

TNO

Отчет TNO

V4548/03

Оценка воздействия микроорганизмов на покрытие
потолочных панелей BioGuard по методу ISO 846 (1997)

Управление риском
и Микробиология
Utrechtseweg 48
P.O. Box 360
3700 AJ Zeist,
The Netherlands.

www.tnl.nl

Тел. +31 30 694 41 44

Факс +31 30 695 72 24

infofood@voeding.tno.nl

Число	Апрель 2002
Автор	Б.Дж. Хартог
Лаборант	Г-жа Х.К.М. Виссерс
№ копии	1
Количество экземпляров	6
Страниц	13
Приложения	0
Заказчик	Armstrong Building Products GmbH, Мюнстер (Германия)
Наименование проекта	Испытания антимикробной активности потолочных панелей
№ проекта	010.52021/01.06.01

Содержание

1	Введение — 3
2	Методы и материалы — 4
2.1	Исследуемые материалы — 4
2.2	Метод испытаний — 4
2.2.1	Принцип — 4
2.2.2.	Подготовка опытных образцов — 5
2.2.3	Организмы, использовавшиеся в ходе испытаний — 5
2.2.4	Подготовка культуры посева — 5
2.2.5	Растворы и питательная среда — 6
2.2.6	Процедура испытаний — 7
3	Результаты и обсуждение — 9
4	Выводы — 10
5	Подпись — 11

1 Введение

Armstrong Building Products, Мюнстер (Германия), дочерняя компания Armstrong World Industries, Пенсильвания (США), – компания по производству строительных материалов, занимающаяся разработкой потолочных панелей с антимикробным защитным покрытием.

По заказу Armstrong Building Products, Мюнстер (Германия) Институтом пищевых и продовольственных исследований TNO (Цейст, Нидерланды) было исследовано воздействие микроорганизмов на защитное покрытие потолочных панелей BioGuard по методу ISO 846 (1997).

Были исследованы образцы материалов потолочных панелей BioGuard Plain и BioGuard Perforated. Согласно письменному утверждению Заказчика, образцы материалов потолочных панелей BioGuard Plain и BioGuard Perforated, предоставленные для исследования TNO, относятся к подтипам Board, Tegular, Microlook и Special.

Результаты исследований представлены в настоящем отчете.

2 Методы и материалы

2.1 Исследуемые материалы

В качестве материала для испытаний компанией Armstrong Building Products были представлены образцы потолочных панелей BioGuard.

Образцы были получены лабораторией TNO в Цейсте 28 января 2002 г. и были зарегистрированы под кодовым обозначением TNO M3119/01/0844 (BioGuard Plain, код Armstrong: B1) и M3119/01/0845 (BioGuard Perforated, код Armstrong: B2).

2.2 Метод испытаний

2.2.1 Принцип

Исследование воздействия микроорганизмов на защитное покрытие потолочных панелей BioGuard проводилось по методу ISO 846:1997 "Пластик – Оценка воздействия микроорганизмов".

В ходе исследования защитное покрытие исследуемых материалов в течение определенного времени подвергалось воздействию отобранных штаммов грибов (*Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Paecilomyces variotii*, *Gliocladium virens*, и *Chaetomium globosum*) и бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*) в условиях определенной температуры и влажности. После чего защитное покрытие исследуемых материалов оценивалось визуально. Результаты, полученные для образцов, подвергавшихся биологическому воздействию, сравнивались с результатами для образцов, не подвергавшимися такому воздействию, или для стерильных образцов, содержащихся в тех же условиях.

Исследование состояло из трех частей:

1. Определение роста грибов

Опытные образцы подвергаются воздействию суспензии смешанных спор грибов в присутствии неполной питательной среды без источника углерода. Грибки могут расти только за счет материала. Если в образцах не содержится питательный компонент, грибки не могут развить мицелий, и ухудшения материала не происходит. Этот метод подходит для оценки собственной сопротивляемости материала воздействию грибов в отсутствие иного органического вещества.

2. Определение фунгистатических эффектов

Опытные образцы подвергаются воздействию суспензии смешанных спор грибов в присутствии полной питательной среды, т.е. при наличии источника углерода. Даже если в материале не содержится каких-либо питательных элементов, грибки могут разрастаться на образцах, и продукт их метаболизма может разрушать материал. Любое замедление роста или на материале, или в среде роста (зона замедления) свидетельствует о фунгистатическом действии материала или о наличии фунгицидной обработки.

3. Определение сопротивляемости бактериям

Оценивается воздействие бактерий на исследуемый материал при использовании неполной среды. Если в агаре вокруг образца рост не происходит, в материале не содержится каких-либо питательных компонентов.

2.2.2 Подготовка опытных образцов

Для каждого из исследуемых материалов были подготовлены три серии по 15 образцов размером 5x5 см. Перед проведением испытаний поверхность опытных образцов, использовавшихся в тесте на определение роста грибов (2.2.1-1) и в тесте на сопротивляемость бактериям (2.2.1-3), была очищена – протерта 70% водно-этаноловым раствором, а затем высушена воздухом. Опытные образцы, использовавшиеся в тесте на определение фунгистатических эффектов (2.2.1-2), перед проведением исследования не очищались.

В каждом из трех отдельных тестов (тест на определение роста грибов, тест на определение фунгистатического эффекта и тест на определение сопротивляемости бактериям) были использованы три серии по пять опытных образцов для каждого исследуемого материала: одна серия была заселена микроорганизмами и выдержана при определенной температуре и влажности, вторая серия была помещена в какие же условия, но не заселена; более того, защитный слой на этих опытных образцах был дезинфицирован (контрольная группа-1); третья серия содержалась в обычных условиях и не была заселена микроорганизмами (контрольная группа-2). Три серии опытных образцов хранились в течение четырех недель при одинаковых условиях.

2.2.3 Организмы, использовавшиеся в ходе испытаний

Для испытаний были взяты следующие штаммы микробов:

Плесневые грибы

1. *Aspergillus niger* ATCC 6275;
2. *Penicillium pinophilum* ATCC 36839 (Основное название: *Penicillium funiculosum*);
3. *Paecilomyces variotii* ATCC 18502;
4. *Gliocladium virens* ATCC 9645;
5. *Chaetomium globosum* ATCC 6205.

Бактерии

6. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388.

2.2.4 Подготовка культуры посева

Штаммы различных организмов, использовавшихся в ходе испытаний, содержались в соответствии со стандартной рабочей процедурой TNO содержания штаммов сбора культуры.

1. Плесневые грибки

Для выращивания штаммов плесневых грибов использовался скошенный агар на отваре овсяной муки с солодовым экстрактом (5 дней при температуре 25° С). Споры плесени (конидии) хорошо спорулирующих культур были собраны путем размывания поверхности твердой культурной среды с использованием увлажняющего стерильного раствора минеральных солей (2.2.5-2). Споры каждой грибковой культуры диспергировались в жидкости путем встряхивания вместе со стерильными стеклянными шариками и отфильтровывались через стерильный фильтр из стекловолокна для удаления фрагментов мицелия.

- Для теста на *рост грибов* (2.2.1-2) отфильтрованные суспензии спор были сепарированы в стерильных условиях на центрифуге, затем повторно разведены в 25 мл раствора минеральных солей (2.2.5-1) и вновь сепарированы для удаления всех поверхностно активных веществ. Смытый остаток был разведен в 50 мл раствора минеральных солей и глюкозы (2.2.5-2), при этом концентрация спор была доведена приблизительно до 10⁶ спор на миллилитр.
- Для теста на *фунгистатический эффект* (2.2.1-2) отфильтрованные суспензии спор были сепарированы в стерильных условиях на центрифуге, повторно разведены в 25 мл раствора минеральных солей и глюкозы (2.2.5-2) и вновь сепарированы. Смытый остаток был разведен в 50 мл раствора минеральных солей и глюкозы (2.2.5-2), при этом концентрация спор была доведена приблизительно до 10⁶ спор на миллилитр.

Концентрация спор проверялась путем высевания образца каждой предварительно разжиженной суспензии спор на агар с глюкозой и дрожжевым экстрактом и количественного определения колонии плесневых грибов после выдерживания культуры посева при 25° С в течение 3-4 дней.

Жизнеспособность суспензий спор проверялась путем внесения посевного материала по капле каждой суспензии на агар с минеральными солями и глюкозой (2.2.5-6). После выдерживания в течение 3–4 дней при температуре 25° С должен был происходить бурный рост плесневых грибов.

Для нанесения посевного материала на опытные образцы использовалась суспензия из смешанных спор, которая была получена путем смешения равных объемов суспензий пяти штаммов плесневых грибов, используемых в тесте. Суспензия из смешанных спор использовалась в течение 6 часов после приготовления.

2. Бактерии

Свежие бактериальные клетки выращивались в экстракте бульона из мозгов и сердца в течение 24 часов при температуре 30° С. Приблизительно 10 мл культуры были разведены в 10 миллилитрах стерильного раствора фосфатного буфера (2.2.5-7), и концентрация бактерий была доведена до 10^6 клеток на миллилитр. Суспензия клеток использовалась в течение часа.

Концентрация и жизнеспособность клеток проверялись путем высевания образца предварительно разжиженной суспензии в трипсино-соевый агар (ТСА); культура посева выдерживалась в течение 24 часов при температуре 30° С, после чего определялась морфология колонии и ее количественные показатели.

2.2.5 Растворы и питательная среда

1. Раствор минеральных солей

NaNO ₃	2,0 г
KH ₂ PO ₄	0,7 г
K ₂ HPO ₄	0,3 г
KCl	0,5 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,01 г
H ₂ O	1000 мл
pH 6,0-6,5	

2. Увлажняющий раствор минеральных солей

Раствор минеральных солей (2.2.5-1)	1000 мл
Эфир полигликоля	0,1 г

4. Раствор минеральных солей и глюкозы

Раствор минеральных солей (2.2.5-1)	1000 мл
Глюкоза	30 г

5. Агар с минеральными солями (неполная агаровая среда)

Раствор минеральных солей (2.2.5-1)	1000 мл
Агар	20 г

Коррекция pH 6,0-6,5

6. Агар с минеральными солями и глюкозой (полная агаровая среда)

Раствор минеральных солей (2.2.5-1)	1000 мл
Глюкоза	30 г
Агар	20 г

Коррекция pH 6,0-6,5

7. Раствор фосфатного буфера

KH ₂ PO ₄	9,1 г/л (раствор А)
Na ₂ HPO ₄	11,9 г/л (раствор В)

600 мл раствора А и 400 мл раствора В смешиваются и стерилизуются,

Коррекция pH 7,0

8. Агар с буферным раствором минеральных солей

KH_2HPO_4	0,7 г
K_2HPO_4	0,7 г
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7 г
NH_4NO_3	1,0 г
NaCl	0,005 г
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 г
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,002 г
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,001 г
Агар	20 г
H_2O	1000 мл
Коррекция pH 7,0	

2.2.6 Процедура испытаний

1. Рост грибков

10 опытных образцов от каждого исследуемого материала (с очищенной поверхностью покрытия; 2.2.2) раздельно помещались в стерильные чашки Петри поверхностью покрытия вверх. Агар с минеральными солями (неполная среда; 2.2.5-5) заливается вокруг опытного образца вровень с поверхностью покрытия и затвердевал.

В каждой из пяти подготовленных таким образом чашечек Петри 0.1 мл суспензии смешанных спор (2.2.4-1) наносилась ровным слоем на поверхность покрытия опытного образца и на поверхность агара.

Поверхность покрытия опытных образцов в каждой из остальных пяти чашечек Петри была продезинфицирована 70% раствором этанола (контрольная группа -1) и не заселялась микроорганизмами.

Опытные образцы выдерживались при температуре 25°C в условиях относительной влажности >95% в течение 4 недель; каждую неделю образцы проходили визуальное обследование на наличие разрастания плесневых грибов.

2. Фунгистатический эффект

10 опытных образцов от каждого исследуемого материала (с очищенной поверхностью покрытия; 2.2.2) раздельно помещались в стерильные чашки Петри поверхностью покрытия вверх. Агар с минеральными солями и глюкозой (полная агаровая среда; 2.2.5-6) заливается вокруг опытного образца вровень с поверхностью покрытия и затвердевал.

В каждой из пяти подготовленных таким образом чашечек Петри 0.1 мл суспензии смешанных спор в растворе минеральных солей и глюкозы (2.2.4-1) наносилась ровным слоем на поверхность покрытия опытного образца и на поверхность агара.

Поверхность покрытия опытных образцов в каждой из остальных пяти чашечек Петри была продезинфицирована 70% раствором этанола и не заселялась микроорганизмами.

Опытные образцы выдерживались при температуре 25°C в условиях относительной влажности >95% в течение 4 недель; каждую неделю образцы проходили визуальное обследование на наличие разрастания плесневых грибов.

3. Сопrotивляемость бактериям

Пять опытных образцов от каждого исследуемого материала (с очищенной поверхностью покрытия; 2.2.2) раздельно помещались в стерильные чашечки Петри поверхностью покрытия вверх. Расплавленный (45°C) агар с буферным раствором минеральных солей (2.2.5-8) заселялся суспензией бактериальных клеток (*Pseudomonas aeruginosa*; 2.2.4-2) до достижения концентрации $5 \cdot 10^4$ клеток на миллилитр агара. Агар и суспензия клеток перемешивались, и полученная смесь сразу заливалась в чашечки Петри вокруг опытного образца вровень с поверхностью покрытия. После отвердевания агара на поверхность покрытия каждого опытного образца тонким слоем (1мм) наливался агар с буферным раствором минеральных солей, также заселенный микроорганизмами.

Другие пять опытных образцов от каждого исследуемого материала раздельно помещались поверхностью покрытия вверх в стерильные чашечки Петри, вокруг

опытного образца вровень с поверхностью покрытия заливается расплавленный (45°C) агар с буферным раствором минеральных солей (2.2.5-8), не заселенный микроорганизмами. После отвердевания агара поверхность покрытия и поверхность агара дезинфицировались однопроцентным раствором *o*-фенилфенола (рН 3,5). Затем на поверхность покрытия каждого опытного образца тонким слоем (толщиной 1мм) наливается также расплавленный незаселенный микроорганизмами агар с буферным раствором минеральных солей (2.2.5-8) (контрольная группа-1).

Опытные образцы выдерживались при температуре 30°C в условиях относительной влажности >95% в течение 4 недель; каждую неделю образцы проходили визуальное обследование на наличие разрастания бактерий.

3 Результаты и обсуждение

Для исследуемых материалов BioGuard Plain (код Armstrong: B1; код TNO: M3119/01/0844) и BioGuard Perforated (код Armstrong: B2; код TNO: M3119/01/0845) была проведена визуальная оценка воздействия микроорганизмов на защитное покрытие по методу ISO 846:1997.

Для материала BioGuard Plain B1 результаты приводятся в таблице 1, для материала BioGuard Perforated B2 – в таблице 2.

1. Определение роста грибов

Исследуемые материалы подвергались воздействию суспензии смешанных грибковых спор в присутствии неполной питательной среды, т.е. без источника углерода.

В обоих случаях, как для исследуемого материала BioGuard Plain B1, так и для BioGuard Perforated B2, за 4 недели эксперимента плесневые грибки не развили видимого мицелия на защитном покрытии. Защитное покрытие обоих опытных материалов продемонстрировало наличие собственной сопротивляемости воздействию грибов в отсутствие иного органического вещества.

2. Определение фунгистатических эффектов

Исследуемые материалы подвергались воздействию суспензии смешанных грибковых спор в присутствии полной питательной среды, т.е. при наличии источника углерода.

Защитное покрытие обоих исследуемых материалов, BioGuard Plain B1 и BioGuard Perforated B2, продемонстрировало очевидную фунгистатическую активность. На защитном покрытии, а также в среде роста вокруг опытных образцов наблюдалось замедление развития грибов. Начиная с первого обследования по истечении первой недели инкубационного периода наличествовали чистые зоны замедления.

3. Определение сопротивляемости бактериям

Воздействие бактерий на опытные материалы оценивалось для *Pseudomonas aeruginosa* при использовании неполной питательной среды.

В обоих случаях, как для исследуемого материала BioGuard Plain B1, так и для BioGuard Perforated B2, за первые три недели инкубационного периода рост *Pseudomonas aeruginosa* в агаре вокруг опытных образцов не наблюдался. По истечении четвертой недели для обоих исследуемых материалов наблюдалось развитие *Ps. aeruginosa* у края защитного покрытия (BioGuard Plain B1: на 4 опытных образцах из 5; BioGuard Perforated B2: на 3 опытных образцах из 5). Помимо этого после четвертой недели для обоих исследуемых материалов наблюдалось развитие бактерий, имеющих розовую окраску, которые покрывали до 25% поверхности защитного покрытия (BioGuard Plain B1: на 3 опытных образцах из 5; BioGuard Perforated B2: на всех пяти опытных образцах). В дальнейшем эти бактерии не были определены. Питательные компоненты для развития бактерий могли быть получены, скорее, из материала плиты-носителя, нежели из защитного покрытия. Таким же образом контаминант розовых бактерий мог происходить из материала плиты-носителя.

4 Выводы

Полученные результаты показывают, что защитное покрытие, нанесенное на исследуемые потолочные панели BioGuard Plain (код Armstrong: B1; код TNO: M3119/01/0844) и BioGuard Perforated (код Armstrong: B2; код TNO: M3119/01/0845), обладает явной сопротивляемостью грибкам. ✓

Полученные результаты показывают, что защитное покрытие, нанесенное на исследуемые потолочные панели BioGuard Plain и BioGuard Perforated, обладает средней сопротивляемостью бактериям.

5 Подпись

Институт пищевых и продовольственных исследований TNO

Идентификация:

Мы, нижеподписавшиеся, настоящим заявляем, что данный отчет содержит точное и полное представление полученных результатов.

Р.Р.А. Ван Дер Меер,
Глава Департамента
управления риском и микробиологии

Б.Дж. Хартог
Мерджер проекта, микробиология

Число: 9-4-2002

9-4-2002

Таблица 1 Потолочные панели BioGuard:
оценка воздействия микроорганизмов по методу ISO 846:1997
Armstrong Building Products, Мюнстер (Германия)
Номер проекта 010.52021/01.06.01

Тип организмов, использовавшихся в ходе испытаний*		Инкуба- ционный период (недель)	Интенсивность роста**				
			Исследуемый материал: BioGuard Plain код Armstrong: B1 код TNO M3119/01/0844				
			Номер теста				
			1	2	3	4	5
Сопротив- ляемость грибкам	Рост грибков	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
	Фунгистатический эффект	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
Сопротивляемость бактериям		1	0	0	0	0	
		2	0	0	0	0	
		3	0	0	0	0	
		4	2*** (Ps)	2***	2*** (Ps)	0 (Ps)	0 (Ps)

* – грибы: *Aspergillus niger* ATCC 6275; *Penicillium pinophilum* ATCC 36839;
Paecilomyces variotii ATCC 18502; *Gliocladium virens* ATCC 9645
Chaetomium globosum ATCC 6205
– бактерии: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388

** Оценка роста микроорганизмов:

Интенсивность роста	Оценка
0	Рост не наблюдается
1	Рост виден в стереоскопический микроскоп
2	Рост виден невооруженным глазом; покрытие до 25% поверхности опытного образца
3	Рост виден невооруженным глазом; покрытие до 50% поверхности опытного образца
4	Значительный рост; покрытие более 50% поверхности опытного образца
5	Обильное разрастание: поверхность опытного образца покрыта полностью

*** Рост бактерий, имеющих розовую окраску, возможно, не принадлежащих к штамму *Ps. Aeruginosa*, который был использован в ходе испытаний.
(Ps) = рост *Ps. Aeruginosa*, наблюдавшийся у края защитного покрытия опытного образца.

Таблица 2 Потолочные панели BioGuard:
оценка воздействия микроорганизмов по методу ISO 846:1997
Armstrong Building Products, Мюнстер (Германия)
Номер проекта 010.52021/01.06.01

Тип организмов, использовавшихся в ходе испытаний*		Инкуба- ционный период (недель)	Интенсивность роста**				
			Исследуемый материал: BioGuard Perforated код Armstrong: B2 код TNO M3119/01/0845				
			Номер теста				
			1	2	3	4	5
Сопро- тив- ляемость грибкам	Рост грибков	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
	Фунгистатический эффект	1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	0	0	0	0	0
Сопротивляемость бактериям		1	0	0	0	0	0
		2	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0
		4	2***	2*** (Ps)	2*** (Ps)	2***	2*** (Ps)

* – грибки: *Aspergillus niger* ATCC 6275; *Penicillium pinophilum* ATCC 36839;
Paecilomyces variotii ATCC 18502; *Gliocladium virens* ATCC 9645
Chaetomium globosum ATCC 6205
– бактерии: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388

** Оценка роста микроорганизмов:

Интенсивность роста	Оценка
0	Рост не наблюдается
1	Рост виден в стереоскопический микроскоп
2	Рост виден невооруженным глазом; покрытие до 25% поверхности опытного образца
3	Рост виден невооруженным глазом; покрытие до 50% поверхности опытного образца
4	Значительный рост; покрытие более 50% поверхности опытного образца
5	Обильное разрастание; поверхность опытного образца покрыта полностью

*** Рост бактерий, окрашенных в розовый цвет, возможно, не принадлежащих к штамму *Ps. Aeruginosa*, который был использован в ходе испытаний.

(Ps) = рост *Ps. Aeruginosa*, наблюдавшийся у края защитного покрытия опытного образца.