

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **237271**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **421947**

(51) Int.Cl.

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/38 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **19.06.2017**

(54) **Sposób oceny porastania i/lub korozji biologicznej struktur porowatych
przez organizmy żywe**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
02.01.2019 BUP 01/19

(73) Uprawniony z patentu:
WOJTASIK BARBARA, Gdynia, PL

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.03.2021 WUP 06/21

(72) Twórca(y) wynalazku:
BARBARA WOJTASIK, Gdynia, PL

PL 237271 B1

Opis wynalazku

W literaturze przedmiotu znane są metody wybarwiania organizmów żywych. Przykładem może być wybarwianie fluorescencyjne pozwalające na odróżnienie komórek przetrwalnikowych (podlegających wybarwieniu) od komórek wegetatywnych (nie następuje wybarwienie). We wcześniejszych metodach wybarwiania za pomocą tioflawiny T (thioflavin T) nie było możliwości odróżnienia komórek wegetatywnych od przetrwalnikowych, co stanowi duże utrudnienie z uwagi na potrzebne umiejętności w oznaczaniu obu grup komórek. Ułatwienie w procedurze rozróżniania osiągnięto poprzez stworzenie metody wybarwiania fluorescencyjnego przy zastosowaniu odpowiednich barwników. Metoda wybarwiania fluorescencyjnego została zastosowana do wybarwiania komórek przetrwalnikowych bakterii (m.in. *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Sporolactobacillus* sp., *Geobacillus* sp., *Thermoanaerobacter* sp.). Wymieniona metoda ma znaczenie dla przemysłu spożywczego w celu określenia jakości żywności oraz podniesienia jej bezpieczeństwa dla konsumentów. Za pomocą wybarwiania fluorescencyjnego można stwierdzić, że komórki przetrwalnikowe uległy sterylizacji, co jest ważne dla określenia bezpieczeństwa żywności, kosmetyków oraz farmaceutyków, a także przy badaniu jakości wody (WO 2015037578).

Omówiona powyżej metoda odnosi się do specyficznych produktów i organizmów – wybranych szczepów bakterii. Z uwagi na stosowanie w środowisku coraz większej ilości różnego typu materiałów o różnej podatności na porastanie przez organizmy żywe istnieje potrzeba stworzenia szybkiej metody oceny tego zjawiska. Przykładowo struktury porowate takie jak beton pozostające w środowisku wodnym i/lub lądowym, bądź na granicy obu środowisk są narażone na działanie czynników abiotycznych, jak również biotycznych. Początkowo organizmy osiadają na powierzchni struktur porowatych. Wraz z upływem czasu głębsze warstwy struktury porowatej, przykładowo betonu stają się siedliskiem dla drobnoustrojów, takich jak bakterie, pierwotniaki, grzyby. Następnie zasiedlają strukturę porowatą, również organizmy większe, takie jak drobne bezkręgowce. Tworzą się łańcuchy troficzne. Później, w miarę postępującej korozji, organizmy przenoszą się w coraz głębsze warstwy betonu. Korozja biologiczna ma wpływ na trwałość budowli betonowych i stanowi jeden z problemów współczesnej techniki i technologii budownictwa.

Dotychczas problem związany z rozpoznaniem tempa korozji biologicznej i jej zasięgu w głąb struktury porowatej jest niewystarczająco poznany. W literaturze przedmiotu występuje niedostatek testów, które pozwoliłyby w sposób szybki poznać tempo korozji biologicznej oraz dawałyby możliwość porównania tego procesu dla różnych rodzajów struktur porowatych (rodzaj i gęstość materiału) oraz w różnych warunkach środowiskowych.

Opracowana metoda pozwala na określenie zasięgu występowania organizmów na powierzchni i wewnątrz struktury porowatej oraz tempa ich przesuwania się w głąb struktury. Umożliwia, także na rozpoznanie powstających gradientów tworzonych przez organizmy przemieszczające się w pionie, poziomie, w zależności od czynników środowiskowych takich, jak m.in.: woda, temperatura, oświetlenie, pH oraz na styku powierzchni woda-powietrze, gdzie zmiany warunków środowiskowych bywają gwałtowne (falowanie, częste zamarzanie i rozmrażanie, wysychanie i nawadnianie, itp.), a także tworzących się łańcuchów troficznych.

Do oceny i zobrazowania zasięgu występowania organizmów w strukturach porowatych zastosowano róż bengalski (Rose Bengal lub Rose Bengal sodium salt), powszechnie znany związek chemiczny (4,5,6,7-tetrachloro-2',4',5',7'-tetraiodofluorescein), o sumarycznym wzorze chemicznym $C_{20}H_4Cl_4I_4O_5$. Róż bengalski jest barwnikiem stosowanym w biologii, jak również medycynie. W latach 50-tych róż bengalski znalazł zastosowanie w procedurze wybarwiania otwornic Foraminifera (Walton 1952). W późniejszych latach róż bengalski znalazł zastosowanie w wybarwianiu próbek zawierających drobne (mikroskopowych rozmiarów), najczęściej bezbarwne organizmy wodne – meiobentos (m.in. Wojtasik 2007, 2013, Wojtasik, Burska 2015). Zaletą wybarwiania próbek różem bengalskim jest możliwość odróżnienia organizmów żywych w momencie pobrania próby od martwych, które się nie wybarwiają. Przykładowe wybarwione organizmy przedstawiono na Fig. 1. i Fig. 2.

Zastosowanie różu bengalskiego do wybarwiania próbek struktur porowatych (w tym betonu), które mają podlegać ocenie pod względem podatności na korozję biologiczną pozwala nie tylko określić zasięg wnikania organizmów w strukturę betonu, ale także na łatwiejszą identyfikację drobnych organizmów (kolonii bakterii, grzybów, porostów), niewielkich rozmiarów bezkręgowców. Przykładowe, wybarwione struktury porowate o różnej intensywności zasiedlania przez organizmy żywe przedstawiono na Fig. 3.

Prezentowana metoda wybarwiania może mieć zastosowanie w przypadku różnych struktur porowatych, w tym betonu hydrotechnicznego. Zastosowanie metody może mieć znaczenie w określaniu tempa biodegradacji oraz tworzenia się łańcuchów troficznych. Z drugiej strony do określenia odporności na porastanie, trwałości struktur oraz do oceny toksyczności materiałów.

Roztwór różu bengalskiego może być, w zależności od potrzeb, stosowany wraz z substancjami standardowo używanymi do konserwacji drobnych organizmów, bezkręgowców (alkohol etylowy, formaldehyd, mieszaniny alkoholu etylowego i glicerolu itp.). Natomiast istotnym czynnikiem jest zwrócenie uwagi na wartości parametrów takich jak pH roztworu konserwującego (szczególnie jeśli dodatkiem w mieszaninie jest kwas, np. kwas octowy), tak aby nie powodowało to dodatkowej korozji substancji porowatej, przykładowo betonu, przez co obraz struktury wewnętrznej mógłby odbiegać od rzeczywistej przed zastosowaniem płynu konserwującego.

Walton W. 1952. Techniques for recognition of living forams. Contrib. Cushman Found. Foraminiferal Res. 3: 56-60.

WO 2015037578. Method for rapid detection of spores by fluorescent staining (<http://patents.google.com>).

Wojtasik B. 2007. Zgrupowania meiobentosu jezior zlewni górnej Raduni (Meiobenthic assemblages in the lakes of the Upper Radunia catchment), [w:] D. Borowiak [red.] Jeziora Kaszubskiego Parku Krajobrazowego. Katedra Limnologii, Uniwersytet Gdański: 131-144.

Wojtasik B. 2013. Ecological condition of small water reservoirs of Wdzydze Landscape Park (Northern Poland) based on meiobenthos assemblages analyses. TEKA Komisji Ochrony i Kształtowania Środowiska - OL PAN, 10: 504-514.

Wojtasik B., Burska D. 2015. Stan ekologiczny jezior kartuskich, [w:] T. Dyl-Sosnowska [red.]. Piękne i brudne, czyli rzecz o jeziorach kartuskich. Kartuzy: 35-54, (www.fundacja-salomea.org).

Zastrzeżenia patentowe

1. Zastosowanie różu bengalskiego w ocenie porośnięcia lub korozji substancji porowatych, w tym materiałów budowlanych, w szczególności betonu hydrotechnicznego **znamienny tym**, że poprzez wybarwianie substancji porowatych roztworem wodnym różu bengalskiego lub różu bengalskiego w standardowej substancji konserwującej organizmy, uzyskuje się barwny obraz w miejscach występowania żywych komórek drobnoustrojów lub drobnych organizmów wyższych, w szczególności bezkręgowców i glonów.
2. Zastosowanie różu bengalskiego w ocenie porośnięcia lub korozji substancji porowatych, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do zastosowania w pracach badawczych, technicznych, budownictwie, przemyśle, ekspertyzach związanych z oceną korozji biologicznej substancji porowatych oraz w analizach toksyczności substancji porowatych na środowisko biotyczne.

Rysunki

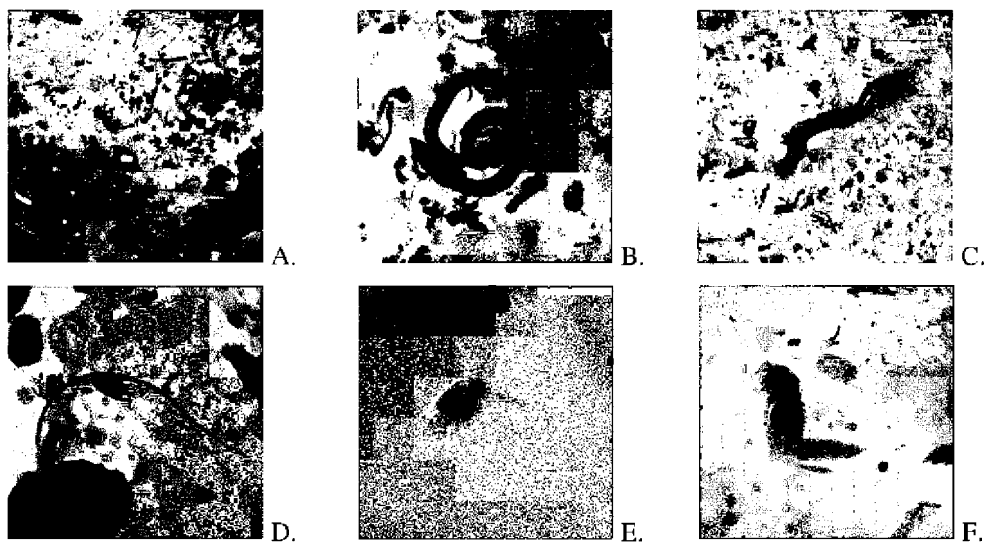


Fig. 1. Przykład organizmów bezkręgowych wybarwionych różem bengalskim: A. Bivalvia, B. Oligochaeta, C. Diptera larvae, Chironomidae, D. Nematoda, E. Cladocera, F. Copepoda, Harpacticoida,

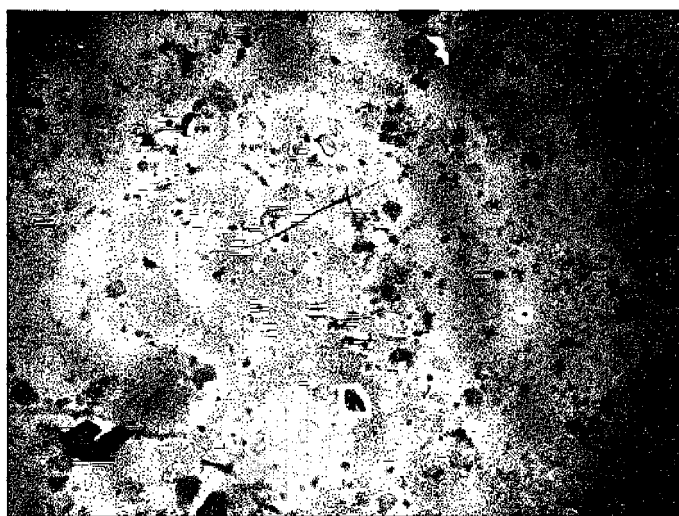


Fig. 2. Przykład wybarwionych różem bengalskim organizmów bezkręgowych (m.in. Nematoda w środkowej części zdjęcia) wśród niewybarwionych ziaren piasku (do wybarwienia organizmów zastosowano Rose Bengal sodium salt, SIGMA nr R3877-5G),

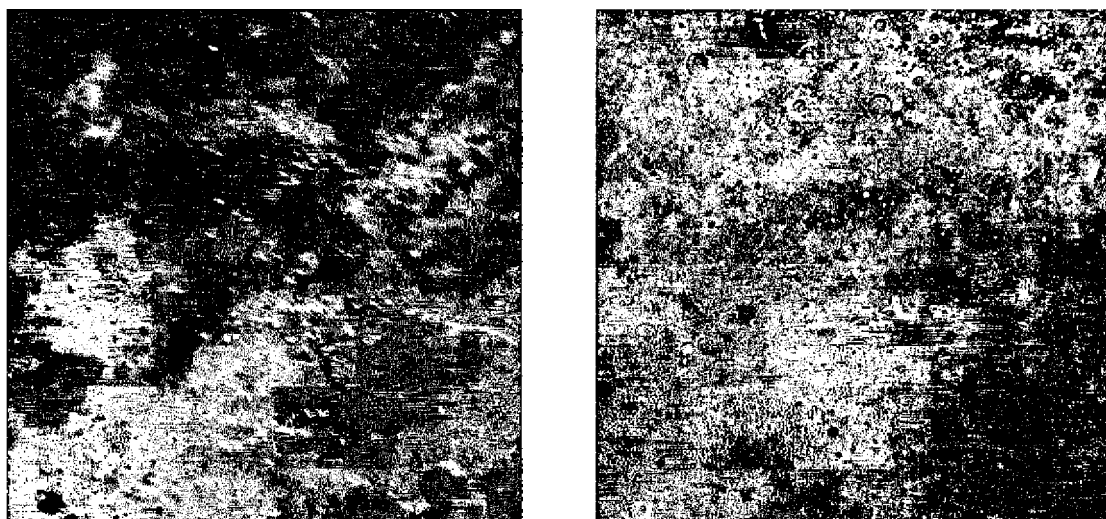


Fig. 3. Struktury porowate zasiedlone przez organizmy żywe (wybarwione na różowo): A. niewielki stopień pokrycia organizmami, B. intensywna kolonizacja przez organizmy struktury porowatej (do wybarwienia struktury porowatej zastosowano Rose Bengal, ALDRICH nr 198250-5G),