

Dr hab. Jarosław Król
Zakład Mikrobiologii, Katedra Patologii
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Wrocław, 2023.11.21

Raport z badania skuteczności przeciwdrobnoustrojowej preparatu **Eco-pH** wobec bakterii *Escherichia coli*

I. Informacje wstępne

Badanie przeprowadzono w dniach od 7.11 – 21.11.2023 z użyciem szczepu referencyjnego *Escherichia coli* ATCC25922 (fermentującego laktozę). Do określania liczby żywych komórek *E. coli* zastosowano podłoże wybiórczo-różnicujące MacConkey'a firmy BioMaxima (Polska), zawierającego w swym składzie substancje hamujące wzrost drobnoustrojów Gram-dodatnich (fiolet krystaliczny, sole kwasów żółciowych) oraz czynnik różnicujący – cukier laktozę. Szczepy *E. coli* fermentujące laktozę po 24 h inkubacji tworzą kolonie barwy czerwono – różowej, średnicy 2-3 mm (ryc. 1).



Ryc. 1. Wzrost laktozododatnich kolonii *Escherichia coli* na podłożu MacConkey'a (posiew 0,1 ml badanego szczepu zawieszonego przez 24 h w płynie fizjologicznym).

II. Posiew preparatu **Eco-pH** na podłoże MacConkey'a

Ponieważ preparat FGZ S stanowi mieszaninę żywych komórek wielu gatunków bakterii, w pierwszym etapie badania wykonano posiew tego preparatu (w rozcieńczeniu 1:10 oraz 1:100) na podłoże MacConkey'a, które inkubowano następnie w temp. 30°C przez 48 godzin w warunkach tlenowych. Po 24 godzinach inkubacji stwierdzono wzrost b. licznych drobnych laktozoujemnych kolonii (średnicy poniżej 0,5 mm, ryc. 2) oraz nielicznych kolonii 1,5-2 mm średnicy, również laktozoujemnych. Nie stwierdzono wzrostu kolonii laktozododatnich. Podłoże MacConkey'a mogło być więc użyte w dalszych etapach doświadczenia, a ewentualny wzrost kolonii laktozododatnich wynikłby wyłącznie z obecności żywych komórek bakterii *Escherichia coli* dodanych do preparatu **Eco-pH**.



Ryc. 2. Posiew płynu **Eco-pH** na podłożu MacConkey'a (rozcieńczenie 1:100, inkubacja przez 24 h). Widoczny wzrost wyłącznie drobnych, laktozoujemnych (bezbarwnych) kolonii.

III. Przygotowanie zawiesiny *E. coli*

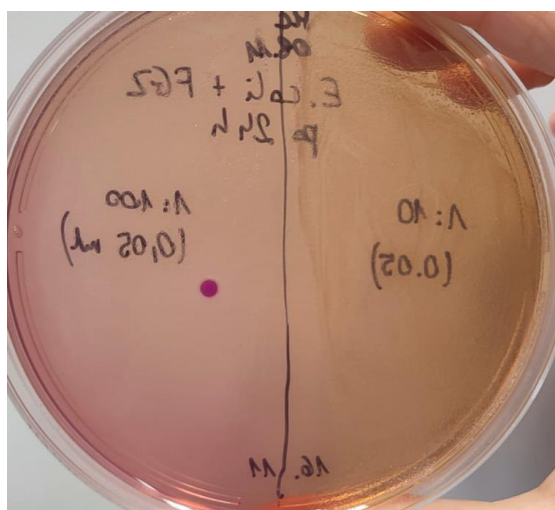
Wyhodowane na podłożu tryptozowo-sojowym bakterie *E. coli* dodano do płynu fizjologicznego, uzyskując zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Następnie, zawiesinę tę rozcieńczono 1:10.000 oraz 1:100.000 i z każdego rozcieńczenia przenoszono 0,1 ml na płytki Petriego z podłożem tryptozowo-sojowym w celu obliczenia liczby komórek *E. coli* w zawiesinie. Na podstawie liczby uzyskanych kolonii po inkubacji podłoża, wartość ta została oszacowana na $5,4 \times 10^7$ /ml zawiesiny.

IV. Ocena działania preparatu **Eco-pH** na *E. coli*

Przygotowaną wcześniej zawiesinę *E. coli* o gęstości 0,5 w skali McFarlanda mieszano z nierozcieńczonym preparatem **Eco-pH** w proporcji 1:1 (2ml zawiesiny *E. coli* + 2ml preparatu) i pozostawiono w temp. pokojowej. Po 24 i 48 godzinach oraz po 5 dniach trwania eksperymentu pobierano po 0,5 ml mieszaniny, rozcieńczano w płynie fizjologicznym w stosunku 1:10, 1:100 oraz 1:10.000 i wysiewano po 0,05 - 0,1 ml każdego rozcieńczenia na podłoże MacConkey'a. Inkubacja podłoży odbywała się w temp. 37°C przez 24 godziny. Na każdym etapie doświadczenia określano liczbę żywych komórek *E. coli* poprzez obliczenie liczby uzyskanych kolonii laktozododatnich. Dla większej wiarygodności uzyskanych wyników, opisaną w punktach III i IV procedurę przeprowadzono dwukrotnie.

W pierwszym badaniu, już po 24 godzinach inkubacji zawiesiny *E. coli* z preparatem **Eco-pH**, nie stwierdzono wzrostu tej bakterii z żadnego użytego rozcieńczenia (nawet 1:10). Nie stwierdzono również wzrostu *E. coli* po 48 godzinach i po 5 dniach inkubacji z płynem **Eco-pH**. Oznacza to inaktywację 100% komórek *E. coli* już po 24 h.

W badaniu powtórnym, po 24 godzinach inkubacji zawiesiny *E. coli* z preparatem **Eco-pH**, nie stwierdzono wzrostu tej bakterii z rozcieńczenia 1:10, natomiast wzrost 1 kolonii z rozcieńczenia 1:100 (ryc. 3). Opisana sytuacja mogłaby wynikać albo z przypadkowego przeniesienia 1 komórki *E. coli* podczas sporządzania seryjnych rozcieńczeń, albo z faktu hamowania kontaktowego wzrostu *E. coli* bezpośrednio na podłożu przez większe stężenie (tj. 1:10) preparatu **Eco-pH**.



Ryc. 3. Podłoże MacConkey'a z naniesioną zawiesiną bakterii *Escherichia coli* inkubowaną z płynem **Eco-pH** przez 24 godziny (po stronie lewej rozcieńczenie 1:100, po prawej – 1:10). Widoczne b. liczne kolonie laktozoujemne przy rozcieńczeniu 1:10 oraz jedna kolonia laktozododatnia (*E. coli*) przy rozcieńczeniu 1:100.



W badaniu powtórным, po 48 godzinach i po 5 dniach inkubacji zawiesiny *E. coli* z preparatem **Eco-pH**, nie stwierdzono już wzrostu tej bakterii z żadnego z użytych rozcieńczeń.

Przyjmując nawet, że obecność 1 kolonii przy rozcieńczeniu 1:100 nie jest kwestią przypadku, liczba komórek *E. coli* po 24-godzinym działaniu preparatu **Eco-pH** wynosiła 2×10^3 , co oznacza redukcję żywych komórek tej bakterii na poziomie 99,995%.

V. Wniosek końcowy

Preparat **Eco-pH** posiada b. silne działanie przeciwbakteryjne wobec *Escherichia coli*, powodując inaktywację 99,995 – 100% komórek tej bakterii już po 24 godzinach działania oraz 100% komórek po 48 godzinach.

KIEROWNIK ZAKŁADU MIKROBIOLOGII
dr hab. Jarosław Król
HEAD OF THE MICROBIOLOGY DEPARTMENT
Jarosław Król, DVM, PhD