

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Urška TOMC

**IZOLACIJA MIKROORGANIZMOV IZ OBRATA PROIZVODNJE
VODNIH BARV IN ANALIZA UČINKOVITOSTI BIOCIDOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM WATER-BASED PAINT
MANUFACTURING PLANT AND ANALYSIS OF EFFICIENCY OF
BIOCIDES**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju živilske mikrobiologije na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete v Ljubljani.

Po sklepu Komisije za dodiplomski študij mikrobiologije ter na osnovi Pravilnika o diplomskem delu je bil za mentorja diplomskega dela imenovan prof. dr. Peter Raspor, za somentorico doc. dr. Barbara Jeršek in za recenzenta prof. dr. David Stopar.

Mentor: prof. dr. Peter Raspor

Somentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzent: prof. dr. David Stopar

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Romana Marinšek Logar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter Raspor

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Barbara Jeršek

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: prof. dr. David Stopar

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Urška Tomec

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Dn
DK UDK 579.66 : 579.24 : 667.613.5 (043) = 163.6
KG industrijska mikrobiologija/industrija barvil/vodne barve/izolacija mikroorganizmov/aerobne mezofilne bakterije/plesni/biocidi/minimalna inhibitorna koncentracija/kinetika rasti
AV TOMC, Urška
SA RASPOR, Peter (mentor)/JERŠEK, Barbara (somentorica)/STOPAR, David (recenzent)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
LI 2011
IN IZOLACIJA MIKROORGANIZMOV IZ OBRATA PROIZVODNJE VODNIH BARV IN ANALIZA UČINKOVITOSTI BIOCIDOV
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XII, 76 str., 12 pregl., 10 sl., 10 pril., 77 vir.
IJ SI
JI sl/en
AI Namen diplomskega dela je bil določiti mikrobiološko stanje v industrijskem obratu za izdelavo vodnih barv, najbolj zastopane mikroorganizme pa testirati na delovanje biocidov, ki jih uporabljajo v proizvodnji. Opravili smo izolacijo in opis mikroorganizmov iz različnih vzorcev, vzetih v različnih fazah proizvodnega procesa disperzijske vodne barve za notranje površine. Izbrali smo 4 tekoče (tehnološka voda, raztopina karboksimetilceluloze, polizdelek in končni izdelek), 1 praškasti (suha karboksimetilceluloza) in dva vzorca površin (zalogovnik in izdelovalna posoda). Iz vzorcev smo izolirali 34 izolatov aerobnih mezofilnih bakterij in 15 izolatov plesni. Določili smo njihovo koncentracijo v vzorcih in makro- ter mikromorfološke lastnosti. Tri bakterijske izolate (št. 9, 15 in 22) in tri izolate plesni (E, O in S) smo testirali proti delovanju izbranih biocidov in jim določili minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Uporabili smo metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici in rezultate preverili z rastnimi krivuljami. Vrednosti MIC biocida 1 (raztopina cinkovega piritiona, 2-oktilizotiazolona, 3-jodo-2-propinilbutilkarbamata in cinkovega oksida) so bile za bakterijske izolate v območju 33,0–264 µg/ml, za glivne izolate pa 0,516–1,03 µg/ml. Vrednosti MIC biocida 2 (raztopina 1,2-benzizotiazolona in metilizotiazolinona) so bile za bakterijske izolate v območju 6,21–199 µg/ml, za glivne izolate v območju 33,1–66,2 µg/ml. Vrednosti MIC biocida 3 (raztopina 5-kloro-2-metilizotiazolona in 2-metilizotiazolona) so bile za bakterijske izolate v območju 1,78–14,2 µg/ml, za glivne izolate pa ≤ 0,889 µg/ml. S kinetiko rasti smo potrdili, da so koncentracije biocidov, določene kot vrednosti MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB, zavirale rast bakterijskih izolatov. Vrednosti MIC biocidov na testirano koncentracijo spor plesni (za 1 sev) niso imele učinka.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579.66 : 579.24 : 667.613.5 (043) = 163.6
CX industrial microbiology/paint industry/water-based paints/isolation of microorganisms/aerobic mesophilic bacteria/molds/biocides/minimal inhibitory concentration/time-kill curves
AU TOMC, Urška
AA RASPOR, Peter (supervisor)/JERŠEK, Barbara (co-advisor)/STOPAR, David (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
PY 2011
TI ISOLATION OF MICROORGANISMS FROM WATER-BASED PAINT MANUFACTURING PLANT AND ANALYSIS OF EFFICIENCY OF BIOCIDES
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XII, 76 p., 12 tab., 10 fig., 10 ann., 77 ref.
LA SI
AL sl/en
AB The purpose of this study was to determine the microbiological status of an industrial plant for production of water-based paints, and to test the most often present microorganisms for the working of biocides used in the production. We performed an isolation and description of microorganisms from different samples, taken at different stages of the production process of water-based paint. Four samples were liquid (water, 2 % carboxymethylcellulose (CMC) prepared in laboratory, semi-product 2.4 % CMC, and end-product water-based paint), one sample was powder (dry CMC) and two were areas of process and storage tanks. From the samples, 34 aerobic mesophilic bacterial and 15 fungal isolates were isolated. We determined their sample concentration and described macromorphologic and micromorphologic characteristics. Three bacterial (numbered 9, 15 and 22) and three fungal isolates (E, O in S) were tested against biocides used in manufacturing process and minimal inhibitory concentrations (MIC) were determined. To determine MICs the method for broth dilution in microtiter plates was used. Biocide 1 (zinc pyrithione, 2-octylisothiazolone, 3-iodine-2-propynilbutylcarbamate and zinc oxide) had antibacterial effect in concentration 33.0–264 µg/ml, and antifungal effect in concentration 0.516–1.03 µg/ml. Biocide 2 (1,2-benzisothiazolone and methylisothiazolone) had antibacterial effect in concentration 6.21–199 µg/ml and antifungal effect in concentration 33.1–66.2 µg/ml. Biocide 3 (5-chloro-2-methylisothiazolone and 2-methylisothiazolone) had antibacterial effect in concentration 1.78–14.2 µg/ml and antifungal effect in concentration ≤ 0.889 µg/ml. By determining time-kill curves we verified that the MICs obtained by broth dilution method did in fact inhibit growth of bacterial isolates but MICs had no significant fungicidal activity (one strain tested).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG.....	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
SLOVARČEK	XII
1 UVOD.....	1
1.1 NAMEN	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPLOŠNA SESTAVA BARV	3
2.2 MIKROORGANIZMI V BARVAH	5
2.3 OBSTOJNOST BARV	7
2.4 BIOCIDI V BARVAH	9
2.5 ODPORNOST MIKROORGANIZMOV PROTI BIOCIDOM	13
2.5.1 Podatki o vrednostih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) za določene biocide in njihovem delovanju	14
3 MATERIAL IN METODE.....	17
3.1 MATERIAL	17
3.1.1 Vzorci	17
3.1.2 Biocidi	18
3.1.3 Mikrobiološka gojišča	19
3.1.4 Drugi reagenti	20
3.1.5 Laboratorijska oprema	21
3.2 METODE	23
3.2.1 Potek eksperimentalnega dela	23
3.2.2 Vzorčenje	24
3.2.3 Kvantitativna mikrobiološka preiskava vzorcev	26

3.2.4	Določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti izbranih sevov	27
3.2.4.1	Barvanje po Gramu	28
3.2.5	Testiranje protibakterijske aktivnosti biocidov	28
3.2.5.1	Izbor bakterijskih izolatov	28
3.2.5.2	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici	29
3.2.5.3	Rastne krivulje	32
3.2.6	Testiranje protiglivne aktivnosti biocidov	33
3.2.6.1	Izbor izolatov plesni	33
3.2.6.2	Metoda razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici	33
3.2.6.3	Rastne krivulje za izolate plesni	35
3.2.7	Shranjevanje izolatov	36
3.2.7.1	Shranjevanje bakterijskih kultur	36
3.2.7.2	Shranjevanje glivnih kultur	36
4	REZULTATI	37
4.1	KVANTITATIVNA PREISKAVA VZORCEV	37
4.2	MAKRO- IN MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI IZOLATOV	39
4.2.1	Bakterijski izolati	39
4.2.2	Izolati plesni	42
4.3	DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI BIOCIDOV	43
4.3.1	Določitev minimalnih inhibitornih koncentracij biocidov 1, 2 in 3 za izbrane bakterijske izolate	44
4.3.2	Rast bakterij v tekočem gojišču MHB z dodano minimalno inhibitorno koncentracijo posameznih biocidov	45
4.4	DOLOČANJE PROTIGLIVNE AKTIVNOSTI BIOCIDOV	49
4.4.1	Določitev minimalnih inhibitornih koncentracij biocidov 1, 2 in 3 za izbrane izolate plesni	49
4.4.2	Rast plesni v tekočem gojišču RPMI-1640 z dodano minimalno inhibitorno koncentracijo posameznih biocidov	50
5	RAZPRAVA IN SKLEPI	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.1.1	Kvantitativna preiskava vzorcev	52
5.1.2	Določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti	55
5.1.3	Testiranje biocidne aktivnosti	57

5.2	SKLEPI	64
6	POVZETEK.....	65
7	VIRI.....	67
ZAHVALA		
PRILOGE		

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Učinki mikrobne razgradnje na sestavine barv (Dey in sod., 2004: 456).	5
Preglednica 2: Vrednost parametrov kakovosti v svežih in 10 mesecev starih vzorcih barve (Obidi in sod., 2010).	8
Preglednica 3: Skupna koncentracija aktivnih učinkovin (mg/ml) v pripravljenih biocidnih raztopinah za posamezne biocide.	30
Preglednica 4: Postavitev koncentracij skupnih aktivnih učinkovin biocidov 1, 2 in 3 ($\mu\text{g/ml}$) za preizkus na mikrotitrski ploščici za bakterijske izolate in položaj kontrol.	31
Preglednica 5: Postavitev koncentracij skupnih aktivnih učinkovin biocidov 1, 2 in 3 ($\mu\text{g/ml}$) za preizkus na mikrotitrski ploščici za izolate plesni in položaj kontrol.	34
Preglednica 6: Koncentracije različnih skupin mikroorganizmov v vzorcih V1-V8.	37
Preglednica 7: Makromorfološke lastnosti bakterijskih izolatov po 5 dneh inkubacije na gojišču NA pri 23–25 °C.	39
Preglednica 8: Mikromorfološke lastnosti bakterijskih izolatov (24-urne kulture).	41
Preglednica 9: Makro in mikromorfološke lastnosti izolatov plesni na gojišču MEA.	42
Preglednica 10: Ocena koncentracije izbranih bakterijskih izolatov v vzorcih V1–V8.	44
Preglednica 11: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biocidov 1, 2 in 3 za izbrane bakterijske izolate.	44
Preglednica 12: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biocidov 1, 2 in 3 za izbrane izolate plesni.	49

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram izdelave barve (Winkowski, 2002).	1
Slika 2: Načini delovanja biocidov (Chapman, 2003a: str. 134).	1
Slika 3: Kemijske strukture značilnih izotiazolinonskih biocidov (Rafoth in sod., 2007: 75). 12	
Slika 4: Kemijska struktura cinkovega piritiona (Yebra in sod., 2004: 94).	15
Slika 5: Hodogram eksperimentalnega dela.	23
Slika 6: Hodogram vzorčenja.	25
Slika 7: Rast bakterijskega izolata št. 9 v gojišču MHB z dodanim biocidom	46
Slika 8: Rast bakterijskega izolata št. 15 v gojišču MHB z dodanim biocidom	47
Slika 9: Rast bakterijskega izolata št. 22 v gojišču MHB z dodanim biocidom	48
Slika 10: Rast izolata plesni O v gojišču RPMI-1640 z dodanim biocidom.	51

KAZALO PRILOG

Priloga A: Koncentracije mikroorganizmov v vzorcih V1–V8.

Priloga A1: Grafična primerjava koncentracij aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih V1–V8 na logaritemski skali z odstopanji (standardni odklon).

Priloga A2: Grafična primerjava koncentracij aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na CMC kot edinem viru ogljika, v vzorcih V1–V8 na logaritemski skali z odstopanji (standardni odklon).

Priloga A3: Grafična primerjava koncentracij plesni v vzorcih V1–V8 na logaritemski skali z odstopanji (standardni odklon).

Priloga A4: Grafična primerjava koncentracij skupin mikroorganizmov v vzorcih V1–V8.

Priloga B: Fotografije barvnih in nativnih preparatov bakterij in plesni, ki smo jih testirali na delovanje biocidov 1, 2 in 3.

Priloga B1: Bakterijski izolat št. 9, barvan po Gramu (1000-kratna povečava).

Priloga B2: Bakterijski izolat št. 15, barvan po Gramu (1000-kratna povečava).

Priloga B3: Bakterijski izolat št. 22, barvan po Gramu (1000-kratna povečava).

Priloga B4: Izolat plesni E, nativni preparat v laktofenolu (400-kratna povečava).

Priloga B5: Izolat plesni O, nativni preparat v laktofenolu (400-kratna povečava).

Priloga B6: Izolat plesni S, nativni preparat v laktofenolu (400-kratna povečava).

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BIT	1,2-benzizotiazolin-3-on
CFU	kolonijska enota, angl. colony forming unit
CIT	5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-on
CMC	karboksimetilceluloza
EU	Evropska unija
H ₂ S	vodikov sulfid
INT	2-p-jodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil tetrazolijev klorid
IBPK	3-jodo-2-propinilbutilkarbamat
MEA	sladni agar, angl. malt extract agar
MHA	trdno gojišče Mueller – Hinton
MHB	tekoče gojišče Mueller – Hinton
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
min	minuta
MIT	2-metil-4-izotiazolin-3-on
NA	hranilni agar, angl. nutrient agar
OGYE	angl. oxytetracycline glucose yeast extract agar
OIT	2-oktil-2H-izotiazol-3-on
PDA	krompirjev dekstrozni agar (angl. potato-dextrose agar)
RPMI-1640	gojišče, poimenovano po inštitutu Roswell Park Memorial Institute
RR	razredčevalna raztopina
SD	standardni odklon
št.	številka
TSB	tekoče gojišče triptični soja bujon (angl. Tryptone soya broth)
ZDA	Združene države Amerike
ZnO	cinkov oksid

SLOVARČEK

Biocid: snov, ki ubija žive organizme. V našem primeru je biocid sinonim za mikrobicid.

Podpomenke, ki opišejo, na kateri organizem deluje, so baktericid, fungicid, algicid (King, 1995).

Mikrobiostatični agens: snov, ki preprečuje rast mikroorganizmov in njihovih spor, vendar jih ne nujno uniči (King, 1995).

Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC): najnižja koncentracija protimikrobne snovi, ki povzroči določeno zmanjšanje vidne rasti mikroorganizmov pri testiranju protimikrobne aktivnosti (Rex in sod., 2008).

Spekter delovanja: opisuje učinkovitost mikrobicida; širok spekter pomeni učinkovitost proti več skupinam mikroorganizmov (King, 1995).

1 UVOD

V industriji se pogosto dogaja, da kljub standardnemu postopku in doslednemu delu končni izdelki ne ustrezajo določenim standardom za kakovost. Za to obstaja več razlogov. Eden od njih je lahko kontaminacija znotraj procesa z različnimi mikroorganizmi. Zidne barve niso izjema in so prav tako lahko podvržene mikrobnemu delovanju. Samo v Evropi so skupni stroški mikrobnega kvara barv ocenjeni na 20–25 milijard evrov letno (Edge in sod., 2001). V slovenskem prostoru je bilo na tem področju do zdaj narejenih dokaj malo raziskav, zato smo se s slovenskim proizvajalcem zidnih barv odločili napraviti raziskavo, ki bo lahko služila kot osnova za nadaljnje raziskave.

Opravili smo izolacijo in opis mikroorganizmov iz različnih vzorcev, vzetih v različnih fazah proizvodnega procesa disperzijske vodne barve za notranje površine. Izbrali smo 4 tekoče (tehnološka voda, raztopina karboksimetilceluloze, polizdelek in končni izdelek), 1 praškasti (suha karboksimetilceluloza) in dva vzorca površin (zalogovnik in izdelovalna posoda). Iz vzorcev smo izolirali aerobne mezofilne bakterije in plesni ter določili njihovo koncentracijo v vzorcih. Tri bakterijske izolate in tri izolate plesni smo testirali proti delovanju biocidov, ki jih uporabljajo v proizvodnji.

1.1 NAMEN

Namen diplomskega dela je:

- preveriti higiensko stanje v industrijskem obratu,
- določiti skupno število aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih,
- določiti število aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika in ki so s tem tudi potencialni povzročitelji biorazgradnje barve,
- določiti število plesni v vzorcih,
- najbolj zastopane mikroorganizme testirati na delovanje biocidov, ki jih uporabljajo v praksi, in določiti minimalne inhibitorne koncentracije.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Pričakovali smo, da bo v tekočih vzorcih prisotnih več bakterij, v brisih in prašku pa več plesni. Najvišje skupno število aerobnih mikroorganizmov (bakterij in plesni) smo pričakovali v vzorcih brisov. Najnižje skupno število mikroorganizmov smo pričakovali v vzorcih vode in suhe karboksimetilceluloze.

Predpostavili smo naslednje hipoteze:

- Najvišja koncentracija vseh skupin mikroorganizmov (aerobnih mezofilnih bakterij, aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na karboksimetilcelulozi, in plesni) bo na notranji površini posod. Pri tem bo imela notranja površina zalogovnika končnega izdelka višjo koncentracijo mikroorganizmov kot notranja površina izdelovalne posode.
- Najnižja koncentracija vseh tipov mikroorganizmov bo v vzorcu vode in vzorcu suhe karboksimetilceluloze.
- V tekočih vzorcih bo koncentracija bakterij višja od koncentracije plesni.
- V vzorcih notranjih površin posod in vzorcu suhe karboksimetilceluloze bo višja koncentracija plesni kot bakterij.
- Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za posamezne izolate bodo primerljive s koncentracijami biocidov, ki so navedene v literaturi.
- MIC bodo nižje za bakterije kot za plesni.
- Najnižje MIC za bakterije bo imel biocid 3, najvišje pa biocid 1.
- Najnižje MIC za plesni bo imel biocid 1, najvišje pa biocid 2.

2 PREGLED OBJAV

Barve imajo poleg zaščitne tudi dekorativno vlogo, delovanje mikroorganizmov pa lahko občutno zmanjša njihovo funkcionalnost (Winkowski, 2004). V nadaljevanju sledi pregled obstoječih objav o vodnih barvah, mikroorganizmih, ki so lahko prisotni v ali na njih, in biocidih, ki jih uporabljajo v barvah. V poglavju 2.5.1 so podani podatki iz literature o minimalnih inhibitornih koncentracijah aktivnih učinkovin biocidov, ki jih smo testirali v diplomskem delu.

2.1 SPLOŠNA SESTAVA BARV

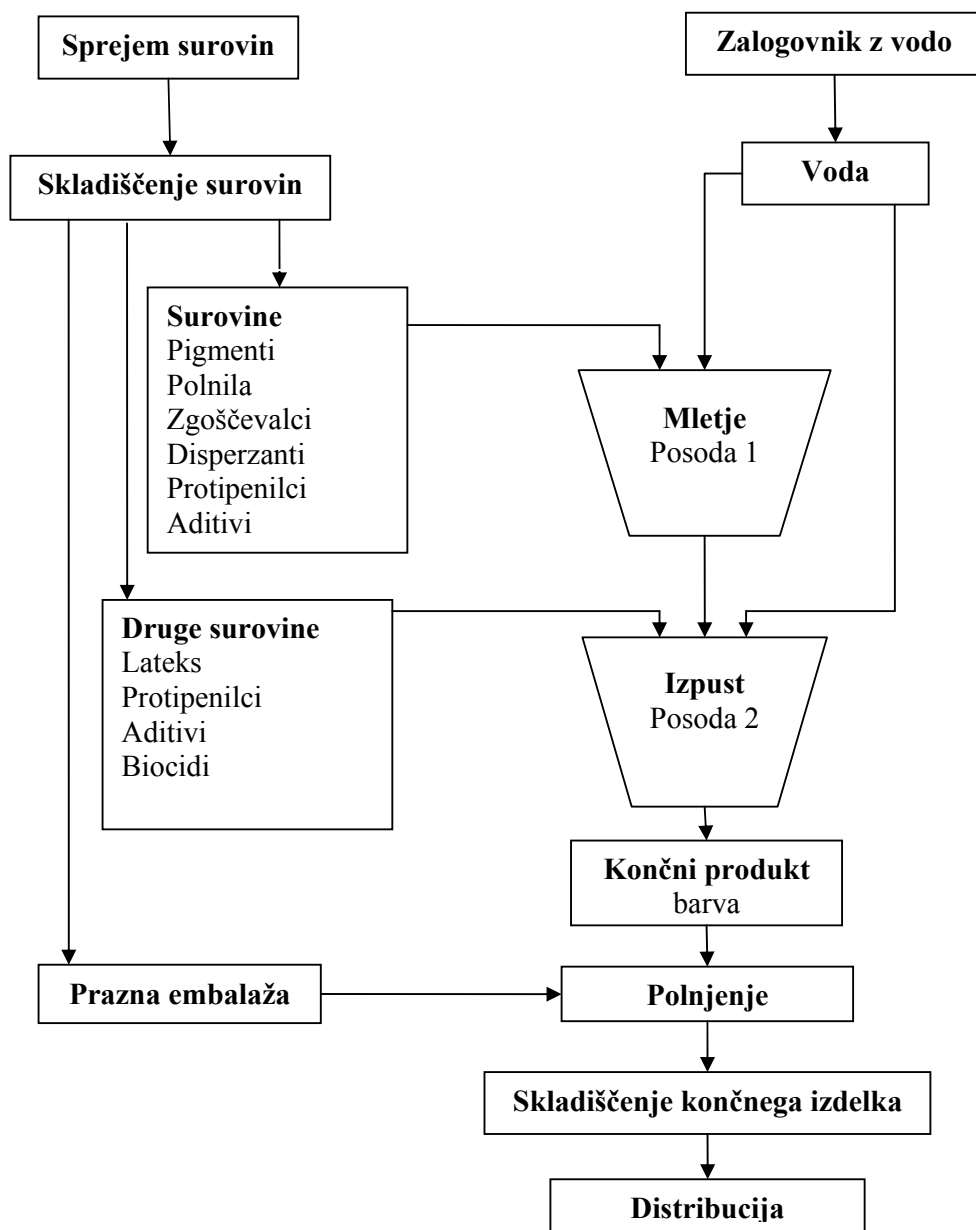
Lastnosti barv so pogojene z njihovo sestavo. V splošnem barvo sestavljajo štiri osnovne komponente:

- topilo (voda ali organsko topilo), v katerem se topijo pigmenti in vezivo,
- polnilo (npr. kalcit oz. kalcijev karbonat),
- barvila (razni pigmenti, ki dajo barvi določen barvni odtenek) in
- vezivo (npr. acetatne, akrilatne emulzije za vodne barve ali naravne in umetne smole za barve na osnovi organskih topil), ki povzroči vezavo barve s površino in omogoča tvorbo barvnega sloja na površini.

Zraven so potrebni še številni dodatki, ki imajo različne funkcije: uravnavajo reološke lastnosti oz. delujejo kot zgoščevalec (celulozni derivati npr. karboksimetilceluloza), sredstva proti penjenju, biocidna zaščita ali stabilizatorji (Gillatt, 2002; Ploštajner, 2004; Talbert, 2008; Rosen in Quinn Gothard, 2010).

Večina notranjih zidnih barv je narejena na osnovi disperznih veziv. To so polimerne snovi, dispergirane v vodi. Kemijsko gledano gre za vinil-acetatne, stiren-akrilatne in akrilatne kopolimere. Vrsta in količina veziva vpliva na lastnosti filma, kot so trdota, svetlobna stabilnost, paroprepustnost, navzemanje umazanije, elastičnost itd. Proizvajalec izbere vezivo glede na zahteve, ki naj bi jih izpolnjevala barva (Ploštajner, 2004).

Običajno se postopek izdelave barve na vodni osnovi prične z dodajanjem polnila vodi, tako da se ga v mlinu zdrobi v najmanjše delce in hkrati zmeša z vodo. Nato sledi dodajanje raznih dodatkov (vodotopnih surovin), med katere spada tudi biocidna zaščita. Temu sledi dodajanje polnil in pigmentov (prašnate surovine), na koncu se doda še vezivo v obliki emulzije. Postopek je odvisen od recepture proizvajalca (Talbert, 2008), primer letga pa lahko vidimo na Sliki 1.



Slika 1: Hodogram izdelave barve (Winkowski, 2002).

2.2 MIKROORGANIZMI V BARVAH

Večina vodnih barv, zaradi svoje sestave oz. surovin, načina izdelave in kasneje uporabe, ustvarja primerne razmere za rast mikroorganizmov. Navadno vsebujejo veliko virov ogljika in mikroelementov, pH je med 8 in 10, kisik pa je raztopljen v vodi, na kateri bazirajo. Večina barv doseže med izdelavo ali hrambo ustrezne temperature za rast mikroorganizmov. Posledično lahko nizka stopnja mikrobne kontaminacije preko noči doseže problematične koncentracije (Gillatt, 2002). Učinke biorazgradnje barve lahko hitro opazimo (Preglednica 1), za kontaminacijo so bolj dovzetne barve na vodni kot na oljni osnovi (Dey in sod., 2004).

Preglednica 1: Učinki mikrobne razgradnje na sestavine barv (Dey in sod., 2004: 456).

Komponenta	Posledice mikrobne delovanja
Celulozni zgoščevalci	Izguba viskoznosti, nastajanje plina in sprememba pH
Disperzanti	Sprememba barve, precipitacija pigmentov, nastanek gela, slabša prekrivnost
Snovi proti sprijemanju polnil, glikoli	Zmanjšanje sijaja, slaba stabilnost zmrznjene oz. taljene barve, poroznost nanešenega sloja, slaba adhezija, sprijemanje
Protipenilci	Penjenje, poroznost nanešenega sloja
Dispergirani pigmenti	Spremenjen barvni odtenek, neenakomerna obarvanost, aglomeracija barvila

Do kontaminacije z mikrobi lahko pride preko vodnega vira, surovin in procesne opreme. Med kritične točke za mikrobno kontaminacijo spadajo rezervoarji, cevi in pipe, posode in nekatere surovine, kot so protipenilci, zgoščevalci, disperzanti in emulzije, ter voda in barve iz kontaminiranih šarž (La Rosa in sod., 2008). Vir kontaminacije je lahko tudi embalaža, če do polnjenja ni primerno shranjena (Gillatt, 2002).

Veliko surovin, ki prihajajo v obliki prahu, npr. kitajska glina, smukec in kalcijev karbonat, izvira iz tal in so pogosto kontaminirane z mikroorganizmi (Gillatt, 2002). Nekateri mikroorganizmi tvorijo biofilme, ki so lahko pritrjeni na površine vodovodnih cevi, procesnih posod in zalogovnikov in drugih okolij v tovarni ter so v splošnem zelo odporni proti delovanju biocidov ali dezinficijensov (Winkowski, 2002).

V literaturi je objavljenih precej zapisov o biorazgradnji barv v embalaži in na barvanih površinah zaradi delovanja bakterij in gliv (Arquiaga in sod., 1995, Bjurman, 1999, Dornieden in sod., 2000). Mikroorganizmi barve uporabljajo kot vir hranil. Sestavine barv, predvsem organske komponente (pigmenti, aditivi, veziva itd.), stimulirajo mikrobno rast (Obidi in sod., 2010). Posledice mikrobne kontaminacije so običajno neprijeten vonj, sprememba oz. izguba viskoznosti, napihovanje embalaže (pločevink) zaradi nastajanja plina, sprememba pH, sprememba barve, vidna površinska rast in produkcija encimov (King, 1995; Gillatt, 2002; Winkowski, 2002). Pojavijo se lahko tudi druge spremembe, ki so posledica mikrobne razgradnje aditivov, npr. spremembe v adheziji (Winkowski, 2002).

Biorazgradnjo barve lahko razložimo z njeno ekologijo: določeni organizmi, npr. *Pseudomonas* sp., lahko razgrajujejo veliko različnih organskih snovi. Nekatere od teh snovi so lahko prisotne v barvi. *Pseudomonas* sp. ali drugi aerobni organizmi presnavljajo te snovi, stranski produkti pa so lahko vir hranil za druge prisotne organizme. Produkti mikrobne združbe naprej omogočajo rast anaerobnim organizmom, kot so sulfatni reducenti, ki so lahko prisotni, vendar se razrastejo šele, ko zmanjka kisika (Oppermann in Goll, 1984).

Oppermann in Goll (1984) sta iz kontaminiranih barv na vodni osnovi izolirala anaerobne bakterije. Po Gramu negativne anaerobne bakterije so bile vrst *Actinomyces israelii*, *Bifidobacterium adolescentis* in *Eubacterium aerofaciens*. Po Gramu pozitivne anaerobne bakterije so bile vrst *Bacteroides clostridiiformis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides hypermegas*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides* sp., *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium sphenoides*, *Clostridium subterminale*, *Clostridium* sp., *Lactobacillus fermentum*, *Peptococcus saccharolyticus* in *Streptococcus intermedius*. Poleg tega sta izolirala tudi fakultativno anaerobne bakterije vrst *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella* sp., *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia liquefaciens* in *Serratia marcescens*.

Seznam mikroorganizmov, izoliranih iz tekočih barv, poleg anaerobov in fakultativnih anaerobov, ki jih navajata Oppermann in Goll (1984), vsebuje aerobne po Gramu

negativne bakterije vrst *Achromobacter* sp., *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas maltophilia*, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri* in *Providencia alcalifaciens*, po Gramu pozitivne aerobne bakterije rodu *Bacillus*, kvasovke rodov *Candida*, *Rhodotorula* in *Saccharomyces* ter plesni rodov *Aspergillus*, *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Penicillium* in vrsto *Graphium putredinis* (Tothill in Seal, 1993). Plesni v sveži barvi rastejo na njeni površini. Navadno se to zgodi potem, ko je pH padel zaradi delovanja drugih mikroorganizmov (Gillatt, 2002).

Bakterije, ki so bile opisane kot kontaminanti iz vodnih virov in ki sodelujejo v biorazgradnji barv, so bile vrste rodov *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* in *Alcaligenes* (Arquiaga in sod., 1995). Raziskovalci so odkrili, da je v pokvarjenih barvah najpogostejše prisotna vrsta *Pseudomonas aeruginosa* in predstavlja 75 % vseh izolatov iz pokvarjenih barvnih emulzij (Dey in sod., 2004). La Rosa in sodelavci (2008) so iz akrilne barve izolirali bakterije vrste *Stenotrophomonas maltophilia* in tri neidentificirane vrste gliv. Obidi in sod. (2009a) so iz barv izolirali bakterije vrst *Bacillus polymyxa*, *Bacillus brevis*, *Bacillus laterosporus*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus brevis* in *Pseudomonas aeruginosa* ter plesni vrst *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* in *Penicillium citrinum*. V dobi 10 mesecev je mikrobna populacija narasla iz $1,0 \times 10^1$ na $4,7 \times 10^5$ CFU/ml.

2.3 OBSTOJNOST BARV

Obstojnost barv na vodni osnovi je odvisna od mnogih dejavnikov, kot so začetna mikrobiološka kakovost surovin in embalaže ter higienske razmere v samem izdelovalnem obratu (Gillatt, 2002; Obidi in sod., 2009b).

Barve lahko opišemo z nekaterimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi, ki sestavljajo model, s katerim lahko predvidimo obstojnost oz. rok trajanja barve. Te lastnosti so mikrobiološko stanje, specifična teža, optična gostota in transmitanca, pH ter viskoznost (Obidi in sod., 2010).

Obidi in sod. (2010) so pokazali, da se v primeru mikrobne razgradnje optična gostota zviša, ostali parametri padejo (v dobi 10 mesecev, kot je trajala študija), kar lahko vidimo v Preglednici 2. Poleg tega so barve postopno izgubljale originalni barvni odtenek, teksturo in viskoznost, torej se ti parametri odražajo v roku trajanja.

Preglednica 2: Vrednost parametrov kakovosti v svežih in 10 mesecev starih vzorcih barve (Obidi in sod., 2010).

Parameter	Srednja vrednost svežih vzorcev	Srednja vrednost po 10 mesecih
specifična teža	2,8658	1,0853
optična gostota	1,49	3,91
transmitanca	5,2	2,3
pH	8,4	5,6
viskoznost	$1,17 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$	$1,08 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$
skupno število mikroorganizmov	$1,0 \times 10^1 \text{ CFU/ml}$	$4,7 \times 10^5 \text{ CFU/ml}$

Kvaliteto barve najbolj prizadene izguba viskoznosti, ki je lahko posledica delovanja mikrobnega metabolizma ali pa je kemijske narave, kar je manj pogosto (Tothill in Seal, 1992). Bakterije in glive, ki spreminjajo viskoznost barv na vodni osnovi, imajo različne mehanizme delovanja.

Bakterije presnavljajo veliko različnih komponent v barvi in jih lahko najdemo kjerkoli v barvni emulziji (Tothill in Seal, 1993). Bakterije v barvah imajo relativno nizko celulolitično aktivnost. Bakterijske ekstracelularne celulaze povzročajo enakomeren padec viskoznosti. Bakterijska kontaminacija je manj nevarna kot glivna in se navadno zgodi ob visokem pH (Tothill in Seal, 1993). 38 % bakterijskih izolatov Oppermanna in Golla (1984) je razgrajevalo celulozni zgoščevalec, hidroksietilcelulozo. Večinoma je pri razgradnji celuloze nastajala kislina. 46 % izolatov je bilo sposobnih razgrajevati surfaktante, ki so po kemijski naravi soli polimernih karboksilnih kislin.

Glive raje rastejo na površini tekoče barve in na ostankih barve na procesni opremi (Gillatt, 2002). Do razgradnje barve pride zaradi celulolitičnih encimov, ki jih spuščajo v okolje, kjer razgrajujejo celulozne zgoščevalce. Glive imajo zelo aktiven celulazni kompleks, ki

ima sicer največjo aktivnost pri nizkem pH, vendar je stabilen tudi v alkalnem, tako da lahko resno vpliva na viskoznost barve (Tothill in sod., 1998).

Za podaljšanje obstojnosti so v preteklosti (od sredine dvajsetih let prejšnjega stoletja) barvam v velikem obsegu dodajali svinec (Rabin, 1989), vendar se je le-ta izkazal za visoko zdravstveno tveganje (Rabin, 1989; Mathee in sod., 2007). Z namenom vzdrževanja mikrobiološke kakovosti in preprečevanja kontaminacije z mikroorganizmi se danes v barve dodajajo različni biocidi (Winkowski, 2002).

2.4 BIOCIDI V BARVAH

Biocidi so anorganske ali sintetične organske molekule, ki se jih uporablja za dezinfekcijo, sanitacijo ali sterilizacijo objektov in površin ter za zaščito materialov pred procesi mikrobiološke razgradnje (Chapman, 2003a). Biocidni proizvodi so aktivne snovi in pripravki, ki vsebujejo eno ali več aktivnih snovi. Pripravljeni so v obliki, v kakršni se dobavljajo uporabniku, in so namenjeni temu, da se z njimi kemično ali biološko uničuje, odvrta, naredi neškodljivo ali kako drugače prepreči škodljivo delovanje organizma. Med biocidne proizvode uvrščamo dezinfekcijska sredstva, uporabna na različnih področjih, kemikalije, ki se uporabljajo kot konzervansi proizvodov in materialov, neketijske pesticide in antivegetacijska sredstva (Ministrstvo za zdravje, 2011a). Uporablja se širok spekter kemikalij, od bakra, kositra in arzenata do organskih heterocikličnih spojin, kot so hidantoini in izotiazoloni. V ZDA je EPA (United States Environmental Protection Agency) kot biocide registrirala več kot 400 različnih snovi, v Evropi pa je preko CEFIC (fr. Conseil Européen des Fédérations de l'Industrie Chimique, Svet evropske kemijske industrije) registriranih več tisoč tovrstnih spojin (Chapman, 2003a). V Sloveniji velja Register o biocidnih proizvodih (2008). V Registru biocidnih proizvodov z dne 31. 01. 2011 so 1403 biocidni proizvodi, v Registru biocidnih proizvodov z dne 30. 4. 2011 pa je 1468 proizvodov.

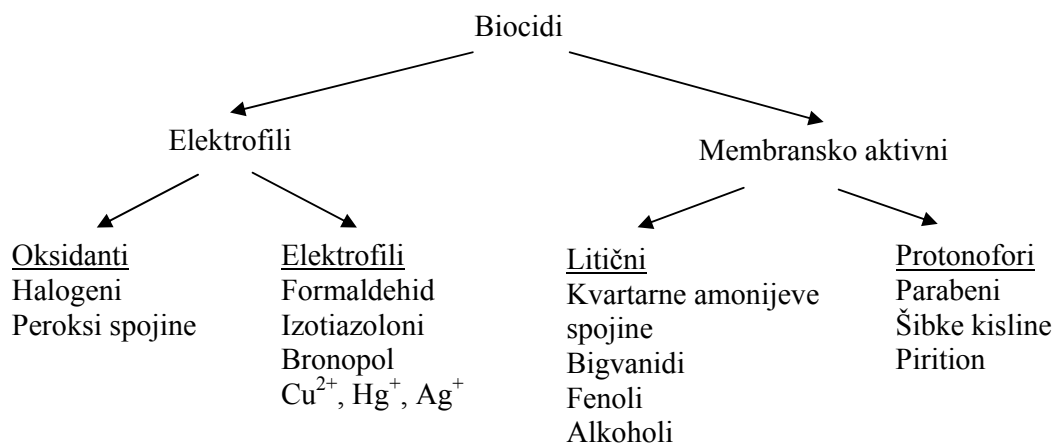
V Evropski skupnosti velja za ravnanje z biocidi Direktiva 98/8/ES Evropskega parlamenta in sveta o dajanju biocidnih pripravkov v promet (1998), v pripravi je nova direktiva. V

skladu z zakonodajo EU je predpise sprejemala in dopolnjevala tudi Republika Slovenija. Za zakonodajo o ravnanju z biocidi je pristojen Urad Republike Slovenije za kemikalije. Ravnanje z biocidi je določeno z Zakonom o biocidnih proizvodih (ZBioP) (2006). K ZBioP spadajo razni pravilniki, ki dodatno opredeljujejo zahteve pri ravnanju z biocidi, npr. Pravilnik o razvrščanju, pakiranju in označevanju biocidnih proizvodov ter o varnostnih listih za biocidne proizvode (2007), Pravilnik o pravilni uporabi biocidnih proizvodov za poklicne uporabnike (2007) itd.

Idealni biocid je učinkovit, ima širok spekter delovanja, je temperaturno stabilen, stabilen v širokem območju pH, topen v vodi (hkrati ne sme prehajati v organsko fazo emulzije), kompatibilen s širokim naborom tipov barv in surovin, ne vpliva na barvo in njene reološke lastnosti, je stroškovno učinkovit in stabilen v končnem produktu. Poleg tega je okolju prijazen, v okolju hitro razgradljiv in ima minimalno toksičnost za netarčne organizme (Gillatt, 2002; Chelossi in Faimali, 2006).

V splošnem lahko mehanizme delovanja biocidov razdelimo v štiri kategorije, prikazane na Sliki 2: oksidanti, elektrofilni agensi, kationsko membransko aktivni oziroma litični biocidi in protonofori (Chapman, 2003a).

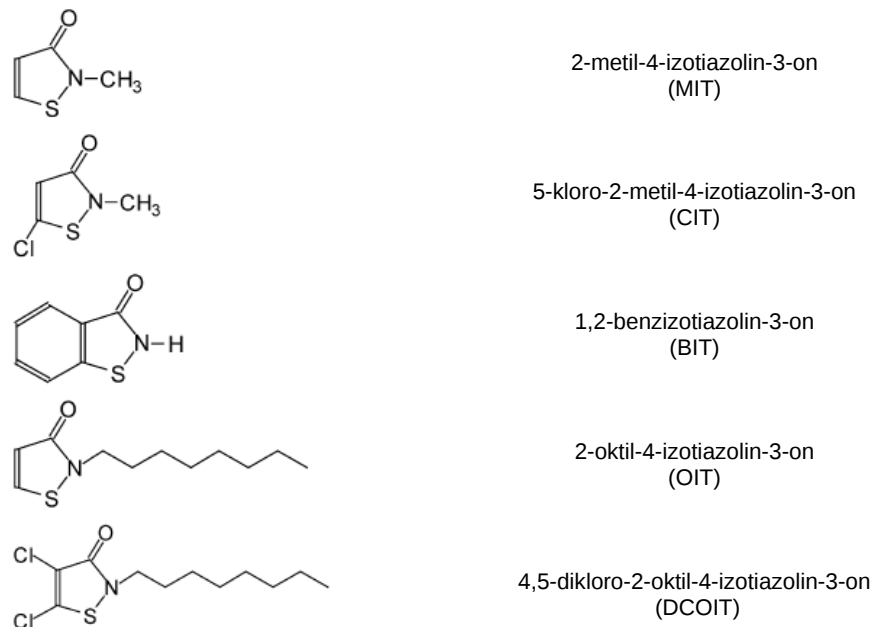
Oksidanti (halogenske in peroksi spojine: klor in klorove spojine, ozon, brom in bromove spojine, vodikov peroksid) preko radikalov oksidirajo organski material. Elektrofilni agensi vključujejo anorganske ione (srebrovi, bakrovi in živosrebrovi ioni) in organske biocide, kot so formaldehid in izotiazoloni. Tovrstni agensi kovalentno reagirajo s celičnimi nukleofili in na ta način inaktivirajo encime. Kationski membransko aktivni biocidi, kot so klorheksidin in amonijeve kvartarne spojine, in alkoholi (npr. fenoksietanol) destabilizirajo membrano in povzročijo hitro lizo celic. Protonofori (šibke kisline, npr. sorbična in benzojska kislina, pirition) motijo pH-ravnovesje, kar povzroči zakisanje znotraj celic in motnje v delovanju metabolizma (Videla, 2002; Chapman, 2003a).



Slika 2: Načini delovanja biocidov (Chapman, 2003a: 134).

Čeprav nobena spojina sama ne izpolnjuje vseh zahtev za idealni biocid, veljajo izotiazolinonove spojine kot najboljše na razpolago. Najpogostejša je uporaba kombinacije 5-kloro-2-metil-4-izotiazolin-3-ona (CIT), 2-metil-4-izotiazolin-3-ona (MIT) ali 1,2-benzizotiazolin-3-ona (BIT). CIT ima najboljšo biocidno učinkovitost, vendar nizko stabilnost. MIT ima šibko biocidno delovanje, vendar deluje sinergistično z BIT ali CIT in poveča njuno stabilnost. Zmes biocidov ima tudi širši spekter in večjo intrinzično aktivnost delovanja, pri tem ima največ prednosti zmes MIT/BIT (Gillatt, 2002), vendar ima le-ta omejeno protiglivo delovanje (Winkowski, 2004). Izotiazolinonove spojine se v celici vežejo na tiolne skupine in preprečijo delovanje encimov (Collier in sod., 1990).

CIT, BIT in MIT oz. njihove kombinacije se dodajajo za preprečevanje mikrobne razgradnje sveže barve. Biocidi, namenjeni zaščiti suhega barvnega sloja, se med seboj razlikujejo v topnosti v vodi. Dva bolj vodotopna sta 2-oktil-4-izotiazolin-3-on in 3-jodo-2-propinilbutil karbamat (Winkowski, 2004).



Slika 3: Kemijske strukture značilnih izotiazolinonskih biocidov (Rafoth in sod., 2007: 75).

Prisotnost nekaterih organskih ali anorganskih snovi, stopnja pH, temperatura pri dodajanju biocida in izpostavljenost UV svetlobi lahko deaktivirajo uporabljeni biocid (King, 1995). Sondossi in sod. (1999) so z metodo razredčevanja v tekočem gojišču TSB preizkušali komercialni biocid, ki je vseboval 10,87 % CIT in 3,36 % MIT. Za bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* so za volumen 2 ml TSB določili vrednost MIC 25 µl biocidne raztopine/ml. V večjem merilu (za volumen 100 ml) so Sondossi in sod. (1999) določili še višjo vrednost MIC za CIT/MIT, in sicer 5,5 mg/ml, kar pomeni, da večji volumen vpliva na biocidno aktivnost. McCoy in sod. (1986) so pokazali, da je učinkovitost CIT/MIT odvisna tudi od pH, saj so bile pri pH 8 za 99 % zmanjšanje števila bakterij vrste *Legionella pneumophila* pri 6 urah kontaktnega časa potrebne za polovico nižje, pri 3 urah kontaktnega časa pa za tretjino nižje koncentracije biocida kot pri pH 6,7. Torej je delovanje tovrstnih biocidov poleg pH odvisno tudi od kontaktnega časa. Pri učinkovitosti CIT/MIT je pomembna sestava medija, saj spojino stabilizirajo soli v spojini in je bolj stabilen v trdi vodi (King, 1995).

2.5 ODPORNOST MIKROORGANIZMOV PROTI BIOCIDOM

Biocidi navadno delujejo v vegetativni fazi rasti, medtem ko se odpornost proti biocidom razvije v času sporulacije mikrobne celice (Russel, 1995). Mikroorganizem označujemo kot odporen, če ima občutno zmanjšano dovzetnost za selektivni agens v primerjavi z občutljivimi sevi (Chapman, 1998). Odpornost se lahko razvije z mutacijo, pridobitvijo novega genetskega materiala s horizontalnim prenosom genov, izražanjem utišanih genov, rastjo v biofilmu in z drugimi, slabše definiranimi spremembami fenotipa (Chapman, 2003b). Bakterije za odpornost proti biocidom uporabljajo iste mehanizme kot pri odpornosti proti antibiotikom (Chapman, 2003a). Strategije, ki so na voljo posameznim celicam v populaciji, so sprememba tarče biocida, inaktivacija biocida in omejitev dostopa do tarče. Strategije celičnih populacij, najpogosteje v biofilmih, so omejevanje dostopa do tarče z manjšo difuzijo zaradi komponent biofilma ali visoke celične gostote in slabo definirane spremembe fenotipa (Chapman, 2003b).

Pri bakterijah se pojavlja navzkrižna odpornost (Chapman, 1998); nekateri izolati, ki so odporni proti izotiazolonom ali formaldehidu, so navzkrižno odporni tudi proti kvartarnim amonijevim spojinam in/ali peroksidom (Chapman, 2003b).

Pri določanju vrednosti MIC za mikroorganizme moramo najprej ugotoviti stabilnost biocidov v določenem matriksu. Nato izoliramo mikroorganizme na trdno gojišče. Vanj ne dodamo selektivnega agensa (biocida), saj ta predvideva določeno stopnjo odpornosti. Pomembno je, da MIC določimo s čim manj prenosi, saj so nekateri odporni fenotipi nestabilni in se lahko izgubijo v odsotnosti selektivnega pritiska (Chapman, 1998).

Oppermann in Goll (1984) poročata, da je za doseganje baktericidnega učinka pri anaerobnih bakterijah potrebno dodati več biocida kot pri aerobnih. Obstajajo tudi razlike v biocidnem delovanju med aerobno in anaerobno kultivacijo fakultativno anaerobnih mikroorganizmov, kar bi lahko pripisali spremembi metabolizma pri prehodu iz aerobnega v anaerobno stanje. Vsak biocid namreč deluje na določene točke v metabolizmu. Če se

metabolizem spremeni, je lahko biocid manj učinkovit, razen če deluje na kritično točko v vseh biokemijskih poteh.

Chapman (1998) v svoji zbirki proti biocidom odpornih mikroorganizmov kot najpogostejšo omenja vrsto *Burkholderia cepacia* (29,7 % vseh odpornih izolatov), sledijo bakterije vrst *Pseudomonas aeruginosa* (23,4 %), *Pseudomonas putida* (21,9 %), *Pseudomonas fluorescens* (12,5 %), *Pseudomonas corrugata* (4,7 %) in *Enterobacter* sp. (3,1 %).

Mehanizem odpornosti pri glivah je slabše raziskan (McDonnell in Russell, 1999). Med glivami predstavlja plesen vrste *Aureobasidium pullulans* eno najbolj odpornih vrst; preživi izsuševanje, UV sevanje, odporna je tudi proti veliko biocidom (Clausen, 2000). Shirakawa in sod. (2002) so iz površine sveže prebarvanih stavb, ki so vsebovale 0,25 % (w/w) biocida (zmes aktivnih učinkovin karbendazina, 2-oktilizotiazolona in N-(3,4-diklorofenil)N,N-dimetiluree), izolirali glive iz rodov *Cladosporium* (prisotne v 89 % vzorcev), *Epicoccum* (v 78 % vzorcev), *Alternaria* (v 61 % vzorcev), *Monascus* (v 56 % vzorcev), *Aureobasidium* (v 56 % vzorcev), *Curvularia* (v 50 % vzorcev) in *Helminthosporium* (v 50 % vzorcev). Izolirali so tudi celomicetne glive (v 67 % vzorcev) in kvasovke (v 50 % vzorcev). Ostali rodovi (*Aspergillus*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Peyronellaea*, *Pithomyces*, *Tripospermum*, *Trichoderma* in *Ulocladium*) so bili prisotni v ≤ 17 % vzorcev.

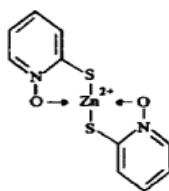
2.5.1 Podatki o vrednostih minimalnih inhibitornih koncentracij (MIC) za določene biocide in njihovem delovanju

3-jodo-2-propinilbutilkarbamat (IPBK) deluje proti glivam (King, 1995). Vrednosti MIC IPBK za glive so v območju 0,1-25 µg/ml: 0,1–2 µg/ml za *Aureobasidium pullulans*, 0,5–1,6 µg/ml za *Aspergillus niger* (Lidert in sod., 1997; Winkowski, 2004) in *Chaetomium globosum*, 0,8 µg/ml za *Penicillium funiculosum*, 25 µg/ml za *Cladosporium resinae* (Lidert in sod., 1997), 1,0 µg/ml za *Aspergillus oryzae* in 2,0 µg/ml za *Ulocladium virens*.

(Winkowski, 2004). Vrednost MIC za bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* je pri pH 7 0,2 µg/ml (Lidert in sod., 1997).

2-oktilizotiazol-3-on (OIT) deluje proti glivam. Kot baktericid je učinkovit le proti redkim vrstam bakterij. Za večino vrst gliv so vrednosti MIC OIT v območju 0,5–10 µg/ml (Nichols, 2004). Deluje tako, da reagira s tiolnimi skupinami aminokislin ali proteinov (King, 1995), v reducirajočem okolju pa izgubi protimikrobni učinek (Nichols, 2004).

Cinkov oksid (ZnO) deluje proti plesnim in ima fungistatično delovanje; zavira micelijsko rast in germinacijo spor, vendar jih ne uniči (Salvin, 1944). Deloval naj bi kot kelator kovin in kot inhibitor encimov (King, 1995). Sawai (2003) je določil, da je vrednost MIC za *Escherichia coli* 32,4 mg/ml in za *Staphylococcus aureus* 0,99 mg/ml. Laundon in sod. (2001) so določili vrednosti MIC ZnO za plesni *Neurospora crassa* in *Aspergillus oryzae*. MIC so bile v območju 1–5 % (w/v) ZnO, pri tem je kazala vrsta *Aspergillus oryzae* višjo odpornost proti ZnO kot *Neurospora crassa*.



Slika 4: Kemijska struktura cinkovega piritiona (Yebra in sod., 2004: 94).

Cinkov pirition že v nizkih koncentracijah deluje proti bakterijam in glivam (Nichols, 2004). Proti mikroorganizmom deluje na več ravneh. Je membransko aktiven, saj se veže na membranski fosfolipid dietanolamin in jo tako destabilizira. Povzroča tudi depolarizacijo membrane. Tako posredno ali neposredno ovira delovanje protonskih črpalk in s tem membranski transport. Delovanje je verjetno intracelularno. Deluje lahko tudi kot kelator kovinskih ionov, verjetno pa tudi na drugih metabolnih ravneh, npr. kot inhibitor produkcije folatov (Guthery in sod., 2005). Vrednosti MIC so v območju 10 µg/ml (vrste *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Candida* spp. in dermatofiti) do 300 µg/ml (vrsta *Xanthomonas maltophilia*) oz. do 400

µg/ml za *Pseudomonas aeruginosa*. Najpogosteje inhibicijo mikrobne rasti dosežemo že pri 40 µg/ml (Nichols, 2004).

Benzizotiazolon (BIT) deluje proti mikroorganizmom, tako da reagira z nukleofilnimi skupinami (King, 1995). MIC za bakterije so v območju 20–250 µg/ml (Gillatt, 2002; Winkowski, 2004). MIC za bakterije *Escherichia coli* in *Klebsiella* sp. je 25 µg/ml, za *Proteus* sp. in *Pseudomonas stutzeri* 20 µg/ml ter za *Pseudomonas aeruginosa* 150 µg/ml (Gillatt, 2002) do 250 µg/ml (Winkowski, 2004). MIC za glive so v območju 25–250 µg/ml. MIC za glive vrste *Aspergillus niger* je 100–250 µg/ml, za *Aureobasidium pullulans* 50 µg/ml in za *Penicillium funiculosum* 25–100 µg/ml (Gillatt, 2002; Winkowski, 2004).

Metilizotiazolon (MIT) ima vrednosti MIC za bakterije v območju 15–30 µg/ml. MIC za bakterije *Escherichia coli* je 18 µg/ml, za *Klebsiella* sp. 20 µg/ml, za *Pseudomonas aeruginosa* 30 µg/ml, za *Proteus* sp. 25 µg/ml in za *Pseudomonas stutzeri* 15 µg/ml. MIC za glive je v območju 200–750 µg/ml: za vrsto *Aspergillus niger* 750 µg/ml in za *Penicillium funiculosum* 200 µg/ml (Gillatt, 2002). Diehl in Chapman (1999) sta določila, da je MIC za biocid MIT v minimalnem mediju z glukozo za bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* v območju 12,3–17,6 µg/ml, za vrsto *Pseudomonas fluorescens* pa 17,5 µg/ml.

Zmes aktivnih učinkovin deluje sinergistično in občutno zmanjša območje vrednosti MIC za bakterije, predvsem za *Pseudomonas aeruginosa*, pa tudi za plesni. BIT/MIT ima za bakterijske vrste *Escherichia coli*, *Proteus* sp. in *Pseudomonas stutzeri* vrednosti MIC 10 µg/ml, za *Pseudomonas aeruginosa* in *Klebsiella* sp. 20 µg/ml ter 50 µg/ml za vrsti plesni *Aspergillus niger* in *Penicillium funiculosum* (Gillatt, 2002).

CIT/MIT deluje proti bakterijam in glivam, saj pri fiziološkem pH oksidira tiolne skupine proteinov (King, 1995). Na tak način biocid inhibira membransko vezane proteine (Denyer, 1995). Diehl in Chapman (1999) sta določila, da so vrednosti MIC za biocid CIT v minimalnem mediju z glukozo za bakterije vrste *Pseudomonas aeruginosa* v območju 0,43–0,63 µg/ml, za vrsto *Pseudomonas fluorescens* pa 0,20 µg/ml. McCoy in sod. (1986) so določili, da 0,35 µg/ml CIT/MIT v 24 urah zmanjša število bakterij vrste *Legionella pneumophila* za 4 log enote.

3 MATERIAL IN METODE

V raziskovalnem delu diplomskega dela smo preiskali 7 različnih vzorcev in uporabili klasične mikrobiološke tehnike za določitev koncentracije mikroorganizmov in njihovih makro- in mikromorfoloških lastnosti. Za analizo učinkovitosti treh biocidov smo uporabili metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici in metodo določanja rastne krivulje.

3.1 MATERIAL

Vzorci in biocide smo pridobili iz industrijskega obrata proizvodnje vodnih barv. Ostali material je bil iz laboratorija živilske mikrobiologije na Katedri za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil.

3.1.1 Vzorci

Vzorec 1 (V1) je suha karboksimetilceluloza (CMC), vhodna surovina za izdelavo disperzijske kalcitne barve na vodni osnovi. Suha CMC je v obliki praška in še ne vsebuje biocidov.

Vzorec 2 (V2) je (tehnološka) voda, ki jo uporabljajo kot surovino (topilo) za izdelavo disperzijske kalcitne barve na vodni osnovi. Pred vstopom v proces jo obdelajo z UV svetlobo z namenom zmanjšanja števila živih mikroorganizmov. Do uporabe jo hranijo v zalogovniku.

Vzorec 3 (V3) je 2,4 % vodna raztopina CMC z dodanimi biocidi in predstavlja vmesno fazo oz. polizdelek v postopku proizvodnje disperzijske kalcitne barve na vodni osnovi. Nahaja se v zalogovniku, kot polizdelek, z dodanimi biocidi v količini, ki zadošča za zaščito končnega izdelka.

Vzorec 4 (V4) je laboratorijsko pripravljena 2 % vodna raztopina CMC brez dodanih biocidov.

Vzorec 5 (V5) je končni izdelek iz polnilne linije, disperzijska kalcitna barva, pred polnjenjem jo hranijo v zalogovniku. Vzorec vsebuje tudi mešanico biocidov.

Vzorec 7 (V7) je notranja površina izdelovalne posode (disolverja) za izdelavo disperzijskih barv in polizdelkov. Izdelovalne posode se čistijo enkrat tedensko. Vzorec vsebuje tudi mešanico biocidov.

Vzorec 8 (V8) je notranja površina zalogovnika končnega izdelka (egalizatorja) pred polnilno linijo, v katerem se shranjujejo disperzijske kalcitne barve; pogostost čiščenja je odvisna od mikrobiološkega testiranja, ki se izvaja vsakih 14 dni, in ni v naprej predpisana. Vzorec vsebuje tudi mešanico biocidov.

3.1.2 Biocidi

Biocide smo označili s številkami 1–3. Vsi biocidi so bili pripravljene v tekoči obliki; biocid 1 je bil v obliki disperzije, biocida 2 in 3 pa v obliki raztopine.

Biocid 1 vsebuje 4,6–5 % raztopino cinkovega piritiona (< 0,6 %), 2-oktil-2H-izotiazol-3-ona (< 0,5 %), 3-jodo-2-propinil-butilkarbamata (2,5–10 %) in cinkovega oksida (< 5 %). Njegova gostota je 1,1 g/ml.

Biocid 2 vsebuje 5 % 1,2-benzizotiazol-3(2H)-ona in 5 % metilizotiazolinona. Njegova gostota je 1,05–1,06 g/ml.

Biocid 3 vsebuje 14 % raztopino 5-kloro-2-metil-2H-izotiazolona in 2-metil-2H-izotiazolona. Njegova gostota je 1,30 g/ml.

3.1.3 Mikrobiološka gojišča

Tekoče gojišče MHB (Mueller - Hinton broth)

Gojišče MHB (Oxoid LTD, CM0405, Basingstoke, Hampshire, Anglija) je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

Tekoče gojišče BHI (angl. brain heart infusion)

Gojišče BHI (Merck KgaA, VM859493734, Darmstadt, Nemčija) je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

Tekoče gojišče RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)

Gojišče RPMI-1640 (Sigma, R6504, Steinheim, Nemčija) je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca. pH smo umerili na 7,0 s 0,165 M pufrom MOPS (3-N-morfolinopropansulfonska kislina; Sigma-Aldrich, 045KO158, St. Louis, MO). Gojišče smo sterilizirali s filtracijo preko filtra Millipore Express plus (ZDA) z velikostjo por 0,22 µm.

Trdno gojišče NA (angl. nutrient agar, hranljivi agar)

Gojišče NA (Oxoid LTD, CM0003B, Basingstoke, Hampshire, Anglija) smo pripravili po navodilih proizvajalca. V 0,5 l gojišča smo dodali 1,5 g D-glukoze (Kemika, 200-075-1, Zagreb, Hrvaška). Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

Trdno gojišče CMC NA (modificiran hranljivi agar, karboksimetilceluloza hranljivi agar)

Gojišče NA (Oxoid LTD, CM0003B, Basingstoke, Hampshire, Anglija) smo pripravili po navodilih proizvajalca. V 0,5 l gojišča smo namesto D-glukoze dodali 1,5 g CMC v prahu. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

Selektivno trdno gojišče za glive OGYE (angl. oxytetracycline glucose yeast extract agar, oksitetraciklin glukoza kvasni ekstrakt agar)

Gojišče OGYE (Biolife OGYE agar base, 4018382, Italiana S. r. l. Viale Monza, Milano, Italija) je bilo pripravljeno po navodilih proizvajalca. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri

121 °C. Ohlajenemu, še tekočemu gojišču smo sterilno dodali antibiotik oksitetraciklin (Oxytetracyclin ant. Supplement, Biolife, 424000, Milano, Italija) v koncentraciji 100 mg/l.

Trdno gojišče MEA (angl. malt extract agar, sladni agar)

Gojišče MEA (Merck, WMO21598 842, Darmstadt, Nemčija) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

Trdno gojišče MHA (Mueller - Hinton agar)

Gojišče MHA (Oxoid LTD, CM0337, Basingstoke, Hemsphire, Anglija) smo pripravili po navodilih proizvajalca. Gojišče smo sterilizirali 20 min pri 121 °C.

Razredčevalna raztopina

V 1000 ml destilirane vode smo odpipetirali 1,25 ml (2 x 625 µl) raztopine KH_2PO_4 (Kemika, 231-834-5, Zagreb, Hrvaška) s koncentracijo 0,034 g/ml in dobro premešali. Za določitev števila mikroorganizmov z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču smo v epruvete odpipetirali po 9 ml razredčevalne raztopine (RR). Za pripravo suspenzije spor plesni smo pripravili 50 ml RR in dodali 0,5 ml Tween 20 (Sigma-Aldrich, P2287, Steinheim, Nemčija). Epruvete in steklenici z RR smo sterilizirali v avtoklavu 20 min pri 121 °C (Murano in Hudnall, 2001).

3.1.4 Drugi reagenti

Drugi uporabljeni reagenti so:

- destilirana voda,
- sterilna destilirana voda,
- kristal violet (Merck, FN1016745 650, Darmstadt, Nemčija),
- lugol,
- 96 % etanol (Merck, K39522671 850, Darmstadt, Nemčija),
- safranin (Merck, ZC267248 603, Darmstadt, Nemčija),
- INT (Sigma-Aldrich, 14096LJ, Steinheim, Nemčija),

- glicerol (Kemika, 200-289-5, Zagreb, Hrvaška),
- imerzijsko olje (Kemika, Zagreb, Hrvaška),
- laktofenol,
- MOPS (Sigma-Aldrich, 045KO158, Steinheim, Nemčija).

3.1.5 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje aparate:

- digitalno tehtnico (Mettler - Toledo, PB1502-S, Švica),
- zaščitno mikrobiološko komoro (Iskra, PIO SMBC 122 AV, Slovenija),
- avtoklav (Sutjeska, tip 500 x 700, Jugoslavija),
- avtoklav (Sutjeska, tip 1-61-137, Jugoslavija),
- omaro za sušenje steklovine (Elektromedicina, SO-250, Slovenija),
- mikrovalovno pečica (Sanyo, Japonska),
- zamrzovalnik (LTH, Slovenija),
- hladilnik (LAE, Slovenija),
- hladilnik (LTH, Slovenija),
- inkubator (Sutjeska, tip R8/26, Jugoslavija),
- inkubator (Kambič, I-115C, Slovenija),
- stresalnik mikrotitrskih ploščic (Eppendorf thermomixer comfort, 4344, Nemčija)
- vrtinčnik (Yellowline, TTS2, ZDA)
- gnetilnik (Stomacher tip 499 Pbi international, Seward, Anglija),
- stresalnik (Vibriomix 314 EVT, Tehnica, Slovenija),
- mikroskop (Motic BA300),
- pH meter (Seven Easy pH, Mettler - Toledo, Švica).

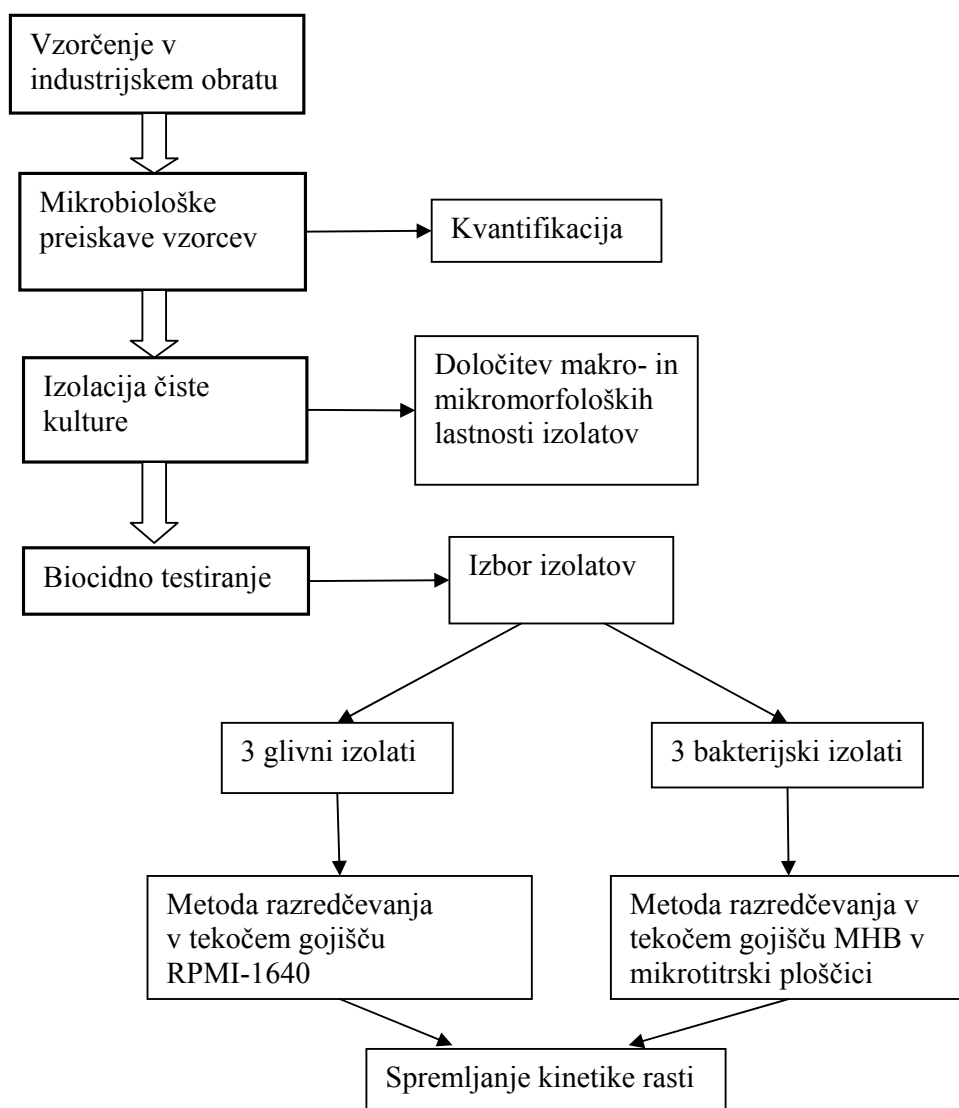
Drobna oprema:

- objektna stekelca (Brand GMBH, Nemčija),
- hemocitometer (Bürker - Türk, Brand, Nemčija)
- sterilne plastične cepilne zanke,
- steklene epruvete,
- sterilne petrijeve plošče (Labortechnika Golias, Slovenija),
- sterilni zobotrepci,
- plastični lončki (Labortechnika Golias, Slovenija),
- pincete,
- stojala za odpadni kontaminirani material,
- vreče za odpadni kontaminirani material (Plastibrand, Nemčija),
- parafilm »M« (PM 992 American National Can, ZDA),
- laboratorijske steklenice (Duran),
- plinski gorilnik,
- avtomatske pipete (Gilson, Francija; Eppendorf, Nemčija),
- nastavki za pipete 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 10 ml (Eppendorf, Nemčija; Gilson, Francija; Plastibrand, Nemčija),
- merilni valji,
- mikrotitrne ploščice,
- plastične centrifugirke,
- sterilni brisi,
- sterilne plastične vrečke za gnetilnik,
- krioeprovete,
- mikrocentrifugirke (Gilson, Francija),
- merilnik časa,
- ostala steklovina.

3.2 METODE

3.2.1 Potek eksperimentalnega dela

Potek eksperimentalnega dela je prikazan na Sliki 5. Najprej smo vzorčili po določenih kritičnih točkah kontaminacije v industrijskem obratu. Sledili sta kvantitativna preiskava vzorcev in določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti izolatov. Za določene izolate smo opravili biocidno testiranje.



Slika 5: Hodogram eksperimentalnega dela.

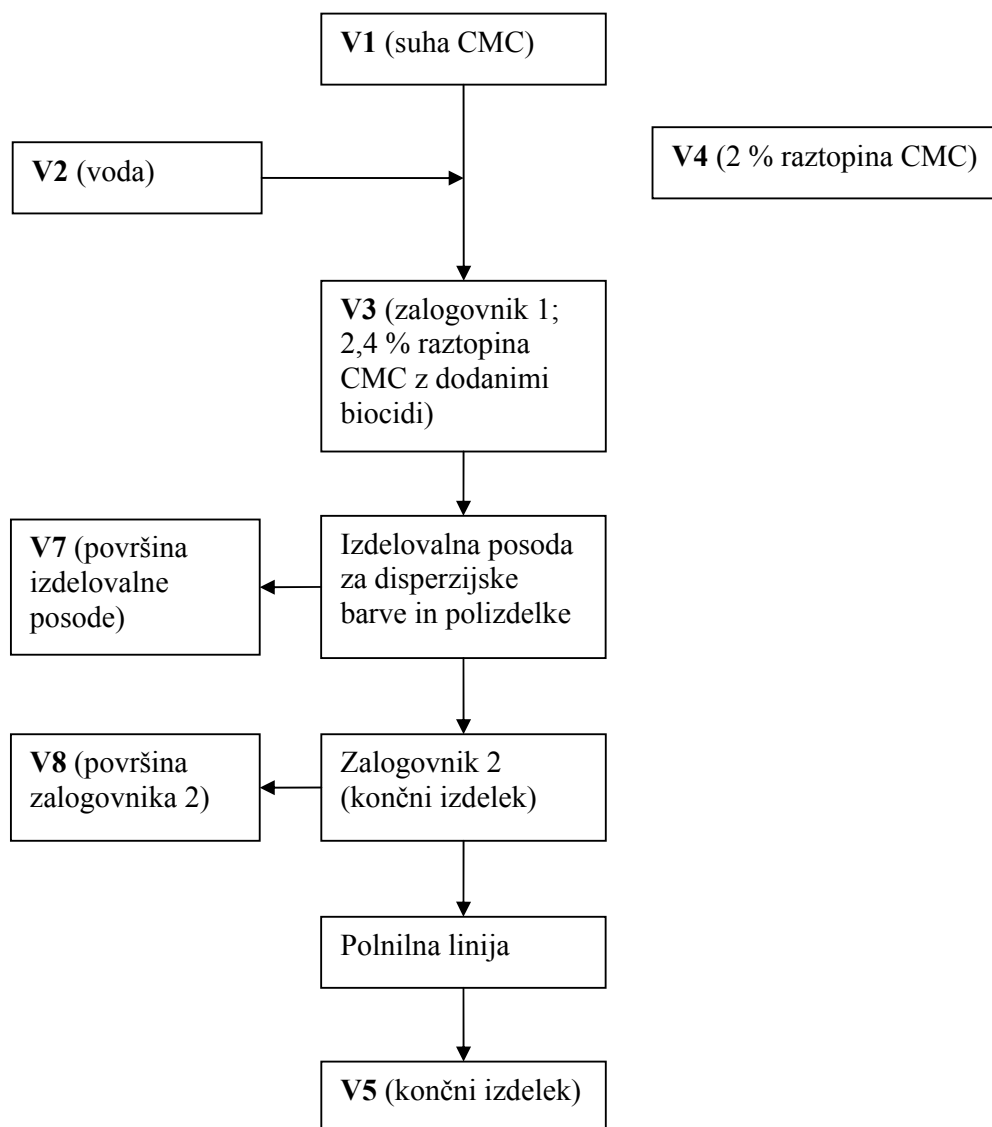
3.2.2 Vzorčenje

Vzorčenje smo poskušali opraviti aseptično. Vzorčili smo po hodogramu na Sliki 6, in sicer v dveh paralelkah:

- Vzorec 1 (V1):
suha CMC brez dodanih biocidov; natresli smo jo v sterilno steklenico z zamaškom.
- Vzorec 2 (V2):
tehnološka voda; sterilno steklenico smo obrisali s 70 % etanolom in jo potopili v zalogovnik z vodo. Odprli in zaprli smo jo pod vodo.
- Vzorec 3 (V3):
2,4 % raztopina CMC z dodanimi biocidi; iz zalogovnika smo jo odvzeli skozi ventil tako, da smo odtočili nekaj raztopine, nato pa v sterilne steklenice, ki so bile čim krajši čas odprte na zraku, prestregli curek. Ventil smo pred tem obrisali s 70 % etanolom.
- Vzorec 4 (V4):
V laboratoriju sveže pripravljena 2 % raztopina CMC brez dodanih biocidov.
- Vzorec 5 (V5):
Končni izdelek iz polnilne linije, disperzijska kalcitna barva; v tem primeru pred odvzemom nismo mogli razkužiti šobe z etanolom, saj izdelek z njim ne reagira dobro (se strjuje), poleg tega je pravkar potekalo polnjenje. Izdelek smo natočili v posodo, ki smo jo prej obrisali z etanolom in počakali, da se posuši, nato pa smo ga prelili v sterilno steklenico.
- Vzorec 7 (V7):
Notranja površina izdelovalne posode za izdelavo disperzijskih barv in polizdelkov; s sterilno vatirano palčko smo odvzeli bris z vrha stene zalogovnika na površini 10 x 10 cm².

- Vzorec 8 (V8):

Notranja površina zalogovnika končnega izdelka pred polnilno linijo, v katerem shranjujejo disperzijske kalcitne barve; s sterilno vatirano palčko smo odvzeli bris z vrha stene zalogovnika na površini 10 x 10 cm².



Slika 6: Hodogram vzorčenja

Legenda: V – vzorec; CMC – karboksimetilceluloza.

3.2.3 Kvantitativna mikrobiološka preiskava vzorcev

Določali smo skupno število aerobnih mezofilnih bakterij, število aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika, in število plesni v vzorcih. Kvantitativna mikrobiološka preiskava vzorcev je potekala po metodi štetja kolonij na trdnem gojišču (SIST EN ISO 4833, 2003).

Najprej smo pripravili matične raztopine za vzorce V1 (suha CMC brez dodanih biocidov), V2 (tehnološka voda), V3 (2,4 % raztopina CMC z dodanimi biocidi), V4 (v laboratoriju pripravljena 2 % raztopina CMC brez dodanih biocidov), V5 (končni izdelek iz polnilne linije). V sterilno plastično vrečko smo zatehtali 10 g posameznega vzorca (V2–V5) in dodali 90 ml razredčevalne raztopine (RR), čemur je sledila 1-minutna homogenizacija v gnetilniku. V primeru vzorca 1 smo matično raztopino pripravili tako, da smo 99 ml RR dodali 1 g CMC v prahu in nato homogenizirali 1 minuto v gnetilniku.

Naredili smo 10-kratne razredčitve matičnih raztopin (1 ml raztopine v 9 ml RR) vzorcev V1–V5 in vzorcev notranjih površin (V7 in V8) ter jih nacepili na trdna gojišča. Po 100 μ l vsake razredčitve smo v paralelkah razmazali na gojišča do končne razredčitve na plošči 10^{-5} (oz. 10^{-6} za V1 in 10^{-4} za vzorce notranjih površin), tako da smo imeli za vsako napravljeno redčitev pri določenem vzorcu 4 plošče. Razredčitve smo razmazali na naslednja gojišča:

- NA za določanje skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij,
- CMC NA za določanje števila aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika in
- OGYE za določanje števila plesni v vzorcih.

Nekatere vzorce (vzorec vode (V2), vzorec v laboratoriju pripravljene 2 % raztopine CMC brez dodanih biocidov (V4), bris izdelovalne posode (V7) in bris zalogovnika (V8)) smo direktno vmešali v gojišče, tako da smo v petrijevko odpipetirali 1 ml vzorca, čez prelili gojišče in petrijevko nežno premešali. Pri ostalih vzorcih smo direktno vmešali matične

raztopine, in sicer v gojišča NA in CMC NA. V OGYE smo vmešali le V2 in matično raztopino V2.

Vsa gojišča smo inkubirali 5 dni pri sobni temperaturi (25–28 °C), nato smo prešteli bakterijske kolonije na gojišču NA za določitev skupnega števila aerobnih mezofilnih bakterij, bakterijske kolonije na gojišču CMC NA za določitev števila aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika, in kolonije plesni na gojišču OGYE za določitev števila plesni v vzorcih. Iz podatkov smo izračunali koncentracijo določenih mikroorganizmov v vzorcu po formuli

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot R} , \quad \dots (1)$$

pri čemer je N koncentracija bakterij oz. spor plesni v vzorcu (CFU/ml), $\sum C$ vsota vseh kolonij na vseh števnihih ploščah, n_1 število plošč prve upoštevane redčitve, n_2 število plošč druge upoštevane redčitve in R faktor razredčitve pri prvi upoštevani redčitvi.

3.2.4 Določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti izbranih sevov

Najpogostejše bakterijske kolonije smo precepili na gojišče NA in jih subkultivirali do čiste kulture (5 subkultivacij). Precepili smo jih tudi na gojišče CMC NA, da bi videli, ali lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika. Po aerobni inkubaciji pri sobni temperaturi (25–28 °C) smo določili makromorfološke lastnosti kolonij (barva, oblika, premer, tekstura, profil, površina in rob). Nato smo pripravili barvne preparate po Gramu (3.2.4.1) in določili mikromorfološke lastnosti (oblika in reakcija na barvanje po Gramu).

Kolonije plesni smo precepili na gojišči OGYE in CMC NA, da bi videli, ali lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika. Po aerobni inkubaciji pri sobni temperaturi na trdnem gojišču MEA smo kolonijam določili makromorfološke lastnosti

(barva, oblika, premer, reverz). Pogledali smo jih tudi pod mikroskopom (nativni preparat v laktopenolu) in jim določili rod.

3.2.4.1 Barvanje po Gramu

Bakterijske kulture smo precepili na sveže gojišče NA. Po 24-urni inkubaciji na 28 °C smo kolonije s cepilno zanko postrgali s plošče in jih razmazali na objektno stekelce, na katero smo pred tem dali kapljico razredčevalne raztopine. Ko se je razmaz posušil, smo kulturo fiksirali nad plamenom. Objektna stekelca smo nato 2 minuti barvali v kristal vijoličnem, sledilo je spiranje z vodo, 2 minuti barvanja v lugolu, spiranje s 96 % etanolom, spiranje z vodo, 30 sekund v safraninu in spiranje z vodo (Jeršek, 2008).

3.2.5 Testiranje protibakterijske aktivnosti biocidov

Biocidno delovanje smo testirali z metodo razredčevanja v tekočem gojišču mikrotitrski ploščici (Eloff, 1998). Rezultate smo potrdili z rastnimi krivuljami.

3.2.5.1 Izbor bakterijskih izolatov

Za izbor bakterijskih izolatov smo določili kriterij, da morajo biti iz vzorcev z najvišjim skupnim številom mikroorganizmov, tip kolonije pa je prisoten vsaj v 2 vzorcih in po oceni v najvišjem številu. Izbrali smo 3 različne bakterijske izolate.

Ker smo izolacijo bakterij izvedli pri inkubaciji pri 25–28 °C, smo preizkusili uspešnost rasti izbranih treh izolatov v gojišču MHB 25–28 °C in 37 °C v dveh paralelkah. Za vsak izolat smo določili število celic v času 0 in po 24 urah z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču. Glede na rezultat preizkusa rasti smo nadaljne inkubacije izvajali pri temperaturi, ki je bolj ustrezala posameznemu izolatu (4.3).

3.2.5.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici

Z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici (Eloff, 1998) smo določali protimikrobno aktivnost izbranih 3 biocidov. Iskali smo najnižjo koncentracijo, pri kateri imajo biocidi še zaviralni učinek na bakterijsko rast.

- Priprava bakterijskih kultur

Bakterijske izolate smo iz trdnega gojišča MHA precepili v epruvete s 4 ml tekočega gojišča MHB (po 1 kolonijo), jih premešali na vrtinčniku in nato 24 ur inkubirali pri 25–28 °C oz. pri 37 °C. Prekonočno kulturo smo razredčili do koncentracije 10^5 – 10^6 CFU/ml, tako da smo prenesli 150 µl kulture v 10 ml MHB. Koncentracijo celic v inokulumu smo preverili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MHA.

- Priprava osnovnih raztopin biocidov

Biocida 1 in 3:

V 3 ml sterilnega tekočega gojišča MHB smo v zaščitni mikrobiološki komori odpipetirali 61 µl biocida, tako da smo dobili 2 % raztopine.

Biocid 2:

V 3 ml sterilnega tekočega gojišča MHB smo v zaščitni mikrobiološki komori odpipetirali 93 µl biocida, tako da smo dobili 3 % raztopino, saj se ta biocid uporablja v višji koncentraciji kot ostala dva (3.1.2.2), zato smo predvidevali, da bo tudi MIC zanj višja kot za ostala dva biocida.

Potrebni volumen raztopine biocida smo izračunali po formuli:

$$V_1 = \frac{\frac{c_2}{c_1} \cdot V_2}{1 - \frac{c_2}{c_1}} \quad \dots (2)$$

Pri tem je V_1 volumen raztopine z višjo koncentracijo c_1 (100 %), V_2 pa končni volumen raztopine (3 ml) s končno koncentracijo c_2 (2 %).

Po pridobitvi podatkov o aktivnih učinkovinah v posameznih biocidih (3.1.2) smo izračunali koncentracijo aktivnih učinkovin v naših biocidnih raztopinah.

Preglednica 3: Skupna koncentracija aktivnih učinkovin (v mg/ml) v pripravljenih biocidnih raztopinah za posamezne biocide.

	2 % raztopina	3 % raztopina
Biocid 1	1,06	-
Biocid 2	2,12	3,18
Biocid 3	3,64	-

- Izvedba metode

Za izvedbo metode smo pripravili osnovne raztopine biocidov, bakterijske kulture, pozitivne in negativne kontrole ter slepe vzorce. Pozitivne kontrole je sestavljalo 50 μ l razredčene bakterijske kulture in 50 μ l MHB. Negativne kontrole je sestavljalo 50 μ l razredčene bakterijske kulture in 50 μ l osnovne biocidne raztopine. Slepe vzorce je sestavljalo 50 μ l MHB in 50 μ l osnovne biocidne raztopine.

Osnovna raztopina biocida 1 je vsebovala 1,06 mg/ml protimikrobnih snovi. V mikrotitrski ploščici smo jo razredčili do 0,258 μ g/ml. Osnovna raztopina biocida 2 je vsebovala 3,18 mg/ml protimikrobnih snovi. V mikrotitrski ploščici smo jo razredčili do 0,776 μ g/ml. Osnovna raztopina biocida 3 je vsebovala 3,64 mg/ml protimikrobnih snovi. V mikrotitrski ploščici smo jo razredčili do 0,889 μ g/ml, kot je prikazano v Preglednici 4.

Preglednica 4: Postavitev koncentracij skupnih aktivnih učinkovin biocidov 1, 2 in 3 ($\mu\text{g/ml}$) za preizkus na mikrotitrski ploščici za bakterijske izolate in položaj kontrol.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Biocid 1	A	528	264	132	66,0	33,0	16,5	8,25	4,12	2,06	1,03	0,516	0,258
	B	528	264	132	66,0	33,0	16,5	8,25	4,12	2,06	1,03	0,516	0,258
Biocid 2	C	1590	795,0	397,5	198,7	99,37	49,69	24,84	12,42	6,211	3,105	1,553	0,7764
	D	1590	795,0	397,5	198,7	99,37	49,69	24,84	12,42	6,211	3,105	1,553	0,7764
Biocid 3	E	1820	910	455	228	114	56,9	28,4	14,2	7,11	3,55	1,78	0,889
	F	1820	910	455	228	114	56,9	28,4	14,2	7,11	3,55	1,78	0,889
	G	SV	NK1	NK2	NK3								
	H	SV	NK1	NK2	NK3							PK	PK

Legenda: SV - slepi vzorec, NK - negativna kontrola, PK - pozitivna kontrola.

V vrstice A–F smo v stolpce od 2–12 vnesli po 50 μl gojišča MHB. V stolpec 1 smo vnesli po 100 μl osnovnih raztopin biocidov (vrstici A in B biocid 1, vrstici C in D biocid 2, vrstici E in F biocid 3). V vrsticah A–F smo naprej po stolpcih prenašali po 50 μl (vmes smo po 8-krat premešali s pipeto), tako da smo v vsakem naslednjem stolpcu biocid razredčili v razmerju 1 : 2. Zadnjih 50 μl (iz stolpca 12) smo zavrgli. Nato smo v vse vdolbinice dodali po 50 μl tekoče kulture določenega bakterijskega izolata (za vsak izolat smo uporabili 1 mikrotitrsko ploščico).

V vrsticah G in H so bile kontrole, in sicer v stolpcu 1 slepa proba (100 μl sterilnega gojišča MHB), v stolpcih 2–4 negativne kontrole (50 μl sterilnega MHB in 50 μl osnovne raztopine biocida), v stolpcih 11 in 12 v vrstici G je bila pozitivna kontrola (50 μl sterilnega MHB in 50 μl kulture bakterijskega izolata). Pred inkubacijo smo mikrotitrsko ploščo premešali v stresalniku mikrotitrskih ploščic (25/23 $^{\circ}\text{C}$, 700 rpm, 1 min).

Po koncu 24-urne inkubacije pri 25–28 $^{\circ}\text{C}$ za bakterijska izolata št. 9 in 22 in 37 $^{\circ}\text{C}$ za izolat št. 15 smo v vse polne jamice na mikrotitrski ploščici dodali po 10 μl barvila INT, ki je indikator biološke aktivnosti. Ploščico smo zavili v aluminijasto folijo, jo premešali v stresalniku mikrotitrskih ploščic (25/23 $^{\circ}\text{C}$, 700 rpm, 1 min) in jo za 30 min postavili v temo. V tem času se je v jamicah, v katerih so bile žive (biološko aktivne) celice, razvila

rožnata barva. Odčitali smo, katere so bile najnižje koncentracije biocidov, ki so še preprečile razvoj rožnate barve in jih označili kot minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Inokulum smo preverili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MHA. Odvzeli smo 100 μ l 24-urne kulture in jo prenesli v mikrocentrifugirko z 900 μ l RR ter naredili 10-kratne razredčitve v RR. Ploščo z gojiščem MHA smo razdelili na 6 delov in na vsakega od njih nakapljali 3 x 10 μ l posamezne razredčitve, tako da smo imeli na plošči razredčitve od 10^{-3} do 10^{-8} . Plošče smo inkubirali 24 ur na ustrezni temperaturi, nato pa prešteli kolonije in po formuli (1) izračunali inokulum.

3.2.5.3 Rastne krivulje

Z rastno krivuljo ugotavljamo kinetiko inaktivacije z metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Rastnemu mediju dodamo protimikrobno sredstvo v takšni koncentraciji, da bo končna koncentracija enaka MIC, ki smo jo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču. Nato dodamo razredčeno bakterijsko kulturo (v koncentraciji 10^5 – 10^6 CFU/ml), premešamo in inkubiramo 24 ur pri primerni temperaturi. V določenih časovnih presledkih odvajamo vzorec, ga razredčimo in izbrane redčitve nacepimo na agarске plošče. Po 24 urah preštujemo zrasle kolonije in izračunamo povprečno število (Klančnik in sod., 2010).

Metodo smo uporabili z namenom, da bi preverili rezultate (MIC), pridobljene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici.

V tekočem gojišču MHB smo pripravili raztopine biocidov z dvakrat višjimi koncentracijami, kot smo jih določili za MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici, in sicer za vsak testiran izolat posebej. Osnovne raztopine biocidov (3.2.5.2) smo razredčili do ustrezne koncentracije po formuli (2).

Kulture smo pripravili enako kot pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči (3.2.5.2).

Za določitev rastnih krivulj smo v epruvete v dveh paralelkah odpipetirali 1 ml pripravljene bakterijske kulture in 1 ml raztopine biocida, tako da je bila končna koncentracija biocida v epruveti enaka MIC. Rastno kontrolo sta sestavljala 1 ml razredčene bakterijske kulture in 1 ml MHB brez dodanega biocida. Da bi pridobili podatke o kinetiki rasti bakterij, smo vzorčili v času 0, 6 h in 24 h in določili število bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MHA.

3.2.6 Testiranje protiglivne aktivnosti biocidov

3.2.6.1 Izbor izolatov plesni

Za izbor izolatov plesni smo določili kriterij, da morajo predstavljati po oceni največkrat zastopan tip kolonije, poleg tega pa morajo imeti dobro sporulacijo. Izbrali smo tri izolate.

3.2.6.2 Metoda razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici

Metodo smo izvedli po navodilih Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Rex in sod., 2008).

- Priprava kultur

Izbrane izolate smo nacepili na plošče MEA in 5 dni inkubirali pri temperaturi 23–25 °C (do sporulacije). Kulture smo prelili s 5 ml razredčevalne raztopine z dodatkom 1 % Tween 20, da smo s kolonij sprali spore. 1 ml suspenzije spor v razredčevalni raztopini smo prenesli v mikrocentrifugirko in jo homogenizirali na vrtinčniku (Rex in sod., 2008). Koncentracijo spor smo določili s štetjem v hemocitometru (Bürker - Türk, Brand, Nemčija) in jih razredčili v tekočem gojišču RPMI-1640 do končne koncentracije 10^4 – 10^5 spor/ml (Mahlo in sod., 2010). Inokulum smo preverili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MEA.

- Priprava osnovnih raztopin biocidov

Pripravili smo 2 % raztopine biocidov, enako kot pri testiranju protibakterijske aktivnosti (3.2.5.2).

- Izvedba metode

Za izvedbo metode smo pripravili osnovne raztopine biocidov, kulturo plesni, pozitivne in negativne kontrole ter slepe vzorce. Pozitivne kontrole je sestavljalo 100 µl razredčene suspenzije spor kulture plesni in 100 µl tekočega gojišča RPMI-1640. Negativne kontrole kontrole je sestavljalo 100 µl razredčene suspenzije spor kulture plesni in 100 µl osnovne biocidne raztopine. Slepe vzorce je sestavljalo 100 µl tekočega gojišča RPMI-1640 in 100 µl osnovne biocidne raztopine. Osnovno raztopino biocidov smo v mikrotitrski ploščici razredčili do končnih koncentracij, kot je prikazano v Preglednici 5.

Preglednica 5: Postavitev koncentracij skupnih aktivnih učinkovin biocidov 1, 2 in 3 (µg/ml) za preizkus na mikrotitrski ploščici za izolate plesni in položaj kontrol.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Biocid 1	A	528	264	132	66,0	33,0	16,5	8,25	4,12	2,06	1,03	0,516	0,258
	B	528	264	132	66,0	33,0	16,5	8,25	4,12	2,06	1,03	0,516	0,258
Biocid 2	C	1060	530	265	132	66,2	33,1	16,6	8,28	4,14	2,07	1,04	0,518
	D	1060	530	265	132	66,2	33,1	16,6	8,28	4,14	2,07	1,04	0,518
Biocid 3	E	1820	910	455	228	114	56,9	28,4	14,2	7,11	3,55	1,78	0,889
	F	1820	910	455	228	114	56,9	28,4	14,2	7,11	3,55	1,78	0,889
	G	SV	NK1	NK2	NK3								
	H	SV	NK1	NK2	NK3							PK	PK

Legenda: SV - slepi vzorec, NK - negativna kontrola, PK - pozitivna kontrola.

V vrstice A–F smo v stolpce od 2–12 vnesli po 100 µl gojišča RPMI-1640. V stolpec 1 smo vnesli po 200 µl osnovnih raztopin biocidov (vrstici A in B biocid 1, vrstici C in D biocid 2, vrstici E in F biocid 3). V vrsticah A–F smo naprej po stolpcih prenašali po 100 µl (vmes smo po 8-krat premešali s pipeto), tako da smo v vsakem naslednjem stolpcu biocid razredčili v razmerju 1 : 2. Zadnjih 100 µl (iz stolpca 12) smo zavrgli. Nato smo v

vse vdolbinice dodali po 100 µl razredčene suspenzije spor kulture plesni (za vsak izolat smo uporabili 1 mikrotitrsko ploščico).

V vrsticah G in H so bile kontrole, in sicer v stolpcu 1 slepi vzorec (200 µl sterilnega tekočega gojišča RPMI-1640), v stolpcih 2–4 negativne kontrole (100 µl sterilnega tekočega gojišča RPMI-1640 in 100 µl osnovne raztopine biocida), v stolpcih 11 in 12 v vrstici G je bila pozitivna kontrola (100 µl sterilnega tekočega gojišča RPMI in 100 µl razredčene suspenzije spor kulture plesni). Na koncu smo v vsako vdolbinico dodali še 40 µl indikatorja INT v koncentraciji 0,2 mg/ml. Pred inkubacijo smo mikrotitrsko ploščico premešali v stresalniku mikrotitrskih ploščic (pri 25/23 °C, 700 rpm, 1 min).

Mikrotitrsko ploščice smo inkubirali v temi pri sobni temperaturi (23–25 °C). Rezultate smo odčitali po 48 urah in znova po 7 dneh. Rast rožnatega micelija na dnu jamice je pomenil pozitiven rezultat. Odčitali smo, katere so bile najnižje koncentracije biocidov, ki so še preprečile razvoj kolonij rožnate barve in jih označili kot minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

Preverili smo tudi inokulum z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču: odvzeli smo 100 µl 24-urne kulture, jo prenesli v mikrocentrifugirko z 900 µl RR in naredili 10-kratne razredčitve. Po 100 µl razredčitev smo razmazali na plošče MEA in po 48-urni inkubaciji pri sobni temperaturi prešteli kolonije. Upoštevali smo plošče, na katerih je zraslo 15 do 150 kolonij in po formuli (2) izračunali inokulum.

3.2.6.3 Rastne krivulje za izolate plesni

Metodo smo uporabili z namenom, da bi preverili, ali MIC biocidov, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici, delujejo fungicidno ali fungistatično. Testirali smo le en, naključno izbran izolat plesni.

V tekočem gojišču RPMI-1640 smo pripravili raztopine z dvakrat višjo koncentracijami, kot smo jih določili za MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640 v

mikrotitrski ploščici (3.2.6.2). Osnovne raztopine biocidov (3.2.5.2) smo razredčili do ustrezne koncentracije. Kulture smo pripravili enako kot pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski plošči (3.2.6.2).

Za določitev rastnih krivulj smo v epruvete v dveh paralelkah odpipetirali 1 ml pripravljene suspenzije spor kulture plesni in 1 ml raztopine biocida, tako da je bila končna koncentracija biocida v epruveti enaka MIC. Rastno kontrolo sta sestavljala 1 ml suspenzije spor kulture plesni in 1 ml RPMI-1640 brez dodanega biocida. Epruvete smo inkubirali 24 ur pri sobni temperaturi. Da bi pridobili podatke o germinaciji spor, smo vzorčili v času 0, 6 h in 24 h in določili število CFU/ml z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MEA (Keele in sod., 2001; Krishnan-Natesan in sod., 2009).

3.2.7 Shranjevanje izolatov

3.2.7.1 Shranjevanje bakterijskih kultur

Bakterijske kulture smo precepili v 4 ml svežega gojišča BHI in za 24 ur inkubirali pri 37 °C. Nato smo v krioeprovete odpipetirali 0,8 ml 24-urne kulture in z injekcijsko brizgo dodali 0,2 ml glicerola (7 do 8 kapljic). Preden smo jih zamrznili na –80 °C, smo vsebino vsake krioeprevete 1 minuto mešali na vrtinčniku.

3.2.7.2 Shranjevanje glivnih kultur

Glivne kulture smo precepili na sveže gojišča OGYE in 7 dni inkubirali na 25 °C. V krioeprovete smo odpipetirali po 0,8 ml sterilne destilirane vode in z injekcijsko brizgo dodali 0,2 ml glicerola (7 do 8 kapljic). Nato smo s cepilno zanko iz gojišča postrgali spore oz. dele kolonij in jih prenesli v krioeprovete, v 20 % raztopino glicerola. Preden smo jih zamrznili na –80 °C, smo vsebino vsake krioeprevete 1 minuto mešali na vrtinčniku.

4 REZULTATI

Rezultati raziskovalnega dela so podani v 7 preglednicah in na 4 slikah. Razdeljeni so na 4 sklope, in sicer na kvantitativno preiskavo vzorcev (4.1), makro- in mikromorfološke lastnosti izolatov (4.2), določanje protibakterijske aktivnosti (4.3) in določanje protiglivične aktivnosti (4.4).

4.1 KVANTITATIVNA PREISKAVA VZORCEV

Rezultati kvantitativne preiskave vzorcev so prikazani v Preglednici 6. V njej lahko vidimo koncentracijo aerobnih mezofilnih bakterij, izoliranih na NA oz. CMC NA (aerobne mezofilne bakterije, ki rastejo na CMC kot edinem viru ogljika), in koncentracijo plesni. Koncentracije določenih mikroorganizmov so podane v CFU/g za vzorce V1–V5 oz. v CFU/cm² za vzorca notranjih površin (V7 in V8). Odstopanja so podana v obliki standardnega odklona. V določenih primerih (predvsem pri določanju koncentracije plesni) nismo dobili števnih plošč (na ploščah je zraslo manj kot 15 kolonij), zato smo koncentracije podali kot ocene.

Primerjava koncentracij določenih mikroorganizmov v vzorcih je prikazana na Sliki 7. Grafični prikaz Preglednice 6 s standardnimi odkloni je podan v Prilogi A4.

Preglednica 6: Koncentracije različnih skupin mikroorganizmov v vzorcih V1-V8.

Vzorec	Oznaka vzorca	Enota	Plesni	Aerobne mezofilne bakterije	Aerobne mezofilne bakterije, ki rastejo na CMC
				N ± SD	
suha CMC	V1		50* ± 70,7	225,0 ± 189,3	250,0 ± 100,0
tehnološka voda	V2		< 1	3* ± 1,3	15* ± 29,7
2,4 % raztopina CMC z biocidi	V3	CFU/g	< 1000	(1,3 ± 1,9) x 10 ⁵	(3,8 ± 4,5) x 10 ⁴
2 % raztopina CMC brez biocidov	V4		< 1000	126,3 ± 11,5	111,0 ± 23,0
končni izdelek	V5		500* ± 707	(4,3 ± 3,0) x 10 ⁴	(6,5 ± 3,3) x 10 ⁴
notranja površina izdelovalne posode	V7	CFU/cm ²	3* ± 4,8	(3,3 ± 2,1) x 10 ³	(2,9 ± 1,6) x 10 ³
notranja površina zalogovnika končnega izdelka	V8		5* ± 7,1	(8,5 ± 0,07) x 10 ⁴	(1,7 ± 0,55) x 10 ⁵

* ocena koncentracije (gojišča niso bila števna; na gojišču je zraslo < 15 kolonij)

Koncentracije mikroorganizmov so se gibale od manj kot 1 CFU/g do $(1,7 \pm 0,55) \times 10^5$ CFU/cm² v mikrobno bolj onesnaženih vzorcih. Najbolj mikrobno onesnaženi vzorci so 2,4 % raztopina CMC (V3), končni izdelek (V5) in notranja površina zalogovnika končnega izdelka (V8). Najnižje koncentracije vseh tipov mikroorganizmov vsebuje tehnološka voda (V2), sledi v laboratoriju pripravljena 2 % CMC (V4) in suha CMC (V1).

Najvišjo koncentracijo aerobnih mezofilnih bakterij je vsebovala 2,4 % raztopina CMC z biocidi (V3), in sicer $(1,3 \pm 1,9) \times 10^5$ CFU/g, sledili so notranja površina zalogovnika končnega izdelka (V8), končni izdelek (V5), notranja površina izdelovalne posode (V7), vzorec suhe CMC (V1) in 2 % raztopina CMC brez biocidov (V4).

Najvišjo koncentracijo aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na CMC kot edinem viru ogljika, je vsebovala notranja površina zalogovnika končnega izdelka (V8), in sicer $(1,7 \pm 0,55) \times 10^5$ CFU/cm². Sledili so končni izdelek (V5), 2,4 % raztopina CMC (V3), notranja površina izdelovalne posode (V7), suha CMC (V1) in 2 % CMC (V4).

Najvišja koncentracija plesni je po naši oceni prisotna v končnem izdelku (V5), in sicer okoli 500 CFU/ml. Podobna koncentracija je ocenjena tudi za vzorca V3 in V4. V vzorcih površin (V7 in V8) smo pridobili zelo nizke koncentracije plesni. V vodi plesni niso bile prisotne. Če pogledamo posamezne vzorce, je bila koncentracija plesni povsod nižja od koncentracije bakterij.

Razlike med koncentracijami aerobnih mezofilnih bakterij in aerobnih mezofilnih bakterij, ki rastejo na CMC, sicer so, vendar so večinoma istega velikostnega reda z izjemo V3 in V8. Da bi ugotovili, ali so te razlike signifikantne, bi morali napraviti statistično analizo, ki je zaradi premajhnega števila podatkov nismo izvedli.

4.2 MAKRO- IN MIKROMORFOLOŠKE LASTNOSTI IZOLATOV

Izolirali smo 34 bakterijskih in 15 glivnih izolatov. Bakterijske izolate smo označili z arabskimi številkami, glivne izolate pa z latinskimi črkami.

4.2.1 Bakterijski izolati

Dobili smo 34 bakterijskih izolatov. Opis makromorfoloških lastnosti bakterijskih izolatov je v Preglednici 7, mikromorfološke lastnosti pa so predstavljene v Preglednici 8.

Vsi bakterijski izolati so lahko rasli na CMC NA, torej na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika. Izolati št. 4, 6, 10, 13, 14, 16–18, 21, 24, 26, 28, 29, 32, 34 in 40 so boljše rasli na NA kot na CMC NA. Izolata št. 7 in 37 sta boljše rasla na CMC NA kot na NA. Pri ostalih izolatih je bila rast na obeh gojiščih približno enaka. Izolat št. 27 je imel na CMC NA drugačno morfologijo kot na NA. Na gojišču NA je rasel v obliki marelčno oranžnih kolonij, na CMC NA pa v obliki belih kolonij. Vsi izolati, razen št. 40, so bili po Gramu negativni (Preglednica 8).

Preglednica 7: Makromorfološke lastnosti bakterijskih izolatov po 5 dneh inkubacije na gojišču NA pri 23–25 °C.

Št. izolata	Barva	Oblika	Velikost (premer v mm)	Površina	Rob	Tekstura	Prosojnost	Profil	Izolirana iz vzorca
1	živo oranžna	O, nepravilna	2,5	s	gladek	mazava	-	izbočen	V4
2	svetlo oranžna	O	1	s	gladek	mazava	+	izbočen	V4
3	oranžno rumena	O	2,5	s	gladek	mazava	+	dvignjen, raven	V4
4	rumeno oranžna	O	do 3	s	gladek	mazava	-	izbočen	V4
5	rumena	O	1	r	gladek	mazava	-	izbočen	V4
6	mlečno rumena	O	1	r	gladek	mazava	+ / -	izbočen	V4
7	mlečno rumena	O	do 1,5	s	gladek	mazava	-	izbočen	V5
8	rumena	O	do 2,5	s	gladek	mazava	+ / -	izbočen	V2
9	rjavkasta (bež)	O	do 3	s	gladek	mazava	+	rahlo stožčast	V7

se nadaljuje ...

... nadaljevanje: **Preglednica 7: Makromorfološke lastnosti bakterijskih izolatov po 5 dneh inkubacije na gojišču NA pri 23–25 °C.**

Št. izolata	Barva	Oblika	Velikost (premer v mm)	Površina	Rob	Tekstura	Prosojnost	Profil	Izolirana iz vzorca
10	peščena	O	2	s	gladek	sluzasta	+	izbočen	V4
11	bela	O	do 2	r	gladek	mazava	+	nizek, raven	V4
12	bela	O	do 2	s	lomljen	mazava	+ / -	nizek, raven	V3
13	svetlo rumeno rjava	O, nepravilna	do 2,5	s, nagubana	naguban	mazava	+ / -	rahlo izbočen	V3
15	umazano bela	O	1,5	s	gladek	mazava	-	izbočen	V2
16	rumeno oranžna	pikčasta	do 1	s	gladek	mazava	+	izbočen	V2
17	bež	O	2,5	s	gladek	mazava	+	izbočen	V3
18	umazano bela	O, nepravilna	do 1,5	s	gladek	mazava	+	dvignjen, raven	V5
19	bela	O	do 2,5	r	gladek	sluzasta	-	stožčast	V5
21	bež	O	do 3	s	gladek	mazava	+	na sredi izbočen	V4
22	umazano bela	O	3	s, rahlo nagubana	lomljen	mazava	+	nizek, raven	V7
24	bela	O	2,5	s	gladek	mazava	+ / -	izbočen	V5
25	oranžno rumena	pikčasta	do 1,5	s	gladek	nemazava	+ / -	izbočen	V4
26	rumena	O	do 3	s	gladek	mazava	+	izbočen	V7
27	marelično oranžna	O	2	s	gladek	mazava	-	izbočen	V3
28	oranžna	pikčasta	do 1	s	gladek	mazava	+ / -	izbočen	V4
29	bež	O	do 4	s, nagubana	gladek	nemazava	+ / -	nizek, raven	V7
30	bež	O	3	s	gladek	mazava	+	izbočen	V8
31	rumena (kot čebelji vosek)	O	2,5	s, nagubana	nazobčan	mazava	+	nizek, raven	V8
33	bež	O	2	s	gladek	mazava	+	izbočen	V8
34	svetlo rjava	O	do 5	s, nagubana	neraven	mazava	+ / -	nizek, raven	V7
35	bež	O	do 4	s	nazobčan	mazava	+	na sredi izbočen	V7
37	rumena	O	2,5	s	gladek	mazava	+	rahlo stožčast	V8
38	oranžna	O	2	s	gladek	nemazava, vlečljiva	+	izbočen	V4
39	bež	O, nepravilna	do 5	s	gladek	sluzasta, mazava	-	izbočen	V1
40	bela	O	2,5	r	gladek	nemazava	-	izbočen	V1

Legenda: O – okrogla oblika, s – svetleča, gladka površina, r – hrapava, mat površina, + – prosojne kolonije, +/- – polprosojne kolonije, - – neprosojne kolonije. V1 – surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC; V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalogovnika končnega izdelka.

Preglednica 8: Mikromorfološke lastnosti bakterijskih izolatov (24-urne kulture).

Št. izolata	Barvanje po Gramu	Oblika (in formacija) celic
1	G –	kratke kokoidne palčke, kratke z zaobljenimi konci
2	G –	veliki diplokokki
3	G –	kratke palčke
4	G –	majhni stafilokoki
5	G –	veliki stafilokoki
6	G –	veliki stafilokoki
7	G –	veliki stafilokoki
8	G –	veliki stafilokoki
9	G –	palčke z zašiljenimi konci
10	G –	palčke z zašiljenimi konci
11	G –	kratke kokoidne oz. ovalne palčke, različne dolžine
12	G –	filamentozne, dolge palčke, raven rob
13	G –	kratke palčke
15	G –	diplokokki
16	G –	koki
17	G –	tanke palčke
18	G –	dolge ravne palčke z zaobljenimi konci
19	G –	veliki ovalni diplokokki
21	G –	majhni koki
22	G –	kratke kokoidne palčke
24	G –	stafilokoki
25	G –	debelejše zaobljene palčke, znotraj nekaterih prozoren krog
26	G –	ukrivljene palčke
27	G –	veliki koki
28	G –	kratke ovalne palčke
29	G –	debelejše zaobljene palčke, znotraj nekaterih prozoren krog
30	G –	daljše palčke
33	G –	palčke
34	G –	debelejše zaobljene palčke, znotraj nekaterih prozoren krog
35	G –	zaobljene palčke z zašiljenimi konci
37	G –	palčke
38	G –	različno dolge palčke
39	G –	veliki koki
40	G +	velike ovalne celice, prisotnost brstov, verjetno kvasovke

S pregledom pod mikroskopom smo ugotovili, da s 5 subkultivacijami v nekaterih primerih nismo uspeli dobiti čiste kulture (npr. izolati št. 19, 26, 38). Izolat št. 40 se je izkazal za kvasovke.

4.2.2 Izolati plesni

Pridobili smo 15 izolatov plesni. Po aerobni inkubaciji 5 dni pri sobni temperaturi (25 °C) na trdnem gojišču MEA smo kolonijam določili makromorfološke lastnosti (Preglednica 9). S pregledom pod mikroskopom smo po značilnih mikroskopskih strukturah izolatov plesni določili rod. Vsi izolati plesni so rasli tudi na drugih gojiščih, kot sta OGYE in MEA (npr. NA, CMC NA, MHA). Na njih so imeli drugačno morfologijo in v več primerih kasnejšo sporulacijo.

Preglednica 9: Makro in mikromorfološke lastnosti izolatov plesni na gojišču MEA.

Oznaka izolata	Vzorec	Barva kolonije	Oblika	Premjer (mm)	Eksudat	Reverz	Rod
A	V2	sivo zelena, bel zunanji kolobar (3 mm)	okrogla	do 25	brezbarven	brezbarven	<i>Penicillium</i>
B	V2	olivno zelena	nepravilna, nagubana	do 10	ne	črn	<i>Cladosporium</i>
C	V5	siva z belim zunanjim kolobarjem	okrogla, nizek zračni micelj, radialno naguban	do 30	brezbarven	brezbarven	<i>Penicillium</i>
D	V7	sivo zelena, kolobarji	okrogla	30	brezbarven	brezbarven	<i>Penicillium</i>
E	V3	sivo zelena, tanki kolobarji iste barve, zunanji kolobar bel	okrogla	30	brezbarven	brezbarven	<i>Penicillium</i>
F	V7	temno zelena, z belim zunanjim kolobarjem (2 mm)	okrogla, nizek zračni micelj	15	ne	brezbarven	<i>Penicillium</i>
G	V2	bela	okrogla	2	ne	brezbarven	*
I	V4	sivo zelena, zelo izraziti kolobarji	okrogla, bele tvorbe na zunanjem kolobarju	do 30	brezbarven	brezbarven	<i>Penicillium</i>
K	V4	bela, rjavi pigmenti v gojišču	okrogla, bel zračni micelj 5 mm v višino		ne	temno rjav	<i>Fusarium</i>
N	V2	sivo zelena	okrogla, nizek zračni micelj, na sredi izbočena z višjimi zračnimi hifami	do 25	brezbarven	svetlo rumeno zelen	<i>Penicillium</i>
O	V2	siva, zunanja kolobarja bel (2 mm) in rumen (2 mm)	okrogla	do 25	ne	rumen	<i>Penicillium</i>
P	V2	siva z belim zunanjim kolobarjem	okrogla, nizek zračni micelj, radialno naguban	do 30	brezbarven	živo	<i>Penicillium</i>
R	V1	bela	okrogla, nizek zračni micelj, redke hife	do 50	ne	brez reverza	*
S	V1	olivno zelena	okrogla, na sredi izbočena	20	ne	črn	<i>Cladosporium</i>
T	V1	siva, sivi kolobarji	okrogla, neraven rob, izbočena, nizek zračni micelj	do 15	ne	rjav	*

Legenda: V1– surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC; V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalogovnika končnega izdelka; * – rodu ni bilo mogoče določiti zaradi odsotnosti fruktifikacije.

4.3 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI BIOCIDOV

Primerjali smo protibakterijsko delovanje treh biocidov. Biocid 1 kot aktivno učinkovino vsebuje 4,6–5 % zmes cinkovega piritiona, 2-oktil-2H-izotiazol-3-ona, 3-jodo-2-propinil-butilkarbamata in cinkovega oksida. Biocid 2 vsebuje kot aktivni učinkovini 4,7–5,3 % 1,2-benzizotiazol-3-on in 4,7–5,3 % metilizotiazolinon. Biocid 3 vsebuje 14 % raztopino 5-kloro-2-metil-2H-izotiazolinona in 2-metil-2H-izotiazolinona. Za tri bakterijske izolate smo z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici določili MIC biocidov, nato smo pri teh koncentracijah (MIC) določili kinetiko rasti.

Izbrali smo tri bakterijske izolate, ki smo jih izolirali iz vzorcev z najvišjim skupnim številom mikroorganizmov (V3, V5, V7 in V8), tip kolonije pa je bil prisoten vsaj v 3 vzorcih in v največjem številu. Izbrali smo bakterijske izolate št. 9, 15 in 22. Izolat št. 9 je bil prisoten v 3 vzorcih, in sicer v V1 (surovina suha karboksimetilceluloza (CMC)), V7 (notranja površina izdelovalne posode) in V8 (notranja površina zalogovnika končnega izdelka). Izolat št. 15 je bil prisoten v vseh vzorcih razen v V8. Izolat št. 22 je bil prisoten v 5 vzorcih, in sicer V1, V4 (laboratorijsko pripravljena 2 % CMC), V5 (končni izdelek kalcitna vodna barva), V7 in V8. Lastnosti izbranih bakterijskih izolatov so opisane v Preglednicah 7 in 8, ocena njihove koncentracije v določenih vzorcih pa je podana v Preglednici 10. Njihove mikroskopske fotografije so v Prilogi B.

Bakterijski izolat št. 15 je v tekočem gojišču MHB boljše rasel pri 37 °C, ostala dva pa pri sobni temperaturi (25 °C).

Preglednica 10: Ocena koncentracije izbranih bakterijskih izolatov v vzorcih V1–V8.

Vzorec	Oznaka vzorca	Enota	Bakt. izolat št. 9	Bakt. izolat št. 15	Bakt. izolat št. 22
			Ocena koncentracije N*		
suha CMC	V1		< 100	150	< 100
tehnološka voda	V2		< 1	2	< 1
2,4 % raztopina CMC z biocidi	V3	CFU/g	< 1000	$3,5 \times 10^3$	< 1000
2 % raztopina CMC brez biocidov	V4		< 1	25	1
končni izdelek	V5		< 10	< 10	10
notranja površina izdelovalne posode	V7		$4,5 \times 10^3$	2	$1,2 \times 10^4$
notranja površina zalogovnika	V8	CFU/cm ²	$2,6 \times 10^5$	< 1	$1,9 \times 10^6$
končnega izdelka					

Legenda: V1 – surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC; V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalogovnika končnega izdelka

4.3.1 Določitev minimalnih inhibitornih koncentracij biocidov 1, 2 in 3 za izbrane bakterijske izolate

Z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici smo določili MIC za bakterijske izolate št. 9, 15 in 22. Razpon testiranih koncentracij je bil 0,258–528 µg/ml aktivne učinkovine za biocid 1, 0,776–1590 µg/ml aktivne učinkovine za biocid 2 in 0,889–1820 µg/ml aktivne učinkovine za biocid 3. MIC smo določali pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml. V takem številu sta bila v vzorcih prisotna izolata št. 9 in 22, in sicer na notranji površini zalogovnika končnega izdelka (Preglednica 10). Kot MIC smo vzeli tisto najnižjo koncentracijo biocida, pri kateri sta bili obe paralelki negativni za biološko aktivnost (se ni razvila rožnata barva po dodatku INT). Rezultati so podani v Preglednici 11.

Preglednica 11: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biocidov 1, 2 in 3 za izbrane bakterijske izolate.

	N _{št. 9} (CFU/ml)	MIC št. 9 (µg/ml)	N _{št. 15} (CFU/ml)	MIC št. 15 (µg/ml)	N _{št. 22} (CFU/ml)	MIC št. 22 (µg/ml)
Biocid 1	$2,6 \times 10^7$	264	$3,6 \times 10^6$	33,0	$1,7 \times 10^6$	264
Biocid 2	$1,8 \times 10^7$	199	$1,7 \times 10^6$	6,21	$1,7 \times 10^6$	199
Biocid 3	$1,8 \times 10^7$	14,2	$3,6 \times 10^6$	1,78	$1,1 \times 10^6$	1,78

N – koncentracija celic v inokulumu

Biocid 1 ima protibakterijsko delovanje v območju 33,0–264 µg/ml. Proti biocidu 1 je najbolj občutljiv bakterijski izolat št. 15, saj pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml kot MIC zadostuje že koncentracija 33,0 µg/ml. Bakterijska izolata št. 9 in 22 imata pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml 8-krat višjo MIC kot izolat št. 15.

Biocid 2 ima protibakterijsko delovanje v območju 6,21–199 µg/ml. Tudi proti temu je najmanj odporen bakterijski izolat št. 15, saj je za zaviranje njegove rasti pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml dovolj že 6,21 µg/ml biocida 2. Izolata št. 9 in 22 imata pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml 32-krat višjo MIC kot izolat št. 15.

Biocid 3 ima protibakterijsko delovanje v območju 1,78–14,2 µg/ml. Proti njemu sta najmanj odporna bakterijska izolata št. 15 in 22, saj je za zaviranje njihove rasti pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml dovolj že 1,78 µg/ml biocida 3. Izolat št. 9 ima pri številu bakterij 10^6 – 10^7 CFU/ml 8-krat višjo MIC kot izolata št. 15 in 22.

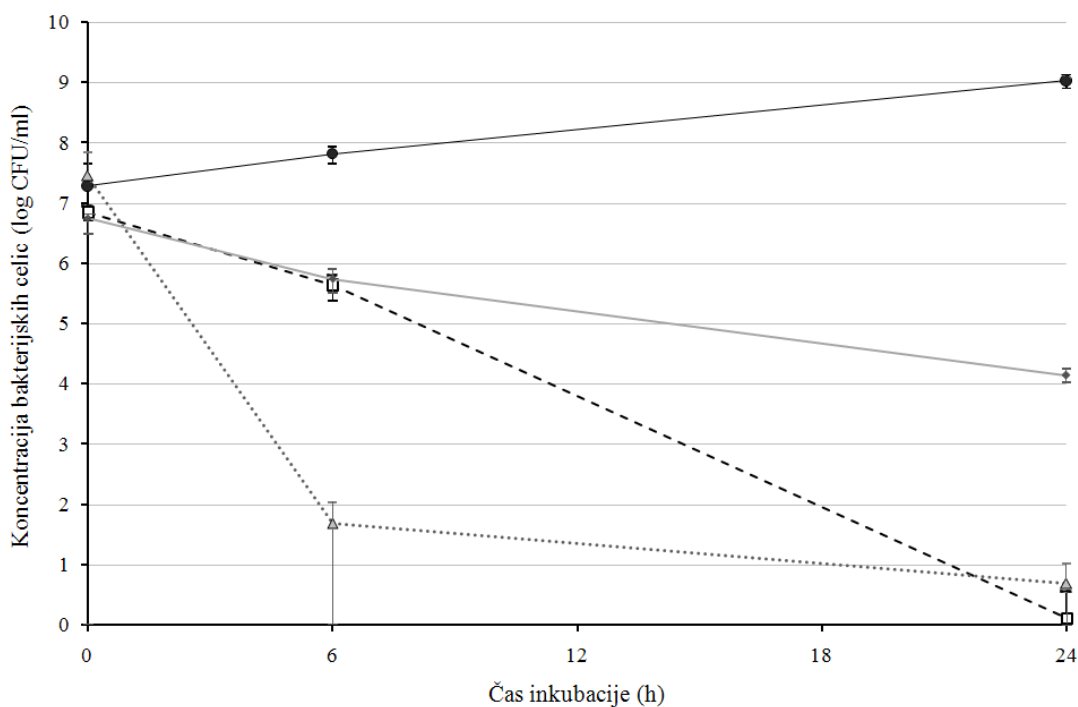
Proti vsem trem biocidom je torej najmanj odporen izolat št. 15, saj ima najnižje MIC v vseh treh primerih. Poleg tega se od izbranih treh izolatov v vzorcih pojavlja v najnižjem številu (Preglednica 10). Proti vsem trem biocidom je najbolj odporen izolat št. 9, saj ima v vseh treh primerih najvišje vrednosti MIC. Izolat št. 22 kaže višjo dovzetnost za biocid 3.

4.3.2 Rast bakterij v tekočem gojišču MHB z dodano minimalno inhibitorno koncentracijo posameznih biocidov

Na Slikah 7, 8 in 9 lahko vidimo učinek MIC posameznih biocidov na rast bakterijskih izolatov v tekočem gojišču MHB. Na Sliki 7 je prikazana rast bakterijskega izolata št. 9 brez dodanega biocida (pozitivna kontrola) in z dodanim biocidom 1 v koncentraciji 264 µg/ml, biocidom 2 v koncentraciji 199 µg/ml in biocidom 3 v koncentraciji 14,2 µg/ml. Na Sliki 8 je prikazana rast bakterijskega izolata št. 15 brez dodanega biocida (pozitivna kontrola) in z dodanim biocidom 1 v koncentraciji 33,0 µg/ml, biocidom 2 v koncentraciji 6,21 µg/ml in biocidom 3 v koncentraciji 1,78 µg/ml. Na Sliki 9 je prikazana rast bakterijskega izolata št. 22 brez dodanega biocida (pozitivna kontrola) in z dodanim

biocidom 1 v koncentraciji 264 µg/ml, biocidom 2 v koncentraciji 199 µg/ml in biocidom 3 v koncentraciji 1,78 µg/ml.

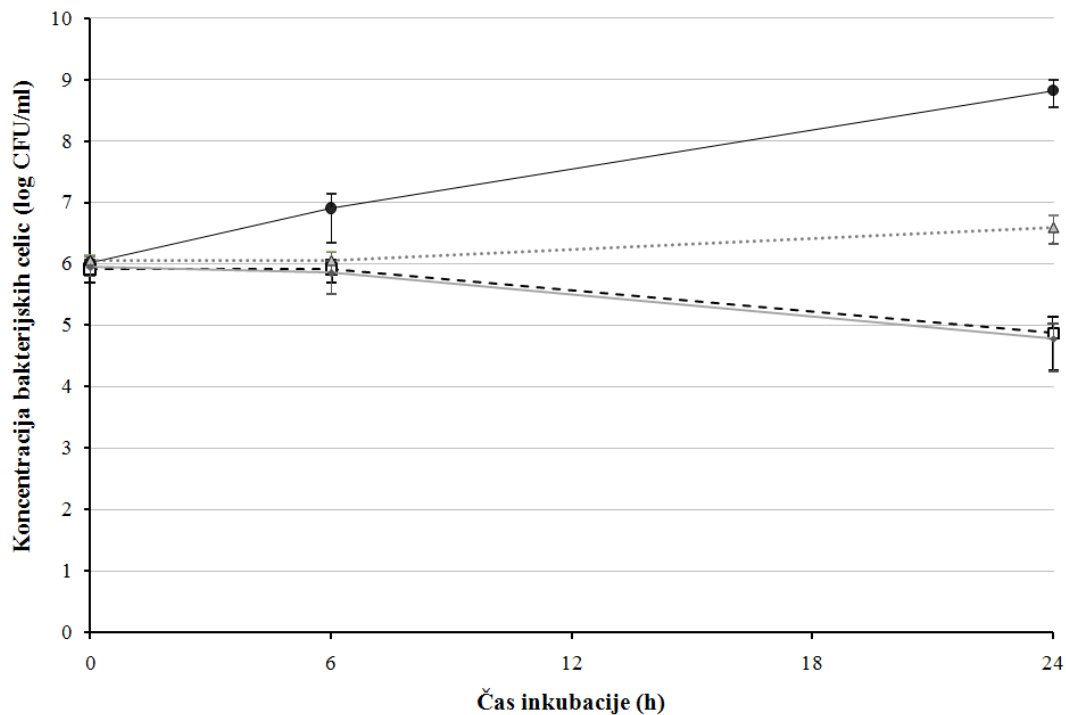
Če je bila po 24 urah inkubacije koncentracija bakterij za 90 % oz. 1 log enoto nižja v primerjavi s pozitivno kontrolo, je to pomenilo potrditev rezultata – vrednosti MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici (Burt, 2004).



Slika 7: Rast bakterijskega izolata št. 9 v gojišču MHB z dodanim biocidom
 (—●— brez biocida; -□- biocid 1; ...△... biocid 2; —◆— biocid 3).

Vsi trije biocidi v 24 urah zmanjšali koncentracijo celic bakterijskega izolata št. 9 za več kot 1 log enoto (Slika 7). Biocida 1 in 2 v koncentraciji 264 µg/ml (biocid 1) in 199 µg/ml (biocid 2) sta v 24 urah skoraj popolnoma uničila bakterijske celice, saj sta zmanjšala koncentracijo inokuluma za več kot 6 log enot, v primerjavi s pozitivno kontrolo pa za več kot 8 log enot (v primeru biocida 2 je bilo ob vzorčenju pri času 6 ur število bakterij < 100 CFU/ml, pri času 24 ur pa < 10 CFU/ml). Delovanje biocida 3 je bilo počasnejše kot delovanje biocidov 1 in 2. Biocid 3 v koncentraciji 1,78 µg/ml je v 24 urah zmanjšal koncentracijo inokuluma za 3 log enote, razlika s pozitivno kontrolo pa je v času 24 ur

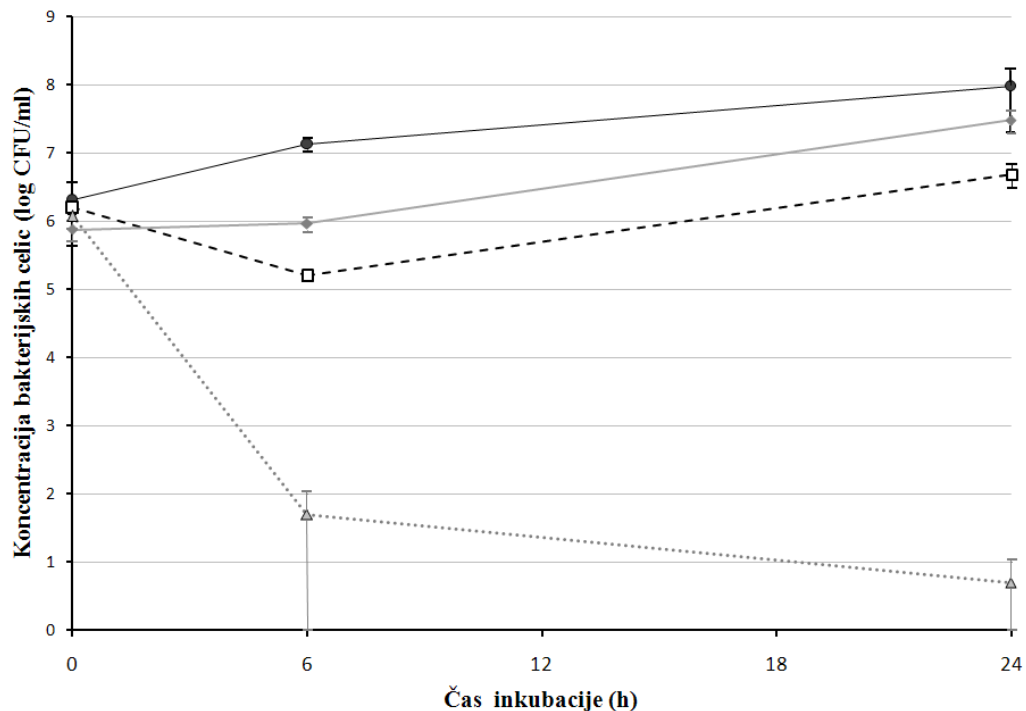
znašala 5 log enot. Vse tri MIC, ki smo jih določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, so torej zavirale rast bakterij. Delovanje vseh treh biocidov je pri danih koncentracijah verjetno baktericidno.



Slika 8: Rast bakterijskega izolata št. 15 v gojišču MHB z dodanim biocidom

(—●— brez biocida; -□- biocid 1; ...△... biocid 2; -◆- biocid 3).

Vsi trije biocidi so v 24 urah zmanjšali koncentracijo celic bakterijskega izolata št. 15 za več kot 1 log enoto (Slika 8). Biocida 1 in 3 sta pri danih koncentracijah (33,0 µg/ml za biocid 1 in 1,78 µg/ml za biocid 3) delovala podobno. V 24 urah sta znižala začetno koncentracijo celic za več kot 1 log enoto, v primerjavi s pozitivno kontrolo pa za približno 4 log enote. Delovanje biocida 2 v koncentraciji 6,21 µg/ml je bilo počasnejše kot delovanje biocidov 1 in 3. Biocid 2 je upočasn timer rast bakterijskega izolata št. 15 v primerjavi s pozitivno kontrolo, saj je bila po 24 urah koncentracija celic v kontroli za 2 log enoti višja kot v primeru dodanega biocida 2. Vse tri vrednosti MIC, ki smo jih določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, so torej zavirale rast bakterij.



Slika 9: Rast bakterijskega izolata št. 22 v gojišču MHB z dodanim biocidom

(—●— brez biocida; —□— biocid 1; ...△... biocid 2; —◆— biocid 3).

V 24 urah so vsi trije biocidi zmanjšali koncentracijo celic bakterijskega izolata št. 22, vendar ne vsi za več kot 1 log enoto (Slika 9). Biocid 2 v koncentraciji 199 µg/ml je v 24 urah zmanjšal koncentracijo celic izolata št. 22 za več kot 5 log enot, v primerjavi s kontrolo pa je bila koncentracija nižja za več kot 7 log enot. Pri časih 6 in 24 ur je bila koncentracija bakterij manj kot 100 oz. 10 CFU/ml. Ostala dva biocida sta v primerjavi s kontrolo upočasnila rast izolata št. 22; biocid 1 v koncentraciji 264 µg/ml je po 6 urah zmanjšal začetno koncentracijo celic za 1 log enoto, v primerjavi s pozitivno kontrolo po 6 urah pa je bila koncentracija celic nižja za skoraj 2 log enoti. Biocid 3 v koncentraciji 1,78 µg/ml ni zmanjšal začetne koncentracije celic, vendar je koncentracijo celic zadržal nižjo od koncentracije celic pri pozitivni kontroli; po 6 urah inkubacije je bila koncentracija celic nižja za približno 1 log enoto, po 24 urah pa le še za približno 0,5 log. Biocid 3 v koncentraciji, določeni kot MIC z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici, ni inhibiral bakterijskega izolata št. 22 v zadostni meri (ni zmanjšal števila bakterij za vsaj 90 % v

primerjavi s pozitivno kontrolo), da bi pri metodi rastnih krivulj lahko dano koncentracijo vzeli za MIC. Tudi dane koncentracije biocida 1 ne moremo z gotovostjo vzeti za MIC, saj je v tem primeru rezultat (število bakterij) po 24-urni inkubaciji znotraj odklona pozitivne kontrole. Biocid 2 je v koncentraciji 199 µg/ml na bakterijski izolat št. 22 verjetno deloval baktericidno.

4.4 DOLOČANJE PROTIGLIVNE AKTIVNOSTI BIOCIDOV

Izbrali smo tri izolate plesni, ki so imeli najpogostejši tip kolonije in dobro sporulacijo. Izbrali smo izolate plesni E, O in S. Njihove lastnosti so opisane v Preglednici 9, fotografije njihovih nativnih preparatov pa so prikazane v Prilogi B.

4.4.1 Določitev minimalnih inhibitornih koncentracij biocidov 1, 2 in 3 za izbrane izolate plesni

Z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici smo določili MIC za izolate plesni E, O in S. Kot MIC smo vzeli tisto najnižjo koncentracijo biocida, pri kateri sta bili obe paralelki negativni za biološko aktivnost oz. kjer se niso pojavile rožnate kolonije. Rezultati so podani v Preglednici 12.

Preglednica 12: Minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) biocidov 1, 2 in 3 za izbrane izolate plesni.

	N _E	MIC E	N _O	MIC O	N _S	MIC S
	(CFU/ml)	(µg/ml)	(CFU/ml)	(µg/ml)	(CFU/ml)	(µg/ml)
Biocid 1	5,3 x 10 ³	1,03	3,0 x 10 ³	0,516	8,0 x 10 ³	0,516
Biocid 2	5,3 x 10 ³	66,2	3,0 x 10 ³	33,1	8,0 x 10 ³	33,1
Biocid 3	5,3 x 10 ³	0,889	3,0 x 10 ³	0,889	8,0 x 10 ³	0,889

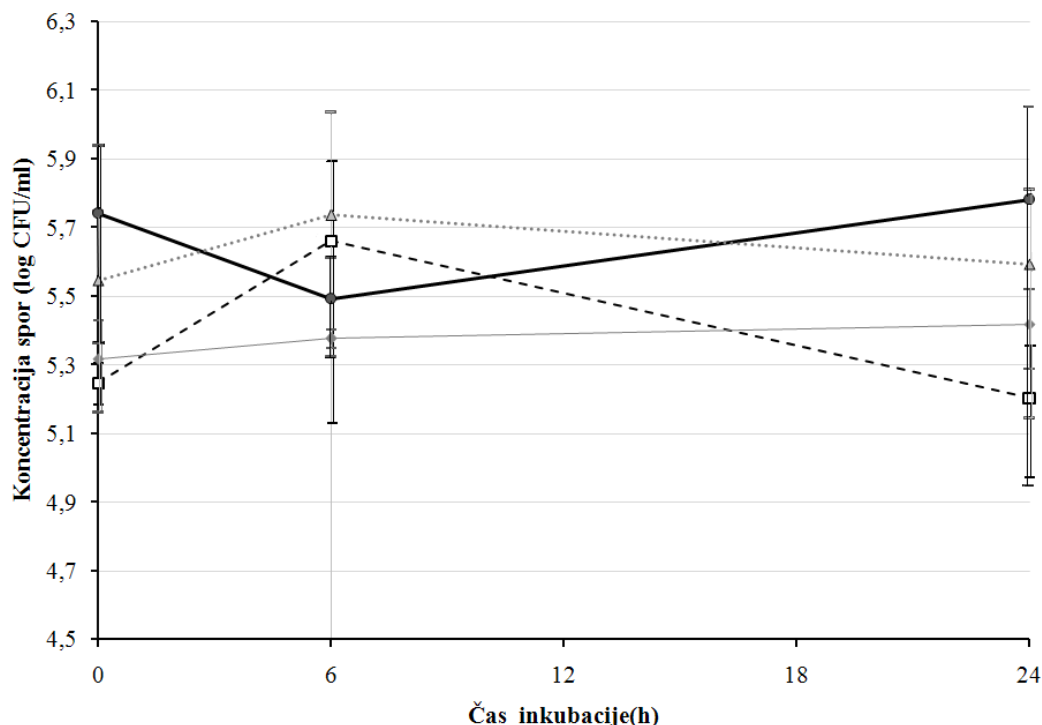
N – koncentracija celic v inokulumu

V Preglednici 12 so podane MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, za določeno koncentracijo spor. Koncentracijo spor inokuluma smo določili s štetjem pod mikroskopom in rezultat preverili z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču MEA.

Končna koncentracija spor je bila nekoliko nižja, kot smo jo določili s štetjem pod mikroskopom (3.2.6.2) in kot jo metoda zahteva. Vzroka sta lahko, da vse spore niso bile viabilne ali pa se spore pri razredčevanju v razredčevalni raztopini niso enakomerno porazdelile (Rex in sod., 2008).

4.4.2 Rast plesni v tekočem gojišču RPMI-1640 z dodano minimalno inhibitorno koncentracijo posameznih biocidov

Rastne krivulje v tekočem gojišču smo določili le za en naključno izbrani izolat plesni, in sicer za izolat O, ki je imel najboljšo sporulacijo. Na Sliki 10 lahko vidimo učinek posameznih biocidov na rast izolata plesni O v primerjavi s pozitivno kontrolo. Biocid 1 smo dodali v koncentraciji 0,516 µg/ml, biocid 2 v koncentraciji 33,1 µg/ml in biocid 3 v koncentraciji 0,889 µg/ml.



Slika 10: Rast izolata plesni O v gojišču RPMI-1640 z dodanim biocidom
(—●— brez biocida; -□- biocid 1; ...△... biocid 2; —◆— biocid 3).

Glede na rezultate na Sliki 10 dodatek MIC biocidov ni vplival na viabilnost spor izolata O. Koncentracije se po 6 in 24 urah niso bistveno spremenile v primerjavi s kontrolo in začetnim inokulumom. Če bi biocidi v danih koncentracijah imeli fungicidno oz. sporocidno delovanje, bi morala biti koncentracija spor po 24 urah nižja od koncentracije inokuluma (Krishnan-Natesan in sod., 2008). Možen razlog, da nismo potrdili fungicidnega delovanja MIC, določenih z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici, je verjetno prekratek čas trajanja poskusa ali pa prenizka koncentracija spor v prejšnji metodi, zato so bile MIC za to koncentracijo spor (10^5 – 10^6 CFU/ml) prenizke. Verjetno bi morali uskladiti število spor pri obeh metodah oz. ponoviti celoten postopek ter podaljšati čas inkubacije.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Kvantitativna preiskava vzorcev

Določali smo koncentracijo aerobnih mezofilnih bakterij in gliv. Pri rezultatih je prišlo do zelo velikih odstopanj v obliki standardnega odklona, zato lahko v večini primerov rečemo, da smo dobili le ocene koncentracije mikrobov. Do tako velikega standardnega odklona (SD) je lahko prišlo zaradi uporabe neprimernih metod izolacije oz. manj primernih gojišč, neprimernega načina vzorčenja in/ali premalo ponovitev. Težko se je bilo odločiti, katere plošče oz. razredčitve bomo upoštevali pri določanju skupnega števila, še posebej zato, ker veliko plošč ni bilo števnih, saj niso vsebovale 15–300 kolonij (SIST EN ISO 4833).

Za izolacijo aerobnih bakterij so avtorji uporabljali osnovna mikrobiološka gojišča, kot je NA (Dey, 2004; Obidi in sod. 2009a; Obidi in sod., 2009b; Obidi in sod. 2010), ali difencialna gojišča, kot sta krvni agar (La Rosa in sod., 2008) in MacConkey agar (Obidi in sod., 2009b; Obidi in sod., 2010). Razmere inkubacije so bile nekoliko drugačne kot pri naši metodi, in sicer so plošče aerobno inkubirali pri 37 °C 24 ur (Obidi in sod., 2009a) oz. 1–2 dni (Obidi in sod., 2010), medtem ko smo mi plošče inkubirali pri sobni temperaturi (25–28 °C) 5 dni. Obidi in sod. (2009b) so, podobno kot mi, plošče inkubirali pri sobni temperaturi (33 ± 3 °C) 2–5 dni.

Večina avtorjev je za izolacijo plesni uporabljala gojišča dikloran - 18 % glicerol agar (DG-18) (Pasanen in sod. 2000; Hyvärinen in sod., 2002; Salonen in sod., 2007), sladni agar (MEA) (Hyvärinen in sod., 2002; Dey in sod., 2004; Salonen in sod., 2007), krompirjev dekstrozni agar (PDA) (La Rosa in sod., 2008; Obidi in sod., 2009a) ali Sabourad dekstrozni agar (SDA) (Shirakawa in sod., 2001) brez dodanih antibiotikov, medtem ko smo mi uporabili OGYE agar z dodanim antibiotikom oksitetraciklinom. Med objavami nismo zasledili, da bi OGYE agar uporabili v kateri od tovrstnih raziskav. Razmere izolacije so bile podobne kot pri naši metodi, in sicer je inkubacija trajala 72 ur

(Obidi in sod., 2009a) oz. 3–5 dni pri sobni temperaturi 30 ± 2 °C (Obidi in sod., 2010) Glede na to, da so izolati plesni rasli tudi na drugih gojiščih, kot so NA, CMC NA in MHA, lahko zaključimo, da smo izolirali plesni, ki so ubikvitarne in nezahtevne za rast. Z uporabo več različnih gojišč za izolacijo bi morda lahko ugotovili višjo koncentracijo gliv in izolirali več različnih vrst organizmov.

Glede na koeficient variacije (Preglednica 6) je od uporabljenih za izolacijo bakterij najbolj primerno gojišče NA (povprečni koeficient variacije je 59,5 %), CMC gojišče ima namreč višja odstopanja (povprečni koeficient variacije je 73,6 %). OGYE agar se je izkazal kot manj primeren za izolacijo plesni iz barv (povprečni koeficient variacije je 146,2 %), saj so na njem zrasle le posamezne kolonije plesni. Zaradi dodanega antibiotika oksitetraciklina na OGYE agarju bakterije namreč ne rastejo (razen proti oksitetraciklinu odporni sevi) (Mossel, 1970), morale pa bi rasti glive. Glivam ali to gojišče ni ustrezalo, saj so posamezne kolonije rasle na NA in CMC, ali pa so bile v vzorcih res prisotne v zelo nizkem številu.

Nekateri vzorci, npr. V3 (polizdelek 2,4 % raztopina CMC) in V5 (končni izdelek), so vsebovali biocide, zato obstaja verjetnost, da nekateri mikrobi pri nižjih redčitvah niso zrasli zaradi inhibitornega učinka biocidov (števne so bile šele višje razredčitve, pri nižjih pa je bilo kolonij na ploščah manj kot 15). Problematični so bili tudi nekateri vzorci; za vzorec suhe karboksimetilceluloze (V1) smo imeli najnižjo redčitev 10^{-2} , saj je bil vzorec pri nižjih redčitvah preveč viskozen in se ga ni dalo pipetirati. Pri vzorcu notranje površine zalogovnika končnega izdelka (V8) se je izkazalo, da smo naredili premalo razredčitev, saj so bile plošče NA in CMC NA pri najvišji razredčitvi 10^{-4} neštevne in so večinoma vsebovale več kot 300 kolonij (števna je bila ena paralelka, druga paralelka pa ne).

Vzorci V1 (CMC v prahu), V2 (tehnološka voda) in V4 (laboratorijsko pripravljena raztopina CMC) niso vsebovali biocidov, zato bi v njih lahko pričakovali višjo koncentracijo mikrobov. Po drugi strani ti vzorci mikrobom ne nudijo primernih razmer za rast. V1 je suha snov z nizko vodno aktivnostjo, odsotnost proste vode pa mikroorganizmom onemogoča rast. V1 je vseboval $(2,3 \pm 1,9) \times 10^2$ CFU/g aerobnih mezofilnih bakterij in $(2,5 \pm 1,0) \times 10^2$ CFU/g aerobnih bakterij, ki lahko rastejo na CMC.

Gliv je vseboval okoli 50 CFU/g. Surovina očitno ni močno onesnažena z mikroorganizmi, glede na to, da so bile koncentracije mikroorganizmov v karboksimetilceluloznih zgoščevalcih zabeležene celo med 10^8 in 10^9 CFU/g, izolirani pa so bili proteolitični in celulolitični mikroorganizmi (Tothill in Seal, 1993). Vseeno smo pričakovali višjo koncentracijo plesni, saj bi takšen vzorec lahko vseboval več njihovih spor. V2 je tehnološka voda, surovina za izdelavo barv, ki jo pred uporabo tretirajo z UV svetlobo in tako v njej občutno zmanjšajo skupno število mikrobov. Tehnološka voda je vsebovala manj kot 1 CFU/g gliv, manj kot 10 CFU/g aerobnih mezofilnih bakterij in manj kot 50 CFU/g aerobnih bakterij, ki lahko rastejo na CMC. V primeru, da je voda onesnažena, lahko vsebuje do 10^7 CFU/ml aerobnih bakterij in 10^4 CFU/ml gliv (Obidi in sod., 2009a). V4 je laboratorijsko pripravljena 2 % raztopina CMC in je vzorec, dejansko sestavljen iz V1 in V2. Po koncentraciji mikroorganizmov je V4 nekje vmes med vzorcema V1 in V2, in sicer vsebuje manj kot 1000 CFU/g gliv (najnižja razredčitev na plošči je bila 10^{-3}) in $(1,3 \pm 0,1) \times 10^2$ CFU/g aerobnih mezofilnih bakterij in $(1,2 \pm 0,2) \times 10^2$ CFU/g aerobnih bakterij, ki rastejo na CMC.

Vzorca V3 (2,4 % raztopina CMC) in V5 (končni izdelek) sta vsebovala biocide, vendar sta imela tudi precej visoko koncentracijo aerobnih mikroorganizmov (10^4 – 10^5 CFU/g). Koncentracija gliv je bila v obeh primerih 1000 CFU/ml. V sveži, mikrobiološko čisti barvi je skupno število aerobnih bakterij okoli 10 CFU/ml. Prav tako koncentracijo naj bi imele tudi glive. Pokvarjene barve imajo lahko skupno koncentracijo aerobnih bakterij do $3,4 \times 10^{10}$ CFU/ml, koncentracijo koliformnih bakterij $2,9 \times 10^7$ CFU/ml in koncentracijo gliv $3,2 \times 10^5$ CFU/ml (Obidi in sod., 2009b). Koncentracija mikroorganizmov v vzorcih V3 in V5 kaže, da sta vzorca vsebovala proti biocidom odporne mikroorganizme ali pa je bil biocid v uporabljeni koncentraciji neučinkovit. Ne vemo pa, kako ti mikroorganizmi vplivajo na rok trajanja barvnih proizvodov in ali biocidi nanje delujejo bakteriostatično.

Vzorca V7 in V8 sta notranji površini izdelovalne posode (V7) in zalogovnika s končnim izdelkom (V8) in imata glede na naše hipoteze (1.2) pričakovano najvišjo koncentracijo mikrobov, saj so posode na vrhu izpostavljene zraku in usedanju prahu na površino. Če se pred novim polnjenjem posode ne opere, je ostanek v njej lahko vir za kontaminacijo nove barve. Vir kontaminacije je lahko tudi biofilm, ki ga lahko tvorijo mikrobi ob steni, če se

ga pred ponovno uporabo posod temeljito ne odstrani (Winkowski, 2002). V8 je precej bolj mikrobno onesnažen kot V7, kar je verjetno posledica pogostosti čiščenja. V7 čistijo enkrat tedensko, V8 pa manj kot dvakrat mesečno (3.1.1).

V nekaterih vzorcih (voda, končni izdelek in bris zalogovnika končnega izdelka) je bila koncentracija bakterij, ki rastejo na CMC, višja kot koncentracija bakterij, izoliranih na NA. To bi lahko pomenilo pojav specializiranih tipov bakterij, ki lahko rastejo le na CMC. Pri vzorcu vode lahko to trditev ovržemo, saj voda načeloma ne vsebuje celuloznih ostankov. V primeru, da odpadno vodo reciklirajo (jo očistijo in ponovno uporabijo kot topilo v procesu), bi lahko vsebovala organske snovi, predvsem celulozne ostanke. Takšna voda je lahko izvor kontaminacije, če ni ustrezno protimikrobno obdelana (Dey in sod., 2004).

Po naši oceni koncentracija plesni v nobenem vzorcu ni bila višja od koncentracije bakterij. Najvišje ocenjeno koncentracijo plesni najdemo v končnem izdelku (V5), na drugem mestu pa je suha CMC (V1), ki vsebuje 10-krat nižjo koncentracijo plesni kot V5.

5.1.2 Določitev makro- in mikromorfoloških lastnosti

Vsi bakterijski izolati, razen št. 40, pri katerem se je izkazalo, da gre za kvasovke, so bili po Gramu negativni. Tudi La Rosa in sod. (2008) so iz vodnih barv izolirali le po Gramu negativne bakterije.

Bakterijske izolate smo poleg na NA nacepili tudi na CMC NA, saj to gojišče vsebuje karboksimetilcelulozo kot edini vir ogljika. V primeru, da so bakterijski izolati rasli na CMC NA, je to pomenilo, da so sposobni razgrajevati vsaj eno od sestavin barv (ob predpostavki, da kot vir ogljika ne uporabljajo katere druge molekule iz gojišča NA) in so lahko odgovorni za krajšo obstojnost barvnih izdelkov. Hkrati je bila to potrditev, da smo jih res izolirali iz naših vzorcev (in niso rezultat kontaminacije). Izkazalo se je, da so vsi izolati sposobni rasti na CMC NA. Dva bakterijska izolata (št. 7 in 37) sta bolje rasla na CMC NA, kar lahko nakazuje razvoj specializiranih sevov za razgradnjo CMC.

Mikro- in makromorfološke lastnosti bakterijskih izolatov nakazujejo raznolike mikrobne združbe v vzorcih. Izolirali smo tako po Gramu negativne koke, večinoma stafilokoke, kot po Gramu negativne bacile oz. paličaste bakterije različnih velikosti. Nekateri med izolati (npr. št. 18, 25, 29 in 34) so bili verjetno sporogeni, kar jim lahko omogoča odpornost proti biocidom (Russell, 1995).

Najpogostejši rod plesni, ki smo ga izolirali, je bil *Penicillium*. Iz tega rodu je bila iz svežih barv pogosto izolirana vrsta *P. citrinum* (Obidi in sod., 2009a; Obidi in sod., 2009b; Obidi in sod., 2010). Izolirali smo 9 različnih sevov rodu *Penicillium*, 2 seva rodu *Cladosporium*, 1 sev rodu *Fusarium* in 3 seve, ki jim zaradi odsotnosti značilnih mikrostruktur nismo mogli določiti rodu. Glivnih izolatov rodu *Aspergillus*, ki velja za najpogostejše prisotno plesen v barvi (Obidi in sod., 2009a), nismo izolirali. Glive (plesni) pogosteje najdemo na že nanesenem sloju barve. V sveži barvi pa jih lahko najdemo v obliki površinske rasti (Gillatt, 2002).

Številčne zastopanosti posameznih izolatov v vzorcih konkretno nismo določali, smo pa ocenili, koliko naj bi bilo v posameznem vzorcu bakterijskih izolatov (št. 9, 15 in 22), izbranih za določanje biocidne aktivnosti. Najvišjo koncentracijo smo ocenili za bakterijski izolat št. 22, in sicer $1,9 \times 10^6$ CFU/cm² v vzorcu V8 (notranja površina zalogovnika končnega izdelka). Relativno visoko koncentracijo je imel tudi v vzorcu V7 (notranja površina izdelovalne posode), in sicer $1,2 \times 10^4$ CFU/cm². Bakterijski izolat št. 9 se je pojavljal v vzorcih v približno 10-krat nižjih koncentracijah kot izolat št. 22, in sicer v koncentraciji $4,5 \times 10^3$ CFU/cm² v V7 in $2,6 \times 10^5$ CFU/cm² v V8. Za ostale vzorce smo ocenili, da je bila koncentracija izolatov št. 9 in 22 < 1000 CFU/ml. Izolat št. 15 je imel najvišjo koncentracijo v vzorcu V3 (2,4 % raztopina CMC z biocidi), in sicer $3,5 \times 10^3$ CFU/ml, v ostalih vzorcih pa je bila njegova koncentracija prav tako < 1000 CFU/ml oz. CFU/cm² (Preglednica 10).

5.1.3 Testiranje biocidne aktivnosti

MIC je najnižja koncentracija protimikrobnega sredstva, ki vidno inhibira rast testiranega organizma (Mourey in Canillac, 2002; Rex in sod., 2008). Določimo jo lahko vizualno ali spektrofotometrično na podlagi rasti ali metabolne aktivnosti z dodatkom tetrazolijeve soli npr. INT (Eloff, 1998; Mourey in Canillac, 2002; Burt, 2004). INT (2-p-jodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil tetrazolijev klorid) je tetrazolijeva sol, ki je reducirana ob prisotnosti dehidrogenaz, pri tem pride do spremembe barve (Eloff, 1998). Merjenje dehidrogenazne aktivnosti kaže na celokupno oksidativno aktivnost celic, saj obstaja mnogo različnih specifičnih dehidrogenaznih sistemov, ki so udeleženi v metabolni aktivnosti mikroorganizmov. Aktivni mikroorganizmi v celici kopičijo kristale formazana (Danevčič in Mandič-Mulec, 2007). Uporaba tetrazolijevih soli pri določanju vrednosti MIC je primerna le za aerobne organizme in ne za mikroaerofilne (Klančnik in sod., 2010). V primeru bakterijske rasti se je gojišče v vdolbinici obarvalo rožnato, v primeru rasti plesni, pa so zrasle drobne rožnate kolonije. Vrednosti MIC smo odčitali vizualno.

Za bakterijske izolate so bile vrednosti MIC v tekočem gojišču MHB v območju 33,0–264 µg/ml za biocid 1, 6,21–199 µg/ml za biocid 2 in 1,78–14,2 µg/ml za biocid 3. Največje območje protibakterijskega delovanja ima torej biocid 2, saj je bila najvišja vrednost MIC (za bakterijska izolata št. 9 in 22) 32-krat višja od najnižje MIC (za bakterijski izolat 15). V primeru biocida 1 in 3 so bile najvišje vrednosti MIC 8-krat višje od najnižjih. Glede na koncentracijo je bil proti vsem bakterijskim izolatom najbolj učinkovit biocid 3, saj je imel območje vrednosti MIC v najnižjih koncentracijah, najmanj pa biocid 1, ki je imel območje vrednosti MIC v najvišjih koncentracijah (Preglednica 11).

Za izolate plesni so bile vrednosti MIC v tekočem gojišču RPMI-1640 v območju 0,516–1,03 µg/ml za biocid 1, 33,1–66,2 µg/ml za biocid 2 in $\leq 0,889$ µg/ml za biocid 3. Predvidoma najmanjše območje protiglivnega delovanja ima biocid 3, ki je preprečil rast vseh treh izolatov plesni pri najnižji testirani koncentraciji. Glede na koncentracijo je bil proti vsem izolatom plesni najmanj učinkovit biocid 2, saj je imel območje vrednosti MIC

v najvišjih koncentracijah. Biocida 1 in 3 sta imela območje vrednosti MIC v primerljivih koncentracijah, in sicer v območju blizu ali $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ (Preglednica 12).

Biocid 1 vsebuje 2,5–10 % 3-jodo-2-propinilbutilkarbamat (IPBK), < 5 % cinkov oksid (ZnO), < 0,6 % cinkov pirition in < 0,5 % 2-oktilizotiazol-3-on (OIT). Koncentracija IPBK v območju vrednosti MIC biocida 1 za bakterije je 17,2–550 $\mu\text{g/ml}$, v območju vrednosti MIC za plesni pa 0,269–2,15 $\mu\text{g/ml}$. Koncentracija OIT v območju vrednosti MIC biocida 1 za bakterije je < 3,44 do < 27,5 $\mu\text{g/ml}$, v območju vrednosti MIC za plesni pa < 0,0537 do < 0,107 $\mu\text{g/ml}$. Koncentracija ZnO v območju vrednosti MIC biocida 1 za bakterije je od < 34,4 do < 275 $\mu\text{g/ml}$, v območju vrednosti MIC za plesni pa < 0,537 do < 1,07 $\mu\text{g/ml}$. Koncentracija cinkovega piritiona v območju vrednosti MIC biocida 1 za bakterije je od < 4,12 do < 33 $\mu\text{g/ml}$, v območju vrednosti MIC za plesni pa od < 0,0644 do < 0,129 $\mu\text{g/ml}$.

Biocid 1 ima po sestavi pretežno protiglivo delovanje. To potrjujejo tudi naši rezultati, saj so bile vrednosti MIC najnižje za 2 izolata plesni, za bakterijske izolate pa najvišje. Glede na podatke iz literature o vrednostih MIC posameznih aktivnih učinkovin biocida 1 sta glavni komponenti 3-jodo-2-propinilbutilkarbamat (IPBK) in 2-oktilizotiazol-3-on (OIT), saj se vrednosti MIC najboljše ujemajo z našimi eksperimentalnimi vrednostmi MIC plesni (Lidert in sod., 1997; Winkowski, 2004). V območju vrednosti MIC biocida 1 za plesni je IPBK v koncentracijah 0,269–2,15 $\mu\text{g/ml}$, kar se ujema s poročanjem Liderta in sod. (1997), da so vrednosti MIC IPBK za glive v območju 0,1–25 $\mu\text{g/ml}$. V območju vrednosti MIC biocida 1 za plesni je OIT v koncentracijah od < 0,0537 do < 0,107 $\mu\text{g/ml}$, kar je še nižje od poročanj Nicholisa (2004), da so vrednosti MIC OIT v območju 0,5–10 $\mu\text{g/ml}$. Cinkovi spojini verjetno delujeta sinergistično z OIT in IPBK, saj imata sicer mnogo višje vrednosti MIC, kot je njuna koncentracija v območju vrednosti MIC biocida 1. Cinkov oksid ima fungistatično delovanje (Salvin, 1994), poleg tega pripomore k hitrejšemu sušenju barvnega sloja (King, 1995), cinkov pirition pa je protibakterijska komponenta (Nichols, 2004). Hkrati lahko predstavlja kombinacija štirih protimikrobnih snovi sistem večkratnih ovir za mikrobno rast.

Biocid 2 vsebuje 5 % 1,2-benzizotiazolon (BIT) in 5 % metilizotiazolinon (MIT). Biocid 2 je imel za bakterije vrednosti MIC v območju 6,21–199 $\mu\text{g/ml}$, kar je višje, kot je poročal

Gillatt (2002), in za plesni v območju 33,1–66,2 µg/ml. Od vseh treh biocidov je imel najvišje vrednosti MIC za glivne izolate, kar potrjuje podatke iz literature o šibkejšem fungicidnem delovanju (Winkowski, 2004; Gillatt, 2004).

Biocid 3 vsebuje 14 % raztopino 5-kloro-2-metil-2H-izotiazolona in 2-metil-2H-izotiazolona. V kombiniranem biocidu CIT/MIT je razmerje med aktivnima učinkovinama navadno 3 : 1 (McCoy in sod., 1986; Sondossi in sod., 1999; Rafoth in sod. 2007). Biocid 3 je imel najnižje vrednosti MIC za vse bakterijske in za 1 izolat plesni. Vrednosti MIC biocida 3 za bakterijske izolate so v območju 1,78–14,2 µg/ml, kar je primerljivo s podatki iz literature (2.5.1) za izolate plesni pa v območju $\leq 0,889$ µg/ml.

Vsi trije biocidi predstavljajo zmes vsaj dveh aktivnih učinkovin. Prednosti zmesi aktivnih učinkovin so uporaba nižjih koncentracij aktivnih učinkovin, kar lahko pomeni nižje stroške in hkrati okolju prijaznejši proizvod, boljšo topnost manj topnih učinkovin in boljšo kompatibilnost s sestavinami barve (Winkowski, 2004). Vsi trije biocidi vsebujejo med aktivnimi učinkovinami izotiazolone. Prednosti uporabe izotiazolonov so, da se jih lahko uporablja v širokem območju pH in so kompatibilni s številnimi kemikalijami. Deaktivira jih H₂S (Videla, 2002). MIT in CIT danes veljata kot alergena in kožna iritanta, zato je v čistilih, barvah, adhezivih ipd. vse pogostejša zamenjava CIT/MIT z BIT/MIT (Rafoth in sod., 2007).

Vrednosti MIC, ki smo jih določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici, smo preverili z metodo spremljanja rasti v tekočem gojišču z dodatkom MIC biocida. Z določitvijo koncentracije mikroorganizmov v določeni časovni točki smo dobili rastne krivulje testiranih izolatov. Namen spremljanja kinetike rasti mikroorganizmov z dodatkom protimikrobnega sredstva (določanja rastnih krivulj) je določitev hitrosti in trajanja protimikrobnega delovanja (Burt, 2004).

Po primerjavi koncentracij viabilnih celic v pozitivni kontroli in koncentracij viabilnih celic v tekočem gojišču z dodatkom MIC biocida smo preverili, ali določena vrednost MIC res zavira rast bakterij. V primeru, da je bila koncentracija bakterij po 24-urni inkubaciji nižja za 1 log enoto v primerjavi s pozitivno kontrolo, je to pomenilo, da se vrednosti MIC

obeh metod ujemata (Burt, 2004). Če je bila koncentracija celic po 24 urah za več kot 1 log enoto nižja od koncentracije celic v kontroli, pomeni, da bi z metodo spremljanja mikrobne rasti določili nižjo vrednost MIC kot z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB v mikrotitrski ploščici. V primeru bakterijskih izolatov št. 9 in 15 so MIC biocidov zavirale bakterijsko rast, saj so bile vse koncentracije celic po 24 urah nižje za več kot 1 log enoto v primerjavi s kontrolo. Prav tako lahko zaključimo, da so bile vrednosti MIC za bakterijska izolata št. 9 in 15, določene z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici, za vse biocide določene višje, kot bi jih določili z metodo spremljanja rasti. Pri bakterijskem izolatu št. 22 bi bila vrednost MIC za biocid 3 z metodo spremljanja rasti verjetno določena višje kot z metodo razredčevanja v mikrotitrski ploščici (koncentracija bakterij po 24 urah je bila manj kot 1 log enoto nižja od pozitivne kontrole). Pri bakterijskem izolatu št. 22 po dodatku vrednosti MIC biocida 3, se je po 6 urah zgodil padec koncentracije in nato porast po 24 urah (Slika 9). Ta pojav bi lahko pripisali hitremu delovanju biocida, pri tem se je lahko koncentracija biocida v gojišču zmanjšala, saj sta Diehl in Chapman (1999) ugotovila, da celice *Pseudomonas aeruginosa* služijo kot ponor za biocid CIT. Pri tem koncentracija biocida v celicah poraste do 400-krat (v primeru, da je koncentracija CIT v mediju 1 µg/ml). Ostale celice so se lahko razmnoževale naprej, ker so v gojišču ostale subinhibitorne koncentracije biocida 3. Izpostavljanje subinhibitornim koncentracijam protimikrobnega sredstva lahko vodi v pojav rezistence (King, 1995). Odpornost proti CIT so odkrili pri laboratorijskih sevih in izolatih iz okolja (Sondossi in sod., 1999; Chapman, 2003a).

Metoda določanja rastne krivulje se uporablja za testiranje fungicidne aktivnosti. Če koncentracija viabilnih spor pada, potem biocid deluje fungicidno (Krishnan-Natesan in sod., 2008). Pri spremljanju rasti izolata plesni O pri biocidnih koncentracijah, ki smo jih prej določili kot vrednosti MIC z metodo razredčevanja v tekočem gojišču RPMI-1640, za nobenega od biocidov nismo zaznali fungicidne aktivnosti. Predlagan razlog zato je bila razlika v koncentraciji inokuluma. Kontrola koncentracije inokuluma pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču je pokazala nekoliko nižji inokulum, kot ga zahteva metoda po CLSI, kar je $0,4\text{--}5 \times 10^4$ CFU/ml (Rex in sod., 2008). Pri metodi razredčevanja v tekočem gojišču smo za izolat plesni O uporabili koncentracijo konidijev 3×10^3 CFU/ml, pri metodi spremljanja rasti v tekočem gojišču pa je bila uporabljena

koncentracija 10^5 – 10^6 CFU/ml. Krishnan Natesan in sod. (2008) so za metodo razredčevanja v gojišču RPMI-1640 v mikrotitrski ploščici uporabili koncentracijo 2×10^4 CFU/ml, za metodo kinetike rasti pa 1×10^6 CFU/ml plesni *Aspergillus fumigatus*. Razlika sicer ni prevelika, vendar ima lahko pomemben vpliv na vrednosti MIC. Vrednosti MIC so namreč med drugim odvisne tudi od inokuluma (Elloff, 1998). Drugi možen razlog je, da biocidi pri vrednosti MIC še ne delujejo fungicidno (torej da je delovanje fungicidno pri višjih koncentracijah) ali pa biocidi sami nimajo fungicidnega delovanja (kar je manj verjetno). Ne moremo reči zagotovo, ali so bile vrednosti MIC določene prenizko ali so biocidi delovali fungistatično, torej zavirali brstenje konidijev, saj se filamentozna rast v kontroli še ni začela. Poskus bi torej morali podaljšati do začetka filamentozne rasti v kontroli.

Pri *in vitro* študijah kinetike rasti se moramo zavedati omejitev. Koncentracije protimikrobnega sredstva so statične, kar v dejanskem okolju načeloma niso, rastni medij, vrsta mikroorganizma in razlike med postopki pa imajo lahko učinek na rezultate *in vitro* študij (Keele in sod., 2001). Pri štetju kolonij na ploščah moramo upoštevati tudi to, da se z bakterijami prenese na gojišče tudi majhen del protimikrobnega sredstva, ki lahko zavira rast bakterij. V tem primeru protimikrobno sredstvo lahko daje vtis mikrobicidnega delovanja, v resnici pa je le-to inhibitorno (Canillac in Mourey, 2001). Podatki o vrednostih MIC nam dajo le okvirno sliko o aktivnosti biocida, zato je rezultate priporočljivo potrditi še v dejanskem barvnem matriksu (Nichols, 2002; Winkowski, 2004; Nichols, 2004). Potrebno bi bilo torej preveriti tudi učinkovitost posameznih biocidov pri nižji koncentraciji bakterijskega inokuluma posameznega izolata, proti skupnemu številu mikroorganizmov in v samem vzorcu. Poleg tega moramo upoštevati, da z različnimi metodami dobimo različne vrednosti MIC (Klančnik in sod. 2010). Na vrednost MIC ima velik vpliv inokulum (Elloff, 1998), stopnja rasti mikroorganizma, pH in sestava medija, okolje, v katerem poteka inkubacija, čas inkubacije, koncentracija protimikrobnega sredstva in meje merjenja vrednosti MIC (Hindler, 1998) ter vrsta protimikrobnega sredstva (Ambaye in sod., 1997).

Koncentracija biocidne raztopine v samem izdelku oz. surovinah je odvisna tudi od tega, ali hočemo doseči mikrobistatično ali mikrobicidno delovanje ali da biocid deluje kot

prezervativ (upočasni mikrobno rast in s tem biorazgradnjo barve). Pri doziranju biocidov je potrebno upoštevati predvideno začetno koncentracijo mikroorganizmov (Eloff, 1998; Winkowski, 2002), interakcije različnih mikroorganizmov, sočasno delovanje morebitnih drugih uporabljenih biocidov (King, 1995; Gillatt, 2001; Winkowski, 2004), hitrost razgradnje oz. obstojnost biocida (Winkowski, 2002) in okolje, v katerem se biocid nahaja (kemijski in fizikalni faktorji, ki pozitivno ali negativno vplivajo na delovanje biocida). Upoštevati je treba tudi prenos v večje merilo, saj je vrednost MIC biocida v manjšem volumnu lahko nižja od vrednosti MIC v večjem volumnu (Sondossi in sod., 1999). V obzir moramo vzeti tudi (morebitno) prisotnost anaerobnih in fakultativno anaerobnih mikroorganizmov. Za doseganje baktericidnega učinka pri anaerobnih bakterijah je potrebno dodati več biocida kot pri aerobnih (Oppermann in Goll, 1984).

V kvantitativni analizi smo ugotovili, da so najvišje koncentracije mikroorganizmov v vzorcih, ki vsebujejo biocide. Vzroki za to so lahko, da so v praksi uporabljene koncentracije biocidov prenizke, da se je razvila odpornost ali da biocidi niso učinkoviti. Za odporne veljajo sevi, ki imajo vrednosti MIC višje od priporočenih oz. zakonsko predpisanih koncentracij biocidov (Sondossi, 1999) oz. ki niso inaktivirani s koncentracijami biocidov v praksi oz. ki niso inaktivirani s koncentracijo biocida, ki inaktivira druge seve istega organizma (Russel, 2003). Lidert in sod. (1997) in Chapman (1998) kot občutljive opisujejo tiste seve bakterij, ki imajo vrednosti $MIC < 1 \text{ ppm}$ ($1 \mu\text{g/ml}$). V našem primeru ni bila za noben bakterijski izolat vrednost $MIC < 1 \mu\text{g/ml}$. Ker večina biocidov deluje na več tarč hkrati, mutacija znotraj ene same tarče najverjetneje ne bo pomenila neuspeha v preprečevanju mikrobnega delovanja. Vendar so v primeru biocidov razlike med občutljivimi in odpornimi sevi pogosto mnogo manjše kot v primeru antibiotikov. Majhna porast vrednosti MIC bo sicer le redko pomenila neučinkovitost delovanja biocida, če pa tarčne celice rastejo v biofilmih, se njihova občutljivost lahko zmanjša za 1000-krat (McBain in Gilbert, 2001). Pojav odpornosti je odvisen od intrinzičnih lastnosti mikroorganizma za razvoj odpornosti, režima dodajanja biocidov, neenakomerne izpostavljenosti mikroorganizmov biocidom in padanja koncentracije biocida zaradi reakcij s komponentami v barvi (Sondossi in sod., 1999).

Najpomembnejši dejavnik za zmanjševanje kontaminacije in preprečevanja pojava proti biocidom odpornih sevov je splošno vzdrževanje obrata. Puščanje vode v ceveh in posodah, ki so prej vsebovale z biocidi zaščiten material, omogoči stik mikroorganizmov s subletalnimi koncentracijami biocidov, kar lahko vodi do pojava odpornosti. Pogosto se izkaže, da ko mikroorganizem pridobi odpornost proti enemu tipu biocida, postane odporen tudi proti drugim biocidom, še posebno če uporabljamo kemijsko podobne aktivne učinkovine. Zato zamenjava biocida nima nujno želenega učinka na odporne mikroorganizme, stanje se lahko še poslabša, saj mikroorganizmi razširijo svoj spekter odpornosti. S stališča kontrole kakovosti je zaželeno dosledno spremljati prisotnost in koncentracijo protimikrobnega sredstva, da se prepričamo, ali je bilo sredstvo sploh dodano in če je bilo dodano v pravi koncentraciji (King, 1995).

Podjetju predlagamo vključitev CIP (cleaning in place) sistemov in pogostejše ter temeljitejše čiščenje. Na ta način bodo zmanjšali (že obstoječo) kontaminacijo, s tem pa bodo potrebne tudi nižje koncentracije biocidov. Manj toksičen in morda tudi bolj učinkovit način konzerviranja barvnih proizvodov bi bilo preprečevanje aktivnosti celulaz s pomočjo inhibitorjev celulolitičnih encimov (Tothill in sod., 1993).

5.2 SKLEPI

Iz rezultatov našega raziskovalnega dela lahko sklepamo naslednje:

- Najvišja koncentracija vseh skupin mikroorganizmov je v vzorcu 2,4 % raztopine karboksimetilceluloze in vzorcu notranje površine zalogovnika končnega izdelka.
- Najnižja koncentracija vseh skupin mikroorganizmov je v vzorcu vode in vzorcu suhe karboksimetilceluloze.
- Koncentracija plesni je v vseh vzorcih nižja od koncentracije bakterij.
- Najbolj mikrobnno onesnaženi z aerobnimi bakterijami so vzorci polizdelek raztopina karboksimetilceluloze, notranja površina zalogovnika končnega izdelka in notranja površina izdelovalne posode.
- V vodnih barvah najdemo pretežno po Gramu negativne bakterije, od plesni pa je najpogostejše prisoten rod *Penicillium*.
- Najnižje MIC za bakterije ima biocid 3 (raztopina 5-kloro-2-metilizotiazolona in 2-metilizotiazolona), za plesni pa biocid 1 (za 2 izolata plesni) in 3 (za 1 izolat plesni).
- Najvišje MIC za bakterije ima biocid 1 (raztopina cinkovega piritiona, 2-oktilizotiazolona, 3-jodo-2-propinilbutilkarbamata in cinkovega oksida), najvišje MIC za plesni pa biocid 2 (raztopina 1,2-benzizotiazolona in metilizotiazolinona). Pri tem so MIC plesni nižje kot MIC bakterij.
- Z metodo spremljanja kinetike rasti v tekočem gojišču smo potrdili, da MIC, ki smo jih določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču MHB, zavirajo rast bakterij, nismo pa potrdili fungicidnega delovanja MIC biocidov.

6 POVZETEK

V svetu industrije se pogosto dogaja, da kljub standardnemu postopku in doslednemu delu končni izdelki ne ustrezajo določenim standardom za kakovost. Eden od razlogov je lahko mikrobna kontaminacija procesa. Zidne barve so prav tako lahko podvržene mikrobemu delovanju. V sodelovanju s slovenskim proizvajalcem vodnih barv smo opravili izolacijo in opis mikroorganizmov iz različnih vzorcev, pridobljenih v različnih fazah proizvodnega procesa disperzijske vodne barve za notranje površine. Namen diplomskega dela je bil preveriti mikrobiološko stanje v industrijskem obratu, določiti skupno število aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih, določiti število aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na karboksimetilcelulozi kot edinem viru ogljika in ki so s tem tudi potencialni povzročitelji biorazgradnje barve, določiti število plesni v vzorcih, najbolj zastopane mikroorganizme pa testirati na delovanje biocidov, ki jih uporabljajo v praksi, ter določiti vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Izbrali smo 4 tekoče (tehnološka voda, raztopina karboksimetilceluloze, polizdelek in končni izdelek), 1 praškasti (suha karboksimetilceluloza) in dva vzorca površin (notranjost zalogovnika in izdelovalne posode). Iz vzorcev smo izolirali aerobne mezofilne bakterije in plesni ter določili njihovo koncentracijo v vzorcih. Tri bakterijske izolate in tri izolate plesni smo testirali proti delovanju biocidov, ki jih uporabljajo v proizvodnji.

Koncentracija aerobnih bakterij je bila najnižja v vodi (< 5 CFU/g), najvišja pa v 2,4 % raztopini karboksimetilceluloze ($1,3 \times 10^5$ CFU/g), na notranji površini zalogovnika končnega izdelka ($8,5 \times 10^4$ CFU/cm²) in v končnem izdelku ($4,3 \times 10^4$ CFU/g). Koncentracija aerobnih bakterij, ki rastejo na karboksimetilcelulozi, je bila najnižja v vodi (< 50 CFU/g), najvišja pa na notranji površini zalogovnika končnega izdelka ($1,7 \times 10^5$ CFU/cm²), v končnem izdelku ($6,5 \times 10^4$ CFU/g) in v 2,4 % raztopini karboksimetilceluloze ($3,8 \times 10^4$ CFU/g). Za koncentracijo plesni smo ocenili, da je najnižja v vodi (< 1 CFU/g), najvišja pa v končnem izdelku (okoli 500 CFU/g).

Iz vzorcev smo izolirali 34 aerobnih bakterijskih izolatov in 15 izolatov plesni. Tri bakterijske izolate (št. 9, 15 in 22) in tri izolate plesni (E, O in S) smo testirali proti

delovanju biocidov, ki jih uporabljajo v proizvodnji, in jim določili vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Uporabili smo metodo razredčevanja v tekočem gojišču v mikrotitrski ploščici in metodo določanja rastne krivulje. Vrednosti MIC biocida 1 (raztopina cinkovega piritiona, 2-oktilizotiazolona, 3-jodo-2-propinilbutilkarbamata in cinkovega oksida) so bile za bakterijske izolate v območju 33,0–264 µg/ml, za glivne izolate pa 0,516–1,03 µg/ml. Vrednosti MIC biocida 2 (raztopina 1,2-benzizotiazolona in metilizotiazolinona) so bile za bakterijske izolate v območju 6,21–199 µg/ml, za glivne izolate v območju 33,1–66,2 µg/ml. Vrednosti MIC biocida 3 (raztopina 5-kloro-2-metilizotiazolona in 2-metilizotiazolona) so bile za bakterijske izolate v območju 1,78–14,2 µg/ml, za glivne izolate pa v območju $\leq 0,889$ µg/ml. S spremljanjem rasti in določanjem rastnih krivulj smo potrdili, da so vrednosti MIC, določene z metodo razredčevanja v tekočem gojišču, večinoma zavirale rast bakterijskih izolatov, medtem ko pri plesnih nismo zaznali fungicidnega delovanja.

7 VIRI

- Ambaye A., Kohner P.C., Wollan P.C., Roberts K.L., Roberts G.D., Cockerill F.R. 1997. Comparison of agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 4: 847–852
- Arquiaga M.C., Canter L.W., Robertson J.M. 1995. Microbiological characterization of the biological treatment of aircraft paint stripping wastewater. *Environmental Pollution*, 89, 2: 189–195
- Bjurman J. 1999. Fungal and microbial activity in external wooden panels as determined by finish, exposure, and construction techniques. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43, 1–2: 1–5
- Burt S. 2004. Essential oils: Their antibactericidal properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223–253
- Canillac N., Mourey A. 2001. Antibacterial activity of the essential oil of *Picea excelsa* on *Listeria*, *Staphylococcus aureus* and coliform bacteria. *Food Microbiology*, 18: 261–268
- Chapman J.S. 1998. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41, 3–4: 241–245
- Chapman J.S. 2003a. Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51, 2: 133–138
- Chapman J.S. 2003b. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 271–276

- Chelossi E., Faimali M. 2006. Comparative assessment of antimicrobial efficacy of new potential biocides for treatment of cooling and ballast waters. *Science of the Total Environment*, 356: 1–10
- Chevalier J., Corre J., Crémieux A. 1995. Evaluation of synergistic effects of three bactericidal agents associated in an antiseptic formulation. *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 70: 155–159
- Clausen C.A. 2000. Recognize, remove, and remediate mold and mildew. V: Proceedings of the 2nd annual Conference on durability and disaster mitigation in wood-frame housing. Monona Terrace Convention Center, Madison, Wisconsin. 6-8 nov. 2000. Madison, Forest Products Society: 231–234
<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf2000/claus00e.pdf> (10. 5. 2011)
- Collier P.J., Ramsey A., Waigh R.D., Douglas K.T., Austin P., Gilbert P. 1990. Chemical reactivity of some isothiazolone biocides. *Journal of Applied Bacteriology*, 69: 578–584
- Danevčič T., Mandič-Mulec I. 2007. Praktikum iz fiziologije mikroorganizmov za študente mikrobiologije. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 28 str.
- Denyer S.P. 1995. Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36: 227–245
- Dey B.K., Hashim M.A., Hasan S., Sen Gupta B. 2004. Microfiltration of water-based paint effluents. *Advances in Environmental Research*, 8, 3–4: 455–466
- Diehl A.M., Chapman J.S. 1999. Association of the biocide 5-chloro-2-methyl-isothiazol-3-one with *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas fluorescens*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 44: 191–199
- Direktiva 98/8/ES Evropskega parlamenta in sveta z dne 16. februarja 1998 o dajanju biocidnih pripravkov v promet. 1998. Uradni list Evropske unije, 41, L 123/1: 1–63

- Dornieden T., Gorbushina A.A., Krumbein W.E. 2000. Biodecay of cultural heritage as a space/time-related ecological situation — an evaluation of a series of studies. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 4: 261–270
- Edge M., Allen N.S., Turner D., Robinson J., Seal K. 2001. The enhanced performance of biocidal additives in paints and coatings. *Progress in Organic Coatings*, 43: 10–17
- Eloff J.N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Medica*, 64: 711–713
- Gillatt J. 2002. Preservation of paints in wet-state. V: *Industrial biocides: Selection and application*. Karsa D.R., Ashworth D. (eds.). Cambridge, Royal Society of Chemistry: 64–83
- Guthery E., Seal L.A., Anderson E.L. 2005. Zinc pyrithione in alcohol-based products for skin antisepsis: Persistence of antimicrobial effects. *American Journal of Infection Control*, 33: 15–22
- Hindler J. 1998. Antimicrobial susceptibility testing. V: *Essential procedures for clinical microbiology*. Isenberg H.D. (ed.). Washington, American Society for Microbiology: 207–223
- Hyvärinen A., Meklin T., Vepsäläinen A., Nevalainen A. 2002. Fungi and actinobacteria in moisture-damaged building materials – concentrations and diversity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49: 27–37
- Jeršek B. 2008. Osnovni principi identifikacije plesni, kvasovk in bakterij v živilih. Skripta in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu živilska mikrobiologija. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 75 str.

- Keele D.J., DeLallo V.C., Lewis R.E., Ernst E.J., Klepser M.E. 2001. Evaluation of amphotericin B and flucytosine in combination against *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* using time-kill methodology. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 41: 121–126
- King V.M. 1995. Bactericides, fungicides, and algicides. 1995. V: Paint and coating testing manual: 14th ed. of the Garden-Sward Handbook. Koleske J.V. (ed.). Philadelphia, American Society for Testing and Materials: 261–267
- Klančnik A., Piskernik S., Jeršek B., Smole Možina S. 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 121–126
- Krishnan-Natesan S., Chandrasekar P.H., Alangaden G.J., Manavathu K.E. 2008. Fluvastatin potentiates the activity of caspofungin against *Aspergillus fumigatus* *in vitro*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60, 4: 369–373
- Krishnan-Natesan S., Manavathu K.E., Alangaden G.J., Chandrasekar P.H. 2009. A comparison of the fungicidal activity of amphotericin B and posaconazole against *Zygomycetes* *in vitro*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63: 361–364
- La Rosa F.R., Giese E.C., Huibert Dekker R.F., Sanchez Pelayo J., de Melo Barbosa A. 2008. Microbiological contamination of water-based paints from an industry in the state of Parana, Brazil. *Semina: Ciencias Exatas e da Terra, Londrina*, 29, 1: 85–92
- Laundon R.D., Reid A.W., Furness G.R. 2001. Biostatic Agent. World Intellectual Property Organization WO/2001/083603: 22 str.
- Lidert Z., Young D.H.J., Bowers-Daines M.M., Sherba S.E., Mehta R.J., Lange B.C., Swithenbank C., Kiyokawa H., Johnson M.G., Morris-Natschke S.L., Lee K-H. 1997. 1,4-bis-(2,3-epoxypropylamino)-9,10-anthracenedione and related compounds as potent

- antifungal and antimicrobial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 7, 24: 3153–3158
- Mahlo S.M., McGaw L.J., Eloff J.N. 2010. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens. *Crop Protection*, 29, 12: 1529–1533
- Mathee A., Röllin H., Levin J., Naik I. 2007. Lead in paint: Three decades later and still a hazard for African children? *Environmental Health Perspectives*, 1151, 31: 321–322
- McBain A.J., Gilbert P. 2001. Biocide tolerance and the harbingers of doom. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 47: 55–61
- McCoy W.F., Wireman J.W., Lashen E.S. 1986. Efficacy of methylchloro/methylisothiazolone biocide against *Legionella pneumophilla* in cooling water. *Journal of Industrial Microbiology*, 1: 49–56
- McDonnell G., Russell A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 147–179
- Ministrstvo za zdravje. 2011a. Biocidni proizvodi. Splošno: Kaj so biocidni proizvodi? Ljubljana, Urad Republike Slovenije za kemikalije: 1 str.
http://www.uk.gov.si/si/delovna_podrocja/biocidni_proizvodi/splosno/ (12. 5. 2011)
- Ministrstvo za zdravje. 2011b. Register biocidnih proizvodov z dne 28. 2. 2011. Ljubljana, Urad RS za kemikalije: 42 str.
http://www.uk.gov.si/fileadmin/uk.gov.si/pageuploads/pdf/RBP_30apr2011.pdf (12. 5. 2011)
- Mossel D.A.A., Kleynen-Semmelin A.M.C., Vincentie H.M., Beerens H., Catsaras M. 1970. Oxytetracycline-glucose-yeast extract agar for selective enumeration of moulds and yeasts in foods and clinical material. *Journal of Applied Bacteriology*, 33: 454–457

- Mourey A., Canillac N. 2002. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, 13: 289–292
- Murano E.A., Hudnall J.A. 2001. Media, reagents, and stains. V: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4th ed. Downes F.P., Ito K. (eds.). Washington, American Public Health Association: 601–648
- Nichols D. 2002. Antimicrobial additives in plastics and the European Biocidal products directive. *Plastics, Additives and Compounding*, 4, 12: 14–17
- Nichols D. 2004. Biocides in plastics. *Rapra Review Report* 180. Shawbury, Rapra Technology Ltd.: 126 str.
- Obidi O.F., Aboaba O.O., Makanjuola M.S., Nwachukwu S.C.U. 2009a. Microbial evaluation and deterioration of paints and paint-products. *Journal of Environmental Biology*, 30, 5: 835–840
- Obidi O.F., Nwachukwu S.C.U., Aboaba O.O. 2009b. The use of predictive modeling in shelf life determination of paints. *Academia Arena*, 1, 5: 41–46
- Obidi O.F., Nwachukwu S.C., Aboaba O.O., Nwalor J.U. 2010. Estimation of shelf life for water-based paints using regression methods. *Journal of American Science*, 6, 4: 123–127
- Oppermann R.A., Goll M. 1984. Presence and effects of anaerobic bacteria in water-based paint. *International Journal of Coatings Technology*, 56, 712: 51–56
- Pasanen A.-L., Kasanen J.-P., Rautiala S., Ikäheimo M., Rantamäki J., Kääriäinen H., Kalliokoski P. 2000. Fungal growth and survival in building materials under fluctuating moisture and temperature conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 46, 3–4: 117–127

- Ploštajner B. 2004. Notranje zidne barve – vrste, lastnosti in zahteve. Barve govorijo, Helios Domžale, 11: 5–5
<http://www.helios.si/slo/casopis-barve-govorijo> (11. 5. 2011)
- Pravilnik o pravilni uporabi biocidnih proizvodov za poklicne uporabnike. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 17, 79: 10959–10959
- Pravilnik o razvrščanju, pakiranju in označevanju biocidnih proizvodov ter o varnostnih listih za biocidne proizvode. 2007. Uradni list Republike Slovenije, 17, 53: 7308–7309
- Rabin R. 1989. Warnings unheeded: A history of child lead poisoning. American Journal of Public Health, 79, 12: 1668–1674
- Rafoth A., Gabriel A.S., Sacher F., Brauch H.-J. 2007. Analysis of isothiazolinones in environmental waters by gas chromatography–mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1164: 74–81
- Register biocidnih proizvodov. 2008. Uradni list Republike Slovenije, 18, 115: 15230–15261
- Rex J.H., Alexander B.D., Andes D., Arthington-Skaggs B., Brown S.D., Chaturveli V., Espinel-Ingroff A., Ghannoum M.A., Knapp C.C., Moutyl M.R., Ostrosky-Zeichner L., Pfaller M., Sheehan D.J., Walsh T.J. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard - 2nd ed. (M38-A2). Wayne, Clinical and Laboratory Standards Institute: 35 str.
- Rosen J., Quinn Gothard L. 2010. Encyclopedia of physical science. New York, Facts On File: 767 str.
- Russell A.D. 1995. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. International Biodeterioration & Biodegradation, 36, 3–4: 247–265

- Russell A.D. 1998. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infections*, 43, suppl. 1: S57–S68
- Russell A.D. 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infectious Diseases*, 3: 794–803
- Salonen H., Lappalainen S., Lindroos O., Harju R., Reijula K. 2007. Fungi and bacteria in mould-damaged and non-damaged office environments in a subarctic climate. *Atmospheric Environment*, 41: 6797–6807
- Salvin S.B. 1944. Influence of zinc oxide on paint molds. *Industrial & Engineering Chemistry*, 36: 336–340
- Sawai J. 2003. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 177–182
- Shirakawa M.A., Gaylarde C.C., Gaylarde P.M., John V., Gambale W. 2002. Fungal colonization and succession on newly painted buildings and the effect of biocide. *FEMS Microbiology Ecology*, 39, 2: 165–173
- Sondossi M., Rossmore H.W., Lashen E.S. 1999. Influence of biocide treatment regimen on resistance development to methylchloro-/methylisothiazolon in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 43: 85–92
- SIST EN ISO 4833. Splošno navodilo za ugotavljanje števila mikroorganizmov. Štetje kolonij pri 30 °C. 2003: 8 str.
- Talbert R. 2008. Paint technology handbook. Boca Raton, CRC Press: 91–93
- Tothill I.E., Seal K.J. 1993. Biodeterioration of waterborne paint cellulose thickeners. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 31: 241–254

- Tothill I.E., Best D.J., Seal K.J. 1993. Studies on the inhibitory effect of paint raw materials on cellulolytic enzymes present in waterborne paint. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 32: 233–242
- Videla H.A. 2002. Prevention and control of biocorrosion. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 49: 259–270
- Weckesse, S., Engel K., Simon-Haarhaus B., Wittmer A., Pelz K., Schempp C.M. 2007. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine*, 14: 508–516
- Winkowski K. 2002. Controlling microbial contamination. *Paint & Coatings Industry*, 7: 60–66
- Winkowski K. 2004. Biocide optimization: Blends of actives. *Paint & Coatings Industry*, 7: 72–77
- Winkowski K. 2006. Biocides for the coatings industry. V: *Coatings technology handbook*. 3rd ed. Tracton A.A. (ed.). Boca Raton, CRC Press: 81-1-3
- Yebra D.M., Kill S., Dam-Johansen K. 2004. Antifouling technology - past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50, 2: 75–104
- Zakon o biocidnih proizvodih (ZBioP). 2006. Uradni list Republike Slovenije, 16, 61: 6623–6637

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Petru Rasporju za podporo in pomoč pri izbiri in izdelavi diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi recenzentu prof. dr. Davidu Stoparju za temeljit pregled diplomskega dela in koristne napotke. Še posebej se želim zahvaliti delovni mentorici doc. dr. Barbari Jeršek za pomoč in hitro ter dosledno popravo diplomskega dela. Zahvaljujem se tudi lektorici Anji Potočnik Metelko, prof., prijateljici Jeni Kure, prof. angl., za pregled angleškega dela, ga. Lini Burkan za tehnični pregled diplomskega dela, ga. Lidiji Hočevnar in ga. Nataši Iršič Bedenik ter Janezu Orehku, ki mi je pomagal z materiali in koristnimi nasveti.

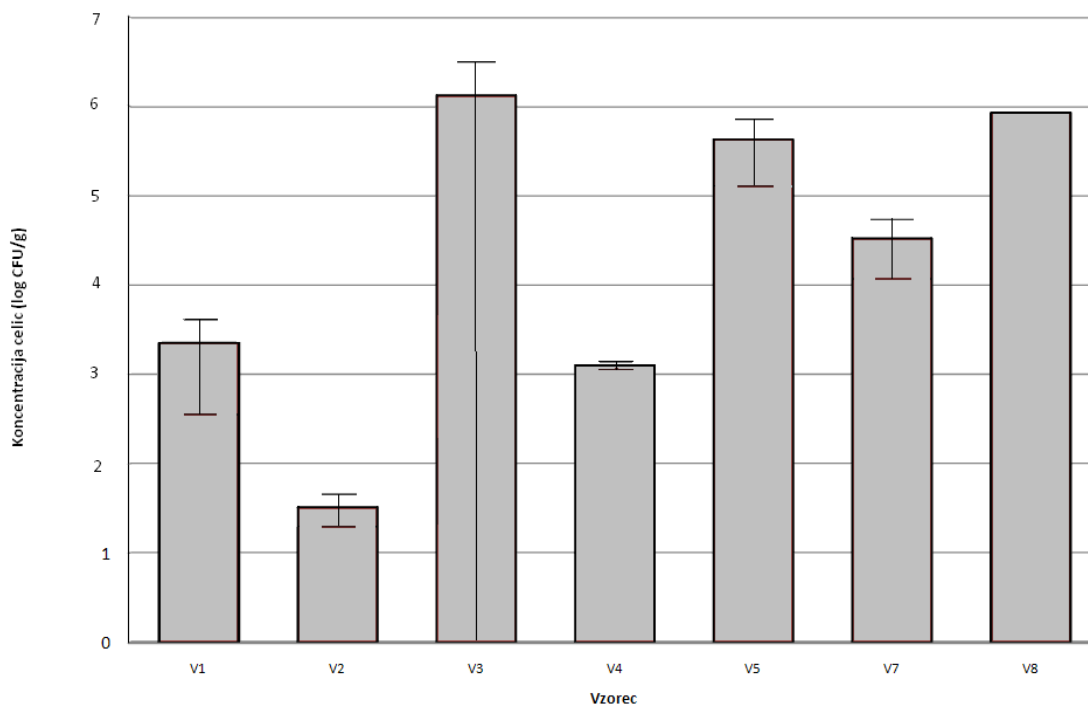
Iskreno se zahvaljujem tudi svoji družini in prijateljem za podporo skozi celoten študij.

Hvala vam vsem!

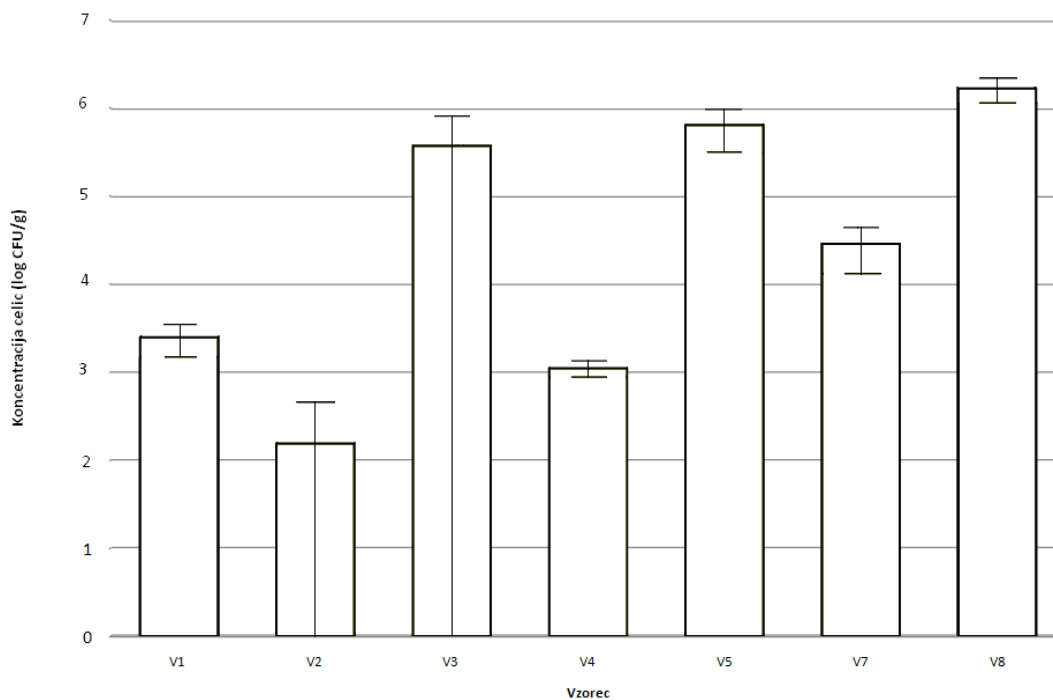
PRILOGE

Priloga A

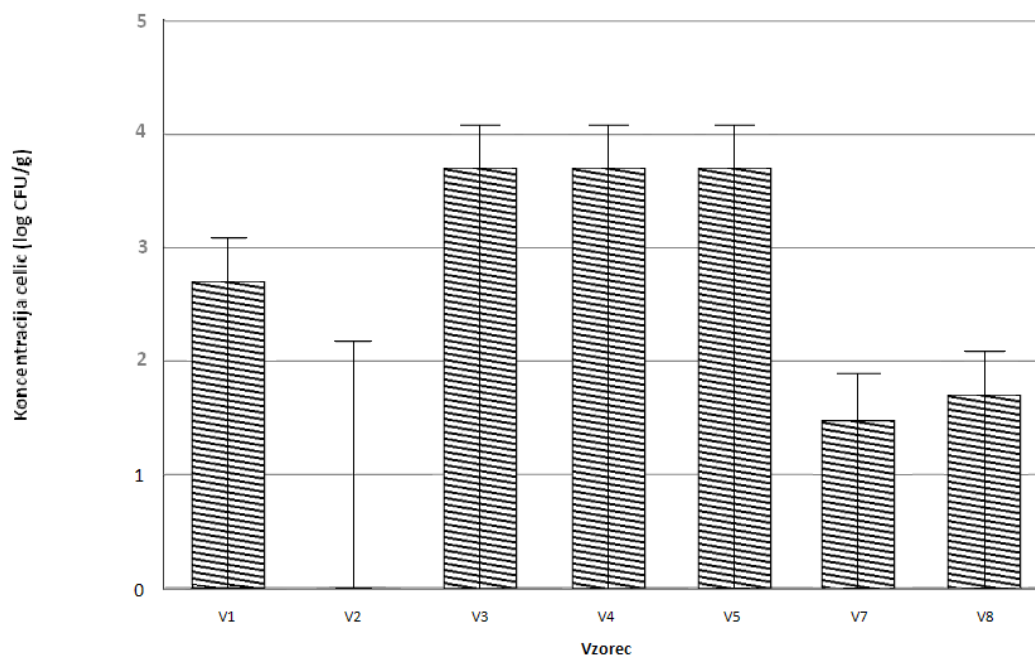
Koncentracije mikroorganizmov v vzorcih V1–V8



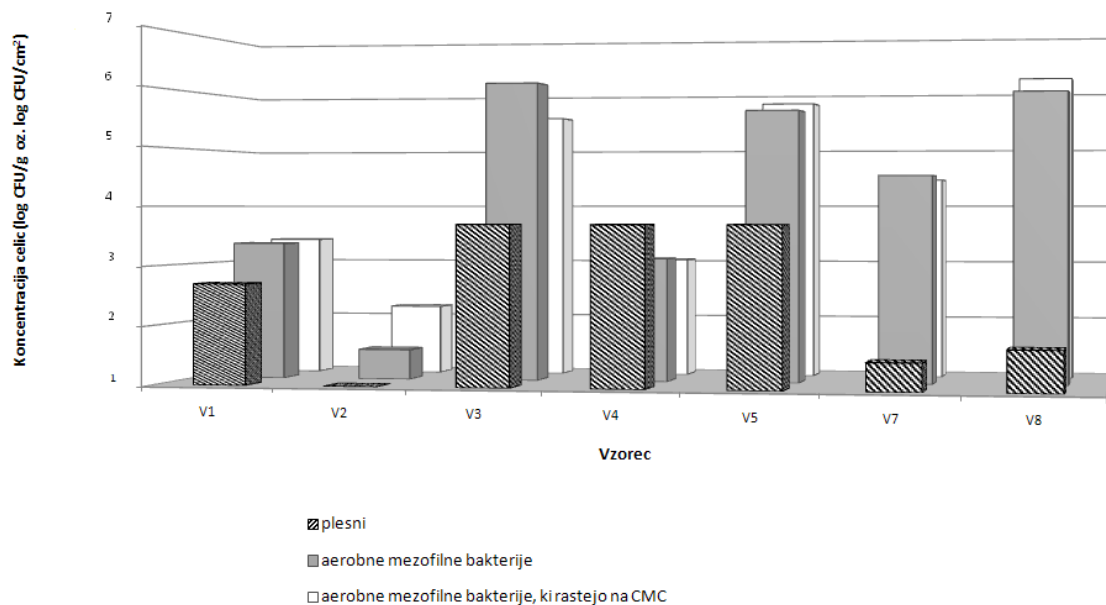
Priloga A1: Grafična primerjava koncentracij aerobnih mezofilnih bakterij v vzorcih V1–V8 na logaritemski skali z odstopanji (standardni odklon). V1 – surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC z dodanimi biocidi; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC, V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalogovnika končnega izdelka. V7 in V8 imata enoto log CFU/cm².



Priloga A2: Grafična primerjava koncentracij aerobnih mezofilnih bakterij, ki lahko rastejo na CMC kot edinem viru ogljika, v vzorcih V1–V8 na logaritemski skali z odstopanji (standardni odklon). V1 – surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC z dodanimi biocidi; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC, V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalgovnika končnega izdelka. V7 in V8 imata enoto log CFU/cm².



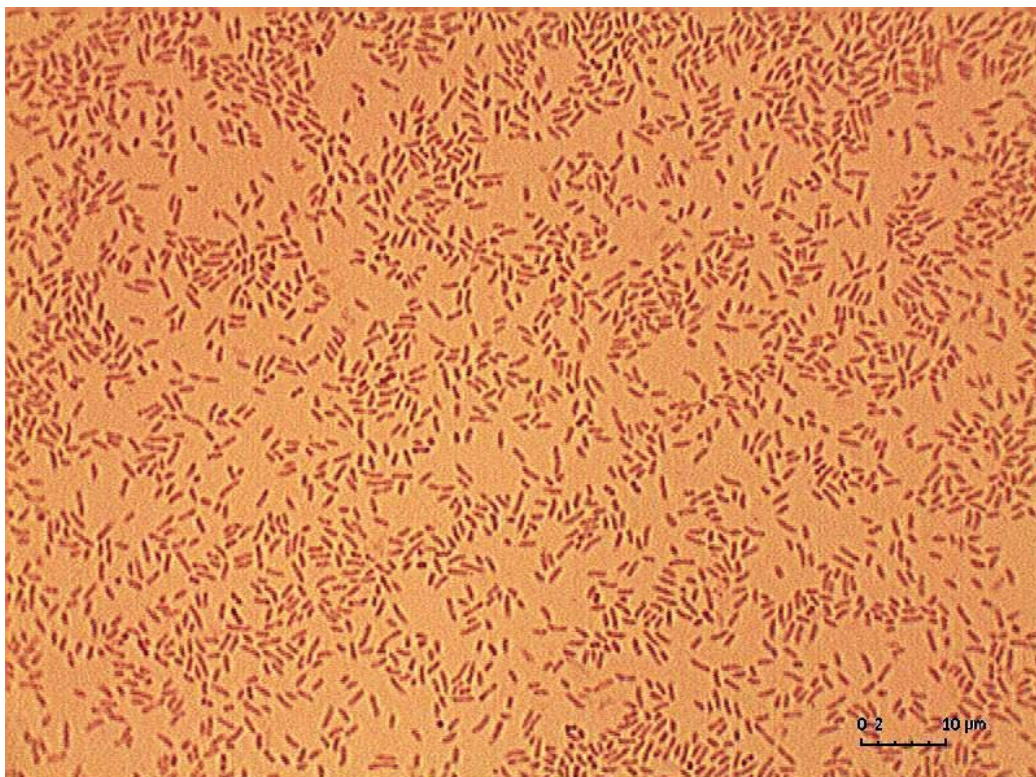
Priloga A3: Grafična primerjava koncentracij plesni v vzorcih V1–V8 na logaritemski skali z odstopanji (standardni odklon). V1 – surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC z dodanimi biocidi; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC, V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalogovnika končnega izdelka. V7 in V8 imata enoto log CFU/cm².



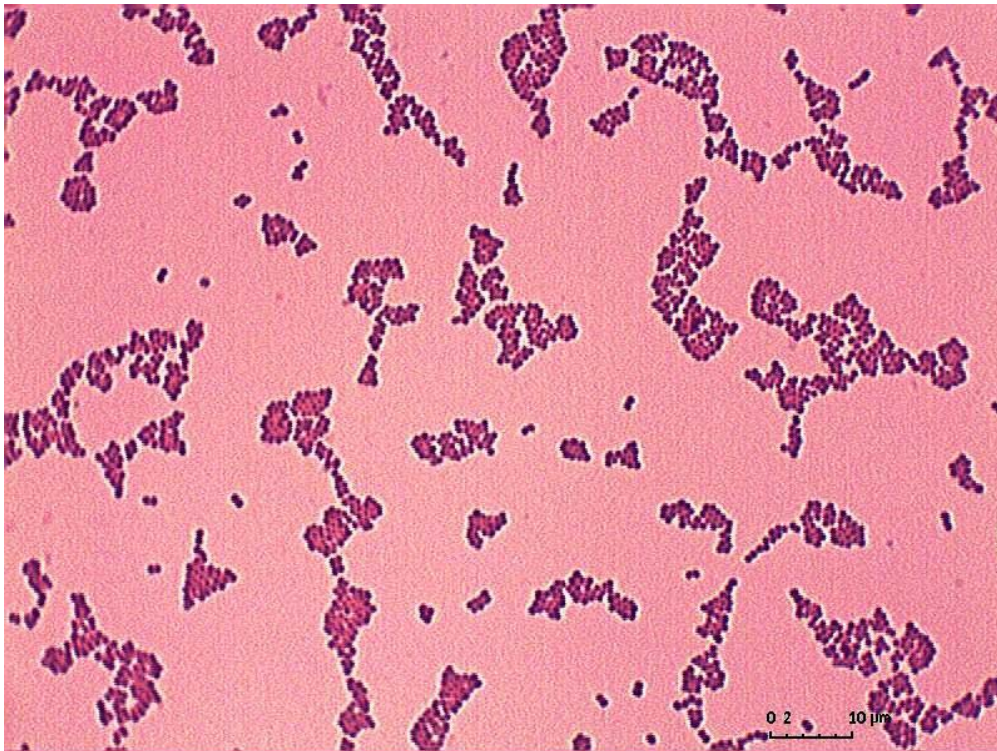
Priloga A4. Grafična primerjava koncentracij skupin mikroorganizmov v vzorcih V1–V8. V1 – surovina suha karboksimetilceluloza (CMC); V2 – tehnološka voda; V3 – polizdelek 2,4 % CMC z dodanimi biocidi; V4 – laboratorijsko pripravljena 2 % CMC, V5 – končni izdelek kalcitna vodna barva; V7 – notranja površina izdelovalne posode; V8 – notranja površina zalogovnika končnega izdelka. V7 in V8 imata enoto log CFU/cm².

Priloga B

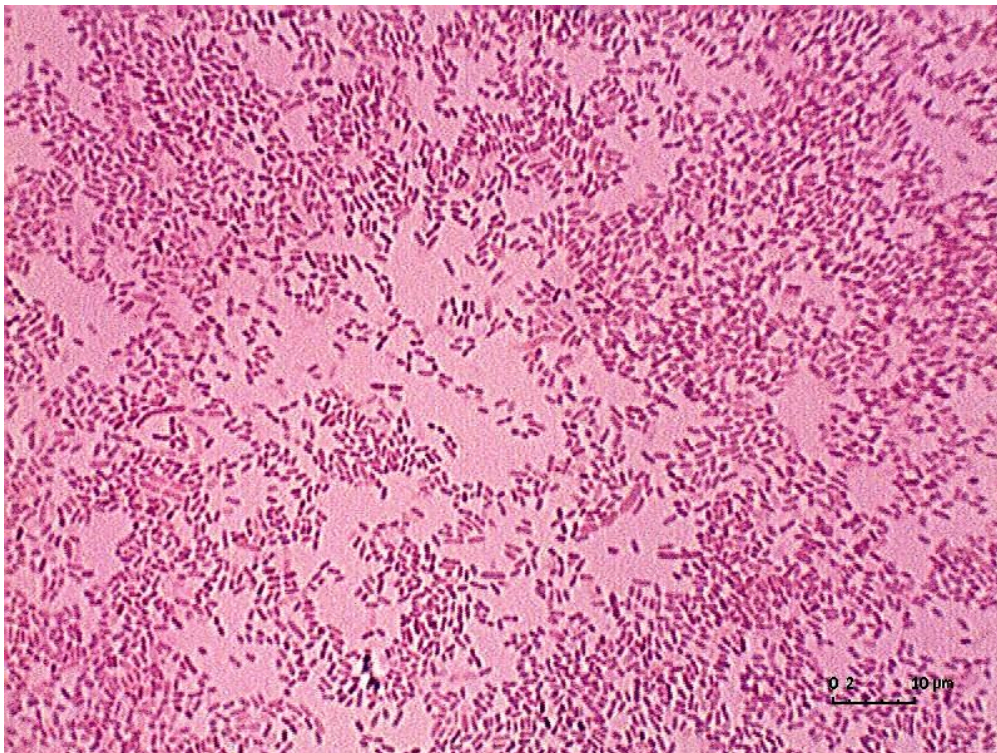
**Fotografije barvnih in nativnih preparatov bakterij in plesni, ki smo jih testirali
na delovanje biocidov 1, 2 in 3**



Priloga B1: Bakterijski izolat št. 9, barvan po Gramu (1000-kratna povečava).



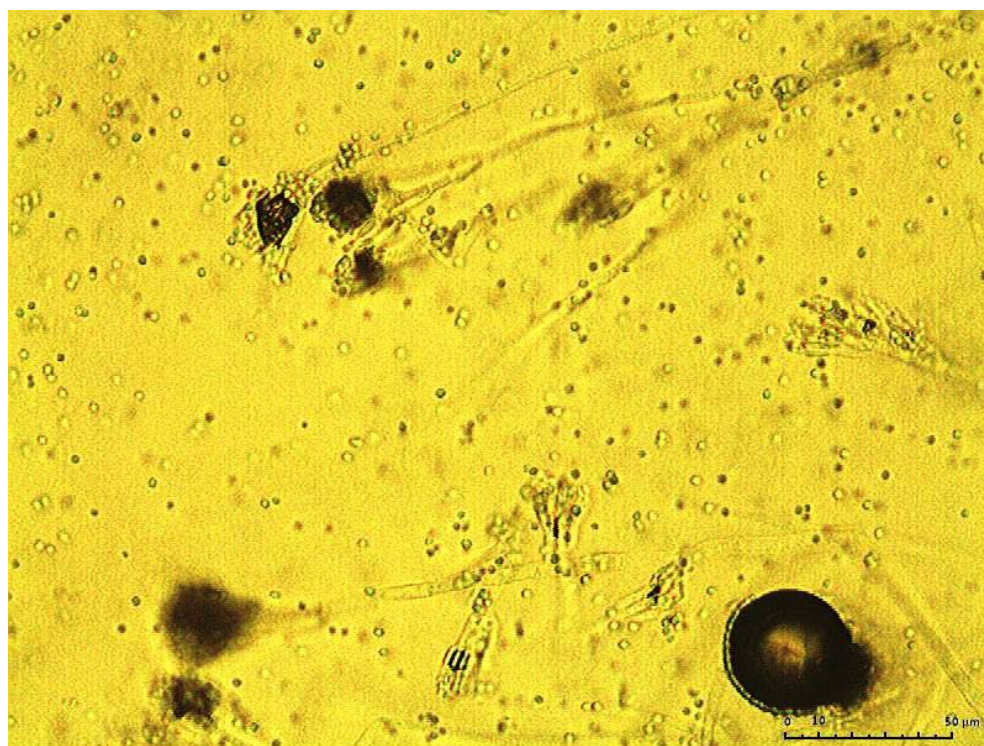
Priloga B2: Bakterijski izolat št. 15, barvan po Gramu (1000-kratna povečava).



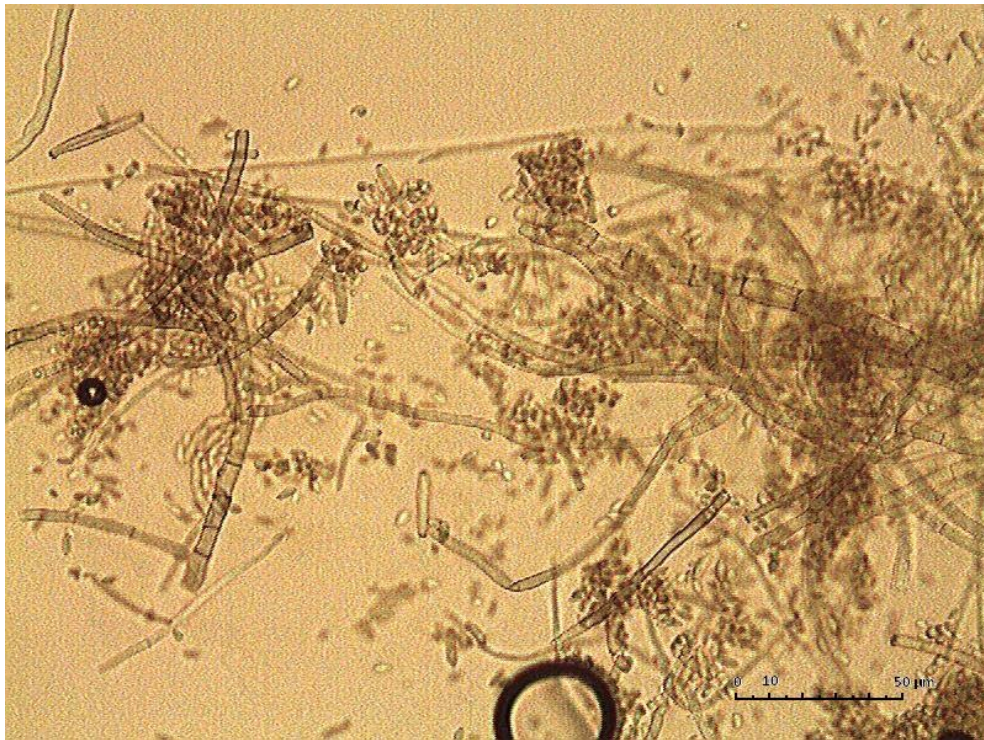
Priloga B3: Bakterijski izolat št. 22, barvan po Gramu (1000-kratna povečava).



Priloga B4: Izolat plesni E, nativni preparat v laktofenolu (400-kratna povečava).



Priloga B5: Izolat plesni O, nativni preparat v laktofenolu (400-kratna povečava).



Priloga B6: Izolat plesni S, nativni preparat v laktofenolu (400-kratna povečava).

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Urška Tomc

**IZOLACIJA MIKROORGANIZMOV IZ OBRATA
PROIZVODNJE VODNIH BARV IN ANALIZA
UČINKOVITOSTI BIOCIDOV**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2011