

Diss. No. 4457

**Quantitative Manometric Investigation of
Antimicrobial Agents on the Growth of Microorganisms
under Chemically Defined Nutritional Conditions**

DISSERTATION

submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY
ZURICH

for the degree of Doctor of Natural Sciences

presented by

ZAKI AHMED ALLAWALA

B. Sc., M. Sc. University of Karachi
born January 1, 1939
Citizen of Pakistan

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. P. Speiser
P.-D. Dr. M. Soliva

Juris Druck + Verlag Zurich
1970

4. SUMMARY

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* in synthetic, semisynthetic and natural broth are studied for correlation between bacterial growth, measured by the viable plate count method, and oxygen consumption using the Warburg manometric method.

- There is found to be a marked parallelism between growth and oxygen consumption in the case of *Escherichia coli* in synthetic medium 1.
- This "parallelism" is not found to hold true for all the media and microorganisms studied. *Staphylococcus aureus* shows that the rate of oxygen uptake is still increasing when the growth rate has already begun to decrease.
- One single subculture of both bacteria does not differ considerably from the general mean behaviour of all the subcultures in different manometers.

During the logarithmic growth phase the growth rate is compared with the rate of oxygen consumption.

- On average the rate of oxygen consumption is found to be less than the rate of growth, when expressed by viable count. This is especially true of *Escherichia coli* and to a somewhat lesser extent of *Staphylococcus aureus*. It is also true of the average behaviour in media 1,2, and 3 but not in medium 4.
- As expected, growth rate and rate of oxygen consumption differ in various media. On average the rates are fastest in medium 3 followed by media 2,4,1.

Antimicrobial agents such as aromatic alcohols, Quats and mercurial compound are tested quantitatively for their effect on the growth and oxygen consumption of various bacteria. After a contact time of 24 hours bacteriostatic and bactericidal values are determined using the viable plate count method.

- *Escherichia coli* in the presence of 0.1 % and 0.2 % benzyl alcohol and 0.05 % and 0.1 % 2-phenyl-ethylalcohol shows an increase in oxygen consumption.
- Aromatic alcohols are found to be non-specific in their action. 2-phenyl-ethylalcohol at a concentration of 0.5 % is more active against *Ps. aeruginosa* than *Staph. aurea* and *Esch. coli*.
- Quats and mercurial compounds are specific in their action. They are found to be more active against the Gram-positive than the Gram-negative bacteria. In the Gram-negative bacteria group *Ps. aeruginosa* is more resistant than *Esch. coli*.
- Quats are approximately 10 times less active than phenylmercuric acetate. On the whole there is not much difference between the bacteriostatic and bactericidal effect of benzalkonium chloride and cetylpyridinium chloride of the Quats group.

The conclusion is reached that the Warburg manometric technique is a useful method for quantitative evaluation of antimicrobial and preservative agents. There is no significant variation in the rate constants measured. The manometric method, as described, could therefore eventually replace the viable plate count method, at least in the solution of certain problems.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Quantitative manometrische Untersuchung von antimikrobiellen Stoffen auf das Wachstum von Mikroorganismen unter chemisch definierten Nährbedingungen.

Zweck dieser Arbeit ist eine Korrelation zwischen Bakterienwachstum und Sauerstoffverbrauch unter verschiedenen Nährbedingungen zu finden und die Wahl eines einfachen und chemisch definierten Nährmediums für die quantitative Bewertung antimikrobieller Stoffe.

Bei *Staph. aureus* und *Esch. coli* wird die Beziehung zwischen Bakterienwachstum, das mit Hilfe der Gussplatten-Methode bestimmt wird und Sauerstoffverbrauch unter Züchtungsbedingungen mit synthetischen (Medium 1), halbsynthetischen (Medien 3 und 4) und natürlichen Nährmedien (Medium 2) mittels der manometrischen Warburg Methode untersucht.

- Im synthetischen Medium 1 ergibt sich bei *Esch. coli* eine deutliche Parallelität zwischen Wachstum und Sauerstoffverbrauch.
- Diese Parallelität trifft aber nicht für alle geprüften Medien und Mikroorganismen zu. Bei *Staph. aureus* ist ersichtlich, dass bei Abnahme der Wachstumsgeschwindigkeit die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme noch zunimmt.
- Nachkulturen beider Bakterien weichen nur wenig von dem allgemeinen Durchschnittsverhalten sämtlicher Nachkulturen in verschiedenen Manometern ab.

Während der logarithmischen Wachstumsphase wird die Wachstumsgeschwindigkeit mit dem Sauerstoffverbrauchs verglichen.

- Im Durchschnitt ergibt sich eine geringere Geschwindigkeit für den Sauerstoffverbrauch gegenüber der Wachstumsgeschwindigkeit. Dies trifft besonders im Falle von *Esch. coli* zu, etwas weniger im Falle von *Staph. aureus*. Diese Untersuchungsergebnisse treffen vor allem für das Verhalten in den Nährmedien 1,2, und 3 zu, jedoch nicht für das Nährmedium 4.
- Wie erwartet, unterscheiden sich die Geschwindigkeiten des Sauerstoffverbrauchs und des Wachstums in verschiedenen Medien. Im

Durchschnitt sind die Geschwindigkeiten beim Nährmedium 3 am grössten, gefolgt von den Medien 2,4, und 1.

Die Wirkung antimikrobieller Stoffe, wie z. B. aromatische Alkohole, quaternäre Ammoniumbasen und Quecksilberverbindungen auf Wachstum und Sauerstoffverbrauch verschiedener Bakterien wird quantitativ geprüft. Nach einer Kontaktzeit von 24 Stunden werden die bakteriostatischen und bakteriziden Werte durch Anwendung der Gussplattenmethode bestimmt.

- Esch. coli zeigt bei Anwesenheit von 0,1 % und 0,2 % Benzylalkohol und 0,05 % und 0,1 % 2-Phenyl-Aethylalkohol eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs.
- Aromatische Alkohole zeigen keine Spezifität gegenüber den untersuchten Mikroorganismen. 2-Phenyl-Aethylalkohol bei einer Konzentration von 0,5 % weist eine grössere Wirkung gegenüber Ps. aeruginosa auf, als gegenüber Staph. aureus und Esch. coli.
- Quaternäre Ammoniumbasen und Quecksilberverbindungen zeigen eine spezifische antibakterielle Wirkung, indem sie gegenüber Gram-positiven Keimen eine wesentlich aktivere Wirkung aufweisen, als gegenüber Gram-negativen Keimen. Innerhalb der untersuchten Gramnegativen Keime ergibt sich bei Ps- aeruginosa eine höhere Resistenz als bei Esch. coli.
- Quaternäre Ammoniumbasen zeigen eine etwa zehn Mal schwächere Wirkung als Phenylquecksilberazetat. Im ganzen unterscheidet sich die bakteriostatische und bakterizide Wirkung der untersuchten Quats, Benzalkoniumchlorid und Cetylpyridinium nur wenig.

Abschliessend darf gesagt werden, dass die manometrische Warburg Methode sich zur quantitativer Bewertung antimikrobieller Stoffe und Konservierungsmittel als gut verwendbar erweist. Die Gesamtvariation zwischen den gemessenen Verhältniskonstanten ist unbedeutend. Die Manometrische Methode könnte daher eventuell die mühsamere Gussplattenmethode ersetzen und zumindestens zur Lösung bestimmter Probleme von Vorteil sein.