ALTERNATOR
Misliti znanost.

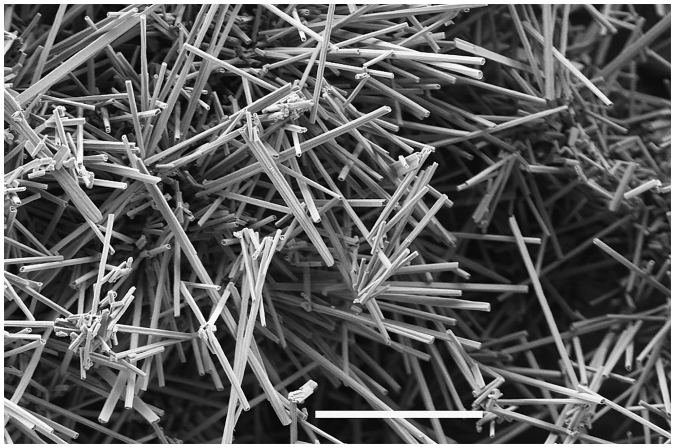
Protimikrobne nanokompozitne prevleke – ključ do zmanjšanega prenosa okužb

30. 9. 2021

Number: 42/2021

Author:

- Urška Gradišar Centa

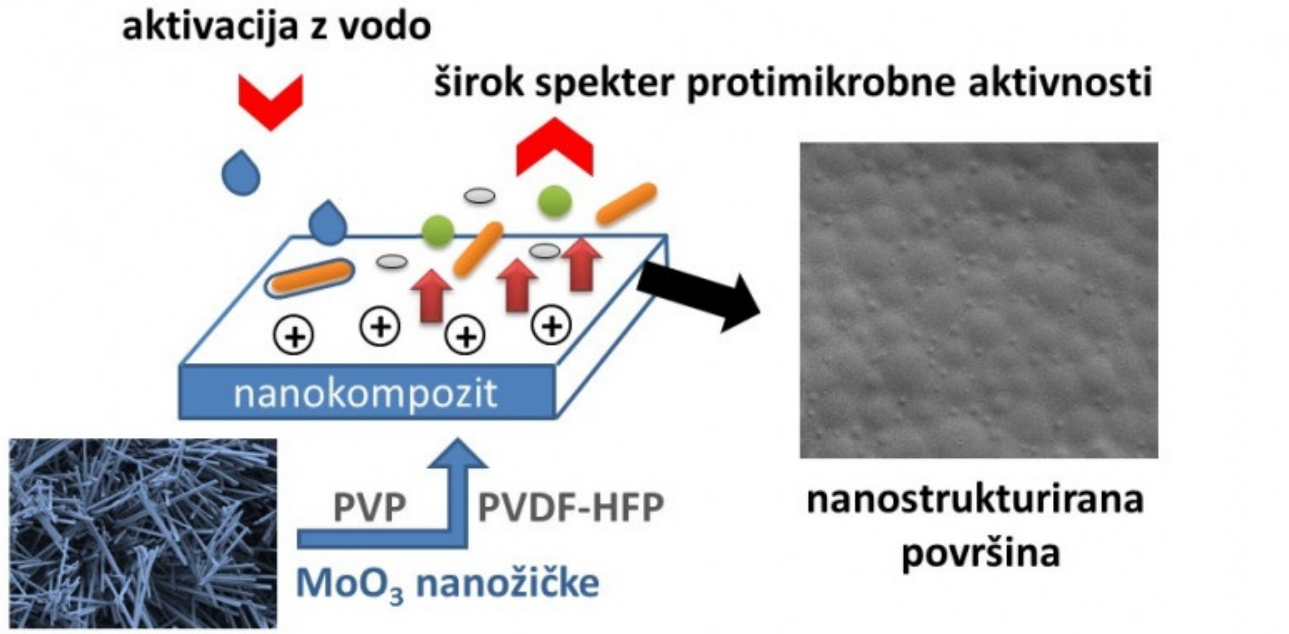


Nanožice MoO_3 pod elektronskim mikroskopom

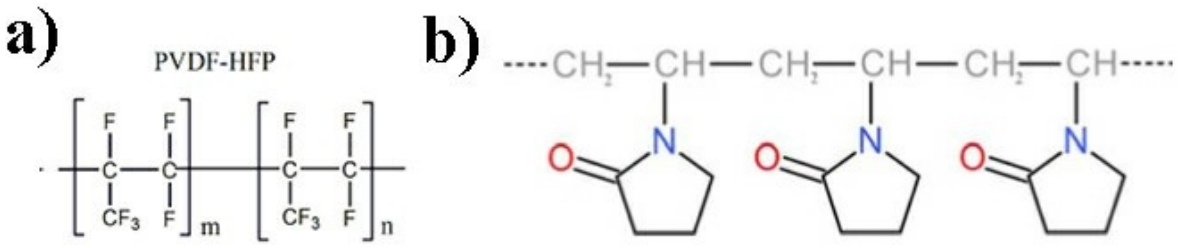
Kljuke na vratih, gumbi v dvigalih, držala v avtobusih, ročaji nakupovalnih vozičkov, jedilne mize, površine v gostinskih lokalih – vse to so površine na javnih mestih, npr. v bolnišnicah, trgovinah, na avtobusih, kjer je velik pretok ljudi in na katerih je najti številne različne mikroorganizme. To so predvsem bakterije, glive in kvasovke, ki lahko rastejo v planktonski (prosto plavajoči) obliki oziroma v pogostejši obliki biofilma (tj. skupek mikroorganizmov in njihovih zunajceličnih produktov, ki so pritrjeni na podlago). Kadar se takih površin dotikamo, se izpostavljamo velikemu tveganju za prenos mikrobne okužbe; mikroorganizmom je namreč zagotovljeno pravo okolje za kolonizacijo, rast in tvorbo biofilma, saj je v notranjih prostorih običajno dovolj visoka zračna vlaga. Poleg tega so na površinah tudi organske molekule, ki jih tam puščamo kot sledi dotikanja, mikroorganizmom pa služijo kot hranivo. Mikroorganizmi se pred zanje neugodnimi dejavniki iz okolja, med katere sodijo tudi izpostavljenost biocidnim sredstvom, antibiotikom in razkužilom, zaščitijo s tvorbo biofilma.

Antibiotska odpornost mikroorganizmov postaja vse širši problem, zato znanstveniki intenzivno razvijajo nove strategije za preprečevanje prenosa okužb. Mednje sodijo tudi t. i. *protimikrobne prevleke*, v katere so pogosto vključeni različni nanomateriali (titanov dioksid, cinkov oksid, bakrov oksid, srebro, zlato in drugi), ki pod določenimi fizikalno-kemijskimi pogoji izkazujejo protimikrobno delovanje. Med nanodelci (delci, ki so vsaj v eni dimenziji manjši od 100 nm) in bakterijami lahko pride do elektrostatske interakcije, preko katere se nanodelci pritrdijo na bakterijsko membrano, sicer pa lahko nanodelci izzovejo tudi poškodbe membrane, sprožijo nastajanje prostih kisikovih radikalov ter mutacije bakterijskih sevov. Učinkovitost protimikrobnih prevlek pa še dodatno povečajo protiadhezivne lastnosti površine, kar mikroorganizmom oteži interakcijo in pritrjevanje na podlago, ki je običajno v ta namen na različne načine nanostrukturirana in funkcionalizirana. Protimikrobne prevleke lahko delujejo pasivno ali aktivno, najvišja učinkovitost pa je dosežena s prepletom obeh strategij. Pri pasivni strategiji ima površina protiadhezivne lastnosti, pri aktivni strategiji pa se iz prevleke sprošča baktericidna snov. *Polimerni nanokompoziti* so sodobni materiali, sestavljeni iz več različnih materialov na makroskopskem nivoju, ki lahko izkazujejo protiadhezivne lastnosti ter tako zmanjšajo možnost, da bi mikroorganizmi naselili površino, lahko pa se iz nanokompozita sprošča tudi baktericidna komponenta. Za pripravo protimikrobnih prevlek uporabljamo različne pristope in tehnike, s katerimi mikrobe imobiliziramo preko pozitivno nabitih protimikrobnih peptidov, ki v membrani bakterijske celice ustvarijo ionske kanalčke ter tako povečajo prepustnost membrane oziroma v nadaljevanju povzročijo propad celice. Lahko pa mikrobe odženemo s sproščanjem protimikrobnih učinkovin, med katere sodijo tudi nanomateriali, kovinski derivati, amonijeve soli, eterična olja ter antibiotiki. Rast mikroorganizmov na različnih površinah je odvisna od več kemijskih in fizikalnih pogojev, kot so temperatura, pH vrednost, površinska topografija, prisotnost vode. Na adhezijo mikroorganizmov in njihovo interakcijo s površino pa vplivata tako topografija in hrapavost kot tudi prisotnost površinskega naboja ter hidrofobnost oziroma hidrofilnost. Na podlagi obširne fizikalne karakterizacije je mogoče predvideti učinkovitost protimikrobne prevleke.

Pred nekaj leti se je za protimikroben material izkazal tudi molibdenov trioksid (MoO_3) v različnih morfologijah (oblikah) in kristalnih strukturah (fazah) (Zollfrank idr. 2012 (https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.09.010)). Protimikrobno aktivnost MoO_3 razlagajo z njegovim raztapljanjem v vodnem mediju, kjer nastaja molibdenova kislina, pri čemer se v nadaljevanju oblikujeta molibdatni (MoO_4^{2-}) in oksonijev ion (H_3O^+) (Krishnamoorthy idr. 2013 (https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.08.026)). Nastali ioni povzročijo, da vrednost pH vodne raztopine prehaja iz nevtralnega v kislo območje, ter tako zmotijo encimski in transportni sistem bakterijske celične stene. Kislo okolje z nizko pH vrednostjo v strokovni in znanstveni literaturi opisujejo kot univerzalno protimikrobno sredstvo proti občutljivim, pa tudi na antibiotike odpornim bakterijskim sevom, ki povzročajo bolnišnične okužbe oziroma zaplete pri zdravljenju primarnega obolenja.

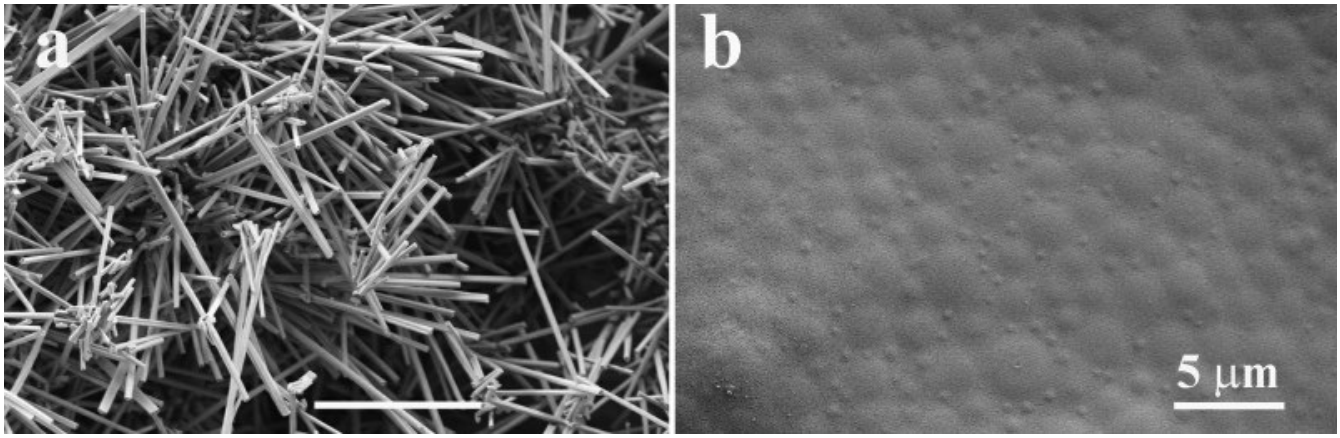


Da bi oblikovala nanostrukturirano površino s širokospektralno protimikrobno aktivnostjo, sem zasnovala polimerni nanokompozit (PVDF-HFP/PVP) z nanožicami (žica, katere premer je v velikostnem redu nanometrov) MoO_3 (kot je prikazano na sliki 2b). Del nanokompozita predstavlja inerten nevodotopen kopolimer poli(viniliden fluorid-ko-heksafluoropropilen) ali krajše PVDF-HFP (kot je prikazano na sliki 1a), drugi del polimerne osnove pa predstavlja biokompatibilen in vodotopen polimer, polivinilpirolidon oziroma krajše PVP (kot je prikazano na sliki 1b). Polimer PVDF-HFP ima nizko stopnjo kristaliničnosti, steklast prehod pri nizki temperaturi, odlikujeta ga visoka toplotna stabilnost ter izboljšana mehanska trdnost glede na PVDF. Kristalizira v več kristalnih fazah, pri čemer so nekatere polarne in druge nepolarne. V vodi zelo dobro topen polimer PVP ima afiniteto za tvorbo kompleksov s hidrofobnimi in hidrofilnimi spojinami, je temperaturno odporen in se uporablja kot stabilizator emulzij (bolj poznan kot emulgator E1201, sredstvo za glaziranje in zgoščevanje) oziroma disperzijski medij. Še dodatno ga plemenitijo dobre električne lastnosti, saj omogoča bogat nabor transportnih mehanizmov naboja, kar pomeni, da lahko pride do prenosa naboja na več načinov. Nanožice MoO_3 (glej sliko 2a) dobimo s termično oksidacijo nanožic molibden-žveplo-jod ($Mo_6S_2I_8$), ki jih na IJS sintetiziramo preko patentno zaščitene (US 8007756 B2, 2015) kemijske transportne reakcije. V povprečju so polikristalinične nanožice MoO_3 dolge do 7 µm in imajo premer okrog 200 nm. Njihova visoka specifična površina (12 m^2/g), primanjkljaj kisikovih atomov in ortorombska kristalna struktura jim omogočajo dobre protimikrobne lastnosti, saj se hitro raztapljajo. Med raztapljanjem nanožic v vodi, katerih topnost znaša približno 2 mg/ml, prehodno nastaja molibdenova kislina, ki v nadaljevanju razpade na oksonijeve (H_3O^+) ione in molibdatne ione (MoO_4^{2-}), raztopina pa ima pH v močno kislem območju (pH ~ 3) – npr. kot jabolčni sok. Skupaj s sodelavci nam je uspelo pokazati, da nanožice MoO_3 izkazujejo tako protibakterijsko kot fungicidno delovanje. To velja tako za obliko neraztopljenega delca kot tudi za raztopljeno obliko ionov, zato sem jih uporabila kot nanopolnilo za pripravo polimernega nanokompozita.



Slika 1: strukturna formula polimerov: a) poli(viniliden fluorid-ko-heksafluoropropilen); b) polivinilpirolidon

Za zagotavljanje toksikološke varnosti nanokompozita smo pred vgrajevanjem nanožic MoO_3 opravili še študijo toksičnega učinka nanožic na človeške kožne celice (HaCaT), ki bi eventualno prišle v stik z njimi preko stične površine. Ugotovili smo, da nanožice MoO_3 ne izkazujejo toksičnega učinka na HaCaT celice do koncentracije 0,5 mg/ml raztopljenega MoO_3 niti po 24-urni izpostavljenosti (Božinović idr. 2020 (https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152564)). Ta koncentracija je zelo visoka, glede na to, da se iz nanokompozita v prvih 90 minutah raztapljanja, ko je iz obeh strani izpostavljen vodi, sprosti le 0,09 mg MoO_3/ml vode.



Slika 2: a) nanožice MoO_3; b) topografija nanokompozita PVDF-HFP/PVP/MoO_3

Polimerni nanokompozit v sestavi PVDF-HFP/PVP/MoO_3 ima na površini filma polkrožne strukture ali domene v velikosti 2–3 µm ter posamezne submikronske otočke čistega PVP polimera (kot je prikazano na sliki 2b). Na tak način nastane nanostrukturirana površina, ki je neugodna za pritrjevanje mikroorganizmov in na kateri so polimerne domene visoke približno 70 nm. Ob dodatku nanožic MoO_3 v polimerno mešanico PVDF-HFP/PVP se je površinska hrapavost filma znižala za približno polovico glede na film iz polimerne mešanice in hkrati povzročila nastanek submikronskih otočkov. Pri pripravi polimernega nanokompozita se nanožice MoO_3 razslojijo v raztopini PVP polimera, pri čemer pa se ohrani njihova oblika nanožic. Nanožice MoO_3 se nahajajo znotraj polimernih otočkov PVP polimera, ki jih obdaja PVDF-HFP polimer, ki kristalizira v feroelektrični (električni dipoli se spontano uredijo) β-fazi. Zaznali smo tudi interakcijo med nanožicami MoO_3 in dolgimi molekulami PVDF-HFP polimera, saj se je na račun tega povečala toplotna stabilizacija nanokompozita (višji elastični modul v celotnem merjenem temeraturnem območju). Površina ima le rahlo hidrofilen značaj, saj je omočitveni kot vode na površini nanokompozitnega filma (87,5 ± 0,2°) le nekoliko večji kot na filmu polimerne mešanice (83,8 ± 0,2°), čeprav je površinska hrapavost nanokompozita kar dvakrat manjša. Za hidrofilne površine je značilno, da neugodno vplivajo na pritrjevanje mikroorganizmov. Na površini nanokompozitnega filma je prisoten pozitiven naboj, kar nakazuje na prisotnost molibdenovih in amonijevih soli. Protimikrobna aktivnost je posledica dveh protimikrobnih mehanizmov znotraj nanokompozita, in sicer raztapljanja nanožic MoO_3, ki povzroča kislo okolje, ter hidrolize PVP polimera, pri čemer nastaja še amonijeva sol, ki prav tako izkazuje protimikrobno aktivnost, in karboksilna kislina (Gradišar Centa idr. 2021 (https://doi.org/10.1680/jsuin.20.00073)).

Protimikrobni potencial nanokompozita smo ocenili na podlagi modificiranega standarda ISO22196 (https://www.iso.org/standard/54431.html) na štirih bakterijah (*S. Aureus*, *L. monocytogenes*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*), dveh kvasovkah (*C. albicans* in *P. anomala*) in dveh plesnih (*P. verrucosum* in *A. flavus*). Število vseh štirih bakterijskih kolonij po 3-urni inkubaciji pade za 2–3 logaritme (log) CFU oziroma za 99–99,9 %, po šestih urah pa je viden popoln baktericidni učinek. Pri kvasovkah je bilo močnejšo protimikrobno aktivnost zaznati pri kvasovki *P. anomala*, in sicer za 1,7 log (98 %) oziroma 2,5 log (99,7 %) po treh oziroma šestih urah inkubacije, fungicidni učinek pa smo opazili po 24 urah. Opaznejše zmanjšanje števila kolonij kvasovke *C. albicans* je bilo opaziti po 24 urah, in sicer za 1,2 log (93,7 %). Pri plesnih se je izkazalo, da nanokompozitni film deluje vrstnospecifično. Število celic plesni *P. verrucosum* se po treh urah inkubacije zmanjša za 0,5 log (68,4 %), po šestih urah za 1,3 log (95 %), po 24 urah pa je prisoten fungicidni učinek. Pri plesni *A. flavus* smo zaznali blag upad, in sicer 1,3 log (95 %) po 24 urah (Gradišar Centa idr. 2021 (https://doi.org/10.1680/jsuin.20.00073)).

Prav pri vseh mikroorganizmih se torej nakazuje trend zmanjševanja števila kolonij oziroma celic, kar je posledica kombinacije dveh protimikrobnih učinkovin: nanožic MoO_3 in amonijeve soli. To nanokompozitu omogoča širokospektralno protimikrobno neselektivno delovanje in mu s tem povečuje aplikativno uporabnost. Še ena izjemna okoljsko naravnana prednost nanokompozita pa je ta, da njegovo protimikrobno delovanje z večstopenjskim mehanizmom aktiviramo s prisotnostjo vode, bodisi v tekoči ali parni fazi. To se zgodi denimo med čiščenjem z mokro krpo ali pa ob stiku z vodo, ki jo s seboj prinesejo mikrobi oziroma se na površini kondenzira iz zračne vlage. Z nanosom te prevleke na dotikalne površine bi lahko zmanjšali uporabo različnih razkužilnih sredstev in tako preprečili še dodaten porast že tako velikega števila odpornih mikroorganizmov. Virološke aktivnosti take prevleke nismo preverjali: trenutno je njen razvoj še v laboratorijski fazi, za prenos v industrijo pa je potrebna nadgradnja sintezne tehnike za izdelavo nanomateriala. V nadaljevanju bodo opravljeni tudi standardizirani testi za površinske premaze, na podlagi katerih se bo nadaljeval razvoj in končna optimizacija nanokompozita.