

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **234373**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **409210**

(22) Data zgłoszenia: **19.08.2014**

(51) Int.Cl.

C12N 11/00 (2006.01)

C12N 11/08 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 21/65 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

(54) **Platforma do badań substancji chemicznych oraz mikroorganizmów techniką wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii Ramana i sposób jej otrzymywania**

(30) Pierwszeństwo:

22.01.2014, PL, P-406900

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

03.08.2015 BUP 16/15

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

28.02.2020 WUP 02/20

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT CHEMII FIZYCZNEJ POLSKIEJ
AKADEMII NAUK, Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**EVELIN WITKOWSKA, Warszawa, PL
TOMASZ SZYMBORSKI, Dębina, PL
JACEK WALUK, Warszawa, PL
AGNIESZKA MICHOTA-KAMIŃSKA,
Sulejówek, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Krystian Żygadło

PL 234373 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest platforma do badań substancji chemicznych oraz mikroorganizmów techniką wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii Ramana i sposób jej otrzymywania. Bardziej szczegółowo, wynalazek ujawnia nową powierzchnię do analizy wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii Ramana (ang. Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS) bazującą na warstwie nanowłókien polimerowych wykonanej techniką przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej (Forcespinning™), o wysoce rozbudowanej powierzchni, pokrytej złotem. Obecne zgłoszenie patentowe ma na celu rozbudowanie już istniejącego zgłoszenia o dodatkowy sposób otrzymywania nanowłókien polimerowych.

Nanowłóknami nazywamy włókna, których średnica nie przekracza 100 nm. Oznacza to, że ich grubość jest w przybliżeniu 80 000 razy mniejsza od średnicy ludzkiego włosa. Cechują się one m.in. znaczną wytrzymałością, dużą powierzchnią w stosunku do objętości, a także dużą elastycznością i sprężystością. Znajdują one szereg zastosowań w elektronice molekularnej, optyce nieliniowej, w medycynie, w nano-biotechnologii, sensorach chemicznych, a także w wielu innych dziedzinach nauki i techniki (McEachin Z., Lozano K., Production and characterisation of polycaprolactone nanofibers via forcespinning™ Technology, *Journal of Applied Polymer Science*, 126: 473–479, 2012).

Znanych jest kilka sposobów wytwarzania włókien o grubości rzędu nanometrów. Jednym z nich jest elektroprzędzenie (ang. electrospinning). Jest to proces otrzymywania włókien ze stopionych polimerów (np. poliamidów, polistyrenu, polilaktydu, polikaprolaktanu, dekstranu, pochodnych celulozy, albuminy, kolagenu czy chitozanu) lub ich roztworów z zastosowaniem wysokiego napięcia. Metoda polega na prowadzeniu strumienia roztworu polimeru przez silne pole elektryczne, rzędu 10–20 kV (Shanmuganathan K., Sankhagowit R. K., Iyer P., Ellisno C. J., Thiol-ene chemistry: a greener approach to making chemically and thermally stable fibers, *Chemistry of Materials*, 23: 4726–4732, 2011). Po raz pierwszy proces elektroprzędzenia został przedstawiony w 1902 roku, niezależnie przez dwóch naukowców (Morton W. J., *Methods of dispersing fluids.*, US 705,691; Cooley W. J., *Apparatus for electrically dispersing fluids*, US 692,631). Niestety, ze względu na ograniczenia technologiczne trudnym zadaniem było przedstawienie potencjalnych zalet otrzymywanych tym sposobem włókien. Dopiero w 1995 roku (Doshi J., Reneker D. H., *Electrospinning process and application of electrospun fibers*, *Journal of Electrostatics*, 35: 151-160, 1995) proces elektroprzędzenia został spopularyzowany i możliwe stało się ukazanie jego ewentualnych zastosowań. Obecnie nanowłókna mogą być stosowane w inżynierii tkankowej do otrzymywania sztucznej skóry, do kontrolowanego podawania leków, w produkcji implantów kostnych czy biodegradowalnych bandaży wewnętrznych. Nanocząstki oraz nanowłókna otrzymywane opisywaną techniką mogą być ponadto stosowane w terapii genowej (http://www.biomedlab-ichip.pw.edu.pl/content/view/13/8/lang_polish/) do transferu DNA do odpowiednich komórek. Mogą być one także wykorzystywane jako membrany przy wytwarzaniu ogniw paliwowych.

Powstające metodą elektroprzędzenia włókna mają średnicę od kilku nanometrów do jednego milimetra. Praktycznie wszystkie polimery mogą być otrzymane w postaci włókien metodą elektroprzędzenia. Po rozpyleniu elektrostatycznym mogą one przybierać postać włókien lub kulistych cząstek. To, jaką postać przybiorą, zależy od ich masy cząsteczkowej, rodzaju zastosowanego rozpuszczalnika, oddziaływań pomiędzy łańcuchami polimeru, zastosowanego napięcia i geometrii układu i wielu innych czynników (Ciach T., *Application of Electro Hydro Dynamie Atomization in Drug Delivery*, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, Editions de Sante, 17: 367–375, 2007).

Technika elektroprzędzenia jest opisywana w ponad połowie artykułów traktujących o sposobach otrzymywania nanowłókien z różnego rodzaju polimerów (Polymer nanofibers, an overview of applications and current research into processing technique, <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1280>) i mimo opracowania kilku technik konkurencyjnych (technika szablonowa, rozdzielanie fazowe, przędzenie na mokro, na sucho i ze stopu), wydaje się, że elektroprzędzenie jest obecnie jedynym sposobem, który może być wykorzystany przy produkcji nanowłókien na skalę przemysłową.

Mimo wielu zalet jakie metoda to posiada, ma ona również swoje wady (sterowanie procesem poprzez dużą ilość parametrów, wykorzystanie rozpuszczalników organicznych, ograniczenie do pewnej grupy materiałów). Obecnie zmierza się do opracowania techniki pozwalającej na wyeliminowanie tych wad, czyli do rozszerzenia spektrum wykorzystywanych w owym procesie materiałów, poprawy wydajności procesu, a także do uzyskania niższych kosztów produkcji poprzez zastosowanie przyjaznego dla środowiska procesu.

Odpowiedzią na postawione wyżej problemy jest technika zwana Forcespinning™, tj. technika przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej, opracowana przez amerykańską firmę FibeRio Technology Corporation (<http://fiberiotech.com>). Jest to metoda analogiczna do elektroprzędzenia, z tym, że silne pole elektryczne zostało zastąpione w tym przypadku przez siłę odśrodkową. Wyeliminowanie konieczności przyłożenia silnego pola elektrycznego sprawia, że możliwe staje się zwiększenie wyboru stosowanych w niniejszej technice materiałów, dzięki czemu do nanowłókien mogą być przekształcane zarówno roztwory nieprzewodzące jak i przewodzące. Ponadto, w przypadku techniki przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej nanowłókna można również uzyskiwać z polimerów stałych, które to polimery uprzednio poddano stopieniu. Co istotne, nie ma potrzeby odzyskiwania rozpuszczalników, gdyż w tym przypadku nie angażujemy ich w opisany proces (Sarkar K., Gomez C., Zambrano S., Ramirez M., de Hoyos E., Vasquez H., Lozano K., Electrospinning to Forcespinning™, *Materials Today*, 13:12–14, 2010).

Kolejną zaletą metody przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej w porównaniu z techniką elektroprzędzenia jest wydajność procesu. W przypadku techniki przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej jesteśmy w stanie uzyskać ~1 gram nanowłókien w przeciągu jednej minuty, podczas gdy elektroprzędzenie umożliwia otrzymanie 0,1 grama nanowłókien w ciągu godziny (Padron S., Fuentes A., Caruntu D., Lozano K., Experimental study of nanofiber production through forcespinning, *Journal of Applied Physics*, 113, 024–318, 2013).

Ilość artykułów dotyczących metody techniki przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej jest niewielka. Wśród kilkunastu publikacji część to prace przeglądowe opisujące samą technikę (Sarkar K., Gomez C., Zambrano S., Ramirez M., de Hoyos E., Vasquez H., Lozano K., Electrospinning to Forcespinning™, *Materials Today*, 13: 12–14, 2010; Recent advances in nanofibre fabrication techniques Nayak R., Padhye R., Kyratzis I. L., Truong Y. B., Arnold L., *Textile Research Journal*, 82: 129–147, 2011), a część traktuje o sposobie uzyskiwania nanowłókien z konkretnych polimerów przy wykorzystaniu tej techniki (Vasquez B., Vasquez H., Lozano K., Preparation and characterization of polyvinylidene fluoride nanofibrous membranes by forcespinning™, *Polymer Engineering & Science*, 52: 2260–2265, 2012; Padron S., Patlan R., Gutierrez J., Santos N., Eubanks T., Lozano K., Production and Characterization of Hybrid BEH-PPV/PEO Conjugated Polymer Nanofibers by Forcespinning, *Journal of Applied Polymer Science*, 125: 3610–3616, 2012).

Mimo mnogości zastosowań nanowłókien uzyskiwanych metodami electrospinning oraz Forcespinning™, żaden z artykułów nie opisuje możliwości ich wykorzystania jako podłoży intensyfikujących sygnał Ramana w metodzie wzmocnionej powierzchniowo spektroskopii Ramana (ang., surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS).

Zjawisko Ramana polega na nieelastycznym rozproszeniu fotonów przez cząsteczki badanej substancji chemicznej. Związane jest to z faktem, iż promieniowanie rozproszone przez molekuly badanej substancji chemicznej składa się nie tylko z fotonów o częstotliwości światła padającego, ale także z fotonów o częstotliwości niższej lub wyższej od niego. Po raz pierwszy owe zjawisko zostało zaobserwowane w 1928 roku przez Chandrasekhara Venkata Raman'a. Od tego czasu ten rodzaj spektroskopii, nazwanej po odkrywcy spektroskopią Ramana, stał się szybko rozwijającą się dziedziną nauki, jako że pozwalał na otrzymanie charakterystycznego dla danego związku układu pasm wibracyjnych w widmie spektroskopowym, co z kolei dawało możliwość detekcji i identyfikacji różnych związków chemicznych. Przełom w spektroskopii ramanowskiej nadszedł w 1974 roku, gdy odkryto, że intensywność słabych pasm ramanowskich może wzrosnąć nawet o sześć rzędów wielkości, jeśli jako powierzchnię bezpośrednio stykającą się z próbką zastosuje się schropowaoną elektrochemicznie elektrodę srebrną (M. Fleischmann, P. J. Hendra, A. J. McQuillan, *Chemical Physics Letters* (1974) 26, 163). Nowa technika badawcza została nazwana wzmocnioną powierzchniowo spektroskopią Ramana (SERS).

Na wzmocnienie sygnału SERS składa się wiele czynników, w tym rodzaj badanego związku chemicznego, częstość promieniowania wzbudzającego czy efektywny ramanowski przekrój czynny. Co więcej, powierzchnia użyta w badaniu musi być zbudowana z odpowiedniego metalu, najlepiej złota, miedzi lub srebra, ponieważ w spektroskopii Ramana najczęściej wykorzystywane jest światło widzialne z zakresu bliskiej podczerwieni, zaś rezonansowe częstotliwości plazmowe srebra, złota i miedzi leżą w zakresie długości fal światła widzialnego i bliskiej podczerwieni. Skutkuje to maksymalnym wzmocnieniem dla tego typu promieniowania elektromagnetycznego i w efekcie otrzymaniem pasm o znacznej intensywności. Rodzaj metalu wykorzystany do pomiaru nie jest jedynym warunkiem, jaki musi być spełniony w celu otrzymania platformy SERS. Użyty do eksperymentu metal musi ponadto posiadać na swej

powierzchni nanonierówności/nanoschropowacenia lub powinien występować pod postacią nanocząstek. W celu otrzymania takich powierzchni najczęściej stosuje się m.in.: procesy trawienia chemicznego, cykle utleniania i redukcji w roztworze elektrolitu, ablację laserową i koloidy metali. Przy wykorzystaniu tych metod rozwinięto różne techniki produkcji platform do badań SERS, w tym: litografię nanosferyczną (ang. Nanosphere lithography, NSL) (X. Zhang, C. R. Yonzon, M. A. Young, D. A. Stuart, R. P. Van Duyne, IEE Proceedings Nanobiotechnology (2005) 152, 195); elektronolitografię (ang. electron beam lithography, EBL) (M. Kahl, E. Voges, S. Kostrewa, C. Viets, W. Hill, Sensors and Actuators B (1998) 51, 285), metodę szablonową (ang. the template method) (C. M. Ruan, B. Gu, G. Eres, W. Wang, Z. Zhang, Langmuir (2007) 23, 5757) czy metodę hybrydową (ang., the hybrid method) (S. Chattopadhyay, C. H. Lo, C. H. Hsu, L. C. Chen, K. H. Chen, Chemistry of Materials (2005) 17, 553).

Należy ponadto wspomnieć o fakcie, że podłoże SERS może być także wykonane z zupełnie innego materiału niż złoto, srebro lub miedź, o ile na jego powierzchni znajdzie się cienka warstwa wyżej wymienionych metali. Grubość tej warstwy jest zazwyczaj rzędu kilkudziesięciu nanometrów.

Mimo obecności na rynku wielu rodzajów podłoża SERS, większość z nich nie może być wykorzystania przy badaniu mikroorganizmów takich jak bakterie. Problem ten częściowo zanika w przypadku, gdy chcemy uzyskać widmo SERS z próbki o wysokim stężeniu komórek bakteryjnych, ale jest nie do uniknięcia wówczas, gdy pragniemy otrzymać widmo z próbek pochodzących od pacjentów. W takiej sytuacji CFU/ml (CFU – colony forming unit) jest często bardzo niskie, zwłaszcza w początkowych stadiach choroby i prawdopodobieństwo związania się komórki bakteryjnej z podłożem SERS jest znikome, a skanowanie podłoża w celu odnalezienia tej komórki bardzo czasochłonne. Kolejnym utrudnieniem związanym z techniką SERS jest powtarzalność widm uzyskanych tą metodą. Widma SERS pochodzące z jednego podłoża powinny mieć tę samą intensywność i poziom szumu w obrębie odpowiadających sobie pasm. To samo tyczy się widm SERS tej samej substancji/tego samego gatunku bakterii, które badane były na różnych podłożach – jeśli ich charakter jest bardzo podobny to powtarzalność widma jest wysoka.

Detekcja i identyfikacja bakterii była przedmiotem wielu zgłoszeń patentowych. Patent US 7,267,948 B2 „SERS diagnostics platforms, methods and systems microarrays, biosensors and biochips” opisuje różne rodzaje podłoża bazujących na nanocząstkach, nanosferach i schropowanych powierzchniach pokrytych odpowiednim metalem. Powierzchnie te otrzymywane są na wiele sposobów i są funkcjonalizowane różnego rodzaju receptorami w zależności od tego jaka substancja ma być związana z podłożem, np. DNA, enzym czy bakteria. Z tego jednak powodu nie są one uniwersalne.

W patencie CN 102115778 A „Method for identifying foodborne pathogenic bacteria by surface enhanced raman spectrometry” przedstawiona została metoda identyfikacji *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* czy *Listerella monocytogene*. Pomimo uzyskania zadowalających wyników, brakuje informacji odnośnie powtarzalności metody. Wadą wynalazku jest fakt, że badania wykonywane są z roztworu, co wymaga znacznego stężenia zarówno nanocząstek i bakterii, aby sygnał był wykrywalny.

Podobnie przedstawia się sytuacja w przypadku patentu US 20080268493 A1 „Identification method based on surface-enhanced Raman scattering”, w którym autorzy mieszają roztwór zawierający bakterie z roztworem srebrnych lub złotych nanocząstek i tak otrzymaną próbkę podają badaniom spektroskopowym.

Patent US 2008/0096005 A1 „Nanostructured substrate for surface enhanced Raman scattering” ukazuje platformy SERS otrzymywane z tlenku glinu, dwutlenku krzemu lub dwutlenku tytanu pokryte nanocząstkami złota, srebra lub miedzi. Dla bakterii *Escherichia coli* zaadsorbowanych na jednej z przykładowych powierzchni uzyskano współczynnik wzmocnienia 2×10^4 . W patencie nie można jednak znaleźć informacji na temat powtarzalności uzyskiwanych widm.

Powyżej wymieniono zaledwie kilka patentów opisujących sposoby uzyskiwania podłoża SERS. W tych, które dotyczą identyfikacji i/lub detekcji bakterii przy pomocy techniki SERS, brakuje informacji o optymalnym nakładaniu bakterii na platformę SERS. Co więcej, żadna z opisanych technik, poza opisaną w patencie „Platforma i jej zastosowanie do detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, techniką powierzchniowo wzmoczonego efektu Ramana oraz sposób osadzania tych mikroorganizmów na wytworzonych platformach” (numer P-406900) nie umożliwia pozbycia się nadmiaru roztworu (sól fizjologiczna, osocze, krew, mocz itd.), w którym zawieszono bakterie. Przez to trudne staje się zwiększenie gęstości bakterii w tym miejscu platformy, w którym dokonywany jest pomiar sygnału SERS. Jest to istotny czynnik, gdyż uniemożliwia on uzyskanie sygnału z roztworu, w którym ilość komórek bakteryjnych jest bardzo niewielka, a przez to wydłuża czasu pomiaru).

Z tego powodu, głównym celem naszego projektu było stworzenie podłoża, które:

- 1) będą umożliwiały otrzymywanie wysokiego wzmocnienia sygnału Ramana,
- 2) pozwolą na pozbycie się roztworu, w którym zawieszono bakterie, a który to roztwór nie jest interesujący z punktu widzenia pomiarów SERS,
- 3) będą umożliwiały bezpośrednie osadzanie bakterii z cieczy, tak by gęstość bakterii na powierzchni podłoża była wysoka.

Wówczas podłoża uzyskane metodą według wynalazku mogłyby posłużyć jako tak zwane platformy do pomiarów powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana bakterii.

Obecny wynalazek ma na celu ukazanie platformy do pomiarów patogenów, a szczególnie bakterii, przy pomocy techniki SERS oraz sposobu otrzymywania tejże platformy. Patogeny te idealnie byłoby wykrywać z płynów takich jak krew, moczu i płyn mózgowo-rdzeniowy, dzięki czemu podłoża będące przedmiotem patentu mogłyby znaleźć zastosowanie w biologii, weterynarii i medycynie. CFU/ml w wymienionych wyżej płynach jest często niewielkie, zwłaszcza w początkowych stadiach zakażenia, a zatem należałoby opracować sposób osadzania bakterii na platformie SERS, równocześnie zwiększając koncentrację bakterii na określonym obszarze tej platformy. Poza tym podłoża umożliwiałyby uzyskanie wzmocnienia sygnału ramanowskiego, a ponadto pozwalałyby na odseparowanie bakterii od cieczy, w której się znajdują (czyli na zwiększenie koncentracji bakterii na powierzchni platformy).

Zgodnie z obecnym wynalazkiem, sposób osadzania mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, na podłożu polimerowym, charakteryzuje się tym, że obejmuje następujące kroki:

- a) najpierw przygotowuje się podłoża w postaci maty z włókien polimerowych wykonanych w technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej, którą pokrywa się warstwą metalu;
- b) tak przygotowaną matę układa się na porowatej strukturze i prowadzi się proces oddzielenia mikroorganizmów od cieczy, w której są one zawieszono, z uzyskaniem zatrzymania mikroorganizmów bezpośrednio na powierzchni maty polimerowej i odpływu cieczy przez pory w macie polimerowej za pomocą podłączonego źródła podciśnienia lub próżni, albo za pomocą nadciśnienia lub siły odśrodkowej, otrzymując matę polimerową pokrytą metalem z osadzonymi na jej powierzchni mikroorganizmami jako platformę SERS.

W sposobie według wynalazku korzystnie stosuje się matę składającą się z włókien polimerowych o rozmiarach od 5 nm do 100 μm , korzystnie między 50 nm a 50 μm , a najkorzystniej między 100 nm a 5 μm .

Jeszcze korzystniej w sposobie według wynalazku stosuje się matę wykonaną z polimerów, wybranych z grupy obejmującej: poliamid (np. nylon), polifluorek winylidenu (PVDF), poli-L-laktyd (PLLA), poli(alkohol winylowy) PVA, poli(winylo piroolidon) (PVP), poli(metakrylan metylu) (PMMA), poliwęglan (PC), polikaprolaktan, agarozę.

Korzystnie, matę pokrywa się warstwą metalu techniką fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD).

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, jako metal stosuje się złoto, srebro lub miedź, korzystnie złoto, albo stopy metali, korzystnie srebro ze złotem, albo stosuje się je w postaci warstwowej, korzystnie warstwa srebra, a na niej warstwa złota.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, stosuje się matę pokrytą warstwą złota, srebra albo miedzi o grubości pomiędzy 10 a 200 nm, korzystnie pomiędzy 30 nm a 150 nm, a najkorzystniej pomiędzy 80 a 100 nm, ewentualnie na warstwie miedzi stosuje się zredukowane złoto z wodnego roztworu HAuCl_4 lub innego roztworu zawierającego jony złota.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, w etapie b) jako ciecz stosuje się płyn lub roztwór, obejmujący korzystnie wodę, płyn ustrojowy, krew, osocze, płyn mózgowo-rdzeniowy i mocz, pochodzenia ludzkiego jak i zwierzęcego.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, w etapie b) stosuje się krok zwiększania gęstości mikroorganizmów poprzez dodawanie kolejnych kropli cieczy do zassania, korzystnie co najmniej dwukrotne, w tym samym obszarze maty polimerowej, w zależności od wymiarów mikroorganizmów.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, jako źródło podciśnienia stosuje się pompkę wodną lub pompkę próżniową.

Korzystnie, w sposobie według wynalazku, mikroorganizmy osadza się na pokrytej złotem macie polimerowej przy pomocy podciśnienia, w ten sposób, że matę umieszcza się na lejku Schotta lub lejku Büchnera, a ten z kolei na kolbie ssawkowej, do której podłączana jest próżnia, powodująca

przejście roztworu do kolby, podczas gdy bakterie lub inne mikroorganizmy zostają zatrzymane na macie polimerowej.

Obecny wynalazek ponadto obejmuje platformę do pomiarów detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii z wykorzystaniem techniki powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (SERS), która charakteryzuje się tym, że obejmuje matę polimerową pokrytą metalem z osadzonymi na jej powierzchni mikroorganizmami, wytworzoną sposobem według wynalazku.

Obecny wynalazek również obejmuje zastosowanie platformy SERS, według wynalazku, do bezpośrednich pomiarów detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, techniką powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (SERS).

Wynalazek ukazuje matę składającą się z włókien polimerowych o średnicy od kilkudziesięciu nanometrów do kilkudziesięciu mikrometrów. Mata ta może być wytwarzana przy pomocy techniki przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej. Metoda ta zapewnia otrzymanie podłoża, przez które przenikać mogą różnego rodzaju ciecze, z powodu występowania w macie niewielkich wolnych przestrzeni między dość ciasno upakowanymi włóknami polimerowymi. Ponadto sama metoda nie wymaga użycia rozpuszczalników organicznych, zatem wytworzone włókna są wolne od ewentualnych zanieczyszczeń.

Co istotne, mata polimerowa po pokryciu warstwą złota nabiera cech **platformy SERS**, tj. wzmacnia sygnał Ramana. Dlatego też mata uzyskana metodą według wynalazku może jednocześnie służyć jako filtr, na którym osadza się bakterie oraz platforma SERS – możliwe staje się odseparowanie bakterii od cieczy, w której bakterie te są zawieszone, a następnie natychmiastowe przeprowadzenie pomiaru SERS tych komórek. Dzięki temu rozwiązaniu nie jest konieczne przenoszenie bakterii z filtru na dedykowane podłoże SERS: proces taki byłby bardzo kłopotliwy, wydłużałby czas pomiędzy filtracją a pomiarem mógłby doprowadzić do kontaminacji próbki. Dodatkowo, dzięki temu, że kolejne krople nakładane są w tym samym miejscu maty polimerowej, możliwe jest zwiększanie gęstości bakterii w tym miejscu, co ma w dalszej kolejności wpływ na jakość sygnału ramanowskiego.

Aby umożliwić przejście roztworu przez matę polimerową i odseparować tym samym bakterie od cieczy (w naszym przypadku osocza), zastosowano podciśnienie. W tym celu matę polimerową wytworzoną w technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej położono na porowatej strukturze, w tym przypadku lejku Schotta, który zmontowano z kolbą ssawkową. Kolbę podłączono następnie do pompy próżniowej, choć możliwe jest przyłączenie jej do dowolnego innego źródła podciśnienia, np. pompki wodnej. Podciśnienie powoduje zassanie cieczy poprzez porowatą strukturę maty polimerowej oraz lejka. Bakterie jednak, ze względu na swoje rozmiary, pozostają na powierzchni maty. Zwiększanie koncentracji bakterii uzyskuje się poprzez wielokrotne umieszczanie kropli w tym samym obszarze maty polimerowej.

Wynalazek zostanie teraz bliżej przedstawiony w korzystnym przykładzie wykonania, z odniesieniem do załączonych rysunków, na których:

Fig. 1 przedstawia matę nylonową wykonaną przy pomocy technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej nasyconą złotem o grubości 90 nm w powiększeniu: x1 000 i x50 000 razy.

Fig. 2 przedstawia matę nylonową wykonaną przy pomocy technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej nasyconą złotem o grubości 90 nm w powiększeniu x457 razy. Widoczna jest struktura maty tj. grube włókna na spodzie pełniące funkcję podłoża oraz nanowłókna na ich powierzchni.

Fig. 3 przedstawia histogram rozkładu wielkości nanowłókien (na podstawie materiałów dostarczonych przez producenta maty, firmę FibeRio® Technology Corporation). Średnia średnica włókien z nylonu wykorzystywana w naszych badaniach to 261.6 nm.

Fig. 4 przedstawia sposób osadzania bakterii na macie polimerowej pokrytej złotem wykonaną przy pomocy technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej. Zestaw do osadzania bakterii składa się ze kolby ssawkowej, lejka Schotta oraz pompy próżniowej. Na lejku kładzie się niewielki, ok. 10 x 10 mm, kawałek maty polimerowej pokrytej złotem, a następnie osadza się tam kroplę roztworu zawierającego bakterie lub inne patogeny. Po włączeniu próżni ciecz przechodzi przez pory w macie polimerowej, podczas gdy bakterie zatrzymują się na jej powierzchni.

Fig. 5 przedstawia zestaw opisany na Fig. 4. Na lejku Schotta widać matę polimerową pokrytą złotem oraz krople krwi z bakteriami *S. aureus*.

Fig. 6 przedstawia zbliżenie układu z Fig. 4, widoczna mata polimerowa, na której umieszczono kroplę krwi z bakteriami *S. aureus*.

Fig. 7 przedstawia analizę EDX dla maty polimerowej wykonanej metodą przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej pokrytej 90 nm złota. Wyniki świadczą o dobrym pokryciu złotem, tj. EDX nie zarejestrował sygnału od podłoża z nylonu.

Fig. 8 przedstawia widmo SERS dla czystego osocza, oraz osocza z bakteriami *S. aureus*, które następnie przefiltrowano przez matę polimerową wykonaną przy pomocy technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej pokrytej 90 nm złota.

Korzystne przykłady realizacji wynalazku

Sposób przedstawiony w niniejszym zgłoszeniu polega na otrzymaniu platformy SERS w postaci maty polimerowej pokrytej złotem, która dzięki swojej strukturze pozwala na osadzenie na jej powierzchni patogenów z roztworów, szczególnie bakterii. Sposób ten polega na umieszczeniu maty polimerowej na lejku Schotta w taki sposób, aby podciśnienie lub próżnia spowodowały przepływ cieczy (m. in. wody, osocza, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego), a gęsto umieszczone włókna polimerowe zatrzymywały bakterie na powierzchni maty.

Maty polimerowe wykorzystane w pomiarach składają się z włókien polimerowych i mogą być wykonane m.in. z nylonu. Materiał do wytworzenia platform wycięto przy pomocy nożyczek z większego fragmentu maty polimerowej wykonanej metodą przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej. W każdym przypadku wycięto kwadraty ok. 10 x 10 mm, mimo że powierzchnia, na którą nanoszono krople roztworu z bakteriami była znacznie mniejsza (ok. 5 x 5 mm). Każdy z kwadratów pokryto złotem.

Do naniesienia warstw złota wykorzystano metodę PVD (ang. Physical Vapor Deposition – fizyczne osadzanie z fazy gazowej). Zastosowano urządzenie firmy Leica, model EM MED020 wraz z układem pomiaru grubości warstwy Leica EM QSG100. Urządzenie EM MED020 wykorzystuje zjawisko osadzania jonów w polu magnetycznym (ang. magnetron sputtering). Próbkę włożono do komory roboczej, po czym odpompowano powietrze do ciśnienia 10^{-5} mbar i wypełniono komorę argonem do ciśnienia 2×10^{-2} mbar. Prąd zastosowany do napyłania złota to 25 mA. Po napyleniu 90 nm złota komorę wypełniono azotem, wyjęto próbki i umieszczono w szczelnych pojemnikach. Maty po napyleniu przedstawione są na Fig. 1 oraz Fig. 2.

W celu namnożenia komórek bakteryjnych pewna ich ilość została zawieszona w 10 ml pożywkę LB (ang. lysogeny broth). Następnie kolba zawierająca pożywkę oraz bakterie została umieszczona w wytrząsarce (150 rpm) na 24 h w temperaturze 30°C. W dalszej kolejności pożywkę z bakteriami poddano wirowaniu w czasie 5 min przy prędkości 4000 rpm, zlano supernatant, a pelet zawieszono w 0,85% roztworze NaCl. Procedurę odwirowywania supernatantu powtórzono kilkakrotnie w warunkach jałowych w celu zapewnienia dużej czystości roztworu, w którym znajdują się bakterie. Tak otrzymana zawiesina służyła następnie do osadzania bakterii na macie polimerowej.

Proces osadzania bakterii na macie polimerowej pokrytej złotem przedstawia schematycznie Fig. 4, natomiast Fig. 5 przedstawia realizację praktyczną układu. Układ składa się z kolby ssawkowej podłączonej do dowolnego źródła podciśnienia lub próżni, w naszym przypadku była to pompa próżniowa membranowa firmy Büchi, typ V-700 ze sterownikiem V-855. Na kolbę nałożony został lejek Schotta. Na powierzchni spieku umieszczono matę polimerową o wymiarach ok. 10 x 10 mm. Na środek maty, na powierzchnię ok. 5 x 5 mm, przy pomocy mikropipety położono kroplę roztworu zawierającego roztwór bakterii (*S. aureus*), a następnie włączono podciśnienie powodujące przesączenie cieczy do kolby ssawkowej oraz zatrzymanie bakterii na macie polimerowej. Tak uzyskana próbka była od razu przenoszona pod mikroskop ramanowski w celu dokonania analizy SERS.

W celu przeprowadzenia pomiarów SERS wykorzystano spektrometr ramanowski Renishaw In Via Raman wyposażony w diodę laserową o mocy 300 mW o długości fali 785 nm. Analiza energii wiązki rozprószonej odbywa się w spektrometrze przy pomocy siatki dyfrakcyjnej, a intensywność dla poszczególnych energii rejestrowana jest w czułym detektorze CCD typ RenCam o rozdzielczości 1024x256 px. Powiększenie obiektu ogniskującego promień lasera na próbce wynosiło x50 (apertura 0.75). Prześwietlona zdolność rozdzielcza była lepsza niż 1 μm , spektralna zdolność rozdzielcza około 1 cm^{-1} . Typowe widmo było rejestrowane przez czas 4 sekund z mocą lasera wynoszącą 5 mW.

Maty polimerowe wykonane w technologii Forcespinning™ z włóknami o średnicy 261.6 ± 96 nm (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3) zostały wykorzystane do przeprowadzenia eksperymentów pokazanych na Fig. 4, Fig. 5 i Fig. 6.

Fig. 7 prezentuje wyniki pomiarów składu chemicznego powierzchni EDX, według których główny zarejestrowany sygnał pochodzi od złota. Oznacza to, że na wynik pomiaru nie miał wpływu skład chemiczny włókien.

Fig. 8 prezentuje zarejestrowane widma SERS, dla czystego osocza oraz dla osocza, w którym umieszczone były bakterie *S. aureus*. Po zastosowaniu procedury przedstawionej schematycznie na Fig. 4 oraz na Fig. 5 zarejestrowano widmo bakterii *S. aureus*. Potwierdza to, że metoda może służyć do detekcji i identyfikacji bakterii z płynów np. krwi czy osocza przy wykorzystaniu platformy SERS na bazie maty polimerowej wykonanej w technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej.

Podziękowanie

Opłaty związane z ochroną wynalazku sfinansowano ze środków projektu NanoTechnology, Bio-materials and Alternative Energy Source for ERA integration FP7-REGPOT-CT-2011-285949-NOBLESSE.

Praca naukowa (T. Szymborski) finansowana ze środków budżetowych na naukę w latach 2012–2013 (projekt luventus Plus IP2011 047871).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób osadzania mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, na podłożu polimerowym, **znamienny tym**, że obejmuje następujące kroki:
 - a) najpierw przygotowuje się podłoże w postaci maty z włókien polimerowych wykonanych w technologii przędzenia przy wykorzystaniu siły odśrodkowej, którą pokrywa się warstwą metalu;
 - b) tak przygotowaną matę układa się na porowatej strukturze i prowadzi się proces oddzielenia mikroorganizmów od cieczy, w której są one zawieszane, z uzyskaniem zatrzymania mikroorganizmów bezpośrednio na powierzchni maty polimerowej i odpływu cieczy przez pory w macie polimerowej za pomocą podłączonego źródła podciśnienia lub próżni, albo za pomocą nadciśnienia lub siły odśrodkowej, otrzymując matę polimerową pokrytą metalem z osadzonymi na jej powierzchni mikroorganizmami jako platformę SERS.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się matę składającą się z włókien polimerowych o rozmiarach od 5 nm do 100 μm , korzystnie między 50 nm a 50 μm , a najkorzystniej między 100 nm a 5 μm .
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że stosuje się matę wykonaną z polimerów, wybranych z grupy obejmującej: poliamid (np. nylon), polifluorek winylidenu (PVDF), poli-L-laktyd (PLLA), poli(alkohol winylowy) PVA, poli(winylo piroolidon) (PVP), poli(metakrylan metylu) (PMMA), poliwęglan (PC), polikaprolaktan, agarozę, i inne.
4. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–3, **znamienny tym**, że matę pokrywa się warstwą metalu techniką fizycznego osadzania z fazy gazowej (PVD).
5. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–4, **znamienny tym**, że jako metal stosuje się złoto, srebro lub miedź, korzystnie złoto, albo stopy metali, korzystnie srebro ze złotem, albo stosuje się je w postaci warstwowej, korzystnie warstwa srebra, a na niej warstwa złota.
6. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–5, **znamienny tym**, że stosuje się matę pokrytą warstwą złota, srebra albo miedzi o grubości pomiędzy 10 a 200 nm, korzystnie pomiędzy 30 nm a 150 nm, a najkorzystniej pomiędzy 80 a 100 nm, ewentualnie na warstwie miedzi stosuje się zredukowane złoto z wodnego roztworu HAuCl_4 lub innego roztworu zawierającego jony złota.
7. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–6, **znamienny tym**, że w etapie b) jako ciecz stosuje się płyn lub roztwór, obejmujący korzystnie wodę, płyn ustrojowy, krew, osocze, płyn mózgowo-rdzeniowy i mocz, pochodzenia ludzkiego jak i zwierzęcego.
8. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–7, **znamienny tym**, że w etapie b) stosuje się krok zwiększania gęstości mikroorganizmów poprzez dodawanie kolejnych kropli cieczy do zassania, korzystnie co najmniej dwukrotnie, w tym samym obszarze maty polimerowej, w zależności od wymiarów mikroorganizmów.
9. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–8, **znamienny tym**, że jako źródło podciśnienia stosuje się pompkę wodną lub pompkę próżniową.
10. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. 1–9, **znamienny tym**, że mikroorganizmy osadza się na pokrytej złotem macie polimerowej przy pomocy podciśnienia, w ten sposób, że matę umieszcza się na lejku Schotta lub lejku Büchnera, a ten z kolei na kolbie ssawkowej, do której

- podłączana jest próżnia, powodująca przejście roztworu do kolby, podczas gdy bakterie lub inne mikroorganizmy zostają zatrzymane na macie polimerowej.
11. Platforma do pomiarów detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii z wykorzystaniem techniki powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (SERS), **znamienna tym**, że obejmuje matę polimerową pokrytą metalem z osadzonymi na jej powierzchni mikroorganizmami, wytworzoną sposobem jak zdefiniowano w zastrz. 1.
 12. Zastosowanie platformy SERS, jak zdefiniowano w zastrz. 11, do bezpośrednich pomiarów detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, zwłaszcza bakterii, techniką powierzchniowo wzmocnionego efektu Ramana (SERS).

Rysunki

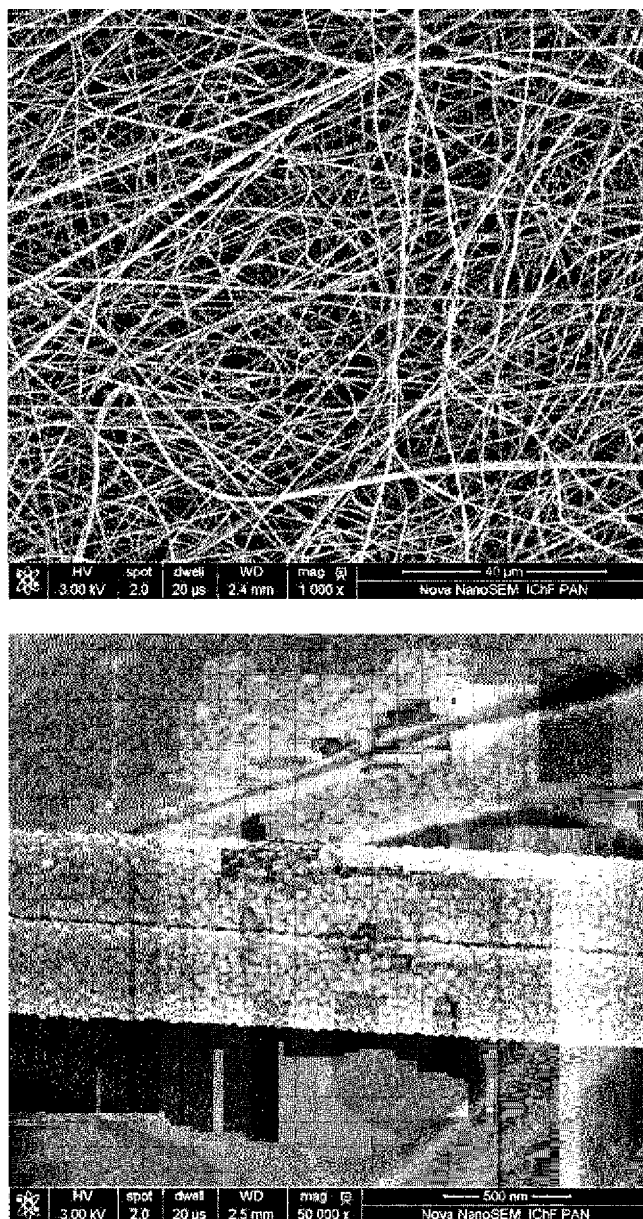


Fig. 1

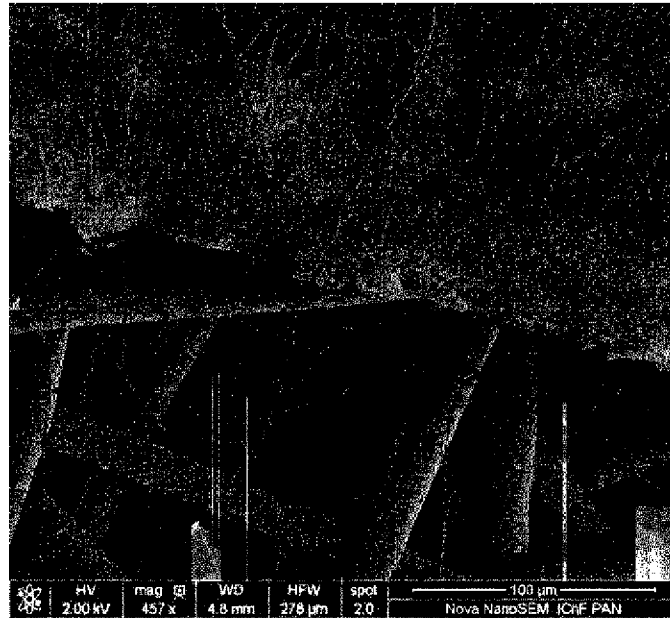


Fig. 2

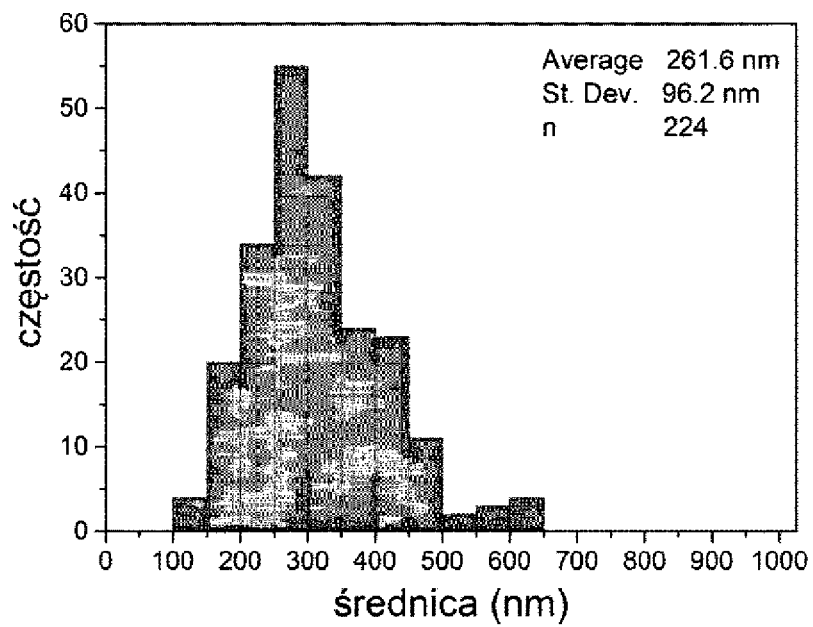


Fig. 3

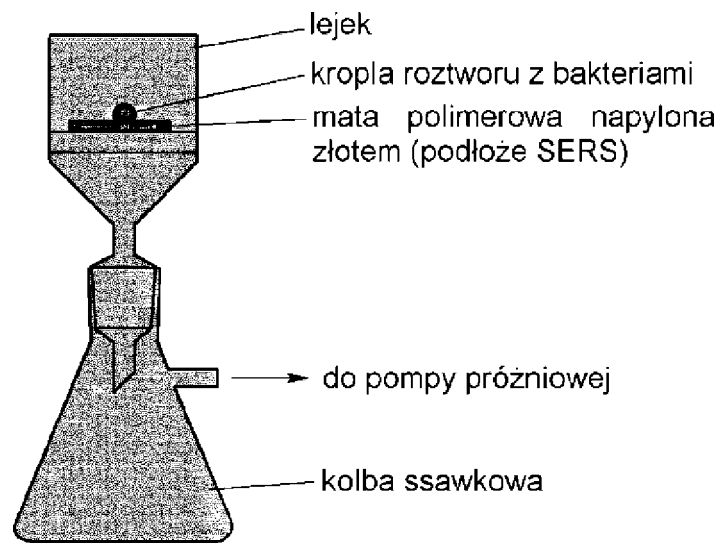


Fig. 4

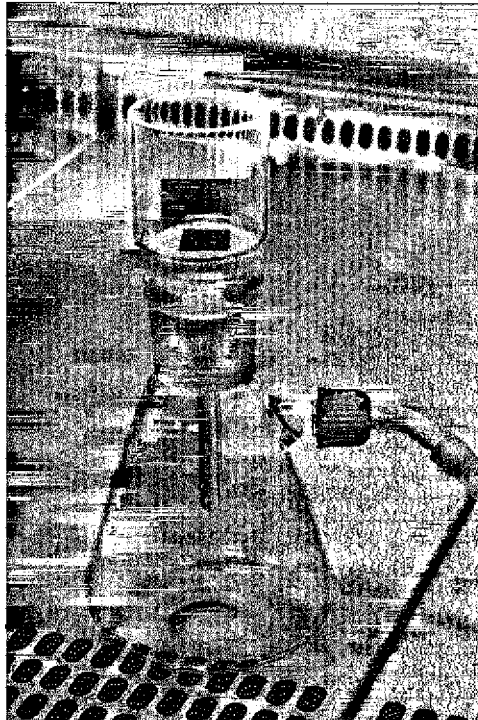


Fig. 5

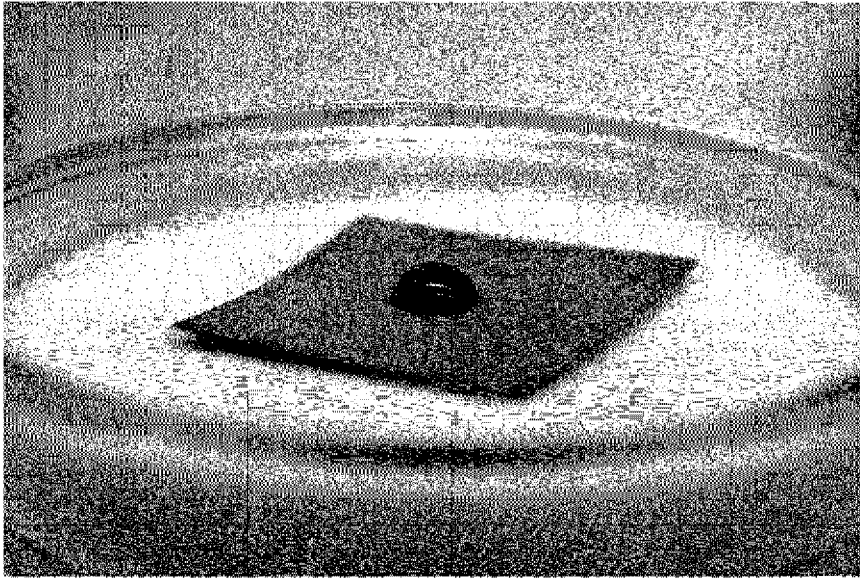
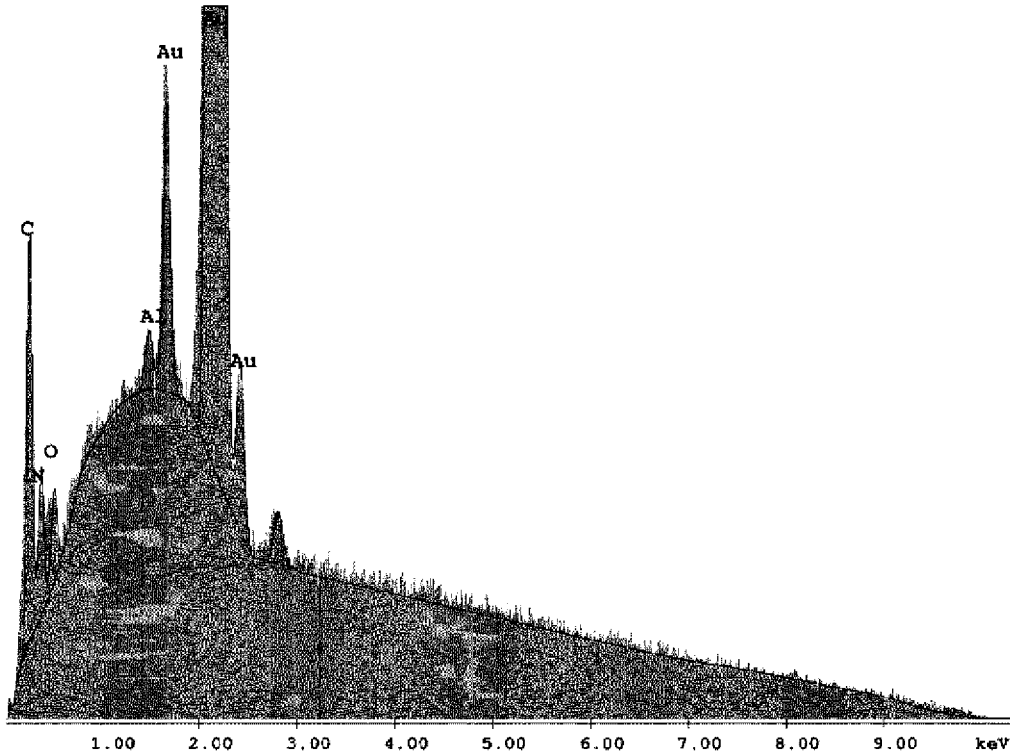


Fig. 6



EDAX ZAF Quantification (Standardless)
 Element Normalized
 SEC Table : Default

Element	Wt %	At %	K-Ratio	Z	A	F
C K	2.94	27.62	0.0113	1.5456	0.2490	1.0000
N K	1.62	13.03	0.0063	1.5241	0.2535	1.0000
O K	0.59	4.17	0.0026	1.5037	0.2969	1.0000
AlK	0.25	1.06	0.0027	1.4440	0.7487	1.0000
AuM	94.59	54.12	0.9114	0.9540	1.0100	1.0000
Total	100.00	100.00				

Element	Net Inte.	Bkgd Inte.	Inte. Error	P/B
C K	85.99	21.95	1.33	3.92
N K	32.35	29.22	2.95	1.11
O K	20.04	39.15	4.95	0.51
AlK	15.83	117.53	10.01	0.13
AuM	1673.45	90.82	0.26	18.43

Fig. 7

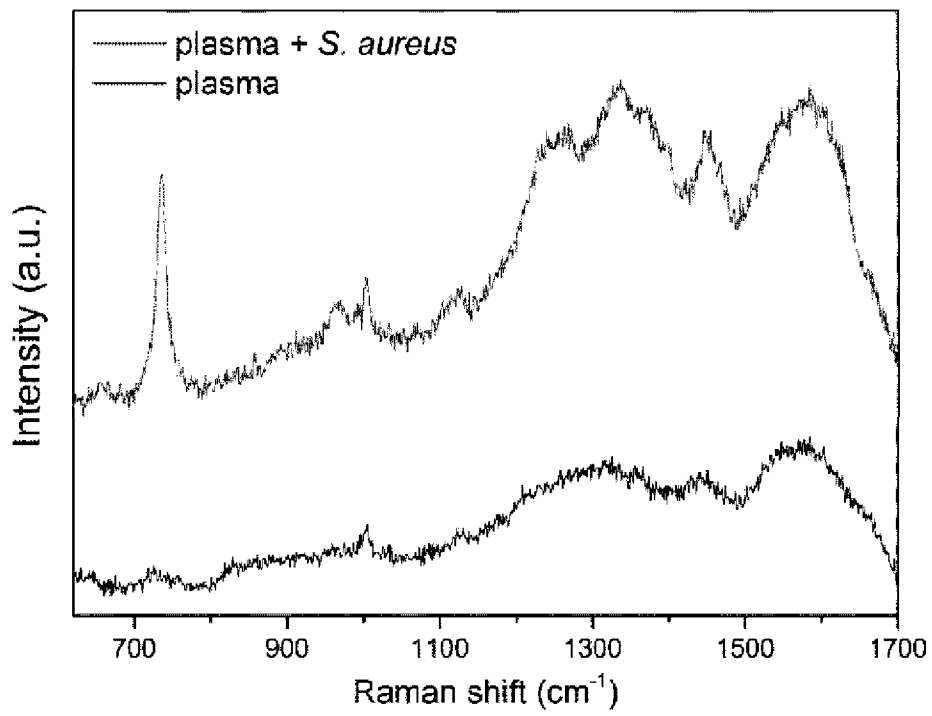


Fig. 8