

*SPRAWOZDANIE MOŻE BYĆ POWIELANE TYLKO W CAŁOŚCI.  
INNA FORMA KOPIOWANIA WYMAGA PISEMNEJ ZGODY LABORATORIUM.*

**SPRAWOZDANIE Z BADAŃ MIKROBIOLOGICZNYCH**  
**Nr 20006/11859/09**

**BADANIA WŁASNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWYCH**

**Egz. Nr .....**

**NAZWA BADANEGO WYROBU : *Miedziana woda NANO - TECH***

**Nr zlecenia : 20006/09**

**z dnia : 09.06.09.**

**Zleceniodawca : *Nano-Tech Polska, Sp. z o.o.***

***ul. Willowa 48 05-410 Józefów***

**Sposób pobrania i / lub dostarczenia próbki wyrobu do badań:** Próbkę do badań dostarczył Zleceniodawca. Za prawidłowe pobranie próbek dostarczonych do badań odpowiada Zleceniodawca.

**Charakterystyka wyrobu:** Opakowanie zastępcze butelka z tworzywa sztucznego o dekl. poj. 250 ml. Na opakowaniu podano nazwę wyrobu, nazwę i adres producenta, skład, stężenie miedzi nanocząsteczkowej: 50 ppm nr serii: 05M/05/2009.

**Nr próbki: 11859**

**Data rozpoczęcia badań: 10.06.09**

**Data zakończenia badań: 13.07.09**

**Imię i nazwisko Kierownika Badania: *mgr Agnieszka Wąsowska***

**Data sporządzenia sprawozdania: 15.07.09**

## **CEL /ZAKRES BADANIA:**

Celem badań jest potwierdzenie własności przeciwdrobnoustrojowych wody z miedzią nanocząsteczkową przy różnych stężeniach nanomiedzi.

Zakres badań obejmuje:

- określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych,
- ocenę grzybobójczego działania preparatów względem patogennego szczepu testowego,
- ocenę oddziaływania preparatów na mikroflorę skóry.

## **UZASADNIENIE BADANIA:**

Cząsteczki nanomiedzi posiadają właściwości przeciwdrobnoustrojowe, a zwłaszcza działają bójczo na komórki grzybów. Przeprowadzone badania miały na celu wykazać przydatność wody z nanomiedzią jako środka antybakteryjnego i antygrzybiczego, która będzie przeznaczona do stosowania w kosmetykach do pielęgnacji i higieny ciała.

Skóra człowieka charakteryzuje się stałą mikroflorą, która w warunkach normalnych pozostaje w naturalnej równowadze. Mikroorganizmy zasiedlające ją różnią się miejscem lokalizacji w poszczególnych partiach ciała w zależności od temperatury, wilgotności i pH, a także wieku i płci człowieka. Do głównych przedstawicieli mikroflory stałej zasiedlającej skórę należą: gronkowce (*S. epidermidis*, *S. capitis* – występujący na skórze głowy, *S. hominis* – na powierzchni ramion i nóg, *S. aureus* – na skórze rąk), ziarniaki (*Enterococcus* – na skórze pachwin, *Streptococcus sp.*, *Micrococcus sp.*), bakterie z rodzaju *Propionobacterium* (w głębszych częściach mieszka włosowego i gruczołów łojowych), a także grzyby – *Candida sp.* – bytujące na skórze w okolicach pachwin i pach oraz w okolicach międzypalcowych.

## **METODA OZNACZANIA:**

Określenie właściwości przeciwdrobnoustrojowych badanego preparatu wykonano metodą zawiesinową zgodnie z Procedurą Badawczą Specjalistycznego Laboratorium Badawczego ITA-TEST PB 32/ChM „Ocena przeciwdrobnoustrojowego działania kosmetyków metodą zawiesinową”.

Badania przeprowadzono przy trzech stężeniach wody miedzianej:

- 1) 50 ppm (stężenie dostarczonego preparatu) dla mieszanki tlenowych drobnoustrojów mezofilnych wyizolowanych ze skóry probantów oraz patogennego szczepu testowego
- 2) 40 ppm (stężenie uzyskane poprzez odpowiednie rozcieńczenie badanego produktu wodą demineralizowaną dostarczoną przez Zleceniodawcę) badania dla patogennego szczepu testowego *Candida albicans* (ATCC 10231)
- 3) 10 ppm (stężenie uzyskane poprzez odpowiednie rozcieńczenie badanego produktu wodą demineralizowaną dostarczoną przez Zleceniodawcę) badania dla tlenowych bakterii mezofilnych wyizolowanych ze skóry probantów.

### **Czas kontaktu z zawiesiną drobnoustrojów:**

Zastosowano następujące czasy kontaktu: 15 min, 3 i 5 godzin.

### **Szczepy testowe:**

- a) *Candida albicans* (ATCC 10231) (zakupiony w firmie Biomedica)
- b) Mieszanka Gram dodatnich i Gram ujemnych szczepów bakteryjnych izolowanych z różnych miejsc skóry probantów ochotników.

### **Materiały i odczynniki:**

Podłoża hodowlane:

- Agar tryptonowo-sojowy (TSA)
- Sabouraud Agar z chloramfenikolem (dla *Candida albicans*)
- Roztwór soli fizjologicznej
- Bulion odżywczy TSB
- Jałowa woda destylowana dostarczona przez Zleceniodawcę
- Temp. badania: 20°C

## ETAPY WYKONYWANYCH BADAŃ:

**Etap I** - Ocena przeciwdrobnoustrojowego działania badanego preparatu o różnych stężeniach nanocząsteczek miedzi względem mieszanki tlenowych drobnoustrojów mezofilnych zasiedlających powierzchnię skóry izolowanych z różnych części ciała.

**Etap II** - Ocena przeciwdrobnoustrojowego działania badanego preparatu względem patogenego szczepu testowego *Candida albicans* (ATCC 10231).

## PRZEBIEG BADANIA:

### Etap I

#### 1) Pozyskanie mieszaniny szczepów bakteryjnych drogą wymazów

Wymazy z powierzchni skóry ludzi z różnych miejsc ciała wykonano stosując Procedurę Badawczą PB 42/ChM ITA - TEST „Pobieranie wymazów do badań mikrobiologicznych”. Wymazy pobrano od 6 probantów – ochotników. Po pobraniu wymazów, waciki z wymazami zawieszono w bulionie odżywczym i inkubowano w temp + 37 °C przez 24 h. W celu uzyskania inoculum o odpowiedniej gęstości wykonano rozcieńczenia w soli fizjologicznej 10<sup>-4</sup> drobnoustrojów.

#### 2) Wykonanie badania

Dla każdej zawiesiny bakteryjnej pochodzącej z wymazów przygotowano rozcieńczenie 10<sup>-4</sup>, a następnie pobrano po 1 ml inoculum do trzech probówek bakteriologicznych (A), (B) i (C) zawierających:

(A) - 9 ml roztworu płynu do rozcieńczeń (próba kontrolna)

(B) - 9 ml badanego preparatu (**Woda z koloidem miedzi – 50 ppm**)

(C) - 9 ml badanego preparatu (**Woda z koloidem miedzi – 10 ppm**)

Po upływie 15 minut, 3 i 5 godzin kontaktu bakterii z badanym preparatem wysiewano na dwie oddzielne płytki 1 ml zawiesiny (A), (B) i (C), które następnie zalewano podłożem TSA. Tak przygotowane płytki inkubowano 24 h w temperaturze +37°C.

Działanie badanej wody o różnych stężeniach koloidu miedzi na mieszaną bakterii oceniono na podstawie redukcji liczby zdolnych do życia drobnoustrojów po wybranym czasie

kontaktu z badanym preparatem w porównaniu do próby kontrolnej. Analizę wykonano w 3-krotnym powtórzeniu, pobierając każdorazowo wymazy od tej samej sześciuosobowej grupy probantów. Wynik badania stanowi średnia arytmetyczna z trzech powtórzeń dla każdego probanta. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w Tabeli nr 1, Wykres 1 oraz zobrazowano na Fot. 1 i 2.

## **Etap II**

### **1) Przygotowanie hodowli szczepów z kolekcji muzealnej (szczep testowy)**

Do badań wykorzystano znany i dokładnie określony patogen *Candida albicans* (ATCC 10231), aby wykazać własności przeciwgrzybicze wyrobu w stosunku do szczepu o podwyższonej oporności na środki antybakteryjne.

Szczepy testowe *Candida albicans* (ATCC 10231) przygotowano w hodowli bulionowej w temperaturze +30<sup>0</sup>C, czas inkubacji wynosił 48 godzin. Szczep pobrano z trzeciego pasażu.

### **2) Wykonanie badań preparatu**

Z inoculum szczepu testowego doprowadzonego do gęstości 2,0 w skali McFarlanda przygotowano rozcieńczenie 10<sup>-4</sup>. Następnie z tak przygotowanego inoculum pobrano po 1 ml do trzech próbek bakteriologicznych oznaczonych, jako (A), (B) i (C) zawierających:

(A) - 9 ml roztworu płynu do rozcieńczeń (próba kontrolna)

(B) - 9 ml badanego preparatu (**Woda z koloidem miedzi – 50 ppm**)

(C) - 9 ml badanego preparatu (**Woda z koloidem miedzi – 40 ppm**)

Zawartość próbek wymieszano. Po upływie 15 minut, 3 i 5 godzin wysiewano po 1 ml zawiesiny (A), (B), (C), które następnie zalewano podłożem wybiórczym Sabouraud Agar z chloramfenikolem.

Badania prowadzono na selektywnym podłożu hodowlanym w taki sam sposób jak w przypadku wymazów pobranych od probantów. W badaniu stosowano 24 – godzinne inoculum w rozcieńczeniu 10<sup>-4</sup>. Czas inkubacji dla *Candida albicans* wynosił 5 dni w temp. +30<sup>0</sup>C.

Analizę wykonano w 3-krotnym powtórzeniu. Wynik badania stanowi średnia arytmetyczna z otrzymanych wyników.

Uzyskane wyniki badań przedstawiono w Tabeli nr 2, Wykres 2 oraz zobrazowano na Fot. 3-4.

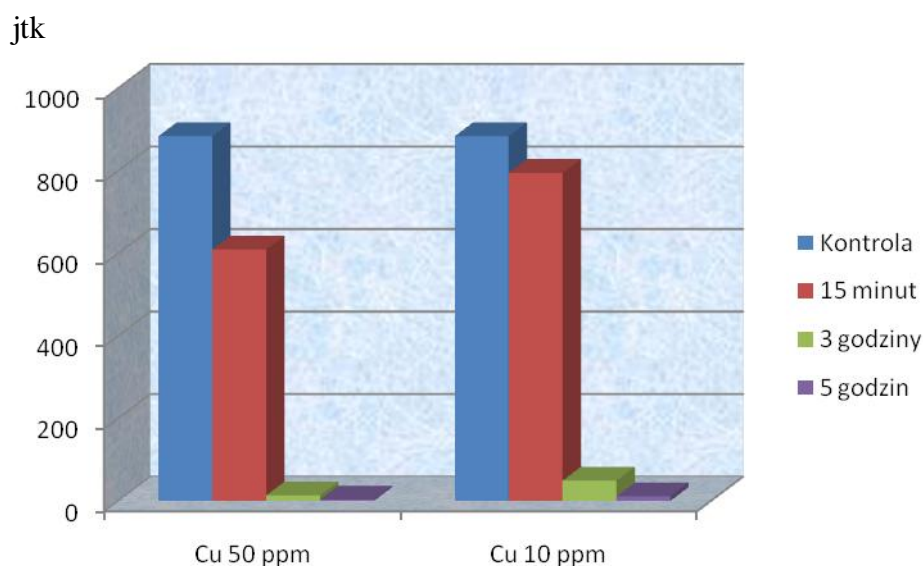
## WYNIKI BADAŃ

Wpływ preparatu Woda z koloidem miedzi (50 ppm oraz 10 ppm) na wzrost drobnoustrojów tlenowych wyhodowanych w warunkach laboratoryjnych, pobranych z powierzchni skóry.

**Tabela 1.** Średnia liczebność drobnoustrojów izolowanych z powierzchni skóry po określonych czasach kontaktu z badanym preparatem w odniesieniu do próby kontrolnej (płyn do rozcieńczeń).

Czas kontaktu preparatów z mieszaniną drobnoustrojów	Liczebność mezofilnych drobnoustrojów tlenowych izolowanych ze skóry [jtk]		
	Woda miedziana 50 ppm	Woda miedziana 10 ppm	Kontrola (płyn do rozcieńczeń)
15 min	609	795	884
3 h	13	49	-
5 h	3	11	-

**Wykres 1.** Średnia liczebność mezofilnych drobnoustrojów tlenowych izolowanych ze skóry po określonych czasach kontaktu z wodą z koloidem miedzi w stężeniu 50 ppm oraz 10 ppm w odniesieniu do próby kontrolnej (płyn do rozcieńczeń).



Uzyskane wyniki wskazują na zahamowanie aktywności wyizolowanych mikroorganizmów tlenowych pod wpływem działania badanego preparatu.

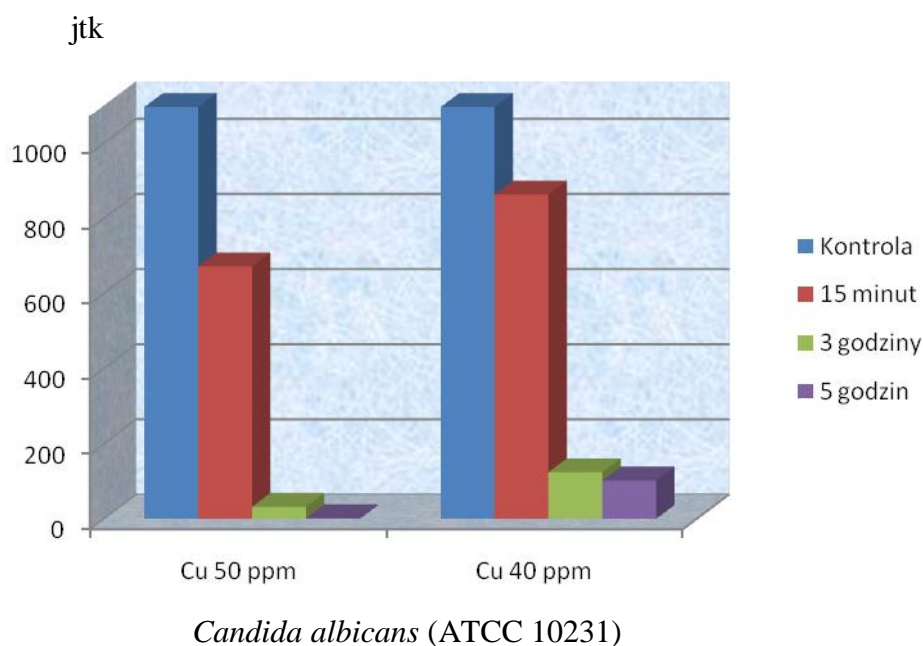
**Woda z koloidem miedzi w stężeniu zarówno 50 ppm jak i 10 ppm** wykazuje właściwości przeciwdrobnoustrojowe w stosunku do mikroorganizmów izolowanych z różnych części ciała w czasie 15 minut, 3 i 5 godzin. Redukcja liczebności mieszaniny drobnoustrojów na poszczególnych płytkach w odniesieniu do płytki kontrolnej (płynu do rozcieńczeń) świadczy o właściwościach antybakteryjnych badanego preparatu. Już po 15 minutach kontaktu badanej wody z mieszaniną drobnoustrojów zaobserwowano osłabienie wzrostu mikroorganizmów. Natomiast po 3 i 5 godzinach kontaktu nastąpiła wyraźna redukcja ich liczebności.

Wpływ preparatu **Woda z koloidem miedzi (50 ppm oraz 40 ppm)** na wzrost patogennego szczepu testowego *Candida albicans*(ATCC 10231).

**Tabela 2.** Liczebność *Candida albicans* (ATCC 10231) po określonych czasach kontaktu z badanym preparatem w odniesieniu do próby kontrolnej (płyn do rozcieńczeń).

Czas kontaktu preparatów z mieszaniną drobnoustrojów	Liczebność <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) [jtk]		
	Woda miedziana 50 ppm	Woda miedziana 40 ppm	Kontrola (płyn do rozcieńczeń)
15 min	672	863	1096
3 h	32	124	-
5 h	2	102	-

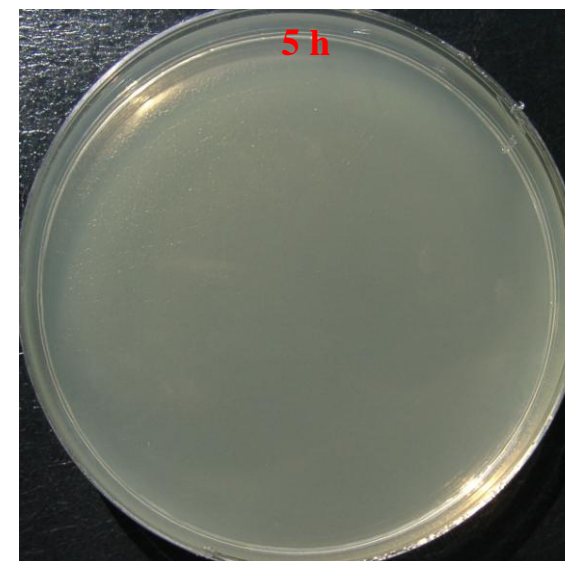
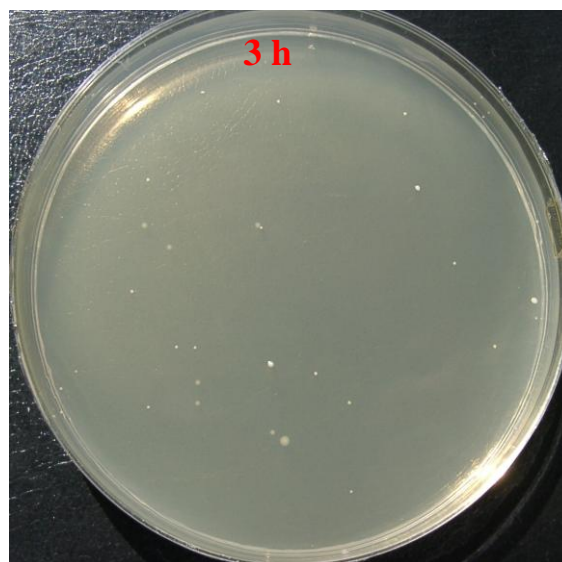
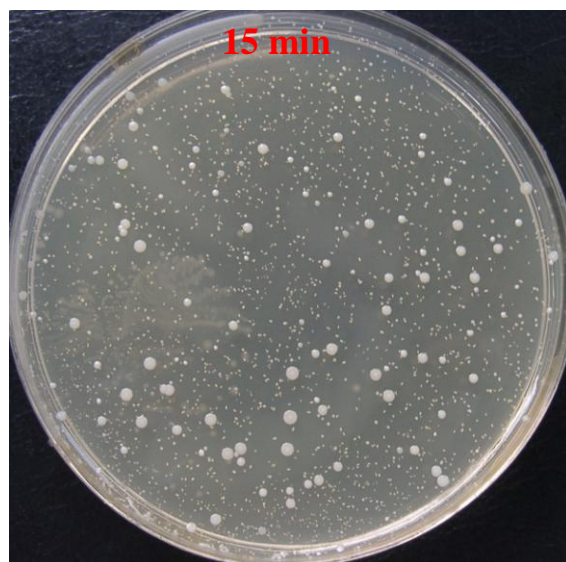
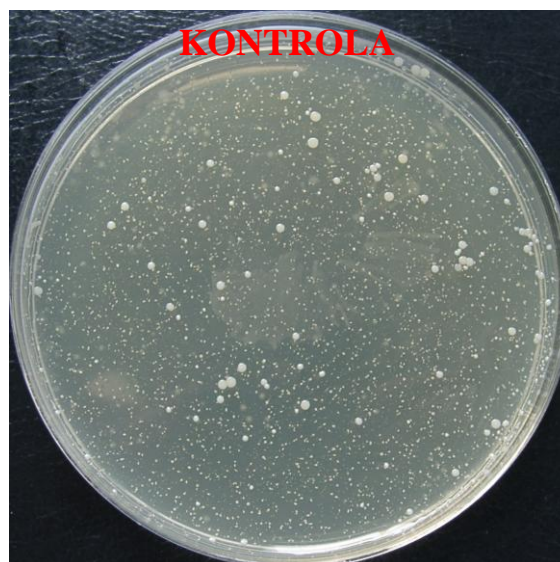
**Wykres 2.** Średnia liczebność *Candida albicans* (ATCC 10231) po określonych czasach kontaktu z woda z koloidem miedzi w stężeniu 50 ppm oraz 40 ppm w odniesieniu do próby kontrolnej (płyn do rozcieńczeń).



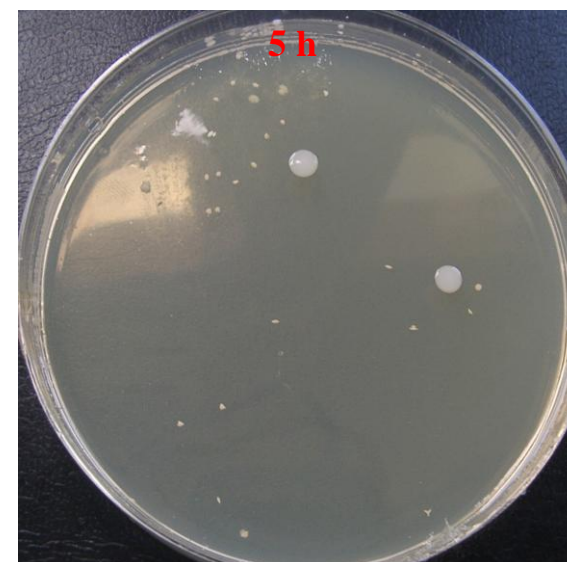
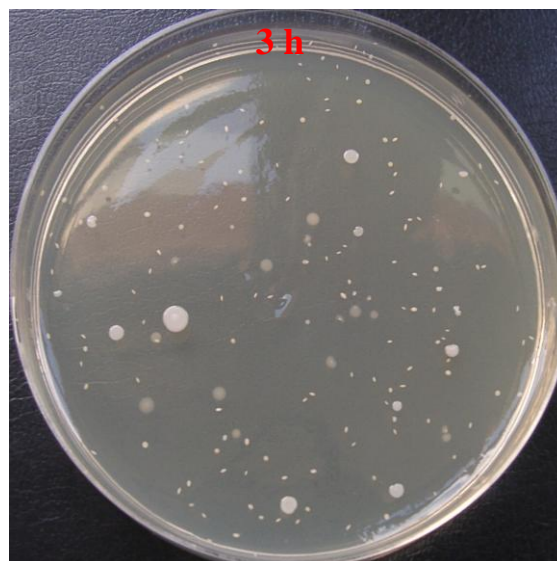
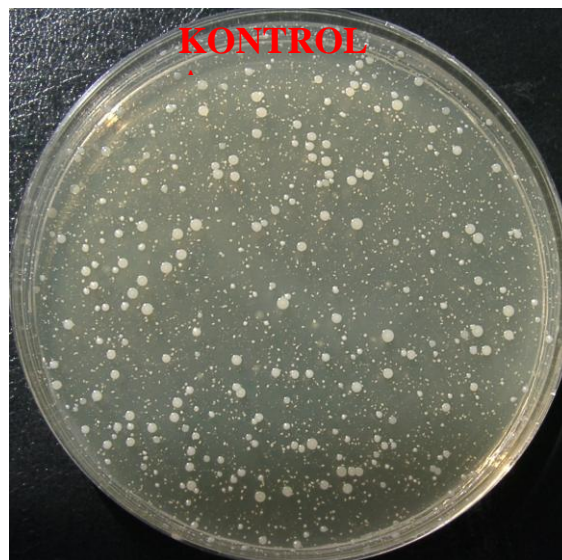
Doświadczenie przeprowadzone na szczepie *Candida albicans* (ATCC 10231) potwierdziło działanie antygrzybicze badanego preparatu po czasie 15 minut, 3 i 5 godzin.

Uzyskane wyniki wskazują na to, że badana **Woda z koloidem miedzi** w stężeniu zarówno 50 ppm jak i 40 ppm działa bójczo na grzyby drożdżoidalne już po 15 minutach kontaktu, liczba komórek zmniejszyła się znacząco w odniesieniu do próby kontrolnej. Jednak działanie antygrzybicze najwyraźniej można zaobserwować po 5 godzinach kontaktu, kiedy to nastąpiła największa redukcja liczebności zdolnych do życia komórek grzybów zwłaszcza przy stężeniu 50 ppm.

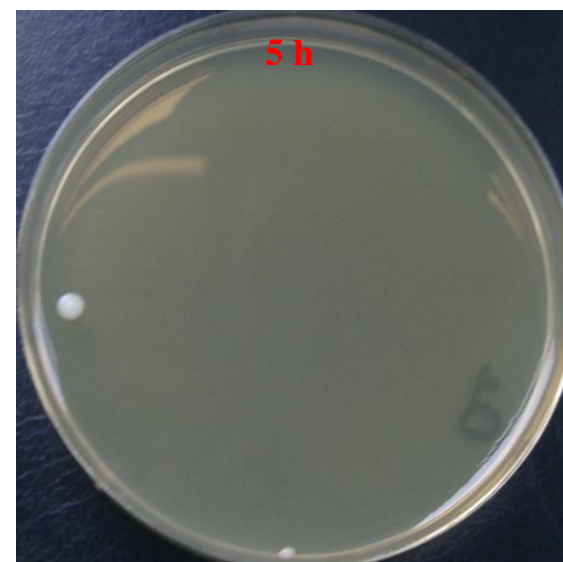
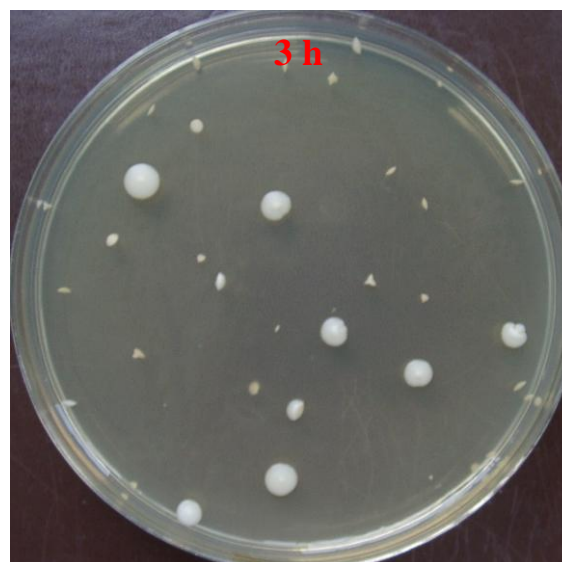
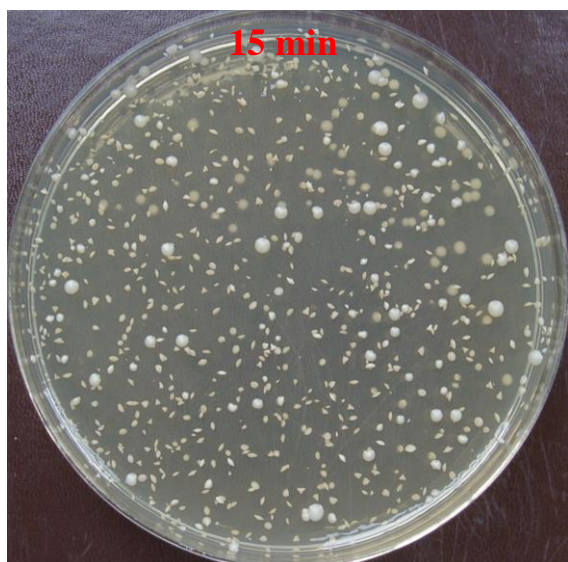
**Fot. 1** Mieszanka bakterii tlenowych uzyskanych z wymazów probantów – ochotników pobranych z skóry na podłożu TSA - Woda miedziana 50 ppm.



**Fot. 2** Mieszanka bakterii tlenowych uzyskanych z wymazów probantów – ochotników pobranych z powierzchni skóry na podłożu TSA - Woda miedziana 10 ppm.



**Fot. 3** *Candida albicans* (ATCC 10231) na podłożu Sabouraud Agar – Woda miedziana 50 ppm.



**Fot. 4** *Candida albicans* (ATCC 10231) na podłożu Sabouraud Agar – Woda miedziana 40 ppm.



## WNIOSKI Z BADAŃ:

**1. Woda z nanomiedzią** zarówno w stężeniu 50 ppm, jak i 10 ppm wykazuje właściwości antybakteryjne w stosunku do wszystkich badanych grup tlenowych bakterii izolowanych z powierzchni skóry

- znacząco redukuje liczbę drobnoustrojów tlenowych wyizolowanych w badanej grupie osób z powierzchni skóry z różnych miejsc ciała.

Pod wpływem działania wyrobu nastąpiło osłabienie wzrostu drobnoustrojów tlenowych w badanych czasach kontaktu z preparatem tj.: 15 minut, 3 i 5 godzin. Oznacza to, że wyrób stosowany na powierzchnię skóry chroni ją przed infekcjami bakteryjnymi oraz zapobiega powstawaniu zakażeń skórnych.

(tabela 1, fotografia 1,2)

**2. Woda z nanomiedzią** zarówno w stężeniu 50 ppm, jak i 40 ppm wykazuje właściwości antygrzybicze w stosunku do badanych patogenów:

- *Candida albicans* (ATCC 10231) – grzybów drożdżoidalnych, odpowiedzialnych za zakażenia grzybicze. Preparat redukując liczebność drożdżaków, zapobiega przed powstaniem zmian grzybiczych na skórze.

(tabela 2, 3, fotografia 3,4)

## PODSUMOWANIE

Na podstawie wyników badań stwierdzamy, że zgłoszona przez **Nano-Tech Polska, Sp. z o.o. ul. Willowa 48, 05 – 410 Józefów – Woda miedzina** w stężeniu 50 ppm i 10 ppm redukuje ilość drobnoustrojów zasiedlających powierzchnię skóry oraz wykazuje działanie antygrzybicze w stosunku do szczepu chorobotwórczego *Candida albicans*.

**Nazwisko i podpis**  
**Osoby / osób wykonującej badania**

*Badania wykonano zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Laboratoryjnej, a sprawozdanie końcowe odpowiada danym źródłowym.*

**Zatwierdzam**

**Data i podpis                    14.07.2009**

Sprawozdanie sporządzono w 3 identycznych egzemplarzach.  
Sprawozdanie otrzymują:  
Egz. nr 1 i nr 2 – Zleceniodawca  
Egz. Nr 3 – Archiwum Specjalistycznego Laboratorium Badawczego „ITA – TEST”.

Próbki do badań mikrobiologicznych i próbki wody nie są archiwizowane i zostają zlikwidowane po 7 dniach od daty zakończenia badania.

**Wyniki badania odnoszą się wyłącznie do badanej próbki.**  
**K O N I E C   S P R A W O Z D A N I A**