

Δρ Δέσποινα Χαραλάμπους,

Λέκτορας , Τμήμα «Χημεία Τροφίμων και Φαρμακευτική Βιοτεχνολογία»
πανεπιστήμιο Frederic, Κύπρος

Δρ. Μαρία Καλουρκώτη –Ρίκκου,

Λέκτορας Τμήμα «Φαρμακευτικής » στο πανεπιστήμιο Frederic , Κύπρος

Πολυμερικές μεμβράνες με αντιμικροβιακές ιδιότητες

(κοινή παρουσίαση)

Καλησπέρα σας ,

Καταρχήν θα ήθελα να σας ευχαριστήσω παρά πολύ για την ευκαιρία που μας δίνεται σε αυτό το πρώτο διεθνές φόρουμ για το νερό. Να σας δώσουμε κάποιες βασικές πληροφορίες για την έρευνα που γίνεται πάνω στον καθαρισμό του νερού και συγκεκριμένα στις πολυμερικές μεμβράνες με τις οποίες ασχολούμαστε. Η κοινή θέση για την οποία έχετε αναφέρει έχει σαν θέμα την σύνθεση και τον χαρακτηρισμό των πολυμερικών μεμβρανών. Αυτές οι πολυμερικές μεμβράνες οι οποίες φτιάχνονται στο εργαστήριο έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται στον καθαρισμό του νερού. Αυτό το έργο το οποίο είναι αποκλειστικά μια εργασία που πραγματοποιείται στο τμήμα φαρμακευτικής που πραγματοποιείται στο πανεπιστήμιο του Frederick στην Λευκωσία συμμετέχουν οι : συνάδελφος δόκτωρ Μαρία Ρίκκου-Καλουρκώτη και η δόκτωρ Θεοδώρα Κρασσιά Χριστοφόρου η οποία είναι αναπληρώτρια καθηγήτρια στο τμήμα μηχανικών μηχανολογίας και κατασκευαστικής του πανεπιστημίου Κύπρου.

Στο τμήμα της φαρμακευτικής του πανεπιστημίου του Frederick κάναμε την σύνθεση των μεμβρανών και τον χαρακτηρισμό τους και η δόκτωρ Κρασσιά Χριστοφόρου μας βοήθησε για την σύνθεση των πολυμερικών μεμβρανών με την μέθοδο ηλεκτροσπινιγκ που θα σας εξηγήσω αργότερα. Καταρχήν η ομιλία μου θα περιλαμβάνει μια εισαγωγή όσον αφορά την σύνθεση αυτών των πολυμερικών μεμβρανών. Να σας δώσω κάποια βασικά στοιχεία για να ξέρετε για τι μιλάμε. Στη συνέχεια θα ακολουθήσει μια συζήτηση σχετικά με το ερευνητικό έργο της μονάδας μας και πως χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των μεμβρανών και στο τέλος θα παρουσιαστούν τα βασικά συμπεράσματα και αποτελέσματα αυτής της εργασίας.

Ξεκινώντας να αναφέρουμε όπως έχουν πει και άλλοι συνάδελφοι σήμερα ότι η μόλυνση του νερού αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα της σύγχρονης εποχής μας. Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας σε μία έκδοση του το 2015 που είναι σχετικά παλαιότερη αναφέρει ότι πάνω από 2.6 δις άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε καθαρό νερό και μια από τις πιο σημαντικές αιτίες μόλυνσης του νερού είναι κάποιο παθογόνοι μικροοργανισμοί , μικρόβια δηλαδή και κάποιες συναφείς νόσοι που οφείλονται στην παρουσία αυτών των μικροοργανισμών στα νερά μας. Επομένως η επεξεργασία του νερού Πέμπτη δεν αποτελεί μια πολυτέλεια αλλά δυστυχώς μια αναγκαιότητα στις μέρες μας.

Η διήθηση που γίνεται στα εργαστήρια με την μέθοδο , για την χρήση αυτών των πολυμερικών μεμβρανών αποτελεί μια απόντος πιο δραστικές τεχνολογίες του νερού μας. Αυτό συμβαίνει γιατί το τελευταίο καιρό αυτές οι πολυμερικές μεμβράνες έχουν αποκτήσει

ιδιαίτερο ενδιαφέρον και αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχουν μια βελτιωμένη επιλεκτικότητα απέναντι σε κάποιους μικροοργανισμούς. Έχουν υψηλή απόδοση διαχωρισμού πολύ καλή και μεγάλη σταθερότητα και επίσης την δυνατότητα να μπορούμε να διαχωρίσουμε διαφορετικού τύπου μόρια χρησιμοποιώντας κάποιες ιδιότητες συγκεκριμένες που έχουν αυτά τα συστήματα. Η ταξινόμηση αυτών των μεμβρανών που γίνεται στα εργαστήρια μας πραγματοποιείται κυρίως με βάση το μέγεθος των πόρων. Σχηματίζονται δηλαδή κάποια κενά σε αυτές τις μεμβράνες τα οποία συγκρατούν τα μικρόβια και με βάση την πίεση λειτουργίας της κατασκευής αυτών των μεμβρανών μπορούμε να τις χωρίσουμε σε αυτές τις 4 κατηγορίες που βλέπουμε εδώ. Είναι οι μεμβράνες μικρό-διήθησης που είναι η πρώτη κατηγορία, οι μεμβράνες υπέρ-διήθησης, οι μεμβράνες νάνο-διήθησης και οι μεμβράνες αντιστροφής όσμωσης. Να αναφέρω εδώ παρενθετικά ότι όποιες από αυτές τις μεμβράνες τις χρησιμοποιούμε για τον καθαρισμό στο σπίτι σας παραδείγματος χάριν αυτά τα συστήματα αντιστροφής όσμωσης όπως ονομάζονται περιλαμβάνουν αυτές τις μεμβράνες που αναφέρει εδώ.

Μια γενικότερη κατηγορία ταξινόμησης των μεμβρανών που μπορούν να κατασκευαστούν έχει να κάνει με τις λεγόμενες ισορροπίες μεμβράνες οι οποίες ως επί το πλείστον χαρακτηρίζονται με μια ομοιόμορφη κατανομή. Στο εργαστήριο δηλαδή μπορούμε να δούμε την δομή τους κάτω από κάποιες συγκεκριμένες συνθήκες και να ταυτοποιήσουμε ότι αυτές οι μεμβράνες έχουν μια ομοιόμορφη δομή παντού σε όλη την επιφάνεια. Και η δεύτερη κατηγορία είναι οι λεγόμενες αν-ισοτροπικές μεμβράνες αυτές δεν έχουν ομοιόμορφη κατανομή κατά μήκος της διαδρομής τους ο τρόπος παρασκευής τους δηλαδή διαχωρίζει την κατηγορία της αν-ισοτροπικής ή της ισοκρατικής μεμβράνης. Και το σε ποια κατηγορία ανήκει μπορούμε εμείς να το καθορίσουμε στο εργαστήριο. Μπορούμε δηλαδή ανάλογα με τον τρόπο παρασκευής της μεμβράνης μας, οι 4 βασικοί τρόποι που βλέπετε είναι εδώ: η μέθοδος αναστροφής φάσης, η μέθοδος διογκούμενου ημενίου, ακτινοβολήση με φορτισμένα σωματίδια και η μέθοδος ηλεκτροσπινινγκ.

Με βάση αυτές τις μεθόδους και τον τρόπο παρασκευής με μια από αυτές τις μεθόδους μπορούμε εμείς να καθορίζουμε αν η με τα η μας θα έχει ομοιόμορφη ή ανομοιόμορφη κατανομή και αυτό θα καθορίσει την λειτουργία στην οποία εμείς θα βάλουμε την μεμβράνη μας να υποστεί τον καθορισμό για τον όπιο θέλουμε να εφαρμόσουμε δηλαδή. Στο συγκεκριμένο έργο χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ηλεκτροσπινινγκ που ήταν η τελευταία α μέθοδος και αυτό επιλέχθηκε γιατί με βάση την βιβλιογραφία οι μεμβράνες που κατασκευάζονται με αυτή την μέθοδο είναι πιο απλές και πιο αποτελεσματικές στον καθαρισμό του νερού όπως θα σας δείξω αργότερα. Ένα βέβαιο πολύ σημαντικό πρόβλημα στη χρήση αυτών των μεμβρανών είναι το γεγονός ότι κάποιοι παθογόνοι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε αυτές τις μεμβράνες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η μεμβράνη μας να μπλοκάρεται να μειώνεται η ροή της δεν καθαρίζεται σωστά το νερό επειδή δεν μπορεί να περάσει και να εμφανίζεται ένας σοβαρός κίνδυνος βιολογικής ρύπανσης. Άρα αυτήν η μεμβράνη μας με αλλά λόγια δεν λειτουργεί τόσο αποτελεσματικά σταματά να λειτουργεί αποτελεσματικά. Έτσι ο σχεδιασμός πολύ τόκων μεμβρανών που αυτός είναι ο στόχος της έρευνας που γίνεται στα εργαστήρια είναι αυτές οι μεμβράνες να έχουν κάποια ιδιαίτερα αντι-μικροβιακά χαρακτηριστικά. Τα οποία θα τους δίνουν μια επιπλέον χρηστικότητα το οποίο θα είναι καλύτερο στον καθαρισμό του νερού.

Το νερό το οποίο περνάει τα διαφορά σωματίδια, βακτήρια και παράσιτα τα οποία θα έρθουν να προσκολληθούν στην μεμβράνη με αποτέλεσμα αυτή η μεμβράνη μας να

μπλοκάρει στο τέλος. Και έτσι εμείς προσπαθούμε να βελτιώσουμε αυτές τις μεμβράνες. Για να αποκτήσουν οι εμένους κάποια αντι-μικροβιακές ιδιότητες θα πρέπει να εισαχθεί κάποια ουσία, κάποιο μόριο που θα τις δίνει αυτή την αντι-μικροβιακή ιδιότητα. Και η εισαγωγή αυτών των αντι-μικροβιακών ομάδων οι οποίες θα σκοτώνουν τα βακτήρια μας μπορεί να γίνει με αυτούς τους 2 τρόπους που βλέπετε εδώ: μπορεί να γίνει με απευθείας πολυμερισμό κάποιων μονομερών οργανικών ενώσεων που περιέχουν τέτοιες λειτουργικές ομάδες, και αυτές οι λειτουργικές ομάδες έχουν αντι-μικροβιακές ιδιότητες. Συνήθως αυτές οι ομάδες είναι κατιονικές ομάδες αμύνης που ξέρουμε στη βιβλιογραφία ότι σκοτώνουν τα μικρόβια και αμφολιτικές ομάδες, είναι οι ομάδες που έχουν θετικό και αρνητικό φορτίο οπότε μπορούν να αντιμετωπίζουν ισάξια τους διάφορους μικροοργανισμούς.

Ο δεύτερος τρόπος είναι η τροποποίηση της τελικής δομής της μεμβράνης που θα παραχθεί αφού πολυμεριστεί και αφού φτιαχτεί. Και αυτή η τροποποίηση που γίνεται μετά την σύνθεση μπορεί να γίνει με την εισαγωγή μιας συγκεκριμένης ομάδας η οποία ξέρουμε από την βιβλιογραφία ότι έχει ισχυρές αντι-μικροβιακές ιδιότητες. Γενικότερα να σας αναφέρω ότι τα βακτήρια μας μπορούν να αλληλοεπιδράσουν με διάφορους τρόπους κάνω σε αυτές τις πολυμερικές μεμβράνες και οι 2 πιο καθορισμένοι τρόποι, οι μηχανισμοί δηλαδή είναι ο παθητικός μηχανισμός δράσης και ο ενεργητικός μηχανισμός δράσης. Στο μεν πρώτο έχουν να κάνουν οι διάφορες αμφολιτικές ομάδες και στο δεύτερο έχουν να κάνουν οι διάφορες οργανικές αντιμικροβιακές ομάδες.

Συγκεκριμένα εμείς εκμεταλλευτήκαμε δυο κατηγορίες ενώσεων. Η μια ήταν ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου δηλαδή είχαν θετικό φορτίο αυτές οι ομάδες και συνεπώς αυτές οι ομάδες έχοντας αυτό το φορτίο μπορούν όπως καταλαβαίνετε να αντιδράσουν με αρνητικά φορτισμένες ομάδες βακτηρίων και έτσι να τα σκοτώνουν. Και υπάρχουν στη βιβλιογραφία μια μεγάλη μελέτη που γίνεται με την χρήση αυτών των ομάδων οι οποίες αυτές ομάδες μπορούν να αποτρέψουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων πάνω μεμβράνη και την καταστροφή τους. Σας δίνω ένα παράδειγμα χωρίς να έξω να σας κουράσω απλά να αναφέρω ότι αυτές οι εμβρυακές είχαν εξαιρετικά καλά αποτελέσματα σε gram αρνητικά και gram θετικά βακτήρια το γνωστό *e.coli* σταφυλόκοκκος αυγούς, ο χρυσίζον σταφυλόκοκκος ο οποίος μπορεί να υπάρχει και χωρίς καμία αλλαγή στην ροή νερού δηλαδή αυτές οι μεμβράνες δεν μπλοκαρίζονταν και κοσμούσαν να σκοτώσουν τα βακτήρια.

Η δεύτερη κατηγορία ενώσεων που έχει στην κατήφεια που αναφέρει πολυμερικές μεμβράνες με αντιμικροβιακές ιδιότητες έχει να κάνει με τις αμφολιτικές ενώσεις που χούμε αναφέρει από πριν. Όπως σας έχω πει και στην προηγούμενη διαφάνεια αυτές οι αμφολιτικές ομάδες έχουν ταυτόχρονα θετικό αξία αρνητικό φορτίο πάνω τους. Αυτό καταλαβαίνετε ότι τους δίνει την δυνατότητα να αντιδρούν και με θετικά και αρνητικά μικρόβια. Κατά συνέπεια να αυξάνει την ικανότητα της με τα να σκοτώνει ένα ευρύτερο φάσμα μικροβίων σε αντίθεση με το συγκεκριμένο θετικό φορτίο που μπορεί να έχει αυτή η κατηγορία. Και όντως στη βιβλιογραφία έχει τεκμηριωθεί αυτό με υψηλά ποσοστά ταυτοποίησης και μείωσης του πολλαπλασιασμού των μικροβίων στις μεμβράνες. Ο σκοπός της έρευνας μας στο εργαστήριο ήταν να συνθέσουμε ένα μόριο ένα γραμμικό πολυμερές το οποίο το ανοίξαμε με ένα υδροφόρο μόριο εμπορικά διαθέσιμο και σε διάφορες συγκεντρώσεις και παρασκευάσαμε με αυτήν τη μέθοδο του ηλεκτροσπινινγκ-μικροβιακές μεμβράνες οι οποίες είχαν για πρώτη φορά το μόριο του ημιδαζολίου.

Αυτό εδώ το μόριο έχει ισχυρές αντι-μικροβιακές ιδιότητες και αυτό τεκμηριώνεται στην βιβλιογραφία. Επομένως εμείς σκεφτήκαμε να πράξουμε ένα καινούριο μόριο παράγοντας αυτό το αντι-μικροβιακό στοιχείο σε καινούριο τύπου μεμβράνες οι οποίες είχαν ένα εμπορικό διαθέσιμο πολυμερές το όπιο ξέραμε ότι χρησιμοποιείται στις υφιστάμενες μεμβράνες που κυκλοφορούν στη αγορά. Και να σε πω ότι οι μεμβράνες αυτές κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο του πανεπιστημίου Κύπρου με την μέθοδο του ηλεκτροσπινιγκ που βλέπετε εδώ με την βοήθεια της δόκτωρ Θεοδώρας Κρασιιάς κι στην συνέχεια αφού οι μεμβράνες χαρακτηρίστηκαν και παράχθηκαν σε 2 διαφορετικές συγκεντρώσεις πολυμερούς αξιολογήθηκαν για την αντι-μικροβιακή ιδιότητα από εμένα στο εργαστήριο του πανεπιστημίου Frederick. Και θα επικεντρωθώ ήρθε σε αυτά τα αποτελέσματα τα οποία θεωρώ τα πιο κατάλληλα στο συνέδριο μας σήμερα.

Αυτή η αξιολόγηση των μεμβρανών περιλαμβάνει την ικανότητα τους να κατακρατούν μικροοργανισμούς δηλαδή εμείς πήραμε τις μεμβράνες στο εργαστήριο και τις βάλαμε σε ένα μείγμα από βακτήρια συγκεκριμένα e.colikai αφού επωάστηκαν και αφού βάλαμε τα κύτταρα μας πάνω στη μεμβράνη εφαρμόσαμε διήθηση για να δούμε αν όντως αυτή η με τα η μας έχει την ικανότητα να κατακρατά τα βακτήρια και από κάτω να παίρνουμε καθαρό νερό. Και όντως όπως βλέπετε δω στις φωτογραφίες, αφού εφαρμόσαμε το e.coli σε αυτές τις μεμβράνες και βυθίσαμε το νερό μας και πήραμε από κάτω το νερό εμείς πήραμε τη μεμβράνη και την βάλαμε σε ένα επιδεικτικό υλικό για e.coli για να δούμε εάν θα μεγαλώσει όντως αυτό το βακτήριο που βάλαμε πάνω στη μεμβράνη μας. Ελέγξαμε και το νερό από κάτω για δούμε ποσό καθαρό είναι το νερό αυτό που πήραμε αφού το διηθήσαμε με παρουσία αυτού του μικροοργανισμού. Τα αποτελέσματα ήταν σημαντικά και κυρίως είχαμε δει ότι στη συγκέντρωση 23% του πολυμερούς μας και σε συγκέντρωση 70-30 των δυο αυτών ομάδων που είχαμε τοποθετήσει στην μεμβράνη η δυνατότητα κατακράτησης του μικροοργανισμού ήταν παρά πολύ μεγάλη σε σχέση με τις άλλες συγκεντρώσεις που ήταν 20 και 60-40.

Στη συνέχεια για τις ίδιες μεμβράνες αποφασίσαμε να μελετήσουμε τις αντι-μικροβιακές ιδιότητες της μεμβράνης μας δηλαδή κατά ποσό αυτήν η μεμβράνη παρουσία κάποιου μικροβίου μπορεί να το σκοτώσει και να αποτρέψει τον πολλαπλασιασμό του γιατί όπως σας είπα και πριν το μπλοκάρισμα της μεμβράνης μας είναι ένα σημαντικό πρόβλημα για αυτά τα είδους μόρια. Το τι κάναμε σε αυτήν την μέθοδο πήραμε μια γνωστή συγκέντρωση μικροοργανισμών βάλαμε μέσα τες μεμβράνες που φτιάξαμε και αφού τις επωάσαμε για 24 ώρες πήραμε δείγμα από το υλικό μας και το απλώσαμε σε τριβλία για να μετρήσουμε τον αριθμό των μικροβίων που επιβιώνουν παρουσία αυτής της μεμβράνης δηλαδή κατά ποσό η μεμβράνη έχει την δυνατότητα να σκοτώνει τα βακτήρια. Το τι είχαμε δει ήταν ότι όντως μετρώντας αυτές τις αποικίες, ονομάζονται στην μικροβιολογία, δηλαδή το κάθε ένα μικρόβιο που έχει σε αυτό το τριβλίο και συγκρίνοντας το με το δείγμα ελέγχου με ένα δείγμα στο όπιο δεν είχαν μεμβράνες είδαμε ότι παρουσία αυτών των καινούριων πολυμερικών μεμβρανών τα κύτταρα μας πέθαιναν γιατί ήταν λιγότερα στα τριβλία. Και ποσοστιαία η αναλογία τους ήταν 77% πέθαιναν σε σχέση με το κοντρόλ 47% που ήταν μια εμπορικά διαθέσιμη μεμβράνη που χρησιμοποιείται για αυτές τις διηγήσεις η λεγόμενη rndf. Επομένως είχαμε βρει τες σωστές αναλογίες είχαμε συγκρίνει τα δείγματα μας και είχαμε δει ότι αυτές οι μεμβράνες δουλεύουν.

Παράλληλα είχαμε στείλει το πρόγραμμα γαία επιχορήγηση στο πρόγραμμα έρευνας και είχαμε καταφέρει να πάρουμε χρηματοδότησης όποτε από τότε έχουμε συνεχίσει αυτή τη

δουλειά και έχουμε δουλέψει και αλλά μικρόβια σε αυτές τις πολυμερικές μεμβράνες , έχουμε δουλέψει και gram θετικά κι gram αρνητικά μικρόβια έχουμε δουλέψει την πλεμονοφυλα ένα μικρόβιο το οποίο προκαλεί σοβαρά προβλήματα στο αναπνευστικό σύστημα αλλά υπάρχει και σε κάποιους υδάτινους πόρους. Και συνοψίζοντας έχω να σας αναφέρω ότι η αξιολόγη αυτών των καινούριων μεμβρανών έχει παρά πολύ ενθαρρυντικά αποτελέσματα τόσο στην κατακράτηση των gram αρνητικών όσο και των gram θετικών βακτηρίων και είμαστε στη φάση τώρα που προσπαθούμε να μελετήσουμε την επίδραση που έχει το μέγεθος αυτής της μεμβράνης. Στην βιβλιογραφία αναφέρει ότι το μοριακό βάρος της μεμβράνης που φτιάχνεις επηρεάζει τους πόρους και κατά επέκταση τα μικρόβια που θα κατακρατεί. Επομένως στη συνεχόμενη δουλειά που έχουμε να κάνουμε τώρα στο εργαστήριο περιλαμβάνεται ο έλεγχος του μοριακού βάρους καθώς επίσης και η σχέση του φορτίου που μπορεί να έχει αυτή η μεμβράνη με την επίδραση του εκάστοτε μικροβίου.

Τέλος θέλοντας να σας ευχαριστήσω , όπως και τη δόκτωρ Κρασιιά Χριστοφόρου για την μέθοδο ηλεκτροσπινινγκ και για την παρασκευή αυτών των πολυμερικών μεμβρανών και εσάς τελειώνοντας σας ευχαριστώ για την ευκαιρία που μας δόθηκε για να σας αναφέρω αυτά τα λίγα ερευνητικά έργα με τα οποία έχουμε ασχοληθεί τον τελευταίο καιρό.

Ευχαριστώ!

