



Povzetek projekta Po kreativni poti do znanja 2017 – 2020, 3. odpiranje, za namen objave in predstavitve na spletni strani sklada

1. Polni naslov projekta: **Protimikrobna sredstva na osnovi aktivnega kisika**

- V katero področje na prvi klasifikacijski ravni KLASIUS-P-16 se uvršča projekt glede na vsebinsko zasnovu:

09 - Zdravstvo in socialna varnost

2. V sodelovanju z:

UL, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo;
UL, Biotehniška fakulteta;
Belinka Perkemija, d.o.o.

3. Besedilo:

- Opredelite problem, ki se je razreševal tekom izvajanja projekta

Protimikrobna odpornost ogroža učinkovito preprečevanje in zdravljenje vedno večjega števila okužb povzročenih z bakterijami, paraziti, virusi in glivami (izjava WHO). Projekt naslavlja ta problem z razvojem novih formulacij vodikovega peroksida za sproščanje protimikrobne učinkovine, ki upošteva vpliv na okolje in odpravlja nevarnosti dolgoročne odpornosti (rezistence) mikroorganizmov zaradi njihove dolgotrajne uporabe. V primerjavi z drugimi protimikrobnimi sredstvi predstavljajo sodobne formulacije vodikovega peroksida eno najprimernejših biocidnih sredstev, saj učinkovito uniči mikroorganizme, ne da bi povzročal njihovo dolgoročno rezistenco. Cilj projekta je bil razvoj novih formulacij vodikovega peroksida, ki bi omogočale njegovo uporabo na področju medicine, zdravstva, veterine, prehranske verige in farmacije.

- Opišite potek reševanja problema oz. kratek povzetek projekta

Najprej smo temeljito pregledali strokovno literaturo in patente, ki so povezani s projektom. Na osnovi že znanih izsledkov iz literature smo naredili načrt priprave novih formulacij vodikovega peroksida, izbora in razvoja novih stabilizatorjev, izbor testnih mikroorganizmov in analitske metode.

V razvojnem oddelku podjetja Belinka Perkemija smo pripravili izhodne raztopine vodikovega peroksida različnih koncentracij v vodi in različnih alkoholih kot topilih, ob dodatku različnih fosfatov in organskih polikarboksilnih kislin ter njihovih analogov kot stabilizatorjev. Pri tem smo se osredotočili predvsem na uporabo ekološko in zdravju prijaznih bio-osnovanih komponent. Nove formulacije temeljijo na sinergiji kombinacij uporabe vode, alkoholov, vodikovega peroksida in dodatkov (stabilizatorjev), ki omogočajo stabilnost vodikovega peroksida in uporabo v različnih, zahtevnih pogojih dezinfekcije.

Obsežna laboratorijska testiranja na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo smo izvedli z 0,5, 1, 2, 3, 4 in 5% vodimi raztopinami vodikovega peroksida z različnimi deleži kombinacij komercialnih stabilizatorjev ATMP in HEDP, ter testirali stabilnost vodikovega peroksida v pripravljenih vzorcih. Vse vzorce smo testirali s t.i. stresnim testom stabilnosti na kopeli 16 ur pri 96 °C. Titrirali smo

referenčne in slepe raztopine za določitev natančne koncentracije vodikovega peroksida ter preverili in izključili različne možnosti izvora napak pri delu. Dodatno smo standardizirali tudi titrant, natrijev tiosulfat in kalijev permanganat.

V nadaljevanju smo testirali stabilnost vzorcev ob dodatku različnih kombinacij stabilizatorjev, kot so: dipikolinijeva, citronska, vinska, askorbinska, glutarna, tartarna, ftalna, maleinska, malonska, nirilotriocetna in fitična kislina, ter natrijev fitat, ureo in toureo. Ob uporabi različnih kombinacij citronske in dipikolinijeve kisline, ter ATMP in HEDP, smo v nekaterih primerih ugotovili sinergijske učinke med njimi.

Testirali smo tudi stabilnost nevodnih (alkoholnih) raztopin vodikovega peroksida in učinkovitosti stabilizatorjev v nevodnem mediju. Pri nizkih koncentracijah vodikovega peroksida (1%) se relativna napaka pri delu močno poveča, zato smo zaradi zmanjšanja vpliva napak na rezultate meritev testirali samo 3% raztopine vodikovega peroksida v različnih alkoholnih raztopinah (metanol, etanol, 2-propanol, etandiol in glicerol) in njihovih kombinacij. Vse koncentracije so izračunane iz povprečja titracij v treh paralelah, rezultati pa podani kot razpad vodikovega peroksida glede na začetno koncentracijo pripravljene raztopine v določenem topilu. Stabilna raztopina vodikovega peroksida se smatra v primeru, da se njegova koncentracija na stresnem testu zniža za manj kot 5%.

Drugi del raziskav je potekal na Biotehniški fakulteti in je v prvi fazi zajemal pregled mikrobiološke testne metodologije, predvsem metod in načinov testiranja, analizo prednosti in slabosti posameznih vrst testiranja, primerjavo razlik med testiranjem v tekočih in na trdnih gojiščih, ter ožji izbor najprimernejših metod.

Nato smo pripravili in avtoklavirali/sterilizirali gojišča in vso uprabljeno steklovino za izvajanje testa protimikrobne učinkovitosti vodikovega peroksida. V sterilne petrijeve plošče smo nalili pripravljene trdni gojišči HA in MEA, ter plošče pustili, da se ohladijo in strdijo. Tekoča gojišča, fiziološko raztopino in pripravljeno steklovino smo do začetka izvajanja poskusov hranili v hladni sobi. Bakterije in kulturo kvasovke smo pripravili v željeni koncentraciji, naredili redčitveno vrsto za pozitivno kontrolo in vsako redčitev nacepili na trdna gojišča v treh paralelkah. Na pripravljenih testnih kulturah smo testirali protimikrobno učinkovitost 1 in 3% raztopine vodikovega peroksida tako, da smo inokulirali kvasno kulturo, nato pa odvezemali vzorce v različnih časovnih intervalih. Za vsak vzorec smo pripravili redčitveno vrsto in vsako redčitev nacepili na trdno gojišče v treh ponovitvah. Na koncu smo prešteli kolonije na ploščah redčitvenih vrst posameznih vzorcev testnih raztopin, ki so se inkubirale v topli sobi, in izračunali koncentracije celic v vzorcu ter jih primerjali s koncentracijo pri pozitivni kontroli. Bakterijsko kulturo iz trdnega gojišča smo v nadaljevanju nacepili tudi v tekoče gojišče in inkubirali na stresalniku v topli sobi ter kasneje analizirali.

V zaključku projekta smo zbirali in analizirali rezultate študentov FKKT (stabilizacija raztopin vodikovega peroksida), BF (protimikrobno delovanje raztopin vodikovega peroksida) in aktivnosti delovnega mentorja v podjetju Belinka Perkemija.

- Navedite in opišite rezultate projekta ter njihov doprinos k družbeni koristnosti

Razvili smo nove stabilne formulacije vodikovega peroksida brez prisotnih komercialnih stabilizatorjev na osnovi fosforjevih spojin. Namesto njih smo uporabili okolju in zdravju bolj prijazne organske karboksilne kisline. Kot učinkoviti stabilizatorji so izkazale predvsem dipikolinijeva, citronska, vinska, askorbinska in maleinska kislina, ki so okoljsko in tudi prehrabeno sprejemljive. Ob uporabi različnih kombinacij citronske in dipikolinijeve kisline smo opazili tudi sinergijske učinke med njimi. Z enakimi organskimi kisljinami kot stabilizatorji smo razvili tudi stabilne 3% raztopine vodikovega peroksida v nekaterih alkoholnih raztopinah (etanol, 2-propanol) in njihovih kombinacijah.

Razvite formulacije vodikovega peroksida smo testirali na bakterijo *Escherichia coli* in kvasovko *Candida parapsilosis*. Pri bakteriji *Escherichia coli* smo skoraj pri vseh vzorcih dobili zelo visoke odstotke redukcije. V primeru 3 % raztopine vodikovega peroksida, so bile redukcije višje, saj smo

že pri $t=0$ min dobili 97,36 % redukcijo. Pri $t=5$ min in $t=15$ min pa smo z višjo koncentracijo vodikovega peroksida dosegli kar 100 % redukcijo. Pri obeh koncentracijah je razvidno hitro delovanje (reaktivnost) vodikovega peroksida, saj je že v prvih 5 minutah prišlo do več kot 99 % redukcije.

Pri testu s kvasovko *Candida parapsilosis* smo v primerjavi z bakterijo dosegli nižje odstotke redukcije. Pri časih $t=5$ min pri 3 % raztopini vodikovega peroksida smo presenetljivo dosegli nižjo redukcijo kot pri 1 % raztopini. Kvasovke rodu *Candida* so v primerjavi z bakterijo *E. coli* (modelni organizem za bakterije) ali kvasovko *Saccharomyces cerevisiae* (modelni organizem za kvasovke) znane po višji toleranci na oksidativni stres. Na ploščah pozitivne kontrole smo opazili brezhibno rast, iz česar lahko z gotovostjo trdimo, da je redukcija posledica delovanja vodikovega peroksida.

Na osnovi opravljene študije lahko zaključimo, da imajo razvite formulacije 1-3 % vodikovega peroksida v vodnih in alkoholnih raztopinah dober protimikrobni učinek in s tem velik potencial za razkuževanje v medicini, zdravstvu, veterini in farmaciji, kot tudi za dezinfekcijo v prehranski industriji.

4. Priloge:

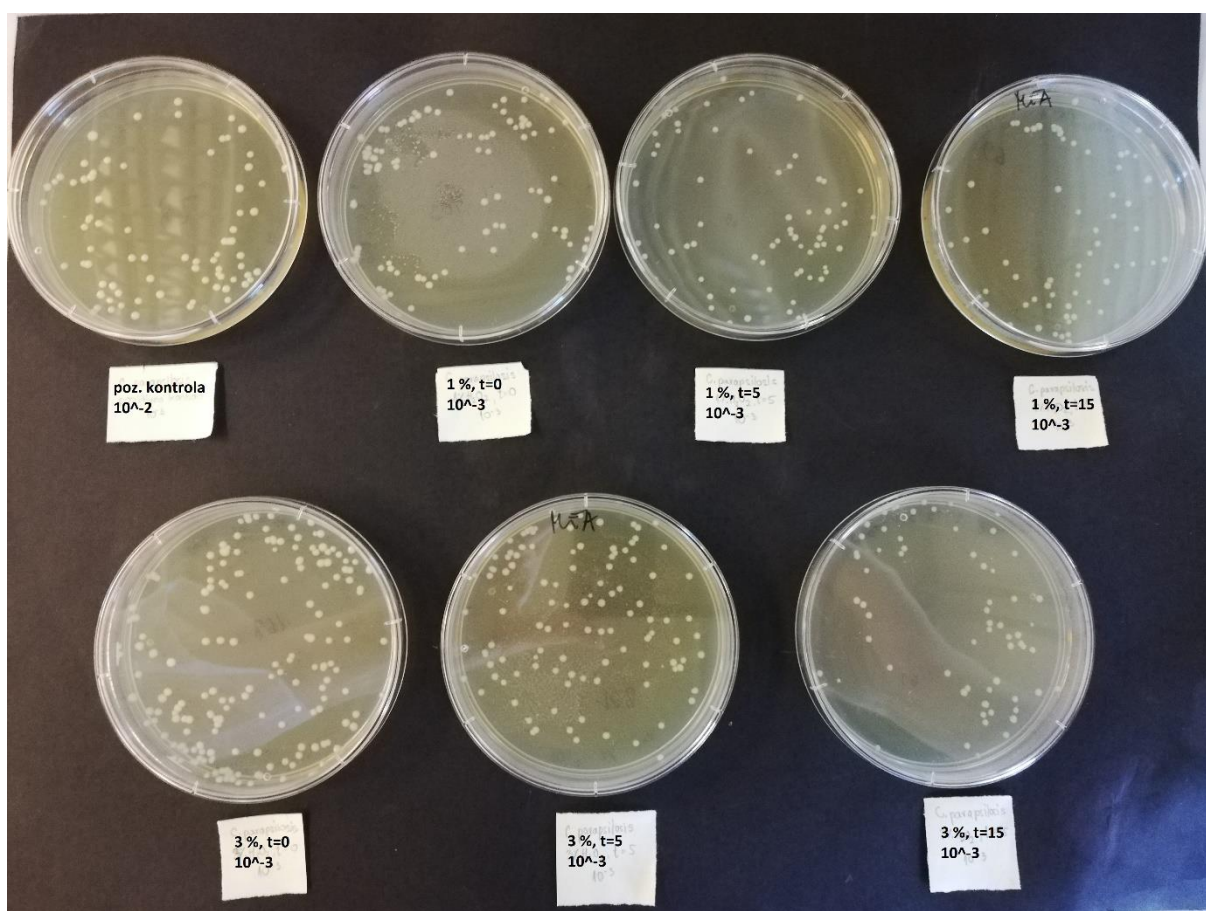
- Slikovno gradivo: Priložite vsaj dve sliki npr. sliko končnega produkta, sliko študentov pri delu na projektu, sliko s sestankov ipd. Pri pošiljanju slik bodite pozorni, v kolikor gre za končni produkt, da bo zadoščeno zahtevam glede informiranja in obveščanja (ustrezni logotipi itd.).



Slika študentov s pedagoškim mentorjem na uvodnem sestanku.



Priprava trdnih gojišč mikroorganizmov - razlivanje plošč.



Rast kolonij kvasovke *Candida parapsilosis* na ploščah MEA. Pod vsako ploščo je naveden odstotek raztopine vodikovega peroksida, čas odvzema vzorca in redčitev.