

Raport z badania w warunkach in vitro
Badanie mikrobiologiczne pilników kosmetycznych

Dane Zleceniodawcy:

INTER - INTER GROUP SPÓŁKA CYWILNA
DAWID SKIBA & ELIZA TRZMIEL
ul. ks. Czesława Klimasa 41c/11
50-515 Wrocław

Zleceniobiorca:

Jagiellońskie Centrum Innowacji Sp. z o.o
Ul. Bobrzyńskiego 14
30-348 Kraków

Nr Raportu: 220624-MB-INTER-1.1

Nr oferty: 2022/04/ASE/11/1

Data otrzymania próbki	Data rozpoczęcia badania	Data zakończenia badania	Data opracowania raportu
13.05.2022	18.05.2022	09.06.2022	24.06.2022

Badanie wykonały

Magdalena Chowaniec
Marta Tokarska-Jaszak

Stanowisko

Specjalista ds. analiz mikrobiologicznych
Kierownik Laboratorium Mikrobiologii

Raport zatwierdziła

Marta Tokarska-Jaszak

1. Cel badania

Celem niniejszego badania było oznaczenie liczby bakterii oraz grzybów i identyfikacja mikroorganizmów pochodzących z pilników kosmetycznych: użytych do zabiegu kosmetycznego oraz pilników poddanych dezynfekcji środkiem o szerokim spektrum działania po 2-3 dniach od zabiegu i 14 dniach od zabiegu. W badaniu wykonano również wizualizację wzrostu grzybów na pilniku użytym do zabiegu kosmetycznego.

Opis badanych próbek i interwały czasowe

W Tabeli 1 przedstawiono informacje odnośnie dostarczonych próbek do badania mikrobiologicznego.

Tabela 1 Opis zestawu pilników kosmetycznych użytych w badaniu

	Zestaw	Termin wykonywania badania
I	a) Pilnik po dezynfekcji b) Pilnik użyty do zabiegu	2-3 dni od zabiegu
II	a) Pilnik po dezynfekcji b) Pilnik użyty do zabiegu	14 dni od zabiegu
III	a) Pilnik użyty do zabiegu	Obserwacja wzrostu grzybów po 5 i 10 dniach inkubacji

2. Warunki badania

W Tabeli 2 przedstawiono informację odnośnie zastosowanych materiałów do badania oraz warunków jego przeprowadzenia.

Tabela 2 Opis materiałów i warunków dla przeprowadzonego badania

Zastosowane podłoża hodowlane	Podłoże TSA – w kierunku ogólnej liczby mikroorganizmów Podłoże Sabourauda – w kierunku ogólnej liczby grzybów
Temperatura inkubacji	30°C ± 1°C – dla bakterii 25°C ± 1°C – dla grzybów
Czas inkubacji	72h ± 2h – dla bakterii 5 dni – dla grzybów

3. Metoda badawcza

3.1 Oznaczenie ilościowe

Oznaczenie ilościowe bakterii i grzybów wykonano stosując metodę dziesiętnych rozcieńczeń Kocha. Pilnik zawieszono w 100 ml zbuforowanej wody peptonowej i dokładnie wymieszano. Następnie wykonano seryjne rozcieńczenia od 10^{-1} do 10^{-5} i wysiewano po 100 μ l z każdego z rozcieńczeń na poszczególne podłoża hodowlane. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych. Po upływie czasu inkubacji wyrosłe kolonie zliczono.

3.2 Identyfikacja mikroorganizmów

Po zakończonym czasie inkubacji wyrosłe kolonie bakteryjne zostały pobrane w celu ich identyfikacji z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF. Do przeprowadzenia identyfikacji wykorzystano metodę transferu bezpośredniego. Z kolei wyrosłe kolonie grzybów strzępkowych zostały namnożone w bulionie Sabourauda i po upływie 48h inkubacji wykonano identyfikację metodą ekstrakcji.

Wyniki z identyfikacji MS MALDI-TOF dołączono jako załączniki do raportu z badania (Załączniki: 220527-MB-INTER 372, 374 i 420). W raportach pod wynikami z analizy zamieszczony jest opis identyfikujący badaną próbkę.

3.3 Wizualizacja wzrostu grzybów na pilniku kosmetycznym

Pilnik kosmetyczny użyty do zabiegu został umieszczony na podłożu hodowlanym Sabourauda. Tak przygotowaną próbkę umieszczono w inkubacji w temperaturze $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Wzrost grzybów na pilniku obserwowano co kilka dni. Poniżej zamieszczono zdjęcia dla pilnika użytego do zabiegu po 5 dniach inkubacji i po 10 dniach inkubacji.



Rycina 1 Wzrost grzybów strzępkowych na pilniku użytym do zabiegu po 5 dniach inkubacji (lewa) i 10 dniach inkubacji (prawa)

4. Wyniki

W Tabelach 3 i 4 zamieszczono wyniki z ogólnej liczby drobnoustrojów oraz liczbę grzybów. Wyniki wyrażono w jednostce jtk – jednostka tworząca kolonie.

Tabela 3 Ogólna liczba drobnoustrojów i liczba grzybów dla zestawu I (2-3 dni po zabiegu)

Zestaw I	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk]	Liczba grzybów [jtk]
Pilnik użyty do zabiegu (nie dezynfekowany)	$6,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$
Pilnik po dezynfekcji	$2,1 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$

Tabela 4 Ogólna liczba drobnoustrojów i liczba grzybów dla zestawu II (14 dni po zabiegu)

Zestaw II	Ogólna liczba drobnoustrojów [jtk]	Liczba grzybów [jtk]
Pilnik użyty do zabiegu (nie dezynfekowany)	$2,9 \times 10^2$	$2, \times 10^1$
Pilnik po dezynfekcji	$<1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^1$

5. Podsumowanie

Badanie laboratoryjne miało na celu sprawdzenie wzrostu grzybów i bakterii na pilnikach kosmetycznych po ich użyciu w zabiegu kosmetycznym oraz po poddaniu ich dezynfekcji środkiem o szerokim spektrum działania. Na podstawie przeprowadzonych badań oznaczenia ilościowego nie stwierdzono znaczących różnic w liczbie drobnoustrojów i grzybów niezależnie od tego czy pilnik był poddawany dezynfekcji i niezależnie od czasu przechowywania pilnika od dnia wykonanego zabiegu kosmetycznego (ten sam rząd wielkości).

W badaniu wykonano również identyfikacje wyrosłych mikroorganizmów za pomocą spektrometru masowego MALDI TOF. W przypadku pilnika użytego do zabiegu, ale nie poddanego dezynfekcji

potwierdzono obecność charakterystycznych patogenów bytujących na ludzkim naskórku np. ziarniaki z rodzaju *Staphylococcus* (*S. borealis* i *S. hominis*) i *Micrococcus luteus* [1]. Wykryto również obecność *Rothia koreensis*, która może być niebezpieczna dla ludzi z obniżoną odpornością. Na użytych pilnikach kosmetycznych zidentyfikowano grzyby strzępkowe takie jak: *Penicillium expansum* [2] oraz *Penicillium brevicompactum* [3], które wytwarzają niebezpieczne mykotoksyny.

W przypadku pilników kosmetycznych, które zostały zdezynfekowane również stwierdzono obecność bakterii oraz grzybów strzępkowych.

Grzyby strzępkowe z rodzaju *Penicillium* stwierdzono w badaniu wizualizacyjnym przedstawiającym wzrost drobnoustrojów na pilniku po użyciu w zabiegu kosmetycznym. Po 10 dniach zaobserwowano intensywny wzrost grzybów związany z roznoszeniem się ich zarodników.

Bibliografia

[1] Kloos W.E, Musselwhite M.S *Distribution and Persistence of Staphylococcus and Micrococcus Species and Other Aerobic Bacteria on Human Skin*, SM Journals Applied Microbiology (1975) Vol. 30, No. 3

[2] Sommer N.F, Buchanan J.R, Fortlage R.J, *Production of Patulin by Penicillium expansum*, Journals Applied Microbiology (1974) Vol. 28, No.4

[3] Min C, Dong H, Zhang Z, *Screening and identification of a Penicillium brevicompactum strain isolated from the fruiting body of Inonotus obliquus and the fermentation production of mycophenolic acid*, Annals of Microbiology (2019)

Koniec raportu z badań