

A26068 - Åpen

Rapport

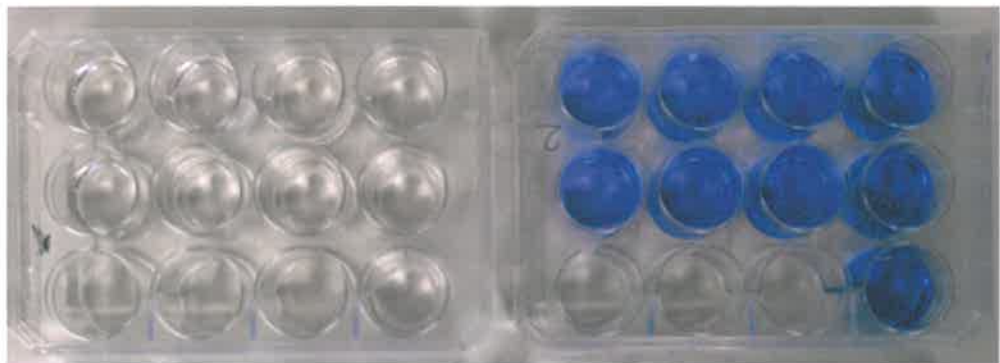
Mikrobiell effekt av begroingshindrende belegg fra Brynsløkken AS

"RACE-midler"

Forfatter(e)

Stine Wiborg Dahle

Eirik Svendsen



Rapport

Mikrobiell effekt av begroingshindrende belegg fra Brynsløkken AS

"RACE-midler"

EMNEORD:

Begroing
Biofilm
Antibegroing
Belegg
Mikrobiologi
Sykdomsbakterier
Akvakultur
Lukkede systemer

VERSJON

1

DATO

2014-03-28

FORFATTER(E)

Stine Wiborg Dahle
Eirik Svendsen

OPPDRAGSGIVER(E)

ACE

OPPDRAGSGIVERS REF.

Finn Victor Willumsen

PROSJEKTNR

6021105-1

ANTALL SIDER OG VEDLEGG:

8

SAMMENDRAG

Brynsløkken AS har tre produkter for desinfisering av overflater, som vi ønsket å studere i forhold til begroingshindrende effekt mot bakterien *Moritella viscosa*, som gir vintersår hos fisk. Om produktene er begroingshindrende kan anvendelsen være stor, fra brønnbåt til lukkede merdsystemer. Dannelse av biofilm på de tre beleggene samt kontroll uten belegg ble evaluert etter en og to dager inkubering med bakterier. Belegg 1 (Clean-IQ) hindret *M. viscosa* i å feste seg til polystyrene og kan være lovende i utvikling av begroingshindrende overflater. Belegg 2 (Science Guardian) så ut til å binde bakteriene til overflata slik produktbeskrivelsen oppgir, siden belegget gav mer biofilm enn kontroll. Om belegget hindrer videre vekst er ukjent og man trenger flere forsøk for å studere dette. Belegg 3 (Science Cleaner) har muligens samme effekt som belegg 2 (binder bakterier til overflata), siden dette belegget gav mest biofilm etter to dager, selv om dette ikke oppgis spesifikt i produktbeskrivelsen.

UTARBEIDET AV

Stine Wiborg Dahle

SIGNATUR



KONTROLLERT AV

Kristine Braaten Steinhovden

SIGNATUR



GODKJENT AV

Eirik Svendsen

SIGNATUR



RAPPORTNR

A26068

ISBN

978-82-14-05716-4

GRADERING

Åpen

GRADERING DENNE SIDE

Åpen

Innholdsfortegnelse

1	Bakgrunn.....	3
2	Metode og gjennomføring	4
2.1	Belegg.....	4
2.2	Biofilmdannelse	4
3	Resultater	5
3.1	Biofilmdannelse	5
4	Diskusjon	6
5	Foreløpige konklusjoner	7

1 Bakgrunn

Brynsløkken AS har tre produkter (Figur 1) for desinfisering av overflater, som vi ønsket å studere i forhold til begroingshindrende effekt mot sykdomsbakterier. Om produktene viser seg å være begroingshindrende kan anvendelsen være stor, men i første omgang var produktene tenkt inn mot smittebekjempelse i brønnbåt og begroing i lukkede merdsystemer.

Målet med forsøkene var å studere om de tre beleggene hindrer sykdomsbakterier i å danne biofilm på ei overflate.

Beskrivelse av de tre produktene:

1. **Clean-IQ (Qore Systems, USA):** Antimikrobiell belegg som skal beskytte mot vekst av mugg, bakterier og sopp på ulike overflater (<http://www.trademarkia.com/cleaniq-85607183.html>).

2. **Science Cleaner Pro (Five Wood, Sverige):** Dette produktet er designet for å motvirke mugg, alger og skitt. Skal rense overflater som tre, plastikk, stein, sement osv. Ved å tilføre Science Cleaner skal man eliminere all vekst øyeblikkelig siden produktet bryter ned cellestruktur og hindrer ny vekst. Påvirker ikke materialet det benyttes på. Bør teste ulike behandlinger/konsentrasjoner og sammenlikne resultater for ulike materialer. Sprayes på og lar væsken tørke (<http://fivewood.se/>).

3. **Science Guardian Pro (Five Wood, Sverige):** Renser og desinfiserer, og etterlater en hygienisk beskyttelse. Teknologien er basert på en elektrostatisk attraksjon av mikroorganismer ved en positiv ladet overflate som gjør at negativt ladede bakterier trekkes til og blir "fanget" på overflata, og kan ikke vokse eller spre kontaminering til omgivelsene. Sprayes på og lar væsken tørke (<http://fivewood.se/>). Produktet består av to virkestoffer som er løst i vann. Et biocid sørger for å desinfisere overflaten under påføring, dette skylles av. Det dannes en overflate som ikke er giftig, men fysisk skadelig for bakterier og andre mikroorganismer. Teknologien er utviklet for å hindre dannelse av biofilm på ubåter, men er også godkjent til bruk som hånddesinfeksjon av FDA (pers. komm Brynsløkken AS).



Figur 1: De tre ulike beleggene testet: 1) Clean-IQ, 2) Science Cleaner, 3) Science Guardian.

2 Metode og gjennomføring

For å studere om disse beleggene er begroingshindrende, ble det benyttet "Microtiter Plate Assay" (Stepanovic et al., 2000), som tillater biofilm biomasse kvantifisering i brønnbrett. Det tilsettes bakterier til et brønnbrett laget av polystyrene (PS) (Figur 2) og biofilm som dannes på PS farges med Krystall fiolett. Krystall fiolett binder seg til negativt ladede overflatemolekyler og polysakkarider i den ekstracellulære matriksen til celler. Dette gjør at både levende og døde celler blir farget. Farget biofilm blir deretter tørket og løst opp med etanol, hvor fargeintensiteten og dermed grad av biofilm-dannelse måles med en plateleser med OD_{595nm}. Bakterie som ble benyttet var *Moritella viscosa* (Stamme nr. 2033, Veterinærinstituttet), patogen bakterie som gir vintersår hos bl.a. laks. Bakterien danner biofilm på overflater og er gram negativ.

2.1 Belegg

De tre ulike beleggene ble sprayet på brønnbrettene og latt tørke i ett døgn dagen før forsøkene startet. To brett for hvert belegg (ett for dag en og ett for dag to).

2.2 Biofilmdannelse

Moritella viscosa ble dyrket opp i TSB medium med 2 % salt, 15 °C, risting i ett døgn. Dagen etter ble bakteriene fortynnet 100 ganger og det ble målt absorbans for å kalkulere konsentrasjon. 8 Brønnbrett ble fylt med *Moritella viscosa* (2 ml) og dette ble inkubert over natt ved 15 °C og risting. To av brettene inkluderte kontroll, ingen belegg og tilsatt bakterier.

Dagen etter tilsetning av bakterier ble alt medium/bakterier i brønnene fjernet og brønnene vasket med 2,5 ml sterilt vann, gjentatt 3 ganger. Brønnene ble deretter lufttørket i 30 minutter (Liaqat et al 2008). Biofilm i brønnene ble farget med 2,0 ml Krystalll fiolett (1 %) løsning i vann, i 15 minutter (Lazado et al. 2010). Krystalll fiolett-løsning ble fjernet og brønner vasket med sterilt vann 3-5 ganger (2,5 ml). Brønnebrett ble deretter satt på absorberende papir for å fjerne all væske. Tørket i 10 minutter. Biofilm ble avfarget med 2,0 ml 95 % etanol og inkubert i RT i 15 minutter. Absorbans ble målt ved OD_{595nm} i plateleser (BioTek Instruments). OD-verdi for blank brønn (kun medium) ble trukket fra verdiene for bakteriene. Målt etter ett og to døgn inkubering.

3 Resultater

3.1 Biofilmdannelse

De oppdyrkede bakteriene hadde en konsentrasjon på ca. 1×10^9 CFU/ml. Bakteriene ble deretter fortynnet 100 ganger til ca. 1×10^7 CFU/ml ved forsøkets start.

En dag

Etter en dag i brønnebrett hadde det dannet seg mest biofilm i brett behandlet med 3. Science Guardian (OD 0,026) og kontrollen (OD 0,011) (Figur 2 venstre; Figur 3), men også noe i brett som var blitt behandlet med 2. Science Cleaner (0,004). 1. Clean-IQ hadde derimot ikke synlig biofilm (Figur 2 venstre), og gav en absorbans på 0,002 (Figur 3).

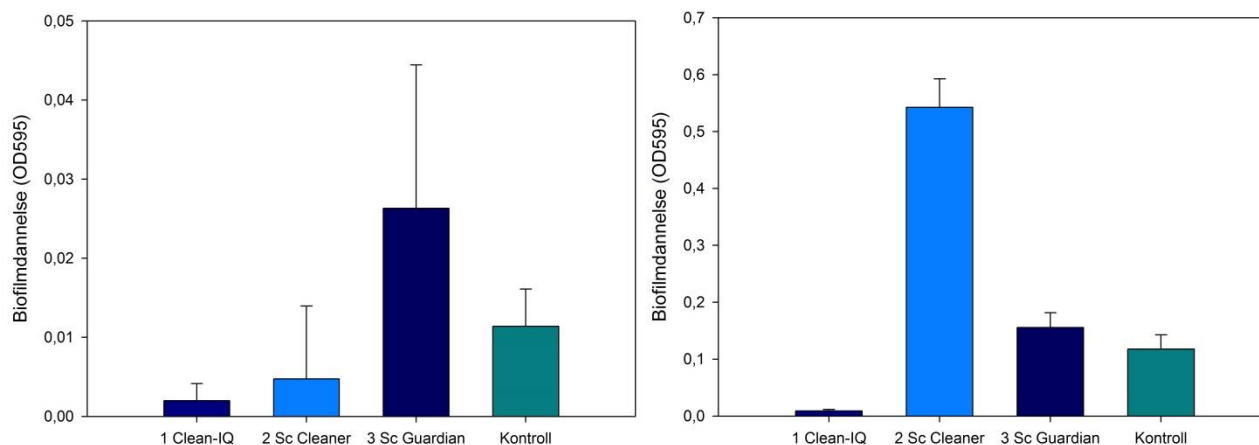
To dager

Etter to dager i brønnebrett hadde det dannet seg mest biofilm i brett behandlet med 2. Science Cleaner (0,542) (Figur 2 høyre), men også i brett som var blitt behandlet med 3. Science Guardian (0,155) samt kontroll (0,118). 1. Clean-IQ hadde derimot ikke synlig biofilm, men gav en absorbans på 0,009 (Figur 3). Sammenliknet med andre biofilm-studier ved SINTEF er det målt absorbans på 0,5 – 3,5 med sykdomsbakterier og probiotiske bakterier (Konsernsatsing på biofilm), men i disse forsøkene har bakteriene vært dyrket i opp mot 5 dager.

Det var mest biofilm ved dag 2 sammenliknet med dag 1, noe som var forventet, siden biofilm vokser over tid.



Figur 2. Dannelse av biofilm etter ett (venstre) og to døgn inkubering (høyre). Brønn 1-6 + 12 er benyttet. Fargeintensiteten viser grad av biofilmdannelse, sterk lilla farge = høy biofilmdannelse.



Figur 3. Biofilmdannelse etter en (venstre) og to dager (høyre) for de tre ulike beleggene og kontroll uten belegg. n=6, standard avvik.

4 Diskusjon

Moritella viscosa er en viskøs bakterie og fester seg lett til alle overflater og danner biofilm. Biofilm-måling etter en dag viste at belegg nr 3 (Science Guardian) hadde mest biofilmdannelse og mer biofilm enn kontroll. Dette kan ha sammenheng med at produktet skal binde bakterier til overflata, i følge produsent, samt hindre at bakteriene vokser videre og kontaminerer omgivelsene. Det burde undersøkes nærmere om disse bakteriene vokser videre, ved f.eks. ta ut prøver av biofilmen som sitter på overflata og se om den vokser videre på en agar. Om beleggene hindrer videre bakterievekst, kan dette være noe som kunne blitt benyttet i smittereduksjon. Belegg 1 (Clean-IQ) og belegg 2 (Science Cleaner) viste lite biofilm etter en dag, og hadde mindre enn kontroll.

Etter to dager inkubering var forskjellene i biofilm større, hvor brett behandlet med belegg 2 (Science Cleaner) hadde mest biofilm. Det kan se ut til at dette belegget binder bakterier til overflata i likhet med belegg 3. I følge produsent skal belegg 2 eliminere all vekst øyeblikkelig siden produktet oppgis å skulle bryte ned cellestruktur og hindre ny vekst. Belegg 3 hadde også en del biofilm ved dag 2 og hadde i likhet med belegg 2 mer enn kontrollen. Belegg 1 viste fortsatt svært lite biofilm, og ser ut til å ha en begroingshindrende effekt. Det er vanskelig å si om dette belegget hindrer biofilm fullstendig, flere forsøk må utføres før dette kan konkluderes.

5 Foreløpige konklusjoner

- **Belegg 1** (Clean-IQ) hindrer *Moritella viscosa* i å feste seg til polystyrene. Kan være lovende i utvikling av begroingshindrende overflater.
- **Belegg 2** (Science Cleaner) muligens har samme effekt som Science Guardian (binder bakterier til overflata), siden dette belegget gav mest biofilm etter to dager, selv om dette ikke oppgis spesifikt i produktbeskrivelsen.
- **Belegg 3** (Science Guardian) binder muligens bakteriene til overflata slik produktbeskrivelsen oppgir, siden belegget gav mest biofilm etter en dag samt en del på dag to (mer enn kontroll ved begge dager). Om belegget hindrer videre vekst er ukjent og man trenger flere forsøk for å kunne konkludere dette.



Teknologi for et bedre samfunn

www.sintef.no