

KEMIAN LAITOS
JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Grafeenipohjaisten materiaalien antibakteeriset sovellukset

Kandidaatintutkielma
18.05.2021
Tiitta Rouhiainen



JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO

Tiivistelmä

Tämä LuK-tutkielma käsittelee grafeenimateriaalien antibakteerisia ominaisuuksia. Tutkielmassa esitellään grafeenimateriaalien antibakteerisia mekanismeja, niihin vaikuttavia tekijöitä sekä vaikutuksia mallibakteereihin ja biofilmeihin. Työssä keskitytään grafeenimateriaalien mahdolliseen käyttöön antibiootteja korvaavana aineena. Tutkimusten perusteella grafeenimateriaaleja voidaan tulevaisuudessa mahdollisesti hyödyntää erilaisissa antibakteerisissa sovelluksissa niiden potentiaalisten bakteereita tappavien ominaisuuksien vuoksi.

Esipuhe

Kandidaatintutkielman kirjallisuuslähteiden etsiminen aloitettiin tammikuussa 2021 ja kirjoittaminen helmikuussa 2021. Tutkielma valmistui toukokuussa 2021. Kirjallisuuslähteitä etsittiin Google Scholar- ja ScienceDirect -tietokannoista. Tutkielman ohjaajana toimi professori Maija Nissinen.

Haluan kiittää ohjaajaani professori Maija Nissistä hyvästä ohjauksesta sekä kemiaan ja biologiaan liittyvästä mielenkiintoisesta aiheesta. Lisäksi haluan kiittää opiskelukavereitani vertaistuesta kirjoitusprosessin aikana.

SISÄLLYSLUETTELO

Tiivistelmä	iii
Esipuhe	iv
Käytetyt lyhenteet	vi
1 Johdanto	1
2 Grafeenipohjaiset materiaalit	2
2.1 Grafeeni	2
2.2 Grafeenioksidi	3
2.3 Pelkistetty grafeenioksidi	4
2.4 Grafeenipohjaiset nanokomposiitit	4
3 Grafeenimateriaalien antibakteeriset ominaisuudet	6
3.1 Antibakteerisuuden mekanismit.	6
3.2 Antibakteeriseen aktiivisuuteen vaikuttavat tekijät	9
3.3 Sytotoksisuus	11
4 Grafeeni ja antibiootit	14
4.1 Antibioottiresistenssi	14
4.2 Grafeeninanomateriaalit antibioottien korvaajana	14
4.2.1. E. coli	15
4.2.2. S. aureus	16
4.2.3. Biofilmit	17
5 Yhteenveto	19
Kirjallisuusluettelo	20

Käytetyt lyhenteet

G	Grafeeni
CNT	Hiilinanoputki
GO	Grafeenioksidi
rGO	Pelkistetty grafeenioksidi
AgNP	Hopeananopartikkeli
GBN	Grafeenipohjainen nanomateriaali
PLL	poly(L-lysiinini)
PVK	polyvinyyli-N-karbatsoli
OS	Oksidatiivinen stressi
TEM	Läpäisyelektronimikroskooppi
GSH	Glutationi
GSSG	Glutathionisulfidi
ROS	Reaktiivinen happiradikaali
NIR	Lähi-infrapunasäteily
AFM	Atomivoimamikroskopia
GPB	Gram-positiivinen bakteeri
GNB	Gram-negatiivinen bakteeri
GONW	GO-nanoseinä
RGNW	rGO-nanoseinä
GN-S	Sileäpohjainen grafeenikalvo
GN-R	Karkeapohjainen grafeenikalvo
<i>In vitro</i>	eliön tai solun ulkopuolella
MMP	Mitokondriaalinen kalvopotentiaali
LDH	Laktaattidehydrogenaasi
MDA	Malonialdehydi

NP

Nanopartikkeli

MRSA

Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus*

1 Johdanto

Grafeeni on vuonna 2004 löydetty hiilen allotrooppi. Se on yhden atomikerroksen paksuinen, kaksiulotteinen (2D) nanomateriaali, jota pidetään maailman vahvimpana aineena.¹ Grafeenin kuusikulmainen rakenne mahdollistaa sen erinomaiset fysikaaliset ja kemialliset ominaisuudet, kuten suuren mekaanisen lujuuden, poikkeuksellisen hyvän sähkön- ja lämmönjohtavuuden sekä suuren pinta-alan. Grafeenipohjaisilla materiaaleilla on useita johdannaisia, joilla on erilaisia ominaisuuksia ja toimintoja.² Viime vuosina grafeenitutkimuksessa on edistytty erityisesti elektroniikan, energianvarastointi- ja muunnoslaitteiden, biolääketieteellisen tutkimuksen, sensoreiden, komposiittien, vedenpuhdistuksen ja katalyyysin osa-alueilla.¹

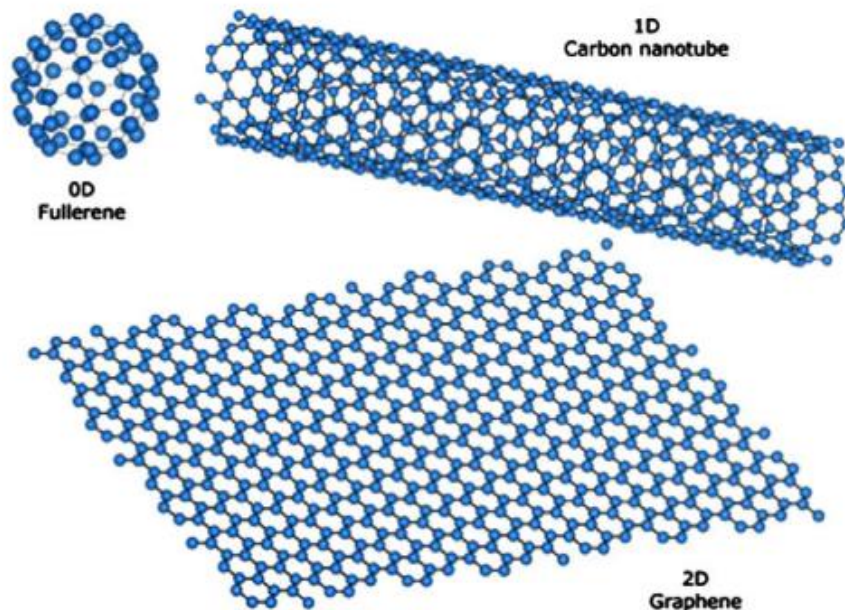
Patogeenisten mikro-organismien aiheuttamat infektiot ovat maailmanlaajuisesti suurimpia terveysuhkia. Bakteereita tappavien aineiden ja antibioottien liiallinen käyttö on johtanut siihen, että mikrobit ovat kehittyneet vastustuskykyisiksi tyypillisille antibakteerisille lääkeaineille. Tämä on tehnyt infektioiden torjunnasta entistä haastavampaa ja siksi antibiooteista riippumattomien ja lääkkeettömien antibakteeristen aineiden kehittäminen on välttämätöntä.² Tähän käyttöön on alettu tutkia grafeenipohjaisia materiaaleja niiden merkittävän bakteereita tappavan aktiivisuuden vuoksi. Grafeenin antibakteeriset mekanismit sisältävät sekä fysikaalisia että kemiallisia toiminnan muotoja. Grafeenipohjaisten materiaalien etuihin kuuluvat niiden helppo valmistaminen, uusiutuvuus, ainutlaatuiset katalyyttiset ominaisuudet sekä poikkeukselliset fysikaaliset ominaisuudet.³

2 Grafeenipohjaiset materiaalit

2.1 Grafeeni

Grafeeni (G) on sp^2 -hybridisoituneista hiiliatomeista koostuva, yhden atomikerroksen paksuinen, kaksiulotteinen (2D) nanorakenne.¹ Grafeeni on poikkeuksellisen lujaa ja sillä on suuri pinta-ala, nopea elektronien liikkuvuus, korkea lämmönjohtavuus sekä vahva Youngin moduuli. Jokaisella hilan hiiliatomilla on s -, p_x - ja p_y -atomiorbitaalit, jotka hybridisoituvat muodostaen kovalenttisia sp^2 -sidoksia. Tämä saa aikaan 120° siduskulmat ja kanaverkkomaiset kerrokset. Grafeeni on usean hiilen allotroopin, kuten grafiitin, puuhiilen, hiilinanoputkien (CNT) ja pallofullereenin, perusrakenneosa (kuva 1).⁴

Grafeeni on uusiutuvaa, halpaa ja paremmin saatavilla kuin muut nanomateriaalit, sillä sen valmistaminen on helppoa ja nopeaa. Grafeenipohjaisilla nanomateriaaleilla ei tarkoiteta vain käsittelemätöntä grafeenia (nk. pristine graphene) vaan myös kemiallisesti muokattua grafeenia, kuten grafeenioksidia (GO) tai pelkistettyä grafeenioksidia (rGO).⁴

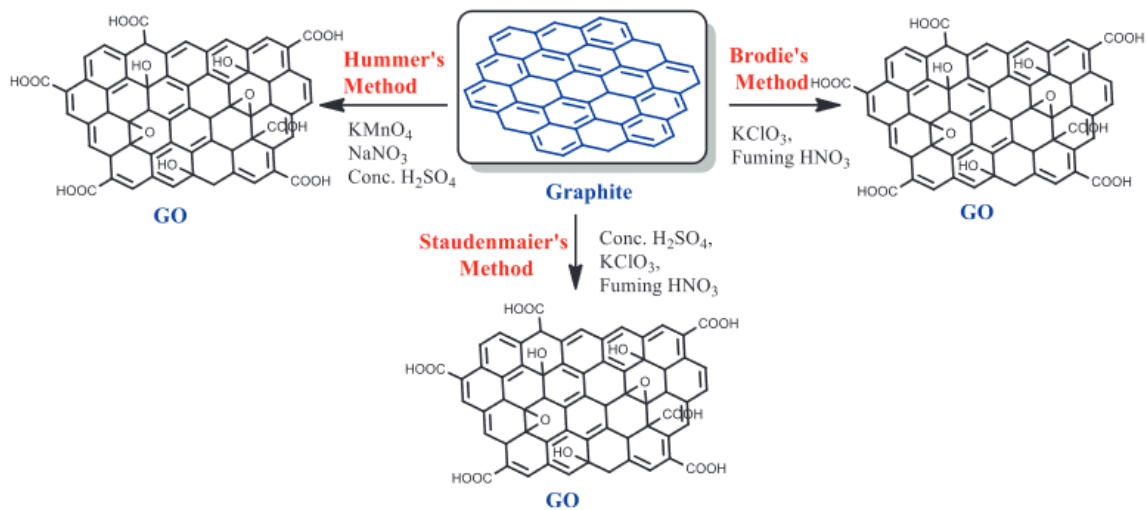


Kuva 1. Matalaulotteiset hiiliallotroopit: fullereeni (0D), hiilinanoputki (1D) ja grafeeni (2D).⁵ Reprinted from ref. 5., Copyright 2010, with permission from Elsevier.

2.2 Grafeenioksidi

Grafeenioksidi (GO) on grafeenin hapetettu muoto. Sen rakenteessa on paljon happea sisältäviä funktionaalisia ryhmiä, kuten karboksyyli-, hydroksyyli- ja epoksiryhmiä. Happea sisältävät ryhmät ja erityinen nanorakenne tekevät grafeenioksidista hydrofiilisen ja parantavat sen dispergoitumista vesiliuoksiin sekä antavat sille merkittäviä antibakteerisia ominaisuuksia useiden erilaisten mekanismien kautta.² Grafeenioksidia on tutkittu paljon sekä teoreettisesti että kokeellisesti sen poikkeuksellisen mekaanisen lujuuden, kemiallisen stabiilisuuden, funktionaalisten ryhmien kemiallisen monipuolisuuden ja kustannustehokkaan synteesin vuoksi.⁶

GO:a voidaan valmistaa kemiallisesti hapettamalla, liuotinvusteisesti kuorimalla tai elektrolyyttisesti hapettamalla grafiitista.⁶ Synteesimenetelmistä tunnetuimmat ovat Staudenmaierin⁷ ja Brodien⁸ menetit sekä useimmiten käytetty Hummersin⁹ metodi (kuva 2).²



Kuva 2. Tunnetut grafeenioksidin valmistusmenetelmät grafiittijauheesta.¹⁰ Reprinted from ref. 10., Copyright 2021, with permission from Elsevier.

2.3 Pelkistetty grafeenioksidi

Grafeenioksidia voidaan pelkistää pelkistetyksi grafeenioksidiksi (rGO). Pelkistäminen palauttaa jossain määrin grafeenin johtokyvyn ja absorbanssin sekä tekee siitä grafeenioksidia hydrofobisemman happea sisältävien ryhmien pelkistymisen vuoksi.²

Pelkistäminen voidaan tehdä kemiallisesti, sähkökemiallisesti tai lämmön avulla. Lämmön avulla pelkistämiseen tarvitaan vain korkea lämpötila eikä prosessi vaadi kemikaaleja, joten se vaikuttaa olevan käytännöllisin ja ympäristöystävällisin tapa valmistaa rGO:a. Reaktioliuoksen emäksisyys vaikuttaa myös rGO:n pelkistymisasteeseen. On todettu, että emäksinen ympäristö on hyödyllinen GO:n pelkistämisessä rGO:ksi, sillä emäs kykenee neutraloimaan muodostuvaa hiilihappoa.²

2.4 Grafeenipohjaiset nanokomposiitit

Grafeenipohjaisilla nanokomposiiteilla tarkoitetaan yleisesti GO:n tai rGO:n funktionalisointia muiden aktiivisten aineiden avulla kovalenttisen tai ei-kovalenttisen sitoutumisen kautta. Tällä saadaan tuotettua GO:lle tai rGO:lle uusia tai paranneltuja ominaisuuksia ja toimintoja. Grafeenipohjaisia nanokomposiitteja ovat esimerkiksi grafeeni-metalli- tai grafeeni-metallioksidi- ja grafeeni-polymeerinanokomposiitit. Grafeenipohjaisia nanomateriaaleja voidaan käyttää nanomittakaavan rakennusmateriaalina dispersoimaan ja stabiloimaan metalli- tai metallioksidinanopartikkeleja. Grafeeninanolevyjen kyky muodostaa merkittävästi ei-kovalenttisia vuorovaikutuksia, kuten van der Waals -vuorovaikutuksia, helpottaa molekyylien ja nanopartikkelien liittämistä grafeeniin. Muodostuneilla nanokomposiiteilla on komponenttejaan paremmat ominaisuudet ja ne toimivat tehokkaammin biologisissa ympäristöissä.²

Hopeananopartikkeleilla (AgNP) on bakteereita tappava vaikutus. Tämä perustuu niiden kykyyn tarttua bakteerin DNA:han, bakteereiden energian kierrätyksen estämiseen ja partikkelin pinnalta vapautuviin hopeaioneihin,¹¹ jotka voivat aiheuttaa mikro-organismien kuoleman tuhoamalla solukalvon ja estämällä DNA-replikaation. Hopeananopartikkelien spontaani kasautuminen kuitenkin rajoittaa niiden käytännön sovelluksia. Grafeenioksidi vaikuttaa lupaavalta kantajalta kuljettamaan hopeananopartikkeleita ja tehostamaan niiden antibakteerisia vaikutuksia. Nanokomposiitin muodossa GO:n ja AgNP:ien antibakteerinen

aktiivisuus on suurempi. Tämä johtuu siitä, että GO voi estää AgNP:ien nukleatiota ja toisaalta GO:iin immobilisoidut hopeananopartikkelit ehkäisevät GO-levyjen kasautumista. Toisin sanoen nanokomposiitin muodostuminen parantaa sekä grafeenioksidin että hopeananopartikkelien stabiilisuutta, mikä johtaa parempaan tehoon. On tutkittu, että GO-AgNP-nanohybridien lisääntynyt antibakteerinen vaikutus johtuu myös kationien suuresta määrästä komposiitin pinnalla. Tämä parantaa vuorovaikutusta bakteerisolukalvojen kanssa.²

Myös metallioksideja on käytetty yleisesti muodostamaan nanokomposiitteja grafeeninanomateriaalien kanssa. Tyypillinen esimerkki on GO-ZnO-nanokomposiitti. GO-ZnO:n antibakteerinen aktiivisuus johtuu grafeenioksidin terävistä reunoista sekä sinkkioksidin pitoisuudesta: ZnO:n osuuden nostaminen parantaa huomattavasti antibakteerista vaikutusta *Escherichia coli* -bakteeriin. Tämä johtuu osittain bakteerisolun osmoottisen paineen noususta, mikä voi johtaa bakteerin elinkyvyn menetykseen.²

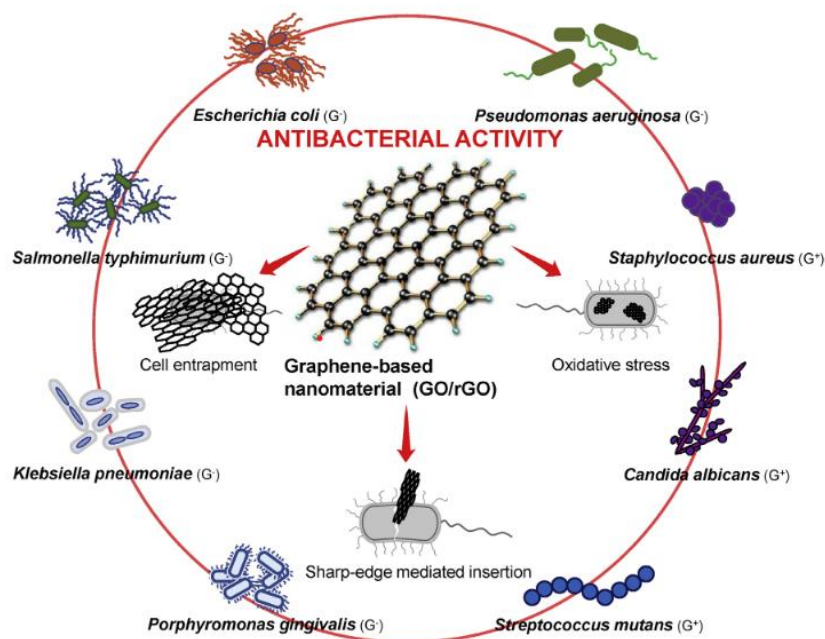
Grafeeninanomateriaalien antibakteerisen aktiivisuuden ja vesidispersiteetin (water-dispersity) tehostamiseksi voidaan käyttää myös joitakin funktionaalisia polymeerejä muodostamaan nanokomposiitteja grafeenipohjaisten nanomateriaalien (GBN) kanssa. Näistä on tutkittu esimerkiksi poly(L-lysiinin) (PLL) ja polyvinyyli-N-karbatsolin (PVK) grafeenikomposiitteja. PLL:n antibakteerinen aktiivisuus säilyi samalla kun sen bioyhteensopivuus kasvoi grafeenijohdannaisen läsnäolon vuoksi. PVK puolestaan paransi merkittävästi GO:n dispersiota ja näin ollen tehosti antibakteerista aktiivisuutta.²

3 Grafeenimateriaalien antibakteeriset ominaisuudet

Suuren pinta-alan ja erinomaisten fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksiensa vuoksi grafeenipohjaiset nanomateriaalit ovat osoittautuneet kiinnostaviksi ehdokkaiksi biologisissa sovelluksissa tarvittaville nanomittakaavan rakennusosille. Lisäksi grafeenia voidaan luontaisten antibakteeristen ominaisuuksiensa vuoksi käyttää uutena, tehokkaana ja vihreänä antibakteerisena aineena.⁴

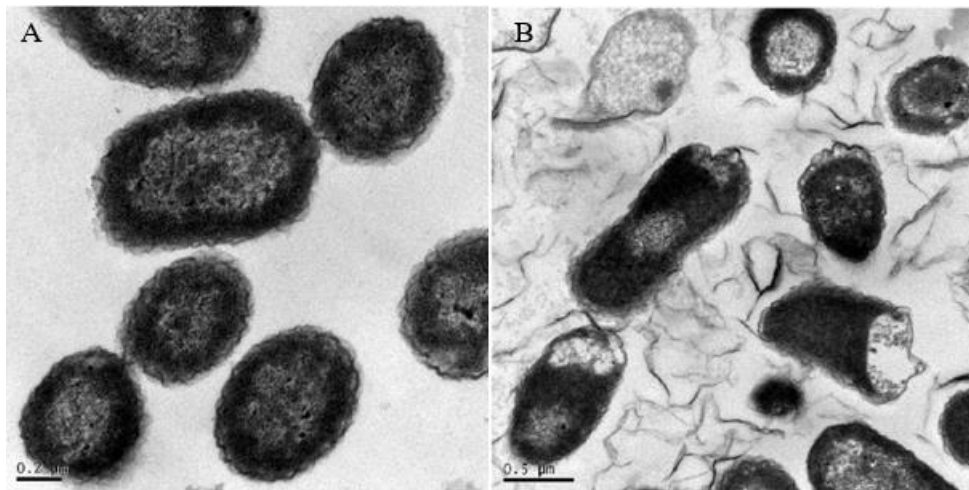
3.1 Antibakteerisuuden mekanismit.

Grafeenimateriaalit voivat vaikuttaa bakteereihin useilla eri tavoilla. Antibakteerisista mekanismeista (kuva 3) yleisimpiä ovat grafeenimateriaalin aiheuttama kalvostressi, jota kutsutaan myös nanoveitsi- tai nanoterävaikutukseksi (nanoknife / nanoblade effect), oksidatiivinen stressi (OS) ja käärimis- tai sieppausmekanismi (wrapping or trapping mechanism).¹ Grafeenimateriaalien varauksensiirtokyky ja fototermiset ominaisuudet vaikuttavat myös materiaalien antibakteerisuuteen. Lisäksi GO:lla on havaittu niin sanottu itsensä tappamismekanismi (self-killing mechanism). Grafeenimateriaalit voivat tappaa mikro-organismeja myös edellä mainittujen mekanismien yhdistelmänä.¹²



Kuva 3. Grafeenimateriaalien antibakteerisia mekanismeista.² Reprinted from ref. 2., Copyright 2019, with permission from Elsevier.

Yleisimmin havaittu mekanismi on nanoveitsi- tai nanoterävaikutus eli terävien reunojen aiheuttama fysikaalinen vaurio mikrobin soluseinään tai -kalvoon. Tämä aiheuttaa solun rikkoutumisen, jolloin sen rakenneosat vuotavat ympäristöön ja mikro-organismit kuolevat.¹ Bakterin solukalvoon voi tulla myös aukkoja, jolloin bakterisolun osmoottinen paine muuttuu. Tämä johtaa lopulta solun kuolemaan.¹² GO-nanolevyjen erinomaiset antibakteeriset vaikutukset on osoitettu ja havaittu läpäisyelektronimikroskoopin (TEM) avulla. TEM-kuvista (kuva 4) nähdään selvästi, että GO-nanolevyille altistaminen vaurioittaa vakavasti *E. coli*-solujen eheyttä ja johtaa solunsisäisen sisällön vuotamiseen.²



Kuva 4. TEM-kuva normaaleista *E. coli*-soluista (A) ja *E. coli*-soluista kahden tunnin GO-nanolevyille altistamisen jälkeen (B).² Reprinted from ref. 2., Copyright 2019, with permission from Elsevier.

Oksidatiivinen stressi johtaa oksidaation ja anti-oksidaation epätasapainoon, mikä häiritsee bakteerien aineenvaihduntaa, tuhoaa solurakenteen ja johtaa lopulta bakteerien elinkyvyn menetykseen. Grafeenimateriaalit voivat aiheuttaa bakteereissa lipidien peroksidaatiota. Lipidien peroksidaatiolla tarkoitetaan sarjaa vapaiden radikaalien ketjureaktioita, missä bakteerien aktiivinen happi lisää rasvahappojen hapettumista. Tämä johtaa lipidiperoksidien muodostumiseen ja sen myötä solukalvon rikkoutumiseen sekä lopulta bakterin kuolemaan. Glutationi (GSH) on bakteerien tärkeä reduktaasi ja sen määrä voi indikoida oksidatiivisen stressin suuruutta, koska se voidaan helposti hapettaa glutationidisulfidiksi (GSSG). Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että GO:lle ja rGO:lle altistamisen jälkeen pelkistetyn glutationin (GSH) pitoisuus laski huomattavasti ja reaktiivisten happiradikaalien (ROS) pitoisuus kasvoi GO:lla 3,8-kertaiseksi ja rGO:lla 2,7-kertaiseksi *P. aeruginosa* -bakteerissa. Tämän vuoksi

uskotaan, että grafeeninanomateriaalien tuottama suuri määrä ROS:a aiheuttaa bakteerien oksidatiivisen stressin.²

Grafeenimateriaalit ovat rakenteeltaan erittäin joustavia.¹² Käärimis- tai sieppausmekanismi perustuu bakteerin eristämiseen ulkoisesta ympäristöstä, mikä rajoittaa bakteerin ravinnon saamista.² GO:lla on happea sisältävien funktionaalisten ryhmiensä vuoksi huomattava kyky sitoa *E. coli* sisäänsä. GO eristää väliaikaisesti bakteerin ympäristöstään, mikä johtaa sen inaktivoitumiseen.¹²

Varauksen siirron on katsottu olevan tehokas antibakteerinen mekanismi ottaen huomioon grafeenimateriaalien hyvä elektronien liikkuvuus (high electronic mobility). Varauksensiirtomekanismia on tutkittu muun muassa grafeenikalvoilla päällystettyjä germanium-substraatteja tutkimalla. Näytteet, jotka olivat päällystetty kokonaan grafeenilla (Full-G) olivat antibakteerisempia *S. aureusta* ja *E. colia* kohtaan kuin näytteet, jotka olivat vain osittain grafeenilla päällystettyjä (Half-G) tai eivät sisältäneet grafeenia ollenkaan (None-G). Antibakteerisuus oli *S. aureusta* kohtaan suurempi kuin *E. colia*, sillä jälkimmäisellä on suojaava ulkokalvo. Toisaalta bakteerin vioittumisen havaittiin liittyvän bakteerin ja grafeenin väliseen elektronien siirtymismekanismiin, mikä johtaa kalvon hajoamiseen ja solun sisällön vuotamiseen. Tässä tapauksessa grafeeni toimii solun ulkopuolisena elektronien vastaanottajana, joka kykenee sieppaamaan hengitysaineenvaihdunnan elektroneja. Tämä johtaa kalvon fysiologisen toiminnan häiriöihin.¹²

Fototermitiset vaikutukset aiheutuvat energianlähteen, kuten laserin, luomasta lämmöstä materiaalissa. Lämpötila mikro-organismien, kuten bakteerien, ympärillä nousee, mikä lopulta tappaa ne. Samaa menetelmää voidaan käyttää myös syöpähoidoissa syöpäsolujen kohdennettuun lämpökäsittelyyn, joka johtaa syöpäsolujen kuolemaan. Esimerkiksi vankomysiiniä sisältävä rGO on osoittanut fototermitistä antibakteerista aktiivisuutta lähi-infrapunasäteilyllä (NIR) käsiteltäessä oksasilliini-lääkeresistenttiä *S. aureusta* ja kanamysiini-lääkeresistenttiä *E. colia* vastaan.¹²

Itsemurhavaikutus tai itsensä tappamismekanismi on GO:n antibakteerinen mekanismi, joka perustuu bakteerien tapaan rajoittaa itseään (self-limiting manner). Tämä mekanismi on huonosti tunnettu kirjallisuudessa, mutta on raportoitu, että bakteerilajit voivat passiivisesti tappaa itsensä poistamalla happea sisältäviä funktionaalisia ryhmiä GO:sta. Tämä johtaa

grafeenioksidin muuntumiseen grafeeniksi. Kyseinen mekanismi on havaittu esimerkiksi *E. coli* -bakteerilla.¹²

Grafeenimateriaalit voivat tappaa mikro-organismeja yhdistelemällä edellä mainittuja mekanismeja. Esimerkiksi GO:n antibakteerinen vaikutus *E. coli*a kohtaan aiheutuu todennäköisesti useista fysikaalisista ja kemiallisista vuorovaikutuksista. GO-nanolevyt voivat tunkeutua bakteerikalvoon terävien reunojensa ansiosta ja toisaalta oksidatiivisella stressillä on merkitys ROS:ien ja vapaiden radikaalien muodostumiseen. Tämä aiheuttaa bakteerin proteiinien denaturoitumisen ja DNA-vaurioita, mikä johtaa bakteerin kuolemaan.¹² Pelkistetyn grafeenioksidin tärkeimmät antibakteeriset mekanismit ovat nanoveitsivaikutus sekä oksidatiivinen stressi. Eräässä tutkimuksessa havaittiin, että pelkistetyn grafeenioksidin antibakteerisuusaste gram-positiiviseen *S. aureus* -bakteeriin oli 48,6 %. Kun rGO yhdistettiin hopeananopartikkeleihin, antibakteerisuusaste oli 89,35 %. Gram-negatiivisiin bakteereihin rGO:n antibakteerisuusaste oli keskimäärin 84,59 % ja yhdistettynä hopeananopartikkeleihin 99,50 %. rGO/Ag-nanokomposiittien korkeampi antibakteerinen aktiivisuus selittyy kiinniotto-tappamismekanismeilla (capturing-killing mechanism), johon yhdistyy myös nanoveitsivaikutus ja oksidatiivinen stressi. rGO/Ag-nanokomposiitin hyvä dispersio veteen lisää huomattavasti kontaktia materiaalin ja bakteerin välillä ja rGO:n pinnalle kerääntyy bakteereja sen suuren pinta-alan ansiosta. Tämän jälkeen rGO ja hopea vahingoittavat bakteerien solukalvoja ja tuottavat vapaita happiradikaaleja, jotka vahingoittavat bakteerien hengityselimistöä.¹

3.2 Antibakteeriseen aktiivisuuteen vaikuttavat tekijät

Grafeenimateriaalien antibakteerinen aktiivisuus riippuu grafeenilastujen ja aggregoituneiden partikkelien koosta, sillä tämä vaikuttaa antibakteerisen aineen ja bakteerin väliseen vuorovaikutukseen.¹² Bakteerisolujen ansaan joutuminen korreloi grafeenipohjaisten nanomateriaalilevyjen koon kanssa: GO:n antibakteeriset ominaisuudet paranevat, kun sen sivuttaismittoja (lateral dimensions) kasvatetaan. Atomivoimamikroskopiolla (AFM) on voitu todentaa, että isommat GO-levyt saivat *E. coli*-soluja tehokkaammin ansaan. Solut eivät voineet lisääntyä, sillä ne olivat täysin eristettyinä.²

GO-komposiittinanolevyjen antibakteerinen aktiivisuus riippuu myös nanopartikkelien koosta. Tutkimuksessa, jossa GO:hon aggregoitiin kooltaan $0,31 \pm 0,20 \mu\text{m}$ kokoisia nanopartikkeleja

ja grafiittioksiidiin $6,28 \pm 2,50 \mu\text{m}$ kokoisia partikkeleja, havaittiin, että GO:n antibakteerinen kyky oli huomattavasti parempi ($69.3 \pm 6.6 \%$) kuin grafiittioksidilla ($15.0 \pm 3.7 \%$), vaikka niiden pinnoilla on lähes samat funktionaaliset ryhmät. Tämä ero selittyy näytteisiin aggregoitujen nanopartikkelien merkittäväällä kokoerolla.¹²

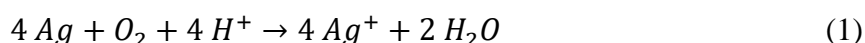
Grafeenimateriaalien muodolla on todettu olevan merkittävä vaikutus niiden antimikrobiseen aktiivisuuteen. Tämä on linjassa aiempiin tutkimuksiin, joissa on havaittu, että myös hiilinanoputkien ja hopeananopartikkelien osoittama sytotoksisuus on muodosta riippuvaista. Nanopartikkelien muodot ovat ratkaisevan tärkeässä roolissa nanopartikkelien ja lipidikaksoiskerroksen välisessä translokaatioprosesseissa, joiden uskotaan olevan suoraan yhteydessä antimikrobiseen aktiivisuuteen. Grafeenilevyt, joilla on terävät kulmat ja ulkonevat reunat, voivat läpäistä solukalvon helposti. Kokeellisissa tutkimuksissa on havaittu, että GO-nanoseinien (GONWs) ja rGO-nanoseinien (RGNWs) terävät reunat laskivat huomattavasti sekä *E. colin* että *S. aureuksen* selviytymisastetta. Muodon vaikutuksen varmistamiseksi *Pseudomonas aeruginosa* - ja *S. aureus*-kannoilla tutkittaessa on valmistettu grafeenikalvoja (graphene film), joissa on eri muotoja ylä- ja alapuolella. Havaittiin, että grafeenikalvo, jolla on sileä yläpuoli (GN-S) on tehokas tappamaan sekä sauvamaisen *P. aeruginosan* että pyöreän *S. aureuksen*. Karkeapohjainen grafeenikalvo (GN-R) pystyi inaktivoimaan tehokkaasti vain sauvamaisen *P. aeruginosan*.⁴

Grafeenioksidilevyissä olevat funktionaaliset ryhmät kuten karboksyylihaporyhmä, hydroksyyliiryhmä ja epoksidiryhmä lisäävät materiaalin dispergoituvuutta. GO vuorovaikuttaaakin paremmin bakteerien, esimerkiksi *E. colin*, kanssa kuin grafiitti ja rGO. Tämä johtuu siitä, että grafeenioksidi dispergoituu paremmin väliaineessa, jolloin sen vuorovaikutus ympäristön kanssa tehostuu. Enemmän happea sisältäviä ryhmiä omaavat grafeenioksidilastut ovat antibakteerisempia jopa matalilla GO-konsentraatioilla. GO-nanolevyillä on havaittu voimakas antibakteerinen vaikutus *Streptococcus mutans* -bakteeria vastaan, sekä planktonisiin (yksittäisiin/vapaisiin) soluihin että biofilmeihin.¹²

Grafeenioksidin antibakteerinen vaikutus on aika- ja konsentraatorippuvaista. Tutkittaessa grafeenioksidin vaikutusta gram-positiivisiin (GPB) ja gram-negatiivisiin bakteereihin (GNB) havaittiin, että grafeenioksidin konsentraation kasvaessa myös rikkoutuneiden bakteerikalvojen määrä kasvaa. Grafeenioksidin bakterisidista (bakteereita tappava) vaikutusta *E. coli* -bakteeriin arvioitaessa havaittiin, että suurin osa bakteereista oli inaktiivisia ensimmäisen tunnin jälkeen. Solukuolleisuus kasvoi grafeenioksidin konsentraation noustessa

ja ajan kuluessa, mikä viittaa myös siihen, että grafeenioksidin antibakteerinen aktiivisuus riippuu ajasta ja konsentraatiosta.¹

Ympäristön pH-arvo voi vaikuttaa grafeenimateriaalien antibakteeriseen aktiivisuuteen. Esimerkiksi GO/Ag -hybridimateriaali on antibakteerisempi *E. colia* ja *S. aureusta* kohtaan matalammilla pH-arvoilla. Havaintoa on selitetty sillä, että happamissa olosuhteissa Ag-nanopartikkeleista irtoaa enemmän hopeaioneja, mikä kasvattaa kokonaisuudessaan antibakteerista suorituskykyä. Myös rGO/Ag on osoittanut tehokkaampaa antibakteerisuutta *P. aeruginosaa* ja *S. aureusta* kohtaan pH:ssa 5,6 verrattuna pH-arvoihin 7,2 ja 8,6. Matalammassa pH:ssa on enemmän liukoista happea ja H⁺-ioneja. Hopeananopartikkelit voivat siten hapettua reaktion (1) mukaisesti tuottaen enemmän Ag⁺-ioneja, mikä edistää antibakteerisia vaikutuksia.¹²



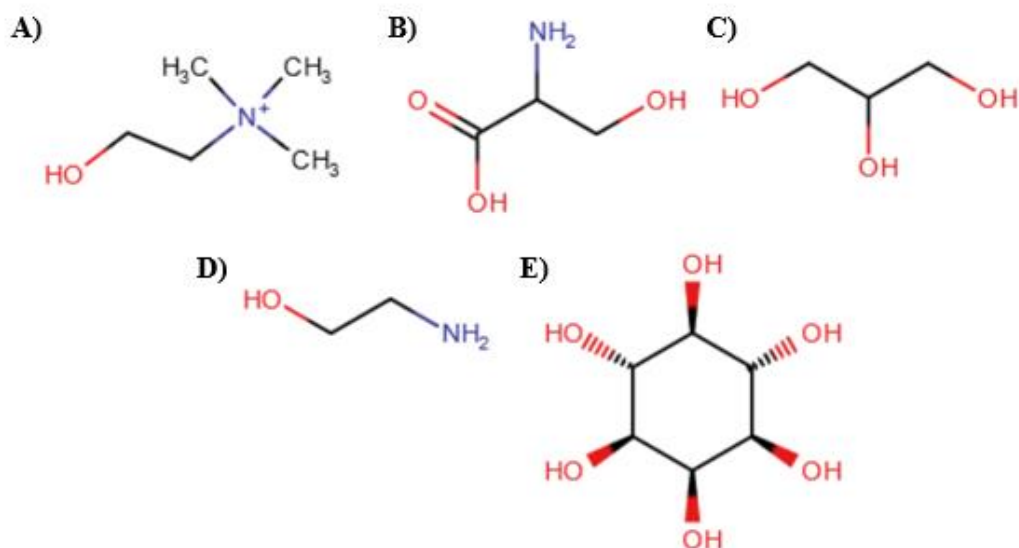
Bakteerityyppi, gram-positiivisuus tai gram-negatiivisuus, on myös tärkeää määritettäessä grafeenimateriaalien antibakteerisia ominaisuuksia. Erityyppisissä bakteereissa voidaan havaita erilaisia antibakteerisuuden asteita ja mekanismeja. GO:lla on parempi antibakteerisuus gram-positiivisiin bakteereihin (*S. aureus* ja *Enterococcus faecalis*) kuin gram-negatiivisiin bakteereihin (*E. coli* ja *P. aeruginosa*). Eri bakteerityyppeihin vaikuttavat eri antibakteeriset mekanismit. Gram-positiivisiin bakteereihin vaikuttaa pääasiassa käärimismekanismi ja gram-negatiivisiin fysikaalisen kontaktin välityksellä tapahtuva kalvovaurio. GO/Ag -hybridimateriaali on osoittanut bakteereita tappavia ominaisuuksia gram-negatiivisiin bakteereihin (*E. coli*) ja bakteerien kasvua estäviä ominaisuuksia gram-positiivisiin bakteereihin (*S. aureus*). Antibakteerisen mekanismin havaittiin perustuvan *E. colissa* solukalvon vaurioon ja *S. aureuksessa* solun jakautumisen estämiseen.¹²

3.3 Sytotoksisuus

Grafeeninanomateriaalit voivat olla biologisesti yhteensopivia tai toksisia biologisia soluja kohtaan. Materiaalin kerrosten lukumäärä, lateraalinen koko, puhtaus, annos, pintakemia ja hydrofiilisyydet vaikuttavat siihen, millainen vaste elävillä soluilla on materiaaliin. Grafeeninanomateriaalien pintakemiat vaihtelevat riippuen käytetystä synteesimenetelmästä sekä eri molekyylien ja polymeerien saatavuudesta pinnan funktionalisoimiseen. Yleensä toksisuuden arvioinnissa *in vitro* käytetään useita pääsolulinjoja. Näihin pääsolulinjoihin

kuuluvat fagosyytit, esimerkiksi makrofagit, sekä ei-fagosyyttiset solut, kuten endoteelisolut, epiteelisolut, syöpäsolut ja punasolut. Lääketieteellisten sovellusten kannalta on tärkeää ymmärtää, miten grafeeninanomateriaalit vuorovaikuttavat näiden solujen kanssa.¹³

Grafeeninanomateriaalien vuorovaikutus solukalvojen kanssa voi aiheuttaa kalvovaurioita ja sytotoksisuutta. Solukalvojen fosfolipidit koostuvat fosfaattipääryhmästä ja kahdesta rasvahappoketjusta. Peruspääryhmiin kuuluvat muun muassa koliini, seriini, glyseroli, etanoliamiini ja inositoli (Kuva 5). Fosfolipidien ominaisuudet eroavat riippuen siitä, mitä pääryhmiä niissä on. Solukalvot sisältävät myös kolesterolimolekyylejä, joilla on tärkeä vaikutus kalvorakenteen stabiilisuuteen, juoksevuuden ylläpitämiseen (fluidity) ja kalvoon liittyvien proteiinien aktiivisuuden mukauttamiseen. Puhtaalla grafeenilla ei ole varauksia pohjatasossa (basal plane), joten se ei vuorovaikuta sähköstaattisesti fosfolipidien kanssa vaan suosii hydrofobisia vuorovaikutuksia lipidihäntien kanssa. Lisäksi hydrofobinen vuorovaikutus grafeenin ja kolesterolihännän välillä voi uuttaa tai poistaa kolesterolimolekyylejä kalvosta johtaen sen vaurioitumiseen.¹³



Kuva 5. Fosfaattipääryhmät: koliini (A), seriini (B), glyseroli (C), etanoliamiini (D) ja inositoli (E).

Grafeenioksidin pintavaraus ja -kemialla vaikuttavat merkittävästi solujen kanssa tapahtuviin vuorovaikutuksiin. GO:lla on hapetettujen funktionaalisten ryhmien vuoksi korkea negatiivinen varaustiheys. Tämän vuoksi GO:n ja kalvon lipidien välillä voi esiintyä

sähköstaattisia vuorovaikutuksia. Grafeenioksidi voi vuorovaikuttaa sähköstaattisesti lipidien kanssa, jotka sisältävät positiivisesti varautuneen lipidipääryhmän, mutta sähköstaattista vuorovaikutusta ei esiinny neutraalin tai negatiivisesti varautuneen lipidin kanssa. Nisäkkäiden soluissa fosfolipidien sähkövaraukset ovat neutraaleja tai negatiivisia. Tämän takia on epätodennäköistä, että negatiivisesti varautuneet lipidit vetäisivät puoleensa grafeenioksidia, jolla on sama varaus: negatiivisesti varautunut GO ja saman varauksen omaavat lipidit hylkivät sähköstaattisesti toisiaan, kun taas hydrofobiset vuorovaikutukset negatiivisesti varautuneen GO:n ja lipidien välillä edistävät GO:n adsorptiota lipideissä. Nämä havainnot osoittavat, että grafeenioksidi voi hydrofobisten vuorovaikutusten kautta vaurioittaa solukalvoa eikä siis vaadi tunkeutumista soluihin.¹³

Grafeeninanomateriaalit pystyvät pienen kokonsa ja terävien reunojensa vuoksi myös tunkeutumaan sytoplasmaan. Ne voivat lävistää helposti solukalvon johtaen kalvon vaurioitumiseen ja sytoplasman sisällön vuotamiseen solun ulkopuolelle. Solun sisällä GO voi aiheuttaa toksisuutta luomalla reaktiivisia happiradikaaleja, jotka voivat aiheuttaa häiriötä mitokondrioiden toimintaan laskemalla mitokondrioiden kalvopotentiaalia (MMP) ja aiheuttamalla solukalvoon vaurioita vapauttamalla laktaattidehydrogenaasia (LDH). Lisäksi reaktiiviset happiradikaalit voivat aiheuttaa lipidiperoksidaatiota reagoimalla kalvon lipidien tyydyttymättömien rasvahappojen kanssa. Reaktiossa syntyy lipidiperoksideja, kuten malondialdehydiä (MDA). GO voi siis luoda reaktiivisia happiradikaaleja sekä solun ulkopuolella että sisäpuolella, jopa pienillä määrillä riippuen annoksesta ja ajasta.¹³

4 Grafeeni ja antibiootit

4.1 Antibioottiresistenssi

Antibiootit ja mikrobilääkeaineet (antimicrobial agent) ovat vähentäneet huomattavasti infektioita aiheuttamia komplikaatioita. Näiden lääkkeiden liiallinen käyttö on kuitenkin lisännyt lääkkeille resistenttejä taudinaiheuttajia. Useille lääkeaineille vastustuskykyiset (multi-drug resistant) mikrobit aiheuttavat maailmanlaajuisesti vakavia terveysuhkia.¹⁴ Bakterien antibioottiresistenssi on syntynyt lyhyessä ajassa ja monin tavoin nopeammin kuin on odotettu. Tämä selittyy bakteerien lyhyellä lisääntymisajalla (generation time), mikä mahdollistaa niiden nopean evoluution. Lisäksi bakteerit kykenevät manipuloimaan omaa genotyyppiään, joten ne pystyvät adaptoitumaan nopeammin antibioottien vaikutuksia vastaan.¹⁵

Monet bakteerit kykenevät myös muodostamaan abiottisille pinoille biofilmejä. Biofilmit voivat muodostua yhdestä tai useammasta bakteerilajista ja osoittaa korkeaa antimikrobista sietokykyä verrattuna yksittäisiin soluihin. Biofilmien muodostuminen on yksi tärkeimmistä taustatekijöistä akuuttien infektioiden muuttuessa kroonisiksi. National Institute of Health and Center of Disease Controlin mukaan noin 65–80 % infektioitaudeista aiheutuu biofilmejä muodostavista bakteereista. Esimerkiksi virtsatieinfektiot ja niihin liittyvät biofilmit ovat vaikeita antibiooteille ja immuunijärjestelmän vasteille kehittyneen resistenssin vuoksi. Tällä hetkellä saatavilla olevat antibiootit ovat tehottomia biofilmi-infektioiden hoidossa ja johtavat toistuviin virtsatieinfektioihin.¹⁶

4.2 Grafeeninanomateriaalit antibioottien korvaajana

Antibiooteista riippumattomien antibakteeristen lääkeaineiden (antibiotics-independent antibacterial agents) kehittäminen on ihmisten terveyden kannalta tärkeää, koska uusien antibioottien löytäminen tai syntetisointi on vaikeaa ja hidasta.² Useiden antibakteeristen materiaalien kuten metalli-ionien ja -oksidien, antibioottien, kvaternääristen ammoniumyhdisteiden ja antimikrobisten peptidien käyttöön bakteri-infektioiden hoidossa liittyy paljon ongelmia. Metallioneilla ja -oksidoilla on paljon antimikrobisia toimintoja sieni-, virus- ja bakteritaudinaiheuttajia vastaan, mutta ne ovat osoittautuneet toksisiksi

joillekin nisäkkäiden soluille. Antibiootteja ja kvaternäärisiä ammoniumsuoloja vastaan taas voi kehittyä resistenssi pitkittyneen käytön vuoksi. Lisäksi puhtaiden antimikrobisten peptidien kehittäminen antibakteeriseksi kuljettajiksi on hyvin kallista. Näiden ongelmien ratkaisemiseksi on etsitty yhä enemmän ei-perinteisiä antibakteerisia materiaaleja kuten metallinanopartikkeleja (NPs), hiilinanoputkia, metallioksidinanopartikkeleja ja grafeenipohjaisia materiaaleja.³

Erityisesti grafeenipohjaisilla materiaaleilla on havaittu erinomaisia ominaisuuksia bakteri-infektioita vastaan.³ Grafeeninanomateriaalit ovat osoittaneet laajakirjoista aktiivisuutta gram-positiivisia ja gram-negatiivisia bakteereja sekä sienipatogeeneja kohtaan. Grafeeninanomateriaaleista grafeenioksidi on osoittautunut antibakteerisuudeltaan tehokkaimmaksi sen terävien reunojen, solun kaappaus/sieppauskykynsä ja sen aiheuttaman oksidatiivisen stressin vuoksi. Pelkistettyä grafeenioksidia on myös käytetty antibakteerisena aineena sen voimakkaan fototermisen vaikutuksen vuoksi.² Grafeenipohjaisten nanomateriaalien käyttö mikrobilääkeaineina on edelleen kuitenkin rajallista, sillä ne dispergoituvat huonosti useimpiin liuottimiin. Lisäksi ne ovat puhtaassa muodossa sytotoksisia ja tuotantokustannukset ovat kalliita.¹⁷

Antibakteeriset materiaalit määritetään yleensä tyypillisiä patogeenisiä bakteriryhmiä vastaan. Näitä ovat muun muassa yleisimpiä ihmisten infektioita aiheuttavat bakteerit *Escherichia coli* (*E. coli*) ja *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*).³

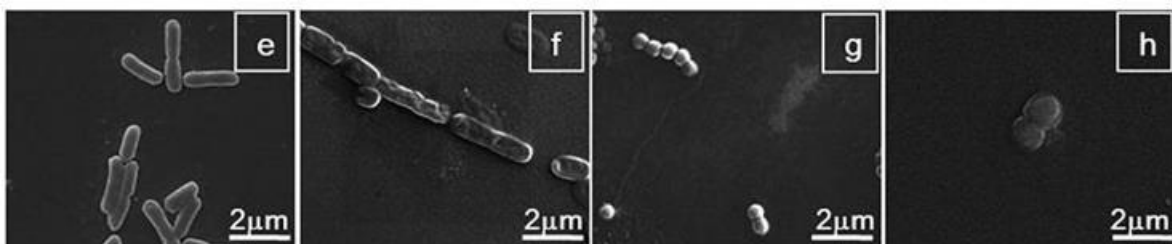
4.2.1. E. coli

E. coli on yksi ihmiskehon kaikissa järjestelmissä esiintyvä gram-negatiivinen bakteeri, joka voi aiheuttaa muun muassa infektioita munuaisiin ja ruuansulatuskanavaan. Se sisältää laajan kirjon erilaisia β -laktaameja ja on resistentti useille antibiooteille mukaan lukien β -laktamaasit, fluorokinolonit ja aminoglykosidit. Patogeenisyytensä ja lääkeresistenssinsä vuoksi sitä on käytetty yleisesti mallikantana testaamaan grafeeninanomateriaalien antibakteerista vaikutusta.²

Grafeenioksidi ja pelkistetty grafeenioksidi ovat osoittaneet merkittävää antibakteerista aktiivisuutta *E. colia* vastaan. GO:lla on rGO:ta parempi antibakteerinen vaikutus planktoniseen *E. coliin* ja sen sytotoksisuus on huomattavasti alhaisempi. Tämän vuoksi GO:n

bioyhteensopivuus on parempi. rGO osoittaa puolestaan suurempaa aktiivisuutta bakteeribiofilmejä vastaan.²

Grafeeninanomateriaaleista on muiden aineiden kanssa muodostettu nanokomposiitteja parantamaan antibakteerista aktiivisuutta sekä fysikaalisia ja kemiallisia ominaisuuksia. 98,36 % *E. coli* -bakteereista menetti elinkykynsä yhdessä tunnissa keskikokoisella annoksella GO-AgNP-materiaalia (60 μ L), kun taas anti-*S. aureus* -aste oli 96,18 %. Kun annosta nostettiin 80 μ L:aan, molemmat kannat inhiboituivat täysin. SEM-kuvista (kuva 5) nähdään, kuinka bakteerisolujen eheys ja sileys on tuhoutunut käsittelyn jälkeen, mikä viittaa vakaviin vaurioihin soluseinässä ja -kalvossa.²



Kuva 6. SEM-kuvat *E. colista* (e ja f) sekä *S. aureuksesta* (g ja h) ennen ja jälkeen GO-Ag altistuksen.² Reprinted from ref. 2., Copyright 2019, with permission from Elsevier.

GO-metallioksidi nanokomposiitit ovat myös osoittaneet merkittävää antibakteerista aktiivisuutta *E. colia* vastaan. GO-ZnO:lla on raportoitu huomattavaa antibakteerista vaikutusta *E. coliin*. Tämä johtuu sinkki-ionien ja grafeenioksidin yhteisvaikutuksesta, sillä GO-levyt vahvistavat paikallista läheistä kontaktia sinkki-ionien ja *E. colin* välillä. GO-TiO₂- sekä rGO-TiO₂-komposiitit ovat osoittaneet erinomaista antibakteerista kykyä sekä stabiilisuutta. *E. colin* soluaktiivisuus oli vain 3 % sen jälkeen, kun sitä oli altistettu GO-TiO₂:lle UV-valon alla neljä tuntia.²

4.2.2. *S. aureus*

Gram-positiivisista bakteereista antibakteerisen aktiivisuuden testaamiseen on yleisesti käytetty *S. aureus* -bakteeria. *S. aureus* on yhteydessä useisiin ihmiskehon infektioihin ja sairauksiin, esimerkiksi alkoholista riippumattomaan rasvamaksaan ja liikalihavuuteen. Metisilliiniresistentti *Staphylococcus aureus* (MRSA) on useille antibiooteille resistentti ja yksi tärkeimmistä sairaalainfektioiden aiheuttajista.²

GO-AgNP:ien MIC- (minimum inhibitory concentration) ja MBC-arvoja (minimum bactericidal concentration) on tutkittu *MRSA*:ta vastaan. Molemmat arvot ovat komposiitilla pienempiä kuin yksin grafeenioksidilla tai hopeananopartikkeleilla. Tämä osoittaa GO-AgNP:ien voimakkaan antibakteerisen aktiivisuuden *MRSA*:ta vastaan.²

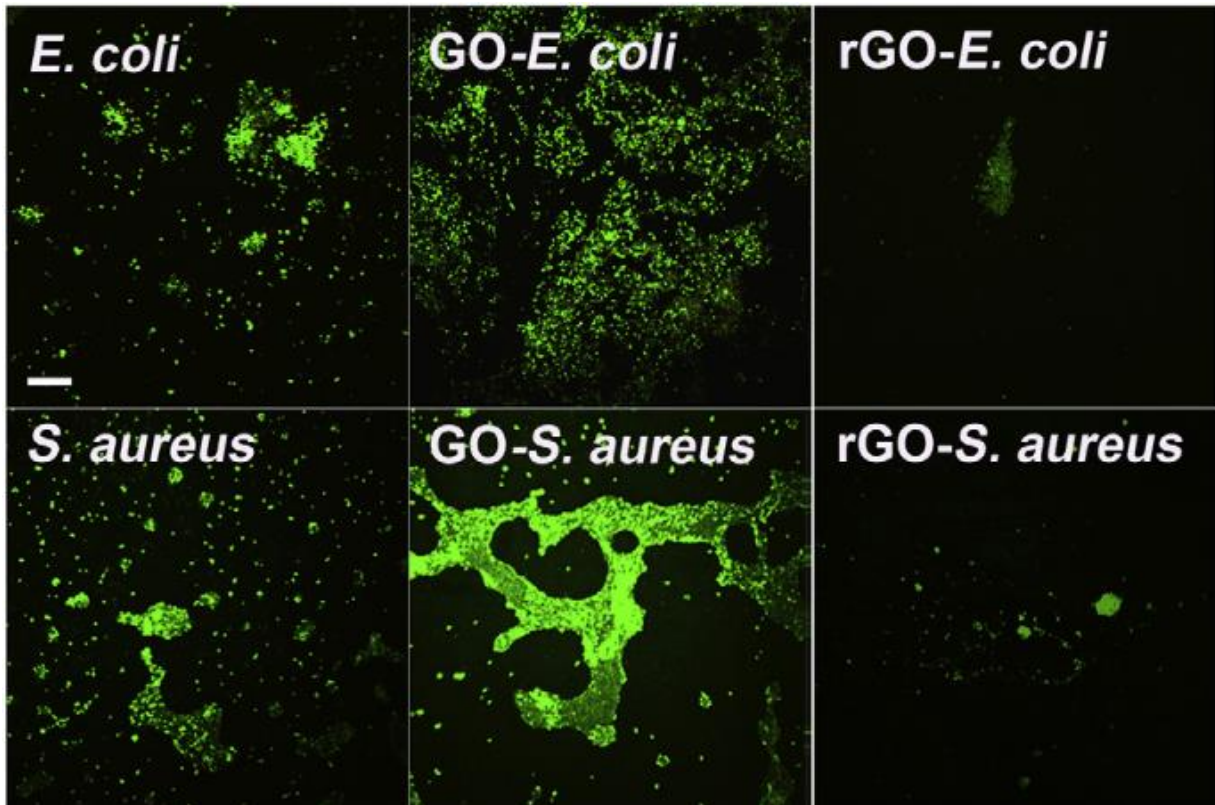
Vertailevassa tutkimuksessa on saatu selville myös, että GO-Ag:lla on korkeampi antibakteerinen aktiivisuus *E. coli*a kuin *S. aureusta* vastaan, johtuen *E. coli*-solujen ohuemmasta soluseinästä. Bakterin peptidoglykaanikerroksen paksuus määrittää bakterisolukalvon kyvyn puolustautua AgNP:ta vastaan.²

Probioottien ja patogeenien välistä vuorovaikutusta on tutkittu ja selville, että GO voisi edistää ihmisen suolistossa *Bifidobacterium adolescentis* -bakteerin lisääntymistä ja tehostaa sen antagonistista aktiivisuutta *S. aureusta* vastaan muodostamalla anaerobisia kalvorakenteita. Tutkimus osoittaa siis, että suoliston mikrobiotan interaktion manipulointi voisi myös olla uusi antibakteerisen toimintamallin mahdollisuus.^{2,18}

4.2.3. Biofilmit

Mikro-organismit voivat biofilmejä muodostamalla kiinnittyä erilaisiin pintoihin, jossa ne kasvavat ja muodostavat solun ulkoisia polymeereja. Tämä johtaa organismien fenotyypin muutoksiin. Biofilmien muodostuminen voi aiheuttaa terveysuhkien lisäksi monenlaisia ongelmia myös esimerkiksi teollisuudessa.¹²

Grafeenioksidin ja pelkistetyn grafeenioksidin vaikutuksia *E. coli*n ja *S. aureuksen* muodostamiin biofilmeihin on tutkittu vertailevassa tutkimuksessa. GO:n ja rGO:n vaikutuksia biofilmin muodostumiseen arvioitiin kristalliviolettiväryksellä (crystal violet staining method). Konsentraatioilla 50–500 mg/l GO tehosti biofilmien muodostumista molemmilla bakterimalleilla. rGO ei 0–50 mg/l:n pitoisuuksilla juurikaan vaikuttanut biofilmien biomassaan, mutta pienensi sitä suurilla pitoisuuksilla. Biofilmejä havainnoitiin tutkimuksessa myös käyttämällä elävä/kuollut-molekyylikoetin -määrittystä (Live/Dead molecular probe assay). GO-käsittelyn jälkeen näytteessä havaittiin eläviä soluja enemmän kuin kontrollinäytteessä, kun taas rGO-käsittelyn jälkeen näytteessä oli vain pieni määrä eläviä soluja (kuva 7).¹⁹



Kuva 7. Konfokaalimikroskopiakuva biofilmeistä objektilaseilla 48 tunnin inkubaatioajan jälkeen. Vasemmalla ilman GO:a ja rGO:a, keskellä GO:lle (500 mg/l) ja oikealla rGO:lle (500 mg/l) altistamisen jälkeen. Kuvan valkoinen palkki osoittaa 100 μ m.¹⁹ Reprinted from ref. 19., Copyright 2017, with permission from Elsevier.

5 Yhteenveto

Grafeeni ja sen johdannaiset, kuten GO ja rGO, ovat osoittaneet muiden mielenkiintoisten ominaisuuksiensa lisäksi antipatogeenista aktiivisuutta. Grafeenimateriaaleilla on erinomaisia antibakteerisia ominaisuuksia sekä gram-negatiivisia että gram-positiivisia bakteereja kohtaan ja ne voivat olla jopa kaupallisia antibiootteja tehokkaampia.¹²

Grafeenimateriaalit voivat toimia itsenäisesti antibakteerisena aineena useiden mekanismien kautta. Näistä mekanismeista tärkeimmät ovat terävien reunojen aiheuttama kalvovaurio, oksidatiivinen stressi ja solun käärimis- tai sieppausmekanismi. Fysikaalis-kemiallisten ominaisuuksien parantamiseksi ja antibakteeristen vaikutusten tehostamiseksi grafeenimateriaalit voivat toimia myös komponenttina nanokomposiiteissa muiden bioaktiivisten aineiden kanssa.²

Grafeenipohjaisten materiaalien antibakteeriseen käyttöön liittyy edelleen ongelmia. Suurin haaste on ymmärtää yksityiskohtaisesti bakteerien ja grafeenipohjaisten materiaalien välinen vuorovaikutus ja muut tekijät, jotka vaikuttavat grafeenimateriaalien antibakteeriseen tehokkuuteen.³ Esimerkiksi grafeenilastujen ja aggregoitujen partikkelien koko vaikuttavat antibakteeriseen aktiivisuuteen. Yleisesti pienempi kokoiset grafeenimateriaalit ovat antibakteerisuudeltaan tehokkaampia. Funktionaalisten ryhmien suurempi määrä kasvattaa grafeenimateriaalien dispergoituvuutta, mikä lisää vuorovaikutusta grafeenimateriaalien ja mikro-organismien välillä parantaen antibakteerista toimintakykyä. Myös grafeenimateriaalien muoto vaikuttaa vuorovaikutukseen ja sen myötä antibakteeriseen aktiivisuuteen. Grafeenimateriaalien antibakteerisia vaikutuksia voidaan kasvattaa konsentraatiota ja kontaktiaikaa nostamalla. Samoin grafeenimateriaaleilla, joilla on suurempi ominaispinta-ala, on parempia antimikrobisia ominaisuuksia.¹²

Grafeenipohjaisiin materiaaleihin liittyvä toksisuus on myös herättänyt huolta ja niiden vaikutukset normaaleihin nisäkäsoluihin ja ympäristöön ovat edelleen kiistanalaista. Grafeenipohjaisten materiaalien antibakteeriset testit on tehty lähinnä *E. colia* ja *S. aureusta* vastaan.³ Jatkuvasti lisääntyvien antibioottiresistenttien bakteerien ja niiden aiheuttaman maailmanlaajuisesti vakavan terveysuhan vuoksi materiaaleja täytyy tutkia myös eri patogeenilajeja ja fenotyyppisiä kohtaan. Tätä kautta saadaan myös havainnollistettua grafeenimateriaalien bakterisidisten ominaisuuksien kirjon laajuutta.¹⁴

Kirjallisuusuettelo

1. Cao, G.; Yan, J.; Ning, X.; Zhang, Q.; Wu, Q.; Bi, L.; Zhang, Y.; Han, Y. ja Guo, J., Antibacterial and antibiofilm properties of graphene and its derivatives, *Colloids and surfaces, B, Biointerfaces*, **2021**, *200*, 111588.
2. Xia, M.; Xie, Y.; Yu, C.; Chen, G.; Li, Y.; Zhang, T. ja Peng, Q., Graphene-based nanomaterials: The promising active agents for antibiotics-independent antibacterial applications, *JCR*, **2019**, *307*, 16-31.
3. Kumar, P.; Huo, P.; Zhang, R. ja Liu, B., Antibacterial properties of graphene-based nanomaterials, *Nanomaterials*, **2019**, *9*.
4. Zou, X.; Zhang, L.; Wang, Z. ja Luo, Y., Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials, *J. Am. Chem. Soc.*, **2016**, *138*(7), 2064-2077.
5. Soldano, C.; Mahmood, A. ja Dujardin, E., Production, properties and potential of graphene, *Carbon*, **2010**, *48*(8), 2127-2150.
6. Petukhov, D. I.; Kapitanova, O. O.; Eremina, E. A. ja Goodilin, E. A., Preparation, chemical features, structure and applications of membrane materials based on graphene oxide, *Mendeleev Commun.*, **2021**, *31*, 137.
7. Staudenmaier, L., Verfahren zur darstellung der graphitsäure, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1898**, *31*(2), 1481-1487.
8. Brodie, B. C., XXIII.-researches on the atomic weight of graphite, *J. Chem. Soc.*, **1860**, *12*(1), 261-268
9. Hummers, W. S. ja Offeman, R. E., Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.*, **1958**, *80*(6), 1339-1339.
10. Sharma, N.; Swami, S.; Shrivastava, V.; Nair, R. ja Shrivastava, R., Graphene oxide and functionalized graphene oxide: Robust, 2D material as heterogeneous green catalyst for heterocyclic synthesis, *Materials today: proceedings*, **2021**.
11. Vi, T.; Kumar, S.; Pang, J. S.; Liu, Y.; Chen, D. W. ja Lue, S. J., Synergistic Antibacterial Activity of Silver-Loaded Graphene Oxide towards Staphylococcus Aureus and Escherichia Coli, *Nanomaterials*, **2020**, *10*.
12. Seifi, T. ja Kamali, A. R., Anti-pathogenic activity of graphene nanomaterials: A review, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2021**, *199*, 111509.

13. Liao, C.; Li, Y. ja Tjong, S. C., Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity, *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19*(11), 3564.
14. Szunerits, S. ja Boukherroub, R., Antibacterial activity of graphene-based materials, *J Mater Chem B*, **2016**, *4*(43), 6892-6912.
15. Sköld, O. ja Sköld, O., *Antibiotics and Antibiotic Resistance*, John Wiley & Sons, Incorporated, Hoboken, USA, 2011, ss. 4.
16. Muthuchamy, M.; Govindan, R.; Shine, K.; Thangasamy, V.; Alharbi, N. S.; Thillaichidambaram, M.; Khaled, J. M.; Wen, J. ja Alanzi, K. F., Anti-biofilm investigation of graphene/chitosan nanocomposites against biofilm producing *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, *Carbohydrate Polymers*, **2020**, *230*, 115646.
17. Carpio, I. E. M.; M. Santos, C.; Wei, X. ja F. Rodrigues, D., Toxicity of a polymer – graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells, *Nanoscale*, **2012**, *4*(15), 4746-4756.
18. Chen, H.; Gao, D.; Wang, B.; Zhao, R.; Guan, M.; Zheng, L.; Zhou, X.; Chai, Z. ja Feng, W., Graphene oxide as an anaerobic membrane scaffold for the enhancement of *B. adolescentis* proliferation and antagonistic effects against pathogens *E. coli* and *S. aureus*, *Nanotechnology*, **2014**, *25*.
19. Guo, Z.; Xie, C.; Zhang, P.; Zhang, J.; Wang, G.; He, X.; Ma, Y.; Zhao, B. ja Zhang, Z., Toxicity and transformation of graphene oxide and reduced graphene oxide in bacteria biofilm, *Sci. Total Environ.*, **2017**, *580*, 1300-1308.