



Politechnika Łódzka
Katedra Biotechnologii Środowiskowej

Łódź, 25.10.2020

Raport z badań

Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej impregnatów do powierzchni

wykonanych na zlecenie firmy HydroSafeGuard S.A
ul. Aleksandrowska 61 95-100 Zgierz

Badania wykonała i raport sporządziła
prof. dr hab. Beata Gutarowska

Cel badań

Celem badań była ocena efektywności przeciwdrobnoustrojowej impregnatów zawierających biocydy. Badania obejmowały:

1. Aktywność przeciwdrobnoustrojową 4 impregnatów wobec 2 szczepów bakterii (gramdodatnie ziarniaki *Staphylococcus aureus*, gramujemne pałeczki *Escherichia coli*) oraz 2 szczepów grzybów (pleśnie - *Aspergillus niger*, drożdże - *Candida albicans*) – badania metodami: krążkową i studzienkową.
2. Wyznaczenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) wzrost oraz Minimalnego Stężenia Bójczego (MBC) – badania dla 4 szczepów drobnoustrojów metodą krążkową dla 2 impregnatów.
3. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej płytek metalowych oraz szklanych pokrytych impregnatem nr 2 - badania ilościowe wobec 2 szczepów drobnoustrojów (*S.aureus*, *C.albicans*).
4. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej płytek metalowych pokrytych impregnatem nr 2 (4 próbki oraz kontrola) po ekspozycji na mikroflorę powietrza (bakterie i grzyby) - badania metodą odcisku.
5. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej impregnatu nr 2 po aplikacji na klamki.

Materiały i metodyka badawcza

Szczepy drobnoustrojów

W badaniach wykorzystano mikroorganizmy należące do Amerykańskiej Kolekcji Czystych Kultur ATCC, przechowywane w Kolekcji Czystych Kultur ŁOCK 105 PŁ: bakterie gramujemne pałeczki *Escherichia coli* ATCC 10536, bakterie gramdodatnie ziarniaki *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, drożdże *Candida albicans* ATCC 10231, pleśnie *Aspergillus niger* ATCC 16404. Drobnoustroje należą do różnych grup (bakterie, grzyby), różnią się morfologią, fizjologią i wrażliwością na biocydy.

Metody badawcze

1. Badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej 4 impregnatów oznaczonych kolejnymi numerami wobec testowanych drobnoustrojów wykonano w pierwszym etapie metodą studzienkową oraz krążkową. Drobnoustroje posiewano metodą wgłębną na pożywki mikrobiologiczne: TSA, (Tryptic Soy Agar, Merck) (bakterie), MEA (Malt Extract Agar, Merck) (drożdże, pleśnie) i inkubowano w warunkach temperatura 37°C, czas 24-48 godz. (bakterie, drożdże), 27°C, 5 dni (grzyby). Aktywność impregnatów sprawdzano metodą studzienkową (przed inkubacją wycinano korkoborem studzienki do których dodawano 250 µl impregnatu) lub metodą krążkową (na jałowe krążki bibułowe наносono po 10 µl lakieru). Po inkubacji mierzono strefy zahamowania wzrostu, wyniki podawano w mm. Za wysoką aktywność uznawano zahamowanie wzrostu powyżej 10 mm. W przypadku metody studzienkowej podawano wartość po odjęciu średnicy studzienki.
2. W kolejnym etapie wyznaczono Minimalne Stężenie Hamujące (MIC) oraz Minimalne Stężenie Bójcze (MBC) dla impregnatów nr 1 i 2 (największe strefy zahamowania wzrostu w etapie 1). Badanie wykonano metodą krążkową. Otrzymany koncentrat impregnatu rozcieńczono w soli fizjologicznej (0,85% NaCl) od 1:2 do 1:128 i naniesiono na jałowe krążki bibułowe po 10 µl. Drobnoustroje posiewano wgłębnie na pożywki jak opisano powyżej, na powierzchnie zestalone układano krążki, następnie inkubację prowadzono w warunkach: temperatura 37°C, czas 24-48 godz. (bakterie, drożdże), 27°C, 5 dni (grzyby). Po tym czasie sprawdzano obecność stref zahamowania wzrostu, strefy < 10 mm oznaczano jako brak wzrostu. Na podstawie informacji od producenta na temat stężenia 2 biocydów obecnych w lakierach obliczono MIC oraz MBC.
3. W kolejnym etapie oceniono aktywność przeciwdrobnoustrojową płytek metalowych oraz szklanych pokrytych impregnatem nr 2 wobec 2 szczepów drobnoustrojów *S.aureus*, *C.albicans*. Badania wykonano metodą ilościową na przygotowanych przez producenta płytkach o wielkości 4 cm², dla płytek szklanych wykonano badania wobec *S.aureus*, dla płytek metalowych wobec *S.aureus*, *C.albicans*. Przygotowano inokulum drobnoustrojów o znanej gęstości 5×10⁹ jtk/ml (*S.aureus*) oraz 7×10⁷ jtk/ml (*C.albicans*) i naniesiono na powierzchnie płytek w objętości 100 µl. Liczbę drobnoustrojów oceniono zaraz po naniesieniu na płytkę oraz po 24 godzinnej inkubacji w warunkach temperatury 37°C. Płytki po inkubacji umieszczono w plastikowych pojemnikach zawierających 50 ml sterylnej 0,85% soli fizjologicznej i wytrząsano przez 5 min. Następnie wykonano rozcieńczenia prób w 0,85% soli fizjologicznej (od 10⁻² do 10⁻⁶) i wysiano po 1 ml i 0,1 ml z odpowiednich rozcieńczeń na sterylne płytki Petriego, zalano je podłożem półpłynnym TSA dla bakterii oraz MEA dla drożdży. Płytki inkubowano w temperaturze

37°C przez 24-48 godzin, a następnie zliczono wyrosłe kolonie, wynik podano w jtk/4cm².

4. W kolejnym etapie zbadano aktywność przeciwdrobnoustrojową płytek metalowych pokrytych impregnatem nr 2 (4 próbki oraz kontrola). Płytki poddano ekspozycji na mikroflorę powietrza przez 5 dni. Po tym czasie zbadano liczbę bakterii i grzybów metodą odcisku na pożywkach TSA (bakterie), MEA (grzyby) i inkubowano w warunkach temperatura 37°C, czas 24 godz. (bakterie), 27°C, 5 dni (grzyby). Po tym czasie zliczono kolonie wyrosłe na płytkach wyniki podano w jtk/4 cm² powierzchni płytek.
5. Przeprowadzono również badania ilościowe mikrobiologiczne 2 klamek wejściowych w przestrzeni publicznej przed i po dezynfekcji impregnatem nr 2. Dezynfekcję przeprowadzono na dla samych drzwi na drugiej klamce impregnatem poprzez aplikację metodą napyłania, po zwilżeniu impregnatem klamkę przetarto jałową ściereczką i poczekano do wyschnięcie przez 5 minut, następnie próbkę pobrano metodą wymazu. Dla drugiej klamki pobrano wymaz bez wykonanej dezynfekcji. Próbkę pobrano jałową wymazówką i zawieszono w 10 ml sterylnej 0,85% soli fizjologicznej i wytrząsano przez 5 min. Następnie wykonano wysiew 0,1 ml na jałowe płytki i zalano półpłynnym podłożem TSA a następnie inkubowano w warunkach 37°C przez 24-48 godzin, a następnie zliczono wyrosłe kolonie, wynik podano w jtk/klamkę.

Wyniki

W Tabelach 1-2 przedstawiono aktywność przeciwdrobnoustrojową 4 impregnatów wobec bakterii i grzybów w badaniach metodami studzienkową i krążkową. Aktywność mierzono strefą zahamowania wzrostu drobnoustrojów (mm).

Tabela 1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa impregnatów wobec bakterii – badania metodami krążkowa i studzienkową

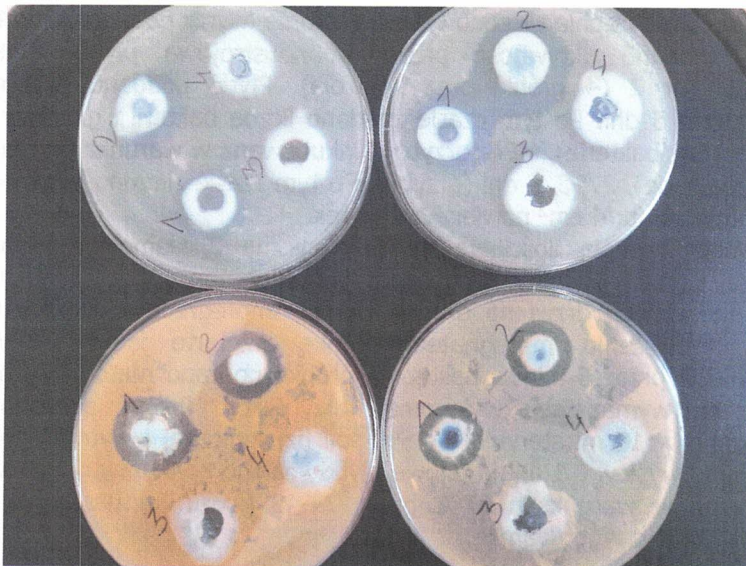
Impregnat	Strefa hamowania wzrostu [mm]			
	<i>E.coli</i>		<i>S.aureus</i>	
	Metoda Krążkowa	Metoda Studzienkowa	Metoda Krążkowa	Metoda Studzienkowa
1	6	12	2	18
2	6	12	2	18
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

- brak stref zahamowania wzrostu, kolorem oznaczono wysoka strefę zahamowania wzrostu > 10 mm

Tabela 2. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa impregnatów wobec grzybów – badania metodami krążkowa i studzienkową

Impregnat	Strefa hamowania wzrostu [mm]			
	<i>C.albicans</i>		<i>A.niger</i>	
	Metoda Krążkowa	Metoda Studzienkowa	Metoda Krążkowa	Metoda Studzienkowa
1	23	26	10	38
2	23	26	15	40
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-

- brak stref zahamowania wzrostu, kolorem oznaczono wysoka strefę zahamowania wzrostu > 10 mm



Fot.1. Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej 4 impregnatów wobec drobnoustrojów, od góry lewej strony: *E.coli*, *A.niger*, *S.aureus*, *C.albicans*

Stwierdzono, że impregnaty nr 1 i 2 wykazują aktywność wobec badanych drobnoustrojów. Impregnaty 1 i 2 wykazywała identyczną aktywność wobec hamowania wzrostu bakterii *S.aureus* i *E.coli* oraz drożdży *C.albicans*, niezależnie od wykorzystywanej metody badawczej. W przypadku pleśni *A.niger* nieznacznie wyższą aktywność wykazano dla impregnatu nr 2 (strefa zahamowania wzrostu 15 mm w metodzie krążkowej oraz 40 mm w metodzie studzienkowej) w porównaniu z impregnatem nr 1 (odpowiednio: 10 mm i 38 mm). Stwierdzono, że badane impregnaty wykazują wyższą aktywność wobec grzybów niż bakterii a wrażliwość drobnoustrojów kształtowała się w kolejności od najbardziej do najmniej wrażliwych: *A.niger*, *C.albicans*, *S.aureus*, *E.coli*. Obie wykorzystywane metody dały podobne wyniki z wyjątkiem badania pleśni, dla której metoda studzienkowa okazała się bardziej miarodajna (wyższe wyniki), co jest spowodowane lepszą dyfuzją lakieru do podłoża agarowego i oddziaływaniem biocydu na grzybnię.

W Tabelach 3-4 przedstawiono wyniki badania Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) wzrost oraz Minimalnego Stężenia Bójkowego (MBC) dla 4 szczepów drobnoustrojów dla 2 impregnatów.

Tabela 3. Hamowanie wzrostu drobnoustrojów dla rozcieńczeń impregnatu nr 1 - wyznaczenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) oraz Minimalnego Stężenia Bójkowego (MBC) – badanie metodą krążkową

Gatunek	Impregnat 1							
	Rozcieńczenie							
	koncentrat	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>E.coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>C.albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A.niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	+

- brak wzrostu, + wzrost, kolorem czerwonym oznaczono Minimalne Stężenie Bójkowe (MBC), kolorem niebieskim oznaczono Minimalne Stężenie Hamujące (MIC)

Tabela 4. Hamowanie wzrostu drobnoustrojów dla rozcieńczeń impregnatu nr 2 - wyznaczenie Minimalnego Stężenia Hamującego (MIC) oraz Minimalnego Stężenia Bójkowego (MBC) – badanie metodą krążkową

Gatunek	Impregnat 2							
	Rozcieńczenie							
	koncentrat	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>E.coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>S.aureus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>C.albicans</i>	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>A.niger</i>	-	-	-	-	-	-	-	+

- brak wzrostu, + wzrost, kolorem czerwonym oznaczono Minimalne Stężenie Bójkowe (MBC), kolorem niebieskim oznaczono Minimalne Stężenie Hamujące (MIC)

Szczegółowe badanie hamowania wzrostu badanych drobnoustrojów przez dwa impregnaty potwierdziły ich aktywność przeciwdrobnoustrojową. Impregnat nr 1 hamował wzrost bakterii *E.coli* oraz *S.aureus* w jednakowy sposób – zarówno w koncentracji jak i rozcieńczeniu 1:2, w rozcieńczeniu 1:4 obecny był już wzrost bakterii przy krążku. Impregnat nr 1. wykazywał wyższą skuteczność wobec grzybów *C.albicans* oraz *A.niger* niż wobec bakterii. Impregnat ten hamował wzrost grzybów aż do rozcieńczenia 1: 64, dopiero rozcieńczony 1:128 nie hamował wzrostu grzybów. Badanie potwierdziło wysoką aktywność grzybobójczą obu badanych impregnatów. Impregnat nr 2 różnił się lepszą skutecznością wobec bakterii *S.aureus*, hamował wzrost tej bakterii w rozcieńczeniu do 1:4, w porównaniu do impregnatu nr 1, dla którego hamowanie zaobserwowano w rozcieńczeniu 1:2. Wyniki hamowania wzrostu przez oba testowane impregnaty dla pozostałych drobnoustrojów nie różniły się. Stwierdzono zatem na podstawie tego eksperymentu, że impregnaty nr 1 i 2 wykazują podobne oddziaływanie na drobnoustroje, z wyższą aktywnością przeciwgrzybową.

Na podstawie uzyskanych wyników oraz informacji od producenta na temat stężenia 2 biocydów wchodzących w skład impregnatów wyliczono Minimalne Stężenie Hamujące (MIC) oraz Minimalne Stężenie Bójcze (MBC) dla wszystkich testowanych drobnoustrojów. Wyniki MIC oraz MBC przedstawiono w Tabelach 5 i 6.

Tabela 5. Minimalne Stężenie Hamujące (MIC) wzrost badanych drobnoustrojów dla 2 biocydów wchodzących w skład impregnatu nr 1 i 2.

Gatunek	MIC [%]	
	Biocyd 1	Biocyd 2
<i>E.coli</i>	0,0075	0,0015
<i>S.aureus</i>	0,0075	0,0015
<i>C.albicans</i>	0,000234375	0,000046875
<i>A.niger</i>	0,000234375	0,000046875

Tabela 6. Minimalne Stężenie Bójcze (MBC) wzrost badanych drobnoustrojów dla 2 biocydów wchodzących w skład impregnatu 1 i 2.

Gatunek	MBC [%]	
	Biocyd 1	Biocyd 2
<i>E.coli</i>	0,015	0,003
<i>S.aureus</i>	0,015	0,003
<i>C.albicans</i>	0,00046875	0,00009375
<i>A.niger</i>	0,00046875	0,00009375

Wartości MIC świadczą o tym że aby zahamować wzrost bakterii *E.coli* i *S.aureus* należy użyć stężenie 0.0075% biocydu 1 oraz 0,0015% biocydu 2 w impregnacji, efekt hamowania wzrostu grzybów osiągniemy już przy niższym stężeniu 0,000234375% biocydu 1 oraz 0,000046875% biocydu 2.

Efekt bójczy impregnatów wobec bakterii zostanie osiągnięty przy stężeniu 0,015% biocydu 1 i 0,003% biocydu 2, dla grzybów stężenia te są znacznie niższe 0,00046875% biocydu 1 i 0,00009375% biocydu 2. Podsumowując stężenia 0,015% dla biocydu 1 i 0,003% dla biocydu 2 są wystarczające do skutecznej dezynfekcji.

Dla próbek płytek metalowych i szklanych z naniesionym impregnatem nr 2. w stężeniu 1% i 5% zbadano aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec 2 szczepów drobnoustrojów (*S.aureus*, *C.albicans*). Badanie wykonano metodą ilościową. Wyniki eksperymentu przedstawiono w Tabeli 7.

Tabela 7. Redukcja liczby drobnoustrojów na powierzchni płytek metalowych i szklanych z naniesionym impregnatem po 24 godzinach ekspozycji z drobnoustrojami

Rodzaj próbki	Liczba drobnoustrojów na powierzchni płytki [jtk/4 cm ²]	Redukcja liczby drobnoustrojów [%]
Płytko metalowa kontrolna <i>S.aureus</i>	1,98×10 ⁹	-
Płytko metalowa z impregnatem 1% <i>S.aureus</i>	3,00×10 ⁸	84,9%
Płytko metalowa z impregnatem 5% <i>S.aureus</i>	8,00×10 ⁷	95,9%
Płytko metalowa kontrolna <i>C.albicans</i>	6,60×10 ⁷	-
Płytko metalowa z impregnatem 1% <i>C.albicans</i>	5,22×10 ⁵	99,2%
Płytko metalowa z impregnatem 5% <i>C.albicans</i>	4,00×10 ⁴	99,9%
Płytko szklana kontrolna <i>S.aureus</i>	9,00×10 ⁸	-
Płytko szklana z impregnatem 5% <i>S.aureus</i>	7,20×10 ⁷	92,0%

- kontrola, nie dotyczy

Stwierdzono, że płytka metalowa oraz szklana pokryta impregnatem nr 2. zahamowała wzrost obu testowanych drobnoustrojów po 24 godzinach ekspozycji. Efekt przeciwdrobnoustrojowy był wyższy dla drożdży *C.albicans* (redukcja liczby komórek o 99,2-99,9% w zależności od stężenia impregnatu) niż bakterii (redukcja 84,9-95,9%). Przy stężeniu impregnatu 5% liczba komórek *C.albicans* na płytce metalowej została obniżona o 3 rzędy w skali logarytmicznej, przy stężeniu impregnatu 1% liczba została obniżona o 2 rzędy w skali logarytmicznej. Dla bakterii *S.aureus* stwierdzono obniżenie liczby bakterii o 1 rząd w skali logarytmicznej w przypadku impregnatu w stężeniu 1% oraz ok. 1,5 rzędu w skali logarytmicznej dla impregnatu 5%.

Wyniki wskazują, że należałoby zastosować wyższe stężenie impregnatu na powierzchniach metalowej i szklanej w celu podniesienia skuteczności.

Kolejnym etapem badań były testy aktywności przeciwdrobnoustrojowej płytek metalowych pokrytych impregnatem nr 2 po ekspozycji na mikroflorę powietrza (bakterie i grzyby), wyniki badań przedstawiono w Tabeli 8.

Tabela 8. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa płytek metalowych pokrytych impregnatem nr 2 wobec bakterii i grzybów po ekspozycji 5 dni na mikroflorę powietrza – badania metoda odciskową

Próbki metalowych płytek pokrytych impregnatem	Liczba bakterii na powierzchni płytki po 5 dniach inkubacji [jtk/4 cm ²]	Liczba grzybów na powierzchni płytki po 5 dniach inkubacji [jtk/4 cm ²]
Kontrola	59	10
1	38	-
2	-	4
3	35	2
4	11	1

- brak wzrostu

Po 5 dniowej ekspozycji płytek (kontrolna oraz pokryta impregnatem) na mikroflorę powietrza stwierdzono obniżenie liczby drobnoustrojów na powierzchni płytki pokrytej lakierem. Liczba bakterii zmniejszyła się z poziomu 59 jtk/4 cm² (kontrola) do 11 jtk/4 cm² (próbka 4) – 35-38 jtk/4 cm² (próbka 1 i 3), natomiast liczba grzybów z poziomu 10 jtk/4 cm² (kontrola) do 1 jtk/4 cm² (próbka 4) - 2-4 jtk/4 cm² (próbka 2 i 3). Wyniki świadczą o tym, że obecność impregnatu na powierzchni metalowej płytki zahamowała wzrost zarówno bakterii jak i grzybów.

Wyniki badania mikrobiologicznego 2 klamek wejściowych w przestrzeni publicznej przed i po dezynfekcji impregnatem nr 2 przedstawiono w Tabeli 9.

Tabela 9. Liczba drobnoustrojów przed i po dezynfekcji 2 klamek za pomocą impregnatu nr 2 – badania metoda wymazów

Klamki	Liczba drobnoustrojów na powierzchni klamki [jtk/klamkę]
Klamka 1 przed dezynfekcją	$5,0 \times 10^2$
Klamka 1 po dezynfekcji	0
Klamka 2 przed dezynfekcją	$6,0 \times 10^2$
Klamka 2 po dezynfekcji	0

0 - brak wzrostu w warunkach eksperymentu (w objętości 10 ml i wysiewie 0,1 ml)

Wnioski

1. Stwierdzono, że impregnaty nr 1 i 2 wykazują podobną aktywność wobec badanych drobnoustrojów *A.niger*, *C.albicans*, *S.aureus*, *E.coli*.
2. Stwierdzono, że badane impreganty nr 1 i 2 wykazują wyższą aktywność wobec grzybów niż bakterii.
3. Stężenia 0,015% dla biocydu 1 i 0,003% dla biocydu 2 w impregnaty nr 1 i 2 są wystarczające do skutecznej dezynfekcji w roztworze.
4. Płytką pokrytą impregnatem nr 2. zahamowała w 85%-99% wzrost *C.albicans* oraz *S.aureus* po 24 godzinach ekspozycji (obniżenie liczby komórek o 1-3 rzędy w skali logarytmicznej). W celu zwiększenia skuteczności na powierzchniach metalowych należy zastosować wyższe stężenie biocydów (stężenie impregnatu 5% i wyższe).
5. Obecność impregnatu na powierzchni metalowej płytki zahamowała wzrost zarówno bakterii jak i grzybów po ekspozycji 5 dniowej na mikroflorę powietrza.
6. Aplikacja impregnatu w stężeniu 5% na klamki przez czas 5 min skutkowała obniżeniem liczby drobnoustrojów o ponad 2 rzędy w skali logarytmicznej (liczba drobnoustrojów obniżyła się do poziomu niewykrywalnego w warunkach eksperymentu).
7. Badane impregnaty są skuteczne przeciwdrobnoustrojowo na powierzchniach metalowych i szklanych.

POLITECHNIKA ŁÓDZKA
Katedra Biotechnologii Środowiskowej
90-924 Łódź, ul. Wólczańska 171/173
NIP 727-002-18-95

Kierownik
Katedry Biotechnologii Środowiskowej
Prof. dr hab. Beata Gutarowska

