

Rapport nr. 104/49

MIKROBIOLOGISK METODE FOR PÅVISNING AV OKSOLINSYRE I ENSILASJE



KVALITET

RAPPORT-TITTEL

MIKROBIOLOGISK METODE FOR PÅVISNING AV OKSOLINSYRE I ENSILASJE

RAPPORTNUMMER	104/49	PROSJEKTNUMMER	104
UTGIVER	RUBIN	DATO	April 1995

UTFØRENDE INSTITUSJONER

Universitetet i Bergen, institutt for mikrobiologi

Jahnebakken 5, 5020 Bergen

Telefon: 55 21 26 62

Kontaktpersoner: Sonal Patel, Bjørn Tore Lunestad

SAMMENDRAG OG KONKLUSJONER

Til nå har analyse av antibiotikarester i ensilasje av lakseavfall kun foregått ved bruk av en kjemisk metode (HPLC). Dette er forholdsvis komplisert og ressurskrevende. Metoden krever et HPLC-instrument, som er forholdsvis kostbart og må bemannes med kompetent analysepersonell.

En annen måte å analysere antibiotika på, og som sannsynligvis vil være enklere, er mikrobiologiske metoder. Slike metoder brukes idag for påvisning av antibiotikarester i slakteferdig oppdrettslaks. Imidlertid har mikrobiologiske metoder foreløpig ikke vært egnet for ensilasje pga. faren for at andre veksthemmende stoffer enn antibiotika i ensilasjen skal kunne slå ut og gi falske resultater under analysen. Slike stoffer kan være enzymer, nedbrytingsprodukter av protein, mm.

Hensikten med prosjektet har vært å utvikle/utteste en enkel mikrobiologisk analysemetode for påvisning av det antibakterielle stoffet oksolinsyre i ensilasje av fisk. For å kunne benyttes i rutinekontroller må metoden være tilstrekkelig sikker for å skille ut den ensilasjen som inneholder spor av oksolinsyre, slik at denne kan håndteres for seg.

En har brukt testbakterien E. Coli. ATCC 1111303, som ble dyrket på agar i petriskåler. Hemmingssoner ble målt etter at ensilasjeprøver var overført til brønner i agaren, og skålene inkubert ved 30°C over natten. Ekstrahering av oksolinsyre fra ensilasje med diklormetan øker sensitiviteten til den mikrobiologiske metoden. Med nøytralisering til pH 7 ble den lavest påviselige konsentrasjon av oksolinsyre 10 ppb. Metoden er beskrevet i detalj i rapporten.

Metoden synes ikke å bli forstyrret av falske påvirkninger fra andre veksthemmende stoffer enn antibiotika, så lenge ensilasjen nøytraliseres til pH 7.

Resultatene fra dette arbeidet viser at den mikrobiologiske metoden kan videreutvikles for å bli et alternativ til HPLC-metoden ved rutinekontroller av ensilasje. Den er enkel, tidsbesparende og billigere enn bruk av HPLC.

Stiftelsen RUBIN
Pirsenteret, Brattøra
7005 Trondheim

Telefon 73 51 82 15
Telefax 73 51 70 84

STIFTELSEN
RUBIN
Resirkulering og utnyttelse av
organiske biprodukter i Norge

MIKROBIOLOGISK METODE FOR PÅVISNING AV
OKSOLINSYRE I LAKSE-ENSILASJE

Sonal Patel

UNIVERSITETET I BERGEN
INSTITUTT FOR MIKROBIOLOGI
Jahnebakken 5, N-5020 Bergen
Tel. 55 21 26 62 Fax. 55 32 39 62

INNHALDSFORTEGNELSE

Sammendrag.....	s. 1
Tillaging av ensilasje	s. 1
Mikrobiologisk analysemetode.....	s. 2
Effekter av ethoxyquin og pH.....	s. 3
Påvisning av oksolinsyre i ensilasje.....	s. 3
Undersøkelse av kommersiell ensilasje	s. 4
Frigivelse av bundet oksolinsyre i ensilasje	s. 5
Fasefordeling av oksolinsyre i ensilasje.....	s. 5
Ekstraksjon av oksolinsyre.....	s. 7
Kommersielle testmetoder.....	s. 9
Konklusjon	s.10

Mikrobiologisk metode for påvisning av oksolinsyre i ensilasje.

Sammendrag

Kjemiske analysemetoder (HPLC; High performance liquid chromatography) har vært brukt for å påvise antimikrobielle stoff i ensilasje av fisk. Disse metodene krever imidlertid stor arbeidsinnsats og kostbart utstyr. Et av problemene i forbindelse med utvikling av mikrobiologiske metoder for påvisning av antimikrobielle midler i ensilasje, er risikoen for å få falske positive resultater på grunn av nedbrytningsprodukter i gammel ensilasje. Formålet med arbeidet som er beskrevet i denne rapporten, var å utvikle en hurtig og enkel bioanalyse til påvisning av antimikrobielle stoff i ensilasje av fisk. Testbakterien *E. coli ATCC 11303* ble brukt i den mikrobiologiske analysen. To test medier ble brukt for analyse av oksolinsyre (OA) i ensilasje. Disse var fra Merck - test agar pH 6,0 og 7,2. Hemningssoner ble målt etter at ensilasjepróver var overført til brønner i agaren og skålene var inkubert ved 30°C natten over (18 - 22 timer). Deteksjons grensen for påvisning av OA ved direkte applikasjon av ensilasjen (justert til pH 7,0) var 200 ppb. Ekstrahering av OA fra ensilasje øker sensitiviteten til den mikrobiologiske metoden. Ekstraktet ble nøytralisert til pH 7, som var optimalt både for vekst av bakterien og metodens sensitivitet. Den lavest påviste konsentrasjon av OA når jeg benyttet ekstraksjons-metoden var 10 ppb (1ppb = 1 µg/l). Test agar pH 7,2 viste seg å være bedre egnet for analysen enn test agar pH 6,0. Uspesifikk hemning på grunn av andre komponenter i ensilasjen enn OA, synes ikke å være noen begrensende faktor. Etter nøytralisering til pH 7 gav ingen av ensilasjene falske positive resultater. Den mikrobiologiske metoden som er beskrevet i denne rapporten kan videre utvikles som et alternativ til kjemisk metodikk. Denne metoden er enkel, tidsbesparende og dessuten billigere enn tilsvarende kjemiske analysemetoder.

Tillaging av ensilasje

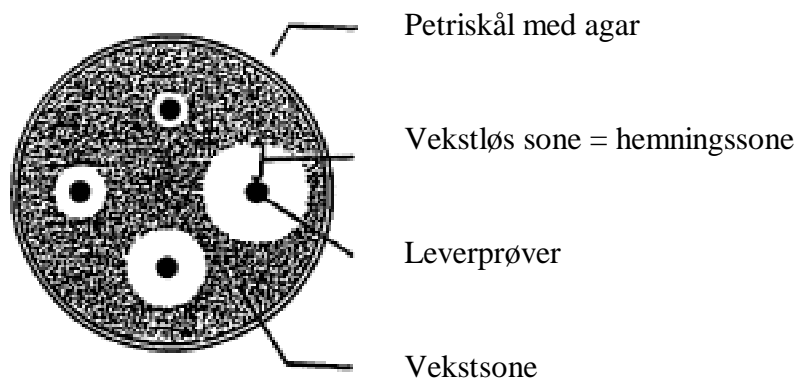
For å kunne standardisere den mikrobiologiske analysemetoden, var det nødvendig å lage en eksperimentell ensilasje fra fisk som med sikkerhet ikke hadde vært behandlet med antimikrobielle midler. Fra Matre havbruksstasjon (Matredal, Hordaland) ble atlantehavslaks (*Salmo salar L.*) stilt til disposisjon. Denne fisken var nylig død og dermed ikke kadaverøs.

For å forsikre seg om at fisken ikke inneholdt rester av antibakterielle midler, ble leverprøver undersøkt ved hjelp av en HPLC metodikk (Perkin Elmer LS40, HP serie 1050 og kolonne PLRS 100 Å med 5 µm kolonne materiale). Det ble hverken funnet OA eller flumequine i prøvene. På samme prøvemateriale ble det også gjennomført en mikrobiologisk undersøkelse med hensyn på antimikrobielle midler. Hemningssoner ble ikke funnet rundt leverprøvene.

Fisken ble malt ved hjelp av en kjøttkvern, og tilsatt 3 % maursyre med en styrke på 85 %. I tillegg ble antioksidanten ethoxiquin (Rexoquin[®]) tilsatt i en endelig konsentrasjon på 0.2 %. Etter fem dagers lagring var pH i ensilasjen 3,6. Ensilasjen ble så fylt på flasker og lagret i kjøleskap. Ved henstand skilte ensilasjen seg, og en tynn, halvt gjennomsiktig væskefase oppstod i bunnen av flasken. Denne fasen var oppløselig både i vann og i 96% etanol, mens den var uoppløselig i upolare stoffer, som xylen.

Mikrobiologisk analysemetode

Mikrobiologiske undersøkelser av antimikrobielle midler i vevsprøver baserer seg på bruk av bakterier som er spesielt følsomme for stoffene en ønsker å påvise. Testbakteriene blir støpt inn i spesielle vekstmedier (agarer). Prøver som skal undersøkes blir enten plassert på overflaten av agaren, eller i brønner, avhengig av prøvens art.



Alternativt kan prøvematerialet bli absorbert i papirlapper som siden avsettes på agaroverflaten. Dersom det finnes antimikrobielle stoffer i prøvene, vil disse diffundere ut i agaren og forhindre bakterievekst. Det dannes dermed en klar hemningssone rundt prøven.

Bakteriekulturen som ble brukt i denne metoden var *Escherichia coli* ATCC 11303, som ble dyrket på Test agar pH 6,0 (Merck, cat.no. 10663).

Testskåler ble laget ved å støpe inn bakteriene i agaren etter at den var nedkjølt til 47°C. Det ble benyttet 15 ml agar i hver skål. Skålene ble for-inkubert i kjøleskap i 2 timer for å tillate spredning av eventuelle antimikrobielle stoff i agaren før bakterien fikk vokse. Deretter ble skålene inkubert ved 30° C natten over (20-22 timer). Hemningssonene ble målt som diameter i millimeter, inkludert diameteren på brønnen som var 6 mm.

Effekter av ethoxiquin og pH

Ettersom ensilasje som oftest blir laget ved tilsetning av 0.2 % ethoxiquin (dvs. 2 g/l), ble dette stoffets effekt på testbakteriene undersøkt. Det ble tilsatt henholdsvis 30, 60, 120, 240 og 480 mg ethoxiquin til brønner i agaren. Fortynningene ble laget i 96 % etanol ettersom ethoxiquin er uoppløselig i vann. Det oppsto ingen hemning selv ved den høyeste tilsetning av ethoxiquin, dvs. 480 mg. Ettersom den kontrollerte mengden av ethoxiquin i dette eksperimentet er mye høyere enn det som vanligvis blir benyttet i ensilasjen, kan man konkludere med at det ikke ville være noe problem med falske positive prøver (dvs. at det oppstår hemningssoner selv om antibakterielt stoff ikke er tilstede), som følge av ethoxiquin i ensilasjen.

Ensilasje har vanligvis en pH på under 4,0, og må derfor nøytraliseres for å unngå hemning av bakterieveksten. Bakterievekst i området fra pH 3,7 til 9,0 ble undersøkt. Ensilasjen ble pH-justert ved å tilsette mettet natriumhydroksid (48,5% NaOH løsning). Volumet av NaOH løsning som var nødvendig for å øke pH, var mindre enn 10%. Denne fortynningen har ikke stor betydning for senere måling av hemningssoner. Resultatene viste at når pH i ensilasjen blir justert til 5,0 eller høyere, blir ikke bakteriene hemmet. En kan derfor konkludere med at for å gjennomføre analysene av ensilasjeprovene ved hjelp av testbakterien *E.coli*, må pH i prøvene justeres til 5,0 eller høyere.

Påvisning av oksolinsyre i ensilasje

Det ble gjennomført et innledende forsøk der effekten av standard løsninger av OA ble undersøkt både ved hjelp av lapp- og brønn-metoder. Det så ut som om OA ble bundet til materialet i lappene, og derfor gav mindre hemningssoner enn samme mengde analysert ved brønnmetoden. Størrelsen på hemningssoner for OA-mengder på 1, 10, 100 og 1000 µg pr. lapp eller brønn var henholdsvis 43, 41, 42 og 60 mm og 45, 53, 60 og 68 mm.

En ensilasje stamløsning med 20 ppm OA (2 mg /100 g ensilasje) ble laget istand ved å tilsette OA i pulverform . Etter homogenisering ble det laget fortyninger for å oppnå følgende konsentrasjoner av OA i ensilasjen : 1, 10, 50, 100, 200, 500 og 1000 ppb (ng/g eller ng/ml). For å finne den pH verdien som ga høyest følsomhet for metoden, ble prøvene justert henholdsvis til, pH 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 8,0 og 9,0. Varierende konsentrasjoner av disse pH-justerte ensilasje-prøvene (40 µl) ble tilsatt brønnene i agarskåler som på forhånd var podet med testbakterier. Skålene ble inkubert ved 30° C, og resultater avlest neste dag. En inkubasjonstemperatur på 37° C ble også forsøkt for alle ovenfor-nevnte konsentrasjoner av OA og varierende pH, for å finne ut om denne inkubasjonstemperaturen gav en mer sensitiv test. Ved temperaturer på 30°C og 37°C, ble det ikke observert hemningssoner med OA-konsentrasjoner på under 500 ppb ved pH 5,5; 6,0; 6,5; 8,0 og 9,0; mens en ved pH 7,0 fikk hemningssoner ved konsentrasjoner på 200 ppb. Difco, Mueller Hinton medium pH 7.3 ble også benyttet for å sjekke om det gav en mer sensitiv test. Mueller Hinton medium ga mindre sensitivitet enn test agar pH 6,0. Deteksjonsgrensen for OA i ensilasje var 200 ppb ved optimale forhold d.v.s. når ensilasjen ble justert til pH 7.0 og skålene (medium - test agar pH 6.0) inkubert ved 30°C.

Undersøkelse av kommersiell ensilasje

Et av problemene i forbindelse med å utvikle en mikrobiologisk metode for å påvise antimikrobielle midler i ensilasje, var risikoen for å få falske positive resultater på grunn av nedbrytningsprodukter i gammel ensilasje. For å undersøke dette ble fire ensilasjeprøver fra slakteriavfall, med varierende totalmengde flyktig nitrogen (TFN), analysert. Prøvene ble stilt til disposisjon av Harald Hagen, Hordafôr A/S. TFN er en av parametrene som kontrolleres for å fastslå kvalitet og ferskhetsgrad på ensilasje. Disse prøvene hadde TFN-verdier på 22,0; 60,0; 73,4 og 146,7 mg/100 g, og ble undersøkt med hensyn på hemningssoner både før og etter justering til pH 6,0 og 7,0. De justerte prøvene gav ingen hemning, mens det ble funnet hemningssoner for de ikke justerte prøvene. En kan derfor si at prøvene ikke inneholdt noen antimikrobiell substans, eller at eventuell forekomst var mindre enn 200 ppb.

Frigivelse av bundet oksolinsyre i ensilasje

Rester av quinoloner (OA) kan bli holdt tilbake i spesielle cellevev i lengre perioder. Særlig er det blitt rapportert at OA kan bindes til benvev. Bundet OA fra benvev kan lekke ut til omgivelsene ved koking, men blir ikke nedbrutt ved kokepunktstemperatur (The Merck Index, Merck & Co. Inc., USA, 11th ed., 1989). Når OA lekker ut blir den mer tilgjengelig, og kan

dermed øke følsomheten til den mikrobiologiske metoden. Ensilasje med pH 7 og 8, og med varierende konsentrasjon av OA ble kokt i autoklav ved 100° C i 5 min. Porsjoner på 35 µl kokt ensilasje ble overført til brønner i agaren og analysert på vanlig måte. Ved denne fremgangsmåten fikk en hemningssoner for ensilasje med 1000 ppb (21 mm) og 500 ppb (16 mm) OA både ved pH 7 og 8. Analyse av tilsvarende ensilasjeprøver ved pH 7,0, men uten koking ga hemningssoner for ensilasje med 1000 ppb (21 mm), 500 (18 mm) og 200 (11 mm) OA. Det ser derfor ut som om vi får mindre hemningssone ved koking. Så langt er det ikke mulig å gi en tilfredsstillende forklaring på dette. Vi kan derfor konkludere at koking av ensilasjen øker ikke sensitiviteten til analysemetoden.

Fasefordeling av oksolinsyre i ensilasje

For å undersøke fordelingen av OA i de forskjellige faser av ensilasjen, ble prøver sentrifugert ved 2400 g i 10 min. Prøvene skilte seg i fire faser: øverst et oljeaktig lag, deretter et lag med bløte partikler, et halvt gjennomsiktig gulaktig, vannholdig lag, og nederst faste partikler. Det øvre, oljeaktige laget blandet seg lett med xylen, men ikke med destillert vann og bestod derfor av ikke-polare komponenter. De andre tre lagene blandet seg med destillert vann og ikke med xylen. Selv om ensilasjen skilte seg godt ved 2400 g, ble sentrifugering ved 5300 g benyttet for å gi fastere lagdeling og gjøre det lettere å pipettere ut den vannholdige fasen.

Små, hvite partikler som var fordelt i ensilasjen samlet seg på bunnen av sentrifugerøret. Disse partiklene ble studert i mikroskop, og knuste partikler så ut til å ha en krystallaktig struktur. Ved tilsetning av HCl ble det ingen gassdannelse og partiklene kunne derfor ikke bestå av kalsiumkarbonat. De løste seg opp i konsentrert HCl og partiklene kan derfor være kalsiumfosfat fra bein. Ved atom absorpsjons analyse (ved Fiskeridirektoratets Ernæringsinstitutt i Bergen), ble det funnet at de hvite partikkene for det meste besto av kalsium (2475 ppm), en del magnesium og jern. Om partiklene inneholdt fosfor var det vanskelig å påvise med denne analysen. Det ble derfor ikke mulig å bekrefte at de hvite partiklene var kalsiumfosfat.

Oksolinsyre kan bindes til toverdige kationer (kalsium og magnesium) i bein. Den kompleksdannende forbindelsen EDTA ($C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot 2H_2O$) ble tilsatt ensilasjen for å finne ut om den kunne binde kationene og om noe OA ble frigitt. Varierende konsentrasjoner av EDTA ble tillaget ved å benytte destillert vann som var justert til pH 3 ved hjelp av 2 N HCl. pH i

løsningen økte til basisk ved tilsetning av EDTA. Porsjoner på 35 µl av EDTA-konsentrasjoner på 0; 0,1; 1,0 og 5,0 mM ble tilsatt brønner i skålene, som så ble inkubert ved 30° C etter for-inkubasjon. Der var ingen hemning av bakterier selv om pH-verdien i EDTA-løsningene på 0; 0,1 og 1,0 mM var under pH 4. Ved tilsetning av EDTA i ensilasjen oppsto ingen pH økning, sannsynligvis p.g.a. høyere bufferkapasitet i ensilasjen enn i destillert vann. Dette viser at EDTA i disse konsentrasjoner ikke gir hemning av test- bakterien.

Det ble tatt prøver av olje- og vannfasen fra ensilasje med 0 og 1000 ppb OA, og disse ble analysert ved hjelp av HPLC-metoden (Samuelsen, O.B., J. of Chromatography B, 655, 1994; 311-314). Det ble tatt to prøver av hver konsentrasjon. Den ene ble tilsatt EDTA til en endelig konsentrasjon på 40 mM. pH-verdien i ensilasjen ble justert til 7 og massen ble deretter sentrifugert ved 2400 g i 10 min. Resultatene viste at oljefasen inneholdt lite OA, mens vannfasen ved pH 7 inneholdt 80-85% av den totale OA-mengden som var tilsatt ensilasjen. Tidligere analyser foretatt ved pH 4 viser en jevn fordeling av OA mellom olje- og vannfase. Det kan derfor konkluderes med at ved justering av pH til 7, vil mesteparten av OA bli konsentrert i vannfasen. Ved HPLC-analysen ble det vist at 84,4% og 83,0% av OA ble gjenfunnet henholdsvis for prøver uten og med EDTA-tilsetning. Det kan derfor konkluderes med at gjenfinningsprosenten av OA var nesten det samme uavhengig av om EDTA var tilsatt eller ikke.

Ettersom vannfasen inneholdt det meste av den totale OA-mengden i ensilasjen, var det bare denne som ble brukt i de videre mikrobiologiske testene. Hemningssoner oppsto bare ved en konsentrasjon på 1000 ppb, mens det ikke forekom hemning ved noen av de andre konsentrasjonene. I tillegg var hemningssonene med 1000 ppb mindre (15 mm) enn de man fikk når hele ensilasjen ble brukt (21/22 mm) i stedet for bare vannfasen. Sensitiviteten til den mikrobiologiske metoden avtok altså ved å tilsette bare vannfasen til brønnene. Så langt er det ikke mulig å gi en tilfredsstillende forklaring på dette.

Ekstraksjon av oksolinsyre

En annen mulighet for å få økt sensitivitet for den mikrobiologiske testen, var ekstraksjon av OA ved hjelp av et organisk ekstraksjonsmiddel. Dersom en utfører ekstraksjon på useparert ensilasje blir prosessen lang og tidkrevende. Derfor ble bare vannfasen analysert ved

ekstraksjonsprosedyren. Ekstrahering av OA ved hjelp av diklormetan ble utført på følgende måte:

1. pH i 15 ml ensilasje ble justert til 7,0 ved å benytte 48,5% NaOH.
2. Ensilasjen ble sentrifugert ved 5300 g i 10 min.
3. Vannfasen ble pipettert av og justert til pH 3,5 ved å benytte 2 N HCl.
4. Oksolinsyre ble ekstrahert fra vannfasen ved hjelp av diklormetan: I en skilletrakt ble det først tilsatt 20 ml diklormetan og deretter prøven (vannfasen). Dette ble så ristet kraftig for hånd, og gassen ble sluppet ut av og til. Trakten fikk så stå i ro en stund til fasene var skilt, og diklormetanen ble tappet ut fra bunnen og over i et begerglass. Prosedyren ble deretter gjentatt med 10 ml diklormetan. Den totale mengde av diklormetan i begeret vil derfor bli 30 ml.
5. Diklormetan ble dampet av ved 40° C i vannbad ved hjelp av nitrogengass.
6. De tørkede prøvene ble tilsatt 0,5 ml fosfat bufret saline (PBS¹) og hver prøve ble grundig blandet. (¹ fosfat bufret saline: NaCl 8,5 g; Na₂HPO₄ * 12H₂O 1,44g; KH₂PO₄ 0,24 g; Destillert vann til 1 l volum. Justering av pH til 7,2)
7. Prøvene ble sentrifugert ved 150 g i 3 min.
8. Mikrobiologisk analyse ble utført ved å pipettere 35 µl av prøvene til brønner i agarplaten og inkubere ved 30°C i 18 - 20 timer.

Tabellen under viser resultater fra ekstraheringsprosedyren:

For å undersøke hvilken lengde på for-inkuberingen (ved 4°C for spredning av antimikrobielle midler) som gir den beste følsomheten, ble både 2 t og 20t for-inkubering forsøkt. Test agar pH 7,2 ble også forsøkt og viste seg å være bedre egnet for påvisning av OA i ensilasje. Hemningssonene ble målt i diameter og inkluderer brønnen som er 6 mm.

Konsentrasjon av OA (ppb)	Hemnings soner (diameter i mm)				
	Test agar pH 6,0			Test agar pH 7.2	
	20 t for- inkubasjon	1*	2*	1* ²	2* ²
0	0	0	0	0	0
10	n.a.	18	0	12	13
50	0 ¹	11	16	19	16
100	26	24	24	21	20
200	34	20	32	23	23
500	29 ¹	27	37	28	28
1000	45	42	44	32	32

* - Det er to paralleller for 2 t forinkubasjon analysert med to forskjellige medier.

1 - En del av prøven ble borte under ekstrahering av oksolinsyre fra vannfasen av ensilasjen.

2 - Prøvene tilsatt OA ble lagret lenge i kjøleskap før analyse. Selv om deteksjonsgrensen var ned mot 10 ppb i disse prøvene, fikk jeg mindre hemningssoner enn forventet (Jeg har ikke mulighet til å kontrollere disse resultatene med nylaget prøver for å forklare de uventet mindre hemningssoner). Imidlertid kan test agar pH 7,2 konkluderes som bedre egnet mht. sensitiviteten i analysen

Ved sentrifugering har det vist seg at vannfasens størrelse varierer. For å finne ut om det var mulig å ta et fast volum fra vannfasen fra hver prøve istedet for å bruke hele fasen ble ensilasje med OA-konsentrasjoner på 50 og 500 ppb nøytralisert til pH 7 og 8. Tre parallelle prøver ble undersøkt for hver konsentrasjon og pH. Vannfasen ble høstet etter at 5 ml ensilasje var sentrifugert, og OA-konsentrasjonen ble deretter kontrollert med HPLC-metoden. Bare det volumet av vannfasen som trengtes for å injesere HPLC-instrumentet ble analysert.

Oksolinsyremengden som ble funnet igjen fra de tre parallelle prøvene med 500 ppb og pH 7 var nesten den samme. Dessuten var gjenvinnings andelen 30-40% større ved pH 7 enn ved 8. Det var vanskelig å si noe særlig om 50 ppb konsentrasjon, da vannfasen var noe uklar og vanskelig å høste kvantitativt, hvilket gjorde det ganske umulig å dra noen konklusjon ang. de oppnådde resultater. Etersom HPLC er en svært sensitiv metode, vil altfor mange forstyrrende stoffer gjøre det vanskelig å identifisere OA-topper i diagrammet. Derfor vil en måtte utføre enten en renselsesprosess eller en ekstraksjon for å kunne si noe mer om reproduserbarheten for prøvene med 50 ppb OA. Men siden prøvene med 500 ppb og pH 7 gav reproduserbare resultater, kan man sannsynligvis si det samme om andre konsentrasjoner også.

Kommersielle testmetoder

Et overordnet mål med undersøkelsene som er beskrevet i denne rapporten, var å finne en enkel og pålitelig metode for påvisning av rester av OA i ensilasje. I denne sammenheng ble to kommersielle testmetoder utprøvd. Disse var som følger:

1. Quick meat[®] medium produsert av COPAN, Italia, er utviklet for mikrobiologisk undersøkelse av kjøtt produkter. Systemet består av et rør med et egnet medium. På toppen av røret er plassert en ampulle som inneholder *B. subtilis* sporer. Mediet smeltes ved å koke røret i vannbad, og sporer tilsettes fra ampullen ved å knekke denne. Kapselen på røret tas deretter av, og mediet helles i petriskåler. Standard OA lapper med 25 µg/lapp ga hemningssoner på 38 til 39 mm diameter. Det ble ikke observert hemningssoner for noen av de undersøkte ensilasjeprøvene, selv ved OA konsentrasjoner på 1000 ppb.
2. Enzym-immunologisk metode for kvantitativ analyse av tetracyclin (Ridascreen[®]), *r-biopharm* ble undersøkt. Dersom teknikken ga tilfredsstillende resultat med tetracyclin, var fabrikanten villig til å utvikle tilsvarende testverktøy for påvisning av OA. Påvisningsgrensen for tetracyclin (TC) er, ifølge denne metoden, 6 ppb for kjøttprøver. Det viste seg å være en del problemer med denne metoden, og de oppnådde resultater var av flere årsaker ikke tilfredsstillende. Standardkurven som fulgte med testverktøyet hadde en øvre grense på 4 ppb, og dekket derfor ikke minimum påvisningsgrense for kjøtt-prøvene. I tillegg varierte avlesninger utført på samme prøver, og repeterbarheten var derfor for dårlig. Metoden må utføres med stor nøyaktighet ettersom man må arbeide med svært små volumer. Beskrivelsen av metoden var komplisert, og det var vanskelig å følge prosedyren og nødvendige beregninger. Derfor ville metoden vanskelig la seg utføre av personer med liten laboratorieerfaring.

Konklusjon:

1. Uspesifikk hemning på grunn av andre komponenter i ensilasjen enn oksolinsyre (OA), synes ikke være noen begrensende faktor for utvikling av en mikrobiologisk metode. Etter nøytralisering til pH 7,0, gav ingen av ensilasjeprøvene falske positive resultater.
2. For å unngå veksthemning av testbakterien *E.coli* på grunn av syre i ensilasjen, måtte prøvene nøytraliseres til pH 5,0 eller høyere.
3. Difco, Mueller Hinton medium pH 7,3 ga mindre sensitivitet enn det mediet som ble brukt til analysene, Test agar pH 6,0 (Merck cat. No. 10663 pH 6,0). Merck, test agar pH 7,2 viste seg å være bedre egnet for påvisning av OA i ensilasje enn pH 6,0.
4. Hemningssonene ved 37°C var mindre enn de ved 30°C.
5. Ved å kontrollere effekten av ren OA løsning, fant jeg at brønnmetoden ga større hemningssoner enn lapp-metoden med samme OA mengde. Det virket som om OA bandt seg til lappen.
6. Å koke ensilasjen for å frigjøre mulig bundet OA fra cellevev og ben, økte ikke metodens sensitivitet.
7. Ved bruk av HPLC-metoden, fant jeg at tilsetning av EDTA ikke hadde noen effekt på gjenvinning av OA.
8. Etter sentrifugering skilte ensilasjen seg i 4 faser; olje, myke proteinpartikler, vandig fase og faste partikler på bunnen.
9. Ved hjelp av HPLC analyse fant jeg at vannfasen ved pH 7,0 inneholdt 80-85% av tilsatt OA, mens oljefasen inneholdt lite OA.
10. Forsøk med å tilsette vannfasen direkte i brønnene gav lavere sensitivitet. Oksolinsyre ble derfor forsøkt oppkonsentrert ved ekstraksjon fra vannfasen ved hjelp av diklormetan. Denne framgangsmåten gav godt resultat, og sensitiviteten til den mikrobiologiske metoden økte så mye at den kan være brukbar ved rutinekontroller. Metoden er langt billigere og

enklere å utføre enn tilsvarende HPLC analyser. Siden det er mange faktorer som kan påvirke agar diffusjons testen, bør disse resultatene kontrolleres nøye. Det blir da mulig å sammenligne konsentrasjon av det antibakterielle midler og tilsvarende hemningoner. For å utvikle denne metoden for andre antibakterielle midler bør andre test organismer tas i betraktning.

11.De to kommersielle testsystemene, Quick meat COPAN[®] og Ridascreen[®] visste seg å være uegnet for undersøkelser av OA i ensilasjen.