

# Effekt av ImproWin™\* på bakteriell vekst

\* *ImproWin™ er her fellesbetegnelse for ImproWin® og DogVitality® -for mage og tarm da bruk av varemerket DogVitality® ikke var bestemt ennå på studietidspunktet.*

*Denne kommentaren er påført av oppdragsgiver, Vitality Innovation AS, i etterkant av studien.*

**Malin Borg og Henning Sørum**



**Norges veterinærhøgskole**

**Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi**

**Seksjon for mikrobiologi, immunologi og parasittologi**

Juni-2005

## **Innledning:**

Prosjektet er et samarbeid mellom oppdragsgiver Vitality Innovation AS og Norges veterinærhøgskole, Seksjon for mikrobiologi, immunologi og parasittologi. ImproWin™ er et førtilskudd, og oppdraget gikk ut på å undersøke den bakterielle veksten under påvirkning av dette produktet. Dette ble bestemt utført ved å avlese MIC-verdi (minste hemmende konsentrasjon) direkte fra agarskåler tilsatt økende konsentrasjon av ImproWin™.

Valget av bakteriearter som skulle inngå i studien er gjort ut fra et ønske om å dekke flest mulige grupper av bakterier som kan inneholde aktuelle sykdomsfremkallende bakterier hos pattedyr. Bakterier som forekommer på hud, slimhinner og i tarm er representert samtidig som de viktigste taksonomiske gruppene er inkludert i stammevalget.

Følgende bakteriestammer ble valgt:

*Escherichia coli* ATCC 11303  
*Staphylococcus aureus* ATCC 10832  
*Pasteurella multocida subsp. multocida* CCUG 43504<sup>T</sup>  
*Listeria monocytogenes* NCTC type 1 7973  
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853  
*Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356<sup>T</sup>  
*Enterococcus faecium* CCUG 36804

## **Materialer:**

- TSB (Tryptic Soy Broth, Bacto™)
- TSA (TSB tilsatt 1,5% Bacto™ Agar)
- Skåler (9 cm, Heger AS)
- Blodagar skåler (Blood agar base No. 2, Oxoid) med 5% storfeblod
- Fysiologisk saltvann (0.9 % NaCl)
- Vinkelstaver
- Podeøser
- pH - meter
- 47 °C vannbad
- ImproWin™

## **Metoder:**

Det ble laget en stockløsning av ImproWin™ på 100 mg/ml ved å veie opp 50 g av pulveret og blande i 500 ml sterilt destillert vann.

For å finne et passende konsentrasjonsintervall ble det gjennomført et forforsøk med *Escherichia coli* ATCC 11303 og *Staphylococcus aureus* ATCC 10832 som representanter for henholdsvis Gram- og Gram+ bakterier. Det ble laget TSA skåler med følgende konsentrasjoner av ImproWin™; 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 8 mg/ml, 10 mg/ml og 20 mg/ml. Stockløsningen sto under røring ved tilsats til TSA mediet,

slik at det uopløste materialet også ble tatt med. Forforsøket og hovedforsøket ble utført som beskrevet under forsøksplan med henholdsvis 3 og 2 parallelle skåler.

### Forsøksplan:

- Dag 1: Bakteriekulturene ble dyrket på blodagarskåler og inkubert ved 37 °C o.n. *Lactobacillus acidophilus* ble inkubert i 2 døgn. En passende mengde TSB ble laget.
- Dag 2: En koloni fra de respektive stammene ble dyrket i hvert sitt 10 ml rør med TSB og inkubert etter anvisningen beskrevet under dag 1. Det ble preparert et stort nok volum av TSA mediet slik at det ble 4 skåler av hver konsentrasjon pr. bakteriestamme + kontroll (uten tilsats av ImproWin™). pH- verdien ble målt i 1 skål fra hver konsentrasjon.
- Dag 3: 200 µl av o.n kultur ble sådd om i 10 ml TSB og inkubert i 37 °C i 3,5 t. De respektive bakteriekulturene ble så fortynnet 1:10 i fysiologisk saltvann. 100 µl av fortynningen ble så inokulert på 2 parallelle TSA skåler med de ulike konsentrasjonene av ImproWin™.

På grunn av at *Lactobacillus acidophilus* og *Pasteurella multocida* vokste dårlig på TSA etter metoden beskrevet under forsøksplanen, ble det i stedet benyttet blodskåler (Blodagarbase no.2 (Oxoid) + 5% blod) som er et mer næringsrikt medium. Disse skålene tilsatt ImproWin™ viste en lavere pH-verdi (<0,8) enn tilsvarende TSA skåler. Det ble så gjort en test for å sammenligne veksten på følgende medier; Blodagarbase no.2 m/5 % blod, TSA m/5 % blod og TSA uten blod ved å pøde direkte fra disse skålene i stedet for fra buljong. *Pasteurella multocida* og *Lactobacillus acidophilus* på skål, inkubert i henholdsvis 1 døgn og 2 døgn, ble podet i hvert sitt rør med en liten mengde TSB til en OD som på øyemål tilsvarte en 3,5 t kultur (fra *S. aureus* og *E. coli*). Dette ble igjen fortynnet 1:10 i TSB i stedet for fysiologisk saltvann. Dette ga god vekst på alle skålene. På bakgrunn av dette ble det valgt å gå tilbake til TSA mediet og utføre dyrkningen som beskrevet over. Dette gjør MIC- resultatet mer sammenlignbart med resultatet fra de andre bakteriestammene.

## **Resultater:**

### **For-forsøk:**

Tabell 1: Vekst av *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* ved eksponering av ImproWin™.

Konsentrasjon av ImproWin™	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
Kontroll (u/ImW)	ov	ov
1 mg/ml	ov	ov
2 mg/ml	ov (-)	ov (-)
4 mg/ml	■	■
6 mg/ml	-	-
8 mg/ml	-	-
10 mg/ml	-	-

20 mg/ml	-	-
----------	---	---

ov – overvekst

På bakgrunn av MIC verdien funnet i dette forforsøket (4 mg/ml for både *E. coli* og *S. aureus*), ble det i første omgang bestemt å sette opp en rekke av følgende konsentrasjoner; 1 mg/ml, 2 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3 mg/ml, 3.5 mg/ml, 4 mg/ml.

**Tabell 2:** pH-verdier av TSA kontrollskål (u/ ImproWin™) og TSA skåler tilsatt økende konsentrasjon av ImproWin™.

Konsentrasjon av ImproWin™	pH
Kontroll (u/ImW)	7,25
1 mg/ml	6,85
2 mg/ml	6,42
4 mg/ml	5,30
6 mg/ml	4,59
8 mg/ml	4,23
10 mg/ml	4,08
20 mg/ml	3,67

Både *E. coli* og *S. aureus* vokste ikke ved tilsats av 4 mg/ml av pulveret, noe som var forventet med en pH- verdi på 5,30.

### Hovedforsøk:

**Tabell 3:** Vekst av de ulike bakteriestammene ved økende konsentrasjon av ImproWin™. Tabellen viser bare én verdi, da de 2 parallelle skålene av hver konsentrasjon pr. bakteriestamme ga samme resultat.

Konsentrasjon av ImproWin	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. faecium</i>
Kontroll (u/ImW)	ov	ov	ov	ov	ov
1 mg/ml	ov	200-500	ov	ov	ov
2 mg/ml	ov	>1000	ov	ov	ov
2,5 mg/ml	ov	>1000	ca.500	ov	ov
3 mg/ml	ov	>1000	■	ov	ov, tynnere lag
3,5 mg/ml	ov, mindre enkeltkol.	vekst	-	ov, tynnere lag	ov, tynnere lag
4 mg/ml	■	■	-	■	vekst, meget tynt lag
4,5 mg/ml					■

ov - overvekst

Konsentrasjon av ImproWin	<i>L. acidophilus</i>	<i>P. multocida</i>
Kontroll (u/ImW)	ov	ov
1 mg/ml	ov	ca.100
1,5 mg/ml *		■
2 mg/ml	ov	
2,5 mg/ml	ov	
3 mg/ml	ov, tynnere lag	
3,5 mg/ml	god vekst, mindre kolonier	
4 mg/ml	vekst	

4,5 mg/ml	vekst	
5 mg/ml **		

\* kun testet på *Pasteurella multocida*

\*\* kun testet på *Lactobacillus acidophilus*

Tabell 4: pH-verdier av TSA kontrollskål (u/ ImproWin™) og TSA skåler tilsatt økende konsentrasjon av ImproWin™.

Konsentrasjon av ImproWin	pH
Kontroll (u/ImW)	7,21
1 mg/ml	6,82
1,5 mg/ml	6,64
2 mg/ml	6,43
2,5 mg/ml	6,23
3 mg/ml	5,99
3,5 mg/ml	5,71
4 mg/ml	5,42
4,5 mg/ml	5,09
5 mg/ml	4,87
5,5 mg/ml	4,78
6 mg/ml	4,71
7 mg/ml	4,44

Resultatet viste at *Lactobacillus acidophilus* og *Enterococcus faecium* var de som hadde høyest MIC- verdi, på henholdsvis 5 mg/ml og 4,5 mg/ml. pH-verdiene ved disse konsentrasjonene er på henholdsvis 4,87 og 5,09. *Pasteurella multocida* har den laveste MIC verdien på 1,5 mg/ml.

*Pseudomonas aeruginosa* har en MIC verdi på 3 mg/ml. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* og *Listeria monocytogenes* har en verdi på 4 mg/ml.

## Konklusjon:

Forsøkene viser at ImproWin™ inneholder komponent(er) som virker hemmende på alle de bakteriestammene som er inkludert i studien. Det er funnet en relativt markert spredning av MIC-verdiene relatert til ImproWin™. *E. coli*, *S. aureus* og *L. monocytogenes* har alle tre den samme MIC-verdi på 4 mg/ml. *E. faecium* og *L. acidophilus* har høyere MIC-verdier, henholdsvis 4,5 og 5 mg/ml. Disse resultatene sammenholdt med pH-målinger i mediene peker på at komponenten av organisk syre i ImproWin™ er en viktig bidragsyter til bakteriehemmingen. De målte pH-verdiene i mediene og aktuell MIC-verdi samsvarer godt med de pH-verdier som i litteraturen angis som hemmende for disse bakteriene (se også Hydro-rapport).

Den lave MIC-verdien *P. multocida* har overfor ImproWin™ er forventet utfra at familien Pasteurellaceae består av mange slimhinnebakterier som er relativt følsomme overfor fysikalske og kjemiske faktorer. Den relativt lave MIC-verdien *P. aeruginosa* – stammen viser er imidlertid noe overraskende siden denne bakterien generelt er godt tilpasset miljøendringer som inntreffer.

Bruk av ImproWin™ som fôrtilskudd vil klart ha et potensiale til å påvirke bakteriefloraen i tarmkanalen og i andre biologiske og fysikalske miljøer hvor fôret kommer i kontakt med bakterier. Effekten er imidlertid doseavhengig og MIC-verdiene ligger fra 1 til 3 tierpotenser over nivået de fleste antimikrobielle stoffer benyttet i infeksjonsterapi har sine MIC-verdier.

Viser også til rapporten fra den parallelle studien av ImproWin™ hemming av bakteriene *Micrococcus luteus* og *Bacillus subtilis* med tittelen ”Antibakteriell effekt av ImproWin™ ved agardiffusjon i testsystemer med *Micrococcus luteus* og *Bacillus subtilis*” utført ved Seksjon for mattrygghet, Institutt for mattrygghet og infeksjonsbiologi, Norges veterinærhøgskole.