

Badania wykonała:

dr hab. Irena Maliszewska
Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii
Wydział chemiczny
Politechnika Wrocławska

Badania efektu bakterio- i grzybostatycznego próbek blachy i tworzywa sztucznego

Zgodnie z normą „PN-EN ISO 846:2002:

Tworzywa sztuczne - Ocena działania mikroorganizmów” w określonych warunkach środowiskowych mikroorganizmy mogą osiadać i tworzyć kolonie na powierzchni materiałów, a obecność mikroorganizmów oraz ich produktów metabolizmu wpływa na uszkodzenie tworzywa lub/i zdolność do użytkowania materiału.

W oparciu o normę PN-EN ISO 846:2002 określono pogorszenie właściwości materiałów pod wpływem działania wybranych mikroorganizmów i oznaczono efekt bakterio- i grzybostatyczny dostarczonych przez zleceniodawcę następujących próbek:

- blacha lakierowana proszkowo (barwa lakieru biała i czarna),
- tworzywo sztuczne z domieszką substancji hamującej rozwój mikroorganizmów,

poprzez ocenę wizualną, i zmianę właściwości fizycznych.

W poniższych badaniach zastosowano następującą definicję efektu bakterio- i grzybostatycznego.

Efekt bakterio- i grzybostatyczny to według punktu 3 w/w normy efekt spowodowany działaniem środka do zwalczania drobnoustrojów, który zabezpiecza materiał przed porośnięciem przez bakterie/grzyby w wilgotnych warunkach.

Zasada badania polegała na poddawaniu próbek działaniu wybranych szczepów bakterii/grzybów przez określony czas (tutaj 28 dni) w określonych warunkach wilgotności i temperatury (według punktu 8.1 normy była to temperatura 23 ± 1 °C; przy wilgotności względnej >95%- wilgotność taka osiągnięta jest przez agar- według tabeli 3 w/w normy). Hodowle szczepów prowadzono według punktu 5.2.2 w/w normy na podłożu agarowym.

1. **Oznaczanie efektu grzybostatycznego** (w tym przypadku *Aspergillus niger* wykonano według punktu 4.2.1.1. – metoda B - oznaczanie efektu grzybostatycznego. Według tego punktu próbki są wystawiane na działanie zawiesiny (tutaj komórek-konidiów pleśni) w obecności pełnowartościowej pożywki tj. ze źródłem węgla. Każde zahamowanie wzrostu, zarówno na badanym materiale jak i na pożywce (strefa inhibitorowa) wskazuje na aktywność grzybostatyczną materiału lub obecność środka hamującego rozwój drobnoustrojów. Do badań wybrano szczep pleśni *A. niger*, co jest zdane z punktem 5.2.1., w którym podano, że wybór szczepów zależy od porozumienia zainteresowanych stron.

Próbki do badań przygotowano zgodnie z punktem 6.1. normy i stanowiły je kwadraty o wymiarach 30mm x 30mm.

W badaniach zastosowano wariant B normy (według punktu 4.2.1.1) metody czyli oszacowanie efektu grzybostatycznego. Próbki były wystawiane na działanie mieszaniny zawiesiny konidiów *A. niger* w obecności pełnowartościowej pożywki tj. ze źródłem węgla przygotowanej według punktu 5.2.3.5 w/w normy (źródło węgla : roztwór glukozy o stężeniu 30 g/L).

Żywotność testowanych pleśni sprawdzana była zgodnie z punktem 8.2.1.4. w/w normy.

W tym celu napełniono sterylne szalki Petriego pożywką pełnowartościową (5.2.3.5) postępując zgodnie z punktem 8.2.1.1 i zaszczepiono je jedną kroplą każdej zawiesiny komórek. Inkubowano w temperaturze 24 ± 1 °C przez 3-4 doby. Po upływie wymaganego czasu obserwowano obfity wzrost drobnoustroju, co potwierdzało odpowiednie przygotowanie komórek oraz ich wymaganą żywotność.

Według normy po zakończeniu ekspozycji próbek wizualnie oceniano próbki przed i po oczyszczeniu. Wyniki badań próbek poddanych działaniu biologicznemu były porównywane z wynikami uzyskanymi na podstawie oceny próbek nie poddanych działaniu mikroorganizmów.

Oceny efektów modyfikacji badanych próbek dokonywano zgodnie z punktem 9.1 normy- ocena wizualna wzrostu grzybów oraz punktem 9.2.1- ocena próbek oczyszczonych. Po okresie 28 dniowej inkubacji próbki poddano ocenie wizualnej i mikroskopowej. W przypadku oceny wizualnej na podstawie tabeli 4 w/w normy przyjęto następujące stopnie oceny:

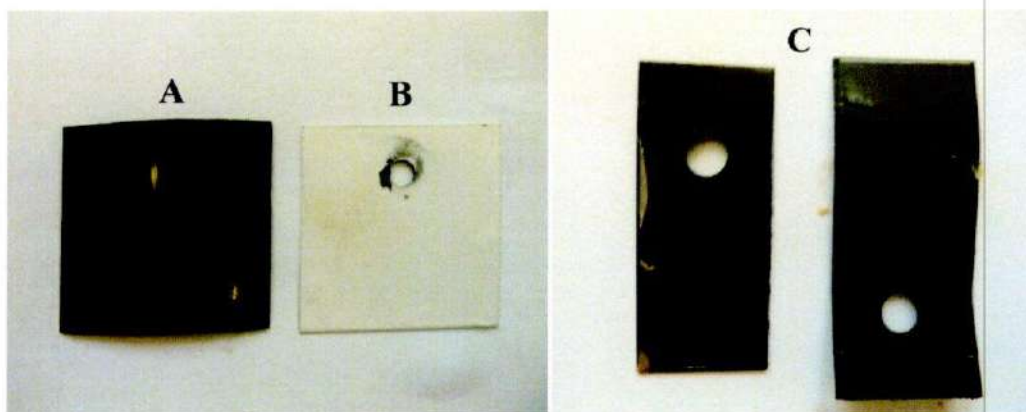
- 0- Brak widocznego pod mikroskopem wzrostu pleśni na próbce;
- 1- Wzrost pleśni na próbce niewidoczny nieuzbrojonym okiem, lecz wyraźnie widoczny pod mikroskopem;

- 2- Wzrost pleśni na próbce dostrzegalny nieuzbrojonym okiem, ale mniej niż 25% powierzchni pokryte hodowlą;
- 3- Wzrost pleśni na próbce dostrzegalny nieuzbrojonym okiem pokrywający do 25% powierzchni;
- 4- Znaczny wzrost pleśni na próbce, pokrywający więcej niż 50% powierzchni badanej;
- 5- Intensywny wzrost pleśni na całej powierzchni badanej.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń, postępując zgodnie z punktem 9.1 w/w normy, próby oceniano nieuzbrojonym okiem, a następnie w każdym przypadku potwierdzano pod mikroskopem stereoskopowym (powiększenie 50x). Wzrost pleśni oceniano według Tabeli 4 w/w normy- „Ocena wzrostu grzybów”. Dodatkową ocenę próbek przeprowadzono po ich oczyszczeniu zgodnie z punktem 9.1 (czyszczenie próbek przeprowadzono zgodnie z punktem 9.2.1 czyli próbki wyjęto z agaru, zanurzone w mieszaninie etanolu z wodą przygotowanego według 5.1.11.1, przepłukano pod bieżącą wodą, wytarto papierową bibułą i pozostawiono przez noc do wyschnięcia w temperaturze pokojowej.

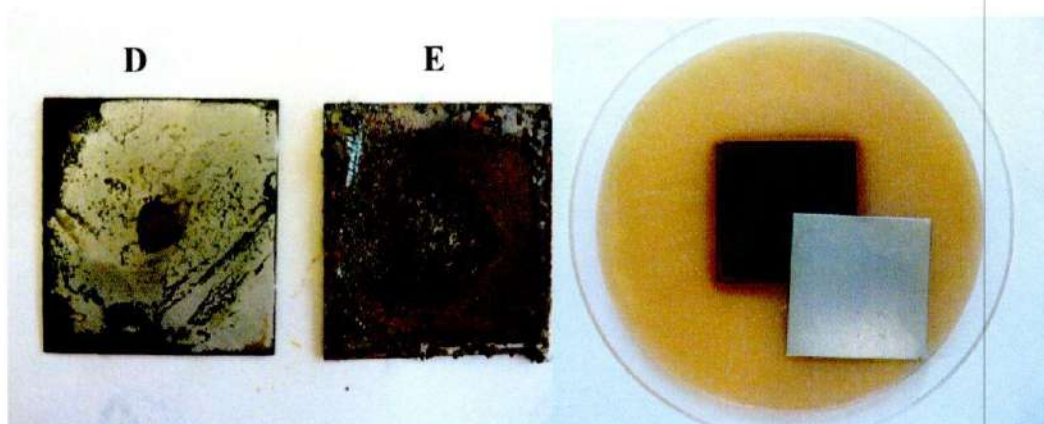
Ocenę wizualną dotyczącą każdej próbki wyrażono stopniem wzrostu komórek w sposób podany w tabeli 4.

- Wygląd próbek dostarczonych do badań po 28 dniach inkubacji w obecności badanych mikroorganizmów przedstawiono na rysunku 1A-C. Jak widać żadna z próbek w trakcie kontaktu z drobnoustrojami nie uległa widocznym zmianom.



Rysunek 1. Obraz powierzchni próbek po 28 dniach inkubacji w obecności *A. niger*. A- tworzywo sztuczne z domieszką środka przeciwdrobnoustrojowego; B- blacha lakierowana proszkowo (biała); C- blacha lakierowana proszkowo (czarna)

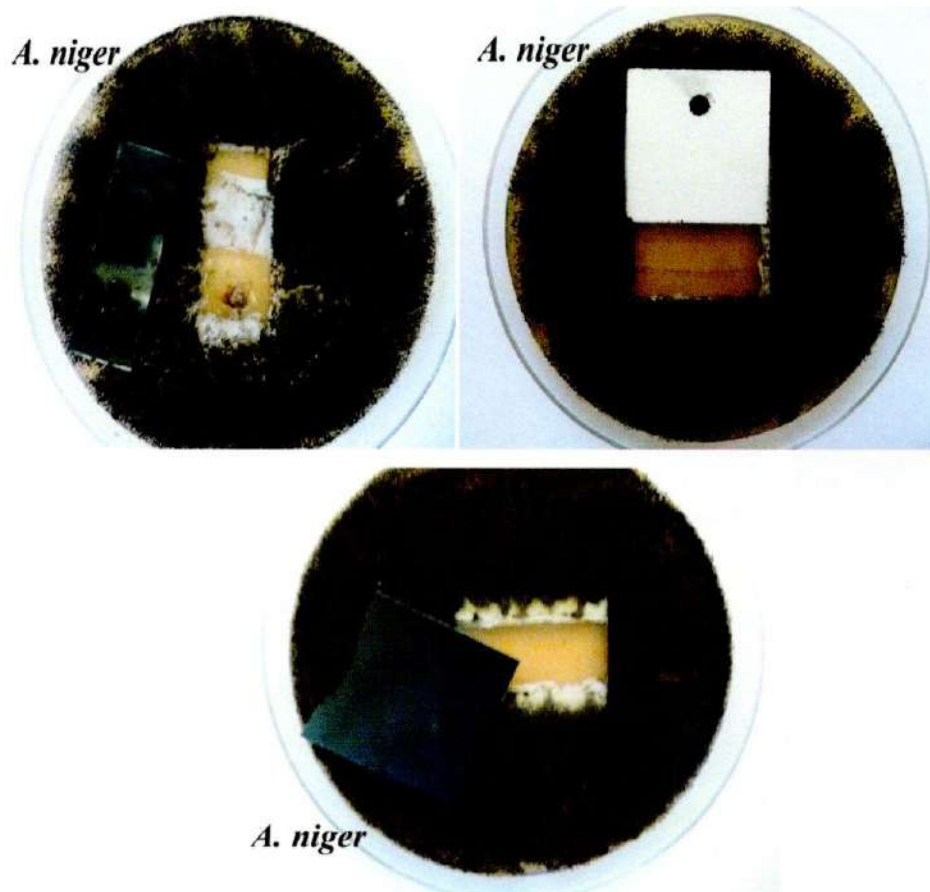
- Wygląd próbek kontrolnych (blacha) poddanych działaniu pleśni po 28 dniach inkubacji przedstawiono na rysunkach 2 D-E. Jak widać dostarczone do testów próbki blachy w trakcie badania ulegały widocznym zmianom- następowała silna korozja materiału. Na pożywce, w miejscu kontaktu próbki z powierzchnią nie zaobserwowano hamowania wzrostu badanego szczepu *A. niger*, co świadczy o nieobecności środka hamującego rozwój badanej grupy drobnoustrojów. Tworzywo sztuczne bez środka konserwującego nie ulegało widocznym zmianom. Nie obserwowano również hamowania wzrostu badanego mikroorganizmu.



Rysunek 2. Obraz powierzchni próbek po 28 dniach inkubacji w obecności *A. niger*. D i E- blacha- kontrola; z prawej widać zmiany barwy pożywki na skutek korozji blachy i brak hamowania wzrostu drobnoustrojów

Działanie grzybostatyczne badanych próbek

Na poniższych rysunkach przedstawiono zahamowanie wzrostu pleśni *A. niger* w obecności badanych próbek tj. blachy lakierowanej proszkowo i tworzywa sztucznego z domieszką materiału przeciwdrobnoustrojowego. Jak widać na poniższych rysunkach dostarczone do badań próbki nie ulegały widocznym zmianom. Na pożywce, w miejscu kontaktu próbek z powierzchnią, zaobserwowano silne hamowanie wzrostu badanego szczepu *A. niger*, co świadczy o obecności środka hamującego rozwój badanej grupy drobnoustrojów.



Rysunek 2. Obraz powierzchni płytki po 28 dniach inkubacji *A. niger* w obecności badanej próbki; od góry z lewej blacha lakierowana proszkowo (czarna) i blacha lakierowana proszkowo (biała); u dołu- tworzywo sztuczne z domieszką środka przeciwdrobnoustrojowego- obrazy po usunięciu próbek

2. Badania z udziałem bakterii przeprowadzono według punktu 8.2.3. (metoda C)

Sposób oczyszczanie próbek prowadzono według punktu 8.2.3.1.. Testy prowadzono na pożywce agarowej przygotowanej według punktu 8.2.3.2. Bakteryjne kultury hodowlane na pożywce agarowej zalewano bulionem wzbogaconym (5.3.2.2) i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ i postępowano zgodnie z opisem.

Próbki do badań przygotowano według punktu 6.2.1 normy. Ich liczba była zgodna z punktem 6.2.2 w/w normy. Zastosowana metoda badania zgodna była z punktem 8.2 tabela 3 w/w/ normy.

Do badań z udziałem bakterii wybrano zgodnie z punktem 5.3.1 normy szczep *Pseudomonas aeruginosa* ATCC13388, który hodowano na podłożu zdefiniowanym w punkcie 5.3.2.1. w/w normy.

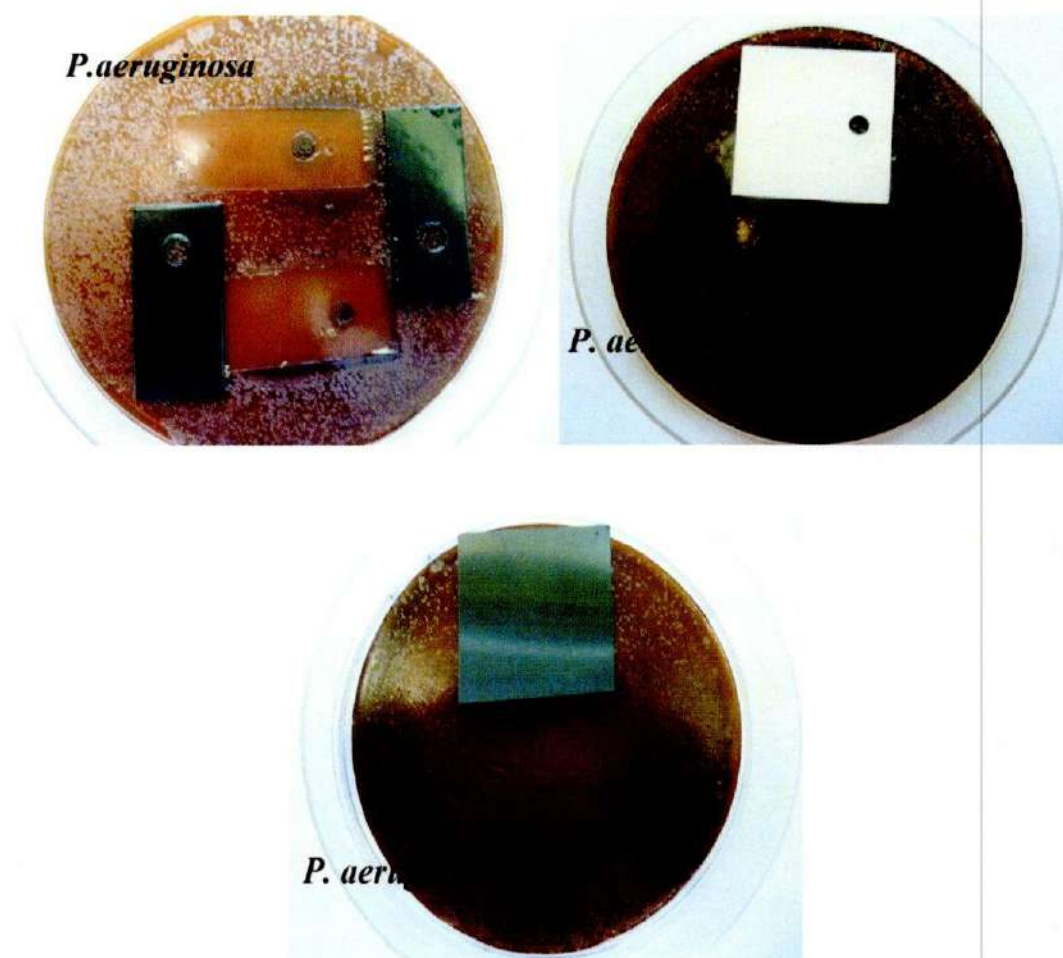
Żywotność szczepu sprawdzano według punktu 8.2.3.4. Do badań pożywkę agarową zaszczerpiono według punktu 8.2.3.5. Przykładowy obraz stanu żywotności *P. aeruginosa* przedstawiono na rysunku 3.



Rysunek 3. Ocena stanu żywotności badanego szczepu *P. aeruginosa*

Jak widać na powyższym rysunku mikroorganizm wykazywał charakterystyczny (obfity) wzrost na pożywce, co potwierdza jego dobrą żywotność.

Wygląd badanych próbek poddanych działaniu szczepu bakterii po 28 dniach inkubacji przedstawiono na rysunku 4.



Rysunek 4. Obraz powierzchni płytki po 28 dniach inkubacji *P. aeruginosa* w obecności badanej próbki; od góry z lewej blacha lakierowana proszkowo (czarna) i blacha lakierowana proszkowo (biała); u dołu- tworzywo sztuczne z domieszką środka przeciwdrobnoustrojowego- obrazy po usunięciu próbek

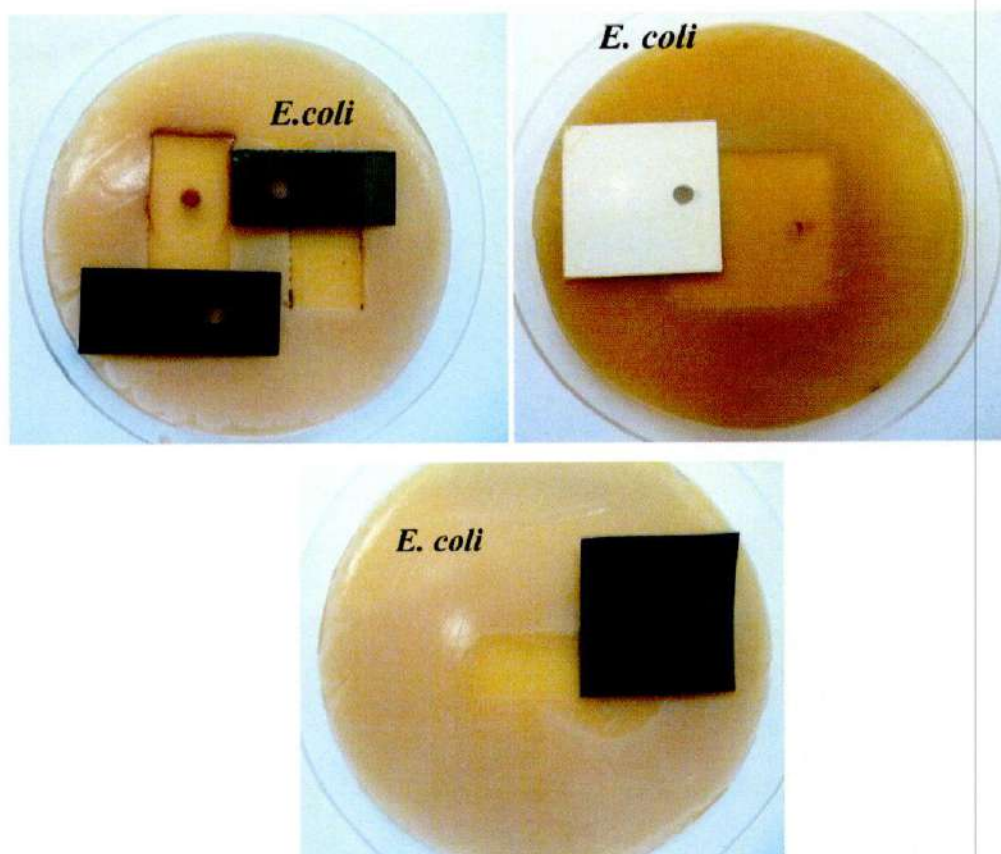
Jak widać dostarczone do badań próbki w trakcie 28 dniowego kontaktu z bakteriami nie ulegały widocznym zmianom. Na pożywce, w miejscu kontaktu profilu z powierzchnią, zaobserwowano silne hamowanie wzrostu badanego szczepu *Pseudomonas aeruginosa*., co świadczy o obecności środka hamującego rozwój badanej grupy drobnoustrojów.

Za porozumieniem obu zainteresowanych stron w badaniach zastosowano dodatkowe szczepy, którymi były: *E. coli* PCM 2209; *S. aureus* PCM 458 i *Bacillus cereus* PCM 2018;

Próbki do badań przygotowano zgodnie z punktem 6.1. normy i stanowiły je kwadraty o wymiarach 30mmx30mm.

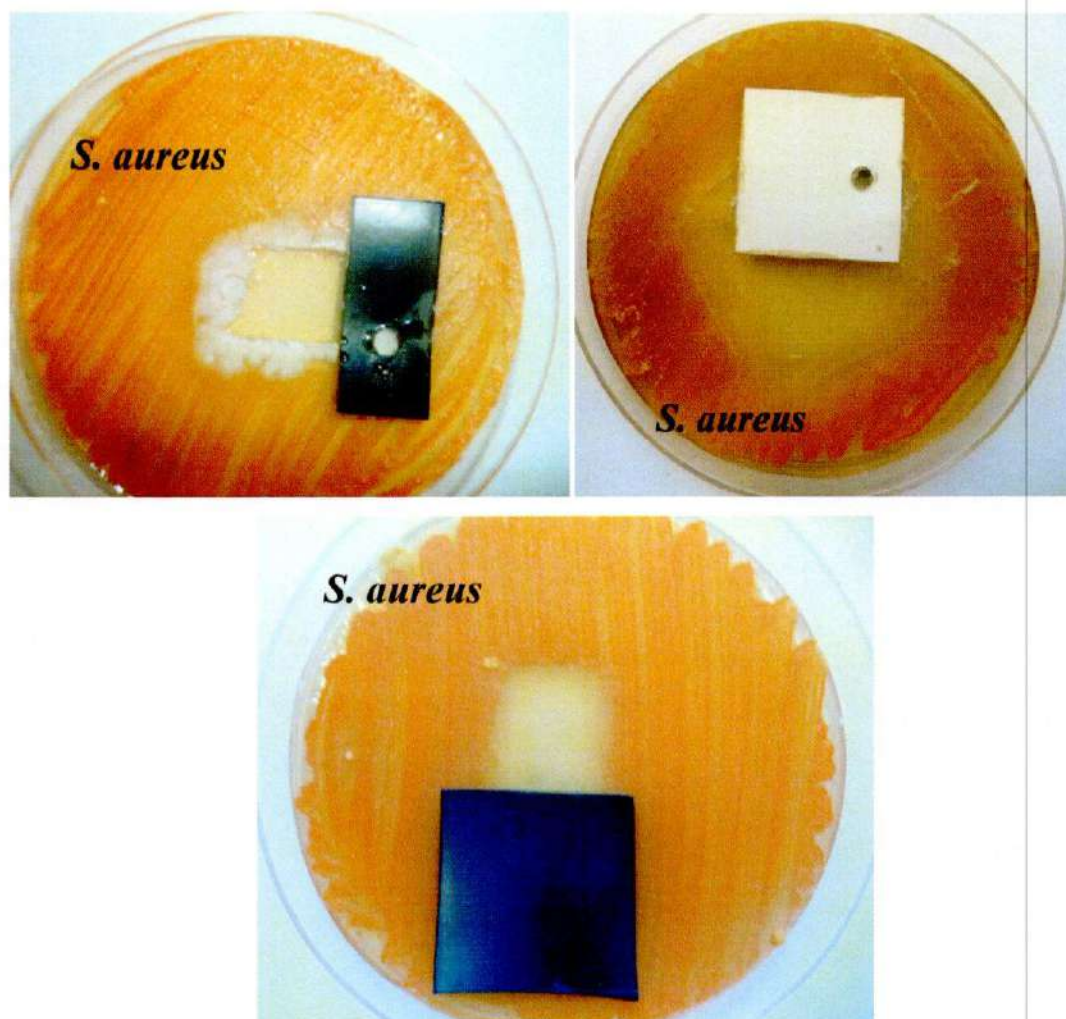
Wygląd próbek poddanych działaniu badanych szczepów bakterii po 28 dniach inkubacji przedstawiono na rysunkach 5, 6 i 7. Jak widać dostarczone do badań próbki w trakcie inkubacji nie ulegały widocznym zmianom. Na pożywce, w miejscu kontaktu próbek z powierzchnią zaobserwowano silne hamowanie wzrostu badanych szczepów *E. coli* PCM 2209; *S. aureus* PCM 458 i *B. cereus* 2018, co świadczy o obecności środka hamującego rozwój badanej grupy drobnoustrojów.

Na poniższych fotografiach (rysunek 5) przedstawiono wygląd powierzchni płytek agarowych po 28 dniach inkubacji wybranych bakterii (*E. coli*) w obecności testowanych próbek.



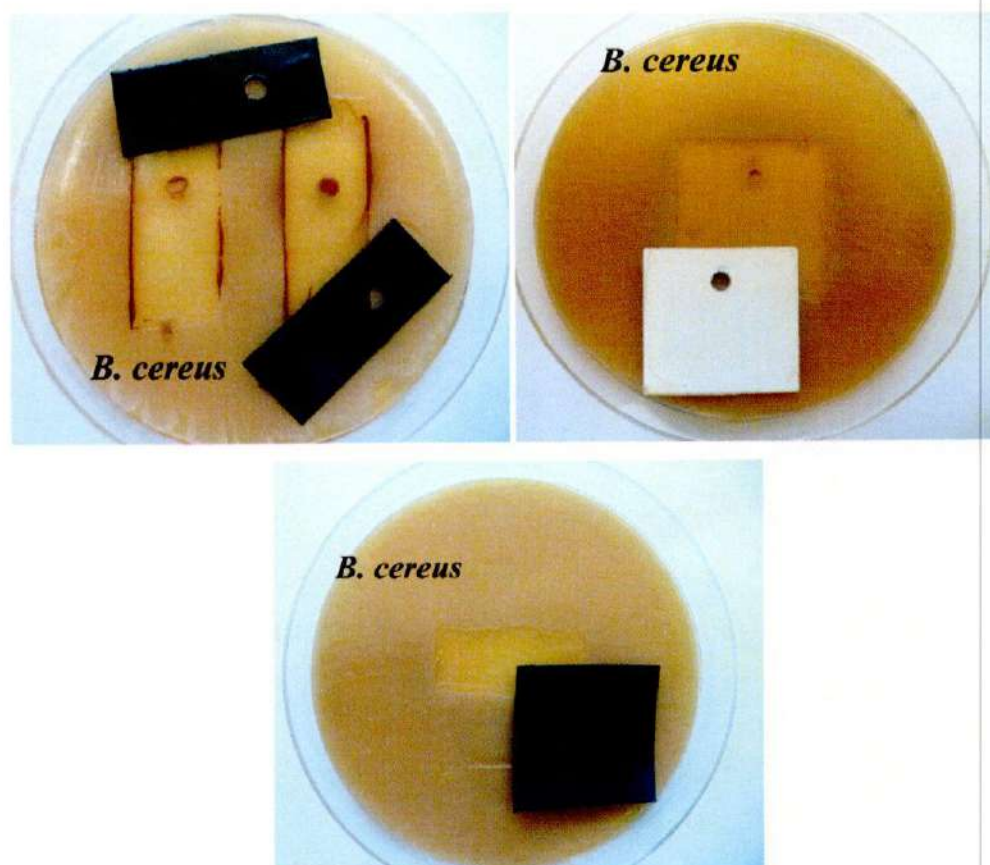
Rysunek 5. Obraz powierzchni płytki po 28 dniach inkubacji *E. coli* w obecności badanej próbki; od góry z lewej blacha lakierowana proszkowo (czarna) i blacha lakierowana proszkowo (biała); u dołu- tworzywo sztuczne z domieszką środka przeciwdrobnoustrojowego- obrazy po usunięciu próbek

Na poniższych fotografiach (rysunek 6) przedstawiono wygląd powierzchni płytek agarowych po 28 dniach inkubacji wybranych bakterii (*S. aureus*) w obecności testowanych próbek.



Rysunek 6. Obraz powierzchni płytki po 28 dniach inkubacji *S. aureus* w obecności badanej próbki; od góry z lewej blacha lakierowana proszkowo (czarna) i blacha lakierowana proszkowo (biała); u dołu- tworzywo sztuczne z domieszką środka przeciwdrobnoustrojowego- obrazy po usunięciu próbek

Na poniższych fotografiach (rysunek 7) przedstawiono wygląd powierzchni płytek agarowych po 28 dniach inkubacji wybranych bakterii (*B. cereus*) w obecności testowanych próbek.



Rysunek 7. Obraz powierzchni płytki po 28 dniach inkubacji *B. cereus* w obecności badanej próbki; od góry z lewej blacha lakierowana proszkowo (czarna) i blacha lakierowana proszkowo (biała); u dołu- tworzywo sztuczne z domieszką środka przeciwdrobnoustrojowego- obrazy po usunięciu próbek

Wnioski

1. Dostarczone do badań próbki (blacha lakierowana proszkowo- biała i czarna) są pokryte trwałą warstwą środka silnie hamującego rozwój testowanych drobnoustrojów tj. *A. niger*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus*.
2. Powłoka zapobiega rozwojowi drobnoustrojów w bezpośrednim kontakcie.
3. Blacha nie pokryta warstwą o przeciwdrobnoustrojowych właściwościach nie hamuje rozwoju drobnoustrojów oraz ulega korozji w kontakcie z pożywką.
4. Tworzywo sztuczne, które nie zawiera środka o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych nie ulega procesowi biodeterioracji, ale nie hamuje rozwoju drobnoustrojów.

5. Tworzywo sztuczne domieszkowane środkiem przeciwdrobnoustrojowym hamuje rozwój: *A. niger*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* i *B. cereus*.

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Zakład Chemii Medycznej i Mikrobiologii
Wybrzeże Wyspiańskiego 27
50-370 Wrocław

dr hab. Irena Maliszewska

