



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

Wrocław, 2023.06.07

Raport z badania skuteczności przeciwdrobnoustrojowej preparatu **Eco-pH FGE** wobec bakterii *Listeria monocytogenes*

I. Informacje wstępne

Badanie przeprowadzono w dniach od 10.05 – 16.05.2023 z użyciem szczepu referencyjnego *Listeria monocytogenes* ATCC7644. Do określania liczby żywych komórek *L. monocytogenes* zastosowano podłoże wybiórczo-różnicujące PALCAM firmy Oxoid (Wielka Brytania), zawierającego w swym składzie substancje hamujące wzrost drobnoustrojów innych niż *Listeria* (chlorek litu, polimyksyna B, chlorowodorek akryflawiny i ceftazydym) oraz czynnik różnicujący eskulinę. Bakterie z rodzaju *Listeria* przekształcają eskulinę do eskuletyny, która wraz z jonami żelaza zawartymi w podłożu daje brązowo-czarne zabarwienie wokół kolonii.

II. Posiew preparatu **Eco-pH FGE** na podłoże PALCAM

Ponieważ preparat **Eco-pH FGE** stanowi mieszaninę żywych komórek wielu gatunków bakterii, w pierwszym etapie badania wykonano posiew tego preparatu (w rozcieńczeniu 1:5 oraz 1:10) na podłoże PALCAM, które inkubowano następnie w temp. 30°C przez 48 godzin w warunkach tlenowych. Nie stwierdzono wzrostu żadnego z drobnoustrojów wchodzących w skład preparatu **Eco-pH FGE**. Podłoże PALCAM mogło być więc użyte w dalszych etapach doświadczenia, a ewentualny wzrost kolonii eskulinododatnich wynikał wyłącznie z obecności żywych komórek bakterii *Listeria monocytogenes* dodanych do preparatu **Eco-pH FGE**.

III. Przygotowanie zawiesiny *L. monocytogenes*

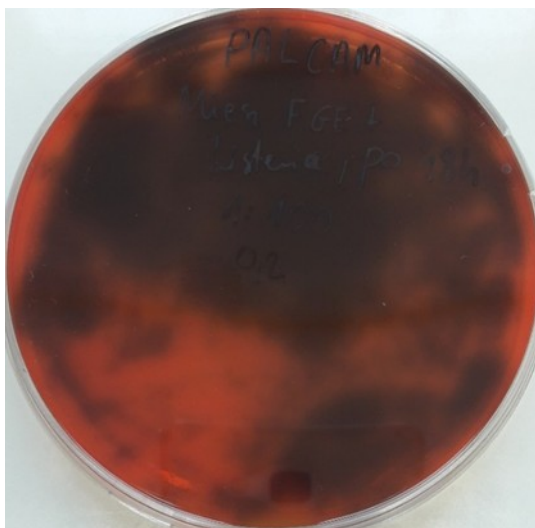
Wyhodowane na podłożu agarowym z krwią bakterie *L. monocytogenes* dodano do płynu fizjologicznego, uzyskując zawiesinę o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Następnie, zawiesinę tę rozcieńczono 1:1000, 1:10.000 oraz 1:100.000 i z każdego rozcieńczenia przenoszono 0,2 ml na płytki Petriego z podłożem PALCAM w celu obliczenia liczby komórek *Listeria* w zawieszynie. Na podstawie liczby uzyskanych kolonii po inkubacji podłoża, wartość ta została oszacowana na $2,1 \times 10^8/\text{ml}$.

IV. Ocena działania preparatu **Eco-pH FGE** na *L. monocytogenes*

Przygotowaną wcześniej zawiesinę *L. monocytogenes* o gęstości 0,5 w skali McFarlanda mieszano z nierozcieńczonym preparatem **Eco-pH FGE** w proporcji 1:1 (2ml zawiesiny *Listeria* + 2ml preparatu) i pozostawiono w temp. pokojowej. Po 24 i 48 godzinach oraz po 5 dniach trwania eksperymentu pobrano po 0,5 ml mieszaniny, rozcieńczono w płynie fizjologicznym w proporcji 1:10, 1:100, 1:1000 oraz 1:10.000 i wysiano po 0,2 ml każdego rozcieńczenia na podłoże PALCAM. Inkubacja podłoża odbywała się w temp. 30°C przez 24 godziny. W każdym ocenianym momencie określano liczbę żywych komórek *L. monocytogenes* poprzez obliczenie liczby uzyskanych kolonii eskulinododatnich. Liczba ta nie uległa obniżeniu w stosunku do wartości wyjściowej nawet po 5 dniach kontaktu komórek *Listeria* z płynem **Eco-pH FGE**. Zaobserwowano natomiast, że stopień wzrostu *Listeria* (mierzony wielkością wyrosłych kolonii bakteryjnych) jest ściśle uzależniony od stężenia płynu **Eco-pH FGE**. Preparat ten rozcieńczony 1:10 praktycznie całkowicie hamował wzrost *L. monocytogenes* (brak widocznych kolonii, ryc. 1). Wraz ze wzrostem rozcieńczenia mieszaniny płynu **Eco-pH FGE** oraz zawiesiny *Listeria* uzyskiwano wzrost kolonii bakteryjnych o coraz większej średnicy (ok. 0,1-0,2 mm przy stężeniu 1:100 [Ryc. 2], ok. 0,5 mm przy stężeniu 1:1000 oraz ok. 1 mm przy stężeniu 1:10.000 [Ryc. 3]).



Ryc. 1. Podłoże PALCAM z naniesioną bakterią *Listeria monocytogenes* inkubowaną z płynem **Eco-pH FGE** przez 24 godziny (rozcieńczenie 1:10). Brak wzrostu kolonii bakteryjnych.



Ryc. 2. Podłoże PALCAM z naniesioną bakterią *Listeria monocytogenes* inkubowaną z płynem **Eco-pH FGE** przez 48 godzin (rozcieńczenie 1:100). Widoczne liczne (niepoliczalne), drobne kolonie eskulinododatnie.



Ryc. 3. Podłoże PALCAM z naniesioną bakterią *Listeria monocytogenes* inkubowaną z płynem **Eco-pH FGE** przez 5 dni (rozcieńczenie 1:10.000). Widoczne liczne kolonie eskulinododatnie średnicy ok. 1 mm.



V. Wniosek końcowy

Preparat **Eco-pH FGE** posiada silne działanie bakteriostatyczne wobec *Listeria monocytogenes*, manifestujące się jako całkowite zahamowanie wzrostu tej bakterii jeszcze przy rozcieńczeniu 1:10.

p.o. KIEROWNIKA
Zakładu Mikrobiologii
dr hab. Jarosław Król