



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ
ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ
ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ *ESHERICHIA
COLI***

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΙΚΟΛΕΤΤΑΣ Η. ΒΛΑΧΟΥ

Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Ε.Μ.Π.

ΕΠΙΒΛΕΨΗ:

Κ. Α. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, 27.10.2015



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΥΛΙΚΩΝ"

**ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ
ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ
ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ *ESHERICHIA
COLI***

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΝΙΚΟΛΕΤΤΑΣ Η. ΒΛΑΧΟΥ

Διπλωματούχου Χημικού Μηχανικού Ε.Μ.Π.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Κ. Α. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Ε. Β. Χριστοφόρου, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

Δ. Κέκος, Καθηγητής Ε.Μ.Π.

ΑΘΗΝΑ, 27.10.2015

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) είναι από τα νανοϋλικά τα οποία παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για έρευνα, λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών, μηχανικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους. Βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς, όπως είναι η ιατρική και η μηχανική, και για αυτόν τον λόγο το εμπορικό ενδιαφέρον αυτών των υλικών είναι ολό ένα και αυξανόμενο. Ήδη αρκετές είναι οι εταιρίες οι οποίες παράγουν μαζικά και εμπορεύονται νανοσωλήνες άνθρακα. Ως εκ τούτου, θεωρείται ζωτικής σημασίας η μελέτη και η κατανόηση των επιδράσεων των CNTs στους ζωντανούς οργανισμούς και το περιβάλλον, ώστε μελλοντικά να μην παρουσιαστούν παρόμοια προβλήματα, όπως έγινε με την περίπτωση του αμιάντου. Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός τους είναι απαραίτητος για τη σύνδεση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων με την τοξική και την αντιμικροβιακή τους δράση. Οι ιδιότητες που έχουν προταθεί ότι σχετίζονται τόσο με τις εμπορικές εφαρμογές όσο και με την κυτταροτοξικότητα περιλαμβάνουν τη διάμετρο, το μήκος, την καθαρότητα του δείγματος και την ύπαρξη ή μη επιφανειακής ή άλλης τροποποίησης. Οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που προτείνονται από τη διεθνή βιβλιογραφία, επίσης, ποικίλλουν, ενώ ανάλογα με το υλικό που διερευνάται μπορεί να είναι διαφορετικοί παρόλο που οδηγούν στο ίδιο αποτέλεσμα, την απόπτωση των κυττάρων. Στην τρέχουσα μεταπτυχιακή εργασία, χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Escherichia coli* (*E.coli*) ως πρότυπος μικροοργανισμός και ελέγχθηκαν, σχετικά με την αντιβακτηριακή τους δράση, CNTs με διαφορετικές εξωτερικές διαμέτρους και επιφανειακές τροποποιήσεις. Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν διάφοροι τρόποι σύνθεσης των CNTs σε εργαστηριακή κλίμακα. Στη μελέτη μας, χρησιμοποιήθηκαν CNTs πολλαπλών τοιχωμάτων τα οποία είχαν συντεθεί με τη μέθοδο της χημικής εναπόθεσης ατμών. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός αυτών με υδροχλωρικό οξύ και τροποποίηση της επιφάνειάς τους με επιφανειακή προσθήκη αμινομάδων και καρβοξυλομάδων. Επιπλέον, εκτιμήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των CNTs στη βιωσιμότητα των βακτηρίων για τον ίδιο χρόνο και τις ίδιες συνθήκες επώασης. Παρατηρήθηκε ότι οι κινητικές σταθερές της ανάπτυξης των *E. coli* κυττάρων, μετά από την επώασή τους παρουσία διαφόρων ποσοτήτων CNTs ανά 100ml θρεπτικού μέσου, παρουσίασαν διαφοροποίηση σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs. Η διαφοροποίηση αυτή ήταν μεγάλη για κάποια από τα δείγματα και μικρότερη για άλλα, ενώ βρέθηκε ότι εξαρτάται ισχυρά από την προστιθέμενη ποσότητα των CNTs. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από την εκτίμηση της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης. Κατά την καταμέτρηση αποικιών επίσης παρουσιάστηκαν διαφοροποιήσεις ανάμεσα στα διάφορα δείγματα που ελέγχθηκαν κατά παρόμοιο τρόπο, γεγονός που επιβεβαιώνει και συμπληρώνει τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών της ανάπτυξης. Τέλος, διερευνήθηκε ένας από τους διάφορους μηχανισμούς αντιβακτηριακής δράσης που προτείνονται από τη διεθνή βιβλιογραφία ότι λαμβάνουν χώρα.

ABSTRACT

Carbon nanotubes (CNTs) are one of the most appealing nanomaterials with unique physicochemical, mechanical, and electrical properties that find application in many different fields, e.g. biology, medicine and mechanics. Moreover, they have a tremendous increase in commercial interest and subsequent mass production. Hence, it is considered crucial to study and understand the effect of CNTs on living organisms and environment for their proper future use. It has been indicated that CNTs' size, purity and surface chemistry are considered important parameters for the toxicological effect on living organisms. The differences in CNTs properties could be the first reason that explains why the results of their toxic effect on various types of cells are diverse, controversial and sometimes conflicting. Another reason could be the different cell culture media and the different cell types. It is obvious that more studies are needed in order to conclude to specific results about the effect of CNTs on cells. The mechanisms of cytotoxicity suggested by the literature also vary, and are depending on the investigating material. In the current master thesis, it was used as a model organism the bacterium *Esherichia coli* (*E.coli*). CNTs with different size and surface modifications were tested on their antibacterial activity. Moreover, it was investigated whether the effect of CNTs on the viability of the bacteria was dose – dependent for both the same time and incubation conditions. Generally, there are several ways of synthesis of CNTs on a laboratory scale. In our study, Multiwall carbon nanotubes were used that have been synthesized *via* T-CVD. Subsequently, the purification was carried out, with hydrochloric acid, and also modification of the surface by surface addition of amino and carboxyl groups. It was observed that the kinetic constants of the development of *E. coli* cells, after incubation with various doses of CNTs showed variation compared with the control sample. These differentiations were more for some of the samples and less on others; it was found that they strongly depend on the added dose of CNTs. Similar results were obtained by estimating the maximum cell concentration. Traditional bacteria quantitative plating analysis was conducted, and the results of which revealed that the thin-wall CNTs and the funtionalized with carboxyl groups CNTs inhibited cell viability whereas the commercial multi-wall CNTs showed a less significant effect on the viability of *E. coli*. Finally, it was investigated whether the carbon nanotubes cause puncturing of the bacteria's cell membrane, since this mechanism is believed to be the dominant that occurs upon the interaction of the bacteria with the carbon nanotubes.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με τίτλο «Αντιβακτηριακή Δράση Των Νανοςωλήνων Ανθρακα - Μελέτη Περίπτωσης *Esherichia Coli*» εκπονήθηκε σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας της Σχολής Χημικών Μηχανικών.

Πρώτο απ' όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή Κ. Α. Χαριτίδη για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντας μου ένα καινούργιο και δύσκολο θέμα σε παγκόσμιο επίπεδο. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την ομάδα από το εργαστήριο της Βιοτεχνολογίας, τον Καθηγητή Δ. Κέκο ο οποίος είναι ο υπεύθυνος του εργαστηρίου και φυσικά την Δρ. Δ. Μαμμά, η οποία με καθοδηγούσε από την αρχή μέχρι το τέλος και με στήριζε τόσο ερευνητικά όσο και ψυχολογικά, σε όλες τις δυσχέρειες που παρουσιάστηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω και τα μέλη της εργαστηριακής ομάδας R-nano, και ιδιαίτερα τους Μ.Κοκλιώτη, Δ. Περιβολιώτη και Α. Φ. Τρομπέτα, οι οποίοι πραγματοποίησαν την σύνθεση, την τροποποίηση και τον χαρακτηρισμό των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής Δ. Κέκος και Ε. Β. Χριστοφόρου για την συμμετοχή τους στην επιτροπή και τα σχόλιά τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, η οποία παράλλες τις δυσκολίες που αντιμετωπίζει αυτή τη στιγμή, στάθηκε για ακόμη μια φορά στο πλάι μου, συμβουλευόντας με και στηρίζοντάς με.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
Luria-Bertani	LB
Νανοςωλήνες άνθρακα	CNTs
Νανοςωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος	SWCNTs
Νανοςωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων	MWCNTs
Chemical Vapor Deposition	CVD
Πολυ (γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ)	PLGA
Colony-forming unit	CPU
Too numerous to count	TNTC
Limit of quantification	LOQ
Αμερικανική υπηρεσία τροφίμων και φαρμάκων για βακτηριακές αναλύσεις	BAM
Οργανισμός τροφίμων και φαρμάκων Αμερικής	FDA
American Society for Testing and Material	ASTM
Οπτική πυκνότητα	OD
Βάρος ξηρής βιομάζας	DCW
Μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης	μ_{\max}
Χρόνος διπλασιασμού του βακτηριακού πληθυσμού	t_d
Μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση	X_{\max}

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης πολυφλοϊκών νανοσωλήνων άνθρακα. Αρχικά, στο 1^ο κεφάλαιο, γίνεται μια εισαγωγή στους μικροοργανισμούς και στις κατηγορίες στις οποίες διακρίνονται. Στη συνέχεια, αναλύονται οι διάφορες φάσεις της μικροβιακής αύξησης, με ιδιαίτερη έμφαση στην εκθετική φάση, καθώς και οι παράγοντες που την επηρεάζουν. Στο 2^ο κεφάλαιο αναφέρονται κάποιες βασικές έννοιες για τους νανοσωλήνες άνθρακα και οι εφαρμογές αυτών που σχετίζονται με την αντιμικροβιακή τους δράση. Επίσης, αναλύεται η επίδρασή τους στους μικροοργανισμούς με βάση την υπάρχουσα διεθνή βιβλιογραφία. Στο 3^ο κεφάλαιο, περιγράφονται οι πιο σημαντικές μέθοδοι απαρίθμησης των μικροοργανισμών, με ιδιαίτερη έμφαση στην απαρίθμηση κυττάρων έπειτα από την επίστρωση σε στερεή καλλιέργεια και στις θολοσιμετρικές μεθόδους, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Στο 4^ο κεφάλαιο, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων από την μελέτη περίπτωσης καθώς και κάποια συμπεράσματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής. Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η επίδραση του μεγέθους, της επιφανειακής τροποποίησης και της συγκέντρωσης των νανοσωλήνων άνθρακα στην ανάπτυξη των βακτηρίων *Esherichia coli*. Για την επίδραση του μεγέθους, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα με διαφορετική εξωτερική διάμετρο. Για την επίδραση της επιφανειακής τροποποίησης χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα με δύο διαφορετικές επιφανειακές προσθήκες λειτουργικών ομάδων, των καρβοξυλομάδων και των αμινομάδων, ενώ συγκρίθηκαν με μη τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα. Όλα τα παραπάνω δείγματα ελέγχθηκαν για διάφορες δόσεις νανοσωλήνων άνθρακα (σε g/100ml) ώστε παράλληλα να διερευνηθεί και η επίδραση των προστιθέμενων ποσοτήτων και ο τρόπος με τον οποίον επηρεάζονται τα αποτελέσματα. Τέλος, πραγματοποιήθηκε διερεύνηση για έναν συγκεκριμένο μηχανισμό αντιβακτηριακής δράσης που προτείνεται από τη βιβλιογραφία για τα είδη νανοσωλήνων άνθρακα που εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

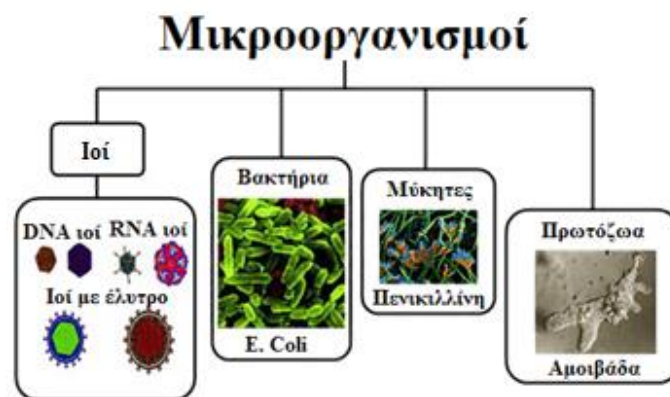
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	I
ABSTRACT.....	II
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	I
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	I
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	VI
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	VII
ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	1
1. 1. ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	1
1. 2. ΒΑΚΤΗΡΙΑ.....	1
1. 3. ΕΝΤΕΡΙΚΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ (ENTEROBACTERIACEAE).....	3
1. 3. 1. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
1. 4. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	5
1. 4. 1. ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ.....	6
1. 5. ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΑΥΞΗΣΗ – ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	12
1. 5. 1. Ο ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	13
1. 5. 2. Η ΕΝΝΟΙΑ ΤΗΣ ΕΚΘΕΤΙΚΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	15
1. 5. 3. ΤΑ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΑ ΤΗΣ ΕΚΘΕΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ.....	17
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	18
ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ (CARBON NANOTUBES, CNTS).....	19
2. 1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	19
2. 2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	19
2. 3. ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	21
2. 3. 1. ΦΙΛΤΡΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΡΡΥΠΑΝΤΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ.....	22
2. 3. 2. ΝΑΝΟΣΥΝΘΕΤΑ CNT - ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ ΜΕ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	22
2. 3. 3. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ.....	23
2. 4. ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ.....	23
2. 5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	24
2. 6. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ.....	28
ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	35
3.1. ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ.....	35
3.2. ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΩΝ ΖΩΝΤΑΝΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ.....	36
3. 2. 1. ΑΡΑΙΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΕΝΑΙΩΡΗΜΑΤΩΝ ΠΡΙΝ ΤΗΝ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ.....	38
3. 2. 2. ΠΗΓΕΣ ΣΦΑΛΜΑΤΟΣ ΣΤΗ ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΡΥΒΑΙΩΝ.....	39
3. 2. 3. ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗ ΚΑΤΑΜΕΤΡΗΣΗ ΤΡΥΒΑΙΩΝ.....	40
3.3. ΘΟΛΟΣΙΜΕΤΡΙΚΟΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	41
3. 3. 1. ΟΠΤΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ.....	41
3. 3. 2. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΟΥ OD ΜΕ ΤΟΝ ΚΥΤΤΑΡΙΚΟ ΑΡΙΘΜΟ.....	41
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ: ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ <i>E. COLI</i>	46
4.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ	46
4.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ	48
4.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΗΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ	59
4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	74
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	76
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	77
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	79

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ

1. 1. Μικροοργανισμοί

Γενικά, ως μικροοργανισμοί ή μικρόβια χαρακτηρίζονται εκείνοι οι οργανισμοί τους οποίους δεν μπορούμε να διακρίνουμε με γυμνό μάτι, γιατί έχουν μέγεθος μικρότερο από 0,1 mm. Είναι όλοι μικροσκοπικοί μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι διαβίουν είτε ως ανεξάρτητοι οργανισμοί, είτε ως παράσιτα σε πολυκύτταρους οργανισμούς (Εικόνα 1). Τα μικροβιακά κύτταρα διαφέρουν από τα κύτταρα των φυτών και των ζώων ως προς το ότι τα πρώτα είναι ανεξάρτητες οντότητες, ικανά να επιτελούν τις διαδικασίες της αύξησης, της παραγωγής ενέργειας και της αναπαραγωγής ανεξάρτητα από άλλα κύτταρα, ίδια ή διαφορετικού είδους. Αντίθετα, τα φυτικά και ζωικά κύτταρα δεν είναι σε θέση να επιτελέσουν μόνα τους τις παραπάνω διεργασίες, αντ' αυτού υπάρχουν μόνο ως μέρη πολυκύτταρων δομών, όπως είναι τα συστήματα οργάνων που διαθέτουν οι ζωικοί οργανισμοί ή τα φύλλα των φυτών. Αναλόγως αν έχουν οργανωμένο πυρήνα ή όχι, οι μικροοργανισμοί διακρίνονται σε ευκαρυωτικούς και σε προκαρυωτικούς, αντίστοιχα. Επιπλέον, στους μικροοργανισμούς ανήκουν και οι ιοί, αν και δεν αποτελούν κυτταρικούς οργανισμούς.



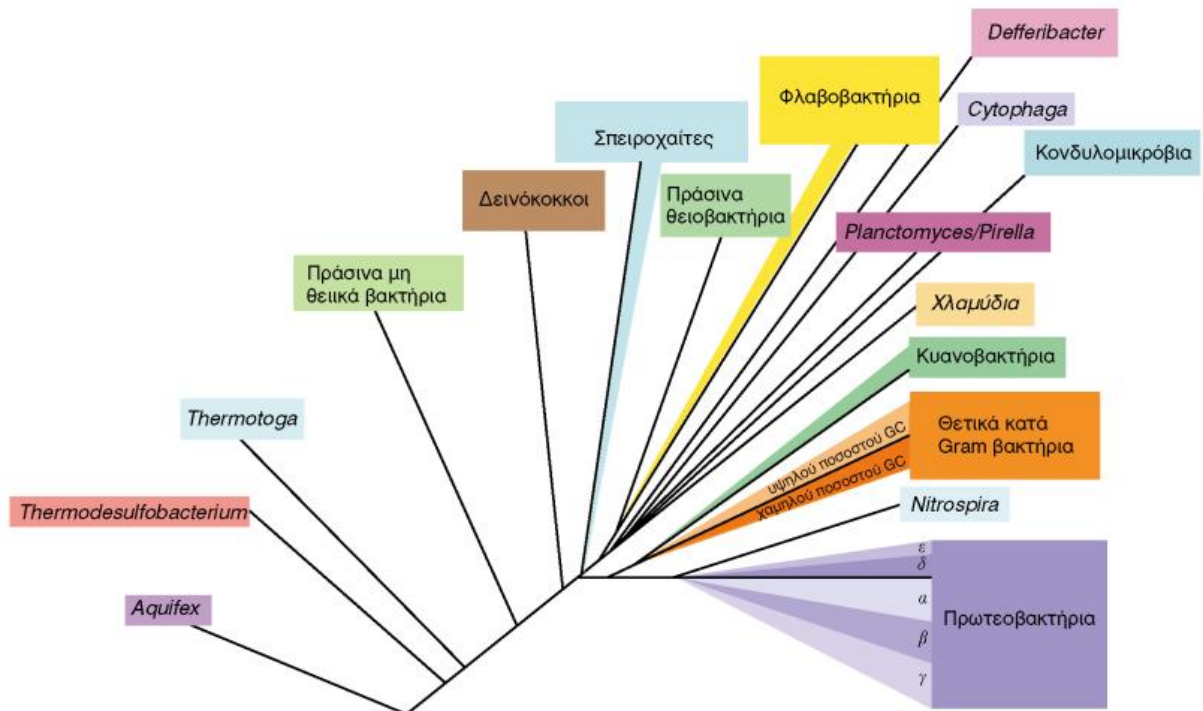
Εικόνα 1 Κατάταξη μικροοργανισμών [1].

1. 2. Βακτήρια

Από μελέτες καλλιέργειών στο εργαστήριο είναι γνωστές τουλάχιστον 17 μείζονες γενεαλογικές γραμμές (φύλα) βακτηρίων, ενώ πολλές άλλες έχουν ταυτοποιηθεί με την απομόνωση και την αλληλούχιση ριβοσωματικών βακτηριακών γονιδίων RNA από φυσικά οικοσυστήματα. Η Εικόνα 2 απεικονίζει την φυλογενητική επισκόπηση των βακτηρίων. Το φυλογενετικά αρχαιότερο φύλο περιλαμβάνει το γένος *Aquifex* και άλλα συγγενικά του, όλα υπερθερμόφιλα χημειολιθοτροφικά γένη, που οξειδώνουν το υδρογόνο. Άλλες κοντινές γενεαλογικές γραμμές, όπως τα *Thermodesulfobacteria*, τα θερμοελυτρώδη και τα πράσινα μη θειικά βακτήρια (*Chloroflexus*) περιέχουν επίσης θερόφιλα είδη. Στη συνέχεια του φυλογενετικού δέντρου βρίσκονται οι δεινοκόκκοι και τα συγγενικά τους γένη, οι μορφολογικά μοναδικές σπειροχαίτες, τα φωτοτροφικά πράσινα θειοβακτήρια, οι χημειοργανοτροφικές ομάδες των *Flavobacterium* και *Cytophaga*, τα εκβλαστώνοντα

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Planctomyces – Pirella, οι ομάδες του *Verrocomicrobium*, τα χλαμύδια και τα γένη *Nitrospira* και *Defferibacter*.

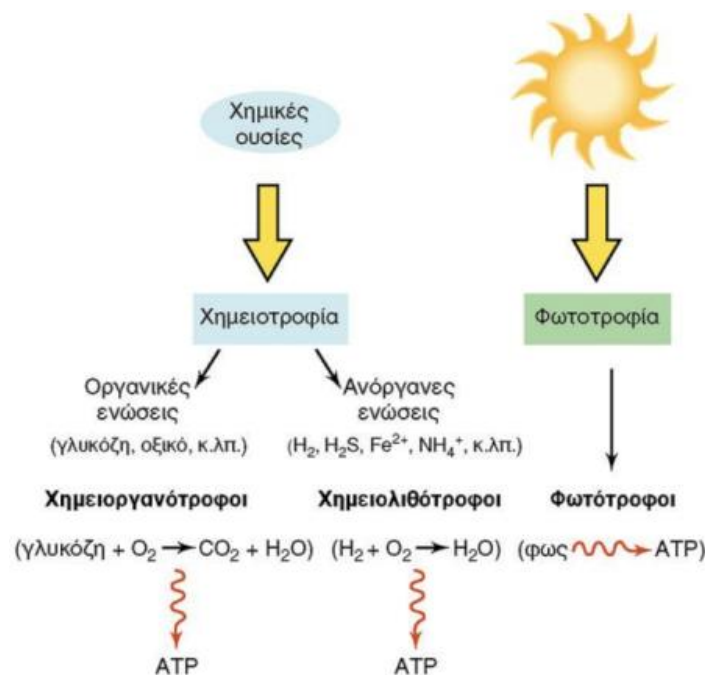


Εικόνα 2 Λεπτομερές φυλογενετικό δέντρο των κυριότερων γενεαλογικών γραμμών (φύλων) των Βακτηρίων, βασισμένο σε συγκρίσεις των αλληλουχιών του ριβοσωματικού RNA 16S [2].

Τα υπόλοιπα φύλα καλλιεργούμενων βακτηρίων περιλαμβάνουν τα θετικά κατά Gram βακτήρια, τα κυανοβακτήρια και τα πρωτεοβακτήρια. Κάθε φύλο αποτελεί μια μεγάλη ομάδα με πολλά γένη· πρόκειται για βακτήρια για τα οποία διαθέτουμε πολλές φαινοτυπικές πληροφορίες. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια αποτελούν μεγάλο σύνολο χημειοργανοτροφικών βακτηρίων και μπορούν να διαχωριστούν σε δύο υποομάδες, τις ονομαζόμενες χαμηλού και υψηλού ποσοστού G+C, όροι που αφορούν το γεγονός ότι στο DNA τους υπάρχει αναλογία βάσεων γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) είτε ανώτερο είτε κατώτερο του 50%, αντιστοίχως. Τα κυανοβακτήρια είναι οξυγονοπαραγωγικοί φωτοτροφικοί προκαρυωτικοί οργανισμοί με εξελικτικές ρίζες κοντά στα θετικά κατά Gram βακτήρια.

Το τελευταίο φύλο του δέντρου των βακτηρίων είναι τα πρωτεοβακτήρια. Η ομάδα αυτή είναι η μεγαλύτερη και περισσότερο διαφοροποιημένη από πλευράς φυσιολογίας μεταξύ όλων των βακτηρίων. Περιλαμβάνει πέντε ομάδες, η καθεμία με πολλά γένη, τα οποία προσδιορίζονται με τα ελληνικά γράμματα α, β, γ, δ και ε. Από πλευράς φυσιολογίας, τα πρωτεοβακτήρια είναι είτε φωτότροφα, είτε χημειολιθότροφα, είτε χημειοργανότροφα (για επεξήγηση όρων βλ. Εικόνα 3) [2].

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Εικόνα 3 Εναλλακτικές μεταβολικές οδοί για την πρόσληψη ενέργειας. Οι οργανικές και ανόργανες χημικές ουσίες που αναφέρονται εδώ είναι λίγες μόνο από την πληθώρα χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούν οι διάφοροι χημειοτροφικοί οργανισμοί. Στους χημειοτροφικούς οργανισμούς, η παραγωγή του ATP οφείλεται στην οξείδωση των οργανικών και ανόργανων ενώσεων, ενώ στους φωτοτροφικούς γίνεται μετατροπή της φωτεινής σε χημική ενέργεια (πάλι υπό τη μορφή ATP) [2].

1. 3. Εντερικά Βακτήρια (*Enterobacteriaceae*)

Το όνομα των Εντεροβακτηριοειδών προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Rahn (1937) [3]. Ο τύπος γένους είναι *Escherichia*. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει μια μεγάλη ομάδα αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, συνήθως 1-5 μm σε μήκος, τα οποία δεν σχηματίζουν ενδοσπόρια. Είναι προαιρετικά αναερόβια, με εξαίρεση των *Saccharobacter fermentans* και ορισμένα στελέχη των *Yersinia* και *Erwinia*, και μοιράζονται την ικανότητα να μετατρέπουν τα νιτρικά ιόντα σε νιτρώδη. Αυτά τα βακτήρια συνηθίζουν να κινούνται με περίτριχα μαστίγια εκτός από τα *Shigella* και *Tatumella* και κάποια άλλα μη κινητικά μέλη αυτής της οικογένειας. Ένα κοινό χαρακτηριστικό των *Enterobacteriaceae*, το οποίο βοηθά στην διαφοροποίηση τους από άλλες οικογένειες που συνδέονται στενά με αυτά τα βακτηρίδια, είναι η έλλειψη της οξειδάσης του κυτοχρώματος C, αν και υπάρχουν εξαιρέσεις, όπως είναι το *Plesiomonas spp.* Τα εντερικά βακτήρια ζυμώνουν μια ποικιλία υδατανθράκων, αλλά η ικανότητά τους να παράγουν οξύ και αέριο από τη ζύμωση, ιδιαίτερα της D-γλυκόζης, είναι ένα χαρακτηριστικό που παραμένει ένας σημαντικός διαγνωστικός ιδιότητα και χρησιμοποιείται συνήθως ως βάση για την ανίχνευση και την απαρίθμηση τους. Ορισμένα μέλη της συγκεκριμένης οικογένειας (π.χ., *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Citrobacter spp.* και *Klebsiella spp.*), μπορούν να αναγνωριστούν χρησιμοποιώντας μεθόδους που εκμεταλλεύονται την ικανότητά τους να προκαλούν ζύμωση της λακτόζης γρήγορα (συνήθως μέσα σε 24 - 48 ώρες) προς παραγωγή οξέως και φυσικού αερίου. Αυτά συλλογικά ονομάζονται κολοβακτηρίδια και χρησιμοποιούνται συχνά ως οργανισμοί δείκτες (κοπράνων) από την βιομηχανία τροφίμων και νερού, επειδή η κανονική "κατοικία" τους είναι η γαστρεντερική οδός θηλαστικών, πτηνών, κ.λπ [4].

Δεν υπάρχει άλλη οικογένεια στη συνομοταξία των Πρωτεοβακτηρίων που να έχει μεγαλύτερο αντίκτυπο στην ιατρική, στη δημόσια υγεία, στη μοριακή γενετική ή στη

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

μικροβιακή οικολογία και φυσιολογία από τα εντεροβακτήρια (*Enterobacteriaceae*). Σε αυτή την οικογένεια υπάρχουν 42 γένη και πάνω από 140 έγκυρα δημοσιευμένα είδη [2, 5]. Τα διάφορα γένη μπορεί να περιέχουν από ένα (π.χ., *Hafnia*, *Plesiomonas*) έως και 12 διακριτά είδη (π.χ., *Enterobacter*). Η εξέλιξη της οικογένειας κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών και η έκρηξη του αριθμού των αναγνωρισμένων ταξινομικών κατηγοριών είναι μια μαρτυρία για τις πρώτες πρωτοποριακές μελέτες από τα Κέντρα Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων και το Ινστιτούτο Παστέρ (γαλλικά: Institut Pasteur). Σε αντίθεση με την κοινή παρανόηση ότι τα εντεροβακτήρια είναι αποκλειστικά κάτοικοι της γαστρεντερικής οδού των σπονδυλωτών, η οικογένεια *Enterobacteriaceae* είναι μάλλον ευρέως διεσπαρμένη στη φύση και υπάρχουν πολλά είδη που ζουν ελεύθερα σε αποικίες στη βιόσφαιρα.

Πολλά είδη στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* χρησιμοποιούνται ως πρωτότυπα για τη μελέτη παγκόσμιων διεργασιών και θεωρείται ότι παίζουν σπουδαίο ρόλο στις μικροβιακές κοινότητες, στην κυτταρική επικοινωνία και στην έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τη μολυσματικότητα [2, 4]. Για παράδειγμα, η *Escherichia coli* εδώ και καιρό αποτελεί ένα καθιερωμένο σύστημα φορέα για κλωνοποίηση και έκφραση γονιδίων και γονιδιακών προϊόντων. Άλλες διεργασίες υψηλού προφίλ που πιστεύεται ότι εμπλέκονται τα εντεροβακτήρια είναι στην περιλαμβάνουν την εξεύρεση απαρτίας (*E. coli*, *Salmonella*) [6] και το σχηματισμό βιομεμβράνης (*E. coli*, *Klebsiella*) [7].

1. 3. 1. *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) απομονώθηκε πρώτη φορά από κόπρανα το 1885 από τον T. Escherich. Ο εν λόγω μικροοργανισμός ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών και είναι αρνητικός κατά Gram. Αποτελεί ένα κοινό μικροοργανισμό του παχέος εντέρου του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών. Βρίσκεται επίσης στα έντερα πτηνών, σε ερπετά, σε αμφίβια και σε έντομα. Απεκκρίνεται σε μεγάλους αριθμούς με τα κόπρανα και είναι πάντα παρόν στο εξωτερικό περιβάλλον (έδαφος, νερό, τρόφιμα και άλλα αντικείμενα). Είναι ραβδόμορφος και προαιρετικά αναερόβιος μικροοργανισμός [8].

Μορφολογία. Η *E. coli* έχει ραβδόμορφο σχήμα (Εικόνα 4) πλάτους 1.016 έως 1.778 cm κατά πλάτος και 2.54 – 7.62 cm σε μήκος. Παρουσιάζεται ως ανεξάρτητος οργανισμός ή σε ζεύγη και χαρακτηρίζεται από πολυμορφισμό. Υπάρχουν κινητοί και μη κινητοί τύποι. Το περιεχόμενο της σε G + C στο DNA είναι 50-51 %. Τέλος, η κυτταρική της επιφάνεια έχει τριγίδια στην οποία απορροφώνται ορισμένοι φάγοι.



Εικόνα 4 Μορφολογία *E. Coli* [9].

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Ανάπτυξη. Η βέλτιστη θερμοκρασία για την ανάπτυξη είναι 30 με 37 °C [7, 10] και η βέλτιστη τιμή pH του μέσου είναι 7.2 έως 7.5. Ο οργανισμός αναπτύσσεται επίσης εύκολα σε θερμοκρασία δωματίου ενώ στους 10 και 45 °C, η ανάπτυξη γίνεται ορατή στις δύο πρώτες ημέρες. Η *E. coli* στα ψυχρόαιμα ζώα μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασία 22 - 37 °C, αλλά όχι σε 42-43 °C.

Σε στερεή καλλιέργεια (ανάπτυξη σε τρυβλίο), η *E. coli* παράγει ελαφρώς κυρτές, ημιδιαφανές, γκριζωπές αποικίες ενώ σε υγρή καλλιέργεια σχηματίζει διάχυτη θολερότητα λόγω του ιζήματος που βρίσκεται σε αιώρηση.

Αντοχή. Η *E. coli* μπορεί να επιβιώσει στο εξωτερικό περιβάλλον για μήνες. Παρουσιάζει μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε φυσικούς και χημικούς παράγοντες του εξωτερικού περιβάλλοντος σε σχέση με τα βακτήρια που προκαλούν τυφοειδή πυρετό και δυσεντερία. Παρόλα αυτά, η *E. coli* σκοτώνεται σχετικά γρήγορα από όλες τις μεθόδους και τα παρασκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση. Στους 55 °C ο οργανισμός σκοτώνεται σε 1 ώρα, ενώ σε 60 °C σε 15 λεπτά.

Η *E. coli* χρησιμοποιείται ως μικροοργανισμός για δοκιμές αποτελεσματικότητας σε απολυμαντικά, σε μεθόδους απολύμανσης καθώς και σε ορισμένα αντιβιοτικά [7].

1.4. Θρεπτικά Μέσα - Καλλιέργεια Μικροοργανισμών

Πριν ένα κύτταρο μπορέσει να αντιγραφεί, θα πρέπει να συντονίσει διάφορες χημικές αντιδράσεις και να οργανώσει πολλά διαφορετικά μόρια σε συγκεκριμένες δομές. Συλλογικά, αυτές οι αντιδράσεις καλούνται μεταβολισμός. Μεταβολικές αντιδράσεις είναι είτε καταβολικές, που σημαίνει απελευθέρωση ενέργειας, είτε αναβολικές, δηλαδή αντιδράσεις που απαιτούν ενέργεια. Ο καταβολισμός "σπάει" μοριακές δομές, απελευθερώνοντας ενέργεια και ο αναβολισμός χρησιμοποιεί ενέργεια για την κατασκευή μεγαλύτερων μορίων από μικρότερα.

Η τροφή είναι το μέρος της μικροβιακής φυσιολογίας που σχετίζεται με τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τη μικροβιακή ανάπτυξη. Διαφορετικοί οργανισμοί χρειάζονται διαφορετικά συμπληρώματα θρεπτικών ουσιών, και δεν απαιτούνται όλα τα θρεπτικά συστατικά στις ίδιες ποσότητες. Κάποια από τα θρεπτικά συστατικά, τα οποία καλούνται μακροθρεπτικά συστατικά, απαιτούνται σε μεγάλες ποσότητες, ενώ άλλα, τα οποία καλούνται ιχνοστοιχεία, είναι απαραίτητα μόνο σε μικρές ποσότητες. Όλες οι μικροβιακές θρεπτικές ουσίες είναι ενώσεις χημικών στοιχείων. Ωστόσο, μόνο ορισμένα στοιχεία κυριαρχούν στα ζωντανά συστήματα και είναι απαραίτητα: το υδρογόνο (H), το οξυγόνο (O), ο άνθρακας (C), το άζωτο (N), ο φωσφόρος (P), το θείο (S), και το σελήνιο (Se). Εκτός από αυτά, τουλάχιστον άλλα 50 στοιχεία, αν και δεν είναι τόσο απαραίτητα, μεταβολίζονται κατά κάποιο τρόπο από τους μικροοργανισμούς (Εικόνα 5).

Εκτός του νερού, το οποίο αποτελεί το 70 - 80% του υγρού βάρους ενός μικροβιακού κυττάρου, τα κύτταρα αποτελούνται κυρίως από μακρομόρια - πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και πολυσακχαρίτες. Οι πρωτεΐνες κυριαρχούν στη μακρομοριακή σύνθεση ενός κυττάρου και αποτελούν το 55% του συνολικού ξηρού βάρους του. Επιπλέον, η ποικιλία των πρωτεϊνών υπερβαίνει εκείνη όλων των άλλων μακρομορίων σε συνδυασμό. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στην Εικόνα 5 είναι από πραγματικές αναλύσεις κυττάρων *E. coli*. Συγκρίσιμα στοιχεία διαφέρουν λίγο από ένα μικροοργανισμό στο επόμενο αλλά σε κάθε μικροβιακό κύτταρο, ο άνθρακας και το άζωτο είναι σημαντικά μακροθρεπτικά συστατικά.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1. 4. 1. Βασικά στοιχεία στην κυτταρική ανάπτυξη

1. 4. 2. 1. Άνθρακας και Άζωτο

Ο άνθρακας (C) είναι το πιο βασικό στοιχείο για όλα τα κύτταρα. Τα περισσότερα προκαρυωτικά κύτταρα χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα οργανικές ενώσεις. Τα ετερότροφα βακτήρια αφομοιώνουν τις οργανικές ενώσεις και τις χρησιμοποιούν για την παραγωγή νέου κυτταρικού υλικού. Τα βακτήρια μπορούν να μεταφέρουν και να καταβολίζουν αμινοξέα, λιπαρά οξέα, οργανικά οξέα, σάκχαρα, αζωτούχες βάσεις, αρωματικές ενώσεις και αναρίθμητες άλλες οργανικές ενώσεις. Οι αυτότροφοι μικροοργανισμοί δημιουργούν τις κυτταρικές δομές τους από το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) μέσω της ενέργειας που λαμβάνεται από το ηλιακό φως. Σε ένα βακτηριακό κύτταρο υπάρχει περίπου 13% άζωτο, το οποίο περιέχεται στις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και σε διάφορα άλλα συστατικά των κυττάρων. Η διαθέσιμη ποσότητα αζώτου στη φύση βρίσκεται σε μορφή αμμωνίας (NH_3), νιτρικών αλάτων (NO_3^-), ή αέριου αζώτου (N_2). Σχεδόν όλοι οι προκαρυώτες μπορούν να χρησιμοποιήσουν την NH_3 ως πηγή αζώτου και πολλοί μπορούν επίσης να χρησιμοποιήσουν και τα NO_3^- . Αντιθέτως, το N_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο από ορισμένα βακτήρια. Τέλος, το δεσμευμένο άζωτο που υπάρχει σε οργανικές ενώσεις, όπως είναι τα αμινοξέα, μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί από τους μικροοργανισμούς και να καταβολιστεί σαν πηγή ενέργειας.

1. 4. 2. 2. Άλλα Μακροθρεπτικά Συστατικά

Εκτός από τον άνθρακα, το άζωτο, το οξυγόνο και το υδρογόνο, πολλά άλλα στοιχεία χρειάζονται στα κύτταρα αλλά σε πιο μικρές ποσότητες (Εικόνα 5). Ο φωσφόρος είναι σημαντικό στοιχείο για τα νουκλεϊκά οξέα και τα φωσφολιπίδια και προσλαμβάνεται από τα κύτταρα υπό μορφή φωσφορικών αλάτων (PO_4^{3-}). Το θείο συναντάται στα αμινοξέα κυστεΐνη και μεθειονίνη και σε ορισμένες βιταμίνες, συμπεριλαμβανομένων της θειαμίνης, της βιοτίνης και του λιποϊκού οξέως. Τα κύτταρα προμηθεύονται το θείο σε ποικίλες μορφές, όπως θειούχα (HS^-) και θειικά άλατα (SO_4^{2-}). Το κάλιο (K) απαιτείται για τη δραστηριότητα διαφόρων ενζύμων, ενώ το μαγνήσιο λειτουργεί σαν σταθεροποιητής των ριβοσωμάτων, των μεμβρανών και των νουκλεϊκών οξέων και επίσης χρησιμοποιείται σαν σταθεροποιητής διαφόρων ενζύμων. Από την άλλη το ασβέστιο (Ca) δεν απαιτείται από όλα τα είδη κυττάρων αλλά μπορεί να έχει σημαντικό ρόλο όχι μόνο στην σταθεροποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων των βακτηρίων αλλά και στην θερμική σταθερότητα των ενδοσπορίων. Το νάτριο (Na) απαιτείται από κάποιους, αλλά όχι όλους τους μικροοργανισμούς, ενώ η απαίτησή του αντανακλά συνήθως τον βióτοπό τους. Για παράδειγμα, το θαλασσινό νερό περιέχει σχετικά μεγάλες ποσότητες Na και έτσι οι θαλάσσιοι μικροοργανισμοί συνήθως απαιτούν Na για την ανάπτυξή τους. Αντιθέτως, τα είδη του γλυκού νερού είναι συνήθως ικανά να αναπτυχθούν και απουσία του Na. Το K, το Mg, το Ca, και το Na παρέχονται στα κύτταρα ως άλατα, συνήθως ως χλωρίδια ή θειικά άλατα.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Ομάδες → 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18

Περίοδοι ↓ 1 2 3 4 5 6

■ Απαραίτητα για όλους τους μικροοργανισμούς
■ Απαραίτητα κατιόντα & ανιόντα για τους περισσότερους μικροοργανισμούς
■ Ιχνοστοιχεία, σημαντικά για κάποιους μικροοργανισμούς
■ Χρησιμοποιούνται για ειδικές λειτουργίες
■ Επουσιώδη που μεταβολίζονται
■ Επουσιώδη που δεν μεταβολίζονται

(a)

Ζωτικά στοιχεία σαν ποσοστό ξηρής κυτταρικής μάζας



(b)

Μακρομοριακή σύσταση ενός κυττάρου

Μακρομόριο	Ποσοστό ξηρού βάρους
Πρωτεΐνες	55
Λιπίδια	9.1
Πόλυσακχαρίτες	5.0
Λιποπολυσακχαρίτες	3.4
DNA	3.1
RNA	20.5

(c)

Εικόνα 5 Στοιχειακή και μακρομοριακή σύσταση βακτηριακών κυττάρων (τα δεδομένα αφορούν κύτταρα *E. coli*). (a) Περιοδικός πίνακας που αφορά τα στοιχεία που μεταβολίζονται από μικροοργανισμούς. Με εξαίρεση το ουράνιο, το οποίο μπορεί να μεταβολιστεί από ορισμένους προκαρυώτες, τα στοιχεία στην 7^η περίοδο από τον πλήρη περιοδικό πίνακα των στοιχείων δεν είναι γνωστό ότι μεταβολίζονται. (b) Συνεισφορές από τα βασικά στοιχεία στο ξηρό βάρος των κυττάρων και (c) σχετική αφθονία των μακρομορίων σε ένα βακτηριακό κύτταρο [11].

Τα δεδομένα στο (c) αφορούν τα *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium* [12].

1. 4. 2. 3. Ιχνοστοιχεία

Οι μικροοργανισμοί απαιτούν πολλά μέταλλα για την ανάπτυξη τους (Εικόνα 5a). Το σημαντικότερο από αυτά είναι ο σίδηρος (Fe), το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική αναπνοή. Ο σίδηρος είναι βασικό συστατικό των κυτοχρωμάτων (σειρά ενζύμων σημαντικών για τον μεταβολισμό των κυττάρων) και των πρωτεϊνών σιδήρου-θείου που εμπλέκονται σε αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Υπό ανοξικές συνθήκες, ο σίδηρος είναι γενικά στην σιδηρούχο (Fe^{2+}) μορφή του και είναι διαλυτός. Ωστόσο, κάτω από όξινες συνθήκες, ο σίδηρος είναι τυπικά στην τρισθενή (Fe^{3+}) μορφή, ως μέρος των αδιάλυτων ανόργανων συστατικών. Για να αποκτήσουν το Fe^{3+} από τα ορυκτά, τα κύτταρα παράγουν μόρια που λειτουργούν δεσμεύοντας το Fe^{3+} ενώ έπειτα το μεταφέρουν μέσα στο κύτταρο. Ωστόσο, παρόλο που ο σίδηρος είναι σημαντικό στοιχείο για τα περισσότερα κύτταρα, μερικοί οργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν και απουσία του. Για παράδειγμα, πολλά βακτήρια γαλακτικού οξέος, όπως τα είδη του *Lactobacillus*, δεν περιέχουν ανιχνεύσιμο σίδηρο και αναπτύσσονται κανονικά απουσία του. Σε αυτούς τους οργανισμούς, το μαγγάνιο (Mn^{2+}) διαδραματίζει συχνά ένα ρόλο παρόμοιο με αυτό που αναφέρθηκε για τον σίδηρο. Πολλά άλλα μέταλλα απαιτούνται ή αλλιώς μεταβολίζονται από τους μικροοργανισμούς (Εικόνα 5a). Όπως ο σίδηρος, αυτά τα μικροθρεπτικά συστατικά ονομάζονται ιχνοστοιχεία. Τα ιχνοστοιχεία συνήθως αποτελούν συμπαράγοντες για τα ένζυμα.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1. 4. 2. 4. Μέσο Luria-Bertani

Το μέσο LB, γνωστό εσφαλμένα και ως μέσο Luria-Bertani (LB) [13, 14], Luria Broth ή Lennox Broth [13], χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάπτυξη βακτηριακών καλλιιεργειών, κυρίως επειδή είναι εύκολο στην παρασκευή του, ενώ παρέχει μια ευρεία βάση θρεπτικών ουσιών. Τα συστατικά του LB, όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, είναι η τρυπτόνη (ένα μίγμα πεπτιδίων που σχηματίζονται από την πέψη της καζεΐνης με το παγκρεατικό ένζυμο, θρυψίνη), το εκχύλισμα μαγιάς (yeast extract, ένα προϊόν autólυσης των κυττάρων ζύμης), και το χλωριούχο νάτριο (NaCl). Συντέθηκε από τον Giuseppe Bertani [15] το 1951 όταν μελετούσε τη λυσιγονία σε βακτήρια *E. coli*. Το ονόμασε "λυσιγόνο μέσο" ή LB. Αυτό το μέσο έχει σχεδιαστεί για χαμηλής πυκνότητας βακτηριακές καλλιέργειες. Είναι τα πιο κοινά μέσα που χρησιμοποιούνται έως και σήμερα για την ανάπτυξη της *E. coli* και χρησιμοποιείται επίσης για την καλλιέργεια μιας ποικιλίας προαιρετικών οργανισμών.

Συστατικά του Μέσου LB

Ένας λόγος που το LB είναι τόσο δημοφιλές είναι επειδή είναι απλό στη σύνθεσή του, ενώ χρειάζεται μόνο λίγα συστατικά: τρυπτόνη, εκχύλισμα μαγιάς και NaCl. Η τρυπτόνη, παρέχει αζώτο και διοξείδιο του άνθρακα. Το εκχύλισμα μαγιάς παρέχει βιταμίνες (συμπεριλαμβανομένων των βιταμινών B) και ορισμένα ιχνοστοιχεία. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl), προβλέπει τα ιόντα νατρίου για τις μεταφορές και για την οσμωτική ισορροπία [13].

Ιστορικά Στοιχεία για το LB

Από τη δεκαετία του 1950 το διατροφικά πλούσιο μέσο LB έχει χρησιμοποιηθεί κατακόρον για την καλλιέργεια των εντερικών βακτηρίων και για τον προσδιορισμό βακτηριοφάγων. Επιτρέπει την γρήγορη, με καλές αποδόσεις, ανάπτυξη για πολλά είδη. Υπάρχουν τρεις συνταγές για το LB: το LB Miller, το LB Lennox και το LB Luria (Πίνακας 1). Τα αναπληρωματικά σκευάσματα LB ποικίλουν συνηθώς στην ποσότητα του χλωριούχου νατρίου (NaCl) αλλά παρότι διαφέρουν μερικές φορές αναφέρονται όλα ως LB.

Πίνακας 1 Συνταγή για το LB, ανά L (σε g/L).

Συστατικά	Ποσότητα κατά Luria [16]	Ποσότητα κατά Lennox [17]	Ποσότητα κατά Miller [18]
Tryptone	10.0	10.0	10.0
Yeast Extract	5.0	5.0	5.0
Sodium Chloride (NaCl)	0.5	5.0	10.0

Ο Bertani αρχικά ονόμασε το LB ως Lysogeny Broth. Η σύγχυση, όσον αφορά το πλήρες όνομα του LB, είναι κατανοητή δεδομένης της ιστορίας των Bertani, Luria και Lennox. Ο Giuseppe Bertani ήταν μέλος του εργαστηρίου Salvador Luria στο Πανεπιστήμιο της Ιντιάνα, όταν συνέθεσε το μέσο LB. Ο Ed Lennox ήταν μέλος του εργαστηρίου Luria και εργάστηκε με τον Bertani σε μερικά από τα πρώτα πειράματα στη λυσιγονία χρησιμοποιώντας το *Shigella*. Ο Luria δημοσίευσε ένα έγγραφο το 1955 στο οποίο αντέγραψε την αρχική φόρμουλα του Bertani και έτσι το LB μερικές φορές λανθασμένα αποδίδεται στον Luria. Δηλαδή, το LB μπορεί επίσης να αναφέρεται λανθασμένα και ως Luria Broth.

Η αρχική φόρμουλα που χρησιμοποιήθηκε από τον Bertani [15, 16] είναι η εξής:

- 1.0% Bacto Tryptone (10.0g/L)
- 0.5% Yeast Extract (5.0g/L)
- 1.0% Sodium Chloride (NaCl) (10.0g/L)
- 0.1% Glucose (1.0g/L)

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Το pH ρυθμίζεται στο 7.0 με 1N NaOH. Η γλυκόζη προστίθεται αφότου αποστειρωθεί. Με την πάροδο του χρόνου, η προσθήκη της γλυκόζης καταργήθηκε από όλα τα μέσα LB.

Η αρχική φόρμουλα του LB που περιέχει 1.0% NaCl (10,0 g / L) αναφέρεται ως LB Miller [18] και είναι το πιο κοινό μέσο LB που χρησιμοποιείται σήμερα. Το 1955, ο Ed Lennox [17] μελετούσε τους μηχανισμούς σύνθεσης του DNA χρησιμοποιώντας στελέχη της *E. coli* τα οποία ήταν ευαίσθητα στην ωσμωτική πίεση. Ο Ed Lennox έκανε μία τροποποίηση στο LB ώστε να περιέχει το μισό άλας της αρχικής σύνθεσης, δηλαδή 0,5% NaCl (5,0 g / L). Αυτό το σκεύασμα αναφέρεται ως LB Lennox. Σήμερα, το LB Lennox χρησιμοποιείται για την καλλιέργεια της *E. coli* όταν χρησιμοποιούνται αντιβιοτικά ευαίσθητα στο NaCl, όπως το Blastidicin, η πυρομυκίνη και το Zeiocin. Η τρίτη φόρμουλα LB, που περιέχει τη μικρότερη ποσότητα αλατιού, αναφέρεται ως LB Luria. Η σύνθεση αυτή περιέχει 0,05% NaCl (0.5g / L). Το LB Luria χρησιμοποιείται για την απομόνωση θαλάσσιων οργανισμών, όπως το *Vibrio cholerae*. Το LB Luria πήρε το όνομά του από σεβασμό προς τον Salvador Luria.

Περιορισμοί του LB σαν Θρεπτικό Μέσο

Ενώ το LB είναι αρκετά δημοφιλές ως μέσο ανάπτυξης πολλών βακτηρίων με ερευνητικό ενδιαφέρον, είναι μια ακατάλληλη επιλογή για φυσιολογικές μελέτες, όπου η αναπαραγωγισιμότητα είναι απαιτούμενη. Μόνο βακτηριακές καλλιέργειες σε ισορροπημένη ανάπτυξη έχουν ένα μέσο μέγεθος κυττάρου και ίδια χημική σύνθεση. Αυτό επιτυγχάνεται με επαρκή χρόνο σε εκθετική ανάπτυξη. Για να συμβεί αυτό, κανένα από τα συστατικά του υγρού μέσου δεν θα πρέπει να εξαντληθεί κατά την διάρκεια της ανάπτυξης της καλλιέργειας.

Η ανάπτυξη της *E. coli* συνήθως σταματάει, ακόμη και με την παρουσία μεγάλης συνολικά συγκέντρωσης οργανικών θρεπτικών συστατικών στο LB, όταν το OD₆₀₀ φθάσει περίπου στο 2, που αντιστοιχεί σε περίπου 0.6 mg *E. coli* (ξηρό βάρος) ανά ml. Ο λόγος είναι ότι το μέσο LB παρέχει μόνο μια ελάχιστη ποσότητα υδατανθράκων, και εκπληκτικά μικρές ποσότητες άλλων πηγών άνθρακα. Η tryptone και το εκχύλισμα μαγιάς ως επί το πλείστον αποτελούνται από πεπτίδια διαφορετικού μήκους. Στην μελέτη τους σχετικά με το *Bacto Neopeptone* οι Payne και Gilvarg [17] το 1968 διαπίστωσαν ότι υπήρχε ένα σαφές όριο μεγέθους για τα πεπτίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε περίπου 650 daltons. Τα μικρότερα πεπτίδια, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ήταν μια μειοψηφία, ίσως το ένα τέταρτο του συνόλου του μίγματος. Τα ελεύθερα αμινοξέα ήταν μια ακόμη μικρότερη μειονότητα, περίπου 1% ή λιγότερο του συνόλου του παρασκευάσματος. Αν υποθέσουμε μια παρόμοια κατανομή μεγέθους για τα πεπτίδια στην τρυπτόνη και στο εκχύλισμα μαγιάς, μπορούμε να υποθέσουμε ότι η απόδοση της ανάπτυξης της *E. coli* περιορίζεται κυρίως από τις διαθέσιμες πηγές άνθρακα [14]. Το 2007, ο D'Arì και οι συνεργάτες του [19] πραγματοποίησαν μια εμπειρισταωμένη μελέτη των χαρακτηριστικών της ανάπτυξης σε μέσο LB, εξετάζοντας ειδικότερα τη φυσιολογία της *E. coli* K-12, ένα από τα πιο κοινά στελέχη που χρησιμοποιούνται στη μοριακή βιολογία σήμερα. Έδειξαν ότι πολύ νωρίς κατά την περίοδο που συνήθως θεωρείται ότι είναι εντός της εκθετικής φάσης, όταν το OD₆₀₀ έφθασε περίπου την τιμή 0.3, υπάρχει μια απότομη αλλαγή στην φυσιολογία, ενώ το μέγεθος των κυττάρων αρχίζει να μειώνεται. Η παρατήρηση αυτή δεν είναι νέα. Όπως αναγνωρίζεται από την ομάδα του D'Arì, ο Wang και Koch [20] το 1978 είχε δείξει ότι ομοίως, από πολύ νωρίς το «εκθετική» φάση ανάπτυξης, η *E. coli* σε LB αλλάζει τη συμπεριφορά της ανάπτυξής της. Η ομάδα του D'Arì προχώρησε ένα βήμα παραπέρα και πρότεινε ότι αυτό που έχει σημασία δεν είναι η γενική διαθεσιμότητα των αμινοξέων που παράγεται από την ενδοκυτταρική υδρόλυση των εισαγόμενων πεπτιδίων, αλλά η διαθεσιμότητα των αμινοξέων που εύκολα χρησιμοποιούνται ως πηγές άνθρακα. Παρά το γεγονός ότι αυτή η ερευνητική ομάδα παρακολούθησαν μόνο τα ελεύθερα αμινοξέα στο μέσο (ενώ τα κύτταρα αναμφίβολα

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

χρησιμοποιούν πεπτίδια ως επί το πλείστον), κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι κατά την διάρκεια της ανάπτυξης σε LB τα κύτταρα *E coli* υφίστανται μεταβολές λόγω του ότι αρχικά χρησιμοποιούν τα εύκολα στην πρόσληψη αμινοξέα έως ότου εξαντληθούν, ενώ μετά μεταβαίνουν στη χρήση αμινοξέων που διατίθενται δυσκολότερα.

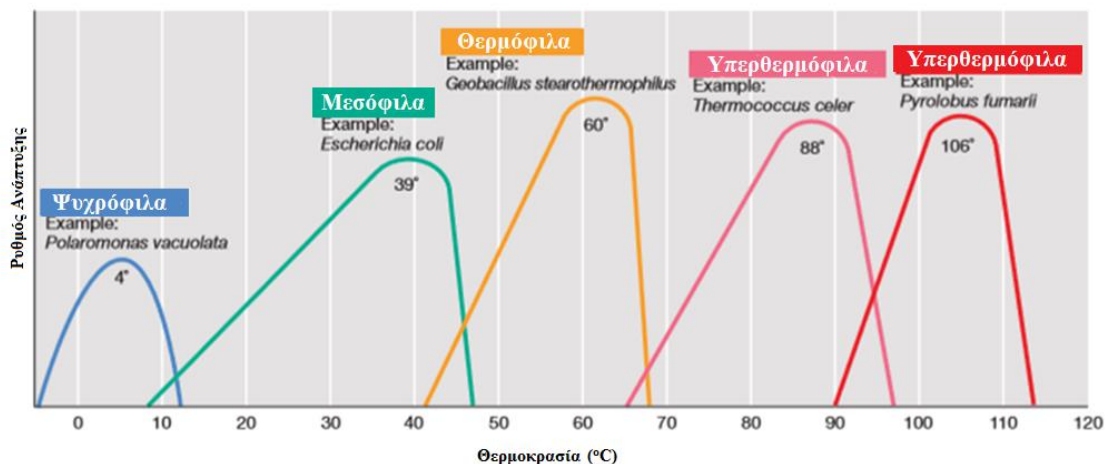
Έτσι, η έρευνα που διεξήχθη από τον D'Αγι υπογραμμίζει ότι ενώ LB είναι ένα καλό μέσο για τη συνήθη ανάπτυξη, πρέπει να αποτρέπεται η χρήση του όταν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για μελέτες στις οποίες διερευνούνται η φυσιολογική κατάσταση και οι μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων [14].

1. 4. 2. 5. Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Οι δραστηριότητες των μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένου της ανάπτυξης, επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τη χημική και τη φυσική κατάσταση του περιβάλλοντός τους. Πολλοί περιβαλλοντικούς παράγοντες επηρεάζουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, ωστόσο, τέσσερις είναι οι βασικοί: η θερμοκρασία, το pH, και η διαθεσιμότητα οξυγόνου. Ορισμένοι άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όπως η πίεση και η ακτινοβολία. Τέτοιου είδους, πιο εξειδικευμένοι, περιβαλλοντικοί παράγοντες δεν θα εξεταστούν στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία. Είναι σημαντικό για μια επιτυχή καλλιέργεια οποιουδήποτε μικροοργανισμού, τόσο το μέσο όσο και οι συνθήκες ανάπτυξης πρέπει να είναι κατάλληλα.

Θερμοκρασία και Μικροβιακή Ανάπτυξη

Η θερμοκρασία είναι ίσως ο πιο σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξη και την επιβίωση των μικροοργανισμών. Αν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή ή πολύ υψηλή, οι μικροοργανισμοί δεν είναι σε θέση να αυξηθούν και μπορεί ακόμη και να πεθάνουν [2, 4]. Οι ελάχιστες και μέγιστες θερμοκρασίες για την ανάπτυξη ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των διαφόρων μικροοργανισμών και συνήθως αντανakλούν το εύρος θερμοκρασίας και τη μέση θερμοκρασία του φυσικού περιβάλλοντός τους. Ορισμένα παραδείγματα μικροοργανισμών φαίνονται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 6).



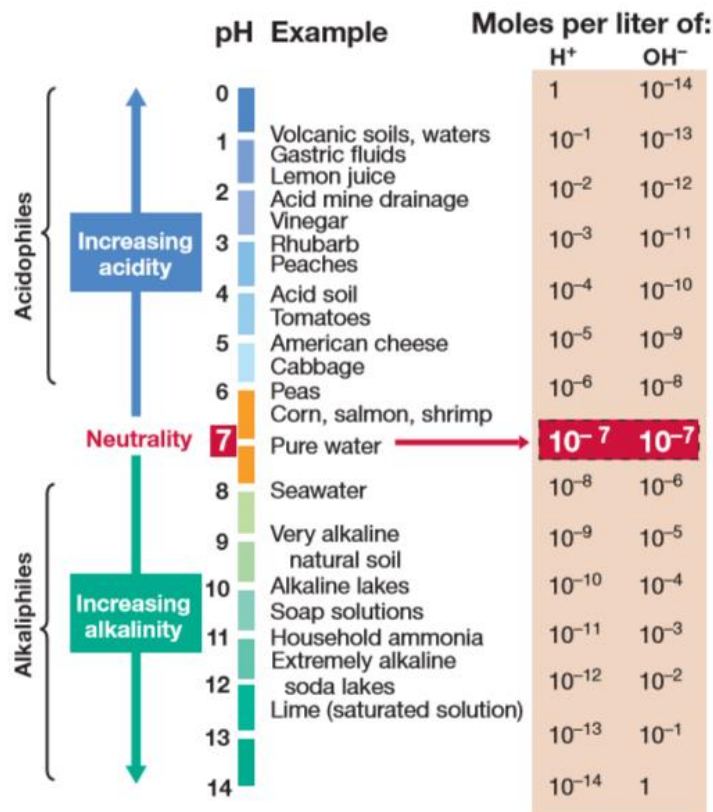
Εικόνα 6 Θερμοκρασία και ανάπτυξη σε διαφόρων μικροοργανισμών. Η βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε οργανισμού φαίνεται στο γράφημα [2].

Οξύτητα και Αλκαλικότητα

Η οξύτητα ή αλκαλικότητα ενός διαλύματος εκφράζεται από την κλίμακα pH στην οποία το pH 7 είναι το ουδέτερο (Εικόνα 7). Οι τιμές pH μικρότερες από 7 όξινες, ενώ μεγαλύτερες από 7 είναι αλκαλικές. Κάθε μικροοργανισμός έχει ένα εύρος pH εντός του οποίου είναι

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

δυνατή η ανάπτυξη και τυπικά η ανάπτυξή του είναι η βέλτιστη. Οι περισσότεροι οργανισμοί παρουσιάζουν μια καλή ανάπτυξη για 2 - 3 μονάδες pH. Τα περισσότερα φυσικά περιβάλλοντα έχουν ένα pH μεταξύ 4 και 9 [2, 4], και έτσι συνηθέστερα απαντώνται οι οργανισμοί που αναπτύσσονται σε αυτό το φάσμα. Μόνο μερικά είδη μπορούν να αναπτυχθούν σε τιμές pH χαμηλότερες από 3 ή μεγαλύτερες από 9. Στον Πίνακα 2, φαίνονται ορισμένα παραδείγματα μικροοργανισμών καθώς και το βέλτιστο pH στο οποίο αναπτύσσονται.



Εικόνα 7 Η κλίμακα pH. Αν και κάποιοι μικροοργανισμοί μπορούν και αναπτύσσονται σε πολύ χαμηλό ή πολύ υψηλό pH, το εσωτερικό των κυττάρων τους παραμένει πάντα σε ουδέτερο pH [2].

Πίνακας 2 Σχέση μικροοργανισμών με το pH [2].

Κλάση μικροοργανισμών	Κατάλληλο pH για βέλτιστη ανάπτυξη	Παράδειγμα μικροοργανισμού
Ουδετερόφιλα (pH > 5.5 και < 8)	7	<i>Escherichia coli</i>
Οξεόφιλα (pH < 5.5)	5	<i>Rhodospila globiformis</i>
	3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>
Αλκαλίφιλα (pH ≥ 8)	1	<i>Picrophilus oshirnae</i>
	8	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
	9	<i>Bacillus firmus</i>
	10	<i>Natronobacterium gregoryi</i>

Οξυγόνο και Μικροοργανισμοί

Επειδή πολλοί οργανισμοί, όπως ο άνθρωπος, απαιτούν μοριακό οξυγόνο (O₂), είναι εύκολο να υποθέσουμε ότι όλοι οι οργανισμοί απαιτούν O₂. Ωστόσο, αυτό δεν είναι αλήθεια καθώς πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν, και κάποιοι πρέπει, να αναπτύσσονται σε απόλυτη απουσία οξυγόνου.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Το οξυγόνο είναι λίγο διαλυτό στο νερό, και λόγω των συνεχών αναπνευστικών δραστηριοτήτων των μικροοργανισμών στα υδάτινα οικοσυστήματα, το O₂ μπορεί γρήγορα να γίνει εξαντληθεί. Έτσι, οι ανοξικές (O₂-free) συνθήκες επικρατούν σε οικοσυστήματα που περιλαμβάνουν λάσπες και άλλα ιζήματα, βάλτους, το υπέδαφος και πολλά άλλα περιβάλλοντα. Σε τέτοιου είδους ανοξικά οικοσυστήματα, ευδοκιμούν κυρίως προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί.

Γενικά, οι μικροοργανισμοί, όσον αφορά το οξυγόνο, διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τους αερόβιους και τους αναερόβιους. Επιπλέον, οι αερόβιοι χωρίζονται σε επιπλέον κατηγορίες, τους υποχρεωτικά αερόβιους, τους προαιρετικά αερόβιους και τους μικροαερόφιλους. Αντίστοιχα, οι αναερόβιοι διακρίνονται στους αεροανθεκτικούς και τους υποχρεωτικά αναερόβιους. Στον Πίνακα 3, φαίνονται ορισμένα παραδείγματα μικροοργανισμών και η σχέση τους με το οξυγόνο.

Πίνακας 3 Παραδείγματα μικροοργανισμών και η σχέση τους με το οξυγόνο [2].

Κατηγορία	Σχέση με το O ₂	Παράδειγμα	Οικοσύστημα
Αερόβιοι			
Υποχρεωτικά	Απαιτούμενο	<i>Micrococcus luteus</i>	Δέρμα, σκόνη
Προαιρετικά	Δεν απαιτείται, αλλά αναπτύσσονται καλύτερα παρουσία του	<i>Escherichia coli</i>	Παχύ έντερο θηλαστικών
Μικροαερόφιλοι	Απαιτείται αλλά σε επίπεδα χαμηλότερα από τα ατμοσφαιρικά	<i>Spirillum volutans</i>	Νερό λιμνών
Αναερόβιοι			
Αεροανθεκτικοί	Δεν απαιτείται και δεν αναπτύσσονται περισσότερο παρουσία του	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Άνω αναπνευστική οδός
Υποχρεωτικά	Επιβλαβές ή θανατηφόρο	<i>Methanobacterium formicicum</i>	Λύματα, ιλύς, ανοξικά ιζήματα

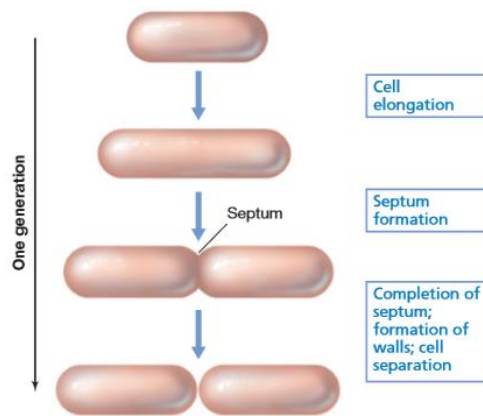
1. 5. Μικροβιακή Αύξηση - Καμπύλη Ανάπτυξης

Ο όρος αύξηση (ή ανάπτυξη) στη μικροβιολογία αναφέρεται στον πολλαπλασιασμό των μικροβιακών κυττάρων. Η αύξηση είναι μια ουσιώδης συνιστώσα της μικροβιακής λειτουργίας, λόγω του ότι κάθε κύτταρο έχει πεπερασμένο όριο ζωής στη φύση. Ως εκ τούτου, τα διάφορα είδη διατηρούνται μόνο μέσω της διαρκούς αύξησης του πληθυσμού τους.

Συγκεκριμένα για το βακτηριακό κύτταρο ισχύει ότι η ικανότητα της αύξησης αποτελεί μια σύνθετη διαδικασία, ενώ περιλαμβάνει πάνω από 2000 χημικές αντιδράσεις. Οι κύριες αντιδράσεις που οδηγούν στη σύνθεση του κυττάρου είναι ως επί το πλείστον αντιδράσεις πολυμερισμού. Στη συνέχεια, μόλις συντεθούν τα διάφορα μακρομόρια, ακολουθεί η συναρμολόγηση αυτών και ο σχηματισμός κυτταρικών δομών όπως είναι το κυτταρικό τοίχωμα.

Ο ρυθμός αύξησης είναι η μεταβολή του αριθμού των κυττάρων ή της κυτταρικής μάζας ανά μονάδα χρόνου. Κατά τη διάρκεια του κύκλου διαίρεσης, όλα τα δομικά στοιχεία του κυττάρου διπλασιάζονται. Το διάστημα κατά το οποίο σχηματίζονται δύο κύτταρα από ένα προϋπάρχον ονομάζεται γενεά και ο χρόνος που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί αυτό καλείται χρόνος γενεάς. Κατά τη διάρκεια μιας γενεάς διπλασιάζεται τόσο ο αριθμός των κυττάρων όσο και η κυτταρική μάζα.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Εικόνα 8 Δυαδική σχάση σε ραβδόμορφο προκαρυώτη. Οι αριθμοί των κυττάρων διπλασιάζονται με κάθε γενιά [2].

Ο χρόνος γενεάς για ένα συγκεκριμένο βακτηριακό είδος μπορεί να διαφέρει και εξαρτάται ισχυρά από γενετικούς παράγοντες, την διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και την θερμοκρασία. Υπό βέλτιστες συνθήκες, ο χρόνος γενεάς για μια εργαστηριακή καλλιέργεια *E. coli* είναι περίπου 20 λεπτά. Άλλα βακτήρια αναπτύσσονται πιο γρήγορα ενώ άλλα πολύ πιο αργά. Βέβαια στη φύση, η μικροβιακή ανάπτυξη είναι πολύ μικρότερη από τον μέγιστο ρυθμό ανάπτυξής τους καθώς σπάνια όλες οι συνθήκες είναι ευνοϊκές ώστε ο ρυθμός ανάπτυξης να είναι πάντα ο βέλτιστος [2].

1. 5. 1. Ο κύκλος της αύξησης

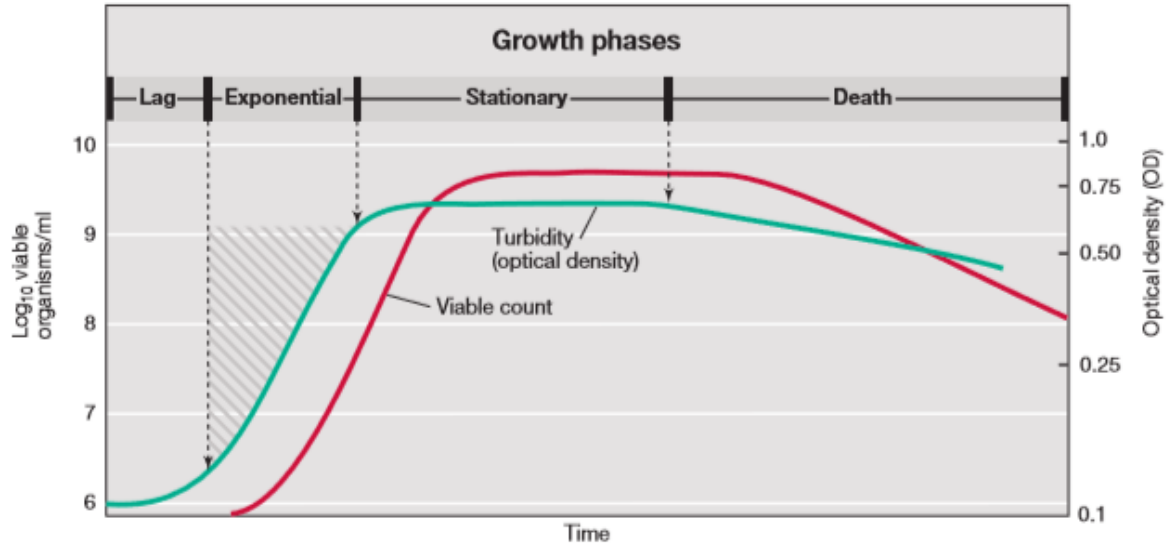
Για διάφορους λόγους, οι οποίοι δεν θα αναλυθούν στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία, ένας οργανισμός δεν μπορεί να αναπτύσσεται εκθετικά σε κάποιο κλειστό δοχείο, όπως είναι ένας δοκιμαστικός σωλήνας ή μια φιάλη, επ' αόριστον. Αντ' αυτού, μια τυπική καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού είναι αυτή απεικονίζεται στην Εικόνα 9. Η καμπύλη ανάπτυξης περιγράφει έναν ολόκληρο κύκλο ανάπτυξης και περιλαμβάνει την φάση υστέρησης, την εκθετική φάση, τη στάσιμη φάση και τέλος τη φάση θανάτου.

1. 5. 1. 1. Φάση Υστέρησης

Όταν μια μικροβιακή καλλιέργεια εμβολιάζεται σε ένα νέο μέσο, η ανάπτυξη αρχίζει συνήθως μόνο μετά από ένα χρονικό διάστημα που ονομάζεται φάση υστέρησης. Αυτό το χρονικό διάστημα μπορεί να είναι σύντομο ή να παραταθεί, ανάλογα με την ιστορία του εμβολίου και τις συνθήκες ανάπτυξης. Εάν μια εκθετικά αυξανόμενη καλλιέργεια μεταφερθεί μέσα στο ίδιο μέσο και υπό τις ίδιες συνθήκες ανάπτυξης (θερμοκρασία, εξαερισμός, κ.α), δεν υπάρχει υστέρηση και η εκθετική ανάπτυξη ξεκινά αμέσως. Ωστόσο, εάν το εμβόλιο λαμβάνεται από μια παλιά (στατική φάση) καλλιέργεια και μεταφέρεται στο ίδιο μέσο, υπάρχει συνήθως μια υστέρηση ακόμη και αν όλα τα κύτταρα στο εμβόλιο είναι ζωντανά. Αυτό συμβαίνει επειδή τα κύτταρα εξαντλούν τα διάφορα βασικά συστατικά τους και ως εκ τούτου απαιτείται χρόνος για την βιοσύνθεση τους. Καθυστέρηση στην ανάπτυξη, επίσης, συμβαίνει όταν το εμβόλιο αποτελείται από κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη (αλλά όχι απόπτωση) λόγω της θερμοκρασίας, της ακτινοβολίας ή τοξικών χημικών ουσιών, λόγω του χρόνου που απαιτείται από τα κύτταρα για την αποκατάσταση της βλάβης. Υστέρηση παρατηρείται επίσης, όταν ένας μικροβιακός πληθυσμός μεταφέρεται από ένα πλούσιο μέσο καλλιέργειας σε ένα άλλο, φτωχότερο σε θρεπτικά συστατικά. Τα κύτταρα για να αναπτυχθούν σε οποιοδήποτε μέσο καλλιέργειας πρέπει να έχουν ένα πλήρες συμπλήρωμα ενζύμων για τη σύνθεση των βασικών μεταβολιτών που δεν υπάρχουν σε αυτό το μέσο. Ως εκ

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

τούτου, κατά τη μεταφορά σε ένα μέσο όπου πρέπει να βιοσυντεθούν οι σημαντικοί μεταβολίτες, απαιτείται χρόνος για την παραγωγή των νέων ενζύμων που θα πραγματοποιήσει αυτές τις αντιδράσεις.



Εικόνα 9 Τυπική καμπύλη ανάπτυξης ενός βακτηριακού πληθυσμού [2].

1. 5. 1. 2. Εκθετική Φάση

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης κάθε κύτταρο διαιρείται για να σχηματίσει δύο κύτταρα, καθένα από τα οποία διαιρείται επίσης για να σχηματίσει δύο άλλα κύτταρα, και ούτω καθεξής, για μια σύντομη ή παρατεταμένη περίοδο, ανάλογα με τους διαθέσιμους πόρους και άλλους παράγοντες. Σε γενικές γραμμές, τα περισσότερα βακτήρια έχουν μικρότερους χρόνους διπλασιασμού από τους περισσότερους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Ο χρόνος διπλασιασμού ενός δεδομένου οργανισμού σε μια καλλιέργεια εξαρτάται από το μέσο ανάπτυξης και τις συνθήκες επώασης που χρησιμοποιούνται. Πολλά βακτήρια έχουν ελάχιστο χρόνο γενεάς περίπου 0.5 - 6 ώρες υπό βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Άλλοι ταχέως αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί έχουν χρόνο γενεάς λιγότερο από 20 λεπτά ενώ μερικοί αργά αναπτυσσόμενοι μικροοργανισμοί έχουν χρόνο γενεάς αρκετές ημέρες ή ακόμη και εβδομάδες. Τα κύτταρα που βρίσκονται στη φάση της εκθετικής ανάπτυξης είναι συνήθως στην πιο υγιή τους κατάσταση και ως εκ τούτου αυτά είναι επιθυμητά για τις μελέτες ενζύμων τους ή άλλων συστατικών τους.

Οι ρυθμοί της εκθετικής αύξησης ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό. Ο ρυθμός της εκθετικής ανάπτυξης επηρεάζεται από περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, σύνθεση του μέσου καλλιέργειας), καθώς και από τα γενετικά χαρακτηριστικά του ίδιου του οργανισμού. Σε γενικές γραμμές, τα προκαρυωτικά κύτταρα μεγαλώνουν γρηγορότερα από ότι τα ευκαρυωτικά, και οι μικροί ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί αναπτύσσονται γρηγορότερα από τους μεγάλους. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μικρά κύτταρα έχουν αυξημένη ικανότητα ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών και αποβλήτων σε σύγκριση με μεγαλύτερα κύτταρα, και αυτό το πλεονέκτημα επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ανάπτυξη και άλλες ιδιότητες τους.

1. 5. 1. 3. Στατική Φάση

Σε μια εργαστηριακή καλλιέργεια (δηλαδή, σε δοκιμαστικό σωλήνα, σε φιάλη ή σε τρυβλίο) η εκθετική ανάπτυξη είναι περιορισμένη. Διαφορετικά από ένα μόνο βακτηριακό κύτταρο με ένα χρόνο γενεάς 20 λεπτών θα παραγόταν μέσα σε 48 ώρες, αν θεωρηθεί ότι

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

αυξάνεται εκθετικά, πληθυσμός κυττάρων που θα ζύγιζε 4.000 φορές το βάρος της Γης! Αυτό είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό αν σκεφτούμε ότι ένα μόνο βακτηριακό κύτταρο ζυγίζει περίπου το ένα τρισεκατομμυριοστό (10^{-12}) του γραμμαρίου. Προφανώς, αυτό είναι αδύνατο, οπότε κάτι λαμβάνει χώρα και περιορίζει την αύξηση του πληθυσμού. Υπάρχουν δύο περιπτώσεις που εξηγούν τον περιορισμό της ανάπτυξης:

1. ένα βασικό θρεπτικό συστατικό του μέσου καλλιέργειας εξαντλείται, ή
2. ένα προϊόν αποβλήτων του οργανισμού συσσωρεύεται στο μέσο και αναστέλλει την ανάπτυξη.

Είτε έτσι είτε αλλιώς, η εκθετική αύξηση σταματάει και ο πληθυσμός φθάνει στην στατική φάση.

Στη στατική φάση, δεν υπάρχει καμία καθαρή αύξηση ή μείωση του αριθμού των κυττάρων και επομένως ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού είναι μηδέν. Παρά το γεγονός ότι ο πληθυσμός δεν μπορεί να αυξηθεί κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης, πολλές κυτταρικές λειτουργίες συνεχίζονται, συμπεριλαμβανομένων του μεταβολισμού της ενέργειας και των βιοσυνθετικών διεργασιών. Μερικά κύτταρα μπορούν ακόμη και να διαιρούνται κατά τη διάρκεια της στατικής φάσης, αλλά καμία καθαρή αύξηση του αριθμού των κυττάρων δεν λαμβάνει χώρα. Αυτό συμβαίνει επειδή μερικά κύτταρα στον πληθυσμό αυξάνονται, ενώ άλλα πεθαίνουν, και έτσι οι δύο διαδικασίες αλληλοαναιρούνται. Αυτό είναι ένα φαινόμενο που ονομάζεται κρυπτική ανάπτυξη.

1. 5. 1. 4. Φάση Απόπτωσης

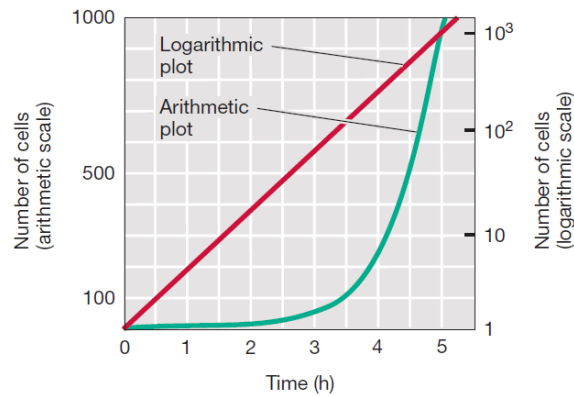
Εάν η επώαση συνεχιστεί και αφού ο πληθυσμός φθάσει στην στατική φάση, τα κύτταρα μπορεί να παραμείνουν ζωντανά και να συνεχίζουν να μεταβολίζουν, αλλά τελικά κάποια στιγμή θα πεθάνουν. Όταν συμβεί αυτό, ο πληθυσμός εισέρχεται στην φάση θανάτου του κύκλου ανάπτυξης. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο θάνατος συνοδεύεται από την πραγματική λύση των κυττάρων. Στην Εικόνα 9, φαίνεται ότι η φάση απόπτωσης του κύκλου ανάπτυξης είναι επίσης μια εκθετική συνάρτηση. Συνήθως, όμως, ο ρυθμός θανάτου των κυττάρων είναι πολύ πιο αργός από τον ρυθμό της εκθετικής ανάπτυξης.

Οι φάσεις της βακτηριακής ανάπτυξης που αναλύθηκαν παραπάνω και απεικονίζονται στην Εικόνα 9, είναι αντανάκλασεις των γεγονότων που συμβαίνουν σε έναν πληθυσμό κυττάρων και όχι σε μεμονωμένα κύτταρα. Έτσι, οι όροι φάση υστέρησης, εκθετική φάση, στάσιμη φάση και φάση απόπτωσης δεν έχουν νόημα για μεμονωμένα κύτταρα αλλά μόνο για κυτταρικούς πληθυσμούς.

1. 5. 2. Η έννοια της εκθετικής αύξησης

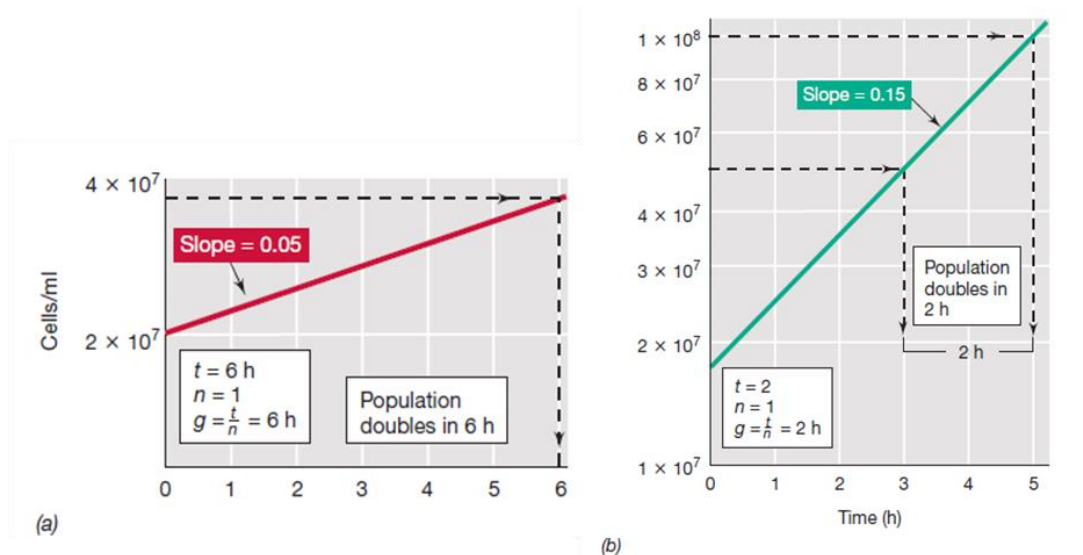
Το μοτίβο αύξησης του πληθυσμού, όπου ο αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται κατά τη διάρκεια ενός σταθερού χρονικού διαστήματος, ονομάζεται εκθετική αύξηση. Όταν ο αριθμός κυττάρων από ένα πείραμα ανάπτυξης παριστάνεται σε γράφημα με αριθμητικές (γραμμικές) συντεταγμένες ως συνάρτηση του χρόνου, λαμβάνεται μια καμπύλη με συνεχώς αυξανόμενη κλίση (Εικόνα 9).

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Εικόνα 10 Ρυθμός ανάπτυξης μιας μικροβιακής καλλιέργειας. Τα δεδομένα παρουσιάζονται σε αριθμητική (αριστερά τεταγμένη) και λογαριθμική (δεξιά τεταγμένη) κλίμακα.

Αντιθέτως, όταν ο αριθμός των κυττάρων σχεδιάζεται σε λογαριθμική (\log_{10}) κλίμακα λαμβάνουμε ένα ημιλογαριθμικό διάγραμμα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 10** (κόκκινη γραμμή) και τα σημεία βρίσκονται σε μια ευθεία γραμμή. Αυτή η ευθεία γραμμή αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι τα κύτταρα αυξάνονται εκθετικά και ο πληθυσμός διπλασιάζεται σε ένα σταθερό χρονικό διάστημα. Τα ημιλογαριθμικά γραφήματα είναι επίσης βολικά στη χρήση για την εκτίμηση του χρόνου γενεάς μιας μικροβιακής καλλιέργειας από ένα σύνολο στοιχείων ανάπτυξης. Οι χρόνοι διπλασιασμού μπορούν να διαβαστούν απευθείας από το διάγραμμα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 11**. Για παράδειγμα, επιλέγουμε δύο σημεία επί της καμπύλης που εκπροσωπούν τον διπλασιασμό των κυττάρων στον άξονα Y και φέρνουμε κάθετες γραμμές, που προέρχονται από τα σημεία αυτά, ώστε να τέμνουν τον άξονα X. Το χρονικό διάστημα που μετράται στον άξονα X είναι ο χρόνος γενεάς (**Εικόνα 11b**).



Εικόνα 11 Υπολογισμός των παραμέτρων της μικροβιακής ανάπτυξης [2].

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης, η αύξηση του αριθμού των κυττάρων είναι αρχικά μάλλον αργή, αλλά αυξάνει με ολοένα ταχύτερο ρυθμό. Σε μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης, αυτό οδηγεί σε μια εκρηκτική αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Έτσι, σε μια ενεργά αυξανόμενη βακτηριακή καλλιέργεια, οι αριθμοί των κυττάρων μπορεί να είναι πολύ μεγάλοι πολύ γρήγορα.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

1. 5. 3. Τα μαθηματικά της εκθετικής ανάπτυξης

Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων σε μια εκθετικά αναπτυσσόμενη καλλιέργεια βακτηρίων προσεγγίζει μια γεωμετρική πρόοδο του αριθμού 2. Υπάρχει σταθερή σχέση μεταξύ του αρχικού αριθμού των κυττάρων σε μια καλλιέργεια και τον αριθμό που υπάρχει μετά από μια περίοδο εκθετικής ανάπτυξης, και αυτή η σχέση μπορεί να εκφραστεί μαθηματικά ως

$$N = N_0 2^n \quad (1)$$

όπου N είναι ο τελικός αριθμός των κυττάρων, N_0 είναι ο αρχικός αριθμός κυττάρων και το n είναι ο αριθμός των γενεών κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης. Ο χρόνος γενεάς (g) του εκθετικά αυξανόμενου πληθυσμού είναι t / n , όπου t είναι η διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης που εκφράζεται σε ημέρες, ώρες ή λεπτά. Γνωρίζοντας τους αρχικούς και τελικούς αριθμούς κυττάρων σε έναν εκθετικά αυξανόμενο πληθυσμό κυττάρων, είναι δυνατόν να υπολογιστεί ο αριθμός των γενεών αλλά και ο χρόνος γενεάς.

Η εξίσωση (1) μπορεί να εκφραστεί συναρτήσει του n ως εξής:

$$N = N_0 2^n$$

$$\log N = \log N_0 + n \log 2$$

$$\log N - \log N_0 = n \log 2$$

$$n = \frac{\log N - \log N_0}{\log 2} = 3.3(\log N - \log N_0)$$

Ο χρόνος γενεάς, πέρα από τον τρόπο προσδιορισμού που αναφέρθηκε, μπορεί να προσδιοριστεί από την κλίση της ευθείας που λαμβάνεται από το ημιλογαριθμικό διάγραμμα της εκθετικής ανάπτυξης. Η κλίση είναι ίση με $0.301 n/t$ (ή $0,301/g$). Ο όρος $0.301/g$ ονομάζεται μέγιστος ειδικός ρυθμός ανάπτυξης, ή συντομογραφικά μ_{\max} . Άλλη μια χρήσιμη έκφραση ανάπτυξης είναι το αντίστροφο του χρόνου γενεάς, που ονομάζεται ρυθμός διαίρεσης, σε συντομογραφία ν . Ο ρυθμός διαίρεσης ισούται με $1/g$ και έχει μονάδα μέτρησης αντίστοιχη του χρόνου (h^{-1}). Ενώ το g είναι ένα μέτρο του χρόνου που χρειάζεται για ένα πληθυσμό να διπλασιάσει τον αριθμό των κυττάρων του, το ν είναι μέτρο του αριθμού των γενεών ανά μονάδα χρόνου σε μια εκθετικά αυξανόμενη καλλιέργεια.

Γνωρίζοντας όλες αυτές τις σταθερές που περιγράφηκαν ανωτέρω για ένα συγκεκριμένο είδος μικροοργανισμού, μπορεί κανείς να βελτιστοποιήσει τις συνθήκες καλλιέργειας για ένα συγκεκριμένο οργανισμό ή/και να εξετάσει την θετική ή αρνητική επίδραση κάποιου υλικού επί της βακτηριακής καλλιέργειας. Για παράδειγμα, σε σύγκριση με ένα αμετάβλητο δείγμα ελέγχου, μπορούν να αναγνωριστούν οι παράγοντες που διεγείρουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη μετρώντας την επίδρασή τους στις διάφορες παραμέτρους ανάπτυξης που συζητήθηκαν.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] C. C. Ping, "Science Year 5," 2012. [Online]. Available: <http://chaucp.blogspot.gr/2012/11/types-of-microorganisms.html>. [Accessed 20 06 2015].
- [2] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl and D. P. Clark, Brock Biology of Microorganisms, San Francisco: Pearson Education Inc., 2012.
- [3] O. Rahn, *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene*, vol. 96, pp. 237-286, 1937.
- [4] C. Baylis, M. Uyttendaele, H. Joosten and A. Davies, "The enterobacteriaceae and their significance to the food industry," ILSI Europe a.i.s.b.l., Brussels, 2011.
- [5] C. L. Baylis, C. W. Penn, N. M. Thielman, R. L. Guerrant, C. Jenkins and S. H. Gillespie, "Escherichia coli and Shigella spp.," in *In Principles and Practice of Clinical Bacteriology*, 2nd Edition ed., London, John Wiley & Sons Ltd, 2006, pp. 347-365.
- [6] M. Walters and V. Sperandio, "Quorum sensing in Escherichia coli and Salmonella," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 296, p. 125, 2006.
- [7] J. M. Janda and S. L. Abbott, "The Family Enterobacteriaceae," in *Practical Handbook of Microbiology*, E. Goldman and L. H. Green, Eds., New York, CRC Press, 2009, pp. 217-224.
- [8] H. J. Rehm, Industrielle Mikrobiologie, Heidelberg: Springer-Verlag, 1980.
- [9] M. Clark, "Food Safety News," 2009. [Online]. Available: <http://www.foodsafetynews.com/2013/03/hawaii-reports-e-coli-outbreak-on-oahu/#.VWsTzs-qqkp>. [Accessed 31 May 2015].
- [10] M. P. Doyle and J. L. Schoeni, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 48, pp. 855-856, 1984.
- [11] K. M. Fagerbakke, M. Heldal and S. Norland, "Content of carbon, nitrogen, oxygen, sulfur and phosphorus in native aquatic and cultured bacteria," *Aquat. Microb. Ecol.*, vol. 10, pp. 15-27, 1996.
- [12] F. Hutchinson, "Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology," in *Mutagenesis*, 2nd ed., F. C. Neidhardt, Ed., Washington, D.C., ASM Press, 1996, p. 2218-2235.
- [13] Teknova, "Teknova - science matters," 2015. [Online]. Available: <http://www.teknova.com/Articles.asp?ID=265>. [Accessed 07 08 2015].
- [14] H. Nikaido, "The Microbe Blog," American Society For Microbiology, 2014. [Online]. Available: <http://schaechter.asmblog.org/schaechter/2009/11/the-limitations-of-lb-medium.html>. [Accessed 07 08 2015].
- [15] G. Bertani, *J. Bacteriol.*, vol. 62, p. 293, 1951.
- [16] S. E. Luria and J. W. Burrous, *J. Bacteriol.*, vol. 74, pp. 461-476, 1955.
- [17] E. S. Lennox, *Virology*, vol. 1, pp. 190-206, 1955.
- [18] J. H. Miller, Experiments in molecular genetics, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1972.
- [19] R. D'Ari, G. Sezonov and D. Joseleau-Petit, *J. Bacteriol.*, vol. 189, pp. 8746-8749, 2007.
- [20] C. H. Wang and A. L. Koch, *J. Bacteriol.*, vol. 136, pp. 969-975, 1978.

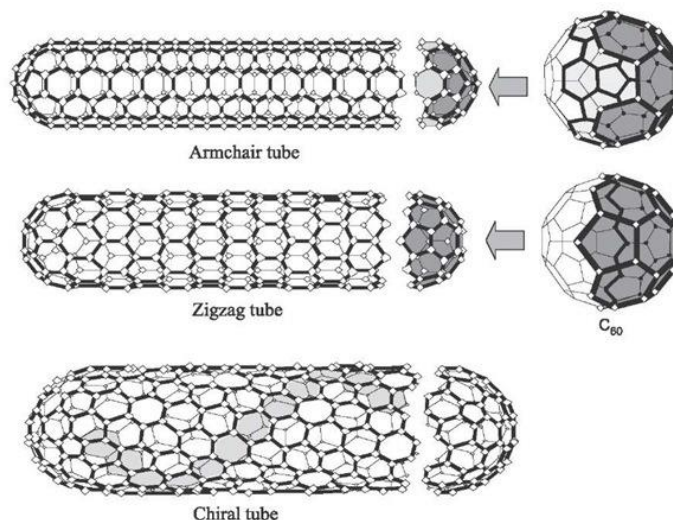
ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ (CARBON NANOTUBES, CNTS)

2. 1. Ιστορική Αναδρομή

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) αποτελούν τα πιο σημαντικά και πιο μελετημένα νανοϋλικά. Είναι μια αλλοτροπική μορφή άνθρακα παρεμφερής με το φουλερένιο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12. Ανακαλύφθηκαν το 1991 από τον S. Iijima [1] κατά τη μελέτη του σχηματισμού φουλερενίων από νεφοποιημένο άνθρακα που προερχόταν από θερμαινόμενο γραφίτη, μέσω της μεθόδου εκκένωσης τόξου (arch – discharge process) [1]. Στη συνέχεια, οι Ebbsesen και Ajayan από την εργαστηριακή ομάδα του Iijima απέδειξαν ότι τα CNTs μπορούν κάλλιστα να παραχθούν σε μεγάλες ποσότητες, μεταβάλλοντας τις συνθήκες εξάχνωσης του γραφίτη [2].

2. 2. Εισαγωγή στους Νανοσωλήνες Άνθρακα

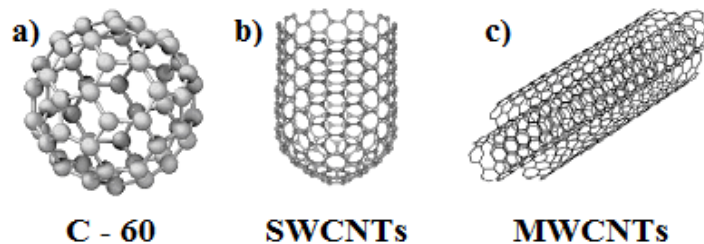
Οι νανοσωλήνες είναι αναδιπλωμένα φύλλα όμοια με του γραφίτη, το κυλινδρικό τμήμα των οποίων αποτελείται αποκλειστικά από εξαγωνικούς δακτυλίους, ενώ τα άκρα κλείνουν με τη συμμετοχή και των πενταγώνων. Σε ορισμένες περιπτώσεις τα άκρα έχουν ημισφαιρικό σχήμα, σαν το μισό του μορίου του φουλερενίου (Εικόνα 13). Συνηθέστερα, όμως, έχουν επίπεδη μορφή, με ένα δακτύλιο από πεντάγωνα στο όριο μετάβασης προς το κυλινδρικό τμήμα του μορίου. Οι πολλαπλοί τρόποι αναδίπλωσης του γραφιτικού φύλλου προς τον σχηματισμό του κυλινδρικού τμήματος του σωλήνα δίνουν διαφορετικές δομές σωλήνων [3], όπως φαίνεται και στην Εικόνα 12.



Εικόνα 12 Οι τρεις δυνατές δομές των SWNTs (a) armchair, (b) zig-zag, και (c) chiral [4].

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Υπάρχουν δύο ειδών CNTs: μονού τοιχώματος (SWCNTs) και πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs). Τα SWCNTs έχουν ένα κυλινδρικό κέλυφος με πάχος όσο αυτό ενός μόνο ατόμου και μπορούν να θεωρηθούν σαν τη θεμελιώδη δομική μονάδα. Η διάμετρός τους μπορεί να κυμαίνεται από 0.4 έως 3.0 nm [5]. Τα MWCNTs αποτελούνται από ομοαξονικούς κυλίνδρους με μήκος δέκατα του μικρομέτρου, αλλά διαμέτρους οι οποίες έχουν συνήθως τιμές από 2-100 nm [6]. Οι διαδοχικές ομοαξονικές κυλινδρικές επιφάνειες απέχουν μεταξύ τους 3.4 Å, τιμή ελαφρώς μεγαλύτερη από την απόσταση των φύλλων γραφίτη που είναι 3.35 Å. Η διαφορά αυτή αποδόθηκε από τον Iijima στον συνδυασμό της καμπυλότητας του γραφιτικού φύλλου και στις ασθενέστερες δυνάμεις van der Waals που ασκούνται ανάμεσα στους διαδοχικούς κυλίνδρους [7].



Εικόνα 13 a) Φουλερένιο (C – 60), b) Μονοφλοιικοί νανοσωλήνες άνθρακα (SWCNTs) c) Πολυφλοιικοί νανοσωλήνες άνθρακα (MWCNTs) [8].

Η αύξηση του εμπορικού ενδιαφέροντος και η μαζική παραγωγή των CNTs, που ήδη έχει αρχίσει να συμβαίνει, έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη πιθανότητα για αλληλεπίδραση των CNTs με τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Έτσι, η κατανόηση των τοξικολογικών και περιβαλλοντικών επιπτώσεων των CNTs είναι καθοριστικής σημασίας για την εφαρμογή αυτών των υλικών [9].

Πρώιμες μελέτες έχουν δείξει ότι το μέγεθος και η επιφάνεια των CNTs είναι σημαντικά χαρακτηριστικά του υλικού από τοξικολογική άποψη [9, 10, 11, 12]. Καθώς το μέγεθος των CNTs μειώνεται, η ειδική επιφάνεια αυξάνει, οδηγώντας σε αυξημένη δυνατότητα για αλληλεπίδραση και πρόσληψη από τα ζωντανά κύτταρα. Αυτό το χαρακτηριστικό θα μπορούσε να οδηγήσει σε δυσμενείς βιολογικές επιδράσεις που διαφορετικά δεν θα ήταν δυνατόν με το ίδιο υλικό σε μία μεγαλύτερη μορφή [9, 11]. Για παράδειγμα, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα SWNTs εμφανίζουν σημαντική κυτταροτοξικότητα σε κύτταρα ανθρώπων [13, 14] και ζώων [15, 16], ενώ τα MWCNTs παρουσιάζουν πιο ήπια τοξικότητα [11]. Ωστόσο, τα διάφορα αποτελέσματα από μελέτες κυτταροτοξικότητας με CNTs και άλλα νανοϋλικά είναι συχνά αντιφατικά. Αυτό οφείλεται πιθανόν στη χρήση CNTs διαφορετικής καθαρότητας και τροποποίησης [16, 17, 18], όπως επίσης στη χρήση διαφορετικών μέσων κυτταρικής καλλιέργειας [19] αλλά και στη χρήση διαφορετικών κυτταρικών τύπων [20] (π.χ. ευκαρυωτικά κύτταρα, βακτήρια, κτλ.). Έτσι, όπως γίνεται κατανοητό, ο καθαρισμός και ο πλήρης φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των CNTs πριν από τη δοκιμή της τοξικότητας τους είναι αναγκαίος.

Παρά τη γενική συμφωνία σχετικά με την πιθανή τοξικότητα των CNTs, ο μηχανισμός τοξικότητας εξακολουθεί να μην είναι εξακριβωμένος. Οι μηχανισμοί που προτείνονται αυτή τη στιγμή αναφέρονται σε επόμενη παράγραφο. Ωστόσο, οι ακριβείς μηχανισμοί για την βακτηριακή απενεργοποίηση παρουσία των CNTs δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή επειδή οι μηχανισμοί κυτταροτοξικότητας που προέρχονται από μοντέλα ανθρωπίνων κυττάρων / ζώων μπορεί να είναι διαφορετικοί από αυτή των μικροβιακών μοντέλων [21].

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Η ποικιλομορφία των δειγμάτων των CNTs που χρησιμοποιείται για εμπορικές εφαρμογές περιπλέκει τις προσπάθειες για τον εντοπισμό και τη μείωση των ανθρώπινων και περιβαλλοντικών επιπτώσεων. Προηγούμενες εκτιμήσεις τοξικότητας έκαναν διάκριση μεταξύ μονού τοιχώματος και πολλαπλών τοιχωμάτων νανοσωλήνες [11, 19, 22, 23, 12], αλλά μόνο λίγοι έχουν ερευνήσει τα αποτελέσματα των φυσικοχημικών τροποποιήσεων [18, 24, 25, 26]. Ο Tian και η ομάδα του [25] διερεύνησαν την κυτταροτοξικότητα σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς για ένα ευρύ φάσμα ανθρακώχων υλικών της νανοκλίμακας, συμπεριλαμβανομένων των SWCNTs, τον ενεργοποιημένο άνθρακα, την αιθάλη, των MWCNTs και του γραφίτη. Τα συμπεράσματά τους υποστηρίζουν ότι η επιφάνεια και η χημεία της επιφάνειας είναι καθοριστικοί παράγοντες τοξικότητας. Ο Sayes και η ομάδα του [24] πραγματοποίησαν *in vitro* πειράματα κυτταροτοξικότητας σε καλλιιεργημένα στο εργαστήριο ανθρώπινων δερματικών ινοβλαστώματα για τη διαλεύκανση των επιδράσεων διαφόρων βαθμών τροποποίησης με προσθήκη καρβοξυλομάδων επί των SWCNTs. Δυστυχώς, αυτές οι μελέτες δεν επεκτάθηκαν ώστε να περιλαμβάνουν εναλλακτικές διαδρομές τροποποίησης ή την ανίχνευση της κυτταροτοξικότητας εναλλακτικών τάξεων των CNTs, όπως τα MWCNTs. Επιπλέον, η τροποποίηση των CNTs επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τη διασπορά τους σε υγρό μέσο αλλά και το μήκος τους, και έτσι η ικανότητα των ερευνητών να διαφοροποιούν κάθε φορά τις επιπτώσεις της χημείας των επιφανειών από την κατάσταση συσσωμάτωσης και τις φυσικές ιδιότητες είναι αμφισβητήσιμη [25, 26].

Με δεδομένο το κόστος και την πολυπλοκότητα της εκτίμησης της τοξικότητας για κάθε πιθανό δείγμα CNT, γενικές συσχετίσεις μεταξύ της κυτταροτοξικότητας και των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των νανοσωλήνων θα είναι θεμελιώδης για χαμηλού κινδύνου εμπορικές εφαρμογές των νανοϋλικών. Οι συσχετίσεις αυτές, βέβαια, απαιτούν τον ταυτόχρονο χαρακτηρισμό των υλικών και τη χρήση στανταρισμένων δοκιμασιών για τη μελέτη της τοξικότητας. Οι προσεκτικά τεκμηριωμένες και σαφώς καθορισμένες μελέτες είναι επίσης χρήσιμες για την κατανόηση του μηχανισμού τοξικότητας των νανοϋλικών.

Η παράλειψη των φυσικοχημικών δεδομένων χαρακτηρισμού περιπλέκει τις προσπάθειες για σύγκριση των αποτελεσμάτων τοξικότητας μεταξύ των ερευνητικών μελετών [11, 19, 23, 12]. Τα νανοϋλικά συχνά δεν είναι καλά χαρακτηρισμένα προ των πειραμάτων τοξικότητας, ενώ τα αποτελέσματα της τοξικότητας παρέχουν μικρή κατεύθυνση για τον "πράσινο" σχεδιασμό των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα.

2. 3. Χρήσεις των νανοσωλήνων άνθρακα και αντιμικροβιακή δράση

Η ισχυρή αντιμικροβιακή δράση που παρουσιάζουν κάποια είδη CNTs αποτελεί κίνητρο για τους ερευνητές για τη μελέτη διαφόρων πιθανών εφαρμογών τους. Η γενική στρατηγική είναι να χρησιμοποιηθούν τα CNTs ως δραστικά δομικά στοιχεία για να σχηματίσουν νανοσύνθετα με διάφορες επιθυμητές μορφολογίες και λειτουργίες, οι οποίες μπορεί να είναι κατάλληλες για ειδικούς σκοπούς. Στη συνέχεια αναλύονται κάποιες πιθανές χρήσεις τους, όπως τα φίλτρα ή οι αντιρρυπαντικές επιφάνειες, τα αντιμικροβιακά νανοσύνθετα πολυμερών με CNTs ή ακόμα η στοχευμένη αντιμικροβιακή δράση.



Εικόνα 14 Πρωτότυπο φορητό φίλτρο νερού το οποίο περιέχει πλέγμα τροποποιημένων CNTs [27].

2. 3. 1. Φίλτρα και αντιρρυπαντικές επιφάνειες

Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην εφαρμογή των CNTs για την απολύμανση του νερού. Όταν τα CNTs εισάγονται σε ένα υδάτινο περιβάλλον, δύναται να αδρανοποιήσουν τα βακτήρια [28]. Συγκεκριμένα, επιφάνειες στις οποίες είχε εναποτεθεί στρώμα από SWCNTs βρέθηκαν να είναι σε θέση να αναστείλλουν τον σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ [29]. Τα βακτήρια και οι ιοί μπορούν επίσης να απομακρυνθούν αποτελεσματικά από τα φίλτρα μεμβράνης που περιέχουν SWCNTs ή MWCNTs [30, 31, 32, 33]. Έτσι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σαν φίλτρα καλής απόδοσης για βιομηχανική χρήση. Επιπλέον, η εισαγωγή MWCNTs σε μεμβράνες επηρεάζει το πορώδες και το μέσο μέγεθος των πόρων. Μειώνεται δε την τραχύτητα της επιφάνειας. Έτσι, δύναται να χρησιμοποιηθούν σαν πρόσθετα σε ναυπηγικές επιστρώσεις αφού αυξάνουν την απόδοση και το χρόνο ζωής των αντιρρυπαντικών επιστρώσεων [34].

2. 3. 2. Νανοσύνθετα CNT - πολυμερών με αντιμικροβιακή δράση

Διάφορα σύνθετα CNT-πολυμερών έχουν μελετηθεί για τις πιθανές αντιμικροβιακές βιοϊατρικές εφαρμογές τους. Για παράδειγμα, έχει κατασκευαστεί μικροπορώδες φιλμ που αποτελείται από SWCNTs και πολυβινυλοπυρρολιδόνη του ιωδίου (PVPI) για εφαρμογή του σαν αντισηπτικός επίδεσμος [35]. Το ιώδιο με την αντισηπτική δράση ήταν διαθέσιμο στην επιφάνεια των SWCNTs τα οποία ήταν ενσωματωμένα σε πολυμερές, και αυτό το φιλμ παρουσίασε υψηλή αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι στο βακτήριο *E. coli*. Ο Aslan και οι συνεργάτες του [36] διέσπειραν SWCNTs σε πολυ (γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA), για να σχηματίσουν λεπτές μεμβράνες. Οι μεμβράνες SWCNT-PLGA μείωσαν αποτελεσματικά την βιωσιμότητα των *E. coli* και *S. epidermidis*. Οι Schiffman και Elimelech [37] ενσωμάτωσαν, αντίστοιχα, SWCNTs σε πολυμερές τα οποία εμφάνισαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι της *E. coli*. Το ποσοστό θνησιμότητας των βακτηρίων αυξήθηκε από 18 σε 76%, όταν η περιεκτικότητα σε SWCNTs αυξήθηκε από 0.1 σε 1.0 % κατά βάρος. Επίσης, ο Nepal και οι συνεργάτες του [38] κατασκεύασαν πολυλειτουργικό βιομημητικό φιλμ αποτελούμενου από SWCNT, DNA και λυσοζύμη. Αυτή η σύνθετη μεμβράνη, με υψηλό μέτρο ελαστικότητας κατά Young και ελεγχόμενη μορφολογία, έδειξε εξαιρετική μακροχρόνια αντιμικροβιακή δράση.

2. 3. 3. Στοχευμένη αντιμικροβιακή δράση

Σε δυνητικά αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι επιθυμητό τα CNTs να μπορούν να αναγνωρίσουν τα επιβλαβή μικρόβια και να μην παρουσιάζουν τοξικές επιδράσεις σε άλλα κύτταρα ή οργανισμούς. Τα CNTs έχουν συχνά μελετηθεί ως εργαλείο για τη μεταφορά και την κυτταρική μετατόπιση θεραπευτικών μορίων [39, 40]. Για παράδειγμα, τα CNTs έχουν μελετηθεί εντατικά για τη στοχευμένη χορήγηση φαρμάκων σε καρκινικά κύτταρα [41, 42, 43]. Ωστόσο, λίγες μελέτες έχουν διερευνήσει την στοχευμένη αντιμικροβιακή δράση μη τροποποιημένων ή επιφανειακά τροποποιημένων CNTs παρουσία μικροβιακών και άλλου είδους κυττάρων. Μια πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι ένα συζυγές τροποποιημένων CNTs και αμφοτερικίνης B παρουσίασαν ισχυρή αντιμικροβιακή δραστηριότητα χωρίς σημαντικές τοξικές επιδράσεις σε κύτταρα Jurkat [44, 45]. Σε αυτή τη μελέτη, τροποποιημένα CNTs χρησιμοποιήθηκαν ως φορέας της αμφοτερικίνης B και όχι κάποιου δραστικού αντιμικροβιακού παράγοντα. Αναμένεται ότι περισσότερη έρευνα θα διεξαχθεί επί τη στοχευμένη αντιμικροβιακή δράση των CNTs στο εγγύς μέλλον. Διάφορες νέες μέθοδοι τροποποίησης διαδραματίζουν ουσιαστικό ρόλο στην παραγωγή και τον έλεγχο της στοχευμένης αντιμικροβιακής δράσης των CNTs.

2. 4. Αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων

Για να γίνει κατανοητή η επίδραση των CNTs στους διάφορους μικροοργανισμούς, είναι απαραίτητη η επιλογή κατάλληλων μεθόδων εκτίμησης της κυτταρικής βιωσιμότητας. Γενικά, είναι διαθέσιμες ποικίλες μέθοδοι για την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών, η καθεμία θεωρώντας διαφορετικές ενδείξεις για το τι συνιστά «βιώσιμο» ένα κύτταρο. Η ακόλουθη εικόνα απεικονίζει μια ποικιλία ενδείξεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων [46], όπως είναι η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, η μεταβολική δραστηριότητα, ο ρυθμός αναπαραγωγής των κυττάρων [47] και το δυναμικό της μεμβράνης. Μέθοδοι που προσδιορίζουν ποιοτικά και ποσοτικά τους παράγοντες αυτούς, ως εκ τούτου, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης των CNTs.



Εικόνα 15 Ενδείξεις για την εκτίμηση της κυτταρικής βιωσιμότητας [46].

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Ωστόσο, πρέπει να τονιστεί ότι δεν είναι όλες οι μέθοδοι κατάλληλες για τέτοιου είδους μελέτες. Οι έρευνες των προηγούμενων ετών χρησιμεύουν ως προειδοποίηση για εκείνους που πρόκειται να ξεκινήσουν νέα έρευνα στον τομέα αυτό. Πολλές τάξεις των CNTs έχουν ιδιότητες που είναι κακώς χαρακτηρισμένες. Ως εκ τούτου, είναι σημαντικό να εξασφαλιστεί ότι τα CNTs που μελετώνται δεν θα παρεμβαίνουν στην μέθοδο που χρησιμοποιείται [48]. Συνιστάται πλήρης χαρακτηρισμός των CNTs, συμπεριλαμβανομένων ιδιοτήτων, όπως είναι η κατανομή μεγέθους, η επιφάνεια, η χημεία των επιφανειών, η διαλυτότητα και η κατάσταση συσσωμάτωσης, ενώ είναι σημαντικό να έχουν προσδιοριστεί πριν από τη διεξαγωγή των πειραμάτων τοξικότητας [49].

Αν και οι ερευνητές έχουν εφαρμόσει με επιτυχία διάφορες μεθόδους, η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών μελετών παραμένει μια πρόκληση. Η έρευνα σε αυτόν τον τομέα είναι ακόμα σε πρώιμο στάδιο και επιπλέον δεν έχουν καθιερωθεί ακόμα τυποποιημένες διαδικασίες για την αξιολόγηση της τοξικότητας των νανοσωλήνων άνθρακα [49]. Οι μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες των διαφόρων ειδών CNTs αποτελούν επίσης μια πρόκληση. Μια μέθοδος που δουλεύει για έναν τύπο CNT μπορεί να είναι ακατάλληλη για ένα άλλο.

Επιτυχείς μέθοδοι έχει βρεθεί ότι είναι αυτές οι οποίες αξιολογούν την κυτταρική ακεραιότητα και την μεταβολική δραστηριότητα ως ενδείξεις της βιωσιμότητας. Η έρευνα σε αυτό το θέμα έχει πρωτοπορήσει αρκετά στις μέρες μας και περιλαμβάνει τη χρήση μιας ποικιλίας μεθόδων, προκειμένου να εξασφαλιστούν αξιόπιστα και έγκυρα αποτελέσματα. Σε τέτοιου είδους έρευνες συχνά μελετάται η ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης. Επίσης, συχνά χρησιμοποιούνται σε τέτοια πειράματα η μικροσκοπία φθορισμού και ο ποσοτικός προσδιορισμός των νουκλεϊκών οξέων [50, 21]. Επιπλέον, οι αλλαγές στη μεταβολική δραστηριότητα και την γενετική έκφραση έχουν διερευνηθεί μέσω μικροσκοπίας φθορισμού και μεθόδων μικροσυστοιχίων, αντίστοιχα [21]. Οι παραδοσιακές μέθοδοι επίστρωσεων, δηλαδή η ανάπτυξη καλλιέργειας σε τρυβλία, είναι χρήσιμες για την ποσοτική εκτίμηση της τοξικότητας, και παρέχουν μια πιο ολοκληρωμένη ένδειξη της βιωσιμότητας των κυττάρων [51, 52]. Ωστόσο, δεν προσφέρουν μια ολοκληρωμένη εικόνα για τους μηχανισμούς τοξικότητας. Άλλες μελέτες έχουν διερευνήσει την απόκλιση από μία πρότυπη καμπύλη μικροβιακής ανάπτυξης ως ένδειξη της μείωσης της βιωσιμότητας [53, 54].

Κάθε μία από τις προαναφερθείσες τεχνικές διαθέτει μοναδικά οφέλη για την κατανόηση του μηχανισμού της τοξικότητας των CNTs, αλλά όταν χρησιμοποιούνται αποσπασματικά, καθιστούν την εικόνα της αλληλεπίδρασης μικροοργανισμών - CNT ατελή. Με τη χρήση πολλαπλών προσεγγίσεων σε μια ενιαία μελέτη, οι ερευνητές θα είναι σε θέση να επαληθεύσουν την συνέπεια των αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων μεθόδων.

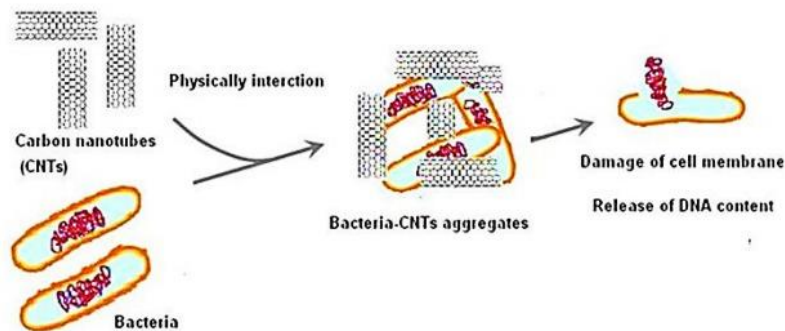
2. 5. Επίδραση των νανοσωλήνων άνθρακα σε μικροοργανισμούς

Τα τοξικά αποτελέσματα των CNTs σε μικροοργανισμούς, και ειδικότερα σε βακτήρια, έχει εξετασθεί κατά κόρον από διάφορες ερευνητικές ομάδες. Μέσω της εφαρμογής πολλαπλών προσεγγίσεων, οι ερευνητές έχουν αρχίσει να διαφωτίζουν πιθανούς μηχανισμούς τοξικότητας. Ωστόσο, η διαθέσιμη βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι αυτές είναι πολύπλοκες αλληλεπιδράσεις που δεν μπορεί να εξηγηθεί με ένα μοναδικό μηχανισμό.

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

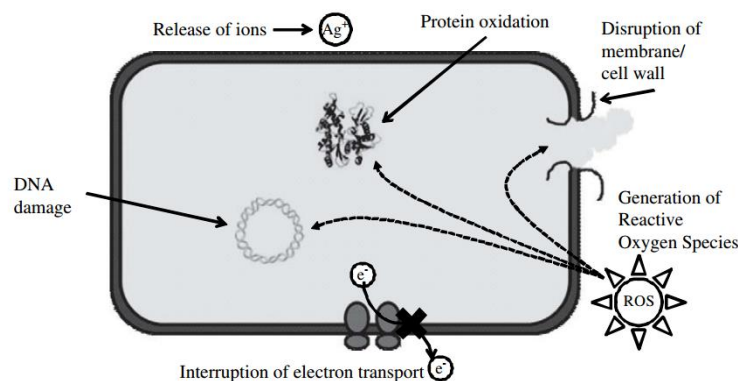
Κάποιοι από τους προτεινόμενους μηχανισμούς αντιμικροβιακής δράσης των CNTs που υπάρχουν, μέχρι στιγμής, είναι οι ακόλουθοι [55, 50, 56, 57, 58, 59, 53, 54, 47, 60]:

- i. διαταραχή της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης λόγω των έντονων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στους μικροοργανισμούς και τα CNTs (Εικόνα 16),
- ii. οξείδωση ή/και διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης (Εικόνα 16 και Εικόνα 17),
- iii. μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων
- iv. τοξικότητα που οφείλονται σε τυχόν ακαθαρσίες, όπως για παράδειγμα υπολείμματα καταλύτη και άμορφου άνθρακα.
- v. Δημιουργία δραστικών ειδών οξυγόνου (Εικόνα 17).



Εικόνα 16 Ένας από τους μηχανισμούς αντιμικροβιακής δράσης των CNTs [61].

Τα CNTs δύναται να προκαλέσουν βλάβες σε πλανκτονικούς μικροοργανισμούς, όπως επίσης και σε οργανισμούς που βρίσκονται στο έδαφος και σε στερεές επιφάνειες. Οι πλανκτονικοί μικροοργανισμοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην "ανακύκλωση" των θρεπτικών συστατικών, ενώ επηρεάζουν την παραγωγικότητα στα επιφανειακά ύδατα. Επιπλέον, τα συσσωματώματα νανοϋλικών – βακτηρίων υπάρχει περίπτωση να δημιουργήσουν φαινόμενα σκίασης με αποτέλεσμα τη μείωση της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας των υδρόβιων φυτών και επομένως της διαθέσιμης βιομάζα που διατίθενται για τα υδρόβια ζώα [62]. Η αυξανόμενη χρήση νανοϋλικών, συμπεριλαμβανομένων και των CNTs, αυξάνει την πιθανότητα να επηρεαστούν αρνητικά και μικροοργανισμοί που παρουσιάζουν βιομηχανικό ενδιαφέρον, όπως για παράδειγμα οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία λυμάτων [56, 57, 63].

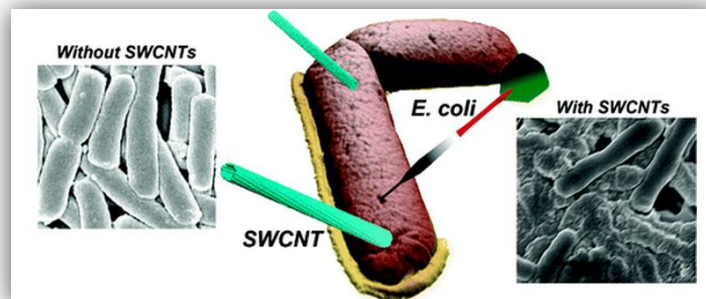


Εικόνα 17 Διάφοροι μηχανισμοί αντιμικροβιακής δράσης που ασκούνται από τα διάφορα νανοϋλικά [60].

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Τα SWCNTs φαίνεται να έχουν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση τόσο σε βακτήρια που βρίσκονται σε αιώρηση σε κάποιο μέσο όσο και σε αυτά που είναι εναποθετημένα σε κάποια επιφάνεια, επηρεάζοντας τη δημιουργία των βακτηριακών φιλμ. Έτσι, θα μπορούσαν να εφαρμοστούν σε επιφάνειες σαν επικάλυψη με σκοπό τη μείωση δημιουργίας βιοφίλμ τόσο σε φυσικό όσο και σε βιομηχανικό περιβάλλον [29, 60].

Η άμεση επαφή των SWCNTs με βακτήρια προκαλεί την κυτταρική απόπτωση [50]. Μειώνουν, επίσης, την ενζυματική δραστηριότητα και τη μικροβιακή βιομάζα σε συγκεντρώσεις από 300 mg/kg και μεγαλύτερες [64]. Τα SWCNTs που παρουσιάζουν πολύ καλή διασπορά είναι πιο τοξικά συγκρινόμενα με αντίστοιχα συσσωματωμένα, λόγω της αυξημένης αποτελεσματικότητας διάτρησης των βακτηριακών μεμβρανών και της υποβάθμισης της ακεραιότητας του βακτηριακού κυττάρου [65], όπως φαίνεται και στην Εικόνα 6. Ο βαθμός συσσωμάτωσης CNTs – βακτηρίων εξαρτάται από την τροποποίηση των CNTs, ενώ το μήκος των νανοσωλήνων μπορεί να μετριάσει την αντιβακτηριακή τους δράση. Συγκεκριμένα, τα ουδέτερα ή αρνητικά φορτισμένα SWCNTs, για παράδειγμα τροποποιημένα με $-OH$ ή $-COOH$ αλληλεπιδρούν πιο αποτελεσματικά με τα βακτήρια και μειώνουν την βιωσιμότητά τους, σε αντίθεση με τα θετικά φορτισμένα SWCNTs που είναι τροποποιημένα με $-NH_2$ [53]. Αντίστοιχα, μεγαλύτερου μήκους SWCNTs έχει παρατηρηθεί ότι προκαλούν απόπτωση στα βακτήρια ανάλογα με την συγκέντρωση και το χρόνο, ενώ τα μικρότερου μήκους SWCNTs δημιουργούν συσσωματώματα μεταξύ τους και έτσι παρουσιάζονται λιγότερο τοξικά [54]. Η καθαρότητα των SWCNTs μπορεί επίσης να επηρεάσει την βακτηριακή τοξικότητα. Νανοςωλήνες με υψηλό μεταλλικό περιεχόμενο προκαλούν μεγαλύτερη τοξικότητα συγκρινόμενοι με πιο καθαρά SWCNTs [58]. Επιπλέον, έχει αποδειχτεί ότι και το θρεπτικό μέσο στο οποίο βρίσκονται σε αιώρηση τα βακτήρια κατά τις διάφορες μελέτες τοξικότητας σε εργαστηριακή κλίμακα επηρεάζει την τοξικότητα των SWCNTs. Πιο συγκεκριμένα, θρεπτικά μέσα με μεγαλύτερη ιοντική ισχύ, όπως είναι το αλατούχο φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα, επίσης μειώνουν την τοξική επίδραση των SWCNTs, συγκρινόμενα με εναιωρήματα χαμηλής ιοντικής ισχύος, για παράδειγμα το απιονισμένο νερό ή ο φυσιολογικός ορός [53]. Η υψηλή ιοντική ισχύ μπορεί να μειώσει την ένταση της αλληλεπίδρασης των κυττάρων με τα SWCNTs [53]. Με τη χρήση κάποιας επικάλυψης μειώνεται η τοξικότητα των SWCNTs, παρόλη τη μειωμένη δημιουργία συσσωματωμάτων [50], πιθανώς λόγω μείωσης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των SWCNTs και των βακτηριακών κυττάρων.



Εικόνα 18 Διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου E. Coli από SWCNTs [66].

Τα MWCNTs φαίνεται να είναι λιγότερο τοξικά σε βακτήρια σε σύγκριση με τα SWCNTs [53, 50, 21, 67]. Η μειωμένη αντιβακτηριακή δράση μπορεί να οφείλεται στις λιγότερο ισχυρές

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα βακτήρια και τα MWCNTs, λόγω της υψηλότερης εγγενούς ακαμψίας και πιθανώς λόγω των μικρότερων δυνάμεων van der Waal's που αναπτύσσονται στην επιφάνειά των MWCNTs [53]. Για τον ίδιο λόγο, λεπτά MWCNTs με μικρότερη διάμετρο προκαλούν υψηλότερη τοξικότητα από αντίστοιχα με περισσότερους φλοιούς [67]. Όσον αφορά την επίδραση του μήκους, τα πιο κοντά MWCNTs βρέθηκαν πιο τοξικά στο *Pseudomonas fluorescens* σε σύγκριση με τα πιο μακριά MWCNTs [68]. Και τα δύο μήκη επηρέασαν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και το γενετικό υλικό (DNA), πιθανόν προκαλώντας την παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου, αυξανόμενη της συγκέντρωσης τους [68]. Η τοξικότητα των λεπτών και κοντών CNTs πιθανότατα οφείλεται στη μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με την κυτταρική μεμβράνη. Όταν τα MWCNTs είναι ανοιχτά (uncapped), αποδεσμευμένα (debundled), κοντά και διεσπαρμένα σε διάλυμα, η τοξικότητά τους αυξάνεται [69]. Η καθαρότητα των CNTs έχει επίσης προταθεί ότι επηρεάζει την τοξικότητα. Ωστόσο, κατά τη σύγκριση της τοξικότητας μεταξύ MWCNTs σε ακατέργαστη μορφή (Fe ως καταλύτης) και "καθαρών" (έπειτα από θερμική επεξεργασία) σε δύο βακτηριακά στέλεχη, δε παρατηρήθηκε καμία διαφορά στην τοξικότητα μεταξύ των δύο μορφών MWCNTs [70]. Ωστόσο, και οι δύο μορφές CNTs ήταν διεσπαρμένες παρουσία αραβικού κόμμι (GA, 0,25% κ.β.), το οποίο μπορεί να τροποποίησε την επιφάνειά τους, επηρεάζοντας έτσι την τοξικότητά τους. Τα MWCNTs ήταν τοξικά για ένα ευαίσθητο στέλεχος *Escherichia coli*, ενώ ένα ανθεκτικό στέλεχος σε ρύπους του *Cupriavidus metallidurans* δεν επηρεάστηκε [70]. Στο έδαφος, τα MWCNTs μειώνουν την ενζυματική δραστηριότητα και τη μικροβιακή βιομάζα σε συγκέντρωση 5000 mg / kg [71]. Η μεγαλύτερη επιφάνεια των SWCNTs [64], σε σύγκριση με αυτή των MWCNTs [71], μπορεί να επηρεάσει η τοξικότητα του εδάφους. Υποστηρίζοντας αυτή την υπόθεση, η συγκέντρωση στην οποία παρατηρούνται οι μικρότερες επιπτώσεις (Lowest-Observed-Effect Concentration, LOEC) για τις δύο μελέτες ήταν 300 mg / kg και 5.000 mg / kg, αντίστοιχα [64].

Μία άλλη μελέτη αξιολόγησε τις επιπτώσεις των MWCNTs στην ανάπτυξη των μυκήτων [72]. Οι εντομοπαθογόνοι μύκητες *Paecilomyces fumosoroseus* επώαστηκαν με 0.2 mg / L μη τροποποιημένα ή καρβοξυλιωμένα MWCNTs από 1 ώρα μέχρι 865 ώρες. Μετά την επώαση, καταγράφηκαν η sporίωση και η ανάπτυξη των μυκηλίων επί στερεού μέσου. Η sporίωση αυξήθηκε μετά από τις σύντομες εκθέσεις και μειώθηκε μετά από μεγαλύτερες εκθέσεις για τους δύο τύπους CNTs. Η έκθεση δεν είχε σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη των μυκήτων και την παραγωγή βιομάζας, εκτός από την περίπτωση έκθεσης στα μη τροποποιημένα MWCNTs έπειτα από 865 ώρες [72]. Οι επιδράσεις πιθανόν να προκαλούνται από μηχανικές επιδράσεις των CNTs, όπως παρατηρείται και στα βακτήρια.

Γενικά, σε ένα πολύπλοκο φυσικό σύστημα, με πολλά δραστικά σωματίδια και μεγάλες επιφάνειες, η αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τους μικροοργανισμούς θα είναι ένα συχνό φαινόμενο. Μόνο λίγες μελέτες είναι διαθέσιμες για τις δράσεις των CNTs σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα [56, 28, 64, 29], ενώ πολλές μελέτες έχουν διεξαχθεί σε βακτηριακές μονοκαλλιέργειες [50, 58, 53, 54, 65, 21, 67, 68, 69, 70]. Από αυτές μπορεί να διεξαχθεί το συμπέρασμα ότι το μέγεθος και επιφανειακά χαρακτηριστικά μπορούν να επηρεάσουν την αντιμικροβιακή δράση των CNTs. Ομοίως, η αντιμικροβιακή δράση εξαρτάται από εξωτερικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως είναι η παρουσία φυσικής οργανικής ύλης (Natural organic matter, NOM).

Συμπερασματικά, υψηλότερη τοξικότητα παρατηρήθηκε για τα SWCNTs όταν ήταν καλά διεσπαρμένα, αρνητικά φορτισμένα και με υψηλότερη περιεκτικότητα σε μέταλλα σε αντίθεση με τα συσσωματωμένα, θετικά φορτισμένα, και καθαρά. Τα SWCNTs αναφέρθηκαν να είναι πιο

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

τοξικά σε σύγκριση με αντίστοιχα MWCNTs. Ομοίως, υψηλότερη τοξικότητα παρατηρήθηκε για τα MWCNTs που ήταν λεπτότερα, πιο κοντά και αποδεσμευμένα σε σύγκριση με αυτά που είχαν περισσότερους φλοιούς, πιο μακριά και ήταν "μπλεγμένα". Οι τοξικές επιδράσεις των CNTs που παρατηρήθηκαν είχαν σχέση με την βελτιωμένη ικανότητα να αλληλεπιδρούν με την κυτταρική μεμβράνη των μικροοργανισμών. Η επιφανειακή τροποποίηση, η επικάλυψη ή η προσθήκη μέσων διασποράς βρέθηκε να αυξάνει ή να μειώνει την τοξικότητα τους, ανάλογα με τον χαρακτήρα της επεξεργασίας [73].

2. 6. Επίδραση της τροποποίησης των νανοσωλήνων άνθρακα σε μικροοργανισμούς

Οι μεταβολές στη δομή των CNTs έχει επισημανθεί ότι επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση τους. Τέτοιες μεταβολές μπορούν να επιτευχθούν με προσθήκη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοσωλήνων με χημικό δεσμό (ομοιοπολικό δεσμό) ή εναλλακτικά, με μη ομοιοπολική τροποποίηση, όπως είναι η περιέλιξη. Τέτοιες διαδικασίες έχουν τη δυνατότητα να επεκτείνουν το εύρος των πιθανών εφαρμογών των CNTs, για αυτό το λόγο παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον για τους ερευνητές. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον, σχετικά με την τοξικότητα, παρουσιάζει η τροποποίηση με προσθήκη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοσωλήνων με ομοιοπολικό δεσμό. Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας υποδεικνύει ότι η τροποποίηση των CNTs περιπλέκει το μηχανισμό τοξικότητας σε σύγκριση με τα μη τροποποιημένα CNTs [50, 21, 65, 54].

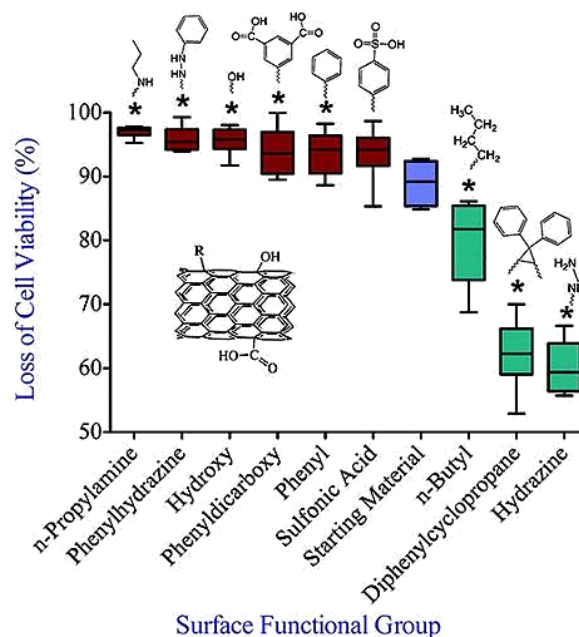
2. 5. 1. Προσθήκη Λειτουργικών Ομάδων με Ομοιοπολικό Δεσμό

Έχει αναφερθεί ότι σημαντική αντιμικροβιακή δράση έχει επιτευχθεί από τροποποιημένους MWCNTs με αργινίνη και λυσίνη. Αυτή η ενισχυμένη τοξικότητα αποδείχθηκε έναντι πολλών ειδών βακτηρίων, αρνητικών κατά Gram, συμπεριλαμβανομένων των *Escherichia coli* και *Salmonella typhimurium*, καθώς και το ανθεκτικό *Staphylococcus aureus*. Έχει προταθεί ότι οι θετικώς φορτισμένες λειτουργικές ομάδες αμινοξέων δύναται να προσροφηθούν στην αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή μεμβράνη. Κατά αυτόν τον τρόπο, επέρχεται ξαφνική κυτταρική λύση. Παρέχουν δηλαδή μια οικονομικά βιώσιμη, λιγότερο τοξική αντιβακτηριακή εναλλακτική λύση, αντικαθιστώντας τα μεταλλικά νανοσωματίδια και τα SWCNTs [74]. Τα τροποποιημένα MWCNTs με -OH, -COOH και -NH₂ σαν λειτουργικές ομάδες έχουν επίσης ερευνηθεί [53]. Αυτά τα αποτελέσματα αμφισβήτησαν επίσης την υπόθεση ότι η τοξικότητα εξαρτάται από την επαφή ή μη των νανοσωλήνων με τους μικροοργανισμούς [50, 21, 53, 65]. Δηλαδή, παρόλο που η επαφή μπορεί να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, αποδεικνύεται ότι και άλλοι μηχανισμοί μπορούν να είναι σημαντικοί [53].

Από αρκετές μελέτες συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι διάφορες χαρακτηριστικές ομάδες που προστίθενται στην επιφάνεια των CNTs μετά την χημική τροποποίηση αυτών προκαλούν στην πραγματικότητα ηπιότερα κυτταροτοξικά αποτελέσματα από τα μη τροποποιημένα ομόλογά τους [75, 54]. Από την άλλη, άλλες μελέτες αποδεικνύουν ότι η τροποποίηση της επιφάνειας φαίνεται να επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή δράση των CNTs, αν και δεν συμπεριφέρονται όμοια όλες οι λειτουργικές ομάδες. Τα τροποποιημένα SWCNTs με υδρόξυ

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

ομάδες (-OH) [76] και καρβοξυλομάδες (-COOH) παρουσιάζουν ισχυρές τοξικές επιδράσεις τόσο σε θετικούς κατά Gram όσο και σε αρνητικούς κατά Gram μικροοργανισμούς και για ένα εύρος συγκεντρώσεων CNTs. Ωστόσο, αυτές οι αντιμικροβιακές επιδράσεις φαίνεται να εξαρτώνται ιδιαίτερα από το ρυθμιστικό διάλυμα στο οποίο βρίσκονται σε διασπορά οι νανοσωλήνες. Προτάθηκε ότι με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος, η ένταση των αλληλεπιδράσεων CNT-μικροοργανισμών μειώνεται, μειώνοντας έτσι την αντιβακτηριακή δράση [53]. Το εύρημα αυτό είναι σε συμφωνία με αρκετές προηγούμενες μελέτες [50, 21, 53, 65]. Αντιθέτως, τα SWCNTs με αμινομάδες (-NH₂) ως λειτουργικές ομάδες εμφάνισαν αντιμικροβιακή δράση μόνο σε υψηλές συγκεντρώσεις. Αυτό επιβεβαιώνεται και από άλλες μελέτες που θέλουν τα CNTs με αμινομάδες (-NH₂) να μην έχουν ιδιαίτερη αντιμικροβιακή δράση. Γενικά, επικρατεί η άποψη ότι η σειρά της αντιμικροβιακής δραστηριότητας είναι: SWCNTs-OH > raw SWCNTs > purified SWCNTs > SWCNTs-COOH > SWCNTs-NH₂ [76]. Αντίστοιχα για την περίπτωση των MWCNTs, ισχύει ότι η τοξικότητα που παρουσιάζουν αυτά με την επιφανειακή προσθήκη αμινομάδων είναι μεγαλύτερη από αυτή των μη τροποποιημένων [74] και αρκετά μικρότερη από αυτή που παρουσιάζουν τα CNTs με την επιφανειακή προσθήκη καρβοξυλομάδων [19].



Εικόνα 19 Επίδραση της διαφορετικής επιφανειακής τροποποίησης των CNTs στην βιωσιμότητα βακτηριακών κυττάρων [75].

2. 5. 2. Προσθήκη Ανόργανων Επικαλύψεων

Έχουν επίσης διερευνηθεί και διάφορες μορφές μη ομοιοπολικής τροποποίησης των νανοσωλήνων άνθρακα. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των νανοσωλήνων άνθρακα που αναφέρθηκαν ενισχύονται σημαντικά όταν συνδυάζονται με μια επικάλυψη αργύρου. Τα ιόντα αργύρου πιστεύεται ότι εισέρχονται στα βακτηριακά κύτταρα και διαταράσσουν την διαδικασία της αναπαραγωγής των κυττάρων (Εικόνα 17). Για παράδειγμα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε με βακτήρια *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* παρατηρήθηκε

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

σημαντική μείωση στον σχηματισμό αποικιών σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου [46, 77, 78]. Έχει προταθεί ότι η μεγάλη περιοχή επιφάνειας σε αναλογία με τον όγκο των νανοσωλήνων άνθρακα συμβάλλει στη βελτίωση των εγγενών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του αργύρου [51]. Επιπλέον, ο προτεινόμενος μηχανισμός διάτρησης των κυτταρικών μεμβρανών από τα CNTs μπορεί να επιτρέψει την αυξημένη μεταφορά των τοξικών ιόντων αργύρου στα βακτηριακά κύτταρα. Παρόμοια μελέτη χρησιμοποίησε το οξείδιο του ψευδαργύρου σαν επικάλυψη των MWCNTs (ZnO/MWCNTs), το οποίο βρέθηκε επίσης να έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση [79].

Μέσω της βιβλιογραφίας που παρουσιάστηκε, είναι προφανές ότι η τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα φαίνεται να περιπλέκει σημαντικά τη δυναμική της αλληλεπίδρασης CNT-μικροοργανισμών. Στην Εικόνα 19, φαίνεται αυτή η επίδραση της διαφορετικής επιφανειακής τροποποίησης στην αλληλεπίδραση αυτή. Δεν είναι μόνο οι χημικές ιδιότητες των λειτουργικών ομάδων που επηρεάζουν την αντιβακτηριακή δράση, αλλά η χημεία των διαλυμάτων και ως εκ τούτου η κινητική της συσσωμάτωσης μπορούν επίσης να είναι εξαιρετικά σημαντικές. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει και το μικροβιακό στέλεχος που χρησιμοποιείται κάθε φορά για τη μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης. Στελέχη, όπως είναι το *E. coli* MG1655 είναι αρκετά ευαίσθητα σε σύγκριση με το *C. metallidurans* CH34 που παρουσιάζεται πιο ανθεκτικό κατά την επώασή του με νανοσωματίδια [70].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Iijima, *Nature*, vol. 354, pp. 56-58, 1991.
- [2] T. W. Ebbesen and P. M. Ajayan, *Nature*, vol. 358, pp. 220-222, 1992.
- [3] Κ. Κορδάτος, Αλλοτροπικές Μορφές του Άνθρακα: Φουλερένια και Νανοσωλήνες Άνθρακα, Αθήνα: Σημειώσεις του Μαθήματος: "Τεχνολογία προηγμένων κεραμικών υλικών", 2006.
- [4] William & Flora Hewlett Foundation; Bill & Melinda Gates Foundation; 20 Million Minds Foundation; Maxfield Foundation; Open Society Foundations; Rice University, "what-when-how," The-Crankshaft Publishing, [Online]. Available: <http://what-when-how.com/nanoscience-and-nanotechnology/carbon-nanotubes-and-other-carbon-materials-part-1-nanotechnology/>. [Accessed 07 2015].
- [5] N. Wang, Z. K. Tang, G. D. Li and J. S. Chen, *Nature*, vol. 408, p. 50, 2000.
- [6] J. Han, Structures and Properties of Carbon Nanotubes, vol. 5, Boca Raton: CRC Press, 2005.
- [7] S. Iijima, *Mater. Sci. Eng.*, vol. B 19, p. 172, 1993.
- [8] A. Prof. Dr. Kolitsch, "HZDR," 26 02 2009. [Online]. Available: <http://www.hzdr.de/db/Cms?pOid=10883&pNid=0>. [Accessed 7 Μάρτιος 2015].
- [9] A. Nel, T. Xia, L. Madler and N. Li, *Science*, vol. 311, p. 622–627, 2006.
- [10] K. Donaldson, V. Stone, C. L. Tran, W. Kreyling and P. Borm, *J. A. Occup. Environ. Med.*, vol. 61, p. 727–728, 2004.
- [11] G. Jia, H. F. Wang, L. Yan, X. Wang, R. J. Pei, T. Yan, Y. L. Zhao and X. B. Guo, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 39, p. 1378–1383, 2005.
- [12] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller and L. Forro, *Nano Lett.*, vol. 6, p. 1121–1125, 2006.
- [13] A. A. Shvedova, V. Castranova, E. R. Kisin, D. Schwegler-Berry, A. R. Murray, V. Z. Gandelsman, A. Maynard and P. Baron, *J. Toxicol. Environ. Health Part A*, vol. 66, p. 1909–1926, 2003.
- [14] S. K. Manna, S. Sarkar, J. Barr, K. Wise, E. V. Barrera, O. Jejelowo, A. C. Rice-Ficht and G. T. Ramesh, *Nano Lett.*, vol. 5, p. 1676–1684, 2005.
- [15] C. W. Lam, J. T. James, R. McCluskey and R. L. Hunter, *Toxicol. Sci.*, vol. 77, p. 126–134, 2004.
- [16] X. Chen, U. C. Tam, J. L. Czlupinski, G. S. Lee, D. Rabuka, A. Zettl and C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 128, p. 6292–6293, 2006.
- [17] H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J. P. Briand, M. Prato, S. Muller and A. Bianco, *Nano Lett.*, vol. 6, p. 1522–1528, 2006.
- [18] P. Wick, P. Manser, L. K. Limbach, U. Dettlaff-Weglikowska, F. Krumeich, S. Roth, W. J. Stark and A. Bruinink, *Toxicol. Lett.*, vol. 168, p. 121–131, 2007.
- [19] Y. Zhu, T. C. Ran, Y. G. Li, J. X. Guo and W. X. Li, *Nanotechnology*, vol. 17, p. 4668–4674, 2006.
- [20] K. Kostarelos, L. Lacerda, G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Luangsivilay, S. Godefroy, D. Pantarotto, J. P. Briand, S. Muller, M. Prato and A. Bianco, *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, p. 108–113, 2007.
- [21] S. Kang, M. Herzberg, D. F. Rodrigues and M. Elimelech, *Langmuir*, vol. 24, pp. 6409-6413, 2008.
- [22] L. H. Ding, J. Stilwell, T. Zhang, O. Elboudwarej, H. J. Jiang, J. Selegue, P. A. Cooke, J. W. Gray and F. Q. F. Chen, *Nano Lett.*, vol. 5, p. 2448–2464, 2005.
- [23] K. Pulskamp, S. Diabate and H. F. Krug, *Toxicol. Lett.*, vol. 168, p. 58–74, 2007.

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

- [24] C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. H. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman and V. L. Colvin, *Toxicol. Lett.*, vol. 161, p. 135–142, 2006.
- [25] F. R. Tian, D. X. Cui, H. Schwarz, G. G. Estrada and H. Kobayashi, *Toxicol. in Vitro*, vol. 20, p. 1202–1212, 2006.
- [26] R. K. A. Saxena, J. K. Mcgee, M. J. Daniels, E. Boykin and I. Gilmour, *Nanotoxicology*, vol. 1, p. 291–300, 2007.
- [27] M. F. L. D. Volder, S. H. Tawfick, R. H. Baughman and A. J. Hart, *Science*, vol. 339, pp. 535–539, 2013.
- [28] S. Kang, M. S. Mauter and M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, p. 2648–2653, 2009.
- [29] D. F. Rodrigues and M. Elimelech, *Environ. Sci. Tehnol.*, vol. 44, pp. 4583–4589, 2010.
- [30] A. S. Brady-Estevez, S. Kang and M. Elimelech, *Small*, vol. 4, p. 481–484, 2008.
- [31] A. S. Brady-Estevez, T. H. Nguyen, L. Gutierrez and M. Elimelech, *Water Research*, vol. 44, p. 3773–3780, 2010.
- [32] A. S. Brady-Estevez, M. H. Schnoor, S. Kang and M. Elimelech, *Langmuir*, vol. 26, p. 19153–19158, 2010.
- [33] A. S. Brady-Estevez, M. H. Schnoor, C. D. Vecitis, N. B. Saleh and M. Elimelech, *Langmuir*, vol. 26, p. 14975–14982, 2010.
- [34] V. Vatanpour, S. S. Madaeni, R. Moradian, S. Zinadini and B. Astinchap, *J. Membrane Sci.*, vol. 375, pp. 284–294, 2011.
- [35] T. J. Simmons, S. H. Lee, T. J. Park, D. P. Hashim, P. M. Ajayan and R. J. Linhardt, *Carbon*, vol. 47, p. 1561–1564, 2009.
- [36] S. Aslan, C. Z. Loebick, S. Kang, M. Elimelech, L. D. Pfefferle and P. R. V. Tassel, *Nanoscale*, vol. 2, p. 1789–1794, 2010.
- [37] J. D. Schiffman and M. Elimelech, *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 3, p. 462–468, 2011.
- [38] D. Nepal, S. Balasubramanian, A. L. Simonian and V. A. Davis, *Nano Letters*, vol. 8, p. 1896–1901, 2008.
- [39] A. Bianco, K. Kostarelos and M. Prato, *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 9, p. 674–679, 2005.
- [40] K. Kostarelos, A. Bianco and M. Prato, *Nature Nanotechnology*, vol. 4, p. 627–633, 2009.
- [41] Z. Liu, W. B. Cai, L. N. He, N. Nakayama, K. Chen, X. M. Sun, X. Y. Chen and H. J. Dai, *Nature Nanotechnology*, vol. 2, p. 47–52, 2007.
- [42] M. R. McDevitt, D. Chattopadhyay, B. J. Kappel, J. S. Jaggi, S. R. Schiffman, C. Antczak, J. T. Njardarson, R. Brentjens and D. A. Scheinberg, *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 48, p. 1180–1189, 2007.
- [43] A. A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. F. Zhang, A. A. Sousa, A. Masedunskas, R. D. Leapman, R. Weigert, J. S. Gutkind and J. F. Rusling, *ACS Nano*, vol. 3, p. 307–316, 2009.
- [44] W. Wu, S. Wieckowski, G. Pastorin, M. Benincasa, C. Klumpp, J. P. Briand, R. Gennaro, M. Prato and A. Bianco, *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 44, p. 6358–6362, 2005.
- [45] M. Benincasa, S. Pacor, W. Wu, M. Prato, A. Bianco and R. Gennaro, *ACS Nano*, vol. 5, p. 199–208, 2011.
- [46] C. J. Krause, "Evaluating the toxicity of nitrogen-functionalized carbon nanotubes.," in *MS (Master of Science) thesis*, University of Iowa, 2014.

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

- [47] Y. - F. Young, H. - J. Lee, Y. - S. Shen, S. - H. Tseng, C. - Y. Lee and N. - H. Tai, *Mater. Chem. Phys.*, vol. 134, pp. 279-286, 2012.
- [48] J. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp and H. Krug, *Nano Letters*, vol. 6, pp. 1261-1268, 2006.
- [49] A. Dhawan and V. Sharma, *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 398, pp. 589-605, 2010.
- [50] S. Kang, M. Pinault, L. D. Pfefferle and M. Elimelech, *Langmuir*, vol. 23, pp. 8670-8673, 2007.
- [51] T. Liu, H. Tang, X. Cai, J. Zhao, D. L. R. Li and X. Sun, *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res.*, vol. 264, pp. 282-286, 2007.
- [52] L. M. Pasquini, R. C. Sekol, A. D. Taylor, L. D. Pfefferle and J. B. Zimmerman, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 47, pp. 8775-8783, 2013.
- [53] L. R. Arias and L. Yang, *Langmuir*, vol. 25, pp. 3003-3012, 2009.
- [54] C. Yang, J. Mamouni, Y. Tang and L. Yang, *Langmuir*, vol. 26, pp. 16013-16019, 2010.
- [55] X. Y. Liu, D. Vinson, D. Abt, R. H. Hurt and D. M. Rand, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, pp. 6357-6363, 2009.
- [56] L. A. Luongo and X. J. Zhang, *J. Hazard Mater.*, vol. 178, pp. 356-362, 2010.
- [57] N. Musee, M. Thwala and N. Nota, *J. Environ. Monit.*, vol. 13, pp. 1164-1183, 2011.
- [58] C. D. Vecitis, K. R. Zodrow, S. Kang and M. Elimelech, *ACS Nano*, vol. 4, pp. 5471-5479, 2010.
- [59] S. Youn, R. Wang, J. Gao, A. Hovespyan, K. J. Ziegler and J. C. Bonzongo, *Nanotoxicology*, vol. 6, pp. 161-172, 2011.
- [60] Q. Li, S. Mahendra, D. Y. Lyon, L. Brunet, M. V. Liga, D. Li and P. J. J. Alvarez, *Water Res.*, vol. 42, p. 4591-4602, 2008.
- [61] S. M. Dizaj, A. Mennati, S. Jafari, K. Khezri and K. Adibkia, *Adv. Pharm. Bull.*, vol. 5, pp. 19-23, 2015.
- [62] E. Navarro, A. Baun, R. Behra, N. B. Hartmann, J. Filser and A. J. Miao, *Ecotoxicol.*, vol. 17, pp. 372-386, 2008.
- [63] T. S. Chan, F. Nasser, C. St-Denis, H. S. Mandal, P. Ghafari and N. Hadjout-Rabi, *Nanotoxicology*, vol. 7, pp. 251-258, 2012.
- [64] L. Jin, Y. Son, T. K. Yoon, Y. J. Kang, W. Kim and H. Chung, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 88, pp. 9-15, 2013.
- [65] S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M. W. Chang and R. Xu, *ACS Nano*, vol. 3, pp. 3891-3902, 2009.
- [66] S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M. W. Chang, R. Xu, Y. Yang and Y. Chen, *ACS Nano*, vol. 3, p. 3891-3902, 2009.
- [67] H. Zheng, L. Liu, Y. Lu, Y. Long, L. Wang, P. K. Ho and K. Y. Wong, *Anal. Sci.*, vol. 26, pp. 125-128, 2010.
- [68] M. J. Riding, F. L. Martin, J. Trevisan, V. Llabjani, I. I. Patel, K. C. Jones and K. T. S., *Environ. Pollu.*, vol. 163, pp. 226-234, 2012.
- [69] S. Kang, M. S. Mauter and M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, pp. 7528-7534, 2008.
- [70] A. Simon-Deckers, S. Lo, M. Mayne-L'hermite, N. Herlin-Boime, N. Menguy, C. Reynaud, B. Gouget and M. Carrière, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, pp. 8423-8429, 2009.
- [71] H. Chung, Y. Son, T. K. Yoon, S. Kim and W. Kim, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 74, pp. 569-575, 2011.
- [72] A. Gorczyca, M. J. Kasprowicz and T. Lemek, *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.*, vol. 44, p. 1592-1597, 2009.

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

- [73] P. Jackson, N. R. Jacobsen, A. Baun, R. Birkedal, D. Kühnel, K. A. Jensen, U. Vogel and H. Wallin, *Chem. Cent. J.*, vol. 7, pp. 1-21, 2013.
- [74] H. Z. Zardini, A. Amiri, M. Shanbedi, M. Maghrebi and M. Baniadam, *Colloids Surf., B*, vol. 92, pp. 196-202, 2012.
- [75] L. M. Pasquini, S. M. Hashmi, T. J. Sommer, M. Elimelech and J. B. Zimmerman, *Environ. Sci. Technol.*, vol. 46, pp. 6297-6305, 2012.
- [76] A. Li, L. Wang, M. Li, Z. Xu, P. Li and Z. Z. Zhang, *Dig. J. Nanomater. Bios.*, vol. 9, pp. 599 - 607, 2014.
- [77] J. D. Kim, H. Yun, G. C. Kim, C. W. Lee and H. C. Choi, *Appl. Surf. Sci.*, vol. 283, pp. 227-233, 2013 .
- [78] S. J. Kazmi, M. A. Shehzad, S. Mehmood, M. Yasar, A. Naeem and A. Bhatti, *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 216, pp. 287-294, 2014.
- [79] M. Sui, L. Zhang, L. Sheng, S. Huang and L. She, *Sci. Total Environ.*, Vols. 452-453, pp. 148-154, 2013.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΑΡΙΘΜΗΣΗΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Γενικά, υπάρχουν διάφορες εργαστηριακές μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής αύξησης. Στον Πίνακα 1, συνοψίζονται οι μεθοδολογίες αυτές και στη συνέχεια αναλύονται επιλεκτικά κάποιες.

Πίνακας 4 Μερικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της βακτηριακής ανάπτυξης [1].

Method	Application	Comments
Direct microscopic count	Enumeration of bacteria in milk or cellular vaccines	Cannot distinguish living from nonliving cells
Viable cell count (colony counts)	Enumeration of bacteria in milk, foods, soil, water, laboratory cultures, etc.	Very sensitive if plating conditions are optimal
Turbidity measurement	Estimations of large numbers of bacteria in clear liquid media and broths	Fast and nondestructive, but cannot detect cell densities less than 10^7 cells per ml
Direct microscopic count	Enumeration of bacteria in milk or cellular vaccines	Cannot distinguish living from nonliving cells
Measurement of total N or protein	Measurement of total cell yield from very dense cultures	only practical application is in the research laboratory
Measurement of Biochemical activity e.g. O₂ uptake CO₂ production, ATP production, etc.	Microbiological assays	Requires a fixed standard to relate chemical activity to cell mass and/or cell numbers
Measurement of dry weight or wet weight of cells or volume of cells after centrifugation	Measurement of total cell yield in cultures	probably more sensitive than total N or total protein measurements

3.1. Απαρίθμηση με Χρήση Μικροσκοπίου

Η συνολική καταμέτρηση των μικροβιακών αριθμών μπορεί να επιτευχθεί χρησιμοποιώντας ένα μικροσκόπιο για την παρατήρηση και την απαρίθμηση των κυττάρων σε μια καλλιέργεια. Αποτελεί την πιο κοινή μέθοδο καταμέτρησης των κυττάρων και μπορεί να γίνει τόσο σε ξηρά δείγματα όσο και σε υγρά. Τα ξηρά δείγματα συνήθως χρωματίζονται με ειδικές χρωστικές ουσίες, ώστε να αυξηθεί η αντίθεση μεταξύ των κυττάρων και του υπόβαθρού τους. Όσον αφορά τα υγρά δείγματα, χρησιμοποιούνται για την καταμέτρησή τους ειδικά σχεδιασμένοι θάλαμοι καταμέτρησης. Σε έναν τέτοιο θάλαμο μέτρησης, σημειώνεται στην επιφάνεια της γυάλινης καλυπτρίδας πλέγμα με τετράγωνα γνωστής επιφάνειας (Εικόνα 1). Όταν η καλυπτρίδα τοποθετείται στο θάλαμο, κάθε τετράγωνο στο πλέγμα έχει έναν συγκεκριμένο όγκο, ο οποίος έχει προσδιοριστεί. Ο αριθμός των κυττάρων ανά μονάδα επιφανείας του πλέγματος μπορεί να μετρηθεί κάτω από το μικροσκόπιο, δίνοντας ένα μέτρο του αριθμού των κυττάρων ανά μικρού όγκου του θαλάμου. Ο αριθμός των κυττάρων ανά χιλιοστόλιτρο εναιωρήματος υπολογίζεται με χρήση ενός συντελεστή μετατροπής με βάση τον όγκο του δείγματος θαλάμου.

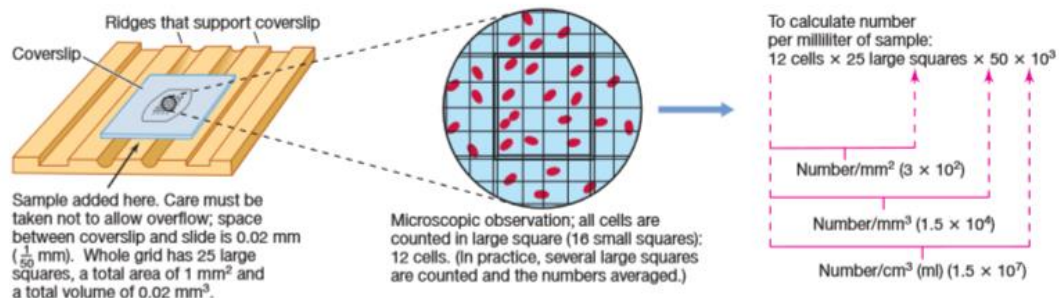
Μία δεύτερη μέθοδος απαρίθμησης κυττάρων σε υγρά δείγματα είναι με τη χρήση ενός κυτταρόμετρου ροής. Αυτό είναι μια διάταξη που χρησιμοποιεί δέσμη λέιζερ και μπορεί να μετρήσει μεμονωμένα κύτταρα. Η κυτταρομετρία ροής σπάνια χρησιμοποιείται για τη συνήθη μέτρηση των μικροβιακών κυττάρων, αλλά έχει εφαρμογές στην ιατρική για την καταμέτρηση

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

και τη διαφοροποίηση των κυττάρων του αίματος και άλλων τύπων κυττάρων από κλινικά δείγματα. Επίσης, έχει χρησιμοποιηθεί στη μικροβιακή οικολογία να τον διαχωρισμό διαφορετικών τύπων κυττάρων με σκοπό την απομόνωσή τους.

Η μικροσκοπική καταμέτρηση είναι ένας γρήγορος και εύκολος τρόπος εκτίμησης του μικροβιακού αριθμού των κυττάρων [2]. Ωστόσο, έχει αρκετούς περιορισμούς και τα αποτελέσματα μπορεί να είναι αναξιόπιστα. Οι περιορισμοί έγκεινται στα εξής [102, 103]:

1. Χωρίς ειδικές τεχνικές χρώσης, τα νεκρά κύτταρα δεν μπορούν να διακριθούν από τα ζωντανά κύτταρα.
2. Τα μικρά κύτταρα είναι δύσκολο να διακριθούν από το μικροσκόπιο
3. Είναι δύσκολο να επιτευχθεί ακρίβεια.
4. Αν το δείγμα δεν είναι χρωματισμένο, με χρώση DAPI για παράδειγμα, απαιτείται μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.
5. Τα κυτταρικά εναιωρήματα χαμηλής πυκνότητας (κάτω από περίπου 10^6 κύτταρα/χιλιοστόλιτρο) έχουν μικρή πιθανότητα να βρεθούν στο πεδίο του μικροσκοπίου, εκτός αν το δείγμα πρώτα συμπυκνωθεί και επαναιωρηθεί σε πιο μικρό όγκο.
6. Τα κύτταρα πρέπει να ακινητοποιούνται πριν από την καταμέτρηση, με διαδικασίες που είναι αρκετά χρονοβόρες.
7. Τα κατεστραμένα κύτταρα του δείγματος μπορεί να μπερδευτούν με τα μικροβιακά κύτταρα προς μέτρηση.



Εικόνα 20 Διαδικασία άμεσης μικροσκοπικής καταμέτρησης με τη χρήση της αντικειμενοφόρου καταμέτρησης (αιματοκυττόμετρο) Petroff-Hausser. [102].

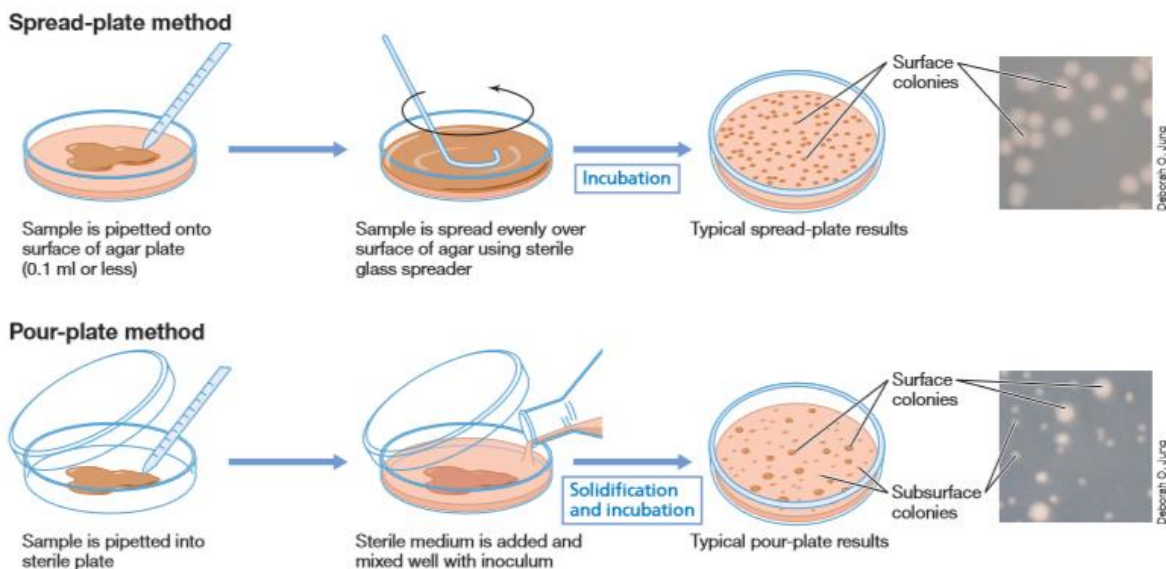
3.2. Μέτρηση των Ζωντανών Βακτηρίων

Ένα ζωντανό κύτταρο είναι αυτό που είναι σε θέση να διαιρείται και να σχηματίζει απογόνους, και στις περισσότερες περιπτώσεις κύτταρο-καταμέτρησης, αυτά είναι τα κύτταρα μας ενδιαφέρουν περισσότερο. Έτσι, είναι προτιμότερη η χρήση μιας μεθόδου καταμέτρησης μόνο των ζωντανών κυττάρων. Για να γίνει αυτό, προσδιορίζουμε τον αριθμό των κυττάρων σε ένα δείγμα ικανό να σχηματίζει αποικίες σε ένα κατάλληλο μέσο άγαρ. Η υπόθεση που έγινε στη συγκεκριμένη διαδικασία καταμέτρησης είναι ότι κάθε ζωντανό κύτταρο μπορεί να αναπτύσσεται και να διαιρείται για να δώσει μία αποικία. Έτσι, οι αριθμοί των αποικιών είναι μια αντανάκλαση του αριθμού των κυττάρων [102, 104, 105, 106].

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Υπάρχουν τουλάχιστον δύο μέθοδοι για τον προσδιορισμό του δείκτη βιωσιμότητας: η μέθοδος spread-plate και η μέθοδος pour-plate (Εικόνα 2). Στη μέθοδο εξαπλώσεως πλάκα, ένας όγκος (συνήθως 0,1 ml ή λιγότερο) μιας καταλλήλως αραιωμένης καλλιέργειας απλώνεται πάνω στην επιφάνεια στρωμένων τρυβλίων με άγαρ χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη σπάτουλα. Τα τρυβλία στη συνέχεια επωάζονται έως ότου εμφανιστούν οι αποικίες, και μετράται ο αριθμός των αποικιών. Η επιφάνεια του στρωμένου τρυβλίου δεν πρέπει να είναι ρευστή, επειδή η προστιθέμενη αραιωμένη καλλιέργεια πρέπει να απορροφάται έτσι ώστε τα κύτταρα να ακινητοποιούνται. Για όγκους μεγαλύτερους από περίπου 0,1 ml αποφεύγεται αυτή η μέθοδος, επειδή η περίσσεια υγρού δεν μπορεί να απορροφηθεί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη συγχώνευση των αποικιών, γεγονός που καθιστά δύσκολη την καταμέτρησή τους.

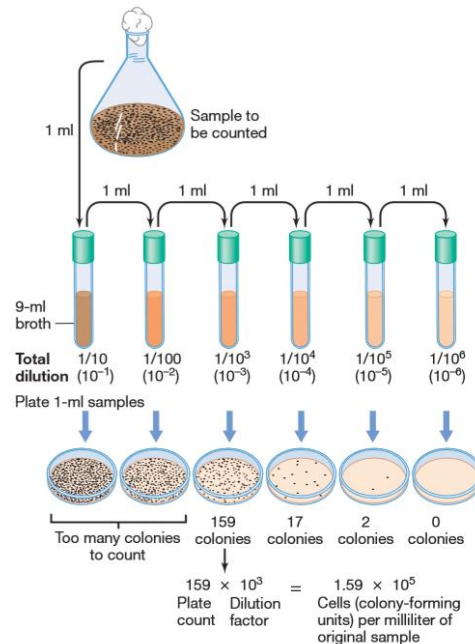
Στη μέθοδο pour-plate (Εικόνα 2), γνωστός όγκος (συνήθως 0,1 - 1,0 ml) καλλιέργειας φέρεται με σιφόνιο σε ένα αποστειρωμένο τρυβλίο. Στη συνέχεια, μέσο άγαρ σε ρυστή κατάσταση προστίθεται στο τρυβλίο, λίγο πριν τη θερμοκρασία γελοποίησης, και αναμιγνύεται καλά με ήπια περιδίνηση επί του πάγκου. Επειδή το δείγμα αναμιγνύεται με το τετηγμένο μέσο άγαρ, ένας μεγαλύτερος όγκος μπορεί να χρησιμοποιηθεί από αυτόν στη μέθοδο spread-plate. Ωστόσο, με αυτή τη μέθοδο ο οργανισμός πρέπει να είναι σε θέση να αντέχει τη σύντομη έκθεση στη θερμοκρασία του τηγμένου άγαρ (+ 45 - 50 °C), γεγονός που την κάνει απαγορευτική για μικροοργανισμούς όπως η *E. Coli*. Εδώ, οι αποικίες σχηματίζονται διαμέσου του μέσου και όχι μόνο στην επιφάνεια του άγαρ, όπως στη μέθοδο spread-plate. Ως εκ τούτου, πρέπει να είμαστε πολύ προσεκτικοί στην καταμέτρησή. Εάν η μέθοδος χύστε πλάκα χρησιμοποιείται για την απαρίθμηση των κυττάρων από ένα φυσικό δείγμα, ένα άλλο πρόβλημα που μπορεί να προκύψει είναι κατεστραμμένα κύτταρα τα οποία πρέπει να διακρίνονται από τις βακτηριακές αποικίες αλλιώς ο μετρούμενος αριθμός των αποικιών θα είναι εσφαλμένος.



Εικόνα 21 Δύο μέθοδοι μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας (καταμέτρησης επί τρυβλίου). Σε κάθε περίπτωση, συνήθως απαιτείται αραιώση του δείγματος πριν την επίστρωση [102].

3. 2. 1. Αραίωση Κυτταρικών Εναιωρημάτων πριν την Επίστρωση

Και με τις δύο μεθόδους είναι σημαντικό ο αριθμός των αποικιών ανάπτυξης επί ή εντός του μέσου να μην είναι πάρα πολλές αλλά ούτε και πολύ λίγες. Στα πολυπληθή τρυβλία μερικά κύτταρα δεν μπορούν να σχηματίσουν αποικίες, και μερικές αποικίες μπορούν να συνενωθούν, γεγονός που οδηγεί σε εσφαλμένες μετρήσεις. Αντιθέτως, εάν ο αριθμός των αποικιών είναι πολύ μικρός, η στατιστική σημασία της καταμέτρησης είναι χαμηλή. Η συνήθης πρακτική, η οποία είναι η πιο έγκυρη στατιστικά, είναι η μέτρηση τρυβλίων που έχουν μεταξύ 30 και 300 αποικίες [102, 107, 108, 109]. Για να αποκτηθεί ο κατάλληλος αριθμός αποικιών, το δείγμα πρέπει σχεδόν πάντα να αραιώνεται [11]. Επειδή κάποιος δεν μπορεί να γνωρίζει τον αριθμό βιώσιμων κυττάρων εκ των προτέρων, είναι συνήθως απαραίτητο να γίνονται περισσότερες από μία αραιώσεις. Συνήθως χρησιμοποιούνται αραιώσεις του δείγματος έως 10 φορές (Εικόνα 3). Για να γίνει μια δεκαδική αραιώση επί 10 (10^{-1}), μπορεί κανείς να αναμειξει 0,5 ml δείγματος με 4,5 ml του διαλύτη, ή 1,0 ml δείγματος με 9,0 ml του διαλύτη. Εάν απαιτείται μία αραιώση επί 100 φορές (10^{-2}), 0,05 ml αναμιγνύονται με 4,95 ml διαλύτη, ή 0,1 ml με 9,9 ml διαλύτη. Εναλλακτικά, μια αραιώση 10^{-2} μπορεί να επιτευχθεί κάνοντας δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Σε μια πυκνή καλλιέργεια, απαιτούνται τέτοιου είδους διαδοχικές αραιώσεις για να φτάσει κανείς σε μια κατάλληλη αραιώση για την επίστρωση ώστε να αποδοθούν μετρήσιμες αποικίες. Έτσι, εάν χρειάζεται αραιώση 10^{-6} ($1/10^6$), αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την πραγματοποίηση τριών διαδοχικών αραιώσεων 10^{-2} ($1/10^2$) ή έξι διαδοχικών αραιώσεων 10^{-1} (Εικόνα 3).



Εικόνα 22 Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας, με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών αραιώσεων του δείγματος και χρήση της μεθόδου αραιώσης του εμβολίου με θρεπτικό υλικό. Το αποστειρωμένο υγρό για τις διαδοχικές αραιώσεις μπορεί να είναι απλώς νερό, αλλά ένα ισοτονικό διάλυμα ή ένα υγρό θρεπτικό υλικό μπορεί να προσφέρουν υψηλότερα ποσοστά ανάκτησης. Ο παράγοντας αραιώσης είναι το αντίστροφο της αραιώσης. Για την γρήγη επίστρωση σε τρυβλίο (Εικόνα 6.10), μπορεί να χρειαστεί επιπλέον αραιώση για τη διασπορά δειγμάτων όγκου 0,1 ml [102].

3. 2. 2. Πηγές Σφάλματος στη Μέτρηση Τρυβλίων

Ο αριθμός των αποικιών που λαμβάνονται σε ένα πείραμα καταμέτρησης, όπως περιγράφηκε παραπάνω, δεν εξαρτάται μόνο από το εμβόλιο και τη βιωσιμότητα της καλλιέργειας, αλλά επίσης και από το μέσο καλλιέργειας και τις συνθήκες επώασης. Ο αριθμός των αποικιών μπορεί επίσης να αλλάξει με το μήκος της επώασης. Για παράδειγμα, αν χρησιμοποιείται μια μικτή καλλιέργεια, τα κύτταρα που αποτίθενται επί του τρυβλίου δεν θα σχηματίσουν όλα αποικίες με τον ίδιο ρυθμό. Εάν χρησιμοποιηθεί ένα μικρό χρονικό διάστημα επώασης, θα ληφθούν λιγότερες αποικίες από το μέγιστο αριθμό. Επιπλέον, το μέγεθος των αποικιών μπορεί να διαφέρει. Αν αναπτυχθούν μερικές μικρές αποικίες τότε αυτές μπορεί να χαθούν κατά τη διάρκεια της καταμέτρησης. Έτσι, προτιμώνται καθαρές καλλιέργειες ώστε η μορφολογία των αποικιών να είναι ομοιόμορφη.

Οι μετρήσεις βιωσιμότητας κυττάρων μπορούν να υπόκεινται σε μάλλον μεγάλα σφάλματα για διάφορους λόγους. Αυτά περιλαμβάνουν ασυνέπειες της επίστρωσης, όπως ένα μη ομοιόμορφο δείγμα (για παράδειγμα, ένα δείγμα που περιέχει συστάδες κυττάρων), ανεπαρκής ανάμιξη, και διάφοροι άλλοι παράγοντες. Ως εκ τούτου, εάν πρόκειται να ληφθούν ακριβείς μετρήσεις, πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή και συνέπεια στην προετοιμασία του δείγματος και την επίστρωση. Αξίζει να σημειωθεί, επίσης, ότι εάν δύο ή περισσότερα κύτταρα βρίσκονται σε μια συστάδα, αυτή αυξανόμενη θα σχηματίσει τελικά μόνο μια αποικία. Έτσι, εάν ένα δείγμα περιέχει πολλά συσσωματώματα κυττάρων, τα φαινομενικά βιώσιμα κύτταρα του εν λόγω δείγματος θα να είναι λίγα, κάνοντας τη μέτρηση λανθασμένη. Τα δεδομένα εκφράζονται συχνά ως ο αριθμός των μονάδων που σχηματίζουν αποικίες (colony-forming units, CFU) που ελήφθη παρά ως πραγματικός αριθμός των βιώσιμων κυττάρων, επειδή μία μονάδα σχηματισμού αποικιών μπορεί να περιέχει ένα ή περισσότερα κύτταρα [111, 112, 102, 100].

Τίθεται έτσι το ζήτημα του ικανοποιητικού αριθμού αποικιών σε ένα τρυβλίο ώστε η μέτρηση να θεωρηθεί αξιόπιστη. Οι Breed και Dotterrer [14] έχουν αναφέρει ότι η ύπαρξη των αναγκαίων θρεπτικών συστατικών μπορεί να είναι ένα σημαντικό ζήτημα, καθώς εξαιτίας αυτού οι αποικίες μπορεί να συγχωνευθούν ή διαφορετικά μπορεί να ανασταλλεί η ανάπτυξη κάποιων άλλων αποικιών. Έτσι, λόγω αυτών και άλλων δυσκολιών, η ανάπτυξη σε ορισμένα τρυβλία για ένα συγκεκριμένο δείγμα είναι πιο ικανοποιητικές και αξιόπιστες έναντι άλλων. Το ζήτημα επομένως της επιλογής των τρυβλίων που πρέπει να χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό των αποικιών γίνεται, επομένως, ένα θέμα που απαιτεί σημαντικό βαθμό κρίσης.

Οι Breed και Dotterrer [14] επέλεξαν να στρώνουν τρυβλία εις τριπλούν από κάθε αραίωση, απαιτώντας τα αποδεκτά τρυβλία για μέτρηση να είναι εντός του 20 % του μέσου όρου τους. Επίσης, έκριναν ότι τα τρυβλία με περισσότερα από 400 CPU δεν ήταν ικανοποιητικά για μέτρηση, όπως και εκείνα που ήταν λιγότερο από 30 CPU, με τα καλύτερα αποτελέσματα στο εύρος 50-200 CPU/τρυβλίο. Σήμερα, βάση των προτύπων ASTM [15] απαιτούνται 20-80 CPU/μεμβράνη και 30-300 CPU για τρυβλία ενώ το Εγχειρίδιο της Αμερικανικής Υπηρεσίας Τροφίμων και Φαρμάκων για Βακτηριακές Αναλύσεις (BAM) [16] συνιστά 25-250 CPU/τρυβλίο, ώστε τα αποτελέσματα να θεωρούνται αξιόπιστα.

Το ανώτερο όριο αποικιών ανά τρυβλίο εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως είναι το μέγεθος και η συμπεριφορά των αποικιών (π.χ. εξάπλωση), όπως επίσης και η "στρωμένη" επιφάνεια του τρυβλίου. Το μέγεθος έχει ιδιαίτερη σημασία κατά την επίστρωση μεμβράνης για τον προσδιορισμό των CPU, καθώς η επιφάνεια της εν λόγω μεμβράνης είναι τόσο πολύ μικρότερη από εκείνη ενός προτύπου τρυβλίου. Όταν, λοιπόν, οι αποικίες είναι πάρα πολλές για

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

να μετρηθούν (TNTC), τότε αυτό μπορεί να αναφερθεί με αρκετούς τρόπους [8]. Το ASTM [15] συνιστά να αναφέρετε αυτό ως > "ανώτατο όριο". Το BAM του FDA συνιστά απαρίθμηση των αποικιών από την κατάλληλη αραιώση που δίνει αποικίες πλησιέστερα στις 250, μετρώντας ένα τμήμα του τρυβλίου και εκτιμώντας τον συνολικό αριθμό. Το Υπουργείο Γεωργίας των Η.Π.Α (USDA) συνιστά τη χρήση πλέγματος στο τμήμα της περιοχής μέτρησης, στη συνέχεια, τον προσδιορισμό του μέσου CPU/πλέγμα και τον πολλαπλασιασμό αυτού του μέσου όρου των CPU/πλέγμα με τον αριθμό των δικτύων στο τρυβλίο [17].

Ο λόγος που υπάρχει ένα ανώτατο όριο για τον αριθμό των CPU/πλάκα είναι ότι οι αποικίες αρχίζουν να ανταγωνίζονται για τον χώρο και τα θρεπτικά συστατικά, με αποτέλεσμα η καταμέτρηση να μην είναι σωστή. Αν υπάρχουν μετρήσιμες αποικίες, αλλά είναι κάτω από τα μετρήσιμα όρια, προτείνεται να μετριοούνται έτσι κι αλλιώς και να αναφέρεται μια κατ'εκτίμηση μέτρηση. Η Φαρμακοποιία των Η.Π.Α (USP) δεν έχει ειδική σύσταση σχετικά με το πώς να αναφέρονται οι χαμηλοί αριθμοί αποικιών, αλλά σημειώνει ότι "τα χαμηλότερα όρια μέτρησης για καλλιέργειες έπειτα από τη μεγαλύτερη αραιώση σε σειρά πρέπει να αιτιολογείται" [18]. Το BAM του FDA συνιστά μια διαφορετική μορφή εκθέσεων [16]. Συγκεκριμένα, όλες οι μετρήσεις καταγράφονται στα ανεπεξέργαστα δεδομένα, αλλά οι πληροφορίες αναφέρονται ως <LOQ.

Στην ιδανική περίπτωση που ποτέ δεν θα δούμε δύο ξεχωριστές αραιώσεις με μετρήσεις εντός των ορίων που αναφέρθηκαν, τα όρια αυτά καλύπτονται από ένα φάσμα 10-πλάσιας αραιώσης. Ωστόσο, αυτό δεν συμβαίνει πάντα. Το ASTM προτείνει να ληφθούν και οι δύο αραιώσεις υπόψη, να γίνει καθορισμός της CFU/mL (ή ανά γραμμάριο) χωριστά για το καθένα και ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων να αποτελεί το τελικό αποτέλεσμα [15].

Παρά τις δυσκολίες που συνδέονται με την εν λόγω μέτρηση, η διαδικασία δίνει την καλύτερη εκτίμηση του αριθμού των βιώσιμων κυττάρων σε ένα δείγμα και έτσι χρησιμοποιείται ευρέως σε πολλούς τομείς της μικροβιολογίας. Για παράδειγμα, χρησιμοποιείται στα τρόφιμα, τα γαλακτοκομικά, την ιατρική, και την υδρόβια μικροβιολογία. Η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα της υψηλής ευαισθησίας. Αυτό το χαρακτηριστικό επιτρέπει την ευαίσθητη ανίχνευση της μικροβιακής μόλυνσης των τροφίμων ή άλλων υλικών.

3. 2. 3. Στοχευμένη Καταμέτρηση Τρυβλίων

Η χρήση ιδιαίτερα επιλεκτικού μέσου καλλιέργειας και οι συνθήκες ανάπτυξης επιτρέπουν την στόχευση μόνο συγκεκριμένων ειδών, ή σε ορισμένες περιπτώσεις ακόμη και ένα μόνο είδος, σε ένα μικτό πληθυσμό των μικροοργανισμών που υπάρχουν στο δείγμα. Για παράδειγμα, ένα σύμπλοκο μέσο που περιέχει 10% NaCl είναι πολύ χρήσιμο στην απομόνωση ειδών *Staphylococcus* από το δέρμα, επειδή το άλας παρεμποδίζει την ανάπτυξη των περισσότερων από άλλα βακτήρια. Σε πρακτικές εφαρμογές, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, η απαρίθμηση των ζωντανών κυττάρων σε διάφορα μέσα επιτρέπει την ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση των μικροοργανισμών που υπάρχουν σε ένα προϊόν διατροφής. Δηλαδή, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ένα μέσο για τη συνολική καταμέτρηση των μικροοργανισμών και ένα δεύτερο μέσο για τη στόχευση ενός συγκεκριμένου οργανισμού, όπως για παράδειγμα κάποιο συγκεκριμένο παθογόνο. Οι στοχευμένες καταμετρήσεις είναι κοινές σε λύματα και άλλες αναλύσεις του νερού. Για παράδειγμα, εντερικά βακτήρια προέρχονται από τα κόπρανα και είναι εύκολο να στοχευθούν με τη χρήση επιλεκτικών μέσων. Έτσι, εάν εντερικά βακτήρια ανιχνευθούν σε ένα

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

δείγμα νερού από μια περιοχή κολύμβησης, για παράδειγμα, η παρουσία τους είναι ένα σήμα ότι το νερό δεν είναι ασφαλές για τον άνθρωπο [102].

3.3. Θολοσιμετρικοί Μέθοδοι

Κατά τη διάρκεια της εκθετικής ανάπτυξης, όλα τα κυτταρικά συστατικά αυξάνονται κατά αναλογία με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων. Έτσι, αντί για τη μέτρηση μεταβολών στον αριθμό των κυττάρων με το χρόνο, θα μπορούσε κανείς να μετρήσει την αύξηση των πρωτεϊνών, του γενετικού υλικού (DNA), ή το ξηρό βάρος της καλλιέργειας ως βαρόμετρο της ανάπτυξης. Ωστόσο, δεδομένου ότι τα κύτταρα σκεδάζουν το φως, μία ταχεία και αρκετά χρήσιμη μέθοδος υπολογισμού των αριθμών των κυττάρων που βασίζονται σε αυτή την ιδιότητα είναι η θολερότητα.

Ένα εναιώρημα κυττάρων φαίνεται θολό στο μάτι, επειδή τα κύτταρα σκεδάζουν το φως που διέρχεται μέσα από το εναιώρημα. Όσο περισσότερα κύτταρα υπάρχουν, τόσο περισσότερο φως σκεδάζεται, και ως εκ τούτου τόσο πιο θολό είναι το εναιώρημα. Αυτό που στην πραγματικότητα αξιολογείται σε μια θολοσιμετρική μέτρηση είναι η συνολική μάζα των κυττάρων. Ωστόσο, επειδή η κυτταρική μάζα είναι ανάλογη προς τον αριθμό των κυττάρων, η θολερότητα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα μέτρο του αριθμού των κυττάρων ενώ επίσης χρησιμοποιείται για την παρακολούθηση της αύξησης του αριθμού των κυττάρων μιας αναπτυσσόμενης καλλιέργειας [118, 119, 120, 121, 122, 102, 123].

3.3.1. Οπτική Πυκνότητα

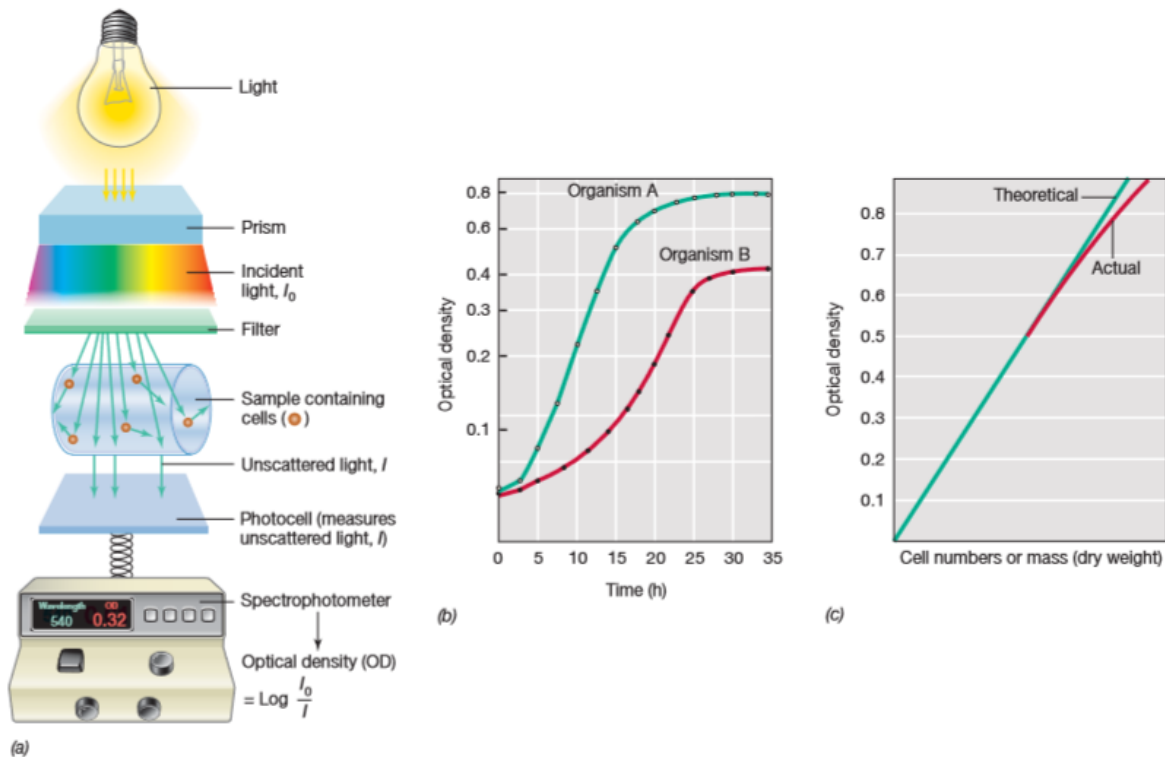
Η θολερότητα μετράται με φασματοφωτόμετρο, μια διάταξη που περνάει το φως μέσα από ένα κυτταρικό εναιώρημα και μετρά το ασκέδαστο φως που προκύπτει. Όσο περισσότερα κύτταρα βρίσκονται στο κυτταρικό εναιώρημα, τόσο περισσότερο θολό θα είναι (Εικόνα 4). Ένα φασματοφωτόμετρο χρησιμοποιεί ένα πρίσμα ή φράγμα περίθλασης για να δημιουργήσει προσπίπτον φως για συγκεκριμένου μήκος κύματος (Εικόνα 4a). Κοινώς χρησιμοποιούμενα μήκη κύματος για βακτηριακές μετρήσεις θολερότητας είναι τα 480 nm (μπλε), τα 540 nm (πράσινο), τα 600 nm (πορτοκαλί) και τα 660 nm (κόκκινο). Η ευαισθησία είναι μεγαλύτερη σε χαμηλά μήκη κύματος, αλλά οι μετρήσεις πυκνών κυτταρικών αιωρημάτων είναι πιο ακριβείς σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η μονάδα θολερότητας ονομάζεται οπτική πυκνότητα (OD) σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, δηλαδή για παράδειγμα, OD_{540} για φασματοφωτομετρικές μετρήσεις στα 540 nm (Εικόνα 4). Ο όρος απορρόφηση (A), για παράδειγμα A_{540} , χρησιμοποιείται επίσης ευρέως, αλλά θα πρέπει να γίνει κατανοητό ότι αυτό που μετράται στις θολοσιμετρικές μετρήσεις της μικροβιακής ανάπτυξης είναι η σκέδαση του φωτός και όχι η απορρόφηση [102].

3.3.2. Συσχέτιση του OD με τον Κυτταρικό Αριθμό

Για μονοκύτταρους οργανισμούς, το OD είναι ανάλογο, εντός ορισμένων ορίων, με τον αριθμό των κυττάρων. Η θολερότητα μπορεί, επομένως, να χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατο για το σύνολο ή των βιώσιμων μεθόδων καταμέτρησης. Ωστόσο, πριν να γίνει αυτό, πρέπει να βρεθεί η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς που συσχετίζει τον αριθμό των κυττάρων, το ξηρό βάρος ή την περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες με την θολερότητα. Όπως μπορεί να δει κανείς σε μια τέτοια καμπύλη (Εικόνα 4c), η σχέση αναλογίας ισχύει μόνο εντός κάποιων ορίων. Αυτό

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

συμβαίνει γιατί σε υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων, το φως που σκεδάζεται μακριά από το φωτοκύτταρο του φασματοφωτομέτρου εξαιτίας ενός κυττάρου μπορεί να σκεδαστεί από ένα άλλο κύτταρο. Για το φωτοκύτταρο, αυτό είναι σαν το φως να μην είχε σκεδαστεί ποτέ. Σε τέτοιες υψηλές πυκνότητες κυττάρων, η αντιστοιχία ένα-προς-ένα μεταξύ του αριθμού των κυττάρων και της θολερότητας αποκλίνει από τη γραμμικότητα και οι μετρήσεις OD γίνονται λιγότερο ακριβείς. Ωστόσο, μέχρι αυτό το όριο, οι μετρήσεις θολερότητας μπορεί να είναι ακριβή μέτρα του αριθμού κυττάρων ή του ξηρού βάρους. Επίσης, επειδή διαφορετικοί οργανισμοί διαφέρουν στο μέγεθος και το σχήμα, ίσοι αριθμοί κυττάρων από δύο διαφορετικά βακτηριακά είδη δεν θα αποδώσει αναγκαστικά το ίδιο OD. Έτσι, για την συσχέτιση του OD με τον πραγματικό αριθμό κυττάρων, πρέπει να γίνει μια πρότυπη καμπύλη που να συνδέει αυτές τις δύο παραμέτρους για κάθε διαφορετικό οργανισμό που καλλιεργείται στο εργαστήριο. Οι μετρήσεις θολερότητας έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι γρήγορες και εύκολες στην εκτέλεσή τους. Επίσης, μπορούν να λάβουν χώρα χωρίς να καταστραφεί ή να διαταραχθεί αισθητά το δείγμα. Για τους λόγους αυτούς, οι μετρήσεις θολερότητας χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροβιακών καλλιεργειών [25]. Το ίδιο δείγμα μπορεί να ελέγχεται κατ'επανάληψη και οι μετρήσεις απεικονίζονται σε ημιλογαριθμικό διάγραμμα συναρτήσεως του χρόνου. Από αυτά, είναι εύκολο να υπολογιστεί ο χρόνος γενεάς και άλλες παράμετροι της αναπτυσσόμενης καλλιέργειας (Εικόνα 4b).



Εικόνα 23 Μέτρηση θολερότητας για τον προσδιορισμό της μικροβιακής ανάπτυξης. (a) Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται σε ένα φασματοφωτόμετρο και οι ενδείξεις αναφέρονται σε οπτική πυκνότητα. (b) Τυπικές καμπύλες ανάπτυξης για δύο μικροοργανισμούς με διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης. (c) Η σχέση ανάμεσα στον αριθμό των κυττάρων ή την ξηρή βιομάζα και στις μετρήσεις θολερότητας [102].

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Παρόλα αυτά, οι μετρήσεις θολερότητας δεν είναι πάντα εφικτές [102, 125]. Παρά το γεγονός ότι πολλοί μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε υγρό μέσο, πολλοί άλλοι δεν το κάνουν. Μερικά βακτήρια σχηματίζουν μικρές ή μεγάλες συστοιχίες και σε τέτοιες περιπτώσεις, οι μετρήσεις OD μπορεί να είναι αρκετά ανακριβής ως μέτρο της συνολικής μικροβιακής μάζας. Επιπλέον, πολλά βακτήρια αναπτύσσονται σε βιοφίλμ, π.χ. σε τοιχώματα σωλήνων. Έτσι, για τον προσδιορισμό της κυτταρικής μάζας μέσω του OD, με ακρίβεια, σε μια υγρή καλλιέργεια, οι συστοιχίες και η δημιουργία βιοφίλμ πρέπει να ελαχιστοποιηθούν. Αυτό μπορεί συχνά να επιτευχθεί με ανάδευση ή ανακίνηση, ώστε κατά την διάρκεια της διαδικασίας ανάπτυξης να αποφευχθεί ο σχηματισμός κυτταρικών συσσωματωμάτων και βιολογικών φιλμ.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] K. Todar, «Todar's Online Textbook of Bacteriology,» Madison, Wisconsin, 2008-2012. [Ηλεκτρονικό]. Available: www.textbookofbacteriology.net. [Πρόσβαση 29 07 2015].
- [2] A. Singh, B. H. Pyle και G. A. McFeters, *J. Microbiol. Methods*, vol. 10, pp. 91-101, 1989.
- [3] M. T. Madigan, J. M. Martinko, D. A. Stahl και D. P. Clark, *Brock Biology of Microorganisms*, San Francisco: Pearson Education Inc., 2012.
- [4] M. M. H. Mohammadd, «Practical microbiology-Direct microscopic count,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.uobabylon.edu.iq/eprints/paper_2_13669_749.pdf. [Πρόσβαση 07 29 2015].
- [5] Y.-F. Young, H.-J. Lee, Y.-S. Shen, S.-H. Tseng, C.-Y. Lee και N.-H. Tai, *Mater. Chem. Phys.*, vol. 134, pp. 279-286, 2012.
- [6] X. Dong, Y. Tang, M. Wu, B. Vlahovic και L. Yang, *J. Biol. Eng.*, vol. 7, 2013.
- [7] A. A. Chaudhari, S. L. Jasper, E. Dosunmu, M. E. Miller, R. D. Arnold, S. R. Singh και S. Pillai, *J. Nanobiotechnology*, vol. 13, pp. 1-17, 2015.
- [8] S. Sutton, *Journal of Validation Technology*, vol. 17, pp. 42-46, 2011.
- [9] L. Maturin και J. T. Peeler, «Bacteriological Analytical Manual - Aerobic Plate Count,» U.S. Food and Drug Administration, 2001.
- [10] M. R. Zipkes, J. Gilchrist και J. T. Peeler, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, vol. 64, pp. 1465-1469, 1981.
- [11] ModuleStudio 0.5.4, «Microbiology Laboratories,» [Ηλεκτρονικό]. Available: <http://inst.bact.wisc.edu/inst/index.php?module=book&type=user&func=displayarticle&aid=106>. [Πρόσβαση 29 07 2015].
- [12] H. R. Barbosa, M. F. A. Rodrigues, C. .. Campos, M. E. Chaves, I. Nunes, Y. Juliano και N. F. Novo, *J. Microbiol. Methods*, vol. 22, pp. 39-50, 1995.
- [13] T. L. Snyder, *Biological Plate Counting Methods*, vol. 54, pp. 641-654, 1947.
- [14] R. Breed και W. Dotterer, *J. Bacterial.*, vol. 1, pp. 321-331, 1916.
- [15] ASTM, «Standard Practice for Determining Microbial Colony Counts from Water Analyzed by Plating Methods,» 1998.
- [16] L. J. Maturin και J. Peeler, «Chapter 3: Aerobic Plate Count,» [Ηλεκτρονικό]. Available: Bacteriological Analysis Manual, <http://www.fda.gov/Food/Sd.enceResearch/LaboratoryMethods/Bacteriological-AnalyticalManualBAM/ucrn063346.htm>. [Πρόσβαση 28 06 2011].
- [17] USDA, «Laboratory Guidebook MLG 3.01 Quantitative Analysis of Bacteria in Foods as Sanitary Indicators,» [Ηλεκτρονικό]. Available: http://www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_3_01.pdf. [Πρόσβαση 28 06 2011].
- [18] USP, «<1227> Validation of Microbial Recovery from Pharmacopeial Articles,» pp. 783-786, 2011.
- [19] C. Yang, J. Mamouni, Y. Tang και L. Yang, *Langmuir*, vol. 26, pp. 16013-16019, 2010.
- [20] S. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M. W. Chang, R. Xu, Y. Yang και Y. Chen, *ACS Nano*, vol. 3, pp. 3891-3902, 2009.
- [21] H. Z. Zardini, A. Amiri, M. Shanbedi, M. Maghrebi και M. Baniadam, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 92, pp. 196-202, 2012.

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

- [22] X. Zheng, Y. Su, Y. Chen, R. Wan, M. Li, Y. Wei και H. Huang, *Sci. Re.* , vol. 4, pp. 1-7, 2014.
- [23] A. Magrez, S. Kasas, V. Salicio, N. Pasquier, J. W. Seo, M. Celio, S. Catsicas, B. Schwaller και L. Forro, *Nano Lett.*, vol. 6, pp. 1121-1125, 2006.
- [24] L. R. Arias και L. Yang, *Langmuir* , vol. 25, pp. 3003-3012, 2009.
- [25] A. Dorfman και M. L. Ott, *J. Biol. Chem.* , vol. 172, pp. 367-375, 1948.
- [26] M. D. J. Spaun, *Bull. Wld. Hlth. Org.*, vol. 26, pp. 219-225, 1962.

ΜΕΛΕΤΗ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗΣ: ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ *E. COLI*

4. 1. Μέθοδοι και Υλικά

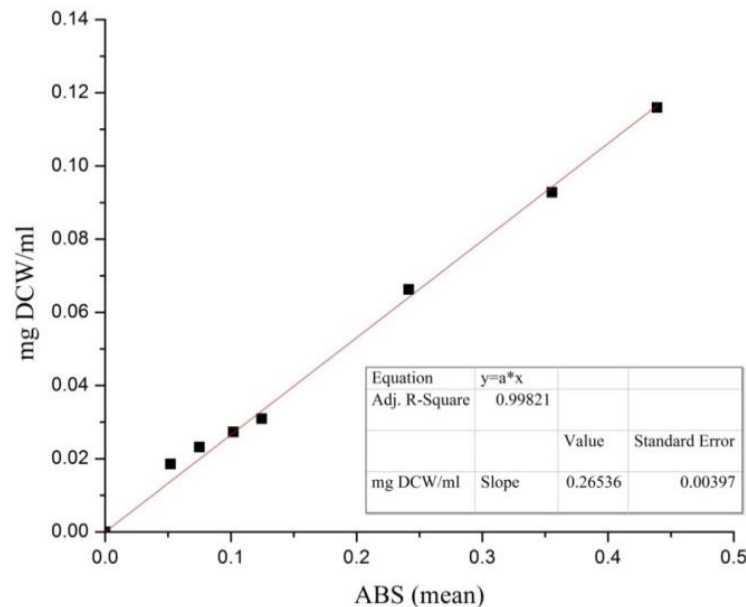
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη σε στερεό μέσο με τη μέθοδο spread-plate που αναλύθηκε στην παράγραφο 3.2. Για την επίστρωση χρησιμοποιήθηκε μίγμα LB - άγαρ. Η αραίωση του κυτταρικού εναιωρήματος (βλ. παράγραφο 3.2.1.) πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα το οποίο ρυθμίστηκε σε pH 7.3 – 7.4 και περιείχε:

- 7.2 g NaCl
- 0.37 g KCl
- 0.17 g CaCl₂ σε 1 L H₂O

Τα τρυβλία επώαστηκαν για 16 h στους 37 °C. Η επίστρωση για κάθε δείγμα CNTs έγινε τρεις φορές. Οι νανοσωλήνες προστέθηκαν στα τρυβλία σε μορφή σκόνης.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη της *E. coli* σε υγρό μέσο για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών της ανάπτυξης παρουσία CNTs. Κατά τη διάρκεια της επώασης της *E. coli* στο θρεπτικό μέσο Luria Bertani (LB) (βλ. κεφάλαιο 1. 4. 1, Πίνακας 2, "ποσότητα κατά Miller") στους 37 °C με ανακίνηση στα 180 rpm, ελήφθησαν μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στα 600 nm (OD₆₀₀) στο φασματόμετρο υπεριώδους-ορατού (UV-Vis) V-630iRM (JASCO). Μέσω της καμπύλης αναφοράς που φαίνεται στο Διάγραμμα 1, οι παραπάνω μετρήσεις μετατράπηκαν σε ξηρή μάζα κυττάρων (DCW, mg/ml) οι οποίες, συναρτήσει του χρόνου, μας δίνουν τις καμπύλες ανάπτυξης που φαίνονται στις ακόλουθες παραγράφους. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις του κυτταρικού αιωρήματος και μετρήθηκαν οι απορροφήσεις αυτών. Ακολούθησε η διήθηση του κυτταρικού αιωρήματος σε προζυγισμένους ηθμούς. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε καλή έκπλυση και ακολούθησε ξήρανση αυτών στους 65 °C μέχρι σταθερού βάρους.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Διάγραμμα 1 Καμπύλη συσχέτισης τιμές απορρόφησης με mg DCW/ml.

Ο λεπτομερής χαρακτηρισμός των δειγμάτων MWCNTs είναι απαραίτητος για τη σύνδεση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων με την αντιβακτηριακή δράση. Οι ιδιότητες που σχετίζονται τόσο με τις εμπορικές εφαρμογές όσο και με την κυτταροτοξικότητα περιλαμβάνουν τη διάμετρο, το μήκος, την καθαρότητα του δείγματος και την ύπαρξη ή μη επιφανειακής ή άλλης τροποποίησης [1]. Τα χαρακτηριστικά των CNTs που χρησιμοποιήθηκαν για την διερεύνηση της επίδρασής τους στα βακτήρια *E. coli*, φαίνονται στον Πίνακα 5. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες ίδιου μήκους αλλά διαφορετικής εξωτερικής διαμέτρου, για τη διερεύνηση της επίδρασης του μεγέθους στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες ίδιου μήκους και εξωτερικής διαμέτρου αλλά διαφορετικής επιφανειακής τροποποίησης, για τη διερεύνηση της επίδρασης της επιφανειακής τροποποίησης στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Πίνακας 5 Χαρακτηριστικά μεγέθη των CNTs που χρησιμοποιήθηκαν.

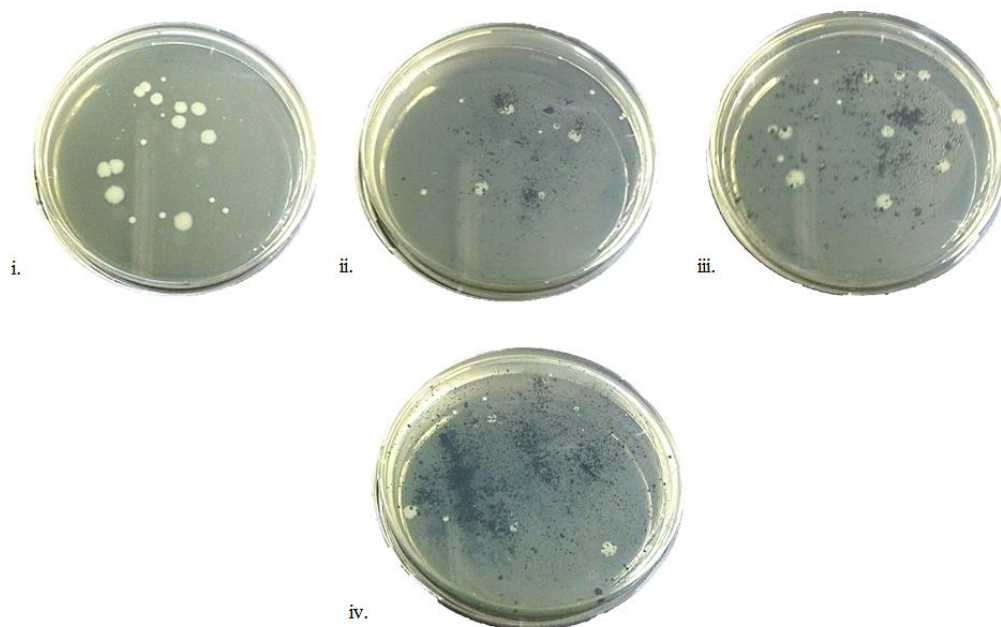
Είδος	Εξωτερική Διάμετρος [nm]	Μήκος [μm]	Καθαρότητα [%]	Κωδικός Δείγματος
Commercial MWCNTs	15-35	≥ 10	97	com1
Commercial Thin-MWCNTs	6-15	≥ 10	≤94	com2
MWCNTs	20-30	≥ 10	≥96	p-CNTs
F- MWCNTs (-COOH)	20-30	≥ 10	≥96	f-CNTs
F- MWCNTs (amino)	20-30	≥ 10	≥96	a-CNTs

4. 2. Επίδραση του Μεγέθους

Αρχικά, έγινε διερεύνηση της επίδρασης του μεγέθους στην ανάπτυξη της *E. coli*. Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά CNTs ίδιου μήκους αλλά διαφορετικής εξωτερικής διαμέτρου, τα χαρακτηριστικά των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 5. Τα δείγματα που ελέγχθηκαν λήφθηκαν από την εταιρία Nanothinx και έχουν κωδικό προϊόντος NTX1 και NTX2 για τη μεγάλη και μικρή διάμετρο, αντίστοιχα. Στις παραγράφους που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επώαση της *E. coli* παρουσία διαφόρων ποσοτήτων από ένα είδος CNTs κατά την καλλιέργεια σε στερεό και υγρό μέσο.

4. 2. 1. Εμπορικοί νανοσωλήνες άνθρακα μεγάλης διαμέτρου

Έπειτα από την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που επιστρώθηκαν, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στις Εικόνα 24 και Εικόνα 25.



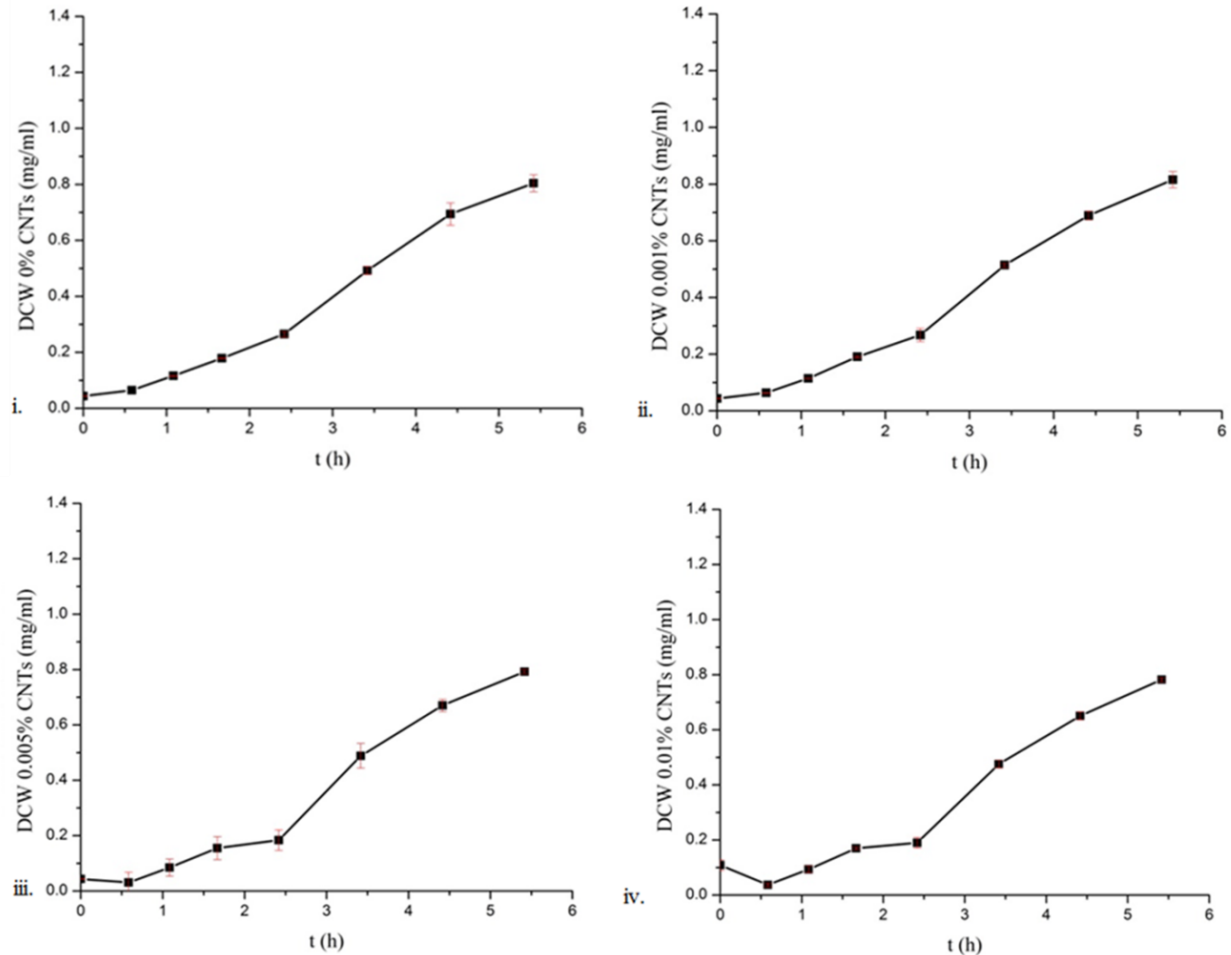
Εικόνα 24 Επώαση της *E. coli* σε άγαρ για 16 h, παρουσία i) 0g com1 /100ml άγαρ ii) 0.02g com1 /100ml άγαρ, iii) 0.04g com1 /100ml άγαρ, iv) 0.10g com1 /100ml άγαρ.

Συγκεκριμένα, απουσία CNTs, ο αριθμός των αποικιών ήταν 22×10^7 CFU/ml. Παρουσία εμπορικών CNTs μεγάλης διαμέτρου 0.02g/100ml άγαρ, ο αριθμός των αποικιών ήταν 15×10^7 CFU/ml, παρουσία 0.04g/100ml άγαρ, ο αριθμός των αποικιών ήταν 14×10^7 CFU/ml και παρουσία 0.10g/100ml άγαρ, ο αριθμός των αποικιών ήταν 12×10^7 CFU/ml. Παρουσιάστηκε, δηλαδή, μείωση του αριθμού των αποικιών κατά 32%, 36% και 45%, αντίστοιχα.

Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη σε υγρό μέσο καλλιέργειας για διαφορετικές ποσότητες CNTs. Από τις μετρήσεις OD₆₀₀ κατά τη διάρκεια της επώασης της *E. coli* στο μέσο LB παρουσία εμπορικών μη τροποποιημένων CNTs μεγάλης και μικρής διαμέτρου και μέσω της καμπύλης αναφοράς (Διάγραμμα 1) κατασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαγράμματα. Αρχικά,

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

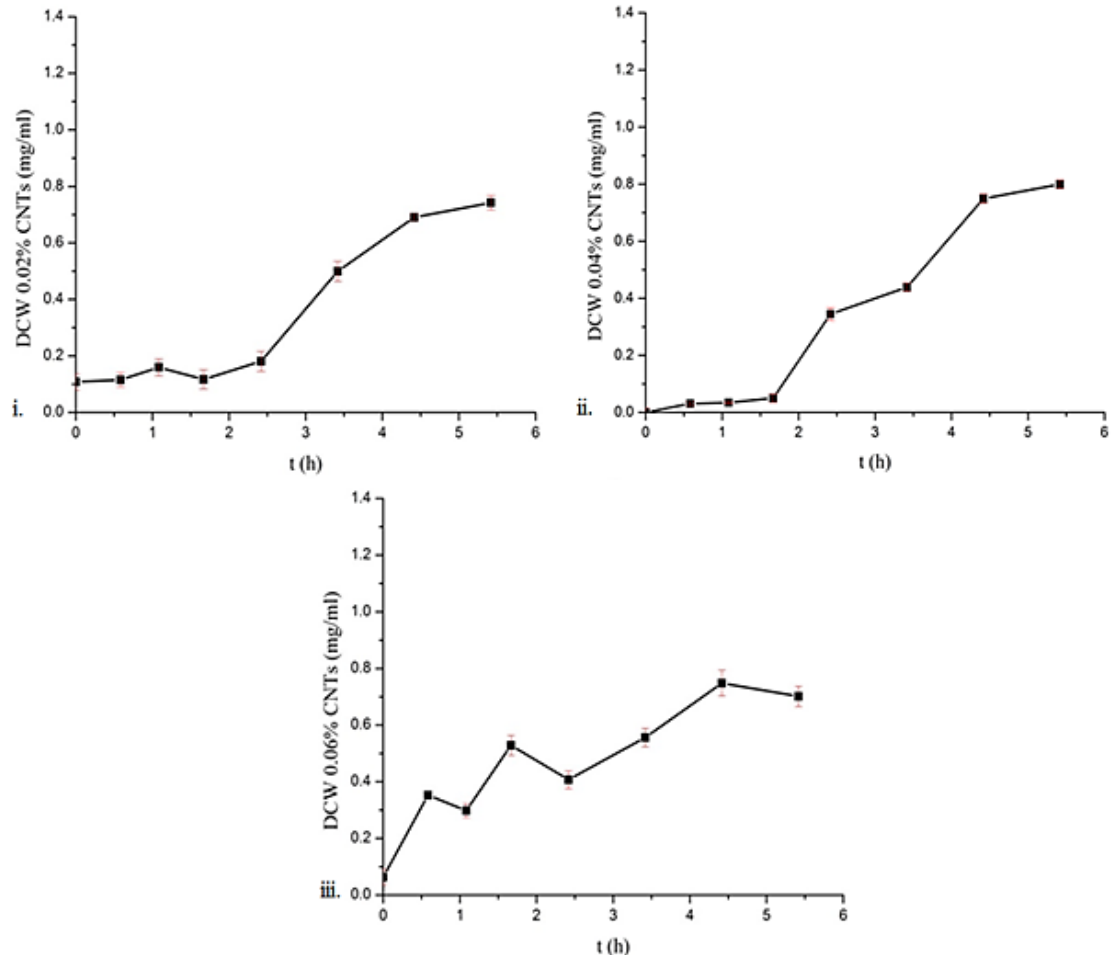
συγκρίθηκαν τα δείγματα που περιείχαν ποσότητες CNTs έως και 0.01 gcom1/100ml LB (Διάγραμμα 2 ii, iii, iv) με το δείγμα που δεν περιείχε CNTs (Διάγραμμα 2 i). Η επίδραση στην ανάπτυξη παρατηρήθηκε ότι δεν ήταν μεγάλη. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις κινητικές σταθερές του Πίνακας 6, οι οποίες θα συζητηθούν στη συνέχεια.



Διάγραμμα 2 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0g com1/100ml LB, ii) 0.001g com1/100ml LB, iii) 0.005g com1/100ml LB και iv) 0.01g com1/100ml LB.

Έπειτα, διερευνήθηκε η επίδραση της προσθήκης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων στην ανάπτυξη των βακτηρίων. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 3. Παρατηρείται ότι για συγκέντρωση έως και 0.04g CNTs/100ml η μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων δεν μεταβάλλεται ιδιαίτερα σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs. Για συγκεντρώσεις από 0.06g CNTs/100ml, η μείωση που παρατηρείται στην μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων είναι της τάξης του 32%.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



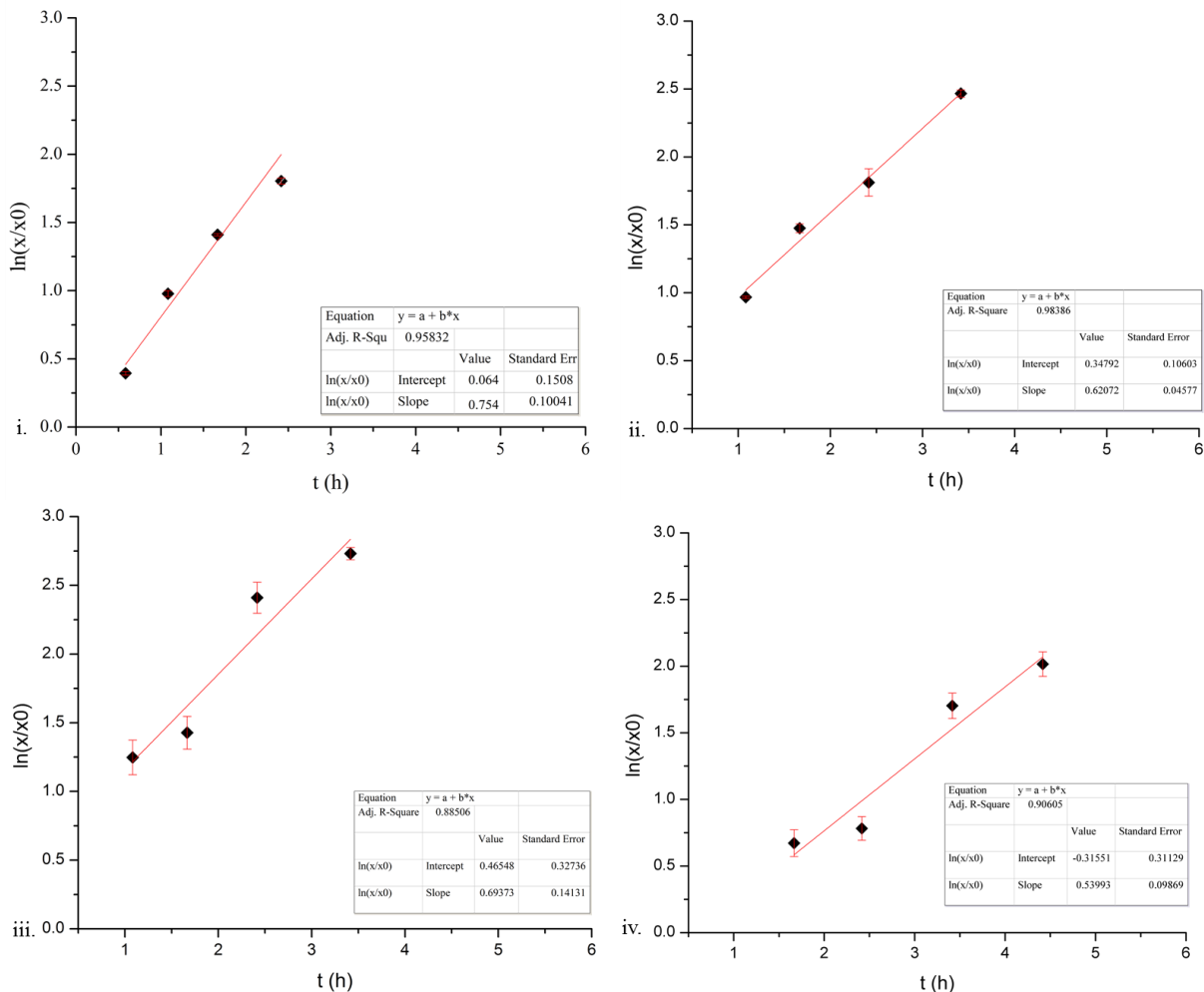
Διάγραμμα 3 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0.02g com1/100ml LB, ii) 0.04g com1/100ml LB και iii) 0.06g com1/100ml LB.

Για τον υπολογισμό των κινητικών σταθερών ανάπτυξης απαιτείται η λογαρίθμηση του εκθετικού τμήματος των παραπάνω καμπυλών. Μετά τη γραμμικοποίηση, προσαρμόζεται μέσω γραμμικής παλινδρόμησης η βέλτιστη ευθεία που διέρχεται από τα σημεία της εκθετικής φάσης. Από την κλίση της ευθείας που προκύπτει προσδιορίζουμε τον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, μ_{max} , δηλαδή την μέγιστη ταχύτητα με την οποία αναπτύσσονται τα βακτήρια.. Χρησιμοποιώντας μετά την εξίσωση (1) υπολογίζουμε τον χρόνο διπλασιασμού, t_d .

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_{max}} \quad (1)$$

Τα παραπάνω απεικονίζονται στα ακόλουθα διαγράμματα καθώς και στον Πίνακα 2 που ακολουθεί. Για συγκεντρώσεις έως 0,005% η αλληλεπίδραση των CNTs με τα βακτήρια ήταν μικρή και για αυτό δεν παρουσιάστηκε σημαντική μεταβολή στο μ_{max} (Πίνακας 6). Για συγκεντρώσεις πάνω από 0.04g com1/100ml LB υπήρξε σημαντική μεταβολή στο μ_{max} και ειδικότερα παρατηρήθηκε στη μέγιστη χρησιμοποιηθήσα συγκέντρωση (0.06g com1/100ml LB) μείωση στο μ_{max} της τάξης του 61%. Δοκιμάστηκαν και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αλλά δεν κατέστη δυνατή η μέτρησή τους.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



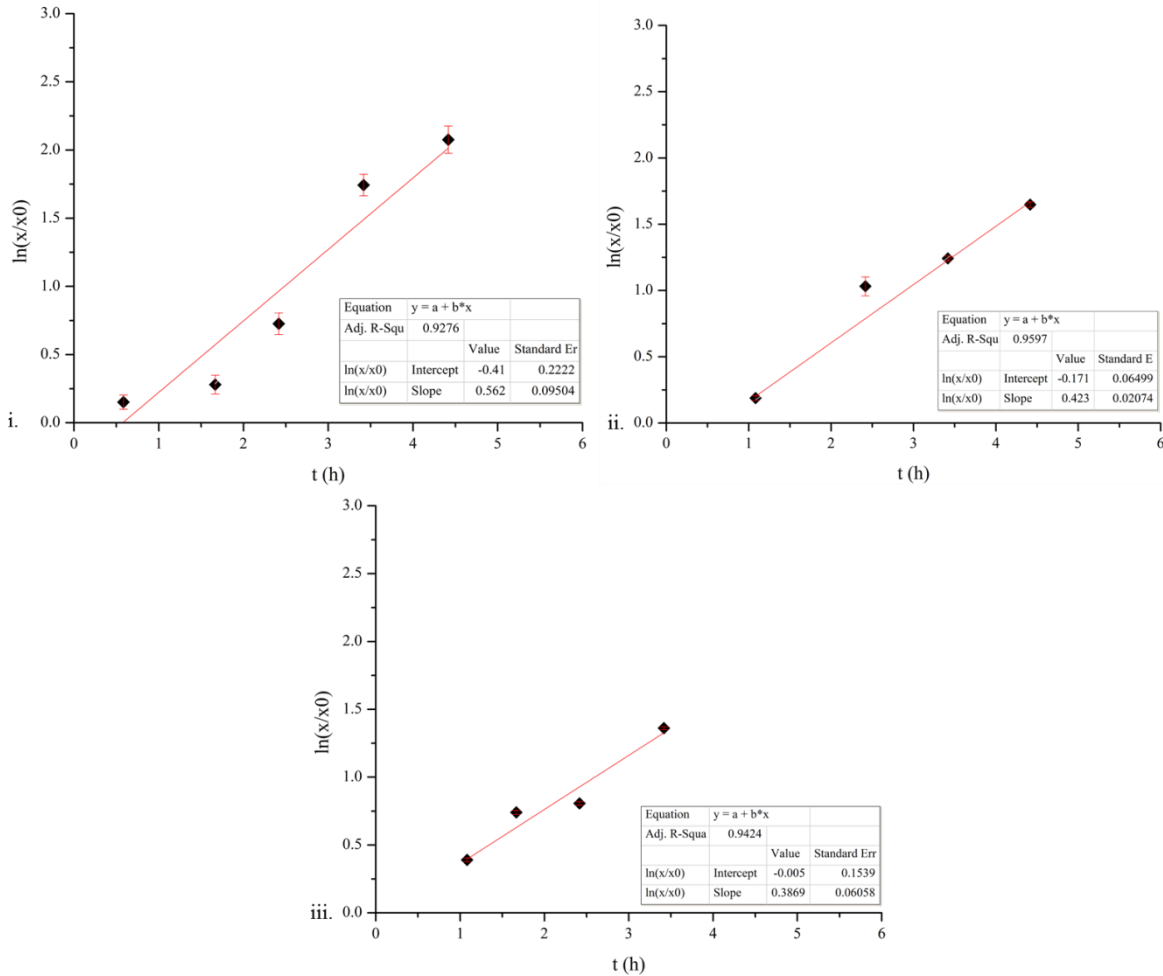
Διάγραμμα 4 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) για i) 0g com1/100ml LB, ii) 0.001g com1/100ml LB, iii) 0.005g com1/100ml LB και iv) 0.01g com1/100ml LB.

Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και από τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού των βακτηρίων (Πίνακας 2). Συγκεκριμένα, το t_d παρουσίασε αύξηση σχεδόν 34% και 78% για συγκεντρώσεις 0.02g και 0.04g com1/100ml LB, αντίστοιχα. Για συγκέντρωση 0.06g com1/100ml LB ο χρόνος που χρειάζονται ο βακτηριακός πληθυσμός για να διπλασιαστεί είναι κατά 95% μεγαλύτερος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (απουσία CNTs) στο οποίο τα βακτήρια αναπτύσσονται φυσιολογικά. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι με την προσθήκη μεγαλύτερης συγκέντρωσης CNTs μεγάλης διαμέτρου, ο χρόνος διπλασιασμού αυξάνεται, ενώ για συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0.06g com1/100ml LB, η αύξηση αυτή είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τις μικρότερες από αυτή συγκεντρώσεις. Παρατηρείται, δηλαδή, μείωση της ταχύτητας ανάπτυξης του μικροοργανισμού για συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες των 0.04g CNTs/100ml, χωρίς να μεταβάλλεται ιδιαίτερα η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση, ενώ για συγκέντρωση 0.06g CNTs/100ml η ανάπτυξη παρεμποδίζεται, γεγονός που επιβεβαιώνεται από τη μειωμένη κυτταρική συγκέντρωση.

Τα συγκεκριμένα CNTs εμφάνιζαν κακή διασπορά στο θρεπτικό μέσο. Έτσι για μικρές συγκεντρώσεις η αλληλεπίδρασή τους με τα βακτήρια ήταν μικρή, για αυτό και δεν

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

παρουσιάστηκε μεταβολή στην ανάπτυξη. Αυξανόμενη της ποσότητας, όμως, αυξήθηκε η αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τα CNTs.



Διάγραμμα 5 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) για i) 0.02g com1/100ml LB, ii) 0.04g com1/100ml LB και iii) 0.06g com1/100ml LB.

Πίνακας 6 Κινητικές σταθερές της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία εμπορικών CNTs μεγάλης διαμέτρου.

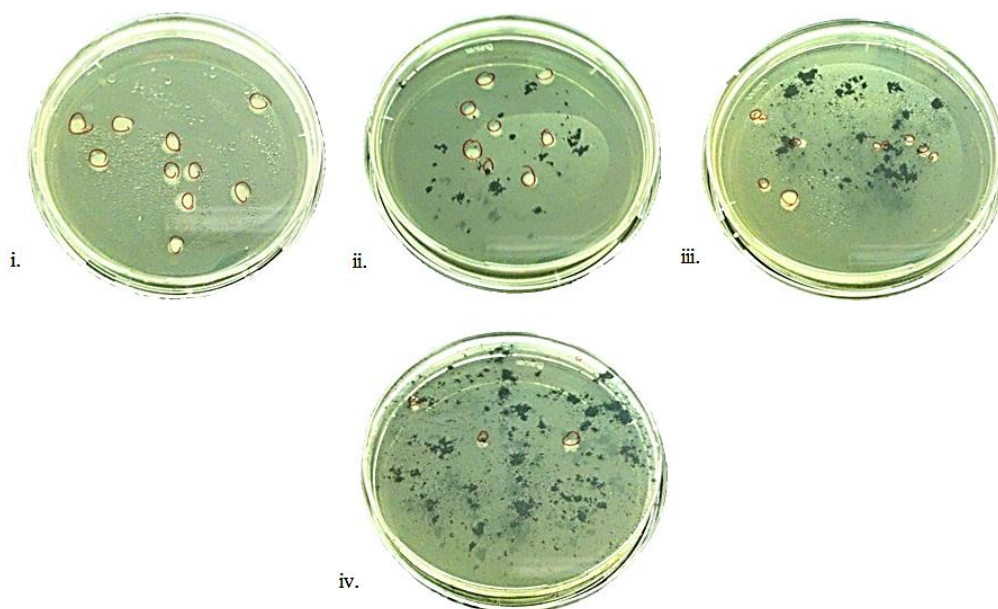
Δόση [% w/v]	μ_{\max} [h^{-1}]	Ποσοστό μείωσης* μ_{\max} [%]	t_d [h]	Ποσοστό αύξησης* t_d [%]
0	0.75	-	0.92	-
0.001	0.62	18	1.12	21
0.005	0.63	16	1.09	19
0.01	0.58	23	1.19	29
0.02	0.56	25	1.23	34
0.04	0.42	44	1.64	78
0.06	0.39	49	1.79	95

* Τα ποσοστά μεταβολής έχουν υπολογιστεί με βάση το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

4. 2. 2. Εμπορικοί νανοσωλήνες άνθρακα μικρής διαμέτρου

Για την περίπτωση των εμπορικών CNTs μικρής διαμέτρου, η μείωση των αποικιών για προστιθέμενες ποσότητες 0.02g/100ml άγαρ, 0.04g/100ml άγαρ και 0.10g/100ml άγαρ, ήταν 33%, 21% και 50%, αντίστοιχα. Η επίδραση, δηλαδή, στο σχηματισμό αποικιών είναι παραπλήσια για τα εμπορικά CNTs διαφορετικής διαμέτρου. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη σε υγρό μέσο καλλιέργειας για τα CNTs μικρής διαμέτρου και λήφθηκαν οι ακόλουθες καμπύλες ανάπτυξης.

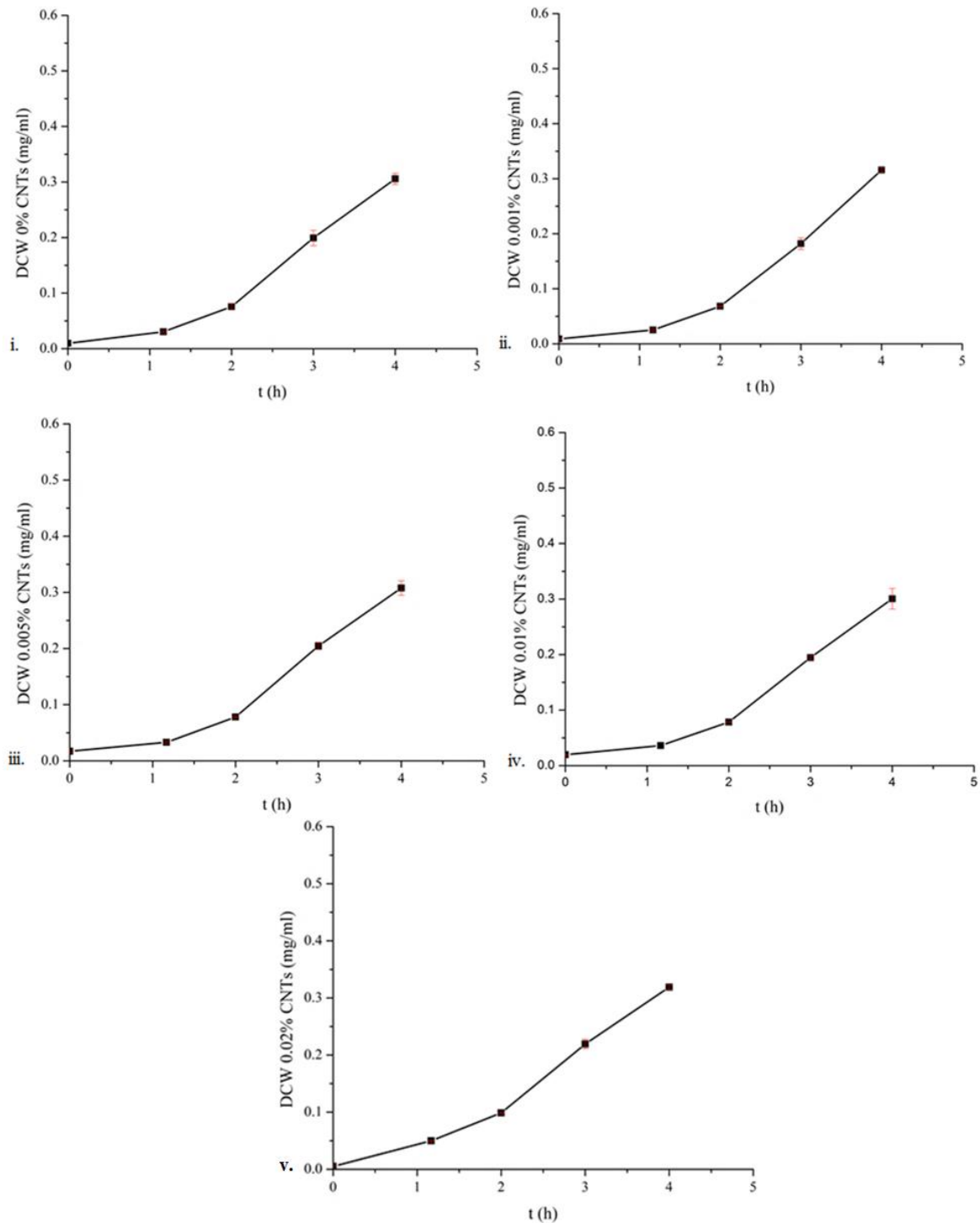


Εικόνα 25 Επώαση της *E. coli* σε άγαρ για 16 h, παρουσία i) 0g com2 /100ml άγαρ ii) 0.02g com2 /100ml άγαρ, iii) 0.04g com2 /100ml άγαρ, iv) 0.10g com2 /100ml άγαρ.

Συγκρίνοντας πάλι τα δείγματα που περιείχαν ποσότητες CNTs έως και 0.005g com2/100ml LB (Διάγραμμα 6 ii, iii, iv) με το δείγμα που δεν περιείχε CNTs (Διάγραμμα 6 i) παρατηρούμε ότι η προσθήκη των CNTs δεν επιδρά σημαντικά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις κινητικές σταθερές του Πίνακας 7. Παρουσία των συγκεντρώσεων 0.01g και 0.02g com2/100ml LB, η ταχύτητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού μειώνεται χωρίς όμως να παρουσιάζεται διαφοροποίηση στην μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση. Για συγκέντρωση 0.04g com2/100ml LB, όχι μόνο παρουσιάζεται αισθητή μείωση στην ταχύτητα ανάπτυξης αλλά και η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση μειώνεται 67% σε σχέση με το δείγμα ελέγχου. Για συγκεντρώσεις από 0.06g com2/100ml LB και μεγαλύτερες, ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται καθόλου.

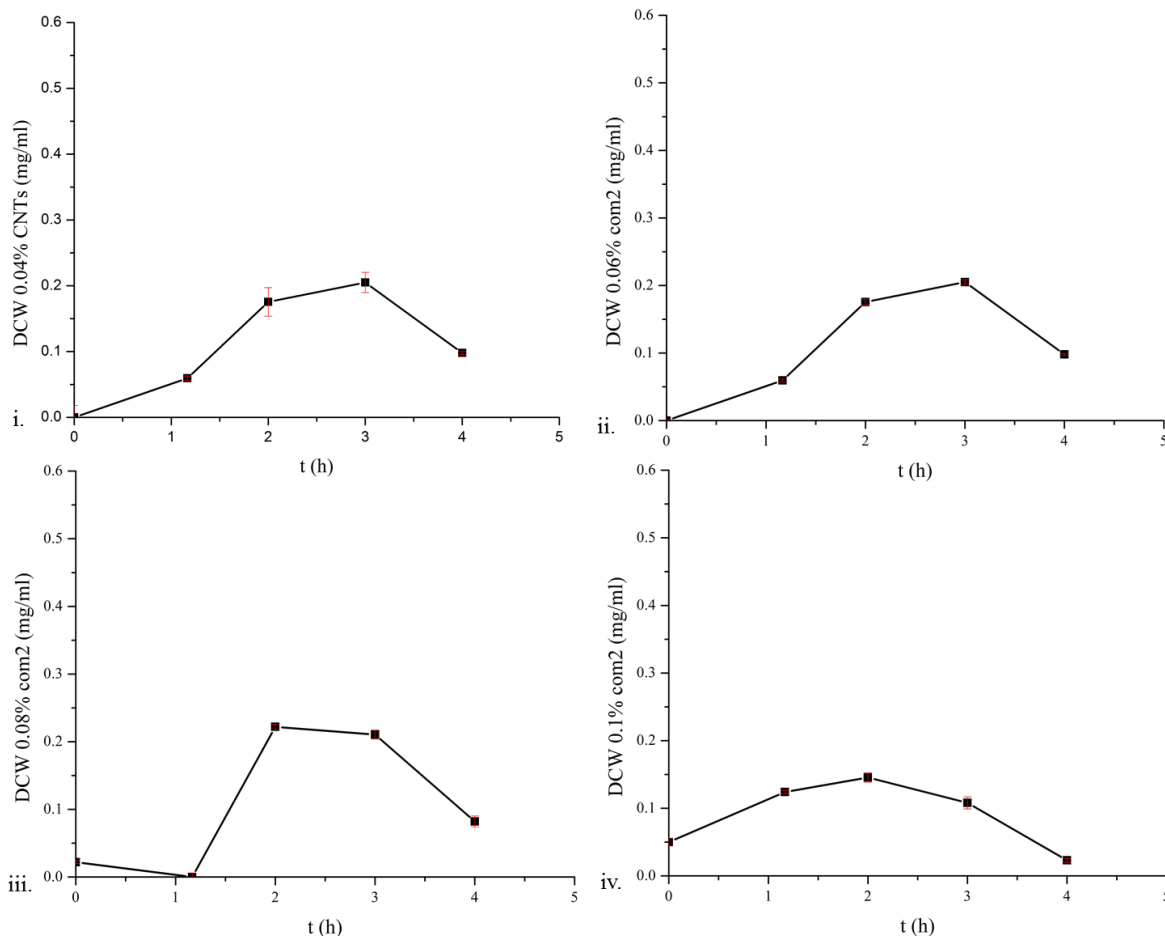
Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους νανοσωλήνες μεγάλης διαμέτρου, φαίνεται ότι η επίδραση των CNTs μικρής διαμέτρου στην βακτηριακή ανάπτυξη είναι ισχυρότερη, για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων. Όπως ήδη έχει αναφερθεί, για συγκεντρώσεις από 0.06g/100ml και μεγαλύτερες ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται καθόλου. Για αυτό το λόγο, όπως είναι κατανοητό, δεν κατέστη δυνατό να εκτιμηθούν οι κινητικές σταθερές της ανάπτυξης.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Διάγραμμα 6 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0g com2/100ml LB, ii) 0.001g com2/100ml LB, iii) 0.005g com2/100ml LB, iv) 0.01g com2/100ml LB και v) 0.02g com2/100ml LB.

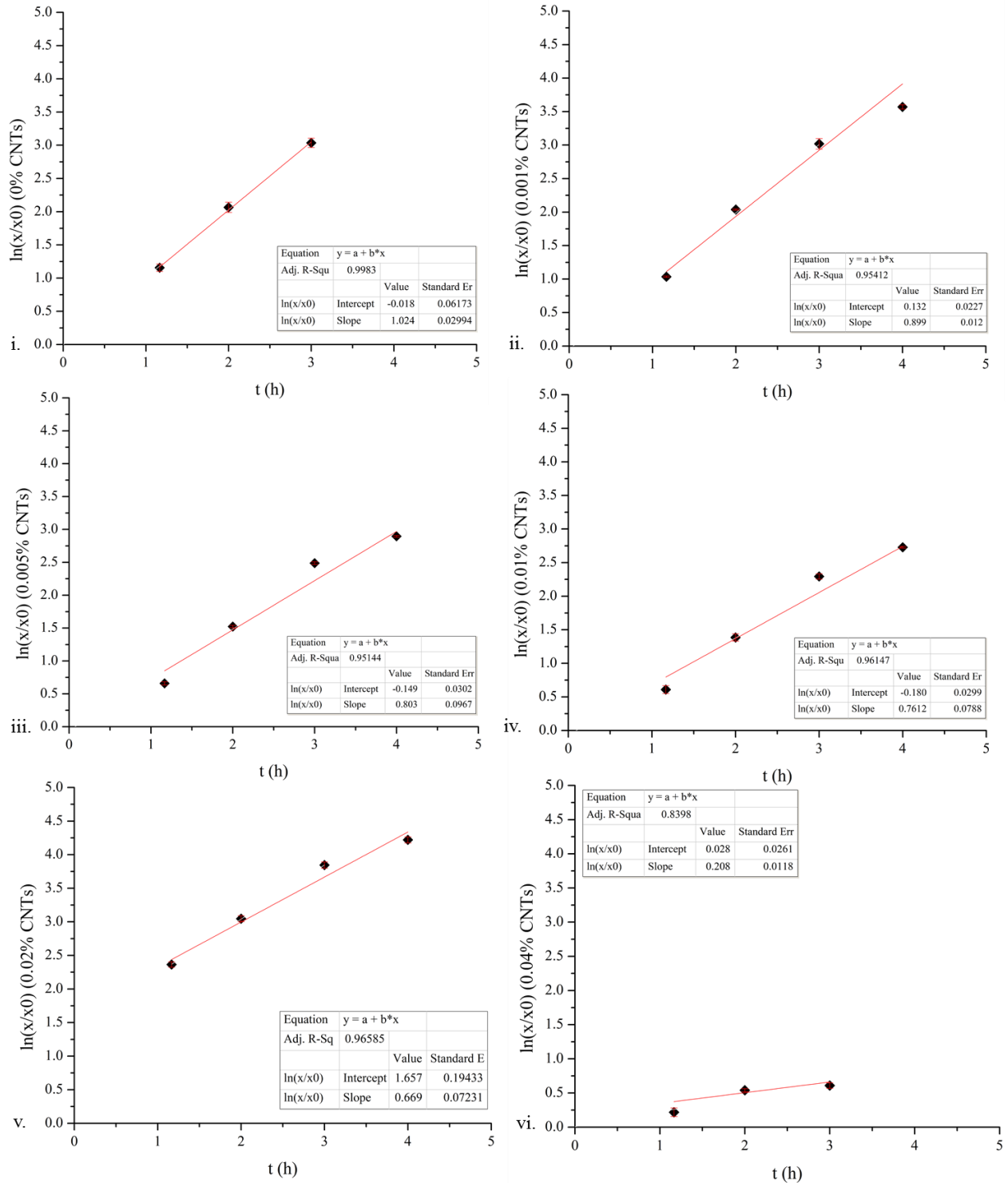
4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Διάγραμμα 7 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0.04g com2/100ml LB, ii) 0.06g com2/100ml LB, iii) 0.08g com2/100ml LB και iv) 0.10g com2/100ml LB.

Μετά τη γραμμικοποίηση και την προσαρμογή της βέλτιστης ευθείας που διέρχεται από τα σημεία της εκθετικής φάσης, λήφθηκαν τα παρακάτω διαγράμματα και οι τιμές των κινητικών σταθερών ανάπτυξης που φαίνονται στον Πίνακα 7. Αυξανόμενης της προστιθέμενης ποσότητας των CNTs στο υγρό μέσο, το μ_{max} έχει την τάση να μειώνεται. Η αντιβακτηριακή δράση τους, δηλαδή, επίσης εξαρτάται από την συγκέντρωση των νανοσωλήνων. Για συγκεντρώσεις μικρότερες από 0.02g com2/100ml LB η μείωση αυτή είναι της τάξης του 30%, ενώ για 0.04g CNTs/100ml θρεπτικού μέσου η ταχύτητα ανάπτυξης του μικροοργανισμού μειώνεται πάρα πολύ. Συγκεκριμένα η μείωση αυτή φτάνει το 80%, όπως παρατηρείται και στον Πίνακα 3. Τα παραπάνω συμπεράσματα επιβεβαιώνονται και από τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού. Συγκεκριμένα, το t_d παρουσίασε αύξηση 28%, 35% και 54% για συγκεντρώσεις 0.005g, 0.01g και 0.02g com2/100ml LB, αντίστοιχα. Επίσης, για συγκέντρωση 0.04g com1/100ml LB ο χρόνος που χρειάζονται τα βακτήρια για να διπλασιάσουν τον αριθμό τους είναι σχεδόν πενταπλάσιος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (απουσία CNTs) στο οποίο τα βακτήρια αναπτύσσονται φυσιολογικά.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Διάγραμμα 8 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για i) 0g com2/100ml LB, ii) 0.001g com2/100ml LB, iii) 0.005g com2/100ml LB, iv) 0.01g com2/100ml LB, για v) 0.02g com2/100ml LB και vi) 0.04g com2/100ml LB.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Απουσία CNTs τα βακτήρια χρειάζονται μόλις 40 min για να διπλασιάσουν τον πληθυσμό τους ενώ παρουσία 0.04g com1/100ml LB απαιτούνται σχεδόν 200 min. Η τάση που ακολουθεί ο χρόνος διπλασιασμού είναι αντίστροφη από αυτή που ακολουθεί το μ_{\max} . Αυξανόμενης της προστιθέμενης ποσότητας CNTs ο μεν χρόνος διπλασιασμού αυξάνεται η δε ταχύτητα ανάπτυξης μειώνεται. Για ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις τα βακτήρια δεν αναπτύσσονται καθόλου.

Πίνακας 7 Κινητικές σταθερές της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία εμπορικών CNTs μικρής διαμέτρου.

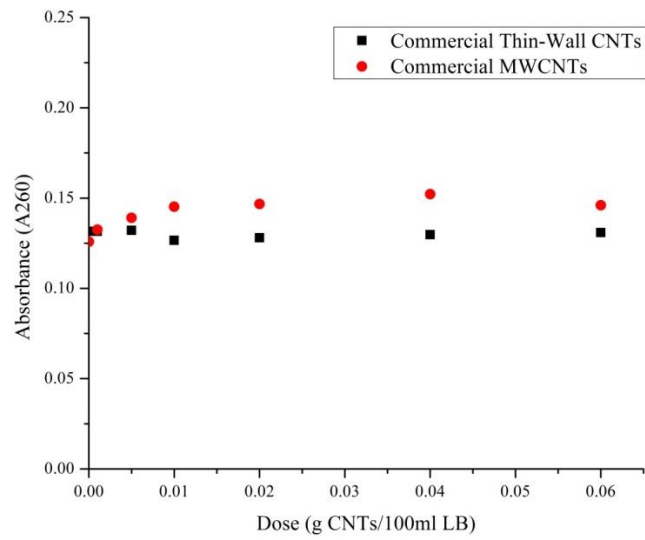
Δόση [% w/v]	μ_{\max} [h ⁻¹]	Ποσοστό		Ποσοστό αύξησης*	
		μείωσης*	μ_{\max}	t_d	t_d
		[%]		[h]	[%]
0	1.02	-		0.68	-
0.001	0.90	12		0.77	14
0.005	0.80	22		0.86	28
0.01	0.76	26		0.91	35
0.02	0.67	35		1.04	54
0.04	0.21	80		3.33	392
0.06	-	-		-	-

* Τα ποσοστά μεταβολής έχουν υπολογιστεί με βάση το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs.

Τα συγκεκριμένα CNTs εμφάνιζαν κακή διασπορά στο θρεπτικό μέσο. Έτσι για μικρές συγκεντρώσεις η αλληλεπίδρασή τους με τα βακτήρια ήταν μικρή, για αυτό και δεν παρουσιάστηκε μεταβολή στη μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση. Αυξανόμενης της ποσότητας, όμως, αυξήθηκε η αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τα CNTs. Η μεταβολή των κινητικών σταθερών και της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης σε αυτή την περίπτωση ήταν πολύ πιο μεγάλη για τις ίδιες μέγιστες χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις. Πιθανώς αυτό οφείλεται στο μικρότερο μέγεθος τους. Η μικρότερη διάμετρος οδήγησε σε μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τα βακτήρια. Αυτό επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά από το γεγονός ότι οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος (SWCNTs), οι οποίοι έχουν πολύ πιο μικρή διάμετρο σε σχέση με όλα τα MWCNTs, παρουσιάζουν ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση [127, 128, 126, 129, 130]. Ο μηχανισμός που προτείνεται με βάση τη βιβλιογραφία είναι ότι τα συσσωματώματα των υδρόφοβων MWCNTs [6] που δημιουργούνται προσδένονται στην επιφάνεια των βακτηριακών κυττάρων, δυσχεραίνοντας έτσι την διχοτόμηση και άρα την ανάπτυξή τους [127, 132, 133].

Ο συνηθέστερος μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης των νανοσωλήνων άνθρακα είναι η διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Έτσι, για την επιβεβαίωση του μηχανισμού στην περίπτωση των εμπορικών νανοσωλήνων διαφορετικής διαμέτρου, μετρήθηκε δείγμα από την υγρή καλλιέργεια σε φασματόμετρο υπεριώδους – ορατού σε μήκος κύματος A_{260} . Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο μήκος κύματος διότι εκεί απορροφά το γενετικό υλικό (DNA). Αύξηση στην απορρόφηση υποδεικνύει διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης αφού σε φυσιολογικές συνθήκες είναι αδιαπέραστη. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9, δεν έλαβε χώρα αύξηση της τιμής της απορρόφησης. Επομένως, η κυτταρική μεμβράνη παρέμεινε άθικτη. Έτσι, ο μηχανισμός δράσης στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι διαφορετικός. Αυτό που προτείνεται είναι ότι τα CNTs προσκολλούνται στην επιφάνεια των βακτηρίων, χωρίς να διαταράσσουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, δυσκολεύοντας την ανάπτυξη και διχοτόμησή τους.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



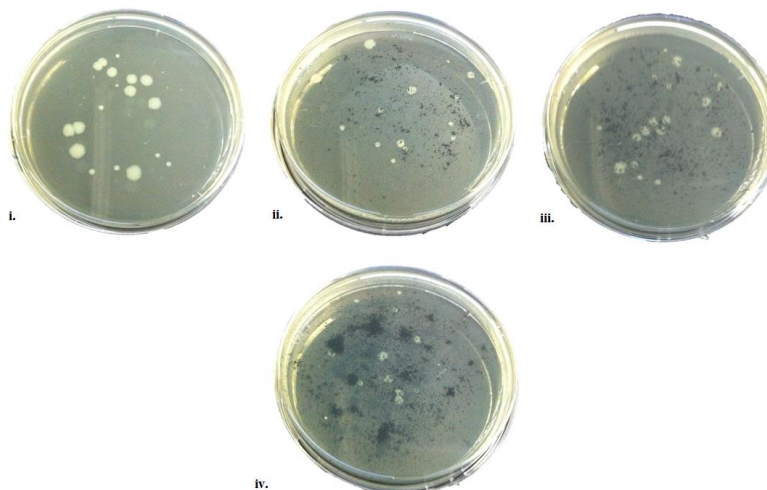
Διάγραμμα 9 Μέτρηση δείγματος εμπορικών CNTs μεγάλης διαμέτρου (κόκκινο) και εμπορικών CNTs μικρής διαμέτρου (μαύρο) σε μήκος κύματος 260 nm.

4. 3. Επίδραση της Επιφανειακής Τροποποίησης

Στη συνέχεια, ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με MWCNTs, τα οποία συντέθηκαν, τροποποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν από την ερευνητική μονάδα προηγμένων, σύνθετων, νάνο υλικών και νανοτεχνολογίας (R-NanoLab) [9], ώστε να διερευνηθεί η επίδραση της διαφορετικής επιφανειακής τροποποίησης στην ανάπτυξη της *E. coli*. Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκαν CNTs ίδιου μήκους αλλά χωρίς τροποποίηση, τροποποιημένα με προσθήκη καρβοξυλομάδων και τροποποιημένα με προσθήκη αμινομάδων, τα χαρακτηριστικά των οποίων φαίνονται στον Πίνακα 5. Η σύνθεση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της θερμικής χημικής εναπόθεσης ατμών (T-CVD). Στις παραγράφους που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την επώαση της *E. coli* παρουσία διαφόρων ποσοτήτων από έκαστο είδος CNTs κατά την υγρή και την στερεή καλλιέργεια.

4. 3. 1. Μη τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα

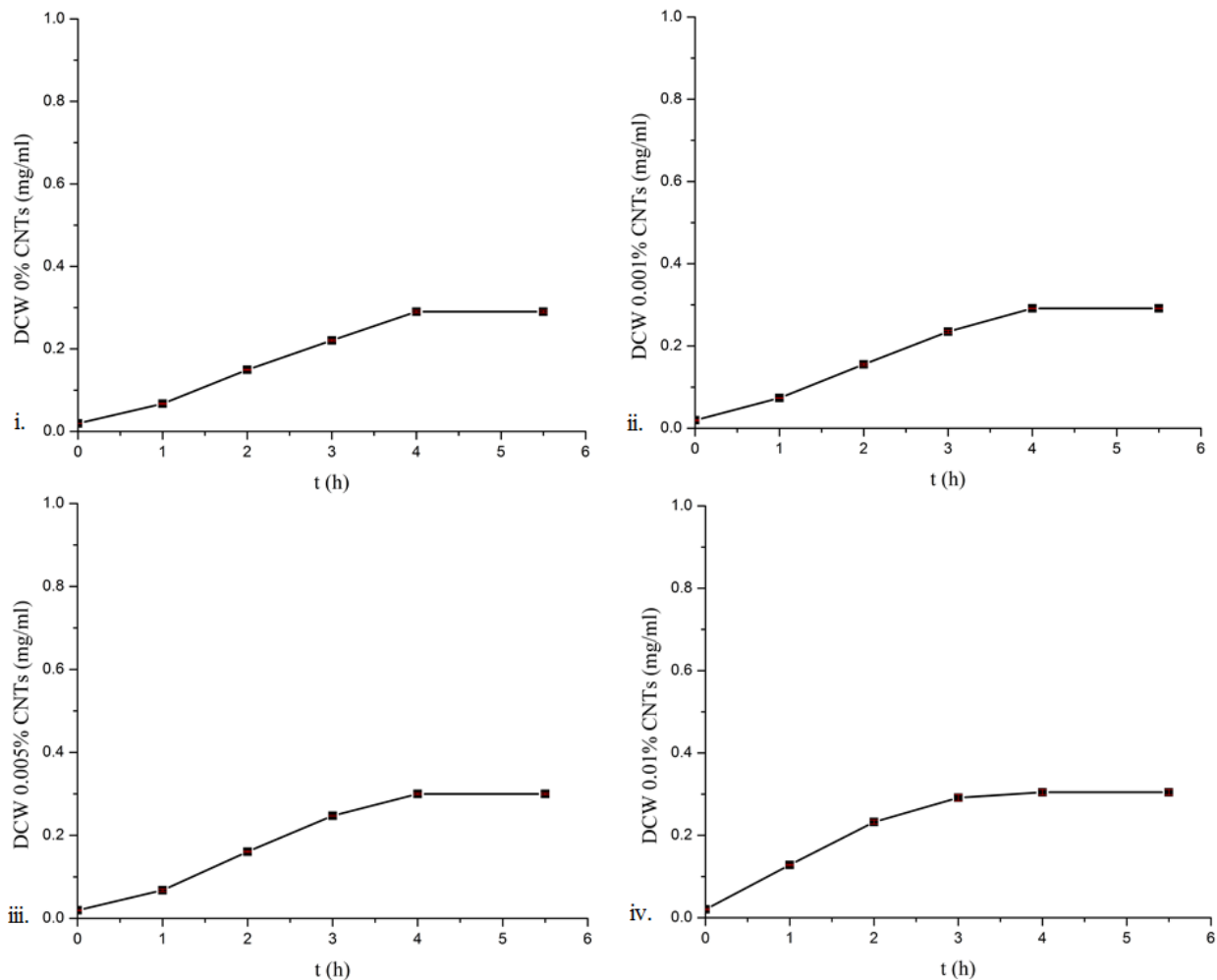
Μετά την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που επιστρώθηκαν, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 26. Συγκεκριμένα, απουσία CNTs, ο αριθμός των αποικιών ήταν 22×10^7 CFU/ml. Παρουσία μη τροποποιημένων CNTs 0.02g/100ml άγαρ, ο αριθμός των αποικιών ήταν 16×10^7 CFU/ml, παρουσία 0.04g/100ml άγαρ, ο αριθμός των αποικιών ήταν 13×10^7 CFU/ml και παρουσία 0.10g/100ml άγαρ, ο αριθμός των αποικιών ήταν 11×10^7 CFU/ml. Παρουσιάστηκε, μείωση του αριθμού των αποικιών κατά 27%, 41% και 50%, αντιστοίχως. Επομένως, προκύπτει το συμπέρασμα ότι και στη συγκεκριμένη περίπτωση η παρεμπόδιση στο σχηματισμό των αποικιών είναι εξαρτώμενη της ποσότητας των CNTs που προστίθενται, όπως και στην περίπτωση των εμπορικών μη τροποποιημένων CNTs. Τα ποσοστά μείωσης του αριθμού των αποικιών σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (απουσία CNTs) είναι παραπλήσια με την περίπτωση των εμπορικών μη τροποποιημένων CNTs, γεγονός που ήταν αναμενόμενο. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάπτυξη σε υγρό μέσο καλλιέργειας με προσθήκη μη τροποποιημένων CNTs και λήφθηκαν οι ακόλουθες καμπύλες ανάπτυξης.



Εικόνα 26 Επώαση της *E. coli* σε άγαρ για 16 h, παρουσία i) 0g p-CNTs/100ml άγαρ, ii) 0.02g p-CNTs/100ml άγαρ, iii) 0.04g p-CNTs/100ml άγαρ και iv) 0.10g p-CNTs/100ml άγαρ.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

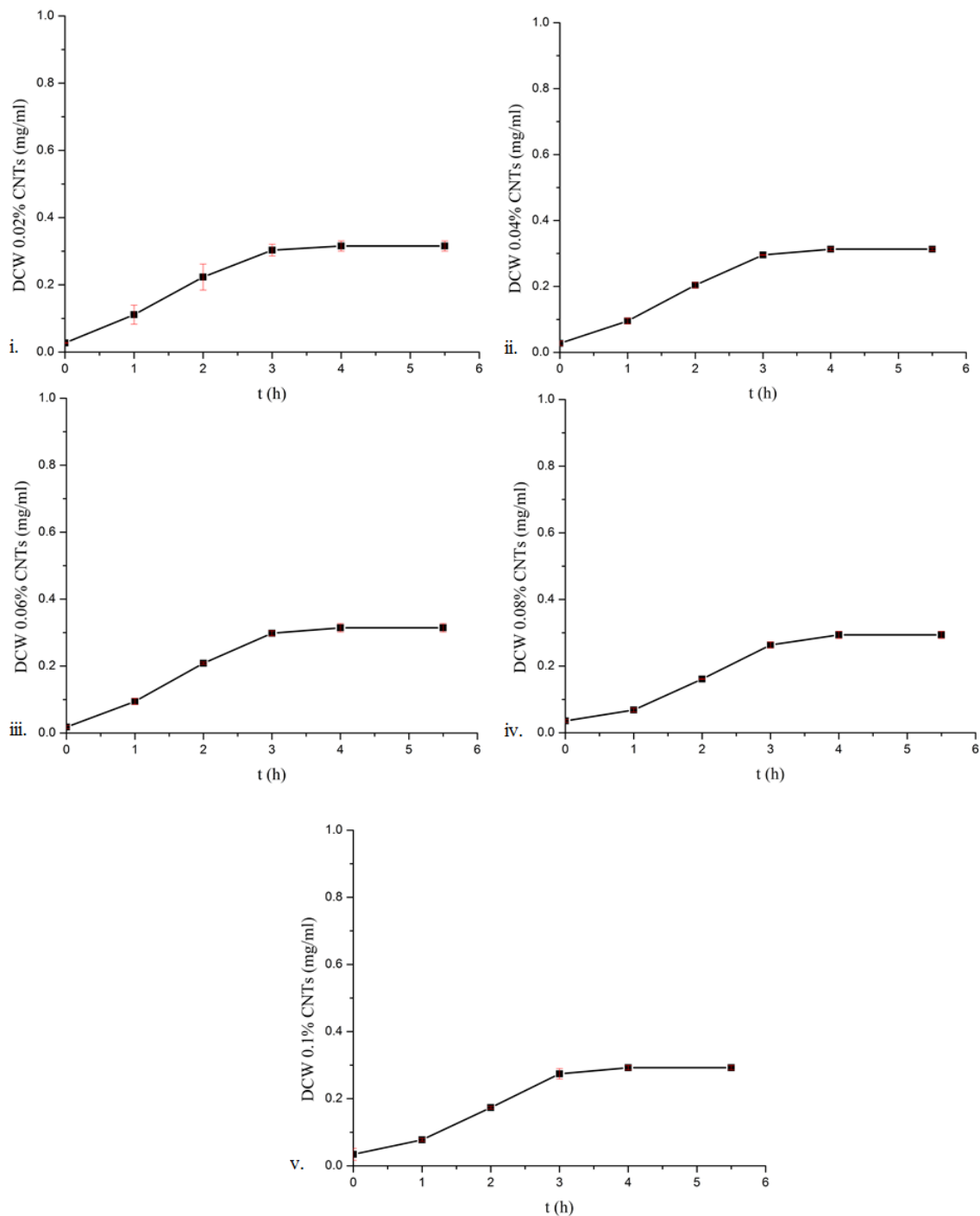
Μέσω της καμπύλης αναφοράς της παραγράφου 4. 1, οι παραπάνω μετρήσεις μετατράπηκαν σε ξηρή μάζα κυττάρων (DCW, mg/ml) οι οποίες, συναρτήσει του χρόνου, μας δίνουν τις καμπύλες ανάπτυξης των διαγραμμάτων που ακολουθούν.



Διάγραμμα 10 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0g p-CNTs/100ml LB, ii) 0.001g p-CNTs/100ml LB, iii) 0.005g p-CNTs/100ml LB και iv) 0.01g p-CNTs/100ml LB.

Συγκρίνοντας, αρχικά, τα δείγματα που περιείχαν ποσότητες μη τροποποιημένων CNTs έως και 0.01g CNTs/100ml LB (Διάγραμμα 10 ii, iii, iv) με το δείγμα που δεν περιείχε CNTs (Διάγραμμα 10 i) παρατηρούμε ότι η προσθήκη των CNTs δεν επιδρά στην ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Αυτό επιβεβαιώνεται από τις κινητικές σταθερές του Πίνακα 8 και από την προκύπτουσα μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση, η οποία ήταν παραπλήσια για όλες αυτές τις περιπτώσεις. Στη συνέχεια, προστέθηκαν, πάλι σε υγρό μέσο καλλιέργειας, μεγαλύτερες ποσότητες CNTs ώστε να διερευνηθεί αν μεταβάλλονται οι κινητικές σταθερές και αν τα CNTs σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη της *E. coli*. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Διάγραμμα 11.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

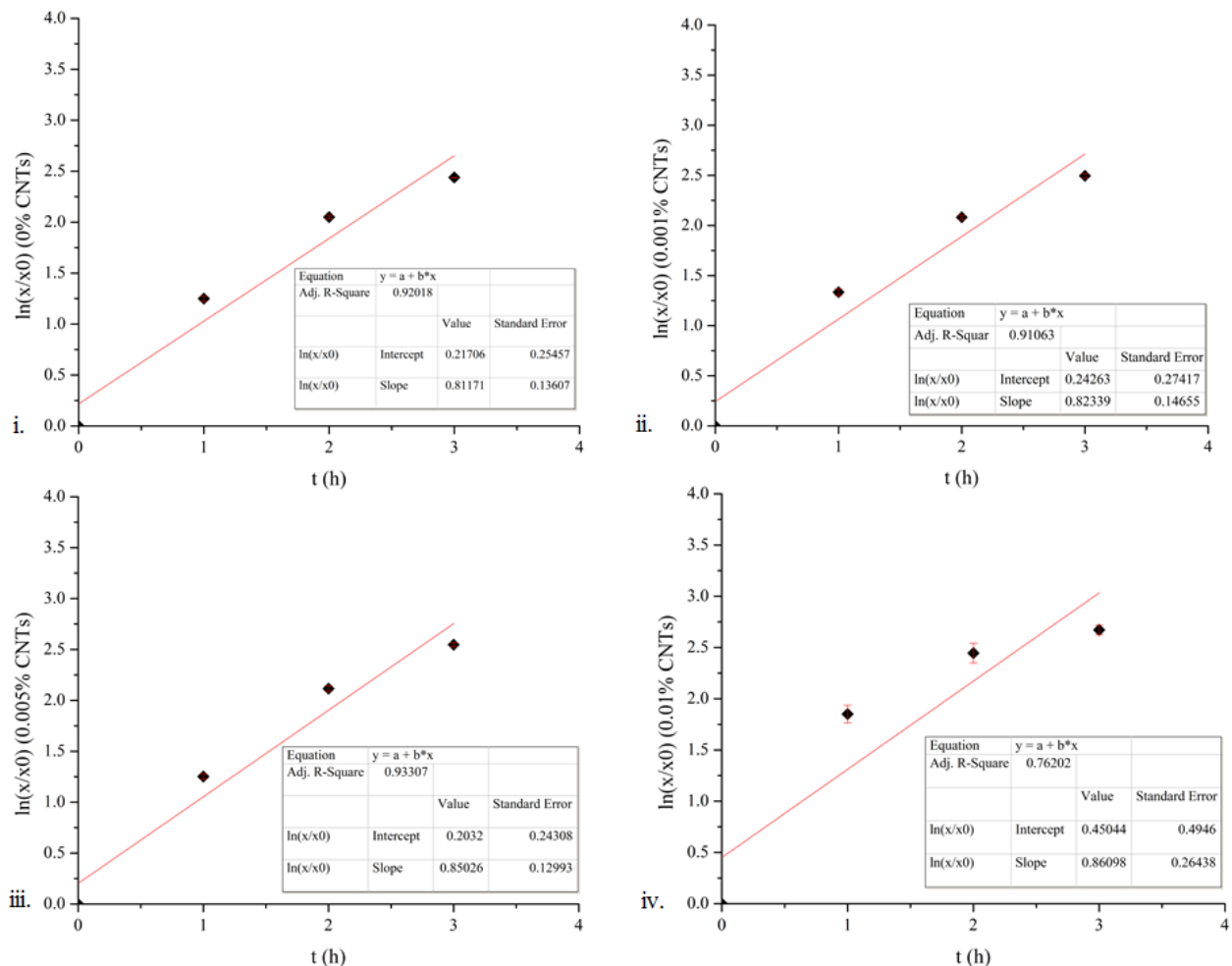


Διάγραμμα 11 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0.02g p-CNTs/100ml LB, ii) 0.04g p-CNTs/100ml LB, iii) 0.06g p-CNTs/100ml LB, iv) 0.08g p-CNTs/100ml LB και v) 0.10g p-CNTs/100ml LB.

Πάλι η προσθήκη των CNTs δεν επηρεάζει την βακτηριακή ανάπτυξη. Η μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση προκύπτει, επίσης, παραπλάσια με τις προηγούμενες περιπτώσεις και είναι της τάξης των 0.278mg/ml.

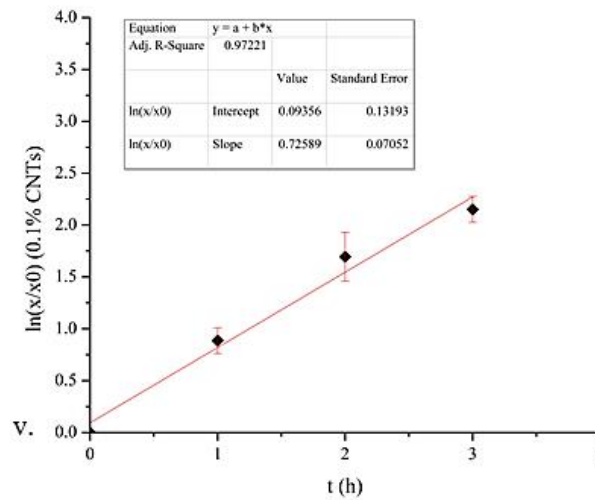
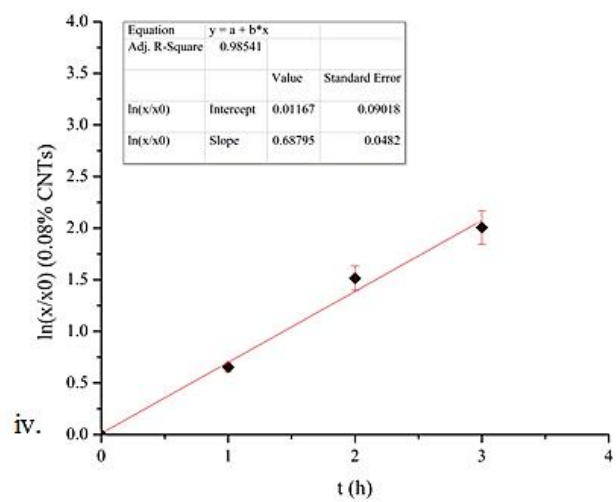
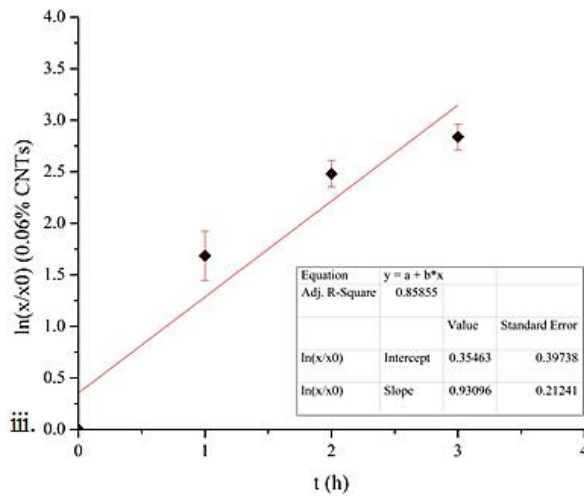
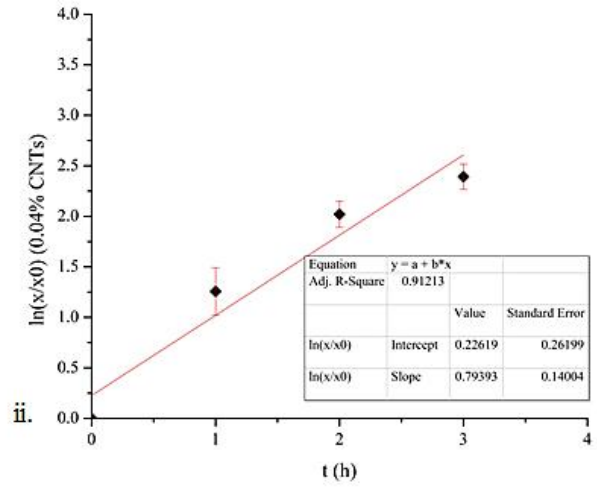
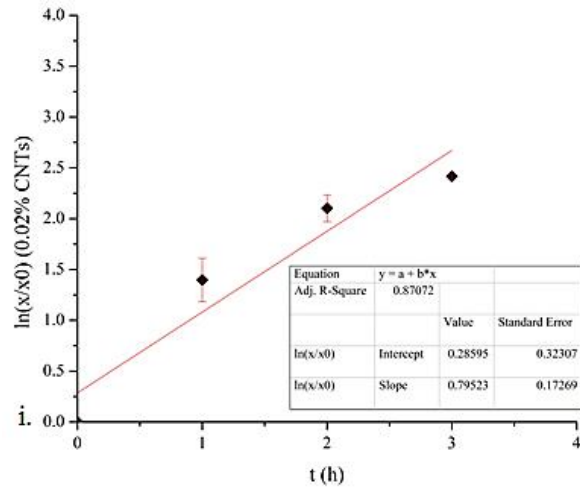
4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Ο υπολογισμός των κινητικών σταθερών της ανάπτυξης έγινε με τον τρόπο που περιγράφηκε στις προηγούμενες παραγράφους. Τα διαγράμματα 14 και 15 αναφέρονται στον υπολογισμό των κινητικών σταθερών της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία μη τροποποιημένων CNTs. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 8. Παρατηρείται ότι, ακόμα και για τις μεγαλύτερες ποσότητες, δεν υπάρχει αντιβακτηριακή δράση ούτε και χρόνος υστέρησης που να υποδεικνύει παρεμπόδιση στην ανάπτυξη. Η μεταβολή στον μέγιστο ειδικό ρυθμό ανάπτυξης, όπως επίσης, και στον χρόνο διπλασιασμού δεν είναι σημαντική και έτσι επιβεβαιώνεται το συμπέρασμα ότι, για τις συγκεντρώσεις που διερευνήθηκαν, δεν παρουσιάζεται, αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του συγκεκριμένου βακτηρίου, γεγονός που βεβαιώνεται και βιβλιογραφικά [10]. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στην κακή διασπορά που παρουσίαζαν οι νανοσωλήνες, παρά την συνεχή ανακίνησή τους, στο υγρό μέσο που χρησιμοποιήθηκε. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την μικρή αλληλεπίδραση των νανοσωλήνων με τα βακτήρια, λόγω των δημιουργημένων συσσωματωμάτων.



Διάγραμμα 12 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για i) 0g p-CNTs/100ml LB, ii) 0.001g p-CNTs/100ml LB, iii) 0.005g p-CNTs/100ml LB, και iv) 0.01g p-CNTs/100ml LB,.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Διάγραμμα 13 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για i) 0.02g p-CNTs/100ml LB, ii) 0.04g p-CNTs/100ml LB, iii) 0.06g p-CNTs/100ml LB, iv) 0.08g p-CNTs/100ml LB, και v) 0.10g p-CNTs/100ml LB.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Πίνακας 8 Κινητικές σταθερές της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία μη τροποποιημένων CNTs.

Δόση [% w/v]	μ_{\max} [h ⁻¹]	Ποσοστό μείωσης* μ_{\max} [%]	t_d [h]	Ποσοστό αύξησης* t_d [%]
0	0.8117	-	0.8593	-
0.001	0.8234	-	0.8418	-
0.005	0.8503	-	0.8152	-
0.01	0.8610	-	0.8051	-
0.02	0.7952	2	0.8717	2
0.04	0.7939	2	0.8731	2
0.06	0.9310	-	0.7445	-
0.08	0.6879	15	1.0076	18
0.1	0.7559	7	0.9170	7

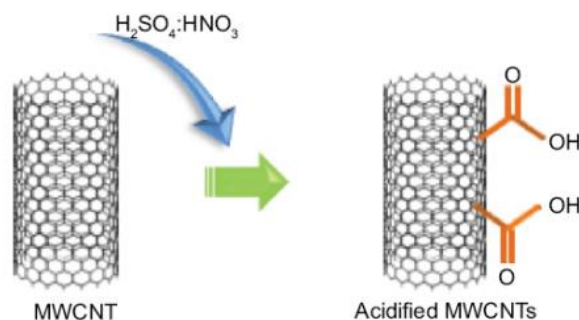
* Τα ποσοστά μεταβολής έχουν υπολογιστεί με βάση το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs.

Η διαφορά στην αντιμικροβιακή δράση των εμπορικών νανοσωλήνων από αυτούς που συντέθηκαν στο εργαστήριο πιθανώς έγκειται σε κάποια θερμική κατεργασία ή στην προσθήκη επιφανειοδραστικών ουσιών, όπως είναι το Tween 20 [11] με στόχο την καλύτερη διασπορά τους σε υγρά μέσα. Η διασπορά που παρουσίασαν στο θρεπτικό μέσο LB ήταν καλύτερη από τους εργαστηριακά συντεθειμένους νανοσωλήνες άνθρακα με αποτέλεσμα να εμφανίσουν μεγαλύτερη αλληλεπίδραση.

4. 3. 2. Επιφανειακά τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με προσθήκη καρβοξυλομάδων

Διερευνήθηκε, στη συνέχεια η επίδραση δύο επιφανειακών τροποποιήσεων στην ανάπτυξη της *E. coli*. Γενικά, οι διαδικασίες τροποποίησης και καθαρισμού των CNTs, δύναται να μεταβάλλουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους αρκετά ώστε να επηρεαστεί και η κυτταροτοξικότητά τους στην *E. coli*. Η τροποποίηση με μια σειρά ομοιοπολικά συνδεδεμένων λειτουργικών ομάδων επιτρέπει τον προσαρμοσμένο έλεγχο των χημικών ιδιοτήτων των νανοσωλήνων.

Η πρώτη επιφανειακή τροποποίηση αφορούσε την προσθήκη καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια των CNTs. Η προσθήκη των καρβοξυλομάδων πραγματοποιήθηκε έπειτα από παραμονή του δείγματος σε μίγμα οξέων ($H_2SO_4:HNO_3 = 3:1$) υπό ανάδευση στους 80 °C [12].

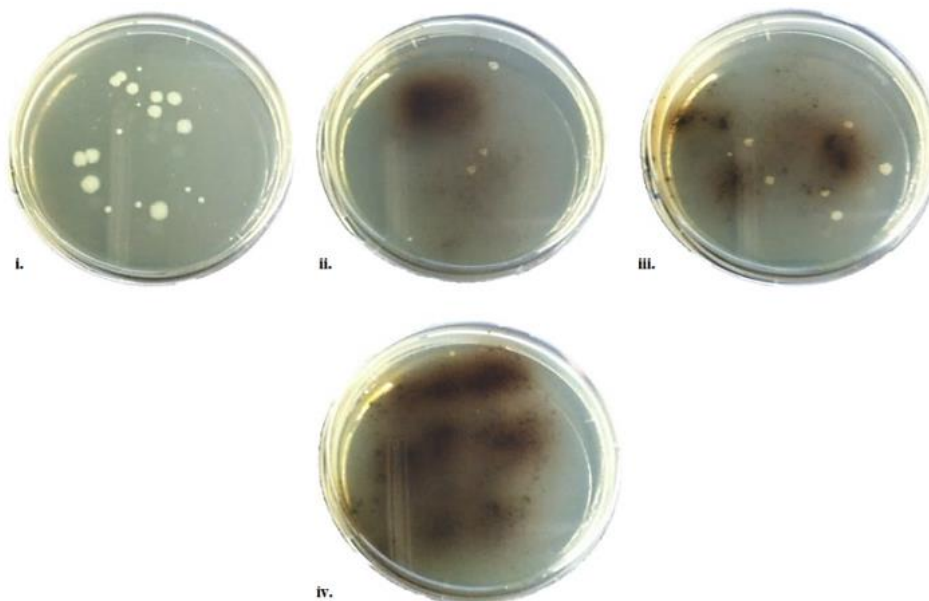


Εικόνα 27 Επιφανειακή τροποποίηση με προσθήκη καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια των CNTs [13].

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Μετά την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που επιστρώθηκαν, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 27. Παρουσία των επιφανειακά τροποποιημένων CNTs 0.02g/100ml άγαρ, 0.04g/100ml άγαρ και 0.10g/100ml άγαρ η μείωση ήταν 73%, 59% και 77%, αντιστοίχως.

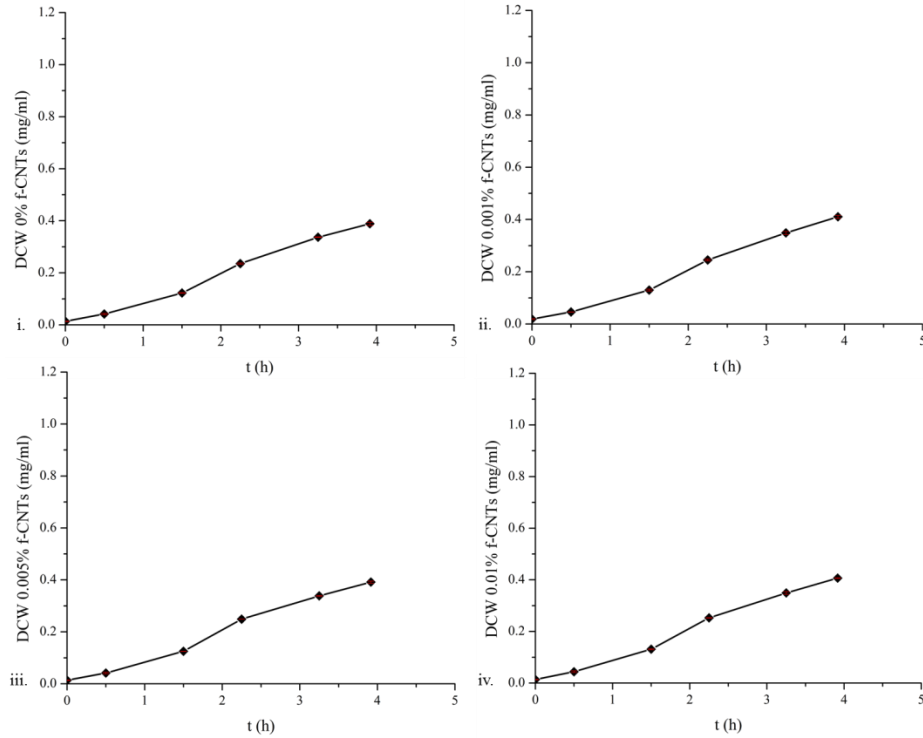
Στη συνέχεια, έλαβε χώρα η ανάπτυξη του μικροοργανισμού υγρό μέσο καλλιέργειας παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων νανοσωλήνων άνθρακα, αντίστοιχα με τα άλλα είδη CNTs που προαναφέρθηκαν, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση των νανοσωλήνων στην βακτηριακή ανάπτυξη. Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στα Διαγράμματα 16 – 18, καθώς επίσης και στον Πίνακα 9, στον οποίον παρουσιάζονται αναλυτικά οι μεταβολές στις κινητικές σταθερές της ανάπτυξης.



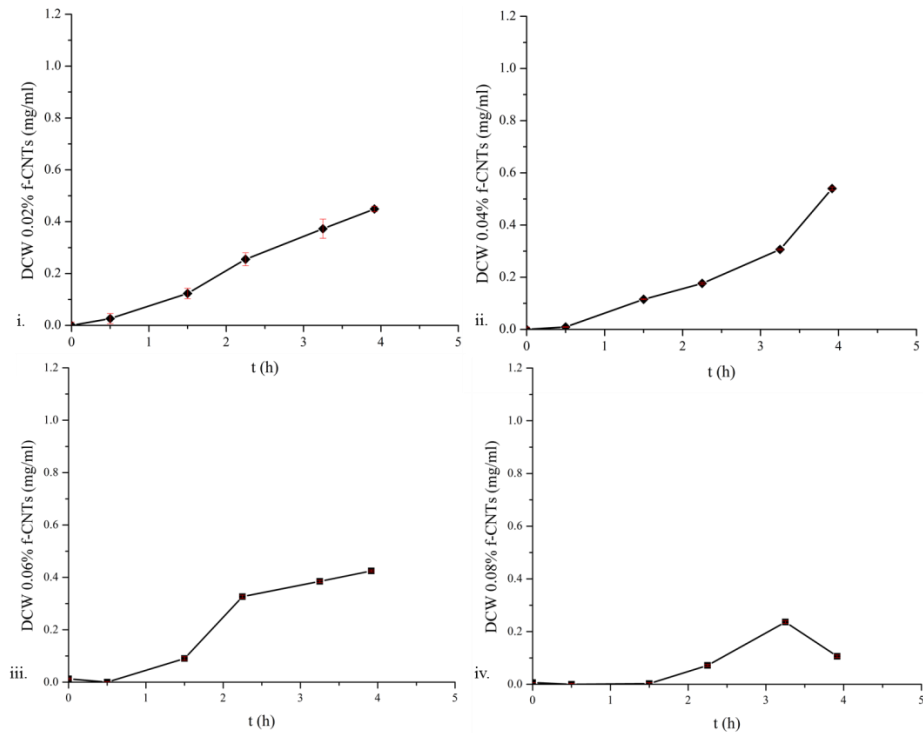
Εικόνα 28 Επώαση της *E. coli* σε άγαρ για 16 h, παρουσία i) 0g f-CNTs/100ml LB, ii) 0.02g f-CNTs/100ml LB, iii) 0.04g f-CNTs/100ml LB και iv) 0.10g f-CNTs/100ml LB.

Για μικρές προστιθέμενες ποσότητες CNTs παρουσιάζεται σχετικά μικρή επίδραση στη βακτηριακή ανάπτυξη. Όπως παρατηρείται από τα Διαγράμματα 16 και 17, για δόση 0.01g CNTs/100ml LB, δεν παρατηρείται κάποια επίδραση στη μικροβιακή ανάπτυξη. Η μέγιστη κυτταρική ανάπτυξη είναι παραπλήσια γις ενδιάμεσες συγκεντρώσεις μέχρι τα 0.01g CNTs/100ml LB και το δείγμα ελέγχου. Παρόμοια συμπεράματα προκύπτουν και για τις συγκεντρώσεις 0.02g και 0.04g CNTs/100ml LB. Μετά την επώαση, όμως, του μικροοργανισμού παρουσία 0.06g CNTs/100ml LB παρατηρήθηκε 20% μείωση της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης, ενώ παρουσία 0.08g CNTs/100ml LB παρατηρήθηκε 89% μείωση της μέγιστης κυτταρικής συγκέντρωσης, με αυτή να φτάνει μόλις τα 0.042mg/ml. Η συγκεκριμένη τροποποίηση, δηλαδή, ενισχύει την αντιβακτηριακή δράση των CNTs για συγκεντρώσεις από 0.06g CNTs/100ml LB και μεγαλύτερες [1, 14, 15, 4]. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τις κινητικές σταθερές του Πίνακα 9.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



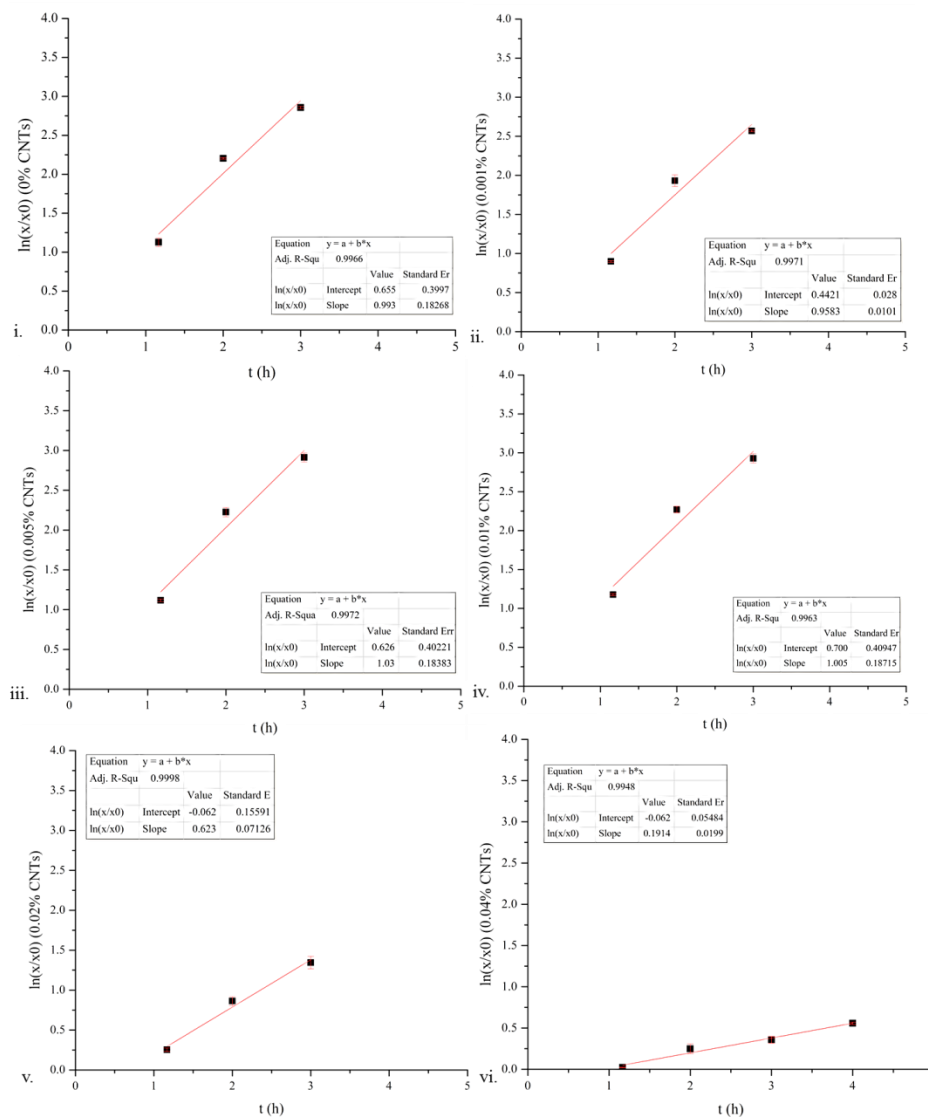
Διάγραμμα 14 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0g f-CNTs/100ml LB, ii) 0.001g f-CNTs/100ml LB, iii) 0.005g f-CNTs/100ml LB και iv) 0.01g f-CNTs/100ml LB.



Διάγραμμα 15 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0.02g f-CNTs/100ml LB, ii) 0.04g f-CNTs/100ml LB, iii) 0.06g f-CNTs/100ml LB και iv) 0.08g f-CNTs/100ml LB.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Το Διάγραμμα 16 αναφέρεται στον υπολογισμό των κινητικών σταθερών της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία των επιφανειακά τροποποιημένων CNTs με προσθήκη καροξυλομάδων. Για συγκεντρώσεις έως και 0.01 g CNTs/100ml LB, δεν υπάρχει σημαντική μεταβολή στον ειδικό ρυθμό ανάπτυξης. Η μεταβολή στην κλίση είναι εμφανής από 0.2 g CNTs/100ml LB και για υψηλότερες δόσεις. Για συγκεντρώσεις 0.2 g CNTs/100ml LB και 0.4 g CNTs/100ml LB Παρουσιάζεται μεταβολή στις κινητικές σταθερές χωρίς, όμως, αυτό να έχει ως αποτέλεσμα την μειωμένη κυτταρική συγκέντρωση. Για τις συγκεντρώσεις, δηλαδή, τα CNTs καθούν την ανάπτυξη χωρίς, όμως, τελικά να την παρεμποδίζουν. Για συγκέντρωση 0.6 g CNTs/100ml LB παρουσιάζεται μεταβολή τόσο στις κινητικές σταθερές όσο και στην μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση. Για συγκεντρώσεις από 0.8 g CNTs/100ml LB και μεγαλύτερες, η ανάπτυξη παρεμποδίζεται πλήρως.



Διάγραμμα 16 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{max}) για i) 0% w/v ii) 0.001 g f-CNTs/100ml LB, iii) 0.005 g f-CNTs/100ml LB, iv) 0.01 g f-CNTs/100ml LB, v) 0.02 g f-CNTs/100ml LB και vi) 0.04 g f-CNTs/100ml LB.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Τα συμπεράσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από τον υπολογισμό του χρόνου διπλασιασμού των βακτηρίων (Πίνακας 5). Αρχικά, για συγκεντρώσεις έως και 0.01 g CNTs/100ml LB, δεν παρουσιάζεται σημαντική μεταβολή. Για συγκεντρώσεις από 0.02 g CNTs/100ml LB και μεγαλύτερες, ο χρόνος διπλασιασμού αυξάνεται όλο και περισσότερο. Με διπλασιασμό της ποσότητας των CNTs επί της ποσότητας που παρουσίασε μεταβολή στο μ_{\max} σχεδόν 40%, ο χρόνος διπλασιασμού σχεδόν τριπλασιάζεται. Για συγκέντρωση 0.08 g CNTs/100ml LB, ο χρόνος διπλασιασμού σχεδόν επταπλασιάζεται σε σύγκριση με το δείγμα ελέγχου (απουσία CNTs). Συγκεκριμένα, αυξάνεται από 42 min σε 287 min (4.79 h).

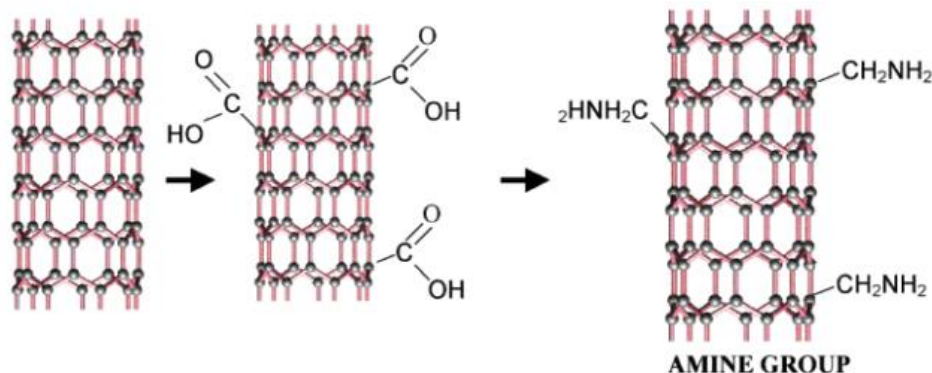
Πίνακας 9 Κινητικές σταθερές της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία τροποποιημένων CNTs με προσθήκη καρβοξυλομάδων.

Δόση [% w/v]	μ_{\max} [h^{-1}]	Ποσοστό μείωσης* μ_{\max} [%]	t_d [h]	Ποσοστό αύξησης* t_d [%]
0	0.99	-	0.70	-
0.001	0.96	4	0.72	4
0.005	1.03	-	0.67	-
0.01	1.01	-	0.69	-
0.02	0.62	37	1.11	59
0.04	0.19	81	3.62	419
0.06	0.26	74	2.65	279
0.08	0.15	85	4.79	587

* Τα ποσοστά μεταβολής έχουν υπολογιστεί με βάση το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs.

4. 3. 3. Επιφανειακά τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα με προσθήκη αμινομάδων

Η επόμενη επιφανειακή τροποποίηση αφορούσε την προσθήκη αμινομάδων στην επιφάνεια των CNTs. Η προσθήκη των αμινομάδων πραγματοποιήθηκε με την προσθήκη αιθυλενοδιαμίνης σε καρβοξυλιωμένους νανοσωλήνες υπό ατμόσφαιρα αζώτου [16, 17].

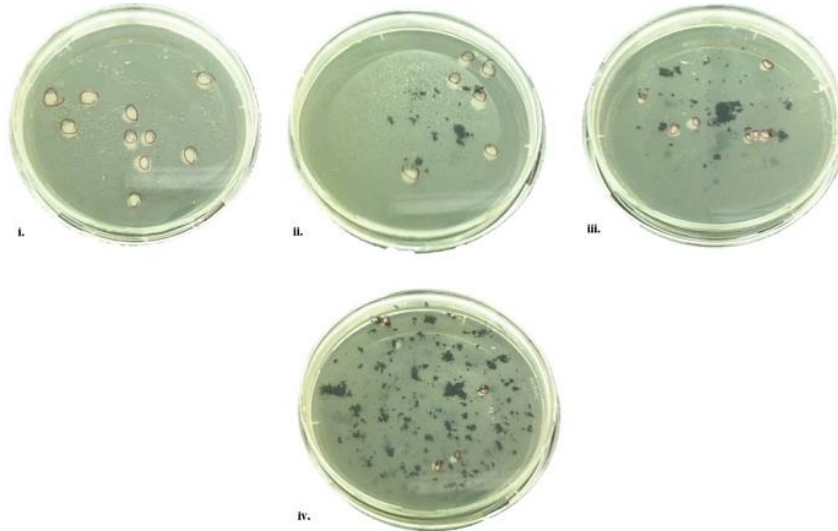


Εικόνα 29 Επιφανειακή τροποποίηση με προσθήκη αμινομάδων στην επιφάνεια των CNTs [17].

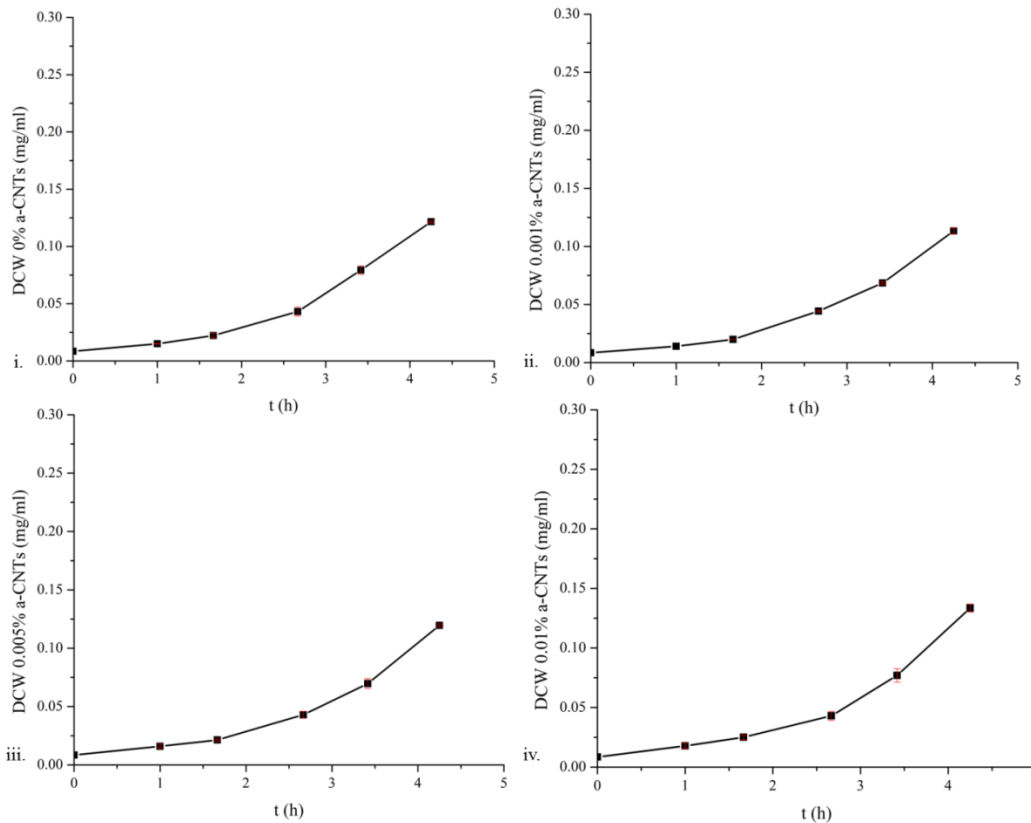
Μετά την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία που επιστρώθηκαν, προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στην Εικόνα 29. Παρουσία των επιφανειακά τροποποιημένων

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

CNTs 0.02g/100ml άγαρ, 0.04g/100ml άγαρ και 0.10g/100ml άγαρ η μείωση ήταν 40%, 11% και 62%, αντιστοίχως.



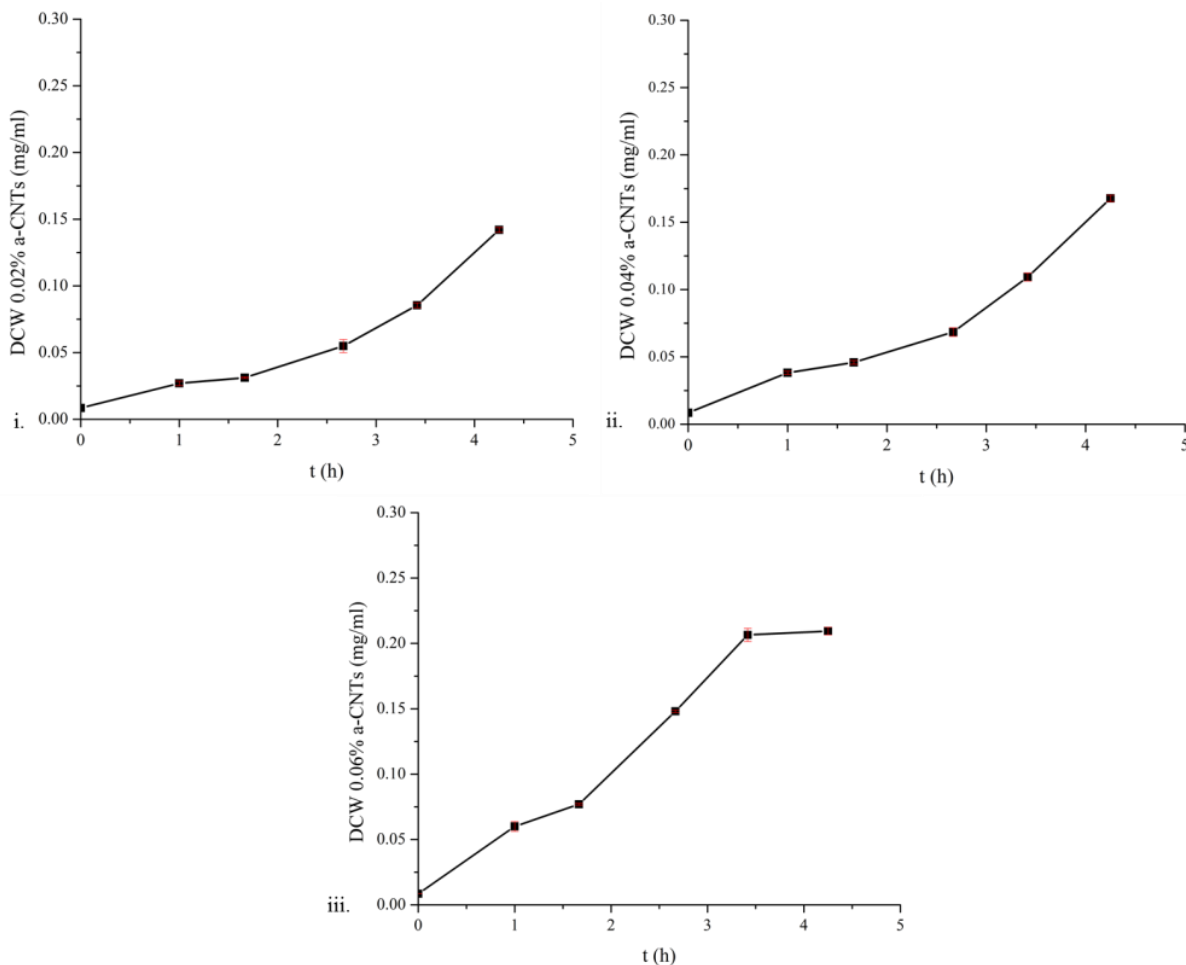
Εικόνα 30 Επώαση της *E. coli* σε άγαρ για 16 h, παρουσία i) 0% w/v ii) 0.02g a-CNTs/100ml LB, iii) 0.04g a-CNTs/100ml LB και iv) 0.10g a-CNTs/100ml LB.



Διάγραμμα 17 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0g a-CNTs/100ml LB, ii) 0.001g a-CNTs/100ml LB, iii) 0.005g a-CNTs/100ml LB και iv) 0.01g a-CNTs/100ml LB.

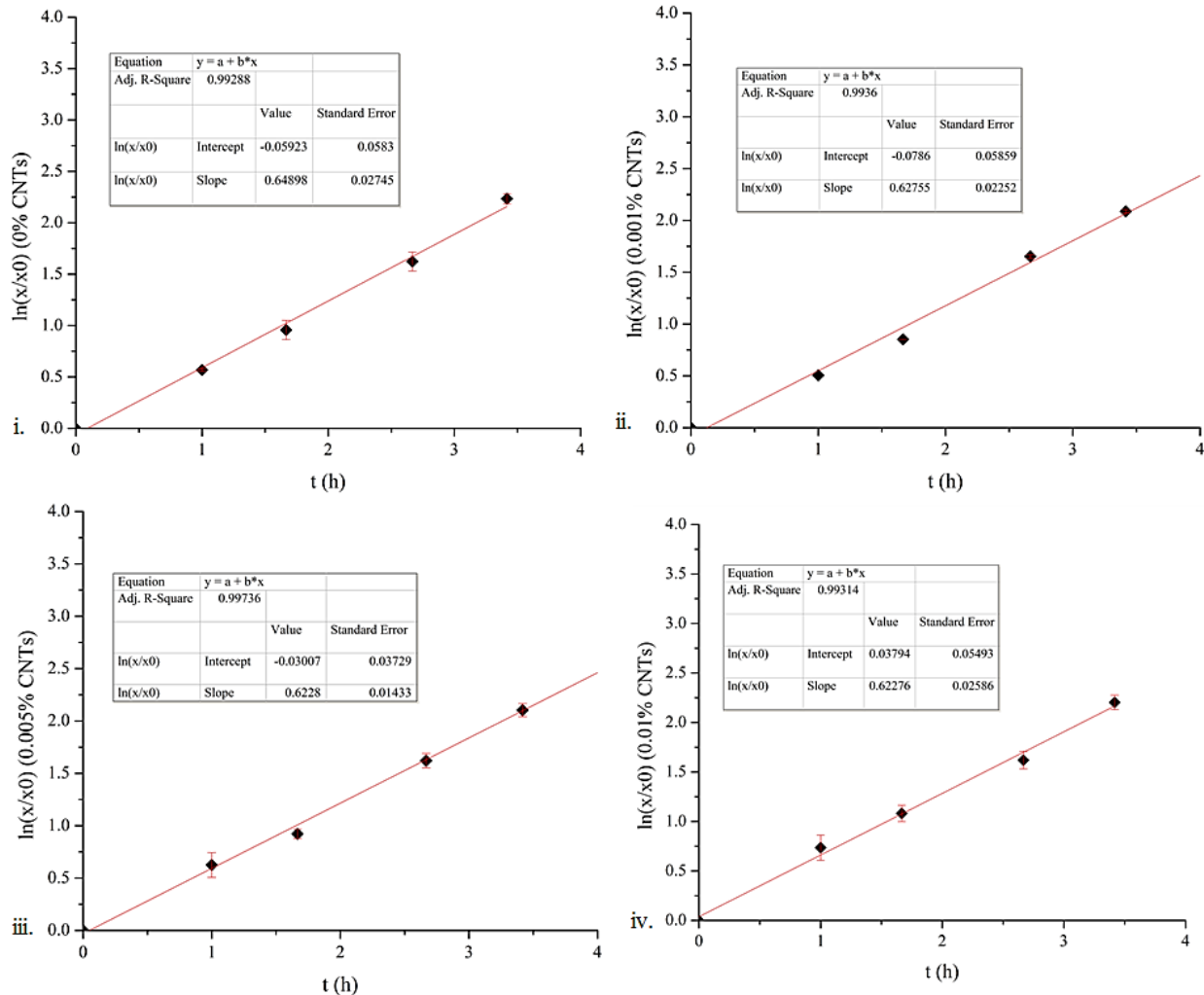
4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

Δεν παρατηρήθηκε παρεμπόδιση στην ανάπτυξη για τις ελεγχόμενες προστιθέμενες ποσότητες CNTs (Διαγράμματα 19 – 20). Δεν επέρχεται απόπτωση των κυττάρων, καθώς δεν προέκυψε σημαντική μεταβολή στη μέγιστη παραχθείσα συγκέντρωση κυττάρων, αλλά μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, όπως παρατηρείται στον Πίνακα 10. Η μέγιστη συγκέντρωση κυττάρων ήταν της τάξης των 0.117 mg/ml, για όλες τις συγκεντρώσεις CNTs που ελέγχθηκαν. Αυξανόμενη της ποσότητας των CNTs μειώνεται η μέγιστη ταχύτητα ανάπτυξης των βακτηρίων. Για αυτό το λόγο, κατά την επίστρωση τρυβλίων και επώασή τους σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στον αριθμό των αποικιών. Η μείωση αυτή, αρχίζει να γίνεται σημαντική για συγκεντρώσεις από 0.04g CNTs/100ml LB και μεγαλύτερες. Αντίστοιχα, τα ίδια συμπεράσματα προκύπτουν και για τον χρόνο διπλασιασμού. Η αύξηση στο t_d γίνεται σημαντική για συγκεντρώσεις από 0.04g CNTs/100ml LB, ενώ για τη συγκέντρωση 0.06g CNTs/100ml LB είναι περίπου τριπλάσιος σε σχέση με το δείγμα ελέγχου (απουσία CNTs).



Διάγραμμα 18 Καμπύλες ανάπτυξης κατά την επώαση της *E. coli*, σε υγρό μέσο, παρουσία i) 0.02g a-CNTs/100ml LB, ii) 0.04g a-CNTs/100ml LB και iii) 0.06g a-CNTs/100ml LB.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

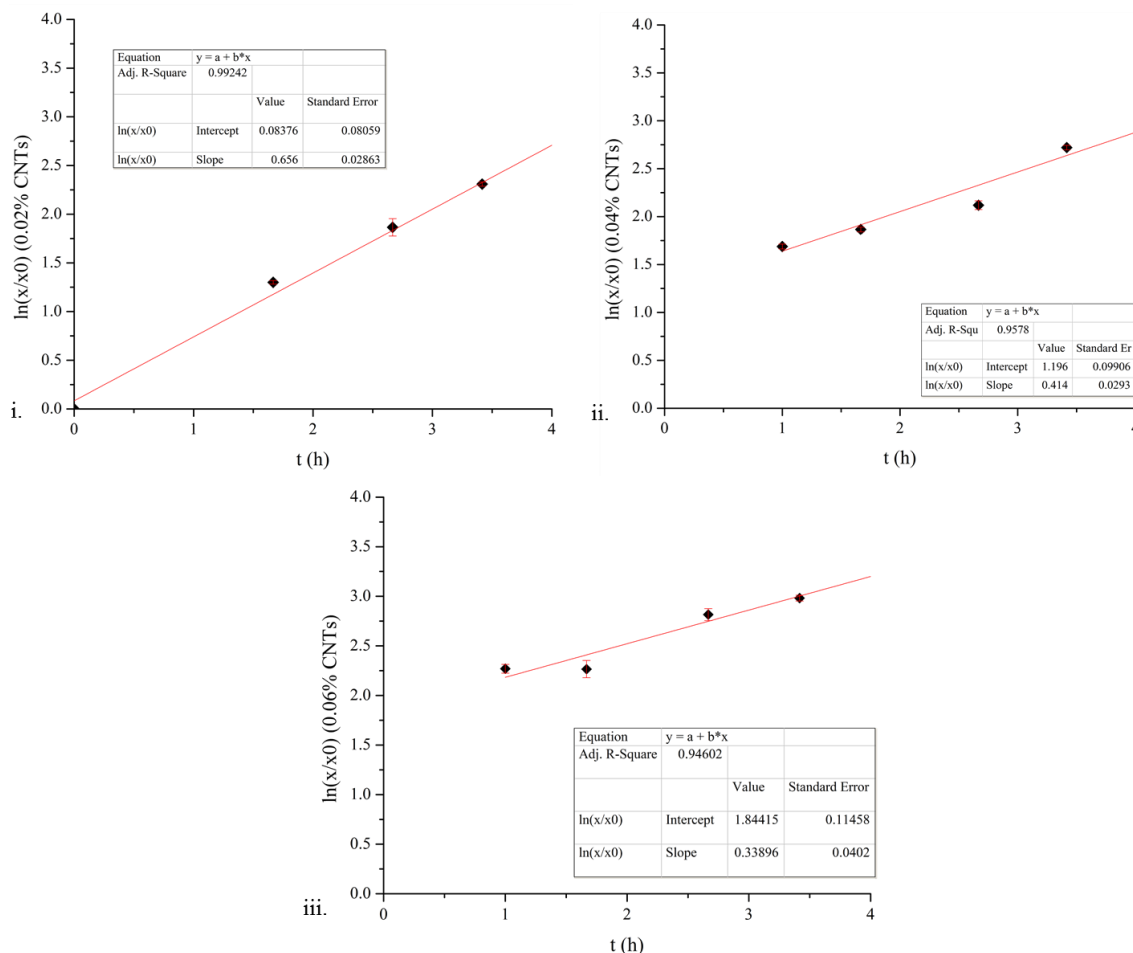


Διάγραμμα 19 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) για i) 0g a-CNTs/100ml LB, ii) 0.001g a-CNTs/100ml LB, iii) 0.005g a-CNTs/100ml LB και iv) 0.01g a-CNTs/100ml LB.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η τοξικότητα που παρουσιάζουν τα CNTs με επιφανειακή προσθήκη αμινομάδων είναι μεγαλύτερη από αυτή των μη τροποποιημένων [10] και αρκετά μικρότερη από αυτή που παρουσιάζουν τα CNTs με επιφανειακή προσθήκη καρβοξυλομάδων [15], κάτι που επιβεβαιώνεται από τα εν λόγω πειραματικά αποτελέσματα.

Το γεγονός ότι τα CNTs με την συγκεκριμένη τροποποίηση δεν εμφάνισαν επίδραση στην βακτηριακή ανάπτυξη για τις συγκεντρώσεις που ελέγχθηκαν δεν σημαίνει ότι για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις το αποτέλεσμα θα είναι το ίδιο. Εξαιτίας του μηχανισμού δράσης ο οποίος δεν είναι γνωστός, δεν μπορούν να γενικευτούν τα συμπεράσματα της μελέτης και για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Η πιθανή διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων τοξικότητας με άλλες έρευνες από τη βιβλιογραφία έγκειται στο γεγονός ότι οι προσαρτημένες αμινομάδες δεν είναι ταυτόσημες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η αλληλεπίδραση με τα βακτήρια να μην είναι ίδια σε όλες τις περιπτώσεις.

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ



Διάγραμμα 20 Προσδιορισμός του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης (μ_{\max}) για i) 0.02g a-CNTs/100ml LB, ii) 0.04g a-CNTs/100ml LB και iii) 0.06g a-CNTs/100ml LB.

Πίνακας 10 Κινητικές σταθερές της ανάπτυξης της *E. coli* παρουσία τροποποιημένων CNTs με προσθήκη αμινομάδων.

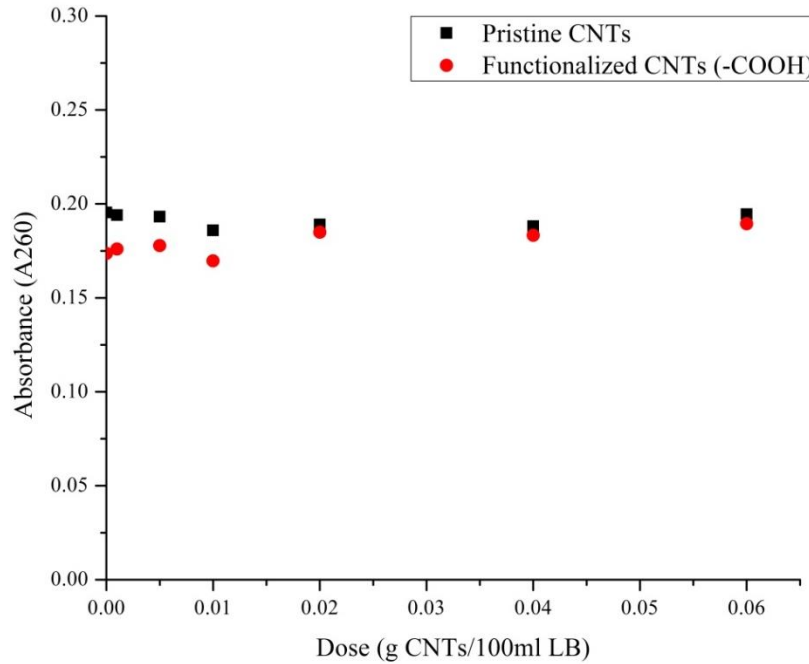
Δόση [% w/v]	μ_{\max} [h ⁻¹]	Ποσοστό		Ποσοστό αύξησης*	
		μείωσης*	μ_{\max}	t_d	t_d
		[%]		[h]	[%]
0	0.65	-		1.07	-
0.001	0.63	3		1.10	3
0.005	0.62	4		1.11	4
0.01	0.62	4		1.11	4
0.02	0.59	10		1.18	11
0.04	0.41	36		1.67	57
0.06	0.34	48		3.01	182

* Τα ποσοστά μεταβολής έχουν υπολογιστεί με βάση το δείγμα ελέγχου που δεν περιείχε CNTs.

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε αν σε αυτή την περίπτωση ο μηχανισμός αντιβακτηριακής δράσης των νανοσωλήνων είναι η διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων. Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 21, δεν έλαβε χώρα αύξηση της τιμής της απορρόφησης. Επομένως, η κυτταρική μεμβράνη παρέμεινε άθικτη. Έτσι, ο μηχανισμός δράσης στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

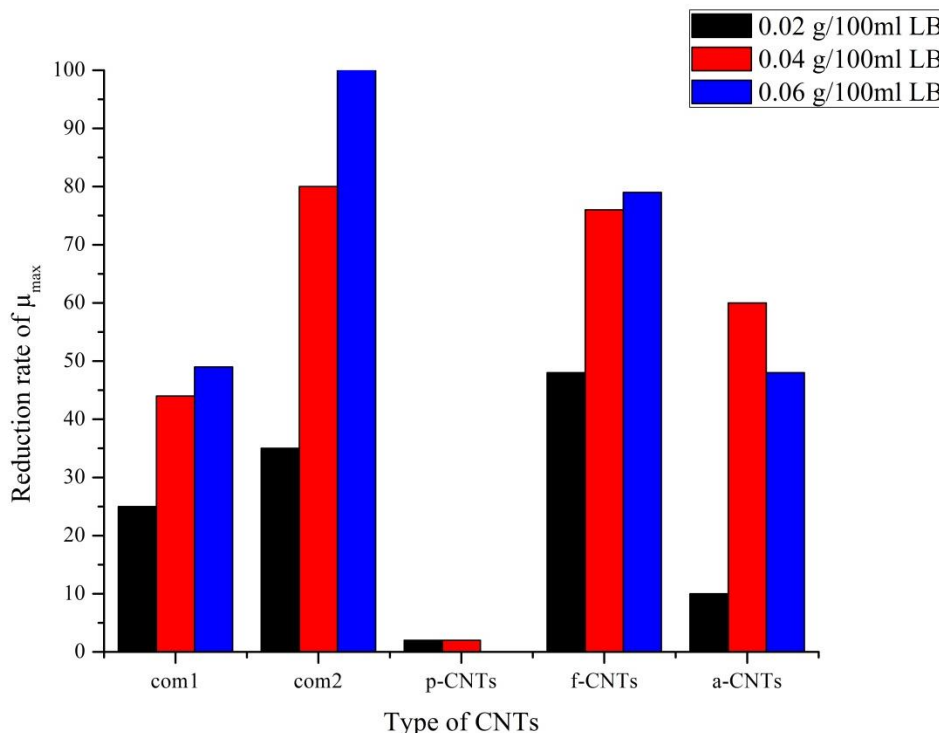
διαφορετικός. Αυτό που προτείνεται είναι ότι τα CNTs προσκολλούνται στην επιφάνεια των βακτηρίων, χωρίς να διαταράσσουν την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης, δυσκολεύοντας την διχοτόμησή και επομένως την ανάπτυξη τους.



Διάγραμμα 21 Μέτρηση δείγματος μη τροποποιημένων CNTs (μαύρο) και επιφανειακά τροποποιημένων CNTs με προσθήκη καρβοξυλομάδων (κόκκινο) σε μήκος κύματος 260 nm.

4. 4. Συζήτηση Αποτελεσμάτων

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση των CNTs σε βακτήρια *E. coli*, συναρτήσει διαφόρων παραγόντων. Οι παράγοντες που ελέγχθηκαν αν επιδρούν στην ανάπτυξη ήταν η διάμετρος των νανοσωλήνων, η επιφανειακή τροποποίηση και η συγκέντρωσή τους στο θρεπτικό μέσο. Όσον αφορά τα εμπορικά MWCNTs διαφορετικής διαμέτρου, αυτά με τη μικρότερη διάμετρο, για την ίδια δόση, προκαλούν μεγαλύτερη παρεμπόδιση στην βακτηριακή ανάπτυξη. Επομένως, το μέγεθος των νανοσωλήνων επηρεάζει την φυσιολογική ανάπτυξη των βακτηρίων. Στη συνέχεια, βρέθηκε ότι και η επιφανειακή τροποποίηση συμβάλλει, επίσης, στην αντιβακτηριακή δράση. Από τις δύο επιφανειακές τροποποιήσεις που ελέγχθηκαν, μεγαλύτερη επίδραση έχει αυτή με την προσθήκη των καρβοξυλομάδων, τόσο στον ρυθμό βακτηριακής ανάπτυξης όσο και στον σχηματισμό αποικιών. Επίσης, τα περισσότερα από τα είδη που ελέγχθηκαν εμφάνισαν αντιβακτηριακή δράση εξαρτώμενη από την προστιθέμενη δόση CNTs, εκτός από την περίπτωση των μη τροποποιημένων CNTs που συντέθηκαν στο εργαστήριο και αυτών με την επιφανειακή προσθήκη αμινομάδων, τα οποία δεν παρουσίασαν σημαντική επίδραση στον βακτηριακό πληθυσμό για τις ελεγχθείσες συγκεντρώσεις. Για τα υπόλοιπα, όσο πιο μεγάλη ήταν η προστιθέμενη δόση, τόσο πιο μεγάλη ήταν η επίδραση που παρουσιάστηκε στην βακτηριακή ανάπτυξη.



Διάγραμμα 22 Συγκεντρωτικό διάγραμμα μεταβολής του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης για τα διάφορα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν.

Συγκρίνοντας την παραχθείσα μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση, τα εμπορικά CNTs μικρής διαμέτρου εμφάνισαν τη μικρότερη για συγκέντρωση 0.04g CNTs/100ml LB, ενώ για

4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ

μεγαλύτερες συγκεντρώσεις δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη. Από τα υπόλοιπα δείγματα, τα τροποποιημένα CNTs με προσθήκη καρβοξυλομάδων, για συγκέντρωση 0.08g CNTs/100ml LB, παρουσίασαν την μεγαλύτερη μεταβολή στη μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση. Τέλος, όσον αφορά τους μέγιστους ειδικούς ρυθμούς ανάπτυξης για όλα τα δείγματα για τις ίδιες συγκεντρώσεις (Διάγραμμα 22), προκύπτει ότι οι τροποποιημένοι νανοσωλήνες με προσθήκη καρβοξυλομάδων εμφανίζουν ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση από τους υπόλοιπους τύπους για 0,02g CNTs/100ml LB. Ακολουθούν τα MWCNTs μικρής διαμέτρου και τα τροποποιημένα MWCNTs με επιφανειακή προσθήκη αμινομάδων. Για συγκέντρωση 0.04g CNTs/100ml LB, οι μικρής διαμέτρου νανοσωλήνες, τώρα, παρουσιάζονται πιο παρεμποδιστικοί, ενώ ακολουθούν οι επιφανειακά τροποποιημένοι με καρβοξυλομάδες και με αμινομάδες.

Συμπερασματικά, η αντιβακτηριακή δράση των διαφόρων ειδών που χρησιμοποιήθηκαν ακολουθεί την εξής φθίνουσα πορεία: Thin – MWCNTs > MWCNTs – COOH > MWCNTs – amino groups > commercial MWCNTs > pristine MWCNTs. Τέλος, πέρα από τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η αντιμικροβιακή δράση για έκαστο είδος, επηρεάζεται και από την συγκέντρωση των CNTs στο θρεπτικό μέσο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S. Kang, M. Mauter και M. Elimelech, *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 43, pp. 2648-2653, 2009.
- [2] S. Kang, M. Pinault, L. D. Pfefferle και M. Elimelech, *Langmuir*, τόμ. 23, p. 8670–8673, 2007.
- [3] L. R. Arias και L. Yang, *Langmuir*, τόμ. 25, pp. 3003-3012, 2009.
- [4] S. Kang, M. Herzberg, D. F. Rodrigues και M. Elimelech, *Langmuir*, τόμ. 24, pp. 6409-6413, 2008.
- [5] H. Zheng, L. Liu, L. Lu, Y. Long, L. Wang, K. P. Ho και K. Y. Wong, *Anal. Sci.*, τόμ. 26, pp. 125-128, 2010.
- [6] M. Bottini, S. Bruckner, K. Nika, N. Bottini, S. Bellucci, A. Magrini, A. Bergamaschi και T. Mustelin, *Toxicol. Lett.*, τόμ. 160, pp. 121-126, 2006.
- [7] J. Liu και M. C. Hersam, *MRS Bulletin*, τόμ. 35, p. 315–321, 2010.
- [8] H. F. Wang, L. R. Gu, Y. Lin, F. S. Lu, M. J. Meziani, P. G. J. Luo, W. Wang, L. Cao και Y. P. Sun, *J. Am. Chem. Soc.*, τόμ. 128, p. 13364–13365, 2006.
- [9] A. F. Trompeta, D. K. Perivoliotis, M. A. Koklioti, I. Lynch και C. A. Charitidis, *J. Clean. Prod.*, Submitted on September 2015.
- [10] H. Zardini, M. Davarpanah, M. Shanbedi, A. Amiri, M. Maghrebi και L. Ebrahimi, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, τόμ. 102, pp. 1774-81, 2014.
- [11] S. B. Liu, L. Wei, L. Hao, N. Fang, M. W. Chang, R. Xu, Y. H. Yang και Y. Chen, *ACS Nano*, τόμ. 3, p. 3891–3902, 2009.
- [12] Y.-F. Young, H.-J. Lee, Y.-S. Shen, S.-H. Tseng, C.-Y. Lee, N.-H. Tai και H.-Y. Chang, *Mater. Chem. Phys.*, τόμ. 134, p. 279–286, 2012.
- [13] Y. Seo, J. Hwang, J. Kim, Y. Jeong, M. P. Hwang και J. Choi, *International Journal of Nanomedicine*, τόμ. 9, p. 4621—4629, 2014.
- [14] G. Jia, H. Wang, L. Yan, X. Wang, R. Pei, T. Yan, Y. Zhao και X. Guo, *Environ. Sci. Technol.*, τόμ. 39, p. 1378–1383, 2005.
- [15] Y. Zhu, T. Ran, Y. Li, J. Guo και W. Li, *Nanotechnology*, τόμ. 17, p. 4668–4674, 2006.
- [16] M. Soleimani, M. G. Afshar και A. Sedghi, *ISRN Nanotechnology*, τόμ. 2013, pp. 1-8, 2013.
- [17] T. Ramanathan, F. T. Fisher, R. S. Ruoff και L. C. Brinson, *Chem. Mater.*, τόμ. 17, pp. 1290-1295, 2005.
- [18] N. Chatterjee, J. Yang, H. M. Kim, E. Jo, P. J. Kim, K. Choi και J. Choi, *J. Toxicol. Environ. Health A*, τόμ. 77, pp. 1399-408, 2014.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Γενικά, η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωλήνων άνθρακα έχει προταθεί ότι εξαρτάται από την διάμετρό τους, το μήκος τους, την ικανότητα διασπορά τους στο θρεπτικό μέσο που ελέγχεται, στην ύπαρξη ή μη κάποιας επιφανειακής τροποποίησης, το είδος της επιφανειακής τροποποίησης, όπως επίσης και από την συγκέντρωση τους στο θρεπτικό μέσο και τον χρόνο επώασης του εκάστοτε (μικρο)οργανισμού παρουσία τους.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε διερεύνηση της επίδρασης διαφόρων τύπων CNTs τόσο στη βιωσιμότητα όσο και στην κινητική της ανάπτυξης των βακτηρίων *E. coli*. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν οι εξής παράγοντες: η διάμετρος, η επιφανειακή τροποποίηση, και η συγκέντρωση των νανοσωλήνων στο θρεπτικό μέσο, για τον ίδιο χρόνο επώασης. Όσον αφορά τη διάμετρο, ελέγχθηκαν CNTs με δύο διαφορετικές διαμέτρους (15-35 nm και 6-15 nm). Η επίδραση της επιφανειακής τροποποίησης ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας CNTs χωρίς τροποποίηση και με δύο διαφορετικές τροποποιήσεις. Η πρώτη τροποποίηση περιλάμβανε την επιφανειακή προσθήκη καρβοξυλομάδων, ενώ η δεύτερη την επιφανειακή προσθήκη αμινομάδων. Αυτό που παρατηρήθηκε σε όλες, σχεδόν, τις περιπτώσεις είναι ότι αυξανόμενη της προστιθέμενης ποσότητας των CNTs για συγκεκριμένη ποσότητα θρεπτικού υλικού, επηρεάζεται αρνητικά τόσο η βιωσιμότητα όσο και οι κινητικές σταθερές της ανάπτυξης. Επίσης, για τις ίδιες συγκεντρώσεις, τα CNTs με μικρότερη διάμετρο επηρεάζουν σημαντικά τη βιωσιμότητα σε αντίθεση με αυτά που έχουν μεγαλύτερη διάμετρο. Στις κινητικές σταθερές, η επίδραση των πρώτων είναι ακόμα μεγαλύτερη από των δεύτερων. Δηλαδή, παρουσία των CNTs μικρότερης διαμέτρου, τα βακτήρια αναπτύσσονται με πιο αργό ρυθμό, γεγονός που θα μπορούσε να θεωρηθεί παρεμπόδιση στην ανάπτυξη. Ιδιαίτερα για μεγάλες συγκεντρώσεις αυτών (>0.06g CNTs/100ml LB), δεν υπάρχει πρακτικά ανάπτυξη των βακτηρίων για τον συγκεκριμένο χρόνο επώασης που ελέγχθηκε. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι τα βακτήρια, παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων CNTs μικρής διαμέτρου, αδυνατούν να αναπτυχθούν. Εξίσου έντονη παρεμπόδιση στην ανάπτυξη παρατηρήθηκε όταν τα βακτήρια επώαστηκαν μαζί με τροποποιημένους νανοσωλήνες. Ανάλογα, όμως, με την τροποποίηση, τα αποτελέσματα ήταν πάλι διαφοροποιημένα. Συγκεκριμένα, τα επιφανειακά τροποποιημένα CNTs με καρβοξυλομάδες εμφάνισαν μεγαλύτερη παρεμπόδιση από τα αντίστοιχα με αμινομάδες για τον ίδιο χρόνο επώασης. Έτσι, διεξάγεται το συμπέρασμα ότι τα CNTs με επιφανειακή προσθήκη καρβοξυλομάδων έχουν πιο ισχυρή αντιμικροβιακή δράση από τα αντίστοιχα με αμινομάδες. Η τάση που ακολουθείται από τα είδη CNTs που δρουν παρεμποδιστικά στην ανάπτυξη είναι αρχικά να μειώνεται η ταχύτητα με την οποία αναπτύσσονται τα βακτήρια, χωρίς να παρουσιάζεται μεγάλη διαφοροποίηση στην μέγιστη κυτταρική συγκέντρωση, ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νανοσωλήνων, η ανάπτυξη παρεμποδίζεται πλήρως. Έτσι, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η μεταβολή, και συγκεκριμένα η μείωση, του μέγιστου ειδικού ρυθμού ανάπτυξης αποτελεί ένδειξη ότι για ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις CNTs η ανάπτυξη θα παρεμποδιστεί πλήρως.

Πολλές φορές τα αποτελέσματα της τοξικής επίδρασης των CNTs είναι ποικίλα, αμφιλεγόμενα και συχνά αλληλοαναιρούμενα. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι ιδιότητες των CNTs που χρησιμοποιούνται κάθε φορά στις διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί ως τώρα διαφέρουν, ενώ πολλές φορές αυτά δεν είναι καλά χαρακτηρισμένα ώστε να μπορέσει να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στις διάφορες έρευνες. Επίσης, πολλές φορές χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι κυττάρων, γεγονός που κάνει ακόμα πιο δύσκολη τη σύγκριση. Ακόμα ένας λόγος για τον οποίο πολλές φορές υπάρχει διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων είναι τα διαφορετικά μέσα κυτταρικής καλλιέργειας που χρησιμοποιούνται. Αυτό επηρεάζει τη διασπορά των νανοσωλήνων και άρα τα αποτελέσματα δεν μπορούν να είναι συγκρίσιμα καθώς σε κάποια μέσα τα CNTs διασπείρονται καλύτερα έναντι άλλων και άρα η αλληλεπίδραση με τα κύτταρα είναι εντονότερη.

Από τα παραπάνω, είναι προφανές ότι απαιτείται η δημιουργία κάποιου πρωτόκολλου βάση του οποίου θα διεξάγονται όλα τα πειράματα ώστε αυτά να μπορούν να συγκριθούν. Ακόμα, πριν τη διεξαγωγή οποιουδήποτε πειράματος τοξικότητας, θα πρέπει τα υλικά να χαρακτηρίζονται πλήρως. Νέες μέθοδοι απαιτούνται για την σύνθεση, τον καθαρισμό και την τροποποίηση των CNTs, έτσι ώστε τα CNTs που προκύπτουν να έχουν καλά καθορισμένες ιδιότητες ώστε η αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης να είναι πιο εύκολη. Εξίσου σημαντική είναι και η δημιουργία νέων μεθόδων ενεργοποίησης, ώστε να γίνει επίτευξη της στοχευμένης αντιμικροβιακής δράσης. Επίσης, από μια ευρύτερη άποψη, η αντιμικροβιακή δράση των CNTs θα μπορούσε κάλλιστα να συνδυαστεί με τις μοναδικές τους ηλεκτρικές, θερμικές και φασματοσκοπικές ιδιότητες για την ανάπτυξη καινοτόμων περιβαλλοντικών και βιοϊατρικών εφαρμογών.

Μελλοντικά, είναι σημαντικό να γίνει χαρακτηρισμός με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) ώστε να προσδιοριστεί με ποιο τρόπο αλληλεπιδρούν τα βακτήρια με τα CNTs. Στη συνέχεια, θα πρέπει να ελεγχθεί πως επηρεάζουν την αντιμικροβιακή δράση των νανοσωλήνων άλλες τροποποιήσεις, όπως για παράδειγμα η επιφανειακή προσθήκη υδροξυλομάδων, καθώς επίσης και πως επηρεάζεται η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωλήνων για την ίδια τροποποίηση η οποία, όμως, έχει λάβει χώρα μέσω διαφορετικής οδού. Θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί και να ελεγχθεί η αντιβακτηριακή δράση των CNTs με επιφανειακή προσθήκη αμινοξέων ή άλλων βιολογικών ειδών, με εγγενή ή χωρίς αντιμικροβιακή δράση, και να ελεγχθεί η ικανότητα αυτών για στοχευμένη αντιμικροβιακή δράση. Σημαντικός, επίσης, είναι και ο προσδιορισμός της διασποράς των CNTs σε διαφορετικά θρεπτικά μέσα και πώς αυτό επηρεάζει την αντιμικροβιακή τους δράση. Τέλος, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση του μηχανισμού αντιμικροβιακής δράσης ανά περίπτωση.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΠΡΟΣΩΠΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ



Νικολέττα Βλάχου

📍 163, Μεγ. Αλεξάνδρου, Αθήνα, 13562, Ελλάδα

☎ 210-2696877 📠 6945660862

✉ ch08107@hotmail.com
nikolvlachou@gmail.com

Φύλο Θήλυ | Ημερομηνία γέννησης 16/02/1991 | Εθνικότητα Ελληνική

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑ

Χημικός Μηχανικός

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

10/2012 – 09/2013

ΚΛΕΒΑ Α.Φ.Β.Ε.Ε., Λ. Πάρνηθος 189, 136 75 Αχαρνάι - Τηλ.: 210 2402404-7, www.kleva.gr
Βοηθός Διευθυντή Παραγωγής και Εργοστασίου (Τμήμα Παραγωγής)

- Ενασχόληση με διαδικασίες και έντυπα ISO
- Κατάθεση στον ΕΟΦ, μέσω της διαδικτυακής εφαρμογής του, των επικολημένων και σκάρτων ταινιών γνησιότητας
- Έλεγχος αξιόπιστης λειτουργίας ξηρών και υγρών κλιβανισμών (validation)
- Διακριβώσεις ζυγών, θερμομέτρων & υγρασιομέτρων
- Έκδοση δελτίων παραγωγής και συσκευασίας προϊόντων

Επιχείρηση ή κλάδος φαρμακευτικά προϊόντα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΚΑΤΑΡΤΙΣΗ

02/2014-Σήμερα

Μεταπτυχιακές Σπουδές στο ΔΠΜΣ "Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών"

Τριτοβάθμια εκπαίδευση

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών
(Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, 15780, Αθήνα, Ελλάδα/ www.chemeng.ntua.gr/)

- Διπλωματική εργασία
"Αντιβακτηριακή Δράση Νανοσωλήνων Άνθρακα – Μελέτη Περίπτωσης *E. coli*",
Επιβλέπων: Κ. Α. Χαριπίδης, Καθηγητής του Τομέα Επιστήμης & Τεχνικής Υλικών,
Σχολή Χημικών Μηχανικών σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του
Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

10/2008 – 03/2014

Δίπλωμα Χημικής Μηχανικής (Εκτιμώμενος Βαθμός διπλώματος: 7,72/10 "Λίαν Καλώς")

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο Σχολή Χημικών Μηχανικών
(Πολυτεχνειούπολη Ζωγράφου, 15780, Αθήνα, Ελλάδα/ www.chemeng.ntua.gr/)

- Διπλωματική εργασία
"Μελέτη Τοξικότητας Νανοσωματιδίων",
Επιβλέπων: Κ. Α. Χαριπίδης, Καθηγητής του Τομέα Επιστήμης & Τεχνικής Υλικών, Σχολή Χημικών
Μηχανικών, του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου σε συνεργασία με το ερευνητικό εργαστήριο
Υλικών του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε Δημόκριτος.

11/09/2005 – 24/06/2008

Απολυτήριο Λυκείου (Βαθμός απολυτηρίου: 18,9 "Άριστα")

Δευτεροβάθμια εκπαίδευση

3^ο Ενιαίο Λύκειο Αγ. Αναργύρων (Θετική Κατεύθυνση)
(Δεληγιάννη & Καρπενησίου, 13562, Αθήνα, Ελλάδα/ <http://srv-3lyk-ag-anarg.att.sch.gr/>)

ΑΤΟΜΙΚΕΣ ΔΕΞΙΟΤΗΤΕΣ

Μητρική γλώσσα Ελληνικά

Λοιπές γλώσσες

	ΚΑΤΑΝΟΗΣΗ		ΟΜΙΛΙΑ		ΓΡΑΦΗ
	Προφορική	Γραπτή (ανάγνωση)	Επικοινωνία	Προφορική έκφραση	
Αγγλικά	C2	C2	C2	C2	C2
Proficiency – University of Michigan					
Γαλλικά	A2	A2	A2	A2	A2
επίπεδο Delf A2					

Επίπεδα: A1/2: Βασικός χρήστης - B1/2: Ανεξάρτητος χρήστης - C1/2: Έμπειρος χρήστης
Κοινό Ευρωπαϊκό Πλαίσιο Αναφοράς για Γλώσσες

Επικοινωνιακές δεξιότητες

Καλές επικοινωνιακές δεξιότητες που αποκτήθηκαν μέσα από την εμπειρία μου σε :

- Επικοινωνία με πελάτες της ΚΛΕΒΑ Α.Φ.Β.Ε.Ε σχετικά με τις ταινίες γνησιότητας ΕΟΦ
- Εξοικείωση συνεργασίας με πολλά άτομα/ ομαδικό πνεύμα (που αποκτήθηκε μέσω των εργαστηριακών ομάδων κατά τη διάρκεια φοίτησής μου αλλά και από την τρέχουσα συνεργασία μου με τα διάφορα τμήματα της ΚΛΕΒΑ Α.Φ.Β.Ε.Ε)

Οργανωτικές / διαχειριστικές δεξιότητες

- Ηγετικές ικανότητες (συντονίστρια των εργαστηριακών ομάδων κατά τη διάρκεια φοίτησής μου)

Επαγγελματικές δεξιότητες

- Ενασχόληση με διαδικασίες και έντυπα ISO.
- Έλεγχος αξιοπιστίας λειτουργίας ξηρών και υγρών κλιβανισμών (validation).
- Διακρίβωση εργαστηριακών οργάνων
- Trend analysis σωματιδιακής συγκέντρωσης σε όλους τους χώρους του εργοστασίου.
- Έκδοση δελτίων παραγωγής και συσκευασίας.
- Ικανότητα συνεργασίας με συναδέλφους.
- Εξοικείωση με τη διαδικτυακή εφαρμογή του ΕΟΦ για τις ταινίες γνησιότητας φαρμακευτικών προϊόντων.

Δεξιότητες πληροφορικής

- Καλός χειρισμός των εργαλείων Microsoft Office™
- MathCAD 14
- Comsol MultiPhysics 3.5a
- Matlab R2010a
- Mathematica 7
- Origin Lab
- Adobe Acrobat X Pro
- SL Enterprise Version 7.50.0.0.
- SimaPro 7 & 8

Λοιπές δεξιότητες

- Okinawa te tai karate do (καφέ ζώνη)
- Point Fighting
- Κολύμβηση
- Ζωγραφική
- Χορός

Δίπλωμα οδήγησης ▪ Κατηγορία Β (κάτοχος οχήματος)

ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ

Δημοσιεύσεις

- C. A. Charitidis, A. Trombeta, N. Vlachou, V. Markakis, Risk management of engineered nanomaterials in EU-The case of carbon nanotubes and carbon nanofibers: A review, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 2015
- N. Vlachou, A. Trombeta, H. Sarimveis, C. A. Charitidis, Life Cycle Assessment as a Prerequisite Tool in Maritime Industry, ASHRAE Transactions, 2015

Παρουσιάσεις

- 10^η Επετειακή Εκδήλωση Ελληνικής Εταιρείας Βιοϋλικών, Αθήνα 26-28/11/2015. N.H. Βλάχου, Δ. Μαμμά, Δ. Κέκος, Κ.Α. Χαριτίδης, Αντιβακτηριακή Δράση Νανοσωλήνων Άνθρακα Διαφορετικής Διαμέτρου και Τροποποίησης (poster).
- 10ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής, Πάτρα 6-8/06/2015. N. Vlachou, A. Trombeta, D. Perivoliotis, D. Mamma, A. Skarmoutsou, D. Kekos, C. A. Charitidis, Carbon nanotubes and their effect on *E. Coli* viability (poster).
- Environment and Energy in Ships, Πειραιάς 22-24/05/2015
N. Vlachou, A. Trombeta, H. Sarimveis, C. A. Charitidis, Life Cycle Assessment as a Prerequisite Tool in Maritime Industry (oral).
- Sustainable Nanotechnology Conference, Venice 9-11/03/2015.
C. Piller, E. Gunter-Hoch, F. Ben-Ami, N. Vlachou, D. Perivoliotis, A.F. Trombeta, A. Skarmoutsou, Y. Benayahu, C.A. Charitidis, Ecotoxicity effects of multi walled carbon nanotubes (oral)
- [avniR] Conference, Life Cycle in Practice, Lille, 5-6/11/2014.
Sophie Dropsit, Nikol H. Vlachou, Aikaterini - Flora A. Trombeta, Costas A. Charitidis, Olivier Talon, Evaluation Of The Influence Of Innovative Antifouling Solutions On The Environmental Impact Of Maritime Transportation (poster).
- XXVIII Πανελλήνιο Συνέδριο Φυσικής Στερεάς Κατάστασης και Επιστήμης Υλικών, Πάτρα, 23-26/09/2012.
N. Vlachou, E. K. Efthimiadou, C. Tapeinos, G. Kordas, C. A. Charitidis, Toxicology of nanomaterials Study Case: drug-loaded particles (poster).

Συνέδρια

- 9ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής.
- 8ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο Χημικής Μηχανικής.

Σεμινάρια

- 1st Sustainable Nanotechnology School, Venice, Italy.
- COST MODENA meeting, Syracuse, Italy
- Δημερίδα "Ερευνώ - Καινοτομώ - Επιχειρώ".

Προγράμματα

- " Καινοτόμα Αυτοϊάσιμα Οικολογικά Υφαλοχρώματα με Αντιδιαβρωτική και Αντιβιοεπιστρωτική Δράση(MARIPAINTS)", ΕΣΠΑ 2007-2013

Τιμητικές διακρίσεις και βραβεία

- Αρίστευση κατά τη φοίτηση στο ΔΠΜΣ "Επιστήμη και Τεχνολογία Υλικών" (εντός των τριών πρώτων αποφοιτήσαντων)