia prowadzone w ramach niniejszego projektu realizowane były w warunkach temperatury pokojowej i normalnego ciśnienia atmosferycznego. Badania czystości mikrobiologicznej powietrza oraz powierzchni roboczych wykonywano w odstępach 2 miesięcy. Pomiary wilgotności względnej wykonywano raz na kwartał.

2.1. Badanie stanu mikrobiologicznego pomieszczeń

W okresie od września 2016 roku do marca 2018r prowadzono badania stanu mikrobiologicznego pomieszczeń (Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności), w których realizowane były w ramach projektu prace badawcze. Badania obejmowały następujące pomieszczenia:

- Pokój 20 – komora laminarna
- Mikrobiologia (pokój 16)
- Pomieszczenie z autoklawami (pokój 15)
- Pomieszczenie chłodnicze (pokój 23)
- Hala półtechniki
- Pracownia biochemiczna (pokój 30 - pokój wagowy, pomieszczenie w którym znajduje się spektrofotometr)

W celu oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów (mezofilnych i psychrofilnych) oraz liczby drożdży i pleśni, wykonano posiewy mikrobiologiczne z powietrza metodą płytkową Kocha. Do oznaczeń wykorzystano podłoże bulionowe z dodatkiem 2 % glukozy i 2% agaru oraz podłoże z chloramfenikolem (oznaczanie pleśni i drożdży). Przygotowane płytki Petriego ekspozowano przez 15 min., następnie zamykano wieczkiem i przenoszono do termostatu.

Po inkubacji liczono wyrosłe kolonie oraz obliczano liczbę drobnoustrojów (x) w 10 dm³ powietrza według wzoru:

$$x = \frac{a * 100}{b * c}$$

gdzie:

- a- średnia arytmetyczna z liczby kolonii wyrosłych na dwóch płytkach z tym samym podłożem;
- b- powierzchnia płytki w cm²;
- c- współczynnik czasu ekspozycji płytki (dla 15 min. c = 3)

Oznaczenia wykonano zgodnie z zaleceniami zawartymi w normach:

- PN-89/Z-04111/01:01:1989
- PN-89/Z-04111/02:1989
- PN-89/Z-04111/03:1989
- PN-89/Z-04008/08:1989

W czasie trwania projektu wykonywano także wymazy z powierzchni roboczych (10 x 10 cm). Przed oznaczeniem sterylny tampon z waty wkładano do kolby zawierającej 25 cm³ jałowej soli fizjologicznej. Następnie odcisniętym tamponem przecierano dokładnie powierzchnię ograniczoną jałowym szablonem. Tampon wrzucano z powrotem do kolbki ze solą, wstrząsano przez 2 min z otrzymanej zawiesiny wykonywano posiewy. Po okresie inkubacji obliczano liczbę drobnoustrojów przypadającą na 1 cm² badanej powierzchni.

Uzyskane wyniki oceny stanu mikrobiologicznego powietrza zestawiono w tabelach 2-7. W II kwartale 2018 roku zwiększono częstotliwość badań powietrza (badania raz w tygodniu), co związane było z realizacją etapu 3, który obejmował m.in. określenie warunków etapów produkcyjnych w celu zminimalizowania zanieczyszczenia, które może niekorzystnie wpłynąć na działanie wskaźników biologicznych, tj. temperatury, wilgotności, ciśnienia i czystości powietrza. Szczegółowe dane dotyczące czystości mikrobiologicznej dla II kwartału przedstawiono w tabelach 6-7. Obecnie nie ma w Polsce aktów prawnych i normatywnych dotyczących czynników biologicznych – mikroorganizmów w powietrzu. Nie

ma wyznaczonych wartości progowych zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Zespół Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisja ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych, podał propozycje dopuszczalnej liczebności drobnoustrojów w powietrzu [Chmiel, 2015]. Wg tych zaleceń wartości referencyjne w pomieszczeniach mieszkalnych i użyteczności publicznej oraz w powietrzu atmosferycznym są następujące:

- Całkowita liczba bakterii mezofilnych 5000 jtk/m³
- Grzyby - 5000 jtk/m³

Z danych przedstawionych w tabelach 2-7 wynika, że w żadnym z badanych pomieszczeń, w których odbywały się prace projektowe zalecane wartości referencyjne nie zostały przekroczone. Największe zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza stwierdzono w hali póltechniki, która stanowi dużą, częściowo otwartą przestrzeń. Prowadzono tutaj zamknięte hodowle bioreaktorowe, w związku z tym zanieczyszczenie powietrza nie odgrywało tutaj kluczowej roli. Również w pracowni biochemicznej (pokój 30), gdzie wykonywano pomiary spektrofotometryczne oraz naważono związki chemiczne, okresowo wykazywano skażenia powietrza na poziomie 500-600 jtk/ m³ (np. wrzesień, listopad 2016). W innych okresach roku poziom zanieczyszczeń w tym pomieszczeniu wynosił poniżej 100 jtk/ m³ (np. marzec, maj 2017). Zwiększona częstotliwość badań czystości mikrobiologicznej powietrza w II kwartale 2018 roku nie wykazała istotnych różnic w stosunku do pomiarów prowadzonych w ciągu całego czasu trwania projektu. Nie stwierdzono wpływu stopnia zanieczyszczenia powietrza w badanych pomieszczeniach na działanie wskaźników biologicznych.

Tabela 2. Stan mikrobiologiczny powietrza (wrzesień 2016-styczeń 2017)

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/m³]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/m³]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/m³]
Wrzesień 2016r	Pokój 20	30,1	n/o	54,2
	Mikrobiologia	52,4	n/o	78,65
	Pokój 15	26,21	n/o	104,84
	Chłodnia	n/o	183,5	235,9
	Hala półtechniki	2490,05	n/o	157,27
	Pokój 30	550,44	n/o	131,86
Listopad 2016 r.	Pokój 20	45,6	n/o	26,21
	Mikrobiologia	104,83	n/o	30,1
	Pokój 15	52,4	n/o	78,65
	Chłodnia	n/o	55,6	78,4
	Hala półtechniki	2254,2	n/o	74,6
	Pokój 30	602,87	n/o	52,33
Styczeń 2017 r.	Pokój 20	21,4	n/o	14,5
	Mikrobiologia	94,5	n/o	22,3
	Pokój 15	29,4	n/o	63,1
	Chłodnia	n/o	50,0	24,3
	Hala półtechniki	1995,2	n/o	68,3
	Pokój 30	547,33	n/o	44,7

n/o – nie oznaczano

Tabela 3. Stan mikrobiologiczny powietrza (marzec 2017- lipiec 2017)

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/m³]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/m³]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/m³]
Marzec 2017r	Pokój 20	0	n/o	10,11
	Mikrobiologia	0	n/o	26,21
	Pokój 15	0	n/o	29,00
	Chłodnia	n/o	209,7	157,27
	Hala półtechniki	183,5	n/o	78,65
	Pokój 30	78,65	n/o	183,5
Maj 2017 r.	Pokój 20	0	n/o	15,66
	Mikrobiologia	0	n/o	30,32
	Pokój 15	0	n/o	132,44
	Chłodnia	n/o	210,3	131,86
	Hala półtechniki	131,86	n/o	131,86
	Pokój 30	87,44	n/o	177,6
Lipiec 2017 r.	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	27,9	n/o	0
	Pokój 15	0	n/o	170,5
	Chłodnia	n/o	n/o	140,10
	Hala półtechniki	205,4	n/o	209,7
	Pokój 30	0	n/o	197,6

n/o – nie oznaczano

Tabela 4. Stan mikrobiologiczny powietrza (wrzesień 2017-styczeń 2018)

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/m³]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/m³]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/m³]
Wrzesień 2017r	Pokój 20	0	n/o	27,5
	Mikrobiologia	24,5	n/o	64,5
	Pokój 15	38,6	n/o	78,4
	Chłodnia	n/o	75,4	194,5
	Hala półtechniki	2000,0	n/o	166,0
	Pokój 30	450,6	n/o	110,0
Listopad 2017r.	Pokój 20	23,1	n/o	16,2
	Mikrobiologia	62,5	n/o	28,5
	Pokój 15	40,5	n/o	65,4
	Chłodnia	n/o	50,6	86,5
	Hala półtechniki	1955	n/o	44,2
	Pokój 30	245,5	n/o	69,8
Styczeń 2018 r.	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	23,5	n/o	0
	Pokój 15	33,5	n/o	27,5
	Chłodnia	n/o	37,9	65,5
	Hala półtechniki	15422	n/o	78,4
	Pokój 30	347,3	n/o	36,4

n/o – nie oznaczano

Tabela 5. Stan mikrobiologiczny powietrza (marzec 2018)

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/m³]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/m³]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/m³]
Marzec 2018r	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	35,4	n/o	78,9
	Pokój 15	27,5	n/o	0
	Chłodnia	n/o	45,8	27,5
	Hala półtechniki	547,5	n/o	184,0
	Pokój 30	199,6	n/o	44,7

n/o – nie oznaczano

Tabela 6 Stan mikrobiologiczny powietrza (kwiecień, maj 2018)

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/m³]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/m³]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/m³]
Kwiecień 2018r I tydzień	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	24,0	n/o	26,0
Kwiecień 2018r II tydzień	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	0	n/o	0
Kwiecień 2018r III tydzień	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	27,0	n/o	30,1
Kwiecień 2018r IV tydzień	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	26,0	n/o	22,3
Maj 2018r I tydzień	Pokój 20	20,0	n/o	0
	Mikrobiologia	23,5	n/o	26,2
Maj 2018r II tydzień	Pokój 20	10,0	n/o	0
	Mikrobiologia	35,0	n/o	0

n/o – nie oznaczano

Tabela 7. Stan mikrobiologiczny powietrza (maj, czerwiec 2018)

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/m³]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/m³]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/m³]
Maj 2018r III tydzień	Pokój 20	20,0	n/o	0
	Mikrobiologia	23,0	n/o	28,0
Maj 2018r IV tydzień	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	17,0	n/o	0
Czerwiec 2018r I tydzień	Pokój 20	0	n/o	0
	Mikrobiologia	25,0	n/o	23,0
Czerwiec 2018r II tydzień	Pokój 20	10,0	n/o	0
	Mikrobiologia	28,0	n/o	0
Czerwiec 2018r III tydzień	Pokój 20	20,0	n/o	0
	Mikrobiologia	30,0	n/o	0
Czerwiec 2018r IV tydzień	Pokój 20	15,0	n/o	0
	Mikrobiologia	15,0	n/o	10,0

n/o – nie oznaczano

W Polsce nie ma aktów prawnych i normatywnych dotyczących czystości mikrobiologicznej powierzchni produkcyjnych. Dla przemysłu spożywczego zalecenia PZH, określają, że powierzchnia jest czysta jeżeli jest poniżej 10 jtk/cm². Dla standardów medycznych [European GMP Standard, Annex 1, 2003] na powierzchni powinno być mniej niż 1 CFU 55mmm płytką (oznaczenie metodą odciskową) dla klasy A, a poniżej 25 dla klasy B. Wyniki badań czystości mikrobiologicznej powierzchni roboczych przedstawiono w tabelach 8-13. Analizy takie prowadzono w ciągu całego okresu trwania projektu, jednakże w II kwartale 2018 roku zwiększono ich częstotliwość do analizy tygodniowej.

Dla większości badanych powierzchni nie liczebność mikroorganizmów nie przekraczała 10 na cm². Najwięcej doświadczeń projektowych wykonywano w pomieszczeniach: pokój 20 i pracownia mikrobiologii, gdzie ogólna liczba bakterii mezofilnych jak i liczba drożdży i pleśni nie przekraczała poziomu 10/cm². Zwiększenie częstotliwości badań nie spowodowało wystąpienia istotnych zmian. Nie stwierdzono istotnego wpływu stopnia zanieczyszczenia powierzchni w badanych pomieszczeniach na działanie wskaźników biologicznych.

Tabela 8. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/cm²]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/cm²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm²]
Wrzesień 2016r	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	1,0*10 ¹	<10
	Hala półtechniki	1,2*10 ¹	n/o	1,1*10 ¹
	Pokój 30	<10	n/o	<10
Listopad 2016 r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	<10	1,0*10 ¹
	Hala półtechniki	1,1*10 ¹	n/o	1,1*10 ¹
	Pokój 30	<10	n/o	<10
Styczeń 2017 r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	1,0*10 ¹	<10
	Hala półtechniki	<10	n/o	1,0*10 ¹
	Pokój 30	<10	n/o	1,0*10 ¹

n/o – nie oznaczane

Tabela 9. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/cm²]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/cm²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm²]
Marzec 2017r	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	2,0*10 ¹
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	1,1*10 ¹	7,0*10 ¹
	Hala półtechniki	<10	n/o	<10
	Pokój 30	<10	n/o	1*10 ¹
Maj 2017 r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	3,0*10 ¹
	Chłodnia	n/o	<10	3,0*10 ¹
	Hala półtechniki	2,0*10 ¹	n/o	1,0*10 ¹
	Pokój 30	1,0*10 ¹	n/o	7,0*10 ¹
Lipiec 2017r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	1,0*10 ¹
	Pokój 15	<10	n/o	2,0*10 ¹
	Chłodnia	n/o	<10	<10
	Hala półtechniki	<10	n/o	4,0*10 ¹
	Pokój 30	<10	n/o	<10

n/o – nie oznaczane

Tabela 10. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/cm²]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/cm²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm²]
Wrzesień 2017r	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	1,0*10 ¹	n/o	2,0*10 ¹
	Pokój 15	2,0*10 ¹	n/o	6,0*10 ¹
	Chłodnia	n/o	2*10 ¹	3,0*10 ¹
	Hala półtechniki	<10	n/o	<10
	Pokój 30	<10	n/o	<10
Listopad 2017 r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	1,0*10 ¹	2,0*10 ¹
	Hala półtechniki	<10	n/o	1,0*10 ¹
	Pokój 30	2,3*10 ²	n/o	8,0*10 ¹
Styczeń 2018r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	1,0*10 ¹	<10
	Hala półtechniki	4,0*10 ¹	n/o	1,0*10 ¹
	Pokój 30	1,2*10 ²	n/o	2,0*10 ¹

n/o – nie oznaczane

Tabela 11. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/cm²]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/cm²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm²]
Marzec 2018r	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	2,3*10 ¹	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	2,0*10 ¹	1,0*10 ¹
	Hala półtechniki	9,2*10 ¹	n/o	7,6*10 ¹
	Pokój 30	2,4*10 ²	n/o	<10
Maj 2018r.	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
	Pokój 15	<10	n/o	<10
	Chłodnia	n/o	1,0*10 ¹	<10
	Hala półtechniki	3,2*10 ¹	n/o	<10
	Pokój 30	1,0*10 ¹	n/o	<10

n/o – nie oznaczane

Tabela 12. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/cm²]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/cm²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm²]
Kwiecień 2018r I tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Kwiecień 2018r II tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Kwiecień 2018r III tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Kwiecień 2018r IV tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Maj 2018r I tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Maj 2018r II tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10

n/o – nie oznaczane

Tabela 13. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.

Data	Pomieszczenie	Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych [jtk/cm²]	Ogólna liczba drobnoustrojów psychrofilnych [jtk/cm²]	Liczba drożdży i pleśni [jtk/cm²]
Maj 2018r III tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Maj 2018r IV tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Czerwiec 2018r I tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Czerwiec 2018r II tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Czerwiec 2018r III tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10
Czerwiec 2018r IV tydzień	Pokój 20	<10	n/o	<10
	Mikrobiologia	<10	n/o	<10

n/o – nie oznaczane

2.2. Badanie poziomu wilgotności względnej pomieszczeń Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności.

Polskie przepisy nie określają poziomu wilgotności powietrza na stanowiskach pracy i w pomieszczeniach produkcyjnych. Jedynie Polska Norma PN-EN 13779:2008 – Wentylacja budynków niemieszkalnych – Wymagania dotyczące właściwości instalacji wentylacji i klimatyzacji, podaje, że w typowym zakresie temperatury powietrza w pomieszczeniu 20°C ÷ 26°C, parowanie odgrywa drugorzędną rolę w utrzymywaniu temperatury ciała ludzkiego, gdy wilgotność względna powietrza wynosi od 30% do 70%.

W okresie od września 2016 roku do marca 2018 r prowadzono badania poziomu wilgotności względnej pomieszczeń (Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności), w których realizowane były w ramach projektu prace badawcze. Badania obejmowały następujące pomieszczenia:

- Pokój 20 – komora laminarna
- Mikrobiologia (pokój 16)
- Pomieszczenie z autoklawami (pokój 15)
- Pomieszczenie chłodnicze (pokój 23)
- Hala półtechniki
- Pomieszczenie dla Doktorantów (pokój 30 - pokój wagowy, pomieszczenie w którym znajduje się spektrofotometr)

Od kwietnia do czerwca 2018 zwiększono częstotliwość pomiarów (pomiaru temperatury i wilgotności wykonywano przez 5 dni w tygodniu, ok. godz.12.00). Pomiaru wilgotności względnej dokonywano za pomocą higrometru – Hygro –Thermometer HD2101.2, a wyniki przedstawiono w tabelach 14-17. Wilgotność względna kształtowała się na poziomie RH= 30-50% i mieściła się w granicach normy PN-EN 13779:200. Zwiększenie częstotliwości badań potwierdziło uzyskane wcześniej wyniki. Wahania wilgotności spowodowane były różnymi temperaturami w badanych pomieszczeniach i były uzależnione od warunków atmosferycznych i pory roku, jednak nie wpływały one na badania prowadzone w ramach projektu.

Tabela 14. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry.

Data	Pomieszczenie	Wilgotność względna [% RH]	Temperatura pomieszczenia [°C]
Wrzesień 2016 r.	Pokój 20	38,0	24
	Mikrobiologia	35,6	24
	Pokój 15	37,5	22
	Chłodnia	36,4	5
	Hala półtechniki	34,0	25
	Pokój 30	39,1	22
Styczeń 2017 r.	Pokój 20	37,0	23
	Mikrobiologia	36,4	22
	Pokój 15	38,0	22
	Chłodnia	38,0	4
	Hala półtechniki	36,4	23
	Pokój 30	40,2	23
Maj 2017 r.	Pokój 20	40,0	21
	Mikrobiologia	43,2	22
	Pokój 15	42,1	21
	Chłodnia	39,5	5
	Hala półtechniki	40,2	23
	Pokój 30	45,6	22
Wrzesień 2017 r.	Pokój 20	41,5	24
	Mikrobiologia	45,6	24
	Pokój 15	44,6	23
	Chłodnia	41,2	5
	Hala półtechniki	41,1	25
	Pokój 30	45,6	24

Tabela 15. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry c.d.

Data	Pomieszczenie	Wilgotność względna [% RH]	Temperatura pomieszczenia [°C]
Styczeń 2018 r.	Pokój 20	42,3	23
	Mikrobiologia	40,1	22
	Pokój 15	47,6	21
	Chłodnia	44,5	5
	Hala póltechniki	44,5	23
	Pokój 30	50,4	22
Marzec 2018 r.	Pokój 20	32,5	29
	Mikrobiologia	32,9	28
	Pokój 15	31,9	27
	Chłodnia	33,0	5
	Hala póltechniki	31,0	29
	Pokój 30	38,8	26

Tabela 16. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry c.d.

Data	Pomieszczenie	Wilgotność względna [% RH]	Temperatura pomieszczenia [°C]
Kwiecień 2018r I tydzień	Pokój 20	37,38,39,40,40	24,23,24,23,22
	Mikrobiologia	37,38,39,40,40	24,23,24,23,22
Kwiecień 2018r II tydzień	Pokój 20	37,37,39,39,40	22,21,22,20,23
	Mikrobiologia	37,37,39,39,40	22,21,22,20,23
Kwiecień 2018r III tydzień	Pokój 20	39,40,41,42,40	22,22,23,22,24
	Mikrobiologia	39,40,41,42,40	22,22,23,22,24
Kwiecień 2018r IV tydzień	Pokój 20	37,39,38,36,40	20,21,22,22,24
	Mikrobiologia	37,39,38,36,40	20,21,22,22,24
Maj 2018r I tydzień	Pokój 20	39,39,39,42,41	22,22,22,24,24
	Mikrobiologia	39,39,39,42,41	22,22,22,24,24
Maj 2018r II tydzień	Pokój 20	40,41,40,41,40	22,22,22,22,22
	Mikrobiologia	40,41,40,41,40	22,22,22,22,22

(pomiary temperatury i wilgotności wykonywano przez 5 dni w tygodniu, ok. godz.12.00)

Tabela 17. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry c.d.

Data	Pomieszczenie	Wilgotność względna [% RH]	Temperatura pomieszczenia [°C]
Maj 2018r III tydzień	Pokój 20	37,37,40,42,40	24,24,24,23,23
	Mikrobiologia	37,37,40,42,40	24,24,24,23,23
Maj 2018r IV tydzień	Pokój 20	43,44,45,41,45	23,23,22,24,24
	Mikrobiologia	43,44,45,41,45	23,23,22,24,24
Czerwiec 2018r I tydzień	Pokój 20	41,42,43,44,43	25,24,24,23,23
	Mikrobiologia	41,42,43,44,43	25,24,24,23,23
Czerwiec 2018r II tydzień	Pokój 20	42,43,45,45,41	24,24,23,25,24
	Mikrobiologia	42,43,45,45,41	24,24,23,25,24
Czerwiec 2018r III tydzień	Pokój 20	44,43,44,43,45	24,23,24,23,25
	Mikrobiologia	44,43,44,43,45	24,23,24,23,25
Czerwiec 2018r IV tydzień	Pokój 20	42,42,42,44,44	23,23,23,24,24
	Mikrobiologia	42,42,42,44,44	23,23,23,24,24

(pomiary temperatury i wilgotności wykonywano przez 5 dni w tygodniu, ok. godz.12.00)

W celu określenia wpływu wilgotności otoczenia na stan fizjologiczny spor *Geobacillus stearothermophilus*, komórki te umieszczano w układzie doświadczalnym, w którym panowały określone warunki – tabela 18. Układy te przechowywano w trzech różnych temperaturach - 15°C, 20°C i 30°C. W celu uzyskania określonych poziomów wilgotności, przygotowano trzy rodzaje roztworów - **MgCl₂**, **K₂CO₃**, **KCl**, które przelano do szczelnych ampulek, w których umieszczono endorfy ze sporami. Układy te przechowywano (w odpowiednich temperaturach) przez okres 3 miesięcy. Po tym czasie wykonano posiewy mikrobiologiczne, w których wykazano, że liczba spor nie uległa zmianie i utrzymywała się na poziomie 10⁶ jtk/g (tabela 19).

Tabela 18. Warunki panujące w układzie doświadczalnym.

Temperatura [°C]	Wilgotność względna [% RH]		
	MgCl ₂	K ₂ CO ₃	KCl
15	33,30 ± 0,21	43,15 ± 0,33	85,92 ± 0,33
20	33,07 ± 0,18	43,16 ± 0,33	85,11 ± 0,29
30	32,44 ± 0,14	43,17 ± 0,50	83,62 ± 0,25

Rysunek 1. Układy doświadczalne.

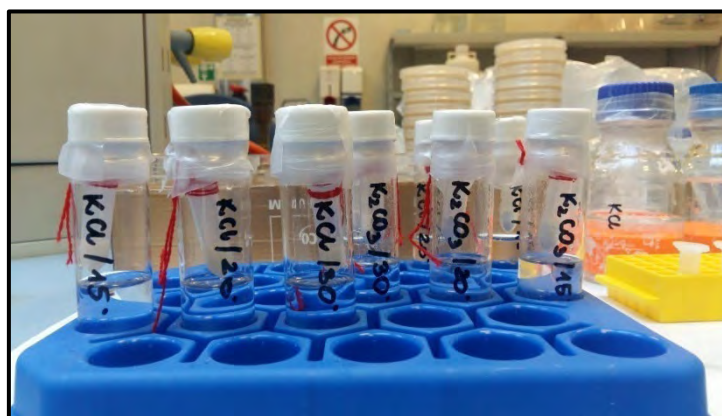


Tabela 19. Wyniki posiewów mikrobiologicznych układów doświadczalnych (spory przechowywane w zmiennych wartościach wilgotności).

Temperatura [°C]	Wilgotność względna [% RH]	OLD _{przetrwalikujących} [jtk/g] W dniu założenia doświadczenia	OLD _{przetrwalikujących} [jtk/g] po 3 miesiącach przechowywania	OLD _{przetrwalikujących} [jtk/g] Po 6 miesiącach przechowywania
15	33,30 ± 0,21	7*10 ⁶	6,6*10 ⁶	3,6*10 ⁶
20	33,07 ± 0,18		7,0*10 ⁶	3,7*10 ⁶
30	32,44 ± 0,14		6,9*10 ⁶	2,9*10 ⁶
15	43,15 ± 0,33		5,9*10 ⁶	3,3*10 ⁶
20	43,16 ± 0,33		6,8*10 ⁶	4,1*10 ⁶
30	43,17 ± 0,50		6,8*10 ⁶	4,8*10 ⁶
15	85,92 ± 0,33		6,2*10 ⁶	4,5*10 ⁶
20	85,11 ± 0,29		6,4*10 ⁶	4,5*10 ⁶
30	83,62 ± 0,25		6,8*10 ⁶	4,5*10 ⁶

3. Ocena wytrzymałości na ekspozycję oraz warunki procesów sterylizacji wskaźnika (używanego do pomiaru ilości ATP).

Celem doświadczenia było określenie wpływu temperatury na czułość oznaczenia kompleksu Lucyferyna/Lucyferaza (firmy Promega). Badaniom poddano 6 wariantów przechowalniczych w/w wskaźnika:

1. Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza poddany procesowi sterylizacji termicznej (121°C/20 min)
2. Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza poddany procesowi sterylizacji termicznej (134°C/7 min)
3. Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza poddany procesowi inkubacji termicznej (55°C/25 min)
4. Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza przechowywany w temperaturze 21°C przez czas 12 h
5. Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza przechowywany w temperaturze 4°C przez czas 12 h
6. Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza przygotowany bezpośrednio przed pomiarem (przechowywanie uprzednio w temperaturze zalecanej przez producenta -20°C)

Test przechowalniczy przeprowadzono z wykorzystaniem bioluminescencyjnego pomiaru ilości ATP. Do jego wykonania użyto zawieszonych w jałowej wodzie destylowanej spor *Geobacillus stearothermophilus* (10^6 jtk/ml). Spory te uprzednio zawieszono w zoptymalizowanej pożywce mikrobiologicznej III (z dodatkiem germinantów), a następnie inkubowano w termobloku w temperaturze 55°C. W 0 oraz 25 minucie inkubacji pobierano próbę do której dodawano wskaźnik w stosunku 1:1 (kompleks Lucyferyna/Lucyferaza). Całość mieszano a następnie dokonywano pomiaru ilości ATP [RLU] (Lumac).

W tabeli 20 przedstawiono uzyskane wyniki doświadczenia. Wykonana ocena wytrzymałości na ekspozycję oraz procesy sterylizacji potwierdziły zalecenia producenta wskaźnika (kompleksu Lucyferyna/Lucyferaza) mówiące o parametrach przechowywania tego komponentu. Dla przechowywanego w minus 20°C wskaźnika uzyskiwano najwyższą czułość oznaczenia – 25 minutowa inkubacja układu spory + medium germiacyjne (w temperaturze 55°C), a następnie dodanie w stosunku 1:1 kompleksu Lucyferyna/Lucyferaza pozwoliło na uzyskanie ponad 290000 RLU (przy wyjściowym poziomie \pm 10000 RLU).

Dodanie do inkubowanego układu kompleksu ówczśnie przechowywanego przez 12 h w temperaturze 4°C, w temperaturze 21°C oraz w temperaturze 55°C (przez 25 minut), skutkowało zmniejszeniem czułości oznaczenia, odpowiednio o 3%, 10% i 30% (w stosunku do kompleksu przechowywanego w parametrach określonych przez producenta wskaźnika). Wartości te jednak nadal były wysokie i charakteryzowały się co najmniej 20-krotnym przyrostem ilości wydzielanego ATP (w stosunku do testu, w którym dane warianty wskaźnika dodano do spor nieinkubowanych).

W przypadku potraktowania wskaźnika sterylizacją parową (odpowiednio: 121°C/20min oraz 134°C/7 min), uzyskano wyniki, które nie korelowały z wyżej opisanymi wartościami. W obu przypadkach (zarówno przy dodatku wskaźnika do spor nieinkubowanych jak i inkubowanych) uzyskane wyniki oscylowały na poziomie bliskim zero co świadczy o całkowitym rozpadzie termicznym kompleksu Lucyferyna/Lucyferaza, a tym samym o jego niemożności zastosowania bezpośrednio w teście biologicznym, dedykowanym sterylizacji parowej.

Tabela 20. Ilość uwalnianego ATP [RLU].

Parametry przechowywania / traktowania wskaźnika		Sterylizacja parowa	Sterylizacja parowa	Termiczne traktowanie	Przechowywanie	Przechowywanie	X
	Temperatura	121°C	134°C	55°C	21°C	4°C	minus 20°C
	Czas	20 minut	7 minut	25 minut	12 h	12 h	x
Czas inkubacji spor							
0 h	I	50	20	9692	9855	10275	10037
	II	37	24	9224	9556	10433	10231
	III	24	22	8997	9586	10377	10415
	IV	35	27	10390	8778	10823	10154
	V	38	27	10457	9975	10868	10578
	VI	40	25	10229	10681	10882	10724
	VII	45	22	8992	8386	10674	9821
	VIII	42	21	8921	8504	10917	9845
	IX	41	20	8754	9199	10956	9271
	Średnia	39	23	9517	9391	10689	10120
	Od. Standar.	7	3	646	707	246	417
25 minut	I	48	24	211990	251010	290451	292634
	II	37	25	212208	256470	281546	291000
	III	61	24	212458	270992	282210	291234
	IV	54	21	213797	264999	270992	295478
	V	45	27	207895	259870	280154	289745
	VI	52	31	208440	269901	289741	288445
	VII	51	36	193657	258467	286254	286286
	VIII	53	29	195478	254778	280145	294756
	IX	58	28	201457	269870	281254	290245
	Średnia	51	27	206376	261817	282527	291091
	Od. Standar.	7	4	7218	6948	5535	2743

I-IX powtórzenia

Podsumowanie:

Wg zaleceń Zespołu Ekspertów ds. Czynników Biologicznych Międzyresortowej Komisja ds. Najwyższych Dopuszczalnych Stężeń i Natężeń Czynników Szkodliwych całkowita liczba bakterii mezofilnych 5000 jtk/m³, a grzybów - 5000 jtk/m³. Badania oceny stanu mikrobiologicznego powietrza w laboratorium, gdzie były wykonywane doświadczenia mieściły się w granicach dopuszczalnych zaleceń. Taki stan powietrza powinien być także utrzymany w warunkach produkcyjnych.

Zalecenia PZH określają, że powierzchnia jest czysta jeżeli jest poniżej 10 jtk/cm², natomiast dla standardów medycznych na powierzchni powinno być mniej niż 1 CFU 55 mm płytką (oznaczenie metodą odciskową) dla klasy A, a poniżej 25 dla klasy B. W ramach przeprowadzonych badań wytyczne PHZ zostały spełnione i takie też powinny być utrzymane w warunkach produkcyjnych.

Polska Norma PN-EN 13779:2008 – Wentylacja budynków niemieszkalnych – Wymagania dotyczące właściwości instalacji wentylacji i klimatyzacji, podaje, że w typowym zakresie temperatur wilgotność względna powietrza powinna wynosić od 30% do 70%. Podczas prowadzonych eksperymentów wilgotność kształtowała się na poziomie 30-50% i taka powinna być utrzymana w warunkach produkcyjnych.

W tabeli 21 przedstawiono zbiorcze parametry przechowalnicze poszczególnych składowych testu biologicznego oraz ich czasu trwałości (oznaczonej na podstawie przeprowadzonych badań).

Tabela 21. Parametry przechowalnicze.

Składowa testu	Temperatura przechowywania	Trwałość
Pożywka mikrobiologiczna	21°C	6 miesięcy
Germinanty	21°C	6 miesięcy
Spory liofilizowane	21°C	6 miesięcy
Kompleks Lucyferyna/Lucyferaza	-20°C	6 miesięcy
	4°C	1 miesiąc
	21°C	2 tygodnie

4. Spis literatury

1. PN-89/Z-04111/01:01:1989 Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Postanowienia ogólne i zakres normy.
2. PN-89/Z-04111/02:1989 Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
3. PN-89/Z-04111/03:1989 Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
4. PN-89/Z-04008/08:1989 Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (imisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
5. PN-EN 13779:2008 Wentylacja budynków niemieszkalnych. Wymagania dotyczące właściwości instalacji wentylacji i klimatyzacji.
6. Wexler A, Hasegawa S.: Relative Humidity-Temperature Relationships of Some Saturated Salt Solutions in the Temperature Range 0⁰ to 50⁰ C. Journal of Research of the National Bureau of Standards, Vol. 53, 1954.
7. Chmiel M., Frączek K., Grzyb J.,: Problemy monitoringu zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza. Woda-Środowisko-Obszary wiejskie, T.15, Z. 1, 2015.

5. Spis tabel

Tabela 1. Liczebność spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i> uzyskana w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy SMS).....	4
Tabela 2. Stan mikrobiologiczny powietrza (wrzesień 2016-styczeń 2017).....	8
Tabela 3. Stan mikrobiologiczny powietrza (marzec 2017- lipiec 2017).....	9
Tabela 4. Stan mikrobiologiczny powietrza (wrzesień 2017-styczeń 2018).....	10
Tabela 5. Stan mikrobiologiczny powietrza (marzec 2018).....	11
Tabela 6 Stan mikrobiologiczny powietrza (kwiecień, maj 2018).....	12
Tabela 7. Stan mikrobiologiczny powietrza (maj, czerwiec 2018).....	13
Tabela 8. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych.....	15
Tabela 9. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.....	16
Tabela 10. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.....	17
Tabela 11. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.....	18
Tabela 12. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.....	19
Tabela 13. Stan mikrobiologiczny powierzchni roboczych c.d.....	20
Tabela 14. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry.....	22
Tabela 15. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry c.d.....	23
Tabela 16. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry c.d.....	24
Tabela 17. Poziom wilgotności względnej w pomieszczeniach Katedry c.d.....	25
Tabela 18. Warunki panujące w układzie doświadczalnym.....	26
Tabela 19. Wyniki posiewów mikrobiologicznych układów doświadczalnych (spory przechowywane w zmiennych wartościach wilgotności).....	27

6. Spis rysunków

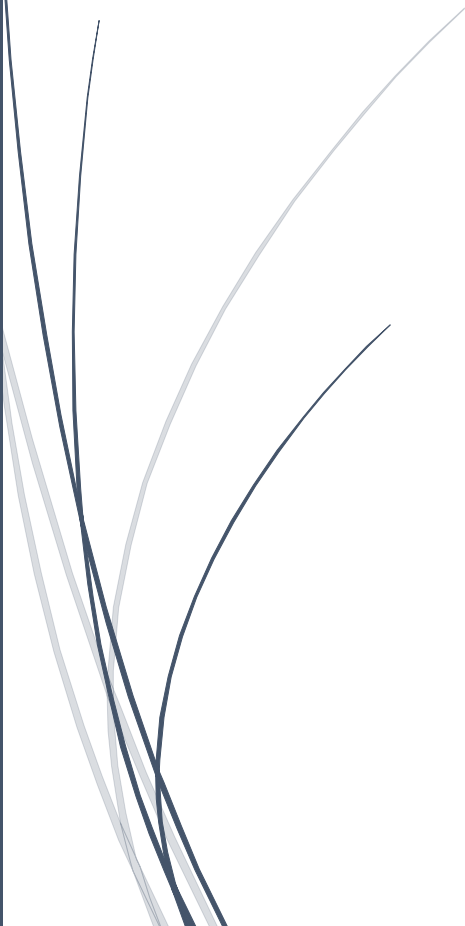
Rysunek 1. Układy doświadczalne.....	26
--------------------------------------	----



Sprawozdanie roczne

D/2018

R/9



Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

Spis treści

1. Opracowanie założeń technologicznych metody i urządzenia do odczytu wskaźników biologicznych.	3
1.1. Założenia metody odczytu poprzez Bioluminescencyjny pomiar ATP	3
1.2. Założenia technologiczne i specyfikacja dla urządzenia do odczytu poprzez bioluminescencyjny pomiar ATP	4
2. Założenia technologiczne metody archiwizacji wyników odczytu wskaźników biologicznych pomiaru ATP	7
2.1. Algorytmy odczytu i rejestracji danych	7
2.2. Projekt urządzenia	12
3. Przeprowadzenie badania określającego parametry techniczne dla wskaźnika chemicznego klasy I niezbędnego do umieszczania na ampulce testu biologicznego	15
4. Opracowanie konstrukcji testu biologicznego zapewniającej skuteczną penetrację czynnika sterylizującego, tj. plazmy H ₂ O ₂ oraz pary wodnej	16
5. Opracowanie technologii wytwarzania testów biologicznych w zakresie: produkcji pakowania, etykietowania, określania warunków przechowywania i transportu	17
6. Spis literatury	18
7. Spis tabel	19
8. Spis rysunków	19

1. Opracowanie założeń technologicznych metody i urządzenia do odczytu wskaźników biologicznych.

W celu określenia założeń technologicznych sposobu odczytu testów biologicznych metodą ATP na podstawie analizy wcześniej przeprowadzonych badań określono miarodajny poziomu odczytu testu biologicznego metodą ATP uwzględniający następujące czynniki:

- warunki przechowywania kitów ATP
- temperatury przechowywania kitów ATP
- testy symulacyjne sterylizacji plazmowej na urządzeniach sterylizujących różnych producentów
- testy symulacyjne sterylizacji parowej na urządzeniach sterylizujących różnych producentów
- temperatury inkubacji
- poziom oznaczenia

1.1. Założenia metody odczytu poprzez Bioluminescencyjny pomiar ATP

Szczep bakterii – *Geobacillus stearothermophilus*

Nośnik do immobilizacji bakterii – tlenek krzemu 0,1 g

Pożywka germinacyjna:

Składnik	Ilość
Bulion	3%
Pepton bakteriologiczny	0,50%
NaCl	0,80%
Glukoza	0,10%
L- Alanina	0,1M
L-Asparagina	0,1 M

Wskaźnik – Luceferyna z lucyferazą (2 x 1,5ml)

Warunki wzrostu (inkubacji) – temp. 55 °C

Założenia minimalne dla warunków przechowalniczych dla komponentów testu –

- temperatura -20°C do 6 miesięcy
- temperatura 4°C do 2 miesiące

Objętość – ponad 3 ml

Czas odczytu testu (detekcji) – 30 min.

W celu przeprowadzania odczytu testu biologicznego (pozytywny/negatywny) metodą ATP poprzez pomiar ilości jednostek świetlnych [RLU] na podstawie przeprowadzonych badań dobrano poziom detekcji [RLU] 50 000

1.2. Założenia technologiczne i specyfikacja dla urządzenia do odczytu poprzez bioluminescencyjny pomiar ATP

Celem automatycznego monitorowania wskaźników biologicznych ATP po procesie sterylizacji jest określenie skuteczności procesu sterylizacji. Odbywać się to będzie poprzez elektroniczny odczyt i rejestrację podjętych informacji o stanie testu (pozytywny/negatywny). Rejestracja będzie się odbywała poprzez pomiar wartości bioluminescencji RLU za pomocą detektorów w postaci fotodiod.

Przeznaczenie urządzenia:

- automatyczny odczyt i monitorowanie wskaźników biologicznych ATP w czasie inkubacji
- automatyczny odczyt skuteczności procesu sterylizacji (sterylizacja termiczna i plazmowa) poprzez pomiar ilości jednostek świetlnych RLU

Dane dotyczące konstrukcji:

- minimum 8 niezależnych cel pomiarowych

- cele z możliwością zamknięcia zbiorczego lub indywidualnego zapobiegające zakłóceniom os światła zewnętrznego (prawidłowość odczytu dla natężenia oświetlenia minimum 3000lx)
- cele wykonane z aluminium
- materiał odporny na temperaturę do 100°C

Parametry dotyczące inkubacji:

- możliwość inkubacji testów biologicznych bezpośrednio w urządzeniu
- możliwość mieszania próby po umieszczeniu w celi podczas inkubacji (załączone opcjonalnie)
- czas inkubacji kontrolowany automatycznie, regulowany w zakresie od 1 minuty do 72 godzin
- inkubacja testów zbiorczo po umieszczeniu w urządzeniu w temperaturze 37-60°C $\pm 2^{\circ}\text{C}$, regulacja co 1°C
- automatyczne rozpoczęcie odliczania czasu inkubacji po umieszczeniu próbki dla każdej celi niezależnie
- układ grzania gwarantujący osiągnięcie i stabilizację zadanej temperatury w czasie nie dłuższym niż 1h

Parametry dotyczące odczytu testu biologicznego:

- odczyt testu poprzez pomiar ilości jednostek świetlnych [RLU]
- zakres pomiarowy RLU od 50 000
- możliwość regulacji progu zadziałania poprzez zmianę poziomu RLU
- odczyt testu w czasie 30 – 60 minut

Dane dotyczące testu:

- testy biologiczne poddawane badaniu transportowane do urządzenia/umieszczane w urządzeniu w probówkach pomiarowych o pojemności minimum 3ml

Układ sterowania:

- sterowanie urządzenia poprzez sterownik mikroprocesorowy z wyświetlaczem dotykowym kolorowym LCD o przekątnej minimum 4”
- możliwością programowania
- sygnał dźwiękowy zakończenia pomiaru pozytywnego
- sygnał dźwiękowy zakończenia błędu w pomiarze

- informacja świetlna o fazie procesu inkubacji
- wydruk wyników pomiaru na wbudowanej lub zewnętrznej drukarce
- rejestracja wyników pomiarowych w wewnętrznej pamięci (opcjonalnie)
- system autodiagnostyki kontrolujący prawidłowość działania podzespołów wykrywający następujące nieprawidłowości: usterka czujnika temperatury, niestandardowy przyrost temperatury, nieprawidłowa stała temperatura, korelacja wartości początkowej RLU względem czasu odczytu testu, usunięcie testu w czasie odczytu
- kontrola temperatury przy wykorzystaniu czujników PT100 lub PT1000

Podłączenie i współpraca z komputerem klasy PC:

- komunikacja poprzez RJ45, USB lub RS232
- zapis wyników odczytu wskaźników biologicznych
- opcjonalnie możliwość przypisania wyniku do konkretnego procesu sterylizacji

Parametry dotyczące zasilania:

- AC: 100~240V, 1,5A, 50/60Hz - zasilacz
- DC: 12V – moduł pomiarowy

Parametry dotyczące warunków pracy urządzenia:

- temperatura otoczenia: 5°C ~ 40°C
- wilgotność względna otoczenia: ≤95% (>85% otoczenie niekondensujące)
- przeznaczenie do pracy wyłącznie w pomieszczeniach
- natężenie oświetlenia w miejscu pracy maksymalnie 1500lx

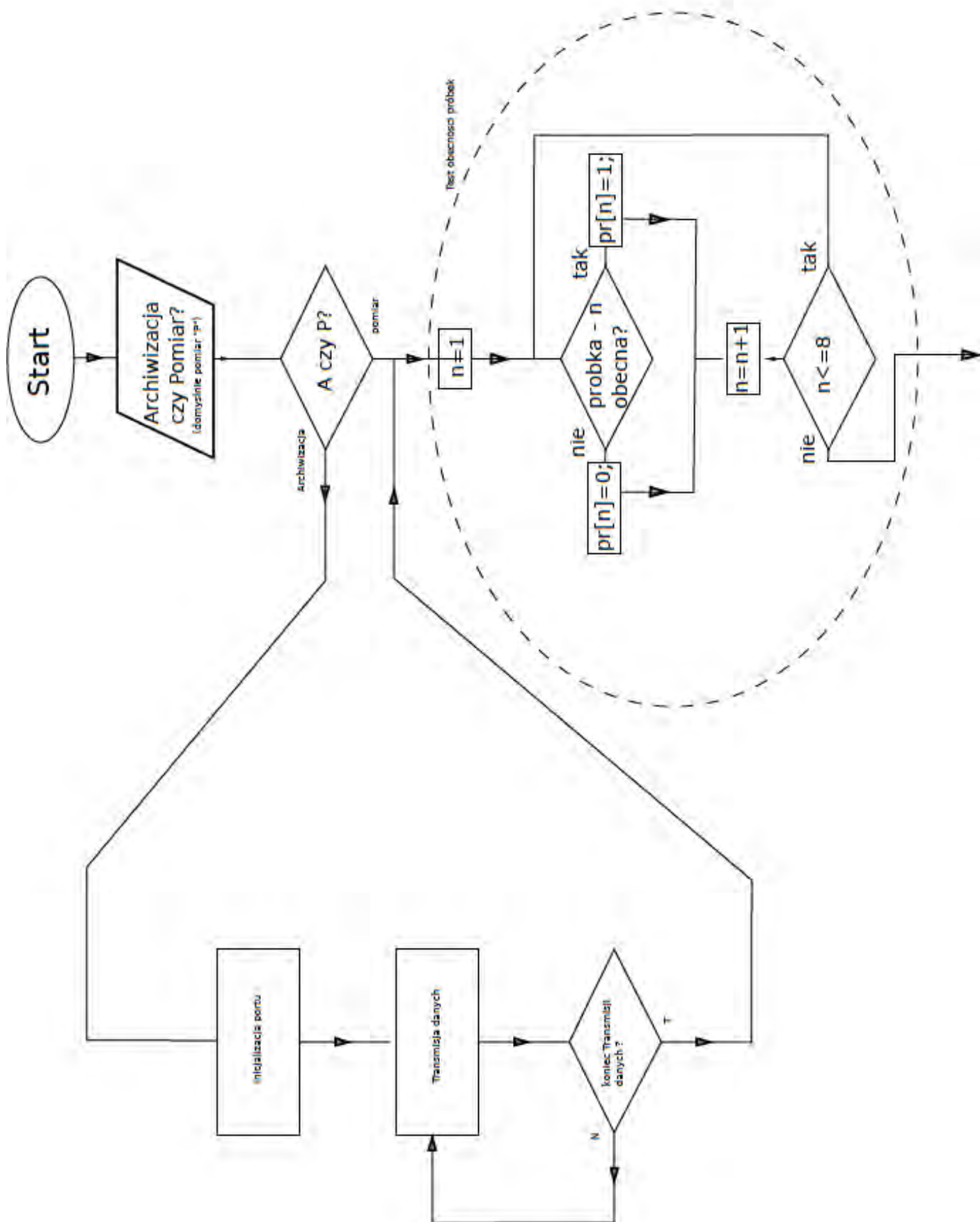
2. Założenia technologiczne metody archiwizacji wyników odczytu wskaźników biologicznych pomiaru ATP

Celem dobranej metody jest archiwizacja i automatyczne przekształcenie wyników odczytu wskaźników biologicznych ATP z fizycznego wyniku testu na elektroniczny zapis. Rejestracja odczytu będzie się odbywała poprzez pomiar wartości bioluminescencji RLU za pomocą detektorów w postaci fotodiod dla zidentyfikowanej próbki, następnie przetworzenie sygnału przez mikroprocesor oraz w wyniku końcowym prezentacja i zapis danych.

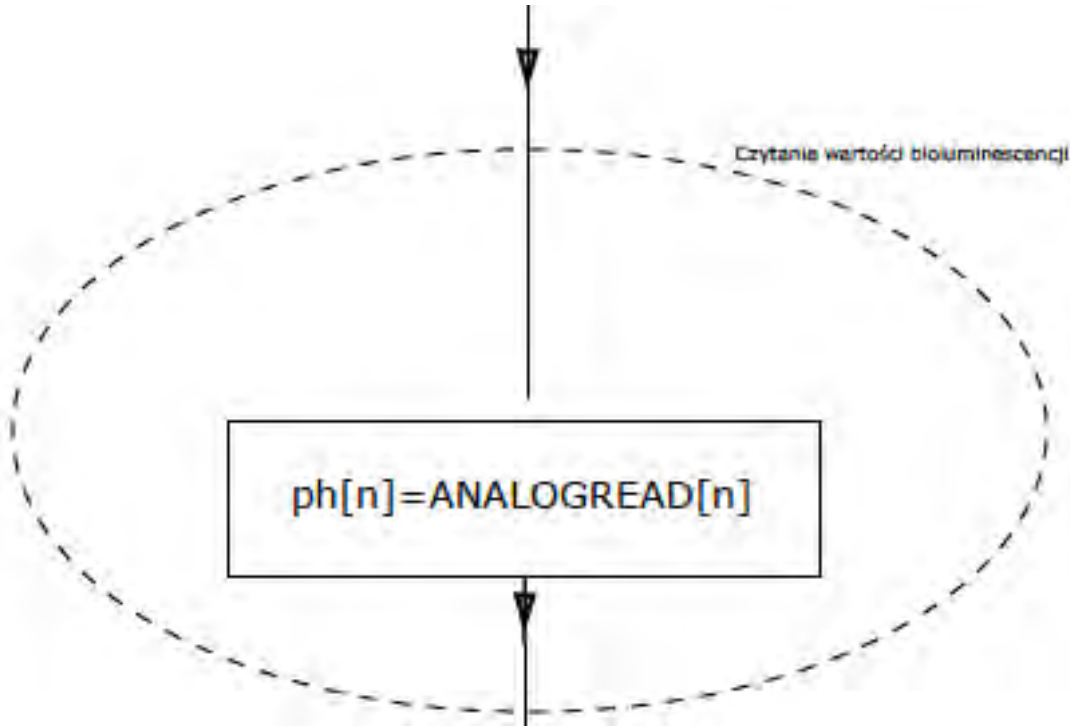
2.1. Algorytmy odczytu i rejestracji danych

- n - ilość cel pomiarowych
- pr[n] - tablica obecności próbki w slocie
- ph[n] - zmienna przechowująca wartość bioluminescencji próbki n
- k - nr pomiaru dla danej próbki
- n - ilość cel pomiarowych
- S - Ilość testów przeprowadzonych na każdej próbce

Test obecności próbki:

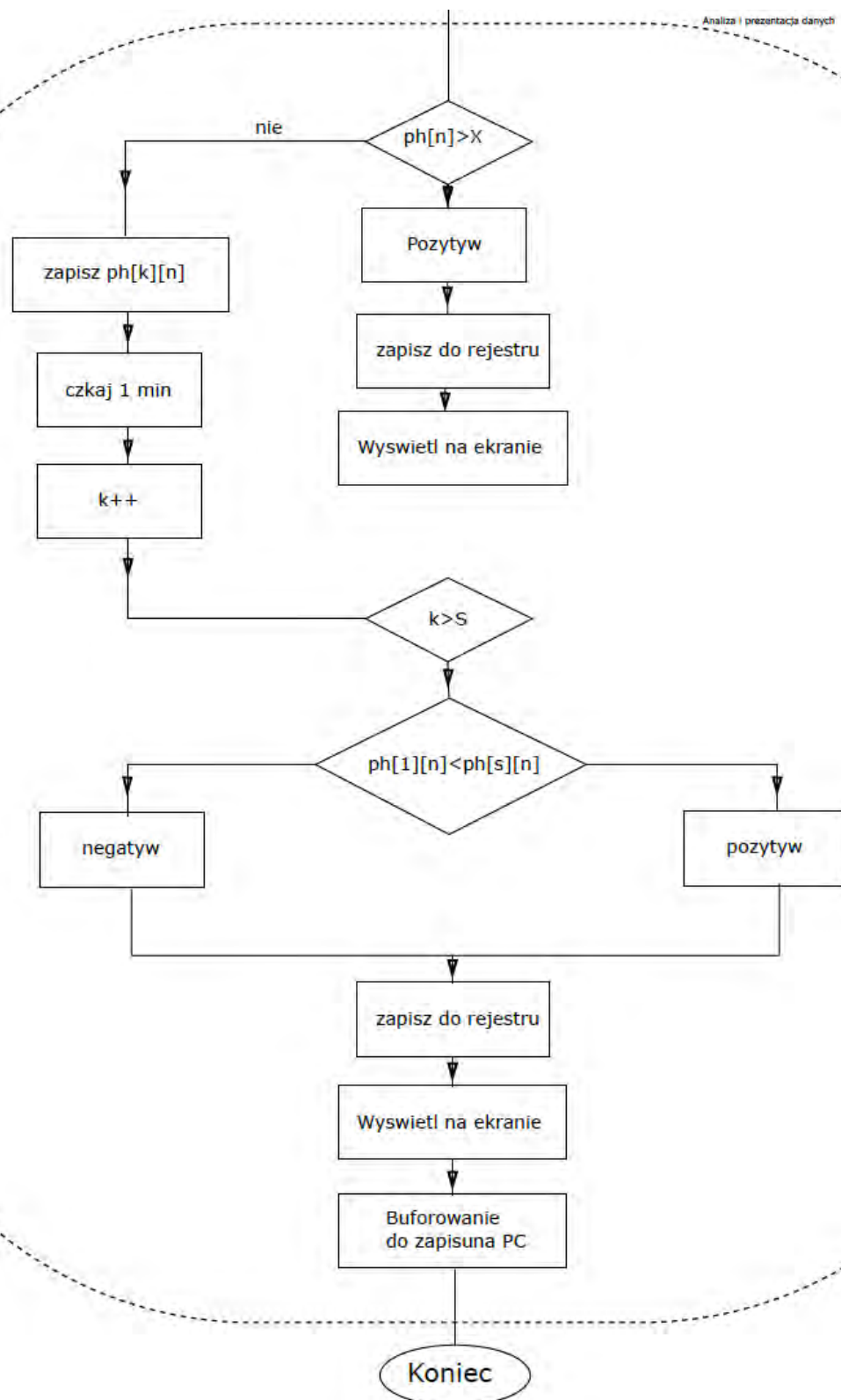


Odczyt wartości bioluminescencji:

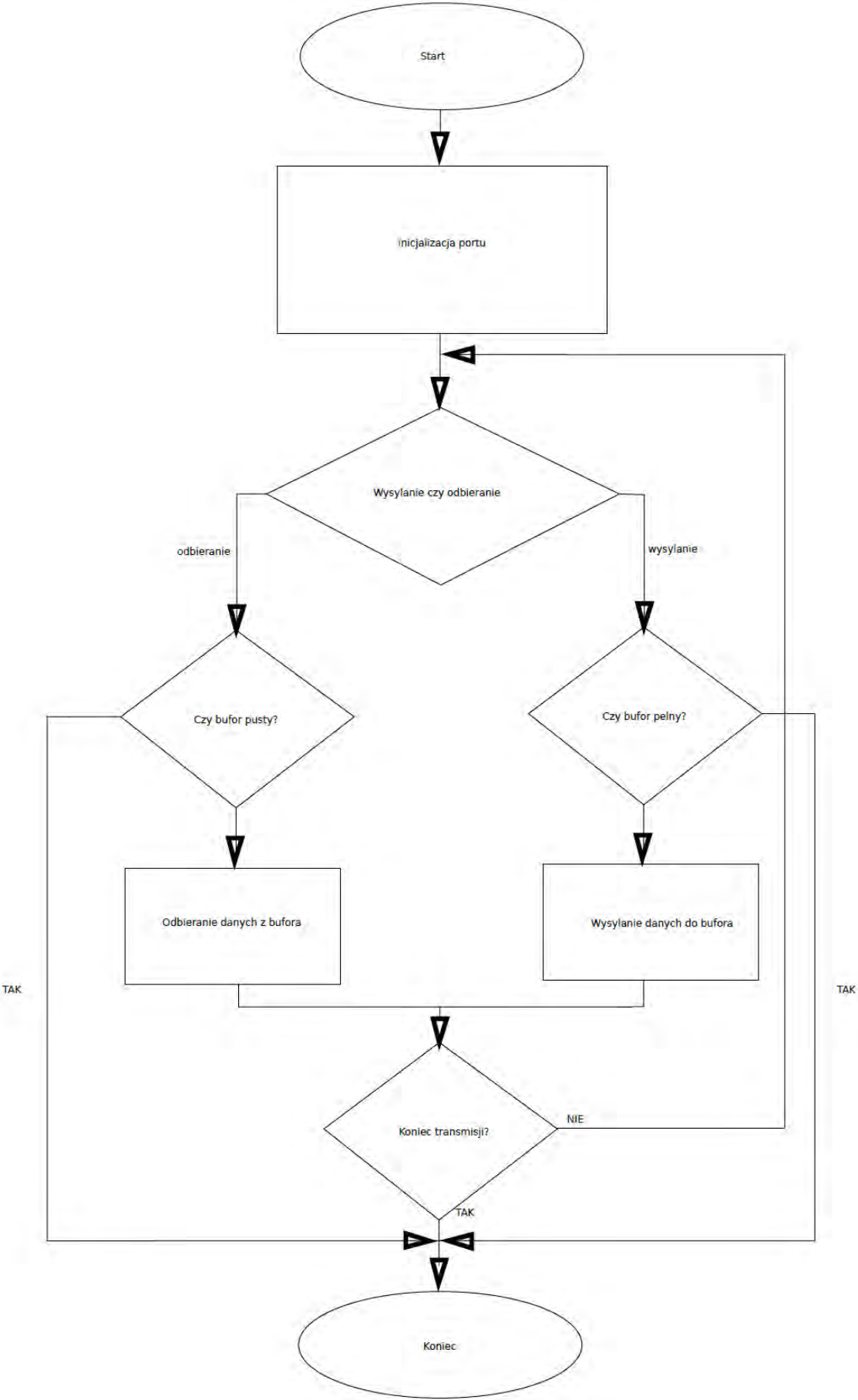


Analiza i prezentacja danych:

Analiza i prezentacja danych



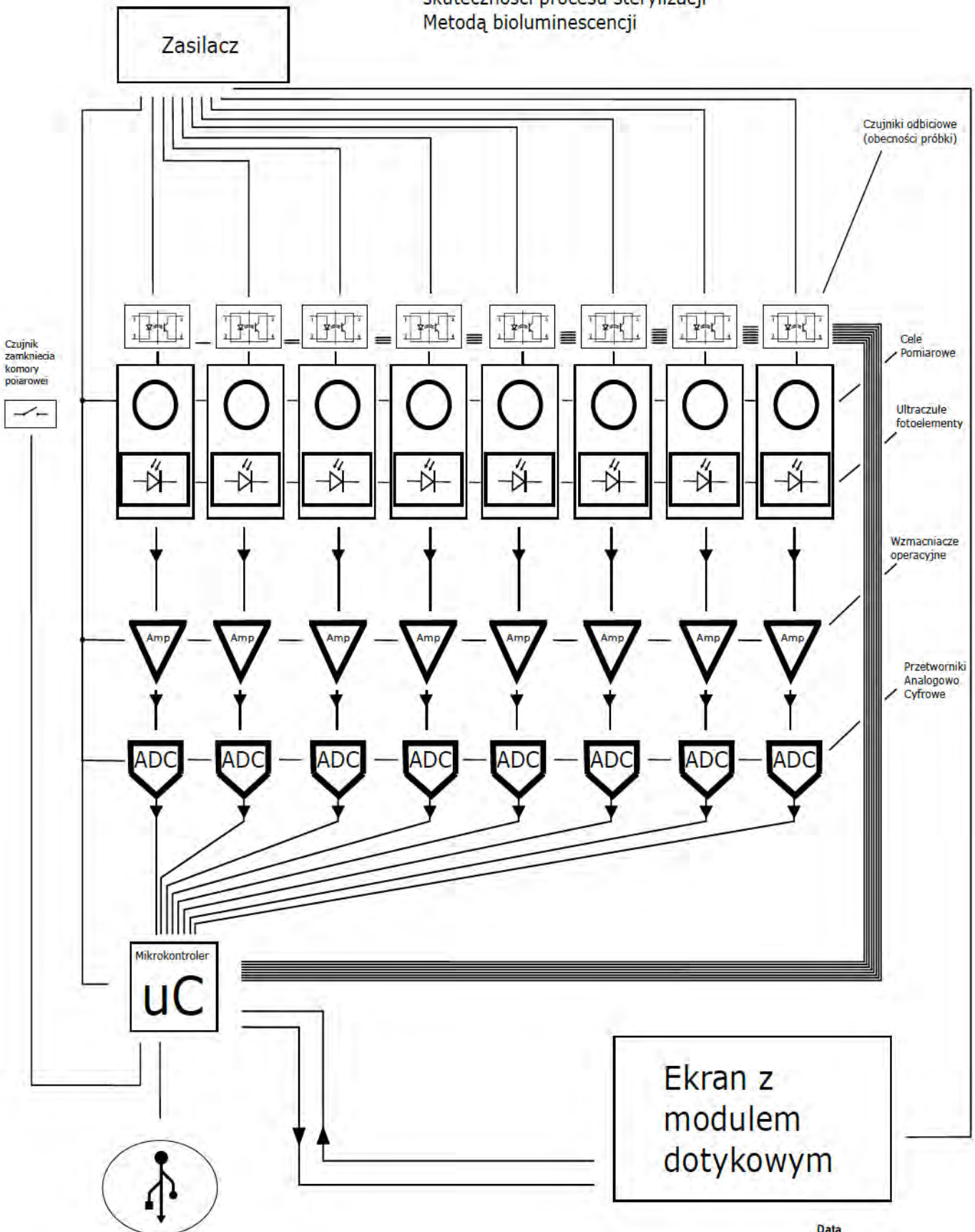
Algorytm archiwizacji danych na PC za pomocą portu komunikacyjnego:



2.2. Projekt urządzenia

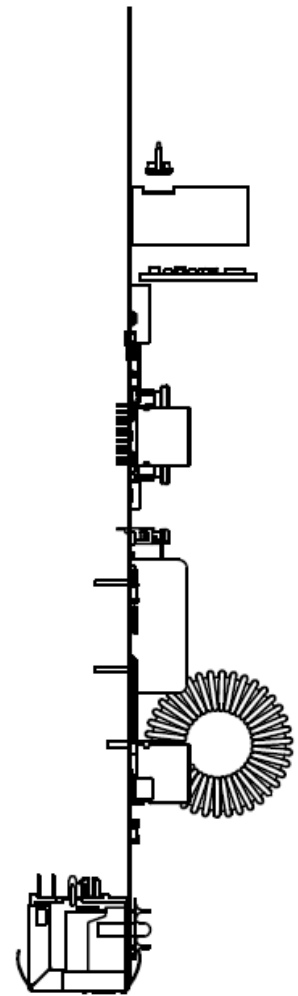
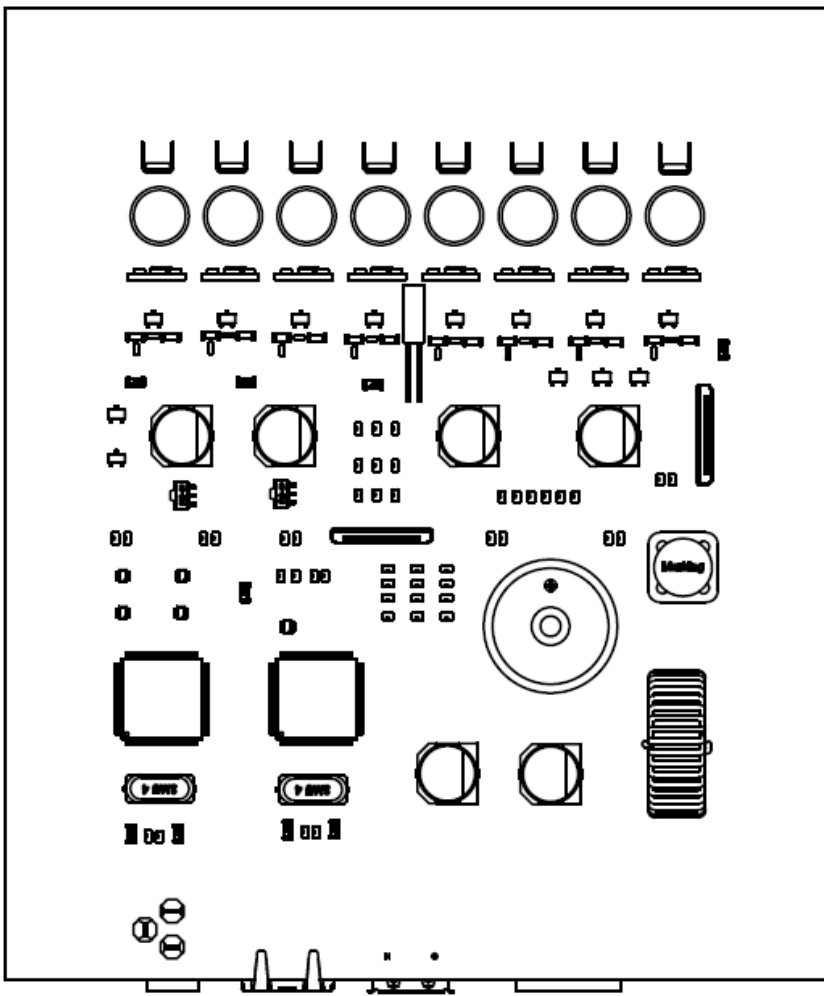
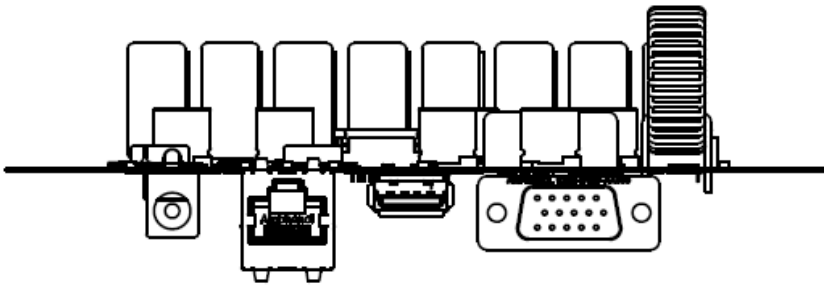
Schemat blokowy:

Urządzenie do odczytu
wskaźników biologicznych
skuteczności procesu sterylizacji
Metodą bioluminescencji



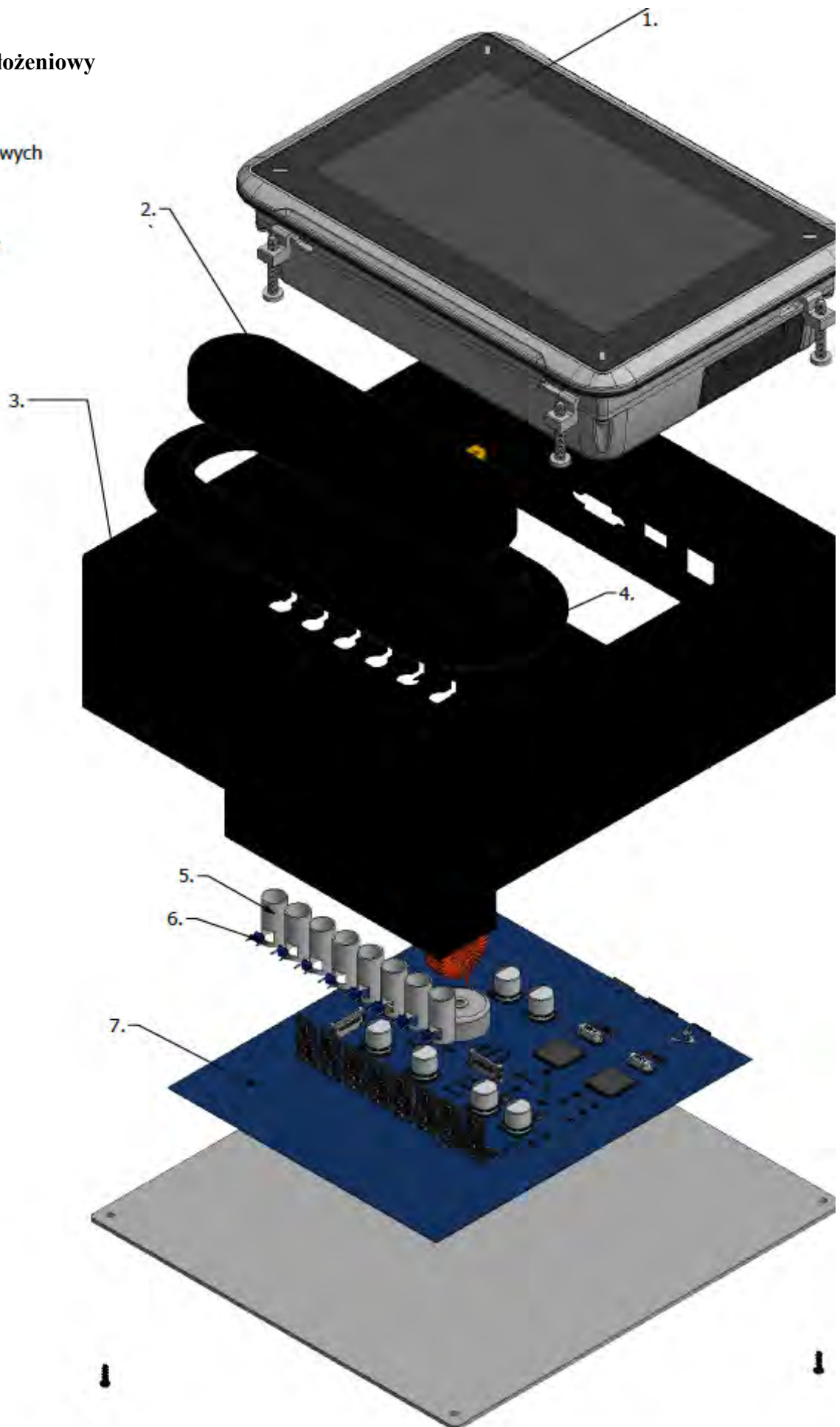
Data

Płyta główna:



Rysunek złożeniowy

1. Ekran LCD Dotykowy
2. Zamknięcie cel pomiarowych
3. Obudowa
4. Sloty Pomiarowe
5. Cele pomiarowe
6. Ultraczułe fotoelementy
7. Płyta sterująca

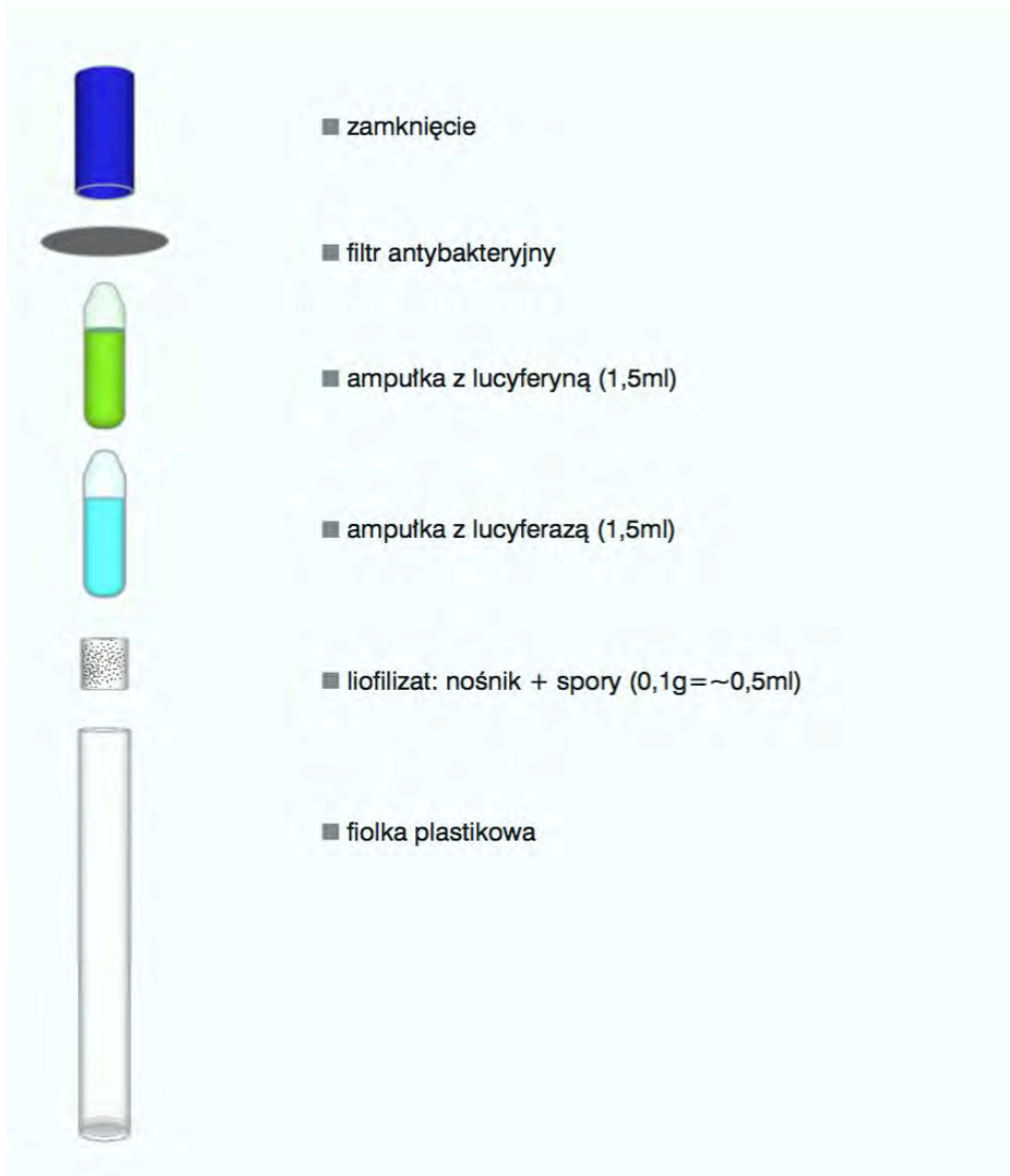


3. Przeprowadzenie badania określającego parametry techniczne dla wskaźnika chemicznego klasy I niezbędnego do umieszczania na ampulce testu biologicznego

4. Opracowanie konstrukcji testu biologicznego zapewniającej skuteczną penetrację czynnika sterylizującego, tj. plazmy H₂O₂ oraz pary wodnej

Test biologiczny

elementy składowe testu



5. Opracowanie technologii wytwarzania testów biologicznych w zakresie: produkcji pakowania, etykietowania, określania warunków przechowywania i transportu

6. Spis literatury

1. PN-89/Z-04111/01:01:1989 Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Postanowienia ogólne i zakres normy.
2. PN-89/Z-04111/02:1989 Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby bakterii w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
3. PN-89/Z-04111/03:1989 Ochrona czystości powietrza. Badania mikrobiologiczne. Oznaczanie liczby grzybów mikroskopowych w powietrzu atmosferycznym (imisja) przy pobieraniu próbek metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
4. PN-89/Z-04008/08:1989 Ochrona czystości powietrza. Pobieranie próbek powietrza atmosferycznego (imisja) do badań mikrobiologicznych metodą aspiracyjną i sedymentacyjną.
5. PN-EN 13779:2008 Wentylacja budynków niemieszkalnych. Wymagania dotyczące właściwości instalacji wentylacji i klimatyzacji.
6. Wexler A, Hasegawa S.: Relative Humidity-Temperature Relationships of Some Saturated Salt Solutions in the Temperature Range 0⁰ to 50⁰ C. Journal of Research of the National Bureau of Standards, Vol. 53, 1954.
7. Chmiel M., Frączek K., Grzyb J.,: Problemy monitoringu zanieczyszczeń mikrobiologicznych powietrza. Woda-Środowisko-Obszary wiejskie, T.15, Z. 1, 2015.

7. Spis tabel

8. Spis rysunków



Sprawozdanie roczne **D/2017**

Badanie nad możliwością
wykorzystania opracowanych w
etapie 1 metod do oceny
skuteczności procesów sterylizacji



Sprawozdanie roczne

D/2017

R/4

Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

Raport cząstkowy R/4

Określenie aktywności enzymów podczas procesu kiełkowania spor

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Wykorzystanie metody bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej
- Ustalenie minimalnego czasu kiełkowania przetrwalników umożliwiającego ich wykrycie w danej metodzie (wizualna ocena zmiany barwy)
- Kontynuacja badań nad wyborem nośnika do immobilizacji spor

Spis treści

1. Wprowadzenie	5
1.1. Wyniki:	8
1.1.1. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawiesinie przetrwalników bakterii.....	8
1.1.2. Wyniki oznaczeń poziomu ATP dla bakterii zimmobilizowanych na bibule Whatmana 13	
1.1.3. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawiesinie przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na Tyvek.	18
1.1.4. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w liofilizacie przetrwalników bakterii (proszek) ..	23
1.1.5. Wpływ germinantów na zmianę barwy wskaźnika redox – resazuryny - wizualna zmiany barwy	28
2. Spis literatury	31
3. Spis rysunków	32
4. Spis tabel	32

1. Wprowadzenie

W wyniku prac przeprowadzonych w poprzednich etapach (Raporty cząstkowe R1-R3), dokonano wyboru optymalnych składów pożywki, będących medium przyspieszającym proces germinacji. Testy potwierdzające słuszność wyboru danych komponentów prowadzono w pożywkach płynnych, zawierających pożywkę mikrobiologiczną III (Raport R2), odpowiedni aminokwas - **asparaginę** jako germinant oraz **alaninę** lub **inosine**, będące ko-germinantem. Dodatkowo, na podstawie doświadczeń przeprowadzonych nad wpływem wybranych jonów na kiełkowanie przetrwalników, pożywka w swoim składzie zawierała 100 mM kationów Na^+ lub K^+ . Jako kontrolę zastosowano zmodyfikowaną pożywkę III tylko z dodatkiem kationów (bez aminokwasów) (Krzywicka i wsp, 1996, raport D/2016).

W celu określenia aktywności enzymów podczas procesu kiełkowania spor przeprowadzono osiem wariantów doświadczeń (tabela 1), w których badano następujące parametry: gęstość optyczną oraz ilość ATP.

Tabela 1. Warianty doświadczeń

L.p.	Skład mieszaniny hodowlanej	Ilość [μM]
1	X + Na^+	100
2	X + K^+	100
3	Asp + Ino + Na^+	100 + 100 + 100
4	Asp + Ino + K^+	100 + 100 + 100
5	Asp + Ino + Na^+ + K^+	100 + 100 + 100 + 100
6	Asp + Ala + Na^+	100 + 100 + 100
7	Asp + Ala + K^+	100 + 100 + 100
8	Asp + Ala + Na^+ + K^+	100 + 100 + 100 + 100

Legenda:

X – brak aminokwasów (Próba kontrolna)

Na^+ - sód (Na Cl)

K^+ - potas (KCl)

Asp - asparagina

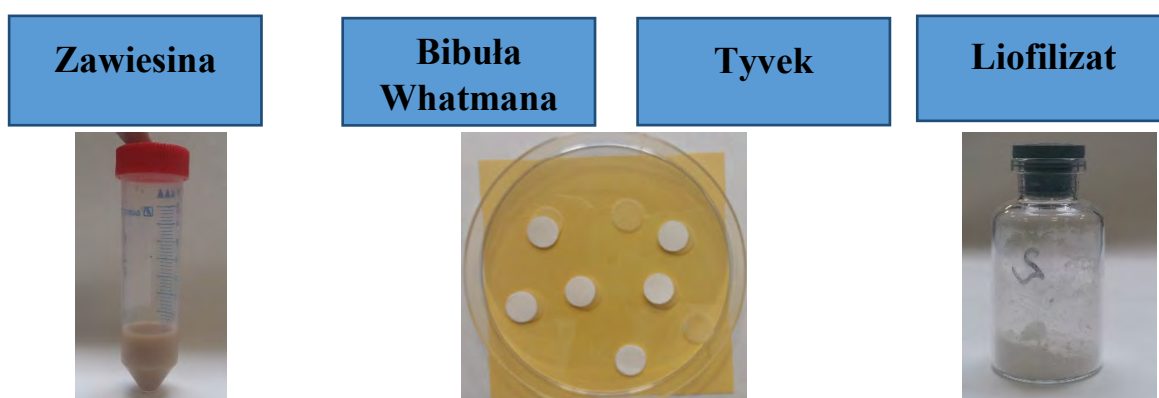
Ino – inosine

Ala - alanina

W celu określenia szybkości procesu germinacji, badane spory użyto w formie natywnej (zawiesina przetrwalników w ilości 200 μ l na każde 12 ml badanej pożywki, o wystandaryzowanej liczebności 10^7 jtk/ml). Dodatkowo, wyżej wymienioną zawiesinę zimmobilizowano na dwóch rodzajach nośników – bibule Whatmanna oraz na materiale Tyvek. W tym celu 100 μ l zawiesiny nakrapiano na krążek i czekano do całkowitego wyschnięcia – 48 h (w testach stosowano 2 krążki na każde 12 ml badanej pożywki). Otrzymaną zawiesinę suszono także liofilizacyjnie, gdzie nośnikiem był tlenek krzemu. W trakcie suszenia oznaczono przeżywalność spor (posiewy ilościowe [jtk/g]) oraz wykonano podstawowe bilanse technologiczne (oznaczano masę suszu oraz wydajność suszenia). Do każdej próbówki, zawierającej 12 ml badanego komponentu, dodawano 0,05g badanego liofilizatu.

➤ Rodzaje badanego materiału:

1. Zawiesina
2. Krążki
 - a. Bibuła Whatmana
 - b. Tyvek
3. Liofilizat (proszek)



Rysunek 1. Rodzaje stosowanych nośników

W trakcie testów oznaczano % germinacji [Woese i Morowitz, 1958, metodyka z publikacji -Cheida Aouadhi; Optimaliation of nutrient – induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores using response surface methodology), liczebność komórek (jtk/ml – zalewową metodą płytkową), ilość uwalnianego ATP [RLU] oraz ocenę zmiany barwy wskaźnika (resazuryna).

➤ Mierzone parametry:

1. Ilość ATP (RLU)
2. % Germinacji

$$G = \left(\frac{OD_i - OD_f}{OD_i} \right) * 100 [\%]$$

Gdzie:

OD_i – gęstość optyczna początkowa

OD_f - gęstość optyczna końcowa

3. Ocena zmiany barwy wskaźnika - resazuryna

1.1. Wyniki:

1.1.1. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawieszynie przetrwalników bakterii

Przeprowadzone badania wykazały wpływ wybranych mieszanin (składających się z aminokwasów, kationów i inosyny) na proces germinacji *Geobacillus stearothermophilus*. Zmiana poziomu germinacji spor zawieszonych w jałowej wodzie destylowanej była wyznaczona i przedstawiona jako procentowa redukcja OD [gęstość optyczna].

Poziom gęstości optycznej przedstawiono w tabeli 2. W początkowych etapach hodowli obserwowano spadek gęstości optycznej zawiesiny bakterii. Było to związane z przechodzeniem form przetrwanych w wegetatywne. Podobne wyniki obserwowane były również przez innych badaczy [Porębska i wsp., 2017] W większości przypadków spadek wartości OD utrzymywał się do godziny 2.

Tabela 2. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
1	0,65645	0,4483	0,20945	0,4013	0,3844
2	0,58105	0,35625	0,21835	0,4127	0,41525
3	0,5633	0,4391	0,2652	0,3894	0,42605
4	0,55075	0,28245	0,22295	0,4009	0,42655
5	0,60475	0,44075	0,21095	0,40255	0,41485
6	0,51965	0,41815	0,2392	0,3826	0,4003
7	0,6416	0,4054	0,3868	0,36025	0,3638
8	0,70535	0,47355	0,3769	0,3738	0,2790

W przypadku procentowego wyznaczenia poziomu germinacji (tabela 3), największym % germinacji charakteryzował się wariant 2 i 5 (w drugiej godzinie hodowli) oraz wariant 8 (4 godzina hodowli). Wartości te oscyływały na poziomie powyżej 60 %. Świadczy to o istotnej roli jonów potasu w kiełkowaniu przetrwalników. Ponadto uzyskane wyniki świadczą o istotnej roli inosyny w usunięciu ochronnych warstw przetrwalnika. Biorąc pod uwagę procent germinacji i czas, najlepszym wariantem okazał się wariant 5, gdzie w mieszaninie zawarta była asparagina, inosyny oraz sól i potas (każdy ze składników po 100 μ M).

Tabela 3. % germinacji dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego

Wariant	Germinacja [%]								
	0	1h		2h		3h		4h	
1	0	40,110	30,980	70,824	67,857	44,526	38,378	45,556	41,086
		21,851		64,890		32,230		36,616	
2	0	31,103	38,519	58,295	62,329	22,244	28,823	22,614	28,403
		45,936		66,364		35,403		34,191	
3	0	15,132	21,773	44,582	52,588	20,263	30,449	11,539	23,854
		28,413		60,593		40,634		36,168	
4	0	46,064	48,888	56,759	59,698	26,745	27,238	34,309	21,786
		51,711		62,638		27,732		9,263	
5	0	31,999	26,348	64,057	65,285	37,529	32,789	35,506	30,753
		20,697		66,513		28,049		26,000	
6	0	19,864	19,536	39,961	53,832	19,728	26,308	17,046	22,909
		19,207		67,702		32,889		28,773	
7	0	52,042	32,583	51,402	36,466	52,349	41,490	51,018	41,153
		13,125		21,530		30,631		31,289	
8	0	43,600	30,908	50,381	45,871	51,204	46,240	50,430	62,269
		18,217		41,361		41,277		74,108	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP, dla 8 wariantów doświadczeń (tabela 1). Oznaczenia wykonano w 0, po 2 i 4 h inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń).

Po 2 godzinach hodowli w każdym z wariantów zaobserwowano znaczny wzrost ilości uwalnianego ATP (około 10-krotny wzrost). Najlepszą kombinacją substancji przyspieszających kiełkowanie, dla tej techniki pomiarowej, był wariant 7 (Asp + Ala + K⁺).

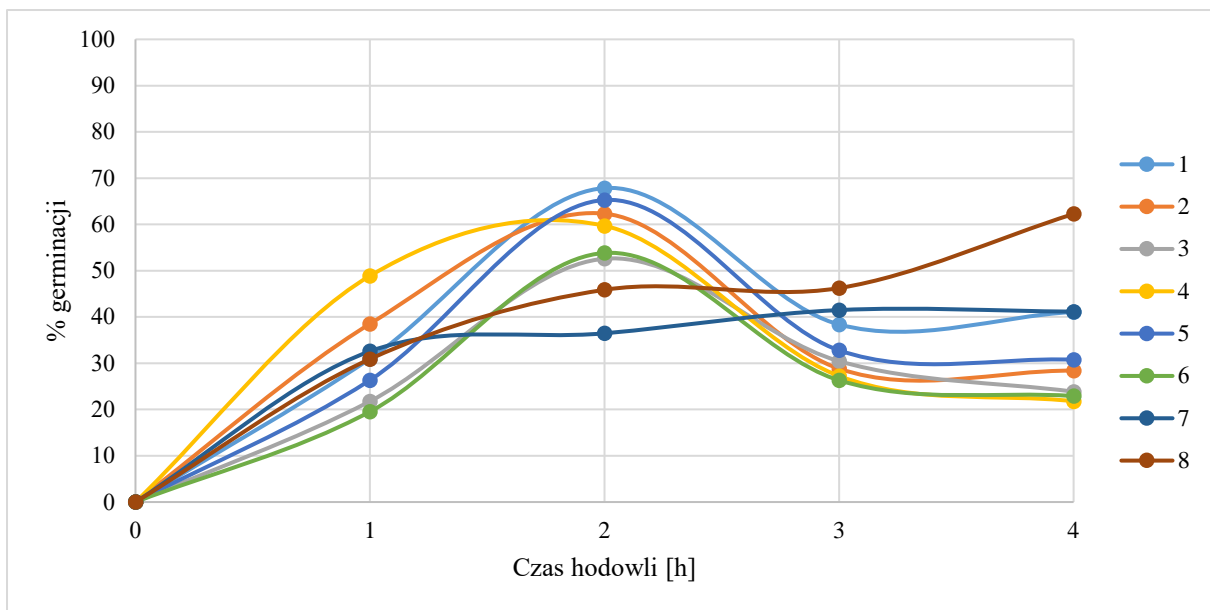
W dalszych etapach hodowli (4h) nie zaobserwowano dalszego wzrostu ilości ATP, co prawdopodobnie spowodowane było brakiem innych składników pokarmowych w pożywce hodowlanej. Nie mniej jednak na potrzeby tego doświadczenia lepsze było wykorzystanie takich mieszanin, bez dodatku innych stymulatorów wzrostu, które mogłyby zafałszować wyniki tych eksperymentów.

Na rysunkach 2-4 przedstawiono graficzną formę wyników.

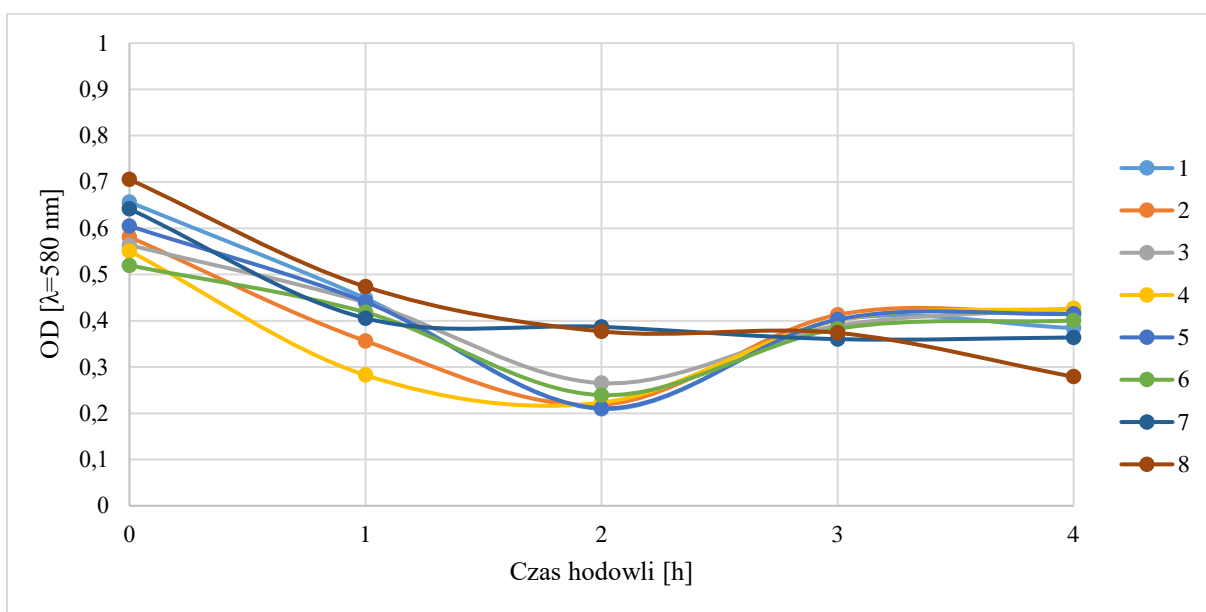
Tabela 4. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].

Wariant	ATP [RLU]														
	0 h				2 h					4 h					
	I	II	III	Średnia cząstk.	Średnia	I	II	III	Średnia cząstk.	Średnia	I	II	III	Średnia cząstk.	Średnia
1	401	364	410	392	311	3354	3451	2987	3264	3387	3938	4018	4004	3987	4677
	231	231	228	230		3296	3578	3657	3510		6134	6411	3556	5367	
2	212	307	402	307	326	2472	2774	2787	2678	3429	3933	3968	4155	4019	5239
	293	346	393	344		4325	4053	4163	4180		6419	6462	6498	6460	
3	271	241	248	253	227	2691	2855	2927	2824	3141	5711	5666	5720	5699	5454
	169	204	230	201		3187	3310	3873	3457		5001	5512	5112	5208	
4	199	178	206	194	479	2909	3172	3083	3055	3169	4266	4779	4959	4668	5418
	622	683	986	764		3229	3227	3391	3282		5459	6077	6968	6168	
5	231	171	192	198	311	3781	3237	3100	3373	3453	4773	4862	4924	4853	4850
	347	417	508	424		3469	3515	3617	3534		4856	4785	4899	4847	
6	330	318	337	328	301	2379	2640	2623	2547	3484	5914	5831	5970	5905	5971
	247	281	291	273		4195	4252	4812	4420		5985	6223	5902	6037	
7	409	498	484	464	399	7192	7686	7714	7531	5912	3956	4135	4577	4223	4307
	320	319	362	334		4274	4227	4379	4293		4288	4405	4479	4391	
8	370	347	421	379	301	2075	2839	2929	2614	3281	6501	6597	6740	6613	5195
	214	216	240	223		3897	3968	3976	3947		3720	3769	3845	3778	

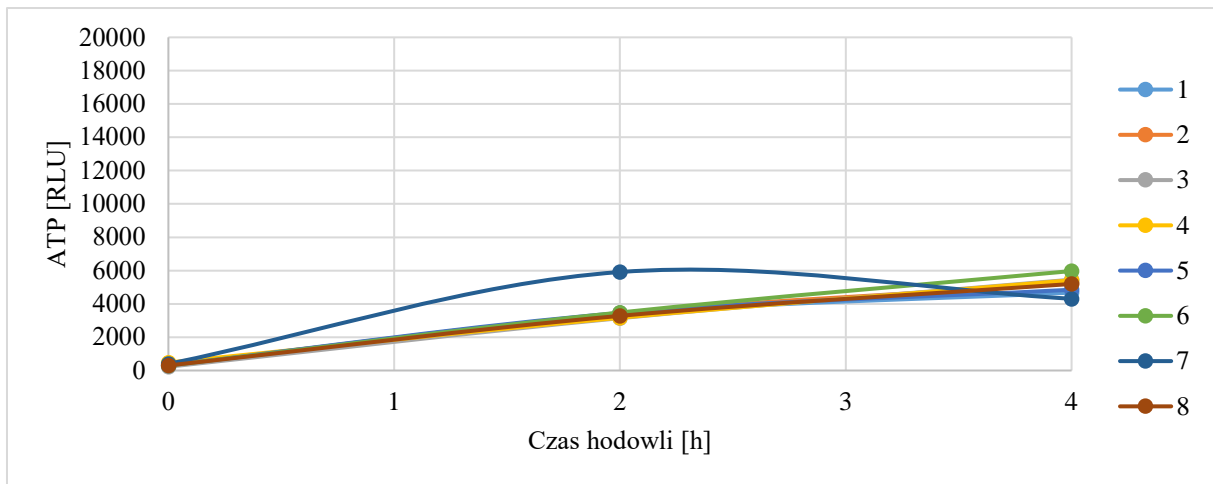
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.



Rysunek 2. Wpływ składu podłoża na % germinacji – przetrwalniki zawieszono w H₂O.



Rysunek 3. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną zawiesiny – przetrwalniki zawieszono w H₂O.



Rysunek 4. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – przetrwalniki zawieszone w H₂O.

1.1.2. Wyniki oznaczeń poziomu ATP dla bakterii zimmobilizowanych na bibule Whatmana

Do dalszych doświadczeń wybrano 5 najlepszych wariantów pożywek (wariant 4, 5, 6, 7, 8), wyznaczonych w doświadczeniu z zawiesiną przetrwalników w wodzie. Zawiesinę bakterii zimmobilizowano na bibule Whatmanna. W tym celu 100 µl zawiesiny o wystandaryzowanej liczebności 10^7 jtk/ml, nakrapiano na krążek i czekano do całkowitego wyschnięcia – 48 h (w testach stosowano 2 krążki na każde 12 ml badanej pożywki).

Tabela 5. Gęstość optyczna ($OD_{\lambda=580\text{ nm}}$), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników zimmobilizowanych na bibule Whatmana.

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
4	0,1691	0,2077	0,2286	0,2747	0,2275
5	0,1937	0,2395	0,2241	0,2466	0,2714
6	0,0800	0,1123	0,0978	0,1800	0,2158
7	0,1334	0,1528	0,2389	0,2571	0,3824
8	0,1106	0,1315	0,1560	0,2263	0,2999

Z danych przedstawionych w tabeli 5 wynika, że w przypadku immobilizacji przetrwalników bakterii na nośniku (bibuła) obserwowano znacznie niższe wartości OD, niż przypadku zawiesiny przetrwalników w wodzie (tabela 2). Było to prawdopodobnie związane z zatrzymaniem komórek na nośniku. Nie stwierdzono też spadku gęstości optycznej w trakcie 4 godzin hodowli. Skutkowało to utrzymaniem ujemnych wyników % germinacji (tabela 6), co wynika ze wzoru na obliczanie tego parametru (wzór przedstawiono na str. 5 niniejszego raportu). Jednakże biorąc pod uwagę wartości bezwzględne otrzymanych parametrów (które wskazują na największą różnicę pomiędzy wartościami początkowymi a wartościami otrzymanymi w ramach przeprowadzonych eksperymentów), najlepsze okazały się warianty 6 – w 3 godzinie hodowli i 7 oraz 8 w czwartej godzinie hodowli (wartości te zaznaczono kolorem żółtym w tabeli 6).

Tabela 6. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.

Wariant	Germinacja [%]								
	0h	1h		2h		3h		4h	
4	0	-43,2	-21,9	-36,3	-35,2	-90,7	-63,1	-66,3	-33,4
		-0,7		-34,1		-35,4		-0,4	
5	0	-15,8	-25,1	-2,6	-18,1	-27,1	-27,4	-22,1	-43,5
		-34,4		-33,7		-27,7		-64,8	
6	0	-39,1	-40,7	-26,9	-21,1	-127,2	-124,6	-188,9	-165,2
		-42,3		-15,2		-121,9		-141,5	
7	0	-15,4	-14,8	-98,1	-83,5	-181,9	-113,6	-279,7	-208,4
		-14,1		-68,9		-45,3		-137,1	
8	0	-3,2	-23,0	-31,1	-43,7	-50,8	-118,5	-175,5	-170,1
		-42,8		-56,3		-186,2		-164,6	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

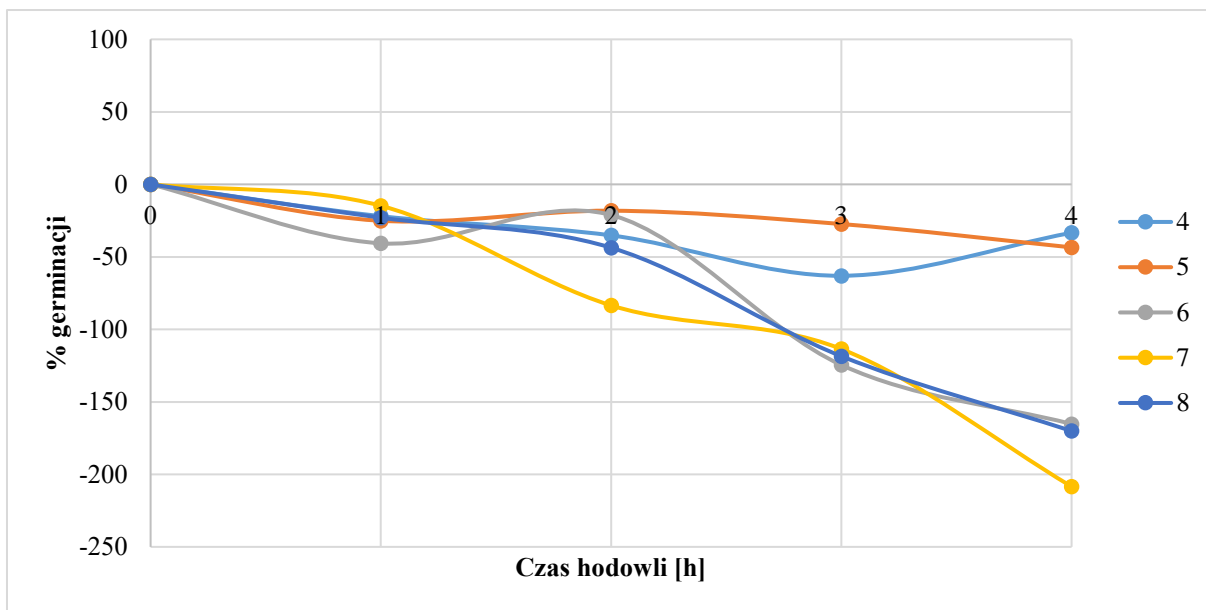
W tabeli 7 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP dla przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na bibule Whatmana. Oznaczenia wykonano w 0, po 1, 2, 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń). Po 2 godzinach inkubacji bakterii w mieszaninie doświadczalnej nie zaobserwowano tak znaczących przyrostów poziomu ATP jak w przypadku zawiesiny bakterii w wodzie. Największy poziom ATP uzyskano po 1 godzinie hodowli dla wariantu 5(Asp + Ino + Na⁺ + K⁺) i po 4 godzinie dla wariantu 6 (Asp + Ala + Na⁺). Świadczy to o ochronnej roli nośnika w stosunku do przetrwalników bakterii. Potwierdzają to również badania innych Autorów, którzy wykazywali ochronny wpływ różnych matryc na skuteczność procesów biologicznych (np. inaktywacji przetrwalników) (Ocio i wsp., 1996, Ananta i wsp., 2001).

Graficzną formę wyników przedstawiono na rysunkach 5-7.

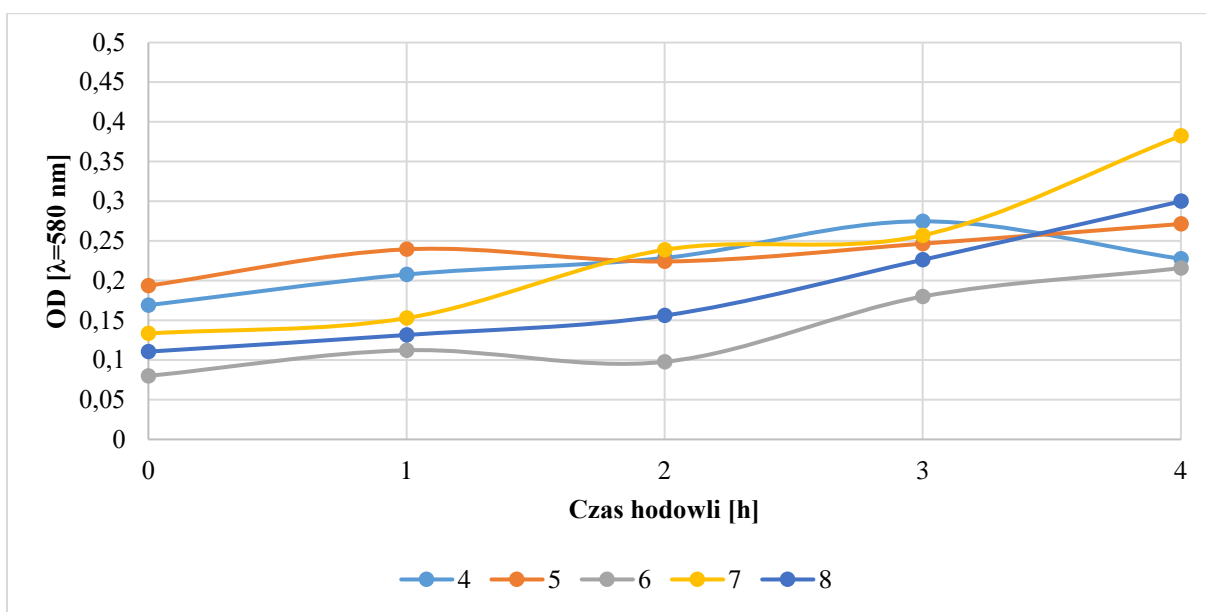
Tabela 7. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].

Wariant	ATP [RLU]																			
	0 h					1 h					2 h					4 h				
	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia
4	839	845	826	837	733	1668	1647	1562	1626	1312	2637	2388	2355	2460	1855	4510	4215	4015	4247	3923
	611	645	630	629		1005	1012	976	998		1267	1227	1254	1249		3443	3493	3860	3599	
5	885	908	904	899	1027	5288	5399	5388	5358	5399	3965	3955	3451	3790	3706	3358	3379	3306	3348	2475
	1121	1198	1147	1155		5300	5365	5654	5440		3030	3493	4342	3622		1548	1645	1613	1602	
6	742	711	742	732	900	1531	1552	1518	1534	1248	1887	1894	1945	1909	1488	9246	9620	9929	9598	9258
	929	1050	1227	1069		963	956	968	962		1045	1070	1087	1067		8745	9014	8994	8918	
7	1085	1130	1142	1119	1207	1162	1206	1212	1193	1398	3530	3625	3741	3632	3847	2538	2514	2629	2560	3235
	1324	1315	1243	1294		1514	1614	1682	1603		3397	4001	4789	4062		3707	3846	4175	3909	
8	843	832	797	824	714	984	1003	958	982	1061	1940	2116	2250	2102	2029	2294	2364	2491	2383	3179
	624	589	596	603		1103	1137	1181	1140		1872	1970	2027	1956		3335	4014	4574	3974	

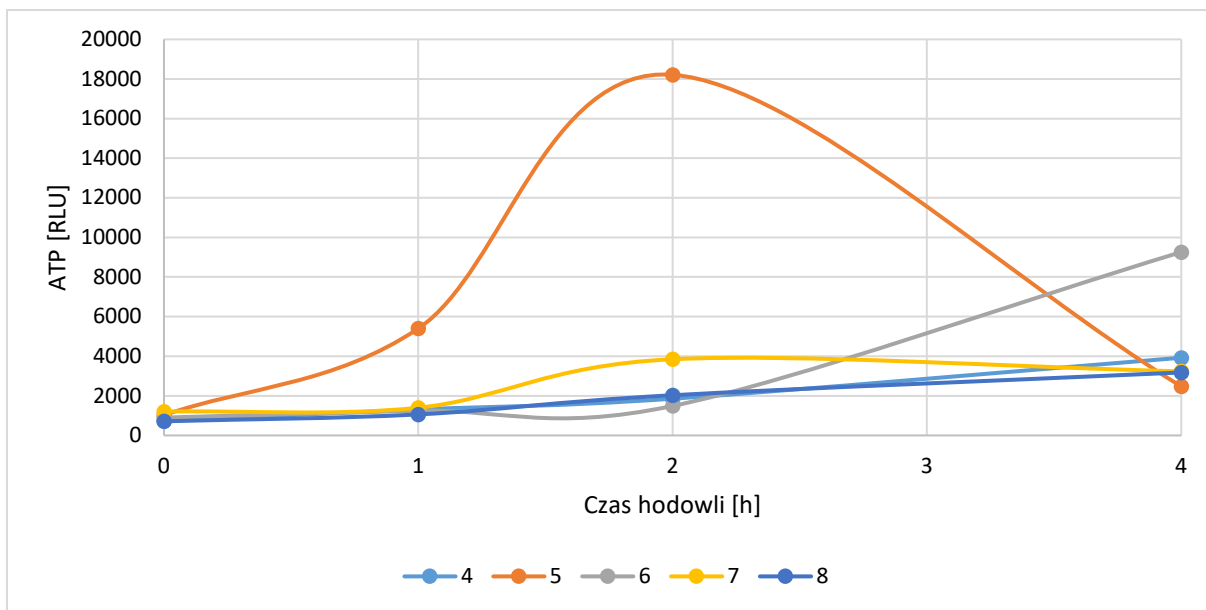
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.



Rysunek 5. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na bibule Whatmana.



Rysunek 6. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na bibule Whatmana.



Rysunek 7. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na bibule Whatmana.

1.1.3. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawieszynie przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na Tyvek.

Badania przetrwalników bakterii *Geobacillus stearothermophilus* kontynuowano dla 5 najlepszych wariantów pożywek (wariant 4, 5, 6, 7, 8), wyznaczonych w doświadczeniu z zawiesziną przetrwalników w wodzie (analogicznie jak dla przetrwalników zimmobilizowanych na bibule Whatmana. W celu 100 µl zawiesiny o wystandaryzowanej liczebności 10^7 jtk/ml, nakrapiano na krążek i czekano do całkowitego wyschnięcia – 48 h (w testach stosowano 2 krążki na każde 12 ml badanej pożywki). Wyniki pomiarów gęstości optycznej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników zimmobilizowanych na Tyvek.

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
4	0,09615	0,07135	0,24125	0,21505	0,2309
5	0,1444	0,0465	0,30845	0,28955	0,29475
6	0,15555	0,18595	0,2343	0,34865	0,1228
7	0,13035	0,20305	0,29415	0,24515	0,0487
8	0,13175	0,15515	0,28825	0,2383	0,33455

Z przedstawionych danych wynika, że w przypadku immobilizacji przetrwalników bakterii na nośniku (Tyvek) obserwowano znacznie niższe wartości OD, niż przypadku zawiesiny przetrwalników w wodzie (tabela 2). Uzyskane wyniki są zbliżone do tych uzyskanych dla przetrwalników zim mobilizowanych na bibule Whatmana, jednakże cechowały się większymi rozbieżnościami. Dla niektórych wariantów doświadczeń (wariant 6 i 7) zaobserwowano spadek gęstości optycznej w 4 godzinie, dla pozostałych badanych wariantów obserwowano wzrost tego parametru. Było to prawdopodobnie związane z nierównomiernym zatrzymaniem komórek na nośniku (Tyvek). Skutkowało to otrzymaniem zarówno ujemnych jak i dodatnich wyników % germinacji (tabela 9), co jest trudne do interpretacji. Jednakże biorąc pod uwagę wartości bezwzględne otrzymanych parametrów (które wskazują na największą różnicę pomiędzy wartościami początkowymi a wartościami otrzymanymi w ramach przeprowadzonych eksperymentów), najlepsze okazały się warianty 4 – w 2 godzinie hodowli i 6 – w 3 godzinie hodowli oraz 8 w 4 godzinie hodowli. Kolorem żółtym w tabeli 9 wyróżniono najlepsze uzyskane wyniki.

Tabela 9. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.

Wariant	Germinacja [%]								
	0	1		2		3		4	
4	0	50,84586	22,80361	-145,677	-151,535	-122,932	-123,748	-153,853	-138,51
		-5,23865		-157,392		-124,563		-123,166	
5	0	61,60338	67,70483	-132,771	-113,896	-119,761	-100,808	-118,284	-104,333
		73,80628		-95,0205		-81,8554		-90,382	
6	0	-56,3811	-27,25	-100,787	-61,1204	-303,322	-161,625	-1,92308	16,24741
		1,881037		-21,454		-19,9288		34,4179	
7	0	-76,6667	-58,4736	-199,279	-135,177	-222,793	-105,485	35,67568	59,1538
		-40,2806		-71,0755		11,82365		82,63193	
8	0	-1,8018	-19,4412	-95,7727	-121,208	-97,5745	-79,1144	-135,551	-155,863
		-37,0805		-146,644		-60,6544		-176,174	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

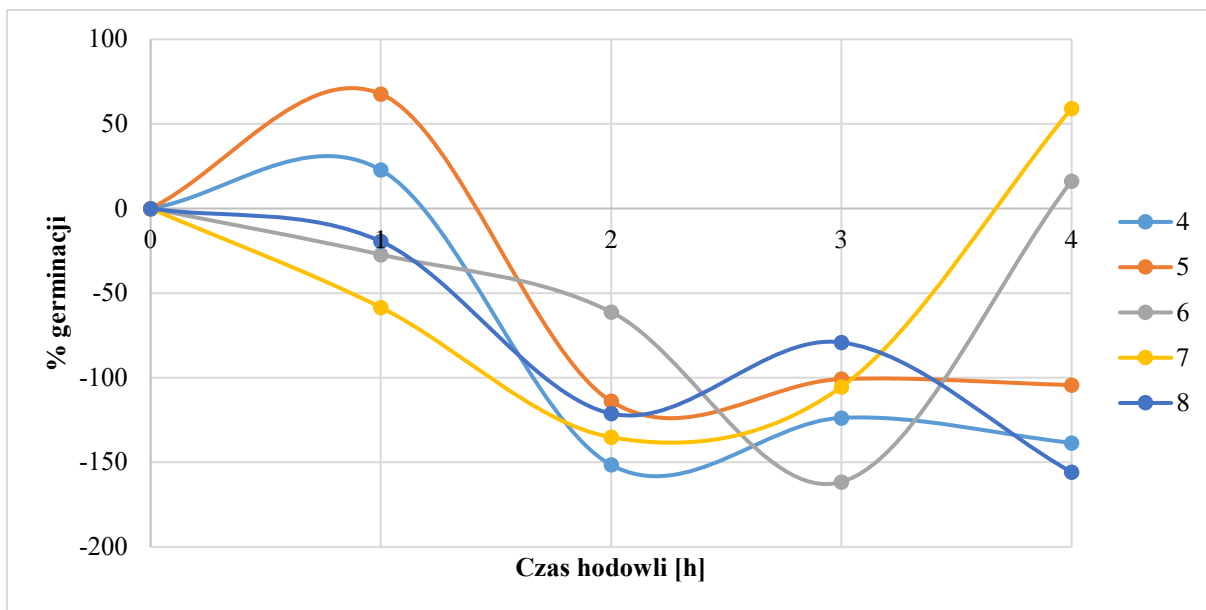
W tabeli 10 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP dla przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na materiale Tyvek. Oznaczenia wykonano w 0, po 2 i 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń). Po 2 godzinach inkubacji bakterii w mieszaninie doświadczalnej nie zaobserwowano tak znaczących przyrostów poziomu ATP jak w przypadku zawiesiny bakterii w wodzie. Największy poziom ATP uzyskano dopiero po 4 godzinie hodowli dla wariantów 5– 8.

Na rysunkach 8-10 przedstawiono graficzną ilustrację otrzymanych wyników dla przetrwalników zim mobilizowanych na Tyvek.

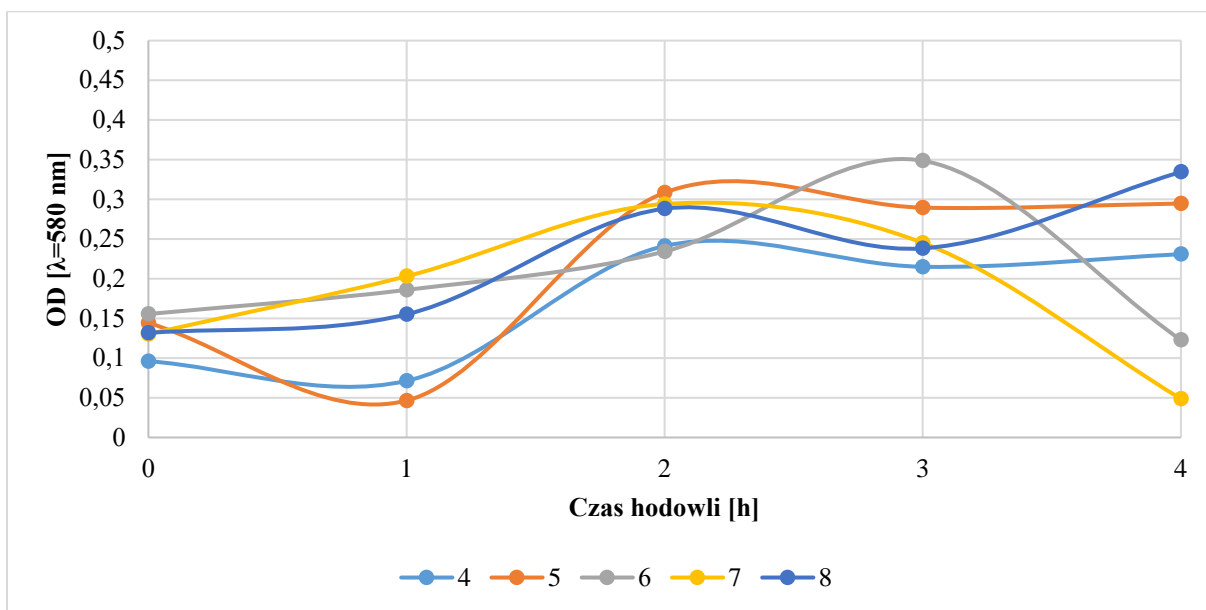
Tabela 10. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU]- immobilizacja przetrwalników na Tyvekcie

Wariant	ATP														
	0 h					2 h					4 h				
	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia
4	2664	2634	2229	2509	2657	3411	3424	3520	3452	3356	10378	10386	10653	10472	10826
	2845	2956	2610	2804		3398	3124	3258	3260		11478	10589	11478	11181	
5	2272	2251	2331	2285	2261	4541	4662	4375	4526	4800	17790	17330	17456	17560	18218
	2243	2253	2215	2237		4557	5358	5305	5073		18444	19307	19054	18876	
6	2785	2743	2613	2714	2833	4097	4335	4462	4298	5088	13797	13690	13987	13744	16378
	2879	2966	3012	2952		5893	5892	5850	5878		19345	18682	19054	19014	
7	2913	3059	3113	3028	2973	4670	4835	4440	4648	4439	19868	19471	19125	19670	19499
	3005	2847	2903	2918		3962	4266	4459	4229		19795	18730	18954	19263	
8	3359	3164	3182	3235	3288	4093	4221	4450	4255	4985	20157	19934	20145	20046	21127
	3220	3154	3645	3340		5546	5707	5733	5662		21939	22479	21456	22209	

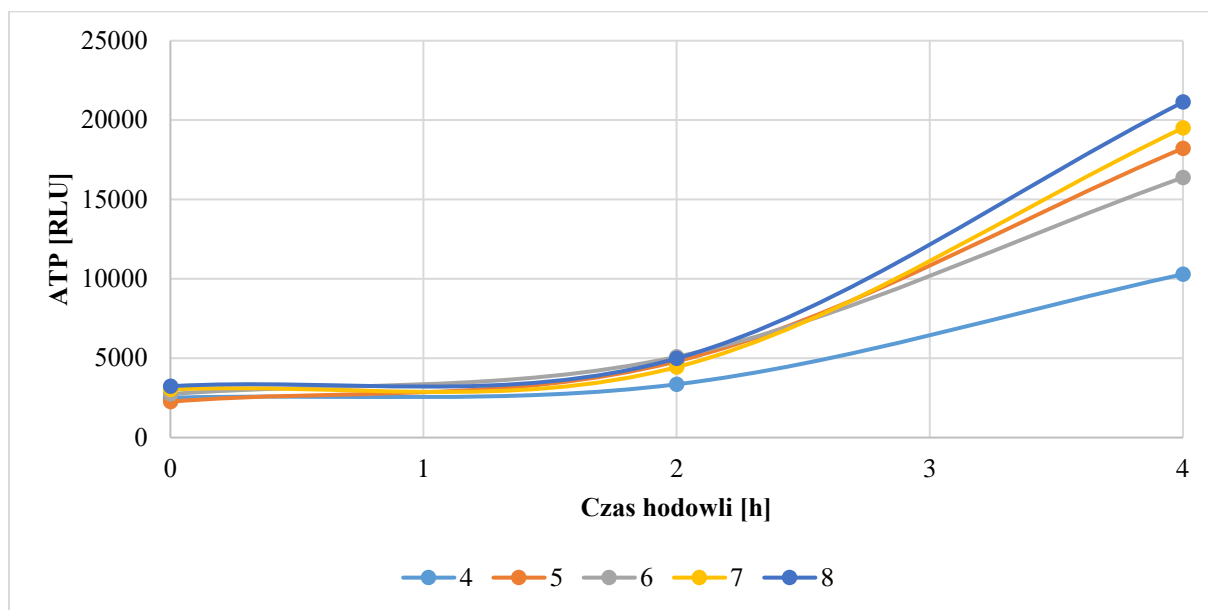
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.



Rysunek 8. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na Tyveksie



Rysunek 9. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na Tyveksie



Rysunek 10. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na Tyvexie

1.1.4. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w liofilizacie przetrwalników bakterii (proszek)

Badania przetrwalników bakterii z *Geobacillus stearothermophilus* kontynuowano dla 5 najlepszych wariantów pożywek (wariant 4, 5, 6, 7, 8), wyznaczonych w doświadczeniu z zawiesiną przetrwalników w wodzie. W tej części eksperymentów wykorzystano liofilizat przetrwalników bakterii. Do 12 ml pożywki dodawano 0,05 g liofilizatu, co pod względem liczebności odpowiadało liczbie przetrwalników zawieszonych w wodzie (pkt. 1.1.1) oraz liczbie przetrwalników zimmobilizowanych na bibule Whatmana oraz na materiale Tyvek (pkt. 1.1.2. i 1.1.3.). Wyniki pomiarów gęstości optycznej dla tego wariantu doświadczeń przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla liofilizatu przetrwalników

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
4	1,3369	1,4425	1,7601	1,90565	1,2312
5	1,3527	1,6434	1,58105	1,9426	1,6285
6	1,09515	1,2505	1,4934	1,7661	1,49945
7	0,65355	1,19285	1,06765	1,3692	1,5945
8	1,06405	0,60955	1,78795	2,03195	1,87915

Z przedstawionych danych wynika, że już na początku hodowle te charakteryzowały się wysokim OD w porównaniu do wcześniejszych eksperymentów (zawiesina przetrwalników, immobilizacja na bibule Whatmana oraz na materiale Tyvek). Dla większości wariantów obserwowano przyrost gęstości optycznej hodowli do 3 godziny eksperymentu, a potem niewielki jej spadek. Spadek gęstości optycznej dla kiełkujących przetrwalników obserwowano również w innych badaniach (Porębska i wsp., 2015).

W tabeli 12 zaprezentowano wyniki obliczeń procentowej liczby germinacji (wzór str. 5). Biorąc pod uwagę bezwzględne wartości danych najlepszym wariantem okazał się wariant 7 (Asp + Ala + K⁺).

Tabela 12. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.

Wariant	Germinacja [%]								
	0	1		2		3		4	
4	0	1,518147	-7,41636	-38,4281	-32,0023	-50,5733	-42,9539	-21,6415	6,392367
		-16,3509		-25,5766		-35,3346		34,42623	
5	0	-22,2345	-21,5358	-9,9233	-16,4561	-48,0905	-43,8828	-24,828	-20,66
		-20,8371		-22,9888		-39,6752		-16,492	
6	0	16,04736	-20,4729	-19,3893	-39,8954	-39,2537	-65,8435	-12,6042	-41,9738
		-56,9932		-60,4015		-92,4333		-71,3435	
7	0	-82,2481	-82,5221	-40,8068	-63,6535	-129,944	-109,237	-134,809	-144,094
		-82,796		-86,5003		-88,5307		-153,379	
8	0	39,04082	43,55111	-51,4308	-71,8151	-73,0559	-95,044	-52,7467	-82,0392
		48,06139		-92,1994		-117,032		-111,332	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

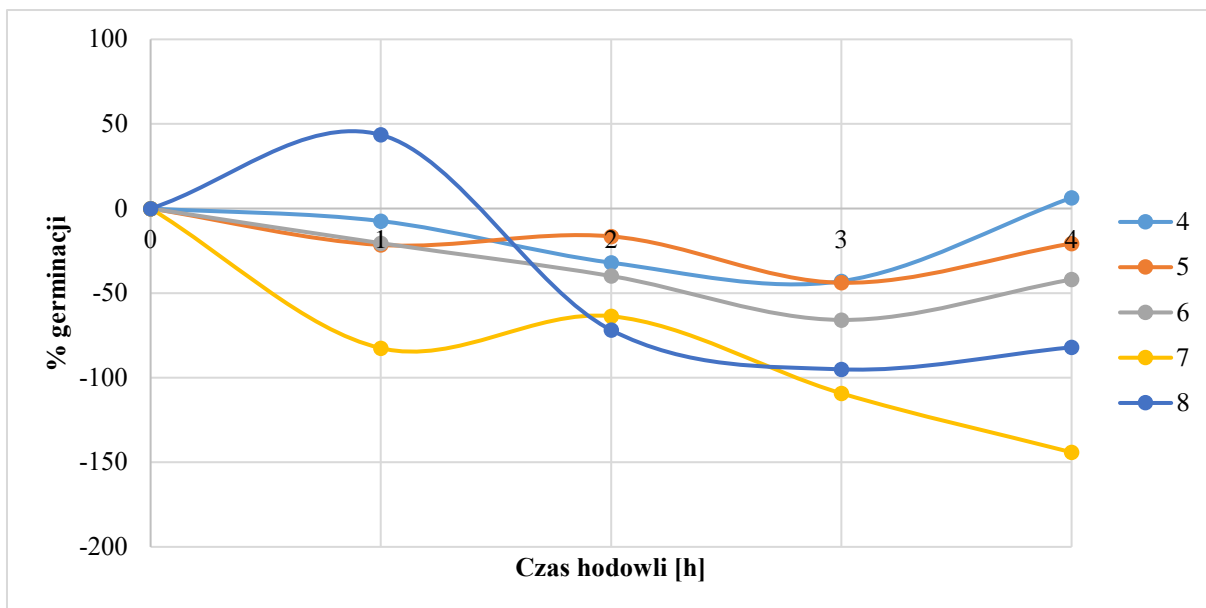
Wyniki pomiarów ilości ATP dla doświadczeń z liofilizatem przetrwalników bakterii z *Geobacillus stearothermophilus* przedstawiono w tabeli 13. Oznaczenia wykonano w 0, pół, 2 i 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń). Obserwowano stopniowy wzrost ilości uwalnianego ATP - po 1 godzinie inkubacji poziom ATP zwiększył się średnio dwukrotnie, a po 2 godzinach – średnio czterokrotnie w porównaniu do godziny 0. Największy wzrost badanego parametru obserwowano po 4 godzinie, w szczególności dla wariantu 8 (Asp + Ala + Na⁺ + K⁺).

Na rysunkach 11-13 przedstawiono graficzną ilustrację otrzymanych wyników dla zliofilizowanych przetrwalników *Geobacillus stearothermophilus*.

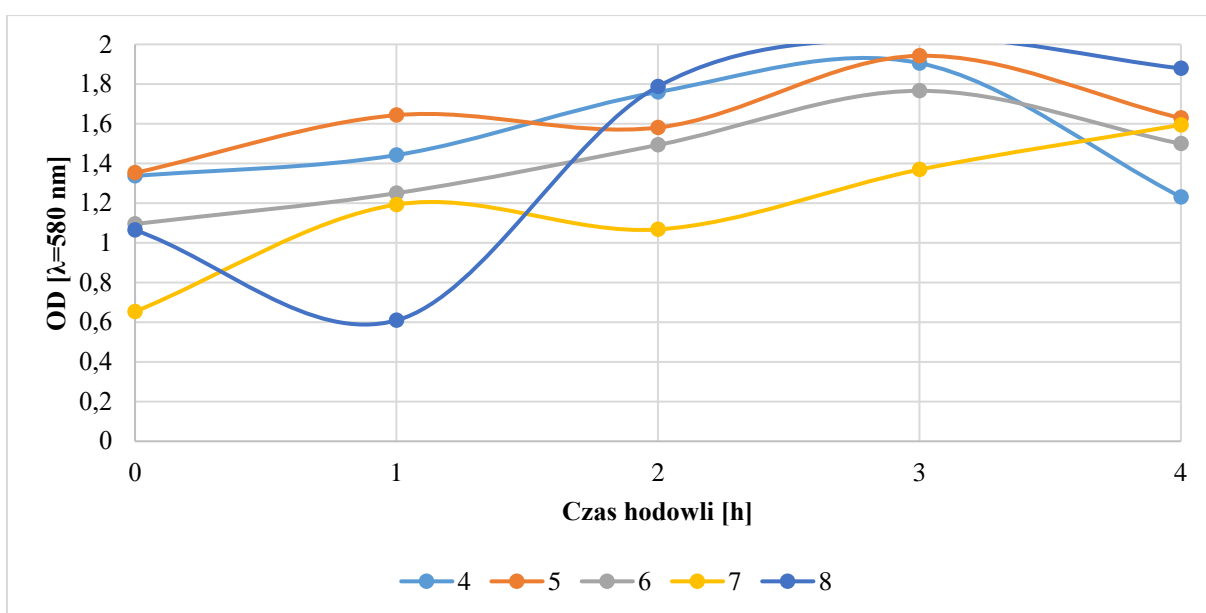
Tabela 13. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU] - liofilizat

Wariant	ATP																			
	0h					1h					2h					4h				
	I	II	III	Śr. częst.	Śred.	I	II	III	Śr. częst.	Śred.	I	II	III	Śr. częst.	Śred.	I	II	III	Śr. częst.	Śred.
4	867	797	782	815	844	1844	1825	1794	1821	1448	3082	2947	2905	2978	3007	7129	6654	6538	6774	6983
	875	894	848	872		1093	1081	1050	1075		3110	3020	2977	3036		7397	7150	7031	7193	
5	912	890	867	890	904	2782	2691	2747	2740	2821	3050	3095	3092	3079	3720	8486	8689	8491	8555	7946
	963	907	883	918		2864	2917	2926	2902		3340	3340	6405	4362		7275	7392	7345	7337	
6	764	812	855	810	819	779	799	799	792	1351	3545	3566	3558	3556	3391	18388	18767	17930	18362	16707
	836	838	806	827		1862	1981	1886	1910		3181	3251	3247	3226		15601	14776	14782	15053	
7	2556	1326	807	1563	1205	1558	1518	1477	1518	1511	2471	2421	2481	2458	2836	10973	11461	10161	10865	11766
	896	802	844	847		1498	1500	1512	1503		3203	3190	3250	3214		12591	12556	12852	12666	
8	1360	1262	1222	1281	1174	1641	1619	1600	1620	1440	6588	6346	6387	6440	6676	111481	114946	116103	114177	114258
	1084	1115	1001	1067		1254	1248	1277	1260		7050	6826	6860	6912		113876	113278	115864	114339	

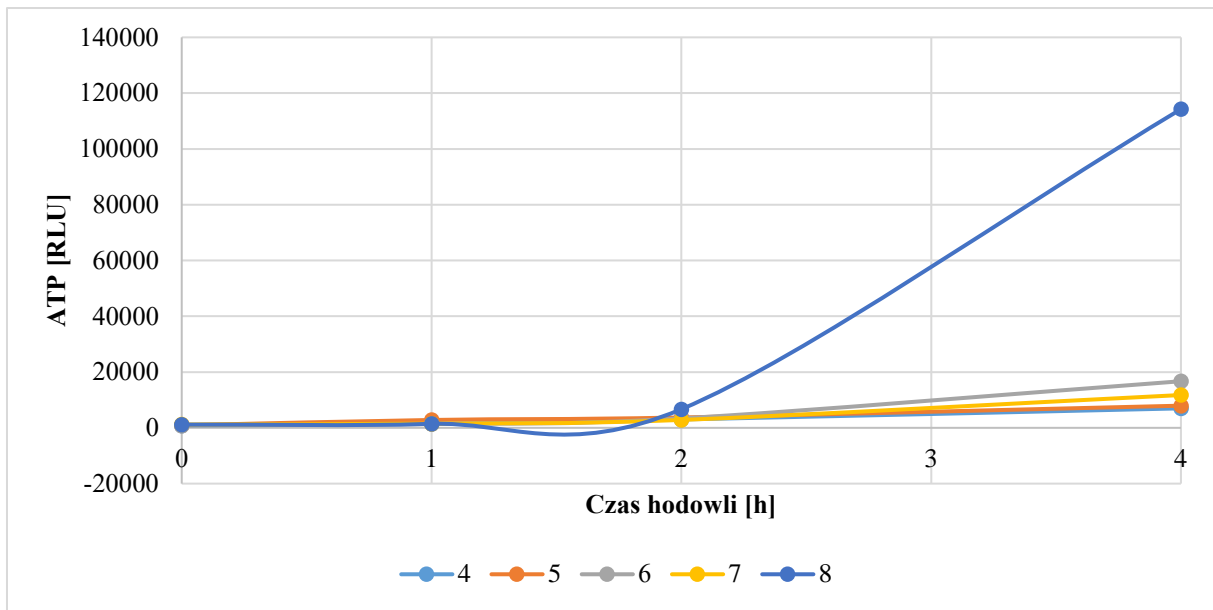
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepszy wynik.



Rysunek 11. Wpływ składu podłoża na % germinacji (liofilizat)



Rysunek 12. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną (liofilizat)



Rysunek 13. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP (liofilizat)

1.1.5. Wpływ germinantów na zmianę barwy wskaźnika redox – resazuryny - wizualna zmiany barwy

W kolejnym etapie badań określono wpływ germinantów (jony, cukry, aminokwasy) na zmianę barwy wskaźnika redox – resazuryny - **wizualna zmiany barwy**. W tym celu wykonano **test studzienkowy**, polegający na nanoszeniu do płytek wielodołkowych 200 µl hodowli (układ: pożywka + germinanty + spory). Układ ten wcześniej poddany był **wstępnej inkubacji** (w temperaturze 55°C) – do dołków nanoszono odpowiednio: 0, 1, 2, 3 i 4 – godziną hodowlę. Hodowle prowadzono na zmodyfikowanej pożywce III (Krzywicka i wsp., 1996, raport R2) z dodatkiem 9 różnych germinantów (tabela 14). Inoculum (spory *Geobacillus stearothermophilus*) stanowiło 10 % całkowitej objętości hodowli.

Ocenę testu studzienkowego dokonywano, dodając do dołków (zawierających odpowiednie warianty hodowli) 20 µl **wskaźnika redoks – resazurynę**. Ocenę zmiany barwy resazuryny (z fioletowej na różową) dokonywano przez 3 kolejne godziny (w godzinnych odstępach czasu, płytki inkubowano w temperaturze 55°C), a wynik obserwacji przedstawiono na rysunku 14. Na zdjęciach kolorem czerwonym wyróżniono tzw. **czas T_{wo}** - **czas wizualnej oceny**, który obejmował czas zmiany barwy liczony po dodaniu wskaźnika.

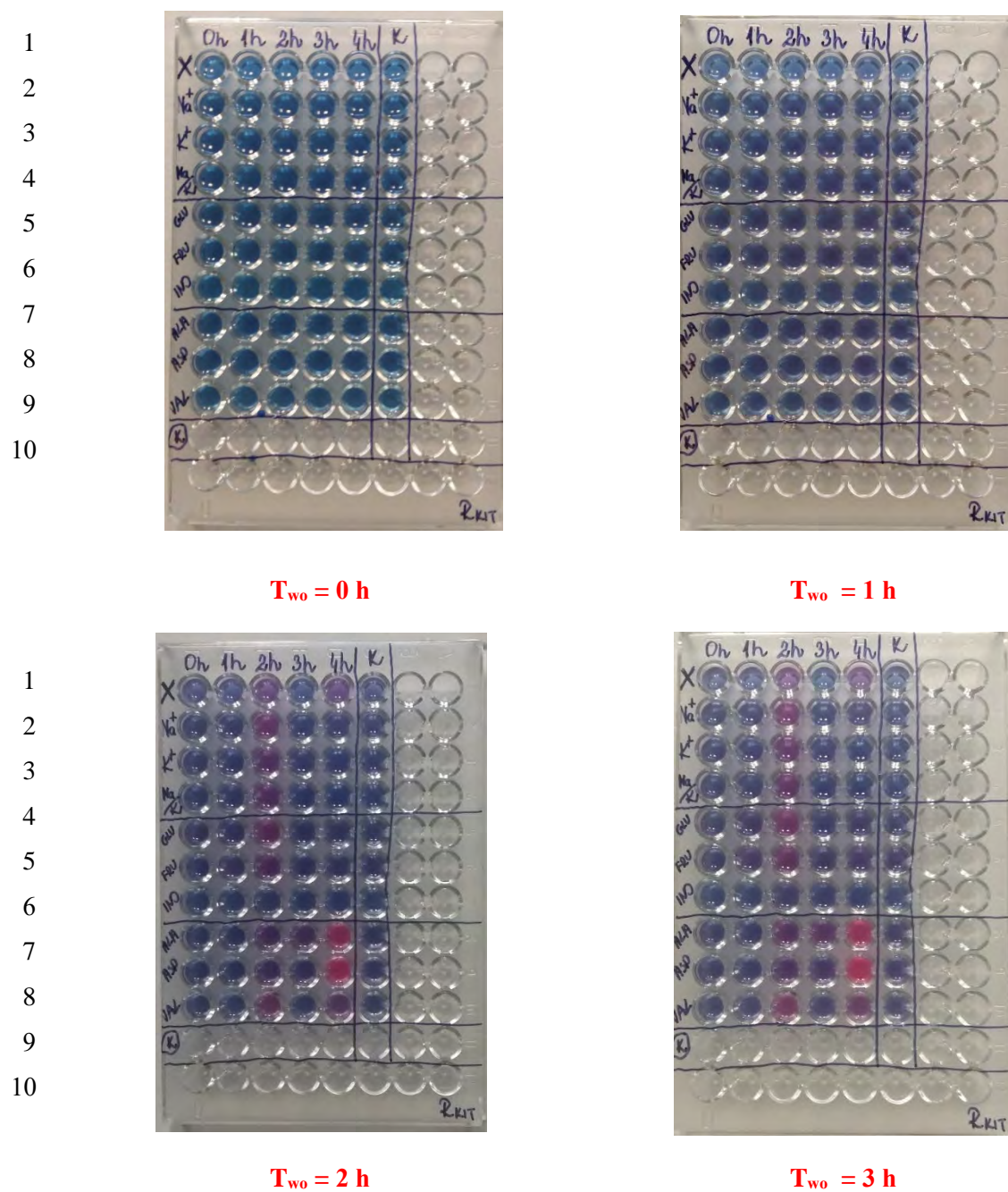
Całkowity czas potrzebny na uzyskanie reakcji barwnej był sumą czasu wstępnej inkubacji oraz czasu **T_{wo}**.

Tabela 14. Warianty pożywek użytych do wizualnej oceny zmiany barwy.

L.p.	Oznaczenie na płytce wielodołkowej	Rodzaj germinanta	Ilość germinanta	Pożywka hodowlana
1	X	Próba kontrolna	100 mM	III
2	Na ⁺	Sód		
3	K ⁺	Potas		
4	Na ⁺ + K ⁺	Sód + potas		
5	GLU	Glukoza		
6	FRU	Fruktoza		
7	INO	Inosine		
8	ALA	L- Alanina		
9	ASP	L- Asparagina		
10	VAL	L- Valina		

W pierwszej godzinie obserwacji nie zauważono zmiany barwy (w stosunku do godziny zerowej), natomiast w godzinie drugiej i trzeciej najlepszą zmianę barwy uchwycono w przypadku pożywki zawierającej w swoim składzie germinant Alaninę i Asparaginę (wariant 8 i 9). W pozostałych przypadkach zmiana barwy była niewielka, często porównywalna do kontroli K.

Rysunek 14. Ocena wizualna zmiany barwy resazuryny.



Legenda:

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – warianty pożywek (tabela 14)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks

2. Spis literatury

1. Ananta E., Heinz V., Schlüter O., Knorr D.: Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 261-272, 2001.
2. Dawgul M., Barańska-Rybak W., Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W.: The influence of antimicrobial peptides on *Candida* biofilm. *Alergia Astma Immunologia*, 15(4): 220-225, 2010.
3. Ocio M.J., Fernández P., Rodrigo F., Martínez A.: Heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in alginate-mushroom puree mixture. *International Journal of Food Microbiology* 29: 391-395, 1996.
4. Porębska I., Sokołowska B., Woźniak Ł.: Dipicolinic acid release and the germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under nutrient germinants. *Polish Journal of Microbiology* 66(1): 67-74, 2017.
5. Porębska I., Rutkowska M., Sokołowska B.: Decrease in optical density as a results of germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under high hydrostatic pressure. *High Pressure Research* 35(1): 89-97, 2015
6. Rogers W.J.: Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices. W: *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*, 2012, page 20-55.
7. Rogers W.J.: The effects of sterilization on medical materials and welded devices. W: *Joining and Assembly of Medical Materials and Devices*, 2013, page 79-130
8. Santos S.M.H., Zarzo T.J.: Evaluation of citric acid and GDL in the recovery at different pH levels of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores subjected to HTST treatment conditions. *International Journal of Food Microbiology* 29: 241-254, 1996.
9. Woese C., Morowitz H.J.: Kinetics of the release of dipicolinic acid from spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 76(1): 81-83, 1958.

3. Spis rysunków

Rysunek 1. Rodzaje stosowanych nośników.....	6
Rysunek 2. Wpływ składu podłoża na % germinacji – przetrwalniki zawieszone w H ₂ O.	11
Rysunek 3. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną zawiesiny – przetrwalniki zawieszone w H ₂ O.....	11
Rysunek 4. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – przetrwalniki zawieszone w H ₂ O.....	12
Rysunek 5. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na bibule Whatmana..	16
Rysunek 6. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na bibule Whatmana.	16
Rysunek 7. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na bibule Whatmana.....	17
Rysunek 8. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na Tyveksie.....	21
Rysunek 9. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na Tyveksie.....	21
Rysunek 10. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na Tyveksie.....	22
Rysunek 11. Wpływ składu podłoża na % germinacji (liofilizat).....	26
Rysunek 12. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną (liofilizat).....	26
Rysunek 13. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP (liofilizat)	27
Rysunek 14. Ocena wizualna zmiany barwy resazuryiny.....	30

4. Spis tabel

Tabela 1. Warianty doświadczeń	5
Tabela 2. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego	8
Tabela 3. % germinacji dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego.....	9
Tabela 4. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].....	10
Tabela 5. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników ziimobilizowanych na bibule Whatmana.....	13
Tabela 6. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.....	14
Tabela 7. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].....	15
Tabela 8. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników ziimobilizowanych na Tyvek.....	18
Tabela 9. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.....	19
Tabela 10. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU]- immobilizacja przetrwalników na Tyvekie	20
Tabela 11. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla liofilizatu przetrwalników	23
Tabela 12. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.....	24
Tabela 13. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU] - liofilizat.....	25
Tabela 14. Warianty pożywek użytych do wizualnej oceny zmiany barwy.	28



Sprawozdanie roczne

D/2017

Badanie nad możliwością
wykorzystania opracowanych w
etapie 1 metod do oceny
skuteczności procesów sterylizacji



Sprawozdanie roczne

D/2017

R/4

Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

Raport cząstkowy R/4

Określenie aktywności enzymów podczas procesu kiełkowania spor

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Wykorzystanie metody bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej
- Ustalenie minimalnego czasu kiełkowania przetrwalników umożliwiającego ich wykrycie w danej metodzie (wizualna ocena zmiany barwy)
- Kontynuacja badań nad wyborem nośnika do immobilizacji spor

Spis treści

1. Wprowadzenie	5
1.1. Wyniki:	8
1.1.1. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawiesinie przetrwalników bakterii.....	8
1.1.2. Wyniki oznaczeń poziomu ATP dla bakterii zimmobilizowanych na bibule Whatmana 13	
1.1.3. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawiesinie przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na Tyvek.	18
1.1.4. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w liofilizacie przetrwalników bakterii (proszek) ..	23
1.1.5. Wpływ germinantów na zmianę barwy wskaźnika redox – resazuryny - wizualna zmiany barwy	28
2. Spis literatury	31
3. Spis rysunków	32
4. Spis tabel	32

1. Wprowadzenie

W wyniku prac przeprowadzonych w poprzednich etapach (Raporty cząstkowe R1-R3), dokonano wyboru optymalnych składów pożywki, będących medium przyspieszającym proces germinacji. Testy potwierdzające słuszność wyboru danych komponentów prowadzono w pożywkach płynnych, zawierających pożywkę mikrobiologiczną III (Raport R2), odpowiedni aminokwas - **asparaginę** jako germinant oraz **alaninę** lub **inosine**, będące ko-germinantem. Dodatkowo, na podstawie doświadczeń przeprowadzonych nad wpływem wybranych jonów na kiełkowanie przetrwalników, pożywka w swoim składzie zawierała 100 mM kationów Na^+ lub K^+ . Jako kontrolę zastosowano zmodyfikowaną pożywkę III tylko z dodatkiem kationów (bez aminokwasów) (Krzywicka i wsp, 1996, raport D/2016).

W celu określenia aktywności enzymów podczas procesu kiełkowania spor przeprowadzono osiem wariantów doświadczeń (tabela 1), w których badano następujące parametry: gęstość optyczną oraz ilość ATP.

Tabela 1. Warianty doświadczeń

L.p.	Skład mieszaniny hodowlanej	Ilość [μM]
1	X + Na^+	100
2	X + K^+	100
3	Asp + Ino + Na^+	100 + 100 + 100
4	Asp + Ino + K^+	100 + 100 + 100
5	Asp + Ino + Na^+ + K^+	100 + 100 + 100 + 100
6	Asp + Ala + Na^+	100 + 100 + 100
7	Asp + Ala + K^+	100 + 100 + 100
8	Asp + Ala + Na^+ + K^+	100 + 100 + 100 + 100

Legenda:

X – brak aminokwasów (Próba kontrolna)

Na^+ - sód (Na Cl)

K^+ - potas (KCl)

Asp - asparagina

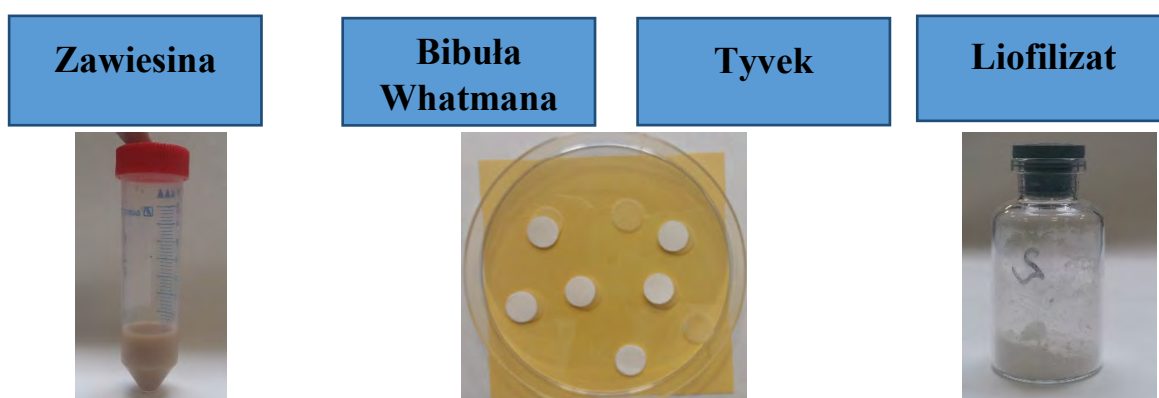
Ino – inosine

Ala - alanina

W celu określenia szybkości procesu germinacji, badane spory użyto w formie natywnej (zawiesina przetrwalników w ilości 200 μ l na każde 12 ml badanej pożywki, o wystandaryzowanej liczebności 10^7 jtk/ml). Dodatkowo, wyżej wymienioną zawiesinę zimmobilizowano na dwóch rodzajach nośników – bibule Whatmanna oraz na materiale Tyvek. W tym celu 100 μ l zawiesiny nakrapiano na krążek i czekano do całkowitego wyschnięcia – 48 h (w testach stosowano 2 krążki na każde 12 ml badanej pożywki). Otrzymaną zawiesinę suszono także liofilizacyjnie, gdzie nośnikiem był tlenek krzemu. W trakcie suszenia oznaczono przeżywalność spor (posiewy ilościowe [jtk/g]) oraz wykonano podstawowe bilanse technologiczne (oznaczano masę suszu oraz wydajność suszenia). Do każdej próbki, zawierającej 12 ml badanego komponentu, dodawano 0,05g badanego liofilizatu.

➤ Rodzaje badanego materiału:

1. Zawiesina
2. Krążki
 - a. Bibuła Whatmana
 - b. Tyvek
3. Liofilizat (proszek)



Rysunek 1. Rodzaje stosowanych nośników

W trakcie testów oznaczano % germinacji [Woese i Morowitz, 1958, metodyka z publikacji -Cheida Aouadhi; Optimaliation of nutrient – induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores using response surface methodology), liczebność komórek (jtk/ml – zalewową metodą płytkową), ilość uwalnianego ATP [RLU] oraz ocenę zmiany barwy wskaźnika (resazuryna).

➤ Mierzone parametry:

1. Ilość ATP (RLU)
2. % Germinacji

$$G = \left(\frac{OD_i - OD_f}{OD_i} \right) * 100 [\%]$$

Gdzie:

OD_i – gęstość optyczna początkowa

OD_f - gęstość optyczna końcowa

3. Ocena zmiany barwy wskaźnika - resazuryna

1.1. Wyniki:

1.1.1. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawieszynie przetrwalników bakterii

Przeprowadzone badania wykazały wpływ wybranych mieszanin (składających się z aminokwasów, kationów i inosyny) na proces germinacji *Geobacillus stearothermophilus*. Zmiana poziomu germinacji spor zawieszonych w jałowej wodzie destylowanej była wyznaczona i przedstawiona jako procentowa redukcja OD [gęstość optyczna].

Poziom gęstości optycznej przedstawiono w tabeli 2. W początkowych etapach hodowli obserwowano spadek gęstości optycznej zawiesiny bakterii. Było to związane z przechodzeniem form przetrwanych w wegetatywne. Podobne wyniki obserwowane były również przez innych badaczy [Porębska i wsp., 2017] W większości przypadków spadek wartości OD utrzymywał się do godziny 2.

Tabela 2. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
1	0,65645	0,4483	0,20945	0,4013	0,3844
2	0,58105	0,35625	0,21835	0,4127	0,41525
3	0,5633	0,4391	0,2652	0,3894	0,42605
4	0,55075	0,28245	0,22295	0,4009	0,42655
5	0,60475	0,44075	0,21095	0,40255	0,41485
6	0,51965	0,41815	0,2392	0,3826	0,4003
7	0,6416	0,4054	0,3868	0,36025	0,3638
8	0,70535	0,47355	0,3769	0,3738	0,2790

W przypadku procentowego wyznaczenia poziomu germinacji (tabela 3), największym % germinacji charakteryzował się wariant 2 i 5 (w drugiej godzinie hodowli) oraz wariant 8 (4 godzina hodowli). Wartości te oscyływały na poziomie powyżej 60 %. Świadczy to o istotnej roli jonów potasu w kiełkowaniu przetrwalników. Ponadto uzyskane wyniki świadczą o istotnej roli inosyny w usunięciu ochronnych warstw przetrwalnika. Biorąc pod uwagę procent germinacji i czas, najlepszym wariantem okazał się wariant 5, gdzie w mieszaninie zawarta była asparagina, inosyny oraz sól i potas (każdy ze składników po 100 μ M).

Tabela 3. % germinacji dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego

Wariant	Germinacja [%]								
	0	1h		2h		3h		4h	
1	0	40,110	30,980	70,824	67,857	44,526	38,378	45,556	41,086
		21,851		64,890		32,230		36,616	
2	0	31,103	38,519	58,295	62,329	22,244	28,823	22,614	28,403
		45,936		66,364		35,403		34,191	
3	0	15,132	21,773	44,582	52,588	20,263	30,449	11,539	23,854
		28,413		60,593		40,634		36,168	
4	0	46,064	48,888	56,759	59,698	26,745	27,238	34,309	21,786
		51,711		62,638		27,732		9,263	
5	0	31,999	26,348	64,057	65,285	37,529	32,789	35,506	30,753
		20,697		66,513		28,049		26,000	
6	0	19,864	19,536	39,961	53,832	19,728	26,308	17,046	22,909
		19,207		67,702		32,889		28,773	
7	0	52,042	32,583	51,402	36,466	52,349	41,490	51,018	41,153
		13,125		21,530		30,631		31,289	
8	0	43,600	30,908	50,381	45,871	51,204	46,240	50,430	62,269
		18,217		41,361		41,277		74,108	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

W tabeli 4 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP, dla 8 wariantów doświadczeń (tabela 1). Oznaczenia wykonano w 0, po 2 i 4 h inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń).

Po 2 godzinach hodowli w każdym z wariantów zaobserwowano znaczny wzrost ilości uwalnianego ATP (około 10-krotny wzrost). Najlepszą kombinacją substancji przyspieszających kiełkowanie, dla tej techniki pomiarowej, był wariant 7 (Asp + Ala + K⁺).

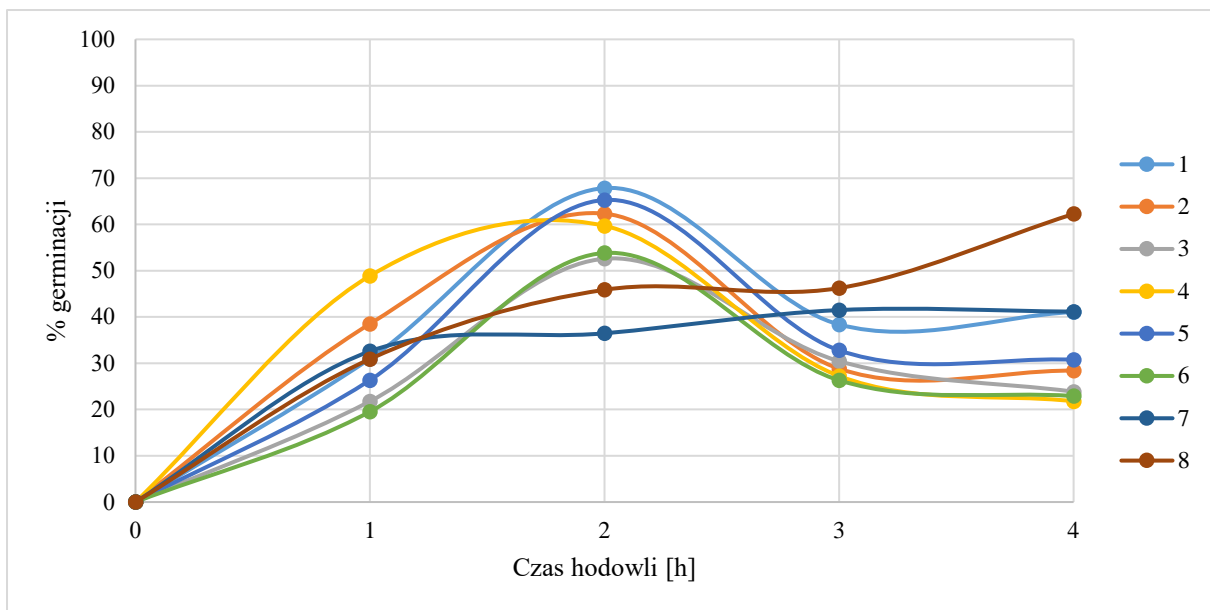
W dalszych etapach hodowli (4h) nie zaobserwowano dalszego wzrostu ilości ATP, co prawdopodobnie spowodowane było brakiem innych składników pokarmowych w pożywce hodowlanej. Nie mniej jednak na potrzeby tego doświadczenia lepsze było wykorzystanie takich mieszanin, bez dodatku innych stymulatorów wzrostu, które mogłyby zafałszować wyniki tych eksperymentów.

Na rysunkach 2-4 przedstawiono graficzną formę wyników.

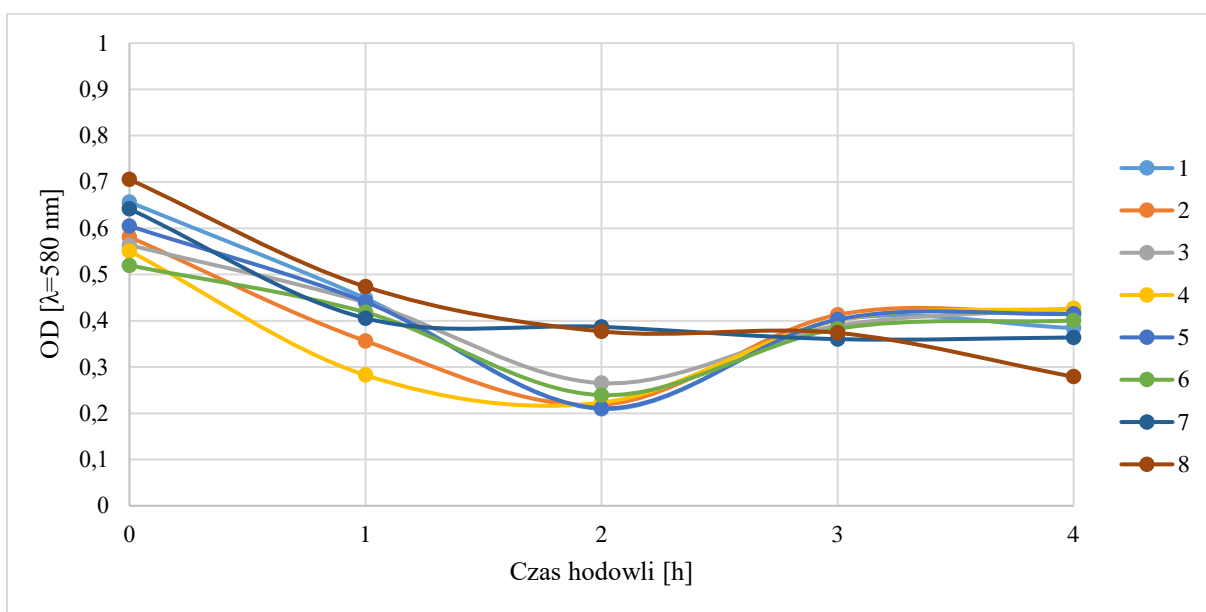
Tabela 4. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].

Wariant	ATP [RLU]														
	0 h				2 h					4 h					
	I	II	III	Średnia cząstk.	Średnia	I	II	III	Średnia cząstk.	Średnia	I	II	III	Średnia cząstk.	Średnia
1	401	364	410	392	311	3354	3451	2987	3264	3387	3938	4018	4004	3987	4677
	231	231	228	230		3296	3578	3657	3510		6134	6411	3556	5367	
2	212	307	402	307	326	2472	2774	2787	2678	3429	3933	3968	4155	4019	5239
	293	346	393	344		4325	4053	4163	4180		6419	6462	6498	6460	
3	271	241	248	253	227	2691	2855	2927	2824	3141	5711	5666	5720	5699	5454
	169	204	230	201		3187	3310	3873	3457		5001	5512	5112	5208	
4	199	178	206	194	479	2909	3172	3083	3055	3169	4266	4779	4959	4668	5418
	622	683	986	764		3229	3227	3391	3282		5459	6077	6968	6168	
5	231	171	192	198	311	3781	3237	3100	3373	3453	4773	4862	4924	4853	4850
	347	417	508	424		3469	3515	3617	3534		4856	4785	4899	4847	
6	330	318	337	328	301	2379	2640	2623	2547	3484	5914	5831	5970	5905	5971
	247	281	291	273		4195	4252	4812	4420		5985	6223	5902	6037	
7	409	498	484	464	399	7192	7686	7714	7531	5912	3956	4135	4577	4223	4307
	320	319	362	334		4274	4227	4379	4293		4288	4405	4479	4391	
8	370	347	421	379	301	2075	2839	2929	2614	3281	6501	6597	6740	6613	5195
	214	216	240	223		3897	3968	3976	3947		3720	3769	3845	3778	

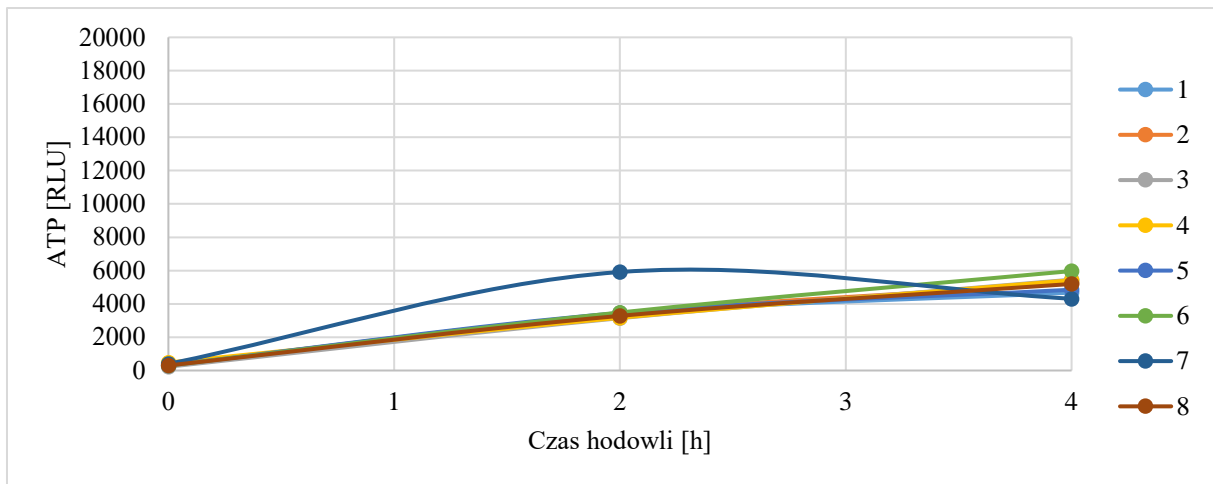
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.



Rysunek 2. Wpływ składu podłoża na % germinacji – przetrwalniki zawieszone w H₂O.



Rysunek 3. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną zawiesiny – przetrwalniki zawieszone w H₂O.



Rysunek 4. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – przetrwalniki zawieszone w H₂O.

1.1.2. Wyniki oznaczeń poziomu ATP dla bakterii zimmobilizowanych na bibule Whatmana

Do dalszych doświadczeń wybrano 5 najlepszych wariantów pożywek (wariant 4, 5, 6, 7, 8), wyznaczonych w doświadczeniu z zawiesiną przetrwalników w wodzie. Zawiesinę bakterii zimmobilizowano na bibule Whatmanna. W tym celu 100 µl zawiesiny o wystandaryzowanej liczebności 10^7 jtk/ml, nakrapiano na krążek i czekano do całkowitego wyschnięcia – 48 h (w testach stosowano 2 krążki na każde 12 ml badanej pożywki).

Tabela 5. Gęstość optyczna ($OD_{\lambda=580\text{ nm}}$), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników zimmobilizowanych na bibule Whatmana.

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
4	0,1691	0,2077	0,2286	0,2747	0,2275
5	0,1937	0,2395	0,2241	0,2466	0,2714
6	0,0800	0,1123	0,0978	0,1800	0,2158
7	0,1334	0,1528	0,2389	0,2571	0,3824
8	0,1106	0,1315	0,1560	0,2263	0,2999

Z danych przedstawionych w tabeli 5 wynika, że w przypadku immobilizacji przetrwalników bakterii na nośniku (bibuła) obserwowano znacznie niższe wartości OD, niż przypadku zawiesiny przetrwalników w wodzie (tabela 2). Było to prawdopodobnie związane z zatrzymaniem komórek na nośniku. Nie stwierdzono też spadku gęstości optycznej w trakcie 4 godzin hodowli. Skutkowało to utrzymaniem ujemnych wyników % germinacji (tabela 6), co wynika ze wzoru na obliczanie tego parametru (wzór przedstawiono na str. 5 niniejszego raportu). Jednakże biorąc pod uwagę wartości bezwzględne otrzymanych parametrów (które wskazują na największą różnicę pomiędzy wartościami początkowymi a wartościami otrzymanymi w ramach przeprowadzonych eksperymentów), najlepsze okazały się warianty 6 – w 3 godzinie hodowli i 7 oraz 8 w czwartej godzinie hodowli (wartości te zaznaczono kolorem żółtym w tabeli 6).

Tabela 6. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.

Wariant	Germinacja [%]								
	0h	1h		2h		3h		4h	
4	0	-43,2	-21,9	-36,3	-35,2	-90,7	-63,1	-66,3	-33,4
		-0,7		-34,1		-35,4		-0,4	
5	0	-15,8	-25,1	-2,6	-18,1	-27,1	-27,4	-22,1	-43,5
		-34,4		-33,7		-27,7		-64,8	
6	0	-39,1	-40,7	-26,9	-21,1	-127,2	-124,6	-188,9	-165,2
		-42,3		-15,2		-121,9		-141,5	
7	0	-15,4	-14,8	-98,1	-83,5	-181,9	-113,6	-279,7	-208,4
		-14,1		-68,9		-45,3		-137,1	
8	0	-3,2	-23,0	-31,1	-43,7	-50,8	-118,5	-175,5	-170,1
		-42,8		-56,3		-186,2		-164,6	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

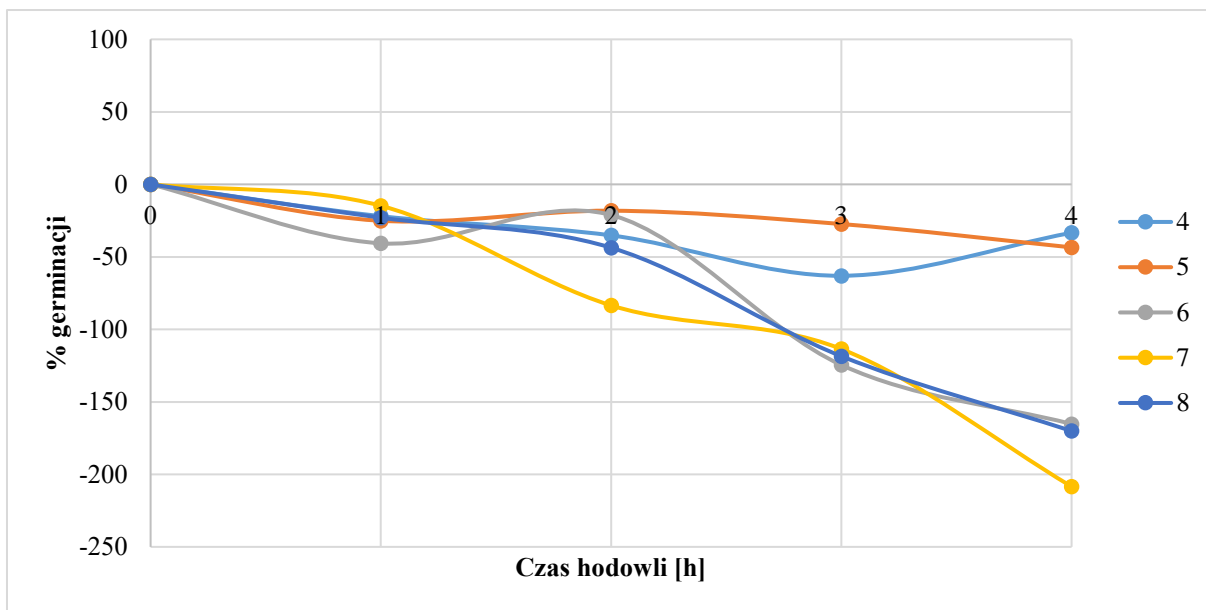
W tabeli 7 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP dla przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na bibule Whatmana. Oznaczenia wykonano w 0, po 1, 2, 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń). Po 2 godzinach inkubacji bakterii w mieszaninie doświadczalnej nie zaobserwowano tak znaczących przyrostów poziomu ATP jak w przypadku zawiesiny bakterii w wodzie. Największy poziom ATP uzyskano po 1 godzinie hodowli dla wariantu 5(Asp + Ino + Na⁺ + K⁺) i po 4 godzinie dla wariantu 6 (Asp + Ala + Na⁺). Świadczy to o ochronnej roli nośnika w stosunku do przetrwalników bakterii. Potwierdzają to również badania innych Autorów, którzy wykazywali ochronny wpływ różnych matryc na skuteczność procesów biologicznych (np. inaktywacji przetrwalników) (Ocio i wsp., 1996, Ananta i wsp., 2001).

Graficzną formę wyników przedstawiono na rysunkach 5-7.

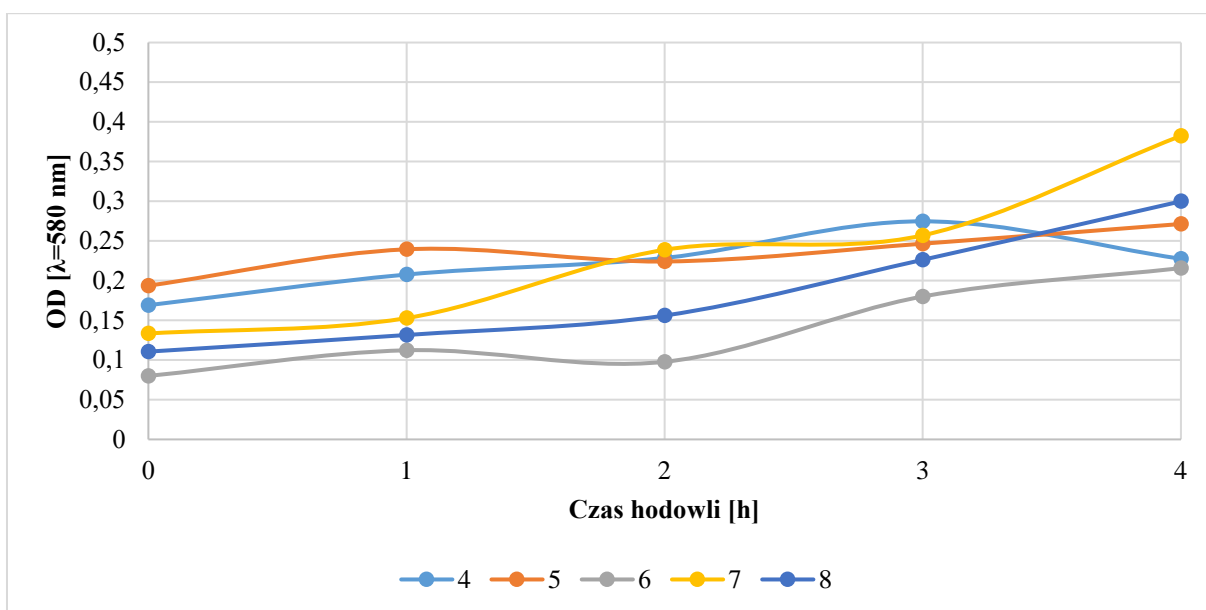
Tabela 7. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].

Wariant	ATP [RLU]																			
	0 h					1 h					2 h					4 h				
	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia
4	839	845	826	837	733	1668	1647	1562	1626	1312	2637	2388	2355	2460	1855	4510	4215	4015	4247	3923
	611	645	630	629		1005	1012	976	998		1267	1227	1254	1249		3443	3493	3860	3599	
5	885	908	904	899	1027	5288	5399	5388	5358	5399	3965	3955	3451	3790	3706	3358	3379	3306	3348	2475
	1121	1198	1147	1155		5300	5365	5654	5440		3030	3493	4342	3622		1548	1645	1613	1602	
6	742	711	742	732	900	1531	1552	1518	1534	1248	1887	1894	1945	1909	1488	9246	9620	9929	9598	9258
	929	1050	1227	1069		963	956	968	962		1045	1070	1087	1067		8745	9014	8994	8918	
7	1085	1130	1142	1119	1207	1162	1206	1212	1193	1398	3530	3625	3741	3632	3847	2538	2514	2629	2560	3235
	1324	1315	1243	1294		1514	1614	1682	1603		3397	4001	4789	4062		3707	3846	4175	3909	
8	843	832	797	824	714	984	1003	958	982	1061	1940	2116	2250	2102	2029	2294	2364	2491	2383	3179
	624	589	596	603		1103	1137	1181	1140		1872	1970	2027	1956		3335	4014	4574	3974	

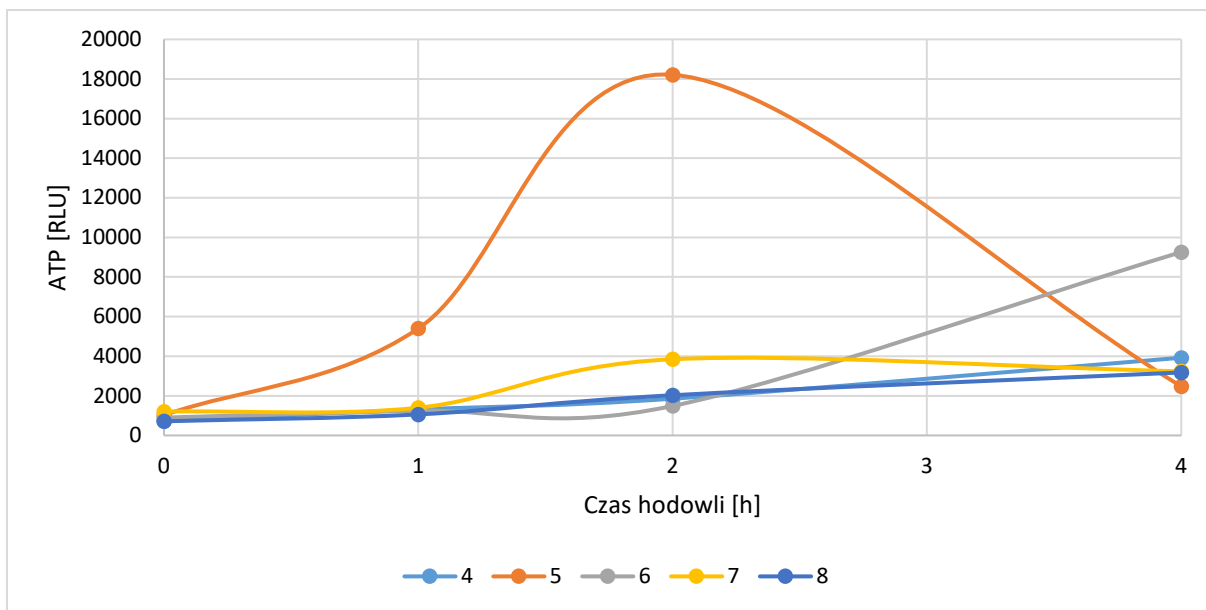
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.



Rysunek 5. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na bibule Whatmana.



Rysunek 6. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na bibule Whatmana.



Rysunek 7. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na bibule Whatmana.

1.1.3. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w zawieszynie przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na Tyvek.

Badania przetrwalników bakterii *Geobacillus stearothermophilus* kontynuowano dla 5 najlepszych wariantów pożywek (wariant 4, 5, 6, 7, 8), wyznaczonych w doświadczeniu z zawiesziną przetrwalników w wodzie (analogicznie jak dla przetrwalników zimmobilizowanych na bibule Whatmana. W celu 100 µl zawiesiny o wystandaryzowanej liczebności 10^7 jtk/ml, nakrapiano na krążek i czekano do całkowitego wyschnięcia – 48 h (w testach stosowano 2 krążki na każde 12 ml badanej pożywki). Wyniki pomiarów gęstości optycznej przedstawiono w tabeli 8.

Tabela 8. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników zimmobilizowanych na Tyvek.

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
4	0,09615	0,07135	0,24125	0,21505	0,2309
5	0,1444	0,0465	0,30845	0,28955	0,29475
6	0,15555	0,18595	0,2343	0,34865	0,1228
7	0,13035	0,20305	0,29415	0,24515	0,0487
8	0,13175	0,15515	0,28825	0,2383	0,33455

Z przedstawionych danych wynika, że w przypadku immobilizacji przetrwalników bakterii na nośniku (Tyvek) obserwowano znacznie niższe wartości OD, niż przypadku zawiesiny przetrwalników w wodzie (tabela 2). Uzyskane wyniki są zbliżone do tych uzyskanych dla przetrwalników zim mobilizowanych na bibule Whatmana, jednakże cechowały się większymi rozbieżnościami. Dla niektórych wariantów doświadczeń (wariant 6 i 7) zaobserwowano spadek gęstości optycznej w 4 godzinie, dla pozostałych badanych wariantów obserwowano wzrost tego parametru. Było to prawdopodobnie związane z nierównomiernym zatrzymaniem komórek na nośniku (Tyvek). Skutkowało to otrzymaniem zarówno ujemnych jak i dodatnich wyników % germinacji (tabela 9), co jest trudne do interpretacji. Jednakże biorąc pod uwagę wartości bezwzględne otrzymanych parametrów (które wskazują na największą różnicę pomiędzy wartościami początkowymi a wartościami otrzymanymi w ramach przeprowadzonych eksperymentów), najlepsze okazały się warianty 4 – w 2 godzinie hodowli i 6 – w 3 godzinie hodowli oraz 8 w 4 godzinie hodowli. Kolorem żółtym w tabeli 9 wyróżniono najlepsze uzyskane wyniki.

Tabela 9. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.

Wariant	Germinacja [%]								
	0	1		2		3		4	
4	0	50,84586	22,80361	-145,677	-151,535	-122,932	-123,748	-153,853	-138,51
		-5,23865		-157,392		-124,563		-123,166	
5	0	61,60338	67,70483	-132,771	-113,896	-119,761	-100,808	-118,284	-104,333
		73,80628		-95,0205		-81,8554		-90,382	
6	0	-56,3811	-27,25	-100,787	-61,1204	-303,322	-161,625	-1,92308	16,24741
		1,881037		-21,454		-19,9288		34,4179	
7	0	-76,6667	-58,4736	-199,279	-135,177	-222,793	-105,485	35,67568	59,1538
		-40,2806		-71,0755		11,82365		82,63193	
8	0	-1,8018	-19,4412	-95,7727	-121,208	-97,5745	-79,1144	-135,551	-155,863
		-37,0805		-146,644		-60,6544		-176,174	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

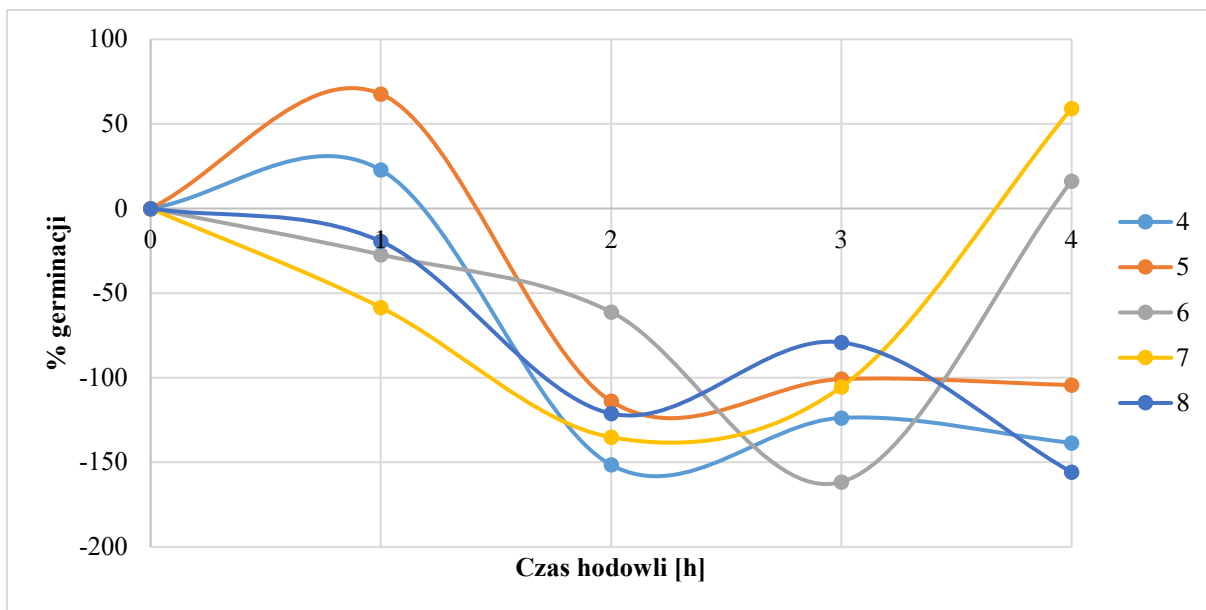
W tabeli 10 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP dla przetrwalników bakterii zimmobilizowanych na materiale Tyvek. Oznaczenia wykonano w 0, po 2 i 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń). Po 2 godzinach inkubacji bakterii w mieszaninie doświadczalnej nie zaobserwowano tak znaczących przyrostów poziomu ATP jak w przypadku zawiesiny bakterii w wodzie. Największy poziom ATP uzyskano dopiero po 4 godzinie hodowli dla wariantów 5– 8.

Na rysunkach 8-10 przedstawiono graficzną ilustrację otrzymanych wyników dla przetrwalników zim mobilizowanych na Tyvek.

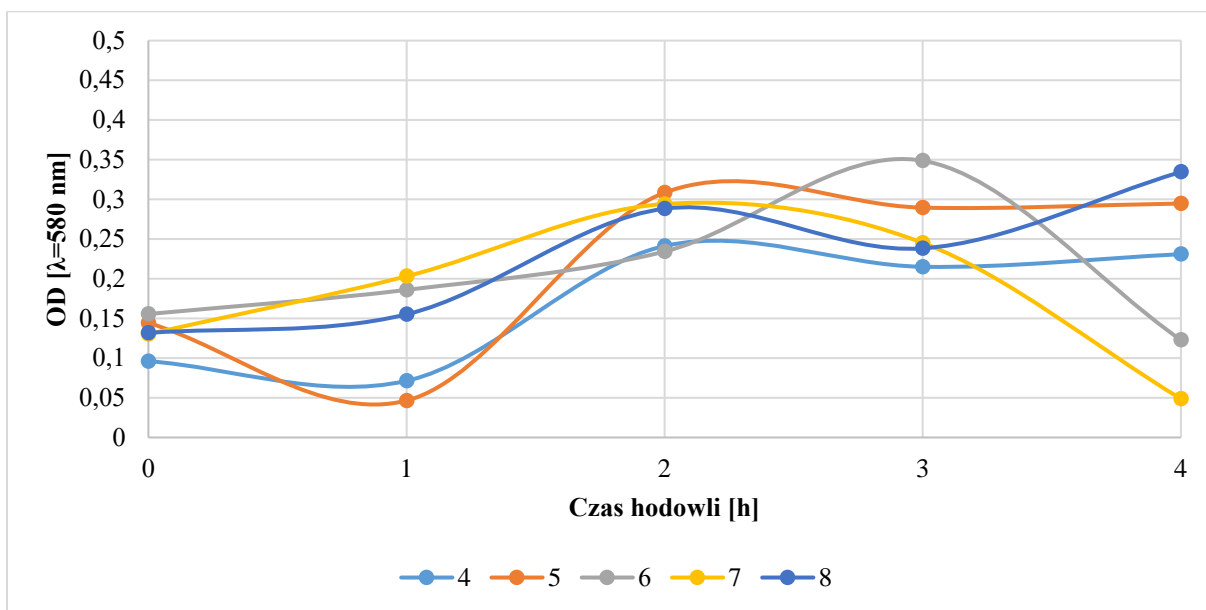
Tabela 10. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU]- immobilizacja przetrwalników na Tyvekcie

Wariant	ATP														
	0 h					2 h					4 h				
	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia	I	II	III	Średnia częst.	Średnia
4	2664	2634	2229	2509	2657	3411	3424	3520	3452	3356	10378	10386	10653	10472	10826
	2845	2956	2610	2804		3398	3124	3258	3260		11478	10589	11478	11181	
5	2272	2251	2331	2285	2261	4541	4662	4375	4526	4800	17790	17330	17456	17560	18218
	2243	2253	2215	2237		4557	5358	5305	5073		18444	19307	19054	18876	
6	2785	2743	2613	2714	2833	4097	4335	4462	4298	5088	13797	13690	13987	13744	16378
	2879	2966	3012	2952		5893	5892	5850	5878		19345	18682	19054	19014	
7	2913	3059	3113	3028	2973	4670	4835	4440	4648	4439	19868	19471	19125	19670	19499
	3005	2847	2903	2918		3962	4266	4459	4229		19795	18730	18954	19263	
8	3359	3164	3182	3235	3288	4093	4221	4450	4255	4985	20157	19934	20145	20046	21127
	3220	3154	3645	3340		5546	5707	5733	5662		21939	22479	21456	22209	

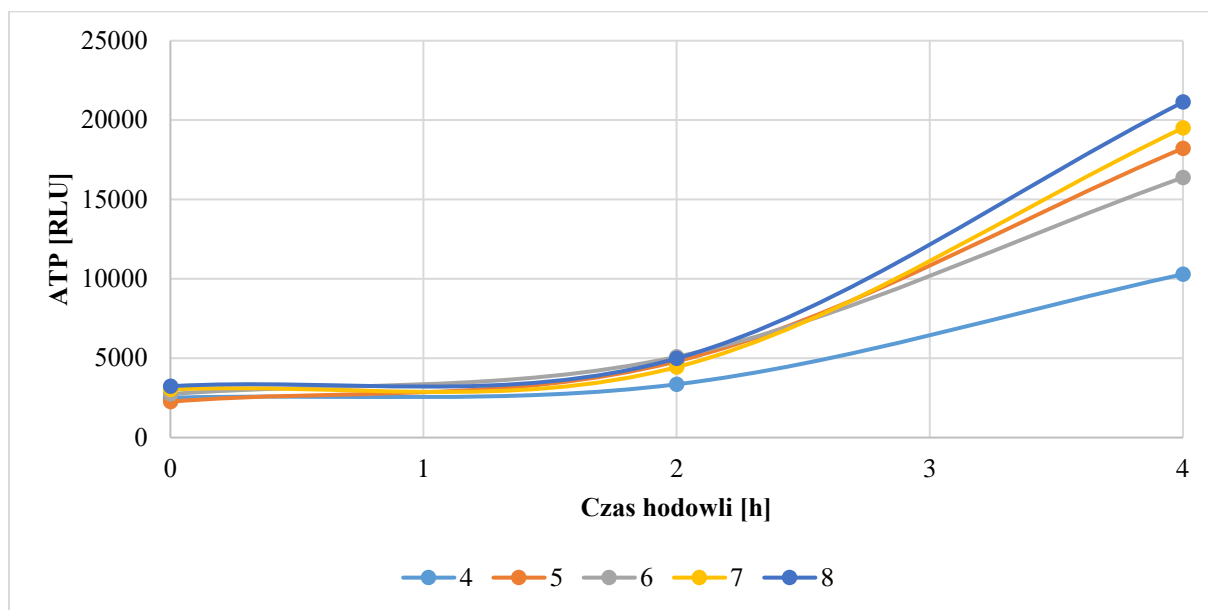
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.



Rysunek 8. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na Tyveksie



Rysunek 9. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na Tyveksie



Rysunek 10. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na Tyvexie

1.1.4. Wyniki oznaczeń poziomu ATP w liofilizacie przetrwalników bakterii (proszek)

Badania przetrwalników bakterii z *Geobacillus stearothermophilus* kontynuowano dla 5 najlepszych wariantów pożywek (wariant 4, 5, 6, 7, 8), wyznaczonych w doświadczeniu z zawiesiną przetrwalników w wodzie. W tej części eksperymentów wykorzystano liofilizat przetrwalników bakterii. Do 12 ml pożywki dodawano 0,05 g liofilizatu, co pod względem liczebności odpowiadało liczbie przetrwalników zawieszonych w wodzie (pkt. 1.1.1) oraz liczbie przetrwalników zimmobilizowanych na bibule Whatmana oraz na materiale Tyvek (pkt. 1.1.2. i 1.1.3.). Wyniki pomiarów gęstości optycznej dla tego wariantu doświadczeń przedstawiono w tabeli 11.

Tabela 11. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla liofilizatu przetrwalników

Wariant	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h
4	1,3369	1,4425	1,7601	1,90565	1,2312
5	1,3527	1,6434	1,58105	1,9426	1,6285
6	1,09515	1,2505	1,4934	1,7661	1,49945
7	0,65355	1,19285	1,06765	1,3692	1,5945
8	1,06405	0,60955	1,78795	2,03195	1,87915

Z przedstawionych danych wynika, że już na początku hodowle te charakteryzowały się wysokim OD w porównaniu do wcześniejszych eksperymentów (zawiesina przetrwalników, immobilizacja na bibule Whatmana oraz na materiale Tyvek). Dla większości wariantów obserwowano przyrost gęstości optycznej hodowli do 3 godziny eksperymentu, a potem niewielki jej spadek. Spadek gęstości optycznej dla kiełkujących przetrwalników obserwowano również w innych badaniach (Porębska i wsp., 2015).

W tabeli 12 zaprezentowano wyniki obliczeń procentowej liczby germinacji (wzór str. 5). Biorąc pod uwagę bezwzględne wartości danych najlepszym wariantem okazał się wariant 7 (Asp + Ala + K⁺).

Tabela 12. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.

Wariant	Germinacja [%]								
	0	1		2		3		4	
4	0	1,518147	-7,41636	-38,4281	-32,0023	-50,5733	-42,9539	-21,6415	6,392367
		-16,3509		-25,5766		-35,3346		34,42623	
5	0	-22,2345	-21,5358	-9,9233	-16,4561	-48,0905	-43,8828	-24,828	-20,66
		-20,8371		-22,9888		-39,6752		-16,492	
6	0	16,04736	-20,4729	-19,3893	-39,8954	-39,2537	-65,8435	-12,6042	-41,9738
		-56,9932		-60,4015		-92,4333		-71,3435	
7	0	-82,2481	-82,5221	-40,8068	-63,6535	-129,944	-109,237	-134,809	-144,094
		-82,796		-86,5003		-88,5307		-153,379	
8	0	39,04082	43,55111	-51,4308	-71,8151	-73,0559	-95,044	-52,7467	-82,0392
		48,06139		-92,1994		-117,032		-111,332	

Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepsze wyniki.

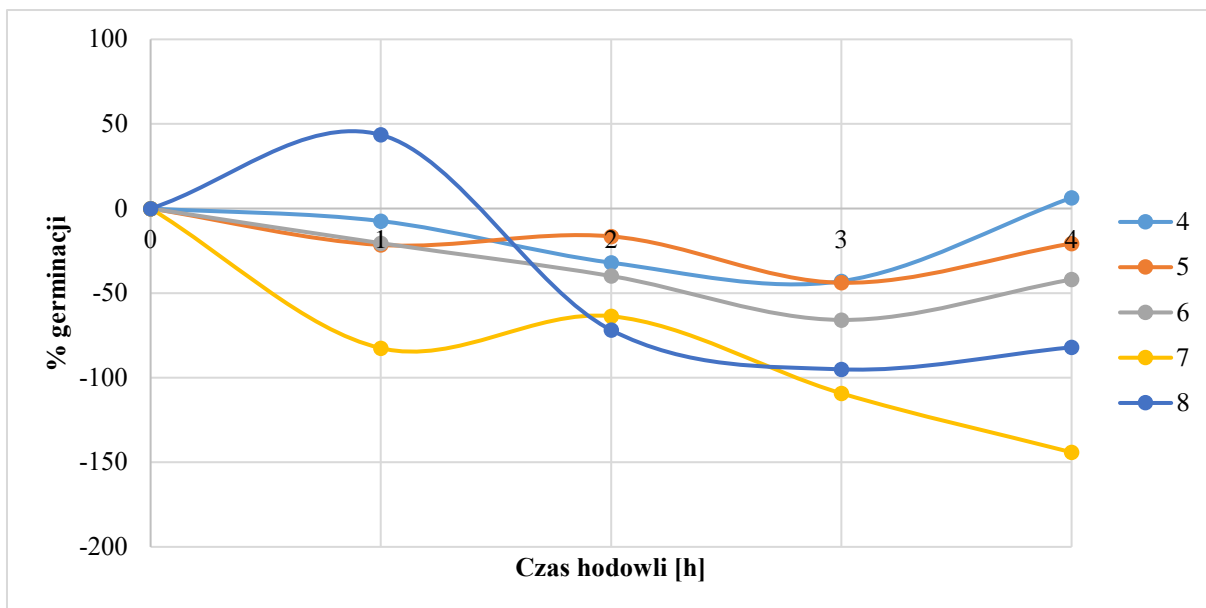
Wyniki pomiarów ilości ATP dla doświadczeń z liofilizatem przetrwalników bakterii z *Geobacillus stearothermophilus* przedstawiono w tabeli 13. Oznaczenia wykonano w 0, pół, 2 i 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 2 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 6 oznaczeń). Obserwowano stopniowy wzrost ilości uwalnianego ATP - po 1 godzinie inkubacji poziom ATP zwiększył się średnio dwukrotnie, a po 2 godzinach – średnio czterokrotnie w porównaniu do godziny 0. Największy wzrost badanego parametru obserwowano po 4 godzinie, w szczególności dla wariantu 8 (Asp + Ala + Na⁺ + K⁺).

Na rysunkach 11-13 przedstawiono graficzną ilustrację otrzymanych wyników dla zliofilizowanych przetrwalników *Geobacillus stearothermophilus*.

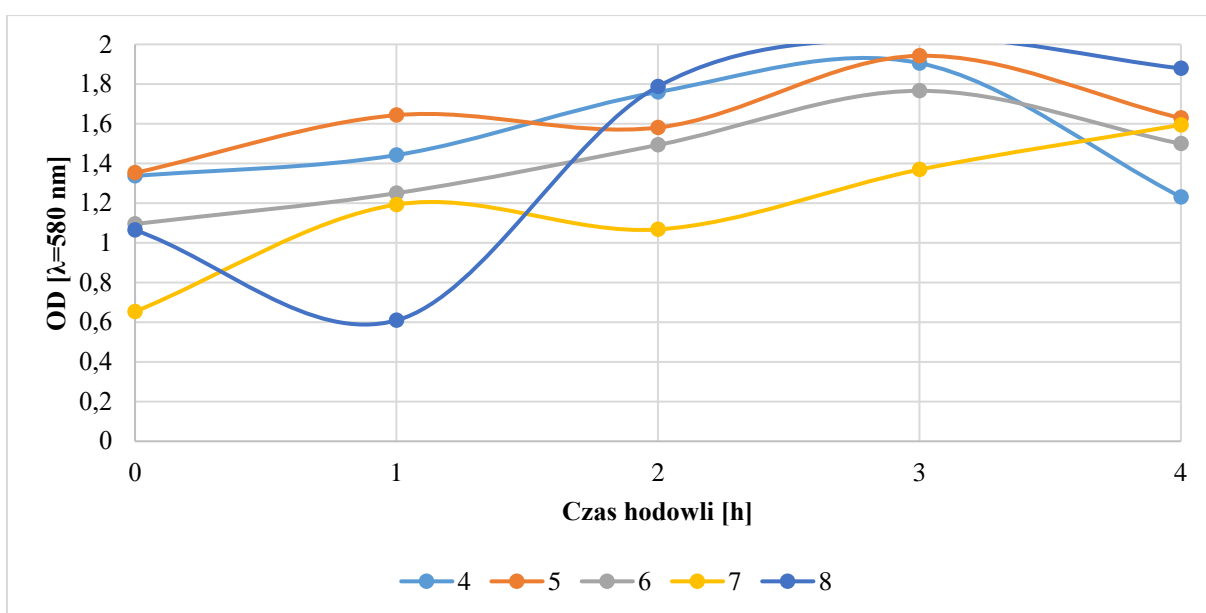
Tabela 13. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU] - liofilizat

Wariant	ATP																			
	0h					1h					2h					4h				
	I	II	III	Śr. częst.	Śred.	I	II	III	Śr. częst.	Śred.	I	II	III	Śr. częst.	Śred.	I	II	III	Śr. częst.	Śred.
4	867	797	782	815	844	1844	1825	1794	1821	1448	3082	2947	2905	2978	3007	7129	6654	6538	6774	6983
	875	894	848	872		1093	1081	1050	1075		3110	3020	2977	3036		7397	7150	7031	7193	
5	912	890	867	890	904	2782	2691	2747	2740	2821	3050	3095	3092	3079	3720	8486	8689	8491	8555	7946
	963	907	883	918		2864	2917	2926	2902		3340	3340	6405	4362		7275	7392	7345	7337	
6	764	812	855	810	819	779	799	799	792	1351	3545	3566	3558	3556	3391	18388	18767	17930	18362	16707
	836	838	806	827		1862	1981	1886	1910		3181	3251	3247	3226		15601	14776	14782	15053	
7	2556	1326	807	1563	1205	1558	1518	1477	1518	1511	2471	2421	2481	2458	2836	10973	11461	10161	10865	11766
	896	802	844	847		1498	1500	1512	1503		3203	3190	3250	3214		12591	12556	12852	12666	
8	1360	1262	1222	1281	1174	1641	1619	1600	1620	1440	6588	6346	6387	6440	6676	111481	114946	116103	114177	114258
	1084	1115	1001	1067		1254	1248	1277	1260		7050	6826	6860	6912		113876	113278	115864	114339	

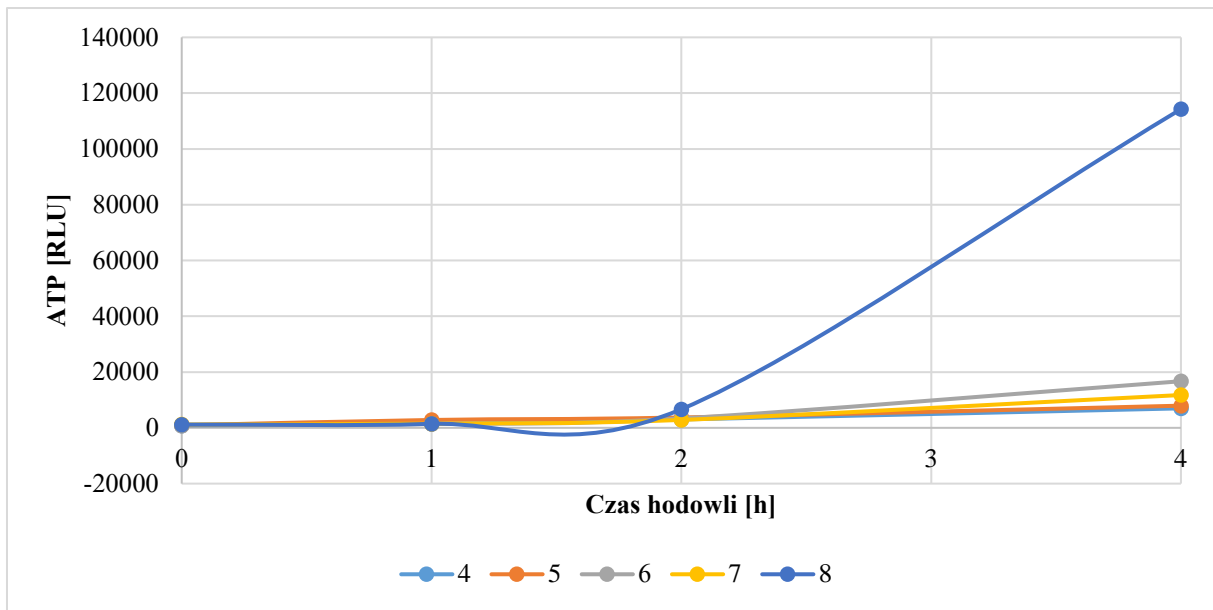
Legenda: kolorem żółtym wyróżniono najlepszy wynik.



Rysunek 11. Wpływ składu podłoża na % germinacji (liofilizat)



Rysunek 12. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną (liofilizat)



Rysunek 13. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP (liofilizat)

1.1.5. Wpływ germinantów na zmianę barwy wskaźnika redox – resazuryny - wizualna zmiany barwy

W kolejnym etapie badań określono wpływ germinantów (jony, cukry, aminokwasy) na zmianę barwy wskaźnika redox – resazuryny - **wizualna zmiany barwy**. W tym celu wykonano **test studzienkowy**, polegający na nanoszeniu do płytek wielodołkowych 200 µl hodowli (układ: pożywka + germinanty + spory). Układ ten wcześniej poddany był **wstępnej inkubacji** (w temperaturze 55°C) – do dołków nanoszono odpowiednio: 0, 1, 2, 3 i 4 – godziną hodowlę. Hodowle prowadzono na zmodyfikowanej pożywce III (Krzywicka i wsp., 1996, raport R2) z dodatkiem 9 różnych germinantów (tabela 14). Inoculum (spory *Geobacillus stearothermophilus*) stanowiło 10 % całkowitej objętości hodowli.

Ocenę testu studzienkowego dokonywano, dodając do dołków (zawierających odpowiednie warianty hodowli) 20 µl **wskaźnika redoks – resazurynę**. Ocenę zmiany barwy resazuryny (z fioletowej na różową) dokonywano przez 3 kolejne godziny (w godzinnych odstępach czasu, płytki inkubowano w temperaturze 55°C), a wynik obserwacji przedstawiono na rysunku 14. Na zdjęciach kolorem czerwonym wyróżniono tzw. **czas T_{wo}** - **czas wizualnej oceny**, który obejmował czas zmiany barwy liczony po dodaniu wskaźnika.

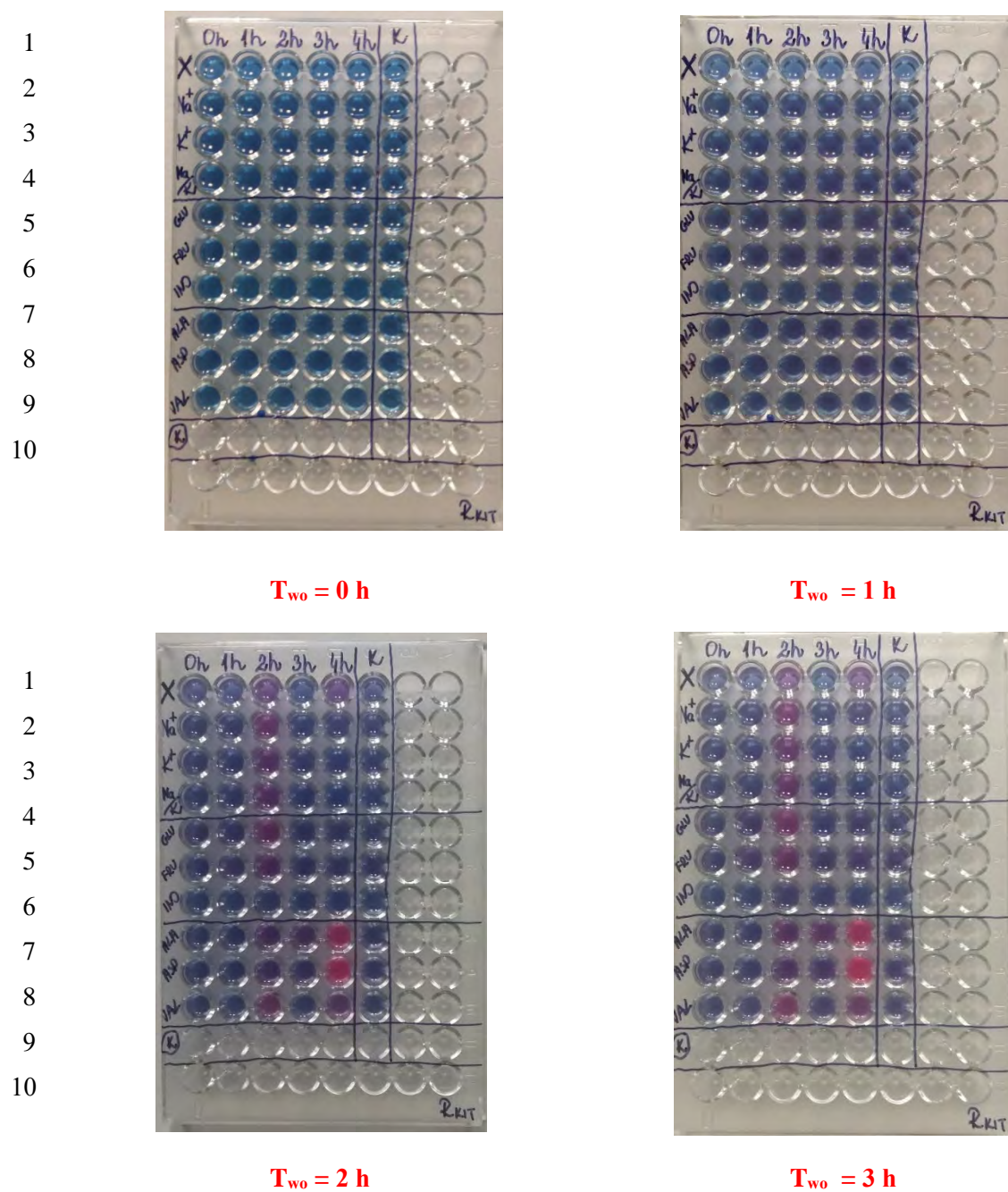
Całkowity czas potrzebny na uzyskanie reakcji barwnej był sumą czasu wstępnej inkubacji oraz czasu **T_{wo}**.

Tabela 14. Warianty pożywek użytych do wizualnej oceny zmiany barwy.

L.p.	Oznaczenie na płytce wielodołkowej	Rodzaj germinanta	Ilość germinanta	Pożywka hodowlana
1	X	Próba kontrolna	100 mM	III
2	Na ⁺	Sód		
3	K ⁺	Potas		
4	Na ⁺ + K ⁺	Sód + potas		
5	GLU	Glukoza		
6	FRU	Fruktoza		
7	INO	Inosine		
8	ALA	L- Alanina		
9	ASP	L- Asparagina		
10	VAL	L- Valina		

W pierwszej godzinie obserwacji nie zauważono zmiany barwy (w stosunku do godziny zerowej), natomiast w godzinie drugiej i trzeciej najlepszą zmianę barwy uchwycono w przypadku pożywki zawierającej w swoim składzie germinant Alaninę i Asparaginę (wariant 8 i 9). W pozostałych przypadkach zmiana barwy była niewielka, często porównywalna do kontroli K.

Rysunek 14. Ocena wizualna zmiany barwy resazuryny.



Legenda:

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – warianty pożywek (tabela 14)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks

2. Spis literatury

1. Ananta E., Heinz V., Schlüter O., Knorr D.: Kinetic studies on high-pressure inactivation of *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in food matrices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 2: 261-272, 2001.
2. Dawgul M., Barańska-Rybak W., Bielińska S., Nowicki R., Kamysz W.: The influence of antimicrobial peptides on *Candida* biofilm. *Alergia Astma Immunologia*, 15(4): 220-225, 2010.
3. Ocio M.J., Fernández P., Rodrigo F., Martínez A.: Heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in alginate-mushroom puree mixture. *International Journal of Food Microbiology* 29: 391-395, 1996.
4. Porębska I., Sokołowska B., Woźniak Ł.: Dipicolinic acid release and the germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under nutrient germinants. *Polish Journal of Microbiology* 66(1): 67-74, 2017.
5. Porębska I., Rutkowska M., Sokołowska B.: Decrease in optical density as a results of germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under high hydrostatic pressure. *High Pressure Research* 35(1): 89-97, 2015
6. Rogers W.J.: Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices. W: *Sterilisation of Biomaterials and Medical Devices*, 2012, page 20-55.
7. Rogers W.J.: The effects of sterilization on medical materials and welded devices. W: *Joining and Assembly of Medical Materials and Devices*, 2013, page 79-130
8. Santos S.M.H., Zarzo T.J.: Evaluation of citric acid and GDL in the recovery at different pH levels of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores subjected to HTST treatment conditions. *International Journal of Food Microbiology* 29: 241-254, 1996.
9. Woese C., Morowitz H.J.: Kinetics of the release of dipicolinic acid from spores of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 76(1): 81-83, 1958.

3. Spis rysunków

Rysunek 1. Rodzaje stosowanych nośników.....	6
Rysunek 2. Wpływ składu podłoża na % germinacji – przetrwalniki zawieszone w H ₂ O.	11
Rysunek 3. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną zawiesiny – przetrwalniki zawieszone w H ₂ O.....	11
Rysunek 4. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – przetrwalniki zawieszone w H ₂ O.....	12
Rysunek 5. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na bibule Whatmana..	16
Rysunek 6. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na bibule Whatmana.	16
Rysunek 7. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na bibule Whatmana.....	17
Rysunek 8. Wpływ składu podłoża na % germinacji – immobilizacja na Tyveksie.....	21
Rysunek 9. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną – immobilizacja na Tyveksie.....	21
Rysunek 10. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP – immobilizacja na Tyveksie.....	22
Rysunek 11. Wpływ składu podłoża na % germinacji (liofilizat).....	26
Rysunek 12. Wpływ składu podłoża na gęstość optyczną (liofilizat).....	26
Rysunek 13. Wpływ składu podłoża na ilość uwalnianego ATP (liofilizat)	27
Rysunek 14. Ocena wizualna zmiany barwy resazuryiny.....	30

4. Spis tabel

Tabela 1. Warianty doświadczeń	5
Tabela 2. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego	8
Tabela 3. % germinacji dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego.....	9
Tabela 4. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].....	10
Tabela 5. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników ziimobilizowanych na bibule Whatmana.....	13
Tabela 6. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.....	14
Tabela 7. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU].....	15
Tabela 8. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla przetrwalników ziimobilizowanych na Tyvek.....	18
Tabela 9. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.....	19
Tabela 10. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU]- immobilizacja przetrwalników na Tyvekie	20
Tabela 11. Gęstość optyczna (OD $\lambda=580$ nm), dla poszczególnych wariantów składu podłoża hodowlanego, dla liofilizatu przetrwalników	23
Tabela 12. Wpływ dodatku germinantów i jonów na % germinacji.....	24
Tabela 13. Wpływ dodatku germinantów i jonów na ilość ATP [RLU] - liofilizat.....	25
Tabela 14. Warianty pożywek użytych do wizualnej oceny zmiany barwy.	28



Sprawozdanie roczne

D/2017

R/6

Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

Raport cząstkowy R/6

Wykorzystanie metod bioluminescyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Wykorzystanie bioluminescyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej
- Ustalenie minimalnego czasu kiełkowania przetrwalników umożliwiającego ich wykrycie w danej metodzie
- Określenie powtarzalności, precyzji i dokładności poszczególnych metod stosowanych do opracowania skutecznych wskaźników biologicznych procesów sterylizacji parowej i plazmowej

Spis treści

1. Wstępna ocena podłoży mikrobiologicznych.....	4
1.1. I tura	4
1.2. II tura	6
1.3. III tura.....	10
1.4. IV tura	13
2. Serie powtórzeń.....	17
2.1. Ocena wizualna	18
2.2. Pomiar ATP.....	28
2.3. Precyzja, powtarzalność metod	32
3. Spis literatury	34
4. Spis tabel	35
5. Spis rysunków	35

1. Wstępna ocena podłoży mikrobiologicznych

1.1. I tura

W celu wyboru pożywki mikrobiologicznej, odpowiedniej dla procesu germinacji dla spor *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), dokonano wstępnej selekcji (na podstawie wyników uzyskanych w poprzednich raportach dla spor *Bacillus subtilis*). Wybrane zostały na podstawie publikacji [Krzywicka i wsp., 1996], z pominięciem pożywki IV, która mimo że w swoim składzie zawierała duże ilości makroelementów, nie powodowała szybkiej germinacji. Składy podłoży przedstawiono w tabeli 1 (szczegółowe ilości komponentów zamieszczone są w w/w publikacji).

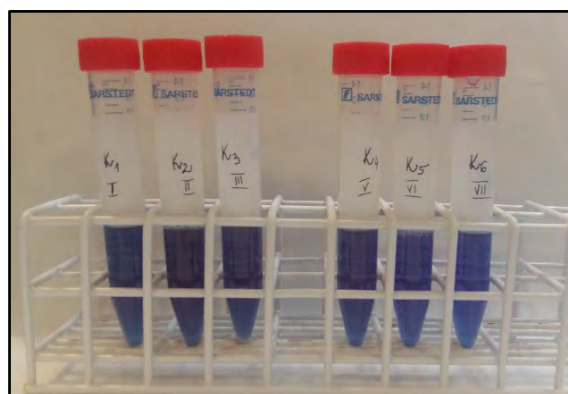
Tabela 1. Skład podłoży wybranych do doświadczenia.

Nr podłoża wg publikacji	Skład	Nr podłoża na zdjęciu
I	Bulion, pepton	1
II	Bulion, Trypton, glukoza	2
III	Bulion, pepton, NaCl, glukoza	3
V	Bulion, pepton, trypton, skrobia, K ₂ HPO ₄	5
VI	Ekstrakt drożdżowy, skrobia, K ₂ HPO ₄	6
VII	Trypton, ekstrakt drożdżowy, K ₂ HPO ₄	7

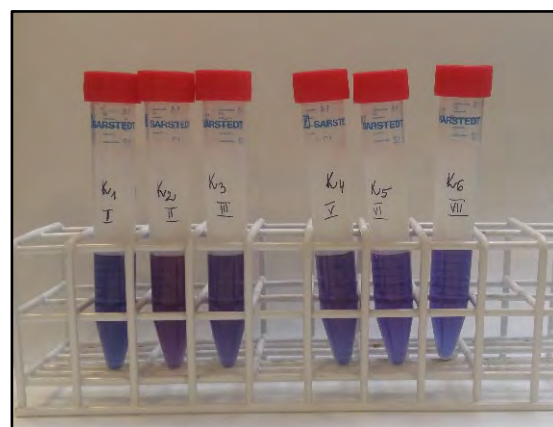
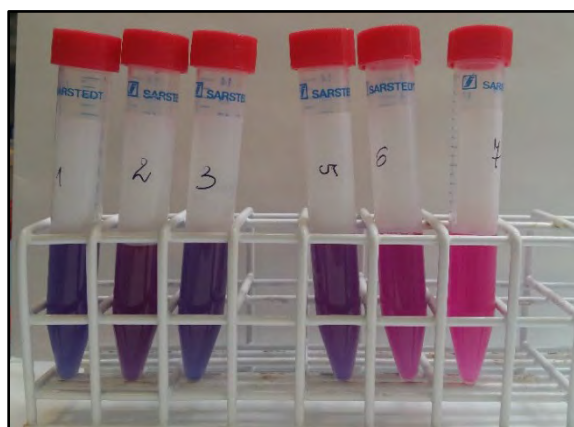
Doświadczenia wykonane w I turze badań polegały na zaszczepieniu 10 % inoculum (spory *Geobacillus stearothermophilus*) odpowiednich pożywek (tabela 1), a następnie na ocenie wizualnej zmiany barwy wskaźnika redoks – resazuryny, która w wyniku zmieniającego się pH środowiska (w czasie kiełkowania spor) zmienia barwę z granatowej na różową (Assay Guidance Manual – Cell Viability Assays, 2013). Ocenie podlegały hodowle prowadzone w temperaturze 55°C, w czasie 24 h. Zdjęcia potwierdzające zmianę barwy wykonano w 2, 3, 4 i 24 godzinie. Na rysunku 1 przedstawiono zdjęcia z 1 godziny inkubacji (dla kontroli, bez dodatku spor) oraz z 4 i 24 godziny (zarówno hodowla jak i kontrola). Ilustracje obrazują wpływ komponentów odżywczych na szybkość germinacji. Już w czwartej godzinie inkubacji można było zaobserwować znaczącą zmianę barwy (z niebieskiego na różowy) dla podłoża nr II, VI oraz VII. Barwa ta pogłębiła się po dobie inkubacji więc do dalszych etapów wybrano właśnie te trzy warianty.

I tura doświadczenia

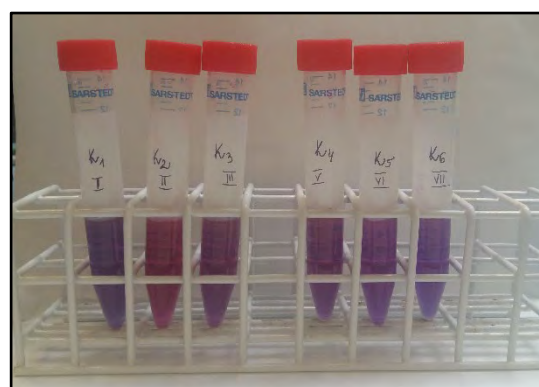
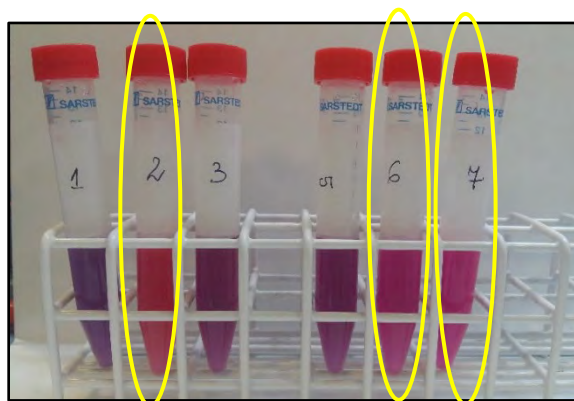
I tura doświadczenia - kontrola



1 h



4 h



24 h

Rysunek 1. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – I tura.

1.2. II tura

W tabeli nr 2 zamieszczono składy podłoży użytych w drugim etapie badań. Podłożem wyjściowym były trzy różne pożywki wybrane w pierwszej turze. Wzbogacone zostały one w trzy różne germinanty – **L-Alaninę, L- Asparaginę oraz Inozynę** (każdy w ilości 0,01mM) [Aouadhi, 2012]. Ilość oraz rodzaj germinanta wybrane zostały na podstawie wcześniejszych badań, których rezultaty przedstawiono w raportach R/4 i R/5.

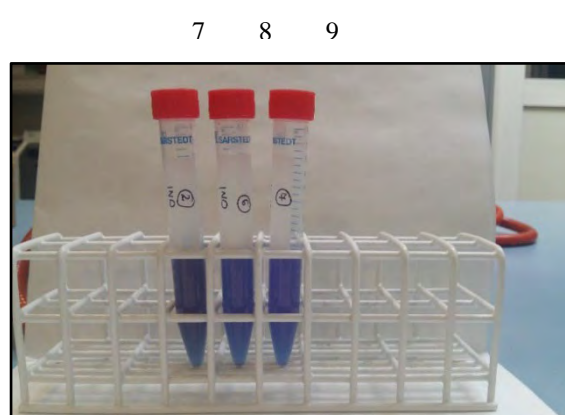
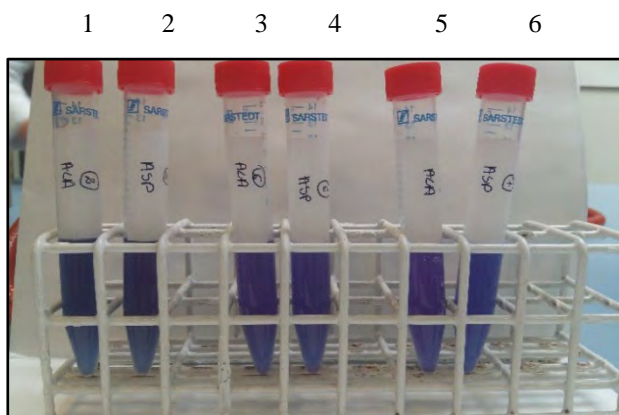
Tabela 2. Skład podłoży wybranych do II tury doświadczenia.

Nr podłoża	Skład	Germinant	Ilość germinanta	Nr podłoża na zdjęciu
II	Bulion, Trypton, glukoza	L-Alanina	0,01 mM	1
		L-Asparagina	0,01 mM	2
		Inosine	0,01 mM	7
VI	Ekstrakt drożdżowy, skrobia, K ₂ HPO ₄	L-Alanina	0,01 mM	3
		L-Asparagina	0,01 mM	4
		Inosine	0,01 mM	8
VII	Trypton, ekstrakt drożdżowy, K ₂ HPO ₄	L-Alanina	0,01 mM	5
		L-Asparagina	0,01 mM	6
		Inosine	0,01 mM	9

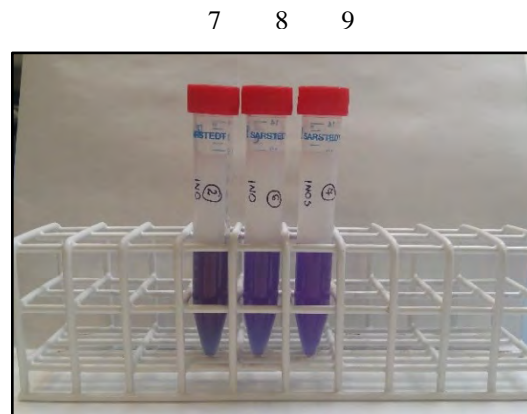
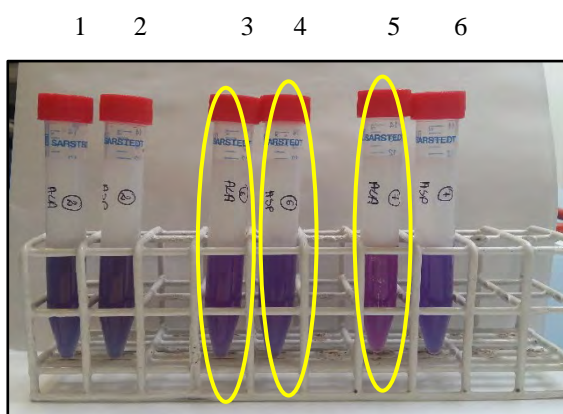
Ocenę zmiany barwy dokonywano w 1, 2, 3, 4 i 24 godzinie inkubacji. Dodatkowo w 4 i 24 godzinie wykonywano zdjęcia prób kontrolnych, zawierających w swoim składzie określone pożywki z resazuryną (ale wolne od spor). Wyniki zebrano na rysunku 2, 3 i 4.

Ze względu na słabe i dość kłopotliwe rozpuszczenie inozyny w buforze oraz słabą zmianę barwy w czasie inkubacji (istotna zmiana barwy na różowa dopiero w 24 godzinie hodowli), zrezygnowano z jej stosowania do dalszych badań (wariant 7, 8 i 9, rys. 2 i 4). Żółtymi kółkami zaznaczono najlepsze warianty pożywek wzbogaconych o germinanty. Zmiany barwy widoczne były już w **2 godzinie hodowli** (zmiana na kolor różowy pogłębiała się w czasie). Zarówno pożywka VI jak i VII wzbogacona o L-Alaninę (odpowiednio **wariant 3 i 5**, rys. 2 i 3) wykazywały najlepszą dynamikę zmiany barwy. Dodatkowo wariant 4 (zawierający pożywkę VI + L-Asparaginę) wykazywał dość szybką reakcję barwną. **W dalszych badaniach nie uwzględniono wariantów 1, 2 i 7 ze względu na dodatni wynik prób kontrolnych** (rys. 3).

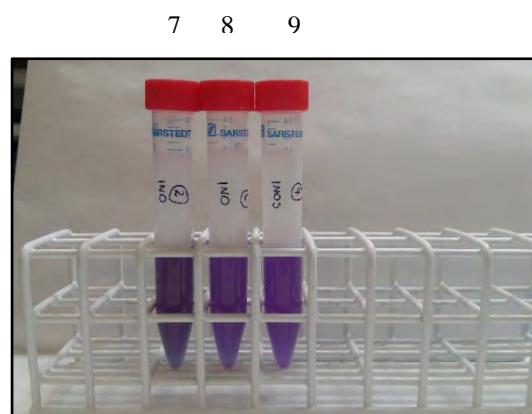
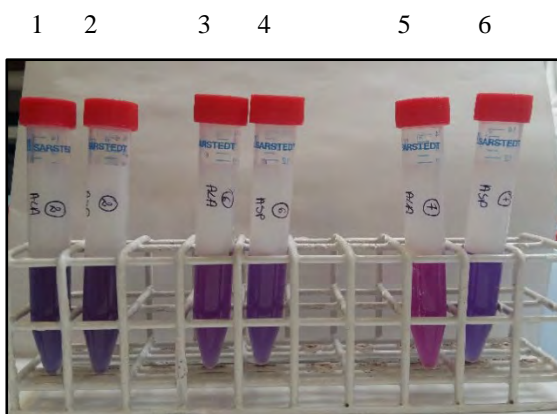
II tura doświadczenia



1 h



2 h

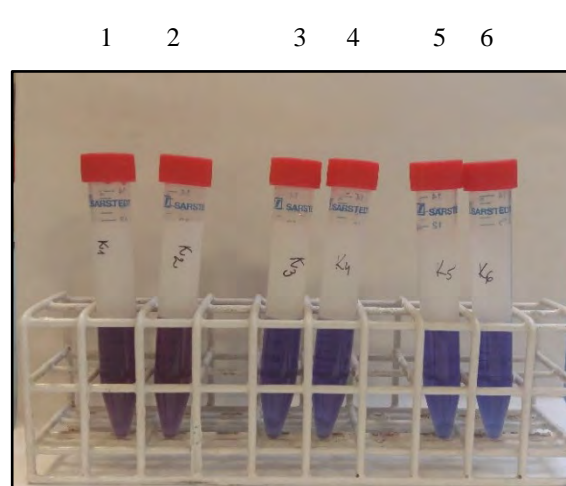
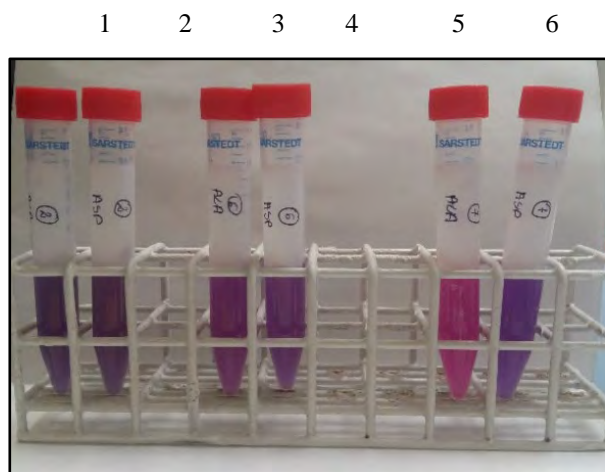


3 h

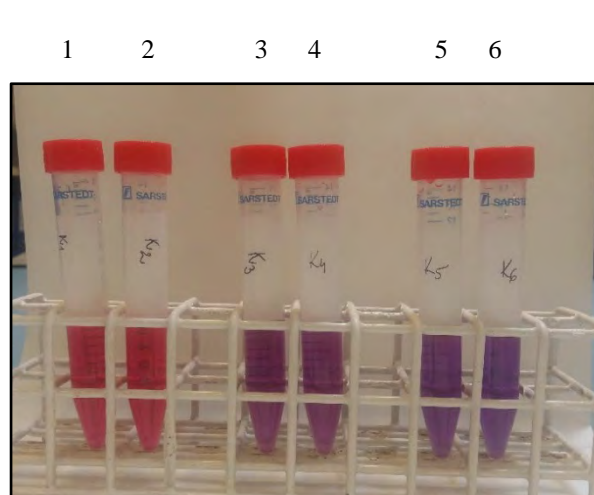
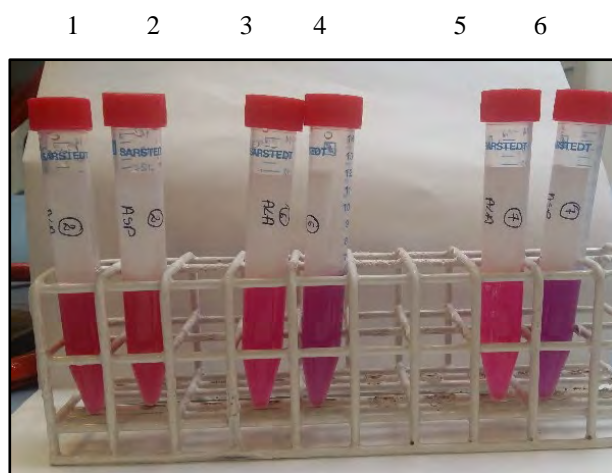
Rysunek 2. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – II tura.

II tura doświadczenia – c.d.

II tura doświadczenia - kontrola



4 h



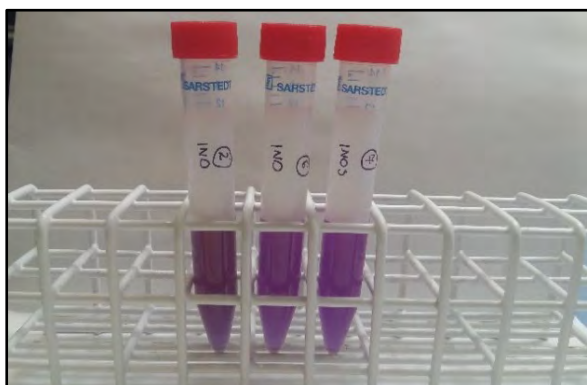
24 h

Rysunek 3. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – II tura c.d.

II tura doświadczenia – c.d.

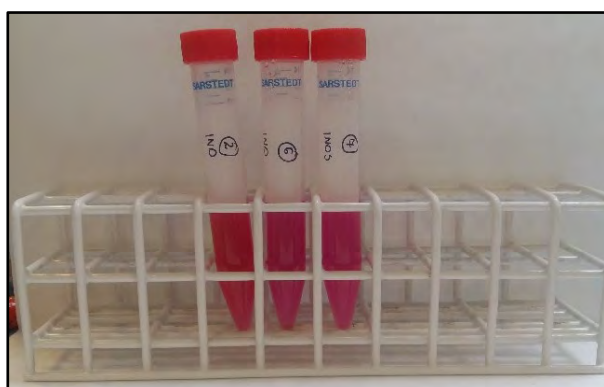
II tura doświadczenia - kontrola

7 8 9

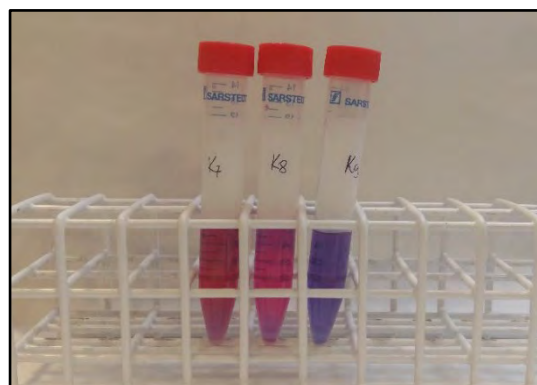


4 h

7 8 9



7 8 9



24 h

Rysunek 4. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – II tura c.d.

1.3. III tura

W tabeli nr 3 zamieszczono składy podłoży użytych do trzeciego etapu badań. Podłożem wyjściowym były dwie pożywki - **VI oraz VII**. Każda z nich wzbogacona została w różne germinanty - **L-Alaninę, L- Asparaginę, KCl lub Fruktozę** (4 kombinacje) [Luu i wsp., 2015].

Tabela 3. Skład podłoży wybranych do III tury doświadczenia.

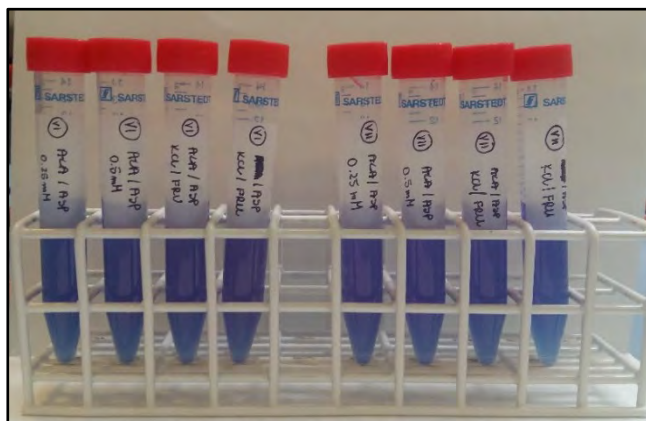
Nr podłoża	Skład	Germinant				Ilość germinanta	Nr podłoża na zdjęciu
		L-ALA	L-ASP	X	X		
VI	Ekstrakt drożdżowy, skrobia, K ₂ HPO ₄	L-ALA	L-ASP	X	X	Każdy po 0,005 mM	1
		L-ALA	L-ASP	X	X	Każdy po 0,01 mM	2
		L-ALA	L-ASP	KCl	FRU	Każdy po 0,01 mM	3
		X	L-ASP	KCl	FRU	Każdy po 0,01 mM	4
VII	Trypton, ekstrakt drożdżowy, K ₂ HPO ₄	L-ALA	L-ASP	X	X	Każdy po 0,005 mM	5
		L-ALA	L-ASP	X	X	Każdy po 0,01 mM	6
		L-ALA	L-ASP	KCl	FRU	Każdy po 0,01 mM	7
		X	L-ASP	KCl	FRU	Każdy po 0,01 mM	8

X- brak germinanta

Pierwsze, widoczne, delikatne zmiany barwy zaobserwowano w **wariancie 5** (VII pożywka, wzbogacona w L-Alaninę i L-Asparaginę) w **1 godzinie hodowli** (rysunek 5). W godzinie czwartej większość wariantów zmieniła swoją pierwotną barwę, jednak najlepszy okazał się wariant 5, 6 oraz 1 (żółte kółka na rysunku 6). Ze względu na dodatnią próbę kontrolną, zrezygnowano z dalszego stosowania wariantów **3, 4, 7 i 8** (czerwone kółka na rysunku 6).

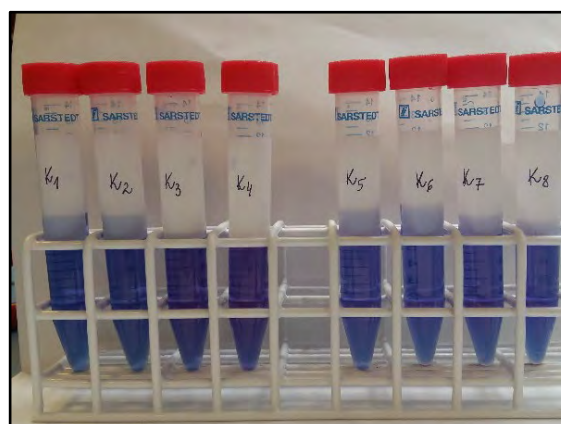
III tura doświadczenia	III tura doświadczenia - kontrola
------------------------	-----------------------------------

1 2 3 4 5 6 7 8



0 h

1 2 3 4 5 6 7 8

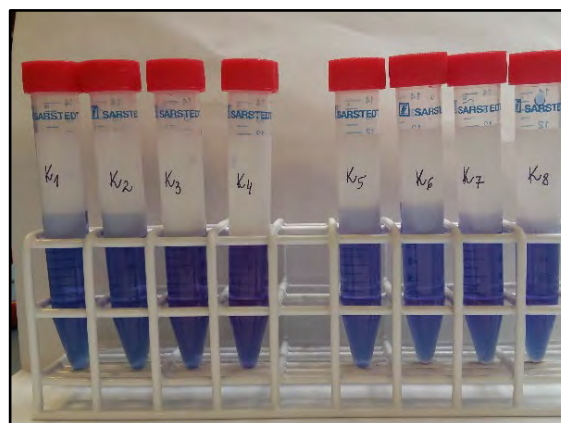


1 2 3 4 5 6 7 8



1 h

1 2 3 4 5 6 7 8

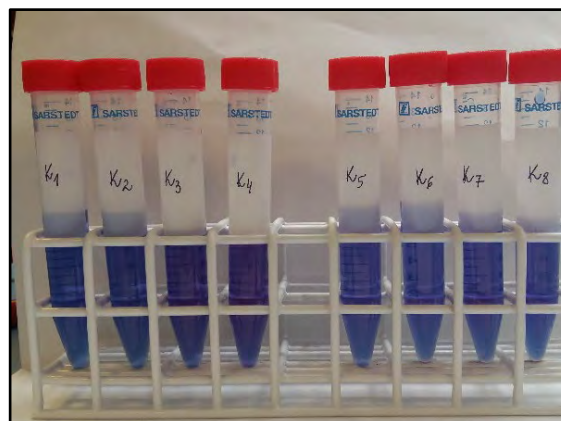


1 2 3 4 5 6 7 8



2 h

1 2 3 4 5 6 7 8



Rysunek 5. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – III tura

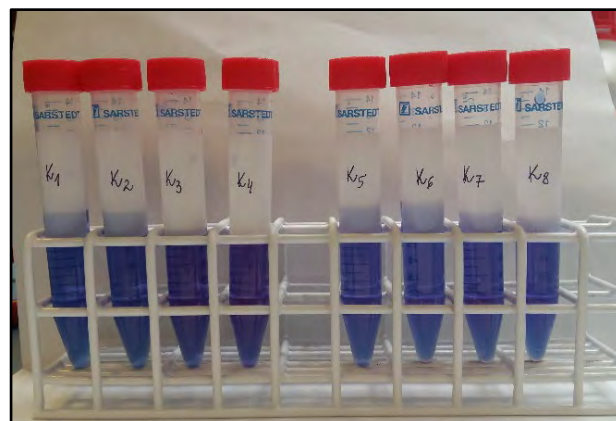
III tura doświadczenia c.d.

III tura doświadczenia - kontrola

1 2 3 4 5 6 7 8



1 2 3 4 5 6 7 8



3 h

1 2 3 4 5 6 7 8



1 2 3 4 5 6 7 8

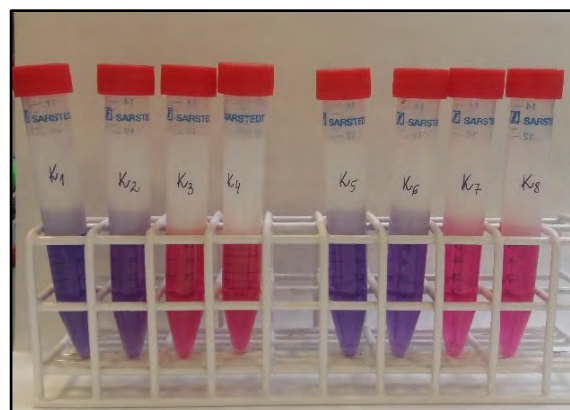


4 h

1 2 3 4 5 6 7 8



1 2 3 4 5 6 7 8



24 h

Rysunek 6. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – III tura, c.d.

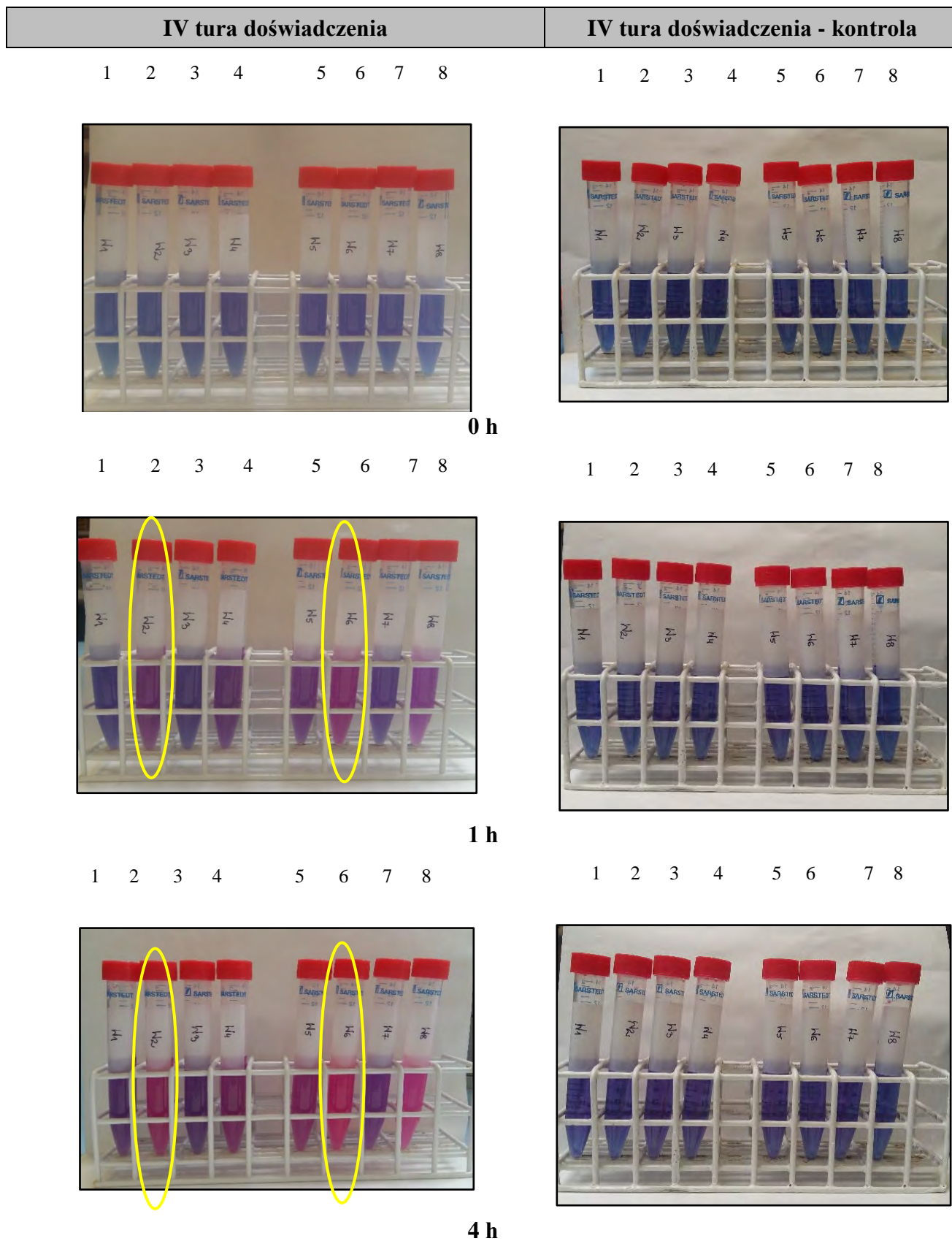
1.4. IV tura

W IV turze doświadczeń podjęto próbę oceny wpływu dodatku **co-germinanta** (roztwór KCl, bez obecności fruktozy jak to miało miejsce w III turze). Dodatkowo zbadano wpływ ilości poszczególnych germinantów na szybkość zmiany barwy. W tym celu zastosowano dwie ilości: **0,01 mM oraz 0,005 mM** (każdego z komponentów). Skład w/w wariantów przedstawiono w tabeli 4. Podłożem wyjściowym były dwie pożywki - VI oraz VII.

Tabela 4. Skład podłoży wybranych do IV tury doświadczenia.

Nr podłoża	Skład	Germinant			Ilość germinanta	Nr podłoża na zdjęciu
VI	Ekstrakt drożdżowy, skrobia, K ₂ HPO ₄	L-ALA	L-ASP	X	Każdy po 0,01 mM	1
		L-ALA	L-ASP	X	Każdy po 0,005 mM	2
		L-ALA	L-ASP	KCl	Każdy po 0,01 mM	3
		L-ALA	L-ASP	KCl	Każdy po 0,005 mM	4
VII	Trypton, ekstrakt drożdżowy, K ₂ HPO ₄	L-ALA	L-ASP	X	Każdy po 0,01 mM	5
		L-ALA	L-ASP	X	Każdy po 0,005 mM	6
		L-ALA	L-ASP	KCl	Każdy po 0,01 mM	7
		L-ALA	L-ASP	KCl	Każdy po 0,005 mM	8

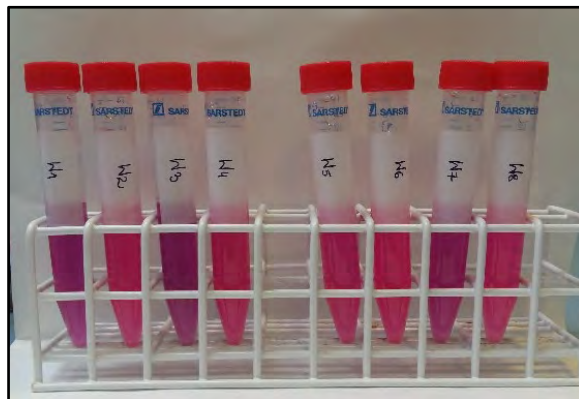
Na rysunku 7 oraz 8 przedstawiono zdjęcia dynamiki zmiany barwy z niebieskiej na różową dla wybranych wariantów komponentów. Po pierwszej godzinie inkubacji układu w temperaturze 55°C, dwa warianty wykazały istotną zmianę (rysunek 7, żółte kółka). Zarówno wariant 2 jak i 6 w swoim składzie zawierał mieszkę germinacyjną składającą się z L-Alaniny i L-Asparainy (ale bez dodatku KCl). Różniły się one w swoim składzie bazową pożywką, jednak zarówno jeden jak i drugi wynik stosowanego wariant był satysfakcjonujący. Dobrym wariantem okazał się także wariant 8 (z dodatkiem KCl). Jednak ze względu na brak znaczonych różnic (w porównaniu do wariantu 2 i 6), postanowiono z niego zrezygnować – KCl nie wnosił znaczącego polepszenia wyniku. Doświadczenie to ukazało także możliwość stosowania mniejszych ilości składowych elementów pożywki (0,005 mM germinanta) przy jednoczesnym uzyskaniu zakładanego, pozytywnego wyniku badania. W żadnym wariacie nie uzyskano dodatniego wyniku próby kontrolnej.



Rysunek 7. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – IV tura.

IV tura doświadczenia c.d.

1 2 3 4 5 6 7 8



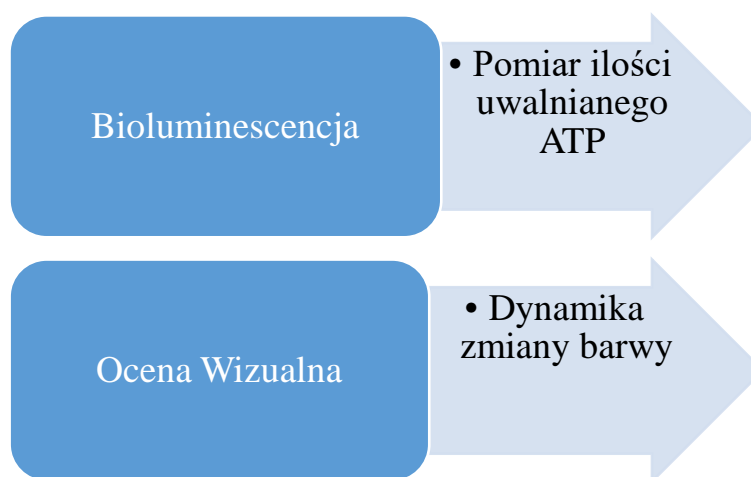
24 h

Rysunek 8. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – IV tura c.d.

2. Serie powtórzeń

W wyniku prac poprzedniego etapu, wytypowano dwa warianty pożywek (2 i 6), które na podstawie wizualnej oceny (dynamiki zmiany barwy wskaźnika redoks) powodowały najszybszy czas obserwacji germinacji *Geobacillus stearothermophilus* (tabela 4). Dla tych pożywek, powtórzono badania aby upewnić się o wyborze optymalnego germinanta.

Na rysunku 9 przedstawiono kierunki doświadczeń przeprowadzonych w kolejnym etapie badań. Warianty wytypowanych pożywek germinacyjnych (tabela 5) badano w dwóch kierunkach: bioluminescyjnego pomiaru ilości uwalnianego ATP oraz oceny wizualnej zmiany barwy. Składy pożywek VI, VII, III oraz tok postępowania nad ich wyborem (jako optymalne medium germinacyjne) przedstawiono w raportach R/2 i R/3.



Rysunek 9. Schemat doświadczenia.

Tabela 5. Warianty wytypowanych pożywek.

Metoda	Medium germinacyjne
Ocena wizualna	VI pożywka + ALA+ASP
	VII pożywka + ALA+ASP
Pomiar ATP	III pożywka + ALA+ASP

2.1. Ocena wizualna

Na rysunkach 10-17 przedstawiono wyniki oceny wizualnej zmiany barwy wskaźnika redoks. W celu zobrazowania wyników badań, wykonano **test studzienkowy**, polegający na nanoszeniu do płytek wielodołkowych 200 μ l hodowli (układ: pożywka + germinanty + spory). Układ ten wcześniej poddany był **wstępnej inkubacji** (w temperaturze 55°C) – do dołków nanoszono odpowiednio: 0, 1, 2, 3 i 4 – godziną hodowlę. Hodowle prowadzono na pożywkach wytypowanych w tabeli 5 (z dodatkiem germinantów). Inoculum (spory *Geoacillus stearothermophilus*) stanowiło 10 % całkowitej objętości hodowli.

Ocenę testu studzienkowego dokonywano, dodając do dołków (zawierających odpowiednie warianty hodowli) 20 μ l **wskaźnika redoks** – resazurynę KIT (Rk) lub roztwór Resazuryna + Dulbecco (R_D). Ocenę zmiany barwy resazuryny (z fioletowej na różową) dokonywano w 0, 30, 60, 90, 120 minucie oraz po 24 h (płytki inkubowano w temperaturze 55°C). Na zdjęciach kolorem czerwonym wyróżniono tzw. **czas T_{wo}** - **czas wizualnej oceny**, który obejmował czas zmiany barwy liczony po dodaniu wskaźnika.

Całkowity czas potrzebny na uzyskanie reakcji barwnej był sumą czasu wstępnej inkubacji oraz czasu T_{wo}.

Legenda do zdjęć:

- 4h – hodowla 4-godzinna
 - 3h – hodowla 3-godzinna
 - 2h – hodowla 2-godzinna
 - 1h – hodowla 1-godzinna
 - 0h – hodowla startowa
 - 1-10
- } poziome podpisy – wstępna inkubacja
- } pionowe podpisy - powtórzenia

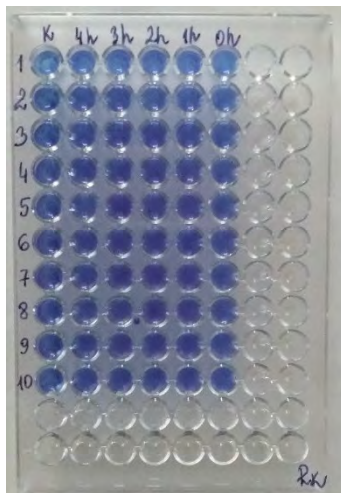
W doświadczeniu tym badano dwa warianty pożywek: VII oraz VI (suplementowane geminantami – Alaniną oraz Asparaginą). Testy wykonano w 20 powtórzeniach (oznaczenia 1-20 na zdjęciach). W każdym wariacie otrzymano negatywną próbę kontrolną (oznaczenie K na zdjęciach), natomiast w obrębie zastosowanych powtórzeń otrzymano wyniki bardzo powtarzalne. Zarówno w wariacie VII (rysunek 10-13) jak i w wariacie VI (rysunek 14-17) już po 30 minutach (T_{wo}=30 min) inkubacji układu pożywka + wskaźnik (badania właściwe)

zaobserwowano znaczącą zmianę barwy, która pogłębiała się wraz z upływem czasu. W przypadku porównania wyników uzyskanych stosując dwa różne wskaźniki, nie zaobserwowano znaczących różnic. Całkowity minimalny czas obserwacji zmiany barwy dla wariantu VI wyniósł $C_{Two} = 90$ min (zarówno dla komercyjnego kitu jak i resazuryny rozpuszczonej w buforze Dulbecco's). Ta sama sytuacja miała miejsce w przypadku wariantu VII.

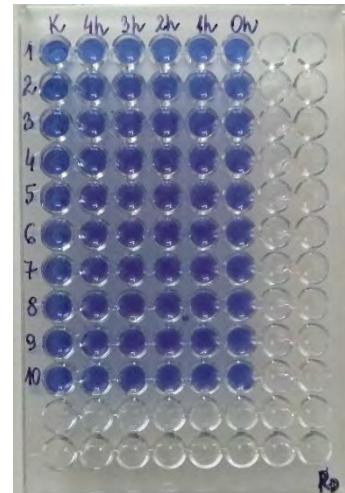
Rysunek 10. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks.

Wariant : VII + ALA + ASP (powtórzenie 1-10)

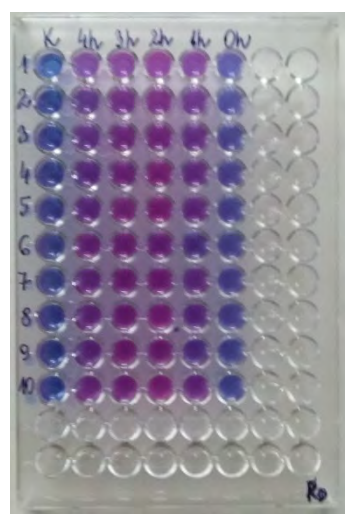
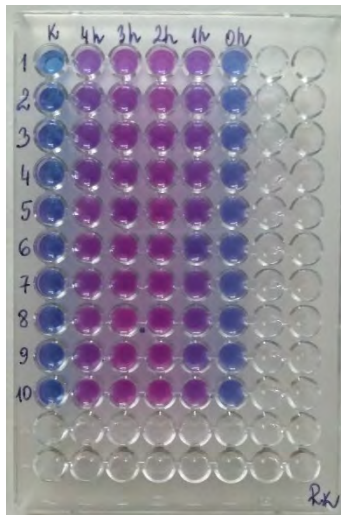
Resazuryna Kit



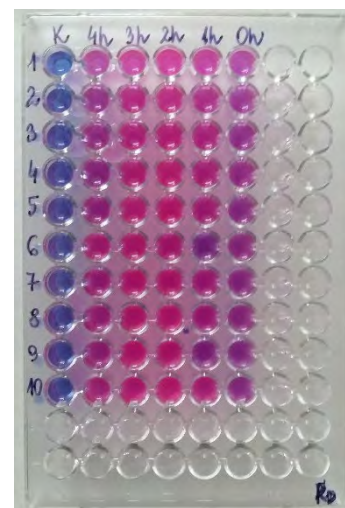
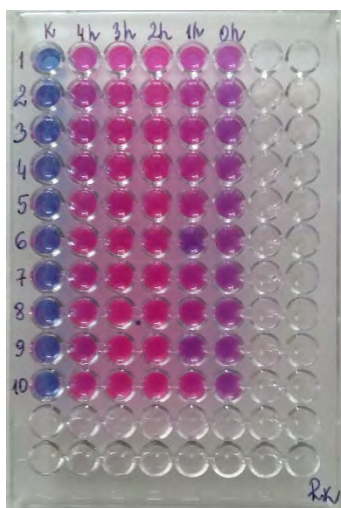
Resazuryna Dulbecco



$T_{wo}=0\text{ h}$



$T_{wo}=30\text{ min}$



$T_{wo}=60\text{ min}$

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

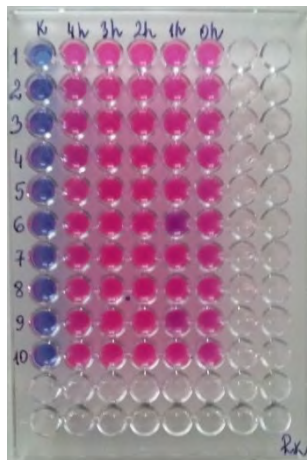
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – powtórzenia

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

Rysunek 11. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.

Wariant : VII + ALA + ASP (powtórzenie 1-10)

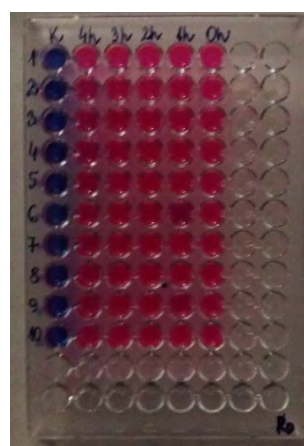
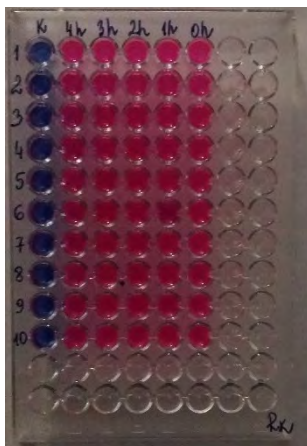
Resazuryna Kit



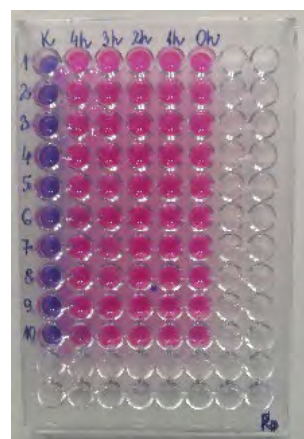
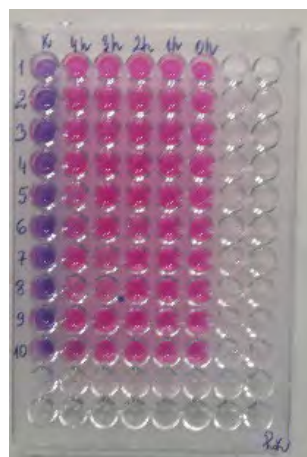
Resazuryna Dulbecco



$T_{wo}=90 \text{ min}$



$T_{wo}=120 \text{ min}$



$T_{wo}=24 \text{ godzina}$

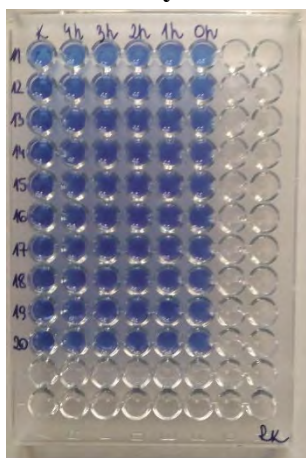
0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – powtórzenia

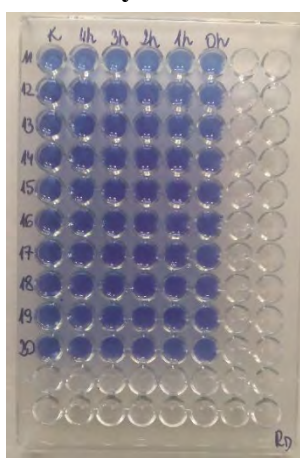
T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

Wariant : VII + ALA + ASP (powtórzenie 11-20)

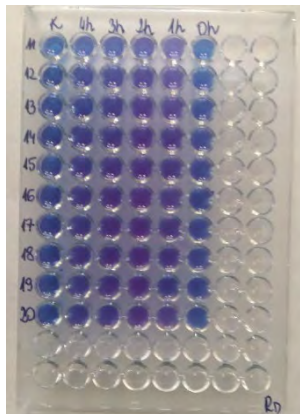
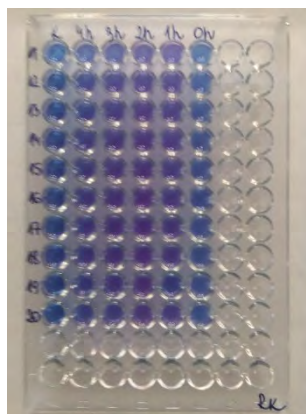
Resazuryna Kit



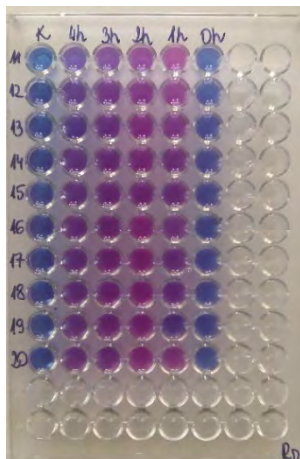
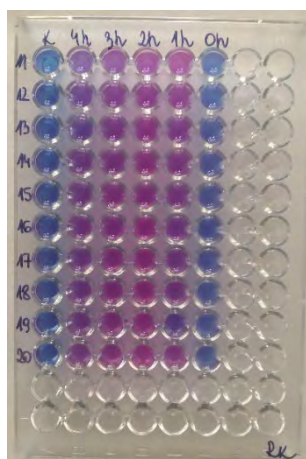
Resazuryna Dulbecco



$T_{wo}=0$ h



$T_{wo}=15$ min



$T_{wo}=30$ min

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

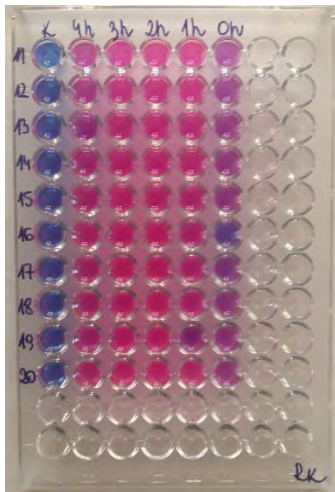
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – powtórzenia

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

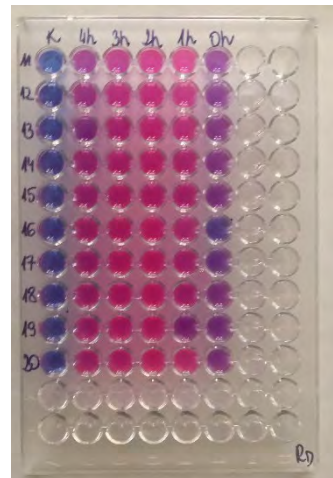
Rysunek 13. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.

Wariant : VII + ALA + ASP (powtórzenie 11-20)

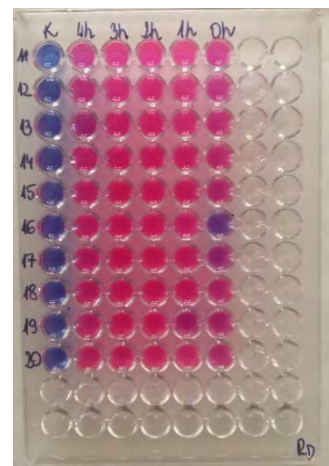
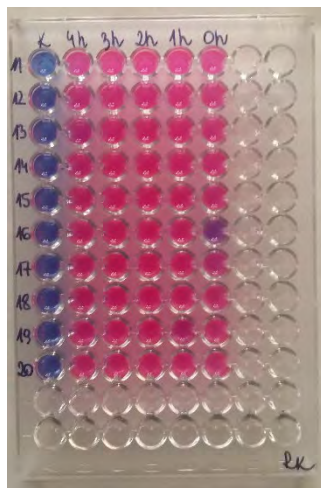
Resazuryna Kit



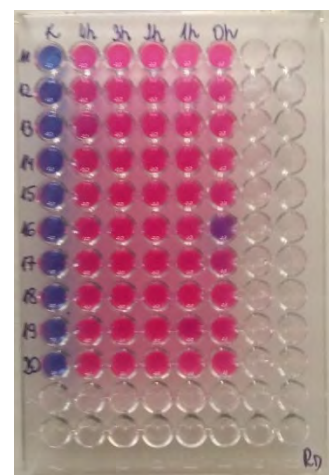
Resazuryna Dulbecco



$T_{wo}=60 \text{ min}$



$T_{wo}=90 \text{ min}$



$T_{wo}=120 \text{ min}$

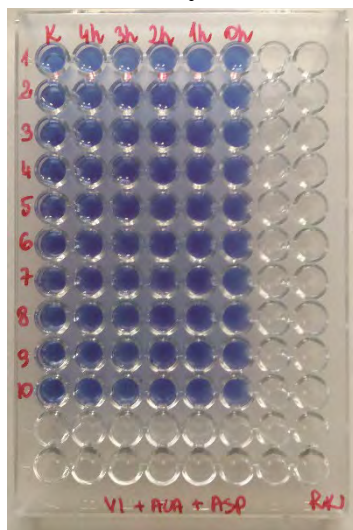
0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – powtórzenia

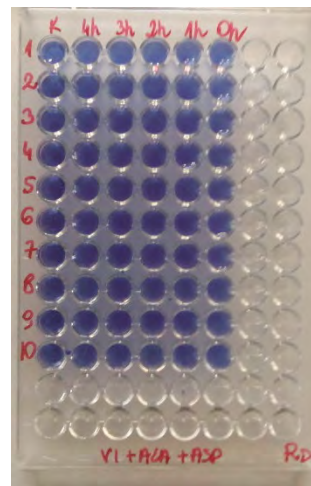
T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

Wariant : VI + ALA + ASP (powtórzenie 1-10)

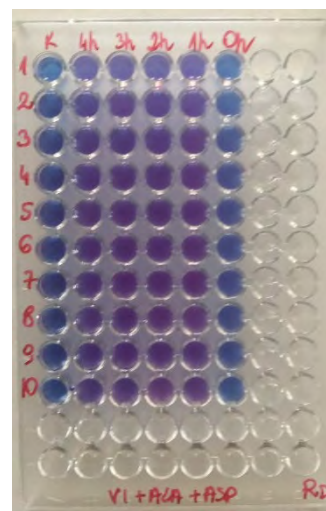
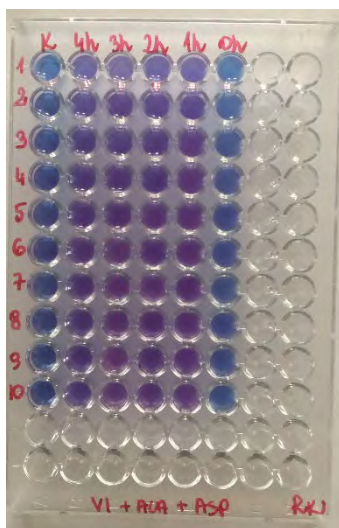
Resazuryzna Kit



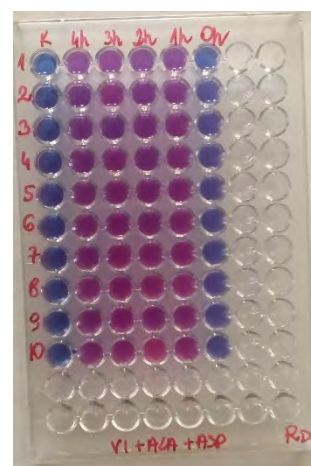
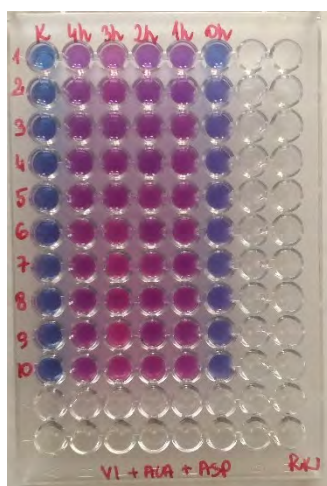
Resazuryzna Dulbecco



$T_{wo}=0$ h



$T_{wo}=15$ min



$T_{wo}=30$ min

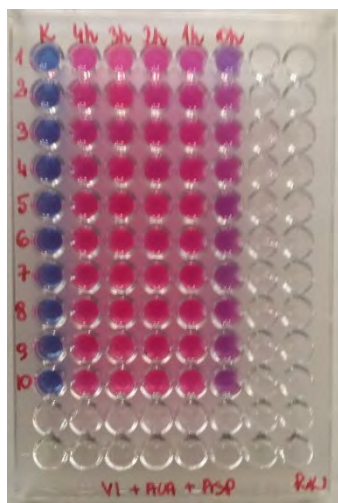
0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – powtórzenia

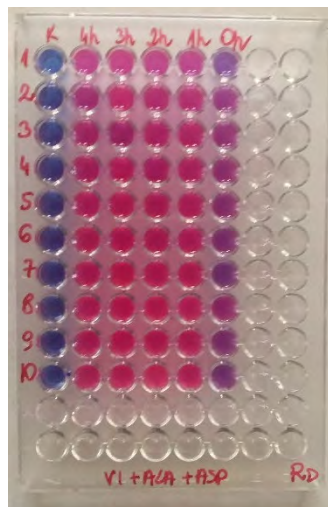
T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

Wariant : VI + ALA + ASP (powtórzenie 1-10)

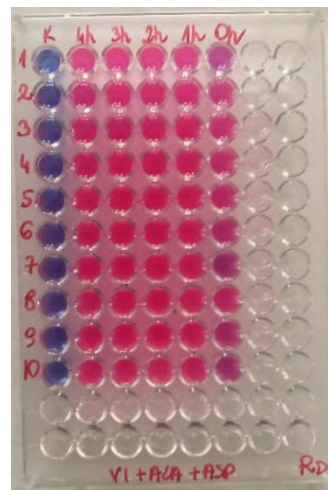
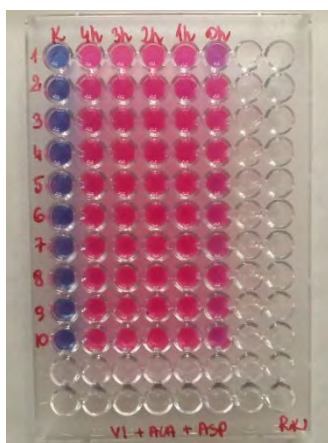
Resazuryrna Kit



Resazuryrna Dulbecco



$T_{wo}=60 \text{ min}$



$T_{wo}=90 \text{ min}$

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

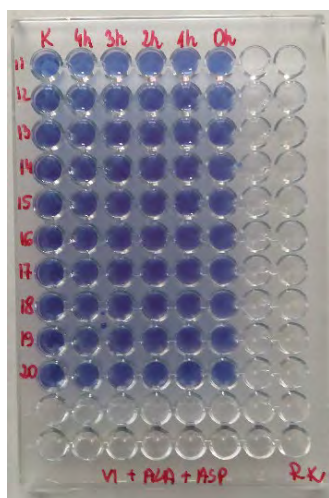
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 – powtórzenia

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

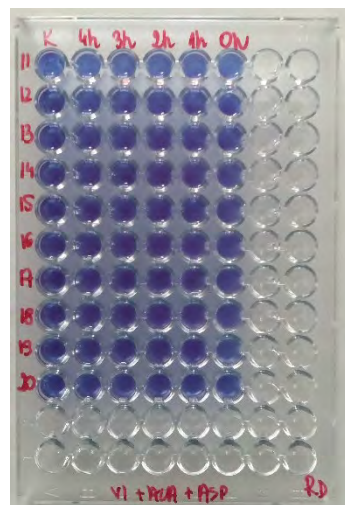
Rysunek 16. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.

Wariant : VI + ALA + ASP (powtórzenie 11-20)

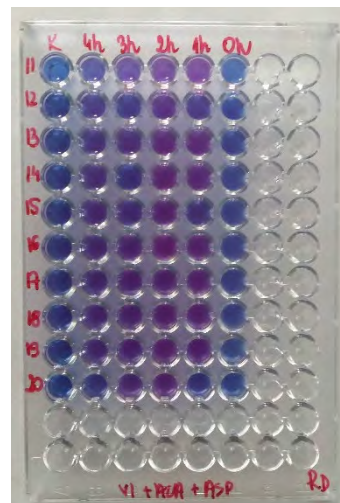
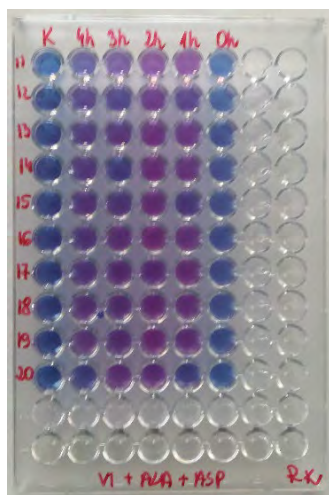
Resazuryzna Kit



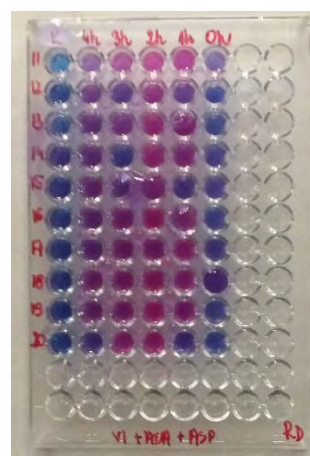
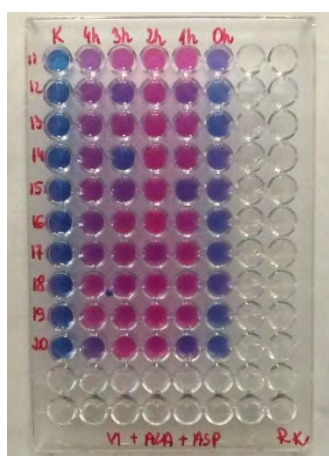
Resazuryzna Dulbecco



$T_{wo}=0$ h



$T_{wo}=15$ min



$T_{wo}=30$ min

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

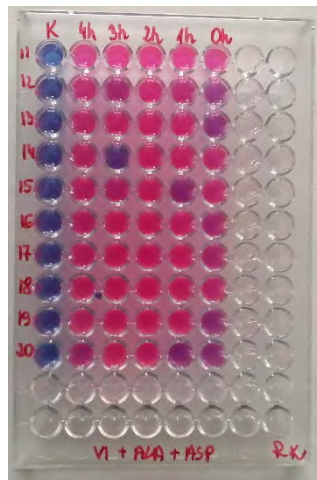
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – powtórzenia

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

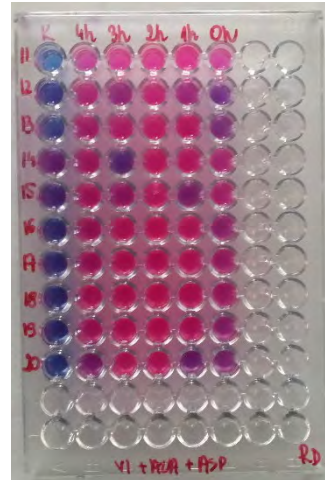
Rysunek 17. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks

Wariant : VI + ALA + ASP (powtórzenie 11-20)

Resazuryna Kit



Resazuryna Dulbecco



$T_{wo}=90min$

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

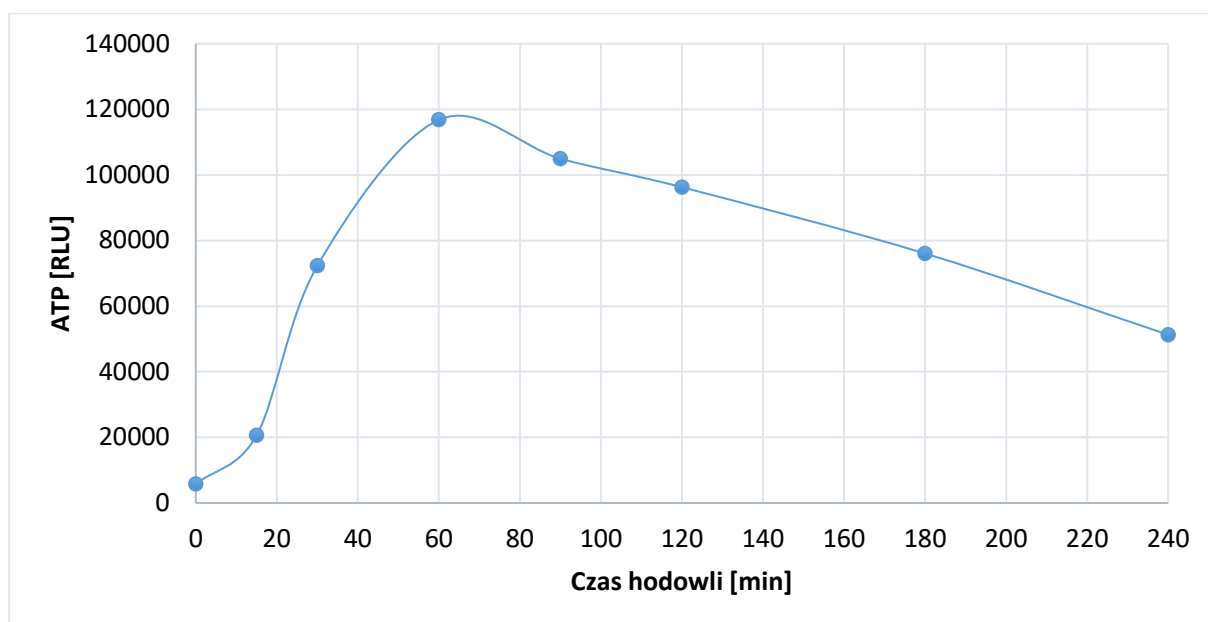
11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 – powtórzenia

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony po dodaniu wskaźnika redoks (czerwony kolor)

2.2. Pomiar ATP

Pomiar ilości ATP (Adenozyno-5'-trifosforan) wykonywano w oparciu o metodę bioluminescencji. W tym celu w określonych minutach hodowli (0', 15', 30', 60', 90', 120', 180', 240') pobierano 200 μ l próby, a następnie dodawano do niej 200 μ l ATP Kit (BacTiter-Glo, PROMEGA). Tak przygotowaną próbkę po ok. 5 minutach wkładano do aparatu LUMAC i odczytywano wynik w jednostkach RLU (Relative Light Units). Badania prowadzono w 12 niezależnych powtórzeniach. Pożywką hodowlaną była zoptymalizowana, wybrana w poprzednich etapach projektu pożywka III.

W tabeli 6 przedstawiono ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji w medium germinacyjnym (pożywka III + germinanty zawieszony w PBS). Znaczący skok wartości ATP zauważono już po 15 minutach i utrzymał się on do 90 minuty, a następnie spadał. Największą ilość ATP uzyskano w 60 minucie hodowli. Na rysunku 18 przedstawiono graficzną formę wyników.



Rysunek 18. Graficzna forma uzyskanych wyników w ocenie kinetyki wydzielania ATP.

Tabela 6. Ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji.

L.p.	Czas inkubacji [min]	ATP [RLU] średnia												Średnia
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1	0	3978	4286	4442	9289	7753	8596	6167	5992	3731	3887	4252	3673	5504
2	15	15447	16979	19261	14705	25003	25816	26568	20929	16554	24862	19663	21082	20572
3	30	62795	68835	78979	70651	82623	87485	83881	75032	55292	57538	59533	79475	71843
4	60	103668	135296	148572	109205	83544	134736	105108	105568	129214	113339	106049	120675	116825
5	90	83633	106967	109048	90199	129012	110590	107048	101603	104464	107197	97173	112946	104976
6	120	90245	119817	118919	94981	102771	109526	87226	70890	86497	81700	73969	97468	96257
7	180	72399	78417	81228	76272	93449	85446	67351	57987	78692	69269	75008	88543	76051
8	240	70510	63031	40993	30572	58286	54215	40149	37758	60449	56918	80043	83939	51288

W celu oznaczenia czasu niezbędnego do wiarygodnej oceny, czy próba wykazuje statystycznie istotną różnicę i można ją uważać za pozytywny odczyt, wykorzystano pojęcia granicy wykrywalności (ang. Limit of Detection LOD) i granicy oznaczalności (ang. Limit of Quantification LOQ). Granica wykrywalności jest to najmniejsza wartość pomiaru możliwa do wykrycia za pomocą danej procedury czy techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Granica wykrywalności jest ściśle związana z określoną procedurą analityczną, jak również poziomem szumów stosowanego urządzenia pomiarowego. Granica oznaczalności jest to najmniejsza wartość pomiaru możliwa do ilościowego oznaczenia za pomocą danej procedury analitycznej z założoną dokładnością i precyzją. Wartość granicy oznaczalności jest wielokrotnością granicy wykrywalności i wynosi $LOQ = 3 \times LOD$ [Szczepaniak, 2002; Konieczka i Namieśnik, 2007].

W celu określenia granicy wykrywalności i granicy oznaczalności dla danej metody pomiarowej wykazano, że wyniki pomiarów mają rozkład normalny (metoda Pearsona, obliczenia z wykorzystaniem programu Microsoft Excel). Następnie wykorzystano test t-Studenta do oceny czy dane średnie różnią się istotnie pod względem statystycznym (obliczenia z wykorzystaniem programu Microsoft Excel). Test t Studenta jest metodą statystyczną służącą do porównania dwóch średnich między sobą jeśli znamy liczbę pomiarów, średnią arytmetyczną oraz wartość odchylenia standardowego. Jeśli wynik testu t Studenta jest istotny na poziomie $p < 0,05$ możemy odrzucić hipotezę zerową, że analizowane średnie są równe, na rzecz hipotezy alternatywnej, że różnice są istotne statystycznie.

Ocena istotności różnicy pomiędzy pomiarami bioluminescencji w poszczególnych okresach pomiarowych, wykazała, że pierwsza statystycznie istotna zmiana nastąpiła po 10 min (tabela 7).

Przyjmując czas 10 minut za poziom wykrywalności istotny statystycznie ($p < 0,05$), i fakt, że osiągnął on poziom RLU 16664, przyjęto że limit oznaczalności w metodzie bioluminescencyjnego pomiaru ATP będzie **wynosił 30 minut**. Czas ten został obliczony na podstawie wzoru: $LOQ = 3 \times LOD$ (3×16748 RLU), co odpowiada poziomowi RLU 50244. Pomiar bioluminescencji na poziomie powyżej 50244 RLU dla wszystkich powtórzeń obserwowany był w 30 min.

Tabela 7. Ilość uwalnianego ATP w czasie germinacji - dane szczegółowe do obliczeń statystycznych.

Czas [min]	Powtórzenie												Średnia	Odchylenie standardowe	Poziom istotności t-studenta
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII			
0	3978	4286	4442	9289	7753	8596	6167	5992	3731	3887	4252	3673	5503,83	2028,00	0
5	5781	5391	5789	8038	8417	8046	8992	6981	5633	5781	6635	4104	6632,33	1475,31	0,066657061
10	14542	14871	15805	16206	19602	17993	18353	16672	14928	17768	16948	17284	16747,67	1553,00	1,76379E-13
15	15447	16979	19261	14705	25003	25816	26568	20929	16554	24862	19663	21082	20572,42	4201,33	7,52682E-11
20	37652	40834	33561	38451	42569	43274	40568	39747	37627	35574	38662	39823	39028,50	2755,01	7,2691E-22
25	49332	46456	48629	47451	48326	45672	47821	47578	49987	46239	48027	45628	47595,50	1391,67	4,55489E-26
30	62795	68835	78979	70651	82623	87485	83881	75032	55292	57538	59533	79475	71843,25	11068,27	4,30129E-16

2.3. Precyzja, powtarzalność metod

Precyzja metody określa stopień zgodności między wynikami uzyskanymi tą samą metodą i na tej samej próbce przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczeń. Charakteryzuje ona stopień rozproszenia zbioru wyników pomiarów względem prawdziwej wartości badanej cechy. Jest zatem wykładnikiem błędów losowych, występujących w przypadku posługiwania się daną metodą. Miarą precyzji jest odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe lub współczynnik zmienności $V[\%]$. Powtarzalność wyznacza się na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego serii pomiarów przeprowadzonych w danym laboratorium, przez danego analityka z wykorzystaniem danego urządzenia pomiarowego, w relatywnie krótkim czasie [Konieczka i Namieśnik, 2007].

W celu oznaczenia powtarzalności wykorzystanej metody (bioluminescencyjny pomiar ATP) wykonano po 10 równoległych pomiarów w trzech punktach pomiarowych. Wartość liczbową współczynnika V obliczono wg wzoru:

$$V = OS / X_{\text{sr}}$$

OS – odchylenie standardowe

X_{sr} – wartość średnia pomiaru

Bioluminescencyjny pomiar ATP

Wartości pomiarowe (próby właściwe, z dodatkiem przetrwalników)

0 min. 5992, 6002, 5783, 5881, 5768, 5890, 6010, 5990, 5799, 5899 [RLU]

$X_{\text{sr}} = 5901,4$ RLU OS = 94,76 **$V = 1,6\%$**

15 min. 20929, 21345, 22004, 20787, 21567, 20562, 21300, 22890, 21397, 24500 [RLU]

$X_{\text{sr}} = 21\,728$ RLU OS = 1176, 58 **$V = 5,41\%$**

30 min. 75 032, 76542, 74981,75647, 74399, 75005, 75693, 75645, 75907, 74 698 [RLU]

$X_{\text{sr}} = 75354,9$ RLU OS = 642,0 **$V = 0,85\%$**

Podsumowując, stosowana metoda badawcza (bioluminescencyjny pomiar ATP) charakteryzowała się dobrą precyzją i powtarzalnością, a współczynnik zmienności nie przekroczył 6% [Szczepaniak, 2002; Konieczka i Namieśnik, 2007].

3. Spis literatury

1. Aouadhi C., Simonin H., Prévost H., de Lamballerie M., Maaroufi A., Mejri S.: Optimization of pressure induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk. *Food Microbiology* 30: 1-7, 2012.
2. Konieczka P., Namieśnik J.: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2007.
3. Krzywicka H., Jakimiak B., Zarzycka E.: Wpływ podłoża wzrostowych na odzysk drobnoustrojów testowych poddanych działaniu pary wodnej w nadciśnieniu. *Roczniki PZH* 47(4): 439-444, 1996.
4. Luu S., Mora J., Setlow B., Feeherry F., Donna C., Setlow P.: The Effects of Heat Activation on *Bacillus* Spore Germination, with Nutrients or under High Pressure, with or without Various Germination Proteins, *Applied and Environmental Microbiology* v.81, 2015
5. Porębska I., Sokołowska B., Woźniak Ł.: Dipicolinic acid release and the germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under nutrient germinants. *Polish Journal of Microbiology* 66(1): 67-74, 2017.
6. Setlow B., Cowan A.E., Setlow P.: Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* 95: 637-648, 2003.
7. Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
8. Woese C., Morowitz H.J.: Kinetics of the release of dipicolinic acid from spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* Vol 76, 1958.

4. Spis tabel

Tabela 1. Skład podłoży wybranych do doświadczenia.	4
Tabela 2. Skład podłoży wybranych do II tury doświadczenia.	6
Tabela 3. Skład podłoży wybranych do III tury doświadczenia.	10
Tabela 4. Skład podłoży wybranych do IV tury doświadczenia.	13
Tabela 5. Warianty wytypowanych pożywek.	17
Tabela 6. Ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji.	29
Tabela 7. Ilość uwalnianego ATP w czasie germinacji - dane szczegółowe do obliczeń statystycznych.	31

5. Spis rysunków

Rysunek 1. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – I tura.	5
Rysunek 2. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – II tura.	7
Rysunek 3. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – II tura c.d.	8
Rysunek 4. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – II tura c.d.	9
Rysunek 5. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – III tura.	11
Rysunek 6. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – III tura, c.d.	12
Rysunek 7. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – IV tura.	14
Rysunek 8. Zdjęcia przedstawiające dynamikę zmiany barwy wskaźnika redoks – IV tura c.d.	15
Rysunek 9. Schemat doświadczenia.	17
Rysunek 10. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks.	20
Rysunek 11. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.	21
Rysunek 12. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.	22
Rysunek 13. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.	23
Rysunek 14. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.	24
Rysunek 15. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.	25
Rysunek 16. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks c.d.	26
Rysunek 17. Dynamika zmiany barwy wskaźnika redoks.	27
Rysunek 18. Graficzna forma uzyskanych wyników w ocenie kinetyki wydzielania ATP.	28



Sprawozdanie roczne

D/2017

R/5

Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

Raport cząstkowy R/5

Dobór odpowiedniego nośnika do immobilizacji przetrwalników

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Kontynuacja badań nad doбором odpowiedniego nośnika do immobilizacji przetrwalników
- Ustalenie minimalnego czasu kiełkowania przetrwalników umożliwiającego ich wykrycie w danej metodzie (bioluminescencyjny pomiar ATP, wizualna zmiana barwy)

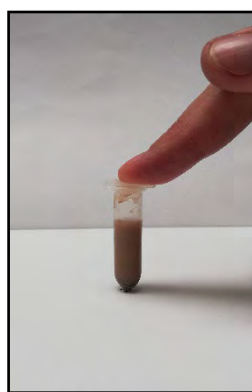
Spis treści

1. Immobilizacja przetrwalników na innych rodzajach nośników	4
2. <i>Geobacillus stearotherophilus</i> – optymalizacja procesu germinacji.....	6
2.1. Testowanie pojedynczych komponentów.....	6
2.2. Test studzienkowy - komponenty (resazuryna).....	14
2.2.1. I tura	15
2.2.2. II tura	17
2.2.3. III tura.....	19
2.3. Kinetyka zmiany barwy wskaźnika – powiększenie skali.....	21
3. Badania z wykorzystaniem liofilizatu bakterii <i>Geobacillus stearotherophilus</i>	25
3.1. Określenie dynamiki ilości uwalnianego ATP	27
3.2. Ocena wizualna zmiany barwy wskaźnika.....	32
4. Spis literatury	34
5. Spis tabel	35
6. Spis rysunków.	36

1. Immobilizacja przetrwalników na innych rodzajach nośników

Na tym etapie badań wykorzystano szczep *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953). Szczep ten wyhodowany został w zoptymalizowanych warunkach procesu (Raport R1), a uzyskane przetrwalniki zostały oczyszczone i zawieszono w wodzie destylowanej, co stanowiło materiał wyjściowy do badań.

W pierwszych etapach pracy do immobilizacji wybrano bibułę Whatmana (jako próbę kontrolną materiału zawierającego celulozę) oraz Tyvek (jako próbę kontrolną materiału nie zawierającego celulozy – dedykowanego sterylizacji plazmowej). Jednocześnie prowadzono doświadczenia z wykorzystaniem bentonitu (SIGMA) i halozytu (halozyt DUNINO, 0-0,04 mm, Intermark). Immobilizacja zawiesiny przetrwalników bakterii *Geobacillus stearothermophilus* z dodatkiem 1% bentonitu spowodowała powstanie w trakcie suszenia jednolicie spieczonej powłoki, uniemożliwiającej jej rozdzielenie i przygotowanie naważek. Wykorzystanie halozytu jako nośnika do immobilizacji przetrwalników, pozwoliło na uzyskanie proszku o liczebności zgodnej z normą PN-EN ISO 11138-1 ($3,0 \times 10^6$ jtk w 0,1 g proszku). Jednakże lekko brązowe zabarwienie nośnika oraz mętność, uniemożliwiało zastosowanie go do testów wizualnej oceny zmiany barwy oraz w pomiarach spektrofotometrycznych (Fot. 1). Wykorzystanie halozytu w pomiarach bioluminescencji też było niemożliwe ze względu na brak jednorodności układu (poza granicą możliwości oznaczenia w bioluminometrze (RLU > 3402 251).



Fot. 1. Nośnik - halozyt wraz z pożywką

Wg danych literaturowych [Woodward, 1988; Guisan, 2006; Holmes i wsp. 2008] najczęściej stosowanymi nośnikami nieorganicznymi do immobilizacji komórek są: krzemionka, tlenki metali, ceramika, ziemia okrzemkowa i szkło porowate. W związku z tym przeprowadzono kolejne próby immobilizacji spor *Geobacillus stearothermophilus* z ziemią

okrzemkową i tlenkiem krzemu. W przypadku ziemi okrzemkowej i tlenku krzemu uzyskano założoną liczebność ($3,0 \times 10^6$ jtk oraz $4,0 \times 10^6$ jtk w 0,1g proszku, odpowiednio). Jednakże ze względu na dużą objętość ziemi okrzemkowej (0,1 g zajmowała objętość ponad 1 cm^3) nie była ona wykorzystywana w doświadczeniach. Tlenek krzemu był biały (nie powodowało to zafałszowań barwy przy wizualnej ocenie zmiany koloru wskaźnika - resazuryny) i szybko sedymentował. Dalsze badania kontynuowano z wykorzystaniem zarówno zawiesiny spor jak i przetrwalników zimmobilizowanych na tlenku krzemu.

2. *Geobacillus stearothermophilus*– optymalizacja procesu germinacji.

2.1. Testowanie pojedynczych komponentów.

W wyniku prac przeprowadzonych na szczepie *Bacillus subtilis* (Raport R1, R2), zawężono badania mające na celu wybór odpowiedniego składu pożywki, która w możliwie jak najkrótszym czasie doprowadzi do przejścia spor *Geobacillus stearothermophilus* w komórki wegetatywne. Badanymi geminatami (w porównaniu do poprzednich badań) była tylko **L-Valina, L-Alanina, L-Asparagina**. Dodatkowo, badano także wpływ **glukozy, fruktozy, inozyny i jonów (sód i potas)** na proces kiełkowania form przetrwalnikowych w wegetatywne. Aby zbadać wpływ tylko wybranych czynników chemicznych (bez dodatkowych substancji, obecnych w pożywce mikrobiologicznej tj peptonu czy bulionu, będących źródłem węgla oraz azotu), badane germinanty zawieszane były buforze fosforanowym. Stosowane warianty przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Germinanty stosowane w testach.

L.p.	Badany czynnik
1	L-Valina
2	L-Alanina
3	L-Asparagina
4	D-Glukoza
5	D-Fruktoza
6	Inosine
7	None
8	Na ⁺
9	K ⁺
10	Na ⁺ + K ⁺

Badania obejmowały kontrolę zmiany % germinacji (Aouadhi i wsp. 2012), ilości wydzielanego ATP oraz zmiany absorbancji (przy dodatku resazuryny, długość fali $\lambda=600$ nm oraz $\lambda=690$ nm).

W tabeli 2 oraz 3 przedstawiono wyniki dotyczące wpływu germiantów na proces germinacji. Wyliczenia przedstawiono w oparciu o wzór zawarty w publikacji (Aouadhi i wsp. 2012):

$$G = \left(\frac{OD_i - OD_f}{OD_i} \right) * 100 [\%]$$

Gdzie :

OD_i – gęstość optyczna początkowa

OD_f - gęstość optyczna końcowa

W przypadku procentowego wyznaczenia poziomu germinacji dla badanych aminokwasów oraz cukrów (tabela 2), największym % germinacji charakteryzował się wariant 3 (w pierwszej godzinie hodowli) oraz wariant 2 i 6 (2 godzina hodowli). Wartości te tylko w kilku przypadkach osiągnęły poziom powyżej 20 %, jednak w porównaniu do poprzednio uzyskanych wyników (dla spor *Bacillus subtilis*, gdzie uzyskiwano wyniki powyżej 60 %), nie był to wynik zadowalający (wyniki zaznaczono kolorem żółtym). W czasie badań zrezygnowano z L-Glutaminy oraz L-Cysteiny (ze względu na trudności w ich rozpuszczaniu).

W przypadku zastosowanych jonów, zdecydowanie lepszym okazał się chlorek potasu, dzięki któremu % germinacji wynosił 53%. Świadczy to o istotnej roli jonów potasu w kiełkowaniu przetrwalników.

Na rysunku 1 oraz 2 przedstawiono graficzną ilustrację otrzymanych wyników.

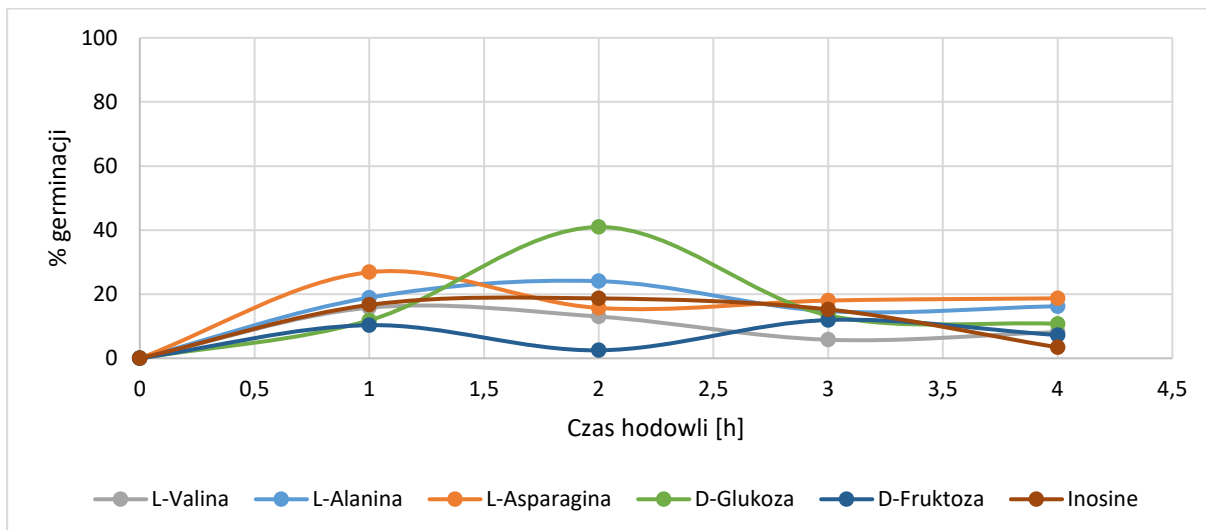
Tabela 2. Wpływ germinantów (aminokwasy i cukry) na proces germinacji.

L.P.	Czynnik	Ilość czynnika [mM]	% germinacji												
			Godzina hodowli [h]												
			0	1	1	Średnia	2	2	Średnia	3	3	Średnia	4	4	Średnia
1	L-Valina	100	0	9,316909	22,23852	15,77772	1,81411	24,22972	13,02192	-11,1534	22,7206	5,783594	4,882419	11,48606	8,18424
2	L-Alanina		0	19,14286	18,71106	18,92696	28,53061	19,61332	24,07197	12,79592	16,62728	14,7116	22,04082	10,46187	16,25134
3	L-Asparagina		0	28,77368	24,93893	26,8563	11,02692	20,39902	15,71297	13,45962	22,57736	18,01849	23,76869	13,66042	18,71456
4	L-Glutamina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L-Cysteina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	D-Glukozą		0	13,66157	10,03107	11,84632	33,08938	48,82379	40,95658	6,631182	20,1953	13,41324	2,971834	18,53085	10,75134
7	D-Fruktoza		0	11,94369	8,732158	10,33792	-0,86285	5,835432	2,48629	6,380563	17,5063	11,94343	4,1099	10,41142	7,26066
8	Inosine		0	20,42291	12,90125	16,66208	25,72687	11,65406	18,69047	18,18502	12,32877	15,25689	11,78855	-4,96831	3,410119

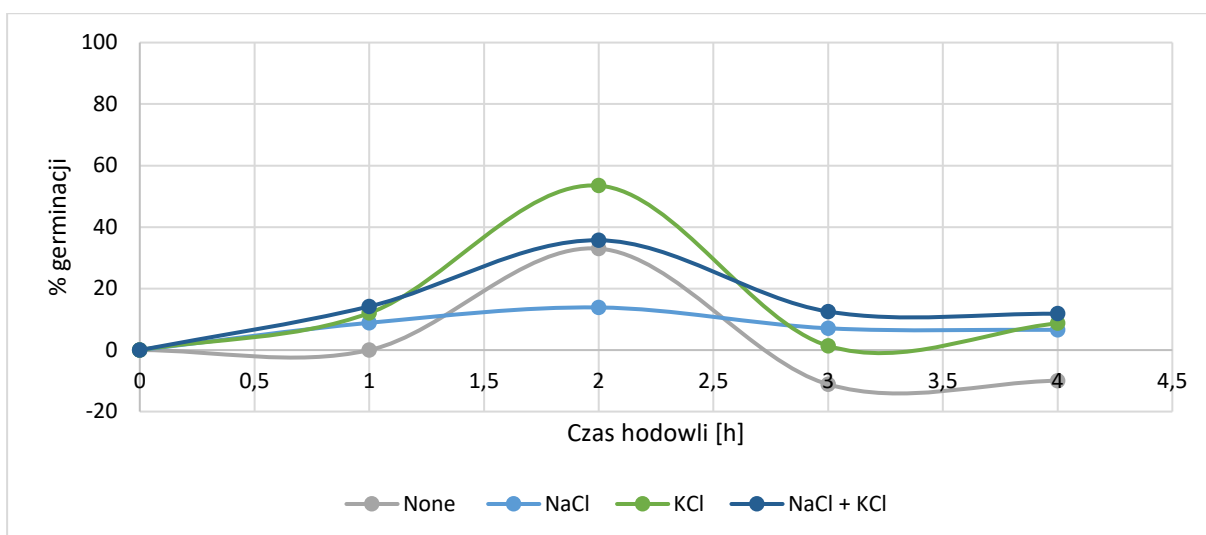
Tabela 3. Wpływ jonów na proces germinacji.

L.P.	Czynnik	Ilość czynnika [mM]	% germinacji												
			Godzina hodowli [h]												
			0	1	1	Średnia	2	2	Średnia	3	3	Średnia	4	4	Średnia
1	None	0	0	-14,2746	-6,9842	0	3,325	3,6654	3,548	-25,8598	3,595145	-11,1323	-23,4032	3,48065	-9,96125
2	NaCl	100	0	7,652719	10,07386	8,86329	14,52226	13,19245	13,85736	-1,90199	16,06483	7,081421	-2,50615	15,67501	6,584428
3	KCl		0	14,27375	9,786977	12,03037	46,60946	60,34968	53,47957	-15,969	18,7299	1,380439	0,648807	16,72026	8,684532
4	NaCl + KCl		0	17,87981	10,49533	14,18757	31,86627	39,56557	35,71592	6,66256	18,3922	12,52873	6,580618	17,03207	11,80635

Na żółto oznaczono najlepsze wyniki



Rysunek 1. Wpływ dodatku czynnika odżywczego(aminokwasy, cukry) na proces germinacji



Rysunek 2. Wpływ dodatku jonów na proces germinacji.

W tabeli 4 oraz 5 przedstawiono wyniki oznaczeń poziomu ATP dla przetrwalników bakterii *Geobacillus stearotherophilus* zawieszonych w roztworach zawierających określone germinanty (tabela 1). Oznaczenia wykonano w 0, po 2 i 4 godzinie inkubacji zawiesiny przetrwalników w obecności badanych aminokwasów i jonów. Eksperymenty wykonano w 4 niezależnych seriach, każda po 3 powtórzenia (końcowy wynik jest średnią z 12 oznaczeń).

Najlepszymi germinantami okazały się **L-Asparagina, D- Fruktaza oraz KCl**. Wartości ATP uzyskane po ich zastosowaniu oscylowały na poziomie powyżej 10 tysięcy RLU.

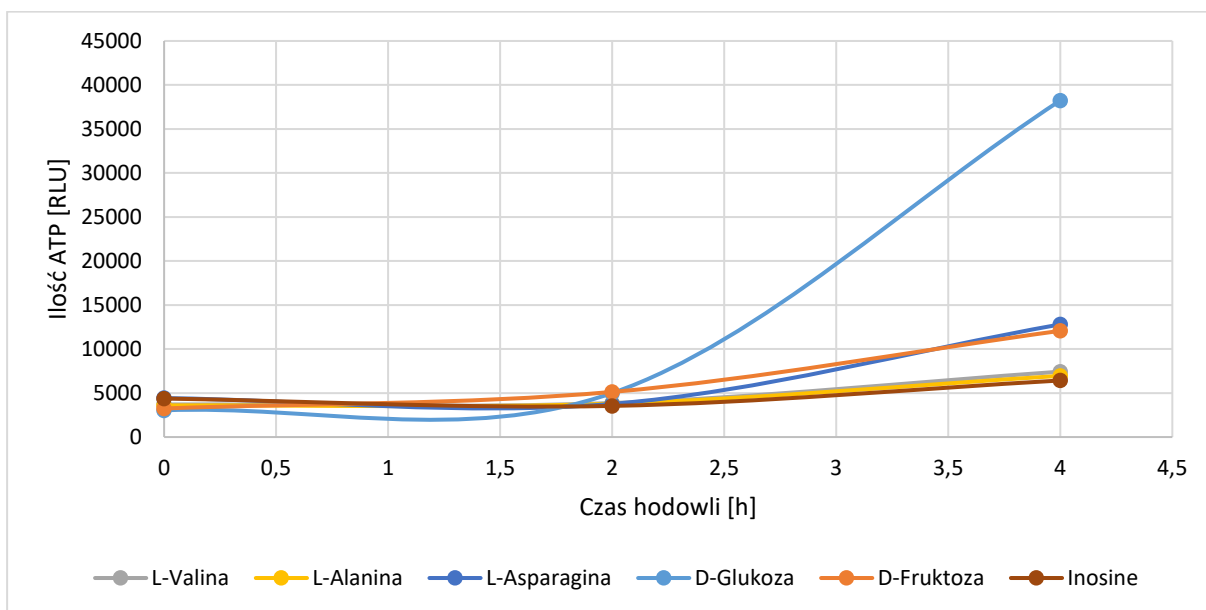
Na rysunku 3 oraz 4 przedstawiono graficzną ilustrację otrzymanych wyników.

Tabela 4. Wpływ germinantów (aminokwasy i cukry) na ilość wydzielanego ATP [RLU].

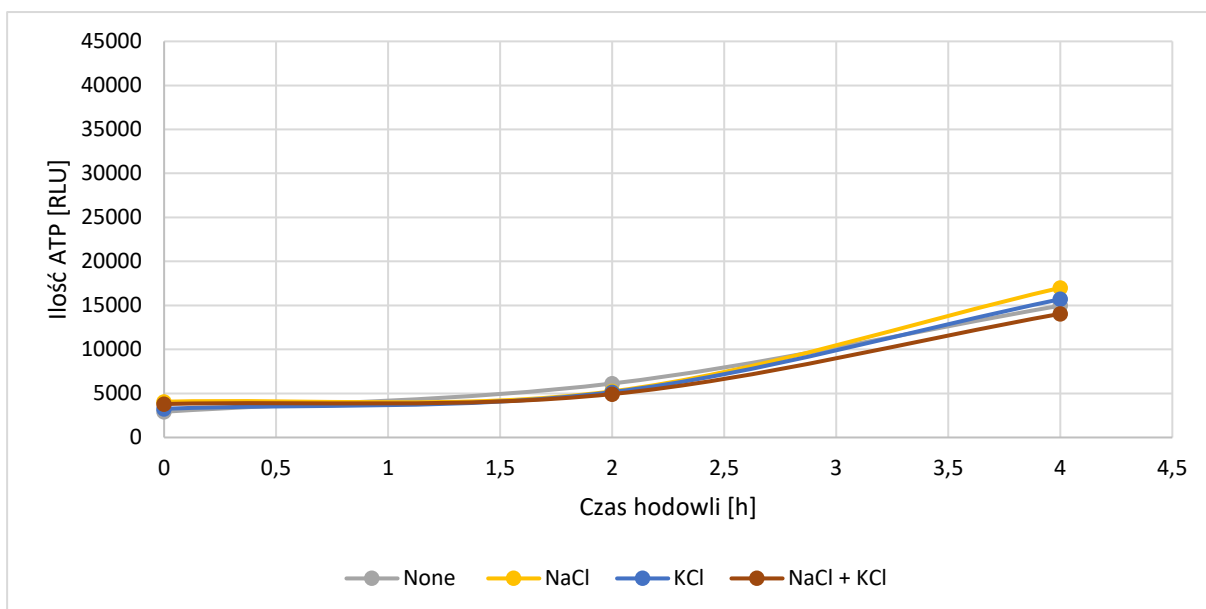
L.P.	Czynnik	Ilość czynnika [mM]	ATP [RLU]														
			Godzina hodowli [h]														
			0	0	0	0	Średnia	2	2	2	2	Średnia	4	4	4	4	Średnia
1	L-Valina	100	3821	3607	3715	3671	3703	4109	3985	3663	3717	3868	6882	6296	8551	7989	7429
2	L-Alanina		3840	3631	3564	3351	3596	4208	4292	3149	3534	3795	5619	5473	8374	8349	6953
3	L-Asparagina		4559	4504	4285	4357	4426	3620	3785	3579	4096	3770	12852	12720	12795	12823	12797
4	L-Glutamina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	L-Cysteina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	D-Glukoza		2965	3012	3122	3045	3036	5183	5125	4819	4867	4998	61161	62944	14373	14468	38236
7	D-Fruktoza		3245	3124	3610	3010	3247	5012	4952	5153	5400	5129	13860	15572	9284	9565	12070
8	Inosine		4725	4685	3944	4151	4376	3731	3656	3260	3509	3539	7075	7311	5636	5688	6427

Tabela 5. Wpływ dodatku jonów na ilość wydzielanego ATP [RLU].

L.P.	Kation	Ilość czynnika [mM]	ATP [RLU]														
			Godzina hodowli [h]														
			0	0	0	0	Średnia	2	2	2	2	Średnia	4	4	4	4	Średnia
1	None	0	2874	2944	3000	2874	2923	5588	5529	6804	6617	6134	8948	8817	2097	2117	1497
2	NaCl	100	4012	3987	4210	4036	4061	5522	4778	5260	5416	5244	18115	17897	15549	16447	17002
3	KCl		3645	3102	3054	3221	3255	5755	4602	5208	5069	5158	21077	21667	10420	9666	15707
4	NaCl + KCl		3856	3945	3745	3655	3800	4857	4854	5019	4995	4931	12595	12393	15973	15235	14049



Rysunek 3. Wpływ dodatku czynnika odżywczego (aminokwasy, cukry) na ilość uwalnianego ATP.



Rysunek 4. Wpływ dodatku jonów na ilość uwalnianego ATP.

W tabeli 6 oraz 7 zamieszczono wyniki pomiaru absorbancji w układzie doświadczalnym, w którym to do danych wariantów pożywek (zawierających różne germinanty) dodano wskaźnik resazurynę. Badania prowadzono zgodnie z metodyką zawartą w dostępnej literaturze, jednak ze względu na brak powtarzalności wyników, zaprzestano dalszym testom.

Tabela 6. Wartości absorbancji dla wybranych germinantów (cukry, aminokwasy)

L.P.	Czynnik	Ilość czynnika [mM]	Resazuryna												
			Godzina hodowli [h]												
			0		0		2		2		4		4		
			Długość fali [nm]												
600		690		600		690		600		690		600		690	
1	L-Valina	100	-0,37	0,6587	0,2426	0,3112	0,2053	0,511	0,2711	0,453	0,1038	0,3295	-0,0308	0,438	
2	L-Alanina		-0,3442	0,6207	-0,0148	0,3519	1,0497	0,2247	1,1435	0,0661	-0,2564	0,3786	-0,3666	0,5498	
3	L-Asparagina		0,0904	0,4025	0,2473	0,2623	-1,1817	0,3706	0,0863	0,2742	-1,5612	0,3074	-1,5146	0,3509	
4	L-Glutamina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	L-Cysteina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	D-Glukozą		0,215	0,3503	0,263	0,4585	0,1071	0,0728	0,0728	0,3142	-0,6185	0,635	0,0373	0,4851	
7	D-Fruktoza		0,1483	0,3716	0,1633	0,4974	-0,6362	0,043	0,043	0,3619	-0,416	0,6239	-0,0468	0,3989	
8	Inosyna		-0,161	0,309	0,2338	0,3113	-1,0628	0,4652	0,2647	0,4651	-1,1661	-0,1788	-0,9313		

Tabela 7. Wartości absorbancji dla wybranych germinantów (jony)

L.P.	Kation	Ilość czynnika [mM]	Resazuryna												
			Godzina hodowli [h]												
			0		0		2		2		4		4		
			Długość fali [nm]												
600		690		600		690		600		690		600		690	
1	None	0	0,3734	0,3649	0,2872	0,3944	-0,247	0,1512	0,1512	0,1942	0,1228	0,3342	0,086	0,4788	
2	NaCl	100	0,2568	0,3642	0,224	0,3959	-1,5209	0,1001	0,1001	0,495	-0,3184	0,9085	0,0582	0,4203	
3	KCl		0,1765	0,3493	0,2438	0,3955	-1,6979	-0,9953	-0,9953	0,5104	-1,1549	0,5196	0,0132	0,3415	
4	NaCl + KCl		0,2347	0,3503	0,3125	0,4178	-1,1529	0,1676	0,1676	0,4745	-0,6894	0,478	-0,0082	0,1653	

2.2. Test studzienkowy - komponenty (resazuryna)

W wyniku prac pierwszego etapu wybrano najlepsze germinanty (pod względem wpływu na ilość wydzielanego ATP oraz dynamiki zmiany barwy wskaźnika), które zestawiono w odpowiednie zestawy komponentów. Aby zawęzić obszar badań a tym samym przebadać jak największą ilość wariantów, zdecydowano prowadzić tylko ocenę stosowania barwnego wskaźnika – resazuryny na określenie aktywności dehydrogenaz.

Szybkość zmiany barwy resazuryny (z koloru ciemno niebieskiego na różowy) przedstawiono na rysunkach 5-7. Tempo tej zmiany uzależnione było od składu użytej pożywki mikrobiologicznej. W sumie przeprowadzono trzy tury doświadczeń. Hodowle prowadzono na zmodyfikowanej pożywce III (Krzywicka i wsp., 1996, raport R2) z dodatkiem różnych germinantów (tabela 8, tabela 9, tabela 10). Inoculum (spory *Geobacillus stearothermophilus*) stanowiło 10 % całkowitej objętości hodowli.

Hodowle wstępne prowadzono w probówkach typu eppendorf, przez 4 godziny, w temperaturze 55°C. W odpowiedniej godzinie hodowli (tj. 0, 1, 2, 3 i 4 h) przenoszono je do płytek wielodołowych i dodawano wskaźnika.

Badania właściwe prowadzono w płytkach wielodołkowych, do których nanoszono 200 µl danej hodowli oraz 20µl wskaźnika redoks – resazuryny. Ocenę zmiany barwy resazuryny dokonywano przez 2 godziny (w godzinnych odstępach czasu), w dwóch temperaturach inkubacji (55°C i 32°C).

Wynik obserwacji przedstawiono na rysunku 13. Na zdjęciach kolorem czerwonym wyróżniono tzw. **czas T_{wo}** - **czas wizualnej oceny**, który obejmował czas zmiany barwy liczony po dodaniu wskaźnika (badania właściwe), natomiast całkowity czas potrzebny na uzyskanie reakcji barwnej był sumą czasu wstępnej inkubacji oraz czasu **T_{wo}** .

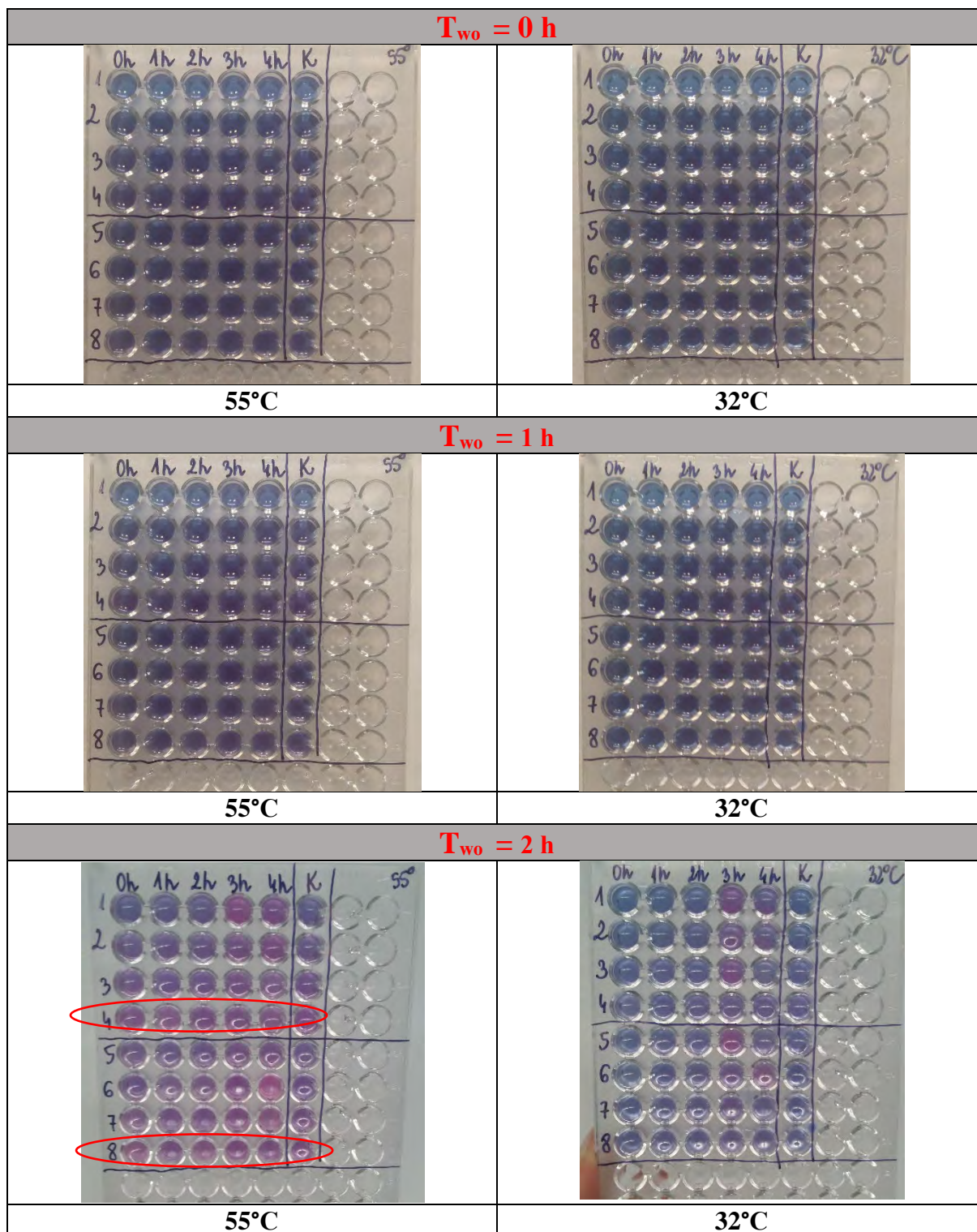
2.2.1. I tura

W pierwszej turze doświadczeń, opierając się na doniesieniach literaturowych (Setlow, 2013; Porębska i wsp., 2017) jako germinant zastosowano kompleks AGFK (glukoza + fruktoza + KCl + L-Asparagina bądź L-Alanina), który dodawano do pożywki III (Krzywicka i wsp., 1996). Kompleks ten dodawano w różnych ilościach- ich wartości podano w tabeli 8.

Tabela 8. Warianty stosowanych komponentów odżywczych użytych do testu studzienkowego.

L.P.	Aminokwas	Cukier	Cukier	Kation	Ilość [każdy]
1	ASP	GLU	FRU	KCl	10 mM
2	ASP	GLU	FRU	KCl	20 mM
3	ASP	GLU	FRU	KCl	50 mM
4	ASP	GLU	FRU	KCl	100 mM
5	ALA	GLU	FRU	KCl	10 mM
6	ALA	GLU	FRU	KCl	20 mM
7	ALA	GLU	FRU	KCl	50 mM
8	ALA	GLU	FRU	KCl	100 mM

Na rysunku 5 przedstawiono zdjęcia wyników uzyskanych z I tury badań. Wstępną hodowlę układu inkubowano tylko w temperaturze 55°C, jednak **badania właściwe** (w płytkach wielodołowych po dodatku wskaźnika erdoks) prowadzono w dwóch wariantach – 32 oraz 55°C. Ze zdjęć umieszczonych na rysunku 5 można wywnioskować, że lepsze wyniki dla szczepu *Geobacillus stearothermophilus* stwierdzono przy inkubacji układu: hodowla + resazuryna w temperaturze 55°C. Zadawalające wyniki uzyskano dopiero w drugiej godzinie badań właściwych ($T_{wo}=2h$). Najlepszym germinantem pierwszej tury doświadczenia okazał się wariant 4 oraz 8 (na rysunku 5 zaznaczona czerwono). Oba komponenty w swoim składzie zawierały jony potasu, glukozę, fruktozę oraz L-Alaninę bądź L-Asparaginę w ilości 100 mM (każda składowa). Całkowity najniższy czas wizualnej oceny zmiany barwy dla tych wariantów wynosił odpowiednio $C_{T_{wo}} = 2h$ (suma czasu wstępnej inkubacji 0h + czasu badań właściwych – po dodatku wskaźnika = 2 h).



Rysunek 5. Ocena przydatności wskaźnika – resazuryny do wyznaczenia aktywności dehydrogenaz (I tura).

Legenda: 0-4h = czas hodowli
 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 – pożywki – tabela 8
 T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks

2.2.2. II tura

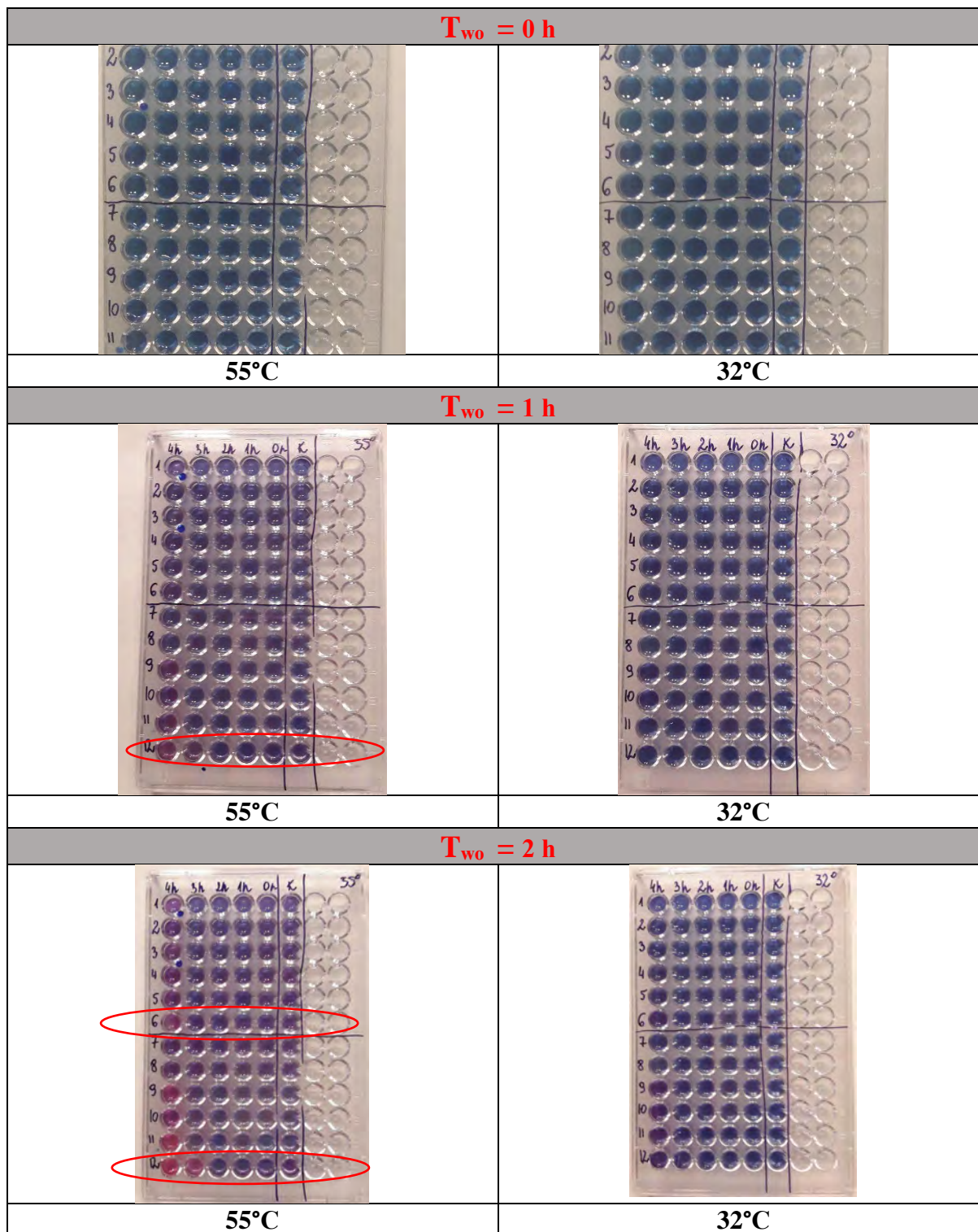
W drugiej turze doświadczeń powtórzono wariant 5, 6, 7 i 8 z pierwszej tury testu. Dodatkowo, powołując się na dane literaturowe (Brousolle i wsp., 2008), do wyżej wspomnianych komponentów dodano Inozynę w ilości 10, 20, 50 i 100 mM. Szczegółowy wykaz zastosowanych wariantów przedstawiono w tabeli 9.

Tabela 9. Warianty stosowanych komponentów odżywczych użytych do testu studzienkowego.

L.P.	Aminokwas	Cukier	Cukier	Kation		Ilość [każdy]
1	-	GLU	FRU	KCl	INO	10 mM
2	-	GLU	FRU	KCl	INO	20 mM
3	-	GLU	FRU	KCl	INO	50 mM
4	-	GLU	FRU	KCl	INO	100 mM
5	ALA	GLU	FRU	KCl	-	10 mM
6	ALA	GLU	FRU	KCl	-	20 mM
7	ALA	GLU	FRU	KCl	-	50 mM
8	ALA	GLU	FRU	KCl	-	100 mM
9	ALA	GLU	FRU	KCl	INO	10 mM
10	ALA	GLU	FRU	KCl	INO	20 mM
11	ALA	GLU	FRU	KCl	INO	50 mM
12	ALA	GLU	FRU	KCl	INO	100 mM

Tak jak w przypadku wyników uzyskanych w pierwszej turze, temperaturą optymalną do inkubacji hodowli wraz ze wskaźnikiem (badania właściwe) dla spor *Geobacillus stearothermophilus* jest 55°C. Na czerwono zakreślono warianty najlepsze dla II tury badań (Rysunek 6). Zarówno dla pierwszej jak i drugiej godziny badań właściwych ($T_{wo} = 1$ h oraz $T_{wo} = 2$ h) był to **wariant 12**, który zawierał wszystkie badane germinanty (w ilości 100 mM każdy). Dla wariantu 12 najniższy całkowity czas oceny wizualnej (suma czasu minimalnej inkubacji wstępnej i czasu po którym dodano wskaźnik) wynosił $C_{wo} = 3$ h.

Dodatkowo, w $T_{wo} = 2$ h **wariant 6** wykazywał także zmianę barwy - najniższy całkowity czas oceny wizualnej (suma czasu minimalnej inkubacji wstępnej i czasu po którym dodano wskaźnik) wynosił $C_{wo} = 6$ h.



Rysunek 6. Ocena przydatności wskaźnika – resazury – do wyznaczenia aktywności dehydrogenaz (II tura).

Legenda:

0-4 = czas hodowli

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 – pożywki – tabela 9

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks

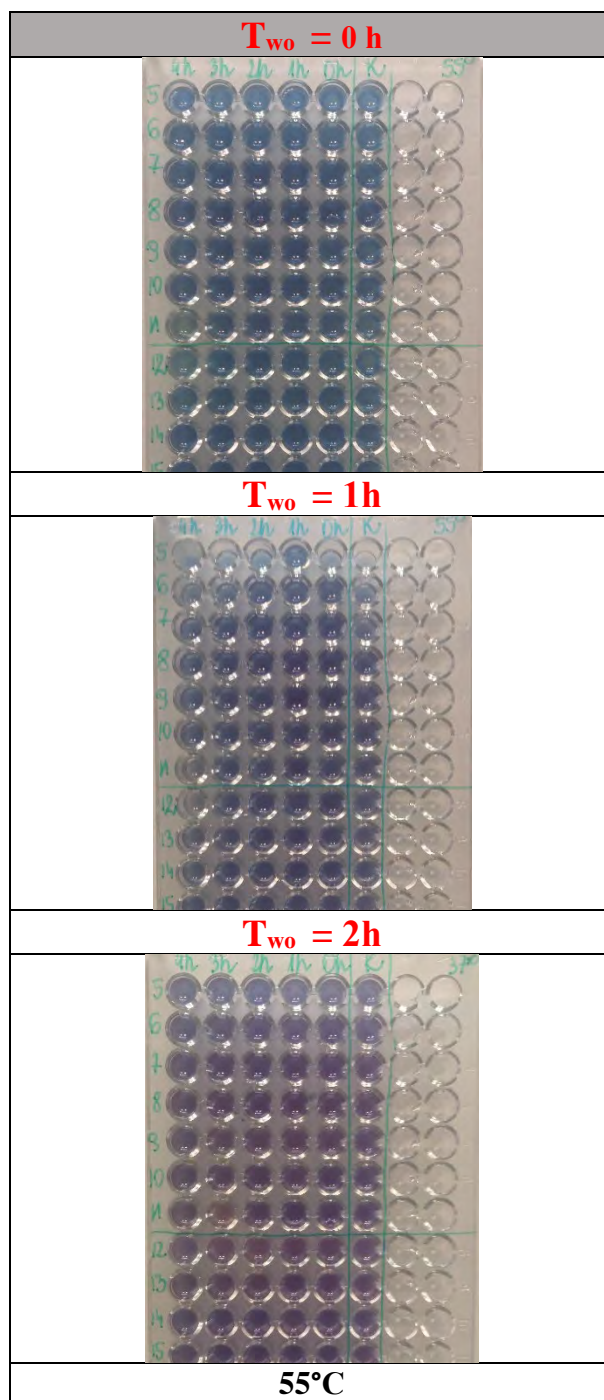
2.2.3. III tura

Celem III tury doświadczeń było określenie wpływu dodatku dodecylaminy na szybkość zmiany barwy wskaźnika redoks (Setlow i wsp., 2003). W tabeli 10 przedstawiono warianty stosowanych komponentów.

Zanim jednak przystąpiono do testów studzienkowych, dla poniższych 16 wariantów założono mikrohodowle. Ze względu na brak wzrostu hodowli w eppendorfach zawierających warianty, składające się tylko z dodecyloaminy (wariant 1, 2, 3 i 4) zrezygnowano z ich użycia. Pozostałe warianty stanowiły komponenty odżywcze, które tak jak w przypadku I i II tury posłużyły jako pożywka do hodowli wstępnej (inkubowanej odpowiednio przez 0, 1, 2, 3 i 4 godziny). Po tych czasach próby przeniesiono do dołków i dodano wskaźnika. Wyniki przedstawiono na rysunku 7, jednak żaden wariant (w porównaniu do I i II tury) nie wykazywał znaczącej zmiany barwy, dlatego też w dalszych badaniach zrezygnowano z dodatku dodecylaminy jako germinanta.

Tabela 10. Warianty stosowanych komponentów odżywczych użytych do testu studzienkowego.

L.P.		Aminokwas	Cukier	Kation	Ilość [każdy]
1	Dodecylamina				10 mM
2	Dodecylamina				20 mM
3	Dodecylamina				50 mM
4	Dodecylamina				100 mM
5	Dodecylamina			KCl	50 mM
6	Dodecylamina			NaCl	50 mM
7	Dodecylamina		GLU		50 mM
8	Dodecylamina		FRU		50 mM
9	Dodecylamina	INO			50 mM
10	Dodecylamina	ALA			50 mM
11	Dodecylamina	ASP			50 mM
12	Dodecylamina			KCl+NaCl	50 mM
13	Dodecylamina		GLU+FRU		50 mM
14	Dodecylamina	ALA+ASP			50 mM
15	Dodecylamina	ALA+ASP	GLU+FRU	KCl+NaCl	50 mM
16	Dodecylamina	ASP	GLU+FRU	KCl	50 mM



Rysunek 7 .Ocena przydatności wskaźnika – resazuryny do wyznaczenia aktywności dehydrogenaz (III tura).

Legenda:

0-4 = czas hodowli

5, 6, 7, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14, 15, 16 – pożywki – tabela 10

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodaniu wskaźnika redoks

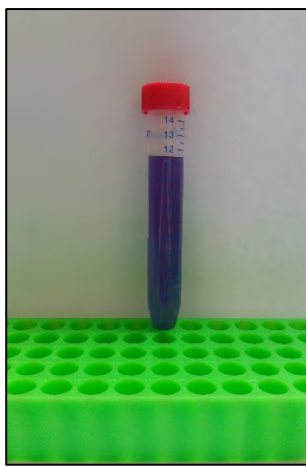
2.3. Kinetyka zmiany barwy wskaźnika – powiększenie skali.

W celu zweryfikowania słuszności wyboru optymalnych stymulatorów kiełkowania (komponentów germinantów wybranych w poprzednich etapach), powiększono skalę – z 300 µl hodowli roboczej na 10 ml. Wybrane warianty (ich skład oraz ilość każdego germinanta) przedstawiono w tabeli 11.

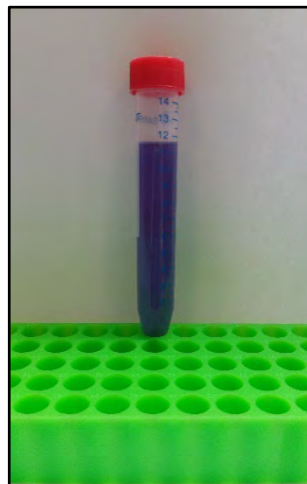
Tabela 11. Warianty komponentów użytych do oceny dynamiki zmiany barwy.

L.p.	Czynnik				Ilość każdego czynnika
I wariant	ALA	GLU	FRU	KCl	po 50 mM
II wariant	ALA	GLU	FRU	KCl	po 100 mM
III wariant	ASP	GLU	FRU	KCl	po 100 mM

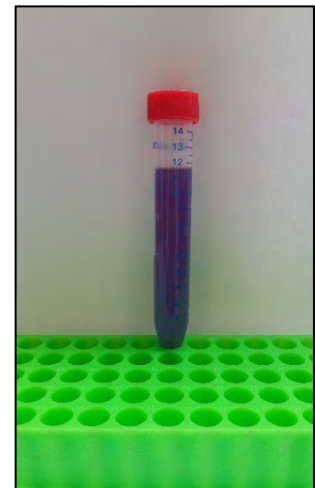
Na rysunkach 8-10 przedstawiono dynamikę zmiany barwy wskaźnika w odpowiednich odstępach czasu trwania hodowli (0, 30, 60, 120, 180 i 240 minuta oraz 24 godzina). W przypadku tego doświadczenia **nie stosowano wstępnej inkubacji**. W godzinie 0 h dodawano zarówno medium germinacyjne ze sporami jak i wskaźnik redoks. Zarówno w pierwszym, drugim jak i trzecim wariacie czas, w którym nastąpiła pierwsza, widzialna zmiana koloru to **240 minuta**. Jednak najlepszym wariantem był wariant II. Po doprowadzeniu inkubacji do czasu **24 godzin** w każdym wariacie zauważono całkowitą zmianę barwy z fioletowo granatowej na jasny róż.



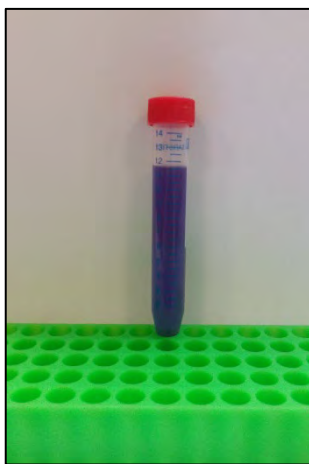
0 h



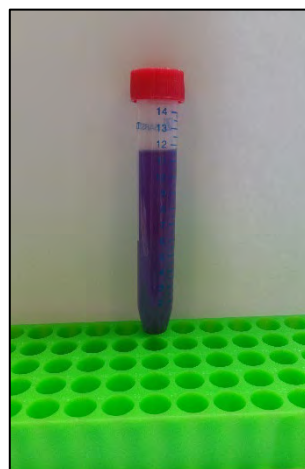
30 min



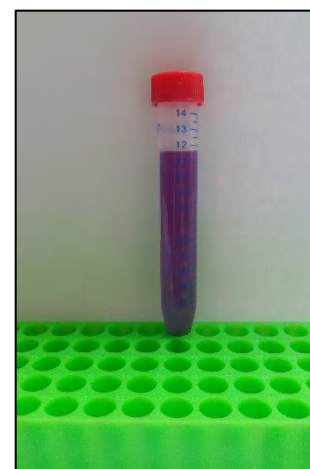
60 min



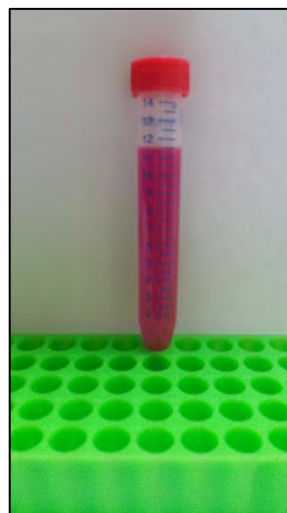
120 min



180 min



240 min

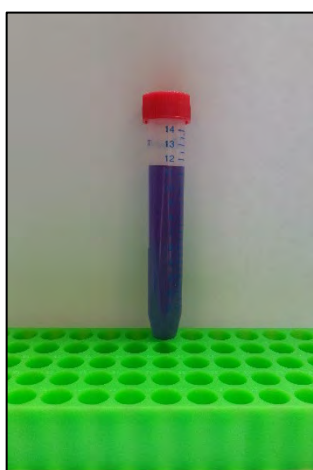


24 h

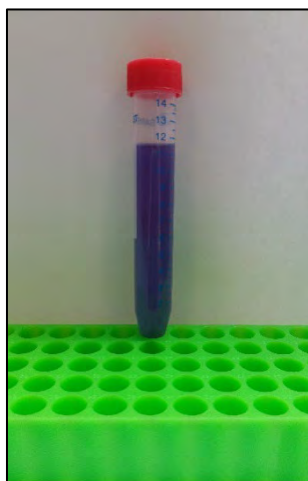
Rysunek 8. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant I (skład tabela 11)

Legenda:

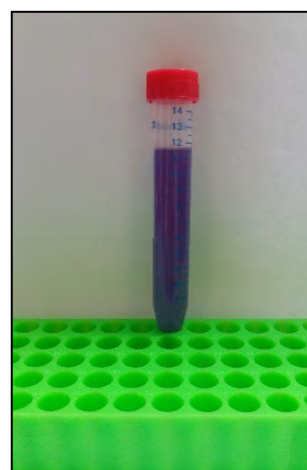
C_{Two} = całkowity czas wizualnej zmiany barwy (0, 30, 60, 120, 180, 240 minuta oraz 24 h)



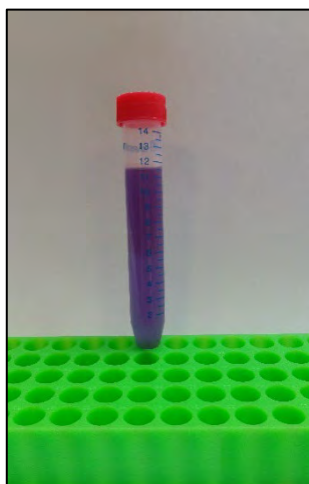
0 h



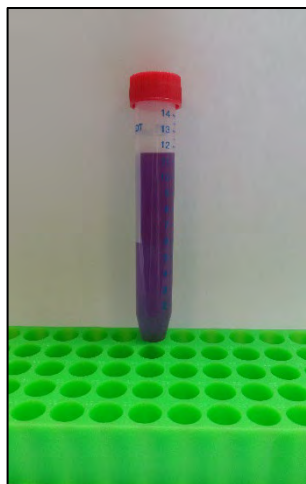
30 min



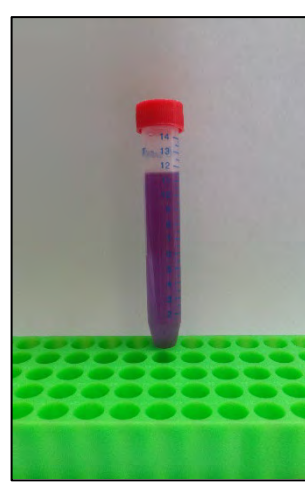
60 min



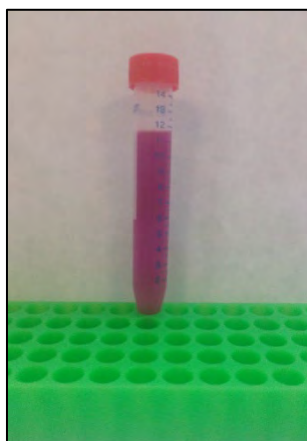
120 min



180 min



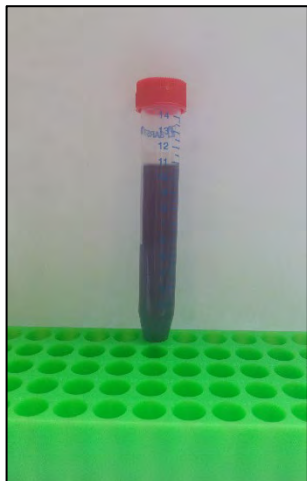
240 min



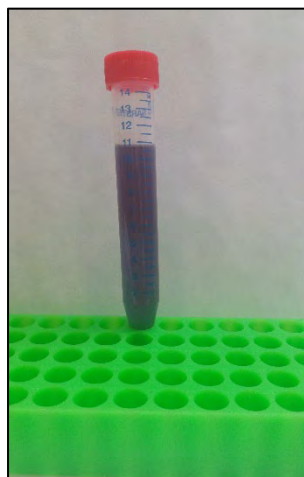
24 h

Rysunek 9. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant II (skład tabela 11)

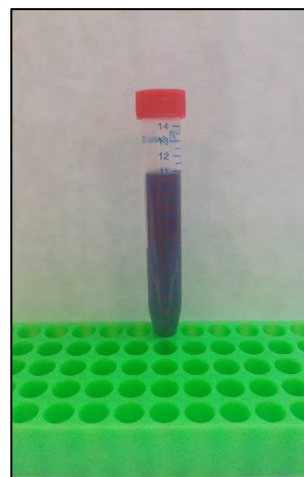
C_{Two} = całkowity czas wizualnej zmiany barwy (0, 30, 60, 120, 180, 240 minuta oraz 24 h)



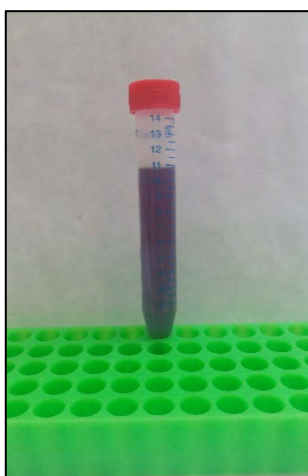
0 h



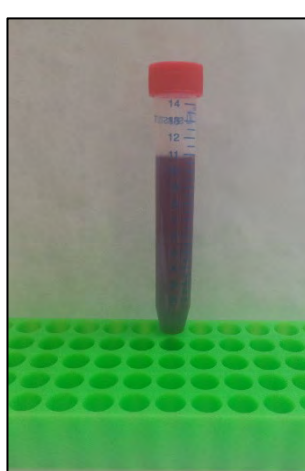
30 min



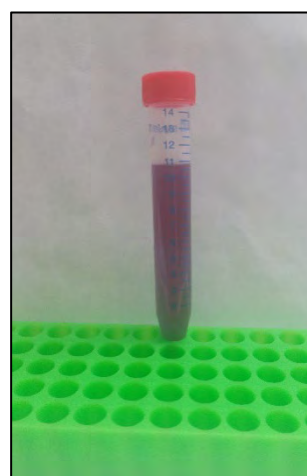
60 min



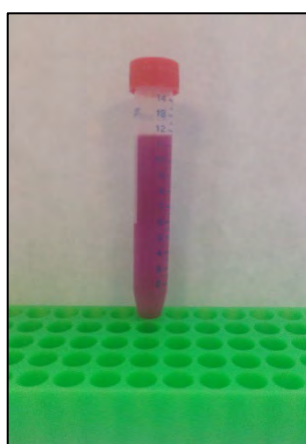
120 min



180 min



240 min



24 h

Rysunek 10. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant III (skład tabela 11)

C_{Two} = całkowity czas wizualnej zmiany barwy (0, 30, 60, 120, 180, 240 minuta oraz 24 h)

3. Badania z wykorzystaniem liofilizatu bakterii *Geobacillus stearotherophilus*

Przedmiotem badań były spory szczepu *Geobacillus stearotherophilus* (ATCC 7953), uzyskane w wyniku prowadzonych hodowli (etap 2 projektu – Raport R2). Komórki przetrwalników badanego szczepu testowano w formie liofilizatu (nośnik – tlenek krzemu). W celu wyznaczenia wpływu pożywki mikrobiologicznej (nr III – wytypowana w wyniku prac opisanych w raporcie R2) na szybkość procesu germinacji, założono doświadczenie polegające na określeniu dynamiki zmian następujących wyróżników:

- Ilości wydzielanego ATP [RLU] – pomiar luminometryczny
- Zmiany barwy wskaźnika red-ox (resazuryna) – pomiar spektrofotometryczny
- Dynamiki wzrostu (komórek wegetatywnych oraz generatywnych) – klasyczny posiew mikrobiologiczny
- Ocena wizualna zmiany barwy wskaźnika (resazuryna)

Uzyskane wyniki porównano z próbą kontrolną, którą była kompozycja składająca się z buforu PBS (Sigma Aldrich) oraz germinantów. Skład badanych komponentów zamieszczono w tabeli 12.

Tabela 12. Warianty pożywek użytych do testu.

Wariant	Czynnik	Ilość czynnika
I	ALANINA	100 mM
	GLUKOZA	10 mM
	FRUKTOZA	10 mM
	KCl	50 mM
	PBS	50% V
	Pożywka III	50% V
II	ALANINA	100 mM
	GLUKOZA	10 mM
	FRUKTOZA	10 mM
	KCl	50 mM
	PBS	100% V

Dodatkowo, w celu określenia wpływu procesu pasteryzacji oraz sterylizacji na inaktywację form wegetatywnych, zastosowano odpowiednią obróbkę termiczną. Parametry fizyczne procesu przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Parametry fizyczne zastosowane w doświadczeniu.

Parametr fizyczny	Pasteryzacja	Sterylizacja
Czas ekspozycji [min]	30	15
Temperatura [°C]	80	121
Ciśnienie [hPa]	-	0,1 MPa

3.1. Określenie dynamiki ilości uwalnianego ATP

Pomiar ilości ATP (Adenozyno-5'-trifosforan) wykonywano w oparciu o metodę bioluminescencji. W tym celu w określonych minutach hodowli (0', 30', 60', 120', 180', 240') pobierano 100 μ l próby, a następnie dodawano do niej 100 lub 200 μ l ATP Kit (BacTiter-Glo, PROMEGA). Tak przygotowaną próbę po ok. 5 minutach wkładano do aparatu LUMAC i odczytywano wynik w jednostkach RLU (RelativeLightUnits). Dla liofilizatu spor *Geobacillus stearotherophilus* stosowano równolegle dwa warianty pożywek, będących medium przyspieszającym proces germinacji (tabela 12).

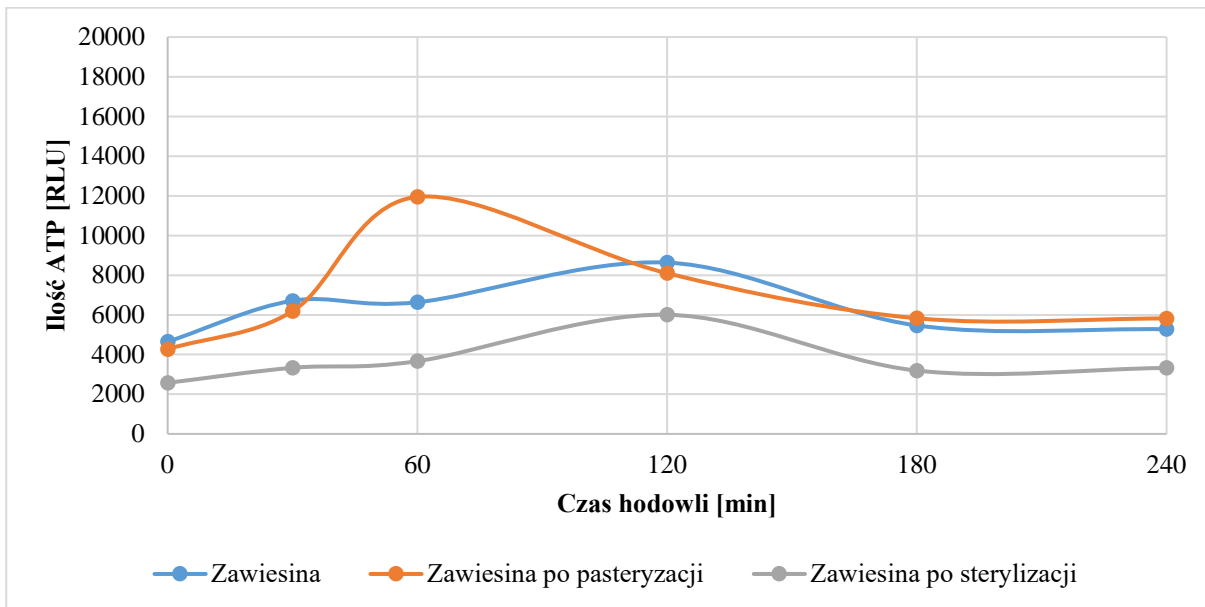
W tabeli 14 przedstawiono ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji w pierwszym wariantcie medium germinacyjnego (pożywka III + germinanty zawieszone w PBS, tabela 12). W każdym przypadku dwukrotnie większy dodatek odczynników (ATP-kit) (200 μ l) powodował lepszą odpowiedź układu pomiarowego (lepsza powtarzalność wyników), dlatego też w następnych doświadczeniach pozostano tylko przy tej wartości. Znaczący skok wartości ATP zauważono już po 30 minutach i utrzymał się on do 120 minuty (w przypadku proszku natywnego jak i poddanego pasteryzacji). W przypadku wysterylizowanego liofilizatu uzyskane wartości ATP były niskie, co świadczy o braku żywotności spor *Geobacillus stearotherophilus*.

Na rysunku 11, 12 i 13 przedstawiono graficzną formę wyników.

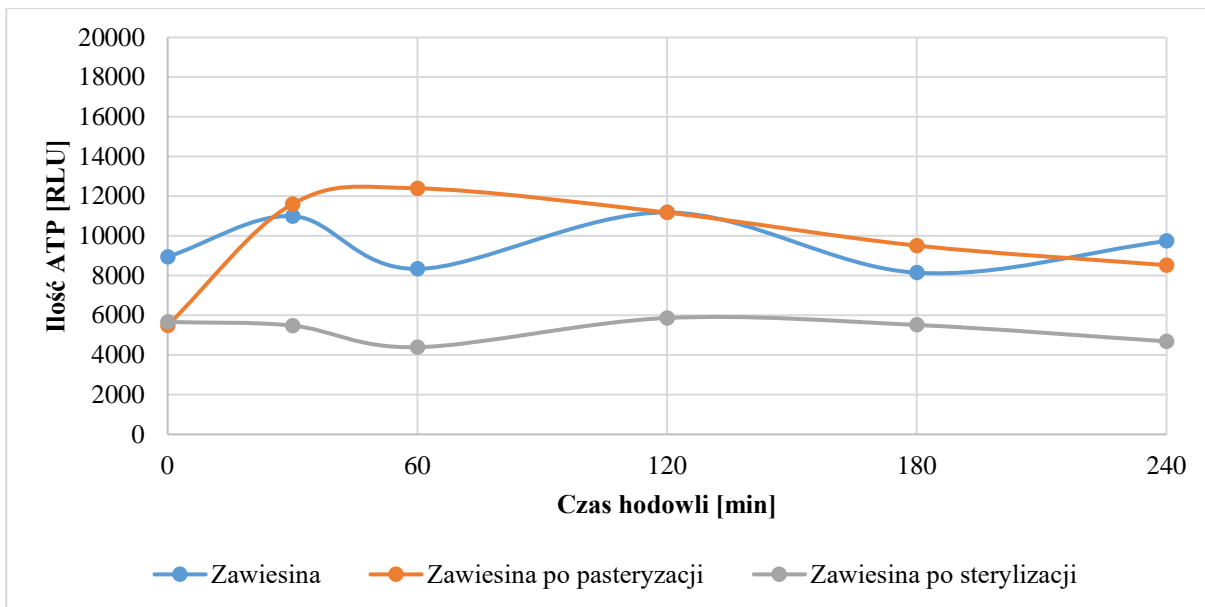
Tabela 14. Ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji –liofilizat, I wariant medium germinacyjnego.

Wariant I - Pożywka III + PBS + Germinanty													
		Ilość ATP [RLU]											
		Liofilizat				Proszek po pasteryzacji				Proszek po sterylizacji			
Czas hodowli [min]	Ilość Kitu [ul]	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia
Pożywka	100	1055	903	901	953	1055	903	901	953	1055	903	901	953
	200	2408	2417	2274	2366	2408	2417	2274	2366	2408	2417	2274	2366
0	100	4652	4664	4626	4647	4363	4221	4232	4272	2577	2555	2591	2574
	200	9087	8862	8889	8946	5462	5560	5454	5492	5540	5636	5815	5664
30	100	6878	6594	6654	6709	6241	6193	6111	6182	3505	3245	3245	3332
	200	11036	10974	10974	10995	11502	11706	11608	11605	5350	5538	5548	5479
60	100	6923	6592	6391	6635	12036	11994	11804	11945	3751	3641	3603	3665
	200	7854	8941	8214	8336	12545	12110	12540	12398	4521	4112	4545	4393
120	100	9196	8956	7747	8633	7839	8069	8385	8098	5844	5929	6242	6005
	200	11418	10881	11250	11183	11292	11061	11174	11176	5781	5964	5844	5863
180	100	5833	5438	5128	5466	6008	5673	5805	5829	3154	3249	3171	3191
	200	8171	8102	8162	8145	9381	9773	9379	9511	5606	5532	5397	5512
240	100	5354	5254	5216	5275	5973	5796	5685	5818	3281	3371	3323	3325
	200	9488	9808	9923	9740	8161	8565	8848	8525	4607	4679	4772	4686

Kolorem żółtym zaznaczono najlepsze wyniki



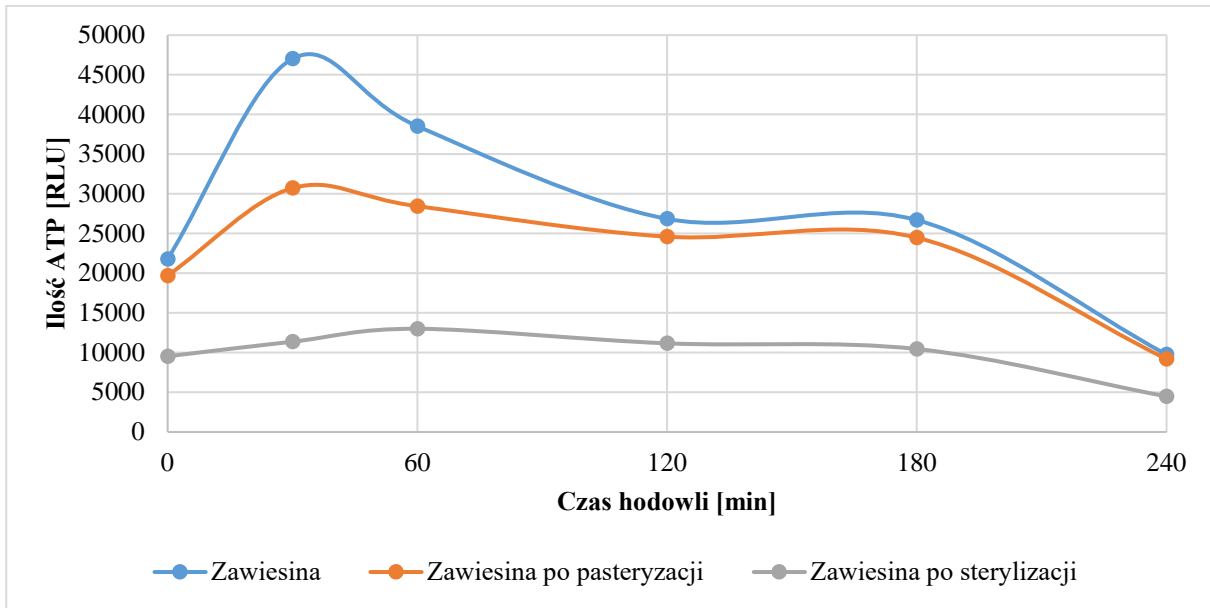
Rysunek 11. Dynamika wydzielania ATP [RLU] - 100 ul Kitu ATP.



Rysunek 12. Dynamika wydzielania ATP [RLU] - 200 ul Kitu ATP.

Tabela 15. Ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji – liofilizat, II wariant medium germinacyjnego.

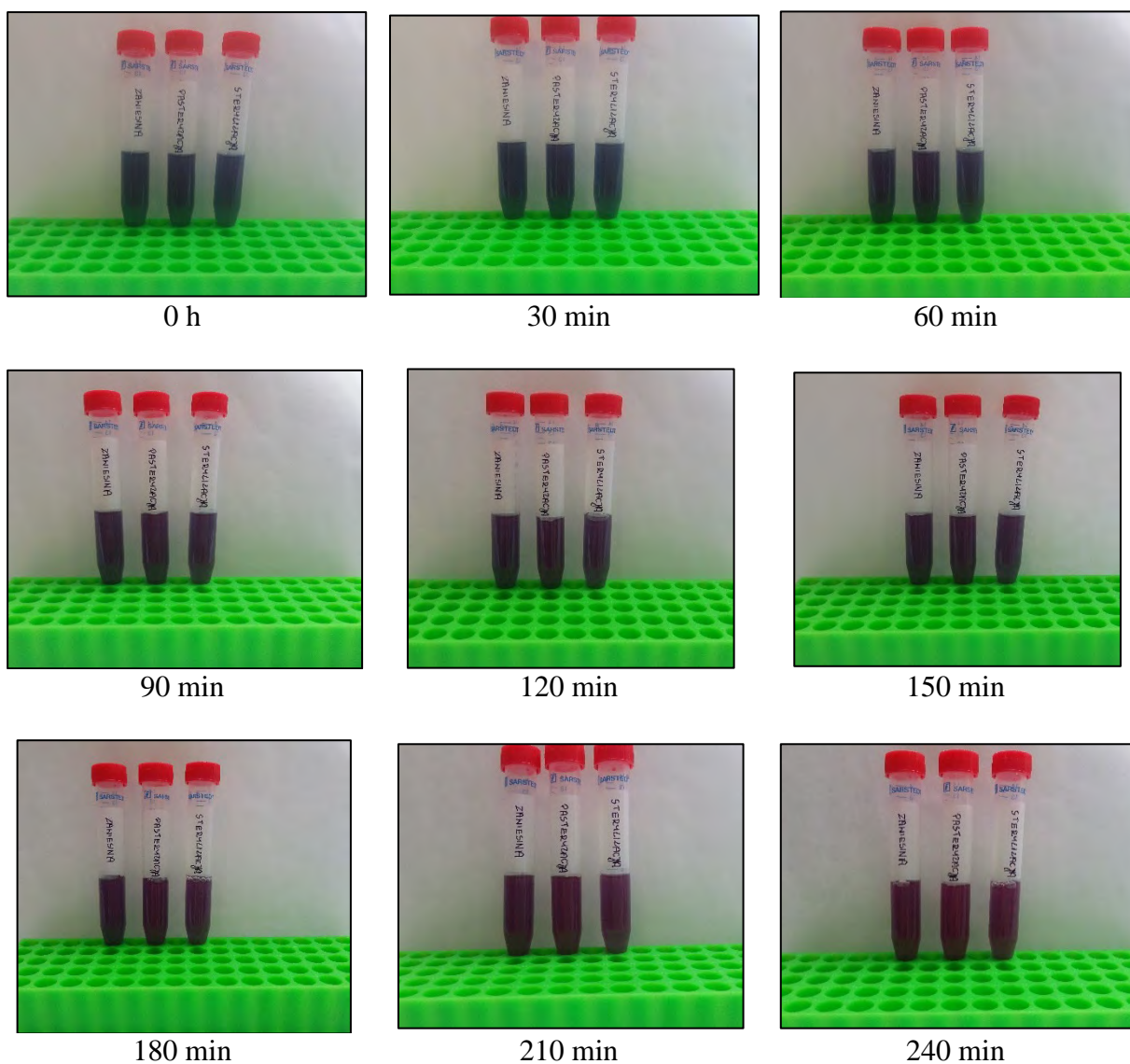
PBS + Germinanty													
		Ilość ATP [RLU]											
		Zawiesina				Zawiesina po pasteryzacji				Zawiesina po sterylizacji			
Czas hodowli [min]	Ilość Kitu [ul]	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia
Pożywka	200	38	29	44	37	38	29	44	37	38	29	44	37
0	200	23046	21488	20867	21800	19850	19740	19535	19708	9746	9469	9403	9539
30	200	51736	44463	44850	47016	31571	30753	29840	30721	11615	11488	11030	11378
60	200	39746	39178	36647	38524	28933	28252	28156	28447	13364	12786	12856	13002
120	200	27020	26859	26668	26849	24868	25158	23786	24604	11267	11128	11107	11167
180	200	27181	26469	26435	26695	24705	24875	23845	24475	10965	10347	10044	10452
240	200	9838	9727	9682	9749	9544	8942	9095	9194	4137	4424	4883	4481



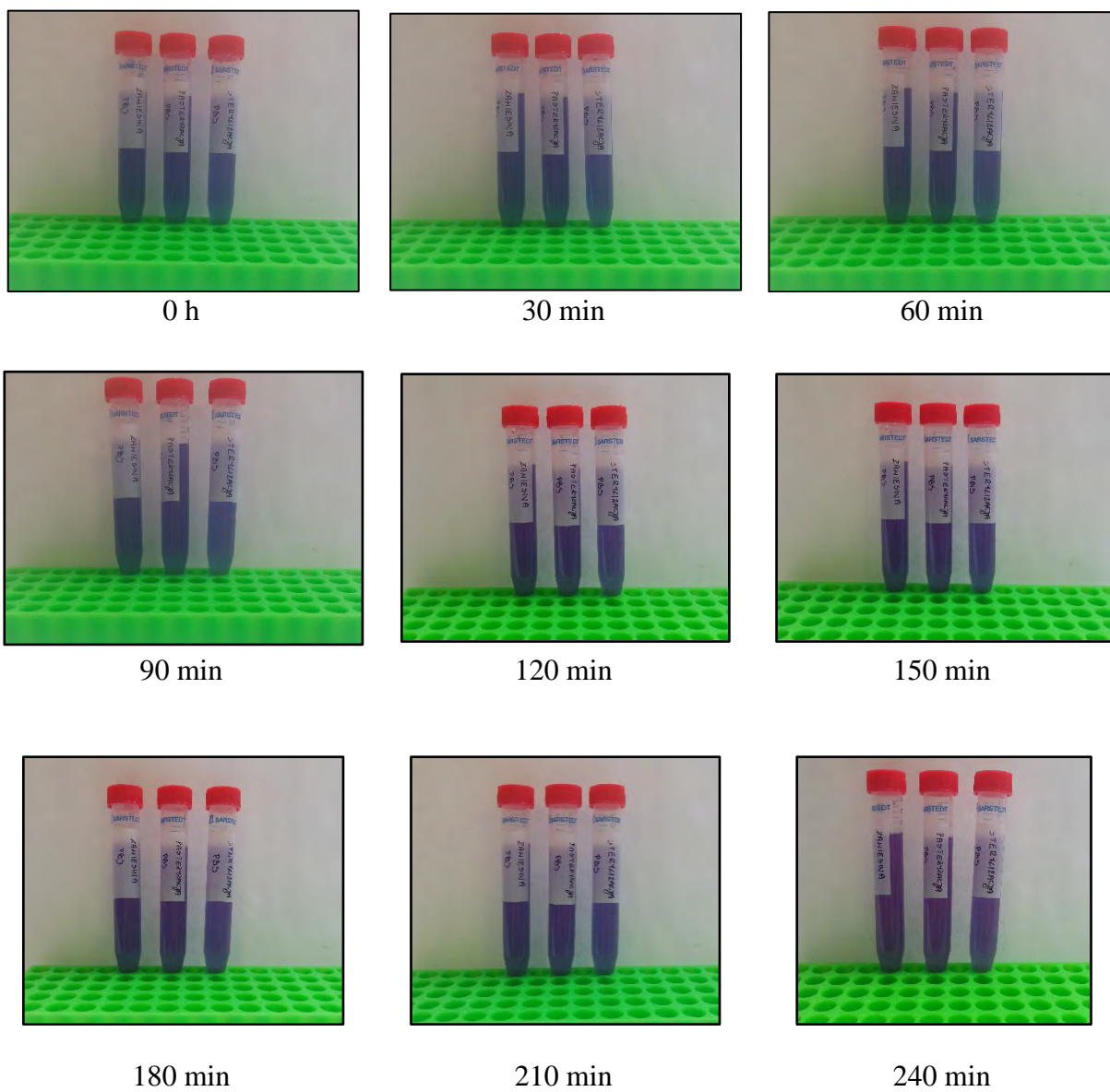
Rysunek 13. Dynamika wydzielania ATP [RLU] - 200 ul Kitu ATP.

3.2. Ocena wizualna zmiany barwy barwywskaźnika.

Tak jak w przypadku punktu 1.3, dla wariantów wyszczególnionych w tabeli 12 (zarówno dla wariantu pierwszego jak i drugiego) dokonano oceny zmiany barwy wskaźnika redoks w czasie trwania hodowli (0, 30, 60, 120, 180 i 240 minuta oraz 24 godzina). Pierwsze niewielkie zmiany barwy dla wariantu I widoczne były już w $C_{Two} = 60$ minut, natomiast wyraźne zmiany obserwowano w 120 minucie. Inna sytuacja miała miejsce w wariacie II (germinanty zawieszane w buforze bez dodatku pożywki). W tym przypadku zmiana barwy nastąpiła dopiero w 240 minucie. Świadczy to o konieczności stosowania pożywki mikrobiologicznej (wzbogaconej o wybrane germinanty) jako medium przyspieszające proces germinacji.



Rysunek 14. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant I (skład podłoży tabela 12)



Rysunek 15. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant II (skład podłoża tabela 12)

4. Spis literatury

1. Aouadhi C., Simonin H., Prévost H., de Lamballerie M., Maaroufi A., Mejri S.: Optimization of pressure induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk. *Food Microbiology* 30: 1-7, 2012.
2. Guisan J.M.: Immobilization of enzymes and cells. W: *Methods in biotechnology*, 2nd ed. (Ed. Walker J.M.), Humana Press, Totowa, USA.
3. Holmes P.F., Currie E.P.K., van der Mei H.C., Busscher H.J., Norde W.: Surface-modified nanoparticles as a new, versatile, and mechanically robust nanoadhesive coating: Suppression of protein adsorption and bacterial adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research, Part A*. 824-833, 2008.
4. Krzywicka H., Jakimiak B., Zarzycka E.: Wpływ podłoża wzrostowych na odzysk drobnoustrojów testowych poddanych działaniu pary wodnej w nadciśnieniu. *Roczniki PZH* 47(4): 439-444, 1996.
5. Porębska I, Sokołowska B., Woźniak Ł.: Dipicolinic acid release and the germination of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores under nutrient germinants. *Polish Journal of Microbiology* 66(1): 67-74, 2017.
6. Setlow B., Cowan A.E., Setlow P.: Germination of spores of *Bacillus subtilis* with dodecylamine. *Journal of Applied Microbiology* 95: 637-648, 2003.
7. Woodward J.: Methods for immobilization of microbial cells. *Journal of Microbiology Methods* 8(1-2): 91-102, 1988.

5. Spis tabel

Tabela 1. Germinanty stosowane w testach.	6
Tabela 2. Wpływ germinantów (aminokwasy i cukry) na proces germinacji.	8
Tabela 3. Wpływ jonów na proces germinacji.	8
Tabela 4. Wpływ germinantów (aminokwasy i cukry) na ilość wydzielanego ATP [RLU].	11
Tabela 5. Wpływ dodatku jonów na ilość wydzielanego ATP [RLU].	11
Tabela 6. Wartości absorbancji dla wybranych germinantów (cukry, aminokwasy)	13
Tabela 7. Wartości absorbancji dla wybranych germinantów (jony)	13
Tabela 8. Warianty stosowanych komponentów odżywczych użytych do testu studzienkowego.	15
Tabela 9. Warianty stosowanych komponentów odżywczych użytych do testu studzienkowego.	17
Tabela 10. Warianty stosowanych komponentów odżywczych użytych do testu studzienkowego.	19
Tabela 11. Warianty komponentów użytych do oceny dynamiki zmiany barwy.	21
Tabela 12. Warianty pożywek użytych do testu.	25
Tabela 13. Parametry fizyczne zastosowane w doświadczeniu.	26
Tabela 14. Ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji – liofilizat, I wariant medium germinacyjnego.	28
Tabela 15. Ilość ATP uwalnianego w czasie procesu germinacji – liofilizat, II wariant medium germinacyjnego.	30

6. Spis rysunków.

Rysunek 1. Wpływ dodatku czynnika odżywczego(aminokwasy, cukry) na proces germinacji.....	9
Rysunek 2. Wpływ dodatku jonów na proces germinacji.	9
Rysunek 3. Wpływ dodatku czynnika odżywczego (aminokwasy, cukry) na ilość uwalnianego ATP.12	
Rysunek 4. Wpływ dodatku jonów na ilość uwalnianego ATP.	12
Rysunek 5. Ocena przydatności wskaźnika – resazuryny do wyznaczenia aktywności dehydrogenaz (I tura).	16
Rysunek 6. Ocena przydatności wskaźnika – resazuryny do wyznaczenia aktywności dehydrogenaz (II tura).	18
Rysunek 7 .Ocena przydatności wskaźnika – resazuryny do wyznaczenia aktywności dehydrogenaz (III tura).	20
Rysunek 8. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant I (skład tabela 11).....	22
Rysunek 9. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant II (skład tabela 11).....	23
Rysunek 10. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant III (skład tabela 11)	24
Rysunek 11. Dynamika wydzielania ATP [RLU] - 100 ul Kitu ATP.....	29
Rysunek 12. Dynamika wydzielania ATP [RLU] - 200 ul Kitu ATP.....	29
Rysunek 13. Dynamika wydzielania ATP [RLU] - 200 ul Kitu ATP.....	31
Rysunek 14. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant I (skład podłoży tabela 12)	32
Rysunek 15. Dynamika zmiany barwy wskaźnika (resazuryna) – wariant II (skład podłoży tabela 12)	33



Sprawozdanie roczne

D/2017

R/7

Raport ze specyfikacją
biologicznych parametrów metod
umożliwiających opracowanie
skutecznych wskaźników
biologicznych

CZEŚĆ I

Raport cząstkowy R/7

Wykorzystanie metody bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Przygotowanie hodowli *Geobacillus stearothermophilus* w skali półtechnicznej w celu badań metodycznych i przechowalniczych
- Wykorzystanie metody bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej
- Stymulacje warunków zbliżonych do rzeczywistych z walidacją procesów zachodzących w urządzeniach podczas sterylizacji parowej i plazmowej
- Badania nad określeniem warunków przechowywania i transportu wskaźników biologicznych
- Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom w warunkach zbliżonych do rzeczywistych, przeprowadzonych na urządzeniach do sterylizacji różnych producentów

Spis treści

1. Testy przechowalnicze	4
1.1. Wpływ warunków oraz czasu przechowywania komponentów medium germinacyjnego na ich skuteczność germinacji spor	7
1.2. Wpływ warunków oraz czasu przechowywania komercyjnych kitów ATP na czułość oznaczenia	11
1.3. Wpływ warunków, czasu przechowywania oraz sposobu przygotowania wskaźnika redoks (roztwór resazuryny) na jego czułość oznaczenia	19
1.3.1. Test I	19
1.3.2. Test II	24
2. Badania symulacyjne	30
2.1. Sterylizacja plazmowa	30
2.2. Sterylizacja parowa	35
3. Produkcja spor	39
4. Spis literatury	43

1. Testy przechowalnicze

Zgodnie z harmonogramem prac etapu 2, w czwartym kwartale 2017 roku kontynuowano badania przechowalnicze nad trwałością wytworzonych wskaźników. Przechowywaniu poddano poszczególne komponenty składające się na medium germinacyjne oraz substraty, kity i wskaźniki niezbędne do skutecznej oceny szybkości procesu germinacji spor.

Wykaz przechowywanych substancji chemicznych przedstawiono w tabeli 1. Testom przechowalniczym poddano komercyjny KIT do pomiaru ilości ATP (firma PROMEGA). Kit ten przechowywano w temperaturze -20°C, 4°C oraz 21°C. W każdej z wyżej wymienionych temperatur testowane były kity pod dwoma postaciami: w formie gotowego roztworu oraz w formie dwóch składowych – buforu (G819A) oraz proszku (G818A). W tym ostatnim przypadku proszek został zawieszony w buforze dopiero w dniu wykonywania oznaczeń.

Przechowywaniu poddano także Resazurynę : komercyjny kit, który przechowywany był bez dostępu światła w temperaturze 4°C oraz roztwór resazuryny (w buforze Dulbecco's). Roztwór ten przechowywano w dwóch temperaturach 4°C oraz 21°C (z i bez dostępu światła).

Testy przechowalnicze zaplanowano także dla wytypowanego w poprzednich pracach medium germinacyjnego. Doświadczeniom poddano zarówno same pożywki mikrobiologiczne (III, VI oraz VII), germinanty (aminokwasy) jak i gotowe, złożone medium germinacyjne. Roztwory te przechowywano w temperaturze 4 °C i 21 °C (tabela 2).

Wyżej wymienione substancje poddano zarówno ocenie jakościowej jak i ilościowej.

Tabela 1. Wykaz substancji chemicznych, poddanych testom przechowalniczym.



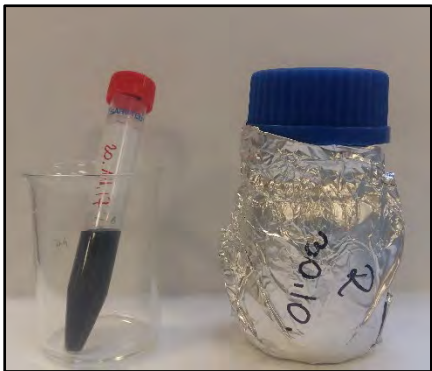
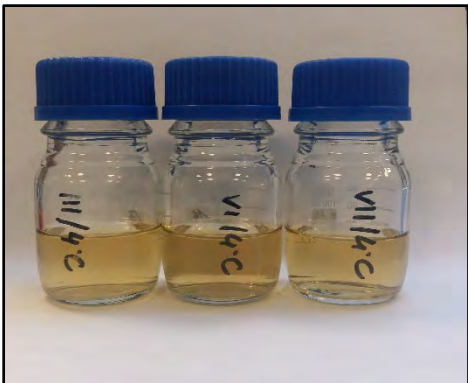

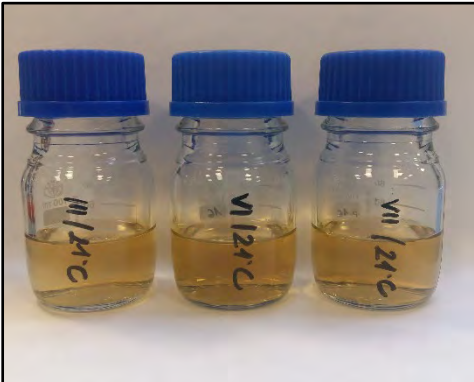
KIT ATP	
	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura -20°C : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bufor ▪ Proszek ▪ Roztwór • Temperatura 4°C : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bufor ▪ Proszek ▪ Roztwór • Temperatura 21 °C : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Bufor ▪ Proszek ▪ Roztwór
Resazuryna	
	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura 4 °C : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Komercyjny KIT
	<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura 4 °C : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proszek + Dulbecco (bez dostępu światła) ▪ Proszek + Dulbecco • Temperatura 21 °C : <ul style="list-style-type: none"> ▪ Proszek + Dulbecco (bez dostępu światła) ▪ Proszek + Dulbecco

Tabela 2. Wykaz substancji chemicznych, poddanych testom przechowalniczym.

Pożywka	
	<ul style="list-style-type: none"> • Pożywka III, VI i VII <ul style="list-style-type: none"> ▪ Temperatura 4 °C ▪ Temperatura 21 °C
Germinanty	
	<ul style="list-style-type: none"> • L-Alanina i L-Asparagina <ul style="list-style-type: none"> ▪ Temperatura 4 °C ▪ Temperatura 21 °C
Pożywka + Germinanty (medium germinacyjne)	
	<ul style="list-style-type: none"> • Pożywka III, VI i VII + Germinanty (L-ALA i L-ASP) <ul style="list-style-type: none"> ▪ Temperatura 4 °C ▪ Temperatura 21 °C

1.1. Wpływ warunków oraz czasu przechowywania komponentów medium germinacyjnego na ich skuteczność germinacji spor

Zgodnie z normą EN 12322, pożywki mikrobiologiczne powinny być badane pod kątem zanieczyszczeń mikrobiologicznych. Norma EN 12322 nie precyzuje jednak ile pożywek należy poddać kontroli jałowości. Dlatego też ocenę jałowości przeprowadzono, inkubując pożywki w różnych temperaturach przez określony okres czasu. Temperatury dobrano w odniesieniu do typowych warunków przechowalniczych (4°C – temperatura chłodnicza i 21°C – temperatura pokojowa). Kontrolę jałowości przeprowadzono klasyczną metodą ilościową – za pomocą posiewu mikrobiologicznego. Stosowaną pożywką był Trypton Soy Broth (TSB, Oxoid), natomiast warunki inkubacji to 48 godzin/37°C. Prace przechowalnicze rozpoczęto **05.10.2017**.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki otrzymane podczas posiewów mikrobiologicznych. W każdym przypadku (zarówno w pożywkach jak i pełnych komponentach medium germinacyjnego) nie zaobserwowano skażenia mikrobiologicznego. Ponadto nie wykazano wpływu temperatury przechowywania na stan mikrobiologiczny pożywek.

W ciągu 6-miesięcznego okresu przechowywania nie stwierdzono skażenia mikrobiologicznego komponentów pożywek i germinantów stosowanych w badaniach.

Tabela 3. Stan mikrobiologiczny pożywek i poszczególnych ich komponentów, w trakcie przechowywania

Rodzaj badanego roztworu	Temperatura przechowywania	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]									
		Data oznaczenia									
		05.10	26.10	02.11	09.11	16.11	30.11	14.12	08.01	05.02	14.03
Pożywka III	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
Pożywka VI	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
Pożywka VII	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
L-Alanina	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
L-Asparagina	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
Pożywka III + L-ALA + L-ASP	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
Pożywka VI + L-ALA + L-ASP	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
Pożywka VII + L-ALA + L-ASP	4°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o
	21°C	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o	n/o

n/o - nieobecne

Wyszczególnione w tabeli 3 określone komponenty medium poddano także kontroli właściwości biochemicznych w odniesieniu możliwości ich wykorzystania w stosownych testach. Do takiej oceny pożywek wpływających na szybkość procesu germinacji wykorzystano metodę ilościową oraz jakościową.

W przypadku metody ilościowej, badano potencjał biochemiczny poszczególnych pożywek wykorzystując metodę oznaczania ilości ATP, natomiast przy metodzie jakościowej oceniano (wizualnie) skuteczność zastosowania resazuryiny jako wskaźnika redox.

Szczegółowe wyniki przedstawiono w punkcie 1.2 i 1.3 niniejszego raportu (R/7). Zarówno pożywki (III, VI i VII), germinanty (Alanina i Asparagina) jak ich mieszaniny przechowywane były w 4°C i 21°C. W tabeli 4 wyszczególniono okres, w którym do określenia wpływu warunków oraz czasu przechowywania komercyjnych kitów ATP czy wskaźnika redoks wykorzystano właśnie te komponenty. Plusem zaznaczono komponent, który został wzięty w danym terminie do badań, natomiast minusem ten który nie był użyty.

Wyniki pokazały, że za każdym razem oprócz tego, że komponenty te były czyste pod kątem mikrobiologicznym to także spełniały wymagania stawiane im pod względem jakościowym (spełniając kryterium medium germinacyjnego).

Tabela 4. Potencjał biochemiczny pożywek i poszczególnych ich komponentów, zastosowanych w oznaczeniach ATP i skuteczność resazuryiny jako wskaźnika redox

Rodzaj badanego roztworu	Temperatura przechowywania	Potencjał biochemiczny					
		Czas oznaczenia (od czasu założenia doświadczenia)					
		Po 1 dniu	Po 1 tygodniu	Po 1 miesiącu	Po 2 miesiącach	Po 3 miesiącach	Po 6 miesiącach
Pożywka III	4°C	-	-	+	+	+	+
	21°C	+	+	-	-	-	-
Pożywka VI	4°C	-	-	+	+	-	-
	21°C	+	+	-	-	-	-
Pożywka VII	4°C	-	-	+	+	-	-
	21°C	+	+	-	-	-	-
L-Alanina	4°C	-	-	+	+	+	+
	21°C	+	+	-	-	-	-
L-Asparagina	4°C	-	-	+	+	+	+
	21°C	+	+	-	-	-	-
Pożywka III + L-ALA + L-ASP	4°C	-	-	+	+	+	+
	21°C	+	+	-	-	-	-
Pożywka VI + L-ALA + L-ASP	4°C	-	-	+	+	-	-
	21°C	+	+	-	-	-	-
Pożywka VII + L-ALA + L-ASP	4°C	-	-	+	+	-	-
	21°C	+	+	-	-	-	-

Legenda:

+ wykonanie badań

1.2. Wpływ warunków oraz czasu przechowywania komercyjnych kitów ATP na czułość oznaczenia

W tabeli 5 przedstawiono zmienne eksperymentalne użyte do oceny wpływu warunków oraz czasu przechowywania komercyjnych kitów ATP na czułość oznaczenia. Parametrami tymi była **temperatura, forma przechowywanego kitu oraz wiek spor**.

Pod nazwą „wiek spor” rozumie się czas ich przechowywania od momentu produkcji. Sporami świeżymi nazwano spory otrzymane w wyniku prac hodowlanych w 4 kwartale 2017r (1 tygodniowe spory), natomiast spory stare to te, uzyskane w lutym 2017 roku (9 miesięczne spory). Mimo iż w dostępnej literaturze jest bardzo mało informacji na temat roli wieku spor na ich szybkość germinacji, to jednak niektórzy Autorzy zauważyli wpływ tego parametru na efektywność dezaktywacji przetrwalników (Bomar, 1961; Rodriguez-Palacios i wsp., 2011; Egan i wsp., 2016).

Tabela 5. Zmienne eksperymentalne.

Temperatura przechowywania
-20°C
4°C
21°C
Rodzaj materiału
Bufor + proszek
Roztwór
Wiek spor
Spory świeże (2 tygodnie od czasu produkcji)
Spory stare (wyhodowane 6 miesięcy wcześniej)

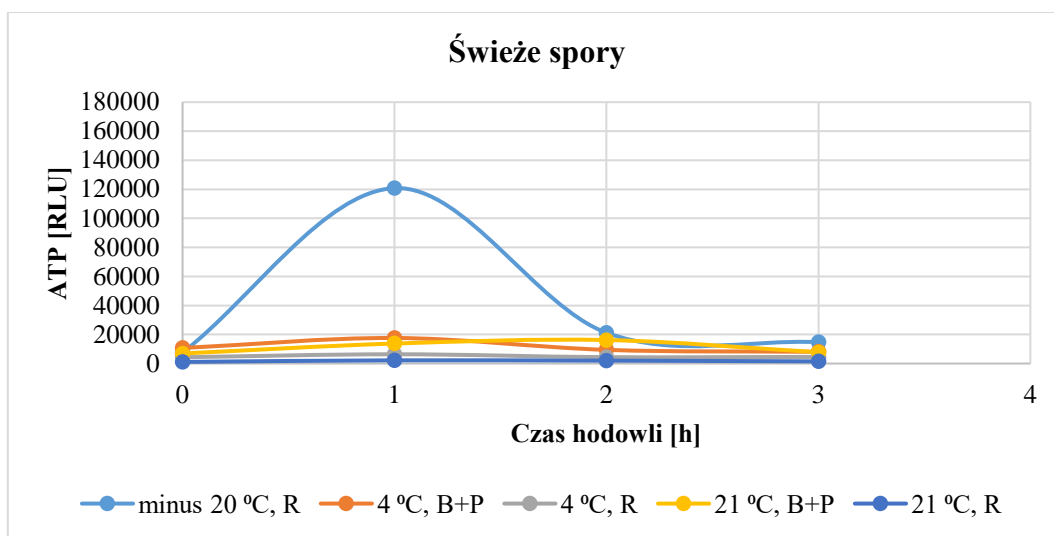
W tabeli 6 przedstawiono uśrednione wyniki (średnia z 3 powtórzeń) pomiaru ilości ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych. Zarówno dla spor starych jak i świeżych **największy przyrost ilości ATP zaobserwowano dla gotowego Kitu przechowywanego według zaleceń producenta (temperatura -20°C)**. Wraz ze wzrostem temperatury przechowywania kitu (bez względu na to czy kit był w postaci gotowego roztworu czy też przechowywanego bez wcześniejszej rehydratacji), jego czułość malała.

Hodowle prowadzono w medium germinacyjnym, zawierającym pożywkę III oraz wyselekcjonowane germinanty (temperatura 55°C). Poniższe wyniki potwierdziły wnioski uzyskane w Raporcie R/5 i R/6, że w większości przypadków największy przyrost ilości ATP uzyskuje się w 1 godzinie hodowli.

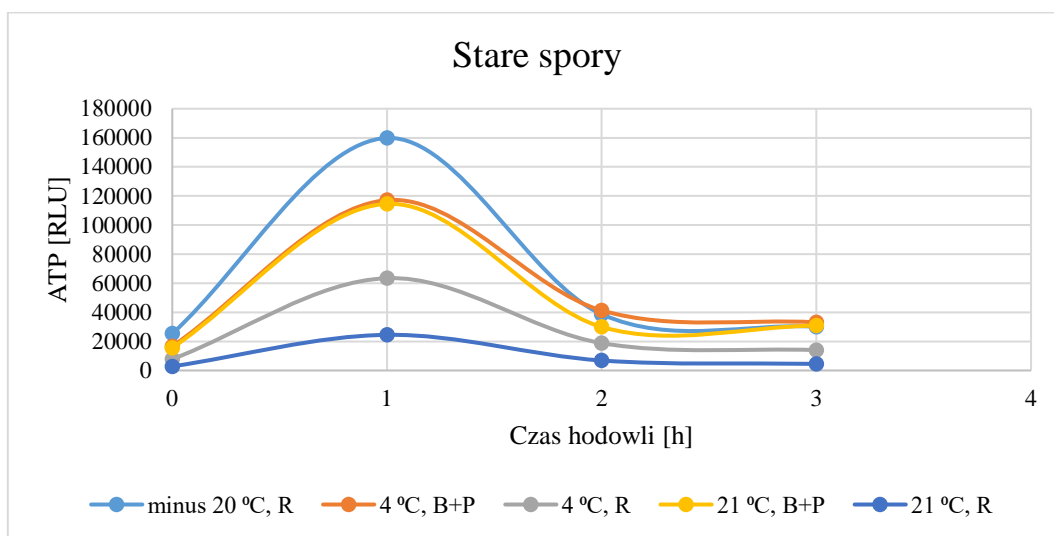
Tabela 6. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych (wyniki uśrednione, średnia z 3 powtórzeń)

	Temperatura przechowywania	Temperatura -20 °C	Temperatura 4 °C		Temperatura 21 °C	
	Rodzaj materiału	Roztwór	Bufor + proszek	Roztwór	Bufor + proszek	Roztwór
	Czas hodowli	Ilość ATP [RLU]				
Świeże spory	0 h	7455	10703	4343	6924	1120
	1 h	120792	17590	6375	13766	2203
	2 h	21201	9406	4378	16173	1985
	3 h	14704	8066	4558	7793	1496
Spory stare	0 h	25308	16619	7809	15590	2832
	1 h	159867	117114	63470	114572	24508
	2 h	38673	41295	18813	29932	6852
	3 h	30092	33105	14035	30834	4533

Opisane wyniki przedstawiono w formie graficznej na wykresach 1 i 2.



Wykres 1. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania (R – kit przechowywany w postaci gotowego roztworu; B+R – bufor i proszek zmieszany krótko przed wykonaniem testu) – dla spor świeżych.



Wykres 2. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania (R – kit przechowywany w postaci gotowego roztworu; B+R – bufor i proszek zmieszany krótko przed wykonaniem testu) – dla spor starych.

Potencjał biochemiczny przechowywanych (w odpowiednich warunkach) kitów ATP oceniano także po 1, 2, 3 oraz po 6 miesiącach. Ich czułość oznaczenia mierzono dla układu: medium germinacyjne (pożywka III + germinanty) + spory („stare”). Układ ten inkubowano w termostacie w 55°C przez okres 120 min. W 0 min, 30 min i 120 min pobierano 200 µl próby, a następnie dodawano do niej w stosunku 1:1 odpowiedni wariant kitu (dla kitów przechowywanych przez okres 3 i 6 miesięcy próby rozszerzono o pomiar w 60 minucie inkubacji). Pomiar ilości jednostek świetlnych [RLU] dokonywano na urządzeniu LUMAC.

Warianty przechowalnicze stanowiły dwa rodzaje kitów: w postaci mieszaniny (proszku zawierającego kompleks lucyferyna/luceferaza i bufor) oraz wyżej wymienionych składowych przechowywanych (na czas trwania testów przechowalniczych) oddzielnie i mieszanych ze sobą w dniu analizy. Tak jak w poprzednim doświadczeniu, badano wpływ temperatury przechowywania kitów na ich czułość oznaczenia.

Wyniki przedstawiono w tabelach 7-9 oraz na wykresach 3-5. **Uzyskane wartości RLU świadczą o spadającej wraz z upływem czasu stabilności stosowanych do oznaczeń ATP komercyjnych kitów.** Najlepszą temperaturą przechowywania było -20°C. Jest to zgodne z zaleceniami producenta odczynników (firma Promega). Takie warunki powinny być też zapewnione w trakcie przechowywania półproduktu w warunkach produkcyjnych, transportu wskaźników biologicznych oraz docelowo u odbiorcy testów. Nie zauważono natomiast znaczących różnic co do rodzaju przechowywanego materiału (dla tej temperatury). Przechowywanie testów do oznaczeń ATP w warunkach chłodniczych (4°C) wykazało, że wymagany poziom czułości odczytu (powyżej 50000 RLU) uzyskano tylko po 1 miesiącu przechowywania. Po 2 miesiącach przechowywania w temperaturze chłodniczej uzyskano pomiary na poziomie 35000-40000 RLU (tabela 7).

Tabela 7. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych – czas oznaczenia po 2 miesiącach przechowywania kitów.

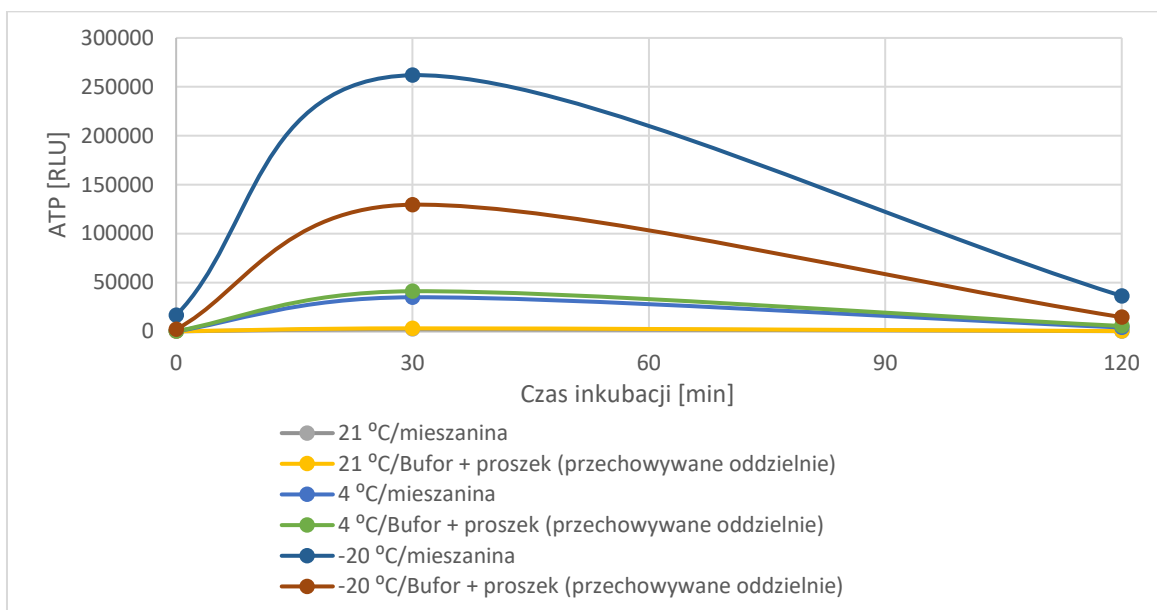
Nr	Temperatura	Rodzaj przechowywanego materiału	0 min				30 min				120 min					
			I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia		
			1 miesiąc przechowywania													
1	21 °C	21 °C/mieszanina	141	125	139	135	1254	1458	1379	1364	290	254	373	306		
2		21 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	180	201	196	192	2154	2785	2933	2624	456	417	470	448		
3	4 °C	4 °C/mieszanina	398	402	318	373	55477	54652	56987	55705	2900	2978	2865	2914		
4		4 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	425	436	419	427	58741	59632	59321	59231	5124	4954	5017	5032		
5	-20 °C	-20 °C/mieszanina	11874	12569	12987	12477	267850	264441	261132	264474	40145	41254	42698	41366		
6		-20 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	10456	12541	11987	11661	154786	165410	169870	163355	18563	18741	19015	18773		
			2 miesiące przechowywania													
1	21 °C	21 °C/mieszanina	155	161	159	158	2308	2412	2572	2431	376	356	342	358		
2		21 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	229	231	225	228	3205	3346	3315	3289	511	512	501	508		
3	4 °C	4 °C/mieszanina	433	419	410	421	34684	35382	35022	35029	4168	4135	4042	4115		
4		4 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	475	504	530	503	39516	41808	42217	41180	5704	5815	5491	5670		
5	-20 °C	-20 °C/mieszanina	16750	16740	16580	16690	259208	257975	268486	261890	36190	36394	36559	36381		
6		-20 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	2179	2239	2411	2276	127629	130074	131130	129611	14801	14485	14773	14686		

Tabela 8. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych – czas oznaczenia po 3 miesiącach przechowywania kitów.

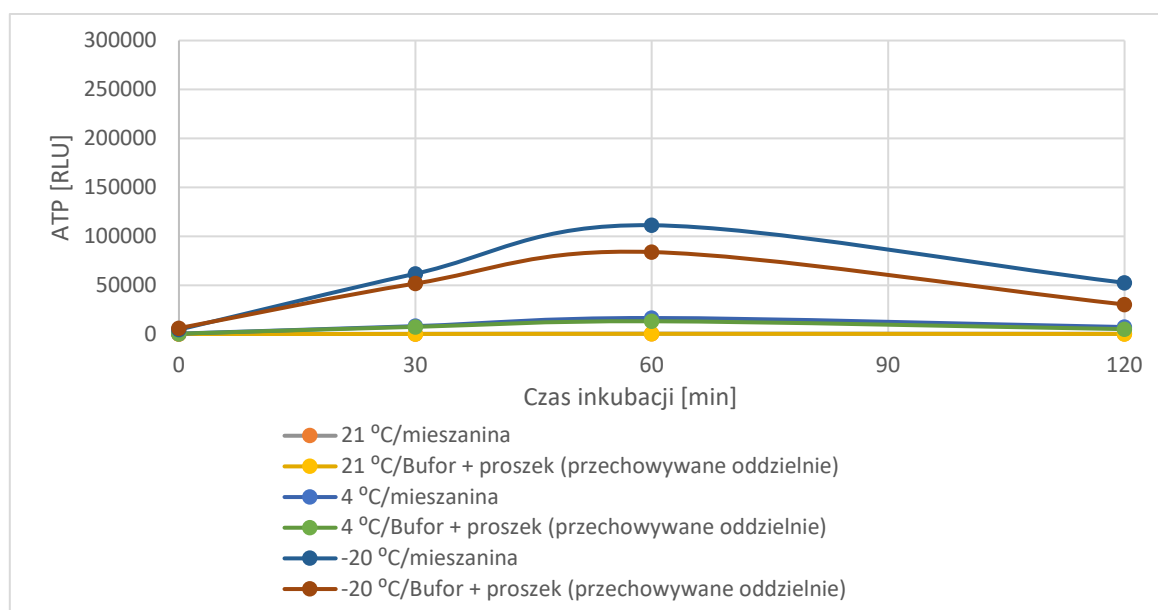
Nr	Temperatura	Rodzaj przechowywanego materiału	0 min				30 min				60 min				120 min			
			I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia
1	21 °C	21 °C/mieszanina	144	166	171	160	317	319	317	318	500	564	572	545	337	338	340	338
2		21 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	37	54	63	51	211	219	212	214	334	339	360	344	225	225	218	223
3	4 °C	4 °C/mieszanina	543	567	561	557	7855	8326	8383	8188	15513	16857	17122	16497	8383	6761	6709	7284
4		4 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	453	450	453	452	7339	7393	7580	7437	13373	13336	12758	13156	5150	5139	5117	5135
5	-20 °C	-20 °C/mieszanina	4602	4676	4617	4632	61578	61377	62278	61744	110253	112346	111254	111284	51821	52848	52734	52468
6		-20 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	5727	6314	6394	6145	51860	52011	51253	51708	80386	84690	86591	83889	25525	32297	33072	30298

Tabela 9. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych – czas oznaczenia po 6 miesiącach przechowywania kitów.

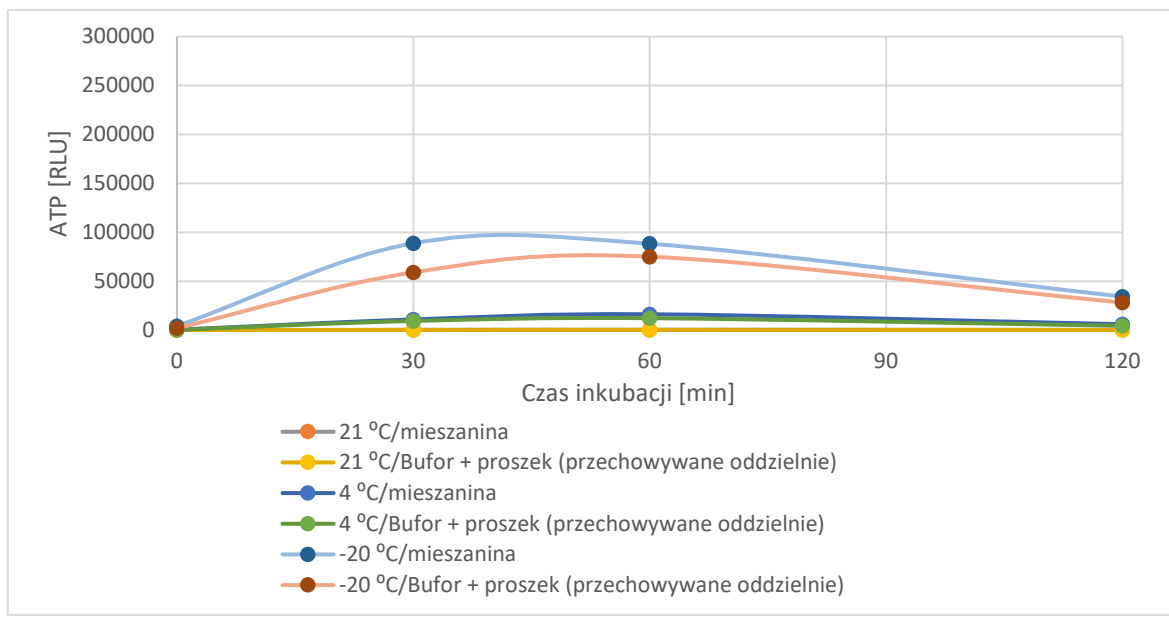
Nr	Temperatura	Rodzaj przechowywanego materiału	0 min				30 min				60 min				120 min			
			I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia	I	II	III	Średnia
1	21 °C	21 °C/mieszanina	105	95	79	93	404	400	404	403	503	501	479	494	388	388	374	383
2		21 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	42	55	57	51	258	252	262	257	342	350	355	349	141	176	211	176
3	4 °C	4 °C/mieszanina	514	501	513	509	10743	10899	11196	10946	16294	16126	16416	16279	6088	6065	6102	6085
4		4 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	426	419	420	422	8983	9490	9838	9437	12532	12066	12203	12267	4369	4498	4524	4464
5	-20 °C	-20 °C/mieszanina	3922	4427	4400	4250	86026	89872	90417	88772	91194	84511	89458	88388	33182	34407	35374	34321
6		-20 °C/Bufor + proszek (przechowywane oddzielnie)	2057	2271	1826	2051	54943	60767	61553	59088	74503	75317	75486	75102	28365	23741	32465	28190



Wykres 3. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania - czas oznaczenia po 2 miesiącach przechowywania kitów



Wykres 4. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania - czas oznaczenia po 3 miesiącach przechowywania kitów



Wykres 5. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania - czas oznaczenia po 6 miesiącach przechowywania kitów

1.3. Wpływ warunków, czasu przechowywania oraz sposobu przygotowania wskaźnika redoks (roztwór resazuryny) na jego czułość oznaczenia

1.3.1. Test I

Testom przechowalniczym poddano także wskaźnik Redoks. Badane roztwory resazuryny testowane były w postaci komercyjnego kitu (Sigma) oraz składane zgodnie z metodyką opisaną w publikacji Bowling. i wsp., 2012. Resazurynę kit przechowywano w temperaturze 4°C (zgodnie z zaleceniami producenta), natomiast resazurynę „składaną” zarówno w temperaturze 4°C jak i 21°C. Dodatkowo, wskaźnik ten w temperaturze pokojowej przechowywano w ciemności i w świetle. Skład oraz możliwość wykorzystania roztworu resazuryny (nie komercyjnego kitu) zaczerpnięto z publikacji Nagler i wsp., 2014.

Badany materiał stanowiły spory uzyskane w wyniku hodowli wykonanych w kwietniu 2017r (spory „stare”) (karty fermentacji Raport D/2016 R/1) oraz w listopadzie 2017r (spory „świeże”) (Karty fermentacji Raport D/2017 R/7). Dodatkowo, zarówno spory „stare” jak i „świeże” poddane zostały liofilizacji, a następnie przebadane.

Badanie polegało na ocenie **wizualnej zmiany barwy**. W tym celu wykonano **test studzienkowy**, polegający na nanoszeniu do płytek wielodołkowych 200 µl hodowli (układ: pożywka + germinanty + spory). Układ ten wcześniej poddany był **wstępnej inkubacji** (w temperaturze 55°C) - do dołków nanoszono odpowiednio: 0, 1, 2, 3 i 4 – godziną hodowlę. Hodowle prowadzono na zmodyfikowanej pożywce III (Krzywicka i wsp., 1996, raport R2). Inoculum (spory *Geococcus stearothermophilus*) stanowiło 10 % całkowitej objętości hodowli.

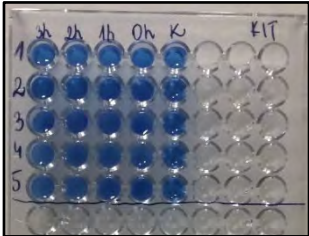
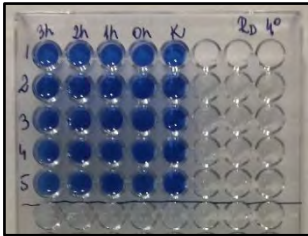
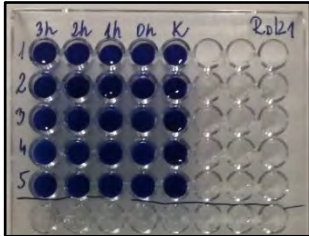
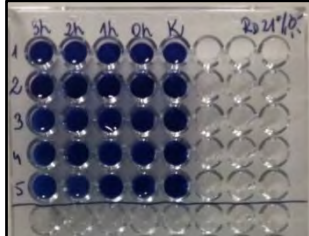
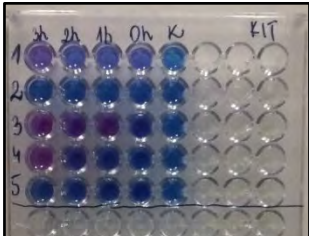
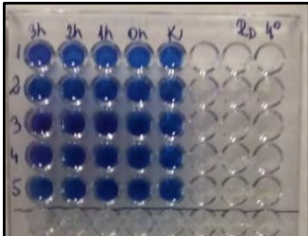
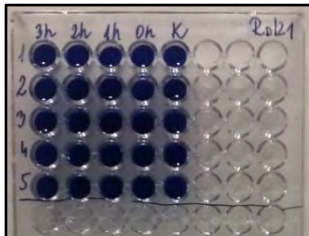
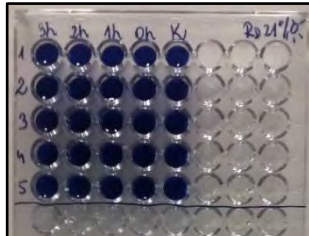
Ocenę testu studzienkowego dokonywano, dodając do dołków (zawierających odpowiednie hodowle – 5 wariantów) 20 µl **wskaźnika redoks – resazurynę**. W wyżej opisywanym doświadczeniu wykorzystywano 3 warianty wskaźnika – w każdym przypadku była to resazuryna rozpuszczona w buforze Dulbecco’s, jednak przechowywane były one w różnych wariantach (w temperaturze 4°C oraz 21°C). Jako kontrolę zastosowano komercyjny KIT. Ocenę zmiany barwy resazuryny (z fioletowej na różową) dokonywano przez 90 minut (w odstępnie 30 minut). Płytki inkubowano w temperaturze 55°C, a wynik obserwacji przedstawiono w tabeli 11-12. Na zdjęciach kolorem czerwonym wyróżniono tzw. **czas T_{wo}** - **czas wizualnej oceny**, który obejmował czas zmiany barwy liczony po dodaniu wskaźnika.

Całkowity czas potrzebny na uzyskanie reakcji barwnej był sumą czasu wstępnej inkubacji oraz czasu T_{wo} .

Tabela 10. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.

Nr dolka (pion)	Oznaczenie
1	Zawiesina – spory „stare”
2	Zawiesina – spory „świeże”
3	Liofilizat – spory „stare”
4	Liofilizat– spory „świeże”
5	Liofilizat – spory „stare” po 3-krotnej sterylizacji
Nr dolka (poziom)	Oznaczenie
3 h	Czas hodowli (przed dodaniem resazuryny)
2 h	
1 h	
0 h	
K	Kontrola (bez spor)

Tabela 11. Dynamika zmiany barwy resazury w przechowywaniu w różnych warunkach temperatury.

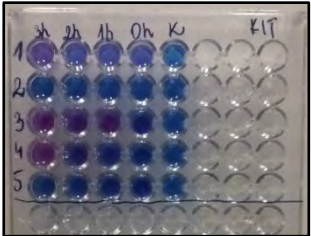
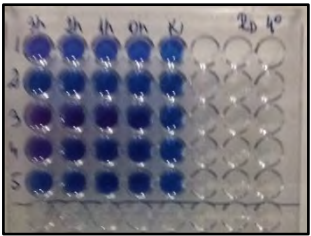

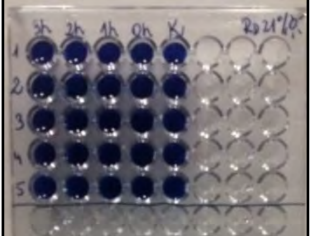
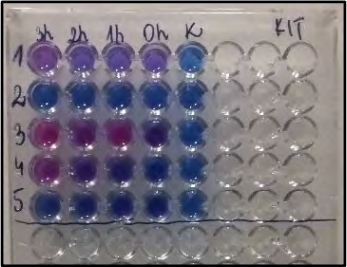
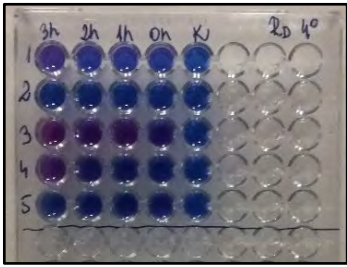
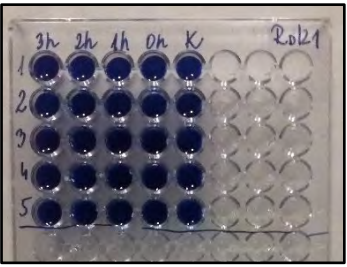
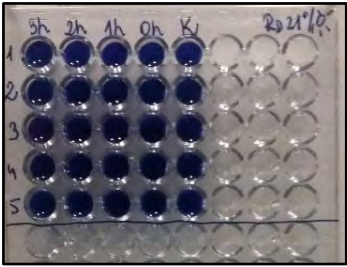
Kit resazury 4°C	Resazury Dulbecco		
	4°C	21°C	21°C, dostęp światła
T_{wo} = 0 h			
			
T_{wo} = 30 min			
			

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5 – warianty pożywek (tabela 10)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks

Tabela 12. Dynamika zmiany barwy resazuryzny przechowywanej w różnych warunkach temperatury c.d.

Kit resazuryna 4°C	Resazuryna Dulbecco		
	4°C	21°C	21°C, dostęp światła
Two = 60 min			
			
Two = 90 min			
			

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5 – warianty pożywek (tabela 10)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks

W tabeli 11 i 12 przedstawiono wyniki, uzyskane w niniejszych doświadczeniach. Zadawalające wyniki uzyskano tylko w przypadku użycia resazuryny przechowywanej (przed wykonaniem doświadczenia) w 4°C oraz resazuryny Kit (komercyjnej). Zmiana barwy następowała już po 30 minutach badań właściwych (Two = 30min). Najlepszy okazał się wariant 3 - liofilizat starych spor (pionowe oznaczenie na płytkach wielodołowych). Dobrym czasem odbarwienia wskaźnika charakteryzował się także wariant 1 (zawiesina spor starych) oraz 4 – liofilizat świeżych spor.

W każdym przypadku nie uzyskano przebarwienia resazuryny w wariancie 5. Był to liofilizat poddany 3 krotnemu procesowi sterylizacji w 121°C, co świadczy o dobrym procesie jałowienia (zabicia) spor.

Wyniki doświadczeń dla wariantów, gdzie stosowano proszek resazuryny zawieszony w buforze Dulbecco's nie okazały się zadawalające. Tylko w przypadku przechowywania w temperaturze 4°C obserwowano zmiany barwy wskaźnika. Testy przechowalnicze w temperaturze 21°C dały wyniki negatywne, bez względu na dostęp światła.

1.3.2. Test II

Ze względu na niezadawalające wyniki uzyskane w teście I (brak zmiany barwy w możliwie krótkim czasie dla wariantów, w których użyto resazuryny przechowywanej w temperaturze pokojowej) postanowiono badanie powtórzyć.

Modyfikacji podlegała procedura wykonania roztworu resazuryny. Choć w danych literaturowych nie można znaleźć innych (niż bufor Dulbecco's) buforów, w których można rozpuścić wskaźnik, podjęto próbę wykonania oznaczeń reakcji redox dla resazuryny rozpuszczonej w PBS oraz jałowej wodzie destylowanej. Dodatkowo, postanowiono obniżyć stężenie wodnego roztworu resazuryny do poziomu 0,01% oraz 0,02%. Testom poddano zarówno spory stare jak i świeże. Testowaną formą przetrwalników była ich zawiesina w jałowej wodzie destylowanej. W przypadku testu II także wykonano test studzienkowy (opisany w punkcie 1.3.1). W tabeli 13 przedstawiono legendę do oznaczeń zamieszczonych w płytkach wielodołkowych ukazanych w tabelach 14-17.

Tabela 13. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.

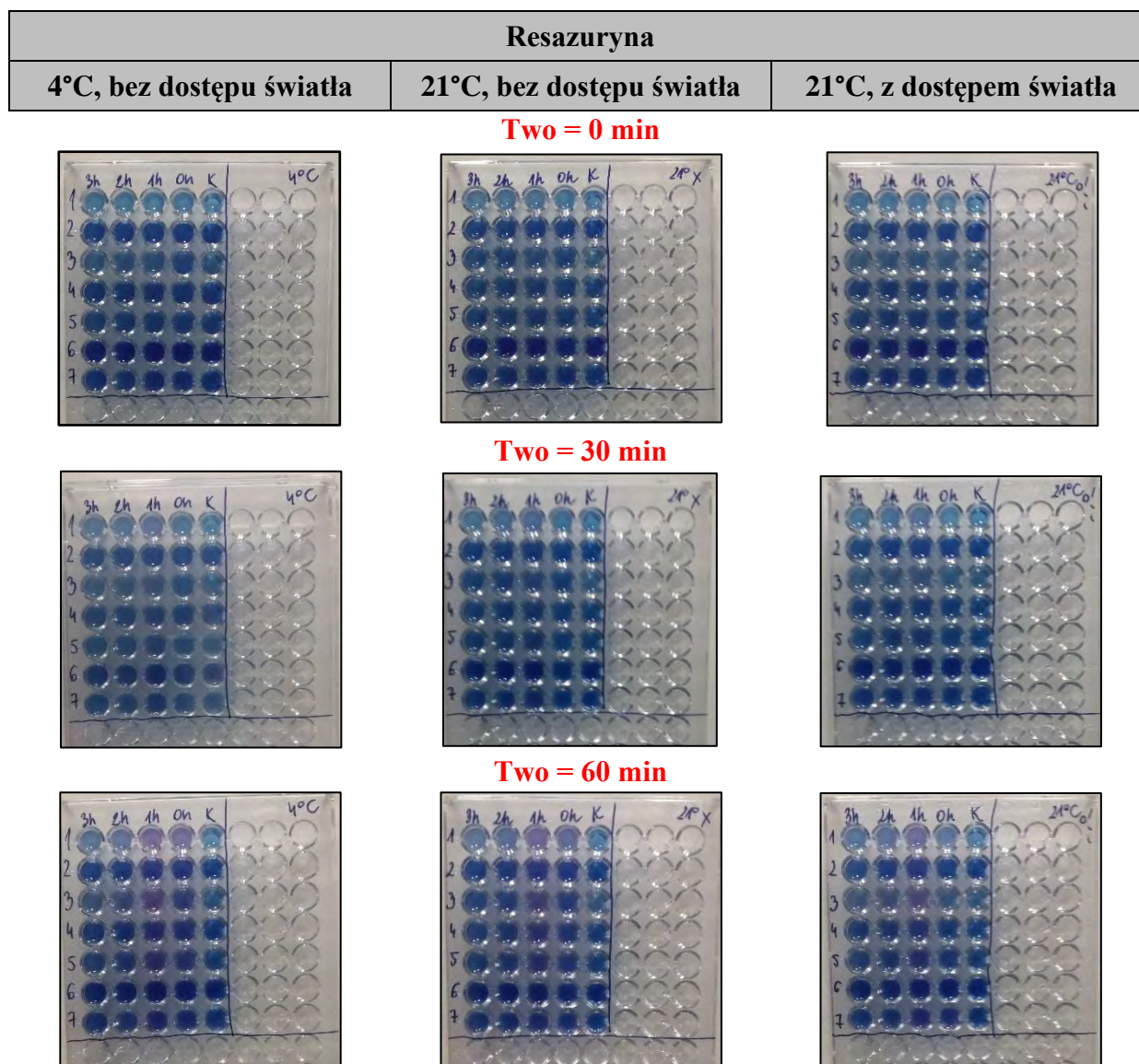
Nr dołka (pion)	Oznaczenie
1	Bufor Dulbecco + 0,01% R
2	Bufor Dulbecco + 0,02% R
3	Bufor PBS + 0,01% R
4	Bufor PBS + 0,02% R
5	Woda destylowana + 0,01% R
6	Woda destylowana + 0,02% R
7	Resazuryna KIT (komercyjny)
Nr dołka (poziom)	Oznaczenie
3 h	Czas hodowli (przed dodaniem resazuryny)
2 h	
1 h	
0 h	
K	Kontrola (bez spor)

W tabelach 14-17 przedstawiono dynamikę zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych temperaturach oraz stężeniach. Zdjęcia wykonywano w odstępie 30 min (od 0 minuty do 150). W tabelach 14 i 15 przedstawiono testy w których użyto spor starych natomiast w tabelach 16 i 17 spory świeże. W obu przypadkach użyto 6 różnych roztworów resazuryny (skład poszczególnych wariantów przedstawiono w tabeli 13). Tak jak w przypadku testu I każdy z wariantów przed użyciem przechowywano w trzech różnych warunkach (badano wpływ dostępu światła oraz temperatury na stabilność wskaźnika).

W przypadku spor starych pierwsze wizualne zmiany barwy obserwowano w 60 minucie oceny zmiany barwy ($T_{90}=60$ min) w każdej temperaturze przechowywania roztworu. Całkowite odbarwienie następowało w 90 minucie badań właściwych – dla wariantu 1 i 3. Zarówno wariant 1 jak 3 zawierał mniejszą ilość sproszkowanej resazuryny (0,01%). Minimalny całkowity czas odbarwienia wskaźnika (dla wariantu 1 i 3) to 2,5 godziny (suma inkubacji wstępnej oraz badań właściwych – po dodaniu resazuryny). Wariant 5 i 6 (roztwór wykonany na bazie wody destylowanej) nie przyniósł spodziewanych rezultatów.

W przypadku spor świeżych, dopiero w 90 minucie (tabela 17) można zaobserwować lekką zmianę barwy (dla wariantów 1 i 3) co świadczy o wpływie wieku spor na proces germiancji. Nie stwierdzono istotnych różnic dla wariantów przechowywania w 21°C w ciemności czy z dostępem światła. Uzyskane badania wykazały możliwość przechowywania testów z resazuryną jako wskaźnikiem, w temperaturze pokojowej. Takie warunki powinny być też zapewnione w trakcie transportu wskaźników biologicznych.

Tabela 14. Dynamika zmiany barwy resazury w przechowywaniu w różnych warunkach temperatury oraz stężenia – spory stare.



0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

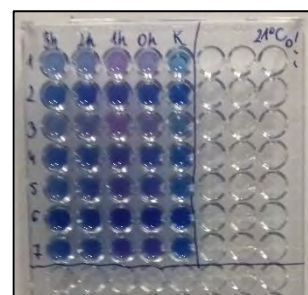
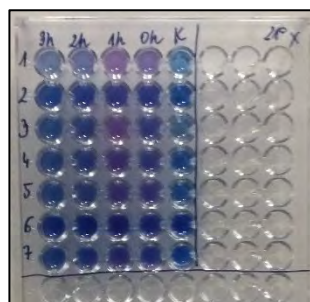
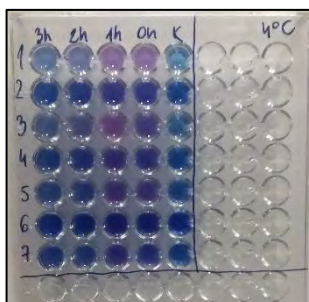
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – warianty pożywek (tabela 13)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks (kolor czerwony)

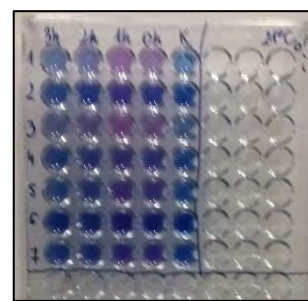
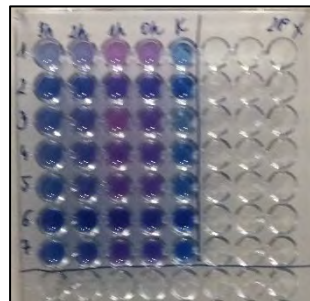
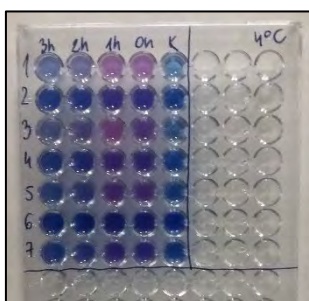
Tabela 15. Dynamika zmiany barwy resazuryzny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia - spory stare c.d.

Resazuryzna		
4°C, bez dostępu światła	21°C, bez dostępu światła	21°C, z dostępem światła

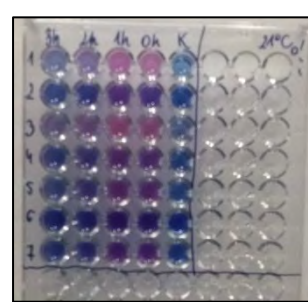
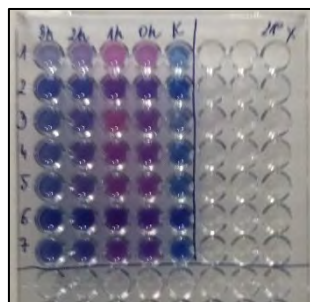
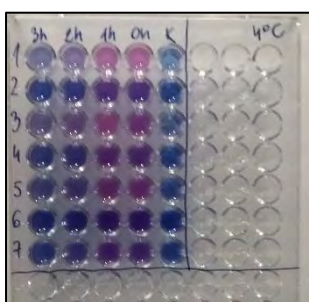
Two = 90 min



Two = 120 min



Two = 150 min

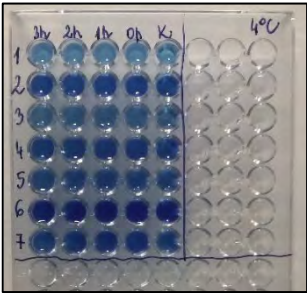
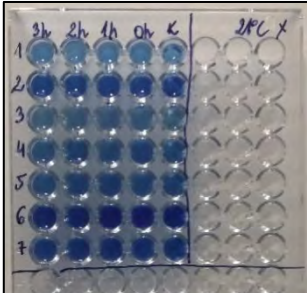
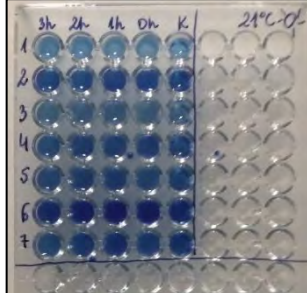
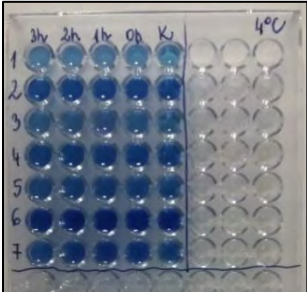
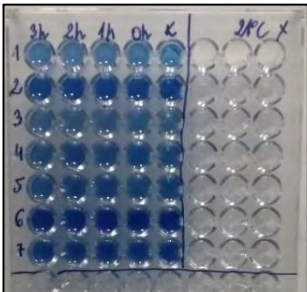
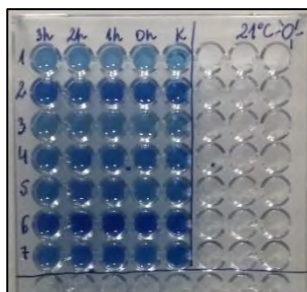
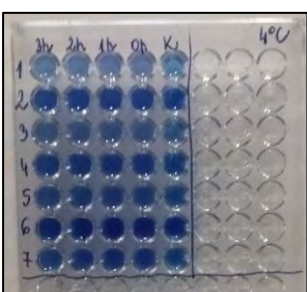
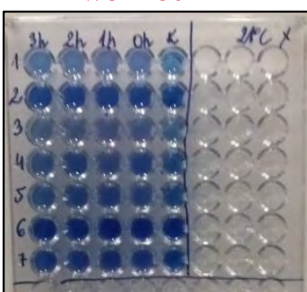
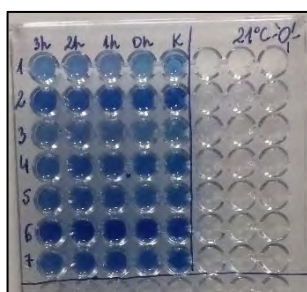


0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – warianty pożywek (tabela 13)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks (kolor czerwony)

Tabela 16. Dynamika zmiany barwy resazuryzny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia – spory świeże.

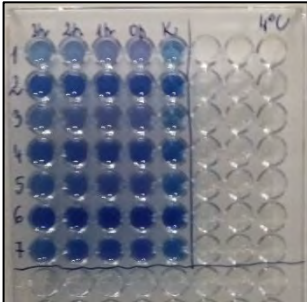
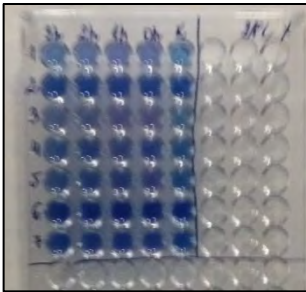
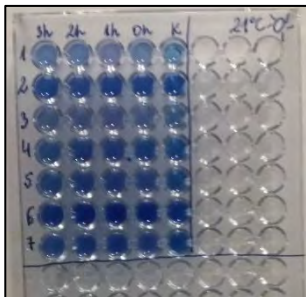
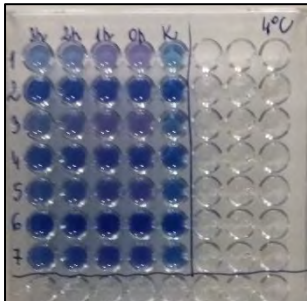
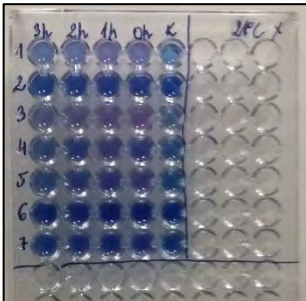
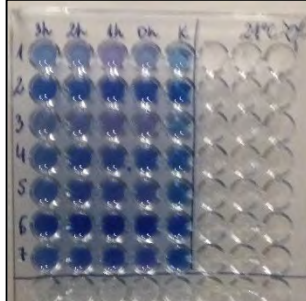
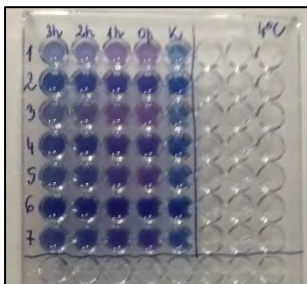
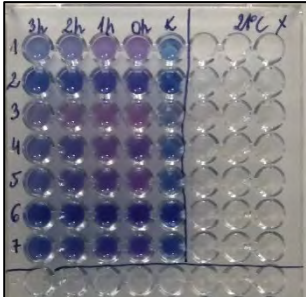
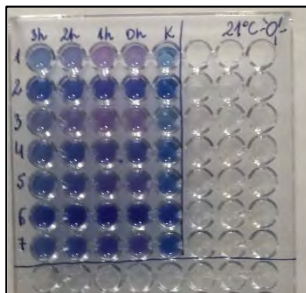
Resazuryzna		
4°C, bez dostępu światła	21°C, bez dostępu światła	21°C, z dostępem światła
T_{wo} = 0 min		
		
T_{wo} = 30 min		
		
T_{wo} = 60 min		
		

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – warianty pożywek (tabela 13)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodania wskaźnika redoks (kolor czerwony)

Tabela 17. Dynamika zmiany barwy resazuryzny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia – spory świeże c.d.

Resazuryzna		
4°C, bez dostępu światła	21°C, bez dostępu światła	21°C, z dostępem światła
T_{wo} = 90 min		
		
T_{wo} = 120 min		
		
T_{wo} = 150 min		
		

0-4h = czas hodowli (inkubacji wstępnej)

1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – warianty pożywek (tabela 13)

T_{wo} czas wizualnej zmiany barwy – czas liczony do dodaniu wskaźnika redoks (kolor czerwony).

2. Badania symulacyjne

W ramach niniejszego etapu projektu przeprowadzono badania, w których zasymulowano warunki zbliżone do rzeczywistych. Przygotowane liofilizaty spor *Geobacillus stearothermothilus* poddano sterylizacji plazmowej i parowej.

2.1. Sterylizacja plazmowa

Odpowiednio przygotowane i zabezpieczone zliofilizowane spory trafiły do laboratorium firmy Informer Med, gdzie poddane zostały one sterylizacji plazmowej. W tabeli 18 przedstawiono parametry procesu. Do chwili obecnej wykonano 3 serie badań, jednak zgodnie z harmonogramem prac, testy te będą kontynuowane, a wyniki przedstawione zostaną w drugiej części raportu (R/7).

Tabela 18. Parametry jałowienia

Urządzenie	L.p.	Temperatura	Czas
Sterrad NX	Seria I	55°C	20 min
Renosem S30	Seria II	55°C	20 min
Sterrad 100S	Seria III	55°C	20 min

Otrzymane, wysterylizowane spory poddano ocenie stopnia jałowości. Jego wyznacznikiem była:

- Ocena wizualna (przy użyciu wskaźnika resazuryny)
- Pomiar ilości ATP
- Posiew ilościowy

W tabeli 19 przedstawiono uzyskane wyniki oceny wizualnej zmiany barwy resazuryny (komercyjny KIT). Hodowle prowadzono z użyciem wysterylizowanych spor, zawieszonych w wyselekcjonowanej pożywce III. Hodowle inkubowano w 55°C przez okres 120 minut (z dodatkiem 10% kitu wskaźnika). Zdjęcia ukazują, że w żadnym z trzech powtórzeń nie uzyskano zmiany barwy z niebiesko – fioletowej na różową, co świadczy o skuteczności procesu sterylizacji.

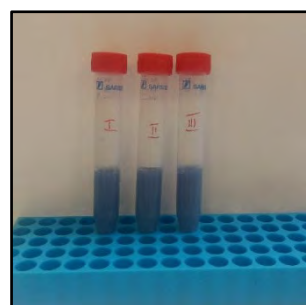
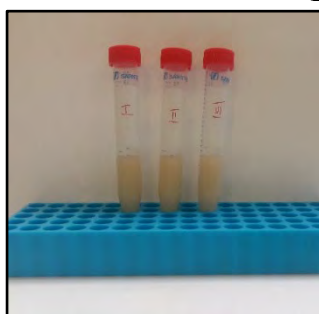
Spory te poddano także ilościowej ocenie uwalnianego ATP (przy użyciu komercyjnego kitu firmy PROMEGA). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 20 i 21. Ilość względnych jednostek świetlnych (RLU) była zróżnicowana, w zależności od zastosowanego urządzenia do sterylizacji plazmowej (Sterrad NX, Renosem S30, Sterrad 100s). Pomimo tych rozbieżności pomiędzy próbami i seriami sterylizacji plazmowej, maksymalna wartość (14 259) nie przekroczyła poziomu 16 747 RLU, którą to wartość uznano za statystycznie istotną na poziomie ufności $p < 0,05$ (raport R6, tabela 7).

W mikrobiologicznym posiewie ilościowym nie obserwowano na płytkach Petriego wzrostu *Geobacillus stearothermophilus*. Posiew na ogólną liczbę drobnoustrojów dokonano w trzech, niezależnych powtórzeniach (tabela 22). Dodatkowo, po miesiącu przechowywania otrzymanego, wysterylizowanego materiału dokonano powtórnego posiewu, który także nie wykazał wzrostu mikroorganizmów (tabela 23).

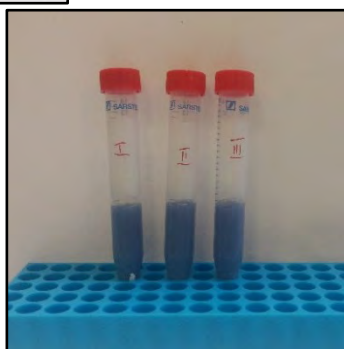
Tabela 19. Ocena wizualna – dynamika zmiany barwy wskaźnika redox

Liofilizat

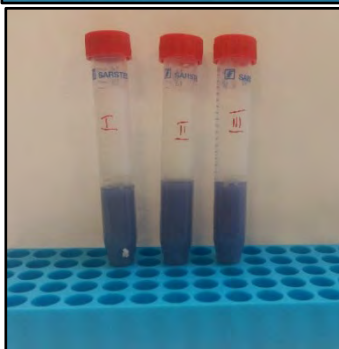
0 min



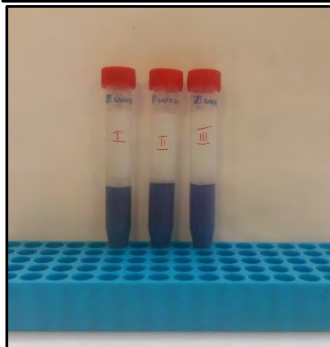
30 min



60 min



90 min



120 min

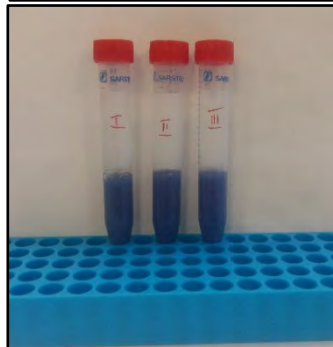


Tabela 20. Ilość uwalnianego ATP (sterylizacja plazmowa).

ATP [RLU]				
nr powtórzeń	I	II	III	Średnia
1.1	12380	13022	13428	12943
1.2	14277	14144	14356	14259
1.3	228	1059	998	762
2.1	3102	4173	4427	3901
2.2	7126	7984	8378	7829
2.3	3115	3872	4105	3697
3.1	9591	10873	11649	10704
3.2	6441	7984	8980	7802
3.3	1214	1981	1346	1514

Tabela 21. Ilość uwalnianego ATP (sterylizacja plazmowa), po miesiącu przechowywania.

ATP [RLU]				
nr powtórzeń	I	II	III	Średnia
1.1	7699	7619	7433	7584
2.1	5989	5924	5838	5917
3.1	12246	12161	12093	12167

Tabela 22. Wynik posiewów mikrobiologicznych spor poddanych sterylizacji plazmowej.

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzenia	I	II	III
1.1	n/o	n/o	n/o
1.2	n/o	n/o	n/o
1.3	n/o	n/o	n/o
2.1	n/o	n/o	n/o
2.2	n/o	n/o	n/o
2.3	n/o	n/o	n/o
3.1	n/o	n/o	n/o
3.2	n/o	n/o	n/o
3.3	n/o	n/o	n/o

n/o – nie obecne

Tabela 23. Wynik posiewu mikrobiologicznego spor poddanych sterylizacji plazmowej (po miesiącu przechowywania).

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzenia	I	II	III
1.1	n/o	n/o	n/o
2.1	n/o	n/o	n/o
3.1	n/o	n/o	n/o

n/o – nie obecne

2.2. Sterylizacja parowa

Tak jak w przypadku punktu 2.1 niniejszego raportu, dokonano oceny wizualnej, pomiaru ilości ATP oraz ogólnej liczby drobnoustrojów dla zliofilizowanych spor poddanych trzykrotnemu procesowi sterylizacji parowej. Jałowienia dokonano w urządzeniu firmy SMS Warszawa (parametry procesu: ekspozycja 121°C/20 min, chłodzenie 10 min). Jako kontrolę stosowano natywne spory (wyprodukowane i zliofilizowane w marcu 2017r – spory stare). Doświadczenie prowadzono w 5 niezależnych powtórzeniach.

W tabeli 24 i 25 przedstawiono wyniki oceny wizualnej. Stosowanym roztworem resazuryny był komercyjny KIT (firma SIGMA). Zdjęcia ukazują, że proces sterylizacji parowej przebiegł pomyślnie – w czasie 150 min hodowli nie zaobserwowano zmiany barwy wskaźnika. Jeśli chodzi o natywne spory, już w 60 minucie obserwowano zmianę barwy, która pogłębiała się wraz z upływem czasu (w tabeli 24 zaznaczono kolorem żółtym).

Tabela 24. Ocena wizualna – dynamika zmiany barwy wskaźnika redox liofilizatów spor *Geobacillus stearothermophilus*.

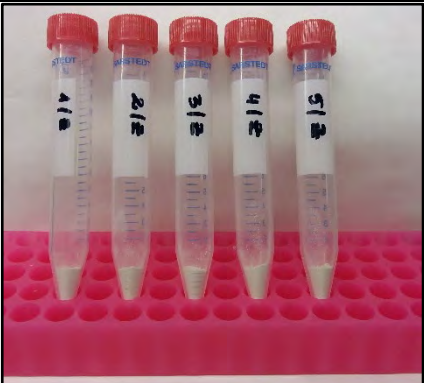
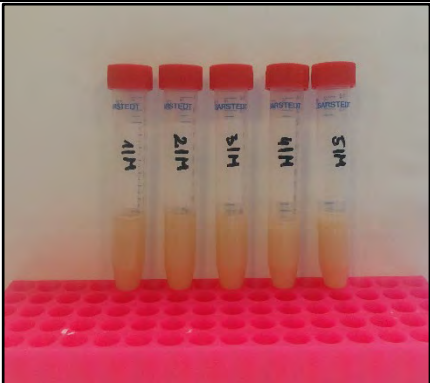
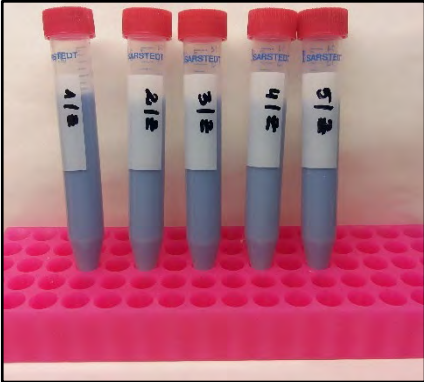
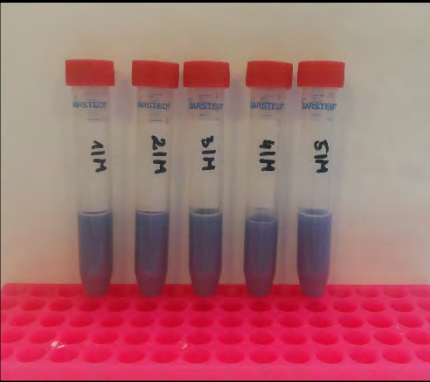
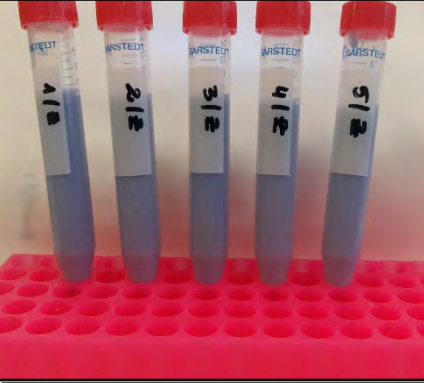
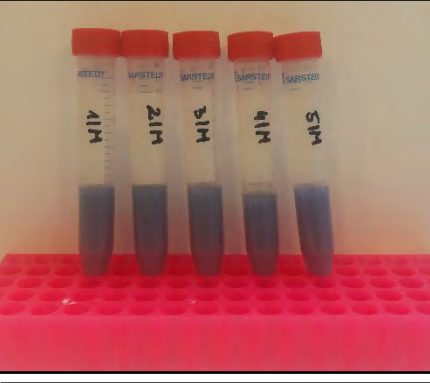
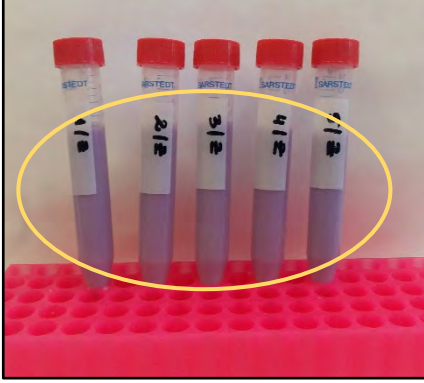
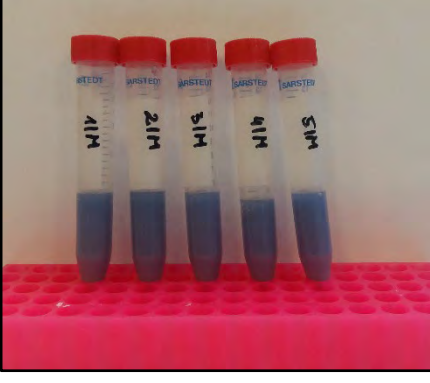
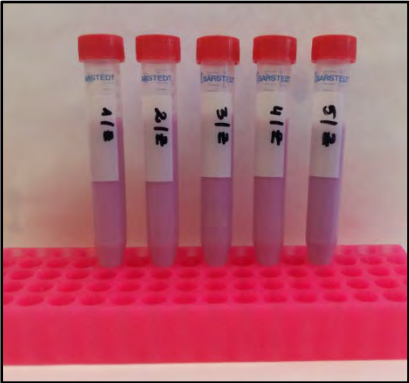
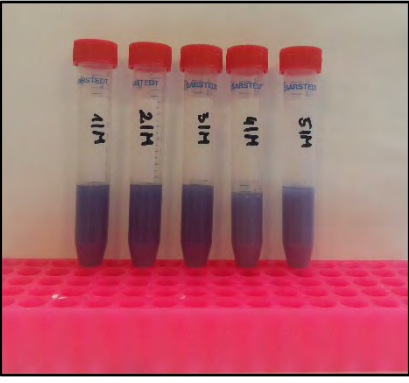
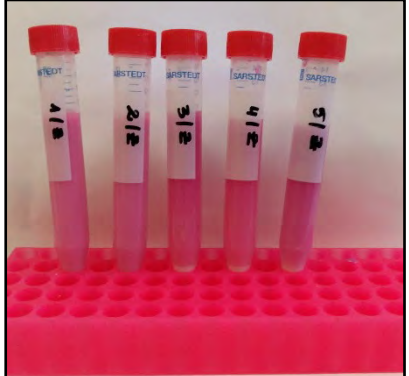
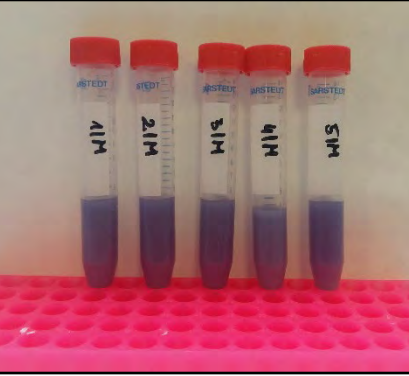
	Liofilizat	Liofilizat po sterylizacji parowej
0 min		
0 min		
30 min		
60 min		

Tabela 25. Ocena wizualna – dynamika zmiany barwy wskaźnika redox liofilizatów spor *Geobacillus stearothermophilus* c.d.

	Liofilizat	Liofilizat sterylizacji parowej
90 min		
150 min		

W tabeli 26 przedstawiono wyniki uzyskane w wyniku oceny uwalnianego ATP (przy użyciu komercyjnego kitu firmy PROMEGA) dla spor poddanych procesowi sterylizacji termicznej. Ilość względnych jednostek świetlnych (RLU) była niewielka, porównywalna z próbami kontrolnymi i oscylowała na poziomie poniżej 9000 RLU (dane z raportu R6).

Tabela 26. Ilość uwalnianego ATP (sterylizacja termiczna).

ATP [RLU]				
nr powtórzenia	I	II	III	Średnia
1.1	8460	7458	8741	8220
1.2	9158	8744	7745	8549
1.3	7231	9511	8745	8496
1.4	6597	7547	9541	7895
1.5	5427	5478	6547	5817
1.6	3050	5632	6322	5001
1.7	6653	7599	4521	6258
1.8	4540	5006	5663	5070
1.9	7300	4698	5879	5959
1.10	8879	8541	7889	8436
Średnia:				6970

Wynik posiewu mikrobiologicznego spor poddanych sterylizacji parowej wykazał że hodowle (pożywka VI+spory) były wolne od komórek (tabela 27).

Tabela 27. Wynik posiewu mikrobiologicznego spor poddanych testom jałowości .

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzenia	I	II	III
1	n/o	n/o	n/o
2	n/o	n/o	n/o
3	n/o	n/o	n/o
4	n/o	n/o	n/o
5	n/o	n/o	n/o

n/o – nie obecne

3. Produkcja spor

W celu wyprodukowania spor potrzebnych do dalszych prac w projekcie, w ostatnim kwartale 2017 roku wykonano także 5 hodowli bioreaktorowych. Czyste, zdeponowane w kolekcji Katedry kolonie *Geobacillus stearothermophilus* poddane zostały dwukrotnemu pasażowaniu na pożywkę mikrobiologiczną TSB, (wybranej na podstawie badań, Raport D/2016 - R/1), odpowiednio w próbówce typu eppendorf 2 ml, próbówce 10 ml oraz kolbie 150 ml, stanowiącej inoculum dla hodowli bioreaktorowej.

Właściwy proces hodowli prowadzono w bioreaktorze typu Biostat B plus (firmy Sartorius Stedim). Zgodnie z danymi umieszczonymi w publikacji Leighton i Doi (1970), do produkcji spor użyto zmodyfikowaną pożywkę 2xSG medium. Parametry poszczególnych hodowli zamieszczono w tabeli 28.

Tabela 28. Parametry hodowli bioreaktorowych.

Parametry	Nr fermentacji				
	F1	F2	F3	F4	F5
Temperatura	55°C	55°C	55°C	55°C	55°C
pH	Bez regulacji	Bez regulacji	7,20	7,20	7,20
Napowietrzanie	2 vvm	2 vvm	2 vvm	2 vvm	2 vvm
Szybkość obrotów mieszadła	100 rpm	100 rpm	100 rpm	100 rpm	100 rpm
Pożywka mikrobiologiczna	TSB	TSB	2xSG	2xSG	2xSG
Ilość inoculatu	5%	5%	5%	5%	5%
Czas trwania hodowli	7 dni	7 dni	6 dni	6 dni	5 dni

Hodowle prowadzono do czasu uzyskania form przetrwalnych (ocena mikroskopowa - barwienie metodą Gram oraz posiew ilościowy w kierunku ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczby form przetrwalnych).

Po skończonym procesie hodowlanym, biomasę zlewano do jałowych butelek (typu Simax), a następnie porcjowano do probówek typu falcon (50 ml). W celu uzyskania zawiesiny spor, wolnych od komórek wegetatywnych, probówki te zgodnie z metodyką zawartą w publikacji (Aouadhi i wsp. 2012) wirowano 5 krotnie i zawieszano w jałowej, zimnej wodzie destylowanej. Po trzecim cyklu wirowania zawiesinę pasteryzowano (10 min, 80°C). Oczyszczone endospory zostały umieszczone w warunkach chłodniczych (finalna koncentracja przetrwalników na poziomie 10^7 spor/ml).

W celu otrzymania przetrwalników w formie sproszkowanej, połowa objętości wyprodukowanych spor poddana została liofilizacji (suszeniu sublimacyjnemu zamrożonych w -80° C spor). Proces ten prowadzono w urządzeniu typu Beta 1-16 i trwał 24 godziny (parametry: ciśnienie P=0,12 mBa, 20 h = 5 °C, 4 h = 22 °C). Zdjęcia ukazujące proces produkcji (otrzymania) komórek przetrwalnych umieszczono na rysunku 1 i 2.

Hodowla - Powiększenie skali


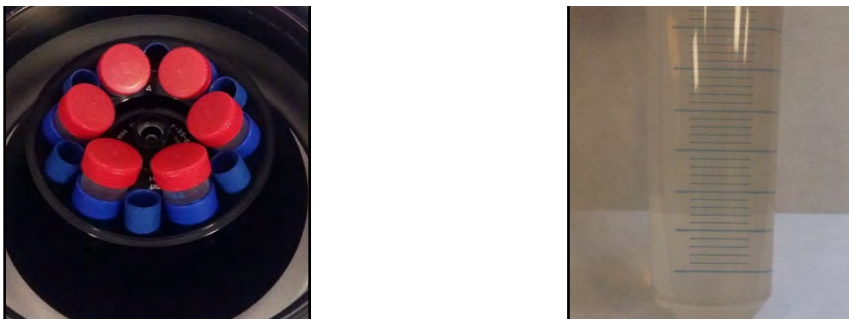


Kolba
[150 ml]



Bioreaktor
[3L]



Rysunek 1. Schemat produkcji spor.

Zlanie biomasy	
Wirowanie	
Zamrożenie	
Liofilizacja	

Rysunek 2. Schemat produkcji spor

4. Spis literatury

1. Aouadhi C., Rouissi Z., Kmiha S., Mejri S., Maaroufi A.: Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. *Food Microbiology* 54: 6-10, 2016.
2. Aouadhi C., Simonin H., Prévost H., de Lamballerie M., Maaroufi A., Mejri S.: Optimization of pressure induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk. *Food Microbiology* 30: 1-7, 2012.
3. Bomar M.: The relationship between the age of *Bacillus subtilis* spores and their resistance to ethylene oxide. *Folia Microbiologica* vol.7, 1962.
4. Bowling T., Mercer L., Don R., Jacobs R., Nare B.: Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human African trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2: 262–270, 2012.
5. Egan K., Field D., Rea M. C., Ross R. P., Hill C., Cotter P. D.: Bacteriocins: Novel solutions to age old spore – related problems?. *Frontiers in Microbiology* vol. 7, no 461, 2016.
6. Leighton T.J., Doi Rov H.: The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis*. *The journal of biological chemistry* vol.246, no 10, 1971.
7. Nagler K., Setlow P., Li Y. Q., Moeller R.: High salinity alters the germination behavior of *Bacillus subtilis* spores with nutrient germinants. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 80, no 4, 2014.
8. Rodriguez – Palacios A., LeJeune J. T.: Moist – Heat resistance, spore aging and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Applied and environmental microbiology*, p.3085-8091, 2011.

CZEŚĆ II

Raport cząstkowy R/7

Wykorzystanie metody bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej

W ramach tego etapu badań wykonano następujące zadania badawcze:

- Wykorzystanie metody bioluminescencyjnego pomiaru ATP do oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej
- Badania mające na celu określenie zakresu ekspozycji na proces sterylizacji metodą parową i plazmową w zdefiniowanych warunkach, w których następuje przejście od wszystkich organizmów testowych wykazujących wzrost (czas przeżycia) do wszystkich organizmów testowych nie wykazujących wzrostu (czas zabicia)
- Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom w warunkach zbliżonych do rzeczywistych, przeprowadzonych na urządzeniach do sterylizacji różnych producentów

Spis treści

1. Testy przechowalnicze	46
1.1. Wpływ warunków, czasu przechowywania oraz rodzaju substancji rozpuszczającej wskaźnik redox na czułość oznaczenia.	46
1.2. Ocena termostabilności komponentów - wizualna ocena zmiany barwy	58
1.2.1. Ocena termostabilności wskaźnika redox (resazuryna).....	58
1.2.2. Ocena termostabilności wskaźnika redox (resazuryna) + pożywka mikrobiologiczna.....	60
1.2.3. Ocena termostabilności układu: wskaźnik redox (resazuryna) + pożywka mikrobiologiczna (rozłożona pojedyncze składniki).....	64
1.2.4. Ocena termostabilności układu: wskaźnik redox (resazuryna) + medium germinacyjne (w różnych wariantach czasowych).....	66
2. Kinetyka zmiany barwy – pomiar spektrofotometryczny	78
2.1. Kinetyka zmiany barwy – układ resazuryna z pożywką	78
2.2. Wyznaczenie widm absorpcyjnych	78
2.4. Kinetyka zmiany barwy –UKŁAD: medium germinacyjne + resazuryna + spory	87
3. Badania mające na celu określenie zakresu ekspozycji na proces sterylizacji metodą parową i plazmową (wyznaczenie czasu przeżycia i czasu zabicia badanych przetrwalników bakterii)	95
4. Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom w warunkach zbliżonych do rzeczywistych przeprowadzonych na urządzeniach do sterylizacji różnych producentów.....	100
5. Badania symulacyjne – 2018 r.	102
5.1. Sterylizacja plazmowa.....	102
5.2. Sterylizacja parowa	108
6. Określenie objętości testu do pomiaru ilości ATP	111
7. Podsumowanie.....	113
8. Spis literatury	118
9. Spis tabel	119
10. Spis rysunków	122
11. Spis wykresów.....	122

1. Testy przechowalnicze

Zgodnie z harmonogramem oraz założeniami wynikającymi z Raportu R/7 części I, kontynuowano testy przechowalnicze. Ocenie po raz kolejny poddano kity oraz medium germinacyjne (przygotowane w IV kwartale 2017 roku). Wyżej wymienione substancje poddano ocenie jakościowej (wizualna ocena zmiany barwy).

1.1. Wpływ warunków, czasu przechowywania oraz rodzaju substancji rozpuszczającej wskaźnik redox na czułość oznaczenia.

I etap doświadczenia

Ocenę wpływu warunków oraz czasu przechowywania wskaźnika redox na jego czułość oznaczenia dokonano zarówno dla komercyjnej resazuryny (KIT), jak i dla resazuryny rozpuszczonej w buforze Dulbecco's. Oba roztwory przechowywane były (od października 2017 roku) w temperaturze 21°C. Przechowywane były w dwóch wariantach – z dostępem światła oraz bez. Doświadczenie prowadzono w płytkach wielodołowych, do których na czas inkubacji (2 doby) przenoszono po 300µl wskaźnika. Próby inkubowano w termostacie, w temperaturze 55 °C. Ponieważ w doświadczeniu tym układ stanowił tylko wskaźnik (bez dodatku pożywki oraz spor), test studzienkowy nie był poprzedzony wstępną inkubacją a całkowity czas wizualnej zmiany barwy był równy Two. Ocenę wizualną dokonano w 0, 4, 10, 16, 24 i 48 godzinie inkubacji. Wykonano 36 powtórzeń każdego wariantu. Wyniki przedstawiono w tabelach 30-31. **Nie stwierdzono wpływu temperatury, dostępności światła oraz czasu przechowywania resazuryny na jej jakość oznaczenia. Nie zaobserwowano także różnic pomiędzy resazuryną komercyjną a składaną w laboratorium.**

Tabela 29. Legenda do rysunków 1-2


Symbol	Oznaczenie
	Dostęp światła
X	Brak dostępu światła

Tabela 30. Dynamika zmiany barwy rezazuryny KIT przechowywanej w różnych warunkach temperatury

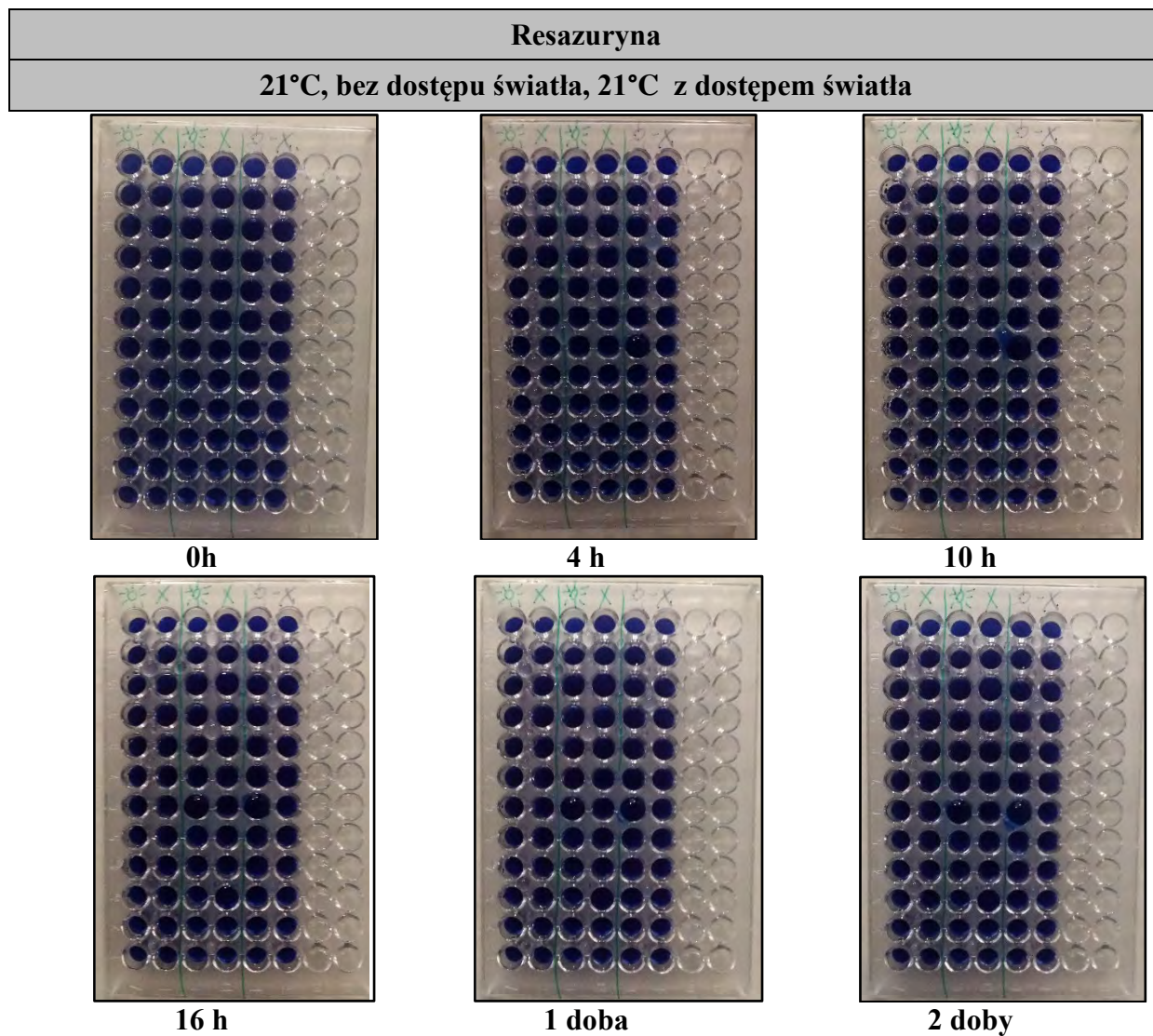
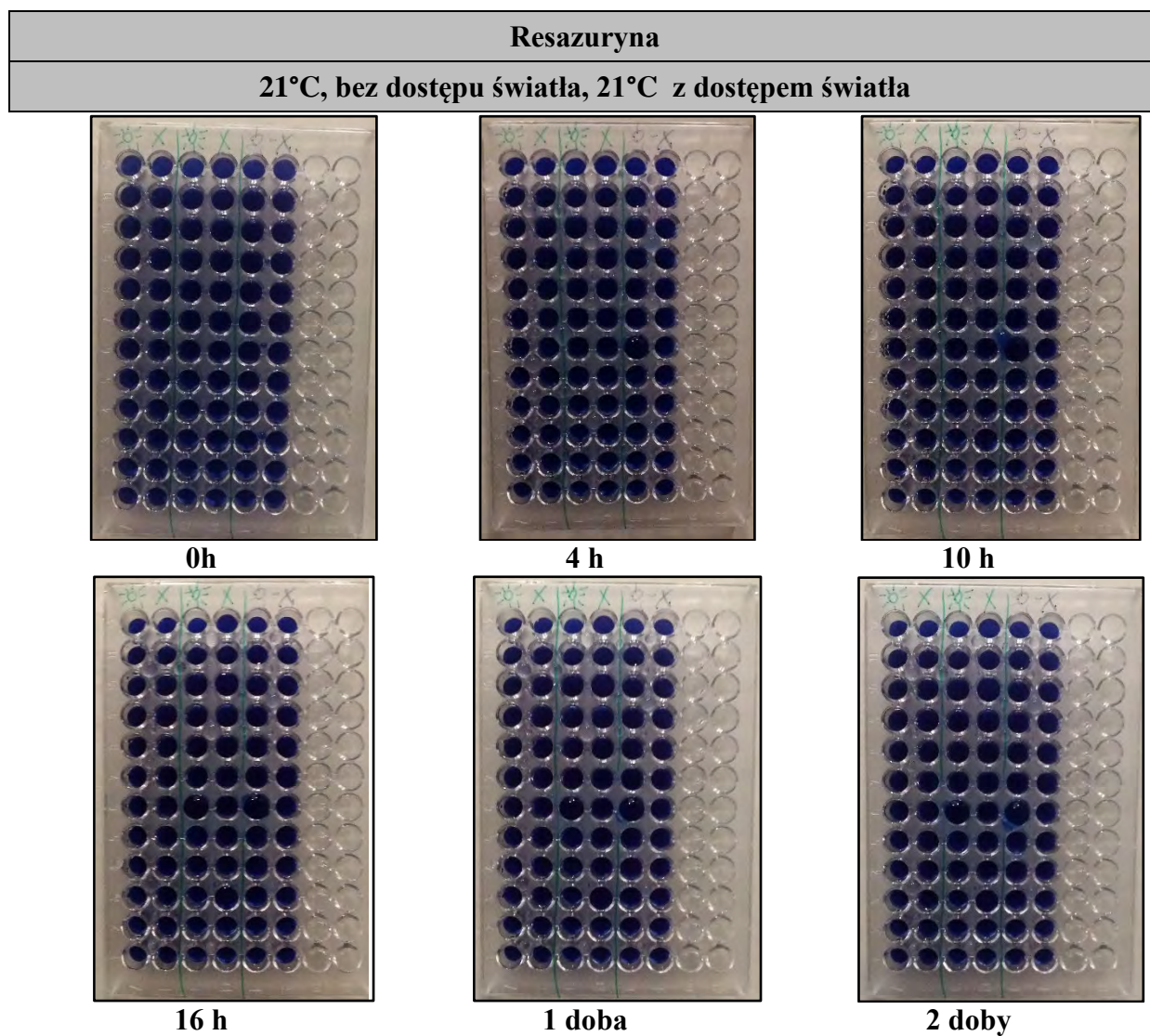


Tabela 31. Dynamika zmiany barwy resazuryzny Dulbecco's przechowywanej w różnych warunkach temperatury



II etap doświadczenia

W drugim etapie badań dokonano oceny wpływu czasu przechowywania wskaźnika redox oraz rodzaju substancji rozpuszczającej wskaźnik na jego czułość oznaczenia. Wszystkie roztwory przechowywane były (od października 2017 roku) w temperaturze 21°C, bez dostępu światła. Ocenie poddano resazurynę rozpuszczoną w trzech różnych substancjach: buforze Dulbecco's, buforze PBS oraz w jałowej wodzie destylowanej. Zastosowano dwa stężenia końcowe resazuryny: 0,01 oraz 0,02 % (legenda do oznaczeń w tabeli 32, 34 i 36). Ocenę jakościową prowadzono w układzie: resazuryna + pożywka III (z germinantami) + spory. **Badania właściwe** (zaczynające się w momencie dodania odpowiedniego wariantu wskaźnika) prowadzono w trzech różnych temperaturach: **60°C, 70°C, 80°C**. Jako kontrolę zastosowano komercyjną resazurynę (KIT).

Doświadczenie prowadzono, opierając się na wcześniej opisanym teście studzienkowym, poprzedzonym inkubacją wstępną w temperaturze **55°C** (przebiegającą odpowiednio w **0h, 1h, 2h i 3h**).

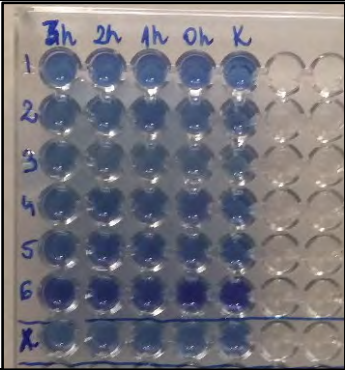
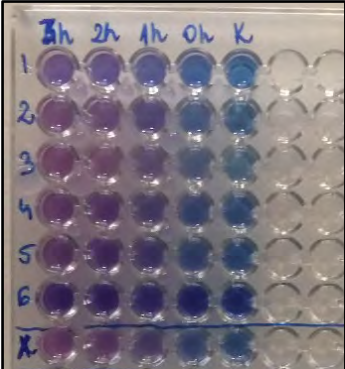
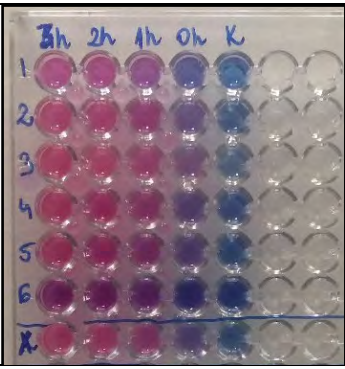

Dynamika zmiany barwy resazuryny ocenianej zarówno w temperaturze 60°C jak i w 70°C (tabela 33 i 35) była taka sama. Pierwsze zmiany barwy obserwowano już w 30 minucie termostatowania ($T_{\text{two}}=30$ min), dla hodowli 1h, 2h i 3h. Świadczy to o tym, że najkrótszy możliwy czas wizualnej oceny barwy to 1,5h. Nie zaobserwowano różnic w stosowaniu jako rozpuszczalnika wskaźnika buforu Dulbecco's i PBS. Rozpuszczenie resazuryny w wodzie destylowanej powodowało słabsze jej odbarwienie.

❖ UKŁAD: Resazuryna + pożywka III + germinanty + spory (temperatura inkubacji 60°C)

Tabela 32. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.

Nr dolka (pion)	Oznaczenie
1	Bufor Dulbecco + 0,01% R
2	Bufor Dulbecco + 0,02% R
3	Bufor PBS + 0,01% R
4	Bufor PBS + 0,02% R
5	Woda destylowana + 0,01% R
6	Woda destylowana + 0,02% R
X	Resazuryna KIT (komercyjny)
Nr dolka (poziom)	Oznaczenie
3 h	Czas hodowli (przed dodaniem resazuryny)
2 h	
1 h	
0 h	
K	Kontrola (bez spor)

Tabela 33. Dynamika zmiany barwy rezazuryny inkubowanej w 60°C.

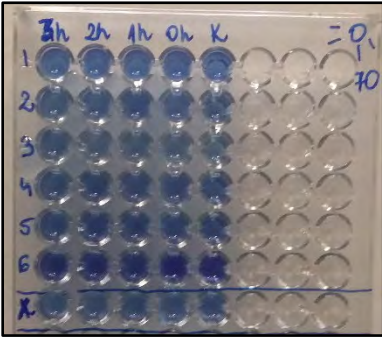
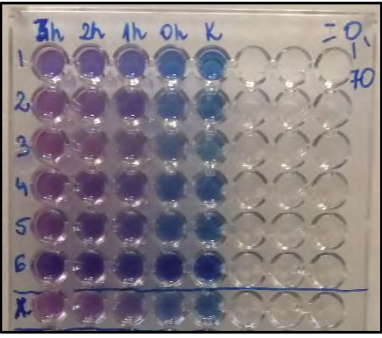
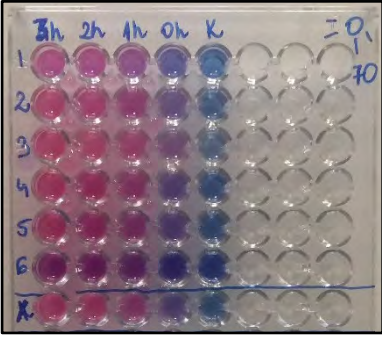
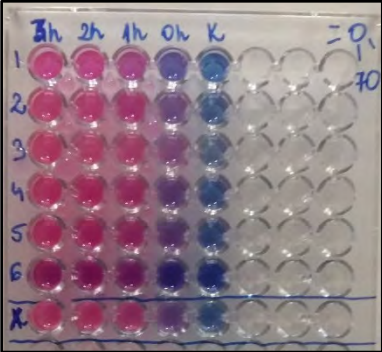
Resazuryna + pożywka III + germinanty + Spory					
					
Two=0 h					
					
Two=30 min					
					
Two=60 min					
					
Two=90 min					

❖ **UKŁAD: Resazuryna + pożywka III + germinanty + spory (temperatura przechowywania 70°C)**

Tabela 34. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.

Nr dolka (pion)	Oznaczenie
1	Bufor Dulbecco + 0,01% R
2	Bufor Dulbecco + 0,02% R
3	Bufor PBS + 0,01% R
4	Bufor PBS + 0,02% R
5	Woda destylowana + 0,01% R
6	Woda destylowana + 0,02% R
X	Resazuryna KIT (komercyjny)
Nr dolka (poziom)	Oznaczenie
3 h	Czas hodowli (przed dodaniem resazuryny)
2 h	
1 h	
0 h	
K	Kontrola (bez spor)

Tabela 35. Dynamika zmiany barwy resazuryiny inkubowanej w 70°C

Resazuryna + pożywka III + germinanty + Spory									
									
Two=0 h									
									
Two=30 min									
									
Two=60 min									
									
Two=90 min									

❖ **UKŁAD: Resazuryna + pożywka III + germinanty + spory (temperatura przechowywania 80°C)**

W przypadku inkubacji układu w temperaturze 80°C, wykonano dwa powtórzenia oceny dynamiki zmiany barwy. W I powtórzeniu do doświadczenia użyto spory „stare” (wyprodukowane 6 miesięcy wcześniej, tabela 37), natomiast w powtórzeniu II spory „świeże” – wyprodukowane 2 tygodnie przed założonym doświadczeniem (tabela 38-39). W obu przypadkach zastosowano resazurynę przechowywaną w temperaturze 21°C: z dostępem światła (lewa kolumna tabeli 37,38 i 39) oraz bez dostępu (prawa kolumna tabeli 37,38 i 39).

Tabela 36. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.

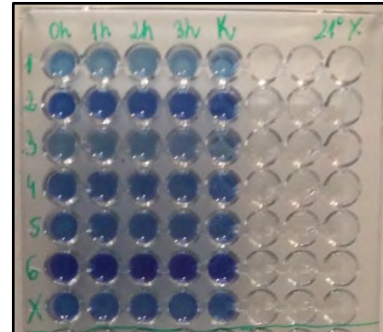
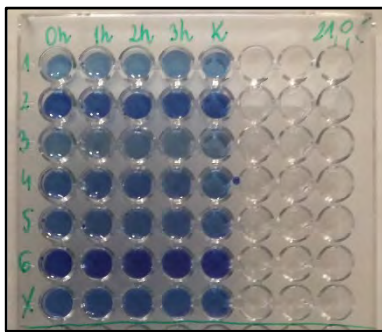
Nr dolka (pion)	Oznaczenie
1	Bufor Dulbecco + 0,01% R
2	Bufor Dulbecco + 0,02% R
3	Bufor PBS + 0,01% R
4	Bufor PBS + 0,02% R
5	Woda destylowana + 0,01% R
6	Woda destylowana + 0,02% R
X	Resazuryna KIT (komercyjny)
Nr dolka (poziom)	Oznaczenie
3 h	Czas hodowli (przed dodaniem resazuryny)
2 h	
1 h	
0 h	
K	Kontrola (bez spor)

Zarówno w powtórzeniu I jak i II pierwsze odbarwienia wskaźnika zaobserwowano w 30 minucie badań właściwych (termostatowania w temperaturze 80°C po dodaniu wskaźnika), dla hodowli 1h, 2h i 3h. Świadczy to o tym, że najkrótszy możliwy czas wizualnej oceny barwy to 1,5h. W każdym przypadku kontrola (K – komercyjny Kit) pozostawała niezmienną. Nie zaobserwowano znaczących różnic w zmianie barwy wynikających z zastosowania różnych buforów (użytych do rozpuszczenia resazuryny). Znacznie szybciej zmieniała się natomiast barwa przy użyciu wskaźnika o stężeniu końcowym 0,01% (w

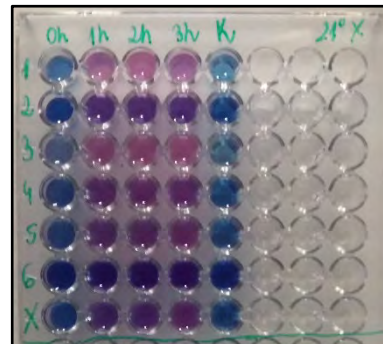
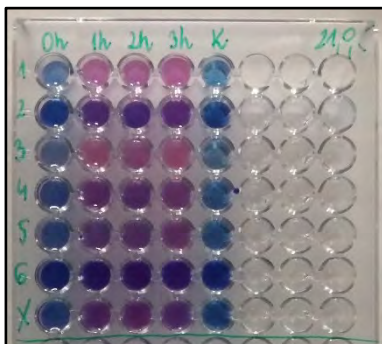
porównaniu do 0,02%). Nie zaobserwowano różnic w szybkości zmiany barwy stosując wskaźnik przechowywany z/lub bez dostępu światła

Tabela 37. Dynamika zmiany barwy resazury w inkubowanej w 80°C – I powtórzenie

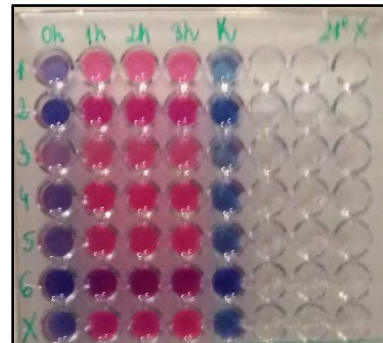
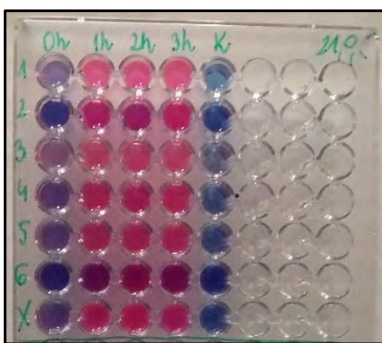
Resazuryna + pożywka III + germinanty + Spory



Two=0 h



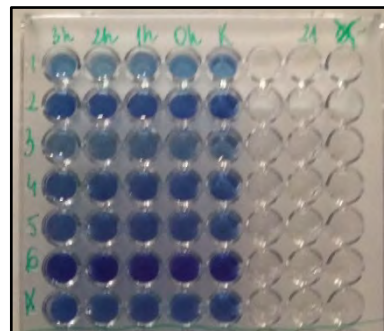
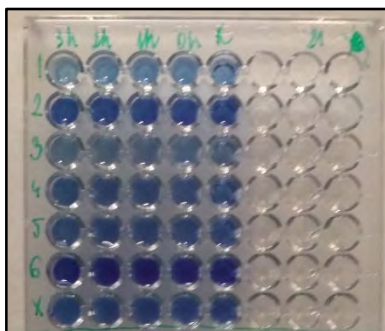
Two=30 min



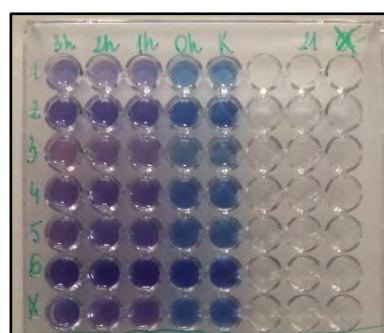
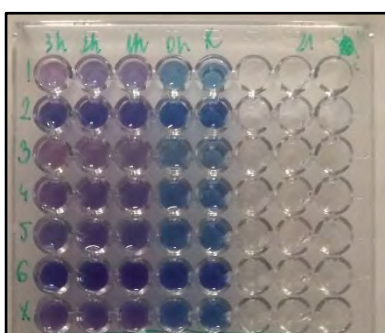
Two=60 min

Tabela 38. Dynamika zmiany barwy resazury w inkubowanej w 80°C – II powtórzenie

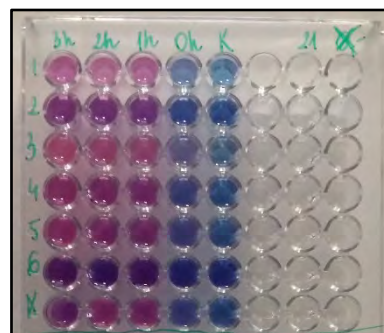
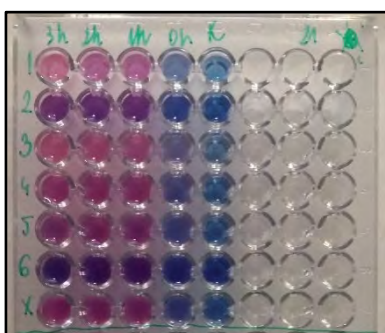
Resazuryna + pożywka III + germinanty + Spory świeże



Two=0 h



Two=30 min



Two=60 min

Tabela 39. Dynamika zmiany barwy resazuryiny inkubowanej w 80°C – II powtórzenie c.d.

Resazuryna + pożywka III + germinanty + Spory świeże



Two=90 min

Podsumowanie:

Testy przechowalnicze i ocena wpływu czasu przechowywania oraz rodzaju substancji rozpuszczającej wskaźnik redox na ich czułość oznaczenia pozwoliły stwierdzić że:

- ❖ Testy przechowalnicze resazuryiny w podwyższonych temperaturach (60, 70, 80°C) wykazały jej trwałość (brak odbarwienia) przez co najmniej 2 doby, dla obu rodzajów badanych barwników.
- ❖ Nie stwierdzono zmian barwy resazuryiny przechowywanej przez okres 6 miesięcy w temperaturze pokojowej (21°C), z i bez dostępu światła. Zastosowanie jej w testach wykazało skuteczność.
- ❖ Zasadne jest stosowanie roztworów resazuryiny przygotowywanej z proszku, której trwałość (brak odbarwienia) jest taka sama jak w przypadku komercyjnej resazuryiny KIT (mniejsze koszty jednostkowe).
- ❖ Najlepsze stężenie końcowe resazuryiny to 0,01%.
- ❖ Najlepsze efekty zmiany barwy uzyskiwano stosując wariant, w którym resazurynę rozpuszczano w buforze Dulbecco's.
- ❖ Najszybsze odbarwienie resazuryiny zaobserwowano przy inkubacji układu w temperaturze 80°C, co wskazuje na zasadność stosowania preinkubacji w tej temperaturze.
- ❖ Układ: pożywka+germinanty przechowywane przez okres 6 miesięcy wykazał skuteczność przy procesie germinacji

1.2. Ocena termostabilności komponentów - wizualna ocena zmiany barwy

1.2.1. Ocena termostabilności wskaźnika redox (resazuryna)

Na podstawie danych uzyskanych w poprzednich etapach projektu (raport R/7, część I), założono doświadczenie, mające na celu określenie wpływu temperatury na stabilność wyjściowej barwy wskaźnika w czasie inkubacji. Materiałem badawczym było 6 wariantów roztworu resazuryny, różniących się między sobą buforem, w którym zostały one zawieszane (Dulbecco's, PBS oraz jałowa woda destylowana) oraz stężeniem końcowym resazuryny (0,01 % i 0,02%). Dodatkowo, każdy z wariantów przechowywano w dwóch kombinacjach – z dostępem oraz bez dostępu światła. Doświadczenie przeprowadzono w probówkach typu eppendorf, do których dodawano odpowiednie warianty układu z resazuryną, a następnie inkubowano w termobloku w temperaturze pokojowej oraz w 60°C, 70°C oraz 80°C (przez okres 56 godzin). Wszystkie doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

W tabelach 40-43 przedstawiono wyniki, uzyskane w opisanym doświadczeniu. Ocena zmiany barwy dokonywano wizualnie (sprawdzano czy wyjściowa, granatowa barwa wskaźnika zmienia się w czasie). **W żadnym z wykonanych wariantów doświadczeń nie zauważono zmiany barwy, również podwyższona temperatura nie wpłynęła negatywnie na wskaźnik wykorzystywany w doświadczeniach.**

Tabela 40. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny na stabilność wyjściowej barwy (21°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie resazuryny	Czas inkubacji [h]								
				4	8	12	18	24	28	36	48	56
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: „-” brak zmiany barwy

Tabela 41. Wpływ temperatury przechowywania rezazuryny na stabilność wyjściowej barwy (60°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie rezazuryny	Czas inkubacji [h]								
				4	8	12	18	24	28	36	48	56
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: „-” brak zmiany barwy

Tabela 42. Wpływ temperatury przechowywania rezazuryny na stabilność wyjściowej barwy (70°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie rezazuryny	Czas inkubacji [h]								
				4	8	12	18	24	28	36	48	56
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: „-” brak zmiany barwy

Tabela 43. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny na stabilność wyjściowej barwy (80°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie resazuryny	Czas inkubacji [h]								
				4	8	12	18	24	28	36	48	56
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9		PBS	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11		H ₂ O	0,01%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12			0,02%	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: „-” brak zmiany barwy

1.2.2. Ocena termostabilności wskaźnika redox (resazuryna) + pożywka mikrobiologiczna

W celu określenia wpływu temperatury inkubacji na stabilność barwy wyjściowej medium germinacyjnego, warianty użyte do doświadczenia opisanego w punkcie 1.2.1 posłużyły jako dodatek do pożywki mikrobiologicznej („III” – wyselekcjonowanej w poprzednich etapach – raport R/3, R/4, R/5). Dodatek wskaźnika stanowił 10% całkowitej objętości badanego roztworu, natomiast pożywka III została zaczerpnięta z testów przechowalniczych założonych w czwartym kwartale 2017 (raport R/7). Wszystkie doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

Tok postępowania był identyczny jak w punkcie 1.2.1 a wyniki przedstawiono w tabelach 44-47. Stężenie końcowe resazuryny oraz bufor w jakim została ona rozpuszczona nie miało istotnego znaczenia dla zmiany barwy układu. Także dostępność światła, lub jego brak, nie wpływało na stabilność układu. Jedynym czynnikiem mającym znaczenie w tym doświadczeniu była temperatura. O ile nie wpływała ona na zmianę zabarwienia samego wskaźnika, to jednak w połączeniu z pożywką III miała istotny wpływ. Ocena wizualna pozwoliła określić czas oraz wysokość temperatury, w której układ wykazuje stabilność. W

temperaturze pokojowej układ resazuryny z pożywką hodowlaną nie zmieniał barwy, bez względu na zastosowany roztwór i stężenie resazuryny (tabela 44). Wraz z podwyższeniem temperatury czas inkubacji znacząco się skracał. Dla temperatury 60°C wyniósł 18 godzin (tabela 45), dla 70°C 12 godzin (tabela 46) natomiast dla 80°C 8 godzin (tabela 47). **Świadczy to o tym, że podniesienie temperatury inkubacji testu może przyczynić się do ograniczenia czasu jego odczytu.** Nie stwierdzono istotnego wpływu stężenia resazuryny i rodzaju roztworu na zmianę barwy układu. W związku z tym do dalszych doświadczeń wybrano stężenie wskaźnika 0,01% i bufor Dulbecco's (zmodyfikowany PBS – raport R6).

Tabela 44. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (21°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie resazuryny	Pożywka	Czas inkubacji [h]									
					4	8	12	18	24	28	36	48	56	
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2			0,02%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3		PBS	0,01%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4			0,02%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5		H ₂ O	0,01%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6			0,02%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8			0,02%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9		PBS	0,01%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
10			0,02%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11		H ₂ O	0,01%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12			0,02%		-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

Tabela 45. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (60°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie resazuryny	Pożywka	Czas inkubacji [h]									
					4	8	12	18	24	28	36	48	56	
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	III	-	-	-	-	+	+	+	+	+	
2			0,02%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
3		PBS	0,01%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
4			0,02%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
5		H ₂ O	0,01%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
6			0,02%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
8			0,02%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
9		PBS	0,01%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
10			0,02%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
11		H ₂ O	0,01%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	
12			0,02%		-	-	-	-	+	+	+	+	+	

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

Tabela 46. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (70°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie resazuryny	Pożywka	Czas inkubacji [h]									
					4	8	12	18	24	28	36	48	56	
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	III	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
2			0,02%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
3		PBS	0,01%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
4			0,02%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
5		H ₂ O	0,01%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
6			0,02%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
8			0,02%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
9		PBS	0,01%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
10			0,02%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
11		H ₂ O	0,01%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
12			0,02%		-	-	-	+	+	+	+	+	+	

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

Tabela 47. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (80°C).

L.p.	Dostęp światła	Bufor	Stężenie resazuryny	Pożywka	Czas inkubacji [h]									
					4	8	12	18	24	28	36	48	56	
1	Brak	Dulbecco's	0,01%	III	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2			0,02%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
3		PBS	0,01%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4			0,02%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
5		H ₂ O	0,01%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6			0,02%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Dostęp	Dulbecco's	0,01%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8			0,02%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9		PBS	0,01%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
10			0,02%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
11		H ₂ O	0,01%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
12			0,02%		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

1.2.3. Ocena termostabilności układu: wskaźnik redox (resazuryna) + pożywka mikrobiologiczna (rozłożona pojedyncze składniki).

W kolejnym etapie doświadczenia podjęto **wstępną** próbę wyselekcjonowania tych składowych pożywki III, które odpowiadają za zbyt szybką zmianę barwy prób kontrolnych (w temperaturach inkubacji wyższych niż 55°C). W tabeli 48 przedstawiono warianty składowych, użytych do doświadczenia. W ich skład nie wchodził dodatek wyselekcjonowanego germinanta (Alanina + Asparagina). Dodanym wskaźnikiem redox była resazuryna KIT (dla wariantów 1-9) oraz Resazuryna rozpuszczona w stężeniu 0,01% w buforze Dulbecco's (1'-9'). Każdy wariant inkubowano w temperaturze 55°C i 60°C. Wizualnej oceny dokonano w 0, 10 oraz 24 godzinie inkubacji. Doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

Tabela 48. Wykaz wariantów doświadczeń (pkt. 1.2.3.)

ID próby	Pożywka	Germinant	Rodzaj wskaźnika	Temperatura inkubacji
1	III	BRAK	R _{KIT}	Każdy wariant inkubowany w temp. 55°C i 60°C
2	III bez peptonu			
3	Bulion + pepton + NaCl			
4	Bulion + pepton + Glukoza			
5	Bulion + pepton			
6	Bulion			
7	Pepton			
8	NaCl			
9	Glukoza			
1'	III		R _{Dulbecco} 0,01%	
2'	III bez peptonu			
3'	Bulion + pepton + NaCl			
4'	Bulion + pepton + Glukoza			
5'	Bulion + pepton			
6'	Bulion			
7'	Pepton			
8'	NaCl			
9'	Glukoza			

W tabeli 47 przedstawiono zmiany barwy mające miejsce w czasie inkubacji w medium germinacyjnym. W celu lepszego zobrazowania zachodzących zmian, wprowadzono 3 stopniową skalę:

+	Lekka zmiana barwy
++	Średnia zmiana barwy
+++	Znacząca zmiana barwy

Po 10 godzinach inkubacji (zarówno w temperaturze 55°C jak i 60°C) zaobserwowano lekką zmianę barwy w każdym wariantcie zawierającym w swoim składzie dodatek bulionu (pojedyncze zastosowanie NaCl i glukozy nie powodowało zmiany barwy). Dodatek peptonu do resazury (wariant 7) powodował zmianę barwy w 10 h tylko w warunkach 55°C, nie stwierdzono zmiany barwy w temp. 60°C. Dla pozostałych wariantów po 10 h inkubacji odnotowano lekką zmianę barwy, a w 24 godzinie inkubacji zmiana barwy była intensywniejsza (2 stopień skali).

Tabela 49. Stopień zmiany barwy w doświadczeniu (pkt. 1.2.3.)

ID próby	Temperatura inkubacji					
	55°C			60°C		
	Czas [h]					
	0	10	24	0	10	24
1	-	+	++	-	+	++
2	-	+	++	-	+	++
3	-	-	++	-	+	++
4	-	+	++	-	+	++
5	-	+	++	-	+	++
6	-	+	++	-	+	++
7	-	+	+	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
1'	-	+	++	-	+	++
2'	-	+	++	-	+	++
3'	-	-	++	-	+	++
4'	-	+	++	-	+	++
5'	-	+	++	-	+	++
6'	-	+	++	-	+	++
7'	-	-	-	-	-	-
8'	-	-	-	-	-	-
9'	-	-	-	-	-	-

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

1.2.4. Ocena termostabilności układu: wskaźnik redox (resazuryna) + medium germinacyjne (w różnych wariantach czasowych).

W celu sprawdzenia możliwości ujednoczenia pożywek dla wszystkich metod pomiarowych i wyeliminowania potencjalnej zmiany barwy układu (próby kontrolnej, wolnej od spor), postanowiono zamienić pożywkę III na komercyjną TSB (nie zawierającą w swoim składzie bulionu wzbogaconego). W tabeli 50 przedstawiono warianty stosowane w doświadczeniach. Przygotowano dwa warianty: pożywkę TSB oraz zoptymalizowaną pożywkę III (suplementowane germinantami - mieszanina alaniny oraz asparaginy). Do każdego wariantu dodawano 10% roztworu resazuryny (z Kitu lub roztwór przygotowywany z proszku i zawieszony w buforze Dulbecco's), tak aby końcowe stężenie wynosiło 0,01%. Dodatkowo podzielono czas inkubacji na dwa etapy: pre-inkubację (60 i 30 minutową), w której testowane zawiesiny przetrzymywano w temperaturze 80°C oraz inkubację właściwą (trwającą 3 godziny), w której zastosowano temperaturę 55°C i 60°C. Doświadczenia wykonano w 3 powtórzeniach.

Tabela 50. Wykaz wariantów w doświadczeniach nad wyborem czasu pre-inkubacji (pkt. 1.2.4)

ID próby	Pożywka	Germinant	Rodzaj wskaźnika	Pre - inkubacja		Inkubacja właściwa	
				Czas [h]	Temperatura	Czas [h]	Temperatura
1	TSB	ALA+ASP	R _{KIT}	1	80°C	3	60°C
2	TSB						55°C
3	TSB		R _{Dulbecco}				60°C
4	TSB						55°C
5	III		R _{KIT}				60°C
6	III						55°C
7	III		R _{Dulbecco}				60°C
8	III						55°C
9	TSB		0,5	R _{KIT}	60°C		
10	TSB				55°C		
11	TSB			R _{Dulbecco}	60°C		
12	TSB				55°C		
13	III			R _{KIT}	60°C		
14	III				55°C		
15	III			R _{Dulbecco}	60°C		
16	III				55°C		

Tabela 51. Wyniki doświadczenia – stopień zmiany barwy.

ID próby	Czas pre-incubacji [h]		Czas pre-inkubacji + Czas inkubacji właściwej [h]										
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	11	25	
1		X	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
2		X	-	-	+	+	+	+	+	+	+	++	+++
3		X	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++
4		X	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	++
5		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
6		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
7		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
8		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
ID próby	Czas pre-incubacji [h]		Czas pre-inkubacji + Czas inkubacji właściwej [h]										
	0,5	1,0	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0	4,5	10,5	24,5	
9	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
10	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
11	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
12	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+++
13	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
14	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
15	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
16	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy
 „x” czas preinkubacji

+	Lekka zmiana barwy
++	Średnia zmiana barwy
+++	Znacząca zmiana barwy

Doświadczenia wykazały, że przy godzinnym okresie pre-inkubacji w temperaturze 80°C pożywka TSB wraz ze resazuryną ulega ponieważ już po czasie godzinnej inkubacji w temperaturze 55 i 60°C ulega lekkiemu odbarwieniu (1 stopień) (warianty 1-4). W pozostałych wariantach, przy godzinnym okresie pre-inkubacji w temperaturze 80°C, odbarwienie następowało po 11 lub 25 godzinie obserwacji. Przy 0,5 godzinnym okresie pre-inkubacji w temperaturze 80°C, najszybsze odbarwienie obserwowano również dla pożywki TSB (warianty 9-12). Najlepszymi wariantami okazały się próby nr 6, 8, 13, 15 oraz 16, które posłużyły jako punkt wyjścia do kolejnych badań.

Ponieważ wytypowane warianty tych doświadczeń dotyczyły 2 temperatur inkubacji właściwej: 55 i 60°C, model kolejnego doświadczenia obejmował 10 kombinacji, które przedstawiono w tabeli 50. Dodatkowo, dla wariantów 1'-10' dodano 10% zawiesiny spor.

Tabela 52. Warianty stosowane w doświadczeniu nad wyborem optymalnego czasu i temperatury pre-inkubacji i inkubacji właściwej (pkt. 1.2.4).

ID próby	Pożywka	Germinant	Rodzaj wskaźnika	Spory	Pre - inkubacja		Inkubacja właściwa			
					Czas [h]	Temperatura	Czas [h]	Temperatura		
1	III	ALA+ASP	R _{KIT}	Nie	1	80°C	3	55°C		
2	III		R _{Dulbecco}					55°C		
3	III		R _{KIT}		0,5			60°C		
4	III								55°C	
5	III		R _{Dulbecco}		60°C					
6	III							55°C		
7	III		R _{KIT}		-			-	3	60°C
8	III		R _{Dulbecco}							55°C
9	III		R _{KIT}		-			-	3	60°C
10	III		R _{Dulbecco}							55°C
1'	III		R _{KIT}	Tak	1	80°C	3	55°C		
2'	III		R _{Dulbecco}					55°C		
3'	III		R _{KIT}		0,5			60°C		
4'	III								55°C	
5'	III		R _{Dulbecco}		60°C					
6'	III							55°C		
7'	III		R _{KIT}		-			-	3	60°C
8'	III		R _{Dulbecco}							55°C
9'	III		R _{KIT}		-			-	3	60°C
10'	III		R _{Dulbecco}							55°C

Ocenę wizualną dokonywano w dwóch niezależnych powtórzeniach (tabela 53 i 54). Potwierdziły one zasadność stosowania jako medium germinacyjnego dla spor *Geobacillus stearothermophilus* zoptymalizowanej pożywki III z germinantami (alaninia i asparagina). Najszybsze odbarwienie wskaźnika w obecności spor uzyskano dla wariantu 1' (zoptymalizowana pożywka III, z dodatkiem resazuryny (Kit), przy godzinnym czasie pre-inkubacji w temperaturze 80°C, i inkubacji właściwej w temperaturze 55°C). Czas w którym zauważono zmianę barwy wskaźnika z granatowej na różową to 1,5 godziny. Porównywalne

wyniki uzyskano dla wariantu 4' (w którym skrócono czas pre-inkubacji o pół godziny). Brak pre-inkubacji (warianty 7'-10') powodował znaczne opóźnienie zmiany barwy wskaźnika.

W przypadku doświadczeń z samą pożywką i wskaźnikiem (warianty 1-10) podniesienie temperatury inkubacji powodowało szybsze odbarwienie się medium (pierwsze zmiany barwy już po 3,5 godziny). Najlepsze efekty (jak najpóźniejsze odbarwienie się pożywki ze wskaźnikiem, bez spor) uzyskano dla wariantów 5-10.

Tabela 53. Wyniki wizualnej oceny zmiany barwy – powtórzenie I.

ID próby	I powtórzenie											
	Czas pre-inkubacji [h]		Czas właściwej inkubacji [h]									
	0,5	1,0	+0,5	+1,0	+1,5	+2,0	+2,5	+3,0	+3,5	+4,0	+10	+24
1		X	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
2		X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	X		-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
4	X		-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
5	X		-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
6	X		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7			-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
8			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1'		X	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2'		X	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3'	X		-	+	+	++	++	++	++	++	++	+++
4'	X		++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5'	X		-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++
6'	X		+	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
7'			-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
8'			-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9'			-	+	+	+	++	++	++	++	++	++
10'			-	-	-	+	+	+	+	+	++	++

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy
 „x” czas pre-inkubacji

+	Lekka zmiana barwy
++	Średnia zmiana barwy
+++	Znacząca zmiana barwy

Tabela 54. Wyniki wizualnej oceny zmiany barwy – powtórzenie II.

ID próby	II powtórzenie											
	Czas pre- incubacji [h]		Czas właściwej inkubacji [h]									
	0,5	1,0	+0,5	+1,0	+1,5	+2,0	+2,5	+3,0	+3,5	+4,0	+10	+24
1		X	-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
2		X	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
3	X		-	-	-	-	+	+	+	+	++	++
4	X		-	-	-	-	-	+	+	+	++	++
5	X		-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
6	X		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
7			-	-	-	-	-	-	-	-	+	++
8			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
9			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
10			-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
1'		X	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2'		X	+	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3'	X		-	+	+	++	++	++	++	++	++	+++
4'	X		+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
5'	X		-	-	-	+	+	++	++	++	++	+++
6'	X		+	+	++	++	++	++	++	++	++	+++
7'			-	-	-	-	-	+	+	+	++	+++
8'			-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
9'			-	+	+	+	+	++	++	++	++	++
10'			-	-	-	+	+	+	+	+	++	++

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy
 „x” analiza

+	Lekka zmiana barwy
++	Średnia zmiana barwy
+++	Znacząca zmiana barwy

Porównując najlepsze wyniki doświadczeń dla wariantów bez spor (jak najpóźniejsze odbarwienie wskaźnika) do analogicznych powtórzeń ze sporami (jak najszybsze odbarwienie wskaźnika) wybrano wariant 6', dla którego po 1,5h obserwowano wyraźne zmiany zabarwienia wskaźnika. Na podstawie tych doświadczeń określono również najlepszą temperaturę inkubacji właściwej: 55°C.

W kolejnym etapie badań (III powtórzenie) zawężono oceniane warianty – ograniczono się tylko do 55°C inkubacji właściwej. Natomiast nadal stosowano dwa rodzaje resazury (z ekonomicznego punktu widzenia bardziej pożądane byłoby zastosowanie roztworu resazury rozpuszczonej w buforze Dulbecco's) oraz dwa różne czasy pre-inkubacji - 1 h oraz 0,5 h (tabela 55).

Wykonano osiem wariantów doświadczeń, każdy w czterech powtórzeniach, a wyniki przedstawiono w tabeli 56. W każdym przypadku wariantów bez dodatku spor (I-IV) zmianę barwy zaobserwowano w 10 godzinie inkubacji (2 stopień w skali). Nie zauważono jednak istotnych różnic po dodatku różnych roztworów wskaźnika (KIT lub roztwór Dulbecco's). W przypadku medium germinacyjnego z dodatkiem spor, lepsze wyniki uzyskano po 1 godzinnej pre-inkubacji (V-VI), jednak różnica (w porównaniu do 0,5 h pre-inkubacji) wynosiła tylko 30 minut. W tabeli 56 kolorem żółtym zaznaczono najlepsze warianty pożywek.

Tabela 55. Warianty użyte do III powtórzenia.

ID prób	Pożywka	Germinant	Rodzaj wskaźnika	Spory	Pre - inkubacja		Inkubacja właściwa	
					Czas [h]	Temperatura	Czas [h]	Temperatura
I	III	ALA+ASP	R _{KIT}	NIE	1	80°C	3	55°C
II			R _{Dulbecco}					
III			R _{KIT}		0,5			
IV			R _{Dulbecco}					
V			R _{KIT}	TAK	1			
VI			R _{Dulbecco}					
VII			R _{KIT}		0,5			
VIII			R _{Dulbecco}					

Tabela 56. Wyniki uzyskane w III powtórzeniu – wizualna ocena zmiany barwy resazuryny.

	ID próby	III powtórzenie											
		Czas pre-inkubacji [h]		Czas właściwej inkubacji [h]									
		0,5	1,0	+0,5	+1,0	+1,5	+2,0	+2,5	+3,0	+3,5	+4,0	+10	+24
I	1		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	1		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
III	1	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	1	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
V	1		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VI	1		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4		X	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VII	1	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VIII	1	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy
 „x” czas pre-inkubacji

+	Lekka zmiana barwy
++	Średnia zmiana barwy
+++	Znacząca zmiana barwy

Ze względu na znacznie niższe koszty jednostkowe stosowania roztworu resazuryny zawieszanej w buforze Dulbecco's, do dalszych badań wytypowano warianty VI i VIII (tabela 56), dla których odbarwienie wskaźnika ze sporami uzyskano po 1,5h.

W kolejnym etapie badań, zawężono zakres wykonywanych doświadczeń do wariantów wytypowanych w poprzednich doświadczeniach (tabela 57).

Tabela 57. Warianty doświadczeń.

ID prób	Pożywka	Germinant	Rodzaj wskaźnika	Spory	Pre - inkubacja		Inkubacja właściwa	
					Czas [h]	Temperatura	Czas [h]	Temperatura
I	III	ALA+ASP	R _{Dulbecco}	NIE	1	80°C	3	55°C
II				TAK				
III				NIE	0,5			
IV				TAK				

Każdy wariant wykonano w 10 powtórzeniach (tabela 58). Próby kontrolne – bez spor (wariant I i III) nie odbarwiały się w 24 godzinie inkubacji (zarówno przy godzinnej jak i 30 minutowej pre-inkubacji). Natomiast kombinacja medium germinacyjne + spory (warianty II i IV) zmieniała swoje zabarwienie po 1,5-2,0 godzinie. Jednakże lepsze wyniki uzyskano dla czasu pre-inkubacji 30 min (pierwsze zauważalna wizualna ocena zmiany barwy po 1 h – wariant IV, powtórzenia 6-10). Całkowita zmiana barwy wskaźnika resazuryny na różową następowała po 3 h dla wariantu II i po 2,5 h dla wariantu IV (wariant ten wytypowano do dalszych badań).

Tabela 58. Wyniki wizualnej oceny zmiany barwy.

	ID próby	I powtórzenie											
		Czas pre-inkubacji [h]		Czas właściwej inkubacji [h]									
		0,5	1,0	+0,5	+1,0	+1,5	+2,0	+2,5	+3,0	+3,5	+4,0	+10	+24
I	1		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10		X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
II	1		X	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2		X	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3		X	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4		X	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	5		X	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6		X	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7		X	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	8		X	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	9		X	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10		X	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
III	1	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	X		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	1	X		-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2	X		-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3	X		-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	4	X		-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	5	X		-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	6	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	7	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	8	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	9	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	10	X		-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

Legenda: „-” brak zmiany barwy „x” czas pre-inkubacji
 „+” zmiana barwy

Ostatnim etapem oceny wizualnej zmiany barwy była próba maksymalnego skrócenia czasu pre-inkubacji w temperaturze 80°C (dane literaturowe potwierdzają skuteczność aktywacji wysoką temperaturą spor bakteryjnych [Yildiz i Westhoff, 1989]). W tabeli 59 przedstawiono warianty doświadczeń. Ocenie poddano medium germinacyjne (pożywka III + germinanty) z resazuryną i sporami. Całość pre-inkubowano w 80°C przez 0, 5, 10, 15, 20, 25 oraz 30 minut, a następnie prowadzono inkubację właściwą w 55°C (inkubacja 3 godzinna).

Tabela 59. Warianty użyte w doświadczeniach nad skróceniem czasu pre-inkubacji.

ID prób	Pożywka	Germinant	Rodzaj wskaźnika	Spory	Pre - inkubacja		Inkubacja właściwa	
					Czas [min]	Temperatura	Czas [h]	Temperatura
I	III	ALA+ASP	R _{Dulbecco}	TAK	30	80°C	3	55°C
II					25			
III					20			
IV					15			
V					10			
VI					5			
VII					0			

W tabeli 60 przedstawiono wyniki wizualnej oceny zmiany barwy wybranych modeli doświadczalnych. Każde z ośmiu wariantów wykonano w 2 powtórzeniach. Najlepsze wyniki uzyskano przy 30 minutowej pre-inkubacji (w temperaturze 80°C) przez 30 minut i 60 minutach inkubacji właściwej (w temperaturze 55°C). Daje to łączny czas odczytu testu na poziomie 90 minut (1,5 godziny).

Tabela 60. Wyniki wizualnej zmiany barwy.

ID próby		Czas pre-inkubacji [min]	Czas właściwej inkubacji [min]						
			+15	+30	+60	+90	+120	+180	+240
			I	1	30	-	-	++	++
	2		-	-	++	++	+++	+++	+++
II	1	25	-	-	+	++	+++	+++	+++
	2		-	-	+	++	+++	+++	+++
III	1	20	-	-	+	++	+++	+++	+++
	2		-	-	+	++	+++	+++	+++
IV	1	15	-	-	+	++	+++	+++	+++
	2		-	-	+	++	+++	+++	+++
V	1	10	-	-	+	+	++	++	++
	2		-	-	+	+	++	++	++
VI	1	5	-	-	-	-	+	+	+
	2		-	-	-	-	+	+	+
VII	1	0	-	-	-	-	-	-	+
	2		-	-	-	-	-	-	+

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

+	Lekka zmiana barwy
++	Średnia zmiana barwy
+++	Znacząca zmiana barwy

W kolejnym doświadczeniu postanowiono sprawdzić także wpływ temperatury pre-inkubacji (80°C) na układ: pożywka III + germinanty + resazuryna (zawieszona w buforze Dulbecco's). Tak jak w przypadku poprzedniego doświadczenia, zastosowano 7 wariantów, w których zmienną eksperymentalną był czas pre-inkubacji (tabela 61). Próby inkubowano w termobloku, oceniając wizualną zmianę barwy wskaźnika (w 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30 i 48h inkubacji). Wykonano 2 powtórzenia każdego wariantu.

Wykazano, że wysoka temperatura pre – inkubacji (80°C) nie wpływa negatywnie na układ: pożywka + germinanty + resazuryna. W żadnym wariantcie (bez względu na czas pre – inkubacji) nie zaobserwowano jakiegokolwiek zmiany barwy wskaźnika (tabela 62).

Tabela 61. Warianty użyte w doświadczeniu

Układ	Pożywka III + Germinanty (alanina i asparagina) + Resazuryna (roztwór)
Czas pre-inkubacji	0, 5, 10, 15, 20, 25 i 30 min
Temperatura pre-inkubacji	80°C
Czas właściwej inkubacji	1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48 h
Temperatura właściwej inkubacji	55°C

Tabela 62. Wyniki wizualnej zmiany barwy układu: pożywka + germinanty + resazuryna

ID próby		Czas pre-inkubacji [min]	Czas właściwej inkubacji [h]							
			+1	+2	+4	+6	+12	+24	+30	+48
			I	1 2	30	-	-	-	-	-
II	1 2	25	-	-	-	-	-	-	-	-
III	1 2	20	-	-	-	-	-	-	-	-
IV	1 2	15	-	-	-	-	-	-	-	-
V	1 2	10	-	-	-	-	-	-	-	-
VI	1 2	5	-	-	-	-	-	-	-	-
VII	1 2	0	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: „-” brak zmiany barwy
 „+” zmiana barwy

2. Kinetyka zmiany barwy – pomiar spektrofotometryczny

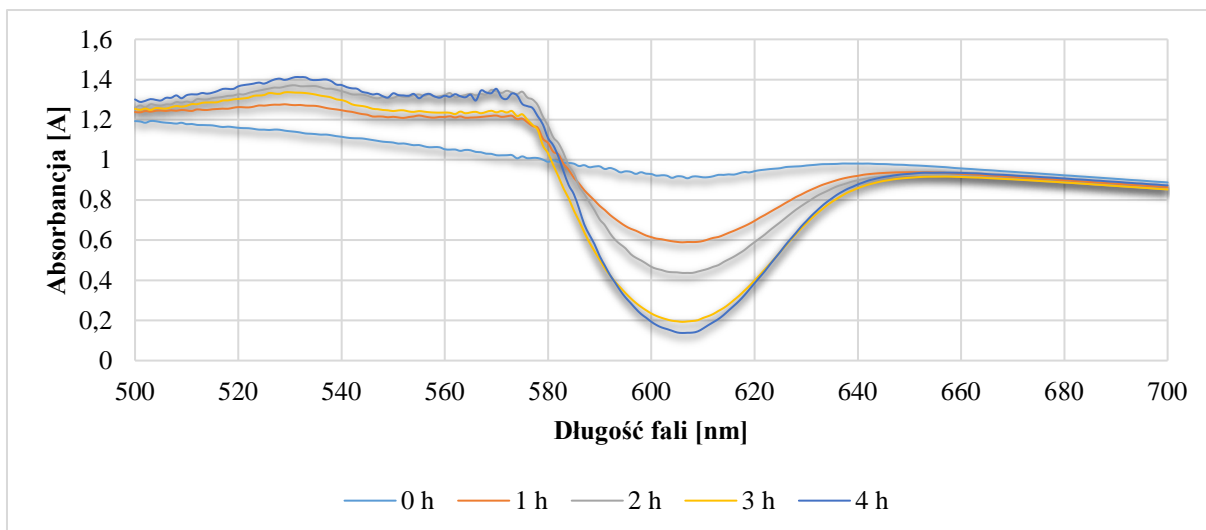
2.1. Wyznaczenie widm absorpcyjnych

Równoległe do oznaczeń spektrofotometrycznych wyznaczano widma adsorpcyjne dla układu: resazuryna Kit + pożywka + spory. Doświadczenie polegało na wykreśleniu widma Vis dla badanego wariantu resazuryny (tabela 63), w celu określenia absorbancji przy analitycznej długości fali (λ_{max}). Pomiar wykonywano na spektrofotometrze jednowiązkowym. W tym celu mierzono absorbancję próby w odniesieniu do próby zerowej w odstępach co 5 nm (w zakresie światła widzialnego – od 500 do 700 nm).

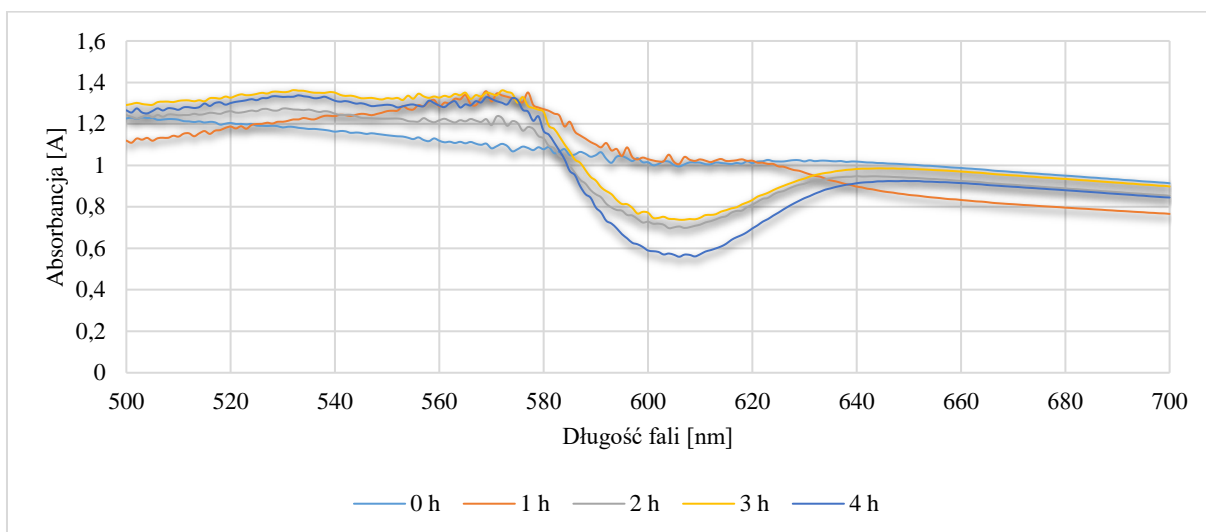
Tabela 63. Zmienne eksperymentalne

L.p.	Temperatura inkubacji	Czas inkubacji
1	55°C	0, 1, 2, 3, 4h
2	60°C	0, 1, 2, 3, 4h
3	80°C	0, 1, 2, 3, 4h

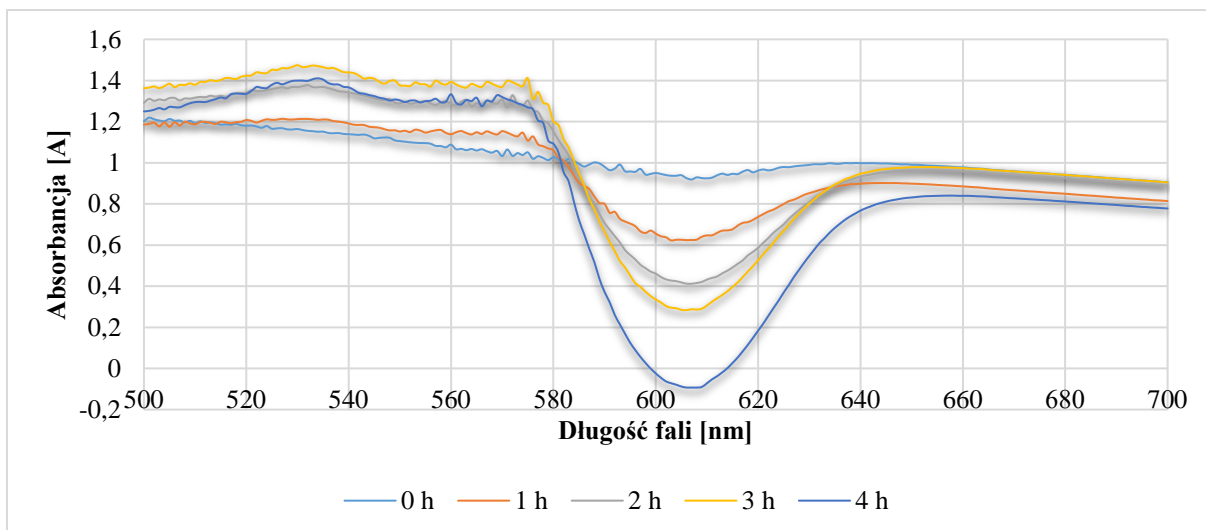
Na wykresach 6-8 przedstawiono uzyskane widma. W każdym wariacie temperatury obserwowano piki (znaczące zmiany poziomu absorbancji) w zakresie fali 580-640 nm. **Maksimum absorbancji uzyskiwano przy długości 600 ±5 nm.** W kolejnych doświadczeniach pomiary absorbancji wykonywano przy długości fali 600 nm. Największe różnice w zmianie absorbancji, wynikające z prowadzenia inkubacji kompleksu medium germinacyjne+spory+resazuryna zaobserwowano w wariacie przy temperaturze 80°C.



Wykres 6. Widmo Vis dla Resazuryny KIT – hodowla w 55°C.



Wykres 7. Widmo Vis dla Resazuryny komercyjnej – hodowla w 60°C.



Wykres 8. Widmo Vis dla Resazuryny komercyjnej – hodowla w 80°C.

2.2. Kinetyka zmiany barwy – układ resazuryna z pożywką

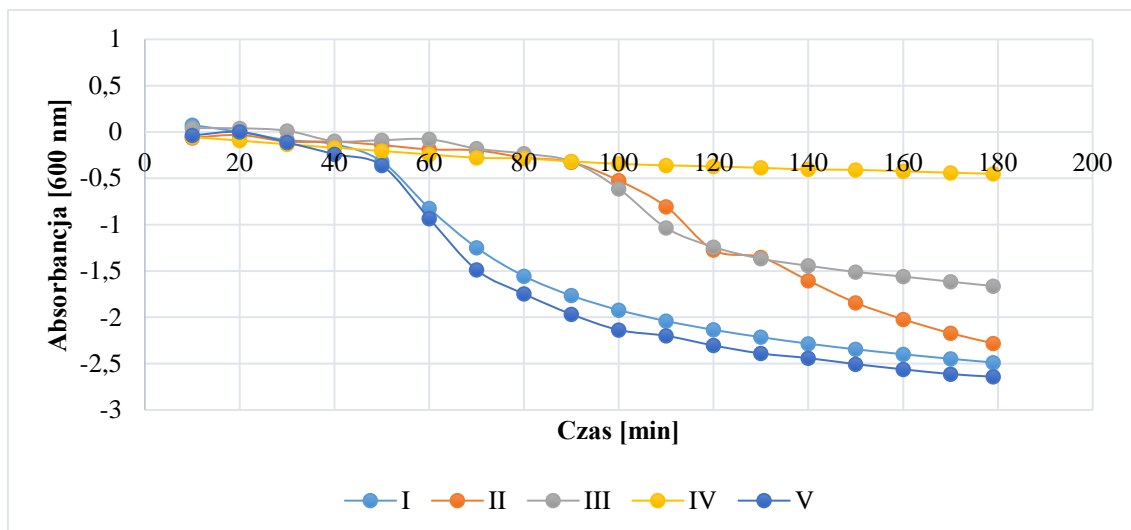
W toku badań nad kinetyką zmiany barwy, podjęto próbę oceny zmiany barwy resazuryny, jako wskaźnika redox. W badaniach tych użyto komercyjnej resazuryny (Resazuryna KIT, SIGMA). Pomiaru absorbancji dokonywano wykorzystując metodę spektrofotometryczną (przy długości fali 600 nm – rekomendowaną przez biuletyn dołączony do produktu Resazuryna KIT). Pomiar dokonywano przez 180 min (w odstępach 10 minutowych). Wykonano 5 powtórzeń, których wyniki przedstawiono w tabeli 64 oraz na wykresie 9. Uzyskane wyniki charakteryzowały się dużym rozrzutem (brak powtarzalności, duże odchylenie standardowe). Było to spowodowane różną dostępnością tlenu w układzie pomiarowym.

Ze względu na niezadawalające wyniki uśrednionych pomiarów oraz ich odchyłeń standardowych powtórzono badania, ograniczając dostępność tlenu w układzie. W tym celu szklaną kuwetę (tuż przed pomiarem) oklejono parafilmem (folia uszczelniająca).

Otrzymane wyniki przedstawiono w tabeli 65 oraz na wykresie 10. Uszczelnienie układu pozwoliło otrzymać wyniki oscylujące na podobnym poziomie – dla długości fali 600 nm. Wykonano pięć powtórzeń, które charakteryzowały się bardzo małymi odchyleniami względem siebie.

Tabela 64. Wyniki uzyskane podczas pomiaru kinetyki zmiany barwy resazuryiny KIT – układ bez parafilmu

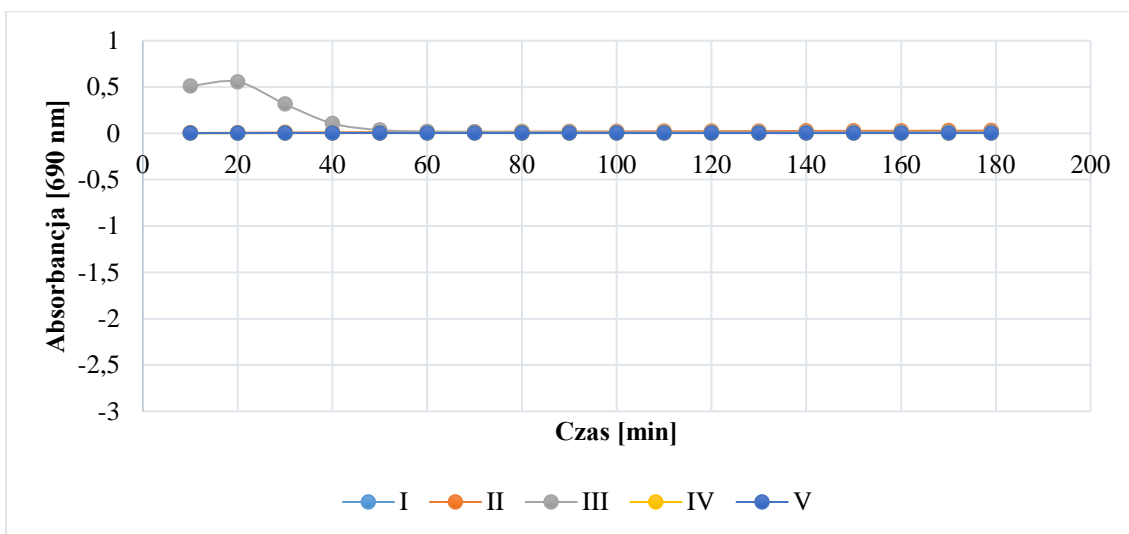
Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie				
		I	II	III	IV	V
		600 nm				
10	600	0,074642	-0,0621	0,040549	-0,05488	-0,03672
20	1200	0,000874	-0,03233	0,04017	-0,09297	0,000143
30	1800	-0,08649	-0,10357	0,013615	-0,1322	-0,11195
40	2400	-0,13139	-0,1036	-0,09843	-0,17032	-0,2393
50	3000	-0,31915	-0,14142	-0,08838	-0,20487	-0,36048
60	3600	-0,82314	-0,1873	-0,07806	-0,24211	-0,93394
70	4200	-1,24799	-0,1979	-0,17914	-0,27764	-1,48844
80	4800	-1,55469	-0,27525	-0,23297	-0,28575	-1,74719
90	5400	-1,76529	-0,32549	-0,31808	-0,3168	-1,96624
100	6000	-1,92101	-0,52463	-0,61311	-0,34381	-2,13638
110	6600	-2,04008	-0,80521	-1,03456	-0,35968	-2,1996
120	7200	-2,13464	-1,27439	-1,24082	-0,37168	-2,30378
130	7800	-2,21425	-1,35146	-1,36751	-0,38675	-2,38996
140	8400	-2,28426	-1,60337	-1,44332	-0,40405	-2,44032
150	9000	-2,3452	-1,84278	-1,51005	-0,4081	-2,50509
160	9600	-2,39836	-2,02132	-1,55992	-0,42399	-2,56104
170	10200	-2,44727	-2,17105	-1,61519	-0,43903	-2,61233
179	10740	-2,48768	-2,28054	-1,66261	-0,45102	-2,64123
Średnia		-1,45141	-0,85021	-0,71932	-0,29809	-1,59299
odchylenie standardowe		0,941079	0,803872	0,663607	0,120047	0,987194



Wykres 9. Kinetyka zmiany barwy dla resazuryny KIT – bez parafilmu – długość fali 600 nm.

Tabela 65. Wyniki uzyskane podczas pomiaru kinetyki zmiany barwy resazuryny KIT – układ z parafilmem.

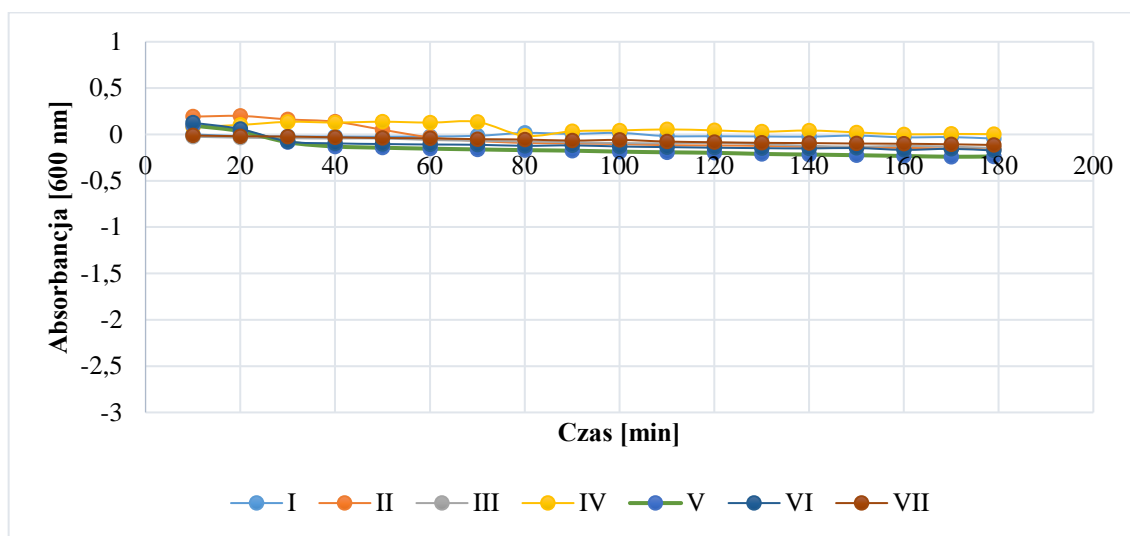
Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie				
		I	II	III	IV	V
		600 nm				
10	600	0,013899	-0,03029	0,32067	0,045011	0,072871
20	1200	0,05127	0,070734	0,320639	0,120297	0,053612
30	1800	0,031837	-0,0487	0,131601	0,080612	-0,01607
40	2400	-0,02124	-0,06599	0,083273	0,099667	-0,01607
50	3000	-0,02138	0,04789	0,039787	0,04406	0,114318
60	3600	-0,02126	-0,06603	-0,06933	0,027021	0,035091
70	4200	0,071532	-0,06602	-0,08502	0,027103	0,017408
80	4800	-0,03763	0,048095	-0,03589	0,061959	-0,04701
90	5400	0,071552	0,048136	-0,05281	0,062041	-0,01605
100	6000	-0,00416	-0,06576	0,039869	0,061887	0,035111
110	6600	0,115038	0,006822	0,019617	0,010768	-0,07598
120	7200	0,032021	-0,031	0,061043	0,099882	0,035111
130	7800	0,032062	-0,01249	0,039879	0,163507	-0,01601
140	8400	-0,05339	-0,01247	0,106855	-0,02007	-0,04703
150	9000	0,013592	-0,08207	-0,06929	0,027389	-0,06174
160	9600	0,051362	0,070509	-0,08504	0,120113	0,035152
170	10200	0,051362	-0,03093	0,106865	0,080612	-0,04695
179	10740	0,032092	0,070519	-0,06925	-0,02005	0,01752
Średnia		0,022697	-0,00828	0,044636	0,060656	0,004071
odchylenie standardowe		0,042309	0,052881	0,11988	0,047689	0,049295



Wykres 10. Kinetyka zmiany barwy dla resazuryiny KIT + parafilm – długość fali 600 nm.

2.3. Kinetyka zmiany barwy – układ : medium germinacyjne + resazuryna (proszek)

W kolejnym etapie zmodyfikowano dodatek wskaźnika – stosując resazurynę rozpuszczoną w buforze Dulbecco's. Dodatek resazuryny o stężeniu 0,01% nadal stanowił 10%, a medium germinacyjnym była zoptymalizowana pożywka III (suplementowana alaniną i asparaginą). W doświadczeniu tym także uszczelniono układ folią (parafilm). Wykonano 7 powtórzeń, których wyniki przedstawiono na wykresie 11 oraz w tabeli 66. Uzyskane wyniki oscylowały na poziomie absorbancji zbliżonym do zera.



Wykres 11. Kinetyka zmiany barwy dla medium germinacyjnego z resazuryną (zabezpieczone para filmem) długość fali 600 nm.

Tabela 66. Wyniki spektroskopowego pomiaru absorbancji dla układu resazuryna + medium germinacyjne.

Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
		Długość fali = 600 nm						
10	600	0,000918	0,192362	-0,02493	0,080418	0,09595	0,126353	-0,01141
20	1200	-0,01798	0,199479	-0,03458	0,102644	0,0359	0,058864	-0,01921
30	1800	-0,0214	0,162673	-0,04063	0,135821	-0,08373	-0,07542	-0,02271
40	2400	-0,02247	0,137196	-0,0439	0,12872	-0,13	-0,09613	-0,03101
50	3000	-0,02425	0,050942	-0,04377	0,13731	-0,14335	-0,10333	-0,0381
60	3600	-0,02139	-0,03136	-0,05996	0,127817	-0,15327	-0,10858	-0,04174
70	4200	-0,01482	-0,07054	-0,06854	0,134882	-0,1615	-0,11155	-0,05098
80	4800	0,015938	-0,09172	-0,07589	-0,01409	-0,16942	-0,12286	-0,05459
90	5400	0,006679	-0,09708	-0,08391	0,033932	-0,17508	-0,11801	-0,06633
100	6000	0,016009	-0,10389	-0,09276	0,043012	-0,18547	-0,13011	-0,05903
110	6600	-0,01792	-0,11601	-0,09583	0,054263	-0,19273	-0,13668	-0,07691
120	7200	-0,01936	-0,11871	-0,0926	0,043821	-0,19823	-0,14309	-0,08388
130	7800	-0,02166	-0,1236	-0,10522	0,029768	-0,21026	-0,14795	-0,09079
140	8400	-0,02374	-0,13474	-0,12273	0,042287	-0,21706	-0,15117	-0,09314
150	9000	-0,0127	-0,14167	-0,13157	0,022337	-0,224	-0,14671	-0,09817
160	9600	-0,03113	-0,14545	-0,12368	0,001269	-0,2324	-0,16645	-0,1005
170	10200	-0,02873	-0,15167	-0,13217	0,005523	-0,24067	-0,15535	-0,10627
179	10740	-0,04478	-0,15983	-0,14565	0,003057	-0,23745	-0,17362	-0,11373
średnia		-0,01571	-0,04131	-0,08435	0,061822	-0,15682	-0,10565	-0,06436
odchylenie standardowe		0,015553	0,124567	0,036604	0,051579	0,088779	0,075162	0,031539

2.4. Kinetyka zmiany barwy –UKŁAD: medium germinacyjne + resazuryna + spory

Ocena termostabilności wskaźnika redox w różnych wariantach czasowych (punkt 2.1) oraz wstępna ocena wizualna (punkt 2.4) stanowią punkt wyjścia do wyznaczenia kinetyki zmiany barwy pełnego układu doświadczalnego (medium + resazuryna + spory). Pomiar dokonywano na spektrofotometrze (SPECORD 205), wyznaczając zmieniającą się absorbancję przy długościach fali 600 nm. Zastosowano różne czasy inkubacji – wprowadzono do doświadczeń preinkubację spor w temperaturze 80°C, mającą na celu aktywację spor [Yildiz i Westhoff, 1989]. We wszystkich wariantach doświadczeń pomiary spektrofotometryczne rozpoczynano dopiero po okresie preinkubacji, dokonując pomiarów w odstępach 1 min. Ze względu na dużą liczbę punktów pomiarowych, z danych wyekstrahowano wyniki w odstępach 10 min.

W ramach badań przeprowadzono trzy tury doświadczeń :

A-brak preinkubacji,

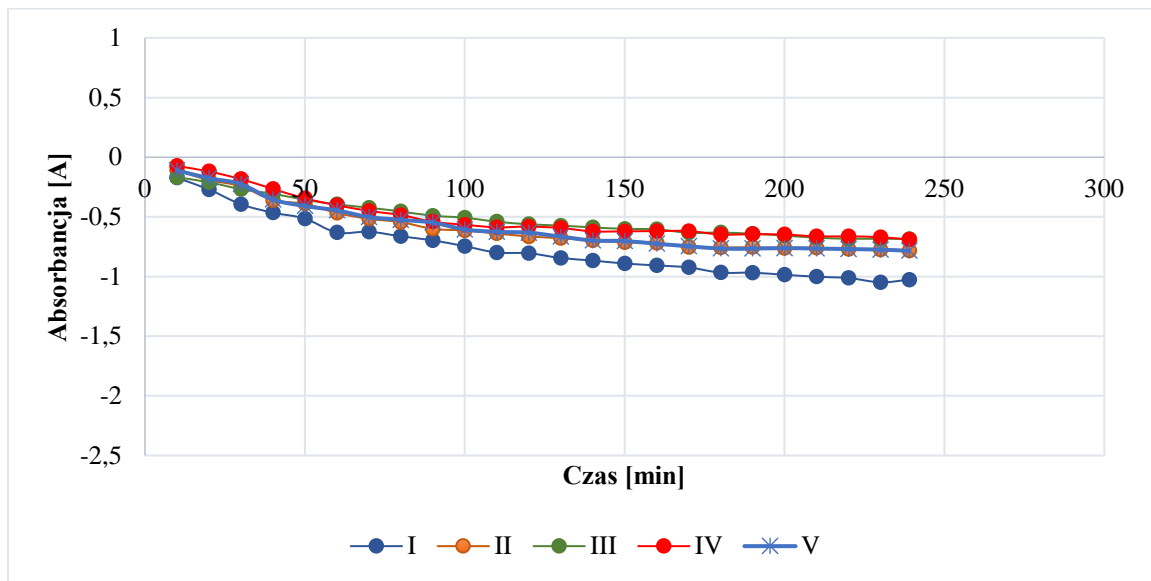
B-0,5 h preinkubacja

C- 1h preinkubacja.

Na wykresach 12-14 oraz w tabelach 67-70 przedstawiono uzyskane wyniki.

Dla prób bez preinkubacji maksymalny spadek absorbancji po 240 minutach wyniósł -1. Dla prób z 0,5 i 1h preinkubacji spadek ten był 2 razy większy i wyniósł -2. Uzyskane wyniki charakteryzowały się jednak małą powtarzalnością, co mogło być spowodowane wprowadzeniem do układu spor zimmobilizowanych na tlenku krzemu, który mógł spowodować rozproszenie wiązki świetlnej.

A. Brak preinkubacji



Wykres 12. Pomiar absorbancji dla układu: zoptymalizowane medium hodowlane + rezazuryna + spory (bez preinkubacji spor)

Tabela 67. Wyniki absorbcyjności dla doświadczenia bez preinkubacji.

Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie					średnia	Odch. Standard.
		I	II	III	IV	V		
		Absorbancja [600 nm]						
10	600	-0,04954	-0,01106	-0,01681	-0,00735	-0,01459	-0,01987	0,015179
20	1200	-0,16911	-0,14955	-0,14934	-0,12187	-0,15598	-0,14917	0,017244
30	1800	-0,3941	-0,24335	-0,26733	-0,18376	-0,22546	-0,2628	0,079499
40	2400	-0,46489	-0,36143	-0,30663	-0,26541	-0,35478	-0,35063	0,074813
50	3000	-0,51419	-0,38947	-0,3559	-0,34456	-0,4087	-0,40256	0,067475
60	3600	-0,63105	-0,46731	-0,39537	-0,40255	-0,44578	-0,46841	0,095705
70	4200	-0,62421	-0,51628	-0,42278	-0,44958	-0,50145	-0,50286	0,077717
80	4800	-0,66312	-0,54427	-0,45492	-0,48467	-0,5248	-0,53436	0,07992
90	5400	-0,69696	-0,60026	-0,49036	-0,54073	-0,54786	-0,57523	0,078401
100	6000	-0,74576	-0,61435	-0,50714	-0,56632	-0,60548	-0,60781	0,087941
110	6600	-0,79877	-0,63899	-0,54048	-0,58752	-0,62547	-0,63825	0,097549
120	7200	-0,80483	-0,6644	-0,56196	-0,58148	-0,63255	-0,64904	0,09608
130	7800	-0,84468	-0,67853	-0,57306	-0,59332	-0,66547	-0,67101	0,107096
140	8400	-0,86597	-0,69804	-0,58843	-0,62151	-0,69804	-0,6944	0,107244
150	9000	-0,89113	-0,71308	-0,6004	-0,62159	-0,70254	-0,70575	0,114686
160	9600	-0,90672	-0,7185	-0,60484	-0,61875	-0,72548	-0,71486	0,120704
170	10200	-0,92404	-0,75333	-0,63302	-0,61884	-0,74586	-0,73502	0,122559
180	10800	-0,9671	-0,75673	-0,63174	-0,64799	-0,76584	-0,75388	0,133926
190	11400	-0,96815	-0,75506	-0,64121	-0,64542	-0,76584	-0,75514	0,132765
200	12000	-0,98525	-0,76165	-0,65694	-0,64801	-0,76165	-0,7627	0,135895
210	12600	-1,00165	-0,75834	-0,67468	-0,66313	-0,76548	-0,77266	0,136281
220	13200	-1,01285	-0,76974	-0,68328	-0,66315	-0,76974	-0,77975	0,139138
230	13800	-1,04831	-0,77463	-0,68339	-0,67053	-0,77463	-0,7903	0,152344
239	14340	-1,02651	-0,78248	-0,68584	-0,68968	-0,78456	-0,79381	0,138622

W celu oznaczenia czasu niezbędnego do wiarygodnej oceny, czy próba wykazuje statystycznie istotną różnicę i można ją uważać za pozytywny odczyt, wykorzystano pojęcia granicy wykrywalności (ang. Limit of Detection LOD) i granicy oznaczalności (ang. Limit of Quantification LOQ). Granica wykrywalności jest to najmniejsza wartość pomiaru możliwa do wykrycia za pomocą danej procedury czy techniki analitycznej z określonym prawdopodobieństwem. Granica wykrywalności jest ściśle związana z określoną procedurą analityczną, jak również poziomem szumów stosowanego urządzenia pomiarowego. Granica oznaczalności jest to najmniejsza wartość pomiaru możliwa do ilościowego oznaczenia za pomocą danej procedury analitycznej z założoną dokładnością i precyzją. Wartość granicy

oznaczalności jest wielokrotnością granicy wykrywalności i wynosi $LOQ = 3 \times LOD$ [Szczepaniak, 2002; Konieczka i Namieśnik, 2007].

W celu określenia granicy wykrywalności i granicy oznaczalności dla danej metody pomiarowej wykazano, że wyniki pomiarów mają rozkład normalny (metoda Pearsona, obliczenia z wykorzystaniem programu Microsoft Excel). Następnie wykorzystano test t-Studenta do oceny czy dane średnie różnią się istotnie pod względem statystycznym (obliczenia z wykorzystaniem programu Microsoft Excel). Test t Studenta jest metodą statystyczną służącą do porównania dwóch średnich między sobą jeśli znamy liczbę pomiarów, średnią arytmetyczną oraz wartość odchylenia standardowego. Jeśli wynik testu t Studenta będzie istotny na poziomie $p < 0,05$ możemy odrzucić hipotezę zerową, że analizowane średnie są równe, na rzecz hipotezy alternatywnej, że różnice są istotne statystycznie.

Ocena istotności różnicy pomiędzy pomiarami spektrofotometrycznymi w poszczególnych okresach pomiarowych, wykazała, że pierwsza statystycznie istotna zmiana nastąpiła po 20 min (tabela 68).

Tabela 68. Wyniki absorbancji dla doświadczenia bez preinkubacji – dane szczegółowe do obliczeń statystycznych.

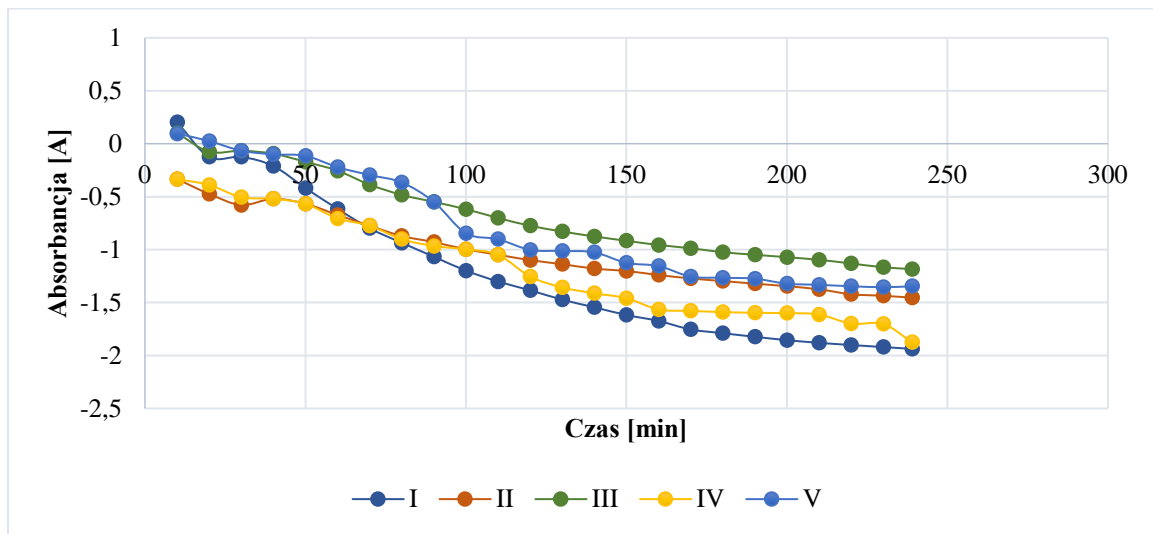
Czas [min]	Czas [s]	I	II	III	IV	V	Średnia	Odchylenie standardowe	poziom istotności w teście t-studenta
0	0	-0,02784	0,004	0,004973	0,003563	0,0033	-0,0024	0,012732379	0
1	60	0,048342	-0,03743	-0,03374	0,102692	0,054	0,026772	0,054322058	0,1631249
5	300	-0,02408	-0,03174	-0,02912	0,023472	-0,00288	-0,01287	0,020813738	0,2079284
10	600	-0,04954	-0,01106	-0,01681	-0,00735	-0,01459	-0,01987	0,015179363	0,0579343
15	900	-0,16073	-0,03303	-0,03976	-0,00723	-0,02745	-0,05364	0,0546351	0,0525764
20	1200	-0,16911	-0,14955	-0,14934	-0,12187	-0,15598	-0,14917	0,015423638	2,281E-07

Legenda:

Kolorem czerwonym zaznaczono poziom istotności $p < 0,05$

Przyjmując czas 20 minut za poziom wykrywalności istotny statystycznie ($p < 0,05$), i fakt, że osiągnął on poziom absorbancji $A = 0,14917$, można przyjąć że limit oznaczalności w metodzie spektrofotometrycznej będzie **wynosił 60 minut**. Czas ten został obliczony na podstawie wzoru: $LOQ = 3 \times LOD$ ($3 \times 0,14917$), co odpowiada poziomowi $A = 0,44751$.

B. 0,5 h preinkubacja

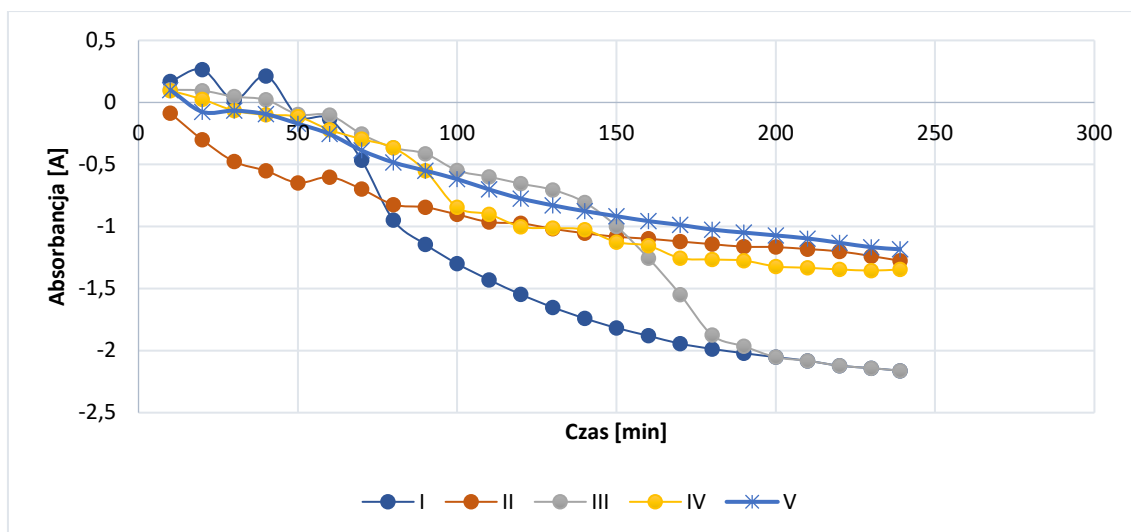


Wykres 13. Pomiar absorbancji dla układu: zoptymalizowane medium hodowlane + resazuryna + spory (0,5 h preinkubacja spor)

Tabela 69. Wyniki absorbancji dla doświadczenia z 0,5 h pre-inkubacją

Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie					średnia	Odch. Standard.
		I	II	III	IV	V		
		Absorbancja [600 nm]						
40	240	0,204298	-0,33384	0,100965	-0,33384	0,09546	-0,053391	0,259658
50	300	-0,12478	-0,47334	-0,07549	-0,38954	0,025478	-0,207534	0,213517
60	360	-0,12468	-0,57868	-0,06588	-0,50458	-0,06588	-0,26794	0,252358
70	420	-0,21058	-0,51981	-0,09447	-0,51981	-0,09987	-0,288908	0,215817
80	480	-0,4189	-0,56743	-0,17065	-0,56743	-0,11456	-0,367794	0,215241
90	540	-0,61513	-0,67216	-0,25489	-0,70548	-0,22145	-0,493822	0,235899
100	600	-0,79855	-0,77431	-0,38627	-0,77431	-0,29547	-0,605782	0,244153
110	660	-0,93553	-0,8712	-0,48309	-0,90125	-0,36547	-0,711308	0,266273
120	720	-1,06677	-0,92885	-0,54944	-0,96548	-0,54944	-0,811996	0,244946
130	780	-1,19833	-0,9969	-0,61825	-0,9969	-0,84578	-0,931232	0,215189
140	840	-1,30089	-1,04827	-0,70107	-1,04827	-0,90124	-0,999948	0,220402
150	900	-1,38384	-1,09929	-0,77454	-1,25467	-1,00214	-1,102896	0,234493
160	960	-1,47279	-1,13731	-0,8289	-1,3569	-1,0125	-1,16168	0,259081
170	1020	-1,54441	-1,17922	-0,87561	-1,41254	-1,02547	-1,20745	0,273695
180	1080	-1,61735	-1,20205	-0,91647	-1,45879	-1,1254	-1,264012	0,276868
190	1140	-1,67377	-1,23959	-0,95632	-1,5648	-1,1547	-1,317836	0,296273
200	1200	-1,75376	-1,27199	-0,98686	-1,57856	-1,25478	-1,36919	0,300185
210	1260	-1,78921	-1,29689	-1,02438	-1,58976	-1,26547	-1,393142	0,29878
220	1320	-1,82314	-1,32145	-1,04857	-1,59654	-1,2745	-1,41284	0,300946
230	1380	-1,85478	-1,34556	-1,07161	-1,6	-1,3214	-1,43867	0,298467
240	1440	-1,88015	-1,3747	-1,09621	-1,61254	-1,33254	-1,459228	0,298185
250	1500	-1,90075	-1,42124	-1,13075	-1,6987	-1,3457	-1,499428	0,302671
260	1560	-1,92011	-1,43594	-1,1665	-1,70214	-1,35478	-1,515894	0,296861
269	1614	-1,93717	-1,45391	-1,1835	-1,87456	-1,34587	-1,559002	0,331685

C. 1 h preinkubacja



Wykres 14. Pomiar absorbcyjności dla układu: zoptymalizowane medium hodowlane + resazuryna + spory (1 h pre-inkubacja spor)

Tabela 70. Wyniki absorbcji dla doświadczenia z 1 h preinkubacją.

Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie					średnia	Odch. Standard.
		I	II	III	IV	V		
		Absorbancja [600 nm]						
70	420	0,168682	-0,08677	0,10245	0,09546	0,100965	0,076157	0,095898
80	480	0,265138	-0,30062	0,09546	0,025478	-0,07549	0,001993	0,209828
90	540	0,022086	-0,47662	0,04687	-0,06588	-0,06588	-0,10788	0,21233
100	600	0,213977	-0,55045	0,02111	-0,09987	-0,09447	-0,10194	0,281143
110	660	-0,11035	-0,64735	-0,09547	-0,11456	-0,17065	-0,22768	0,236335
120	720	-0,1325	-0,60144	-0,10254	-0,22145	-0,25489	-0,26256	0,199443
130	780	-0,46486	-0,69838	-0,25478	-0,29547	-0,38627	-0,41995	0,175678
140	840	-0,94863	-0,82332	-0,36547	-0,36547	-0,48309	-0,5972	0,271593
150	900	-1,14324	-0,84442	-0,4125	-0,54944	-0,54944	-0,69981	0,293816
160	960	-1,29972	-0,90244	-0,54789	-0,84578	-0,61825	-0,84282	0,295693
170	1020	-1,42912	-0,96415	-0,5987	-0,90124	-0,70107	-0,91886	0,321194
180	1080	-1,54736	-0,97451	-0,65478	-1,00214	-0,77454	-0,99067	0,342721
190	1140	-1,65091	-1,01822	-0,70459	-1,0125	-0,8289	-1,04302	0,364506
200	1200	-1,73983	-1,05371	-0,80456	-1,02547	-0,87561	-1,09984	0,372396
210	1260	-1,81715	-1,08255	-0,99877	-1,1254	-0,91647	-1,18807	0,360695
220	1320	-1,88024	-1,09821	-1,2547	-1,1547	-0,95632	-1,26883	0,358407
230	1380	-1,94397	-1,12071	-1,5478	-1,25478	-0,98686	-1,37082	0,38186
240	1440	-1,98638	-1,14199	-1,8745	-1,26547	-1,02438	-1,45854	0,440912
250	1500	-2,02086	-1,16228	-1,9654	-1,2745	-1,04857	-1,49432	0,462716
260	1560	-2,05251	-1,16564	-2,05251	-1,3214	-1,07161	-1,53273	0,482802
270	1620	-2,08177	-1,18177	-2,08177	-1,33254	-1,09621	-1,55481	0,488429
280	1680	-2,12159	-1,20047	-2,12159	-1,3457	-1,13075	-1,58402	0,496821
290	1740	-2,14101	-1,23816	-2,14101	-1,35478	-1,1665	-1,60829	0,490923
299	1794	-2,16208	-1,27561	-2,16208	-1,34587	-1,1835	-1,62583	0,492904

2.5. Kinetyka zmiany barwy –UKŁAD: medium germinacyjne + resazuryna + spory zliofilizowane

W kolejnym etapie badań podjęto próbę pomiaru spektrofotometrycznego (kinetykę zmiany barwy) dla układu składającego się z medium germinacyjnego + resazuryna + zliofilizowane spory (jako nośnik zastosowano tlenek krzemu). Pomiar dokonywano na spektrofotometrze (SPECORD 205), wyznaczając zmieniającą się absorbancję przy długościach fali 600 nm.

W tabeli 71 przedstawiono wyniki przykładowego doświadczenia. Z danych przedstawionych w tabeli można zaobserwować brak korelacji pomiędzy czasem pomiaru kinetyki zmiany barwy a spadkiem absorbancji. Pojawiające się losowo wartości absorbancji na poziomie maksymalnym (7) świadczą o tym, że próbie pojawiają się czynniki, które uniemożliwiają przejście wiązki światła przez kuwetę pomiarową. Doświadczenia powtarzano wielokrotnie uzyskując ten sam efekt zaburzeń. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tych odchyień jest ruch cząstek stałych tlenku krzemu w temperaturze inkubacji ($t=55^{\circ}\text{C}$). Temperatura taka może powodować wystąpienie ruchów dyfuzyjnych czy ruchów Browna. Efektów takich nie obserwowano w temperaturze pokojowej. Z tego względu tlenek krzemu nie jest odpowiednim nośnikiem dla spor *Geobacillus stearothermophilus* do wykorzystania w metodzie spektrofotometrycznej.

Tabela 71. Wyniki absorbancji [$\lambda=600\text{ nm}$] dla doświadczenia ze sporami zliofilizowanymi

Czas [min]	Czas [s]	Powtórzenie						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
0	0	1,172	-0,31724	-0,01618	-0,01627	-0,3172	-0,4141	-0,41412
10	600	1201	7	-0,41403	-0,41403	-0,41405	7	-0,41395
20	1200	2401	-0,61786	-0,41372	-0,618	-0,19198	-0,19196	-0,61798
30	1800	3601	-0,66895	-0,49299	-0,55984	7	7	-0,618
40	2400	4800,984	0,285283	-0,66897	-0,19194	0,285221	-0,31687	-0,61782
50	3000	6000,984	-0,31656	-0,31664	-0,19177	-0,41366	-0,19169	-0,71471
60	3600	7201	0,285532	-0,55955	0,285428	-0,49268	0,285407	7
70	4200	8401	-0,41354	-0,61753	0,285407	-0,31658	-0,41352	-0,41354
80	4800	9601	-0,41339	-0,4135	-0,41347	-0,49262	-0,41337	-0,61746
90	5400	10800,98	-0,49258	0,285656	-0,55949	-0,01533	-0,55947	-0,75578

2.6. Precyzja, powtarzalność metody spektrofotometrycznej

Precyzja metody określa stopień zgodności między wynikami uzyskanymi tą samą metodą i na tej samej próbce przy wielokrotnym powtarzaniu oznaczeń. Charakteryzuje ona stopień rozproszenia zbioru wyników pomiarów względem prawdziwej wartości badanej cechy. Jest zatem wykładnikiem błędów losowych, występujących w przypadku posługiwania się daną metodą. Miarą precyzji jest odchylenie standardowe, względne odchylenie standardowe lub współczynnik zmienności $V[\%]$. Powtarzalność wyznacza się na podstawie wartości obliczonego odchylenia standardowego serii pomiarów przeprowadzonych w danym laboratorium, przez danego analityka z wykorzystaniem danego urządzenia pomiarowego, w relatywnie krótkim czasie [Konieczka i Namieśnik, 2007].

W celu oznaczenia powtarzalności wykorzystanych metod (pomiaru spektrofotometrycznego) wykonano po 10 równoległych pomiarów w trzech punktach pomiarowych. Wartość liczbowa współczynnika V obliczono wg wzoru:

$$V = OS / X_{\text{sr}}$$

OS – odchylenie standardowe

X_{sr} – wartość średnia pomiaru

Pomiary spektrofotometryczne

Wartości pomiarowe (próby właściwe, z dodatkiem przetrwalników)

0 min. -0,1106; -0,1106; -0,1201; -0,1059; -0,1207; -0,1237; -0,1248; -0,109; -0,1195; -0,1128; -0,1178 (absorbancja)

$X_{\text{sr}} = -0,1165$ OS = 0,0065 **V = 5,58%**

30 min. -0,2433; -0,2398; -0,2502; -0,2459; -0,2452; -0,2350; -0,2576; -0,2440; -0,2499; -0,2569 (absorbancja)

$X_{\text{sr}} = -0,2468$ OS = 0,0071 **V = 2,88%**

60 min. -0,4670; -0,4898; -0,5032; -0,4408; -0,4451; -0,4583; -0,4448; -0,4983; -0,4872; -0,4943

$X_{\text{sr}} = -0,4729$ OS = 0,0244 **V = 5,14%**

Podsumowując, stosowane metody badawcze (pomiar spektrofotometryczny) charakteryzowały się dobrą precyzją i powtarzalnością, a współczynnik zmienności nie przekroczył 6% [Szczepaniak, 2002; Konieczka i Namieśnik, 2007].

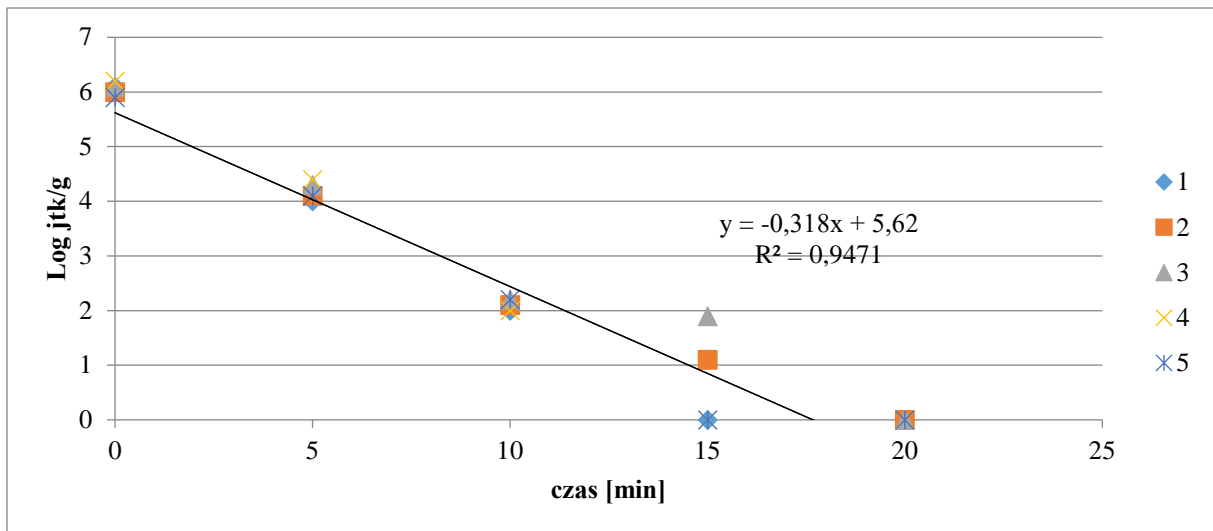
3. Badania mające na celu określenie zakresu ekspozycji na proces sterylizacji metodą parową i plazmową (wyznaczenie czasu przeżycia i czasu zabicia badanych przetrwalników bakterii)

Badania te oparte były na wyznaczeniu krzywej przeżycia dla przetrwalników bakterii *Geobacillus stearothermophilus* zimmobilizowanych na tlenku krzemu (liczebność drobnoustrojów w próbie – 10^6 jtk/g). Ustalenie zakresu przeprowadzonych badań dokonano w oparciu o normę ISO 11138-1 i badania Iciek i wsp., 2007, Iciek i wsp., 2011. Próba właściwa zawierała 10^6 jtk/g i jest to zgodne z punktem 6.3.2 normy ISO 11138-1, która zakłada że liczba zdolnych do życia organizmów powinna się wahać pomiędzy 50 - 300 % wartości ustalonej przez producenta. Minimalna liczba próbek pobieranych do badania początkowej liczby zdolnych do życia organizmów testowych powinna wynosić co najmniej 4. Minimalna liczba warunków ekspozycji na proces sterylizacji powinna wynosić co najmniej 5 (przynajmniej 4 próby dla poszczególnych warunków ekspozycji). Minimalna całkowita liczba próbek pobieranych do badań nie powinna być mniejsza niż 20 (tabela 72, wykres 15).

Warunki sterylizacji parowej: 121°C, czynnik jałowiący – przegrzana para wodna, czasy ekspozycji: 0, 5, 10, 15, 20 min, autoklaw SMS. Na tej podstawie wyliczono wartość D (wartość redukcji dziesięciokrotnej).

Tabela 72. Liczebność spor *Geobacillus stearothermophilus* uzyskana w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy SMS).

czas ekspozycji [min]	Liczebność [jtk/g]				
	Powtórzenie				
	1	2	3	4	5
0	$6,1 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^6$	$6,1 \cdot 10^6$	$6,2 \cdot 10^6$	$5,9 \cdot 10^6$
5	$4 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^6$	$4,4 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^6$
10	$2 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
15	0	$1,1 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	0	0
20	0	0	0	0	0



Wykres 15. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearotherophilus* w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy SMS).

Obliczenia wartości D dokonano w oparciu o następujący wzór [PN-EN ISO 11138-1]

$$D = -1(m)$$

m- nachylenie najlepiej dopasowanej krzywej prostoliniowej

Dla przeprowadzonej serii doświadczeń z użyciem sterylizatora firmy SMS wartość

D= 3,1 min.

Czas potrzebny do zabicia wszystkich form przetrwalnikowych w badanej próbce wynosił

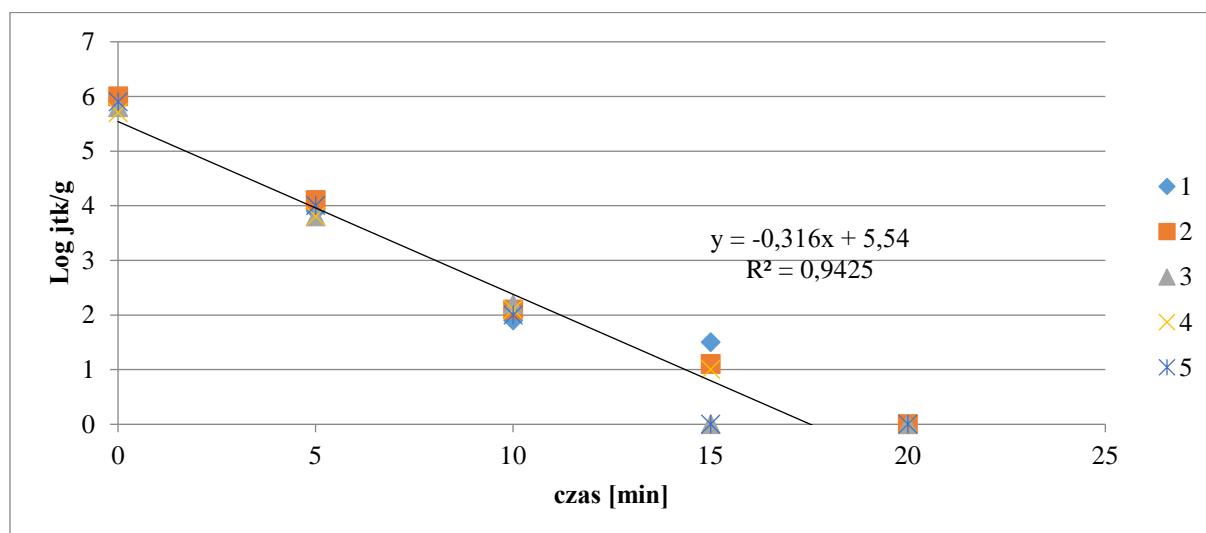
20 min.

4. Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom w warunkach zbliżonych do rzeczywistych przeprowadzonych na urządzeniach do sterylizacji różnych producentów

Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom **sterylizacji parowej** przeprowadzono dla 2 producentów autoklawów: SMS i Getinge. **Warunki sterylizacji parowej dla autoklawu Getinge:** 121°C, czynnik jałowiący – przegrzana para wodna, czasy ekspozycji: 0, 5, 10, 15 i 20 min (tabela 73 wykres 16).

Tabela 73. Liczebność spor *Geobacillus stearothermophilus* uzyskana w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy Getinge).

czas ekspozycji [min]	Liczebność[jtk/g]				
	Powtórzenie				
	1	2	3	4	5
0	5,9*10 ⁶	6*10 ⁶	5,8*10 ⁶	5,7*10 ⁶	5,9*10 ⁶
5	3,9*10 ⁶	4,1*10 ⁶	3,8*10 ⁶	3,8*10 ⁶	4*10 ⁶
10	1,9*10 ⁶	2,1*10 ⁶	2,2*10 ⁶	2,1*10 ⁶	2*10 ⁶
15	1,5*10 ⁶	1,1*10 ⁶	0	1*10 ⁶	0
20	0	0	0	0	0



Wykres 16. Krzywe przeżycia spor *Geobacillus stearothermophilus* w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy Getinge).

Obliczenia wykonano analogicznie jak dla sterylizatora SMS.

D = 3,2 min.

Czas zabicia - 20 min.

Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy w badaniach przeprowadzonych na urządzeniach do sterylizacji parowej różnych producentów (SMS, Getinge)

5. Badania symulacyjne – 2018 r.

W ramach niniejszego etapu projektu przeprowadzono badania, w których zasymulowano warunki zbliżone do rzeczywistych. Przygotowane liofilizaty spor *Geobacillus stearothermophilus* poddano sterylizacji plazmowej i parowej.

5.1. Sterylizacja plazmowa

Odpowiednio przygotowane i zabezpieczone zliofilizowane spory trafiły do laboratorium firmy Informer Med, gdzie poddane zostały one sterylizacji plazmowej. W tabeli 74 przedstawiono parametry procesu. Wykonano 3 serie badań, różniących się partią testowanych spor.

Tabela 74. Parametry jałowienia

L.p.	Temperatura	Czas
Seria I	55°C	30 min
Seria II	55°C	30 min
Seria III	55°C	30 min

Otrzymane, wysterylizowane spory poddano ocenie stopnia jałowości. Jego wyznacznikiem była:

- Ocena wizualna (przy użyciu wskaźnika resazuryny)
- Pomiar ilości ATP
- Posiew ilościowy

W tabeli 75-77 przedstawiono uzyskane wyniki oceny wizualnej zmiany barwy resazury (roztwór Dulbecco's przygotowany i przechowywany od października 2017r.). Hodowle prowadzono z użyciem wysterylizowanych spor, zawieszonych w wyselekcjonowanej pożywce III (z dodatkiem germinantów). Hodowle inkubowano w 55°C przez okres 240 minut (z dodatkiem 10% kitu wskaźnika). Wyniki wskazują, że w żadnym z powtórzeń nie uzyskano zmiany barwy z niebiesko – fioletowej na różową, co świadczy o skuteczności procesu sterylizacji.

Tabela 75. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji plazmowej - I seria.

Ocena wizualna						
nr powtórzenia	0h	0,5 h	1h	2 h	3 h	4 h
Seria I	Inkubacja 55°C, bez wytrząsania					
1.1	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.2	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.3	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.4	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.5	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
	Inkubacja 55°C, z wytrząsaniem					
1.6	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.7	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.8	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.9	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.10	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z

b/z – bez zmiany barwy

Tabela 76. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji plazmowej – II seria.

Ocena wizualna						
nr powtórzenia	0h	0,5 h	1h	2 h	3 h	4 h
	Inkubacja 55°C, bez wytrząsania					
2.1	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.2	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.3	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z

b/z – bez zmian

Tabela 77. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji plazmowej – III seria.

Ocena wizualna						
nr powtórzenia	0h	0,5 h	1h	2 h	3 h	4 h
	Inkubacja 55°C, bez wytrząsania					
3.1	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
3.2	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
3.3	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z

b/z – bez zmian

Spory te poddano także ilościowej ocenie uwalnianego ATP (przy użyciu komercyjnego kitu firmy PROMEGA). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach 78-80. Ilość względnych jednostek świetlnych (RLU) była niewielka i porównywalna z próbami kontrolnymi (Raport R6).

Tabela 78. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji – I tura

Powtórzenie	Czas inkubacji			
	0 h	0,5 h	1,0 h	1,5 h
1.1	12377	9872	13140	10749
1.2	10909	9331	12417	10411
1.3	7843	8499	14325	12890
1.4	12374	10775	13663	10985
1.5	11200	9259	12619	10422
1.6	8276	8733	13456	11421
1.7	12289	9076	13428	10778
1.8	11061	9006	12455	10302
1.9	8243	8568	12876	13456
1.10	10087	8999	13211	12342
Średnia	10465	9211	13159	11375
Odchylenie standardowe	1687	644	565	1070

Tabela 79. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji – II tura

Powtórzenie	Czas inkubacji			
	0 h	0,5 h	1,0 h	1,5 h
2.1	7237	7248	9096	8507
2.2	6554	7309	8740	7668
2.3	8744	6769	12555	8444
2.4	7368	7161	9102	8949
2.5	6333	6930	8815	7643
2.6	9005	6441	13726	8889
2.7	7372	7229	9019	9432
2.8	6384	8452	8786	7734
2.9	7324	6482	13526	9359
2.10	7633	6345	9826	8921
Średnia	7395	7037	10319	8555
Odchylenie standardowe	858	583	1972	642

Tabela 80. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji – II tura

Powtórzenie	Czas inkubacji			
	0 h	0,5 h	1,0 h	1,5 h
3.1	8460	11126	10059	9880
3.2	9158	14333	9213	8604
3.3	11231	15544	15180	16321
3.4	8597	11391	10205	9809
3.5	9429	14991	9089	8837
3.6	13001	15210	14900	15431
3.7	8656	11360	10091	9768
3.8	9451	15001	8855	8532
3.9	12333	14976	14331	13455
3.10	8879	11234	11421	9910
Średnia	9920	13517	11334	11055
Odchylenie standardowe	1570	1851	2380	2754

W mikrobiologicznym posiewie ilościowym nie zaobserwowano na płytkach Petriego wzrostu *Geobacillus stearothermophilus*. Posiew na ogólną liczbę drobnoustrojów dokonano w trzech, niezależnych powtórzeniach. Dla pierwszej tury badań wykonano 6 posiewów (tabela 81), dla drugiej tury pięć posiewów (tabela 82), a dla trzeciej – 6 (tabela 83).

Tabela 81. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji plazmowej – I tura.

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzenia	I	II	III
1.1	n/o	n/o	n/o
1.2	n/o	n/o	n/o
1.3	n/o	n/o	n/o
1.4	n/o	n/o	n/o
1.5	n/o	n/o	n/o
1.6	n/o	n/o	n/o

n/o – nieobecne

Tabela 82. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji plazmowej – II tura.

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzeń	I	II	III
2.1	n/o	n/o	n/o
2.2	n/o	n/o	n/o
2.3	n/o	n/o	n/o
2.4	n/o	n/o	n/o
2.5	n/o	n/o	n/o

n/o – nieobecne

Tabela 83. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji plazmowej – III tura.

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzeń	I	II	III
3.1	n/o	n/o	n/o
3.2	n/o	n/o	n/o
3.3	n/o	n/o	n/o
3.4	n/o	n/o	n/o
3.5	n/o	n/o	n/o
3.6	n/o	n/o	n/o

n/o – nieobecne

5.2. Sterylizacja parowa

Zliofilizowane spory poddane zostały także sterylizacji termicznej. Jałowienia dokonano w urządzeniu firmy SMS Warszawa (parametry procesu: ekspozycja 121°C/20 min, chłodzenie 10min). Doświadczenie prowadzono w 2 niezależnych powtórzeniach (każde po 5 ampulek zawierających 0,1 g spor). Otrzymane, wysterylizowane spory poddano ocenie stopnia jałowości. Jego wyznacznikiem była:

- Ocena wizualna (przy użyciu wskaźnika resazuryny)
- Pomiar ilości ATP
- Posiew ilościowy

Oceny wizualnej dokonano po 0,5, 1, 2, 3 i 4 h inkubacji spor w pożywce z dodatkiem germinantów i resazuryny. Nie stwierdzono zmian barwy wskaźnika – resazuryna (tabela 84).

Tabela 84. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji termicznej.

Ocena wizualna						
nr powtórzenia	0h	0,5 h	1h	2 h	3 h	4 h
	Inkubacja 55°C					
1.1	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.2	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.3	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.4	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
1.5	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.1	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.2	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.3	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.4	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z
2.5	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z	b/z

b/z – brak zmiany barwy

Tabela 85. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji termicznej.

Powtórzenie	Czas inkubacji			
	0 h	0,5 h	1,0 h	1,5 h
1.1	4453	7453	7555	7532
1.2	4559	7559	8654	8452
1.3	4512	7521	7874	7786
1.4	5226	7185	7254	7324
1.5	5153	6547	6987	7001
2.1	5963	7001	7150	7214
2.2	5061	6547	7254	7354
2.3	5213	6998	7185	7202
2.4	4270	4770	6373	6606
2.5	4312	4456	6817	6987
Średnia	4872	6604	7310	7346
Odchylenie standardowe	512	1054	588	478

Również wyniki oceny ilości ATP w próbach ze sporami poddanymi sterylizacji termicznej, nie wykazały wzrostu poziomu RLU (względne jednostki świetlne) – tabela 85. Podobne wyniki uzyskano w poprzednich badaniach symulacyjnych (punkt 2.2 niniejszego raportu). Jest to także zgodne z danymi przedstawionymi w Raporcie R6.

Posiewy ilościowe wykonane dla prób ze sporami podanymi sterylizacji termicznej nie wykazały obecności żywych komórek mikroorganizmów (tabela 86).

Tabela 86. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji parowej.

Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk/ml]			
nr powtórzeń	I	II	III
1.1	n/o	n/o	n/o
1.2	n/o	n/o	n/o
1.3	n/o	n/o	n/o
1.4	n/o	n/o	n/o
1.5	n/o	n/o	n/o
2.1	n/o	n/o	n/o
2.2	n/o	n/o	n/o
2.3	n/o	n/o	n/o
2.4	n/o	n/o	n/o
2.5	n/o	n/o	n/o

n/o – nieobecne w 0,1g

6. Określenie objętości testu do pomiaru ilości ATP

W celu określenia minimalnej ilości nośnika (tlenek krzemu) ze sporami jaki powinien być użyty w teście, wykonano posiewy ilościowe. Przyjęto założenie, że liczba przetrwalników w teście powinna osiągnąć poziom 10^6 jtk (zgodnie z normą PN-EN ISO 11138-1). Ze względu na dużą pylistość, najmniejsza możliwa do odważenia ilość to 0,05g nośnika ze sporami *Geobacillus stearothermophilus*. W związku z powyższym do badań wykorzystano naważki 0,05 g i 0,1 g nośnika ze sporami bakterii. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 87. Uzyskanie poziomu 10^6 jtk zapewniła naważka 0,1 g nośnika ze sporami.

Tabela 87. Wyniki posiewów ilościowych nośnika ze sporami bakterii

Ilość nośnika użyta do posiewu	Powtórzenia				
	1	2	3	4	5
0,05 g	$9,1 \times 10^5$	$8,0 \times 10^5$	$8,6 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$
0,1 g	$3,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$

Wykonano także oznaczenia pomiaru ilości ATP dla prób zawierających zarodniki w liczebności 10^5 jtk i 10^6 jtk (Tabela 88). Uzyskane wyniki wskazują, że proszek zawierający spory na poziomie 10^5 jtk daje sygnał niższy o około 60%. Przedstawione dane są średnią z 3 oznaczeń.

Tabela 88. Wyniki oznaczeń poziomu ATP dla prób o różnej liczebności spor.

Liczebność przetrwalników spor na nośniku	0h	30 min.	1 h
10^5 jtk	11 782	23 706	35 488
10^6 jtk	23 674	60 358	84 032

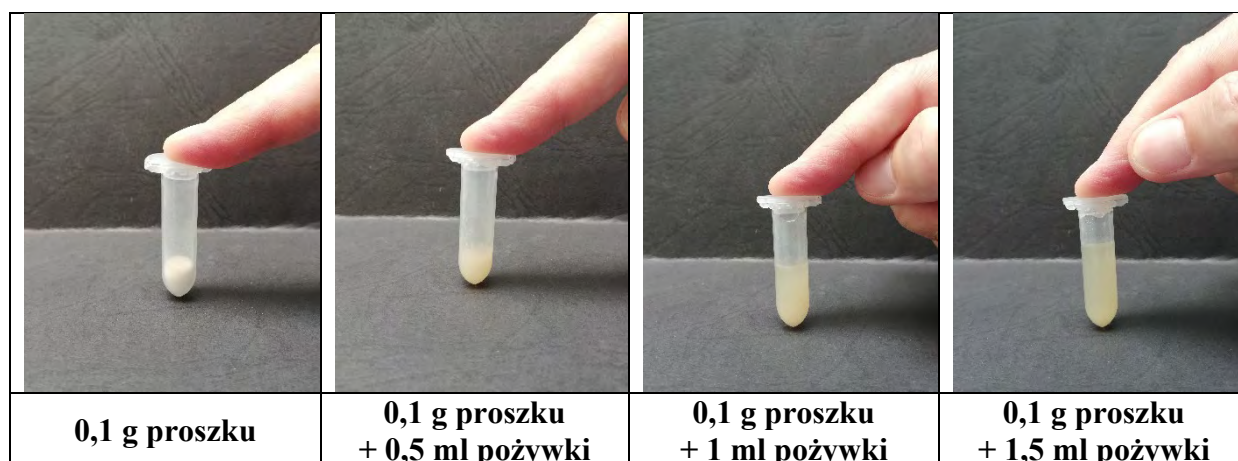
Próba 0,1 g nośnika ze sporami zajmowała objętość 0,5 ml (rysunek 3).

W kolejnym etapie doświadczeń określono najmniejszą ilość pożywki jaka powinna być użyta w badaniach z wykorzystaniem bioluminescencyjnego pomiaru ATP. Do 0,1 g nośnika

ze sporami *Geobacillus stearothermophilus* dodawano 0,5, 1, 1,5 ml pożywki. Uzyskane wyniki przedstawiono na zdjęciach (rysunek 3). Dodatek 0,5 ml pożywki nie spowodował całkowitej hydratacji liofilizatu (nośnik + spory) Również dodatek 1 ml pożywki nie dał efektu powstania płynnej warstwy pożywki. Zamierzony efekt osiągnięto przy dodatku do nośnika ze sporami bakterii 1,5 ml pożywki.

Jednocześnie zgodnie z zaleceniami Producenta odczynników do pomiaru ATP, zalecany jest dodatek wskaźnika (lucyferyna z lucyferazą) w stosunku 1:1 (1,5 ml + 1,5 ml), co daje łączną objętość testu ponad 3 ml.

Rysunek 3. Określenie objętości testu do pomiaru ATP.



7. Podsumowanie

W ramach etapu drugiego badań przemysłowych przeprowadzono dwa zadania:

1. Badanie możliwości wykorzystania opracowanych w I etapie metod do oceny skuteczności procesów sterylizacji
2. Badania laboratoryjne i symulacja zastosowania opracowanych wskaźników w warunkach zbliżonych do rzeczywistych.

W ramach tych zadań zrealizowano następujące badania:

- ❖ Wykorzystanie bioluminescencyjnego pomiaru ATP od oceny skuteczności sterylizacji parowej i plazmowej
- ❖ Ustalenie minimalnego czasu kiełkowania przetrwalników umożliwiającego ich wykrycie w danej metodzie
- ❖ Przygotowanie hodowli bioreaktorowych *Geobacillus stearotherophilus* w skali półtechnicznej w celu otrzymania materiału do badań metodycznych i przechowalniczych
- ❖ Określenie powtarzalności, precyzji i dokładności poszczególnych metod stosowanych do opracowania skutecznych wskaźników biologicznych procesów sterylizacji parowej i plazmowej
- ❖ Przeprowadzenie badań przechowalniczych nad trwałością wytworzonych wskaźników biologicznych dla poszczególnych metod sterylizacji
- ❖ Przeprowadzono symulację warunków zbliżonych do rzeczywistych wraz z walidacją procesów zachodzących w urządzeniach podczas sterylizacji plazmowej i parowej
- ❖ Badania nad określeniem warunków przechowywania i transportu wskaźników biologicznych
- ❖ Badania skuteczności działania wskaźników poddanych procesom w warunkach zbliżonych do rzeczywistych, przeprowadzonych na urządzeniach do sterylizacji różnych producentów

W badaniach wykorzystano 3 metody oceny skuteczności procesów sterylizacji plazmowej i parowej:

- ❖ Ocena wizualna zmiany barwy
- ❖ Ocena spektrofotometryczna zmiany barwy
- ❖ Bioluminescencyjny pomiar ATP

Wizualna ocena zmiany barwy:

Szczep bakterii – *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953)

Nośnik do immobilizacji bakterii – tlenek krzemu 0,1 g

Medium germinacyjne:

Składnik	Ilość
Pepton bakteriologiczny	0,50%
NaCl	0,80%
Głukoza	0,10%
L- Alanina	0,1M
L-Asparagina	0,1 M

Wskaźnik – resazuryna 0,01%

Warunki wzrostu:

- Temperatura pre-inkubacji 80°C (30 minut)
 - Temperatura inkubacji właściwej 55°C (60 minut)
- Łączny czas inkubacji: 90 minut (1,5 h)

Warunki przechowalnicze dla komponentów testu: 21°C, 6 miesięcy

Całkowita objętość testu (medium germinacyjne + spory)– 1,5 ml

Czas odczytu testu – 1,5 h

Spektrofotometryczna ocena zmiany barwy:

Szczep bakterii – *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953)

Nośnik do immobilizacji bakterii – tlenek krzemu 0,1 g

Medium germinacyjne:

Składnik	Ilość
Bulion	3%
Pepton bakteriologiczny	0,50%
NaCl	0,80%
Głukoza	0,10%
L- Alanina	0,1M
L-Asparagina	0,1 M

Wskaźnik – resazuryna 0,01%

Warunki wzrostu:

- Temperatura inkubacji właściwej 55°C (60 minut)
- Łączny czas inkubacji: 60 minut (1,0 h)

Warunki przechowalnicze dla komponentów testu: 21°C, 6 miesięcy

Całkowita objętość testu (medium germinacyjne + spory) – 1,5 ml

Czas odczytu testu – 1,0 h

Bioluminescencyjny pomiar ATP:

Szczep bakterii – *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953)

Nośnik do immobilizacji bakterii – tlenek krzemu 0,1 g

Pożywka germinacyjna:

Składnik	Ilość
Bulion	3%
Pepton bakteriologiczny	0,50%
NaCl	0,80%
Glukoza	0,10%
L- Alanina	0,1M
L-Asparagina	0,1 M

Wskaźnik – Luceferyna z lucyferazą

Warunki wzrostu:

- Temperatura inkubacji właściwej 55°C (30 minut)
Łączny czas inkubacji: 30 minut

Warunki przechowalnicze dla komponentów testu – wymagana temperatura: -20°C, 6 miesięcy; 4°C, 1 miesiąc

Całkowita objętość testu (medium germinacyjne + spory) – 3,1 (± 0,05) ml

Czas odczytu testu – 30 min.

Biorąc pod uwagę założenia projektu pod kątem czasu odczytu testu, tylko metoda bioluminescencyjnego pomiaru ATP spełniła te kryteria (<50 minut). Limit oznaczalności w metodzie bioluminescencyjnego pomiaru ATP ustalono na **30 minut**, co odpowiada poziomowi powyżej 50 000 RLU.

Dla tej metody przedstawiono kalkulację kosztów:

Metoda	Medium germinacyjne	Min czas detekcji	Objętość testu	Cena 1 analizy [zł]	Cena 100 analiz [zł]
Pomiar ATP	Pożywka III	30 min	1,50 ml	0,0194	1,94
	Germinanty		0,15 ml	0,0241	2,41
	Wskaźnik		1,50 ml	32,7	3270
	Tlenek krzemu+spory		0,5 g	0,443	44,3
					33,1865

Jednakże biorąc pod uwagę wyniki testów przechowalniczych, tylko temperatura -20°C pozwala na uzyskanie wyników na wymaganym poziomie czułości przez okres 6 miesięcy.

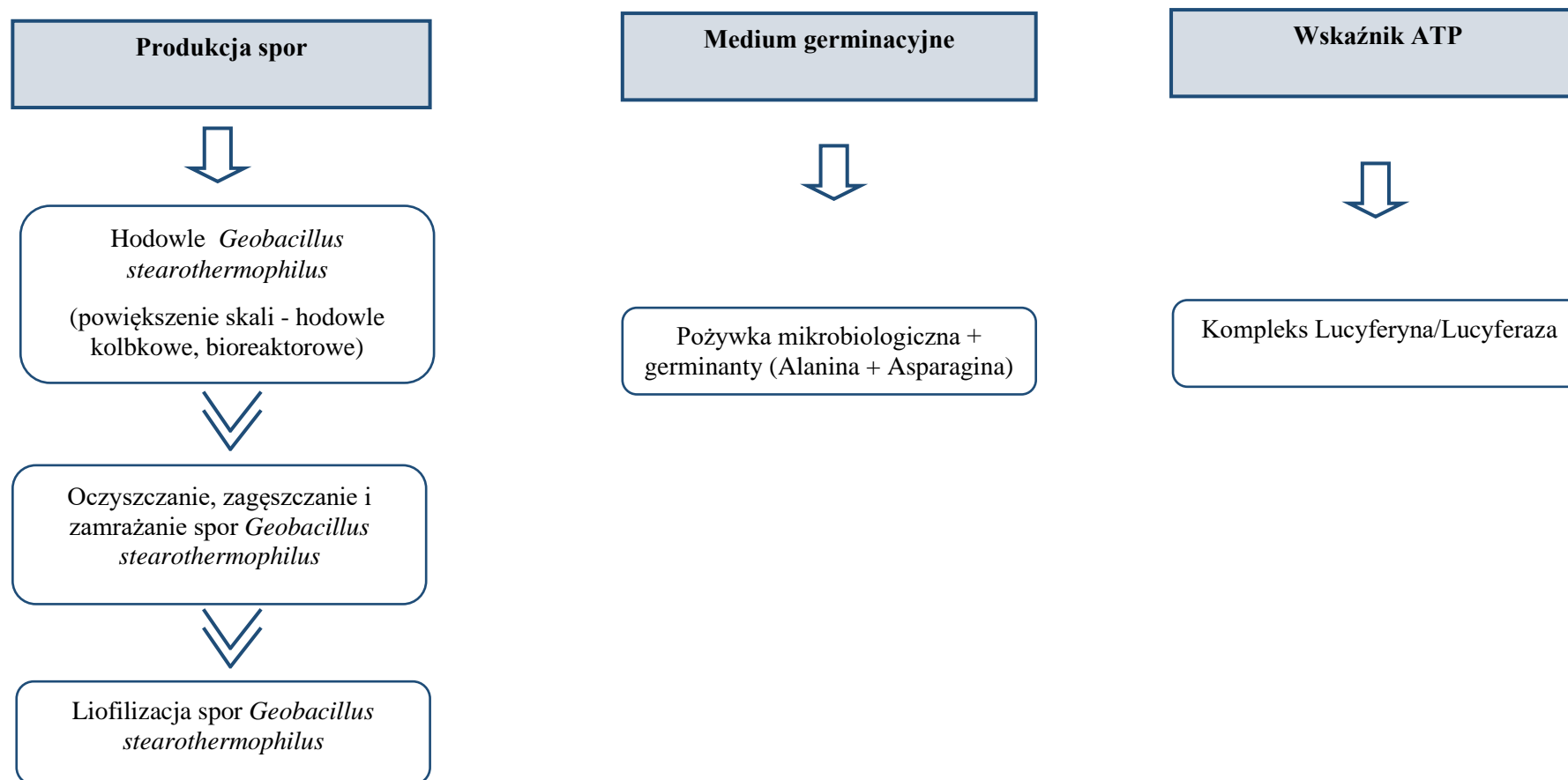
Wykonano także badania przechowalnicze wszystkich komponentów, użytych do opracowania testów biologicznych.

Tabela 89. Wyniki testów przechowalniczych (podsumowanie).

Komponent	Temperatura przechowywania [°C]	Okres stabilności
Zawiesina przetrwalników	4	Co najmniej 6 m-cy
Zliofilizowane przetrwalniki	21	Co najmniej 6 m-cy
Medium germinacyjne (pożywka mikrobiologiczna + germinanty)	21	Co najmniej 6 m-cy
Wskaźnik resazuryna	21	Co najmniej 6 m-cy
Kit ATP (lucyferyna + luceferaza)	-20 lub 4	Co najmniej 6 m-cy lub 1 miesiąc

W tabeli 89 przedstawiono podsumowanie warunków przechowalniczych dla poszczególnych komponentów testów biologicznych. Zawiesina przetrwalników ze względu na dobrą praktykę laboratoryjną powinna być przechowywana w temperaturze 4°C (warunki przechowywania mikroorganizmów). Zarówno przetrwalniki zimmobilizowane na nośniku jak i medium germinacyjne oraz wskaźnik resazuryna mogą być przechowywane w warunkach temperatur pokojowych, przez okres co najmniej 6 miesięcy. Zestaw odczynników do pomiaru bioluminescencji (Kit ATP - lucyferyna + luceferaza) ze względu na wymaganą czułość oznaczenia powinien być przechowywany w temperaturze -20°C. Przechowywanie w warunkach chłodniczych zapewnia okres stabilności przez ok. 1 miesiąc.

Składowe testu biologicznego do pomiaru ATP



8. Spis literatury

1. Aouadhi C., Rouissi Z., Kmiha S., Mejri S., Maaroufi A.: Effect of sporulation conditions on the resistance of *Bacillus sporothermodurans* spores to nisin and heat. *Food Microbiology* 54: 6-10, 2016.
2. Aouadhi C., Simonin H., Prévost H., de Lamballerie M., Maaroufi A., Mejri S.: Optimization of pressure induced germination of *Bacillus sporothermodurans* spores in water and milk. *Food Microbiology* 30: 1-7, 2012.
3. Bomar M.: The relationship between the age of *Bacillus subtilis* spores and their resistance to ethylene oxide.
4. Bowling T., Mercer L., Don R., Jacobs R., Nare B.: Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human African trypanosomiasis. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 2: 262–270, 2012.
5. Egan K., Field D., Rea M. C., Ross R. P., Hill C., Cotter P. D.: Bacteriocins: Novel solutions to age old spore – related problems?. *Frontiers in Microbiology* vol. 7, no 461, 2016.
6. Iciek J., Błaszczuk I., Papiewska A., Chmal-Fudali E.: Inaktywacja spor *Geobacillus stearothermophilus* w procesie sterylizacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 5(78): 163-172, 2011.
7. Iciek J., Błaszczuk I., Papiewska A.: Inaktywacja spor *Geobacillus stearothermophilus* w obecności wybranych kwasów organicznych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.* 2(51): 166-173, 2007.
8. Konieczka P., Namieśnik J.: Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych. Wydawnictwo Naukowo-Techniczne Warszawa, 2007.
9. Leighton T.J., Doi Rov H.: The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis*. *The Journal of Biological Chemistry* vol.246, no 10, 1971.
10. Nagler K., Setlow P., Li Y. Q., Moeller R.: High salinity alters the germination behavior of *Bacillus subtilis* spores with nutrient germinants. *Applied and Environmental Microbiology* vol. 80, no 4, 2014.
11. Polska norma – PN-EN ISO 11138-1. Sterylizacja produktów stosowanych w ochronie zdrowia. Wskaźniki biologiczne. Część 1. Wymagania ogólne, 2008.
12. Rodriguez – Palacios A., LeJeune J. T.: Moist – Heat resistance, spore aging and superdormancy in *Clostridium difficile*. *Applied and Environmental Microbiology*, p.3085-8091, 2011.
13. Szczepaniak W.: Metody instrumentalne w analizie chemicznej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002.
14. Wexler A, Hasegawa S.: Relative Humidity-Temperature Relationships of Some Saturated Salt Solutions in the Temperature Range 0° to 50° C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards*, Vol. 53, 1954.
15. Yildiz F., Westhoff D. C.: Sporulation and thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores in milk. *Food Microbiology*, Vol. 6 (4), 1989.

9. Spis tabel

Tabela 1. Wykaz substancji chemicznych, poddanych testom przechowalniczym.....	5
Tabela 2. Wykaz substancji chemicznych, poddanych testom przechowalniczym.....	6
Tabela 3. Stan mikrobiologiczny pożywek i poszczególnych ich komponentów, w trakcie przechowywania.....	8
Tabela 4. Potencjał biochemiczny pożywek i poszczególnych ich komponentów, zastosowanych w oznaczeniach ATP i skuteczność resazuryny jako wskaźnika redox	10
Tabela 5. Zmienne eksperymentalne.....	11
Tabela 6. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych (wyniki uśrednione, średnia z 3 powtórzeń).....	12
Tabela 7. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych – czas oznaczenia po 2 miesiącach przechowywania kitów.	15
Tabela 8. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych – czas oznaczenia po 3 miesiącach przechowywania kitów.	16
Tabela 9. Wyniki oznaczeń ATP dla poszczególnych wariantów przechowalniczych – czas oznaczenia po 6 miesiącach przechowywania kitów.	16
Tabela 10. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.....	20
Tabela 11. Dynamika zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych warunkach temperatury.	21
Tabela 12. Dynamika zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych warunkach temperatury c.d.	22
Tabela 13. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.....	24
Tabela 14. Dynamika zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia – spory stare.....	26
Tabela 15. Dynamika zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia - spory stare c.d.....	27
Tabela 16. Dynamika zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia – spory świeże.	28
Tabela 17. Dynamika zmiany barwy resazuryny przechowywanej w różnych warunkach temperatury oraz stężenia – spory świeże c.d.....	29
Tabela 18. Parametry jałowienia.....	30
Tabela 19. Ocena wizualna – dynamika zmiany barwy wskaźnika redox	32
Tabela 20. Ilość uwalnianego ATP (sterylizacja plazmowa).	33
Tabela 21. Ilość uwalnianego ATP (sterylizacja plazmowa), po miesiącu przechowywania.	33
Tabela 22. Wynik posiewów mikrobiologicznych spor poddanych sterylizacji plazmowej.....	34
Tabela 23. Wynik posiewu mikrobiologicznego spor poddanych sterylizacji plazmowej (po miesiącu przechowywania).....	34
Tabela 24. Ocena wizualna – dynamika zmiany barwy wskaźnika redox liofilizatów spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	36
Tabela 25. Ocena wizualna – dynamika zmiany barwy wskaźnika redox liofilizatów spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i> c.d.....	37
Tabela 26. Ilość uwalnianego ATP (sterylizacja termiczna).....	38
Tabela 27. Wynik posiewu mikrobiologicznego spor poddanych testom jałowości	38
Tabela 28. Parametry hodowli bioreaktorowych.....	39
Tabela 29. Legenda do rysunków 1-2	46
Tabela 30. Dynamika zmiany barwy resazuryny KIT przechowywanej w różnych warunkach temperatury.....	47

Tabela 31. Dynamika zmiany barwy resazuryny Dulbecco's przechowywanej w różnych warunkach temperatury.....	48
Tabela 32. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.....	50
Tabela 33. Dynamika zmiany barwy resazuryny inkubowanej w 60°C.....	51
Tabela 34. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.....	52
Tabela 35. Dynamika zmiany barwy resazuryny inkubowanej w 70°C.....	53
Tabela 36. Legenda do testów przechowalniczych dla resazuryny.....	54
Tabela 37. Dynamika zmiany barwy resazuryny inkubowanej w 80°C – I powtórzenie.....	55
Tabela 38. Dynamika zmiany barwy resazuryny inkubowanej w 80°C – II powtórzenie	56
Tabela 39. Dynamika zmiany barwy resazuryny inkubowanej w 80°C – II powtórzenie c.d.....	57
Tabela 40. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny na stabilność wyjściowej barwy (21°C).	58
Tabela 41. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny na stabilność wyjściowej barwy (60°C).	59
Tabela 42. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny na stabilność wyjściowej barwy (70°C).	59
Tabela 43. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny na stabilność wyjściowej barwy (80°C).60	
Tabela 44. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (21°C).	61
Tabela 45. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (60°C).	62
Tabela 46. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (70°C).	62
Tabela 47. Wpływ temperatury przechowywania resazuryny + pożywki III na stabilność wyjściowej barwy (80°C).	63
Tabela 48. Wykaz wariantów doświadczeń (pkt. 1.2.3.).....	64
Tabela 49. Stopień zmiany barwy w doświadczeniu (pkt. 1.2.3.).....	65
Tabela 50. Wykaz wariantów w doświadczeniach nad wyborem czasu pre-inkubacji (pkt. 1.2.4)	66
Tabela 51. Wyniki doświadczenia – stopień zmiany barwy.	67
Tabela 52. Warianty stosowane w doświadczeniu nad wyborem optymalnego czasu i temperatury pre-inkubacji i inkubacji właściwej (pkt. 1.2.4).	68
Tabela 53. Wyniki wizualnej oceny zmiany barwy – powtórzenie I.	69
Tabela 54. Wyniki wizualnej oceny zmiany barwy – powtórzenie II.	70
Tabela 55. Warianty użyte do III powtórzenia.	71
Tabela 56. Wyniki uzyskane w III powtórzeniu – wizualna ocena zmiany barwy resazuryny.....	72
Tabela 57. Warianty doświadczeń.....	73
Tabela 58. Wyniki wizualnej oceny zmiany barwy.	74
Tabela 59. Warianty użyte w doświadczeniach nad skróceniem czasu pre-inkubacji.	75
Tabela 60. Wyniki wizualnej zmiany barwy.....	76
Tabela 61. Warianty użyte w doświadczeniu.....	77
Tabela 62. Wyniki wizualnej zmiany barwy układu: pożywka + germinanty + resazuryna.....	77
Tabela 63. Zmienne eksperymentalne.....	78
Tabela 64. Wyniki uzyskane podczas pomiaru kinetyki zmiany barwy resazuryny KIT – układ bez parafilmu	82
Tabela 65. Wyniki uzyskane podczas pomiaru kinetyki zmiany barwy resazuryny KIT – układ z parafilmem.....	83
Tabela 66. Wyniki spektroskopowego pomiaru absorbancji dla układu resazuryna + medium germinacyjne.	86

Tabela 67. Wyniki absorbancji dla doświadczenia bez preinkubacji.....	89
Tabela 68. Wyniki absorbancji dla doświadczenia bez preinkubacji – dane szczegółowe do obliczeń statystycznych.	90
Tabela 69. Wyniki absorbancji dla doświadczenia z 0,5 h pre-inkubacją.....	92
Tabela 70. Wyniki absorbancji dla doświadczenia z 1 h preinkubacją.	94
Tabela 71. Wyniki absorbancji [$\lambda=600$ nm] dla doświadczenia ze sporami zliofilizowanymi.....	95
Tabela 72. Liczebność spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i> uzyskana w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy SMS).....	98
Tabela 73. Liczebność spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i> uzyskana w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy Getinge).	100
Tabela 74. Parametry jałowienia	102
Tabela 75. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji plazmowej - I seria.	103
Tabela 76. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji plazmowej – II seria.	104
Tabela 77. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji plazmowej – III seria.....	104
Tabela 78. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji – I tura	105
Tabela 79. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji – II tura	105
Tabela 80. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji – II tura	106
Tabela 81. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji plazmowej – I tura.	106
Tabela 82. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji plazmowej – II tura.	107
Tabela 83. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji plazmowej – III tura.....	107
Tabela 84. Wizualne obserwacje zmiany barwy wskaźnika w próbach spor poddanych sterylizacji termicznej.....	108
Tabela 85. Wyniki pomiarów ATP w próbach spor poddanych sterylizacji termicznej.	109
Tabela 86. Wyniki posiewów mikrobiologicznych po sterylizacji parowej.....	110
Tabela 87. Wyniki posiewów ilościowych nośnika ze sporami bakterii.....	111
Tabela 88. Wyniki oznaczeń poziomu ATP dla prób o różnej liczebności spor.....	111
Tabela 89. Wyniki testów przechowalniczych (podsumowanie).	116

10. Spis rysunków

Rysunek 1. Schemat produkcji spor.....	41
Rysunek 2. Schemat produkcji spor.....	42
Rysunek 3. Określenie objętości testu do pomiaru ATP.....	112

11. Spis wykresów

Wykres 1. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania (R – kit przechowywany w postaci gotowego roztworu; B+R – bufor i proszek zmieszany krótko przed wykonaniem testu) – dla spor świeżych.....	13
Wykres 2. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania (R – kit przechowywany w postaci gotowego roztworu; B+R – bufor i proszek zmieszany krótko przed wykonaniem testu) – dla spor starych.....	13
Wykres 3. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania - czas oznaczenia po 2 miesiącach przechowywania kitów.....	17
Wykres 4. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania - czas oznaczenia po 3 miesiącach przechowywania kitów.....	17
Wykres 5. Ilość ATP w zależności od warunków przechowywania - czas oznaczenia po 6 miesiącach przechowywania kitów.....	18
Wykres 6. Widmo Vis dla Resazuryny KIT – hodowla w 55°C.....	79
Wykres 7. Widmo Vis dla Resazuryny komercyjnej – hodowla w 60°C.....	79
Wykres 8. Widmo Vis dla Resazuryny komercyjnej – hodowla w 80°C.....	80
Wykres 9. Kinetyka zmiany barwy dla resazuryny KIT – bez parafilmu – długość fali 600 nm.....	83
Wykres 10. Kinetyka zmiany barwy dla resazuryny KIT + parafilm – długość fali 600 nm.....	84
Wykres 11. Kinetyka zmiany barwy dla medium germinacyjnego z resazuryną (zabezpieczone parafilmem) długość fali 600 nm.....	85
Wykres 12. Pomiar absorbancji dla układu: zoptymalizowane medium hodowlane + resazuryna + spory (bez preinkubacji spor).....	88
Wykres 13. Pomiar absorbancji dla układu: zoptymalizowane medium hodowlane + resazuryna + spory (0.5 h preinkubacja spor).....	91
Wykres 14. Pomiar absorbancji dla układu: zoptymalizowane medium hodowlane + resazuryna + spory (1 h pre-inkubacja spor).....	93
Wykres 15. Krzywe przeżycia spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i> w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy SMS).....	99
Wykres 16. Krzywe przeżycia spor <i>Geobacillus stearothermophilus</i> w jednoetapowej sterylizacji (Sterylizator parowy Getinge).....	100