

1. Osiągnięcia

- Określono wpływ wyładowań koronowych na śmiertelność mikroorganizmów: *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger*, *Citrobacter freundii*, *Listeria innocua*, naniesionych na folię z polilaktydu (PLA) oraz specjalne podłoże agarowe.
- Opracowano specjalne podłoże agarowe do badań biobójczości (Patent nr P.396178 udzielony przez Urząd Patentowy RP 19.09.2013 r.) oraz elektrodę do badań biobójczych (Zgłoszenie Patentowe nr P.405907 dokonane w dniu 04.11.2013 r. w Urzędzie Patentowym RP).
- Stwierdzono, że biobójcze działanie wyładowań koronowych jest korzystne w przypadkach stosowania ich w celu modyfikacji folii przeznaczonych na opakowania artykułów spożywczych.
- Stwierdzono, że działanie wyładowań koronowych powoduje śmiertelność poszczególnych szczepów bakterii oraz grzybów, w wyniku uszkodzenia ich błon komórkowych.

2. Uzyskane wyniki

Na podstawie uzyskanych wyników badań wpływu działania wyładowań koronowych (WK) na śmiertelność szczepu bakterii *Salmonella enteritidis* naniesionych na folię PLA można stwierdzić, że odnotowano działanie biobójcze WK. Liczba komórek bakterii odzyskanych z folii PLA poddanych modyfikowaniu z wartościami jednostkowej energii modyfikowania (E_j): 1, 2 i 3,5 kJ/m² jest o 2 rzędy wielkości mniejsza niż na kontrolnych foliach PLA. Uzyskany stopień redukcji (R) jest wystarczający do uznania działania czynnika biobójczego za skuteczny. Na folii PLA poddanych modyfikowaniu z wartościami $E_j = 7, 10$ i 20 kJ/m² stopień redukcji liczby komórek bakterii *Salmonella enteritidis* wynosi 3 rzędy wielkości, co oznacza skuteczne działanie biobójcze WK. W przypadku komórek bakterii *Escherichia coli* naniesionych na folie PLA i poddanych modyfikowaniu oznaczony stopień redukcji (R) wyniósł zaledwie 1. Tak niski poziom redukcji może wynikać z naturalnej śmiertelności bakterii, związanej z ich wysychaniem. Liczba bakterii na foliach PLA po godzinie od momentu ich naniesienia wynosiła $550 \cdot 10^3$, natomiast po około 36 godzinach liczba ta obniżyła się do poziomu $0,7 \cdot 10^3$. Przy tak małej liczebności wyjściowej trudno jest odnotować spadek liczby żywych komórek pod wpływem WK, jako czynnika biobójczego.

Również w przypadku szczepu bakterii *Bacillus subtilis* oraz *Staphylococcus aureus* $R < 2$. Wynik ten nie pozwala uznać WK (w zakresie stosowanych wartości E_j) za czynnik biobójczy. Na podstawie uzyskanych wyników badań biobójczego działania WK na szczep bakterii *Pseudomonas aeruginosa* naniesionych na folię PLA można stwierdzić, że odnotowano działanie biobójcze. Liczba komórek odzyskanych z folii PLA, poddanych modyfikowaniu z wartością $E_j = 1$ kJ/m² jest o 1 rząd wielkości mniejsza niż na kontrolnych foliach PLA. Natomiast dla wartości E_j od 2 do 20 kJ/m², redukcja liczby komórek zdolnych do wzrostu jest mniejsza o 3-4 rzędy wielkości. Ten stopień redukcji jest wystarczający do uznania działania czynnika biobójczego za skuteczny. W przypadku grzyba *Penicillium chrysogenum* naniesionego na folię PLA wyładowania koronowe działają jako środek biobójczy, ponieważ $R \geq 3$.

Podczas obserwacji mikroskopowej zauważono, że na wszystkich próbkach folii PLA, niezależnie od wartości E_j , większość komórek bakterii *Salmonella enteritidis* była martwa (z wyjątkiem próbki P0, niemodyfikowanej). Na wszystkich foliach PLA występowały jednak pojedyncze żywe komórki tej bakterii. W badaniach z zastosowaniem barwienia LIVE/DEAD i obserwacji mikroskopowej zauważono, że dla folii PLA modyfikowanej z wartością $E_j = 1$ i 2 kJ/m² zdecydowana większość komórek bakterii *Staphylococcus aureus* jest żywa. Natomiast zwiększając wartość E_j maleje ilość żywych komórek bakterii. Dla wartości E_j od 3,5 do 10 kJ/m² stosunek komórek bakterii żywych do martwych wynosi od około 50 do 70 %, a dla wartości E_j wynoszącej 20 kJ/m² zdecydowana większość komórek bakterii jest martwa.

Mimo, iż nie we wszystkich przypadkach działanie WK można uznać za środek biobójczy, to jednak wyładowania te powodują śmiertelność wszystkich badanych szczepów bakterii oraz grzyba, w różnym stopniu, co potwierdzają wykonane badania mikroskopowe. Z badań mikroskopowych można również stwierdzić, że przyczyną śmiertelności bakterii podczas działania WK jest uszkodzenie błony komórkowej bakterii. Uszkodzenie błony komórkowej może nastąpić m. in. w wyniku koagulacji białek powierzchniowych, czy też pęknięcia nukleoidu.

Działanie WK powoduje śmiertelność poszczególnych szczepów bakterii oraz grzyba, w wyniku uszkodzenia ich błon komórkowych, jednak nie we wszystkich przypadkach spełnione są kryteria podane w normie (ISO 22196:2011), ponieważ na badanych foliach PLA znajdują się jeszcze mikroorganizmy.

Różna skuteczność niszczenia mikroorganizmów przez zastosowanie WK może być spowodowane tym, że niektóre bakterie (np. *Bacillus subtilis*) wytwarzają przetrwalniki (struktury umożliwiające przetrwanie w niesprzyjających warunkach środowiska), które są odporne na działanie różnych czynników chemicznych lub fizycznych, a m.in. na środki dezynfekcyjne, ciepło w wysokiej temperaturze oraz zamrożenie. Wyniki

prezentowanych badań wskazują na to, że w tym przypadku są one również odporne na działanie WK. W badaniach celowo zastosowano młodą hodowlę

Bacillus subtilis, który wytworzył przetrwalniki, ponieważ do badań wybrano szczepy bakterii powodujące najczęstsze skażenia mikrobiologiczne produktów spożywczych, gdzie skażenie komórkami zawierającymi przetrwalniki jest wysoce prawdopodobne.

Kolejnym powodem różnej skuteczności działania WK może być naturalna śmiertelność bakterii (np. *Escherichia coli*) związana z jej wysychaniem, gdzie trudno było odnotować spadek liczby żywych komórek pod wpływem WK, jako czynnika biobójczego. W przypadku szczepu *Staphylococcus aureus* WK powodują śmiertelność tej bakterii, co potwierdzają badania mikroskopowe, na których widać, że następuje pękanie błon komórkowych.

Działanie biobójcze WK można uznać w przypadku szczepów bakterii *Salmonella enteritidis* i *Pseudomonas aeruginosa* oraz grzyba *Penicillium chrysogenum* naniesionych na folię PLA. W pozostałych przypadkach działanie WK w przedziale jednostkowej energii tych wyładowań do 20 kJ/m² może stanowić czynnik wspomagający procesy sterylizacji prowadzone innymi metodami fizycznymi lub chemicznymi. Może to być zaletą w przypadkach stosowania tych wyładowań w celu modyfikacji folii przeznaczonych na opakowania artykułów spożywczych.

3. Realizowane cele

Celem naukowym projektu było określenie właściwości biobójczych warunków modyfikowania warstwy wierzchniej polilaktydu metodą wyładowań koronowych. A zatem został on zrealizowany.

Określona została podatność folii PLA na sterylizację za pomocą WK i tym samym możliwość stosowania tej metody w procesach wytwarzania opakowań żywności i leków.

4. Wpływ na dyscyplinę

Dzięki badaniom przeprowadzonym w ramach projektu metoda WK może być stosowana do sterylizacji opakowań żywności i leków wytwarzanych z PLA, a także wytwarzanych z innych polimerów. Ze względu na możliwość prowadzenia procesu modyfikowania w sposób ciągły można sterylizować opakowania szybko i tanio.

Otrzymane wyniki badań w ramach projektu dotyczą aspektów związanych z ochroną zdrowia dzięki możliwości biobójczego działania WK, a także z ochroną środowiska naturalnego (tworzenie warunków wdrożenia na masową skalę PLA jako polimeru biodegradowalnego). Dlatego zrealizowanie tego projektu było działaniem na rzecz rozwoju cywilizacyjnego naszego kraju, chociażby dlatego, że wyniki badań obejmują zagadnienia z zakresu nowoczesnego materiału, którego znaczenie użytkowe gwałtownie wzrasta.

Wyniki badań mogą być wykorzystane do celów praktycznych jako metoda sterylizowania opakowań produktów spożywczych z PLA za pomocą WK. Wiedza i doświadczenia uzyskane podczas realizacji tego projektu mogą być wykorzystane w pracach nad zastosowaniami specjalnymi PLA z modyfikowaną warstwą wierzchnią np. w medycynie lub w przemyśle spożywczym.