

BEATA GUTAROWSKA^{*)}, MAŁGORZATA PIOTROWSKA, ZOFIA ŻAKOWSKA,
KONRAD GWOŹDZIŃSKI

Politechnika Łódzka
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź

Analiza przydatności metod oznaczania adenozyntrifosforanu (ATP) oraz mikroskopii fluorescencyjnej do oceny żywotności i adhezji bakterii na powierzchni bioaktywnych polimerów

Streszczenie — Analizowano przydatność metod mikroskopii fluorescencyjnej oraz oznaczania ATP do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej bioaktywnych polimerów. Stwierdzono iż stosowanie jednocześnie obu metod daje pełną informację na temat adhezji do powierzchni polimerów i żywotności komórek bakterii. Porównanie mniej czasochłonnej metody oznaczania ATP z metodą hodowlaną wskazuje, iż dają one porównywalne wyniki dotyczące żywotności komórek. Zależności między zawartością ATP a liczbą bakterii na polimerze oznaczoną metodą hodowlaną można opisać, z wysokim stopniem korelacji, funkcją wykładniczą lub liniową. Odpowiednie przygotowanie powierzchni próbek bioaktywnych polimerów (zawierających nośniki dla biocydów), umożliwiające uzyskanie gładkiej ich powierzchni, zmniejsza błąd powtarzalności obu testowanych metod. W przypadku polimeru kontrolnego (bez dodatków) błąd powtarzalności był niewielki (rzędu kilku %), w przypadku zaś polimerów z nośnikami błąd zwiększa się do poziomu kilkudziesięciu % (47 % i 73 %). Ocena żywotności i adhezji sześciu gatunków bakterii na bioaktywnych polimerach wykazała statystycznie istotne różnice w działaniu ograniczającym adhezję i żywotność: na polimerze z miedzią bakterii *E. coli* oraz na polimerze ze srebrem bakterii *S. aureus*. *B. cepacia* okazała się bakterią silnie przylegającą do polimerów bioaktywnych, ale jej żywotność skutecznie ograniczała obecność srebra w polimerze.

Słowa kluczowe: oznaczanie ATP, mikroskopia fluorescencyjna, bioaktywne polimery ze srebrem lub miedzią, aktywność przeciwbakteryjna.

ANALYSIS OF THE USEFULNESS OF ADENOSINE TRIPHOSPHATE (ATP) DETERMINATION AND FLUORESCENCE MICROSCOPY METHODS FOR THE EVALUATION OF THE VIABILITY AND ADHESION OF BACTERIA ON THE SURFACE OF BIOACTIVE POLYMERS

Summary — The usefulness of fluorescence microscopy and ATP determination methods for the assessment of the antimicrobial activity of bioactive polymers was analyzed. It was found that the simultaneous use of both methods gives full information about the adhesion to the polymer surface and cells viability. The comparison of less time-consuming and labor-intensive ATP assay with culture method shows that these methods give comparable cell viability results. The dependence of ATP content on the number of bacteria on the polymer determined by the culture method can be described, with a high degree of correlation, with exponential or linear function. The appropriate way to prepare the surfaces of bioactive polymer samples (containing biocide carriers), in order to make them smooth, reduces non-repeatability of both tested methods. For the control polymer (without additives) the repeatability error was low: 1 % for fluorescence microscopy and 3 % for ATP assay; the use of polymers with carriers increases this error to the level of 47 % and 73 %, respectively. Evaluation of the viability and adhesion of six bacteria on the bioactive polymers showed a statistically significant differences in the reduction of *E. coli* viability and adhesion on the polymer with copper and of *S. aureus* viability and adhesion on the polymer with silver. The bacterium *B. cepacia* proved to be highly adhesive to bioactive polymers, but her viability was effectively inhibited by the presence of silver in the polymer.

Keywords: ATP assay, fluorescence microscopy, bioactive polymers with silver or copper, antimicrobial activity.

^{*)} Autor do korespondencji; e-mail: beata.gutarowska@p.lodz.pl

WPROWADZENIE

Analizy adhezji i żywotności drobnoustrojów tworzących biofilmy na powierzchniach abiotycznych można dokonać różnymi metodami. Wyróżnia się trzy kategorie metod: 1. oceniające adhezję komórek oraz tworzenie i strukturę biofilmu na podstawie analizy obrazu mikroskopowego (SEM, AFM, mikroskop fluorescencyjny); 2. polegające na oszacowaniu liczby żywych komórek (w hodowlach na pożywkach mikrobiologicznych) oraz składników komórek drobnoustrojów budujących biofilmy (egzopolisacharydów, lipidów, steroli, kwasów nukleinowych); 3. określające aktywność metaboliczną komórek, które uległy adhezji (adenozynotryfosforanu – ATP, enzymów zewnątrzkomórkowych) [1, 2].

Zgodnie z istniejącymi normami i zaleceniami, w wielu krajach do oceny żywotności drobnoustrojów na powierzchniach bioaktywnych polimerów (tj. zawierających w swoim składzie biocydy), szeroko wykorzystuje się metody oparte na analizie hodowlanej (JIS Z 2801:2000; ASTM E2149-01; ASTM E2180-07, i inne). Zasada pomiaru polega w tym przypadku na inkubacji drobnoustrojów na powierzchni polimerów w ciągu określonego czasu, a następnie ocenie liczby drobnoustrojów, które przeżyły kontakt z bioaktywnym polimerem i porównaniu jej z próbą kontrolną, w której inkubację prowadzono na powierzchni polimeru niezawierającego substancji przeciwdrobnoustrojowej. Drobnoustroje można inkubować w hodowli dynamicznej, w pożywce z próbkami polimerów zawierających biocydy zdolne do dyfuzji i przechodzenia w postaci jonową, lub w hodowli statycznej – bezpośrednio na powierzchni polimerów. Metody hodowlane są jednak pracochłonne i czasochłonne (analiza, ze względu na czas hodowli mikroorganizmów, trwa 24–72 h). Dużą trudnością metody hodowlanej w ocenie przeżywalności drobnoustrojów, które uległy adhezji do polimerów jest prawidłowe, zapewniające w pełni ilościową analizę, pobranie próby biofilmu (wycinka, wymazu). Stosowane sposoby wytrząsania, sonifikacji bądź chemiczne nie pozwalają na całkowite usunięcie biofilmów z powierzchni polimerów, przy czym zwłaszcza metody sonifikacji i chemiczne oddziałują również niekorzystnie na żywotność przyległych komórek [3].

Dlatego też poszukuje się nowych metod służących do określania aktywności biobójczej/biostatycznej polimerów zawierających biocydy. W celu oceny oddziaływania bioaktywnych polimerów na żywotność mikroorganizmów można wykorzystać oznaczanie zawartości ATP na powierzchni polimeru metodą bioluminescencyjną. ATP jest dobrym markerem żywych komórek, gdyż jego cząsteczki są produktem metabolizmu komórkowego. Wraz z obumarciem komórki synteza ATP jest zahamowana, a istniejące cząsteczki są rozkładane przez wewnątrzkomórkowe enzymy ATP-azę i fosfatazy. Poziom ATP zależy od rodzaju drobnoustrojów oraz od stanu fizjologicznego komórek, średnia zawartość w komórce bakterii wynosi 10^{-18} mola ATP [4].

Metodę oznaczania ATP szeroko wykorzystuje się w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym do określenia czystości mikrobiologicznej powierzchni produkcyjnych, jest ona również powszechnie stosowana do oceny skuteczności przeprowadzanych zabiegów mycia i dezynfekcji [5, 6]. Pomiar ATP posłużył do wykrycia biofilmów na powierzchniach kontaktujących się z wodą [7] oraz do analizy żywotności bakterii z rodzaju *Staphylococcus* i *Pseudomonas* na powierzchniach polimerowych – polietylenu i polistyrenu [8, 9]. Jak dotąd metody tej nie używano do oceny oddziaływania przeciwdrobnoustrojowego bioaktywnych polimerów.

W badaniach przeciwdrobnoustrojowej aktywności polimerów jest istotne nie tylko określenie biobójczego/biostatycznego efektu, ale również sprawdzenie czy wprowadzony do polimeru biocyd (często osadzony na nośnikach) nie zmienia właściwości powierzchni polimeru, sprzyjając tym samym adhezji mikroorganizmów. Oceny adhezji komórek do powierzchni polimeru można dokonać przy użyciu technik mikroskopowych, m.in. mikroskopii fluorescencyjnej. Metoda ta była wykorzystana do badania biofilmów wytwarzanych na powierzchni różnych materiałów, również polimerów, w środowiskach naturalnych [10, 11]. Dużą zaletą mikroskopii fluorescencyjnej jest możliwość bezpośredniej analizy obrazu komórek ulegających adhezji na powierzchni polimeru oraz różnicowania komórek żywych i martwych. Metody oznaczania zawartości ATP oraz analiza obrazu uzyskanego za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego znalazły zastosowanie w medycynie do oceny adhezji i przeżywalności drobnoustrojów patogennych, takich jak: *Helicobacter pylorii*, *Candida albicans*, gatunków z rodzaju *Staphylococcus*, *Streptococcus* i *Pseudomonas*, na powierzchni różnych materiałów biotycznych – tkanek – oraz abiotycznych, np. polimerów i stopów metali używanych do wytwarzania sprzętu medycznego bądź w transplantologii [12–14].

Celem przedstawionych w niniejszym artykule badań była ocena przydatności metod oznaczania zawartości ATP oraz mikroskopii fluorescencyjnej do analizy żywotności bakterii i adhezji na powierzchni bioaktywnych polimerów.

Praca obejmowała dwa etapy: pierwszy dotyczył badań modelowych, porównawczych, przeprowadzonych metodami: hodowlaną, oznaczania ATP oraz mikroskopii fluorescencyjnej, na polimerze kontrolnym niezawierającym biocydów; na drugim etapie metodami oznaczania ATP i mikroskopii fluorescencyjnej określano działanie przeciwdrobnoustrojowe (adhezję i przeżywalność bakterii) polimerów zawierających biocydy (miedź lub srebro).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Materiały

Polimery

Polimery do badań, uzyskane z Instytutu Chemii Przemysłowej w Warszawie (tabela 1) pocięto na próbki

T a b e l a 1. Charakterystyka polimerów stosowanych w badaniach**T a b l e 1.** Characteristics of the polymers used in the study

Symbol próbki	Skład próbki*)	Średni wymiar cząstek krzemionki, nm	Zawartość Ag/Cu w krzemionce ppm	Uwagi
Polimer 1	PE-HD Purell	—	—	polimer bez dodatków, do badań modelowych
Polimer 2 bioaktywny z Ag	PE-HD Purell + 40 % MD C-120 + 10 % SGS-Ag + 5 % K	30	69 288	zawiera krzemionkę z Ag w cienkich warstwach polietylenu umieszczonych z obu stron rdzenia
Polimer 3 bioaktywny z Cu	PE-HD Purell + 40 % MD C-120 + 15 % SGS-Cu + 5 % K	54	47 640	zawiera krzemionkę z Cu w cienkich warstwach polietylenu umieszczonych z obu stron rdzenia
Polimer 4 kontrola	PE-HD Purell + 40 % MD C-120 + 5 % K	—	—	próba odniesienia — dla polimeru 2 i 3

*) PE-HD Purell — polietylen dużej gęstości, MD C-120 — mączka drzewna, K — kompatybilizator, SGS — krzemionka.

o powierzchni 1 cm², zdezynfekowano 70-proc. alkoholem etylowym, przepłukano sterylną wodą i pozostawiono do wysuszenia.

Drobnoustroje

Wykorzystano sześć gatunków bakterii — cztery szczepy pochodziły z Amerykańskiej Kolekcji Czystych Kultur (ATCC), dwa pozostałe wyizolowano z powierzchni materiałów polimerowych stanowiących fragmenty obudowy wewnętrznej lodówki (zatyczka otworu spustowego lodówki) (tabela 2). Szczepy pozyskano z Kolekcji Czystych Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych ŁOCK 105 Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ. Kryterium wyboru szczepów do badań stanowiła, opisana w literaturze ich zdolność do adhezji na powierzchni polimerów, jak również chorobotwórczość.

T a b e l a 2. Gatunki bakterii stosowane w badaniach**T a b l e 2.** Bacteria examined in the study

Gatunek	Pochodzenie
<i>Escherichia coli</i>	American Type Culture Collection ATCC 10536
<i>Staphylococcus aureus</i>	American Type Culture Collection ATCC 6538
<i>Listeria monocytogenes</i>	American Type Culture Collection ATCC 19115
<i>Salmonella Typhimurium</i>	American Type Culture Collection ATCC 14028
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Izolat ze środowiska (polimerowa zatyczka otworu spustowego lodówki)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Izolat ze środowiska (polimerowa zatyczka otworu spustowego lodówki)

Drobnoustroje przechowywano na podłożu w postaci skosów TSA (tryptone-soya-agar) w temp. +4 °C.

Pożywki mikrobiologiczne i odczynniki

W badaniach wykorzystywano następujące pożywki mikrobiologiczne: **TSA** — agar tryptozowo-sojowy, Merck, do przechowywania szczepów oraz oznaczania liczby bakterii po inkubacji na polimerach w metodzie hodowlanej; **TSB** — bulion tryptozowo-sojowy, Merck, do aktywacji bakterii przed eksperymentami; **M₀** — podłoże mineralne zawierające minimalną ilość substancji odżywczych warunkujących prawidłowy wzrost bakterii [skład: glukoza 5 g, MgSO₄ · 7 H₂O 5 g, (NH₄)₂SO₄ 3 g, KH₂PO₄ 1 g, ekstrakt drożdżowy 10 g, woda destylowana 1 dm³, pH: 5,6 ± 0,2] — do hodowli bakterii na polimerach w badaniach adhezji i przeżywalności. Wszystkie podłoża sterylizowano w temp. 117 °C, w ciągu 20 min.

Używane odczynniki chemiczne: fizjologiczny roztwór chlorku sodu (0,85 % NaCl w wodzie destylowanej) do rozcieńczeń; woda dejonizowana w aparacie Millipore Simplicity, do rozcieńczania pożywki M₀ przed pomiarem zawartości ATP oraz splukiwania z powierzchni polimerów komórek bakterii, które nie uległy adhezji; barwniki fluorescencyjne: jodek propidyny (500 µg/cm³ w 70-proc. alkoholu etylowym, Sigma) oraz bisbenzydyna H 33258 (100 µg/cm³ w wodzie dejonizowanej, Sigma) do barwienia komórek bakterii na powierzchni polimeru.

Hodowla bakterii na polimerach

Przeprowadzono hodowle bakterii na polimerze kontrolnym PE-HD (por. tabela 1, polimer 1) oraz na polimerach bioaktywnych (z dodatkiem srebra lub miedzi, tabela 1, polimery 2 i 3) i odpowiednim polimerze kontrolnym (polimer 4).

Na wstępie przygotowano inokulum bakterii do zaszczerpienia podłoża z polimerami. W tym celu hodowano bakterie na podłożu TSB w temp. 37 °C przez 24 h (szczepy ATCC) oraz w temp. 30 °C w ciągu 24 h (szczepy pochodzące ze środowiska). Następnie, hodowlę bakterii odwirowywano w celu usunięcia płynu pochodzącego

(10000 × g, czas 10 min), a otrzymaną biomasę zawieszano w 50 cm³ soli fizjologicznej (inokulum). Metodą mikroskopową ustalano gęstość inokulum na poziomie 10⁶ komórek/ml. Pożywkę M₀ (50 cm³) umieszczano w kolbach Erlenmayera (250 cm³), zaszczerpiano 0,5 cm³ inokulum bakterii i do pożywki wprowadzono próbki polimerów. Hodowle prowadzono w warunkach dynamicznych (wytrząsając w ruchu eliptycznym z prędkością 110 cykli/min i amplitudą 10) w temp. 30 ± 1 °C przez 5 dób. Próbki do analizy dynamiki wzrostu i adhezji bakterii na powierzchni polimerów (przeprowadzanej za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, oznaczania ATP, metodą hodowlaną) pobierano po 0, 4, 8, 24, 48, 96 h i, dodatkowo, po 168 h hodowli (na potrzeby metody hodowlanej i oznaczania ATP). Próbki polimerów do analizy przeżywalności i adhezji komórek drobnoustrojów po kontakcie z powierzchnią polimerów bioaktywnych i kontrolnych pobierano po 5 dobach hodowli.

Metody badań

Metoda hodowlana

W celu określenia dynamiki wzrostu bakterii i porównania wyników z danymi otrzymanymi metodą oznaczania ATP, metodą hodowlaną oceniano liczbę bakterii na powierzchni polimeru kontrolnego (polimer 1). Po wyjęciu z pożywki polimery przemywano trzykrotnie sterylną wodą destylowaną, aby usunąć komórki, które nie uległy adhezji do powierzchni (planktoniczne), a materiał przenoszono następnie do 50 cm³ sterylnej soli fizjologicznej i całość wytrząsano na wytrząsarce (wytrząsanie w ruchu eliptycznym z prędkością 110 cykli/min i amplitudą 10, w ciągu 15 min) usuwając w ten sposób komórki, które uległy adhezji na powierzchni polimeru. W otrzymanej zawieszynie określano liczbę komórek bakterii metodą płytkową wgłębną, na pożywce TSA, rozcieńczając zawiesinę w sterylnej soli fizjologicznej (od 10⁻⁶ do 10⁻¹⁰). Inkubację prowadzono w opisanych warunkach (jak wyżej), po czym zliczono ilość wyrosłych kolonii, wyniki podawano w jtk/cm². Pomiar powtórzono trzykrotnie w odniesieniu do odrębnych próbek polimerów.

Metoda oznaczania zawartości ATP

Do pomiaru zawartości ATP na powierzchni badanych polimerów wykorzystano system HY-LiTE® (Merck), oparty na metodzie bioluminescencyjnej. Polimery po wyjęciu z pożywki przemywano trzykrotnie dejonizowaną wodą destylowaną w celu usunięcia komórek, które nie uległy adhezji, a następnie metodą wymazu, wykorzystując wymazówki HY-LiTE, pobierano próbki według procedury producenta. Próby umieszczano w luminometrze (Merck) i odczytywano RLU (*Relative Light Unit* – względne jednostki świetlne), wyniki podawano w RLU/cm². Oznaczono również zawartość ATP na

powierzchni czystych polimerów, zawieszonych uprzednio w pożywce (bez hodowli drobnoustrojów). Poziom ATP w próbkach kontrolnych wynosił: 20–39 RLU, co uwzględniano w obliczeniach. Pomiar powtarzano trzykrotnie w odniesieniu do odrębnych próbek polimerów.

Metoda mikroskopii fluorescencyjnej

Badanie adhezji drobnoustrojów na powierzchni polimerów przeprowadzono metodą mikroskopii fluorescencyjnej, przy użyciu zestawu mikroskopu świetlnego CX41, wyposażonego w obiektyw fluorytowy przeznaczony specjalnie do badań w epifluorescencji, oraz w kamerę cyfrową DP70 (zestaw Olympus). Do obróbki i archiwizacji zdjęć zastosowano program cellB (Olympus), za pomocą którego zliczano widoczne na fotografiach wybarwione komórki.

Po hodowli polimery przemywano sterylną wodą destylowaną w celu usunięcia pożywki i komórek, które nie uległy adhezji, na powierzchnię nanoszono następnie 0,5 cm³ roztworu bisbenzydyny i inkubowano w ciągu 120 s. Po upływie tego czasu próbę przemywano sterylną wodą destylowaną (usunięcie barwnika) i na jej powierzchnię nanoszono 0,3 cm³ roztworu jodku propidyny, inkubowano 120 s i ponownie przepłukiwano wodą.

Na ostatnim etapie próbkę suszono w delikatnym strumieniu powietrza i w powiększeniu 100-krotnym obserwowano pod mikroskopem fluorescencją wybarwionych komórek, w zależności od żywotności komórek – zieloną (bisbenzydyna barwi żywe komórki) lub/oraz czerwoną (jodek propidyny barwi komórki martwe). Wybarwione komórki bakterii liczono w 10 polach widzenia mikroskopu. Do obliczeń przyjęto sumę komórek, które uległy adhezji bez rozróżniania komórek żywych i martwych (żywotność została ustalona metodą hodowlaną i ATP). Pole powierzchni obrazu służące do obliczenia liczby komórek przypadających na 1 mm² powierzchni polimeru ustalono za pomocą komputera sprzężonego z mikroskopem fluorescencyjnym. Pomiar adhezji metodą mikroskopii fluorescencyjnej powtórzono trzykrotnie w odniesieniu do odrębnych próbek polimerów.

Błąd powtarzalności metod

W celu wyznaczenia błędów powtarzalności metod oznaczania ATP i mikroskopii fluorescencyjnej przeprowadzono dziesięciokrotny pomiar zawartości ATP oraz liczby komórek na powierzchni polimeru. Polimery do badań uzyskano po hodowli bakterii *Burkholderia cepacia* w warunkach: polimer 1, pożywka M₀, inokulum 10⁶ jtk/cm³, inkubacja 30 °C w ciągu 24 h, hodowla dynamiczna. Oznaczanie błędów powtarzalności obu metod wykonano ponadto w przypadku wszystkich polimerów bioaktywnych i polimeru kontrolnego, po hodowlach bakterii.

Metody matematyczne i statystyczne

Analiza matematyczna obejmowała obliczenia średniej arytmetycznej i odchylenia standardowego uzyskanych wyników.

Wyznaczono ponadto matematyczne zależności między zawartością ATP wyznaczoną metodą bioluminescencji a liczbą komórek bakterii na polimerze ocenianą metodą hodowlaną. Zależności opisano funkcjami wykładniczą i liniową, obliczono współczynnik korelacji R . Korelację uznaje się za wysoką, gdy współczynnik $R > 0,7$, umiarkowaną gdy $R = 0,4-0,6$, małą, gdy $R < 0,4$ [15].

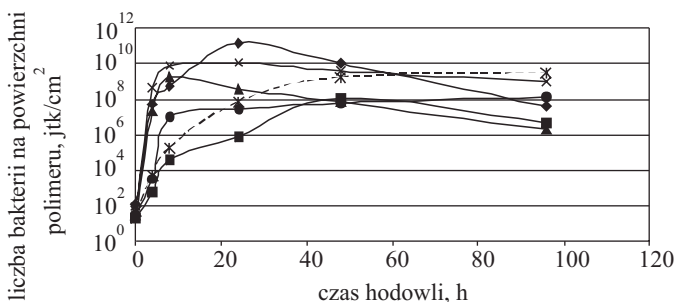
Średnią arytmetyczną i odchylenie standardowe wykorzystano do obliczenia wskaźnika Pearsona, który stanowił miarę błędności powtarzalności metod oznaczania zawartości ATP (bioluminescencja) i liczby komórek bakterii na polimerze (mikroskopia fluorescencyjna). Wskaźnik Pearsona jest miarą rozproszenia wyników wokół średniej [16].

W celu ustalenia czy istnieją statystycznie istotne różnice między wynikami adhezji/przeżywalności na polimerach z dodatkiem biocydów oraz na polimerach kontrolnych przeprowadzono analizę statystyczną przy użyciu testu t-Studenta, przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wszystkie obliczenia matematyczne i statystyczne wykonano stosując programy komputerowe Excel oraz Origin 7.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Polietylen PE-HD (por. tabela 1, polimer 1) okazał się materiałem podatnym na zasiedlanie i wzrost badanych bakterii (rys. 1–3). Świadczy o tym zarówno duża liczba bakterii i zawartość ATP, jak i mierzona metodą mikro-

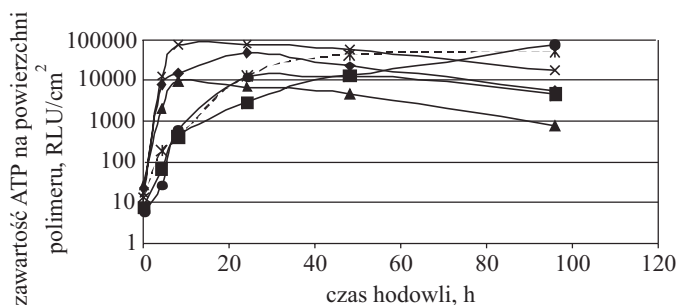


Rys. 1. Dynamika wzrostu bakterii na polimerze 1 mierzona metodą hodowlaną: \blacklozenge – *Burkholderia cepacia*, \blacktriangle – *Salmonella Typhimurium*, $*$ – *Staphylococcus aureus*, \blacksquare – *Listeria monocytogenes*, \times – *Pseudomonas fluorescens*, \bullet – *Escherichia coli*

Fig. 1. The dynamics of bacterial growth on the polymer 1 determined by culture method: \blacklozenge – *Burkholderia cepacia*, \blacktriangle – *Salmonella Typhimurium*, $*$ – *Staphylococcus aureus*, \blacksquare – *Listeria monocytogenes*, \times – *Pseudomonas fluorescens*, \bullet – *Escherichia coli*

skopii fluorescencyjnej liczba komórek, które uległy adhezji na powierzchni polimeru.

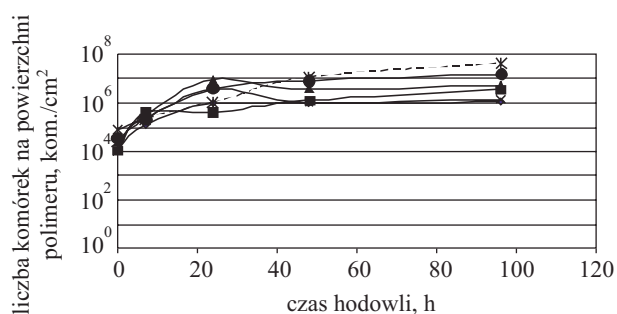
Dynamikę wzrostu bakterii na polimerze mierzoną metodą hodowlaną przedstawiono na rys. 1. Stwierdzono intensywny przyrost liczby bakterii na polimerze do 8–24 godziny hodowli, w zależności od gatunku (faza logarytmicznego wzrostu), po upływie tego czasu bakterie rozpoczęły fazę wzrostu stacjonarnego, a następnie, po 48–96 godzinie hodowli weszły w fazę zamierania. W przypadku *Listeria monocytogenes* nie stwierdzono fazy zamierania, co dodatkowo świadczy o tym, że bakteria ta dobrze rozwija się na powierzchniach polimerów. W hodowli bakterii *Salmonella Typhimurium* zaobserwowano natomiast zamieranie już po ośmiu godzinach inkubacji. Największą liczbę bakterii na powierzchni polimeru, utrzymującą się aż do 50 godziny hodowli, odnotowano w przypadku *Burkholderia cepacia*. Szczep ten, wyizolowany z polimerowej zatyczki otworu spustowego lodówki, w warunkach modelowych wykazał dobre przystosowanie do wzrostu na powierzchni PE-HD (polimer 1).



Rys. 2. Dynamika wzrostu bakterii na polimerze 1 oceniana na podstawie zawartości ATP: \blacklozenge – *Burkholderia cepacia*, \blacktriangle – *Salmonella Typhimurium*, $*$ – *Staphylococcus aureus*, \blacksquare – *Listeria monocytogenes*, \times – *Pseudomonas fluorescens*, \bullet – *Escherichia coli*

Fig. 2. The dynamics of bacterial growth on the polymer 1 determined by ATP content: \blacklozenge – *Burkholderia cepacia*, \blacktriangle – *Salmonella Typhimurium*, $*$ – *Staphylococcus aureus*, \blacksquare – *Listeria monocytogenes*, \times – *Pseudomonas fluorescens*, \bullet – *Escherichia coli*

Dynamika wytwarzania ATP na powierzchni PE-HD miała przebieg niemal identyczny jak krzywe wzrostu liczby bakterii mierzonej metodą hodowlaną (rys. 2). Wzrost poziomu ATP odnotowano w pierwszych 24 godzinach hodowli, w przypadku *E. coli* trwał on nawet do 96 godziny, po upływie tego czasu zawartość ATP spadała, co świadczy o zmniejszającej się aktywności metabolicznej szczepów. W przypadku bakterii *Salmonella Typhimurium* spadek zawartości ATP następuje już po 8 godzinie hodowli, co wskazuje, iż patogen ten nie znalazł na powierzchni badanego polimeru PE-HD dobrych warunków do rozwoju.



Rys. 3. Dynamika adhezji bakterii na polimerze 1 mierzona za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej: \blacklozenge – *Burkholderia cepacia*, \blacktriangle – *Salmonella Typhimurium*, \ast – *Staphylococcus aureus*, \blacksquare – *Listeria monocytogenes*, \times – *Pseudomonas fluorescens*, \bullet – *Escherichia coli*

Fig. 3. The dynamics of bacterial growth on the polymer 1 determined by fluorescence microscopy: \blacklozenge – *Burkholderia cepacia*, \blacktriangle – *Salmonella Typhimurium*, \ast – *Staphylococcus aureus*, \blacksquare – *Listeria monocytogenes*, \times – *Pseudomonas fluorescens*, \bullet – *Escherichia coli*

Wszystkie badane bakterie wykazywały zdolność do adhezji na powierzchni PE-HD (rys. 3). Metodą mikroskopii fluorescencyjnej wykazano, iż do 24 godziny hodowli liczba ulegających adhezji komórek bakterii rosła, a po upływie tego czasu utrzymywała się już na stałym poziomie. Jedynie bakteria *S. aureus* ulegała intensywnej adhezji do 96 godziny hodowli. Należy zauważyć, że liczba jednostek tworzących kolonie na powierzchni polimeru, mierzona metodą hodowlaną, jest nieco większa (o jeden–dwa rzędy wielkości) niż liczba komórek, które uległy adhezji mierzona metodą fluorescencji. W metodzie mikroskopowej analiza obejmuje bowiem zarówno komórki żywe, jak i martwe, metoda hodowlana rejestruje natomiast tylko komórki aktywne.

Z analizy porównawczej metody oznaczania zawartości ATP oraz, określającej liczebność bakterii, metody hodowlanej wynika, że są one ze sobą skorelowane, obie metody oceniają żywotność komórek. Współczynniki tej korelacji (R) oraz opis matematyczny zależności przedstawia tabela 3.

Zależność między porównywanymi wynikami opisano w przypadku wszystkich badanych bakterii dwoma rodzajami funkcji – wykładniczą i liniową, przy czym funkcja wykładnicza z lepszym przybliżeniem matematycznym opisuje tę zależność, współczynniki korelacji dla tej funkcji kształtowały się w przedziale $R = 0,78–0,92$. Opis zależności funkcją liniową wskazywał również na dużą korelację porównywanych metod ($R = 0,73–0,81$). Różnica między współczynnikami korelacji uzyskanymi z opisu dwóch funkcji wynosiła średnio 7%. Obie funkcje można zatem stosować do opisu (z dużym przybliżeniem), dynamiki wzrostu.

Duża korelacja wyników uzyskanych przy użyciu metody hodowlanej i oznaczania ATP wskazuje, iż można je stosować zamiennie, obie metody bowiem określają liczbę żywych komórek. Wykorzystując technikę mikroskopii fluorescencyjnej otrzymujemy dodatkową informację o możliwości adhezji bakterii do powierzchni polimeru. Nie analizowano natomiast korelacji między zawartością ATP a liczbą komórek, które uległy adhezji do powierzchni polimeru, ustaloną metodą mikroskopii fluorescencyjnej, ze względu na to, iż są to dwa różne parametry (żywotność i adhezja).

W badaniach oceniono również błąd powtarzalności oznaczania ATP na powierzchni polimeru oraz określania, metodą mikroskopii fluorescencyjnej, liczby komórek ulegających adhezji (tabela 4). Stwierdzono, iż błąd powtarzalności oznaczania ATP metodą wykorzystującą system HY-LiTE sięga 3 %, natomiast z zastosowaniem mikroskopii fluorescencyjnej kształtuje się na poziomie 1 %.

Dobra korelacja z metodą hodowlaną, niewielki błąd powtarzalności, krótki czas analizy i niewielka pracochłonność stały się podstawą do wyboru metody oznaczania ATP oraz mikroskopii fluorescencyjnej jako alternatywnych dla tradycyjnej metody hodowlanej.

Wybór mikroskopii fluorescencyjnej do analizy komórek ulegających adhezji jest podyktowany również tym, iż niektóre bakterie silnie przylegają do powierzchni polimeru, co uniemożliwia ich usunięcie podczas przygotowania próbek w metodzie hodowlanej i ozna-

T a b e l a 3. Opisane funkcjami matematycznymi zależności pomiędzy zawartością ATP, a oznaczoną metodą hodowlaną liczbą bakterii na polimerze 1

T a b l e 3. Dependence of the ATP content determined by culture method on the number of bacteria on the polymer 1, described with mathematical functions

Gatunek	Funkcja liniowa	Współczynnik korelacji R	Funkcja wykładnicza	Współczynnik korelacji R	Różnica współczynników R dwóch funkcji, %
<i>Escherichia coli</i>	$y = 0,5275x + 0,4289$	0,8051	$y = 0,9459e^{0,212x}$	0,8916	9,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	$y = 0,4643x + 0,2724$	0,7437	$y = 0,8922e^{0,1811x}$	0,8111	8,3
<i>Listeria monocytogenes</i>	$y = 0,4327x + 0,3255$	0,7708	$y = 0,9091e^{0,1715x}$	0,8328	7,4
<i>Salmonella Typhimurium</i>	$y = 0,4128x + 0,3329$	0,7262	$y = 0,8649e^{0,1686x}$	0,7816	7,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	$y = 0,4377x + 0,5591$	0,7952	$y = 1,0591e^{0,1656x}$	0,9257	14,1
<i>Burkholderia cepacia</i>	$y = 0,3821x + 0,7297$	0,7861	$y = 0,9677e^{0,1875x}$	0,7992	1,6

T a b e l a 4. Błąd powtarzalności metody oznaczania zawartości ATP oraz liczby komórek ulegających adhezji na powierzchni polimeru 1 (metoda mikroskopii fluorescencyjnej)

T a b l e 4. The repeatability error of the determination of ATP content and number of cells adherent to the surface of polymer 1 (fluorescence microscopy method)

Metoda bioluminescencji		Metoda mikroskopii fluorescencyjnej	
	[zawartość ATP na powierzchni polimeru, RLU/cm ²]		[liczba komórek ulegających adhezji na powierzchni polimeru, kom/mm ²]
Średnia	4 333,333	Średnia	1,1 · 10 ⁴
Odchylenie standardowe	136,626	Odchylenie standardowe	1,0 · 10 ²
Wskaźnik Pearsona	3,2 %	Wskaźnik Pearsona	0,95 %

czania ATP. Ponadto, komórki są połączone strukturami trójwymiarowymi (sklejone substancją pozakomórkową – EPS spajającą cały biofilm), co sprawia, że w badaniach metodą hodowlaną/ATP, liczba rzeczywistych komórek/zawartość ATP może być niedoszacowana [17, 18]. Przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, oprócz liczby komórek, które uległy adhezji można również obserwować zewnątrzkomórkowe substancje polimerowe EPS. Do bakterii wytwarzających w największych ilościach EPS należą szczepy wyizolowane ze środowiska *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* oraz szczep kolekcyjny *Listeria monocytogenes* (wnioski z obserwacji mikroskopowych).

W przypadku kontaktu bakterii z powierzchnią polimeru zawierającego w swoim składzie biocyd, może dojść do zahamowania ich wzrostu, mimo iż zachowują aktywność życiową. Na podłożu wzrostowym komórki

ulegają regeneracji, dzięki temu liczba zdolnych do wzrostu bakterii jest duża. Wybór metody ATP określającej rzeczywisty stan aktywności metabolicznej bakterii wydaje się zatem bardziej uzasadniony niż metoda analizy hodowlanej.

Do oceny żywotności komórek oraz ich adhezji na powierzchni bioaktywnych polimerów zawierających srebro lub miedź zastosowano metody oznaczania ATP oraz mikroskopii fluorescencyjnej. Porównano liczbę komórek bakterii, które uległy adhezji na powierzchni polimeru bioaktywnego zawierającego srebro z liczbą komórek przyległych do powierzchni polimeru kontrolnego i na tej podstawie stwierdzono, iż istotnie statystycznie różnice liczebności takich komórek występują w przypadku bakterii *S. aureus*, *Ps. fluorescens* oraz *B. cepacia* (tabela 5). Bioaktywny polimer zawierający srebro w znacznym stopniu ograniczał adhezję *S. aureus*, natomiast w przy-

T a b e l a 5. Ocena adhezji i przeżywalności bakterii na powierzchni polimeru zawierającego srebro i polimeru kontrolnego po 5 dobach inkubacji

T a b l e 5. Evaluation of the adhesion and viability of the bacteria on the surface of polymer with silver and control polymer after 5 days of incubation

Gatunek	Metoda mikroskopii fluorescencyjnej, liczba komórek na powierzchni polimeru, komórki/mm ²			Metoda bioluminescencji, zawartość ATP na powierzchni polimeru, RLU/cm ²		
	polimer 2 [z biocydem (Ag)]	polimer 4 (próbka kontrolna)	prawdopodobieństwo różnic (<i>p</i>) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05^{**}$	polimer 2 [z biocydem (Ag)]	polimer 4 (próbka kontrolna)	prawdopodobieństwo różnic (<i>p</i>) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05^{**}$
<i>Escherichia coli</i>	Śr. 2,40 · 10 ⁴ OS: 1,74 · 10 ⁴	Śr. 1,65 · 10 ⁴ OS: 4,28 · 10 ³	0,23850	Śr. 201,33 OS: 119,10	Śr. 453,33 OS: 244,19	0,18344
<i>Staphylococcus aureus</i>	Śr. 8,67 · 10 ³ OS: 2,86 · 10 ³	Śr. 4,38 · 10 ⁴ OS: 2,18 · 10 ⁴	0,00025 ^{**})	Śr. 174,00 OS: 125,49	Śr. 783,33 OS: 132,04	0,00441 ^{**})
<i>Listeria monocytogenes</i>	Śr. 7,94 · 10 ³ OS: 3,93 · 10 ³	Śr. 5,30 · 10 ³ OS: 1,22 · 10 ³	0,08573	Śr. 2 700,00 OS: 2 389,5	Śr. 176,66 OS: 66,58	0,14151
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Śr. 9,73 · 10 ³ OS: 2,76 · 10 ³	Śr. 1,78 · 10 ⁴ OS: 1,97 · 10 ⁴	0,11232	Śr. 59,33 OS: 44,79	Śr. 127,66 OS: 39,95	0,11991
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Śr. 3,00 · 10 ⁴ OS: 1,65 · 10 ⁴	Śr. 6,12 · 10 ³ OS: 1,73 · 10 ³	0,00013 ^{**})	Śr. 356,67 OS: 115,04	Śr. 465,33 OS: 361,34	0,64569
<i>Burkholderia cepacia</i>	Śr. 7,13 · 10 ⁴ OS: 3,69 · 10 ⁴	Śr. 9,42 · 10 ³ OS: 2,96 · 10 ³	0,00029 ^{**})	Śr. 2 466,66 OS: 1 985,78	Śr. 9 766,67 OS: 2 250,18	0,01355 ^{**})

*) Śr. — średnia arytmetyczna, OS — odchylenie standardowe.

**) Różnice statystycznie istotne między polimerem 2 a polimerem 4, jeżeli $p < 0,05$.

padku *B. cepacia* i *Ps. fluorescens* sprzyjał temu procesowi. W literaturze potwierdzano wielokrotnie aktywność przeciwdrobnoustrojową srebra wobec bakterii *S. aureus*, *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, *B. subtilis* [19–21]. W odniesieniu do pozostałych szczepów nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między liczbą komórek ulegających adhezji na polimerze ze srebrem i na polimerze kontrolnym, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi, stwierdzającymi, iż niektóre bakterie charakteryzują się dużą opornością na srebro, np. *Legionella pneumophila* czy *Salmonella Typhimurium*. Może to wynikać z mechanizmów oporności, m.in. z obecności w komórkach plazmidu pMG 101 [20, 22]. Mniejszą adhezję stwierdzono także w odniesieniu do *E. coli* na powierzchni polimeru zawierającego miedź (tabela 6). Silniejsze niż srebra oddziaływanie miedzi na bakterie *E. coli* potwierdzono już w publikacji [19], podobnie natomiast jak w przypadku polimeru z dodatkiem srebra, również na polimerze z udziałem miedzi, bakteria *B. cepacia* w większym stopniu ulegała adhezji niż na powierzchni polimeru kontrolnego. Rosnąca liczba bakterii na polimerach bioaktywnych może być efektem dodatku nośników, które zwiększają powierzchnię polimeru dostępną dla bakterii ulegających silnej adhezji – wytwarzających znaczne ilości EPS, np. *Burkholderia cepacia* i *Pseudomonas fluorescens* [23].

Analiza metodą ATP wykazała istotny statystycznie spadek poziomu żywotności komórek *S. aureus* na polimerze zawierającym srebro i podobnie, w przypadku *E. coli* na polimerze zawierającym miedź, co koreluje ze stwierdzonym, obniżonym poziomem adhezji tych bak-

terii na badanych materiałach. Odmienny wynik otrzymano w odniesieniu do *Burkholderia cepacia* – mimo zwiększonej adhezji komórek bakterii do polimeru zawierającego srebro znacznemu zmniejszeniu uległa ich żywotność w porównaniu z żywotnością bakterii na powierzchni polimeru kontrolnego. W przypadku pozostałych bakterii nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między zawartością ATP na polimerze bioaktywnym i polimerze kontrolnym.

Analizę metodą mikroskopową oraz metodą oznaczania ATP wykonano po 5 dobach inkubacji, gdy biofilm był „młody” i nie w pełni jeszcze ukształtowany. Uzasadniony wybór tego czasu potwierdzają wyniki pracy [17]. Autorzy stwierdzili, iż metoda mikroskopii fluorescencyjnej ma ograniczenia dotyczące analizy dojrzałego biofilmu ze względu na wiele płaszczyzn jego rozwoju uniemożliwiających uzyskanie obrazu przydatnego do rzeczywistej oceny ilościowej.

Zaobserwowano również, iż dodatek do masy polimeru nośnika z substancją biocydową niekorzystnie zwiększał błąd powtarzalności obu testowanych metod. Zanotowano znaczne, często zbliżone do wartości średnich, odchylenia standardowe (por. tabele 5 i 6). Obliczony wskaźnik Pearsona dla powtarzalności metod mikroskopii fluorescencyjnej oraz oznaczania ATP w badaniach na powierzchni bioaktywnych polimerów, kształtował się, średnio na poziomie 47 % dla metody mikroskopowej oraz 73 % dla oznaczania ATP (tabela 7). Może to mieć istotny wpływ na interpretację wyników, w badaniach biologicznych przyjmuje się bowiem, że

T a b e l a 6. Ocena adhezji i przeżywalności bakterii na powierzchni polimeru zawierającego miedź i polimeru kontrolnego, po 5 dobach inkubacji

T a b l e 6. Evaluation of the adhesion and viability of the bacteria on the surface of polymer with copper and control polymer after 5 days of incubation

Gatunek	Metoda mikroskopii fluorescencyjnej, liczba komórek na powierzchni polimeru, komórki/mm ²			Metoda bioluminescencji, zawartość ATP na powierzchni polimeru, RLU/cm ²		
	polimer 3 [z biocydem (Cu)]	polimer 4 (próbka kontrolna)	prawdopodobieństwo różnic (<i>p</i>) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05^{**}$	polimer 3 [z biocydem (Cu)]	polimer 4 (próbka kontrolna)	prawdopodobieństwo różnic (<i>p</i>) przy poziomie istotności $\alpha = 0,05^{**}$
<i>Escherichia coli</i>	Śr. $1,57 \cdot 10^3$ OS: $7,46 \cdot 10^2$	Śr. $1,65 \cdot 10^4$ OS: $4,28 \cdot 10^3$	0,00000**)	Śr. 171,00 OS: 100,16	Śr. 453,33 OS: 244,19	0,00815**)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Śr. $4,14 \cdot 10^4$ OS: $2,68 \cdot 10^4$	Śr. $4,38 \cdot 10^4$ OS: $2,18 \cdot 10^4$	0,89593	Śr. 394,00 OS: 507,84	Śr. 783,33 OS: 132,04	0,34483
<i>Listeria monocytogenes</i>	Śr. $5,22 \cdot 10^3$ OS: $1,29 \cdot 10^3$	Śr. $5,30 \cdot 10^3$ OS: $1,22 \cdot 10^3$	0,74745	Śr. 1 290,00 OS: 1 415,00	Śr. 176,66 OS: 66,58	0,24525
<i>Salmonella Typhimurium</i>	Śr. $9,73 \cdot 10^3$ OS: $2,76 \cdot 10^3$	Śr. $1,78 \cdot 10^4$ OS: $1,97 \cdot 10^4$	0,23914	Śr. 160,67 OS: 166,17	Śr. 127,66 OS: 39,95	0,75486
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Śr. $6,37 \cdot 10^3$ OS: $2,28 \cdot 10^3$	Śr. $6,12 \cdot 10^3$ OS: $1,73 \cdot 10^3$	0,90759	Śr. 1 136,00 OS: 1 787,84	Śr. 465,33 OS: 361,34	0,26811
<i>Burkholderia cepacia</i>	Śr. $7,13 \cdot 10^4$ OS: $3,69 \cdot 10^4$	Śr. $9,42 \cdot 10^3$ OS: $2,96 \cdot 10^3$	0,01460**)	Śr. 521,33 OS: 594,29	Śr. 9 766,67 OS: 2 250,18	0,13755

*) Śr. — średnia arytmetyczna, OS — odchylenie standardowe.

***) Różnice statystycznie istotne między próbą polimeru kontrolną a próbą polimeru z dodatkiem biocydu (Ag) jeżeli $p < 0,05$.

T a b e l a 7. Błąd powtarzalności oznaczania zawartości ATP oraz liczby komórek, które uległy adhezji do powierzchni polimerów bioaktywnych i do polimeru kontrolnego (metoda mikroskopii fluorescencyjnej)

T a b l e 7. The repeatability error of the determination of ATP content and number of cells adherent to the surface of bioactive polymers and control polymer (fluorescence microscopy method)

Rodzaj polimeru	Wskaźnik Pearsona, %	
	metoda bioluminescencji [zawartość ATP na powierzchni polimeru, RLU/cm ²]	metoda mikroskopii fluorescencyjnej [liczba komórek ulegających adhezji na powierzchni polimeru, komórki/mm ²]
Polimer 2 z biocydem (Ag) [PE-HD Purell/MD C-120/SGS-Ag/K]	32–88	28–72
Polimer 3 z biocydem (Cu) [PE-HD Purell/MD C-120/SGS-Cu/K]	58–157	24–65
Polimer 4 kontrolny [PE-HD Purell/MD C-120/K]	16–77	23–49
Średnio dla wszystkich polimerów z nośnikami	73	47

wskaźnik Pearsona do 20 % spełnia kryteria określające metodę jako powtarzalną [16]. Duży błąd powtarzalności może być konsekwencją struktury powierzchni badanych polimerów zawierających maczkę drzewną i nanokrzemionkę z dodatkiem srebra lub miedzi. Na kontrolnym polimerze, bez dodatków, błąd testowanych metod nie przekraczał 3 %. Jest to zatem wskazówka na przyszłość, iż do analizy adhezji i żywotności komórek bakterii do bioaktywnego polimeru należy przygotować jego próbkę o gładkiej powierzchni. Wcześniejsze badania [24] wykazały, iż dodatek nośników do materiałów polimerowych zmienia właściwości fizykochemiczne powierzchni – ich hydrofobowość oraz chropowatość – co w istotnym stopniu wpływa na adhezję bakterii. W celu wyeliminowania wpływu nierównej powierzchni kompozytów żywicznych zawierającego srebro, na adhezję bakterii *Streptococcus mutants*, Bürgers [25] zastosował metodę mechanicznego polerowania powierzchni, co według autora, jest niezbędne do właściwej analizy oddziaływania przeciwdrobnoustrojowego. Autorzy [25] wykazali również, iż dodatek srebra korzystnie zmienia powierzchnię materiałów, staje się ona bardziej hydrofobowa, a dzięki temu zwiększa się efekt przeciwdrobnoustrojowy.

PODSUMOWANIE

Ocenę aktywności przeciwdrobnoustrojowej polimerów bioaktywnych można przeprowadzić metodami mikroskopii fluorescencyjnej oraz oznaczania ATP. Metodą mikroskopii fluorescencyjnej możemy ocenić zarówno liczbę komórek, które uległy adhezji do powierzchni polimeru, jak i potwierdzić możliwość wytwarzania przez bakterie substancji pozakomórkowej EPS. Metody oznaczania ATP i hodowlana dają porównywalne wyniki dotyczące żywotności komórek, opisane z wysokim stopniem korelacji funkcją wykładniczą lub liniową. Ze względu na mniejszą pracochłonność i czasochłonność analizy ATP, tę metodę wytypowano do badań żywotności komórek. Odpowiedni sposób przygotowania powierzchni próbek bioaktywnych polimerów (zawierających nośniki

dla biocydów) ma istotny wpływ na błąd powtarzalności obu testowanych metod. W przypadku polimeru kontrolnego (bez dodatków), błąd powtarzalności był niewielki i wynosił dla metody oznaczania ATP 3 %, dla mikroskopii fluorescencyjnej 1 %. Istotne znaczenie w metodzie mikroskopii fluorescencyjnej ma również czas analizy, który należy tak dobrać aby analizie poddany był tworzący się biofilm, zbyt dojrzała struktura z EPS może być bowiem przyczyną dużego błędu pomiaru liczby przyległych do powierzchni polimeru komórek.

Ocena żywotności i adhezji na powierzchni badanych polimerów sześciu gatunków bakterii wykazała statystycznie istotne różnice w ograniczającym adhezję i żywotność działaniu polimeru z miedzią na bakterie *E. coli* oraz polimeru ze srebrem na bakterie *S. aureus*. *B. cepacia* okazała się bakterią ulegającą silnej adhezji do polimerów bioaktywnych, ale jej żywotność skutecznie ograniczał dodatek srebra w polimerze.

Badania wykonano w ramach Projektu: „Nanokompozyty polimerowe o zwiększonej odporności na działanie mikroorganizmów” Nr UDA-POIG.01.03.01-00-073/09-00 (lata 2010–2012).

Autorzy artykułu składają podziękowania za współpracę kierownikowi projektu dr hab. inż. Reginie Jeziórskiej oraz zespołowi badawczemu z Instytutu Chemii Przemysłowej za przygotowanie materiałów polimerowych do badań.

LITERATURA

1. Lazarowa V., Manem J.: *Water Res.* 1995, **29**(10), 2227.
2. Yuehuei H. An., Friedman R. J.: *J. Microbiol. Methods* 1997, **30**(2), 141.
3. Schultz C. L., Pezzutti M. R., Silor D., White R.: *J. Ind. Microbiol.* 1995, **15**, 243.
4. Lundin A.: w „ATP luminescence rapid methods in microbiology” (red. Stanley P. E., McCarthy B. J., Smither R.), Blackwell Scientific Publications, London 1989, str. 11–27.
5. Żakowska Z., Stobińska H.: „Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym”, Wyd. Politechnika Łódzka, Łódź 2000.

6. Czaczyk K., Powałowski Sz.: *Przemysł Spożywczy* 2001, **12**, 12.
7. Szczętko M., Krogulska B., Rogulski A.: *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny* 2008, **59**(1), 103.
8. Ludwicka A., Switalski L. M., Lundin A., Pulverer G.: *J. Microbiol. Methods* 1985, **4**(3–4), 169.
9. Humphries M., Jaworzyn J. F., Cantwell J. B.: *FEMS Microbiol. Lett.* 1986, **38**(5), 299.
10. Flint S. H., Brookes J. D., Brehmer P. J.: *J. Food Eng.* 2000, **43**, 235.
11. Mikš M. H., Warmińska-Radyko I.: *Medycyna Weterynaryjna* 2008, **5**, 623.
12. Paulsson M., Kober M., Freij-Larsson C., Stollenwerk M., Wesslen B., Ljungh A.: *Biomaterials* 1993, **14**(11), 845.
13. Yuehuei H. An., Friedman R. J., Draughn R. A., Smith E. A., Nicholson J. H., John J. F.: *J. Microbiol. Methods* 1995, **24**(1), 29.
14. O'Mahony R., Basset Ch., Holton J., Vaira D., Roitt I.: *J. Microbiol. Methods* 2005, **61**(1), 105.
15. Czermiński J. B., Inaszkiewicz A., Paszek Z., Sikorski A.: „Metody statystyczne dla chemików”, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 1992.
16. Kala R.: „Statystyka dla przyrodników”, Wyd. Akad. Rolniczej, Poznań 2002.
17. Andrews Ch. S., Denyer S. P., Hall B., Hanlon G. W., Lloyd A. W.: *Biomaterials* 2001, **22**, 3225.
18. Czaczyk K., Myszka K.: *Pol. J. Env. Stud.* 2007, **16**(6), 799.
19. Yoon K.-Y., Byeon J. H., Park J.-H., Hwang J.: *Sci. Total Env.* 2007, **373**, 572.
20. Hwang M. G., Katayama H., Ohgaki S.: *Water Res.* 2007, **41**, 4097.
21. Ruparelia J. P., Chatterjee A. K., Duttagupta S. P., Mukherji S.: *Acta Biomaterialia* 2008, **4**, 707.
22. Silver S.: *FEMS Microbiol. Rev.* 2003, **27**, 341.
23. Myszka K., Czaczyk K.: *Curr. Microbiol.* 2009, **58**(6), 541.
24. Teughels W., Van A. N., Sliepen I., Quirynen M.: *Clin. Oral Implant Res.* 2006, **17**, 68.
24. Bürgers R., Eidt A., Frakenberger R., Rosentritt M., Schweikl H., Handel G., Hahnel S.: *Arch. Oral Biol.* 2009, **54**, 595.

W kolejnym zeszycie ukaza się m.in. następujące artykuły:

- M. El Fray, J. Gajowy — Polimery wykazujące samoorganizację makrocząsteczek jako systemy kontrolowanego uwalniania leków
- D. Jamanek, Z. Wieczorek, I. Leszczyńska, W. Skupiński — Uwodornianie wiązań C=C w kopolimerach blokowych styren-izopren-styren w obecności układów katalitycznych z monocyklopentadienylowymi kompleksami tytanu(IV) (*j. ang.*)
- P. Jakubowska, T. Sterzyński — Dyfuzyjność cieplna kompozytów poliolefin o wysokim stopniu napełnienia węglanem wapnia (*j. ang.*)
- O. Gencel, W. Brostow, G. Martínez-Barrera, M. S. Gok — Właściwości mechaniczne betonów polimerowych zawierających różne ilości hematytu lub kolemanitu (*j. ang.*)
- W. Gustaw, D. Sz wajgier — Właściwości reologiczne mieszanych żeli β -glukanu owsianego i białek serwatkowych
- I. Korus — Kompleksy metali ciężkich z poli(4-styrenosulfonianem sodu) — badania termogravimetryczne (*j. ang.*)
- E. Sasimowski — Badania efektywności działania wyłaczarki nowej generacji. Cz. II. Ukształtowanie powierzchni wewnętrznej tulei obrotowej cylindra