

Certified translation TP/458/2020 from Polish to English of a document submitted for translation on 17.04.2020.-/-

Translation date: 17.04.2020.-/-

Translator's notes in square brackets [] -/-

[University emblem and Latin

inscription]:

UNIVERSITAS RERUM

NATURALIUM

WRATISLAVIENSIS

WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE
SCIENCES -/-

CHAIR OF BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-

TEST REPORT -/-

regarding the effect of addition of silver nanoparticles (SNP) to hygienic papers -/-
on the antimicrobial properties. -/-

On 17.05.2016 Five samples of tissue paper and two samples of adhesive were received for testing. -/-

Tissue paper tests: -/-

Control tissue paper -/-

Tissue paper prepared with the use

Tissue paper prepared with the use

Tissue paper prepared with the use

Tissue paper prepared with the use

Adhesive tests: -/-

GDPR

adhesive -/-

ive -/-

Performance -/-

Antimicrobial activity was tested with respect to the following bacteria: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* yeast. -/-

Tissue paper tests were performed on solid substrate with four pieces of the size of 1cm² being placed on the surface of a 4-hour culture of a given micro organism inwardly inoculated as well as on a liquid substrate with sample turbidity measured in relation to control test for light wave of the length of 600 nm. In the first case, growth on agar plate and/or on a piece of tissue paper was assessed by registering the number of squares around which growth of micro organism was observed. In the second case, the percentage rate of inhibition was calculated in relation to control test on the basis of the value of OD at 600 nm. -/-

The testing [GDPR] was performed with the application of liquid culture technique with the addition of 1 or 3 µL of diluted adhesive (100-fold) do 1mL culture. -/-

Results -/-

1. [GDPR] adhesives without SNP revealed slight activity inhibiting the growth of bacteria and yeast (table 1). -/-

2. Test tissue paper does not cause inhibition of growth either on a solid or liquid substrate (table 2). -/-

3. Cultures on a solid substrate revealed marked inhibition of bacteria of the species of *Staphylococcus aureus* by pieces of tissue paper treated with [GDPR] adhesive containing SNP in concentration of 10 and 20 ppm (Fig. 1). 18 of 32 tested squares (56%) did not manifest overgrowth and the dependence on concentration of SNP was demonstrated. To a lesser extent, inhibition of bacteria of *E.coli* species by SNP present in tissue paper was noted. Regarding the tissue paper with SNP-containing [GDPR] adhesive for 10/16 squares (25%) no infection was noted, and regarding the tissue paper with OC SNP-containing adhesive 2 of 16 squares (12.5%). Dependence on concentration [continued on the following page] -/-

[Footnote]: WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES IN WROCLAW -/-

CHAIR OF BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-

UL. CHEŁMOŃSKIEGO 37 51-630 WROCLAW -/-

Tel. 071 320 77 93 • Fax 071 320 77 94 -/-

Translation page: 1 of 4.



[University emblem and Latin

inscription]:

UNIVERSITAS RERUM
NATURALIUM
WRATISLAVIENSIS

WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE
SCIENCES -/-

CHAIR OF BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-

was not so clearly marked. Regarding the remaining species of bacteria, it was not possible to demonstrate inhibition of growth by using this method (table 3). -/-

4. In fluid cultures, inhibition of growth of *Candida albicans* was demonstrated in the presence of both tested tissue papers and *Escherichia coli* with respect to tissue paper treated with **GDFR** of the dose of 20 ppm (table 2). -/-

Comments: -/-

1. The obtained results confirm positive effect of addition of nanosilver to tissue paper, i.e. inhibiting the growth of micro organisms, but the observed antimicrobial effect was not homogeneous. This may have resulted from insufficient concentration of the added nanosilver and/or its uneven distribution on tissue paper. -/-
2. The method of liquid culture is markedly better for this type of analyses, but it must be performed in greater number of repetitions for a given test, e.g. 10. -/-
3. In earlier tests the inhibiting action of SNP solutions on investigated species of bacteria and yeasts was demonstrated for concentration >9 ppm (Fig. 0, Żarowska et al. 2016). -/-

CONCLUSIONS -/-

1. Nanosilver present in tissue paper inhibits growth of bacteria and yeasts. -/-
2. Addition of nanosilver improves antimicrobial properties of hygienic tissue paper. -/-
3. For greater effect, the dosage of nanosilver added to adhesive ought to be increased (25-30 ppm). -/-

30.05.2016

Prof. Dr Małgorzata Robak, Ph.D.

[Footnote]: WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES IN WROCLAW -/-

CHAIR of BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-

UL. CHEŁMOŃSKIEGO 37 51-630 WROCLAW -/-

Tel. 071 320 77 93 • Fax 071 320 77 94 -/-

Translation page: 2 of 4.



Robak

[University emblem and Latin inscription]:

UNIVERSITAS RERUM
NATURALIUM
WRATISLAVIENSIS

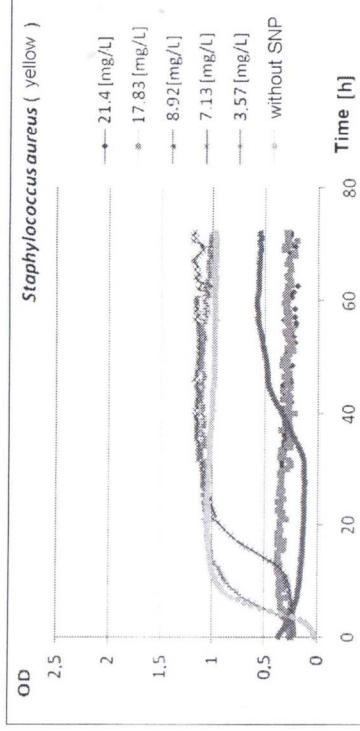
WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE
SCIENCES -/-

CHAIR OF BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-

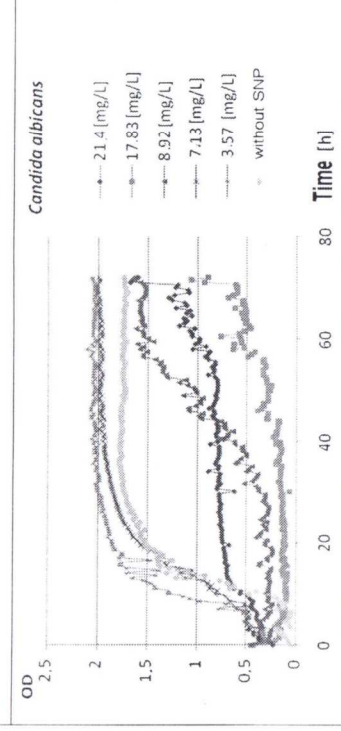
DOCUMENTED AND PUBLISHED INHIBITION OF GROWTH OF BACTERIA AND YEASTS -/-

Żarowska B., Piegza M., Jaros-Kozłeczka K., Koźlecki T., Robak M., (2016). Silver nanoparticles (SNP) and inhibition of growth of micro organisms [Nanoczaszki srebra a hamowanie wzrostu mikroorganizmów], published by Nowoczesne Technologie Produkcji Żywności (ISBN 978-83-7160-837-7), 36-48. -/-

[Pasted image]



[Pasted image]



[Pasted image]

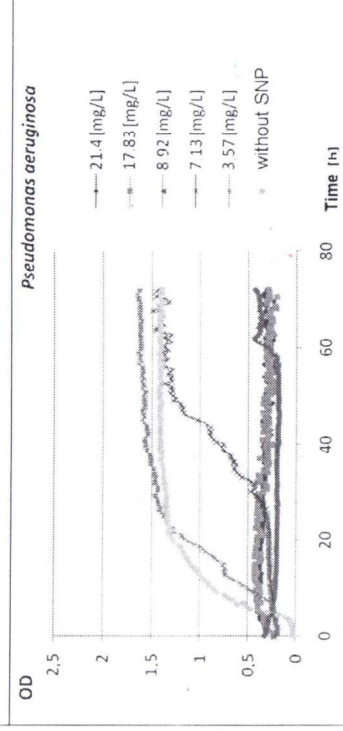


Fig. 0. Growth of micro organisms in the presence of increasing doses of SNP (Żarowska et al. 2016). -/-

[Footnote]: WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES IN WROCLAW -/-
CHAIR of BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-

UL. CHEŁMOŃSKIEGO 37 51-630 WROCLAW -/-

Tel. 071 320 77 93 • Fax 071 320 77 94 -/-



[University emblem and Latin inscription]:

UNIVERSITAS RERUM
NATURALIUM
WRATISLAVIENSIS

WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE
SCIENCES -/-

CHAIR OF BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-
DOCUMENTATION OF TEST RESULTS -/-

Table 1. Inhibition of growth of micro organism by EXTREM and EOC adhesive -/-

Adhesive tested	Species	OD 600nm		Growth [%] in relation to control test
		prior to culture growth (time 0)	after 24-hour culture growth	
Without adhesive(control test)	<i>P. aeruginosa</i>	1.48	3.39	100
			2.63	89.6
			2.67	90
			2.905	100
			2.67	84
Without adhesive(control test)	<i>E. coli</i>	0.84	1.82	100
			1.485	81.6
			1.575	86.5
			1.92	100
			2.07	100
Without adhesive(control test)	<i>C. albicans</i>	1.96	7.965	100
			8.37	100
			9.08	100
			8.76	100
			8.23	100

[Footnote]: WROCLAW UNIVERSITY OF ENVIRONMENTAL AND LIFE SCIENCES IN WROCLAW -/-
CHAIR of BIOTECHNOLOGY AND MICROBIOLOGY OF FOOD -/-
UL. CHEŁMONSKIEGO 37 51-630 WROCLAW -/-
Tel. 071 320 77 93 • Fax 071 320 77 94 -/-

REPERTORY: No.
I, Jerzy Brzozowski, sworn translator of English, No. 1586/06, hereby certify that this is an
accurate translation of the Polish document.
Dated: 17.04.2010 Signature: *J. Brzozowski*



J. Brzozowski

END OF TRANSLATION



RAPORT Z BADAŃ

dotyczących wpływu dodatku nanocząstek srebra (SNP) do papierów higienicznych na właściwości przeciwdrobnoustrojowe.

W dniu 17.05.2016 otrzymano do badań pięć prób bibuły i dwie kleju.

Próby bibuły:

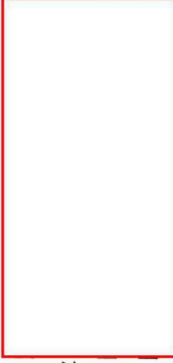
Kontrolna bibuła

Bibuła przygotowana z

Bibuła przygotowana z

Bibuła przygotowana z

Bibuła przygotowana z



SNP w stężeniu 10ppm

SNP w stężeniu 20ppm

w stężeniu 10ppm

w stężeniu 20ppm





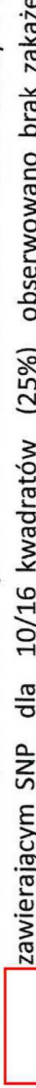

Wykonanie

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa badano wobec bakterii : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* oraz drożdży *Candida albicans*.

Badania bibuły wykonano na podłożu stałym umieszczając cztery kawałki o wymiarze 1cm² na powierzchni 4 godzinnej hodowli posianego wgłębnie danego drobnoustroju oraz na podłożu płynnym wykonując pomiar zmętnienia próby w stosunku do kontroli przy fali świetlnej o długości 600 nm. W pierwszym przypadku oceniano wzrost na agarze lub/i na kawałku bibuły notując liczbę kwadratów wokół których obserwowano wzrost drobnoustroju. W drugim przypadku obliczono % zahamowania wzrostu w stosunku do kontroli na podstawie wartości OD 600 nm.

Badanie  wykonano techniką hodowli płynnych dodając 1 lub 3 μL (100 krotnie) do 1mL hodowli.

Wyniki

1.  bez SNP wykazywały niewielką aktywność hamującą wzrost bakterii i drożdży (tab.1).
2. Bibuła kontrolna nie powoduje zahamowania wzrostu ani w podłożu stałym ani w podłożu płynnym (tab. 2).
3. W hodowlach na podłożu stałym wykazano zdecydowane hamowanie bakterii z gatunku *Staphylococcus auerus* przez kawałki bibuły przygotowane  zawierającymi SNP w stężeniu 10 i 20 ppm (rys. 1). Nie zostało porośniętych 18 na 32 badane kwadraty (56%) i wykazano zależność od stężenia SNP. W mniejszym stopniu obserwowano hamowanie bakterii z gatunku *E.coli* przez SNP zawarte w bibule. Wobec bibuły z klejem  zawierającym SNP dla 10/16 kwadratów (25%) obserwowano brak zakażenia, a wobec bibuły  zawierającym SNP 2 z 16 kwadratów (12,5%). Zależność od stężenia



4. W hodowlach płynnych wykazano zahamowanie wzrostu *Candida albicans* w obecności oby badanych bibuł oraz *Escherichia coli* wobec bibuły przygotowanej w dawce 20 ppm (tab. 2).

Komentarz:

1. Otrzymano wyniki świadczące o pozytywnym oddziaływaniu dodatku nanosrebra do bibuły, czyli hamującym wzrost drobnoustrojów, ale zaobserwowane anty-drobnoustrojowe oddziaływanie nie było jednorodne. Może to wynikać ze zbyt małego stężenia dodanego nanosrebra i/ lub nierównomiernego rozprowadzenia na bibule.
2. Metoda hodowli płynnej jest zdecydowanie lepsza do tego typu analiz, ale należy ją wykonać w większej liczbie powtórzeń dla danej próby, np.10.
3. We wcześniejszych badaniach wykazano hamujące oddziaływanie roztworów SNP na badane gatunki bakterii i drożdży przy stężeniu >9 ppm (rys. 0, Żarowska i in. 2016).

WNIOSKI

1. Nanosrebro zawarte w bibule hamuje wzrost bakterii i drożdży.
2. Dodatek nanosrebra poprawia anty-drobnoustrojowe właściwości bibuły higienicznej.
3. Dla większego efektu należy zwiększyć dawkę dodawanego do kleju nanosrebra (25-30 ppm).

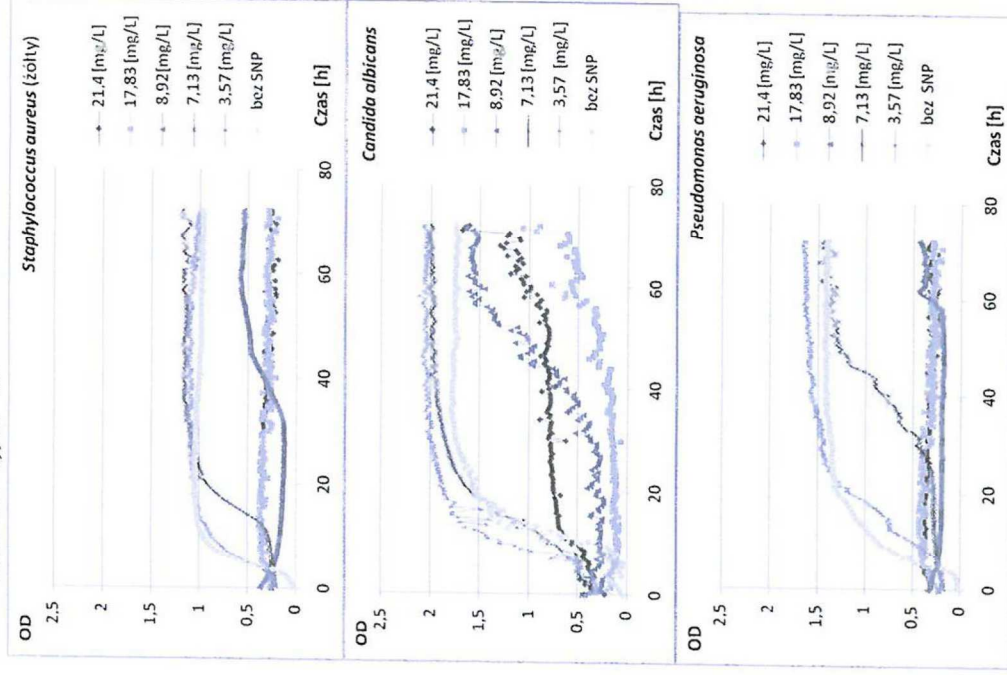
30.05.2016

Prof. dr hab. Małgorzata Robak



UDOKUMENTOWANE I OPUBLIKOWANE HAMOWANIE WZROSTU BAKTERII I DROZDŹY

Żarowska B., Piegza M., Jaros-Koźlecka K., Koźlecki T., Robak M., (2016). Nanocząstki srebra (SNP) a hamowanie wzrostu mikroorganizmów. w *Nowoczesne Technologie Produkcji Żywności* (ISBN 978-83-7160-837-7), 36-48.



Rys.0. Wzrost drobnoustrojów w obecności wzrastających dawek SNP (Żarowska i in. 2016).



Rys. 1b. Porównanie wzrostu *Staphylococcus aureus* w obecności 1cm² kawałków bibuły przygotowanej z dodatkiem 2-ch roztworów SNP zawartych w 2-ch różnych klejach.