

RAPORT Z BADANIA ODPORNOŚCI MIKROBIOLOGICZNEJ
PRÓBEK KAUCZUKÓW SILIKONOWYCH MODYFIKOWANYCH NANOCZĄSTKAMI

Spis treści

1. Cel badań.....	3
2. Materiały i metody.....	3
2.1. Materiał badawczy	3
2.2. Materiał biologiczny	3
2.3. Pożywki i roztwory	4
2.4. Metody badań	5
2.4.1. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów metodą hodowlaną	5
2.4.2. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną oraz pomiaru ergosterolu.....	5
2.4.3. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną według PN-EN ISO 846 2002	6
2.4.4. Ocena odporności materiałów na tworzenie biofilmów przez bakterie i drożdże metodą mikroskopii fluorescencyjnej.	7
2.4.5. Ocena zmian strukturalnych materiałów pod wpływem mikroorganizmów	8
3. Wyniki badań.....	9
3.1. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów metodą hodowlaną	9
3.2. Ocena odporności materiałów na tworzenie biofilmów przez bakterie i drożdże metodą mikroskopii fluorescencyjnej	13
3.3. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną.....	18
3.4. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą według PN-EN ISO 846 2002	20
3.5. Ocena zmian strukturalnych materiałów pod wpływem mikroorganizmów	27
3.5.1. Metoda FTIR	27
3.5.2. Metoda mikroskopii elektronowej.....	44
4. Podsumowanie i wnioski.....	49

1. Cel badań

Celem badań była ocena odporności na działanie mikroorganizmów polimerów silikonowych zawierających nanocząstki srebra, miedzi i ditlenku tytanu oraz ditlenku krzemu pojedynczo lub w mieszaninach.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał badawczy

Materiałem do badań były następujące próbki silikonu modyfikowane poprzez dodatek nanocząstek srebra, miedzi oraz ditlenku tytanu lub ditlenku krzemu (Tab.1).

Tabela 1. Wykaz próbek do badań

Nr próbki	Skład
1	LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm
2	LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm
3	LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm
4	LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm
5	LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm
6	LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm
7	LSR (próbka odniesienia)

Materiały do badań zostały pocięte na fragmenty o wymiarach 15×15 mm. Przed badaniami polimery zostały zdezynfekowane alkoholem i przemyte sterylną wodą.

2.2. Materiał biologiczny

W badaniach zastosowano mikroorganizmy testowe kolekcyjne oraz izolowane ze środowiska naturalnego (Tab.2).

Tabela 2. Wykaz organizmów testowych

Gatunek	Pochodzenie/nr kolekcyjny	Uwagi
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	Bakterie gramujemne
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Gatunek wyizolowany z powierzchni w zakładzie przemysłu spożywczego	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Bakterie gramododatnie
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Drożdże
<i>Aspergillus niger</i> (syn. <i>A. brasiliensis</i> .)	ATCC 16404	Pleśnie
<i>Penicillium chrysogenum</i>	ATCC 60739	
<i>Cladosporium herbarum</i>	ATCC 6506	

Szczepy zostały pozyskane z Kolekcji Czystych Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych ŁOCK 105 w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ. Szczepy pochodziły z American Type Culture Collection. Kultury bakterii przechowywano na skosach z pożywką TSA (Merck) zaś grzybów z pożywką MEA (Merck) w temperaturze 6°C. Przed eksperymentem szczepy aktywowano.

2.3. Pożywki i roztwory

W badaniach stosowano pożywki mikrobiologiczne i roztwory zestawione w tabeli 3.

Tabela 3. Wykaz pożywek i roztworów

Pożywka/roztwór	Skład [g/l]	Przeznaczenie
TSA (Merck)	pepton kazeinowy 15 pepton sojowy 5 NaCl 5 agar 15 woda destylowana do 1l pH = 7,3 ± 0,2 w 25°C	Przechowywanie szczepów bakterii, oznaczenie liczby bakterii
MEA (Merck)	ekstrakt słodowy 17 agar 20 woda destylowana do 1l pH = 5,6 w 25°C	Przechowywanie szczepów grzybów, oznaczenie liczby grzybów
Pożywka M ₀	glukoza 5 MgSO ₄ ×7H ₂ O 5 (NH ₄) ₂ SO ₄ 3 KH ₂ PO ₄ 1 ekstrakt drożdżowy 10 woda destylowana do 1l pH = 6,0 w 25°C	Badanie tworzenia biofilmu przez bakterie i drożdże
Pożywka niepełnowartościowa	NaNO ₃ 2,0 KH ₂ PO ₄ 0,7 K ₂ HPO ₄ 0,3 KCl 0,5 MgSO ₄ ×7H ₂ O 0,01 agar 20 woda destylowana do 1l pH=6,0-6,5 w 25°C	Ocena odporności materiałów na działanie pleśni
Pożywka pełnowartościowa	NaNO ₃ 2,0 KH ₂ PO ₄ 0,7 K ₂ HPO ₄ 0,3 KCl 0,5 MgSO ₄ ×7H ₂ O 0,01 glukoza 30 agar 20 woda destylowana do 1l pH=6,0-6,5 w 25°C	
Roztwór soli	NaNO ₃ 2,0 KH ₂ PO ₄ 0,7 K ₂ HPO ₄ 0,3 KCl 0,5 MgSO ₄ ×7H ₂ O 0,01 Tween 80 0,5 woda destylowana do 1l pH=6,0-6,5 w 25°C	Przygotowanie zawiesiny pleśni
Fizjologiczny roztwór chlorku sodu	NaCl 8,5 woda destylowana do 1l	Płyn do rozcieńczeń

Neutralizator	pepton kazeinowy	17	Neutralizator w badaniu aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów
	pepton sojowy	3	
	NaCl	5	
	glukoza	2,5	
	K ₂ HPO ₄	2,5	
	Lecytyna	1	
	Tween 80	7	
	pH = 6,8-7,2 w 25°C		
Bromek 10-nonylo oranżu akrydyny	Bromek 10-nonylo oranżu akrydyny o stężeniu 1 µg/ml wody		Barwienie komórek bakterii, badanie adhezji

2.4. Metody badań

2.4.1. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów metodą hodowlaną

Badania prowadzono w oparciu o Standard Test Method for Determining the Activity of Incorporated Antimicrobial Agent(s) in Polymeric or Hydrophobic Materials ASTM E2180. W badaniach na powierzchnię materiału umieszczonego w sterylnym naczyniu nanoszono 0,2 ml zawiesiny mikroorganizmów w soli fizjologicznej z 0,3% dodatkiem agaru. Bezpośrednio po naniesieniu ($t=0$) zawiesinę zmywano przy użyciu 10 ml neutralizatora i określano liczebność bakterii i grzybów metodą hodowlaną na pożywce TSA (bakterie) i MEA (grzyby).

Próbki z naniesionymi zawiesinami inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 godziny. Po tym czasie ($t=24$) zawiesinę zmywano przy użyciu 10 ml neutralizatora i określano liczebność bakterii i grzybów metodą hodowlaną na pożywce TSA (bakterie) i MEA (grzyby).

Wyniki podawano jako liczbę jednostek tworzących kolonie na 1 cm² powierzchni materiału (jtk/cm²).

Określano współczynniki zamierania mikroorganizmów dla materiałów z dodatkami oraz materiału wzorcowego:

$$D = (\log \text{ liczby mikroorganizmów }_{t=0} - \log \text{ liczby mikroorganizmów }_{t=24})$$

Badania prowadzono na trzech niezależnych próbkach.

2.4.2. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną oraz pomiaru ergosterolu

Badany materiał układano w płytce Petriego i nanoszono zawiesinę pleśni w roztworze soli oraz w roztworze soli z glukozą (pkt. 2.4.3). Próby inkubowano w komorze klimatycznej w temperaturze 28°C i wilgotności względnej powietrza WWP 80% (komora klimatyczna Binder) przez cztery tygodnie. Po tym czasie określano żywotność grzybów na powierzchni materiału z wykorzystaniem metody hodowlanej. W tym celu badany materiał odciskano na pożywce MEA i inkubowano przez 5 dni w temperaturze 28°C, a następnie oceniano wzrost pleśni.

Ocena rozwoju grzybów pleśniowych na materiałach poprzez pomiar składnika błon komórkowych – ergosterolu ma zastosowanie wtedy, gdy metodami hodowlanymi nie jest to możliwe i gdy pleśń jest na takim etapie rozwoju, że nie są widoczne makroskopowo, lub gdy są nieaktywne – martwe. W badanych przypadkach metoda hodowlana była wystarczająca do określenia odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe, w związku z tym zrezygnowano z metody opartej na pomiarze ergosterolu.

2.4.3. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną według PN-EN ISO 846 2002

Badania prowadzono według PN-EN ISO 846 2002 „Tworzywa sztuczne. Ocena działania mikroorganizmów”. W badaniach stosowano szczepy grzybów pleśniowych w postaci równoobjętościowej mieszaniny zawierającej zawiesiny zarodników (ok. 10^6 jtk/ml) w roztworze soli (Tab. 3) lub soli z 3%glukozą.

W badaniach stosowano trzy warianty:

A – w celu oceny naturalnej odporności badanego materiału, w przypadku, gdy nie ma innej substancji odżywczej i wykazania czy badany materiał jest źródłem pożywienia dla mikroorganizmów.

B i B' – w celu oceny efektu grzybostatycznego oraz określenia wpływu powierzchniowych zanieczyszczeń na właściwości materiału.

Na pożywce niepełnowartościowej w metodzie A i pełnowartościowej w metodzie B układano badany materiał. Następnie na powierzchnię pożywki i prób materiału nanoszono równomiernie zawiesinę mikroorganizmów (w roztworze soli – metoda A oraz w roztworze soli z glukozą – metoda B i B'). W metodzie B' materiał układano na pożywce z 5 dniową hodowlą badanych organizmów i nanoszono roztwór soli z glukozą na powierzchnię materiału. Próbkę inkubowano w komorze klimatycznej w temperaturze 28°C i wilgotności względnej powietrza WWP 80% (komora klimatyczna Binder) przez cztery tygodnie. W trakcie inkubacji oceniano wzrost drobnoustrojów na powierzchni materiału. Próbkę oceniano makroskopowo, stosując skalę ocen zgodnie z normą PN-EN ISO 846 (Tab. 4 i 5).

Tabela 4 Ocena wzrostu mikroorganizmów wg normy

intensywność wzrostu	Ocena
brak widocznego wzrostu pod mikroskopem	0
wzrost niewidoczny nieuzbrojonym okiem, widoczny pod mikroskopem	1
wzrost widoczny nieuzbrojonym okiem, pokrywający do 25% powierzchni próby	2
wzrost widoczny nieuzbrojonym okiem, pokrywający do 50% powierzchni próby	3
znaczny wzrost, pokrywający więcej niż 50% powierzchni próby	4
intensywny wzrost pokrywający całą powierzchnię próby	5

Tabela 5. Ocena badanego materiału wg normy

Metoda	Intensywność wzrostu	Ocena badanego materiału
A	0	Materiał nie jest pożywką dla mikroorganizmów
	1	Materiał zawiera substancje stanowiące pożywkę lub jest zanieczyszczony w niewielkim stopniu, umożliwiającym nieznaczny wzrost
	od 2 do 5	Materiał nie jest odporny na działanie mikroorganizmów i zawiera substancje stanowiące pożywkę dla ich rozwoju
B i B'	0	Silny efekt grzybobójczy
	od 1 do 5	Brak efektu grzybobójczego

2.4.4. Ocena odporności materiałów na tworzenie biofilmów przez bakterie i drożdże metodą mikroskopii fluorescencyjnej.

Do pożywki M_0 dodano po 200 μ l zawiesiny drobnoustrojów o gęstości ok. 10^6 kom/ml. Następnie wprowadzono próbki polimerów. Hodowle prowadzono w temperaturze 30°C przez 7 dni w warunkach dynamicznych, podczas delikatnego wytrząsania. W pracy stosowano wstrząsarkę laboratoryjną firmy Elpin+ o ruchu eliptycznym. Zastosowano prędkość wytrząsania 110 cykli na minutę, amplitudę o wartości 10. Następnie polimery wyjmowano z pożywki i przemywano dokładnie sterylną wodą destylowaną w celu usunięcia komórek niezaadherowanych do powierzchni (planktonicznych) i наносzono na powierzchnię roztwór barwnika – bromku 10-nonylo oranżu akrydyny. Inkubowano przez 120 sekund, po czym barwnik zmywano wodą destylowaną, suszono i przystępowano do badania mikroskopowego (Gutarowska i in., 2012)¹.

Obserwacje mikroskopowe były prowadzone przy użyciu mikroskopu świetlnego Olympus CX 41 z wyposażeniem do pomiaru epifluorescencji z kamerą cyfrową DP70 przy powiększeniu całkowitym mikroskopu 1000 \times . Obróbkę oraz archiwizację zdjęć prowadzono przy użyciu programu Cell B Olympus.

Na podstawie liczby komórek widocznych w 20 polach widzenia określano stopień adhezji bakterii do polimerów korzystając ze skali zaproponowanej przez (Le Thi i in. 2001)²:

- 1 stopień od 0 do 5 komórek w polu widzenia;
- 2 stopień od 5 do 50 komórek w polu widzenia;
- 3 stopień tylko pojedyncze komórki (powyżej 50 w polu widzenia), brak mikroskopisk;
- 4 stopień - pojedyncze komórki + małe mikroskopiska;

¹ Gutarowska B., Piotrowska M., Żakowska Z., Gwoździński K. (2012) Analiza przydatności metod oznaczania adenozyntrofosforanu (ATP) oraz mikroskopii fluorescencyjnej do oceny żywotności i adhezji bakterii na powierzchni bioaktywnych polimerów. Polimery, 57 (3), 236-245.

² Le Thi T.T., Prigent-Combaret C., Dorel C., Lejeune P. (2001) First stages of biofilm formation: characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. Methods Enzymol 336, 152-159.

- 5 stopień - duże, niełączące się mikroskopiska + pojedyncze komórki;
- 6 stopień - łączące się mikroskopiska + pojedyncze komórki;
- 7 stopień - $\frac{1}{4}$ pola widzenia pokryta biofilmem;
- 8 stopień - $\frac{1}{2}$ pola widzenia pokryta biofilmem;
- 9 stopień - całe pole widzenia pokryte biofilmem.

2.4.5. Ocena zmian strukturalnych materiałów pod wpływem mikroorganizmów

Badaniom zmian strukturalnych metodą FTIR poddano próbki materiałów po adhezji bakterii i drożdży oraz działaniu grzybów pleśniowych (pkt. 2.4.3 i 2.4.4). Wykorzystano spektroskop w podczerwieni z transformacją Fouriera firmy Thermo Scientific Nicolet 6700 stosując przystawkę ATR do szybkiej analizy ciał stałych wyposażoną w kryształ diamentowy w zakresie $400-4000\text{cm}^{-1}$, ze zdolnością rozdzielczą 4 cm^{-1} .

Badaniom mikroskopowym z wykorzystaniem mikroskopu elektronowego skaningowego poddano wybrane próbki materiałów, na których wykazano adhezję bakterii.

Ze względu na rodzaj próbki do obserwacji powierzchni materiału wykorzystano mikroskop JSM-6610LV (JEOL, USA) i warunki niskiej próżni LV.

3. Wyniki badań

3.1. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów metodą hodowlaną

W tabelach 6-12 przedstawiono wyniki badań. Wartości w tabelach są średnimi z trzech pomiarów. Kolorem zielonym zaznaczono te materiały dla których wykazana aktywność przeciwdrobnoustrojowa była istotna.

Tabela 6. Wyniki badań – *Escherichia coli*

Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	5,0×10 ⁵	9,7×10 ⁵	5,70	5,99	-0,29
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	5,0×10 ⁵	3,0×10 ⁵	5,70	5,48	0,22
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	8,0×10 ⁵	1,1×10 ⁶	5,90	6,04	-0,14
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	3,0×10 ⁵	1,6×10 ⁵	5,48	5,20	0,28
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	6,0×10 ⁵	8,0×10 ²	5,79	2,90	2,89
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	1,0×10 ²	5,00	2,00	3,00
LSR (próbka odniesienia)	2,0×10 ⁵	5,8×10 ⁵	5,30	5,76	-0,46

Tabela 7. Wyniki badań – *Staphylococcus aureus*

Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	2,0×10 ⁵	1,7×10 ⁵	4,30	5,23	0,07
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	2,0×10 ⁵	2,2×10 ⁵	5,30	5,34	-0,04
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	1,0×10 ⁵	1,6×10 ⁵	5,00	5,20	-0,20
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	3,0×10 ⁵	5,00	5,48	-0,48
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1,0×10 ⁵	1,6×10 ⁵	5,00	5,20	-0,20
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	1,5×10 ⁵	5,00	5,18	-0,18
LSR (próbka odniesienia)	1,0×10 ⁵	3,4×10 ⁵	5,00	5,53	-0,53

Tabela 8. Wyniki badań – *Pseudomonas fluorescens*

Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	3,0×10 ⁵	3,2×10 ⁶	5,48	6,51	-1,03
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	5,0×10 ⁵	2,6×10 ⁶	5,70	6,41	-0,71
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	1,0×10 ⁵	5,8×10 ⁵	5,00	6,76	-0,76
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	3,0×10 ⁵	2,3×10 ⁶	5,48	6,36	-0,88
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1,0×10 ⁵	2,4×10 ⁵	5,00	5,38	-0,38
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	2,3×10 ⁶	5,00	6,36	-1,36
LSR (próbka odniesienia)	2,0×10 ⁵	5,8×10 ⁵	5,30	5,76	-0,46

Początkowa liczba bakterii naniesiona na powierzchnię silikonów była na poziomie około 10⁵ kom/cm². Po 24 godzinach kontaktu liczba bakterii *Escherichia coli* jedynie na materiale zawierającym TiO₂ uległa znacznemu obniżeniu o około 3 wartości logarytmiczne (Tab.6). Oznacza to, że analizowany materiał działa hamująco na rozwój

bakterii gramujemnych. W przypadku pozostałych materiałów zawierających srebro lub miedź ich liczba, nieznacznie przyrosła (100 ppm) lub zmalała (300 ppm). W materiale odniesienia odnotowano przyrost liczby *E.coli*. Dla pozostałych bakterii *Staphylococcus aureus* oraz *Pseudomonas fluorescens* obserwowano przyrost ich liczebności na wszystkich materiałach, przekraczający nawet wartość jednego logarytmu (LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm; *P.fluorescens*).

Tabela 9. Wyniki badań – *Candida albicans*

Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	3,0×10 ⁵	3,0×10 ⁵	5,48	5,48	0
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	3,9×10 ⁴	5,00	4,59	0,41
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	2,0×10 ⁵	2,7×10 ⁶	4,30	6,43	-1,13
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	8,0×10 ³	5,00	3,90	1,1
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	6,0×10 ⁴	3,3×10 ⁴	4,78	4,52	0,26
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	7,0×10 ⁴	2,7×10 ⁴	4,85	4,43	0,42
LSR (próbka odniesienia)	5,0×10 ⁴	3,7×10 ⁴	4,70	4,57	0,13

Spośród badanych materiałów najwyższą aktywność przeciwdrożdżową wykazywał materiał LSR+nano Ag/SiO₂ w ilości 300 ppm. Obserwowano obniżenie liczby żywych komórek *Candida albicans* o jeden rząd wielkości. Redukcję liczby drożdży ale już nie tak znaczącą odnotowano też na materiałach zawierających srebro lub miedź w ilości 300 ppm (Tab.9).

Tabela 10. Wyniki badań – *Aspergillus niger*

Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1,1×10 ⁵	7,0×10 ⁴	5,04	4,85	0,19
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1,0×10 ⁵	1,1×10 ⁴	5,00	4,04	0,96
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	1,7×10 ⁵	9,0×10 ⁴	5,23	4,95	0,28
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1,2×10 ⁵	6,9×10 ⁴	5,08	4,84	0,24
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1,6×10 ⁵	5,9×10 ⁴	5,20	4,77	0,43
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1,6×10 ⁵	8,0×10 ⁴	5,20	4,90	0,30
LSR (próbka odniesienia)	1,5×10 ⁵	9,1×10 ⁴	5,18	4,96	0,22

Tabela 11. Wyniki badań – *Penicillium chrysogenum*

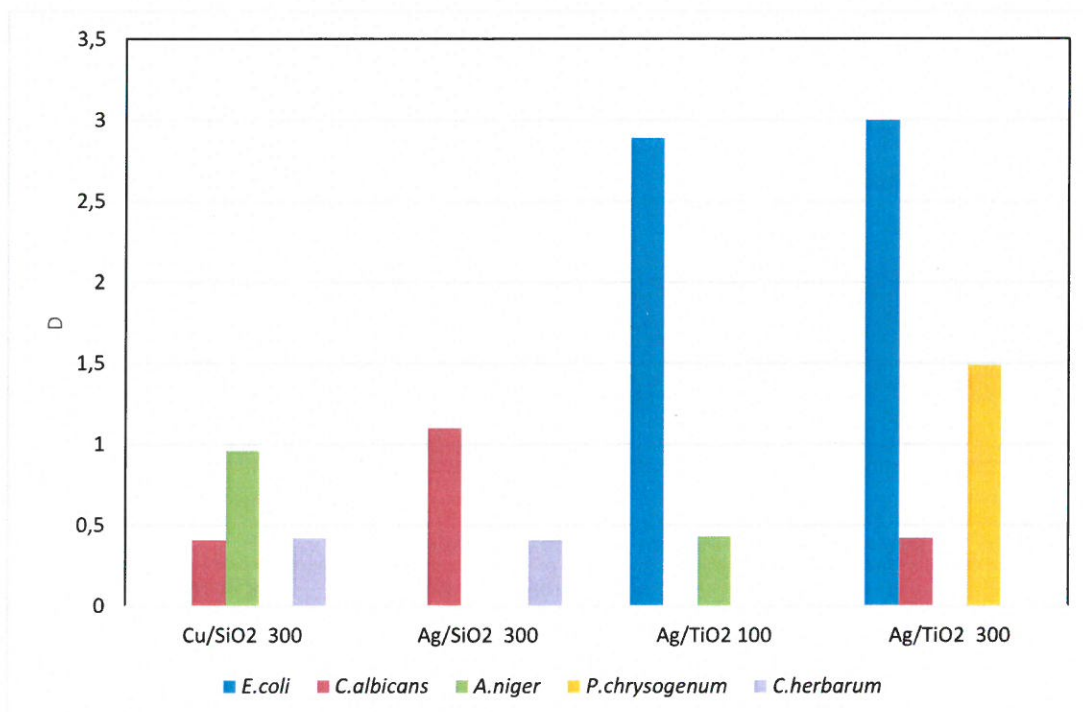
Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	2,8×10 ⁵	2,5×10 ⁵	5,45	5,40	0,05
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	3,6×10 ⁵	2,0×10 ⁵	5,56	5,30	0,26
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	4,8×10 ⁵	2,9×10 ⁵	5,68	5,46	0,22
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	4,3×10 ⁵	2,6×10 ⁵	5,63	5,41	0,22
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	3,9×10 ⁵	2,7×10 ⁵	5,59	5,43	0,16
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	3,7×10 ⁵	1,2×10 ⁴	5,57	4,08	1,49
LSR (próbka odniesienia)	3,8×10 ⁵	2,8×10 ⁵	5,58	5,45	0,13

Tabela 12. Wyniki badań – *Cladosporium herbarum*

Materiał	Liczba mikroorganizmów jtk/cm ²		Log liczby mikroorganizmów		D
	t=0	t=24	t=0	t=24	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1,0×10 ⁵	6,0×10 ⁴	5,00	4,78	0,22
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	7,0×10 ⁴	2,7×10 ⁴	4,85	4,43	0,42
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	3,0×10 ⁵	1,0×10 ⁵	4,48	5,00	-0,52
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	8,0×10 ⁴	3,1×10 ⁴	4,90	4,49	0,41
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1,4×10 ⁵	6,5×10 ⁴	5,15	4,81	0,34
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	9,0×10 ⁴	7,6×10 ⁴	4,95	4,88	0,07
LSR (próbka odniesienia)	8,0×10 ⁴	3,7×10 ⁴	4,90	4,57	0,33

Badane silikony charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością przeciwpleśniową, zależną od składu materiału oraz gatunku grzybów pleśniowych. Kontakt z materiałem LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm spowodował obniżenie liczby żywych zarodników *Aspergillus niger* o prawie jedną wartość logarytmiczną (Tab. 10) oraz o pół logarytmu liczbę *Cladosporium herbarum* (Tab. 12). Najwyższą aktywność odnotowano dla materiału LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm, który spowodował redukcję liczby *Penicillium chrysogenum* o ponad jeden rząd wielkości.

Na rysunku 1 zestawiono zbiorcze wyniki powyższych badań. Przedstawiono tylko rezultaty wskazujące na aktywność przeciwdrobnoustrojową badanych materiałów.



Rysunek 1. Wyniki aktywności przeciwdrobnoustrojowej badanych silikonów

Podsumowanie

1. Materiały zawierające Ag/TiO₂ w ilości 100 i 300 ppm charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną w stosunku do *Escherichia coli* i nieco niższą przeciwgrzybową w stosunku do *Candida albicans* i *Penicillium chrysogenum*.
2. Materiał zawierający Cu/SiO₂ w ilości 300 ppm wykazywał aktywność przeciwgrzybową w stosunku do *C.albicans*, *A.niger* i *C.herbarum*.
3. Materiał zawierający Ag/SiO₂ w ilości 300 ppm wykazywał aktywność przeciwgrzybową w stosunku do *C.albicans* i *C.herbarum*.
4. Pozostałe materiały nie wpływały w znaczący sposób na przeżywalność bakterii i grzybów, a nawet w niektórych przypadkach stymulowały ich wzrost.

3.2. Ocena odporności materiałów na tworzenie biofilmów przez bakterie i drożdże metodą mikroskopii fluorescencyjnej

Badania z wykorzystaniem techniki mikroskopii fluorescencyjnej wykazały brak tworzenia biofilmów na powierzchni materiałów. Jednak bakterie adherowały do powierzchni w zróżnicowanym stopniu. W tabeli 13 przedstawiono wyniki analiz mikroskopowych wyrażone w stopniach adhezji zgodnie z pkt. 2.4.4 metodyki.

W większości przypadków stopień adhezji wynosił 1 lub 2, co oznacza, że w większości pól widzenia (spośród 20) obserwowano pojedyncze komórki do 5 (stopień 1) lub do 50 (stopień 2). Pojawianie się mikroskopisk wskazujących na tendencję mikroorganizmów do tworzenia biofilmów odnotowano dla *E.coli* na materiale LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm (Fot. 4a) oraz dla *S.aureus* na LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm oraz na próbce odniesienia. W żadnym z wariantów doświadczenia nie zaobserwowano tworzenia się biofilmu, tj. pojawiania się wyższych stopni adhezji (6-9).

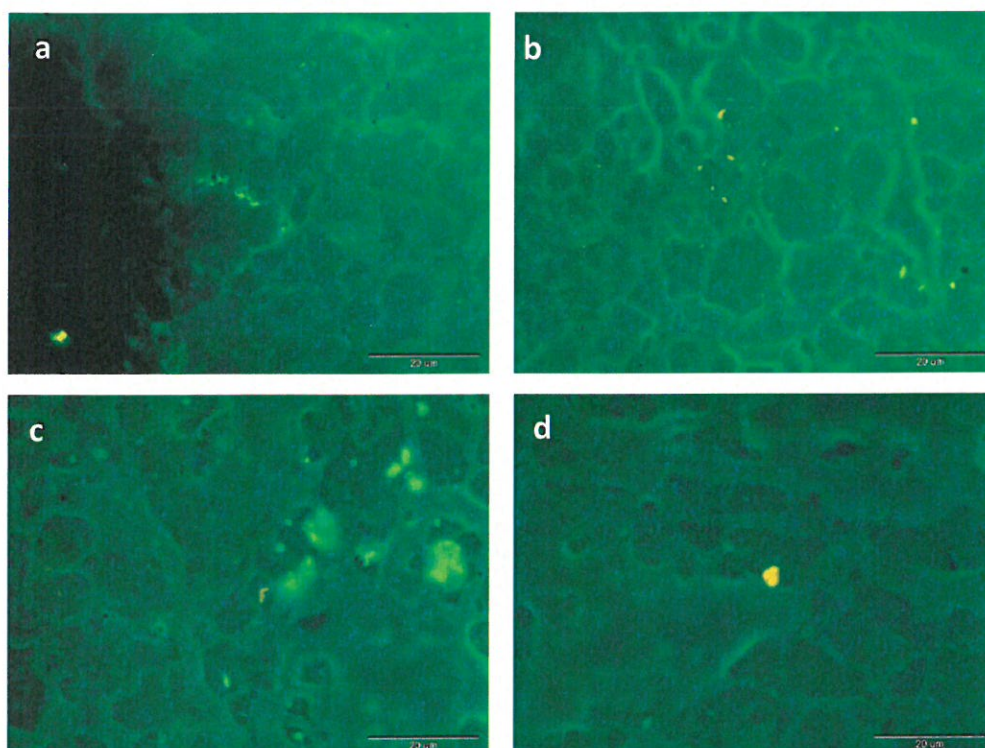
Fotografie 1-7 przedstawiają obrazy mikroskopowe powierzchni materiałów z zaadherowanymi komórkami drobnoustrojów wybarwionymi na kolor żółto-pomarańczowy. W hodowli *Candida albicans* na LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm zaobserwowano obecność komórek bakterii przetrwalnikujących stanowiących zakażenie próbki, prawdopodobnie wniesione wraz z materiałem. Odnotowano pojedyncze komórki oraz mikroskopiska.

Tabela 13. Zbiorcze wyniki badania adhezji bakterii i drożdży do powierzchni materiałów

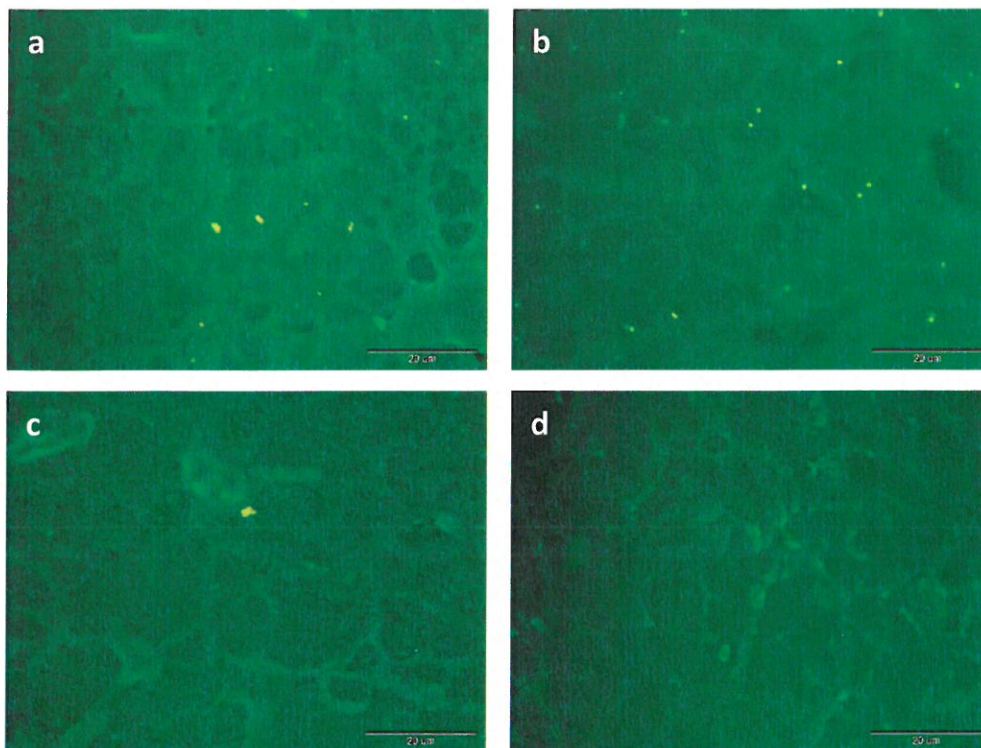
Materiał	Dominujące stopnie adhezji	Pojawienie się wyższych stopni adhezji (6,7,8,9)	Uwagi
<i>Escherichia coli</i>			
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1,2	-	Fot. 1 a
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1,2	-	Fot. 2 a
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	2,3	-	Fot. 3 a
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	2,3 (4)	-	Fot. 4 a
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1	-	Fot. 5 a
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1	-	Fot. 6 a
LSR (próbka odniesienia)	1	-	Fot. 7 a
<i>Staphylococcus aureus</i>			
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1,2	-	Fot. 1 b
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1,2	-	Fot. 2 b
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	2	-	Fot. 3 b
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1,2	-	Fot. 4 b
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	2,3 (4)	-	Fot. 5 b
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1	-	Fot. 6 b
LSR (próbka odniesienia)	1,2(4)	-	Fot. 7 b
<i>Pseudomonas fluorescens</i>			
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1,2	-	Fot. 1 c
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1	-	Fot. 2 c
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	1	-	Fot. 3 c
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1	-	Fot. 4 c
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1	-	Fot. 5 c
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1,2	-	Fot. 6 c
LSR (próbka odniesienia)	1	-	Fot. 7 c

<i>Candida albicans</i>			
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1	-	Fot. 1 d
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1	2	Fot. 2 d
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	1*	-	Fot. 3 d
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1	-	Fot. 4 d
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1	-	Fot. 5 d
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1	-	Fot. 6 d
LSR (próbka odniesienia)	1	-	Fot. 7 d

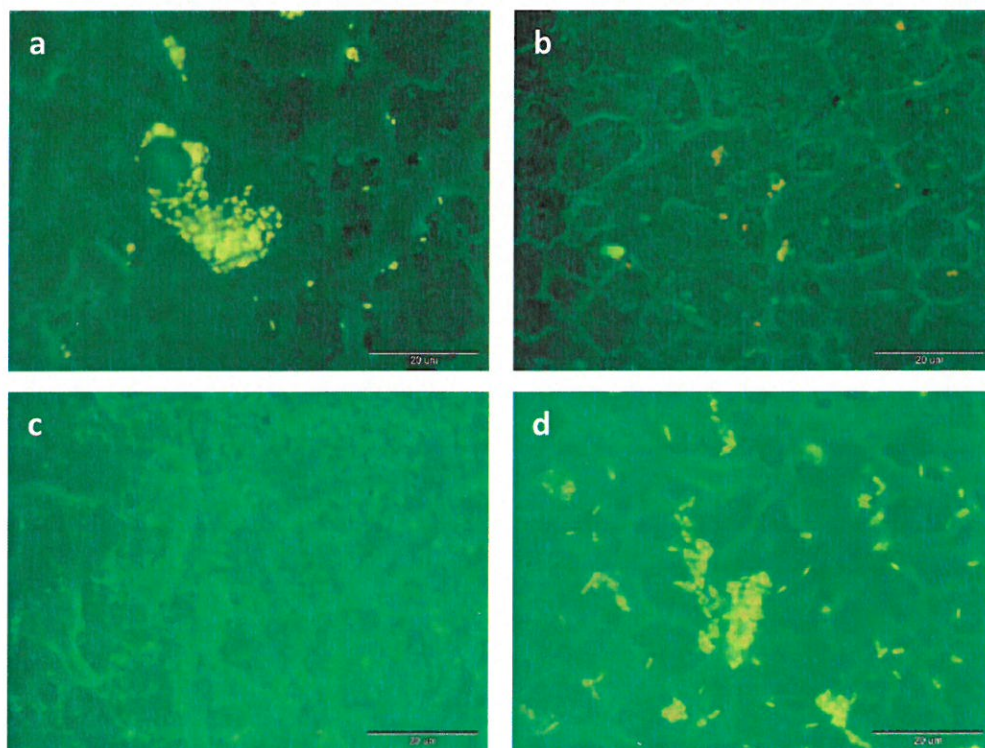
* stwierdzono obecność bakterii przetrwalnikujących (stopień adhezji 2, 3, a nawet 4)



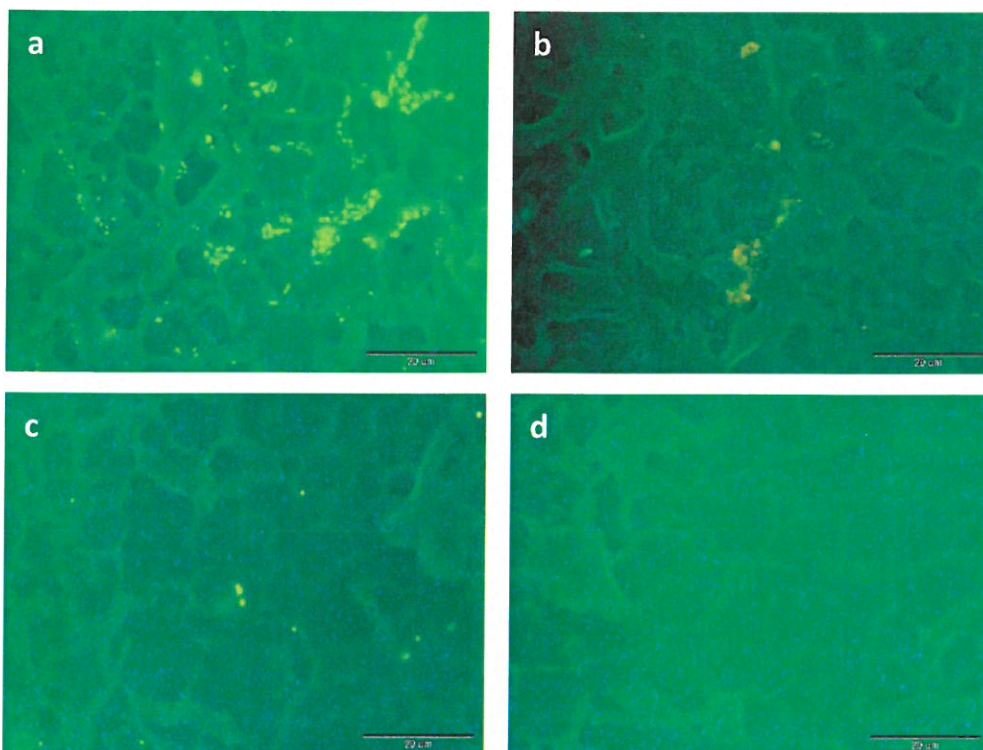
Fotografia 1. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR+nano Cu/SiO₂ 100 ppm
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*



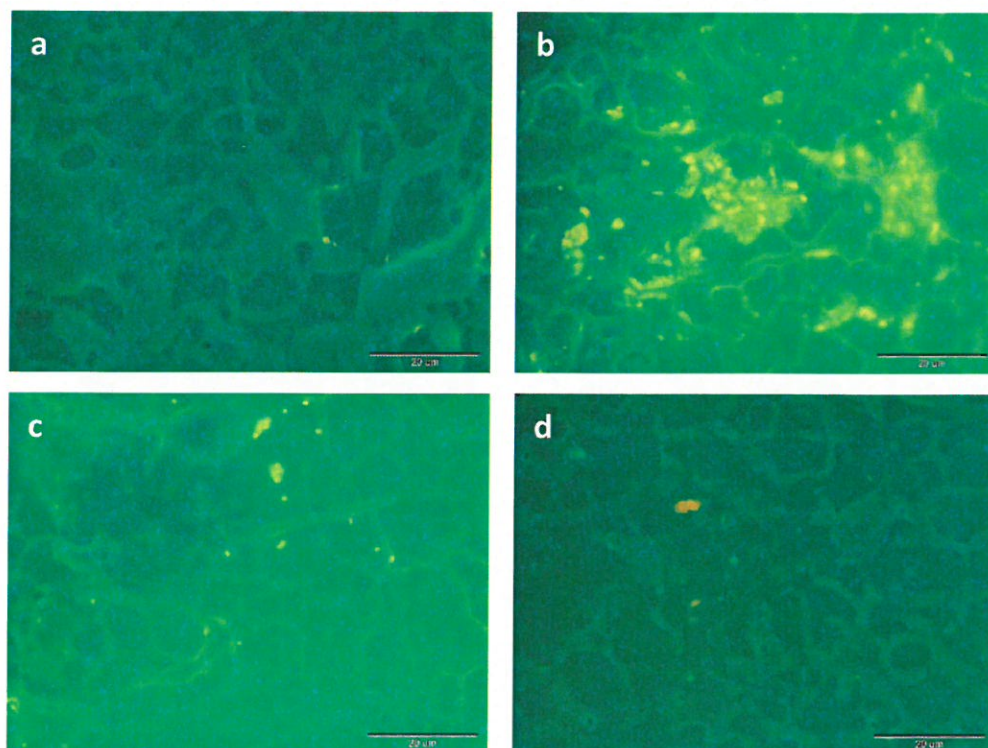
Fotografia 2. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*



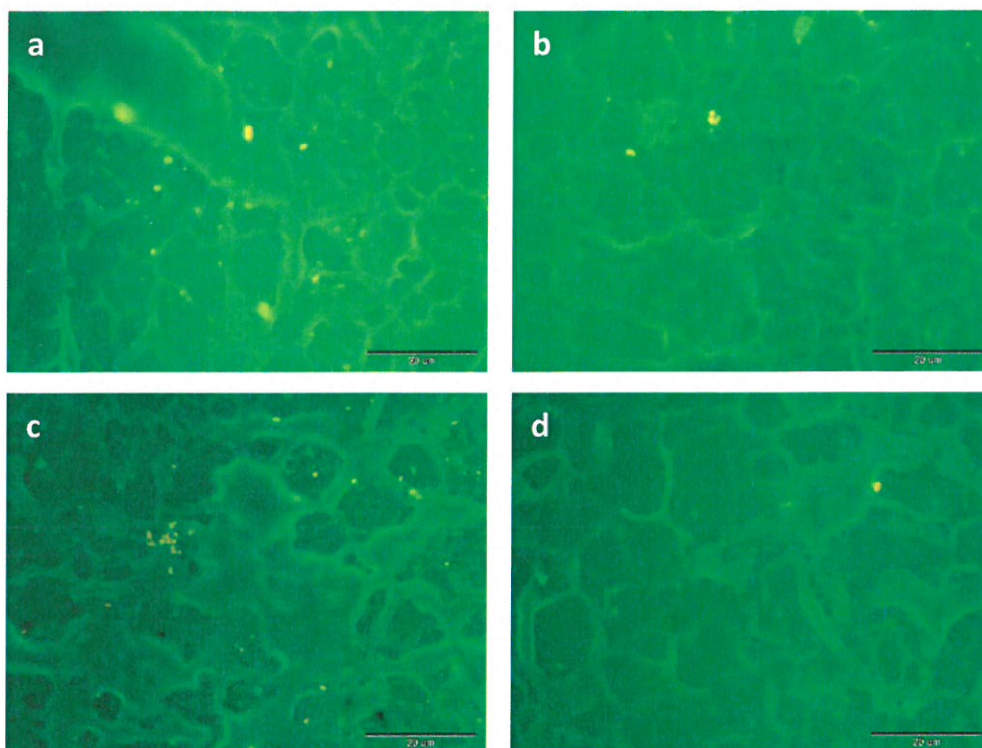
Fotografia 3. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*



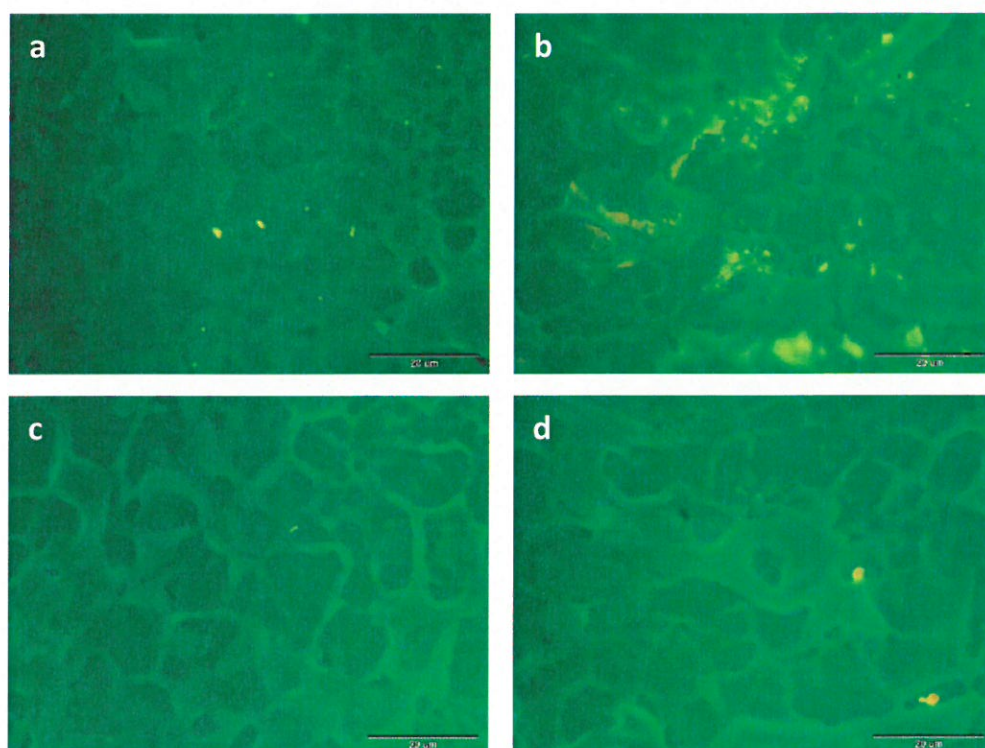
Fotografia 4. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*



Fotografia 5. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*



Fotografia 6. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*



Fotografia 7. Adhezja mikroorganizmów do powierzchni LSR
a – *Escherichia coli*; b – *Staphylococcus aureus*; c – *Pseudomonas fluorescens*; d – *Candida albicans*

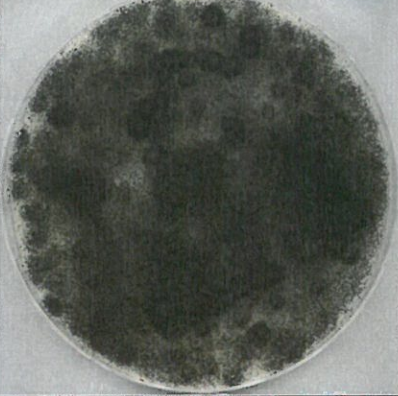

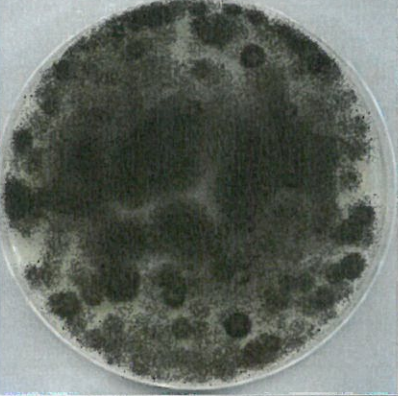


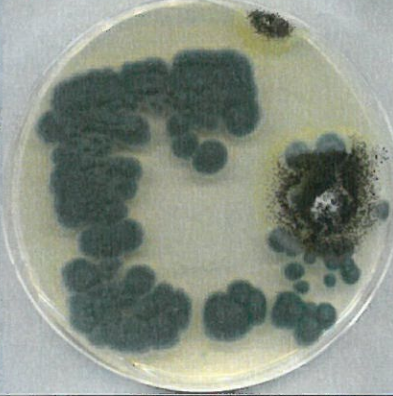
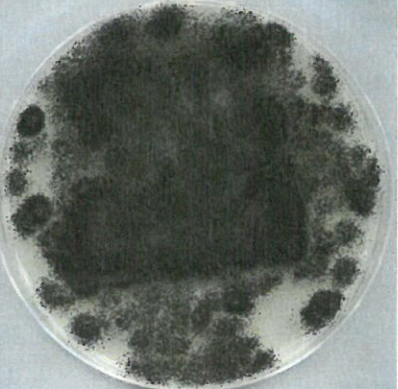
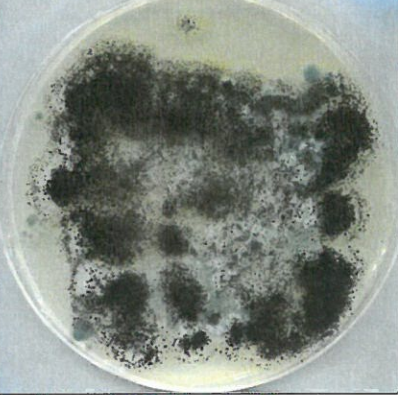
Podsumowanie

1. Bakterie *Escherichia coli* adherują w największym stopniu do LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm i 300 ppm. Jednak w warunkach prowadzenia doświadczenia nie wykazano obecności biofilmu.
2. Bakterie *Staphylococcus aureus* adherują w największym stopniu do LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm i materiału odniesienia, tworząc mikroskupiska. Jednak w warunkach prowadzenia doświadczenia nie wykazano obecności biofilmu.
3. Pozostałe badane mikroorganizmy adherują do silikonów w nieznacznym stopniu.

3.3. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną

Kolejny etap miał na celu pokazanie, czy grzyby pleśniowe naniesione na badany materiał w formie zawiesiny w soli i w soli z dodatkiem glukozy i inkubowane przez miesiąc zamierają na tym materiale, czy też intensywnie rosną. Założono, że wzrost pleśni nie będzie widoczny makroskopowo, jak również po odcisnięciu na pożywce mikrobiologicznej i w takim przypadku zostanie wykorzystana metoda pomiaru ergosterolu do kontroli rozwoju pleśni. Jednak obserwowano niewielki makroskopowy wzrost na materiałach z zawiesiną w roztworze glukozy. Na wszystkich materiałach odnotowano obecność żywych zarodników pleśni, o czym świadczy wzrost kolonii na pożywkach z odciskami materiałów (Tab.14). Z tego względu zrezygnowano z metody oznaczania ergosterolu, która nie wniosłaby niczego nowego do wyników badań. Zaobserwowano ponadto, że na materiałach z glukozą dominował *Aspergillus niger*, zaś na materiałach, gdzie zawiesina była sporządzona w soli wzrost był mniej intensywny, a dominował *Penicillium chrysogenum*. Stwierdzono również ograniczenie rozwoju grzybów na materiałach modyfikowanych nanocząstkami, w porównaniu z materiałem odniesienia.

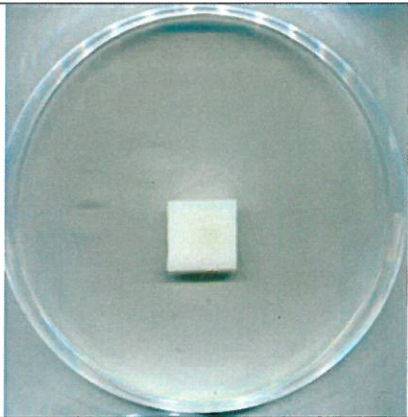
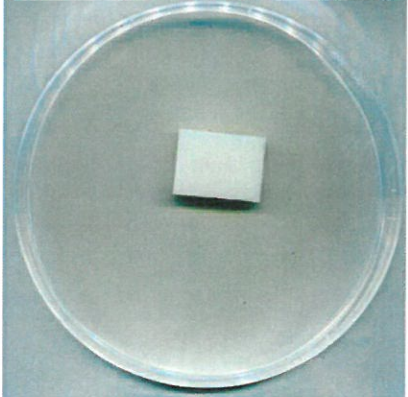
Tabela 14. Wyniki badań materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą hodowlaną

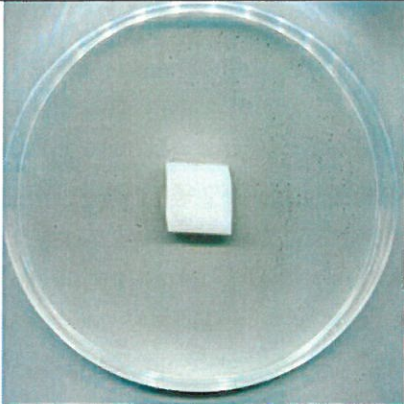
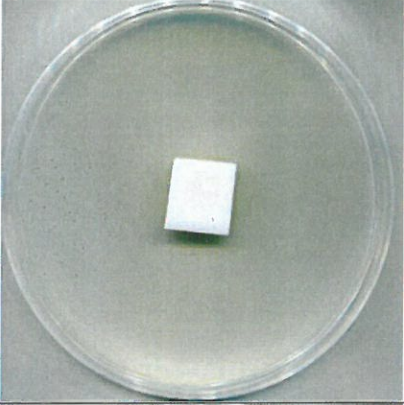
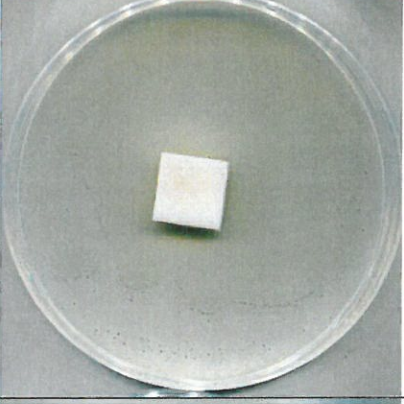
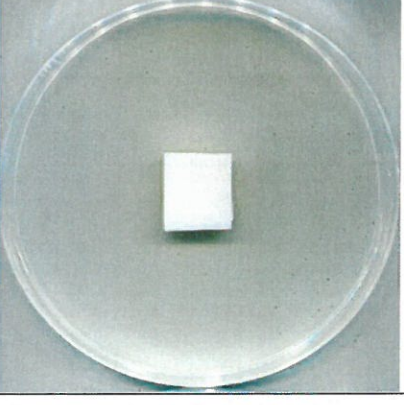
Materiał	Z glukozą	Bez glukozy
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm		
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm		
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm		
LSR (próbka odniesienia)		

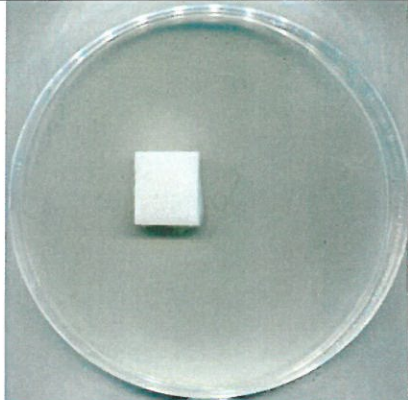
3.4. Ocena odporności materiałów na kolonizację przez grzyby pleśniowe metodą według PN-EN ISO 846 2002

W pierwszym etapie zastosowano wariant badań, w którym nie dodawano do pożywki dodatkowego źródła węgla. Celem doświadczenia było stwierdzenie, czy badany materiał jest wykorzystywany przez grzyby jako pożywka oraz w jaki sposób zawarte w silikonach związki oddziałują na badane mikroorganizmy. W tabeli 15 przedstawiono wyniki badań prowadzonych metodą A. Wykazano brak wzrostu grzybów pleśniowych na powierzchni silikonów, zarówno z dodatkiem związków przeciwdrobnoustrojowych jak i w próbie odniesienia. Oznacza to, że analizowane materiały nie są wykorzystywane przez pleśń jako źródło węgla.

Tabela 15. Ocena oddziaływania grzybów na materiały (metoda A)

Materiał	Intensywność wzrostu	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	0	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	0	

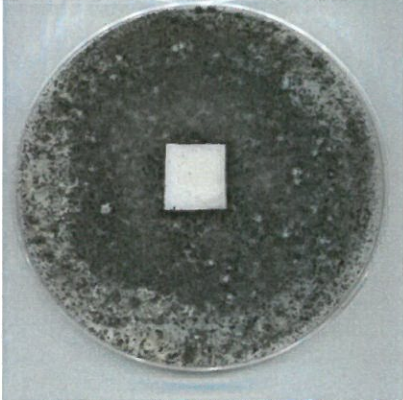
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	0	
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	0	
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	0	
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	0	

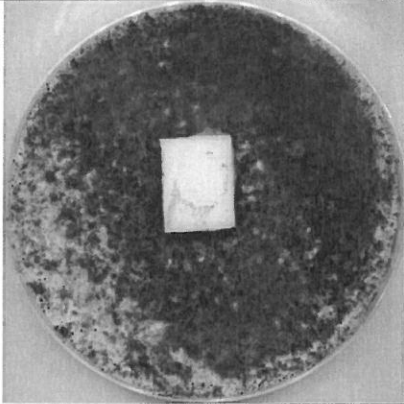
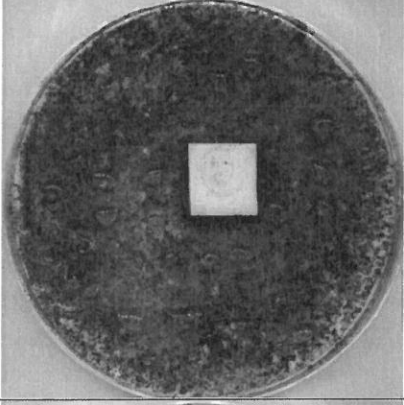
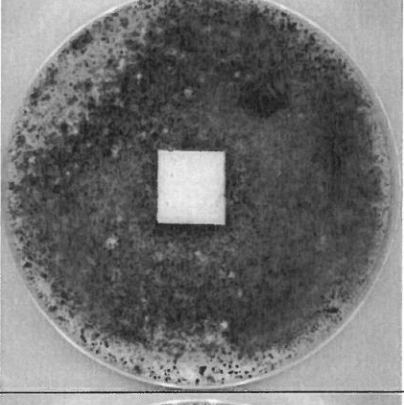
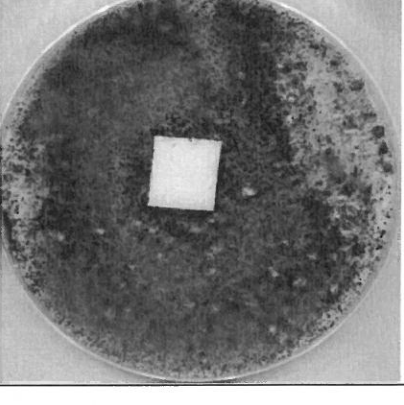
LSR (próbka odniesienia)	0	
--------------------------	---	--

Kolejna część badań (B i B`) miała na celu ustalenie, czy grzyby pleśniowe mogą rosnąć na badanych materiałach, gdy jest obecne źródło węgla (w postaci pożywki mikrobiologicznej). Warunki zastosowane w eksperymencie są zbliżone do występujących w naturze, gdzie drobiny kurzu osadzają się na powierzchniach, niosąc z sobą związki węgla. Wyniki przedstawiono w tabeli 16. Nie stwierdzono hamowania rozwoju grzybów pleśniowych na pożywce wokół próbki materiału. Grzyby nie rosły na powierzchni materiału, jedynie na jego bokach; wzrost w 5-stopniowej skali został oceniony na 1.

Metoda B` wykazała brak widocznego wzrostu grzybów pleśniowych na powierzchni materiałów – ocena 0 (tab.17).

Tabela 16. Ocena oddziaływania grzybów na materiały (metoda B)

Materiał	Intensywność wzrostu	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	1	

LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	1	
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	1	
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	1	
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	1	

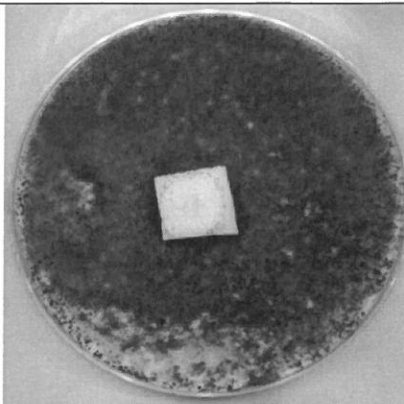
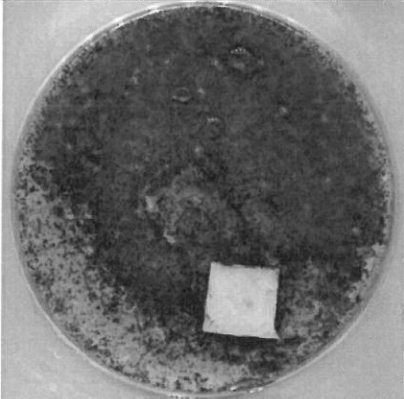
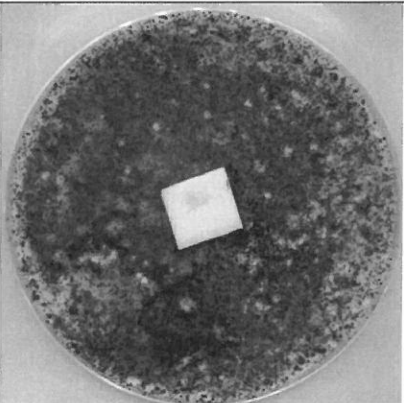
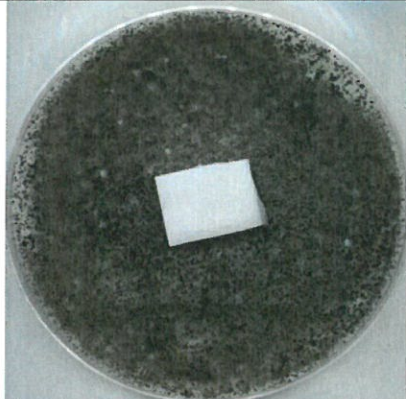
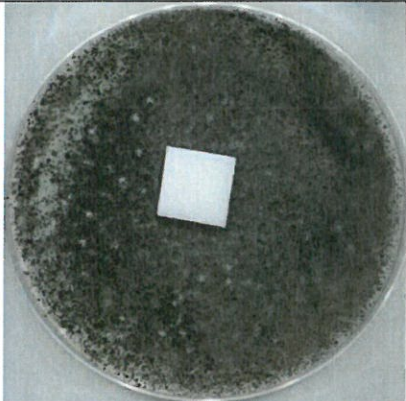

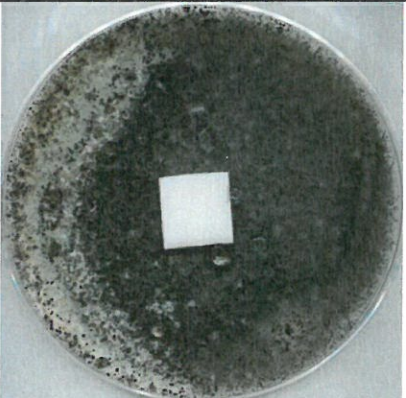
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	1	
LSR (próbka odniesienia)	1	

Tabela 17. Ocena oddziaływania grzybów na materiały (metoda B')

Materiał	Intensywność wzrostu	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm	0	

LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm	0	
LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm	0	
LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm	0	
LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm	0	

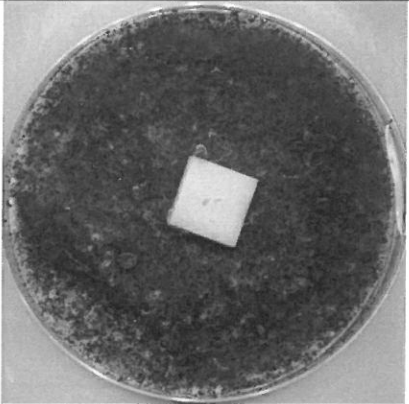
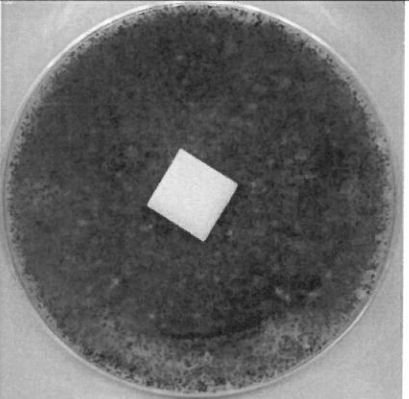
LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm	0	
LSR (próbka odniesienia)	0	

Tabela 18 przedstawia podsumowanie oceny badanych silikonów wg normy PN-EN ISO 846

Tabela 18. Ocena badanych silikonów wg normy PN-EN ISO 846

Materiał	Intensywność wzrostu		Ocena badanych farb
	Metoda A	Metoda B	
LSR+nano Cu/SiO ₂ 100 ppm LSR+nano Cu/SiO ₂ 300 ppm LSR+nano Ag/SiO ₂ 100 ppm LSR+nano Ag/SiO ₂ 300 ppm LSR+nano Ag/TiO ₂ 100 ppm LSR+nano Ag/TiO ₂ 300 ppm LSR (próbka odniesienia)	0	1	Materiał nie jest pożywką dla grzybów. Brak efektu grzybostatycznego

Podsumowanie

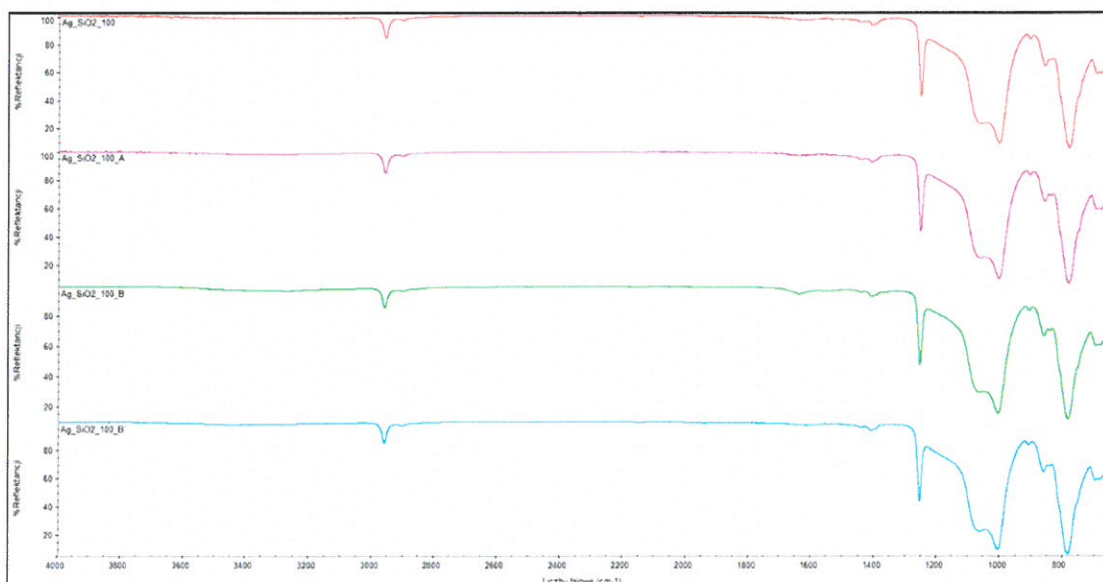
1. Badane silikonów nie są wykorzystywane jako źródło węgla przez grzyby pleśniowe
2. Grzyby pleśniowe nie rosną na materiałach w obecności źródła węgla, jednocześnie ich wzrost wokół silikonów nie jest hamowany.

3.5. Ocena zmian strukturalnych materiałów pod wpływem mikroorganizmów

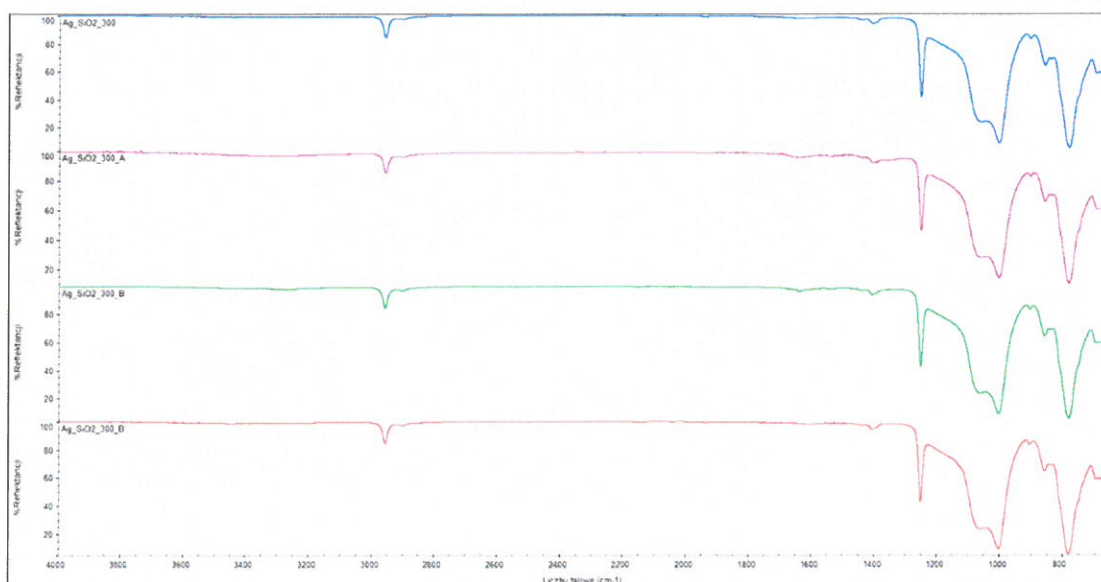
3.5.1. Metoda FTIR

Metoda badania widma silikonów w podczerwieni jest narzędziem, które może określić zmiany w strukturze chemicznej polimerów zachodzące pod wpływem działania mikroorganizmów, tj. w przypadku gdy materiał może być modyfikowany dzięki aktywności enzymatycznej drobnoustrojów lub pod wpływem ich metabolitów.

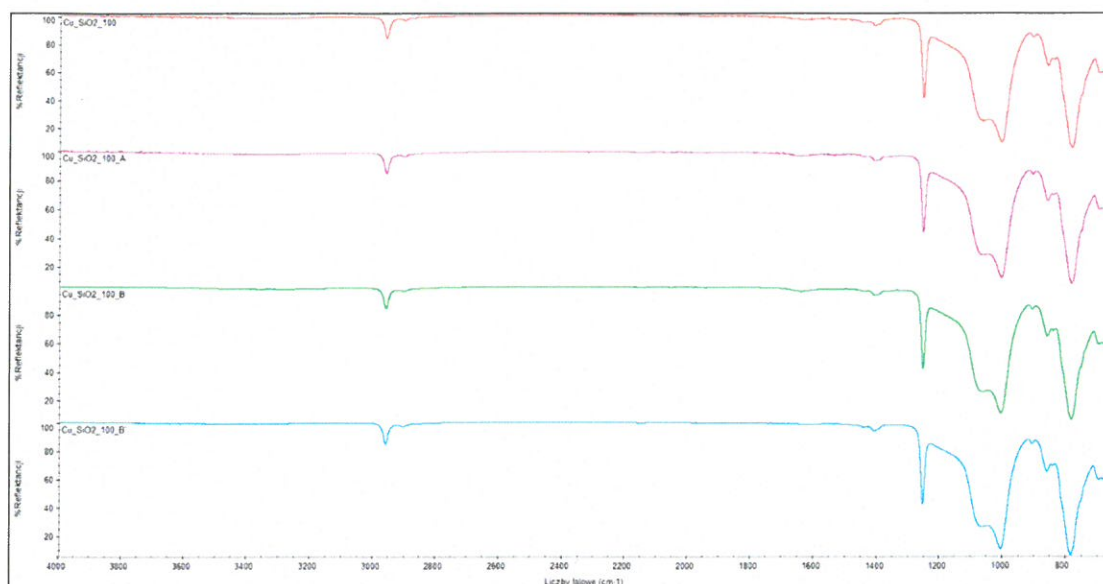
Na rysunkach 2-36 przedstawiono widma badanych materiałów poddanych działaniu pleśni (pkt 2.4.3), bakterii i drożdży (pkt.2.4.4). Kolorem



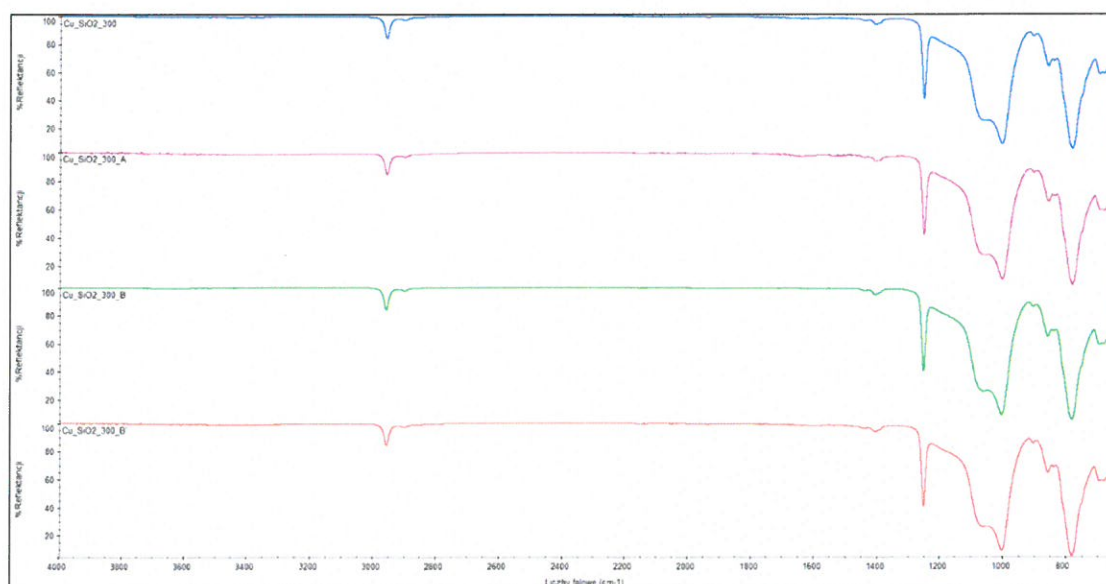
Rysunek 2. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm po działaniu pleśni



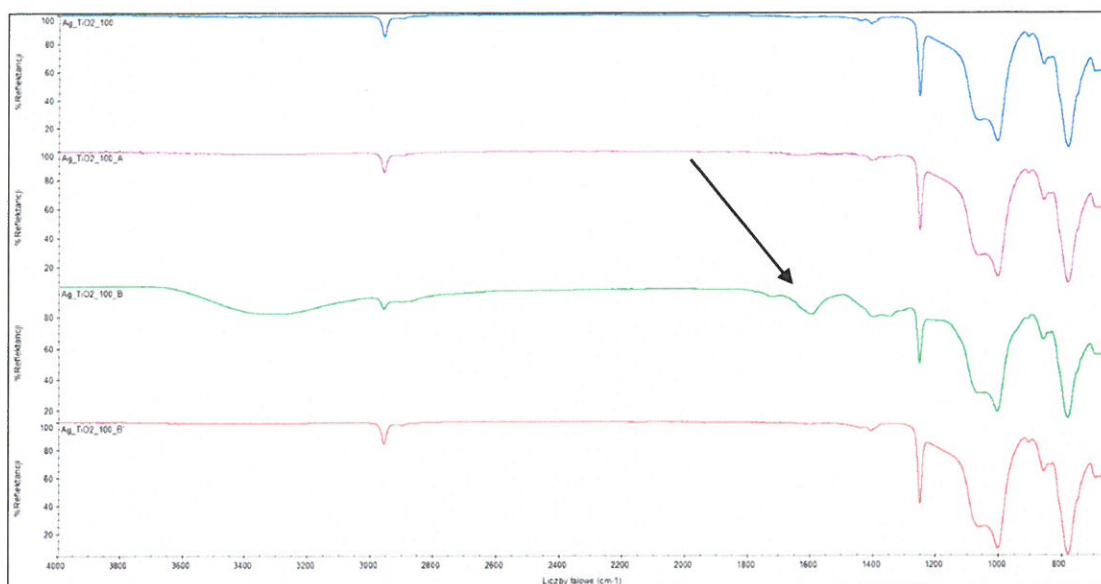
Rys. 3. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm po działaniu pleśni



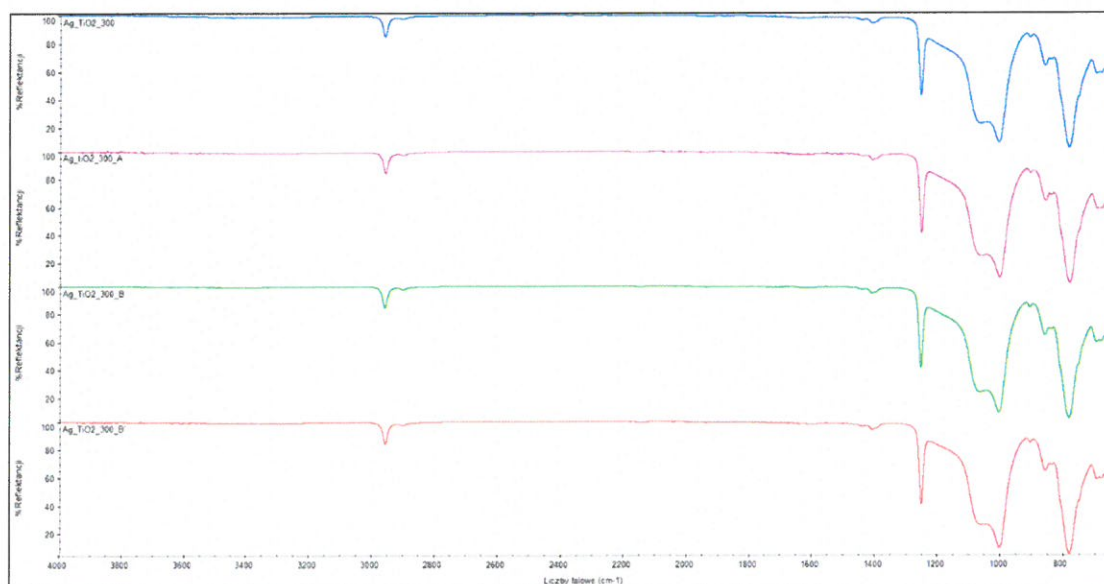
Rys. 4. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 100 ppm po działaniu pleśni



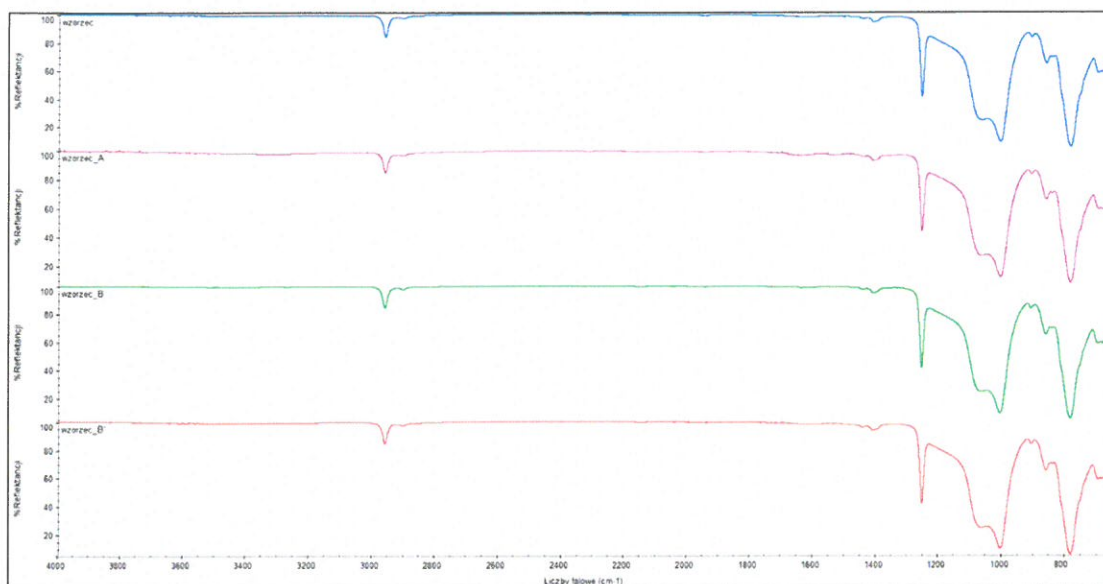
Rys. 5. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu pleśni



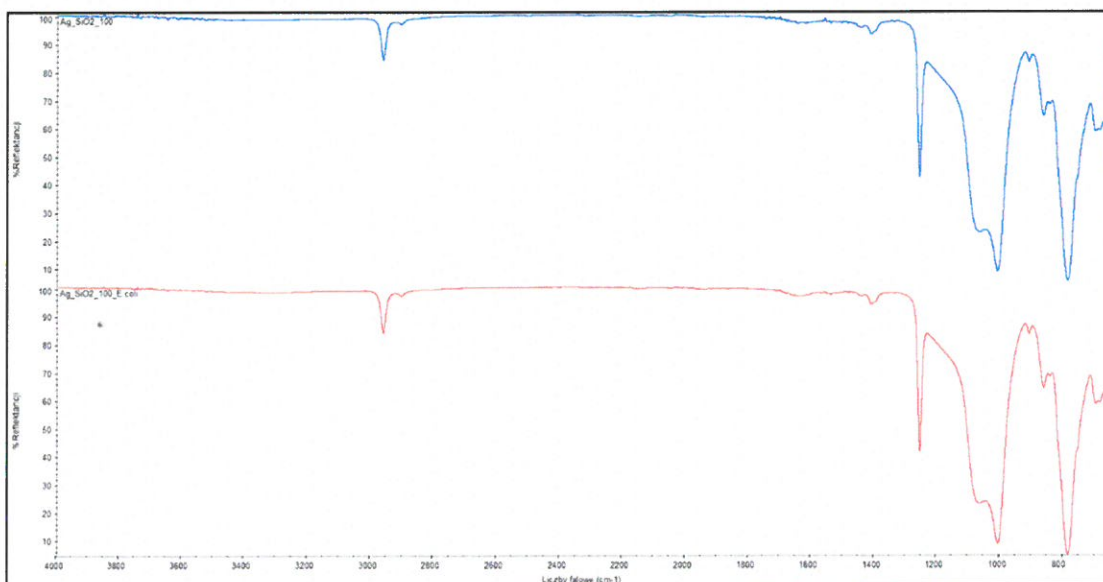
Rys. 6. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu pleśni



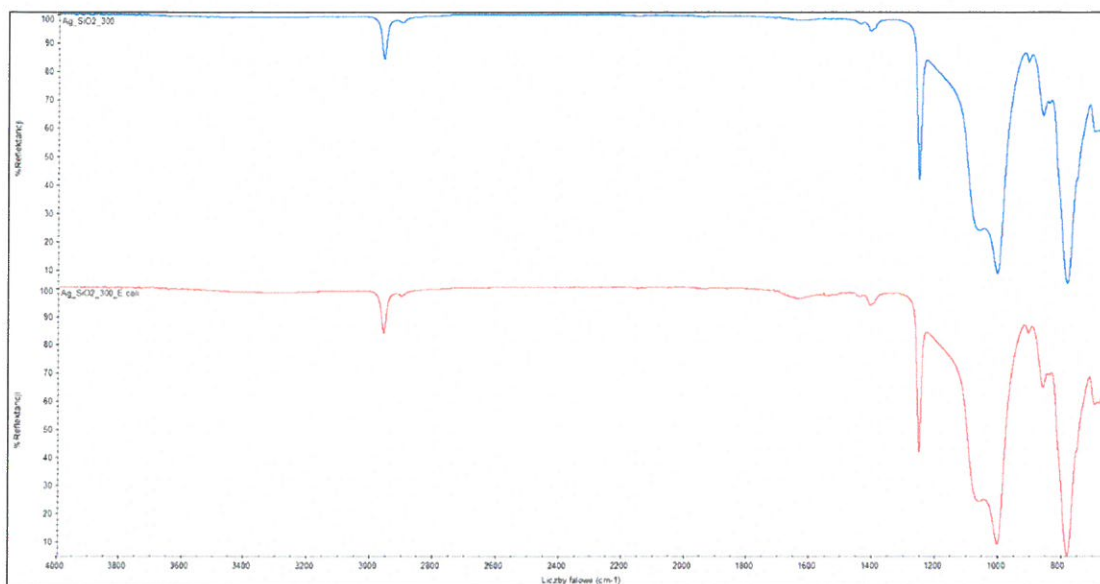
Rys. 7. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm po działaniu pleśni



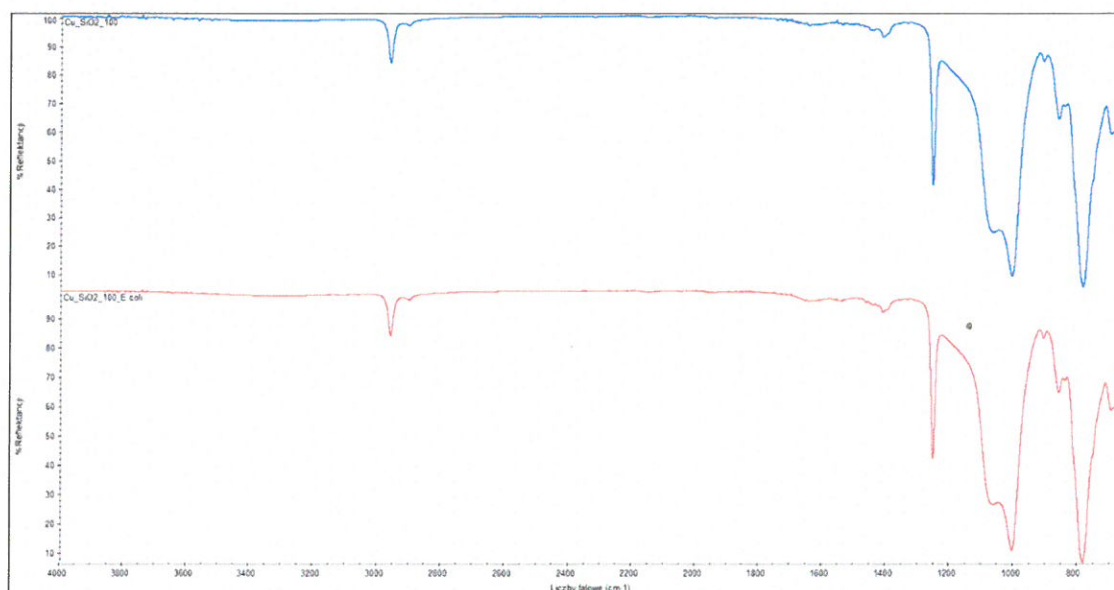
Rys. 8. Widmo FTIR LSR po działaniu pleśni



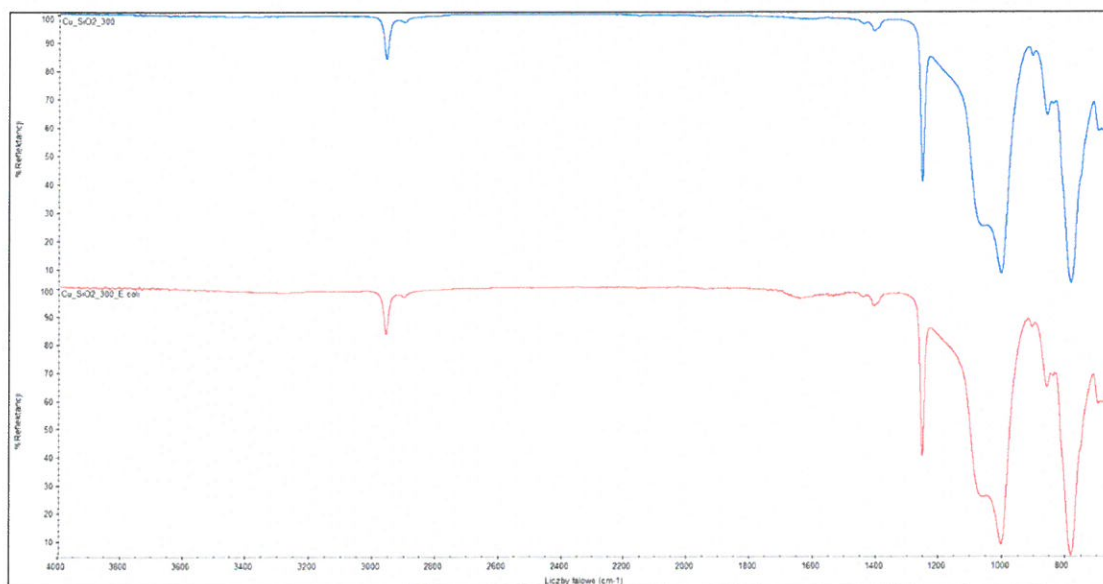
Rys. 9. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Escherichia coli*



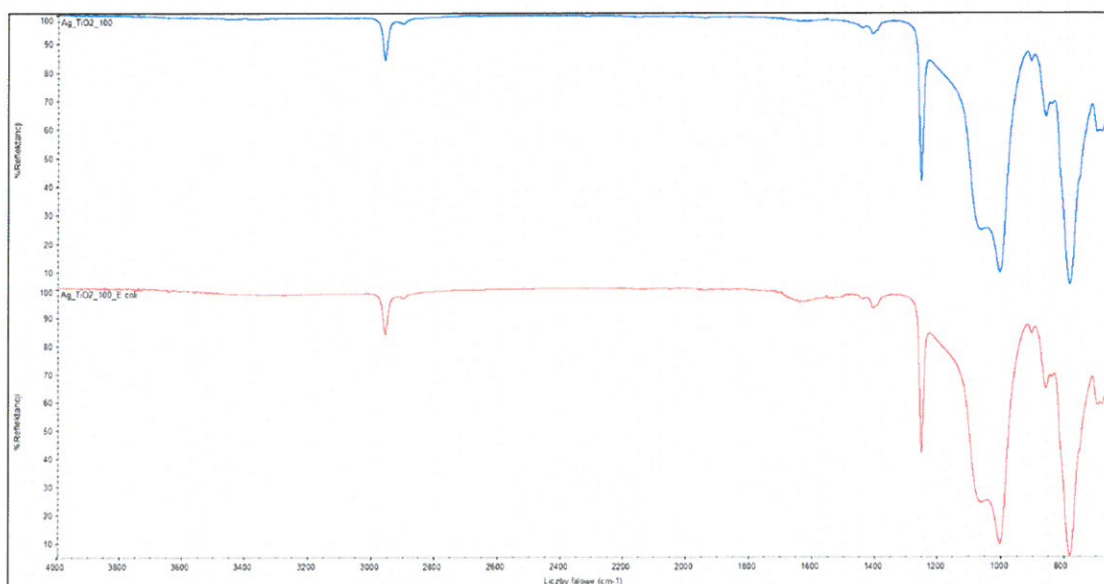
Rys. 10. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Escherichia coli*



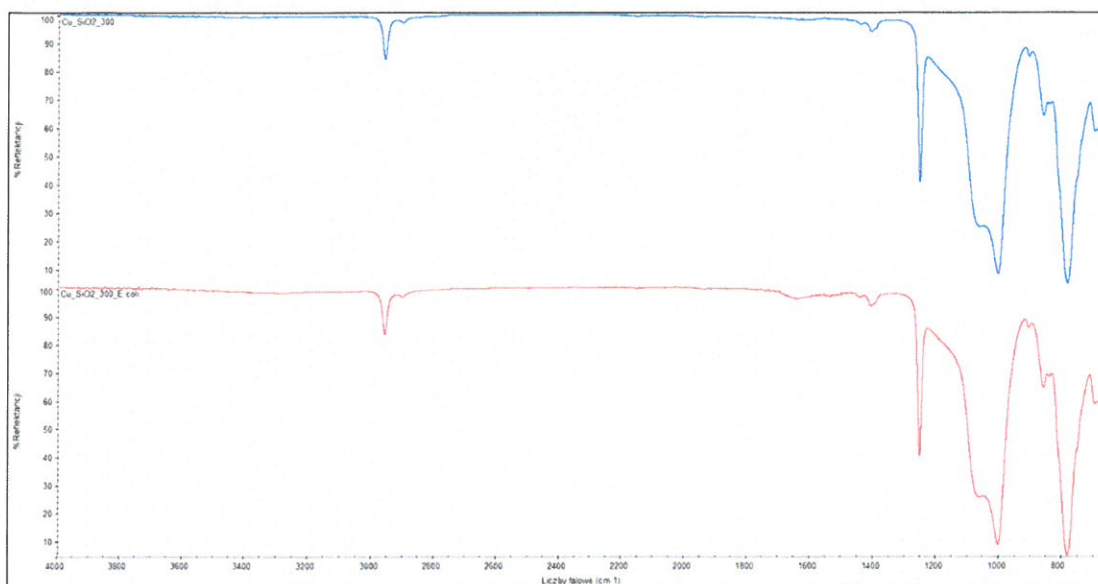
Rys. 11. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Escherichia coli*



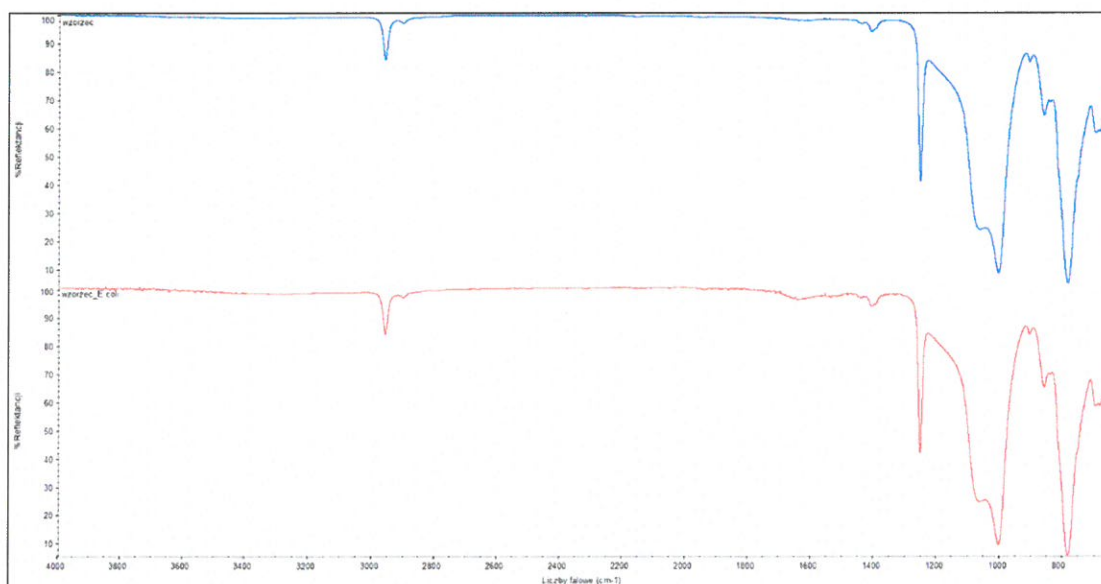
Rys. 12. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Escherichia coli*



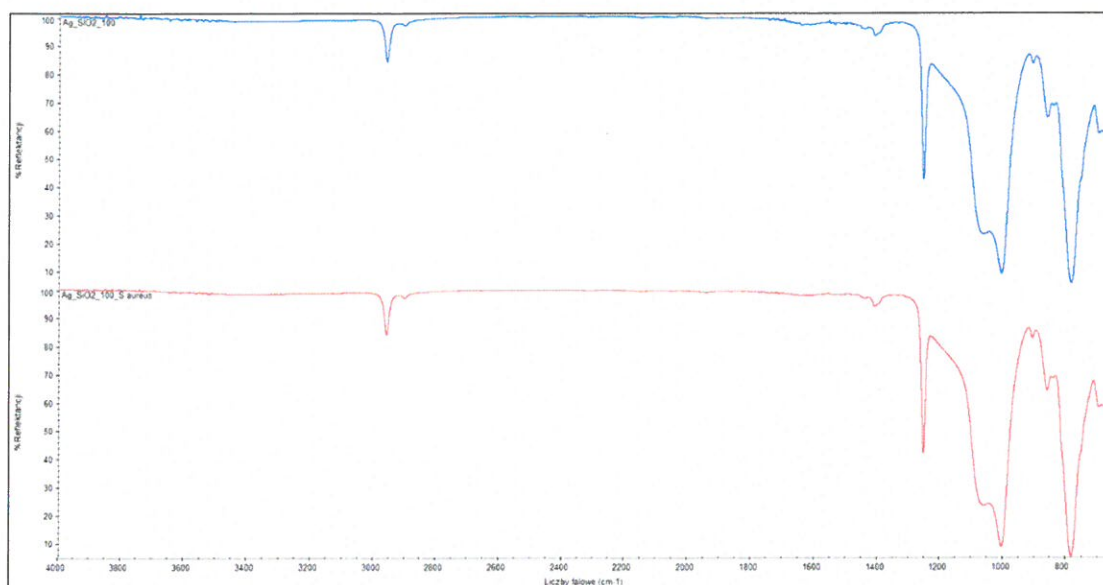
Rys. 13. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu *Escherichia coli*



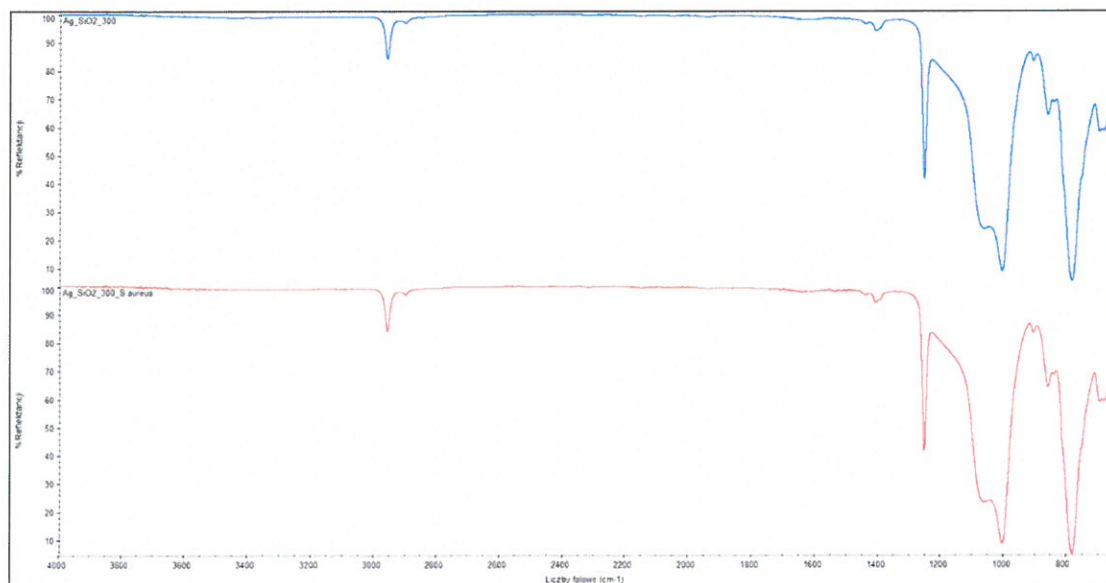
Rys. 14. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm po działaniu *Escherichia coli*



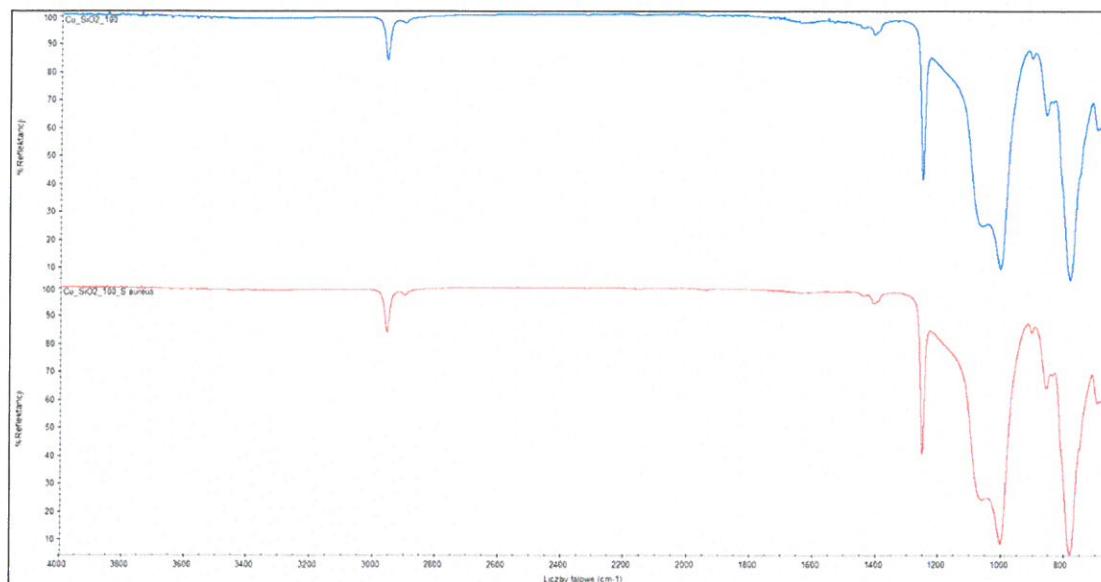
Rys. 15. Widmo FTIR LSR po działaniu *Escherichia coli*



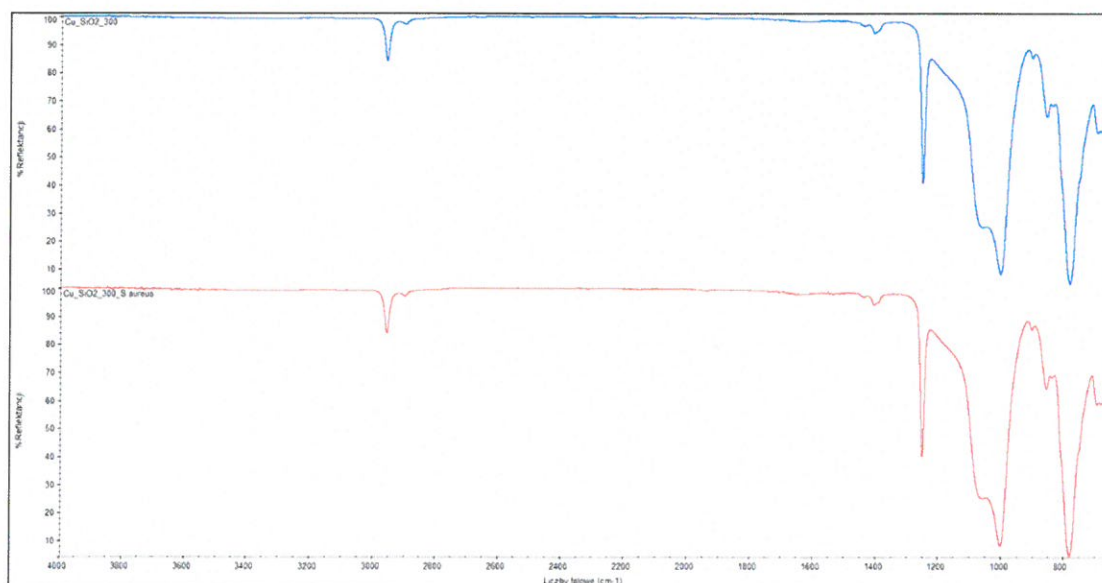
Rys. 16. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



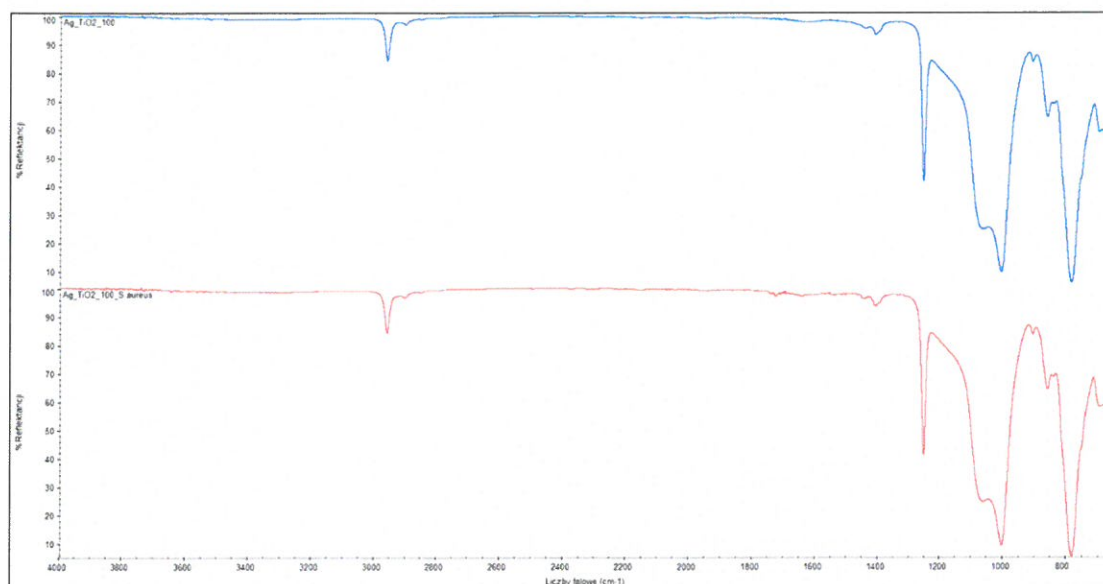
Rys. 17. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



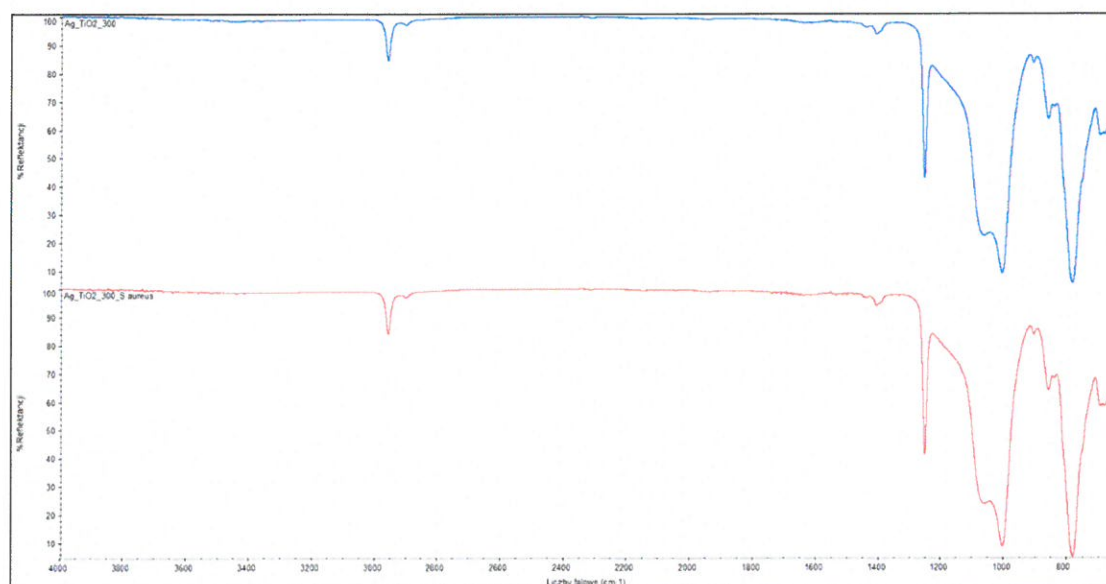
Rys. 18. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



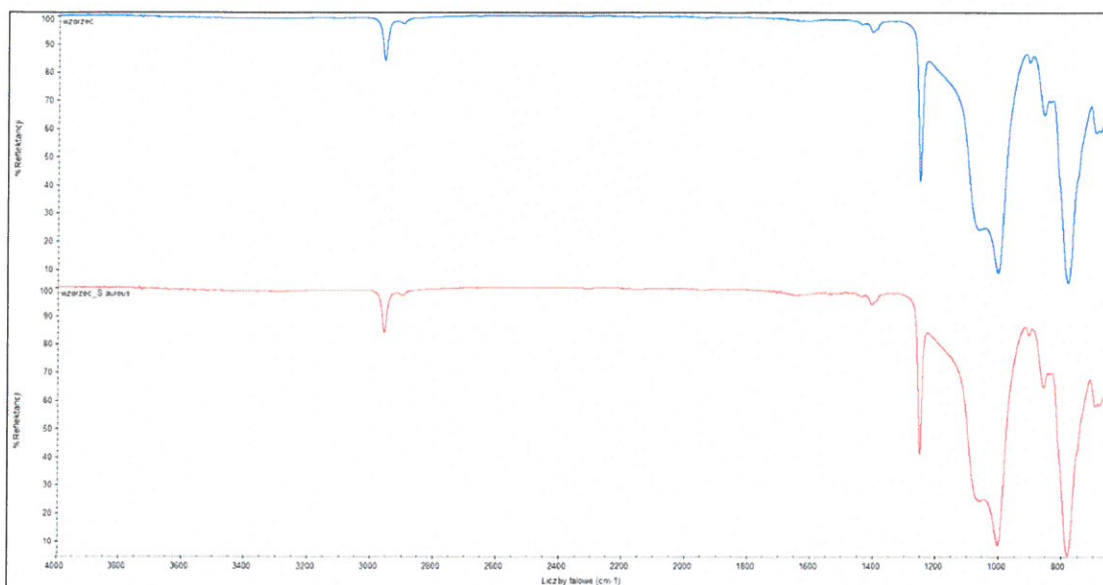
Rys. 19. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



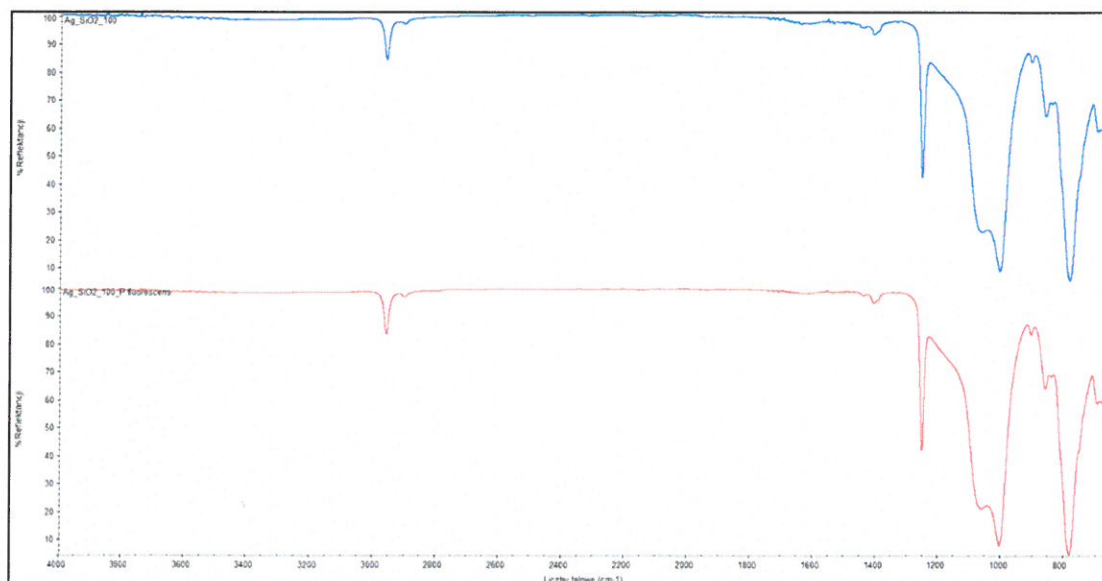
Rys. 20. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



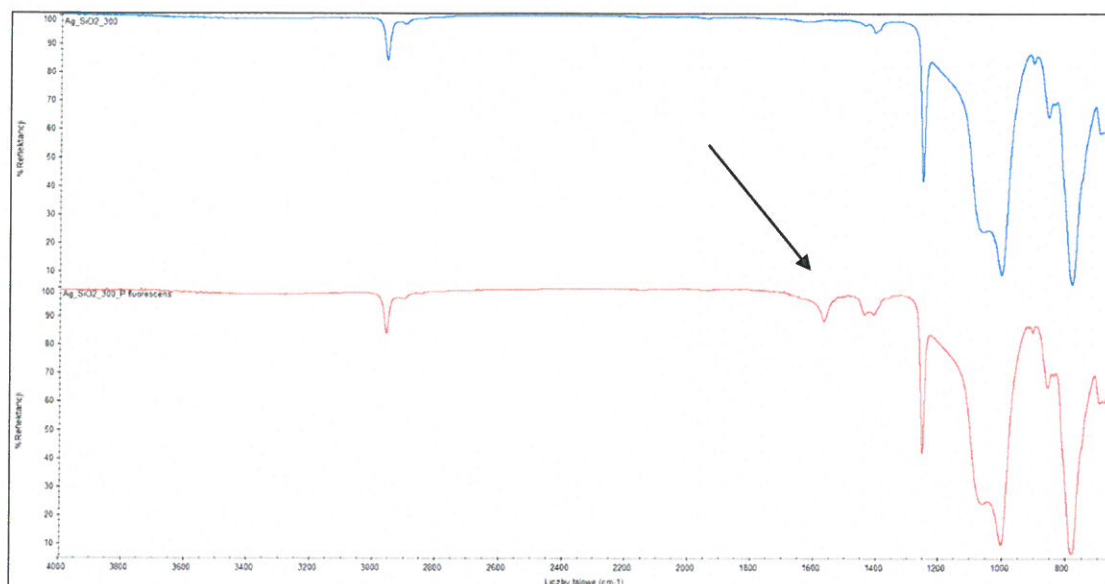
Rys. 21. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



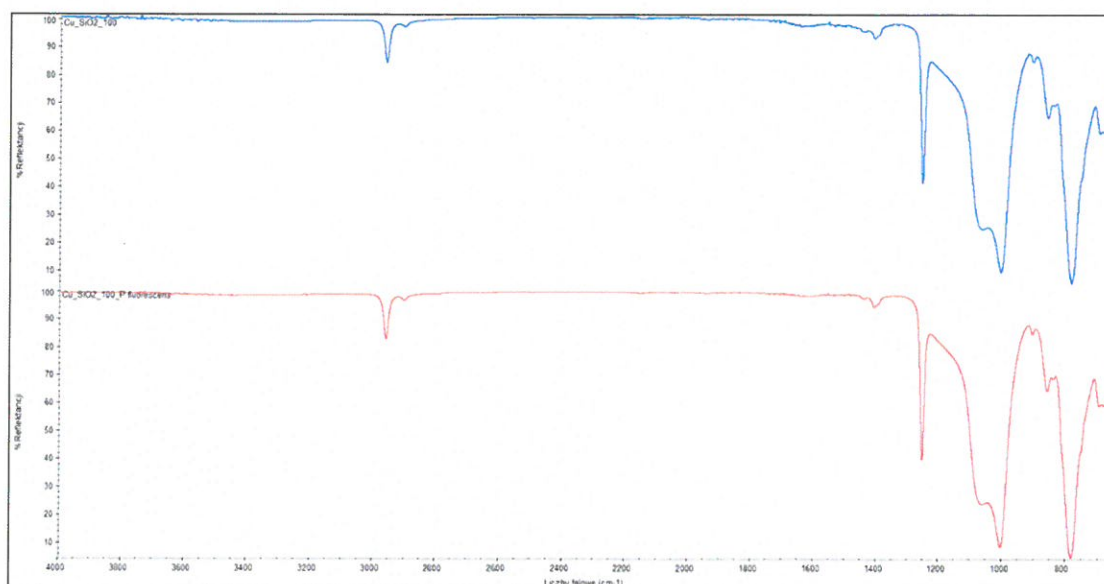
Rys. 22. Widmo FTIR LSR po działaniu *Staphylococcus aureus*



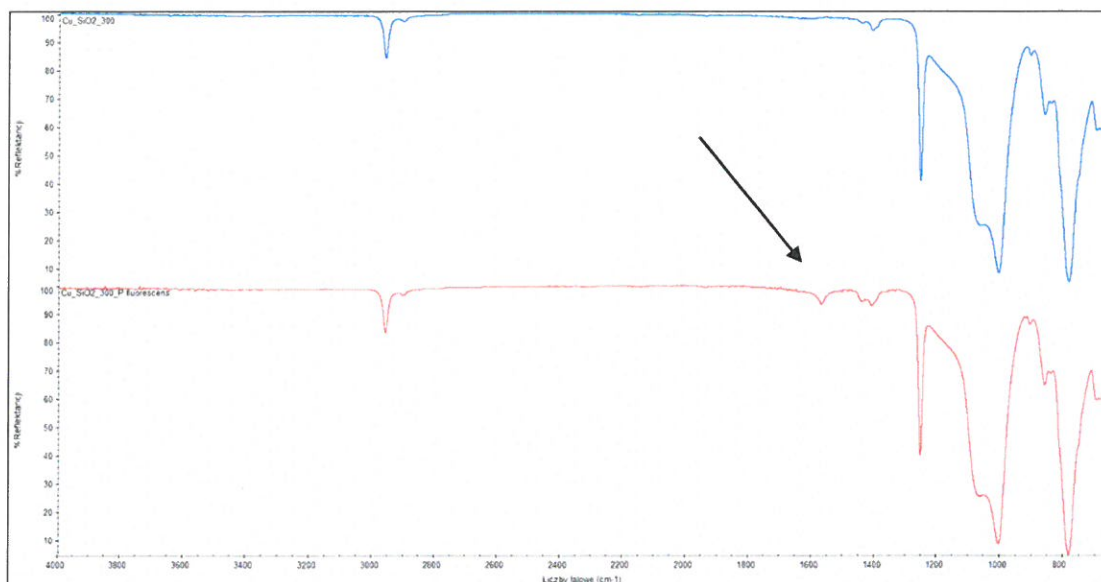
Rys. 23. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



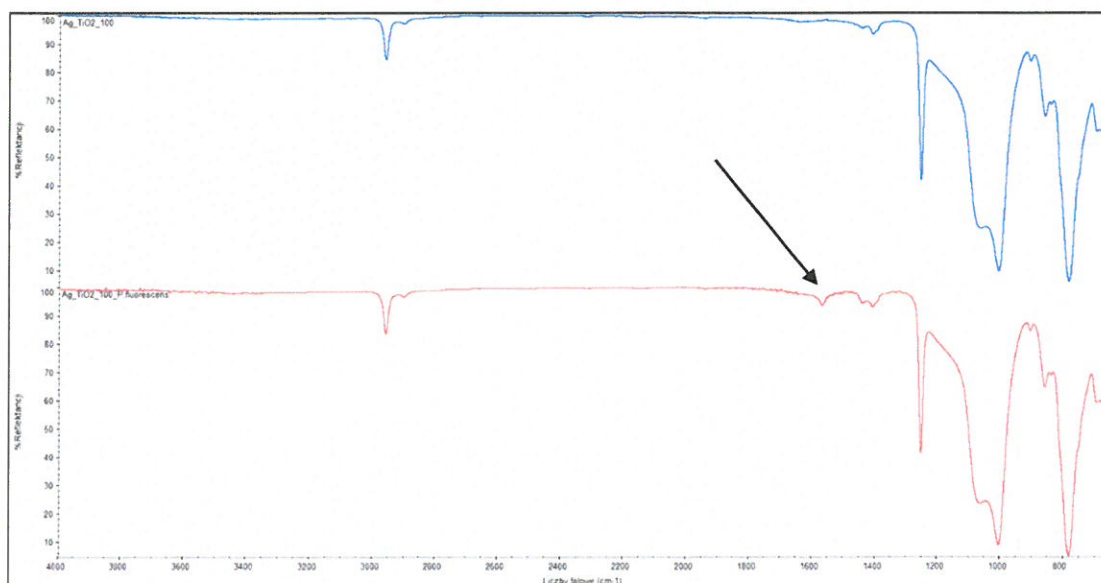
Rys. 24. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



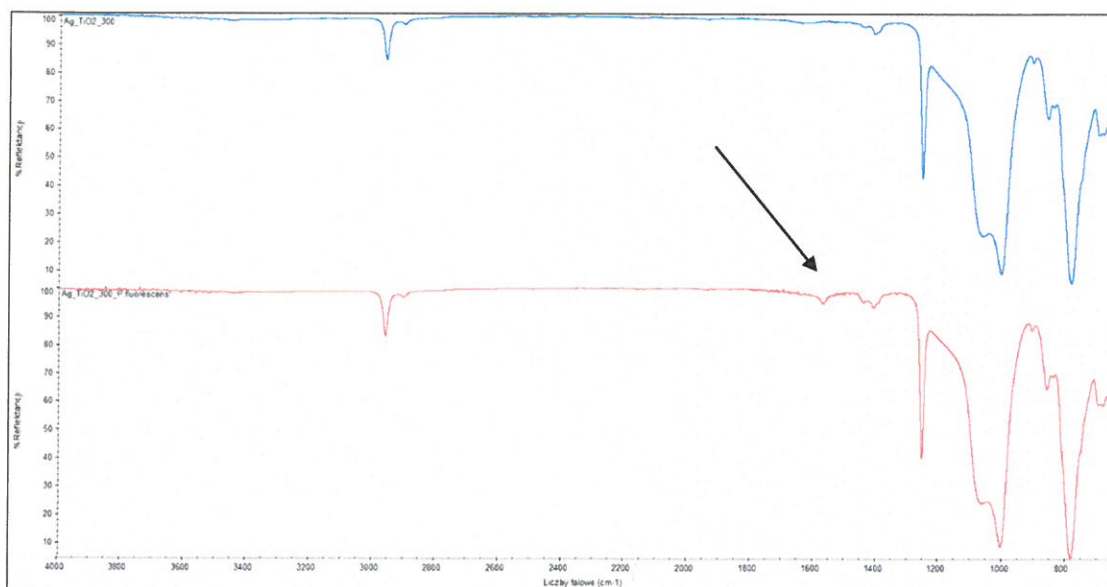
Rys. 25. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



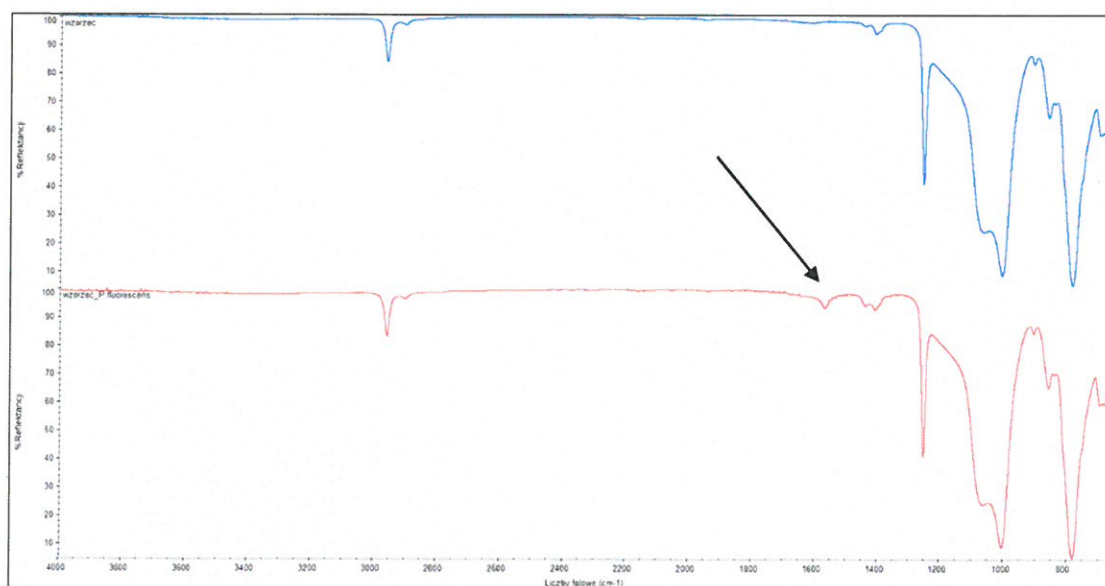
Rys. 26. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



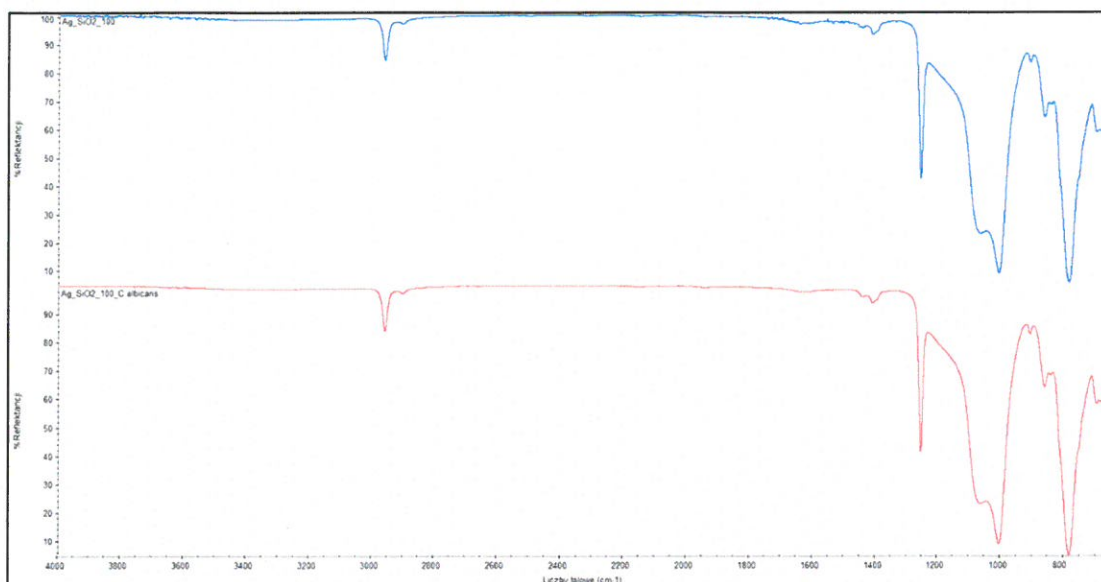
Rys. 27. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



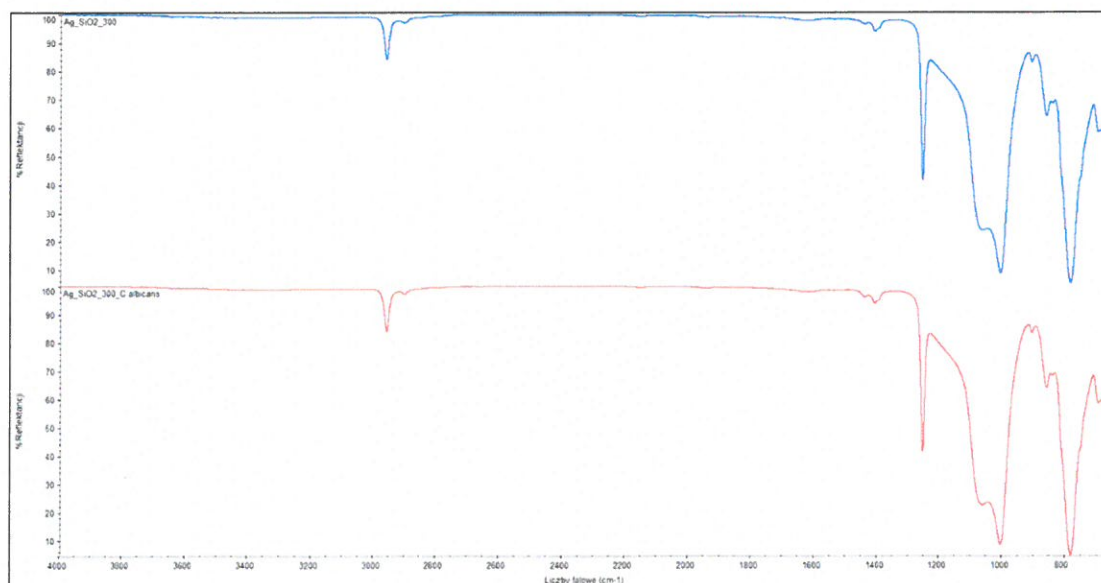
Rys. 28. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



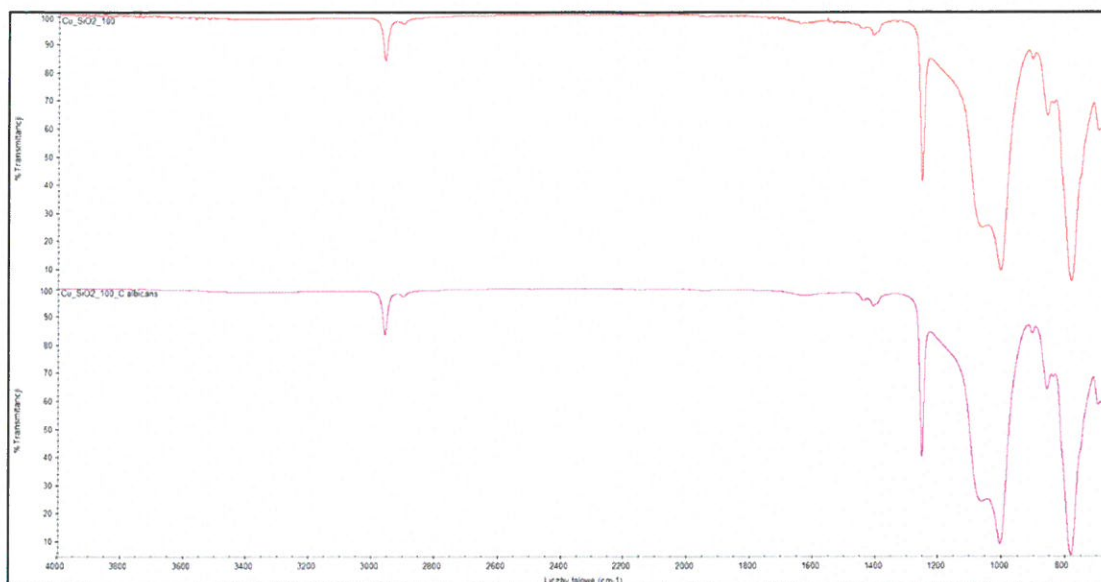
Rys. 29. Widmo FTIR LSR po działaniu *Pseudomonas fluorescens*



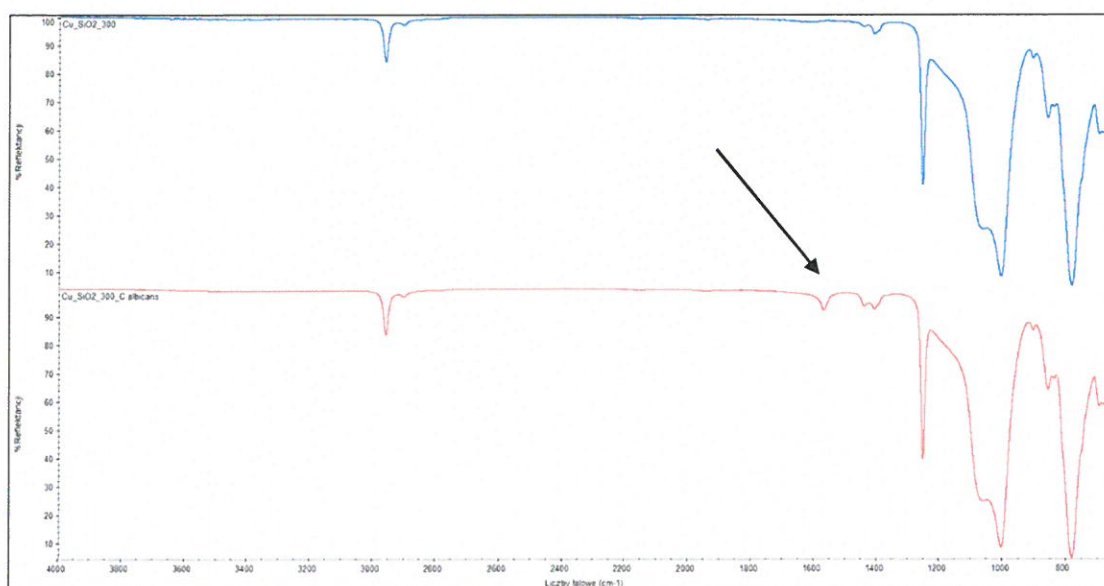
Rys. 30. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Candida albicans*



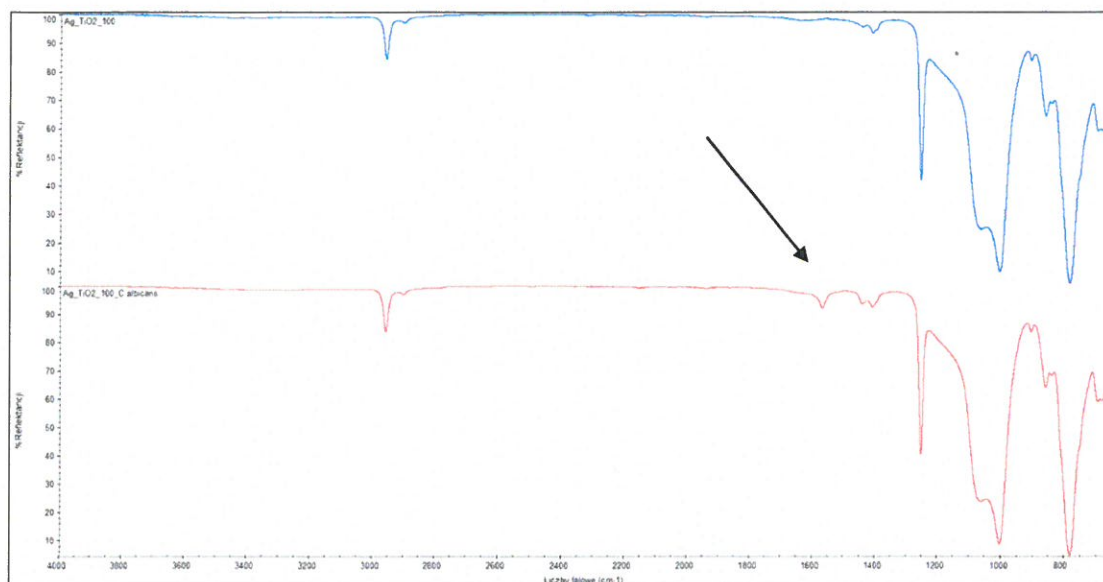
Rys. 31. Widmo FTIR LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Candida albicans*



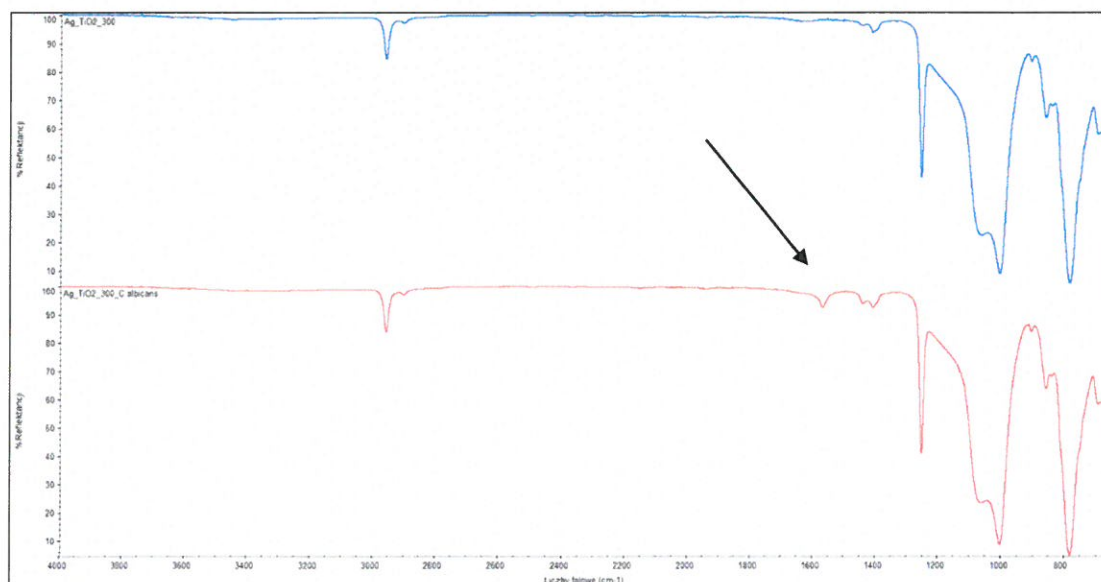
Rys. 32. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 100 ppm po działaniu *Candia albicans*



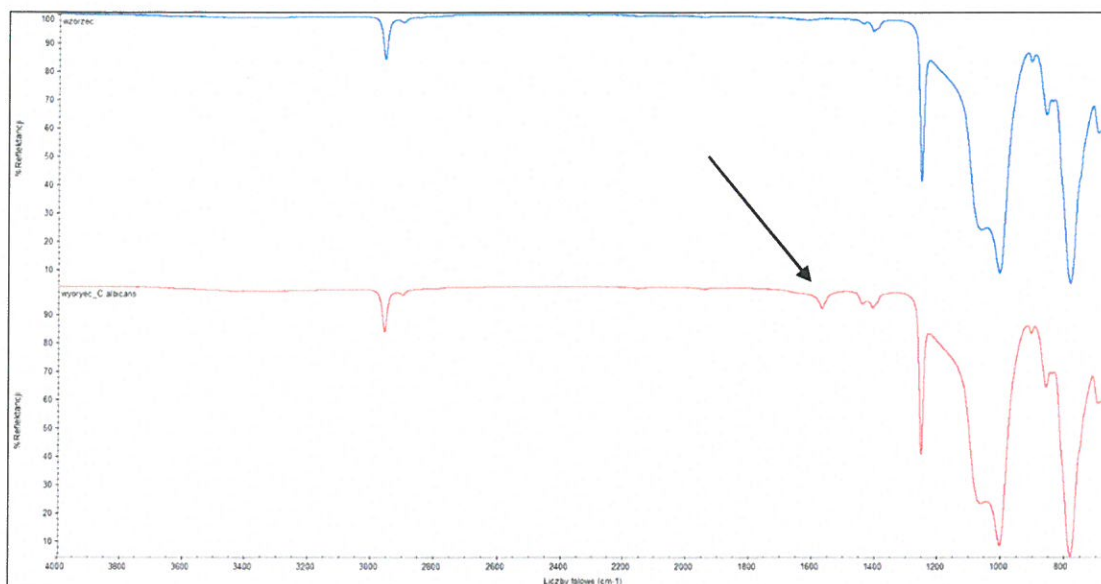
Rys. 33. Widmo FTIR LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Candia albicans*



Rys. 34. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu *Candia albicans*



Rys. 35. Widmo FTIR LSR+nano Ag/TiO₂ 300 ppm po działaniu *Candia albicans*



Rys.36. Widmo FTIR LSR po działaniu *Candida albicans*

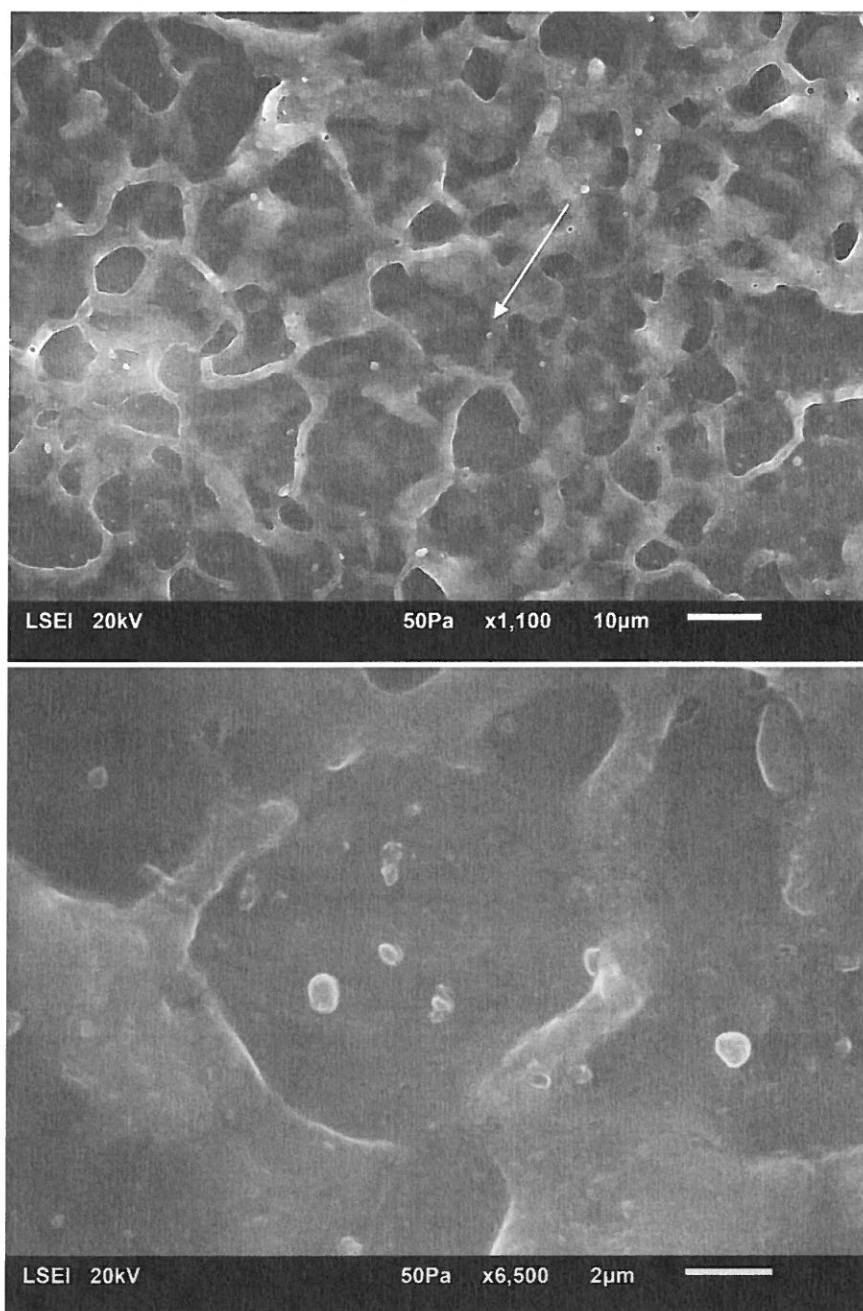
W większości analizowanych przypadków nie stwierdzono żadnych zmian w widmie FTIR badanych próbek w porównaniu z analogicznym materiałem przed doświadczeniem. Widmo było charakterystyczne dla polimerów silikonowych.

Jedynie materiały LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm, LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm, LSR+nano Ag/TiO₂ 100 i 300 ppm oraz wzorzec LSR poddane działaniu *Pseudomonas fluorescens* oraz *Candida albicans* wykazywały niewielkie zmiany w postaci dodatkowego piksu w zakresie 1600 cm⁻¹ (Rys. 24, 26, 27, 28 i 29, 33,34, 35 i 36), jak również Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu pleśni w metodzie B (Rys.6). Wskazana byłaby dłuższa inkubacja próbek w celu wykazania, czy zmiany te pogłębiają się.

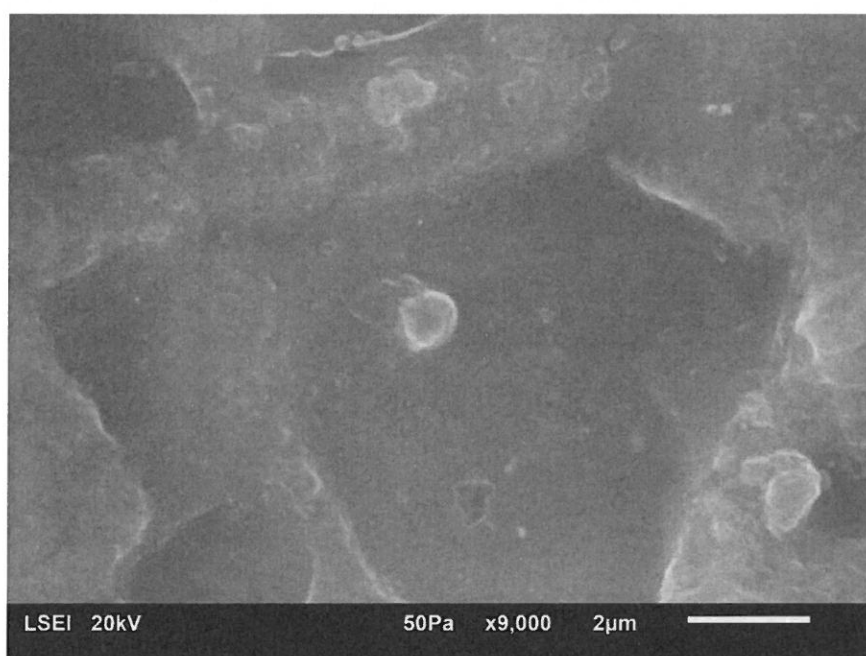
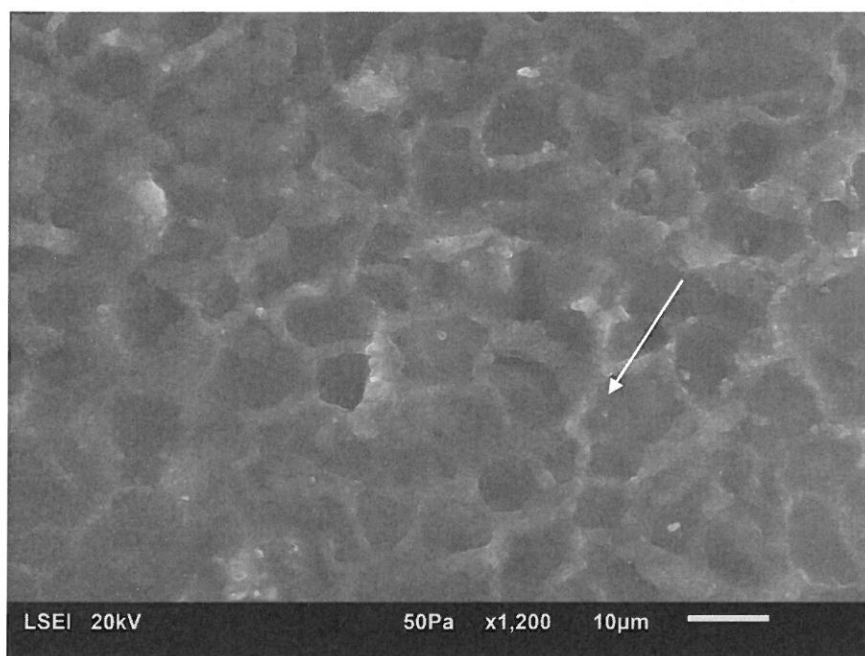
3.5.2. Metoda mikroskopii elektronowej

Obserwacjom w mikroskopie elektronowym skaningowym poddano wybrane próbki, w których na podstawie analizy technika mikroskopii fluorescencyjnej wykazano obecność mikroskopisk. Strzałkami zaznaczono komórki mikroorganizmów (Fot. 8-11).

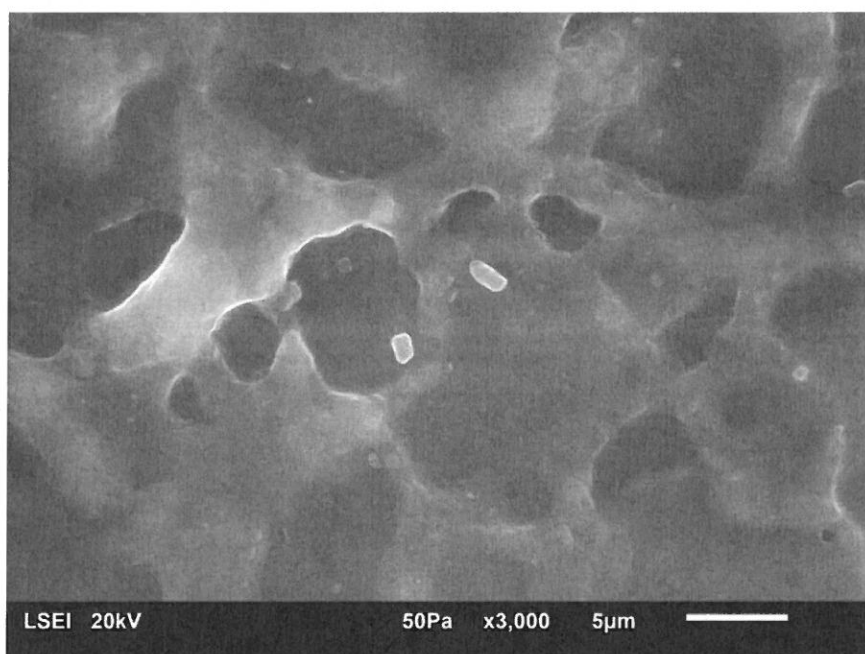
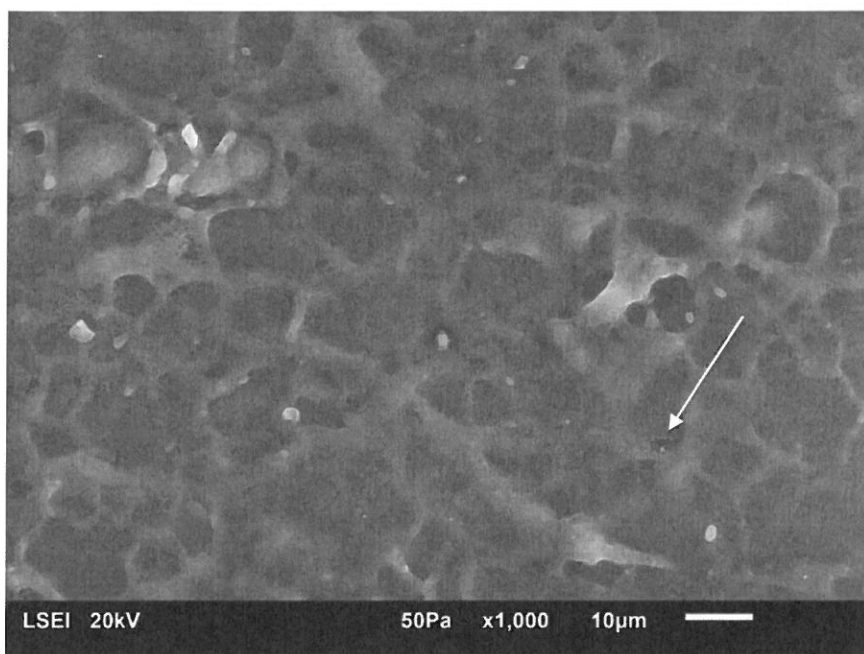
Badania wykazały, że badany materiał nie jest jednorodny, występują w nim zagłębienia, w których głównie obserwowano obecność mikroorganizmów. W żadnym z przypadków nie zaobserwowano tworzenia biofilmu. Jedynie na Fot. 11 przedstawiającej powierzchnię LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus* widoczne są skupiska komórek, które mogą wskazywać na tendencję do tworzenia biofilmu przy dłuższym czasie kontaktu polimeru z bakteriami. Może o tym świadczyć zaznaczone skupisko czterech komórek otoczonych ciemniejszą masą.



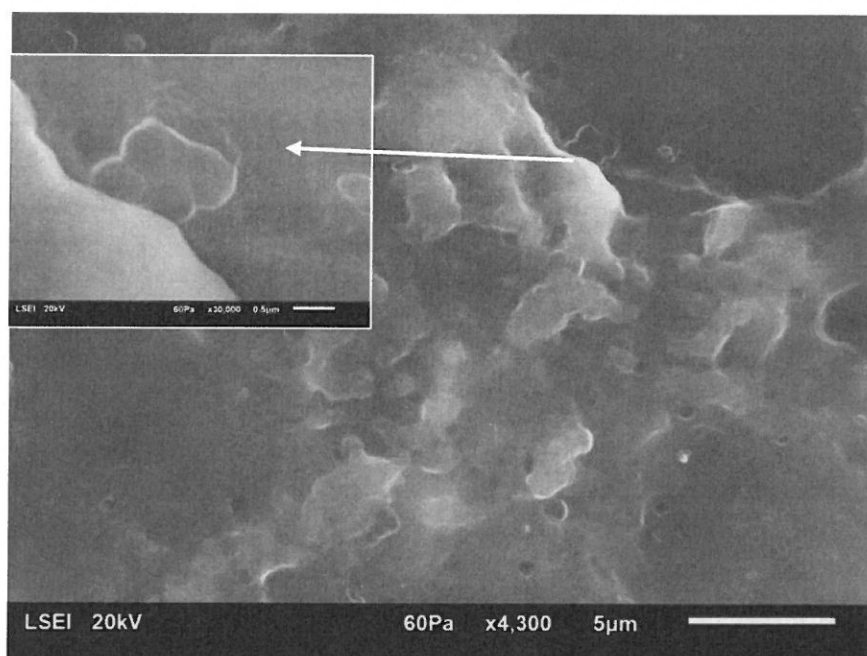
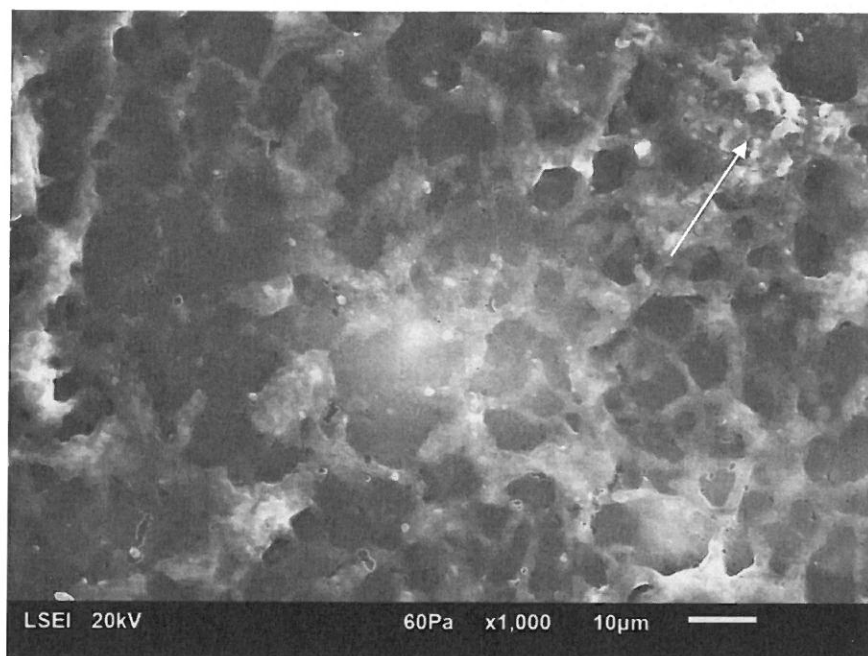
Fot. 8 Obraz mikroskopowy LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



Fotografia 9. Obraz mikroskopowy LSR+nano Ag/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*



Fotografia 10. Obraz mikroskopowy LSR po działaniu *Staphylococcus aureus*



Fotografia 11. Obraz mikroskopowy LSR+nano Cu/SiO₂ 300 ppm po działaniu *Staphylococcus aureus*

4. Podsumowanie i wnioski

W tabeli 19 zestawiono wyniki badań, w których wykazano zróżnicowanie między wariantami doświadczenia. Dla pozostałych punktów wyniki wskazują na pozytywne właściwości materiału w kontekście ich działania przeciwdrobnoustrojowego.

Tabela 19. Zestawienie wyników badań

Wyniki Materiał	3.1.							3.2.				3.5.				
	Ec	Sa	Pf	Ca	An	Ch	Pc	Ec	Sa	Pf	Ca	Ec	Sa	Pf	Ca	p
Cu/SiO ₂ 100	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cu/SiO ₂ 300	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Ag/SiO ₂ 100	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Ag/SiO ₂ 300	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Ag/TiO ₂ 100	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ag/TiO ₂ 300	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
LSR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+

3.1. Ocena aktywności przeciwdrobnoustrojowej materiałów metodą hodowlaną. 3.2. Ocena odporności materiałów na tworzenie biofilmów przez bakterie i drożdże metodą mikroskopii fluorescencyjnej.

3.5. Ocena zmian strukturalnych materiałów pod wpływem mikroorganizmów

Ec – *Escherichia coli*; Sa – *Staphylococcus aureus*; Pf – *Pseudomonas fluorescens*; Ca – *Candida albicans*;

An – *Aspergillus niger*; Ch – *Cladosporium herbarum*; Pc – *Penicillium chrysogenum*; P – pleśń

(+) wynik wskazujący na pozytywne właściwości materiału; (-) wynik wskazujący na negatywne właściwości materiału

Na podstawie przeprowadzonych badań można sformułować następujące wnioski:

1. Materiały zawierające Ag/TiO₂ w ilości 100 i 300 ppm charakteryzowały się wysoką aktywnością przeciwbakteryjną w stosunku do *Escherichia coli* i nieco niższą przeciwgrzybową w stosunku do *Candida albicans* i *Penicillium chrysogenum*.
2. Materiał zawierający Cu/SiO₂ w ilości 300 ppm wykazywał aktywność przeciwgrzybową w stosunku do *C.albicans*, *A.niger* i *C.herbarum*.
3. Materiał zawierający Ag/SiO₂ w ilości 300 ppm wykazywał aktywność przeciwgrzybową w stosunku do *C.albicans* i *C.herbarum*.
4. Pozostałe materiały nie wpływały w znaczący sposób na przeżywalność bakterii i grzybów, a nawet w niektórych przypadkach stymulowały ich wzrost.
5. Bakterie *Escherichia coli* adherują w największym stopniu do LSR+nano Ag/SiO₂ 100 ppm i 300 ppm. Jednak w warunkach prowadzenia doświadczenia nie wykazano obecności biofilmu.
6. Bakterie *Staphylococcus aureus* adherują w największym stopniu do LSR+nano Ag/TiO₂ 100 ppm i materiału odniesienia, tworząc mikroskopiska. Jednak w warunkach prowadzenia doświadczenia nie wykazano obecności rozwiniętego biofilmu.
7. Pozostałe badane mikroorganizmy adherują do silikonów w nieznacznym stopniu.
8. Badane materiały nie są pożywką dla grzybów. Nie wykazują efektu grzybostatycznego.
9. W większości analizowanych przypadków nie stwierdzono żadnych zmian w widmie FTIR badanych próbek w porównaniu z analogicznym materiałem przed doświadczeniem.