



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

**Επιχαλκωμένες μικρο-νανοδομημένες με πλάσμα
υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες με
αντιβακτηριακές ιδιότητες**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Κεφαλληνού Διονυσίας

Επιβλέπουσα: Τσερέπη Αγγελική, *Ερευνήτρια Α΄, ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”*

Αθήνα, 2016



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

**Επιχαλκωμένες μικρο-νανοδομημένες με πλάσμα
υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες με
αντιβακτηριακές ιδιότητες**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Κεφαλληνού Διονυσίας

Εγκρίθηκε από την τριμελή εξεταστική επιτροπή την

.....

Τσερέπη Αγγελική	Γογγολίδης Ευάγγελος	Τσουκαλάς Δημήτριος

Αθήνα, 2016

Διονυσία Κεφαλληνού

© (2016) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

Πρόλογος

Η συγκεκριμένη μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος” κατά το χρονικό διάστημα 2015-2016, με επιβλέπουσα την Ερευνήτρια Δρ. Αγγελική Τσερέπη, την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις ιδιαίτερα εύστοχες παρατηρήσεις της καθ’ όλη τη διάρκεια της διεκπεραίωσης της εργασίας, καθώς και το ουσιαστικό ενδιαφέρον της. Εξίσου, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον Ερευνητή Δρ. Ευάγγελο Γογγολίδη για την ευκαιρία που μου έδωσε μετά την ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος “Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις” του Τμήματος Φυσικής της Σχολής Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, να αναλάβω το συγκεκριμένο θέμα μεταπτυχιακής εργασίας και να παραβρεθώ στο χώρο του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”, καθώς και για την πολύτιμη συμβολή του στην εξέλιξη και καθοδήγηση των πειραμάτων.

Ευχαριστώ θερμά επίσης, το Δρ. Κώστα Σταματάκη, για την παραχώρηση του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μembrανών του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”, προς πραγματοποίηση των πειραμάτων και την καταλυτική συνεισφορά του στο βιολογικό τμήμα της εργασίας.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Κοσμά Έλληνα, ο οποίος συμμετείχε ενεργά τόσο στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, όσο και στην κατεύθυνση της πειραματικής πορείας, με συμβολή απαραίτητη για την έκβαση της εργασίας. Ευχαριστώ επίσης, τη Δρ. Κατερίνα Τσουγένη για τις χρήσιμες συμβουλές και το ενδιαφέρον της, την υποψήφια Διδάκτορα Αθηνά Καστανιά για τη βοήθειά της όποτε τη χρειάστηκα, και τον υποψήφιο Διδάκτορα Άγγελο Ζένιου για την επίβλεψή του κατά τη χρήση του αντιδραστήρα, καθώς και ολόκληρη την “ομάδα πλάσματος” για το φιλόξενο κλίμα υποδοχής. Από το Εργαστήριο Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μembrανών, ευχαριστώ ακόμη, τον υποψήφιο Διδάκτορα Δημήτρη Βαγενό για τη βοήθειά του στην ομαλή εισαγωγή μου στον εργαστηριακό κόσμο της Βιολογίας.

Τέλος, δε θα μπορούσα να ξεχάσω την οικογένειά μου, για την υποστήριξη των επιλογών μου και την υπομονή τους όλα αυτά τα χρόνια της σταδιοδρομίας μου.

Περίληψη

Η κατασκευή αντιβακτηριακών επιφανειών αποτελεί ένα ολοένα αναπτυσσόμενο πεδίο ερευνητικής δραστηριότητας, δεδομένης της ανάγκης εφαρμογής τους σε μια πληθώρα τομέων, που συμπεριλαμβάνουν τον τομέα της υγείας, με χαρακτηριστικά παραδείγματα την προστασία εμφυτευμάτων και ιατρικού εξοπλισμού, και τον τομέα διασφάλισης ποιότητας τροφίμων και πόσιμων υγρών, με τη θωράκιση της συσκευασίας τροφίμων και την προστατευμένη φύλαξη και μεταφορά νερού.

Οι υπερυδρόφοβες επιφάνειες είναι ήδη γνωστές στο ερευνητικό κοινό για την απωθητική τους δράση προς τα βακτήρια. Στην παρούσα εργασία, στα πλαίσια της ευρύτερα επιτασσόμενης αντιβακτηριακής προστασίας των υλικών, επιχειρείται η κατασκευή επιφανειών, οι οποίες εκτός της μη προσκολλητικής τους ιδιότητας, θα είναι ικανές να εξουδετερώνουν τον εναπομείνοντα βακτηριακό πληθυσμό, καθώς έστω και μικρό ποσοστό βακτηριακού αποικισμού είναι δυνατόν να δημιουργήσει βιοφίλμ.

Στην κατεύθυνση αυτή, χρησιμοποιήθηκε μικρο-νανοτεχνολογία για την επιφανειακή τροποποίηση πολυμερικών υποστρωμάτων, και συγκεκριμένα, κατεργασία πλάσματος οξυγόνου (O₂) για τη μικρο-νανοϋφανση των επιφανειών, συνοδευόμενη από εναπόθεση χαλκού λόγω της αποδεδειγμένης ικανότητάς του να εξουδετερώνει βακτήρια, κατασκευάζοντας έτσι, επιχαλκωμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες με συνδυαστική μη προσκολλητική και βακτηριοκτόνο δραστηριότητα.

Λέξεις-κλειδιά: Αντιβακτηριακές επιφάνειες, υπερυδροφοβικότητα, μικρο-νανοϋφανση με πλάσμα αερίων, βακτηριακή προσκόλληση, βακτηριοκτόνος δράση, χαλκός, Gram(-) βακτήρια, πολυμερή.

Abstract

Given the undoubted need for antibacterial surfaces, dominant in a wide range of fields, that include the health sector in areas such as implantations and medical equipment, and the sector of food quality assurance via shielding of food packaging, as well as the protective storage and water transport, the construction of antibacterial surfaces has become an ever-growing field of research activity.

Superhydrophobic surfaces are privileged with repulsive properties against bacteria, largely projected in the research community. In this thesis, in the context of materials' antibacterial protection tendency, the construction of surfaces that combine their non-adhesive properties with a bactericidal ability is attempted, since a minor remaining attached bacteria population is sufficient to colonize the surface.

To this direction, micro-nanotechnology was utilized for surface modification of polymeric substrates, and in particular, oxygen plasma for micro-nanotexturing the surfaces, tallied with copper deposition due to its proven ability of bacteria elimination, this way constructing copper-covered superhydrophobic surfaces with combinational repulsive and bactericidal activity.

Keywords: Antibacterial surfaces, superhydrophobicity, plasma micro-nanotexturing, bacteria adhesion, bactericidal activity, copper, Gram(-) bacteria, polymers.

Περιεχόμενα

1. ANΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ.....	1
1.1 Διάκριση αντιβακτηριακών επιφανειών.....	4
1.2 Μη προσκολλητικές αντιβακτηριακές επιφάνειες.....	6
1.3 Βακτηριοκτόνες επιφάνειες.....	11
1.4 Μικρο-νανοϋφασμένες αντιβακτηριακές επιφάνειες.....	20
1.5 Μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες με αντιβακτηριακές ιδιότητες.....	24
1.5.1 Υπερυδρόφοβες επιφάνειες: Ιδιότητες και τρόπος κατασκευής τους.....	25
1.5.2 Μη προσκολλητικές μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες.....	28
1.5.3 Βακτηριοκτόνες μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες.....	32
1.6 Μη προσκολλητικές και βακτηριοκτόνες μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες.....	33
1.7 Στόχοι της εργασίας.....	38
2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΜΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	40
2.1 Τεχνικές μελέτης προσκόλλησης βακτηρίων σε επιφάνειες.....	40
2.2 Τεχνικές μελέτης βακτηριακής ανάπτυξης πάνω σε επιφάνειες.....	43
2.2.1 Πρωτόκολλο αντιβακτηριακής δράσης και αποτελεσματικότητας πολυμερών.....	44
2.3 Κυανοβακτήρια.....	46
2.3.1 Μορφολογία και οικοσύστημα κυανοβακτηρίων.....	46
2.3.2 Φωτοσύνθεση – Φωτοσυστήματα I και II.....	47
2.4 Πρότυπη μέθοδος προσδιορισμού αντιβακτηριακής δράσης με φθορισμό γλωροφύλλης a κυανοβακτηρίων.....	49
3. ΥΛΙΚΑ, ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	53
3.1 Υλικά και βακτήρια.....	53
3.2 Επιφανειακή κατεργασία και τροποποίηση.....	54
3.2.1 Τεχνολογία πλάσματος.....	54

3.2.1.1 Αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP (Inductively Coupled Plasma).....	57
3.2.2 Σύστημα ιονβολής (sputtering)	62
3.3 Διατάξεις χαρακτηρισμού επιφανειών	65
3.3.1 Μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (SEM).....	65
3.3.2 Σύστημα μέτρησης γωνίας επαφής	68
3.4 Διατάξεις μελέτης προσκόλλησης και ανάπτυξης βακτηρίων	69
3.4.1 Μικροσκοπία φθορισμού	69
3.4.2 Μέτρηση απορρόφησης φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους	72
3.4.3 Μέτρηση φθορισμού Chl a των κυανοβακτηρίων	75
3.5 Άλλα χρησιμοποιηθέντα όργανα	77
3.6 Πειραματικές μέθοδοι.....	80
3.6.1 Προετοιμασία κι επεξεργασία υποστρωμάτων PMMA	80
3.6.1.1 Εντύπωση μικροφρεατίων σε πλακίδια PMMA.....	80
3.6.1.2 Μικρο-νανοϋφανση με πλάσμα επιφανειών PMMA	82
3.6.1.3 Υπερυδροφοβοποίηση PMMA επιφανειών.....	83
3.6.1.4 Εναπόθεση μετάλλου σε νανοϋφασμένες ή μη επιφάνειες PMMA	85
3.6.2 Ανάπτυξη καλλιέργειας <i>Synechococcus</i> sp PCC 7942 προς μελέτη αντιβακτηριακής δράσης επιφανειών.....	87
3.6.2.1 Μέθοδοι παραγωγής και ανάπτυξης καλλιέργειας <i>Synechococcus</i> sp PCC 7942	87
3.6.2.2 Μέθοδοι αντιβακτηριακής μελέτης επιφανειών	90
4. ΜΕΛΕΤΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟ-ΝΑΝΟϋΦΑΣΜΕΝΕΣ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ ΥΠΕΡΥΔΡΟΦΟΒΕΣ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ.....	92
4.1 Πειραματική διαδικασία	92
4.2 Αποτελέσματα	93
4.3 Συζήτηση και συμπεράσματα	105
5. ΑΝΤΙΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΔΡΑΣΗ ΜΙΚΡΟ-ΝΑΝΟϋΦΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ, ΜΕ ΚΑΙ ΧΩΡΙΣ ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΜΕΤΑΛΛΟΥ.....	108
5.1 Επίδραση πειραματικών συνθηκών κι επιφάνειας στην εξάπλωση των <i>Synechococcus</i> sp PCC 7942	109
5.2 Βαθμονόμηση βακτηριακών συγκεντρώσεων σε ακατέργαστες και κατεργασμένες με πλάσμα υπερυδροφικές επιφάνειες	115
5.3 Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης των επιφανειών	121

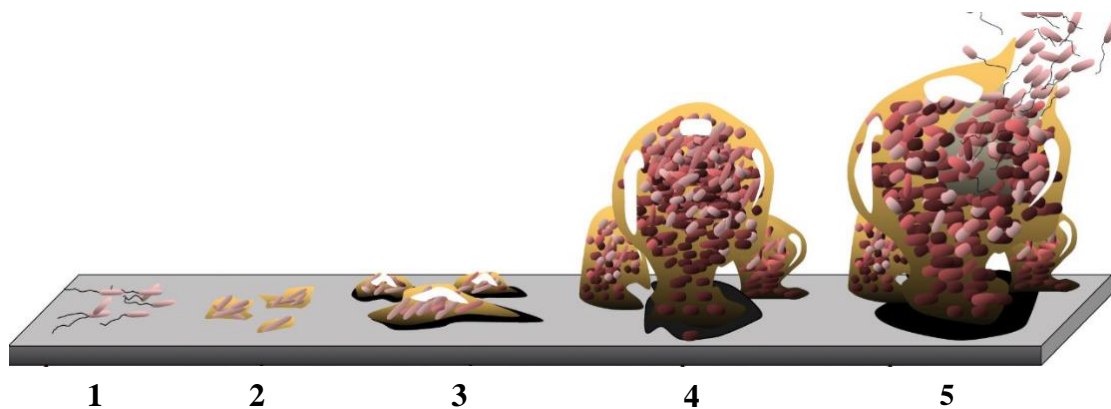
5.3.1 Μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες	121
5.3.2 Επιφάνειες PMMA μετά από εναπόθεση μετάλλου	127
5.3.3 Επιχάλκωμένες μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες.....	134
5.3.3.1 Επιλογή υδρόφοβης επικάλυψης προς κατασκευή επιχάλκωμένων μικρο- νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων επιφανειών	135
5.3.3.2 Επιλογή χρόνου εναπόθεσης υδρόφοβου υμενίου C ₄ F ₈ προς κατασκευή επιχάλκωμένων μικρο-νανοϋφασμένων υπερυδρόφοβων επιφανειών	137
5.3.3.3 Αντιβακτηριακή δράση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών με και χωρίς επιχάλκωση.....	141
5.4 Συγκριτική μελέτη αντιβακτηριακής δράσης ακατέργαστων επιμεταλλωμένων και μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών με και χωρίς επιχάλκωση	145
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ.....	150
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	153
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	158
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159

1. Αντιβακτηριακές επιφάνειες

Τις τελευταίες δεκαετίες, πληθώρα μελετών και πειραμάτων [1] έχουν αποδείξει ότι οι βασικοί παράγοντες που καθορίζουν την αλληλεπίδραση ενός υλικού με ένα ζωντανό οργανισμό, σχετίζονται με τις επιφανειακές του ιδιότητες. Πρόκειται συγκεκριμένα για παράγοντες που αφορούν στη χημική σύσταση της επιφάνειας του υλικού, το επιφανειακό του φορτίο, την υδροφοβικότητά του και την εν γένει επιφανειακή τραχύτητα και τοπογραφία του ([2]–[5]). Έτσι, προς επίτευξη αντιβακτηριακής δράσης ενός υλικού, το ενδιαφέρον της επιστημονικής και τεχνολογικής κοινότητας, έχει στραφεί στην τροποποίηση των επιφανειακών χαρακτηριστικών του, χωρίς παρεμβατική διάθεση στο σύνολο του όγκου του και τις δομικές του ιδιότητες. Η προσέγγιση αυτή στηρίζεται στη βασική λογική ότι μεταβάλλοντας τα επιφανειακά χαρακτηριστικά του υλικού, όπως είναι το επιφανειακό του φορτίο, η χημεία και η τοπογραφία του, ακυρώνεται στο αρχικό της στάδιο η βακτηριακή προσκόλληση και πολλαπλασιασμός του βακτηριακού πληθυσμού, εμποδίζοντας με αυτό τον τρόπο τον οποιοδήποτε μετέπειτα αποικισμό.

Οι μικροοργανισμοί αποτελούν την παλαιότερη μορφή ζωής στον πλανήτη και ως τέτοιοι, έχουν αναπτύξει μια πλειάδα μηχανισμών που τους καθιστούν ανθεκτικούς και ευπροσάρμοστους σε ποικίλα περιβάλλοντα. Το γεγονός αυτό τους προσδίδει το πλεονέκτημα να αποικίζουν διαφόρων ειδών επιφάνειες, διαμορφώνοντας βιοφίλμ που δυσχεραίνουν τη λειτουργία της εκάστοτε επιφάνειας. Συγκεκριμένα, ο σχηματισμός βιοφίλμ πραγματοποιείται σταδιακά και σηματοδοτεί την εξάπλωσή τους και την κατάληψη της επιφάνειας. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.1, ξεκινάει με την αρχική προσκόλληση (*initial attachment*) των ελεύθερα κινούμενων μικροοργανισμών στην επιφάνεια, οφειλόμενη σε ασθενείς δυνάμεις Van der Waals. Ακολουθείται από τη μη αναστρέψιμη προσκόλλησή τους (*irreversible attachment*), όπου δεν μπορούν να απομακρυνθούν με απλό ξέπλυμα, αλλά παραμένουν μόνιμα προσδεδεμένα στην επιφάνεια. Κατά τις δύο φάσεις ωρίμανσής τους (*maturation I & II*), πραγματοποιείται

κυτταρική διαίρεση και σχηματισμός μικροαποικιών, με παράλληλη παραγωγή εξωκυττάρων πολυμερικών ουσιών (extracellular polymeric substances-EPSs), αποτελούμενων κυρίως από πολυσακχαρίτες, που παρέχουν τη μήτρα για το βιοφίλμ. Στο τελικό στάδιο, όπου έχει πλέον θεμελιωθεί πλήρως η σύσταση του βιοφίλμ, πραγματοποιείται διασπορά βακτηριακών αποικιών (*dispersion*), που επιτρέπει την εξάπλωση και τον αποικισμό νέων επιφανειών, μεταβάλλοντας μόνο σε μέγεθος και σχήμα το βιοφίλμ.



Εικόνα 1.1: Πέντε στάδια σχηματισμού βιοφίλμ βακτηρίων: (1) Αρχική προσκόλληση, (2) Μη αναστρέψιμη προσκόλληση, (3) Ωρίμανση I, (4) Ωρίμανση II, και (5) Διασπορά.

Μετά το σχηματισμό βιοφίλμ, τα βακτήρια προστατεύονται από τη δημιουργούμενη μήτρα, όπως θα αναλυθεί στην παραγραφο 1.3, γεγονός που καθιστά αισθητά δυσκολότερη την καταπολέμησή τους. Ως εκ τούτου, η στροφή προς την παρασκευή αντιβακτηριακών επιφανειών προκύπτει ως αδήριτη ανάγκη για την αποφυγή μόλυνσης επιφανειών, που χρησιμοποιούνται σε τομείς όπου είναι απαραίτητη η εξασφάλιση όσο το δυνατόν καλύτερα αποστειρωμένων συνθηκών.

Χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί ο τομέας υγείας, με την ανάγκη μολυσματικής προστασίας να επεκτείνεται σε μια πληθώρα τεχνικών, χώρων, συσκευών και εργαλείων. Στον κλάδο των εμφυτεύσεων για παράδειγμα (ορθοπεδική προσθετική, καρδιακές βαλβίδες), η πιθανότητα δημιουργίας βιοφίλμ στο εμφύτευμα, αν δεν παρεμποδίσει την εξαρχής ενσωμάτωσή του στον ιστό, επιβαρύνει τη μετέπειτα λειτουργικότητά του, οδηγώντας σε σταδιακή χαλάρωσή του από το συνδετικό ιστό

και πρόκληση μολύνσεων επιβαρυντικών για την ανθρώπινη υγεία [6]. Είναι χαρακτηριστικό, ότι μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, το 10% των ασθενών που έχουν υποβληθεί σε προσθετικές οργάνων, έχουν προσβληθεί από μολυσματική ασθένεια, με απόλυτο αριθμό προσεγγιστικά στο 100 000 αυτών, να έχουν οδηγηθεί σε θάνατο[7], [8]. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται και σε νοσοκομειακούς χώρους, όπου λόγω συγκέντρωσης πολλών ασθενών ελλοχεύουν κίνδυνοι βακτηριακών μολύνσεων τόσο στις διάφορες επιφάνειες επαφής, όσο και στον ιατρικό εξοπλισμό, όπως είναι για παράδειγμα τα διάφορα χειρουργικά εργαλεία, οι αρτηριακοί καθετήρες και οι υπόλοιπες ιατρικές συσκευές. Η ανάπτυξη της βιοαναοτεχνολογίας έχει εισαγάγει μεθόδους διάγνωσης και πρόληψης ασθενειών με τη χρήση βιοαισθητήρων, καθώς και εν δυνάμει μεθόδων θεραπείας, με την εφαρμογή τεχνικών όπως η έγχυση φαρμάκων (drug delivery). Στις περιπτώσεις αυτές, είναι εξίσου σημαντική η διασφάλιση προστασίας από βακτηριακές προσβολές, οι οποίες θα ανέστρεφαν τη δράση των θεραπευτικών τεχνικών. Ο τομέας της υγείας, ως άμεσα σχετιζόμενος με τον άνθρωπο, εστιάζει ένα πολύ μεγάλο, αν όχι το μεγαλύτερο μέρος του επιστημονικού ενδιαφέροντος για την κατασκευή αντιβακτηριακών επιφανειών, λόγω ακριβώς και του μεγάλου αριθμού εφαρμογών στον ιατρικό κλάδο.

Εκτός αυτού όμως, υπάρχουν κι άλλοι κλάδοι, έμμεσα σχετιζόμενοι με την ανθρώπινη υγεία, επιρρεπείς σε βακτηριακές μολύνσεις. Οι συσκευασίες τροφίμων χρειάζεται να είναι αντιβακτηριακές, ώστε να αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων στην επιφάνεια των τροφίμων. Συνθήκες αποστείρωσης απαιτούνται αντίστοιχα και στις βιομηχανίες παρασκευής, κατεργασίας ή απλής συσκευασίας προϊόντων που χρειάζεται να παραμείνουν ανεπηρέαστα από μολυσματικές εστίες. Ενδεικτικά, αναφέρουμε τις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και υφασμάτων, δηλαδή προϊόντων που προορίζονται για άμεση χρήση και κατανάλωση από τον άνθρωπο. Σε μεγαλύτερο βαθμό εκτεθειμένες είναι οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με περιβάλλοντα, όπου ευδοκιμούν πολλοί μικροοργανισμοί, όπως είναι οι αγωγοί πετρελαίου και οι επιφάνειες πλοίων. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο σχηματισμός βιοφίλμ βακτηρίων, εκτός του ότι δυσχεραίνει τη λειτουργικότητα των επιφανειών, προκαλώντας για παράδειγμα διαβρώσεις των μεταλλικών επιφανειών, απαιτεί κατανάλωση μεγαλύτερων ποσών ενέργειας. Το ίδιο ισχύει και για επιφάνειες ερχόμενες σε επαφή με το νερό, όπως οι δεξαμενές φύλαξης του ή οι σωλήνες μεταφοράς του, που είναι απαραίτητο να εμφανίζουν αντιρρυπαντικές ιδιότητες προκειμένου να διασφαλίζεται η καθαρότητα

του πόσιμου νερού. Με 780 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως να συνεχίζουν να στερούνται πρόσβαση σε καθαρές πηγές νερού [9], είναι μεγάλης σημασίας η αποφυγή μολύνσεώς του. Από όλα τα παραπάνω, δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι ένας ευρύς κατασκευαστικός κλάδος που άπτεται της βιομηχανικής παραγωγής και κατεργασίας, είναι αφοσιωμένος στην εξασφάλιση αντιβακτηριακών επιφανειών.

1.1 Διάκριση αντιβακτηριακών επιφανειών

Ως αντιβακτηριακές ορίζονται οι επιφάνειες που έχουν τη δυνατότητα να περιορίζουν το βαθμό προσκόλλησης και ανάπτυξης των βακτηρίων που έρχονται σε επαφή με αυτές [10]. Ανάλογα με τον τρόπο επίδρασής τους στα βακτήρια, διακρίνονται σε *αντιρρυπαντικές* ή διαφορετικά, *μη προσκολλητικές*, και σε *βακτηριοκτόνες* [10], [11], [12]. Συγκεκριμένα, οι αντιρρυπαντικές επιφάνειες κυρίως μέσω εξασφάλισης δυσμενών συνθηκών, κατορθώνουν να απωθούν τα βακτήρια, μη επιτρέποντάς τους να προσκολληθούν, ενώ οι βακτηριοκτόνες έχουν την ικανότητα να τα εξουδετερώνουν, προσβάλλοντας την κυτταρική τους μεμβράνη και απενεργοποιώντας ζωτικές τους λειτουργίες [10]. Η διάκριση αυτή, δεν αποκλείει τη συνδυαστική έκφραση τόσο της μη προσκολλητικής όσο και της βακτηριοκτόνου ιδιότητας. Αντιθέτως, είναι επιθυμητή για την απόδοση μιας ολοκληρωμένης αντιβακτηριακής δράσης.

Παρά την αξιοσημείωτη ανάπτυξη των τελευταίων δεκαετιών στον τομέα της νανοβιοτεχνολογίας και τις τεχνικές μικρο-νανοκατεργασίας επιφανειών, σημειώνεται μια διαρκής αναζήτηση νέων μεθόδων παραγωγής αντιβακτηριακών επιφανειών, οι οποίες αποτελούν πλέον αντιπροσωπευτικό παράδειγμα εξελιγμένων βιοϋλικών. Έτσι, ανεξαρτήτως του είδους της αντιβακτηριακής επιφάνειας, εντοπίζονται δύο βασικές κατηγορίες τεχνικών παρασκευής και κατεργασίας τους, η *επιφανειακή εναπόθεση* και η *επιφανειακή τροποποίηση* [13]. Κατά την επιφανειακή εναπόθεση, πραγματοποιείται προσθήκη αντιβακτηριακών παραγόντων, χωρίς να μεταβάλλεται η υπάρχουσα χημική σύσταση και τοπογραφία της επιφάνειας, εν αντιθέσει προς την επιφανειακή τροποποίηση όπου μέσω χημικών αντιδράσεων και κατεργασίας, αποδίδονται

επιθυμητές χημικές ομάδες, φορτίο και τοπογραφία στην επιφάνεια. Ιδιαίτερα η επιφανειακή τροποποίηση επιτυγχάνεται βάσει δύο προσεγγίσεων, μιας χημικής και μιας φυσικής [10]. Όπως προδίδεται από τον ίδιο το χαρακτηρισμό κάθε προσέγγισης, η χημική έγκειται στην τροποποίηση της χημείας της επιφάνειας του υποστρώματος, με τη δημιουργία ενεργών ριζών, τη σύναψη δεσμών, και την ενσωμάτωση αντιβακτηριακών παραγόντων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα διεργασιών, τον πολυμερισμό με επιφανειακή απόθεση (surface polymerization), την παραγοντοποίηση (surface derivatization) και την προσθήκη λειτουργικών ομάδων (surface functionalisation). Ως προς τη φυσική προσέγγιση, εστιάζεται στην κατεργασία της τοπογραφίας και της γεωμετρίας της επιφάνειας ή στη μηχανική της επεξεργασία. Κι εδώ, εμφανίζεται η δυνατότητα ταυτόχρονης χημικής και φυσικής επιφανειακής τροποποίησης προς απόκτηση αντιβακτηριακών ιδιοτήτων.

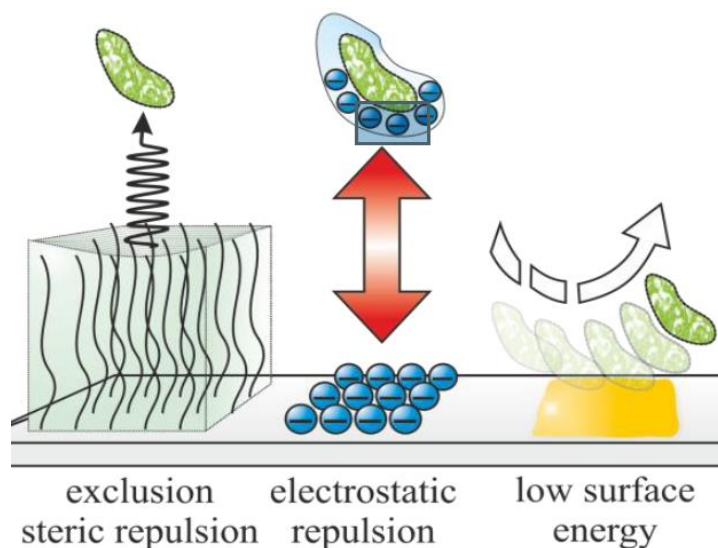
Οι παραπάνω τεχνικές κατεργασίας αντιβακτηριακών επιφανειών, απαντώνται τόσο σε μη προσκολλητικές όσο και σε βακτηριοκτόνες επιφάνειες, με τους παράγοντες που προσδίδουν την αντιβακτηριακή δράση, να εκτείνονται σε βιοκτόνα, μέταλλα, οξειδία μετάλλων, νανοσωματίδια, σύμπλοκα, πολυμερή, επιστρώσεις με οποιονδήποτε από τους προαναφερόμενους παράγοντες ή και με συνδυασμό τους, καθώς και κατάλληλη τοπογραφία.

Στις παραγράφους που ακολουθούν, πραγματοποιείται βιβλιογραφική επισκόπηση των ευρύτερα χρησιμοποιούμενων μεθόδων κατασκευής αυτών των δύο βασικών ειδών αντιβακτηριακών επιφανειών, εστιάζοντας περισσότερο σε επιφάνειες που συνδυάζουν και τις δύο ιδιότητες, δεδομένου ότι αυτή είναι η επιδίωξη της παρούσας εργασίας. Παρά το ότι, όπως θα δούμε και στο Κεφάλαιο 3, τα πειράματά μας πραγματοποιήθηκαν σε πολυμερικές επιφάνειες, οι τεχνικές που θα αναλυθούν αφορούν σε υποστρώματα διαφόρων υλικών, προς εξερεύνηση ενδεχόμενων μελλοντικών προοπτικών.

1.2 Μη προσκολλητικές αντιβακτηριακές επιφάνειες

Βασικό στάδιο της αντιβακτηριακής δράσης μιας επιφάνειας είναι η εξαρχής αποτροπή της προσκόλλησης των βακτηρίων, με αποτέλεσμα μεγάλο τμήμα της βιβλιογραφίας να είναι εστιασμένο σε μεθόδους κατασκευής μη προσκολλητικών επιφανειών. Η κατανόηση των παραγόντων από τους οποίους εξαρτάται η προσκόλληση των βακτηρίων και ο μετέπειτα σχηματισμός βιοφίλμ είναι απαραίτητη ώστε οι επιφάνειες να κατεργάζονται με τέτοιο τρόπο ώστε να παρεμποδίζεται η εκδήλωσή τους. Πρόκειται για παράγοντες σχετιζόμενους με τη φυσική και χημική σύσταση τόσο της επιφάνειας, όσο και του ίδιου του μικροοργανισμού και αφορούν συγκεκριμένα στη χημεία της επιφάνειας του υποστρώματος, το φορτίο της, τη μικρο και νανοδόμησή της, αλλά και το φορτίο της κυτταρικής μεμβράνης του βακτηρίου, τη μοριακή και χημική της σύνθεση, με την ύπαρξη ή μη για παράδειγμα ορισμένων πολυσακχαριτών [14].

Όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 1.2, εντοπίζονται τρεις βασικοί μηχανισμοί μη προσκολλητικής δράσης των επιφανειών. Ο πρώτος αφορά κύρια στις πολυμερικές επικαλύψεις, όπου η δημιουργία παχέος και πυκνού πολυμερικού φιλμ, παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση των βακτηρίων με το υποκείμενο υπόστρωμα. Το φαινόμενο οφείλεται σε στερική απόθηση, καθώς το μεγάλο μοριακό βάρος του πολυμερούς εμποδίζει την προσέγγιση των βακτηρίων και τη σύναψη δεσμών, λόγω της έντονης άπωσης που εμφανίζεται κατά την αλληλεπικάλυψη των ηλεκτρονιακών νεφών μεταξύ των μορίων του πολυμερούς και των βακτηρίων [15]. Συνεχίζουμε με το δεύτερο μηχανισμό δράσης, σύμφωνα με τον οποίο η επιφάνεια του υλικού φορτίζεται αρνητικά, ώστε να απωθεί ηλεκτροστατικά την υπό φυσιολογικές συνθήκες ($\text{pH} \approx 7$) αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των βακτηρίων λόγω των φέρουσων θειούχων και καρβοξυλικών ομάδων της [16]. Ως τελευταίος μηχανισμός δράσης, παρατίθεται η επικάλυψη της επιφάνειας με φιλμ χαμηλής επιφανειακής ενέργειας, ώστε να εξασφαλίζεται ασθενής αλληλεπίδραση με τα βακτήρια, τα οποία με αυτό τον τρόπο θα διαφεύγουν της επιφάνειας.



Εικόνα 1.2: Βασικοί μηχανισμοί μη προσκολλητικής προς τα βακτήρια δράσης επιφανειών [17].

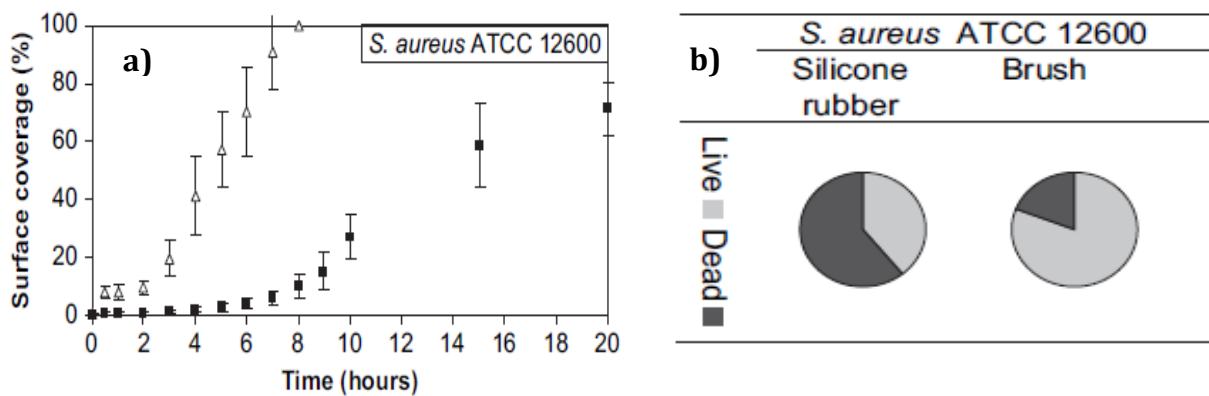
Η πλειοψηφία των μεθόδων καταστολής της βακτηριακής προσκόλλησης περιλαμβάνει τη δημιουργία πολυμερικών επικαλύψεων, συνηθέστερα από πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (poly(ethylene glycol)-PEG) [18] ή από συμπολυμερή της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) συνδεδεμένης με πολυ(αιθυλενοϊμίνη) (poly(ethylene imine)-PEI), οξείδιο πολυπροπυλενίου (poly(propylene oxide)-PPO) ή διάφορα βιολογικά πολυμερή, όπως είναι η πολυ L-λυσίνη (poly(L-lysine)) [19].

Συγκεκριμένα, οι Holmberg et al. [20] μελέτησαν την επίδραση του συμπολυμερούς πολυ(αιθυλενογλυκόλης)/πολυ(αιθυλενοϊαμίνης) (PEG/PEI), στο Gram-positive βακτήριο *Streptococcus mutans*, κατά την εναπόθεσή του σε πολυστυρενική επιφάνεια. Μετά από μίας ώρας επώαση του βακτηριακού στελέχους στις επιφάνειες, μετρήθηκε η προσκόλληση του ραδιοσημασμένου πληθυσμού μειωμένη κατά περίπου 90% συγκριτικά με την ακατέργαστη επιφάνεια. Η επιτυχία στην αποτροπή της προσκόλλησης των βακτηρίων στα κατεργασμένα τοιχώματα πολυστυρενίου, αποδίδεται στον πρώτο μηχανισμό αποθητικής δράσης, καθώς το παχύ στρώμα των αλυσίδων του σύμπλοκου πολυ(αιθυλενογλυκόλης)/ πολυ(αιθυλενοϊμίνης) (PEG/PEI), ήταν αποτρεπτικό για την προσέγγιση των βακτηρίων στο υποκείμενο υπόστρωμα.

Οι Park et al. [21] ανέδειξαν το βασικό μηχανισμό δράσης της πολυ(αιθυλενογλυκόλης), εναποθέτοντάς τη σε διαφορετικά μοριακά βάρη πάνω σε υπόστρωμα πολυουρεθάνης και μελετώντας δύο βακτηριακά στελέχη, τα *Escherichia coli* και *Staphylococcus epidermidis*. Αποδείχτηκε από κοινού ότι η απωθητική δράση της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) αυξανόταν όσο μεγαλύτερο ήταν το μοριακό βάρος των εναποτιθέμενων μορίων της, καθώς η στερική απώθηση εντεινόταν.

Λίγα χρόνια μετά, οι Norde et al. [22], χρησιμοποιώντας αντιπροσωπευτικά στελέχη Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*) και Gram-positive (*Staphylococcus epidermidis*) βακτηρίων, επιβεβαίωσαν την εξάρτηση του βαθμού προσκόλλησής τους από το μοριακό βάρος των αλυσίδων πολυ(αιθυλενογλυκόλης), παρουσιάζοντας ότι όσο μεγαλύτερο ήταν το μήκος των αλυσίδων, τόσο ισχυρότερη ήταν η αντίσταση που προβαλλόταν στην προσέγγιση των βακτηρίων στο υπόστρωμα.

Οι Nejadnik et al. [23] ασχολήθηκαν με το ενδεχόμενο σχηματισμού βιοφίλμ από το ποσοστό του αρχικού βακτηριακού πληθυσμού που παραμένει προσκολλημένο σε επικαλύψεις πολυ(αιθυλενογλυκόλης). Χρησιμοποίησαν φύλλα σιλικόνης, τα οποία κάλυψαν με παχύ φιλμ του συμπολυμερούς οξειδίου πολυαιθυλενίου-οξειδίου πολυπροπυλενίου-οξειδίου πολυαιθυλενίου (PEO₉₉-PPO₆₅-PEO₉₉), και τα μελέτησαν ενάντια σε τρία βακτηριακά στελέχη, δύο Gram-positive, το *Staphylococcus aureus* και το *Staphylococcus epidermidis* κι ένα Gram-negative, το *Pseudomonas aeruginosa*. Για αρχική συγκέντρωση 3×10^8 cfu/mL, ενώ παρατηρήθηκε 10πλάσια μείωση της αρχικής βακτηριακής προσκόλλησης των στελεχών *Staphylococcus* στα πρώτα 30 λεπτά, συγκριτικά με τα ακατέργαστα φύλλα σιλικόνης, ο πληθυσμός που παρέμεινε ήταν αρκετός για να αναπτυχθεί βιοφίλμ μετά από 20 ώρες επώασης (Εικόνα 1.3). Διαφοροποίηση παρατηρήθηκε ως προς το ότι, αν και η βακτηριακή κάλυψη ήταν σχεδόν διπλάσια στις πολυμερικές επιστρώσεις, ήταν εμφανής η καθυστέρηση στην ανάπτυξή τους και η μεγαλύτερη ευκολία αποκόλλησής τους με άσκηση διατημητικής τάσης, γεγονός που σηματοδοτεί την ασθενή αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τις πολυμερικές αλυσίδες. Το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* παρουσίασε παρεμφερή προσκόλληση και βιωσιμότητα σε κατεργασμένα και μη φύλλα αλουμινίου.



Εικόνα 1.3: a) Ποσοστιαία επιφανειακή κάλυψη και b) βιωσιμότητα *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 σε ακατέργαστα (Δ - Silicone rubber) και επικαλυμένα με το συμπολυμερές οξείδιο πολυαιθυλενίου-οξείδιο πολυπροπυλενίου-οξείδιο πολυαιθυλενίου (PEO₉₉-PPO₆₅-PEO₉₉) (■ - Brush) φύλλα σιλικόνης, έως και 20 ώρες ανάπτυξής τους, όπως μελετήθηκε από τους Nejadnik et al.

Σημαντικές εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί με την ενσωμάτωση συμπολυμερών της πολυ(αιθυλενογλυκόλης) με βιολογικά πολυμερή. Χαρακτηριστικά, οι Harris et al. [24] χρησιμοποίησαν πολυ(L-λυσίνη) (poly(L-lysine)-PLL), η οποία συνδεδεμένη με πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) (PLL-g-PEG)) εναποτέθηκε σε επιφάνειες τιτανίου, σημειώνοντας 89-93% μείωση στον πληθυσμό του *Staphylococcus aureus*.

Εκτός όμως από την πολυ(αιθυλενογλυκόλη), βιολογικά πολυμερή έχουν χρησιμοποιηθεί μεμονωμένα για τη δημιουργία μη προσκολλητικών αντιβακτηριακών επικαλύψεων, όπως για παράδειγμα ορισμένες πρωτεΐνες και πολυσακχαρίτες. Ενδεικτικά, αποδεδειγμένη είναι η δράση των πρωτεϊνών ηπαρίνη και αλβουμίνη [25] με την τελευταία να διατηρεί τις ιδιότητές της έως και είκοσι ημέρες από την εναπόθεσή της σε υπόστρωμα καλυμένο με διοξείδιο του τιτανίου (TiO₂) [26]. Παρόμοια, πολυσακχαρίτες όπως το υαλουρονικό οξύ και η δεξτράνη, έχει δειχθεί ότι αναστέλλουν το σχηματισμό βιοφίλμ από τα βακτήρια *Staphylococcus epidermidis* και *Escherichia coli* ([26], [27], [28]).

Πιο αναλυτικά, οι Gadenne et al. [16] χρησιμοποίησαν υδατοδιαλυτούς θειωμένους πολυσακχαρίτες *ulvans*, παραγόμενους από πράσινα θαλάσσια φύκη προς εναπόθεση σε επιφάνειες τιτανίου, για να μελετήσουν την ικανότητά τους να απωθούν τα στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* και *Staphylococcus epidermidis*. Η ακινητοποίηση των πολυσακχαριτών στις επιφάνειες, όχι μόνο μείωσε την αρχική βακτηριακή προσκόλληση στα πρώτα 90 λεπτά κατά περίπου 96%, αλλά εξασφάλισε τη μετέπειτα αντιβακτηριακή δράση των επιφανειών για χρονική διάρκεια 24 ωρών, μειώνοντας το ποσοστό της επιφανειακής κάλυψης του *Pseudomonas aeruginosa* περίπου στο 5% και το ποσοστό προσκόλλησης του *Staphylococcus epidermidis* στο 85%. Η ικανότητα των πολυσακχαριτών να παρεμποδίζουν την βακτηριακή προσκόλληση, αποδίδεται στο αρνητικό φορτίο των φέρουσων θειούχων και καρβοξυλικών ομάδων, το οποίο λειτουργεί απωθητικά προς την υπό φυσιολογικές συνθήκες ($\text{pH} \approx 7$) αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια των βακτηρίων [29].

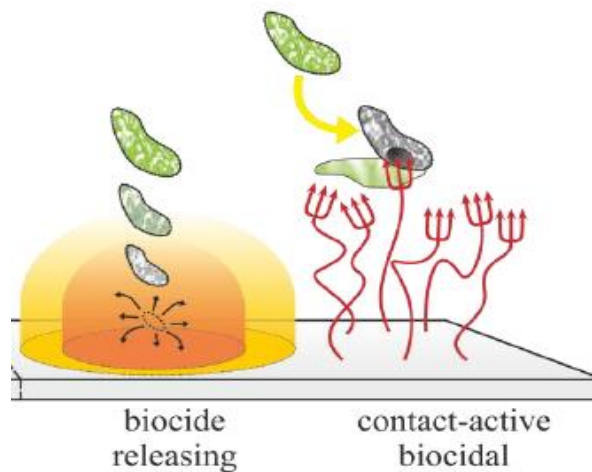
Νανοεπικαλύψεις με χρήση βιολογικών πολυηλεκτρολυτών, όπως είναι η χιτοζάνη, αποτελούν επίσης μια υποσχόμενη μέθοδο για την αντιβακτηριακή θωράκιση επιφανειών. Ιδιαίτερα δημοφιλής είναι η Layer-by-Layer (LbL) τεχνική για την παρασκευή πολυστρωματικών νανοεπικαλύψεων από πολυηλεκτρολύτες ([30],[31]), κατά την οποία πραγματοποιείται εναλλασσόμενη παράθεση αντίθετα φορτισμένων πολυηλεκτρολυτών, έως σχηματισμού του επιθυμητού αριθμού στρωμάτων στην επικάλυψη. Έτσι, οι Bulwan et al. [14] χρησιμοποιώντας θετικά και αρνητικά παράγωγα χιτοζάνης, διαμόρφωσαν με τη LbL τεχνική δέκα διπλοστοιβάδες φιλμ χιτοζάνης πάνω σε υποστρώματα γυαλιού και πυριτίου, το οποίο έλεγξαν ως προς τη μη προσκολλητική του συμπεριφορά απέναντι στο βακτήριο *Staphylococcus aureus* 7187. Μετά από 24-ωρη μελέτη του πληθυσμού, αποδείχτηκε σημαντική μείωσή του, οφειλόμενη τόσο στην αρνητικά φορτισμένη τελευταία στοιβάδα του φιλμ, όσο και στο ικανό του πάχος (≈ 20 nm) για την απόθεση των βακτηρίων.

Συνθετικοί πολυηλεκτρολύτες αποτελούμενοι από πολυ(υδροχλωρική αλλυλαμίνη) (poly(allylamine hydrochloride)-PAH) και πολυ(ακρυλικό οξύ) (poly(acrylic acid)-PAA) αποτελούν επίσης συστατικά πολυστρωματικών νανοεπικαλύψεων, με μη προσκολλητικές αντιβακτηριακές ιδιότητες αυξανόμενες, όσο μικρότερη είναι η μηχανική ακαμψία του δημιουργούμενου φιλμ [32].

1.3 Βακτηριοκτόνες επιφάνειες

Παρά τη βαρύνουσα σημασία αποτροπής της αρχικής βακτηριακής προσκόλλησης, έχει αποδειχτεί (Nejadnik et al. [23]) ότι ακόμη κι ένα μικρό ποσοστό πληθυσμού επαρκεί για το μετέπειτα σχηματισμό βιοφίλμ πάνω στην επιφάνεια. Κατά τη δημιουργία βιοφίλμ, τα βακτηριακά κύτταρα γίνονται περίπου 1 000 φορές περισσότερο ανθεκτικά σε ένα μεγάλο αριθμό αντιβακτηριακών μεθόδων [33], δυσχεραίνοντας σημαντικά τις δυνατότητες εξάλειψής τους. Κι αυτό γιατί, το ίδιο το βιοφίλμ, προστατεύει τα εγκιβωτισμένα βακτήρια μέσω μεταβολικών διεργασιών και αποτρέπει τη διάχυση των αντιβακτηριακών παραγόντων εντός των βακτηριακών κυττάρων [34]. Επιπλέον, πραγματοποιείται ανταλλαγή αντιβιοτικών γονιδίων μεταξύ των βακτηρίων στα πλαίσια του βιοφίλμ, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο πολυανθεκτικά βακτήρια [35], ενώ αρκεί η έκκριση ορισμένων τοξινών για τη διάδοση μολύνσεων [36]. Συμπεραίνουμε λοιπόν, την αναγκαιότητα εξόντωσης των βακτηρίων πριν να προλάβουν να αναπτυχθούν σε ανθεκτικό βιοφίλμ.

Διακρίνονται δύο γενικοί μηχανισμοί δράσης των επιφανειών για την εξουδετέρωση των βακτηρίων, όπως απεικονίζονται στην Εικόνα 1.4, που σχετίζονται με τον τρόπο δράσης του βιοκτόνου. Σύμφωνα με τον πρώτο, ο αντιβακτηριακός παράγοντας απελευθερώνεται σταδιακά από την επιφάνεια του υλικού, ενώ στη δεύτερη περίπτωση, παραμένει προσκολλημένος στην επιφάνεια και δρα εξ'επαφής κατά την προσέγγιση των βακτηρίων.



Εικόνα 1.4: Βασικοί μηχανισμοί δράσης των επιφανειών για την εξουδετέρωση των βακτηρίων [17].

Μια από τις παλαιότερες προσεγγίσεις για την εξασφάλιση βακτηριοκτόνου δράσης μιας επιφάνειας είναι η ενσωμάτωση αντιβιοτικών, εξειδικευμένων κάθε φορά ως προς το είδος του βακτηρίου που επιδιώκεται προστασία. Συναντάται κυρίως σε επιφάνειες εμφυτευμάτων, όπως είναι τα οξείδια μετάλλων ([37], [38], [39]). Ορισμένες τεχνικές περιλαμβάνουν την πρόσδεση ή τον πολυμερισμό του αντιβιοτικού πάνω στην επιφάνεια, με πρόσφατη εργασία των Schneider et al. [40] που παρουσιάζει την αντιβακτηριακή δράση της διϋδροχλωρικής οκτενιδίνης (Octenidine dihydrochloride-OCT) πάνω σε πολυμερικές επιφάνειες τραχειοστομίας ενάντια στα στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa*. Με το ίδιο αντιβιοτικό οι Matl et al. [41] επικάλυψαν χειρουργικά ράμματα από πολυ(γλυκολικό οξύ) (poly(glycolic acid-PGA) προς αποδεδειγμένη μείωση της πιθανότητας μόλυνσης, ενώ οι Anseth et al. ([37], [38]) πολυμέρισαν την βανκομυκίνη, συνδέοντάς τη με ακρυλική πολυ(αιθυλενογλυκόλη) (PEG-acrylate).

Προς ελεγχόμενη απελευθέρωση του αντιβιοτικού στην απαιτούμενη συγκέντρωση και επιμήκυνση του χρόνου δράσης του, πραγματοποιείται συνηθέστερα ενσωμάτωσή του σε επικαλύψεις [42], με απαραίτητη προϋπόθεση να εξασφαλίζεται η συμβατότητα μεταξύ αντιβιοτικού και επικάλυψης [43]. Από ένα ευρύ φάσμα πολυμερικών φορέων, όπως πολυ(γαλακτικό-συν-γλυκολικό οξύ) (PLGA), πολυ(μεθακρυλικός

μεθυλεστέρας) (PMMA) και διάφορα βιοενεργά κεραμικά, ο υδροξυαπατίτης (HA) χρησιμοποιείται συχνότερα, με τους Kim et al. [44] να τον χρησιμοποιούν για την ενσωμάτωση υδροχλωρικής τετρακυκλίνης, ενός αντιβιοτικού αποτελεσματικού ενάντια σε Gram-negative και Gram-positive βακτήρια. Εναλλακτικά, ως φορείς αντιβιοτικών έχουν χρησιμοποιηθεί επικαλύψεις από πολυηλεκτρολύτες, όπου ο αριθμός των εναποτιθέμενων στρώσεων φιλμ συμβάλλει στο ρυθμό με τον οποίο απελευθερώνεται το αντιβιοτικό [45].

Από τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι προκειμένου να επιτευχθεί αποτελεσματική δράση ενός αντιβιοτικού για παρατεταμένο χρονικό διάστημα, χρειάζεται να συνδυάζονται αρκετοί παράγοντες που αφορούν είτε στη χημική σύσταση και το μήκος της αλυσίδας του πολυμερικού φορέα στον οποίο προσδένεται το αντιβιοτικό ή στη συμβατότητα και την αρχιτεκτονική του φιλμ επικάλυψης. Επιπλέον, ως προς το μηχανισμό δράσης των αντιβιοτικών, παρουσιάζεται ανεπαρκής απέναντι στα βακτήρια που έχουν σχηματίσει βιοφίλμ, καθώς εκτός του ότι συνήθως δεν κατορθώνουν να φθάσουν σε αυτά [46], καταστέλλουν κυρίως τις ενεργές κυτταρικές τους λειτουργίες, που δίνει τη δυνατότητα επιβίωσης ενός βραδέως αναπτυσσόμενου και υποσιτιζόμενου βακτηριακού πληθυσμού [47]. Σε κάθε περίπτωση, η γρήγορη εξάντληση και η ανάγκη συχνής ανατροφοδότησης, δεν καθιστά τη χρήση αντιβιοτικών ιδανική μέθοδο μακροχρόνιας καταπολέμησης βακτηρίων.

Δεδομένων των παραπάνω, πολλές μελέτες έχουν στραφεί στη χρήση μετάλλων, είτε οξειδίων μετάλλων ως αντιβακτηριακών παραγόντων, που εξασφαλίζουν μεγαλύτερη βεβαιότητα ως προς την επιτυχή δράση τους και παρουσιάζουν αποτελεσματικότητα προς ευρύτερο φάσμα βακτηρίων. Ο άργυρος (Ag) αποτελεί το εκτενέστερα χρησιμοποιούμενο μέταλλο με βακτηριοκτόνο δράση σε μια πληθώρα βακτηριακών στελεχών, που περιλαμβάνουν τόσο gram-positive, όσο και gram-negative βακτήρια, όπως για παράδειγμα *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, και *Klebsiella pneumoniae* ([48], [49]). Παρουσιάζει μεγάλο αριθμό εφαρμογών σε ιατρικές συσκευές [50], υφάσματα [51], καθετήρες [52], επιδέσμους τραύματος [53], φίλτρα καθαρισμού [54] και γενικότερα, ως επικάλυψη σε πολλά υλικά, όπως πολυαμίδια, φιλμ πολυηλεκτρολυτών, υδρογέλες και πολυμερή, στα οποία απαντάται με διάφορες μορφές αλάτων, ιόντων ή νανοσωματιδίων.

Ο μηχανισμός δράσης του αργύρου στηρίζεται κυρίως στη λειτουργία του ιόντος Ag^+ , το οποίο είτε περιέχεται στις περιπτώσεις που εμφανίζεται με τη μορφή αλάτων ή ζεόλιθων, οπότε αρκεί απλά η διάλυσή του (dissolution) (1), είτε απελευθερώνεται μέσω οξειδωτικής διάλυσης (oxidative dissolution) (2) στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται με τη μορφή νανοσωματιδίων, όπως φαίνεται από τις εξισώσεις:



Τα ιόντα αργύρου Ag^+ λόγω της έντονης δραστηριότητάς τους, ενώνονται με τις οργανικές αμίνες, τα φωσφορικά άλατα και κυρίως, τις θειόλες σχηματίζοντας ημιμοιοπολικό δεσμό [55], ενώ παράλληλα, δρουν ως ενδιάμεσος παράγοντας για τη συνένωση μεταξύ θειόλων, προς σχηματισμό μη διασπώμενων συσσωματωμάτων [56]. Τόσο όμως οι θειόλες, όσο και οι υπόλοιπες χημικές ενώσεις (αμίνες και φωσφορικά σύμπλοκα) που στοχοποιούνται από τα ιόντα, αποτελούν συστατικά ζωτικών βιολογικών μορίων των βακτηρίων, όπως είναι το DNA, διάφορα πεπτίδια δεσμευμένα στη μεμβράνη τους ή μέσα στο κύτταρο και ορισμένες βασικές ενώσεις πρωτεϊνών. Με την ένωση επομένως των ιόντων Ag^+ απενεργοποιούνται τα βιολογικά συστήματα που φέρουν τις αντίστοιχες χημικές ενώσεις, καταστέλλοντας με αυτό τον τρόπο τη δράση σημαντικών βακτηριακών ενζύμων ([57], [58]) και τη λειτουργικότητα των νουκλεϊκών, αφού πειραματικά δεδομένα [59] έχουν αποδείξει την απώλεια της ικανότητας του DNA να αντιγράφεται μετά τη σύνδεση ιόντων αργύρου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε αντίθεση με τα αντιβιοτικά, τα ιόντα αργύρου, λόγω έλλειψης επιλεκτικότητας αντιδρούν παράλληλα με κάθε βιολογικό μόριο, προκαλώντας ταυτόχρονη προσβολή του κυτταρικού μεταβολισμού και οδηγώντας σε σίγουρο θάνατο τα βακτήρια [60].

Ένας ακόμη μηχανισμός δράσης των ιόντων Ag^+ για την απενεργοποίηση των βακτηριακών κυττάρων, περιλαμβάνει την υπερβολική παραγωγή ενεργών ενώσεων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species-ROS) που προκαλεί καταστολή των λειτουργιών του κυττάρου ([54], [61]). Η απορύθμιση της παραγωγής ενεργών ενώσεων οξυγόνου προκαλείται από τη συνένωση των ιόντων με ορισμένα ένζυμα, όπως οι υπεροξειδάσες γλουταθειόνης [62] ή κατά την παρεμπόδιση εγγενών βακτηριακών μηχανισμών για τον έλεγχο της κυκλοφορίας των ενώσεων οξυγόνου. Έτσι, η αύξηση της

συγκέντρωσης των ενώσεων αυτών δημιουργεί συνθήκες έντονης τοξικότητας για το βακτήριο, το οποίο τελικά χάνει τη λειτουργικότητά του.

Όπως είναι αναμενόμενο, πολλές είναι οι μελέτες που χρησιμοποιούν τον άργυρο στις διάφορες μορφές του για την παρασκευή αντιβακτηριακών επιφανειών. Οι Rameshbabu et al. [63] εκμεταλλεύονται τη δράση των ιόντων αργύρου, τα ενσωμάτωσαν σε υδροξυαπατίτη (HA) και παρουσίασαν ότι μόλις 0.5% w/w περιεκτικότητα αργύρου ήταν επαρκής για την πλήρη αναστολή της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus*, αρχικής συγκέντρωσης 10^8 cfu/mL μετά το πέρασμα 24 ωρών. Οι Oh et al. [64] απέδειξαν την ανθεκτικότητα της δράσης του αργύρου, όταν για το ίδιο σύστημα AgHA και συγκέντρωση 0.53% w/w αργύρου, η ανάπτυξη του *E. coli* παρεμποδίστηκε για 1 000 ώρες, δηλαδή περίπου για 41 ημέρες. Η επιτυχία στη διατήρηση της αντιβακτηριακής δράσης του αργύρου παρά τη χαμηλή συγκέντρωσή του, οφείλεται σύμφωνα με τους Lim et al. [65] στο γεγονός ότι τα βακτήρια εξουδετερώνονταν μόνο όταν ερχόντουσαν σε επαφή με τα δέσματα στην επιφάνεια ιόντα αργύρου, επιτρέποντας έτσι την ελεγχόμενη απορρόφησή τους.

Οι Lee et al. [66] ασχολήθηκαν με νανοσωματίδια αργύρου ενσωματωμένα σε φιλμ πολλαπλών στρώσεων πολυ(ακρυλαμίδιου) (PAA), το οποίο εναποτέθηκε σε μαγνητικά σφαιρίδια, καθώς και σε απλό γυαλί. Τα φιλμ βρέθηκαν αποτελεσματικά τόσο στο *E. coli* όσο και στο *S. Epidermidis*. Προσπάθειες ενσωμάτωσης νανοσωματιδίων αργύρου έχουν γίνει και σε πολυμερικά φιλμ με ομάδες θειόλης για την ισχυρή πρόσδεση των νανοσωματιδίων, όπως από τους Niskanen et al. [67], επιδιώκοντας επιμήκυνση της αντιβακτηριακής δράσης και περισσότερο περιβαλλοντικά αβλαβείς επιστρώσεις.

Οι An et al. [emulsion polymerization] πραγματοποίησαν *in-situ* παραγωγή νανοσωματιδίων αργύρου σε γαλάκτωμα συμπολυμερούς πολυ(μεθακρυλικού μεθύλιου-στυρένιου) (poly(MMA-co-St)), προς σχηματισμό του πολυμερικού νανოსύνθετου πολυ(μεθακρυλικό μεθύλιο-στυρένιο)/άργυρος (poly(MMA-co-St)/Ag). Η δράση των νανοσωματιδίων μελετήθηκε ενάντια σε gram positive και gram-negative βακτήρια *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, και *P. aeruginosa*, αποδίδοντας περίπου 94% ποσοστό θανάτωσής τους. Τα αποτελέσματα προέκυψαν για 10^6 cfu/mL

αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων και 12-ωρη παραμονή τους με το πολυμερικό νανοσύνθετο, που περιείχε μόλις 2% w/w συγκέντρωση νανοσωματιδίων.

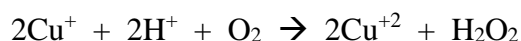
Η θέσπιση του αργύρου ως το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο μέταλλο οδήγησε στην εμφάνιση ανθεκτικότητας στη δράση του από αρκετά βακτηριακά στελέχη [68]. Για το λόγο αυτό, παρουσιάζεται η ανάγκη στροφής και σε άλλα μέταλλα, με το χαλκό να κυριαρχεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία, καθώς αποτελεί αποδεδειγμένα έναν ισχυρό αντιβακτηριακό παράγοντα ενάντια σε μεγάλο εύρος μικροοργανισμών [69]. Η πλειοψηφία των μελετών ([70], [71], [72]) εστιάζει σε στεγνές επιφάνειες χαλκού, όπου εκεί αναδεικνύεται ο έντονα βακτηριοκτόνος χαρακτήρας του, καθώς σε υγρό περιβάλλον είναι περισσότερο ευνοϊκή η ανάπτυξη και αναπαραγωγή των βακτηρίων [73]. Αντιθέτως, σε στεγνές επιφάνειες χαλκού δεν έχει σημειωθεί βακτηριακή ανθεκτικότητα [73].

Συνεπώς, ευρεία εφαρμογή συναντά η χρήση του σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με παθογόνους οργανισμούς, εξαλείφοντας προβλήματα υγιεινής. Συγκεκριμένα, υπάρχει ελπίδα αποφυγής νοσοκομειακών μολύνσεων με τη χρήση κραμάτων χαλκού για την κατασκευή για παράδειγμα, χερουλιών πόρτας, παραθύρων και διακοπών φωτός [70], καθώς και μολυσματικής προστασίας χειρουργικών εργαλείων, ορθοπεδικών επίπλων και γενικότερα εξωτερικών επιφανειών κλινικού εξοπλισμού [74]. Άλλες πιθανές εφαρμογές του αποτελούν οι επιφάνειες καθημερινής χρήσης, όπως γραφεία εργασίας και καρότσια [70], ενώ ήδη χρησιμοποιείται στην κατασκευή νομισμάτων τόσο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όσο και των Ηνωμένων Πολιτειών [70].

Ο μηχανισμός δράσης των μορίων του χαλκού είναι άμεσος από τη στιγμή της επαφής του με τα βακτήρια και εγγυάται την εξόντωσή τους [71]. Η διαδικασία αποδυνάμωσης των βακτηρίων πραγματοποιείται σε δύο στάδια [73]. Κατά το πρώτο, αρκεί η επαφή των μορίων ή των ιόντων του με τα βακτήρια, για να προκληθεί αποσταθεροποίηση της εξωτερικής βακτηριακής τους μεμβράνης που οδηγεί στη ρήξη της και κατά περιπτώσεις, στην παράλληλη δημιουργία οπών στην επιφάνειά της. Η διττή αυτή προσβολή της μεμβράνης τους πραγματοποιείται είτε με την αποδυνάμωση της διαφοράς δυναμικού που εμφανίζει, ενδεικτική του διαφορετικού δυναμικού μεταξύ εσωτερικού και εξωτερικού του βακτηρίου, που την καθιστά με αυτό τον τρόπο περισσότερο διαπερατή στα μόρια ή τα ιόντα χαλκού, είτε με την άμεση απενεργοποίηση δομικών λίθων της, απαραίτητων για τη συντήρηση της μεμβράνης.

Ορισμένα παραδείγματα δομικών λίθων της εξωτερικής μεμβράνης που προσβάλλονται είναι λιποπρωτεΐνες και λιποπολυσακχαρίτες, η καταστολή των οποίων οδηγεί σε απορύθμιση της περιεκτικότητας του εσωτερικού του βακτηρίου σε σημαντικά χημικά στοιχεία για την επίβιώσή του, όπως είναι το νάτριο (Na) και το κάλιο (K).

Κατά το δεύτερο στάδιο δράσης του χαλκού μετά τη διάρρηξη της εξωτερικής μεμβράνης, τα ιόντα του είναι ελεύθερα να εισέλθουν χωρίς περιορισμό προς το εσωτερικό του βακτηρίου. Εκεί, δεσμεύοντας οξυγόνο (O₂) και κατιόν υδρογόνου (H⁺), παράγουν υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂), με το οποίο αντιδρώντας εκ νέου με αντιδράσεις Fenton [75] προκύπτουν ρίζες υδροξυλίου (OH⁻):



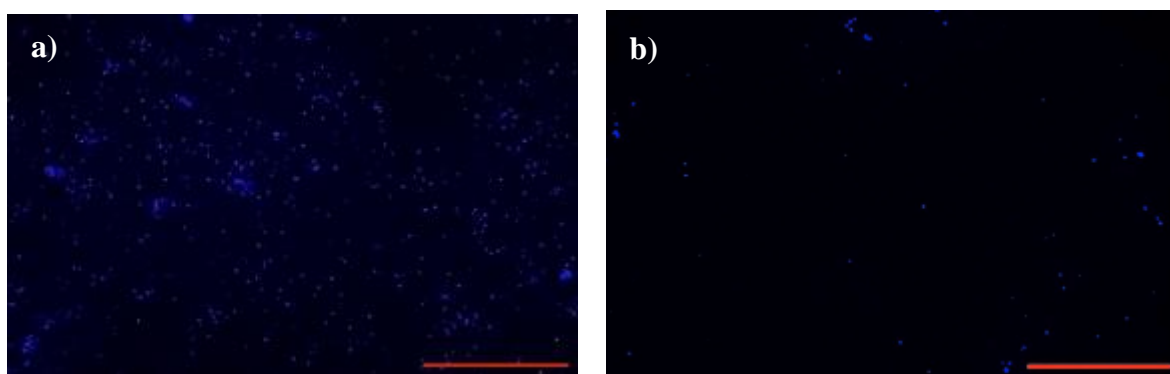
Οι ρίζες υδροξυλίου, ως ιδιαίτερες δραστικές, προκαλούν οξείδωση λιπιδίων και πρωτεϊνών στην εσωτερική μεμβράνη καθώς και το κυτόπλασμα των βακτηρίων, με χαρακτηριστικά παραδείγματα, την κυστεΐνη, βασικό αμινοξύ πολλών πρωτεϊνών και τη γλουταθειόνη. Επιπλέον, η ικανότητά τους να διασπούν σύμπλοκα σιδήρου-θείου (Fe-S) αλλά και να αντιδρούν με σουλφυδρυλικές ομάδες (-SH) ενζύμων και πρωτεϊνών που συμμετέχουν και καταλύουν πολλές από τις βιοχημικές αντιδράσεις που είναι απαραίτητες για την επιβίωση των βακτηρίων, αποδεικνύεται θανατηφόρος [76]:



Με την επαφή συνεπώς του χαλκού με βακτήρια, εκτός της ρήξης της μεμβράνης τους, συντελείται αδρανοποίηση και καταστροφή πρωτεϊνών και ενζύμων τους είτε μέσω οξείδωσης, είτε μέσω άλλων μηχανισμών διάσπασης ομάδων, καθιστώντας τα ανίκανα να παράγουν τροφή και να μεταβολίσουν, με άμεσο επακόλουθο την εξουδετέρωσή τους [73].

Η αμεσότητα της δράσης του χαλκού οδήγησε μεγάλο μέρος της ερευνητικής κοινότητας στη χρησιμοποίησή του ως αντιβακτηριακό παράγοντα. Οι Noyce et al. [77] έδειξαν την πλήρη εξουδετέρωση 10^7 cfu τριών στελεχών του gram-positive βακτηρίου *Staphylococcus aureus* (NCTC 10442, NCTC 11939 και NCTC 13143), κατά την παραμονή τους πάνω σε επιφάνειες χαλκού μετά από 45, 60 και 90 λεπτά, αντίστοιχα. Ο Rensing [78] από το πανεπιστήμιο της Αριζόνα, παρουσίασε την ταχύτατη εξόντωση του gram negative στελέχους *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 πάνω σε διάφορα κράματα χαλκού, αποδεικνύοντας τη δυνατότητα καταπολέμησης βακτηρίων ακόμη και σε υβριδικές επιφάνειες χαλκού.

Συγκεκριμένα με το κράμα ωστενιτικού ανοξείδωτου χάλυβα με χαλκό 317L-Cu SS ασχολήθηκαν οι Sun et al. [74], οι οποίοι απέδειξαν ότι μόλις 4.5% w/w περιεκτικότητα χαλκού, ήταν ικανή για να μειώσει το βακτηριακό πληθυσμό 10^6 cfu/mL του στελέχους *S. aureus* ATCC 25923 έως και 1.4 τάξεις μεγέθους μετά από 5 μέρες παρατήρησης. Τα αποτελέσματα κατά την 5^η ημέρα φαίνονται στην Εικόνα 1.5 που ακολουθεί, όπου τα κύτταρα έχουν σημανθεί με φθορίζουσα χρώση (DAPI) προς καταμέτρηση.



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση βακτηριακού πληθυσμού *S. aureus* ATCC 25923 με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ πάνω σε a) 317L SS και b) 317L-Cu SS μετά από 5 ημέρες.

Δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις όπου χρησιμοποιήθηκαν οξείδια χαλκού, κυρίως με τη μορφή νανοσωματιδίων [79]. Λόγω των πιθανώς χρήσιμων φυσικών ιδιοτήτων του, και της απλότητάς του σε σχέση με τα υπόλοιπα οξείδια, το οξείδιο του χαλκού (I) (CuO) έχει λάβει μεγαλύτερης προσοχής ([80], [81]) με τους Ren et al. [82] να παρασκευάζουν νανοσωματίδια CuO, με χρήση θερμού πλάσματος (*thermal plasma*). Σε εναιώρημα παρουσίασαν Ελάχιστη Βακτηριοκτόνο Συγκέντρωση (Minimum Bactericidal Concentration - MBC) κυμαινόμενη από 100 - 5 000 µg/mL απέναντι σε μεγάλο εύρος παθογόνων συγκέντρωσης της τάξης των 10^7 cfu/mL, συμπεριλαμβάνοντας αρκετά στελέχη *S. aureus*, καθώς και *E. coli* και *P. aeruginosa*.

Εκτός του αργύρου και του χαλκού, που έχουν χρησιμοποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό, άλλα μέταλλα έχουν δοκιμαστεί για τη βακτηριοκτόνο δράση τους, κυρίως με τη μορφή οξειδίων τους, όπως είναι το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO), το διοξείδιο του τιτανίου (TiO₂), το διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) και το οξείδιο του μαγνησίου (MgO) [83].

Συγκεκριμένα, το οξείδιο του ψευδαργύρου παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση εξαρτώμενη από το μέγεθος και τη συγκέντρωση των εμφυτευόμενων νανοσωματιδίων ([84], [85]). Οι Li et al. [86] επικάλυψαν πλαστικά φιλμ πολυουρεθάνης και πολυβινυλοχλωρίδιου (PVC), με νανοσωματίδια ZnO, τα οποία επέδειξαν αποτελεσματική δράση τόσο σε αρνητικά (*E. coli*), όσο και σε θετικά (*S. aureus*) κατά Gram βακτήρια, με τα τελευταία να εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα.

Το διοξείδιο του τιτανίου αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα αντιβακτηριακού παράγοντα που ενεργοποιείται μέσω απορρόφησης στην περιοχή του ορατού ή υπεριώδους [87], με μέγιστο στην περιοχή του εγγύτερου υπεριώδους [83]. Ο μηχανισμός λειτουργίας του στηρίζεται στην παραγωγή ενεργών ομάδων οξυγόνου (Reactive Oxygen Species – ROS) κατά τη φωτοκαταλυτική αντίδραση, οι οποίες είτε προκαλούν άμεση αποδόμηση του βακτηριακού τοιχώματος, είτε έμμεσα εξουδετερώνουν το βακτήριο, αναστέλλοντας τους μηχανισμούς της κυτταρικής αναπνοής του ([88], [89]). Οι L. Caballero et al. [90] απέδειξαν επιτυχή δράση του ενάντια στο *E. coli*, με τους Chung et al. [91] να εστιάζουν στο *S. aureus* και τους Prasad et al. [92] στο Gram-positive *Bacillus anthracis*.

Βασικό του μειονέκτημα είναι το στενό περιθώριο απορρόφησής του, αφού το μέγιστό του εμφανίζεται μόνο στην περιοχή του εγγύτερου υπεριώδους [83]. Για το λόγο αυτό, επιχειρείται η εμφύτευσή του με άλλα μεταλλικά νανοσωματίδια, όπως για παράδειγμα άργυρος, χρυσός, λευκόχρυσος και παλλάδιο, προς διεύρυνση του φάσματος απορρόφησής τους, άρα και της βακτηριοκτόνου δράσης του [83].

Ως μια σχετικά νέα μέθοδος αντιβακτηριακής δράσης αναδεικνύεται η εναπόθεση θετικά φορτισμένων πολυμερικών επικαλύψεων με ενσωματωμένα πολυκατιόντα ή ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου (quaternary ammonium compounds – QACs). Το θετικό φορτίο των φέρουσων ενώσεων, έλκεται από την αρνητικά φορτισμένη βακτηριακή επιφάνεια (παρουσία πρωτεϊνών, φωσφολιπιδίων της εξωτερικής μεμβράνης), διαρρηγνύοντας την εξωτερική και την κυτταροπλασματική μεμβράνη [93]. Οι Kanazawa et al. ([94], [95]) ενσωμάτωσαν φωσφόριο, καθώς και τριτοταγές σουλφόριο [96], ενώ οι Kawabata et al. [97] χρησιμοποίησαν τεταρτοταγές αμμώνιο. Χαρακτηριστικά, οι Gottenbos et al. [98], πραγματοποίησαν ομοιοπολική σύνδεση ενός άλατος τεταρτοταγούς αμμωνίου (3-(τριμεθοξυσιλυλο)-προπυλοδιμεθυλοοκταδεκυλοχλωριούχο αμμώνιο) σε ελαστομερές σιλικόνης (silicone rubber) και στο πλήθος των τελικά προσκολλημένων βακτηρίων, παρατήρησαν ολική θανάτωση του Gram-positive βακτηρίου *S. aureus* και μείωση της βιωσιμότητας των Gram-negative βακτηρίων *E. coli* και *P. aeruginosa* σε 37% και 15%, αντίστοιχα.

1.4 Μικρο-νανοϋφασμένες αντιβακτηριακές επιφάνειες

Μέχρι στιγμής, αναφέρθηκαν μέθοδοι επιφανειακής εναπόθεσης και χημικής επιφανειακής τροποποίησης με την ενσωμάτωση διαφόρων αντιβακτηριακών παραγόντων. Πρόκειται για τεχνικές που παρουσιάζουν αρκετά μειονεκτήματα, με το βασικότερο ίσως από αυτά να είναι η ανάπτυξη βακτηριακής αντίστασης σε αντιβιοτικά ή αντιβακτηριακούς παράγοντες γενικότερα. Η δράση τους είναι συνήθως περιορισμένης χρονικής διάρκειας και απαιτείται καλός έλεγχος του ρυθμού έκλυσής

τους, καθώς λόγω του ότι η συγκέντρωσή τους σε μια επίστρωση είναι περιορισμένη, ενδέχεται η πτώση της κάτω από ορισμένο επίπεδο να μειώνει την αποτελεσματικότητά τους. Τέλος, ακόμη και περιπτώσεις καθυστερημένης απελευθέρωσης των παραγόντων μπορεί να είναι καθοριστικές για το σχηματισμό βακτηριακού βιοφίλμ πάνω στις επιφάνειες ([10], [99], [100]).

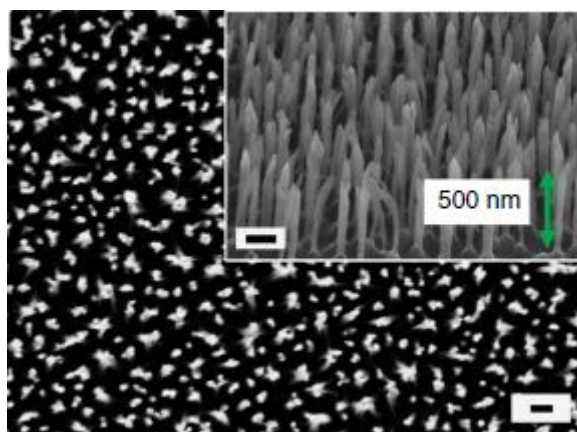
Εμφανίζεται πλέον ως ανάγκη, η χρήση εναλλακτικών μεθόδων κατεργασίας των επιφανειών, που προωθούν τη *φυσική επιφανειακή τροποποίηση*, δημιουργώντας τοπογραφία στη μικρο-νανοκλίμακα. Πρόκειται για επιφάνειες που παρουσιάζουν αυξημένη ενεργό επιφάνεια και λόγο ασυμμετρίας (aspect ratio), προσομοιάζοντας με φυσικές επιφάνειες (βιομιμητική), όπως τα φτερά εντόμων, που αποτέλεσαν έμπνευση για τη δημιουργία τραχύτητας πάνω σε τεχνητές επιφάνειες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν τα φτερά της λιβελούλας (dragonfly) και του τζίτζικιού (cicada), που έχουν ξεχωρίσει λόγω της νανοδομημένης αρχιτεκτονικής τους [12].

Η δημιουργία τοπογραφίας σε μία επιφάνεια, καθώς και ο βαθμός τραχύτητας που παρουσιάζει, καθορίζουν το είδος της αλληλεπίδρασής της με τα βακτήρια. Πέραν της εξάρτησης της εν λόγω αλληλεπίδρασης από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του εκάστοτε βακτηρίου ([101], [102]), έχει θεμελιωθεί μια γενικότερη αρχή που υπαγορεύει συσχέτιση της αντιβακτηριακής δράσης μιας επιφάνειας με το σχετικό μέγεθος βακτηρίου και επιφανειακής τραχύτητας [103]. Συγκεκριμένα, προκειμένου μια τραχειά επιφάνεια να είναι αποτελεσματική απέναντι στα βακτήρια, θα πρέπει τα τοπογραφικά χαρακτηριστικά της να είναι μικρότερων διαστάσεων είτε από τις διαστάσεις των ίδιων των οργανισμών [104], είτε από τα μέρη τους εκείνα που εξερευνούν την επιφάνεια πριν να προσκολληθούν [105].

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία εστιάζει κυρίως στην ικανότητα μιας μικρο-νανοδομημένης επιφάνειας να εξουδετερώνει βακτήρια. Πρόκειται για ένα μηχανικό φαινόμενο, με τον υψηλό λόγο ασυμμετρίας που δημιουργείται στην τοπογραφία να προκαλεί διάρρηξη της μεμβράνη των βακτηρίων, οδηγώντας τα στο θάνατο.

Σε αυτή την κατεύθυνση, πολύ σημαντική είναι η δουλειά των Ivanova et al. [106], οι οποίοι μελέτησαν τη βακτηριοκτόνο δράση κατεργασμένου πυριτίου ενάντια στα

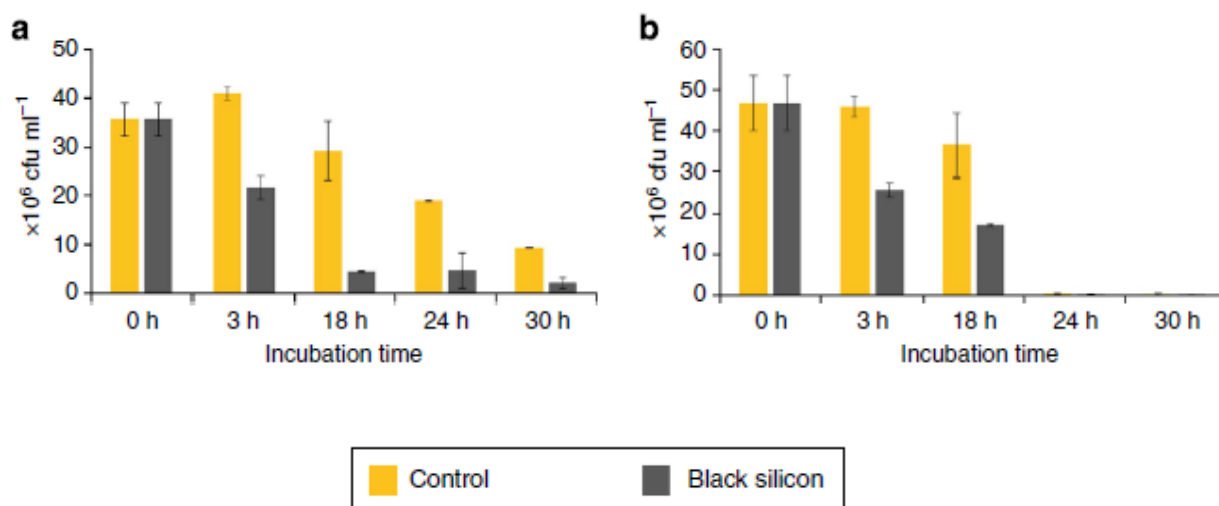
στελέχη Gram-negative *P. aeruginosa* ATCC 9027 και Gram-positive *Staphylococcus aureus* 65.8^T. Το υπόστρωμα πυριτίου υποβλήθηκε σε εγχάραξη από πλάσμα χημικά ενεργού αερίου SF₆ (Reactive Ion Etching-RIE), γνωστό και ως “μαύρο πυρίτιο” (“black silicon”) λόγω της αντιανακλαστικής ιδιότητας που αποκτά εξαιτίας της υψηλής αναλογίας ύψους προς πλάτος. Η προκαλούμενη τοπογραφία φαίνεται στην Εικόνα 1.6, όπου εμφανίζονται νανοκολώνες ύψους περίπου 500 nm και διαμέτρου κυμαινόμενης στην περιοχή των 20-80 nm, οργανωμένες σε συμπλέγματα τυχαίου σχήματος, διαμέτρου 200-1 800 nm και με ακανόνιστη χωρική κατανομή.



Εικόνα 1.6: Εικόνες SEM της τοπογραφίας της επιφάνειας του “μαύρου πυριτίου” σε x 35 000 μεγέθυνση. Μικρογράφημα υπό γωνία 53° ενδεικτικό της παρουσίας αιχμηρών νανοκολώνων. Κλίμακα 200 nm.

Για διάρκειας 30 ωρών επώαση, πραγματοποιήθηκε ανά τακτά χρονικά διαστήματα (0, 3, 18, 24 και 30 ώρες) μέτρηση των ζωντανών βακτηρίων ύστερα από ολονύκτια καλλιέργειά τους σε θρεπτικό άγαρ (plate count technique). Τα αποτελέσματα της βακτηριοκτόνου δραστηριότητας του κατεργασμένου πυριτίου για κάθε στέλεχος, παρατίθενται στην Εικόνα 1.7. Παράλληλα, υπολογίσθηκαν οι ρυθμοί εξόντωσης, προσεγγιστικά στα 450 000 cfu/min·cm² τις πρώτες 3 ώρες, πέφτοντας στη συνέχεια στα 50 000 cfu/min·cm² μόνο για το *Staphylococcus aureus* 65.8^T, και με τον αριθμό των βακτηρίων που σκοτώθηκαν να προκύπτει ως η διαφορά του αριθμού των

ζωντανών κυττάρων μεταξύ της ακατέργαστης επιφάνειας αναφοράς και της κατεργασμένης. Η αποτελεσματικότητα του “μαύρου πυριτίου” οφείλεται αδιαμφισβήτητα στη νανο-αρχιτεκτονική της επιφάνειας, ικανή να θραύσει τη βακτηριακή μεμβράνη.



Εικόνα 1.7: Βακτηριοκτόνος δράση “μαύρου πυριτίου”. Μέτρηση ζωντανών βακτηριακών αποικιών για (a) *P. aeruginosa* και (b) *S. aureus* για μέχρι και 30 ώρες επώαση.

Παρόμοια τοπογραφία κατασκεύασαν οι Bhadra et al. [6] πάνω σε επιφάνειες τιτανίου με υδροθερμική εγχάραξη σε διάλυμα υδροξειδίου του καλίου (KOH) προς σχηματισμό νανοκαλωδίων, ύψους περίπου 400 nm. Απέδειξαν ικανοποιητική βακτηριοκτόνο δράση προσεγγιστικά στο 50% απέναντι στο Gram-negative βακτήριο *P. aeruginosa* ATCC 9027 και μόλις 20% στο Gram-positive *S. aureus* CIP 65.8^T, μετά από 18-ωρη επώαση. Η επιλεκτικότητα στη δράση της τραχύτητας οφείλεται στο σημαντικά μεγαλύτερο πάχος κυτταρικής μεμβράνης των Gram-negative βακτηρίων, που δυσχεραίνει τη διάτρησή της, άρα και την επιτυχία ενός καθαρά μηχανικού τρόπου εξόντωσης του βακτηρίου.

Οι Kang et al. [107] ενσωμάτωσαν νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWCNTs) διαμέτρου μόλις 0.75 – 1.2 nm σε φιλμ φθοριούχου πολυβινυλιδενίου (poly(vinylidene fluoride)-PVDF). Παρατήρησαν ότι μόλις το 6% των βακτηρίων *E. coli* K12 εμφάνιζε μεταβολική δραστηριότητα, άρα και ενδείξεις βιωσιμότητας, με το υπόλοιπο 94% να προσβάλλεται από την τοπογραφία υψηλής αναλογίας μήκους-διαμέτρου, παρουσία των κυλινδρικών νανοσωλήνων, ικανή για τη μόνιμη απενεργοποίηση ζωτικών λειτουργιών των βακτηριακών κυττάρων.

Πρόσφατα, η Lam και η ομάδα της στην Αυστραλία [108] κατασκεύασαν νανοδομημένα πολυμερικά πεπτίδια (Structurally Nanoengineered Antimicrobial Peptide Polymers – SNAPPs) και απέδειξαν ότι η αστεροειδής τοπογραφία τους είναι αποτελεσματική ενάντια σε όλα τα Gram-negative βακτήρια. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη διττή δράση των πεπτιδίων, τα οποία εκτός του ότι παρεισφρύνουν στην κυτταρική μεμβράνη και καταστέλουν το βακτήριο, το ενεργοποιούν να εκκινήσει διαδικασίες αυτοκαταστροφής του. Σημαντική διαφοροποίηση από τα έως τώρα χρησιμοποιούμενα πολυμερικά πεπτίδια για αντιβακτηριακές εφαρμογές, αποτελεί το μεγαλύτερο μήκος της αλυσίδας και η επιλεκτικότητα ως προς τα προσβαλλόμενα κύτταρα που προστατεύει τα υγιή κύτταρα, επιτρέποντας τη χρήση τους σε υλικά εμφυτευμάτων.

1.5 Μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδροφобες επιφάνειες με αντιβακτηριακές ιδιότητες

Όπως προκύπτει από την προηγούμενη παράγραφο, η ύπαρξη επιφανειακής τραχύτητας ευνοεί την εκδήλωση αντιβακτηριακής συμπεριφοράς. Λόγω της άμεσης σύνδεσης της τοπογραφίας μιας επιφάνειας με τις ιδιότητες διαβροχής της, η κατάσταση διαβροχής της θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό κριτήριο για την αξιολόγηση του αντιβακτηριακού της χαρακτήρα. Οι υπερυδροφобες επιφάνειες αναδεικνύονται ως διακριτή κατηγορία επιφανειών με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Προτού παρατεθούν περιπτώσεις υπερυδροφобων αντιβακτηριακών επιφανειών,

ακολουθεί μια σύντομη εισαγωγή στην έννοια της υπερυδροφοβικότητας και των ιδιοτήτων της, ώστε να κατανοηθεί πλήρως η συμβολή τους στην εμφάνιση αντιβακτηριακής δράσης.

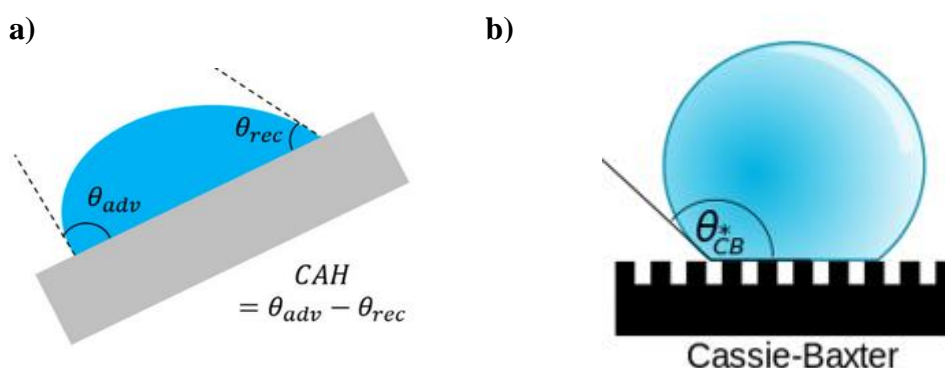
1.5.1 Υπερυδρόφοβες επιφάνειες: Ιδιότητες και τρόπος κατασκευής τους

Ως υπερυδρόφοβες, όπως μπορεί να εξαχθεί από την ονομασία τους, ορίζονται οι επιφάνειες με έντονα απωθητική συμπεριφορά προς το νερό. Ο βαθμός διαβροχής τους από το νερό ποσοτικοποιείται μέσω της *γωνίας επαφής* (*Contact Angle – CA*), η οποία είναι η επαπτόμενη γωνία στη διεπιφάνεια υγρού-ατμού στο τριπλό σημείο συνύπαρξης στερεής, υγρής και αέριας φάσης, και η οποία θα πρέπει να. Λόγω παρουσίας τραχύτητας, κάθε διεπιφάνεια μπορεί να λάβει ένα εύρος γωνιών επαφής, το οποίο ορίζεται μέσω της *γωνίας υστέρησης* (*Contact Angle Hysteresis*) [109], γεγονός που την καθιστά σημαντική για τον πλήρη προσδιορισμό του βαθμού διαβροχής. Έτσι, η διαφορά της γωνίας επαφής κατά την αύξηση του όγκου της σταγόνας (*γωνία προώθησης*, *Advancing Contact Angle*), που προσομοιώνει την προς τα εμπρός κίνηση της σταγόνας, και της γωνίας επαφής κατά την ελάττωση του όγκου της (*γωνία υποχώρησης*, *Receding Contact Angle*), οπότε προσομοιώνεται η κίνηση της πίσω πλευράς της, και για σταθερή διεπιφάνεια υγρού-στερεού, ορίζει τη γωνία υστέρησης (Εικόνα 1.8a).

Συγκεκριμένα λοιπόν, προκειμένου μια επιφάνεια να θεωρηθεί υπερυδρόφοβη, θα πρέπει να εμφανίζει γωνία επαφής ίση ή μεγαλύτερη των 150° , και γωνία υστέρησης μικρότερη των 10° . Οι υπερυδρόφοβες επιφάνειες περιγράφονται επιτυχώς από το μοντέλο των Cassie-Baxter (Εικόνα 1.8b), σύμφωνα με το οποίο η σταγόνα νερού παραμένει στις κορυφές της επιφανειακής τοπογραφίας χωρίς να παρεισφρύει στα υπάρχοντα διάκενα, αλληλεπιδρώντας μόνο με τα υψηλότερα σημεία της ([110], [111]). Το μοντέλο τους περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\cos\theta_{CB} = f_s \cos\theta - (1-f_s)$$

όπου θ_{CB} είναι η γωνία Cassie-Baxter, θ είναι η στατική γωνία επαφής σύμφωνα με την εξίσωση Young, και f_s είναι ο λόγος του εμβαδού της επιφάνειας που έρχεται σε επαφή με τη σταγόνα προς το εμβαδόν της προβολής της.

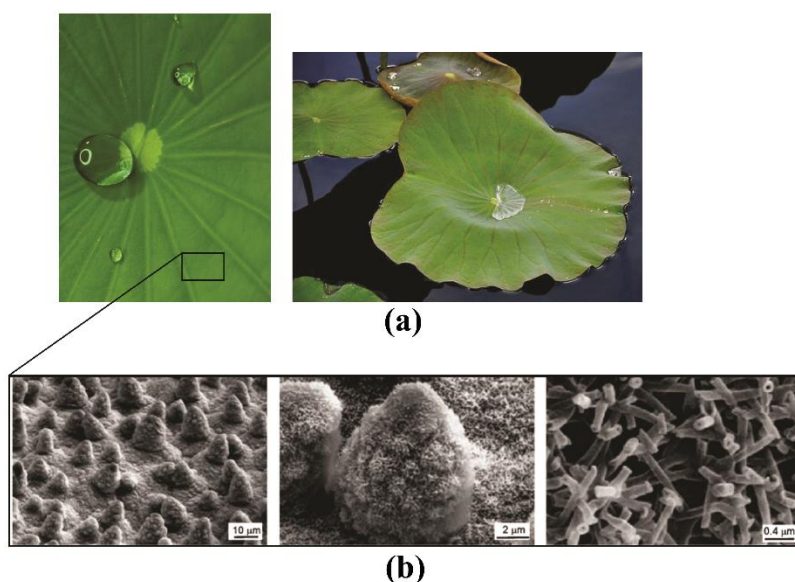


Εικόνα 1.8: a) Σχηματική απεικόνιση γωνίας υστέρησης νερού κατά τη διαβροχή υπερυδρόφοβης επιφάνειας, b) Μοντέλο Cassie-Baxter, όπου εκτός της μεγάλης γωνίας επαφής θ_{CB} , η μικρή γωνία υστέρησης εξασφαλίζει κύλιση της σταγόνας στην επιφάνεια [159].

Η επιτυχία του μοντέλου των Cassie-Baxter να περιγράψει τη διαβροχή των υπερυδρόφοβων επιφανειών, έγκειται στη μείωση της επιφάνειας αλληλεπίδρασης της σταγόνας με την επιφάνεια, μέσω του λόγου f_s . Το φαινόμενο αυτό επιτυγχάνεται με τη δημιουργία ιεραρχικής τοπογραφίας διπλής κλίμακας που αποτελείται από συνδυασμό δομών διαστάσεων μικρομέτρων και νανομέτρων. Με τον τρόπο αυτό, εκτός του ότι εξασφαλίζεται μεγάλη γωνία επαφής, επιτυγχάνεται και μικρή γωνία υστέρησης λόγω ελαχιστοποίησης των σημείων επαφής της σταγόνας με την επιφάνεια, που της επιτρέπει ευκολότερα να κυλήσει.

Στην ύπαρξη ιεραρχικών δομών στηρίζεται και το *φαινόμενο του λωτού* (“*lotus effect*”) ή αλλιώς, *αυτοκαθαρισμός* (Εικόνα 1.9), κατά το οποίο μια σταγόνα νερού κινούμενη πάνω σε υπερυδρόφοβη επιφάνεια μπορεί να συμπαράσχει μόρια ρύπων και σκόνης,

συμβάλλοντας έτσι στον αποτελεσματικό καθαρισμό της. Η ονομασία του φαινομένου από τα φύλλα του λωτού, προκύπτει από το γεγονός ότι η επιφάνειά τους παρουσιάζει διπλής κλίμακας ιεραρχική δομή [109], η οποία σε συνδυασμό με κατάλληλη χημεία χαμηλής επιφανειακής ενέργειας, εξασφαλίζει εκτός από μεγάλη γωνία επαφής, μικρή γωνία υστέρησης που επιτρέπει την ευκολία κύλισης της σταγόνας νερού και κατ'επέκταση, τον αυτοκαθαρισμό της. Παρά το ότι η διπλή ιεραρχική δόμηση εμφανίζεται σε πολλά υπερυδρόφοβα φύλλα στη φύση, έχει επικρατήσει η σύνδεση του φαινομένου με τα φύλλα του λωτού.



Εικόνα 1.9: Φύλλο λωτού. (a) Μηδενική μεγέθυνση [112], (b) Εικόνες SEM για τρεις διαφορετικές μεγεθύνσεις, που απεικονίζουν τη μικρο και νανοδόμηση ιεραρχικής κλίμακας [113].

Κατασκευαστικά, προκειμένου μια επιφάνεια να καταστεί υπερυδρόφοβη, μιμούμενη τέτοια φυσικά φαινόμενα, απαιτείται κατάλληλα διαμορφωμένη τοπογραφία, που θα εγγυάται όσο το δυνατόν λιγότερα σημεία επαφής με τη σταγόνα, καθώς και χαμηλή επιφανειακή ενέργεια, ώστε να είναι ασθενείς οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης με τη σταγόνα νερού.

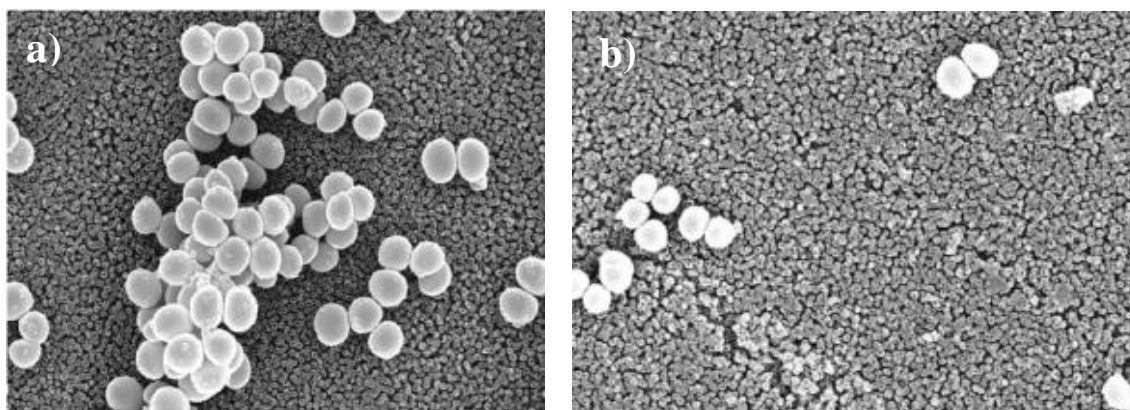
Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες μέθοδοι για την παρασκευή τους είναι η φωτολιθογραφία και η μαλακή λιθογραφία (soft lithography) [114], ενώ αρκετά συχνή είναι η χρήση μικρο-νανοσωματιδίων για δημιουργία της τοπογραφίας. Άλλες τεχνικές περιλαμβάνουν το διαχωρισμό φάσεων (phase separation), την ηλεκτροϋφανση (electrospinning), τη χημική εναπόθεση από ατμό (chemical vapor deposition), τη δημιουργία επιστρώσεων και την ελεγχόμενη κρυστάλλωση, καθώς και την εγχάραξη με χρήση οξέων, λέιζερ ή μέσω ηλεκτρικών εκκενώσεων με χρήση πλάσματος (plasma nanotexturing), που αποτελεί μάλιστα και τη μέθοδο κατεργασίας επιφανειών που θα χρησιμοποιηθεί στη συγκεκριμένη εργασία (παράγραφος 3.2.1).

Οι υπερυδρόφοβες επιφάνειες, εκτός της ικανότητας αυτοκαθαρισμού τους, αναλόγως της κατεργασίας τους μπορούν να εμφανίσουν αντιανακλαστικές [115], αντιπαγωτικές ιδιότητες. Η συνδυαστική τους χρησιμότητα τις καθιστά “έξυπνες επιφάνειες”, με ένα μεγάλο πλήθος εφαρμογών σε εξωτερικές επιφάνειες, όπως τζάμια και φωτοβολταϊκά, στον τομέα της υγείας και της πρόληψης με την κατασκευή μικροεργαστηρίων σε ψηφίδα (Lab-on-a-chip) για τη διάγνωση και ανάλυση βιολογικών ρευστών, αλλά και στον τομέα της προστασίας τροφίμων και περιβάλλοντος με αντίστοιχες καινοτόμες μικρορευστομηχανικές διατάξεις.

1.5.2 Μη προσκολλητικές μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες

Ο ρόλος μιας υπερυδρόφοβης επιφάνειας ως μη προσκολλητική προς τα βακτήρια έγκειται στην ικανότητά της να περιορίζει τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ των βακτηρίων και του υποστρώματος παρουσία επιφανειακής τραχύτητας, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο την απομάκρυνσή τους πριν το σχηματισμό βιοφίλμ [116].

Οι Tang et al. [117] κατασκεύασαν υπερυδρόφοβες επιφάνειες γωνίας επαφής 156° , σε υπόστρωμα τιτανίου χρησιμοποιώντας ηλεκτροχημική οξείδωση προς παραγωγή νανοσωλήνων διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) και τελική επεξεργασία με σιλάνιο (SiH_4), τις οποίες έλεγξαν ως προς την προσκολλητική τους ικανότητα απέναντι στο *S. aureus*. Όπως μπορούμε να δούμε και στις εικόνες SEM που ακολουθούν (Εικόνα 1.10), το ποσοστό των προσκολλημένων βακτηρίων πάνω στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες μετά από 4 ώρες ήταν σημαντικά μειωμένο συγκριτικά με τις αντίστοιχες υδρόφιλες, εμφανίζοντας παράλληλα αρκετά διεσπαρμένη κατανομή.



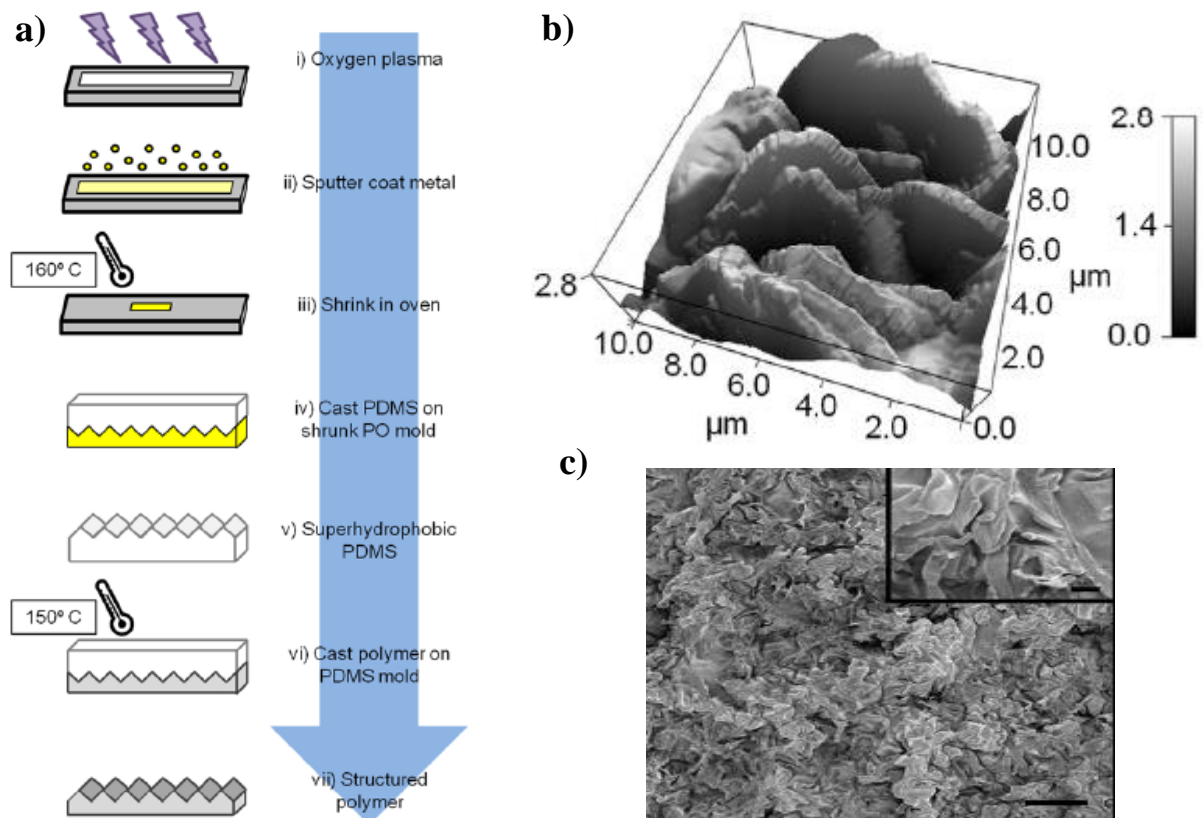
Εικόνα 1.10: Εικόνες SEM του *S. aureus* μετά από 4 ώρες σε (a) υδρόφιλες (54°) και (b) υπερυδρόφοβες (156°) επιφάνειες από τους Tang et al.

Οι Privett et al. [118] παρασκεύασαν υπερυδρόφοβες επιφάνειες γωνίας επαφής 167° με δημιουργία επίστρωσης φθοριούχων κολλοειδών διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και παρατήρησαν σημαντική μείωση της προσκόλλησης των βακτηρίων *S. aureus* και *P. aeruginosa*. Οι Crick et al. [116] απέδειξαν επίσης μικρό βαθμό προσκόλλησης τόσο του Gram-negative *E. coli*, όσο και του Gram-positive *S. aureus* σε υπερυδρόφοβη επίστρωση ελαστομερούς σιλικόνης γωνίας επαφής 165° , που παρήγαγαν με χημική εναπόθεση από ατμό υποβοηθούμενη από αερόλυμα (aerosol assisted chemical vapour deposition – AACVD) πάνω σε υπόστρωμα γυαλιού.

Οι Freschauf et al. από το Πανεπιστήμιο της California στο Irvine [119] χρησιμοποίησαν μια γρήγορη μέθοδο (Εικόνα 1.11a) δομικής τροποποίησης σκληρών

πλαστικών, και συγκεκριμένα, πολυστυρενικού (PS), πολυαιθυλενικού (PE) και πολυκαρβονικού (PC) υποστρώματος, χωρίς τη χρήση χημικών πρόσθετων. Συνδυάζοντας μια καινοτόμο τεχνική συρρίκνωσης μαλακού πλαστικού πολυουρεθάνης (PO) με εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας (160°C) προς απόδοση τοπογραφίας από την προκαλούμενη αναδίπλωση και λύγισμα, μαζί με τη χρήση θερμικά σταθερού πολυδιμεθυλοσιλοξάνιου (PDMS) ως καλούπι για την αποτύπωση τοπογραφίας υψηλής αναλογίας ύψους προς πλάτος (Εικόνες 1.11b, 1.11c), κατασκεύασαν υπερυδροφώβες επιφάνειες με αντιβακτηριακές ιδιότητες ενάντια στο *E. coli*. Συγκεκριμένα, μόλις 2% των αρχικών βακτηριακών κυττάρων προσκολλήθηκε στις υπερυδροφώβες επιφάνειες, ποσοστό που μειώθηκε στο 0.1% μετά από ξέπλυμα.

Οι Poncin-Epaillard et al. [120] επεξεργάστηκαν με πλάσμα τετραφθοράνθρακα (CF₄) υποστρώματα πολυστυρενίου (PS) και πολυπροπυλενίου (PP), που απέκτησαν γωνίες επαφής περίπου ίσες με 130° και 160°, προκειμένου να ελέγξουν τις μη προσκολλητικές τους ικανότητες απέναντι στα βακτήρια *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Enterobacter (Hafnia alvei)*. Το πολυστυρένιο περιόρισε σημαντικά την προσκόλληση καθε στελέχους, σε αντίθεση με το πολυπροπυλένιο που παρουσίασε επιλεκτική αντιβακτηριακή δράση αναλόγως του στελέχους, αποδεικνύοντας τη σημασία του σχετικού μεγέθους βακτηρίων και διαστάσεων τοπογραφίας.



Εικόνα 1.11: (a) Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου που ακολουθήθηκε από τους Freschauf et al., (b) Top-down AFM 3D εικόνα της μορφολογίας και του προφίλ ύψους των κατεργασμένου πολυστυρενίου (PS), (c) Εικόνα SEM της αποτυπωμένης τοπογραφίας από το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Η κλίμακα για τη μεγάλη εικόνα είναι 10 μm, ενώ για την υπό μεγέθυνση 2 μm.

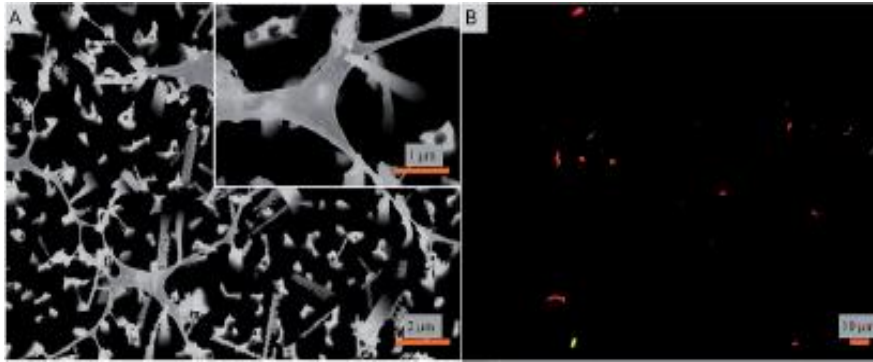
Το βασικό μειονέκτημα της χρήσης της υπερυδροφοβικότητας ως μέσον για τη μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης είναι η μειωμένη ανθεκτικότητα και χρονική αντοχή της προκαλούμενης μικρο-νανοδόμησης και της επιφανειακής χημείας. Η μηχανικά εύθραυστη τοπογραφία και η χρονική εξασθένηση του εναποτιθέμενου φιλμ χαμηλής επιφανειακής ενέργειας μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια του αντιβακτηριακού χαρακτήρα. Οι Fadeeva et al. [121] παρουσίασαν αποικισμό της κατεργασμένης με λέιζερ επιφάνειας τιτανίου από το *S. aureus* μετά από 18 ώρες, ενώ οι Sousa et al. [122] απέδειξαν επικάλυψη υπερυδρόφοβου πολυ (L-γαλακτικού οξέος) τόσο από *S. aureus*, όσο και από *P.aeruginosa* μετά από 24 ώρες.

1.5.3 Βακτηριοκτόνες μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδροφобες επιφάνειες

Παρά την αναγνώριση της συμβολής της τοπογραφίας με υψηλό λόγο ασυμμετρίας και ιεραρχική δόμηση στην εξουδετέρωση βακτηρίων, που αποδείχτηκε στην παράγραφο 1.4 με την κατασκευή μικρο-νανοϋφασμένων βακτηριοκτόνων επιφανειών, δεν έχουν σημειωθεί αρκετές απόπειρες παρασκευής υπερυδροφобων επιφανειών που να είναι συνάμα και βακτηριοκτόνες.

Παρίθεται εδώ, μία από τις σημαντικότερες εργασίες σε αυτή την κατεύθυνση από τους Hasan et al. [12] του Ινδικού Ινστιτούτου Επιστήμης. Εμπνευσμένοι από τα επιφανειακά τοπογραφικά χαρακτηριστικά των φτερών της λιβελούλας (dragonfly wings), κατέστησαν υπερυδροφобη επιφάνεια πυριτίου. Το υπόστρωμα πυριτίου υποβλήθηκε σε διαδοχικούς κύκλους βαθιάς εγχάραξης από πλάσμα χημικά ενεργού εξαφθοριούχου θείου SF₆, ακολουθούμενη από εναπόθεση υδροφобου στρώματος οκταφθοροκυκλοβουτάνιου C₄F₈, τεχνική γνωστή και ως Deep Reactive Ion Etching (DRIE) ή αλλιώς, διαδικασία Bosch. Παρήχθησαν έτσι, επιφάνειες “μαύρου πυριτίου” με στατική γωνία επαφής 154° και γωνία υστέρησης 8.3°, που αντιστοιχούν σε τοπογραφία αιχμηρών νανοκολώνων ύψους 4 μm και διαμέτρου 220 nm.

Η δράση των επιφανειών μελετήθηκε ενάντια στα βακτήρια *E. coli* και *S. aureus*, τα οποία παρουσίασαν ποσοστά θνησιμότητας 83% και 86%, αντίστοιχα μετά από 3 ώρες, όπως προέκυψε και μετά από μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού (Εικόνα 1.12B). Η επιτυχία του “μαύρου πυριτίου” αποδίδεται στη μηχανική ρήξη των βακτηριακών κυττάρων από την έντονη τοπογραφία, τα οποία, όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 1.12A, στην προσπάθειά τους να κινηθούν ενώ παραμένουν αγκυλωμένα στις αιχμηρές προεξοχές, τεντώνονται σε ακραίο βαθμό ώσπου διαρρηγνύονται.



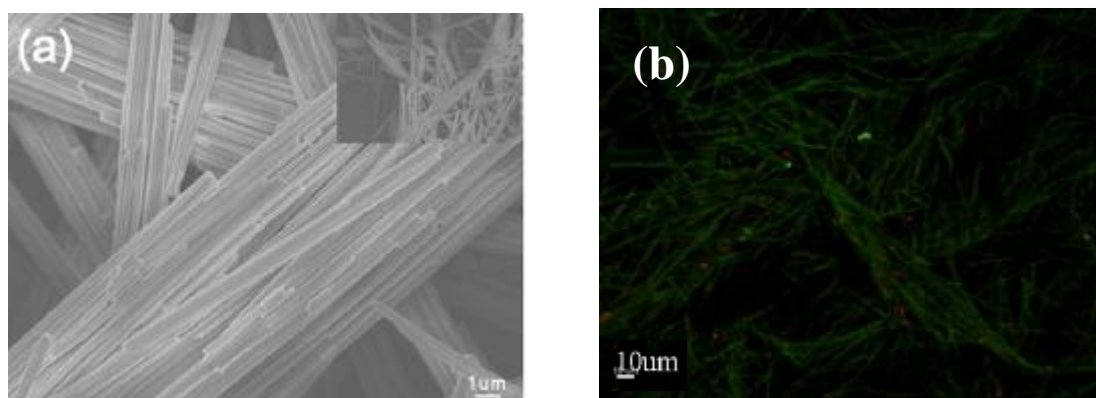
Εικόνα 1.12: (A) Εικόνα SEM προσκόλλησης *E. coli* σε επιφάνεια “μαύρου πυριτίου”, (B) Εικόνες από ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού, όπου με πράσινο απεικονίζονται τα ζωντανά και με κόκκινο τα νεκρά κύτταρα *E. coli*.

1.6 Μη προσκολλητικές και βακτηριοκτόνες μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες

Στην παράγραφο 1.5 αποδείχτηκε ότι οι υπερυδρόφοβες επιφάνειες λόγω της ευαίσθητης τοπογραφίας τους, σταδιακά απολλύουν την αντιβακτηριακή τους δράση. Το ίδιο συμβαίνει και με αρκετούς αντιβακτηριακούς παράγοντες (παράγραφος 1.3), εξαιτίας της γρήγορης εξάντλησής τους. Η δυνατότητα όμως συνδυαστικής εφαρμογής κυρίως της μη προσκολλητικής ιδιότητας των υπερυδρόφοβων επιφανειών, και της βακτηριοκτόνου δράσης ενός αντιβακτηριακού παράγοντα, μπορεί να οδηγήσει στην έκφραση μιας ολοκληρωμένης αντιβακτηριακής συμπεριφοράς. Όπως θα αναλυθεί παρακάτω, η διπλή αυτή λειτουργικότητα των επιφανειών γίνεται εφικτή με τη χρήση της επιφανειακής τραχύτητας ως φορέα για τη φιλοξενία και την ελεγχόμενη απελευθέρωση αντιβακτηριακών παραγόντων ή ακόμη και για την ενίσχυση της αντιβακτηριακής τους δράσης.

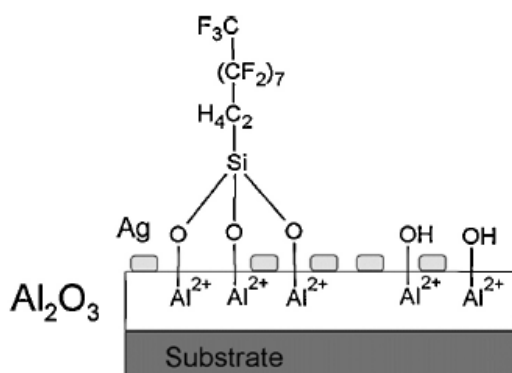
Οι Qi et al. [123] κατασκεύασαν μη προσκολλητικές και βακτηριοκτόνες επιφάνειες πάνω σε ανοξείδωτο ατσάλι, μέσω εγχάραξης από διάλυμα υδροχλωρίου (HCl), ακολουθούμενη από ενσωμάτωση νανοσωματιδίων αργύρου κατά την ηλεκτρολυτική αντίδραση διαλύματος νιτρικού αργύρου (AgNO_3) με την ενεργοποιημένη επιφάνεια και τελική τροποποίηση από θειολικό διάλυμα ODT (Octadecanethiol) προς επίτευξη γωνίας επαφής 152° . Παρατηρήθηκε ολική θανάτωση του *E.coli* μετά από 24 ώρες και άμεση συσχέτιση της υπερυδροφοβικότητας με την εκδήλωση της δράσης των νανοσωματιδίων, καθώς για μικρότερη γωνία επαφής (138°), η αντιβακτηριακή δράση ήταν μειωμένη.

Οι Chung et al. [124] συνέθεσαν σύμπλοκα AgSF, κατά την ανάμειξη νιτρικού αργύρου (AgNO_3) με 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροδεκανιοθειόλη (1H,1H,2H,2H-perfluorodecanethiol, PFDT) πάνω σε υπόστρωμα πυριτίου επικαλυμένο με πολυστυρένιο για καλύτερη εφαρμογή του φιλμ AgSF, δημιουργώντας ιεραρχική δόμηση γωνίας επαφής μεγαλύτερης από 150° αποτελούμενη από ραβδόμορφες μικρο-νανοδομές (Εικόνα 1.13a). Μετά από 9 ώρες επώαση του *P. aeruginosa* PAO1 πάνω στην επιφάνεια, ο βαθμός προσκόλλησης μετρήθηκε με βάση την βακτηριακή κάλυψη, που ήταν μικρότερη από 1%, ενώ η βιωσιμότητά τους δεν ξεπερνούσε το 23% (Εικόνα 1.13b).



Εικόνα 1.13: (a) Εικόνα FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) των ραβδόμορφων AgSF συμπλόκων, (b) Έλεγχος βιωσιμότητας *P. aeruginosa* PAO1 στις 9 ώρες μέσω μέτρησης εκπεμπόμενου φθορισμού με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ. Με πράσινο απεικονίζονται τα ζωντανά και με κόκκινο τα νεκρά βακτηριακά κύτταρα.

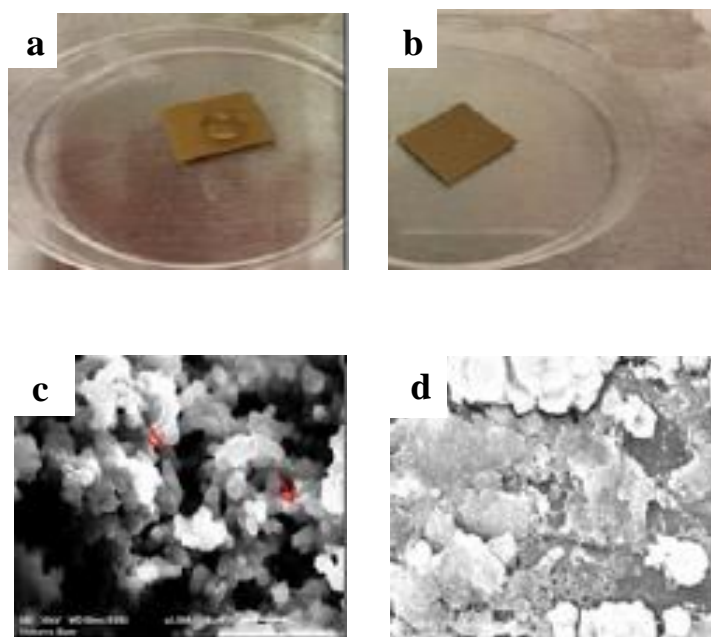
Οι Heinonen et al. [125] παρασκεύασαν υπερυδρόφοβες επιφάνειες (154°) σε ανοξειδωτο ασάλι με μέθοδο παρόμοια με εκείνη των Zhang et al. ([126], [127]), δημιουργώντας τοπογραφία γ-αλουμίνας και εναποθέτοντας υδρόφοβο φίλμ επταδεκαφθορο-1,1,2,2-τετραϋδροξυδεκύ) τριμεθοξυσιλάνιου (heptadecafluoro-1,1,2,2-tetrahydrodecyl)trimethoxysilane), γνωστό και ως FAS, ενώ είχε προηγηθεί ο σχηματισμός νανοσωματιδίων αργύρου με τη διαδικασία Tollens (Εικόνα 1.14). Η μη προσκολλητική και βακτηριοκτόνος μελέτη των επιφανειών ενάντια σε Gram-positive και Gram-negative βακτήρια (*Lactobacillus paracasei*, *Serratia marcescens* και *Pseudomonas fluorescens*), απέδωσε 88% εξουδετέρωση όσων βακτηριακών κυττάρων είχαν προσκολληθεί.



Εικόνα 1.14: Σχηματική απεικόνιση δόμησης της υπερυδρόφοβης επιφάνειας, όπως την κατασκεύασαν οι Heinonen et al. [125], σύμφωνα με τους Zhang et al. ([126], [127]). Το φίλμ επταδεκαφθορο-1,1,2,2-τετραϋδροξυδεκύ) τριμεθοξυσιλάνιου FAS συνδέεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού με το οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3 , αλουμίνα).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η πρόσφατη εργασία των Chaudhari et al. [128] για την αντιβακτηριακή προστασία καμπινών και γενικότερα επιφανειών σε αεροσκάφη. Προς τούτο, σε φύλλα αλουμινίου ψεκάστηκε (spray coating) μίγμα νανοσωματιδίων αργύρου μαζί με οξείδιο μαγνησίου (Ag-MgO), ενεργοποιημένα από επταδεκαφθοροτριαιθοξυσιλάνιο (heptadecafluorotriethoxysilane) και εντός φθοριούχου διαλύτη διχλωρο-1,1,1,2,2-πενταφθοροπροπάνιο (dichloro-1,1,1,2,2-pentafluoropropane), προς εξασφάλιση υπερυδροφοβικότητας (γωνία επαφής μεγαλύτερη των 150°). Για αρχική συγκέντρωση 10^5 cfu/mL των στελεχών *E. coli*

25922 και *S. aureus* 9144, σημειώθηκε μηδενική διαβροχή της κατεργασμένης επιφάνειας μετά από μίας ώρας επώαση (Εικόνα 1.15a), ενώ η πλήρης εξόντωσή τους επιβεβαιώθηκε και μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης SEM (Εικόνα 1.15b).



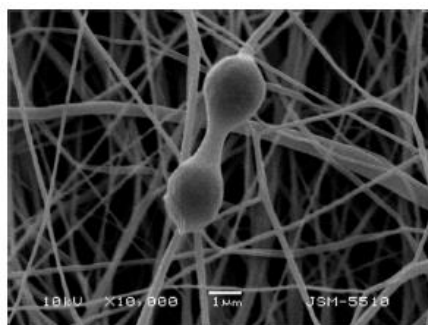
Εικόνα 1.15: (a-b) Βακτηριακή προσκόλληση *E. coli* 25922. (a) Σταγόνα βακτηρίου πάνω σε ακατέργαστο φύλλο ανοξείδωτου ατσαλιού και (b) Πλήρης αφαίρεση της σταγόνας μετά από μονώρη επώαση σε υπερυδρόφοβα Ag-MgO επικαλυμένα φύλλα ατσαλιού. (c-d) Εικόνες SEM *E. coli* 25922. (c) Πλήθος βακτηρίων σε ακατέργαστο φύλλο ανοξείδωτου ατσαλιού, (d) Απουσία βακτηρίων σε υπερυδρόφοβο Ag-MgO επικαλυμένο φύλλο ατσαλιού. Τα βακτήρια επισημαίνονται με κόκκινα βέλη.

Οι Yamauchi et al. [129] χρησιμοποίησαν την παραγόμενη τραχύτητα από φιλμ πολυτετραφθοροαιθυλενίου (polytetrafluoroethylene, PTFE) για την ενίσχυση της φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας ενισχυμένων με άζωτο σωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου (N-doped TiO_2). Η δημιουργούμενη τοπογραφία (152°) διαμόρφωσε θύλακες οξυγόνου που ευνοούν την φωτοκαταλυτική αντίδραση προς παραγωγή δραστικών ομάδων οξυγόνου (ROS), μειώνοντας μετά από ακτινοβολήση x 2 000 ορατού φωτός, από περίπου 10^5 cfu απόλυτο αριθμό κυττάρων *E. coli* και MRSA (Methycillin-Resistant *S. aureus*) σε λιγότερα από 10 cfu εντός 24 ωρών, για περιεκτικότητα 12% w/w ενισχυμένων με άζωτο σωματιδίων TiO_2 . Ως προς τις μη προσκολλητικές

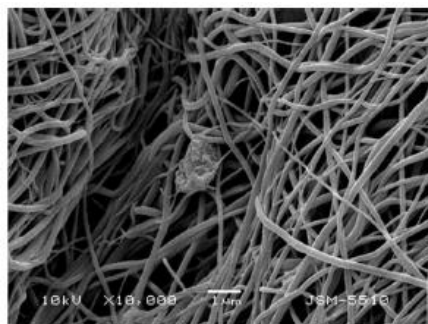
ικανότητες του νανοσύνθετου φίλμ, αποδείχτηκε ότι από αρχικό αριθμό κυττάρων *E. coli* 10^7 - 10^8 cfu, μόλις 100 cfu παρέμειναν.

Οι Zhang et al. [130] απέδειξαν ότι υπερυδρόφοβες επιφάνειες με διμεταλλική σύσταση, παρηγμένες με γαλβανική αντίδραση αντικατάσταση, ακολουθούμενη από θερμική οξειδωση, εκτός του ότι αποτρέπουν τη βακτηριακή προσκόλληση σε ξηρό περιβάλλον, διατηρούν την αποτελεσματικότητά τους και σε υγρό περιβάλλον λόγω της ιεραρχικής τους δόμησης που επιτρέπει συγκρατημένη απελευθέρωση των μεταλλικών ιόντων.

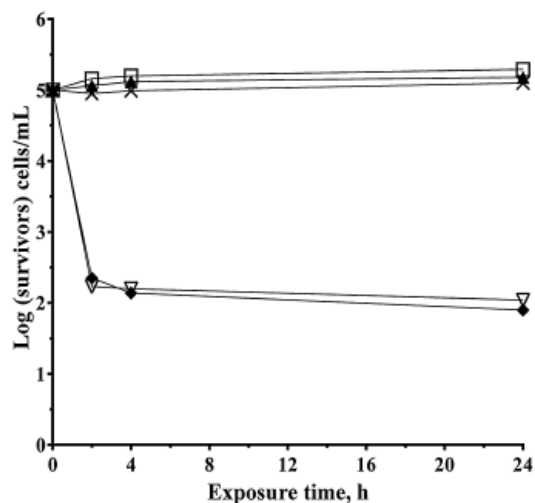
Τέλος, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο ίδιος ο αντιβακτηριακός παράγοντας ενισχύει τη μη προσκολλητική δράση της υπάρχουσας τραχύτητας. Χαρακτηριστικά, πρόσφατα οι Spasova et al. [131] από την Ακαδημία Επιστημών της Βουλγαρίας παρουσίασαν αύξηση της στατικής γωνίας επαφής στις 152° του φθοριούχου πολυβινυλιδένιου of poly(vinylidene fluoride) (PVDF) και του πολυ (βινυλιδενοφθορίδιο-συν-εξαφθοροπροπυλένιου) poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene) (PVDF-HFP) κατά την ενσωμάτωση μέσω ηλεκτροϋφανσης νανοσωματιδίων οξειδίου του ψευδαργύρου. Έτσι, ύστερα από 24ωρη επώαση, παρατηρήθηκε μηδενική προσκόλληση *S. aureus* στις υβριδικές επιφάνειες, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.16B , ενώ σε έλεγχο της βιωσιμότητάς του, μειώθηκε κατά 3 λογαριθμικές μονάδες (Εικόνα 1.16C).



A.



B.



C.

Εικόνα 1.16: (A-B) Εικόνες SEM (A) ακατέργαστου φθοριούχου πολυβινυλιδένιου (PVDF), όπου διακρίνεται κύτταρο *S. aureus*, (B) νανοσύνθετου πολυ (βινυλιδενοφθορίδιο-συν-εξαφθοροπροπυλένιου) (PVDF-HFP) με νανοσωματίδια ZnO, όπου φαίνεται μηδενική προσκόλληση *S. aureus*. (C) Λογαριθμικό διάγραμμα ζωντανών κυττάρων *S. aureus* συναρτήσει του χρόνου □ Επιφάνεια αναφοράς - *S. aureus*, × PVDF, ▲ PVDF-HFP, ▽ PVDF/ZnO, ◆ PVDF-HFP/ZnO.

1.7 Στόχοι της εργασίας

Στην παρούσα εργασία, με τίτλο “Επιχαλκωμένες μικρο-νανοδομημένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες με αντιβακτηριακές ιδιότητες” σκοπός είναι η παρασκευή πολυμερικών υλικών με ολοκληρωμένη αντιβακτηριακή δράση, που θα παρουσιάζουν δηλαδή συνδυαστική έκφραση μη προσκολλητικής και βακτηριοκτόνου δραστηριότητας. Οι μέθοδοι που θα χρησιμοποιηθούν, εντάσσονται στην περιοχή της επιφανειακής τροποποίησης πολυμερών με χρήση μικρο και νανοτεχνολογίας για την ελεγχόμενη διαβροχή και την ευρύτερη κατεργασία τους.

Για το λόγο αυτό, εφαρμόστηκε τεχνολογία πλάσματος οξυγόνου για τη δημιουργία νανοϋφανσης και μερική επιμετάλλωση για την περαιτέρω εξουδετέρωση των βακτηρίων, κατατασκευάζοντας έτσι, επιμεταλλωμένες μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδροφικές επιφάνειες. Όπως διαπιστώθηκε από την παρατιθέμενη βιβλιογραφία, οι σύγχρονες ερευνητικές εξελίξεις χρησιμοποιούν την υπερυδροφοβικότητα μιας επιφάνειας κυρίως για την εξασφάλιση απωθητικής προς τα βακτήρια συμπεριφοράς και την ενσωμάτωση ενός αντιβακτηριακού φορέα για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Παρ' όλα αυτά, σε αυτή την εργασία, εκτός της λιγότερο αμφισβητούμενης μη προσκολλητικής ιδιότητας των υπερυδροφικών επιφανειών, θα μελετηθεί ξεχωριστά το ενδεχόμενο εμφάνισης βακτηριοκτόνου δράσης μόνο λόγω του υπερυδροφικού χαρακτήρα μιας επιφάνειας, καθώς και το εύρος βακτηριακών συγκεντρώσεων που μπορεί αυτό να εκδηλωθεί, κάτι το οποίο δεν εμφανίζεται στη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία.

Τέλος, ύστερα από μια συγκριτική μελέτη μεταξύ υπερυδροφικών επιφανειών, με και χωρίς επιμετάλλωση, θα διερευνηθεί το πλεονέκτημα που προσφέρει η εναπόθεση ενός αντιβακτηριακού μετάλλου ως προς την εκδήλωση αντιβακτηριακής δράσης, καθορίζοντας και πάλι την αντίστοιχη περιοχή συγκεντρώσεων που βρίσκει εφαρμογή.

2. Μέθοδοι προσδιορισμού αλληλεπίδρασης επιφανειών με βακτήρια

Η μεγάλη πληθώρα τεχνικών παρασκευής αντιβακτηριακών επιφανειών που παρουσιάστηκε στο Κεφάλαιο 1, δημιούργησε την ανάγκη για διάφορες πειραματικές μεθόδους εκτίμησης, ποιοτικής είτε ποσοτικής, της αλληλεπίδρασης μιας επιφάνειας με τα βακτήρια. Στο παρόν κεφάλαιο, θα πραγματοποιηθεί αρχικά μια σύντομη ανάλυση των βασικών μεθόδων προσδιορισμού τόσο της βακτηριακής προσκόλλησης σε μια επιφάνεια, όσο και της ικανότητάς της να εξουδετερώνει βακτήρια. Στη συνέχεια, αφού παρουσιαστούν τα βακτήρια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη μας, θα εστιάσουμε στην τεχνική που ακολουθήσαμε για την παρακολούθηση της εξέλιξής τους.

2.1 Τεχνικές μελέτης προσκόλλησης βακτηρίων σε επιφάνειες

Κοινό χαρακτηριστικό όλων των μεθόδων προσδιορισμού του βαθμού της βακτηριακής προσκόλλησης είναι ότι είναι πραγματοποιούνται *in vitro*. Προηγείται μια διαδικασία που περιλαμβάνει παραμονή των βακτηρίων στην επιφάνεια προς εξέταση, με την ποσότητα εμβολιασμού των βακτηρίων, την έκταση της επιφάνειας με την οποία αυτά έρχονται σε επαφή, το χρόνο και τη θερμοκρασία πειράματος να είναι μοναδικοί και καθοριστικοί παράγοντες για κάθε πείραμα. Ακολουθεί απομάκρυνση των μη προσκολλημένων βακτηρίων με ξέπλυμα ή φυγοκέντριση και καταμέτρηση του πλήθους των κυττάρων. Παρέχεται επιπλέον δυνατότητα προσδιορισμού της προσκολλητικής δύναμης όταν η απομάκρυνση πραγματοποιείται μέσω φυγοκέντρισης. Οι μέθοδοι εκτίμησης της βακτηριακής προσκόλλησης ταξινομούνται σε: α)

μετρητικές του πλήθους των ζωντανών βακτηρίων, β) τεχνικές μικροσκοπίας για τη μέτρηση και τη μορφολογική παρατήρηση, καθώς και άλλες άμεσες ή έμμεσες τεχνικές ([132], [133], [134]).

Οι τεχνικές μέτρησης του πληθυσμού των ζωντανών βακτηρίων περιλαμβάνουν τη μέτρηση των κυτταρικών αποικιών (*cfu plate counting*), τη ραδιοσήμανση (*radiolabeling*), τη χρώση με 5-κυανο-2,3-διτολυλ χλωρίδιο τετραζολίου (*5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) staining*), τη σήμανση με ρεσαζουρίνη (*resazurin assay*) ή με διοξική φλουορεσκεΐνη (*fluorescein diacetate (FDA) assay*) [135].

Η τεχνική μέτρησης των κυτταρικών αποικιών (*cfu plate counting*) είναι η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη και στηρίζεται στη λογική αντιστοίχισης μιας αποικίας σε ένα κύτταρο. Βασικό της πλεονέκτημα είναι ο εντοπισμός μόνο των ζωντανών κυττάρων, αν και ως τεχνική είναι περισσότερο χρονοβόρα και κοπιαστική. Η ραδιοσήμανση (*radiolabeling*) προσφέρεται για ανώμαλες επιφάνειες, ενώ πλεονεκτεί ως προς την ακρίβειά της και τη δυνατότητα επεξεργασίας μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Απαιτείται όμως, εξειδικευμένος χειρισμός ραδιενεργών υλικών, με υποθάλλοντα κίνδυνο για τους ερευνητές.

Το τετραζολικό άλας CTC (*CTC staining*), καταναλώνεται κατά την κυτταρική αναπνοή προς παραγωγή φθορίζουσας φορμαζάνης CTC πάνω στην κυτταρική επιφάνεια. Συνεπώς, η ανίχνευσή της είναι ενδεικτική της βασικής αερόβιας λειτουργίας των κυττάρων, άρα και της βιωσιμότητάς τους. Αντίστοιχα, η ρεσαζουρίνη (*resazurin assay*) αποτελεί ένα μπλε οξειδοαναγωγικό δείκτη που στα ζωντανά βακτήρια μετατρέπεται σε ροζ ρεσορουφίνη, ως ένδειξη της ζωτικότητάς τους. Τέλος, η άχρωμη και μη φθορίζουσα διοξική φλουορεσκεΐνη (*FDA assay*), στιγματίζει τα ζωντανά βακτηριακά κύτταρα, καθώς μετατρέπεται σε κίτρινη έντονα φθορίζουσα από τις ενδο- και έξωκυτταρικές εστεράσες. Να σημειωθεί ότι στις δύο τελευταίες περιπτώσεις (*resazurin, FDA assays*), είναι απαραίτητη η δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης προς ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πλήθους.

Οι τεχνικές μικροσκοπίας περιλαμβάνουν την οπτική μικροσκοπία (*Light microscopy*), τη μικροσκοπία επιφθορισμού μέσω ανάλυσης εικόνας (*image-analyzed epifluorescence microscopy*), την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*scanning electron microscopy - SEM*), τη συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (*confocal*

laser scanning microscopy -CLSM), τη μικροσκοπία ατομικής δύναμης (*atomic force microscopy - AFM*) και τη φασματοσκοπία υπερέυθρου μέσω μετασχηματισμού Fourier (*Fourier transform infrared spectroscopy - FTIR*) [135].

Η οπτική μικροσκοπία έχει βελτιωθεί ως προς την ταχύτητα και την ακρίβειά της, χάρη στην εξέλιξη της ανάλυσης εικόνας. Χρησιμοποιείται σε ημιδιαφανή υποστρώματα, ενώ επιτρέπει και τη μορφολογική παρατήρηση των σημασμένων βακτηρίων. Η μικροσκοπία επιφθορισμού μέσω ανάλυσης εικόνας (*image-analyzed epifluorescence microscopy*) απαιτεί τη χρήση κατάλληλων φθορίζουσων ουσιών προς διάκριση ζωντανών από τα νεκρά βακτήρια, επιτρέποντας μόνο διδιάστατη απεικόνισή τους. Για τριδιάστατη απεικόνιση της μορφολογίας τόσο των βακτηρίων, όσο και της επιφάνειας σε επαφή, αλλά και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης, χρησιμοποιείται η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*SEM*), η οποία όμως δεν επιτρέπει την καταμέτρηση όλου του βακτηριακού πλήθους και δεν διακρίτοποιεί τα ζωντανά από τα νεκρά κύτταρα.

Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (*CLSM*) προσφέρει υψηλής ανάλυσης τριδιάστατη εικόνα και ρυθμίσεις απεικόνισης (εστιακό βάθος, έλεγχος υπόβαθρου, σειριακές οπτικές τομές δείγματος), επιτρέποντας παράλληλα τη διάκριση των ζωντανών κυττάρων. Σε αντιστοιχία με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*SEM*), η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (*AFM*) απεικονίζει τη μορφολογία των κυττάρων, με τη διαφορά ότι δεν απαιτείται αφυδατωμένο περιβάλλον, ενώ εξασφαλίζει και καλύτερη ποιότητα ανάλυσης εικόνας, υστερώντας βέβαια ως προς την επιφάνεια παρατήρησης. Ως προς τη φασματοσκοπία υπερέυθρου μέσω μετασχηματισμού Fourier (*FTIR*), προσφέρει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τη βιοχημική σύσταση του βακτηρίου, αποδίδοντας ένα πλήρες φάσμα που καταμετρά τις δονήσεις των χημικών δεσμών όλων των βιοχημικών συστατικών των βακτηρίων.

Άλλες μέθοδοι προσδιορισμού της βακτηριακής προσκόλλησης αφορούν στη φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους, με τη μέτρηση της απορρόφησης φωτός μιας συγκεκριμένης χημικής ουσίας, τη χρήση βιοχημικών δεικτών, όπως του μεταβολικού δείκτη ATP, καθώς και την εφαρμογή της αρχής Coulter (*The Coulter principle*) για τον προσδιορισμό του πλήθους και του μεγέθους των βακτηριακών κυττάρων διαλυμένων σε ηλεκτρολύτες.

2.2 Τεχνικές μελέτης βακτηριακής ανάπτυξης πάνω σε επιφάνειες

Η μεγάλη πλειοψηφία των μεθόδων προσδιορισμού της βακτηριοκτόνου δράσης μιας επιφάνειας είναι ίδια με εκείνες που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση της βακτηριακής προσκόλλησης. Βασική διαφοροποίηση παρατηρείται ως προς το ότι, για την εφαρμογή μιας μεθόδου ελέγχου της ζωτικότητας των βακτηρίων, θα πρέπει να ανταποκρίνεται στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τόσο των ίδιων των βακτηρίων, όσο και των επιφανειών προς εξέταση. Συγκριτικά δηλαδή με τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης, θα πρέπει να λαμβάνεται περισσότερο υπόψη η ιδιαίτερη φύση του εκάστοτε βακτηρίου και ο μηχανισμός εξουδετέρωσης της εξεταζόμενης επιφάνειας [13]. Επιπλέον, κι εδώ η ποσότητα των βακτηρίων και το μέγεθος της επιφάνειας με την οποία αλληλεπιδρά, ο χρόνος και η θερμοκρασία είναι εξίσου κρίσιμες παράμετροι για την αξιολόγηση της επιφάνειας. Μετά την επώαση των βακτηρίων στην επιφάνεια, απομακρύνονται από αυτή προς εκτίμηση της βιωσιμότητάς τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι ειδικά στα χρονοεξαρτώμενα πειράματα εξουδετέρωσης βακτηρίων, μια επιφάνεια θεωρείται κλινικά βακτηριοκτόνος όταν παρατηρείται κατά τουλάχιστον 3 λογαριθμικές μονάδες υποχώρηση της συγκέντρωσης των βακτηρίων σε αυτή [136].

Έτσι, συμπεριλαμβάνοντας το μοναδικό τρόπο δράσης μιας επιφάνειας, καθορίζεται ανάλογα και η μέθοδος μελέτης που θα χρησιμοποιηθεί. Πιο εξειδικευμένα, για αποδεδειγμένη προσβολή της βακτηριακής μεμβράνης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι προσδιορισμού διαρροής ενδοκυττάρων συστατικών, όπως είναι ορισμένα κατιόντα, RNA, DNA ή και πρωτεΐνες. Προχωρημένη διάτρηση της μεμβράνης εντοπίζεται και μέσω απεικονιστικών μεθόδων μικροσκοπίας, όπως είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (*SEM*), η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (*AFM*), η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης (*transmission electron microscopy -TEM*), αλλά και συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (*CLSM*). Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί εντοπισμός των προϊόντων υπεροξειδωσής λιπιδίων με χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως φασματοσκοπία λέιζερ κινητικής ενέργειας (*laser kinetic spectroscopy*), φασματοσκοπία υπερύθρου εξασθενημένης ολικής ανάκλασης μέσω μετασχηματισμού Fourier (*attenuated total reflection Fourier transform infrared*

- FTIR) ([137], [138], [139]), καθώς και με περίθλαση ακτίνων-X [140]. Γενικότερα εφαρμοζόμενες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση του βαθμού επιβίωσης των κυττάρων είναι η μέτρηση των κυτταρικών αποικιών (*cfu plate counting*), η χρώση με 5-κυανο-2,3-διτολυλ χλωρίδιο τετραζολίου (*CTC staining*), η σήμανση με ρεσαζουρίνη (*resazurin assay*), καθώς και με διοξική φλουορεσκεΐνη (*FDA assay*), με τη διαφοροποίηση ότι τα εξαγόμενα αποτελέσματα θα συγκρίνονται με τα αντίστοιχα στις επιφάνειες αναφοράς. Αρκετά συχνά χρησιμοποιείται η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ (*agar diffusion method*) προς έλεγχο της ευαισθησίας των βακτηρίων στην επιφάνεια, με τον ορισμό του εύρους της ζώνης αναστολής ανάπτυξής τους (*inhibition zone*) [141].

2.2.1 Πρωτόκολλο αντιβακτηριακής δράσης και αποτελεσματικότητας πολυμερών

Προκειμένου να προσδιοριστεί ο βαθμός της βακτηριοκτόνου δράσης μιας επιφάνειας και η αποτελεσματικότητά της, έχουν καθιερωθεί ορισμένα πρωτόκολλα αναλόγως του είδους της επιφάνειας και των βακτηρίων. Καθένα από αυτά ακολουθεί συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, στην οποία ενσωματώνεται κάποια από τις προαναφερόμενες τεχνικές αντιβακτηριακής μελέτης. Συγκεκριμένα, δεδομένου ότι στην παρούσα εργασία χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα πολυμερικά δισκία, από πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (poly(methyl methacrylate) - PMMA), παρουσιάζεται το Ιαπωνικό Βιομηχανικό Πρότυπο (Japanese Industrial Standard) JIS Z 2801 : 2010 [142] (ισοδύναμο του ISO 22196:2007 για πλαστικά), που αφορά σε πλαστικά, μεταλλικά και κεραμικά προϊόντα, με χρήση των βακτηρίων *S. aureus* και *E. coli*.

Σύμφωνα με αυτό, τρία δείγματα από ακατέργαστες και κατεργασμένες επιφάνειες τοποθετούνται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και εμβολιάζονται με 0.4 mL βακτηριακού διαλύματος συγκέντρωσης $(2.5-10) \times 10^5$ cfu/mL. Προς αποφυγή εξάτμισης του βακτηριακού εναιωρήματος και όσο το δυνατόν περισσότερο ομοιόμορφη εξάπλωσή του στις επιφάνειες, τα δείγματα καλύπτονται από λεπτό φιλμ πολυαιθυλενίου (έως 10 mm πάχος) διαστάσεων 400-1600 mm², προσεκτικά ώστε να

μην υπάρξει διαφυγή του εναιωρήματος από τις άκρες του φιλμ. Ακολουθεί επώαση των βακτηρίων στα δείγματα για 24 ± 1 ώρες, εξασφαλίζοντας θερμοκρασία 35 ± 1 °C και σχετική υγρασία τουλάχιστον ίση με 90%.

Αμέσως μετά το τέλος της επώασης, τόσο τα ακατέργαστα όσο και τα κατεργασμένα δείγματα τοποθετούνται σε νέα αποστειρωμένα τρυβλία Petri, όπου ξεπλένονται τουλάχιστον τέσσερις φορές με 10 mL ζωμού σόγιας (Soya Casein Digest Lecithin Polysorbate Broth – SCDLP Broth). Το ξέπλυμα υποβάλλεται σε άμεση καταμέτρηση μέσω απαρίθμησης των κυτταρικών αποικιών (*cfu plate counting*) ύστερα από δέκα διαδοχικές αραιώσεις. Τελικά, 1 mL από κάθε αραιωμένο ξέπλυμα τοποθετείται σε δύο αποστειρωμένα τρυβλία, όπου προστίθενται 15-20 mL TSB ή LB άγαρ για *S. aureus* ή *E. coli*, αντίστοιχα, και για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο αριθμός των ζωντανών βακτηρίων εξάγεται ύστερα από απαρίθμηση των κυτταρικών αποικιών, σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$N = \frac{C \times D \times V}{A},$$

όπου N είναι ο αριθμός των ζωντανών βακτηρίων ανά μονάδα επιφανείας δείγματος (cm^2), C ο μέσος αριθμός από τα δύο τρυβλία του καταμετρούμενου αριθμού αποικιών, D ο παράγοντας διάλυσης, V ο όγκος ζωμού SCDLP που προστέθηκε κατά το ξέπλυμα, εκφρασμένος σε mL, και A η επιφάνεια σε cm^2 του φιλμ επικάλυψης.

Ως προς την αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα R των δειγμάτων, προκύπτει από την ακόλουθη σχέση:

$$R = (U_t - U_0) - (A_t - U_0) = U_t - A_t$$

όπου U_0 , U_t είναι η μέση τιμή των λογαρίθμων του αριθμού των ζωντανών βακτηρίων πάνω στις ακατέργαστες επιφάνειες αμέσως μετά την επώαση και μετά από 24 ώρες επώαση, αντίστοιχα και A_t η μέση τιμή των λογαρίθμων του αριθμού των ζωντανών βακτηρίων πάνω στις κατεργασμένες επιφάνειες μετά από 24 ώρες επώαση.

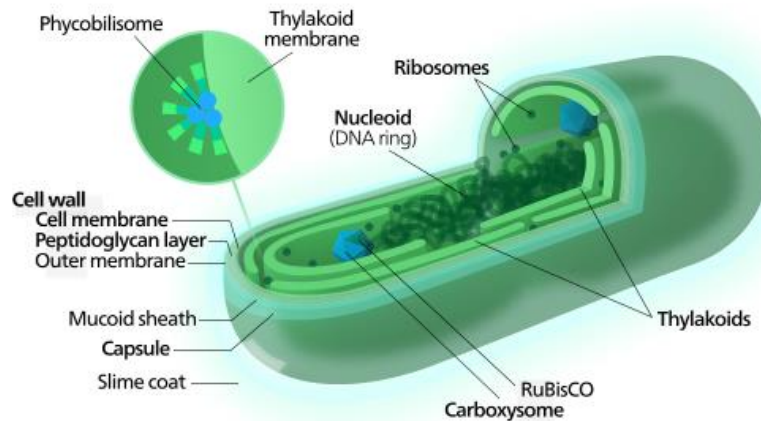
2.3 Κυανοβακτήρια

2.3.1 Μορφολογία και οικοσύστημα κυανοβακτηρίων

Τα κυανοβακτήρια αποτελούν προκαρυωτικούς αυτότροφους οργανισμούς, που αντλούν την ενέργειά τους μέσω της φωτοσύνθεσης. Η ονομασία τους προέρχεται από την παρουσία του συμπλόκου των φυκοβιλινών που συμβάλλουν στη φωτοσυνθετική διαδικασία. Η οξυγονογενής φωτοσυνθετική τους ιδιότητα, παρόμοια με εκείνη των ανώτερων φυτών, τα ξεχωρίζει από το μεγάλο πλήθος των φωτοσυνθετικών προκαρυωτικών οργανισμών [143].

Υπάρχουν αποδείξεις περί εμφάνισής τους πριν από περίπου 3.5 δισεκατομμύρια χρόνια, ύστερα από ερεύσεις απολιθωμάτων τους. Πιθανολογούνται ως οι πρώτοι οργανισμοί που παρείχαν οξυγόνο στη γήινη ατμόσφαιρα μέσω της φωτοσύνθεσης, αυξάνοντας σταδιακά την περιεκτικότητά της σε οξυγόνο, και μειώνοντας παράλληλα τη συγκέντρωσή της σε διοξείδιο του άνθρακα και μεθάνιο [144]. Η προκαλούμενη μείωση της επιφανειακής θερμοκρασίας και τα επαρκή επίπεδα οξυγόνου, συνέβαλαν στη μετέπειτα εξέλιξη της ζωής στη γη.

Ως προκαρυωτικοί οργανισμοί, τα κυανοβακτήρια στερούνται πυρήνα και εμφανών ενδομεμβρανιακών κυτταρικών οργανιδίων. Ανήκουν στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια και ως τέτοια, όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 2.1, αποτελούνται από μία εσωτερική κυτταρική μεμβράνη (κυτταροπλασματική), η οποία περιβάλλεται από ένα στρώμα πεπτιδογλυκάνης, πάχους 2-3 nm, πολύ πιο λεπτό συγκριτικά με το αντίστοιχο στα θετικά κατά Gram βακτήρια (30 nm) [145], και από μία εξωτερική μεμβράνη, αποτελούμενη από λιποπολυσακχαρίτες. Στερούνται μαστιγίου, ενώ η κίνησή τους πραγματοποιείται με τη βοήθεια κενοτόπιων που πληρούνται με αέριο και βοηθούν στην πλευστότητά τους. Αναπαράγονται με ένωση είτε με θραυσματοποίηση, ενώ συναντώνται ως μονοκύτταρες ή νηματοειδείς δομές [146]. Ο φωτοσυνθετικός μηχανισμός απαντάται στο σύστημα της θυλακοειδούς μεμβράνης του κυττάρου, ενώ στο σύνολό τους, οι κυτταρικές διεργασίες πραγματοποιούνται σε μεμβράνες και το υδαρές κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας και της εσωτερικής οργάνωσης ενός κυανοβακτηρίου [147].

Αναπτύσσονται σχεδόν σε κάθε χερσαίο και υδατικό περιβάλλον, όπως είναι οι ωκεανοί, λίμνες, ποτάμια, υγρό έδαφος, παράκτια συστήματα, όπως σε βράχια, αλλά και στο έδαφος. Μερικά είδη εμφανίζονται σε τελείως αφιλόξενα μέρη, όπως για παράδειγμα, σε θερμοπηγές με τη θερμοκρασία να υπερβαίνει τους $+85\text{ }^{\circ}\text{C}$, σε ερήμους, αρκτικές και ανταρκτικές λίμνες, αλλά και γενικότερα σε χιόνι και πάγο [148], καθώς και σε περιβάλλοντα υψηλής αλατότητας, όπως η Νεκρά Θάλασσα. Ορισμένα εξ'αυτών, μπορούν να επιβιώσουν σε καταστάσεις πλήρους έλλειψης φωτός, αναπτύσσοντας την ικανότητα ετεροτροφισμού [143].

2.3.2 Φωτοσύνθεση – Φωτοσυστήματα I και II

Η φωτοσύνθεση είναι ως γνωστόν, μια φυσικοχημική διαδικασία μέσω της οποίας τα φυτά και τα φωτοσυνθετικά βακτήρια μετατρέπουν την ηλιακή ενέργεια σε χημική, προκειμένου να συνθέσουν οργανικές ενώσεις. Τα φυτά και ορισμένα είδη βακτηρίων εκτελούν οξυγονική φωτοσύνθεση, κατά την οποία απελευθερώνεται οξυγόνο και δεσμεύεται διοξείδιο του άνθρακα, ενώ άλλα είδη βακτηρίων εκτελούν ανοξυγονική φωτοσύνθεση, χωρίς την παραγωγή οξυγόνου [149].

Παρ'όλο που η φωτοσυνθετική διαδικασία διαφοροποιείται αναλόγως του οργανισμού που την εκτελεί, ξεκινά πάντα με τη δέσμευση της ηλιακής ακτινοβολίας από ένζυμα, επονομαζόμενα ως *κέντρα αντίδρασης (reaction centers)*, τα οποία περιέχουν φωτοσυνθετικές χρωστικές, όπως είναι η *χλωροφύλλη* και τα *καροτενοειδή*. Τα ένζυμα αυτά συναντώνται σε δύο είδη πολυπρωτεϊνικών συμπλόκων, το *Φωτοσύστημα I* και το *Φωτοσύστημα II*, τα οποία βρίσκονται στις θυλακοειδείς μεμβράνες φυτών, αλγών και κυανοβακτηρίων [150]. Διαφοροποίηση παρατηρείται ως προς το χώρο εύρεσης των θυλακοειδών, όπου στα φυτά και τα άλγη βρίσκεται στους *χλωροπλάστες*, οργανίδια που αφθονούν στα κύτταρα των φύλλων τους, ενώ στα βακτήρια στην κυτταροπλασματική μεμβράνη τους [150].

Κατά τις *φωτεινές αντιδράσεις* της φωτοσυνθετικής διαδικασίας, πραγματοποιείται δέσμευση φωτός και μεταφορά ενέργειας στα κέντρα αντίδρασης που οδηγεί στην παραγωγή δύο μορίων, της NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) και της ATP (adenosine triphosphate), που χρησιμεύουν ως αποθήκες φύλαξης χημικής ενέργειας [149]. Πιο αναλυτικά, η απορρόφηση φωτεινής ακτινοβολίας πραγματοποιείται από τα μόρια της χρωστικής *χλωροφύλλης a (Chlorophyll a – Chl a)* στο κέντρο αντίδρασης του Φωτοσυστήματος II, τα οποία διεγερόμενα χάνουν ηλεκτρόνια. Προς αναπλήρωση της απώλειας των ηλεκτρονίων, αποσπώνται ηλεκτρόνια από τα μόρια νερού μέσω *φωτόλυσης*. Πρόκειται για ένα φαινόμενο που συμβάλλει στη συντήρηση της φωτοσυνθετικής διαδικασίας, καθώς το νερό κατά το διαχωρισμό του, αποτελεί την πηγή των ηλεκτρονίων, ενώ παράλληλα, απελευθερώνεται το πολύτιμο για τη ζωή οξυγόνο ως απόβλητο προϊόν [149]. Εν συνεχεία, τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται μέσω της *αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων (electron transport chain)*, δηλαδή μιας σειράς συμπλόκων εντός της θυλακοειδούς μεμβράνης, που περιλαμβάνει και το ενδιάμεσο πρωτεϊνικό σύμπλοκο *κυτόχρωμα b₆/f*, στο *Φωτοσύστημα I*, προς παραγωγή NADPH από την NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate). Η ενέργεια που δεσμεύεται από τους αποδέκτες των ηλεκτρονίων, χρησιμοποιείται μέσω μιας διαδικασίας που ονομάζεται *φωτοφωσφορυλίωση*, για τη διοχέτευση πρωτονίων H⁺ προς σύνθεση της ATP λόγω της δημιουργούμενης διαφοράς δυναμικού μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού του θυλακοειδούς [149].

Κατά το δεύτερο στάδιο της φωτοσύνθεσης, λαμβάνουν χώρα οι *σκοτεινές αντιδράσεις*. Σύμφωνα με αυτές, πραγματοποιείται δέσμευση του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα, το οποίο συνδυαστικά με τη δράση των NADPH και ATP συντελεί στη σύνθεση υδρογονανθράκων προς ικανοποίηση των απαραίτητων για την επίβιωση λειτουργιών των φυτών ή των βακτηρίων [149].

Η φωτοσύνθεση είναι υπεύθυνη για την παραγωγή και διατήρηση των επιπέδων του οξυγόνου στη γήινη ατμόσφαιρα, και παρέχει όλα τα οργανικά προϊόντα και την πλειοψηφία της ενέργειας που είναι απαραίτητη για τη διαβίωση της βιόσφαιρας. Είναι χαρακτηριστικό ότι το 99% της βιομάζας προέρχεται από τη φωτοσυνθετική διαδικασία, αποτελώντας έτσι το μοναδικό γήινο μηχανισμό δέσμευσης και μετατροπής της αστείρευτης ηλιακής ενέργειας σε άμεσα (αυτότροφοι οργανισμοί) είτε έμμεσα (ετερότροφοι οργανισμοί) αξιοποιήσιμη χημική ενέργεια από τους ζωντανούς οργανισμούς [151].

2.4 Πρότυπη μέθοδος προσδιορισμού αντιβακτηριακής δράσης με φθορισμό χλωροφύλλης a κυανοβακτηρίων

Στο κεφάλαιο αυτό (παράγραφος 2.2), παρουσιάστηκαν αρκετές μέθοδοι προσδιορισμού της βακτηριοκτόνου δράσης μιας επιφάνειας, οι οποίες διαχωρίζονται σε δύο ευρύτερες κατηγορίες, σε ποιοτικές και σε ποσοτικές, έχοντας ως κοινό στοιχείο το γεγονός ότι αποτελούν *in vitro* τεχνικές.

Οι ποιοτικές μέθοδοι, όπως είναι η διάχυση σε άγαρ (*agar diffusion method*) προς προσδιορισμό του εύρους της ζώνης αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης περιμετρικά του δείγματος, στερούνται ακρίβειας και είναι κατά βάση προσεγγιστικές τεχνικές, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή κάποιων αρχικών συμπερασμάτων. Συγκριτικές μελέτες θεωρούνται αξιόπιστες για πειράματα μεταξύ ίδιων υποστρωμάτων, βακτηρίων, αλλά και συνθηκών, καθώς σημαντικό ρόλο διαδραματίζει η ιδιαιτερότητά τους στην έκβαση του αποτελέσματος. Για παράδειγμα,

στη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ, για τον προσδιορισμό της ζώνης αναστολής βακτηριακής ανάπτυξης, θα πρέπει να συνυπολογίζεται το μέγεθος των σχηματιζόμενων αποικιών, το βάρος του δείγματος υπό εξέταση, καθώς και το είδος του αντιβακτηριακού παράγοντα λόγω διαφορετικού βαθμού διάχυσης αλλά και για να μην αντιδρά με το άγαρ ([152], [153]).

Οι ποσοτικές μέθοδοι παρουσιάζουν σίγουρα μεγαλύτερη αξιοπιστία, γι' αυτό και χρησιμοποιούνται ευρύτερα. Βασικό τους μειονέκτημα είναι το γεγονός ότι δεν απεικονίζουν τις πραγματικές συνθήκες πειράματος, καθώς η βακτηριακή ανάπτυξη παρατηρείται σε ευνοημένο θρεπτικό περιβάλλον και επίπεδο υγρασίας.

Ως μια άλλη μέθοδος ποσοτικής μελέτης της ανάπτυξης ενός φωτοσυνθετικού οργανισμού, εμφανίζεται η μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού από φθορίζουσες ουσίες. Κατ' αναλογία, είναι δυνατή η μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* (*Chlorophyll a – Chl a*) των φωτοσυνθετικών οργανισμών, που μας πληροφορεί εκτός από το μηχανισμό λειτουργίας και τους παράγοντες επίδρασης στη φωτοσύνθεση, για την ίδια την πορεία ανάπτυξής τους. Η αντιστοιχία αυτή μεταξύ φωτοσυνθετικής απόδοσης και πληθυσμού αυτότροφων φωτοσυνθετικών οργανισμών, είναι άμεση αφού υψηλότερες διατροφικές ανάγκες σε ένα πληθυσμό είναι ενδεικτικές αυξητικών τάσεων.

Ειδικότερα, επειδή στα κυανοβακτήρια το σύστημα φωτοσύνθεσης είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με τις βασικές μεταβολικές τους διαδικασίες, η μέτρηση φθορισμού της χλωροφύλλης μπορεί να παράσχει σε πραγματικό χρόνο άμεσες πληροφορίες τόσο για την ίδια τη φωτοσυνθετική τους ιδιότητα όσο και για το γενικότερο εγκλιματισμό τους στο εκάστοτε περιβάλλον και συνθήκες, αποτελώντας έτσι σημαντικό γνώμονα μελέτης της ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού.

Προς μέτρηση του φθορισμού με χρήση φθορισμόμετρου, χρησιμοποιούνται όργανα τροποποιημένου παλμού ή συνεχούς διέγερσης. Και στις δύο περιπτώσεις, θα πρέπει να ικανοποιούνται οι βασικές αρχές λειτουργίας τους, δηλαδή η ευαισθησία του οργάνου στα μήκη κύματος φθορισμού, καθώς και η αποκοπή μικρότερων μηκών κύματος, προερχόμενων από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία της πηγής φωτισμού.

Στην παρούσα εργασία προτείνεται μια νέα ποσοτική μέθοδος μέτρησης της βακτηριοκτόνου δράσης επιφανειών, που στηρίζεται στον προσδιορισμό του εκπεμπόμενου φθορισμού της φωτοσυνθετικής χρωστικής *Chl a* των κυανοβακτηρίων.

Πρόκειται για *in vivo* τεχνική, που σε αντίθεση με τις προαναφερόμενες *in vitro*, δεν απαιτεί συμβατότητα με το άγαρ ούτε εξαρτάται από το βαθμό διάχυσης του αντιβακτηριακού παράγοντα, καθώς δε χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό. Επιπρόσθετα, αποτελεί και μία *in situ* τεχνική, γεγονός που εξασφαλίζει το σημαντικό πλεονέκτημα να πραγματοποιείται σε συνθήκες που προσομοιάζουν τις συνθήκες χρήσης της εκάστοτε επιφάνειας. Τέλος, χαρακτηρίζεται από καθολικότητα, αφού δεν παρουσιάζει εξάρτηση από το συγκεκριμένο είδος της επιφάνειας ή του βακτηρίου, και αφορά όλα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια [154], ενώ είναι ιδιαίτερα εύκολη στην εφαρμογή της, λιγότερο χρονοβόρα και οικονομική.

Η διαδικασία μέτρησης του φθορισμού, περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 3.7 του επόμενου κεφαλαίου, καθώς και η συσκευή μέτρησης, μαζί με την αρχή λειτουργίας της. Μετά τη λήψη της τιμής του φθορισμού F_0 της χλωροφύλλης *a*, προκειμένου να διαπιστωθεί η εξέλιξη της ανάπτυξης του βακτηριακού πληθυσμού, υπολογίζεται ο παράγοντας M_i , που εκφράζει την επί τοις εκατό μεταβολή του φθορισμού F_0 των κυανοβακτηρίων ύστερα από *i* ημέρες επώασης πάνω στην επιφάνεια του δείγματος, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$M_i = \frac{F_{0i} - F_{00}}{F_{00}} \times 100,$$

όπου F_{00} είναι η τιμή φθορισμού της χλωροφύλλης *a* σε μηδενικό χρόνο επαφής, και F_{0i} είναι η αντίστοιχη τιμή φθορισμού κατά την *i*-οστή ημέρα.

Ακόμη, η αντιβακτηριακή δραστηριότητα του δείγματος την *i*-οστή ημέρα, προκύπτει από το Δείκτη Βακτηριακής Προστασίας (ΔΒΠ) (Bacterial Protection Index - BPI) Π_i , σύμφωνα με τη σχέση:

$$\Pi_i = \frac{M_{U_i} - M_{T_i}}{M_{U_i}} \times 100,$$

όπου M_{U_i} , M_{T_i} είναι η επί τοις εκατό μεταβολή στην τιμή του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* των κυανοβακτηρίων την *i*-οστή ημέρα, πάνω σε ακατέργαστες και σε κατεργασμένες επιφάνειες, αντίστοιχα.

Η άμεση συσχέτιση της ποσότητας F_0 με το βακτηριακό πληθυσμό, αποδείχτηκε πρόσφατα από τους Heliopoulos et al. [155], οι οποίοι χρησιμοποιώντας τα

κυανοβακτήρια πάνω σε ακατέργαστες μάλλινες επιφάνειες απέδειξαν ότι αύξηση του δείκτη M_i μπορεί να παρατηρηθεί μόνο σε καλλιέργειες βακτηρίων που διατηρούν την ικανότητα να πολλαπλασιάζονται. Η αξιοπιστία της μεθόδου επιβεβαιώθηκε περαιτέρω μετά από σύγκριση με τα αποτελέσματα από το καθιερωμένο πρωτόκολλο AATCC 100-2004 [156] για τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράση σε υφάσματα. Συγκεκριμένα, για διάφορες συγκεντρώσεις χαλκού (Cu^{+2}) σε μάλλινες επιφάνειες, τόσο η παράμετρος της αντιβακτηριακής αποτελεσματικότητας R_{24} του πρωτόκολλου AATCC 100-2004, όσο και ο Δείκτης Βακτηριακής Προστασίας Π_7 της προτεινόμενης μεθόδου, απέδωσαν μείωση του βακτηριακού πληθυσμού με την αύξηση της συγκέντρωσης του χαλκού, με το Δείκτη Βακτηριακής Προστασίας, να παρουσιάζει μάλιστα μεγαλύτερη ευαισθησία.

3. Υλικά, πειραματικές διατάξεις και μέθοδοι

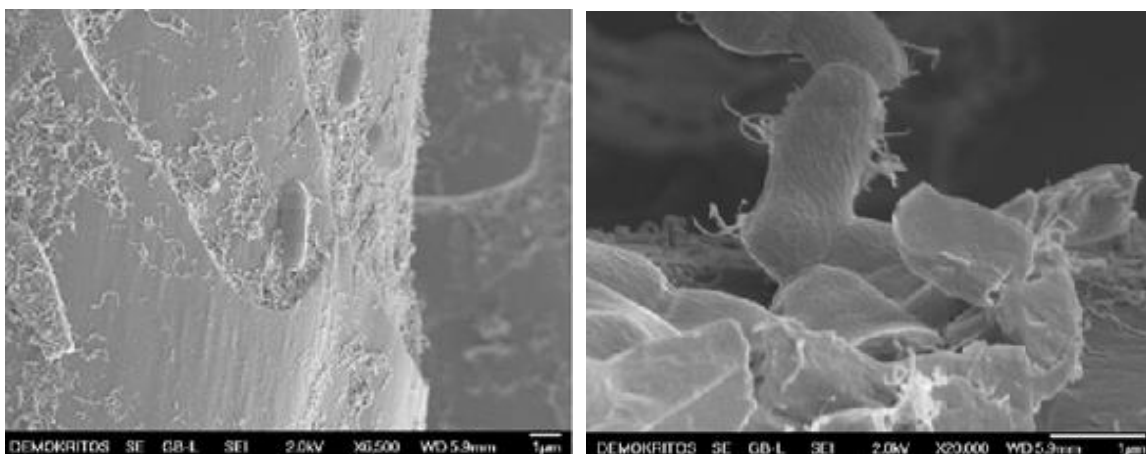
Στο παρόν κεφάλαιο θα παρουσιαστούν αρχικά τα υλικά και το είδος των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Στη συνέχεια, θα περιγραφούν οι πειραματικές διατάξεις για την κατασκευή και το χαρακτηρισμό των επιφανειών, και τη μελέτη της προσκόλλησης και ανάπτυξης των βακτηρίων, ενώ τέλος, θα εκτεθούν οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν τόσο για την καλλιέργεια των βακτηρίων, όσο και για τη μελέτη της δράσης των επιφανειών ενάντια σε αυτά (μη προσκολλητικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες).

3.1 Υλικά και βακτήρια

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν κατασκευασμένες από πολυ(μεθακρυλικό-μεθυλεστέρα) (Poly(methyl methacrylate) – PMMA), γνωστός με μια πλειάδα εμπορικών ονομασιών, όπως Plexiglas ή Acrylite, αναλόγως της ακριβούς σύνθεσής του. Πρόκειται για ένα διαφανές πολυμερές, με απουσία κρυσταλλικής δομής, που εντάσσεται τεχνικά στην κατηγορία των γυαλιών. Αποτελεί θερμοπλαστικό χαμηλού μοριακού βάρους, με θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης T_g κυμαινόμενη από 85°C έως 165°C, αναλόγως της σύστασής του. Στην παρούσα εργασία, οι επιφάνειες PMMA που χρησιμοποιήθηκαν διέθεταν θερμοκρασία υαλώδους μετάβασης $T_g \cong 119^\circ\text{C}$. Όλες τους διατέθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σε μορφή οπτικά διάφανων πλακιδίων πάχους 2 mm, από την ισπανική εταιρεία IRPEN.

Για τον προσδιορισμό των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των επιφανειών PMMA, χρησιμοποιήθηκαν τα κυανοβακτήρια *Synechococcus* sp PCC 7942 (Εικόνα 3.1), προερχόμενα από τη συλλογή μικροοργανισμών και καλλιιεργειών κυττάρων

“Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM)” του Ινστιτούτου “Pasteur” στο Παρίσι της Γαλλίας. Πρόκειται για βακτήρια που η τυπική καμπύλη ανάπτυξής τους σε υγρό θρεπτικό μέσο BG11 pH 7.5, υπό λευκό φως ($100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) και διαρκή ανάδευση, διαρκεί περίπου 7 ημέρες, με την 1^η ημέρα να αντιστοιχεί στη φάση υστέρησης (*lag phase*), ακολουθούμενη από την εκθετική φάση ανάπτυξής τους μέχρι και την 6^η ημέρα, μετά την οποία, εισάγονται ομαλά στη σταθερή τους φάση.



Εικόνα 3.1: Εικόνες SEM κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp PCC 7942 για διαφορετικές μεγεθύνσεις (από αριστερά: $\times 500$ και $\times 20\ 000$), από όπου φαίνεται ότι το μήκος του είναι περίπου $3.25 \mu\text{m}$, και το πάχος του $0.75 \mu\text{m}$.

3.2 Επιφανειακή κατεργασία και τροποποίηση

3.2.1 Τεχνολογία πλάσματος

Το πλάσμα έχει καθιερωθεί ως μία από τις τέσσερις καταστάσεις της ύλης, με τις υπόλοιπες να είναι οι γνωστές σε όλους, στερεά, υγρή και αέρια. Προσομοιάζει με την αέρια ως προς το ότι δε διαθέτει συγκεκριμένο σχήμα και όγκο, διαφέρει όμως ουσιαστικά λόγω της σύστασής του από άτομα, ορισμένα από τα οποία έχουν απωλέσει κάποια ή όλα τα ηλεκτρόνια τους, αφήνοντας θετικά φορτισμένους πυρήνες μαζί με ελεύθερα ηλεκτρόνια να κινούνται χωρίς περιορισμό. Αποτελεί επόμενως ένα μίγμα από ιόντα, ηλεκτρόνια και ουδέτερα σωματίδια, το οποίο στο σύνολό του είναι ηλεκτρικά ουδέτερο.

Παράγεται κατά τη θέρμανση ενός αερίου ή την υποβολή του σε ισχυρό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο με την εφαρμογή λέιζερ ή γεννήτριας μικροκυμάτων σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 5×10^3 °C. Τα παραγόμενα ιόντα και φορτισμένα σωματίδια, παρά του ότι είναι ελεύθερα υπό την έννοια της διάσπασης των ατομικών δεσμών, υπόκεινται στην επίδραση ηλεκτρομαγνητικών δυνάμεων που δημιουργούνται κατά την κίνηση ενός φορτισμένου σωματιδίου. Έτσι, σε αντίθεση με ένα μη ιονισμένο αέριο, το πλάσμα είναι ηλεκτρικά αγώγιμο, γεγονός που του επιτρέπει τη δημιουργία μαγνητικού πεδίου και την αλληλεπίδρασή του με άλλα ηλεκτρομαγνητικά πεδία.

Σε αφθονία απαντάται στο σύμπαν, καθώς αποτελεί την πιο συνηθισμένη κατάσταση της ύλης, συνθέτοντας τον ήλιο και τα υπόλοιπα αστέρια. Άλλες περιπτώσεις εμφάνισής του είναι ο ηλιακός άνεμος, ένα ρεύμα φορτισμένων σωματιδίων και κυρίως πρωτονίων, που προσκρούουν στο μαγνητικό πεδίο της γης, ενώ εμφανίζεται επίσης και στην ανωτερη ατμόσφαιρα της γης, με ένα από τα πιο γνωστά φαινόμενα εκδήλωσής του, το βόρειο σέλας (*Aurora Australis/Aurora Borealis*), το οποίο είναι στην ουσία αποτέλεσμα ιονισμού της ατμόσφαιρας στα χαμηλά γεωγραφικά πλάτη από την έλευση του ηλιακού ανέμου.

Μία από τις μεθόδους τεχνητής παρασκευής πλάσματος περιλαμβάνει τη δημιουργία ηλεκτρικής εκκένωσης εντός θαλάμου υπό κενό σε αντιδραστήρα πλάσματος, κατά τον ιονισμό του περιεχόμενου αερίου με την εφαρμογή υψηλής τάσης στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων. Από τα παραγόμενα προϊόντα (ιόντα, ηλεκτρόνια, ελεύθερες ρίζες, ουδέτερα σωματίδια και φωτόνια), τα ηλεκτρόνια λόγω της μικρής τους μάζας αποκτούν ικανή κινητική ενέργεια ώστε να συγκρούονται με άλλα άτομα ή μόρια και με αυτό τον τρόπο, να εκκινούν τη δημιουργία πλάσματος. Συνεπώς, ο βαθμός ιονισμού του πλάσματος καθορίζεται από τη θερμοκρασία των ηλεκτρονίων, που είναι ανάλογη της ενέργειας ιονισμού, και κυμαίνεται συνήθως στην περιοχή των 1-10 eV, σημαντικά υψηλότερη έως και 4 τάξεις μεγέθους από τη μέση θερμοκρασία του αερίου, που αντιστοιχεί στη θερμοκρασία περιβάλλοντος ($T \approx 300$ K). Είναι απαραίτητο η θερμοκρασία των ηλεκτρονίων να διατηρείται υψηλή, έτσι ώστε να συντηρείται ο ιονισμός του αερίου και η παραγωγή πλάσματος.

Η κατεργασία της επιφάνειας ενός υποστρώματος με χρήση πλάσματος πραγματοποιείται κυρίως από τα θετικά ιόντα και/ή από τα ενεργά ουδέτερα συστατικά. Πιο αναλυτικά, η επιφάνεια του δείγματος, όπως βέβαια και κάθε επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με τα ηλεκτρόνια, φορτίζεται αρνητικά εξαιτίας της υψηλής κινητικής ενέργειας με την οποία προσπίπτουν σε αυτή τα ηλεκτρόνια. Το γεγονός αυτό εξαναγκάζει τα θετικά ιόντα να επιταχυνθούν προς το δείγμα, συγκρουόμενα συνήθως κάθετα μαζί του, προκαλώντας μηχανικής φύσεως κατεργασία της επιφάνειας. Τα ενεργά ουδέτερα συστατικά επιδρούν με χημικό τρόπο στην επιφάνεια του υποστρώματος, αλληλεπιδρώντας μέσω σύναψης χημικών δεσμών με τα μόρια της επιφάνειας. Τα αρνητικά ιόντα δε συμμετέχουν στην επεξεργασία της επιφάνειας, παρά καταναλώνονται σε αντιδράσεις απόσπασης ή επανασυνδέονται με θετικά ιόντα, όντας ανίκανα να διαφύγουν από το πλάσμα λόγω της χαμηλής κινητικής τους ενέργειας. Καθ'όλη τη διάρκεια της ηλεκτρικής εκκένωσης, πραγματοποιείται παραγωγή φωτονίων, ενδεικτική του εκπεμπόμενου φωτός, κατά την αποδιέγερση σε χαμηλότερες ενεργειακές καταστάσεις ατόμων και μορίων.

Οι διεργασίες που πραγματοποιούνται με τεχνολογία πλάσματος μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις βασικές διαδικασίες, την εγχάραξη, την εναπόθεση και την τροποποίηση της επιφάνειας του δείγματος. Η εγχάραξη της επιφάνειας συνίσταται στην αφαίρεση υλικού μέσω απελευθέρωσης πτητικών προϊόντων που παράγονται κατά την αντίδραση μεταξύ χημικά ενεργών ομάδων, ενώ η εναπόθεση συμβάλλει στη δημιουργία λεπτών υμενίων πάνω στην υπάρχουσα επιφάνεια. Η τροποποίηση με χρήση πλάσματος, που αποτελεί τη μέθοδο που χρησιμοποιείται στη συγκεκριμένη εργασία για την παρασκευή μικρο-νανοϋφασμένων υπερυδρόφοβων επιφανειών, προσθέτει μέσω χημικών αντιδράσεων λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια του δείγματος.

Συγκεκριμένα, η τροποποίηση ενός δείγματος με πλάσμα διαφοροποιείται από την εγχάραξη και την εναπόθεση ως προς το ότι δεν μειώνει ούτε αυξάνει τη μάζα του υποστρώματος, αλλά στοχεύει σε μια επιφανειακή χημική ή φυσική, είτε ταυτόχρονη κατεργασία, βάθους της τάξης ορισμένων νανομέτρων. Με αυτό τον τρόπο, είναι δυνατή η αλλαγή των επιφανειακών ιδιοτήτων μιας επιφάνειας και η δημιουργία τοπογραφίας προς απόκτηση για παράδειγμα, ελεγχόμενων ιδιοτήτων διαβροχής. Άλλες εφαρμογές αφορούν την οξειδωση επιφανειών, την ενσωμάτωση πολικών

ομάδων σε πολυμερή, τον καθαρισμό από μολυσματικούς παράγοντες, την πρόσδεση βιομορίων και τη δημιουργία συνάφειας με επιλεκτικά υλικά [157]. Το μεγάλο εύρος εφαρμογών της συγκεκριμένης διεργασίας, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα χρήσης μεγάλης ποικιλίας αερίων, ευγενών ή μη (O_2 , N_2 , NH_3 , N_2/H_2 , Ar , He) σε χαμηλές θερμοκρασίες και την αποφυγή υγρών διαλυτών, έχει ενισχύσει σημαντικά την επιλογή της ως τεχνική επιφανειακής φυσικής ή/και χημικής κατεργασίας.

Από το πανόραμα των διαθέσιμων τεχνολογιών για τη δημιουργία νανοϋφανσης στην επιφάνεια των υλικών, η χρήση τεχνολογίας πλάσματος (*plasma nanotexturing*) αναδεικνύεται για την οικονομία χρόνου, την ακρίβεια και ευχέρεια ελέγχου κατά την εφαρμογή της, καθώς και τη σχετική απλότητα στο χειρισμό της.

3.2.1.1 Αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP (Inductively Coupled Plasma)

Ο αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης διαθέτει ως αρχή λειτουργίας τη δημιουργία από επαγωγή αζιμουθιακού ηλεκτρικού πεδίου, που κατευθύνει τα ηλεκτρόνια, τα οποία επιταχυνόμενα παράγουν πλάσμα. Το επαγόμενο ηλεκτρικό πεδίο προκαλείται από χρονικώς μεταβαλλόμενα μαγνητικά πεδία, τα οποία με τη σειρά τους έχουν δημιουργηθεί από μεταβαλλόμενα ρεύματα ραδιοσυχνοτήτων (RF currents). Βασικές εφαρμογές βρίσκει σε διαδικασίες εγχάραξης και εναπόθεσης διαφόρων υλικών.

Πρόκειται για αντιδραστήρα σχετικά υψηλής πυκνότητας ηλεκτρονίων, τάξης μεγέθους των $10^{10} - 10^{13} \text{ cm}^{-3}$, που αντιστοιχεί σε θερμοκρασίες πλάσματος ηλεκτρονίων μεταξύ 10 000 – 60 000 K. Η μεγάλη συγκέντρωση ιόντων εξασφαλίζει ανισοτροπική εγχάραξη, καθώς η υψηλή πυκνότητα ηλεκτρονίων αυξάνει την αναλογία ιόντων προς ουδέτερων ατόμων που συμμετέχουν στη διαδικασία της εγχάραξης, ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την επιλεκτικότητα στην εγχάραξη και τον έλεγχο της κρίσιμης διάστασης (Critical Dimension – CD). Επιπλέον, οι αντιδραστήρες τέτοιου είδους μπορούν να λειτουργήσουν σε χαμηλές πιέσεις, καθώς η σχετικά υψηλή

πυκνότητα ηλεκτρονίων επιτρέπει τη διατήρηση της ανισοτροπίας καθώς και των υψηλών ρυθμών εγχάραξης.



Εικόνα 3.2: Ο αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP του εργαστηρίου MET της Alcatel και επάνω αριστερά, ο κυρίως θάλαμός του σε μεγέθυνση.

Ο αντιδραστήρας που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν MET (Micromachining Etch Tool) της Alcatel. Όπως μπορούμε να δούμε στην Εικόνα 3.2, αποτελείται από τον προθάλαμο, τον κύριο θάλαμο και διάφορες επιμέρους μονάδες που καθορίζουν τις συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα. Αναλυτικότερα, περιλαμβάνει μια κεντρική μονάδα που ελέγχει βασικές διαδικασίες, όπως είναι η δημιουργία κενού στον προθάλαμο, η διοχέτευση νερού προς ψύξη της κεραίας και η μεταφορά του δισκίου από και προς τον προθάλαμο, ένα σύστημα ελέγχου πίεσης, καθώς επίσης και θερμοκρασίας μέσα στον κυρίως θάλαμο. Επιπλέον, διαθέτει μονάδα ρύθμισης ισχύος της γεννήτριας και του δυναμικού (bias), ρυθμιστές ροής των αερίων,

ενδείξεις πίεσης του προθαλάμου και του κυρίως θαλάμου, καθώς και σύστημα ενημέρωσης για την κατάσταση των αντλιών. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3-1), φαίνονται τα χαρακτηριστικά μεγέθη του αντιδραστήρα και οι περιοχές λειτουργίας τους.

Πίνακας 3-1: Χαρακτηριστικά μεγέθη και περιοχές λειτουργίας του αντιδραστήρα πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP

Μέγεθος	Όρια λειτουργίας
Ισχύς πλάσματος (W)	$\leq 2\ 000$
Τάση δυναμικού πόλωσης (V) - Ισχύς δυναμικού πόλωσης (W)	$< -300 - [0, 250]$ < -100 με O_2
Πίεση αερίου (mTorr)	5 - 100
Θερμοκρασία ηλεκτροδίου ($^{\circ}C$)	(-150) – (+50)
Ροή αερίου O_2 (sccm)	0 - 200
Ρυθμός εγχάραξης (σε πολυμερή) ($\mu m/min$)	0.2 – 2.5

Αναλυτικότερα, η ισχύς της γεννήτριας μπορεί να λάβει τιμές στην περιοχή 0-2 000 W, δημιουργούμενη από ρεύματα ραδιοσυχνότητας (RF currents). Μια επιχαλκωμένη κεραία τύπου Helicon μονής σπείρας, επιτρέπει τη διασύνδεση της γεννήτριας με την πηγή πλάσμα. Η κεραία αυτή ψύχεται με νερό και καταλήγει σε αυτόματο δίκτυο ρυθμιζόμενης ειδικής αντίστασης που επιτρέπει την παραγωγή εναλλασσόμενου μαγνητικού πεδίου, συχνότητας 13.56 MHz. Εν συγκρίσει με άλλους αντιδραστήρες, η λειτουργία σε συχνότητα των 13.56 MHz προσφέρει το πλεονέκτημα υψηλότερης απόδοσης ισχύος.

Το δυναμικό του υποστρώματος (substrate bias) ορίζεται από μια πηγή ραδιοκυμάτων (RF) και λαμβάνει τιμές εντός της περιοχής -250 – 0 V, χωρίς όμως ποτέ στην ουσία να λαμβάνει τιμές μεγαλύτερες των -100 V (για αέριο O_2). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια, κινούμενα με μεγαλύτερες ταχύτητες σε σχέση με τα ιόντα, φορτίζουν αρνητικά την επιφάνεια του δείγματος, δημιουργώντας με αυτό τον τρόπο αρνητικό δυναμικό. Η συνεχόμενη παραγωγή ηλεκτρονίων μειώνει το δυναμικό, ενώ παράλληλα δημιουργεί σταδιακά στην επιφάνεια ηλεκτρικό πεδίο που απωθεί την

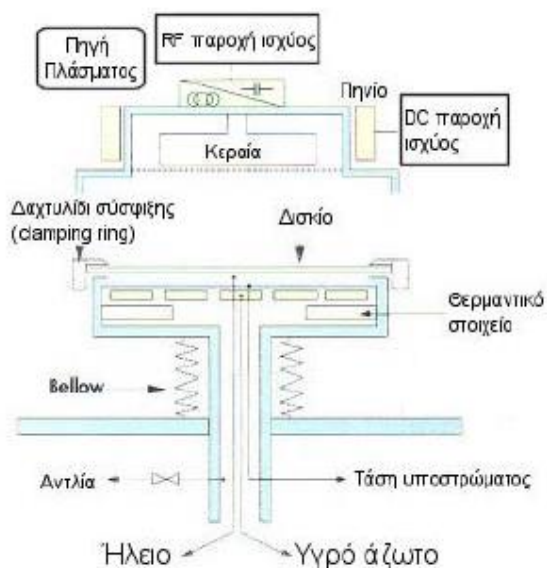
έλευση περισσότερων ηλεκτρονίων, ενώ έλκει τα ιόντα. Με την εξισορρόπηση της ροής των ηλεκτρονίων από τη ροή των ιόντων, παύει η αύξηση της τιμής του δυναμικού, το οποίο λαμβάνει μια αρνητική τάση πόλωσης (DC bias), που αντιστοιχεί στο δυναμικό πλάσματος και είναι περίπου ίση με -20 V.

Η θερμοκρασία του υποστρώματος μπορεί να λάβει τιμές από -150°C έως +50°C και ρυθμίζεται με τη βοήθεια υγρού άζωτου, το οποίο αναλαμβάνει την ψύξη του, ή μέσω θερμαντικών αντιστάσεων που το θερμαίνουν. Η πίεση καθορίζεται από τον έλεγχο μιας βαλβίδας, την οποία ανοίγουμε ή κλείνουμε, μειώνοντας ή αυξάνοντας αντίστοιχα την τιμή της πίεσης εντός του θαλάμου σε ένα εύρος 5-100 mTorr.

Κατά την εκκίνηση μιας τυπικής διεργασίας εγχάραξης ή εναπόθεσης στον αντιδραστήρα ICP, τα δείγματα τοποθετούνται αρχικά εντός του προθαλάμου. Συγκεκριμένα, εναποτίθενται πάνω σε ειδικό βραχίονα, κατάλληλα σχεδιασμένο ώστε να δέχεται δισκία διαμέτρου 4'', ο οποίος θα αναλάβει στη συνέχεια τη μεταφορά τους προς τον κυρίως θάλαμο. Σε περίπτωση που το δείγμα είναι δισκίο 3'' ή και μικρότερων διαστάσεων, τότε θα πρέπει να προηγηθεί επικόλλησή του σε δισκίο πυριτίου 4'' ή σε βάση από ανοδιωμένο αλουμίνιο, με χρήση θερμικής κόλλας, η οποία εξασφαλίζει την ομοιόμορφη μεταφορά θερμότητας από το δισκίο προς το δείγμα. Πριν τη μεταφορά των δειγμάτων στον κυρίως θάλαμο, είναι απαραίτητη η δημιουργία κενού εντός του προθαλάμου, το οποίο επιτυγχάνεται με τη λειτουργία δύο αντλίων, μιας μηχανικής η οποία ξεκινάει την άντληση πρώτη, και μιας τυρβομοριακής, η οποία λειτουργεί στη συνέχεια ενισχυτικά μαζί τη μηχανική, έως ότου η πίεση να κατέβει σε τιμές μικρότερες είτε ίσες των 10^{-4} mbar.

Το δισκίο καταλήγει στον κυρίως θάλαμο, όπου και θα πραγματοποιηθεί η κατεργασία πλάσμα. Ο βραχίονας το εναποθέτει σε κατάλληλο υποδοχέα υποστρώματος (substrate holder) στο κάτω μέρος του θαλάμου, και μετά την αποχώρησή του προς τον προθάλαμο, το υπόστρωμα σταθεροποιείται μηχανικά. Το υπόστρωμα θερμαίνεται μέσω αντιστάσεων και ψύχεται με υγρό άζωτο, ενώ προς περαιτέρω εξασφάλιση της επιθυμητής θερμοκρασίας, εισάγεται ήλιο υπό πίεση, το οποίο διευκολύνει τη μεταφορά θερμότητας μεταξύ του υποστρώματος και της ψυχρής υποδοχής του. Να σημειωθεί πως για τη λειτουργία των ηλεκτρικών εξαρτημάτων του αντιδραστήρα χρησιμοποιείται αέριο άζωτο. Έτσι λοιπόν, μετά την ασφάλιση του δισκίου και την επιβεβαίωση ότι έχουν ρυθμιστεί σωστά όλες οι απαιτούμενες συνθήκες (ισχύς κεραίας

και δυναμικού, πίεση και θερμοκρασία), το υπόστρωμα μετακινείται σε υψηλότερη θέση, έτσι ώστε το δισκίο να βρίσκεται πιο κοντά στην πηγή πλάσματος.



Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού του κυρίως θαλάμου ενός αντιδραστήρα ICP.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η κατεργασία με πλάσμα εντός του θαλάμου (Εικόνα 3.3), είναι απαραίτητη η εξασφάλιση ορισμένων συνθηκών. Οι συνθήκες κενού αντιστοιχούν σε τιμές πίεσης μικρότερες είτε ίσες των 10^{-6} mbar για την πραγματοποίηση όσο το δυνατόν πιο “καθαρών” διεργασιών χωρίς τροφοδοσία αερίου. Για το λόγο αυτό, λειτουργούν ταυτόχρονα δύο αντλίες, μία μηχανική και μια τούρμπομοριακή. Στο θάλαμο μπορούν να εισαχθούν από ένα έως και τέσσερα αέρια, με την επιθυμητή σειρά και διάρκεια, και με ροή ρυθμιζόμενη από την κεντρική μονάδα του αντιδραστήρα. Η πηγή πλάσματος βρίσκεται στο άνω μέρος του θαλάμου και τα αέρια διαχέονται εντός αυτού, ενώ η ανοδίσωση του εσωτερικού του, εξασφαλίζει την προστασία του από τυχόν διαβρωτικά αέρια, αλλά και την προστασία της καθαρότητας των διεργασιών. Οι εκτιμώμενες πυκνότητες ρεύματος ιόντων/ηλεκτρονίων στο δείγμα είναι της τάξεως των $0.5-2 \text{ mA/cm}^2$. Στη διατήρηση αυτών των υψηλών τιμών

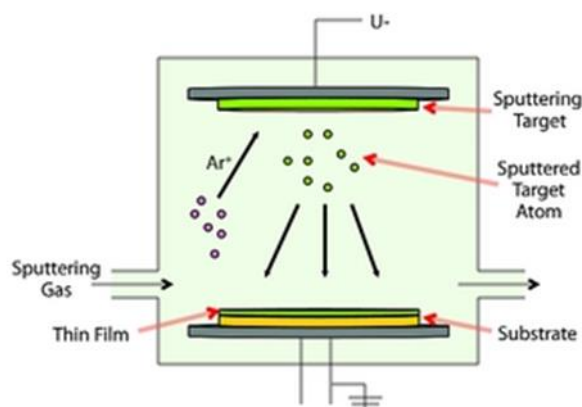
πυκνοτήτων, συμβάλλουν δύο πολυπολικά συστήματα ραβδόμορφων μαγνητών σε διάταξη NS-SN, τοποθετημένα εκατέρωθεν του θαλάμου, τα οποία αποτρέπουν την απώλεια ηλεκτρονίων στα τοιχώματά του, εξαναγκάζοντάς τα να κατευθυνθούν προς τον κύριο όγκο του πλάσματος, όπου και ανατροφοδοτούν το παραγόμενο πλάσμα.

Σημαντικό πλεονέκτημα ενός αντιδραστήρα ICP είναι η δυνατότητα που παρέχει ανεξάρτητου ελέγχου της ισχύος της πηγής και της ισχύος του δυναμικού (bias voltage), που καθορίζουν τη συγκέντρωση των ιόντων και την ιοντική ενέργεια αντίστοιχα. Με αυτό τον τρόπο, καθίσταται εφικτή η αύξηση των ιόντων που συμμετέχουν στη διεργασία εγχάραξης ή εναπόθεσης, χωρίς να απαιτείται ανάλογη αύξηση στο δυναμικό του υποστρώματος, μειώνοντας έτσι, φαινόμενα διάβρωσης και επιφανειακής φθοράς λόγω αυξημένου ιοντικού βομβαρδισμού.

3.2.2 Σύστημα ιονβολής (sputtering)

Η ιονβολή ή φυσική εγχάραξη ή απόθεση σε υπόστρωμα είναι η διεργασία στην οποία πραγματοποιείται αφαίρεση ατόμων από ένα υλικό-στόχο, λόγω κρούσης ιόντων αέριας φάσης στην επιφάνεια του στόχου. Χρησιμοποιείται κύρια σε διεργασίες εγχάραξης, καθαρισμού επιφανειών, εναπόθεσης λεπτών υμενίων, καθώς και ανάλυσης επιφανειών και επιφανειακών στρώσεων. Βασική προϋπόθεση για την πραγματοποίησή της είναι η κινητική ενέργεια των προσπίπτοντων ιόντων στην επιφάνεια του στόχου να είναι μεγαλύτερη από την ενέργεια σύνδεσης των ατόμων του ($\gg 1$ eV), έτσι ώστε να είναι εφικτή η αποκόλλησή τους. Η διεργασία έγκειται στην ανταλλαγή ορμής μεταξύ των προσπίπτοντων ιόντων και των ατόμων του υλικού-στόχου. Τα πρωτογενή σωματίδια (ιόντα) που βάλονται προς το στόχο, προέρχονται από κάποια πηγή ιόντων, πλάσμα ή κάποιο επιταχυντή. Στην περίπτωσή μας, η πηγή προέλευσης των ιόντων είναι πλάσμα, το οποίο δημιουργείται εντός θαλάμου κενού, όπου εισάγεται ευγενές αέριο, συννηθέστερα αργό (Ar).

Συγκεκριμένα, μια διαδικασία εναπόθεσης με ιονοβολή (Εικόνα 3.4) περιλαμβάνει την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, της ανόδου και της καθόδου. Στην άνοδο τοποθετείται το υπόστρωμα που επιθυμούμε να γίνει η εναπόθεση, και στην κάθοδο το υλικό-στόχο προς εναπόθεση. Ως αποτέλεσμα της εφαρμοζόμενης τάσης, η προκαλούμενη ηλεκτρική εκκένωση στο ευγενές αέριο (Ar) του θαλάμου, δημιουργεί πλάσμα. Λόγω της διαφοράς δυναμικού μεταξύ των ηλεκτροδίων, της τάξης των keV, τα θετικά ιόντα του πλάσματος κατευθύνονται με υψηλές ταχύτητες προς το αρνητικά πολωμένο ηλεκτρόδιο, αποσπώντας άτομα του στόχου, τα οποία με τη σειρά τους οδηγούνται προς την επιφάνεια του υποστρώματος.



Εικόνα 3.4: Διεργασία ιονοβολής (sputtering), προς εναπόθεση λεπτού υμενίου υλικού-στόχου πάνω σε υπόστρωμα εντός θαλάμου κενού με χρήση πλάσματος από ευγενές αέριο Ar.

Λόγω της μηχανικής φύσης της διεργασίας, με την ταχύτητα πρόσπτωσης των ιόντων να εξαρτάται σημαντικά από τη γωνία με την οποία προσπίπτουν στην επιφάνεια του στόχου, η ιονοβολή είναι μια ισχυρά ανισοτροπική διαδικασία. Με περίπου 1% των αποσπώμενων ατόμων από το στόχο να ιονίζεται, ο ρυθμός εγχάραξης ή εναπόθεσης της ιονοβολής είναι χαμηλός. Το γεγονός όμως αυτό, καθιστά τη συγκεκριμένη διεργασία ευχερέστερη ως προς τον έλεγχο του πάχους και της μικρο-νανοδομής του εναποτιθέμενου υμενίου. Παρ'όλα αυτά, με ρύθμιση της πίεσης του εισαγόμενου

ευγενούς αερίου ($\approx 1-100$ mTorr) είναι εφικτή η αύξηση του ρυθμού εναπόθεσης ή εγχάραξης των υλικών.

Στην εργασία αυτή, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα ιονβολής Cooke CVE 401, το οποίο παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.5, για λόγους εναπόθεσης μετάλλων, και συγκεκριμένα όπως θα δούμε, αργύρου και χαλκού, πάνω σε πολυμερικές, κατεργασμένες ή μη, επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα).



Εικόνα 3.5: Σύστημα Cooke CVE 401 για εναπόθεση λεπτών μεταλλικών υμενίων με χρήση ιονβολής (sputtering).

3.3 Διατάξεις χαρακτηρισμού επιφανειών

3.3.1 Μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (SEM)

Το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (Scanning Electron Microscope – SEM) είναι ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, το οποίο παρουσιάζει την τοπογραφία του δείγματος, σαρώνοντας την επιφάνειά του με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής κινητικής ενέργειας. Οι παραγόμενες εικόνες του δείγματος είναι αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης της ηλεκτρονικής δέσμης με τα άτομα της επιφάνειας στην οποία προσπίπτουν, που οδηγεί σε εκπομπή μιας ποικιλίας ηλεκτρονίων και ενεργειών που διαμορφώνουν την τοπογραφία του δείγματος.

Τα ηλεκτρόνια, κατά την πρόσπτωσή τους στην επιφάνεια του δείγματος, χάνουν ενέργεια μετά από διαδοχικές σκεδάσεις και απορροφήσεις εντός ενός όγκου αλληλεπίδρασης σε σχήμα σταγόνας στο εσωτερικό του δείγματος, διαμέτρου κυμαινόμενης από λιγότερα των 100 nm έως περίπου τα 5 μm . Έτσι, αναλόγως της ενέργειας της προσπίπτουσας δέσμης, της γωνίας πρόσπτωσής της, τον ατομικό αριθμό των ατόμων του δείγματος και την πυκνότητα, εκπέμπονται τρία διαφορετικά είδη ηλεκτρονίων και ενεργειών:

α) Δευτερογενή ηλεκτρόνια, ενέργειας μικρότερης των 50 eV, που προέρχονται από στρώμα πολύ κοντά στην επιφάνεια του δείγματος και εκπέμπουν χαμηλής ενέργειας ακτινοβολία που αντιστοιχεί στο ορατό φάσμα (καθοδοφωταύγεια).

β) Οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, υψηλότερης ενέργειας προερχόμενα από μεγαλύτερα βάθη μέσα στο δείγμα και τα οποία να έχουν ενδεχομένως υποστεί σκέδαση Rutherford από τους πυρήνες των ατόμων του δείγματος.

γ) Ηλεκτρόνια Auger ή ακτινοβολία X, προερχόμενα από ακόμη μεγαλύτερα βάθη (π.χ. από εσωτερικές στοιβάδες των ατόμων) του δείγματος, λόγω του μικρού βαθμού απορρόφησής τους.

Πιο συγκεκριμένα, τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα κανόνι θερμιονικής εκπομπής, τα οποία επιταχύνονται συνήθως σε ενέργειες 1-40 keV. Μέσω ενός ή δύο συμπακνωτών φακών, η δέσμη εστιάζεται έως διαμέτρου 2-100 nm στην επιφάνεια του δείγματος. Με τη βοήθεια των πηνίων σάρωσης, η λεπτή δέσμη σαρώνει την επιφάνεια του δείγματος, παράλληλα με την καταμέτρηση των παραγόμενων δευτερογενών ηλεκτρονίων από τον αντίστοιχο ανιχνευτή. Σε συγχρονισμό με τη δέσμη των ηλεκτρονίων, η κηλίδα της οθόνης CRT, με την οποία είναι συνδεδεμένο το μικροσκόπιο, σαρώνει την οθόνη και αποδίδει φωτεινότητα ανάλογη εκείνης που προέρχεται από το ενισχυμένο σήμα του ανιχνευτή των δευτερογενών ηλεκτρονίων. Η σάρωση γίνεται σε ένα κάναβο (raster) αποτελούμενο από ένα σύστημα οριζόντιων γραμμών κι έτσι, η ποσότητα της ακτινοβολίας από τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, απεικονίζεται ως οπτική εικόνα στην οθόνη CRT. Είναι δυνατόν, χρησιμοποιώντας τους κατάλληλους ανιχνευτές και την ίδια αρχή συγχρονισμού σάρωσης της ηλεκτρονικής δέσμης και της οθόνης CRT, να λάβουμε εικόνες που αντιστοιχούν σε οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια ή ακτίνες X.

Ως προς τις πληροφορίες που λαμβάνουμε από την απεικόνιση κάθε είδους ηλεκτρονίων και ενεργειών, τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, προερχόμενα από μικρότερα βάρη, αποδίδουν το ανάγλυφο της επιφάνειας του δείγματος, τα οπισθοσκεδαζόμενα, προερχόμενα από μεγαλύτερα, δίνουν μια εικόνα της χημικής σύστασης του δείγματος, ενώ τέλος οι ακτίνες X δίνουν μια χαρτογράφηση της κατανομής των στοιχείων που αποτελούν το δείγμα.



Εικόνα 3.6: Το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (SEM) JEOL JSM-7401F FEG του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”.

Στην παραπάνω Εικόνα 3.6, παρουσιάζεται το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία μας για την απεικόνιση της τοπογραφίας των μικρο-νανοφασμένων με πλάσμα πολυμερικών επιφανειών, το οποίο ήταν το JEOL JSM-7401F FEG SEM, με διακριτική ικανότητα μικρότερη του 1 nm, τάση δέσμης 1-2 kV και ρεύμα δέσμης 2-10 μ A. Να σημειώσουμε ότι επειδή τα δείγματα χρειάζεται να είναι ηλεκτρικά αγώγιμα για να αποφευχθεί η φόρτισή τους κατά τη σάρωση με την ηλεκτρονική δέσμη, υφίστανται επιμετάλλωση με ιονοβολή, πάχους περίπου 10 nm για χρόνο 2 min.

3.3.2 Σύστημα μέτρησης γωνίας επαφής

Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση των γωνιών επαφής των μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα πολυμερικών επιφανειών ήταν το GBX Digidrop Contact Angle Measurement System του εργαστηρίου πλάσματος του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης (Εικόνα 3.7). Τα χαρακτηριστικά λειτουργίας του αναγράφονται στον Πίνακα 3-2.

Πίνακας 3-2: Χαρακτηριστικά λειτουργίας του συστήματος μέτρησης γωνίας επαφής GBX Digidrop Contact Angle Measurement

Εύρος μετρήσεων	0 -180°
Ακρίβεια	± 0.5°
Διακριτικότητα	0.1°
Όγκος σταγόνας	≥ 0.5 μL (χρησιμοποιήθηκαν 5 μL)
Χωρητικότητα σύριγγας	1 mL

Βασική λειτουργία του συστήματος είναι η μέτρηση των ιδιοτήτων διαβροχής των δειγμάτων με την εύρεση των γωνιών επαφής και υστέρησης, καθώς και της επιφάνειας επαφής της εναποτιθέμενης σταγόνας υγρού στην επιφάνειά τους. Συγκεκριμένα, για τις μετρήσεις μας χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο υγρό, το οποίο τοποθετείται εντός μικρομετρικής σύριγγας που συγκρατείται πάνω από την επιφάνεια του δείγματος. Το σύστημα είναι συνδεδεμένο με CCD κάμερα για την καταγραφή των δεδομένων και κατάλληλο λογισμικό για την ανάλυση της εικόνας. Έτσι, με τη βοήθειά του λογισμικού, τοποθετούμε την επιφάνεια του δείγματος εντός του οπτικού πεδίου της κάμερας, έτσι ώστε να βλέπουμε στην οθόνη το σημείο επαφής της σταγόνας με την επιφάνεια. Μετά την εναπόθεση κατάλληλης ποσότητας απιονισμένου νερού, και ρύθμισης με χρήση του λογισμικού του επιπέδου διεπιφάνειας σταγόνας-επιφάνειας δείγματος, εξάγονται η αριστερή και η δεξιά γωνία επαφής, από τις οποίες επιλέγουμε εκείνη που αποδίδει ορθότερα τη διεπαφή της σταγόνας με την επιφάνεια.



Εικόνα 3.7: Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής GBX Digidrop Contact Angle Measurement του εργαστηρίου πλάσματος του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης.

Πιο συγκεκριμένα, για τις μετρήσεις τόσο της στατικής γωνίας επαφής όσο και της γωνίας υστέρησης εναποτίθενται σταγόνες 5 μL . Για τον υπολογισμό της γωνίας υστέρησης, επειδή είναι απαραίτητη η εύρεση της γωνίας προώθησης και υποχώρησης, πραγματοποιούταν αυξομείωση του όγκου της σταγόνας και με χρήση του λογισμικού καταμετρούνταν οι αντίστοιχες γωνίες.

3.4 Διατάξεις μελέτης προσκόλλησης και ανάπτυξης βακτηρίων

3.4.1 Μικροσκοπία φθορισμού

Η μικροσκοπία φθορισμού στηρίζεται στο φυσικό φαινόμενο του φθορισμού, δηλαδή της εκπομπής ακτινοβολίας από οργανικά είτε ανόργανα δείγματα, ανιχνεύσιμης ως ορατό φως, κατά την ακτινοβόλησή τους με φως συγκεκριμένης ζώνης μηκών κύματος. Ορισμένα δείγματα είναι φύσει φθορίζοντα, όπως είναι η γλωροφύλλη και κάποια

έλαια, αλλά τα περισσότερα χρειάζεται να επισημανθούν με φθορίζουσες ουσίες προκειμένου να καταστούν ανιχνεύσιμα.

Έτσι λοιπόν, το μικροσκόπιο φθορισμού είναι ένα οπτικό μικροσκόπιο που αποτελείται συνήθως από μια φωτεινή πηγή (λάμπα ξένου ή υδραργύρου, LEDs και lasers), ένα φίλτρο διέγερσης (excitation filter), ένα διχρωϊκό καθρέφτη (dichroic mirror/beamsplitter), και ένα φίλτρο εκπομπής (emission filter). Η βασική αρχή λειτουργίας του είναι η ακτινοβολία του δείγματος με την επιθυμητή ζώνη μηκών κύματος και ο μετέπειτα διαχωρισμός του σημαντικά ασθενέστερου εκπεμπόμενου φθορισμού από την εκπεμπόμενη ακτινοβολία λόγω διέγερσης. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιούνται φίλτρα και διχρωϊκός καθρέφτης που συνάδουν με τα χαρακτηριστικά φασματικής διέγερσης και εκπομπής της φθορίζουσας ουσίας, φυσικής είτε χημικής.

Πιο αναλυτικά, το φίλτρο διέγερσης επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολίας μόνο της συγκεκριμένης ζώνης κύματος που συνδέεται με τη φθορίζουσα ουσία. Η ακτινοβολία ερχόμενη σε επαφή με τα άτομα του δείγματος, προκαλεί διέγερση των ηλεκτρονίων τους σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, τα οποία αποδιεγερόμενα εκπέμπουν ακτινοβολία. Ακολούθως, ο διχρωϊκός καθρέφτης επιτρέπει τη διέλευση μόνο των μηκών κύματος που είναι μεγαλύτερα της ακτινοβολίας διέγερσης, ανακλώντας προς τα πίσω τα μικρότερα μήκη κύματος. Η λειτουργία αυτή του διχρωϊκού καθρέφτη είναι απαραίτητη για να καταστεί δυνατή η προβολή της ακτινοβολίας φθορισμού σε υψηλή αντίθεση έναντι ενός σκούρου υπόβαθρου, καθώς η ακτινοβολία διέγερσης είναι συνήθως αρκετές εκατοντάδες χιλιάδες έως ένα εκατομμύριο φορές περισσότερο φωτεινή από τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Τελικώς, το φίλτρο εκπομπής επιτρέπει τη διέλευση μόνο της ακτινοβολίας του εκπεμπόμενου φθορισμού.

Η μετατόπιση αυτή της ακτινοβολίας εκπομπής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος εν συγκρίσει με της ακτινοβολίας διέγερσης είναι αποτέλεσμα της απώλειας ενέργειας που υφίστανται τα ηλεκτρόνια κατά τη μετάπτωσή τους από τη διεγερμένη στη θεμελιώδη κατάσταση. Το φαινόμενο αυτό είναι γνωστό ως μετατόπιση Stokes και όσο μεγαλύτερης έντασης είναι, τόσο ευκολότερος είναι ο διαχωρισμός των ακτινοβολιών διέγερσης και εκπομπής με τη συνδυαστική χρήση των φίλτρων και του διχρωϊκού καθρέφτη.

Βασικό πλεονέκτημα του μικροσκοπίου φθορισμού είναι η δυνατότητα ανίχνευσης ενός και μοναδικού μορίου, ενώ σε περίπτωση χρήσης πολλαπλών μονοχρωματικών φθορίζουσων ουσιών, καθιστάται εφικτός ο ταυτόχρονος εντοπισμός πολλών και διαφορετικών μορίων-στόχων.



Εικόνα 3.8: Μικροσκόπιο φθορισμού Axioskop 2 plus της Carl Zeiss, που χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση και καταμέτρηση του φθορισμού της Chl a των κυανοβακτηρίων.

Στη συγκεκριμένη εργασία, το μικροσκόπιο φθορισμού που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Axioskop 2 plus της Carl Zeiss (Εικόνα 3.8), το οποίο συνδεδεμένο με το λογισμικό ImagePro, καταμετρούσε και απεικόνιζε τη φθορίζουσα χρωστική Chl a των κυανοβακτηρίων. Η συγκεκριμένη χρωστική εμφανίζει κορυφή φθορισμού περίπου στα 685 nm εκτεινόμενη στην περιοχή του υπερόθρου έως περίπου τα 800 nm. Βάσει αυτών, χρησιμοποιήθηκε το πράσινο φίλτρο του μικροσκοπίου, το οποίο διεγείρει στην περιοχή των 510-560 nm και επιτρέπει τη διέλευση εκπεμπόμενης ακτινοβολίας μήκους κύματος μεγαλύτερου των 590 nm.

3.4.2 Μέτρηση απορρόφησης φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-VIS Spectroscopy) χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της απορρόφησης μιας ουσίας στην υπεριώδη και ορατή περιοχή του φάσματος, με απώτερο σκοπό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσής της. Συνηθέστερα αντικείμενα μελέτης είναι οργανικά σύμπλοκα, βιολογικά μακρομόρια, καθώς και ανόργανες ενώσεις, τα οποία για τη μέτρησή τους προτιμώνται διαλυμένα σε διαλύτες όπως το νερό, η αιθανόλη, το εξάνιο και το κυκλοεξάνιο ή γενικότερα, σε διαλύτες πλήρως διαπερατούς.

Γενικότερα, κατά την απορρόφηση ακτινοβολίας, προσφέρεται ενέργεια στα μόρια, η οποία έχει ως αποτέλεσμα, τη μεταβολή του spin του πυρήνα ή των ηλεκτρονίων εντός μαγνητικού πεδίου, τη μοριακή περιστροφή ή και τη μοριακή δόνηση, καθώς και τη μετακίνηση ηλεκτρονίων σθένους ή εσωτερικών ηλεκτρονίων προς υψηλότερες ενεργειακές στάθμες. Αναλόγως της έντασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που απορροφάται, της ηλεκτρονικής διαμόρφωσης ατόμων και μορίων και του είδους των δεσμών μεταξύ των ατόμων, καθορίζεται και το είδος της μεταβολής που πραγματοποιείται κάθε φορά. Για απορρόφηση ακτινοβολίας στο υπεριώδες-ορατό, απαντώνται φαινόμενα διέγερσης ηλεκτρονίων σθένους προς υψηλότερες ενεργειακές καταστάσεις.

Η σύνδεση της απορροφούμενης ακτινοβολίας με τη συγκέντρωση της καταμετρούμενης ουσίας, γίνεται μέσω του νόμου Beer-Lambert [158], όπου για ένταση I_0 μονοχρωματικής ακτινοβολίας προσπίπτουσας σε στοιβάδα πάχους d και εξερχόμενη ένταση ακτινοβολίας I , ισχύει:

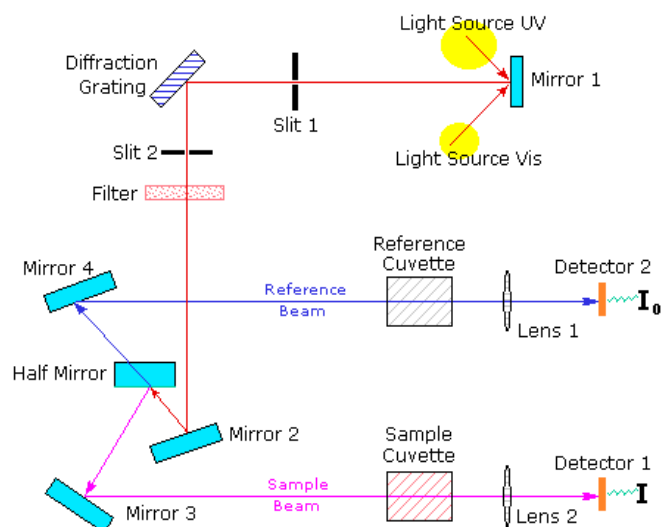
$$D = \log \frac{I}{I_0} = \varepsilon \cdot C \cdot d, \quad (1)$$

όπου $D = \log \frac{I}{I_0}$ η μετρούμενη απορρόφηση ή αλλιώς οπτική πυκνότητα, οριζόμενη ως ο δεκαδικός λογάριθμος της εξερχόμενης ακτινοβολίας I προς την προσπίπτουσα I_0 για το συγκεκριμένο μήκος κύματος ακτινοβολίας, C η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα και ε ο μοριακός συντελεστής απόσβεσης/απορρόφησης της ουσίας στο συγκεκριμένο μήκος κύματος.

Ο νόμος αυτός των Beer-Lambert αποτελεί την αρχή της φασματοφωτομετρίας και ορίζει τη γραμμική σχέση αναλογίας της απορρόφησης με τη συγκέντρωση της ουσίας για ορισμένο μήκος κύματος και σταθερό πάχος στοιβάδας.

Στο νόμο αυτό στηρίζεται και η λειτουργία του φασματοφωτόμετρου προς προσδιορισμό της συγκέντρωσης μιας ουσίας σε διάλυμα. Αναλυτικά, όπως μπορούμε να δούμε και στην Εικόνα 3.9, φως ορατής ή/και υπεριώδους ακτινοβολίας (κόκκινη ακτίνα) διαχωρίζεται αρχικά στα συνιστώντα μήκη κύματός του με τη βοήθεια ενός φράγματος περίθλασης (diffraction grating), με σκοπό τη μέτρηση της απορρόφησης σε καθένα από αυτά. Για το λόγο αυτό, κάθε μονοχρωματική δέσμη διαχωρίζεται σε δύο ίσες έντασης με την παρεμβολή καθρέφτη (half mirror), από όπου η μία ακτίνα διαπερνά μια κυβέττα αναφοράς (reference cuvette) που περιέχει μόνο το διαλύτη, και η δεύτερη από μια πανομοιότυπη (sample cuvette) που περιλαμβάνει το διάλυμα με την ουσία προς μελέτη. Εντός μικρού χρονικού διαστήματος, το φασματοφωτόμετρο σκανάρει με τον ίδιο τρόπο όλα τα συνιστώντα μήκη κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Έτσι, επιλέγοντας διαλύτη που δεν απορροφά στα μήκη κύματος που μας ενδιαφέρουν, θεωρούμε I_0 τη μετρούμενη ένταση μονοχρωματικής ακτινοβολίας που διαπερνά την κυβέττα αναφοράς, και I την αντίστοιχη μετά από απορρόφηση που διαπερνά την κυβέττα με το δείγμα μας, οπότε προκύπτει η απορρόφηση σε κάθε μήκος κύματος ως ο λογάριθμος $\log \frac{I}{I_0}$. Ακολούθως, είναι δυνατός ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της ουσίας ενδιαφέροντος από το νόμο Beer-Lambert (1).



Εικόνα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας φασματοφωτόμετρου ορατού-υπεριώδους.

Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Jasco UVIDEK-610 του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος” (Εικόνα 3.10) προς προσδιορισμό της συγκέντρωσης της Chl *a* των φωτοσυνθετικών κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942, που αποτελεί κατ’επέκταση συγκέντρωση των ίδιων των κυανοβακτηρίων. Για να μετρηθεί η Chl *a*, τα κυανοβακτήρια υπόκεινται αρχικά σε φυγοκέντριση και το ίζημά τους διαλύεται σε N, N-Διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF), το οποίο προκαλεί εκχύλιση της χλωροφύλλης. Το διάλυμα τοποθετείται στη συνέχεια στην κυβέττα, ενώ ο διαλύτης μόνος του αποτελεί το περιεχόμενο της κυβέττας αναφοράς. Μετά από ρύθμιση του φασματοφωτόμετρου στα 664 nm, μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της Chl *a* στο DMF, το όργανο καταμετρά την απορρόφηση της χλωροφύλλης στο διάλυμα και εξάγεται ακολούθως η συγκέντρωση των *Synechococcus* sp PCC 7942 με το νόμο Beer-Lambert.



Εικόνα 3.10: Το φασματοφωτόμετρο Jasco UV-610 που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις συγκέντρωσης Chl a των κυανοβακτηρίων.

3.4.3 Μέτρηση φθορισμού Chl a των κυανοβακτηρίων

Οι μετρήσεις φθορισμού της χρωστικής Chl a πραγματοποιήθηκαν με χρήση φθορισμόμετρου συνεχούς διέγερσης PEA-fluorometer (PEA, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK) [155]. Σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, σχεδόν όλη η φθορίζουσα ακτινοβολία ($\approx 90-95\%$) προέρχεται από τη Chl a που βρίσκεται στον πυρήνα του Φωτοσυστήματος II (PSII) και παρουσιάζει κορυφή φάσματος φθορισμού στα 685 nm, το οποίο εκτείνεται έως περίπου τα 800 nm. Το όργανο (Εικόνα 3.11) αποτελείται από μια συμπαγή, χαμηλού βάρους μονάδα ελέγχου, που παρέχει τις απαραίτητες ρυθμίσεις για τη λειτουργία της καθώς και μία οθόνη όπου ψηφιοποιούνται οι μετρήσεις φθορισμού. Μέσω καλωδίου, η κεντρική μονάδα ελέγχου συνδέεται με την κεφαλή του οργάνου, όπου είναι ενσωματωμένη η πηγή ακτινικού φωτός και ο ανιχνευτής. Η πηγή εκπέμπει ακτινοβολία στα 650 nm, προερχόμενη από μία συστοιχία τριών διόδων εκπομπής φωτός (LED), εστιασμένη στην επιφάνεια του δείγματος για να παρέχει ομοιόμορφο φωτισμό της περιοχής. Οι διόδοι εκπομπής πλεονεκτούν ως προς την

εκπομπή χαμηλών επιπέδων θερμότητας, ενώ κατορθώνουν να αγγίξουν το μέγιστο της έντασής τους ($3500 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \cdot \text{s}$, $\Delta\lambda = 22 \text{ nm}$) εντός πολύ μικρού χρονικού διαστήματος, της τάξεως των μs , από τη στιγμή της ενεργοποίησής τους. Ο ανιχνευτής είναι μια φωτοδίοδος, κατασκευασμένη ώστε να ανιχνεύει το φθορισμό σε μήκη κύματος μεγαλύτερα των 700 nm , συμπεριλαμβάνοντας έτσι την περιοχή φθορισμού της Chl *a* που φθάνει έως περίπου τα 800 nm , και να αποκόπτει ανακλώμενα από την ακτινοβολία της πηγής μικρότερα μήκη κύματος. Μετά τη λήψη του φθορισμού, ο ανιχνευτής συνδεδεμένος με κύκλωμα ενισχυτή, μεταφέρει το σήμα προς τη μονάδα ελέγχου, όπου με τη βοήθεια ενός αναλογικού/ψηφιακού μετατροπέα ψηφιοποιείται και καταγράφεται στην οθόνη [155].



Εικόνα 3.11: Συσκευή PEA (PEA, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK) μέτρησης φθορισμού Chl *a* κυανοβακτηρίων, συνοδευόμενη από τους κατάλληλους συνδετήρες με τα κλείστρα για εξασφάλιση συνθηκών σκότους.

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί μέτρηση φθορισμού, είναι αναγκαία η παραμονή των δειγμάτων στο σκοτάδι, έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης οξείδωση των κέντρων αντίδρασης και προετοιμασία τους για τις φωτοχημικές αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό, η περιοχή του δείγματος καλύπτεται με συνδετήρα (Εικόνα 3.11) που φέρει κατάλληλο κλείστρο, διαμέτρου 3 mm , το οποίο συμβάλλει στην προστασία του από τον

περιβάλλοντα φωτισμό. Το δείγμα διατηρείται σε συνθήκες σκότους για τουλάχιστον 10 min και στη συνέχεια, προς λήψη μέτρησης εφαρμόζεται η κεφαλή του φθορισμόμετρου στο δακτύλιο του συνδετήρα, αποκλείοντας έτσι, οποιαδήποτε πηγή φωτός. Ακολούθως, με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω, λαμβάνεται το σήμα του φθορισμού από τον ανιχνευτή στην κεφαλή συνεχόμενα από τα 0.01 ms έως τα 30 s. Στην εργασία αυτή, για τη μέτρηση του φθορισμού, χρησιμοποιήθηκαν τα πρώτα 10 s ακτινοβολήσης, με την πρώτη αξιόπιστη μέτρηση φθορισμού στα 20 μs να καταγράφεται ως αρχικός φθορισμός F_0 [155].

3.5 Άλλα χρησιμοποιηθέντα όργανα

Στην παράγραφο αυτή, θα παρουσιαστούν κάποια επιπλέον όργανα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας:

1. Αυτοσχέδιος μεταλλικός θάλαμος κενού (Εικόνα 3.12) προς αέρια εναπόθεση φθοριωμένου μονοστρώματος από διάλυμα 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas).



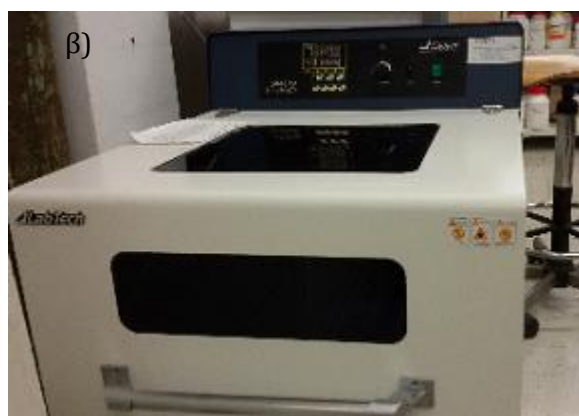
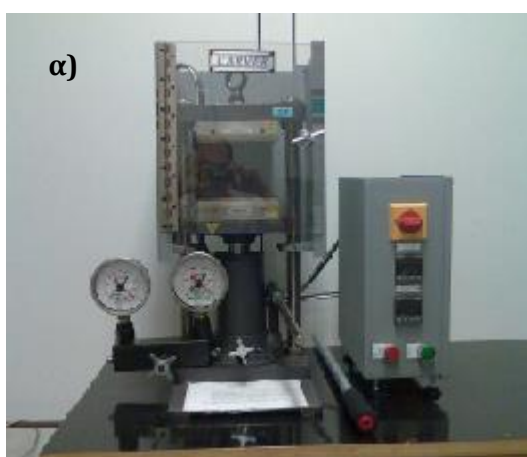
Εικόνα 3.12: Θάλαμος εναπόθεσης φθοριωμένου μονοστρώματος από διάλυμα 1H,1H,2H,2-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas).

2. Περιστροφικός επιστρωτής (spin coater) I-PM-1010DCB15, Headway Research προς λείανση της σφραγίδας που χρησιμοποιήθηκε ως καλούπι για τη διαμόρφωση πηγαδιών $5 \times 5 \times 1.5 \text{ nm}^3$ πάνω σε πολυμερικές επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) (παράγραφος 3.6.1.1). Κατά τη διάρκεια της λείανσης, η σφραγίδα συγκρατείται με υποπίεση πάνω στην κεφαλή ενός περιστροφέα με χρήση μηχανικής αντλίας κενού. Η διάταξη συνδέεται με πίνακα ελέγχου, όπου ρυθμίζονται οι παράμετροι λειτουργίας της (διάρκεια, ρυθμός

λείανσης), ενώ είναι εξοπλισμένη με ένα διακόπτη εκκίνησης και τερματισμού ανάγκης.

3. Θερμοπρέσσα της εταιρείας Carver (Εικόνα 3.13α) προς αποτύπωση τόσο των παραλληλόγραμων διαστάσεων $50 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$, όσο και των τετράγωνων φρεάτιων διαστάσεων $5 \times 5 \times 1.5 \text{ mm}^3$ των αντίστοιχων σφραγίδων στις πολυμερικές επιφάνειες PMMA.

4. Θάλαμος επώασης LabTech, Daihan LabTech Co., LTD (Εικόνα 3.13β) του Τομέα Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιοδιαγνωστικών Προϊόντων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ, ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”), όπου τοποθετήθηκε κατάλληλη συγκέντρωση κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942, σε νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες PMMA επιφάνειες, προς μελέτη της προσκόλλησής τους (Κεφάλαιο 4). Ο θάλαμος δίνει τη δυνατότητα ανάδευσης, λειτουργία που ελέγχεται μαζί με τις υπόλοιπες (θερμοκρασία, φωτισμός, συχνότητα ανάδευσης) από μονάδα ελέγχου των παραμέτρων λειτουργίας του τοποθετημένη στην κορυφή του. Για το πείραμά μας, ήταν ρυθμισμένος σε θερμοκρασία 28°C και παρείχε τον απαιτούμενο φωτισμό, συνθήκες ευνοϊκές προς την ανάπτυξη των βακτηρίων, ενώ δε χρησίμευσε η λειτουργία της ανάδευσης. Ο θάλαμος χρησιμοποιήθηκε για 72 ώρες.



Εικόνα 3.13: α) Θερμοπρέσσα της εταιρείας Carver, β) Θάλαμος επώασης LabTech, Daihan LabTech Co., LTD.

5. Θάλαμος επώασης Gallenkamp INR-401-010 του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών, όπου τοποθετούνται τα κυανοβακτήρια προς διευκόλυνση και επιτάχυνση της ανάπτυξής τους, καθώς τους παρέχονται ιδανικές συνθήκες πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, εντός του θαλάμου, οι καλλιέργειες βρίσκονται υπό συνεχή ανάδευση και φωτισμό με λάμπες φθορισμού ψυχρού-λευκού φωτός ($100 \mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$), καθώς και θερμοκρασία $31 \text{ }^\circ\text{C}$, ενώ δίνεται η δυνατότητα ρύθμισης και της παροχής CO_2 .

6. Χώρος εξασφάλισης συνθηκών στειρότητας του Εργαστηρίου Βιοφυσικής και Βιοτεχνολογίας Μεμβρανών του Ινστιτούτου Βιοεπιστημών και Εφαρμογών (Εικόνα 3.14), όπου εκτός του ότι παρέχεται η δυνατότητα φύλαξης των καλλιεργειών, πραγματοποιούνται όλες οι εργαστηριακές εργασίες που χρήζουν προστασίας από μολύνσεις, όπως για παράδειγμα, η μεταφορά και η εκ νέου δημιουργία καλλιέργειας, η μετάγγιση γλυκόζης, διεργασίες πύκνωσης και αραιώσης καλλιεργειών, κλπ.



Εικόνα 3.14: Χώρος εργασίας, όπου εξασφαλίζονται συνθήκες στειρότητας

3.6 Πειραματικές μέθοδοι

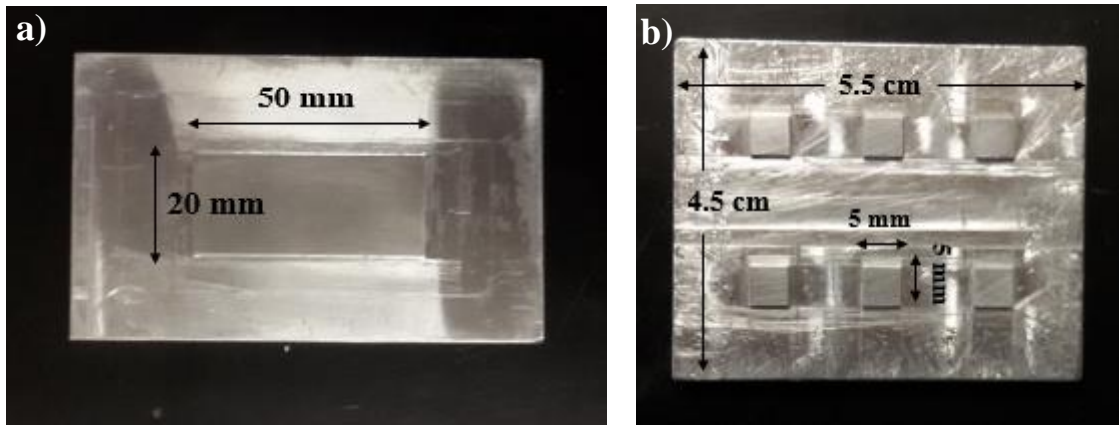
Σε αυτή την παράγραφο, θα παρουσιαστούν συνολικά οι πειραματικές τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν, τόσο για την κατασκευή των επιφανειών, όσο και για τη μετέπειτα καλλιέργεια των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 προς χρησιμοποίησή τους για τη διερεύνηση της αντιβακτηριακή δράσης των επιφανειών.

3.6.1 Προετοιμασία κι επεξεργασία υποστρωμάτων PMMA

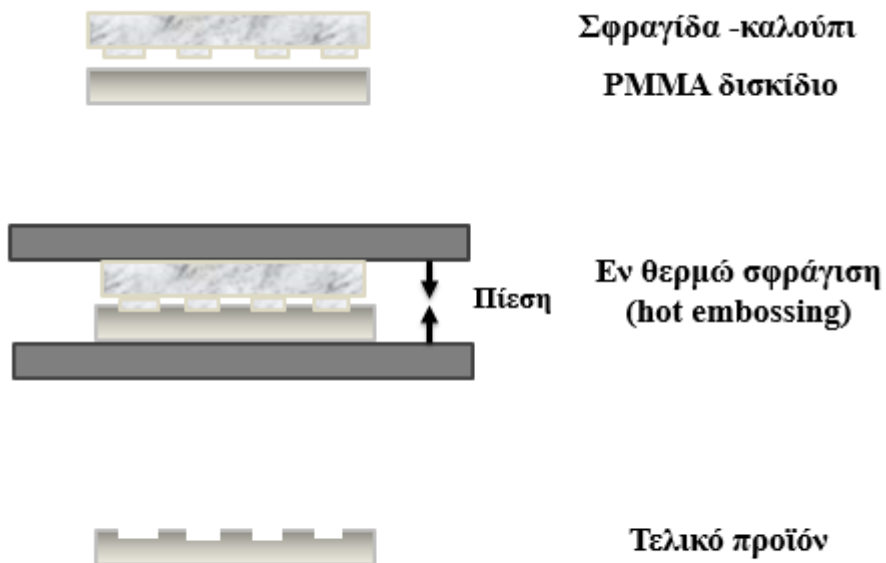
3.6.1.1 Εντύπωση μικροφρεατίων σε πλακίδια PMMA

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.1, οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν λεπτά διάφανα πλακίδια PMMA, πάχους 2 mm. Στο πείραμα μελέτης προσκόλλησης των βακτηρίων στις επιφάνειες (Κεφάλαιο 4), με χρήση της θερμοπρέσσας της εταιρείας Carver, εντυπώθηκαν πάνω στα πλακίδια PMMA παραλληλόγραμμα φρεάτια προσχεδιασμένων διαστάσεων $50 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$, χωρητικότητας 1 mL. Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκε σφραγίδα (Εικόνα 3.15a) των απαιτούμενων διαστάσεων, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως καλούπι για την αποτύπωση του πηγαδιού σε κάθε πλακίδιο.

Με την ίδια λογική, στα πειράματα μελέτης της βακτηριοκτόνου δράσης των επιφανειών (Κεφάλαιο 5), στην περίπτωση των χαμηλών συγκεντρώσεων (0.2×10^9 cfu/mL), χρησιμοποιήθηκε σφραγίδα αποτελούμενη από 2 συστοιχίες 3 φρεατίων, σύνολο δηλαδή 6 φρεάτια, το καθένα από τα οποία είχε διαστάσεις $5 \times 5 \times 1.5 \text{ mm}^3$ (Εικόνα 3.15b). Τα πλακίδια PMMA κόπηκαν σε διαστάσεις $(5.5 \times 4.5) \text{ cm}^2$, και ακολούθως, με τη θερμοπρέσσα η σφραγίδα εντύπωσε τα πηγάδια μέσω *εν θερμώ σφράγισης* (*hot embossing*), όπως αποτυπώνεται σχηματικά στην Εικόνα 3.16. Κάθε πηγάδι αποκόπηκε και χρησιμοποιήθηκε μεμονωμένα. Για τις περιπτώσεις των υψηλών συγκεντρώσεων, η αντιβακτηριακή μελέτη πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα πλακίδια PMMA ως είχαν, σε διαστάσεις $2 \times 2 \text{ cm}^2$.



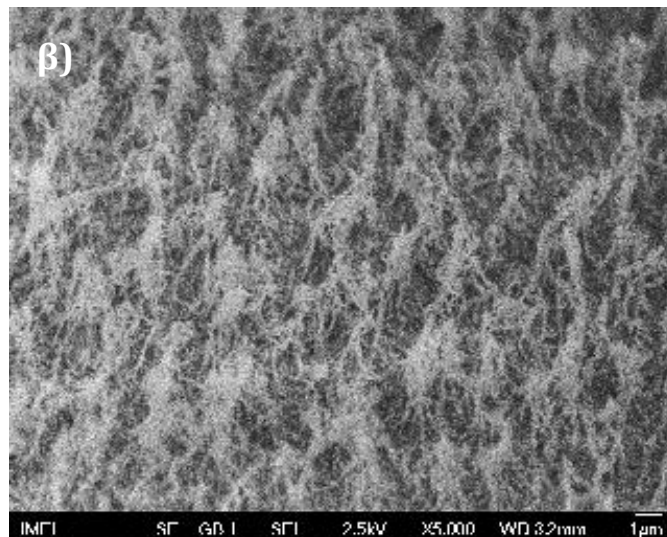
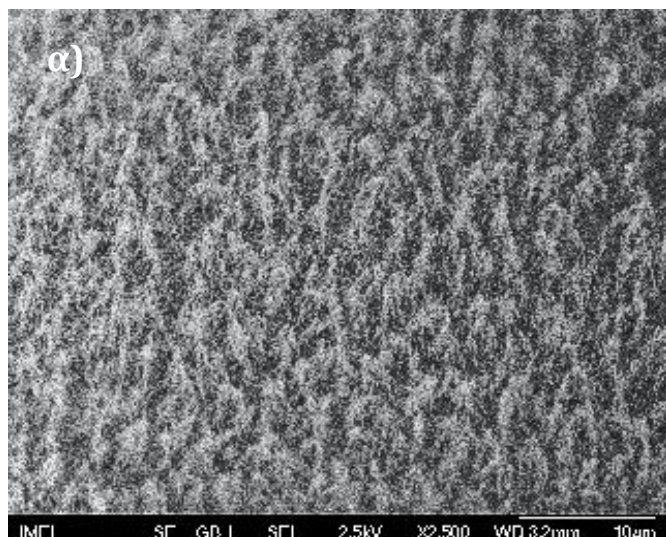
Εικόνα 3.15: Σφραγίδα που χρησιμοποιήθηκε για την εντύπωση α) παραλληλόγραμμου πηγαδιού στο πείραμα μελέτης προσκόλλησης και β) τετράγωνου πηγαδιού στο πείραμα μελέτης εξέλιξης κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 πάνω σε πολυμερικά υποστρώματα PMMA.

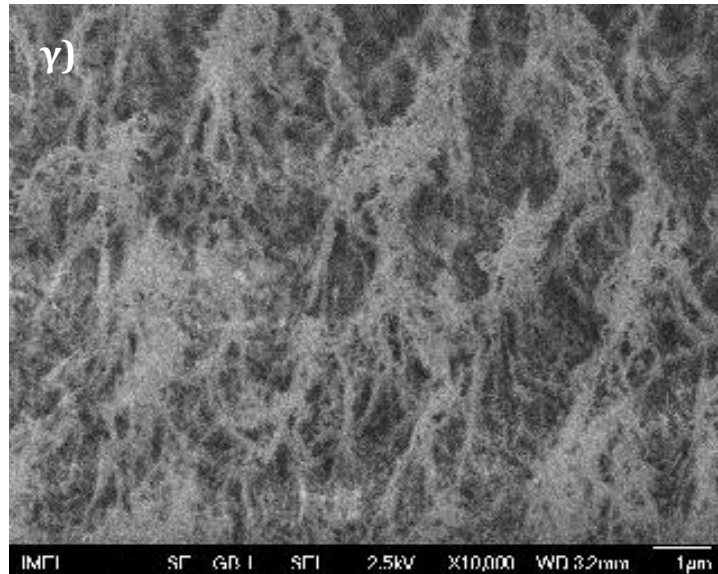


Εικόνα 3.16: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων αποτύπωσης πηγαδιών διαστάσεων (5 x 5 x 1.5) mm³ σε πολυμερικά πλακίδια PMMA με εφαρμογή εν θερμώ σφράγισης (hot embossing).

3.6.1.2 Μικρο-νανοϋφανση με πλάσμα PMMA επιφανειών

Η μικρο-νανοϋφανση των πλακιδίων PMMA, ανεξαρτήτως του αν ήταν σχηματοποιήμενα με πηγάδια, επιτεύχθηκε με χημεία πλάσματος οξυγόνου και σε ισχυρά ανιστροπικές συνθήκες, εντός του αντιδραστήρα πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ισχύς γεννήτριας 1900 W, ροή O₂ 100 sccm, πίεση 0.75 Pa, θερμοκρασία 15 °C και ισχύς ηλεκτροδίου 250 W, για χρόνο 10 min. Με χρόνο κατεργασίας μεγαλύτερο των 5 min, η μικρο-νανοϋφανση που δημιουργείται γίνεται περισσότερο πολύπλοκη, διαμορφώνοντας ινώδεις δομές τυχαίας τοπογραφίας. Χαρακτηριστικές εικόνες της δημιουργούμενης τοπογραφίας σε επιφάνειες PMMA για χρόνο κατεργασίας πλάσμα O₂ 10 min, απεικονίζονται μέσω μικροσκοπίου SEM (Εικόνα 3.17) σε διάφορες μεγεθύνσεις.





Εικόνα 3.17: Φωτογραφίες μικροσκοπίου SEM υπό κλίση 60° τυχαίας τοπογραφίας επιφανειών PMMA μετά από κατεργασία πλάσμα O₂ για χρόνο 10 min σε συνθήκες ισχύος γεννήτριας 1900 W, ροής O₂ 100 sccm, πίεσης 0.75 Pa, θερμοκρασίας 15 °C και ισχύος ηλεκτροδίου 250 W στον αντιδραστήρα ICP, σε μεγέθυνση α) x 2 500, β) x 5 000 και γ) x 10 000.

3.6.1.3 Υπερυδροφοβοποίηση επιφανειών PMMA

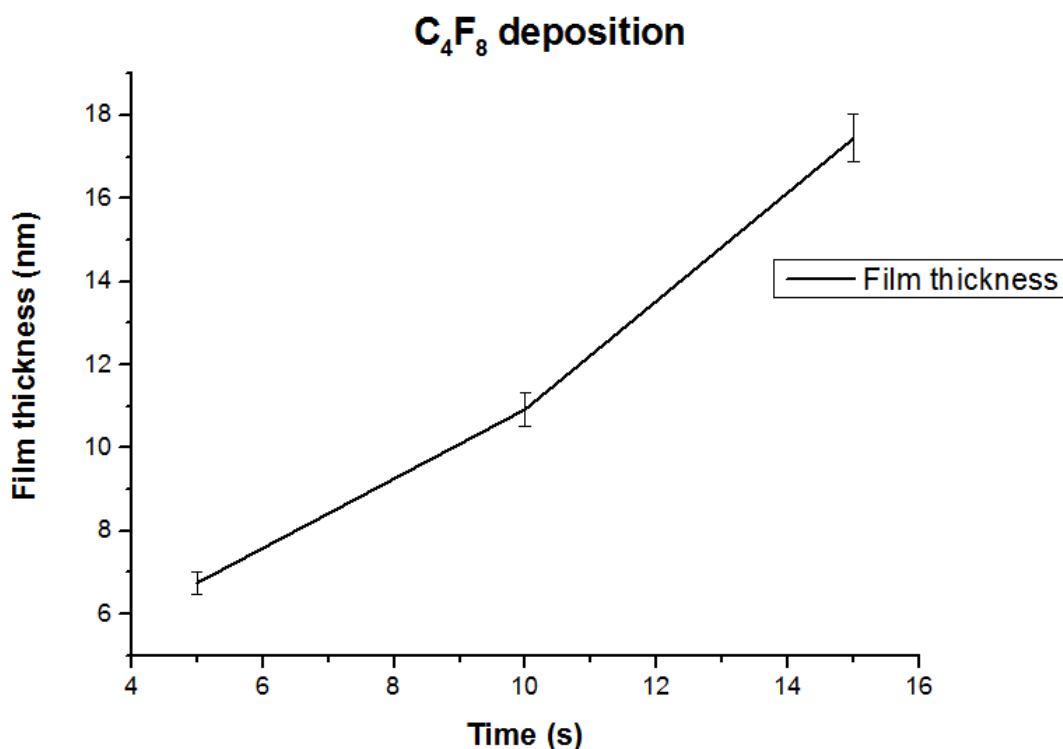
Μετά την εξασφάλιση της τοπογραφίας, προς παρασκευή υπερυδρόφοβων επιφανειών είναι απαραίτητη η χημική τροποποίησή τους με την εναπόθεση κατάλληλης υδρόφοβης επίστρωσης. Όπως θα δούμε στα επόμενα κεφάλαια, χρησιμοποιήθηκαν δύο ειδών επιστρώσεις, φθοριωμένο μονόστρωμα από διάλυμα 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS) και λεπτό υμένιο φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈. Στην πρώτη περίπτωση, κατά την εναπόθεση PFOTS, είναι απαραίτητο να προηγηθεί ενεργοποίηση της επιφάνειας με πλάσμα O₂ έτσι ώστε να δημιουργηθούν ομάδες υδροξυλίων (-OH) και καρβοξυλίων (-COOH), οι οποίες και θα δημιουργήσουν χημικό δεσμό με το φθοριωμένο μονόστρωμα, εξασφαλίζοντας έτσι, τη σταθεροποίησή του πάνω στην επιφάνεια. Συγκεκριμένα λοιπόν, η ενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα ICP, με παραμέτρους: ισχύ γεννήτριας 1900 W, ροή O₂ 100 sccm, πίεση 1.33 Pa, θερμοκρασία 15 °C και 0 bias, για χρόνο 20 s. Επειδή είναι σημαντική η διατήρηση των δημιουργούμενων ριζών μετά

την ενεργοποίηση, η εναπόθεση του μονοστρώματος δε θα πρέπει να καθυστερήσει. Έτσι, χρησιμοποιώντας τον αυτοσχέδιο μεταλλικό θάλαμο κενού, γίνεται αέρια εναπόθεση 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas) με 80 μL PFOTS να εμβολιάζονται σε 2 mL εξανίου με σταθερή ροή 50 $\mu\text{L}/\text{min}$, για συνολική διάρκεια περίπου 2 ωρών.

Για την εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα (Teflon) δεν απαιτείται ενεργοποίηση, αλλά η διαδικασία πραγματοποιείται άμεσα με χρήση του αντιδραστήρα ICP και εκκένωση πλάσματος αερίου C_4F_8 . Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται είναι ισχύς γεννήτριας 900 W, τάση 0 V, πίεση 5.33 Pa και ρυθμός εναπόθεσης περίπου ίσο με 66 nm min^{-1} . Ο χρόνος εναπόθεσης καθορίζει και το πάχος του υμενίου που διαμορφώνεται και επειδή, όπως θα δούμε στο Κεφάλαιο 5, το πάχος της επίστρωσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάδειξη των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων μιας επιφάνειας, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση του αντιδραστήρα ICP για πλάσμα C_4F_8 . Ειδικότερα, χρησιμοποιώντας ένα καθαρό δισκίδιο πυριτίου (Si), για συγκεκριμένους χρόνους (5, 10 και 15 s) μετρήθηκε με χρήση ελλειψομέτρου το αντίστοιχο πάχος του εναποτιθέμενου υμενίου. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 3-3, καθώς και η καμπύλη βαθμονόμησης στην Εικόνα 3.18. Σε κάθε περίπτωση, αξίζει να αναφερθεί ότι η εναπόθεση οποιουδήποτε από τα δύο υδρόφοβα υμένια, δίνει ισοδύναμα αποτελέσματα διαβροχής για το νερό και δεν επηρεάζει την τιμή της γωνίας επαφής.

Πίνακας 3-3: Εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C_4F_8 στον αντιδραστήρα ICP.

Χρόνος εναπόθεσης (s)	Πάχος υμενίου (nm)
5	6.75 ± 0.28
10	10.93 ± 0.41
15	17.45 ± 0.58

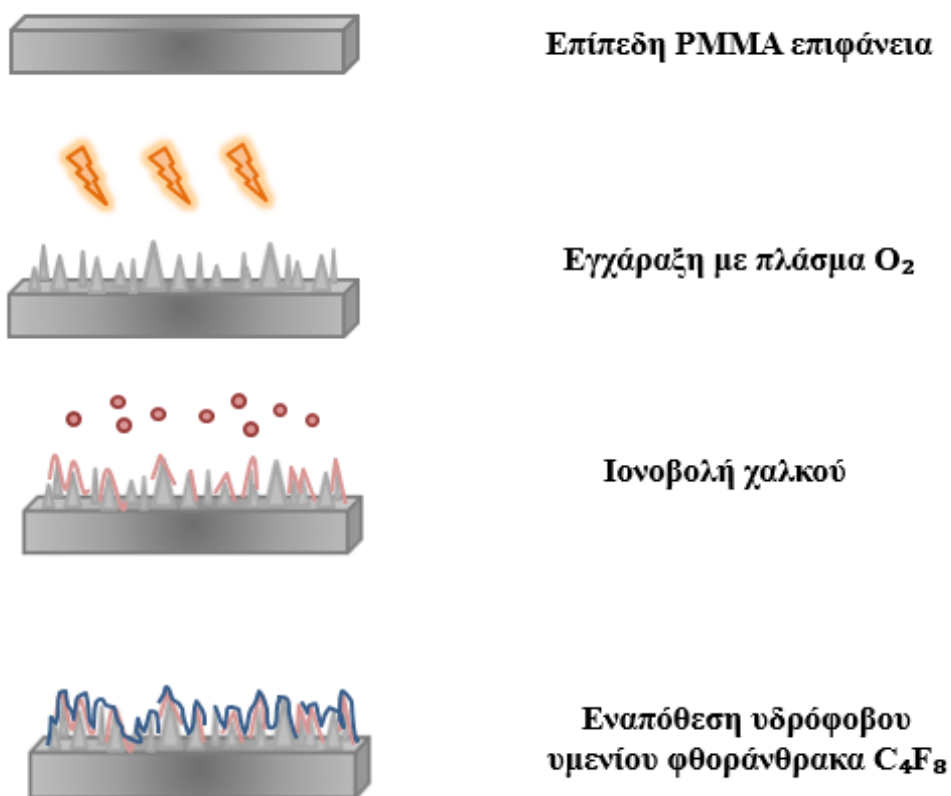


Εικόνα 3.18: Εναπόθεση υδρόφοβου φθορανθρακικού υμενίου από πλάσμα αερίου C₄F₈ στον αντιδραστήρα ICP.

3.6.1.4 Εναπόθεση μετάλλου σε νανοϋφασμένες ή μη επιφάνειες PMMA

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί δημιουργία νανοησίδων μετάλλου, όπως άργυρος (Ag), ή χαλκός (Cu), οι επιφάνειες υπέστησαν ιονοβολή (sputtering) του αντίστοιχου μετάλλου στο σύστημα Cooke CVE 401. Η διαδικασία αυτή, στην περίπτωση των κατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών PMMA, προηγείται της διεργασίας εναπόθεσης υδρόφοβου υμενίου, ενώ στις ακατέργαστες επιφάνειες εφαρμόζεται άμεσα. Προς καλύτερη κατανόηση, παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.19 τα στάδια παρασκευής μιας επιχλωμένης υπερυδρόφοβης επιφάνειας με εναπόθεση υδρόφοβου υμενίου φθοράνθρακα (C₄F₈).

Συνεχίζοντας, το ευγενές αέριο που χρησιμοποιείται για την ιονοβολή είναι το αργό (Ar), με συνήθεις παραμέτρους λειτουργίας πίεση βάσης 5×10^{-8} Torr, πυκνότητα ισχύος 1.41 W/cm^2 , πίεση Ar 3 mTorr, ρυθμός εναπόθεσής του 4.8 nm/sec και ομοιομορφία εναπόθεσης $\pm 5\%$. Οι συνθήκες λειτουργίας ήταν κοινές, ανεξαρτήτως του αν η επιφάνεια είχε υποστεί κατεργασία με πλάσμα ή όχι σε προγενέστερο στάδιο και αντιστοιχούσαν στη δημιουργία φιλμ μετάλλου 10 nm, μετρημένο σε ακατέργαστη επιφάνεια. Στις τραχείες επιφάνειες, λόγω τοπογραφίας δεν πραγματοποιείται κάλυψη από συνεχές φιλμ μετάλλου, παρά σημειώνεται μερική επιμετάλλωση.



Εικόνα 3.19: Σχηματική απόδοση των σταδίων παρασκευής επιχάλκωμνης μικρο-νανοϋφασμένης με πλάσμα O_2 υπερυδρόφοβης επιφάνειας PMMA με εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα C_4F_8 .

3.6.2 Ανάπτυξη καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942 προς μελέτη αντιβακτηριακής δράσης επιφανειών

Θα παρουσιαστούν εδώ οι μέθοδοι ανάπτυξης και δημιουργίας νέας καλλιέργειας των κυανοβακτηρίων, καθώς και η τεχνική χρησιμοποίησής τους πάνω στις επιφάνειες προς μελέτη για να εξεταστεί η βακτηριοκτόνος συμπεριφορά τους.

3.6.2.1 Μέθοδοι παραγωγής και ανάπτυξης καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942

Τα κυανοβακτήρια *Synechococcus* sp PCC 7942 αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο BG11 με pH 7.5 εντός του θαλάμου επώασης Gallenkamp INR-401-010, που τους εξασφαλίζει συνεχή ανάδευση, φωτισμό με λάμπες φθορισμού ψυχρού-λευκού φωτός ($100 \mu\text{mol photons/m}^2 \cdot \text{s}$) και θερμοκρασία 31°C , συνθήκες ιδανικές για τον πολλαπλασιασμό τους. Εναλλακτικά, προς επιβράδυνση του ρυθμού ανάπτυξής τους, αφαιρούνται από το θάλαμο και αφήνονται να αναπτυχθούν στον πάγκο εργασίας που εκτός από τις συνθήκες στειρότητας, τους εξασφαλίζει τον απαραίτητο φωτισμό για να πολλαπλασιαστούν. Σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής τους, η μελέτη της πορείας ανάπτυξής τους γίνεται με μέτρηση της συγκέντρωσης της Chl a, με χρήση του φασματοφωτόμετρου Jasco UVIDEK-610. Προς αυτό, 1 mL της καλλιέργειας φυγοκεντρείται και το ίζημα αυτής αναδιαλύεται σε 1 mL N, N-Διμεθυλοφορμαμίδιου (DMF), υπεύθυνο για την εκχύλιση της χλωροφύλλης a, η οποία εν συνεχεία καταμετράται στο φασματοφωτόμετρο.

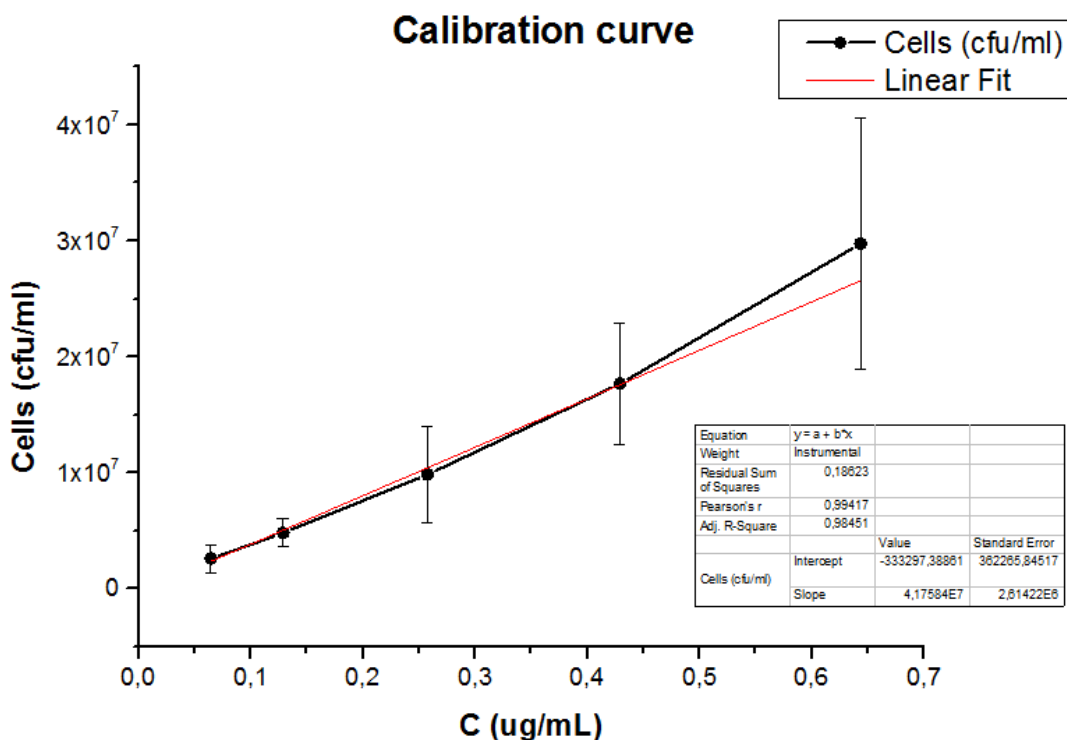
Σε πολλές περιπτώσεις κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, χρειάστηκε η δημιουργία καλλιέργειας ή συγκεκριμένου όγκου καλλιέργειας με την επιθυμητή συγκέντρωση. Για το λόγο αυτό, με χρήση του νόμου της αραίωσης ($C_{\text{αρχ}} \cdot V_{\text{αρχ}} = C_{\text{τελ}} \cdot V_{\text{τελ}}$), γνωρίζοντας τη συγκέντρωση ($C_{\text{αρχ}}$) των κυανοβακτηρίων, είναι δυνατός, ο υπολογισμός του απαραίτητου όγκου ($V_{\text{αρχ}}$) που χρειάζεται να ληφθεί από την αρχική

καλλιέργεια, ώστε να παραχθεί όγκος διαλύματος ($V_{\text{τελ}}$) της επιθυμητής συγκέντρωσης ($C_{\text{τελ}}$). Ο όγκος αυτός ($V_{\text{αρχ}}$), μετά από φυγοκέντριση στις 5 000 στροφές για 5 λεπτά, αναδιαλύεται στον επιθυμητό όγκο ($V_{\text{τελ}}$) θρεπτικού μέσου BG11, οπότε προκύπτει η συγκέντρωση ($C_{\text{τελ}}$) που επιθυμούμε.

Βασικό στάδιο στην κατανόηση του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 που χρησιμοποιούμε, είναι η αντιστοίχιση της συγκέντρωσης της Chl a ($\mu\text{g/mL}$) με τη συγκέντρωση των βακτηρίων (cfu/mL), στηριζόμενοι στην άμεση αναλογία που υπάρχει μεταξύ των δύο μεγεθών. Προς προσδιορισμό αυτής της αντιστοίχισης, πραγματοποιήθηκαν 5 διαδοχικές αραιώσεις, για καθεμιά από τις οποίες μετρήθηκε ο αριθμός των βακτηρίων, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImagePro, που ήταν συνδεδεμένο με το μικροσκόπιο φθορισμού Carl Zeiss Axioskop 2 plus. Πιο αναλυτικά, 5 μL από κάθε συγκέντρωση τοποθετήθηκαν πάνω σε γυάλινη επιφάνεια, η οποία εν συνεχεία καλύφθηκε με καλυπτρίδα για να εξασφαλιστεί ομοιόμορφη κατανομή της σταγόνας. Το δείγμα τοποθετήθηκε στο μικροσκόπιο φθορισμού, όπου με τη βοήθεια του ImagePro, έγινε αυτόματη καταμέτρηση του πληθυσμού των βακτηρίων (Cell number), μετά την έκθεσή τους σε πράσινο φως (διέγερση στα 510-560 nm). Η διαδικασία επαναλήφθηκε 15 φορές για κάθε συγκέντρωση, προς μείωση του στατιστικού σφάλματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεών μας (Cell number), συνοδευόμενα από τα αντίστοιχα στατιστικά σφάλματα μέσης τιμής [$\delta(\text{Cell number})$] φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3-4), καθώς και στην καμπύλη βαθμονόμησης (Εικόνα 3.20).

Πίνακας 3-4: Αντιστοίχιση συγκέντρωσης Chl a ($\mu\text{g/mL}$) σε συγκέντρωση κυττάρων (cfu/mL).

Dilution	C ($\mu\text{g/mL}$)	Cell number (cfu)	$\delta(\text{Cell}$ number) (cfu)	Cell density (cfu/mL)	$\delta(\text{Cell density})$ (cfu/mL)
1:100	0,06	29	13	2 593 939	1 203 489
1:50	0,13	53	13	4 800 000	1 223 916
1:25	0,26	108	46	9 834 343	4 173 874
1:15	0,43	194	57	17 660 606	5 218 638
1:10	0,64	327	119	29 739 958	10 789 415



Εικόνα 3.20: Καμπύλη αντιστοίχισης συγκέντρωσης Chl a (µg/mL) σε συγκέντρωση κυττάρων (cfu/mL).

Για τη μετάβαση από τον καταμετρούμενο αριθμό κυττάρων (cfu) σε βακτηριακή συγκέντρωση (cfu/mL), ξεκινάμε υπολογίζοντας τον όγκο στον οποίο αντιστοιχεί ο εκάστοτε μετρούμενος αριθμός κυττάρων:

$$V = (1,420 \times 1,060 \times 0,007) \text{ mm}^3 = 0,011 \text{ mm}^3,$$

όπου $(1,420 \times 1,060) \text{ mm}^2$ είναι η επιφάνεια μέτρησης της εικόνας του μικροσκοπίου, ενώ $7 \text{ µm} = 0,007 \text{ mm}$ είναι το πάχος του διαλύματος βακτηρίων που εγκλωβίζεται κάτω από την καλυπτρίδα.

Για τον υπολογισμό του πάχους αυτού, κάνουμε την παραδοχή ότι ο αρχικός όγκος ($V_0 = 5 \text{ µL}$) από το δείγμα μας, ισούται με τον όγκο που ορίζεται από την καλυπτρίδα, δεδομένου ότι δεν υπάρχει διαφυγή διαλύματος εκτός αυτής. Έτσι, αν $x = 30,3 \text{ mm}$ και $y = 22 \text{ mm}$, το μήκος και το πλάτος της καλυπτρίδας αντίστοιχα, και z είναι το

ζητούμενο πάχος διαλύματος κάτω από αυτή, τότε αν θεωρήσουμε ότι η σταγόνα κατανέμεται ομοιόμορφα, θα ισχύει:

$$x \cdot y \cdot z = V_0 \Rightarrow z = \frac{V_0}{x \cdot y} = \frac{5}{30,3 \cdot 22} = \frac{5}{667} \text{ mm} = 0,007 \text{ mm} = 7 \mu\text{m}$$

Με αυτό τον τρόπο, έχοντας πλέον βρει τον όγκο ($V = 0,011 \text{ mm}^3$) στον οποίο βρίσκονται τα καταμετρούμενα κύτταρα, μπορούμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή τους (cfu/mL).

3.6.2.2 Μέθοδοι αντιβακτηριακής μελέτης επιφανειών

Όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 1.1, οι αντιβακτηριακές επιφάνειες, αναλόγως της επίδρασής τους στο βακτηριακό πληθυσμό, διακρίνονται σε μη προσκολλητικές και βακτηριοκτόνες. Στην παρούσα εργασία, προς έλεγχο καθεμιάς από τις ιδιότητες αυτές, ακολουθήθηκε διαφορετική πειραματική μέθοδος.

Συγκεκριμένα, για τη μελέτη της μη προσκολλητικής δράσης, χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα, πλακίδια πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) με τα εντυπωμένα παραλληλόγραμμα φρεάτια διαστάσεων $50 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$, στα οποία τοποθετείται ποσότητα 1 mL καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942 της επιθυμητής συγκέντρωσης. Ακολούθως, τα δείγματα τοποθετούνται εντός του θαλάμου LabTech, Daihan LabTech Co., LTD (παράγραφος 3.5), που εξασφάλιζε τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη των βακτηρίων, δηλαδή θερμοκρασία $28 \text{ }^\circ\text{C}$, φως και σχετικά υψηλή υγρασία ($>50\%$). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε για 72 ώρες, με μέτρηση της βακτηριακής προσκόλλησης κάθε 24 ώρες.

Για το λόγο αυτό, στο τέλος κάθε 24ώρου, πραγματοποιούταν απομάκρυνση των μη προσκολλημένων βακτηρίων μέσω απλής ανατροπής των επιφανειών, και στη

συνέχεια, τοποθετούνταν στο μικροσκόπιο φθορισμού Axioskop 2 plus (Carl Zeiss). Προκειμένου να αξιολογηθεί ο βαθμός της βακτηριακής προσκόλλησης, λήφθηκαν δεκαπέντε φωτογραφίες από χαρακτηριστικά σημεία σε κάθε επιφάνεια με χρήση του συνδεδεμένου με το μικροσκόπιο λογισμικού ImagePro, για τις οποίες πραγματοποιήθηκε μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού της χλωροφύλλης *a*, καθώς και της επί τοις εκατό βακτηριακής κάλυψης. Για την εκτίμηση της αντιβακτηριακής δράσης κάθε επιφάνειας, υπολογίστηκε η μέση ένταση φθορισμού και η μέση ποσοστιαία βακτηριακή κάλυψη από το σύνολο των φωτογραφιών της κάθε επιφάνειας.

Ως περαιτέρω μελέτη, πραγματοποιήθηκε στο τέλος του πειράματος (72 ώρες) μέτρηση τόσο της μέσης έντασης φθορισμού, όσο και της % βακτηριακής κάλυψης μετά από ξέπλυμα καθεμίας από τις επιφάνειες με απιονισμένο νερό, προκειμένου να διαπιστωθεί αν μεταβάλλεται ο βαθμός προσκόλλησης.

Για τη μελέτη της βακτηριοκτόνου δράσης των επιφανειών, ποσότητα 50 μL της απαιτούμενης συγκέντρωσης καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942 τοποθετείται με τη βοήθεια πιπέττας σε κάθε επιφάνεια. Η διάμετρος του ίχνους που αφήνει η σταγόνα πάνω σε κάθε επιφάνεια, διαφέρει αναλόγως με το είδος της, όπως θα αποδειχθεί και στην παράγραφο 5.2. Οι επιφάνειες διατηρούνται σε κατάλληλο χώρο που παρέχει φωτισμό και συνθήκες θέρμανσης ($\approx 25^\circ\text{C}$) για την ανάπτυξη των *Synechococcus* sp PCC 7942.

Προς εξερεύνηση της αντιβακτηριακής συμπεριφοράς κάθε επιφάνειας, μετράται καθημερινά ο φθορισμός της Chl *a* με χρήση του οργάνου PEA-fluorometer, λαμβάνοντας την ένδειξη του αρχικού φθορισμού F_0 . Η μελέτη συνεχίζεται έως την ολοκλήρωση της εκθετικής φάσης ανάπτυξης στην επιφάνεια αναφοράς, στην ακατέργαστη δηλαδή επιφάνεια PMMA. Υπολογίζεται εν συνεχεία ο δείκτης M_i (παράγραφος 2.4) της κάθε ημέρας, ως ένδειξη της % μεταβολής στο φθορισμό της κάθε επιφάνειας σε σχέση με την αρχική μέρα, ο οποίος εξασφαλίζοντας εξ'ορισμού ανεξαρτησία από την αρχική τιμή φθορισμού σε κάθε επιφάνεια, αποτελεί αντικειμενικό κριτήριο για την εξέλιξη του βακτηριακού πληθυσμού στην εκάστοτε επιφάνεια. Επιπρόσθετα, με τον υπολογισμό του δείκτη Π_i (παράγραφος 2.4) μπορεί να προκύψει η αντιβακτηριακή δράση κάθε επιφάνειας, συγκριτικά με την επιφάνεια αναφοράς.

4. Μελέτη προσκόλλησης βακτηρίων σε μικρο- νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζεται η πειραματική διαδικασία που πραγματοποιήθηκε, με σκοπό να αποδειχτεί η βασική ιδιότητα των μικρο-νανοϋφασμένων υπερυδρόφοβων επιφανειών, να αναστέλλουν την προσκόλληση βακτηρίων σε αυτές.

4.1 Πειραματική διαδικασία

Η μελέτη της προσκόλλησης των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 σε υπερυδρόφοβες επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) πραγματοποιήθηκε ποιοτικά και ποσοτικά, συγκριτικά με ακατέργαστες επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα), καθώς και εμπορικές (Thermo Scientific Nunc HydroCell 6 cm dish) προορισμένες για την παρεμπόδιση προσκόλλησης κυττάρων. Σημειώνουμε πως χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη υπερυδρόφοβων επιφανειών, διαφοροποιημένων ως προς την εναποτιθέμενη υδρόφοβη επίστρωση (PFOTS/Teflon), προκειμένου να εξετάσουμε ενδεχόμενη διαφοροποίηση στην αντιβακτηριακή τους δράση.

Ως προς το κατασκευαστικό κομμάτι των υπερυδρόφοβων επιφανειών, όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 3.6.1.2 πραγματοποιείται με τη δημιουργία νανοϋφανσης με χρήση πλάσμα O₂ στον αντιδραστήρα ICP, ακολουθούμενη από εναπόθεση

φθοριωμένου μονοστρώματος 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριγλωροσιλανίου (PFOTS) ή λεπτού υμενίου φθοράνθρακα (Teflon) από πλάσμα C₄F₈.

Με εξαίρεση τις εμπορικές επιφάνειες, στις δύο ειδών υπερυδροφώβες καθώς και στις ακατέργαστες PMMA, έχουν εντυπωθεί παραλληλόγραμμα φρεάτια προσχεδιασμένων διαστάσεων (50 x 20 x 1) mm³, προκειμένου να είναι δυνατή η συγκράτηση 1 mL βακτηριακού διαλύματος.

Η συγκέντρωση *Synechococcus* sp PCC 7942 που επιλέχθηκε είναι 2.3 x 10⁹ cfu/mL, (συγκέντρωση χλωροφύλλης a: 50 µg/ml, Πίνακας 3-4, Κεφάλαιο 3) ιδιαίτερος υψηλή ώστε να απεικονίζει πραγματικές καταστάσεις έκθεσης επιφανειών σε εστίες βακτηρίων. Δοκιμάστηκε επίσης συγκέντρωση 4.6 x 10⁹ cfu/mL (100 µg/mL), η οποία όμως έδωσε τα ίδια αποτελέσματα στο πείραμά μας, με αποτέλεσμα να διατηρηθεί εκείνη των 2.3 x 10⁹ cfu/mL.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η μη προσκολλητική ικανότητα των επιφανειών πραγματοποιήθηκε επώαση των κυανοβακτηρίων για 72 ώρες και ανά 24 ώρες μέτρηση της μέσης έντασης φθορισμού χλωροφύλλης a και της μέσης επί τοις εκατό βακτηριακής κάλυψης με χρήση του μικροσκοπίου Axioskop 2 plus μέσω του συνδεδεμένου λογισμικού ImagePro (παράγραφος 3.4.1). Οι ίδιες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά το ξέπλυμα των επιφανειών στο τέλος του πειράματος (72 ώρες).


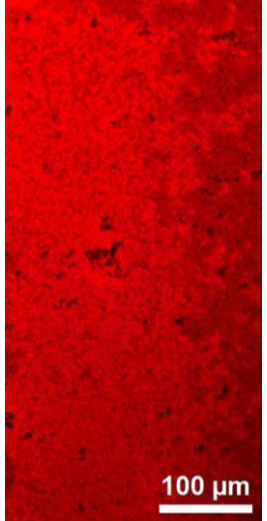

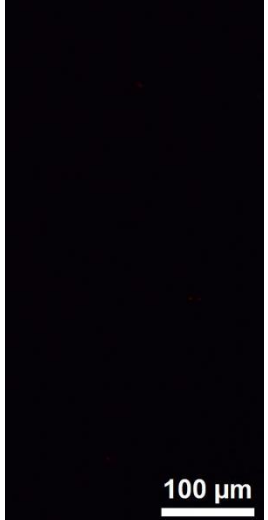
4.2 Αποτελέσματα

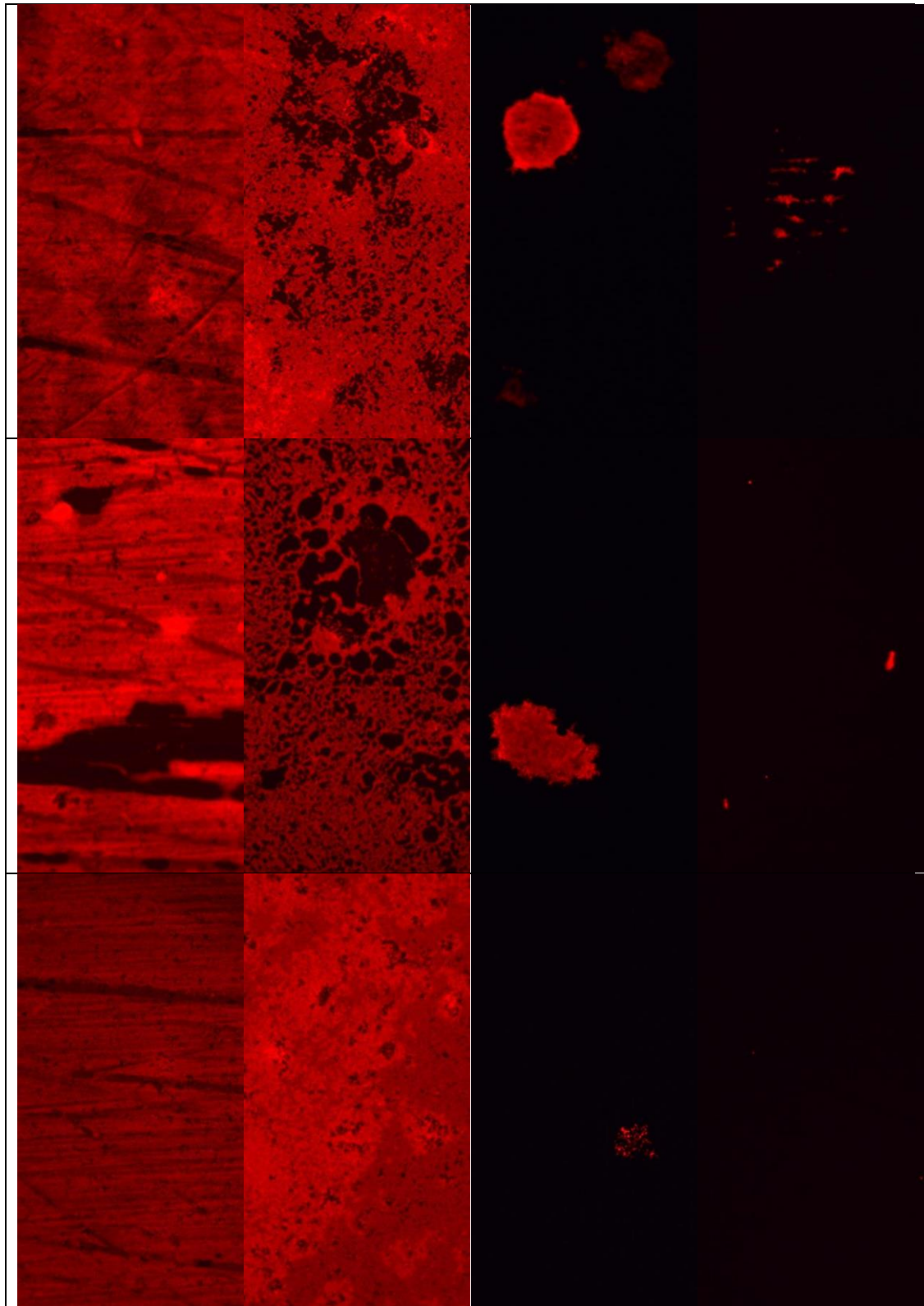
Εδώ παρατίθενται τα αποτελέσματα του πειράματος για συγκέντρωση 2.3 x 10⁹ cfu/mL *Synechococcus* sp PCC 7942 που τοποθετήθηκε πάνω στα τέσσερα είδη επιφανειών, δηλαδή στις ακατέργαστες επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα), τις εμπορικές επιφάνειες (Thermo Scientific Nunc HydroCell) και τις μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδροφώβες επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα), με υδροφώβη επίστρωση PFOTS ή Teflon). Ξεκινάμε με κάποιες χαρακτηριστικές εικόνες από τις επιφάνειες στο τέλος κάθε 24ώρου και μετά το ξέπλυμα (Πίνακας 4-1, 4-2, 4-3 και 4-4) και συνεχίζουμε με το ραβδόγραμμα της μέσης έντασης φθορισμού (Εικόνα

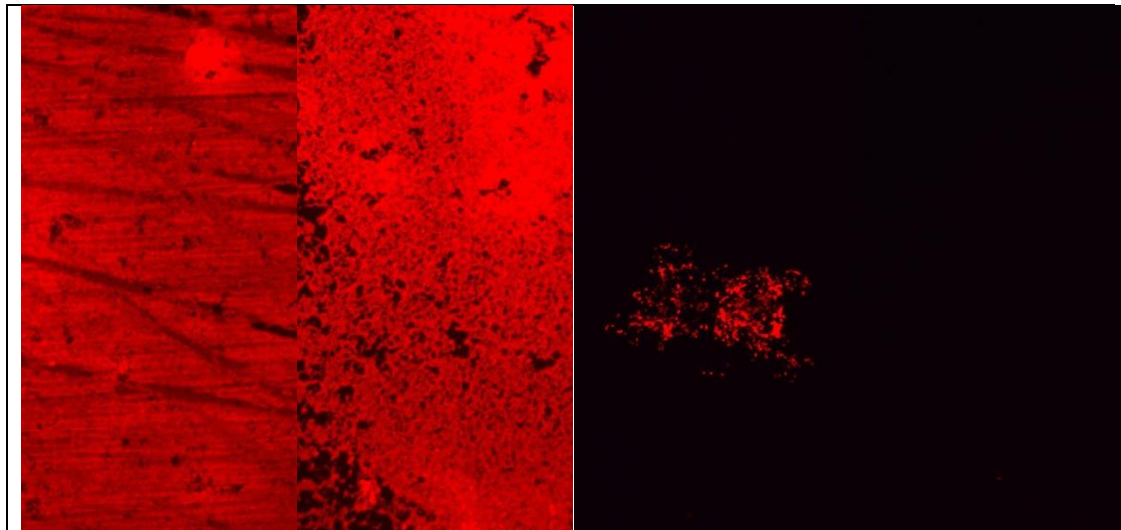
4.1), καθώς και με την % βακτηριακή κάλυψη (Εικόνα 4.3). Να σημειωθεί ότι η ακατέργαστη επιφάνεια PMMA εκλείπει της τελευταίας μέρας παρατήρησης, χωρίς όμως αυτό να αποτελεί πρόβλημα, δεδομένου ότι ο βακτηριακός πληθυσμός αναμένουμε να συνεχίζει να αυξάνεται και κατά την τρίτη μέρα του πειράματος, και δυνάμενοι να χρησιμοποιήσουμε ως μέτρο σύγκρισης για τις νανοϋφασμένες επιφάνειες, την εμπορική, την οποία η ακατέργαστη θα ξεπερνούσε σίγουρα σε βαθμό προσκόλλησης.

ι. Επιφάνειες μετά από 24 ώρες

Πίνακας 4-1: Ακατέργαστες, Εμπορικές και Υπερυδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA στο τέλος της 1^{ης} ημέρας. Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.

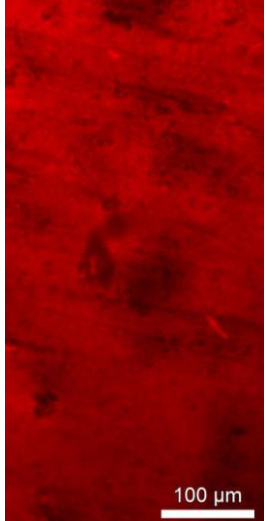
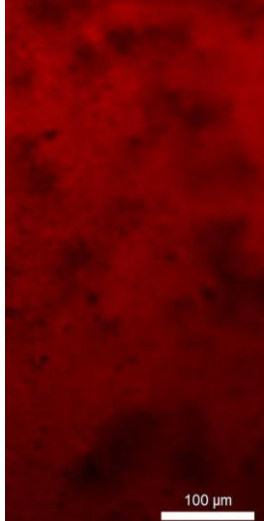
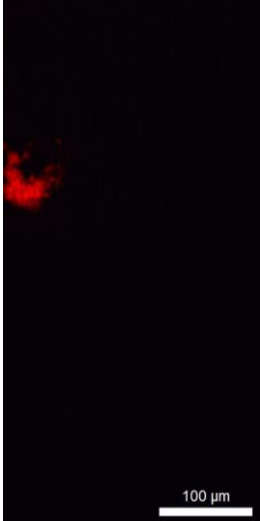
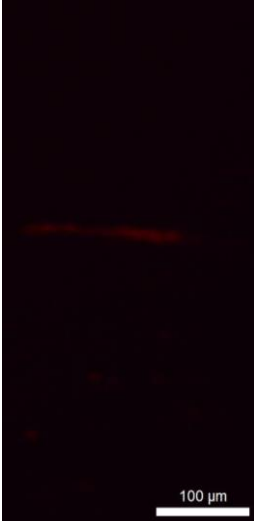
Ακατέργαστη επιφάνεια PMMA	Εμπορική επιφάνεια (Thermo Scientific Nunc HydroCell)	Υπερυδρόφοβη, PFOTS επικαλυμένη επιφάνεια PMMA	Υπερυδρόφοβη, Teflon επικαλυμένη επιφάνεια PMMA
			

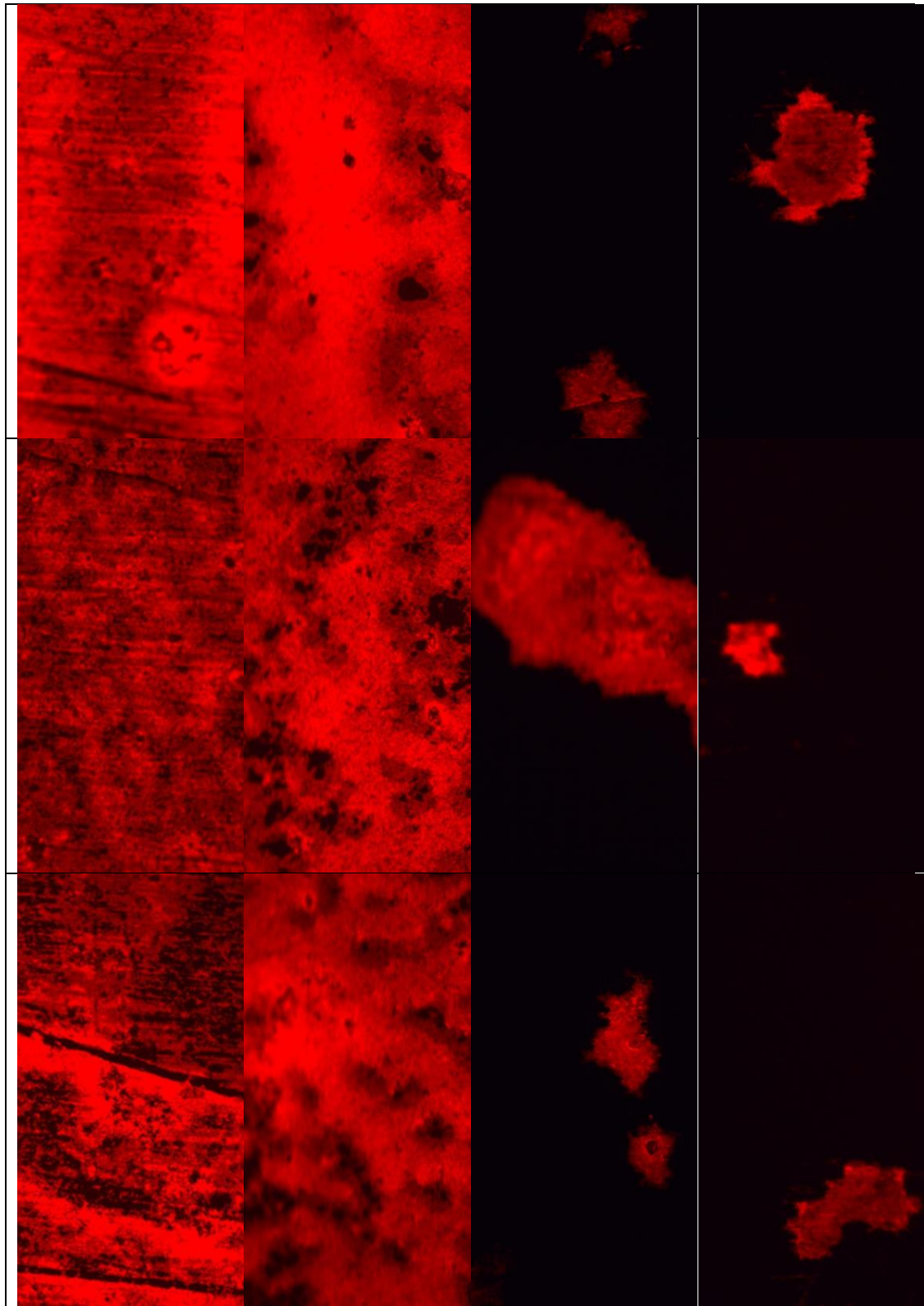


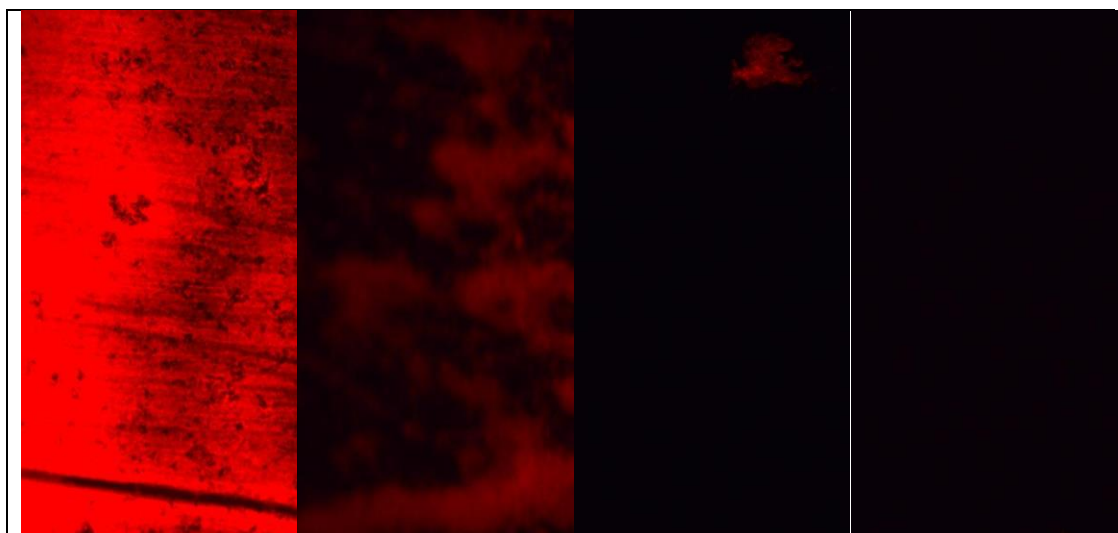


ii. Επιφάνειες μετά από 48 ώρες

Πίνακας 4-2: Ακατέργαστες, Εμπορικές και Υπερυδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA στο τέλος της 2^{ης} ημέρας. Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.

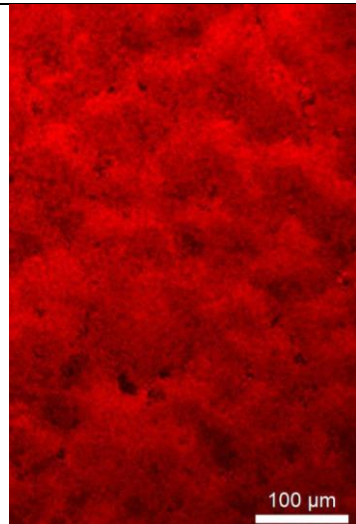
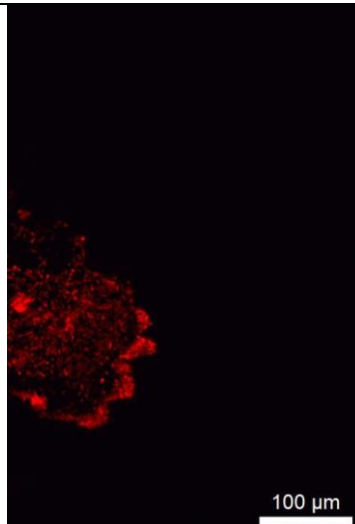

Ακατέργαστη επιφάνεια PMMA	Εμπορική επιφάνεια (Thermo Scientific Nunc	Υπερυδρόφοβη, PFOTS επικαλυμένη επιφάνεια PMMA	Υπερυδρόφοβη, Teflon επικαλυμένη επιφάνεια PMMA
			

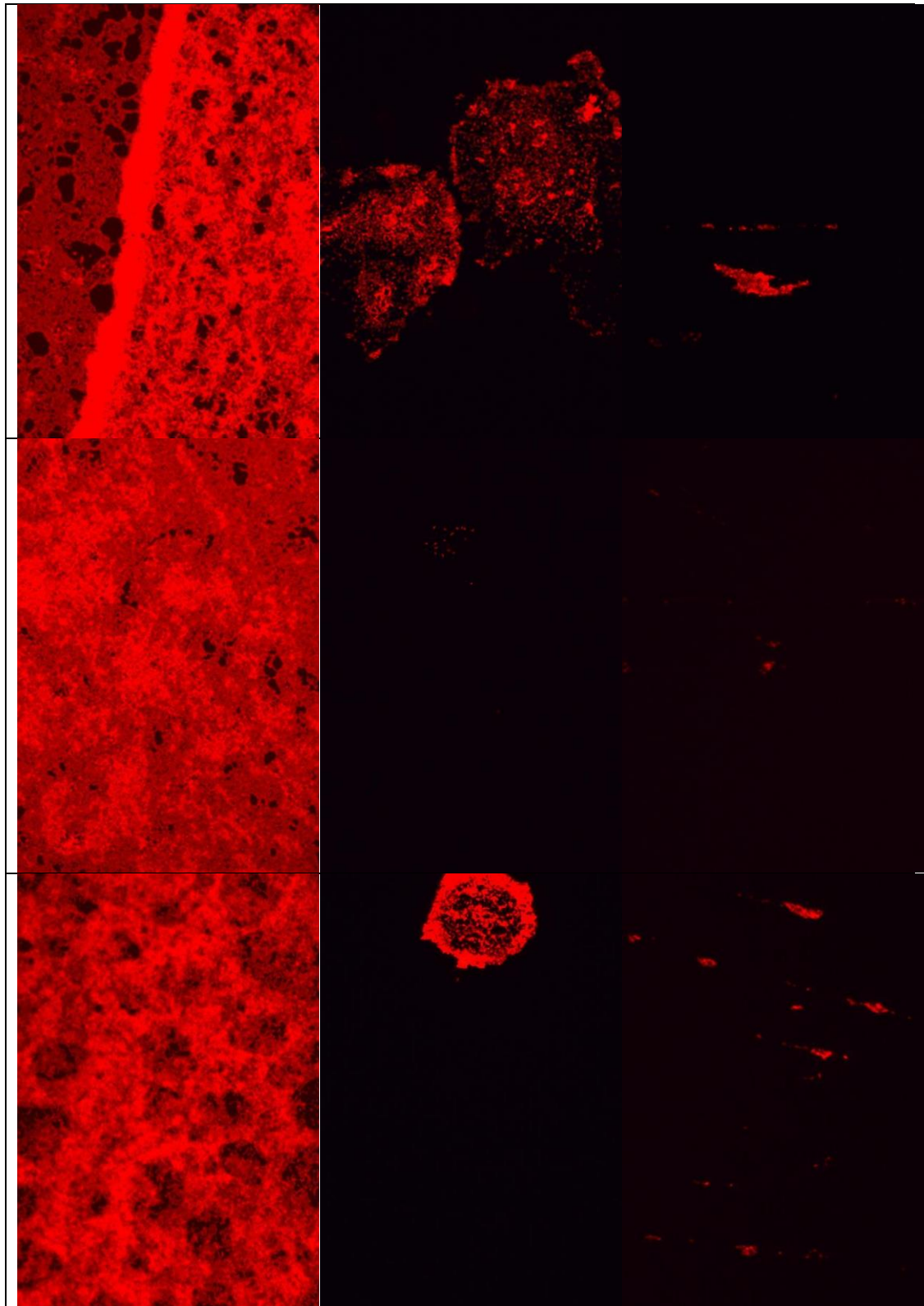


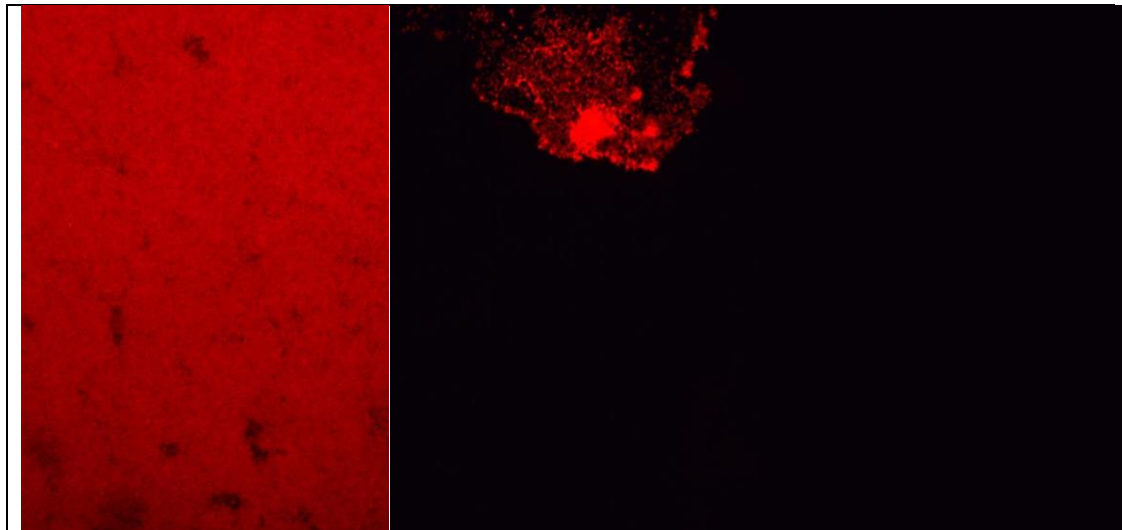


iii. Επιφάνειες μετά από 72 ώρες

Πίνακας 4-3: Εμπορικές και Υπερδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA στο τέλος της 3^{ης} ημέρας. Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.

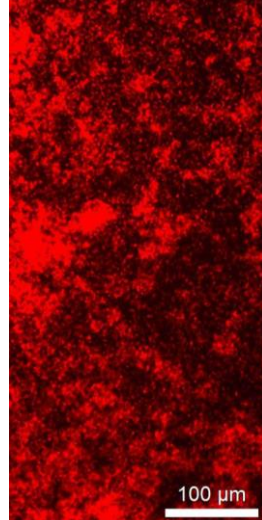
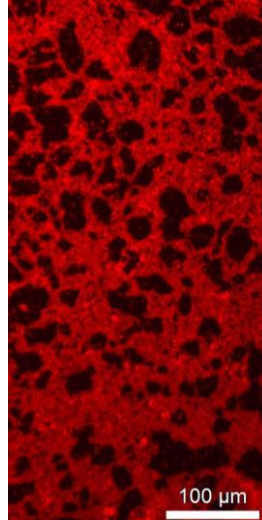


Εμπορική επιφάνεια (Thermo Scientific Nunc HydroCell)	Υπερδρόφοβη, PFOTS επικαλυμένη επιφάνεια PMMA	Υπερδρόφοβη, Teflon επικαλυμένη επιφάνεια PMMA
		

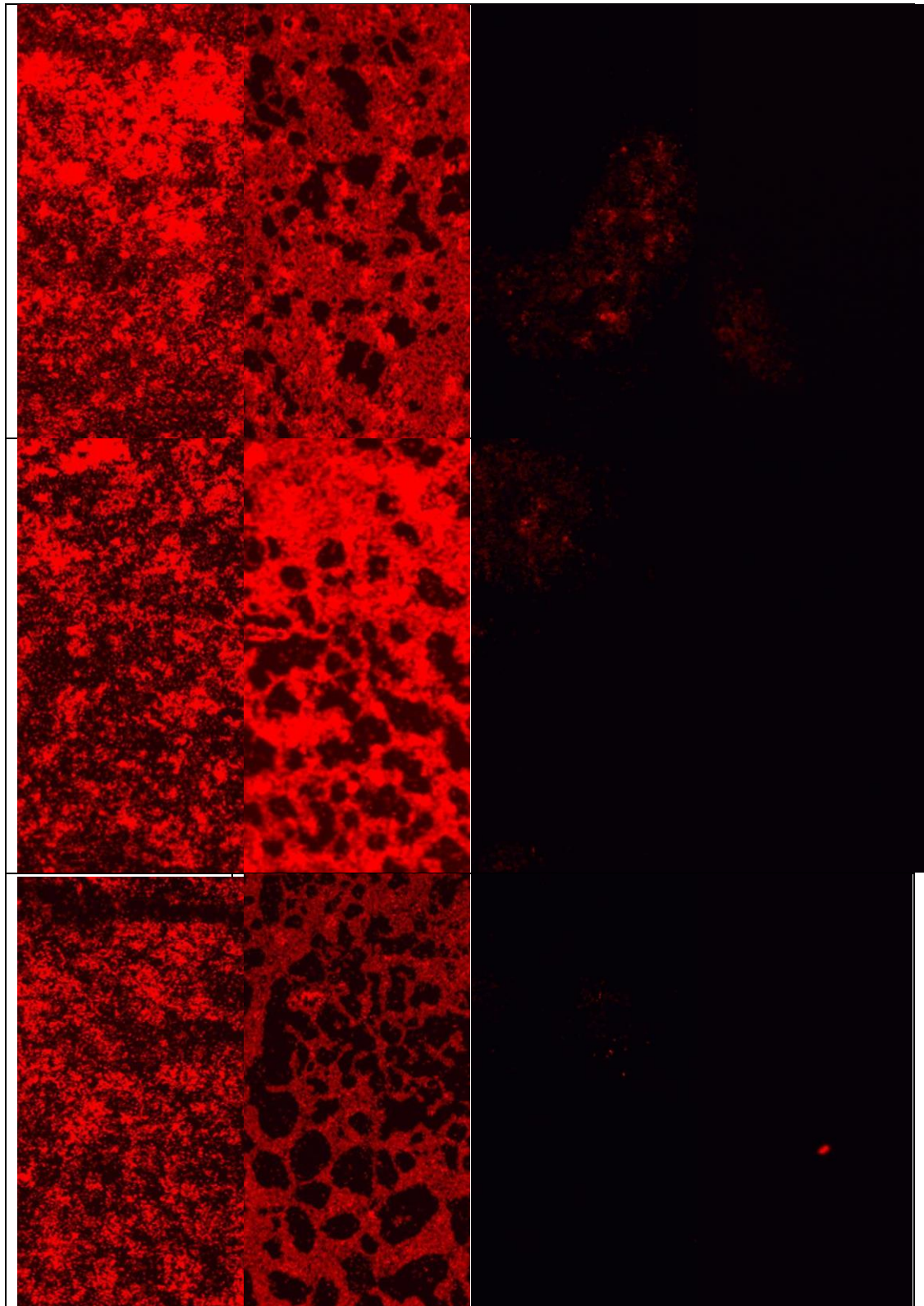


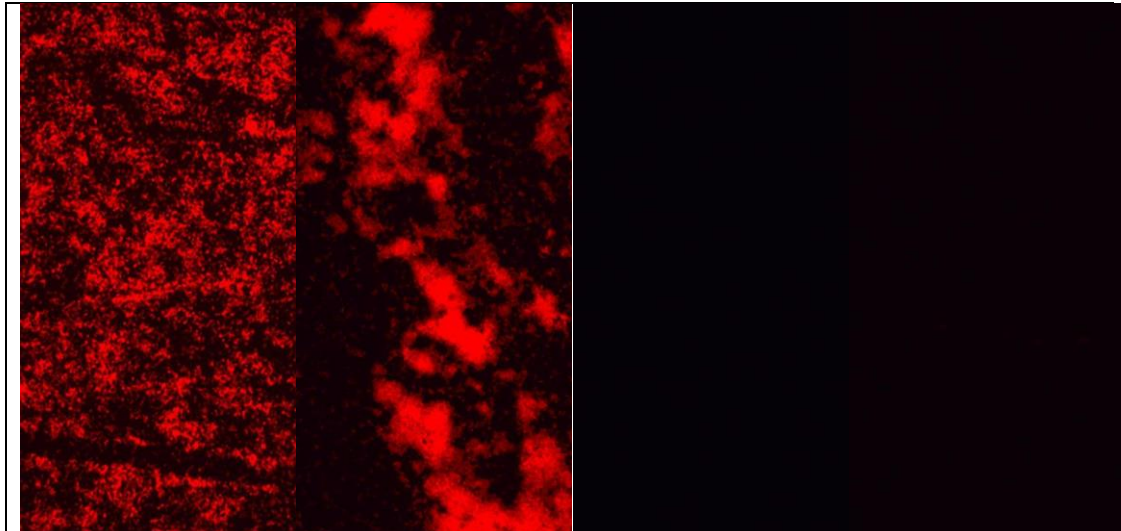


iv. Επιφάνειες μετά το ξέπλυμα (στο τέλος του πειράματος)

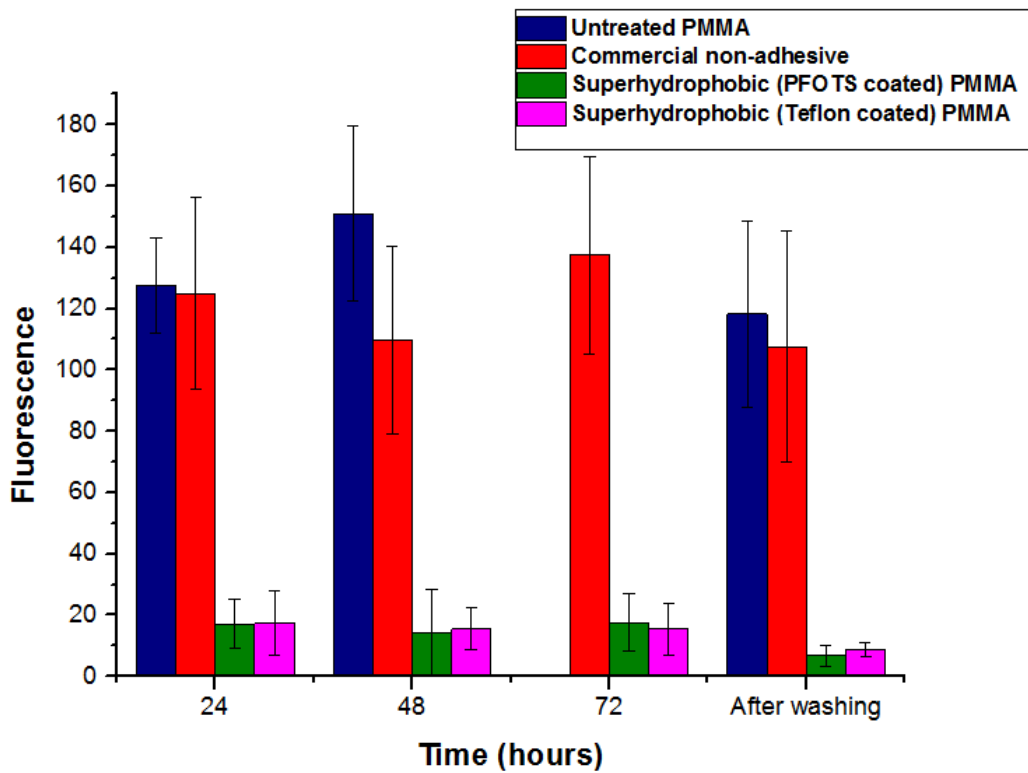
Πίνακας 4-4: Ακατέργαστες, Εμπορικές και Υπερδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA μετά το ξέπλυμα της τελευταίας ημέρας. Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.

Ακατέργαστη επιφάνεια PMMA	Εμπορική επιφάνεια (Thermo Scientific Nunc HydroCell)	Υπερδρόφοβη, PFOTS επικαλυμένη επιφάνεια PMMA	Υπερδρόφοβη, Teflon επικαλυμένη επιφάνεια PMMA
			

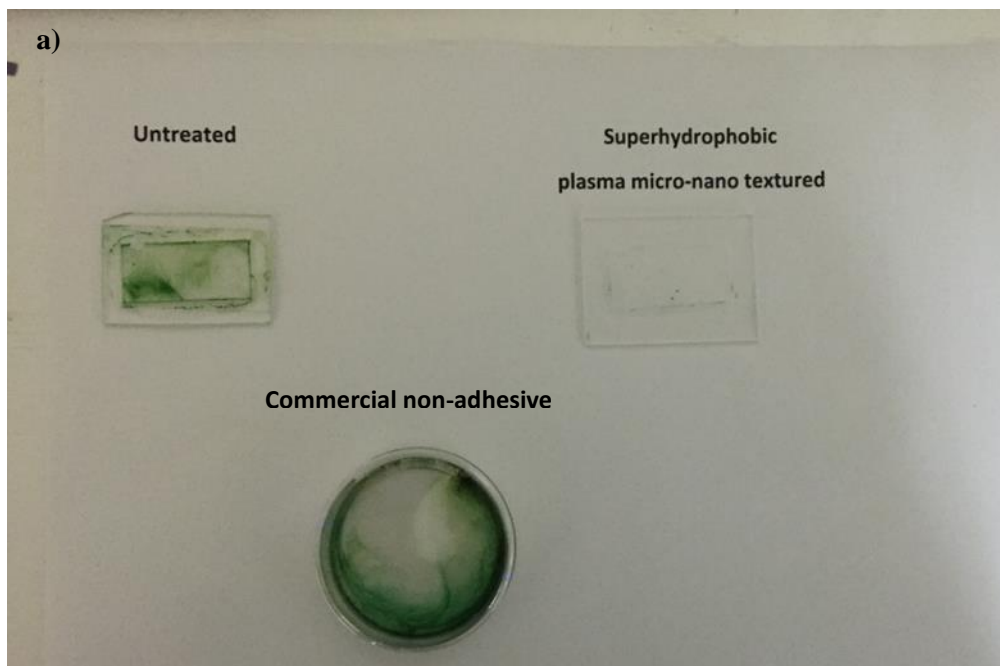


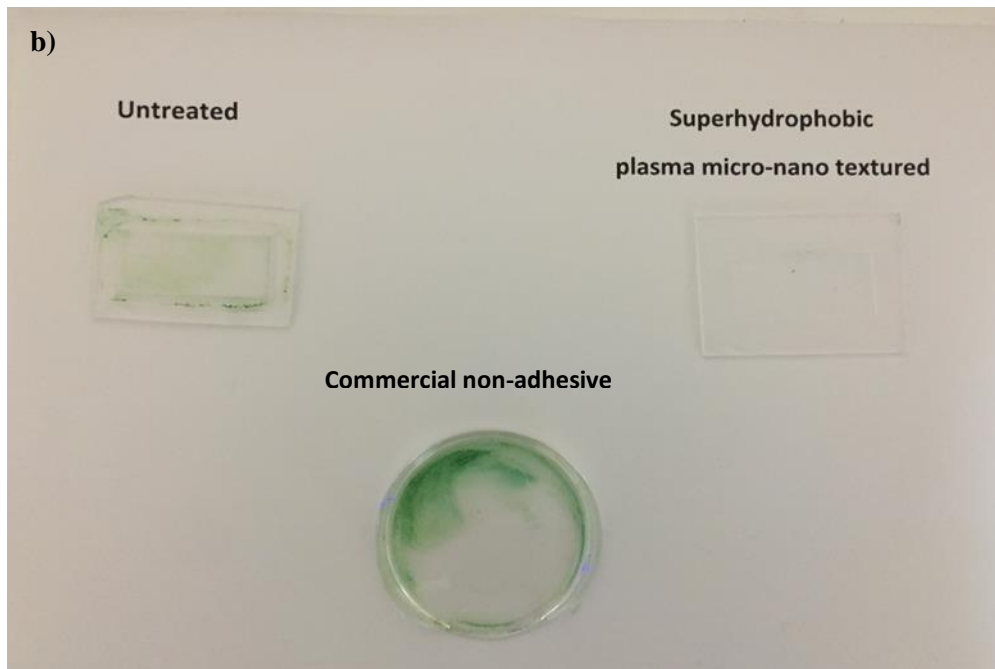


Παρατίθεται στη συνέχεια το ραβδόγραμμα της μέσης έντασης φθορισμού κάθε επιφάνειας (Εικόνα 4.1) για κάθε ημέρα πειράματος, καθώς και φωτογραφίες (Εικόνα 4.2) σε μακροσκοπικό επίπεδο των επιφανειών πριν και μετά το ξέπλυμα με απιονισμένο νερό, που οπτικοποιούν το βαθμό βακτηριακής προσκόλλησης. Προς ποσοτικοποίηση του βαθμού κάλυψης της κάθε επιφάνειας, παρουσιάζεται τέλος ραβδόγραμμα με την % βακτηριακή κάλυψη των επιφανειών (Εικόνα 4.3) για κάθε ημέρα πειράματος και μετά το ξέπλωμά τους, όπως υπολογίστηκε από το λογισμικό ImagePro.

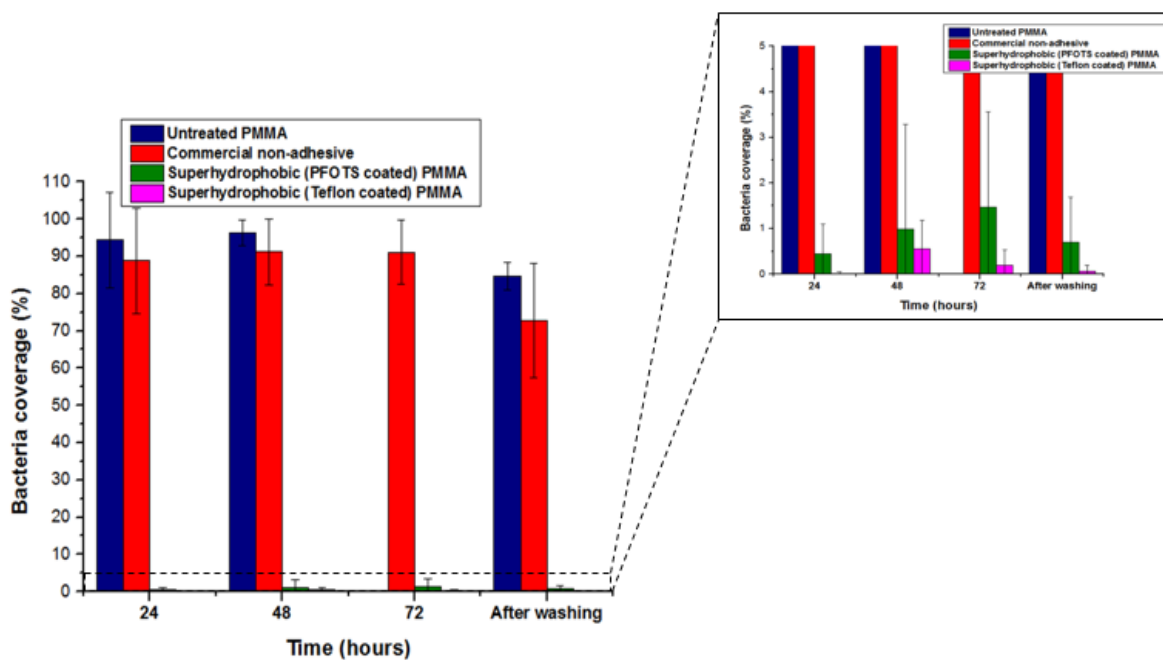


Εικόνα 4.1: Μέσος φθορισμός ακατέργαστης, υπερυδρόφοβων (επικαλυμένων με PFOTS και Teflon) επιφανειών PMMA, καθώς και των ανασταλτικών προσκόλλησης βακτηρίων Thermo Scientific Nunc HydroCell επιφανειών μετά από 24, 48 και 72 ώρες και μετά από ξέπλυμα την τελευταία μέρα.





Εικόνα 4.2: Φωτογραφίες από ακατέργαστες, υπερυδρόφοβες (με εναπόθεση Teflon) PMMA και εμπορικές επιφάνειες την τελευταία ημέρα του πειράματος (72 ώρες): α) πριν και β) μετά το ξέπλυμα.



Εικόνα 4.3: % Βακτηριακή κάλυψη σε ακατέργαστη, υπερυδρόφοβες επιφάνειες PMMA και εμπορική ανασταλτική κυτταρικής προσκόλλησης μετά από 24, 48 και 72 ώρες και ξέπλυμα στο τέλος του πειράματος.

4.3 Συζήτηση και συμπεράσματα

Συγκεντρώνοντας τα αποτελέσματά μας από τα διαγράμματα μέσης έντασης φθορισμού και από την ποσοστιαία βακτηριακή κάλυψη (Εικόνες 4.1 και 4.3, αντίστοιχα), καθώς και από την ίδια την εμπειρία μας κατά την παρατήρηση του βακτηριακού πληθυσμού στο μικροσκόπιο φθορισμού, (Πίνακες 4-1, 4-2, 4-3 και 4-4), μπορούμε να οδηγηθούμε σε κάποια ασφαλή συμπεράσματα ως προς την ικανότητα κάθε επιφάνειας να απωθεί βακτήρια.

Αρχικά, στις ακατέργαστες επιφάνειες ήταν εμφανής ο σχηματισμός βιοφιλμ πολλαπλών στρώσεων, που επικάλυπτε το μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειας (> 90% βακτηριακή κάλυψη). Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε αμείωτο καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος (24 και 48 ώρες), εντεινόμενο κατά την εξέλιξή του, εμφανίζοντας μέχρι 95% κάλυψη και προσεγγιστικά 13% αύξηση στο φθορισμό.

Σε μεγάλο βαθμό συγκρίσιμη με την ακατέργαστη επιφάνεια, παρουσιάζεται η εμπορική επιφάνεια HydroCell, η οποία δεν καταφέρνει να εμφανίσει αξιόλογη αποθητική συμπεριφορά προς τα βακτήρια. Το γεγονός αυτό μαρτυρεί η προκύπτουσα επιφανειακή κάλυψη, που αγγίζει κατά μέσο όρο το 90%, σχεδόν σταθερή με το πέρασμα των ημερών, καθώς και τα επίπεδα φθορισμού, που προσεγγίζουν εκείνα της ακατέργαστης επιφάνειας. Όπως είναι εμφανές και από τις εικόνες μικροσκοπίου, έχουμε κι εδώ σχηματισμό πολλαπλών βακτηριακών στρωμάτων.

Ερχόμενοι στις νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες, χωρίς προς το παρόν να προβούμε σε διάκριση μεταξύ τους ως προς το στρώμα επικάλυψης, είναι εμφανής η ικανότητά τους να εμποδίζουν τα βακτήρια να προσκολληθούν, παρουσιάζοντας καλύτερη επίδοση ακόμη και από ειδικά κατασκευασμένες επιφάνειες εμπορίου για την αναστολή προσκόλλησης βακτηρίων. Συγκεκριμένα, με δείκτη επιφανειακής κάλυψης κυμαινόμενο από 0,01% έως και 1,5%, αναλόγως βέβαια του χρόνου του πειράματος και του είδους της υπερυδρόφοβης επιφάνειας, παρουσιάζουν τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους μικρότερη βακτηριακή κάλυψη σε σχέση με την ακατέργαστη ή εμπορική επιφάνεια (1:158 και 1:150 για την ακατέργαστη και την εμπορική επιφάνεια, αντίστοιχα). Επιπλέον, ως προς τη μέση ένταση φθορισμού τους, με τιμές κατά $\approx 89\%$ και $\approx 87\%$ μειωμένες συγκριτικά με της ακατέργαστης και της εμπορικής,

κατ'αντιστοιχία, δεν μπορεί να αμφισβητηθεί η απωθητική συμπεριφορά τους. Τα ποσοστά αυτά έχουν εξαχθεί για το σύνολο του πειράματος, με μικρές διακυμάνσεις αναλόγως της μέρας μελέτης και του είδους υπερυδροφικής επιφάνειας, γεγονός που μπορεί να μας εξασφαλίσει τη σχεδόν σταθερή συμπεριφορά των υπερυδροφικών επιφανειών, αν λάβουμε υπόψη και την ύπαρξη στατιστικών σφαλμάτων.

Ακόμη όμως και με γυμνό μάτι, μπορούμε να διακρίνουμε τη μεγάλη διαφοροποίηση στο πλήθος των βακτηρίων που έχουν παραμείνει στις υπερυδροφικές επιφάνειες, όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 4.2a, όπου μόνο ίχνη βακτηρίων μπορούν να εντοπιστούν, σε αντίθεση με την ακατέργαστη και την εμπορική επιφάνεια, όπου βλέπουμε ξεκάθαρα στρώσεις βακτηρίων.

Αν θέλουμε να περιοριστούμε στα δύο είδη υπερυδροφικών επιφανειών, παρόλο που παρουσιάζουν παρόμοια συμπεριφορά, διαφαίνεται μια εντονότερη απωθητική ικανότητα κατά την εναπόθεση στρώματος Teflon, η οποία κατά ένα μικρό ποσοστό μπορεί να οφείλεται σε τοπικές αλλοιώσεις στην επιφάνεια με PFOTS, και σε δεύτερο βαθμό σε στατιστικά σφάλματα. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά στην ένταση φθορισμού, οι δύο επιφάνειες παρουσιάζουν αμελητέες διαφορές, εμφανίζοντας την πρώτη μέρα κατά 87% μειωμένες τιμές σε σχέση με την ακατέργαστη, και τη δεύτερη μέρα κατά 91% και 89% μείωση η επιστρωμένη με PFOTS και Teflon επιφάνεια, αντίστοιχα συγκριτικά με την ακατέργαστη.

Σημαντικότερες διαφορές μεταξύ των δυο νανοϋφασμένων επιφανειών ανακύπτουν κατά τη μέτρηση της βακτηριακής κάλυψης. Συγκεκριμένα, η επικάλυψη PFOTS εμφανίζει 0.4-1.5% βακτηριακή κάλυψη, ενώ η Teflon 0.01-0.6%, δηλαδή κατά μέσο όρο μια τάξη μεγέθους μειωμένη σε σχέση με το PFOTS, και συνολικά τουλάχιστον 3 τάξεις μεγέθους μικρότερη συγκριτικά με τις ακατέργαστες επιφάνειες. Μια τέτοια διαφοροποίηση δεν μπορεί να αποδοθεί μόνο σε στατιστικά σφάλματα και αποτελεί μια ένδειξη καλύτερης απωθητικής δράσης της επικάλυψης με Teflon. Κατά τη διάρκεια του πειράματος, μπορούμε να πούμε πως καθεμία από τις δύο επιφάνειες, διατήρησε σταθερή ανασταλτική δράση για την προσκόλληση των βακτηρίων.

Προκειμένου να εξετάσουμε ενδεχόμενη επίδραση ξεπλύματος των επιφανειών στην βακτηριακή προσκόλληση, διεξάγαμε το ανάλογο πείραμα, κατά το οποίο προέκυψε μια ξεκάθαρη μείωση τόσο στον παραγόμενο φθορισμό, όσο και στην % βακτηριακή κάλυψη (Εικόνα 4.2b). Ως προς τη μέση ένταση φθορισμού, σημειώθηκε 16% μείωση

στο ακατέργαστο PMMA και 13% στη HydroCell, ενώ στις υπερυδροφικές, η ποσότητα βακτηρίων που είχε παραμείνει, μειώθηκε περίπου στο ήμισυ μετά το ξέπλυμα, και συγκεκριμένα, κατά 56% στην επικαλυμμένη με PFOTS και 44% στην αντίστοιχη με Teflon.

Συνεχίζοντας, ως προς τη μέση βακτηριακή κάλυψη, στην ακατέργαστη μειώθηκε στο 85%, δηλαδή περίπου κατά 11% σε σχέση με πριν το ξέπλυμα, και στην εμπορική κατά 19%, φθάνοντας σε 73% βακτηριακή κάλυψη. Αντίστοιχα, στις υπερυδροφικές επιφάνειες, μειώθηκε στο 0.7% για την επιφάνεια με PFOTS και 0.06% με Teflon, σημειώνοντας μια 30% και 78% μείωση, για το PFOTS και το Teflon, αντίστοιχα, σε σχέση με τη μέση κάλυψη πριν το ξέπλυμα.

Αξίζει να τονιστεί εδώ, ότι το μεγάλο ποσοστό μείωσης στο φθορισμό των υπερυδροφικών, καθώς στην % βακτηριακή κάλυψη, μας υποδεικνύει ότι ακόμη και ο μικρός πληθυσμός που είχε παραμείνει στις υπερυδροφικές, σε ένα μεγάλο βαθμό δεν είχε προσκολληθεί, ενισχύοντας την ικανότητά τους ως αποθητικές για τα βακτήρια επιφάνειες.

Συμπερασματικά, ακόμη και σε μεγάλες συγκεντρώσεις βακτηρίων που αγγίζουν τα 10^9 cfu/ml, είναι αδιαμφισβήτητο το πλεονέκτημα των νανοϋφασμένων υπερυδροφικών επιφανειών στην παρεμπόδιση της βακτηριακής προσκόλλησης σε σχέση με ακατέργαστες PMMA, αλλά και εμπορικές επιφάνειες, προορισμένες ειδικά για να αναστέλλουν την επικόλληση κυττάρων. Με περίπου 90% μικρότερη μέση ένταση φθορισμού και κατά μέσο όρο τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους μικρότερη % βακτηριακή κάλυψη, η ικανότητά τους να αποτρέπουν τη βακτηριακή προσκόλληση έχει αποδειχτεί.

5. Αντιβακτηριακή δράση μικρο- νανοϋφασμένων με πλάσμα πολυμερικών επιφανειών, με και χωρίς εναπόθεση μετάλλου

Αποδείχτηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο ο μικρός βαθμός προσκόλλησης των κυανοβακτηρίων σε υπερυδροφικές πολυμερικές επιφάνειες πολυ(μεθακρυλικού-μεθυλεστέρα) (PMMA), παρά την ομολογουμένως υψηλή βακτηριακή συγκέντρωση ($\approx 2.3 \times 10^9$ cfu/mL) που εναποτέθηκε. Τα αποτελέσματά μας ήταν ιδιαίτερος ενθαρρυντικά για την ικανότητα των υπερυδροφικών επιφανειών να αποτρέπουν τη βακτηριακή προσκόλληση. Ως περαιτέρω πρόκληση εμφανίζεται η εξασφάλιση συνδυαστικής βακτηριοκτόνου δράσης των υπερυδροφικών επιφανειών, έτσι ώστε ο πληθυσμός των βακτηρίων που παραμένει προσκολλημένος, να αδυνατεί να πολλαπλασιαστεί και να αποικίσει την επιφάνεια.

Προς αυτή την κατεύθυνση, διερευνάται αρχικά το ενδεχόμενο οι υπερυδροφικές επιφάνειες να εξουδετερώνουν τα βακτήρια. Στη συνέχεια, εκμεταλλευόμενοι την ιδιότητα ορισμένων μετάλλων να παρουσιάζουν αντιβακτηριακή δράση (παράγραφος 1.3) πραγματοποιείται επικάλυψη με άργυρο και χαλκό των ακατέργαστων επιφανειών πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA), προκειμένου να διερευνηθεί η βακτηριοκτόνος δράση τους. Επιχειρείται στη συνέχεια, μερική επικάλυψη χαλκού, ως το μέταλλο με την αποδεδειγμένα ισχυρότερη βακτηριοκτόνο δράση έναντι των κυανοβακτηρίων, των υπερυδροφικών επιφανειών, προς εξέταση ενδεχόμενης διαφοροποίησης και ενίσχυσης της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης.

Πραγματοποιείται τέλος, συνολική σύγκριση των υπερυδροφικών επιφανειών, των επιφανειών με εναπόθεση μετάλλων καθώς και του συνδυασμού τους, δηλαδή των υπερυδροφικών επιφανειών με χαλκό, προς εκτίμηση των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων τους και καθορισμό του εύρους βακτηριακών συγκεντρώσεων, όπου κάθε επιφάνεια εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση.

5.1 Επίδραση πειραματικών συνθηκών κι επιφάνειας στην εξάπλωση των *Synechococcus* sp PCC 7942

Για να είναι δυνατή η ερμηνεία της συμπεριφοράς των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 πάνω στην εκάστοτε επιφάνεια, είναι σημαντική η κατανόηση του μηχανισμού ανάπτυξής τους και των συνθηκών που την επηρεάζουν. Τα κυανοβακτήρια, όπως είδαμε στην παράγραφο 2.3, διαθέτουν ως φυσικό περιβάλλον υδάτινα οικοσυστήματα, καθώς αναπτύσσονται σε ωκεάνιες περιοχές, γλυκά νερά (λίμνες, ποτάμια), αλλά και σε συστήματα υψηλής αλατότητας. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων αυτού του κεφαλαίου, στερήθηκαν το υγρό στοιχείο, άρα και την παροχή θρεπτικού μέσου, δεδομένου ότι μετά την εναπόθεσή τους πάνω στις επιφάνειες από υγρή καλλιέργεια, παρέμεναν σε αυτές και ξηραίνονταν, χωρίς να εξασφαλιστεί κάποια πηγή υγρασίας, μέχρι και το τέλος των πειραμάτων. Επειδή όμως πρόκειται για ιδιαίτερα ανθεκτικά βακτήρια, που θρέφονται φωτοσυνθετικά, δύνανται να πολλαπλασιαστούν ακόμη και σε συνθήκες ανυδρίας πάνω στις επιφάνειες.

Η διαφοροποίηση αυτή όμως ως προς τις συνθήκες ανάπτυξης, δεν παύει να επηρεάζει το ρυθμό ανάπτυξής τους. Είναι χαρακτηριστικό ότι σε υγρό θρεπτικό μέσο BG11 pH 7.5 κι εντός θαλάμου επώασης (Gallenkamp INR-401-010), που εξασφαλίζει κατάλληλο φωτισμό και διαρκή ανάδευση, η εκθετική φάση ανάπτυξής τους έχει ολοκληρωθεί στις 7 ημέρες. Πρόκειται για ιδιαίτερα ευνοϊκές συνθήκες, οι οποίες καθιστούν εφικτή τη ραγδαία ανάπτυξή τους ακόμη και από συγκέντρωση εκκίνησης χλωροφύλλης *a* μόλις 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, που μεταφράζεται σε βακτηριακή συγκέντρωση 46 468 684 cfu/mL $\approx 0.046 \times 10^9$ cfu/mL (βλ. Πίνακα 3-4, παράγραφος 3.6.2.1). Όπως όμως θα δειχθεί παρακάτω πειραματικά, για να μπορέσουν τα κυανοβακτήρια να αναπτυχθούν σε συνθήκες ξηρασίας πάνω στις επιφάνειες αναφοράς (ακατέργαστες PMMA) και απουσία βέβαια ανάδευσης, απαιτείται έως και 2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη βακτηριακή συγκέντρωση, ενώ παρατηρείται σημαντικά μεγαλύτερης διάρκειας κύκλος ζωής, λόγω ακριβώς του βραδύτερου ρυθμού ανάπτυξής τους. Έτσι, για να μπορέσει να ξεπεραστεί η επίδραση των χαμηλών διατροφικών συνθηκών και της απουσίας υγρασίας, οι συγκεντρώσεις εκκίνησης (cfu/mL) των πειραμάτων είναι ιδιαίτερα υψηλές.

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα είδη επιφάνειας, κανθένα από τα οποία δοκιμάστηκε για διάφορες συγκεντρώσεις βακτηρίων. Ειδικότερα, στις επιφάνειες περιλαμβάνονται ακατέργαστες PMMA, δύο είδη εμπορικών επιφανειών από πολυστυρένιο, οι Cell Bind (Corning) και Cell Culture (Nunc), που προορίζονται για να βελτιώνουν την κυτταρική, και κατ'επέκταση, τη βακτηριακή προσκόλληση, καθώς και απλές επιφάνειες γυαλιού. Οι επιφάνειες PMMA κόπηκαν σε διαστάσεις 2 x 2 cm², ενώ οι εμπορικές χρησιμοποιήθηκαν ως είχαν. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είναι *in vivo* προσδιορισμός του φθορισμού της Chl a των *Synechococcus* με *in situ* μετρήσεις πάνω στις επιφάνειες με χρήση της συσκευής PEA-fluorometer.

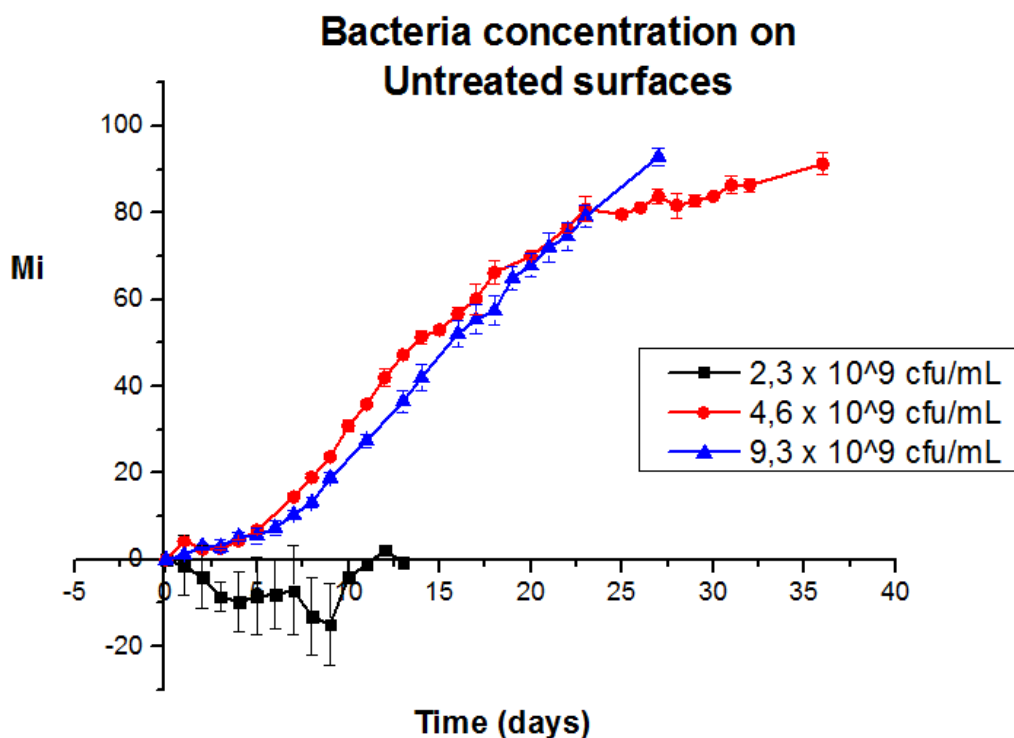
Για την επίτευξη των υψηλών συγκεντρώσεων των κυανοβακτηρίων, καθίσταται απαραίτητη η διαδικασία της πύκνωσης προς επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης κάθε φορά (παράγραφος 3.6.2.1). Μετά από εναπόθεση σταγόνας σταθερής ποσότητας όγκου 50 µL από καλλιέργεια της επιθυμητής συγκέντρωσης, γίνεται μέτρηση του φθορισμού του με χρήση της συσκευής PEA-fluorometer και η εξέλιξη του βακτηριακού πληθυσμού μελετάται έως ότου να φθάσει στη σταθερή του φάση.

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας (Πίνακας 5-1) που περιλαμβάνει όλες τις συγκεντρώσεις χλωροφύλλης a (µg/mL), που θα χρησιμοποιηθούν στη συγκεκριμένη παράγραφο, αλλά και στο σύνολο της εργασίας, συνοδευόμενες από την αντιστοίχισή τους, σε βακτηριακή συγκέντρωση (cfu/mL) (βλ. παράγραφο 3.6.2.1), η οποία για λόγους ευκολίας αποδίδεται και στρογγυλοποιημένη σε δυνάμεις του 10 (x 10⁹ cfu/mL).

Πίνακας 5-1: Αντιστοίχιση συγκεντρώσεων Chl a σε βακτηριακή συγκέντρωση με και χωρίς στρογγυλοποίηση.

Chl a concentration (µg/mL)	Cell density (cfu/mL)	Cell density (x 10⁹ cfu/mL)
5	232 343 422	0.2
50	2 323 434 219	2.3
100	4 646 868 438	4.6
200	9 293 736 875	9.3

Ξεκινάμε μελετώντας τις ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, για τις οποίες χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 2.3, 4.6 και 9.3 x 10⁹ cfu/mL, εναποθέτοντας κάθε φορά σταγόνα όγκου 50 μL και μετρώντας τις ενδείξεις φθορισμού του βακτηριακού πληθυσμού, καθημερινά έως ότου να ολοκληρωθεί η εκθετική φάση ανάπτυξής τους. Κατόπιν, γίνεται υπολογισμός του δείκτη Mi, δηλαδή της % αλλαγής στο φθορισμό της χλωροφύλλης a για κάθε ημέρα (παράγραφος 2.4), που είναι ενδεικτική της πορείας ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων. Τα αποτελέσματά μας απεικονίζονται γραφικά στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 5.1).



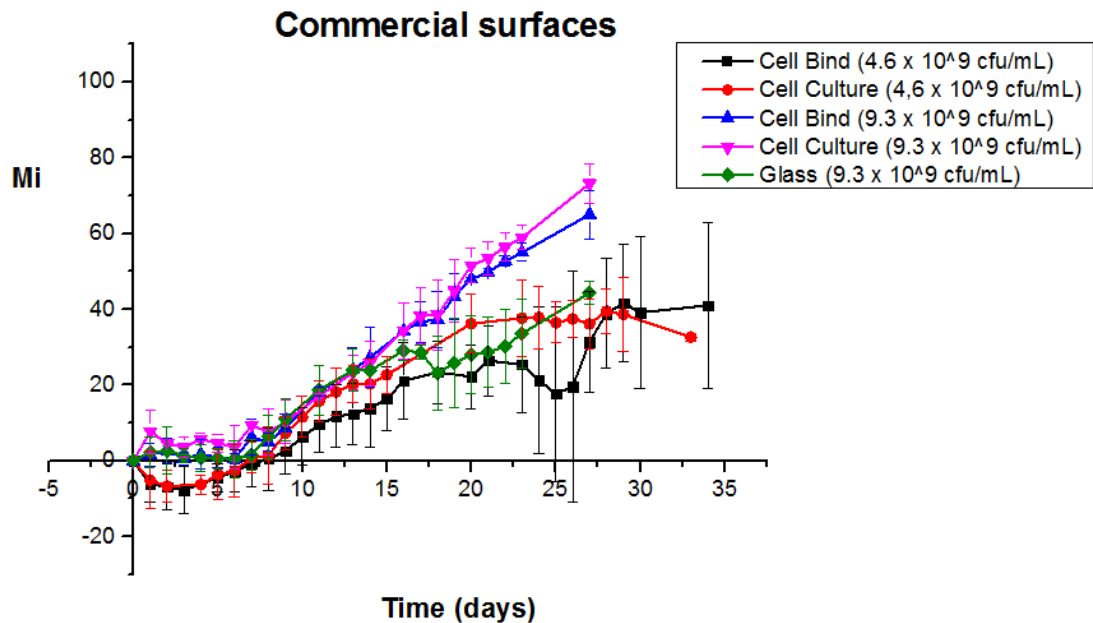
Εικόνα 5.1: Συγκεντρώσεις των 2.3, 4.6 και 9.2 x 10⁹ cfu/mL *Synechococcus* sp PCC 7942 σε ακατέργαστες επιφάνειες PMMA.

Όπως μπορούμε να δούμε στην παραπάνω εικόνα, η συγκέντρωση των 2.3×10^9 cfu/mL ήταν ανεπαρκής για να επιτραπεί η αναμενόμενη αύξηση στο βακτηριακό πληθυσμό, δεδομένου ότι η φάση της εκθετικής ανάπτυξης δεν εμφανίστηκε. Είναι χαρακτηριστικό ότι οι τιμές του δείκτη M_i , με εξαίρεση μια ημέρα όταν και έλαβε τη μέγιστη τιμή του αγγίζοντας το 2, ήταν αρνητικές, ενδεικτικό θανάτου των κυανοβακτηρίων. Με τιμές του δείκτη να πέφτουν έως και στο -15, το πείραμα διακόπηκε τη 13^η ημέρα, καθώς δε διαφαινόταν κάποια προοπτική ανάπτυξης.

Αντιθέτως, οι συγκεντρώσεις των 4.6 και 9.2×10^9 cfu/mL ήταν αρκούντως μεγάλες ώστε να πολλαπλασιαστούν απρόσκοπτα τα βακτήρια. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε, και για τις δύο συγκεντρώσεις ο δείκτης M_i αυξάνεται διαρκώς με το πέρασμα των ημερών και σχεδόν παράλληλα για τις δύο συγκεντρώσεις, λαμβάνοντας παραπλήσιες τιμές που αγγίζουν περίπου το 84 την 27^η ημέρα. Σε αυτό το σημείο είναι δυνατός ο προσδιορισμός της περιόδου ανάπτυξης των βακτηρίων, μέχρι και πριν να φθάσουν τη σταθερή φάση, η οποία διαρκεί προσεγγιστικά 20-25 μέρες πάνω στις πολυμερικές επιφάνειες.

Παρατηρούμε επομένως, ότι δεν είναι ευνοϊκές όλες οι συγκεντρώσεις των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 για την ανάπτυξή τους πάνω στις επιφάνειες PMMA. Συγκεκριμένα, βλέπουμε ότι για συγκεντρώσεις μικρότερες είτε ίσες των 2.3×10^9 cfu/mL, δεν αναπτύσσονται, ενώ για συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 4.6×10^9 cfu/mL, εμφανίζονται να πολλαπλασιάζονται αδιάκοπα.

Το ίδιο πείραμα διεξάγεται και στις εμπορικές επιφάνειες πολυστυρενίου Cell Bind (Corning) και Cell Culture (Nunc) καθώς και στις απλές επιφάνειες γυαλιού, προκειμένου να μελετήσουμε τη συμπεριφορά των κυανοβακτηρίων πάνω σε αυτές και κατά πόσο κι εδώ, ο παράγοντας της συγκέντρωσής τους διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πληθυσμιακή τους αύξηση. Στις πολυστυρενικές επιφάνειες, ως συγκέντρωση εκκίνησης, χρησιμοποιήθηκαν τα 4.6×10^9 cfu/mL, και δοκιμάστηκαν και τα 9.2×10^9 cfu/mL, ενώ στις γυάλινες επιφάνειες, χρησιμοποιήθηκαν μόνο τα 9.2×10^9 cfu/mL. Οι τιμές του δείκτη M_i για κάθε επιφάνεια και συγκέντρωση απεικονίζονται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2: Συγκεντρώσεις των 4.6 και 9.2 x 10⁹ cfu/mL κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 σε εμπορικές υδρόφιλες επιφάνειες Cell Bind (Corning) και Cell Culture (Nunc).

Εστιάζοντας στη συγκέντρωση των 4.6 x 10⁹ cfu/mL, βλέπουμε ότι τα βακτήρια τόσο στις Cell Bind, όσο και στις Cell Culture επιφάνειες παρουσιάζουν μια αυξητική τάση, η οποία όμως εμφανίζει σημαντικές διακυμάνσεις, ιδιαίτερα στην περίπτωση των Cell Bind επιφανειών, και με τις τιμές του δείκτη M_i να μην είναι ιδιαίτερα υψηλές. Πιο αναλυτικά, στις Cell Culture επιφάνειες ο δείκτης M_i δεν ξεπερνά το 38 μέχρι και την 27^η ημέρα πειράματος, με τις Cell Bind να εμφανίζουν ακόμη μικρότερο δείκτη ανάπτυξης, αφού δεν ξεπερνάται το 32 για το ίδιο εύρος ημερών. Ως μέτρο σύγκρισης για την ίδια συγκέντρωση, θα χρησιμοποιήσουμε τις ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, σε σχέση με τις οποίες ο δείκτης M_i εμφανίζεται κατά 55% μικρότερος στις Cell Culture επιφάνειες και κατά 61% στις Cell Bind. Το γεγονός αυτό μάς πληροφορεί ότι η συγκέντρωση των 4.6 x 10⁹ cfu/mL πάνω στις εμπορικές επιφάνειες είναι επαρκής για την επιβίωση των κυανοβακτηρίων, όχι όμως και για την απρόσκοπτη ανάπτυξή τους.

Στρεφόμενοι στη διπλάσια συγκέντρωση (9.2×10^9 cfu/mL), είναι εμφανής η βελτίωση στο βαθμό ανάπτυξης των κυανοβακτηρίων, αφού και στις δύο περιπτώσεις επιφανειών ο πληθυσμός τους εμφανίζει αύξουσα συμπεριφορά με σχεδόν αμελητέες διακυμάνσεις. Οι τιμές του δείκτη M_i είναι ξεκάθαρα αυξημένες σε σχέση με τις αντίστοιχες στα 2.3×10^9 cfu/mL, με τις Cell Bind επιφάνειες να φθάνουν στο 65 και τις Cell Culture στο 73 κατά την 27^η ημέρα πειράματος. Πρόκειται για τιμές συγκρινόμενες με την τιμή 93 του M_i στις ακατέργαστες επιφάνειες PMMA για την ίδια ημέρα πειράματος και συγκέντρωση βακτηρίων, σε σχέση με τις οποίες εμφανίζονται κατά 30% και 22% μειωμένες σε Cell Bind και Cell Culture επιφάνειες, αντίστοιχα.

Ως προς τις γυάλινες επιφάνειες, παρατηρούμε ότι η ίδια συγκέντρωση των 9.2×10^9 cfu/mL, αν και εμφανίζει ανοδική συμπεριφορά, δεν αυξάνεται στον ίδιο βαθμό με τις υπόλοιπες επιφάνειες (ακατέργαστες PMMA και πολυστυρενικές). Αυτό μαρτυρούν και οι ίδιες οι τιμές του δείκτη M_i , που δεν ξεπερνούν το 45 στο τέλος του πειράματος (27^η ημέρα). Ενδεχόμενη αύξηση στη συγκέντρωση των κυανοβακτηρίων μπορεί να απέδιδε μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης.

Από όλα τα παραπάνω, και έχοντας δει τέσσερις διαφορετικές περιπτώσεις επιφανειών (PMMA, Cell Bind, Cell Culture, γυαλί), φαίνεται ότι η εξέλιξη του πληθυσμού των *Synechococcus* σε καθεμία από τις επιφάνειες εξαρτάται από τη συγκέντρωση (cfu/mL) με την οποία εναποτίθεται σε αυτές και ότι υπάρχει για κάθε διαφορετικό είδος επιφάνειας μια βέλτιστη συγκέντρωση για την οποία αναπτύσσονται ραγδαία. Στην ουσία όμως, ο βασικός παράγοντας που επιδρά στην ανάπτυξή τους είναι η ίδια η φύση (χημεία και τοπογραφία) της εκάστοτε επιφάνειας, δεδομένου ότι αποτελεί το μοναδικό διαφοροποιητικό παράγοντα σε κάθε πείραμα, έχοντας εξασφαλίσει ίδιες συνθήκες επώασης (φωτισμός, έλλειψη υγρασίας και θρεπτικού μέσου) για την ίδια συγκέντρωση μελέτης.

Μάλιστα εδώ, παρατηρούμε ότι αν και τόσο οι ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, όσο και οι εμπορικές πολυστυρενίου Cell Bind και Cell Culture, είναι υδρόφιλες, εμφανίζουν διαφορετική συγκέντρωση βέλτιστης ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό μάς προϊδεάζει ότι ακόμη και ο βαθμός υδροφιλικότητας/υδροφοβικότητας μιας επιφάνειας μπορεί να αποτελέσει διαφοροποιητικό παράγοντα στην ανάπτυξη των βακτηρίων, ή θέτοντάς το σε ευρύτερο πλαίσιο, οποιαδήποτε χημική ή φυσική επιφανειακή

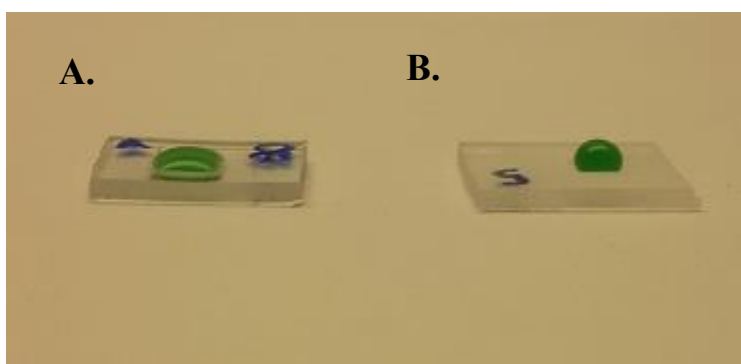
τροποποίηση. Πράγματι, παρατηρήθηκε ότι οι εμπορικές επιφάνειες, όντας κατασκευασμένες να ευνοούν την κυτταρική προσκόλληση, άρα και περισσότερο υδρόφιλες σε σχέση με τις PMMA, χρειάστηκαν διπλάσια συγκέντρωση κυανοβακτηρίων (9.3×10^9 cfu/mL) για να πολλαπλασιαστούν ανεμπόδιστα. Ακόμη όμως και μεταξύ των δύο πολυστερενικών επιφανειών διαφαίνονται διαφορές, αφού οι Cell Bind επιφάνειες, ως περισσότερο υδρόφιλες από τις Cell Culture, σε καθεμία από τις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (4.6 και 9.2×10^9 cfu/mL), εμφάνιζαν μικρότερες τιμές M_i συγκριτικά με εκείνες των Cell Culture, ενδεικτικό του ότι με την αύξηση της υδροφιλικότητας, απαιτούνταν μεγαλύτερη βακτηριακή συγκέντρωση για σημειωθεί πολλαπλασιασμός σε δυσμενείς πειραματικές συνθήκες.

5.2 Βαθμονόμηση βακτηριακών συγκεντρώσεων σε ακατέργαστες και κατεργασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες

Όπως αποδείχτηκε στην προηγούμενο παράγραφο, η διαφορετική φύση μιας επιφάνειας επιδρά με διαφορετικό τρόπο στη βακτηριακή ανάπτυξη. Βασική προϋπόθεση εξαγωγής συμπερασμάτων σε κάθε πειραματική μέθοδο, είναι η εξασφάλιση κοινών πειραματικών συνθηκών, έτσι ώστε η συμπεριφορά των αντικειμένων προς μελέτη να αποδίδεται στο μεταξύ τους διαφοροποιητικό παράγοντα. Έτσι και στην εργασία αυτή, όπου θα μελετηθούν αρκετά διαφορετικών μεταξύ τους επιφανειών, εννοώντας ακατέργαστες είτε μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες PMMA, επιμεταλλωμένες ή μη και στις δύο περιπτώσεις, είναι απαραίτητη η εξασφάλιση ενός κοινού μέτρου σύγκρισης, ώστε η εκάστοτε εξέλιξη της βακτηριακής ανάπτυξης να οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στη διαφορετική επίδραση κάθε επιφάνειας.

Σημαντικές είναι οι διαφοροποιήσεις ως προς τη χημεία και την τοπογραφία που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι ακατέργαστες επιφάνειες και οι υπερυδρόφοβες, με ή χωρίς εναπόθεση μετάλλου. Λόγω των διαφορετικών ιδιοτήτων διαβροχής τους, διαφοροποιείται η επιφάνεια επαφής της σταγόνας βακτηρίων σε αυτές, άρα και το

πλήθος των βακτηρίων που έρχονται πραγματικά σε επαφή με αυτή. Πιο συγκεκριμένα, στις επιφάνειες που δεν έχουν υποστεί κατεργασία, η υδρόφιλη φύση του PMMA (γωνία επαφής $\sim 70^\circ$), καθιστά μεγαλύτερη την επιφάνεια επαφής της σταγόνας, σε αντίθεση με τις υπερυδρόφοβες. Μακροσκοπικά, το φαινόμενο αυτό μπορεί να οπτικοποιηθεί ως μεγαλύτερη και μικρότερη εξάπλωση της σταγόνας πάνω σε ακατέργαστες και κατεργασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες, αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5.3 που ακολουθεί.



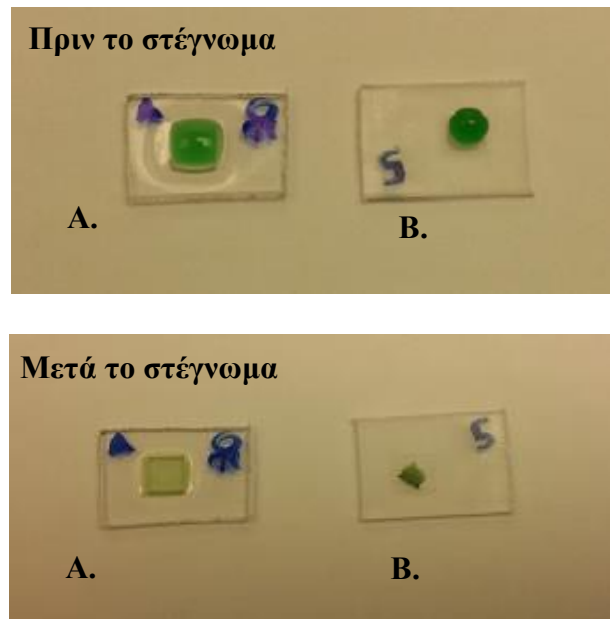
Εικόνα 5.3: Μακροσκοπική απεικόνιση του μεγαλύτερου βαθμού διασποράς της σταγόνας 50 μL καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942 πάνω σε (A) ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, συγκριτικά με (B) μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες PMMA.

Από κατασκευής του πειράματος, η σταγόνα δεν αλληλεπιδρά με όλο τον όγκο των δειγμάτων, παρά μόνο με το τμήμα εκείνο της επιφάνειας με το οποίο έρχεται σε επαφή. Συνεπώς, όλο το πείραμα στηρίζεται σε φαινόμενα αλληλεπίδρασης των βακτηρίων σε δύο διαστάσεις με την επιφάνεια του εκάστοτε δείγματος. Κάτι τέτοιο, μάς οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κρίσιμη παράμετρος σύγκρισης μεταξύ των επιφανειών για την επίτευξη αντικειμενικού πειράματος, είναι η επιφανειακή συγκέντρωση C_s , ο αριθμός δηλαδή των κυττάρων που αναλογεί στη μονάδα επιφάνειας (cfu/cm^2). Έτσι, λόγω του διαφορετικού βαθμού διασποράς που παρατηρείται στις επιφάνειες, για ίδια αρχική συγκέντρωση βακτηρίων κατά την εναπόθεση της σταγόνας, έχουμε διαφορετικό αριθμό κυττάρων που αντιστοιχούν στη μονάδα κάθε επιφάνειας.

Για να αντιμετωπιστεί αυτό το φαινόμενο, απαιτείται μια βαθμονόμηση, έτσι ώστε η επιφανειακή συγκέντρωση βακτηρίων με την οποία αλληλεπιδρά κάθε επιφάνεια να είναι ίδια. Αν μετρηθεί ο λόγος των εμβαδών $b = \frac{S_U}{S_{SH}}$, όπου S_U το εμβαδόν που καταλαμβάνει η σταγόνα στην ακατέργαστη επιφάνεια και S_{SH} στην αντίστοιχη υπερυδροφόβη, είναι δυνατόν να ποσοτικοποιηθεί η διαφορά στη διασπορά της σταγόνας σε κάθε επιφάνεια, δίνοντας τον παράγοντα επί τον οποίο πρέπει να πολλαπλασιαστεί η επιφανειακή συγκέντρωση σε ακατέργαστες επιφάνειες για να εξισωθεί με την αντίστοιχη στις υπερυδροφόβες.

Για τον υπολογισμό του λόγου b , αρκεί η εύρεση του εμβαδού της σταγόνας σε ακατέργαστη (S_U) και υπερυδροφόβη επιφάνεια (S_{SH}), έχοντας θεωρήσει ότι είναι σε κάθε περίπτωση κυκλικό. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε το όργανο GBX Digidrop Contact Angle Measurement System (παράγραφος 3.3.2), με το οποίο μετρήθηκε η διάμετρος της κάθε σταγόνας. Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε αντίθεση με την ακατέργαστη επιφάνεια, η διάμετρος της σταγόνας στην υπερυδροφόβη επιφάνεια δεν παρέμενε ίδια από τη στιγμή εναπόθεσής της έως το στέγνωμα, αλλά μεταβαλλόταν από $d_{SH} = 2.89 \pm 0.25$ mm κατά τη στιγμή τοποθέτησής της, σε $d_{SH} = 1,4 \pm 0,1$ mm μετά το στέγνωμά της, τιμή που αντιστοιχεί στη διάμετρο της πραγματικής επιφάνειας επαφής των βακτηρίων με την υπερυδροφόβη επιφάνεια (*contact line*).

Στην Εικόνα 5.4, παρουσιάζεται η μεταβολή στη διάμετρο του ίχνους της σταγόνας (*projection line*), η οποία αν και είναι μεγαλύτερη της πραγματικής διαμέτρου της επιφάνειας επαφής των βακτηρίων (*contact line*), αποτελεί μια μακροσκοπική απεικόνιση της σμίκρυνσης της σταγόνας μετά το στέγνωμά της πάνω σε υπερυδροφόβη επιφάνεια. Το φαινόμενο αυτό υπαγορεύεται από την ίδια την υδροφόβη φύση της επιφάνειας, που εξαναγκάζει την ελαχιστοποίηση της επιφάνειας κάλυψης.



Εικόνα 5.4: Εικόνες από (A) ακατέργαστες και (B) μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες PMMA, πριν και μετά το στέγνωμα σταγόνας 50 μL καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942, όπου φαίνεται η αισθητή μείωση της διαμέτρου του ίχνους της (*projection line*) στις υπερυδρόφοβες.

Συνεχίζοντας, δεδομένου ότι, με εξαίρεση τις πρώτες περίπου 4 ώρες μετά την τοποθέτηση της σταγόνας, στο μεγαλύτερο τμήμα του πειράματος συνολικής διάρκειας περίπου 20 ημερών η σταγόνα είναι στεγνή και παραμένει στο ίδιο μέγεθος, θα χρησιμοποιήσουμε ως διάμετρό της, εκείνη της πραγματικής επιφάνειας επαφής (*contact line*) μετά το στέγνωμά της, δηλαδή $d_{SH} = 1,4 \pm 0,1$ mm. Έτσι, έχοντας μετρήσει τη διάμετρο της σταγόνας στην ακατέργαστη επιφάνεια ίση με $d_U = 6.0 \pm 0.3$ mm, ο λόγος b θα είναι:

$$b = \frac{S_U}{S_{SH}} = \frac{\pi r_U^2}{\pi r_{SH}^2} = \frac{\pi \left(\frac{d_U}{2}\right)^2}{\pi \left(\frac{d_{SH}}{2}\right)^2} = \frac{28.3}{1.5} = 18.9 \approx 19$$

όπου r_U , r_{SH} η ακτίνα της σταγόνας σε ακατέργαστη και υπερυδρόφοβη σταγόνα, αντίστοιχα.

Στρογγυλοποιώντας συνεπώς στη δεκάδα, μπορούμε να εξαγάγουμε ότι προκειμένου να μελετάμε ακατέργαστες και υπερυδρόφοβες επιφάνειες σε κοινή βάση, θα πρέπει η συγκέντρωση βακτηρίων ανά μονάδα όγκου (cfu/mL) που τοποθετούμε στις

ακατέργαστες να είναι 20πλάσια της αντίστοιχης στις υπερυδροφικές, εξασφαλίζοντας έτσι την ίδια επιφανειακή συγκέντρωση (cfu/cm²) και στα δύο είδη επιφανειών.

Θεωρώντας προσεγγιστικά ίση γωνία επαφής των ακατέργαστων επιμεταλλωμένων (με άργυρο ή χαλκό) επιφανειών PMMA με τις ακατέργαστες επιφάνειες αναφοράς PMMA, θα πρέπει να εφαρμοστεί σε αυτές ο ίδιος νορμαλισμός κατά τη συγκριτική μελέτη τους με τις υπερυδροφικές επιφάνειες με ή χωρίς εναπόθεση μετάλλου. Συγκεκριμένα δηλαδή, προκειμένου να επιτευχθεί κοινή επιφανειακή συγκέντρωση βακτηρίων, θα πρέπει οι συγκεντρώσεις βακτηρίων (cfu/mL) που εναποθέτουμε τόσο στις επιφάνειες αναφοράς (untreated), όσο και σε εκείνες που έχουν υποστεί ιονοβολή αργύρου ή χαλκού, λόγω της υδοφιλικότητάς τους και του έντονου βαθμού διασποράς βακτηριακής σταγόνας που μειώνει την επιφανειακή βακτηριακή τους συγκέντρωση (cfu/cm²), να πολλαπλασιαστούν με τον παράγοντα $b \approx 20$, έτσι ώστε η προκύπτουσα συγκέντρωση (cfu/mL) να αποδίδει την ίδια επιφανειακή συγκέντρωση (cfu/cm²) με εκείνη στις κατεργασμένες επιφάνειες. Ο γενικός κανόνας συνεπώς συγκεντρώνεται στην εξής σχέση:

$$C_U = b \cdot C_T, \quad (1)$$

όπου C_U είναι η συγκέντρωση των κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 πάνω σε ακατέργαστες επιφάνειες και απλώς επιμεταλλωμένες επιφάνειες και C_T , η συγκέντρωσή τους πάνω σε κατεργασμένες υπερυδροφικές με ή χωρίς υποκείμενο μέταλλο, εκφρασμένη και στις δύο περιπτώσεις σε cfu/mL.

Προς επιβεβαίωση των ανωτέρω, θα επιχειρήσουμε να υπολογίσουμε την επιφανειακή συγκέντρωση σε ακατέργαστες και κατεργασμένες επιφάνειες, για συγκεντρώσεις στα δύο είδη επιφανειών, που συνδέονται μεταξύ τους με τη σχέση (1). Έτσι, επιλέγουμε συγκέντρωση 4.6×10^9 cfu/mL σε ακατέργαστες επιφάνειες, για συγκέντρωση 0.2×10^9 cfu/mL σε κατεργασμένες, αφού:

$$b \cdot C_T = 20 \cdot 0.2 \times 10^9 \text{ cfu/mL} = 4 \times 10^9 \text{ cfu/mL} \approx 4.6 \times 10^9 \text{ cfu/mL} = C_U$$

Το εμβαδόν σταγόνας πάνω σε κάθε επιφάνεια, εκφρασμένο σε cm², είναι ίσο με:

$$S_U = 28.3 \text{ mm}^2 = 0.28 \text{ cm}^2,$$

$$S_T = S_{SH} = 1.5 \text{ mm}^2 = 0.015 \text{ cm}^2,$$

όπου S_U είναι το εμβαδόν της στις ακατέργαστες επιφάνειες, συμπεριλαμβανομένων και των επιμεταλλωμένων και S_T είναι το εμβαδόν της στις κατεργασμένες υπερυδροφικές, με και χωρίς την επικάλυψη μετάλλου.

Έτσι, γνωρίζοντας τα εμβαδά της σταγόνας σε κάθε επιφάνεια, για συγκέντρωση 4.6×10^9 cfu/mL σε εμβαδόν ακατέργαστης επιφάνειας $S_U = 0.28 \text{ cm}^2$, προκύπτει επιφανειακή συγκέντρωση $C_{S_U} = 829\,797\,936 \text{ cfu/cm}^2 \approx 8.3 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2$, ενώ για συγκέντρωση 0.2×10^9 cfu/mL σε εμβαδόν κατεργασμένης επιφάνειας $S_T = 0.015 \text{ cm}^2$, προκύπτει επιφανειακή συγκέντρωση $C_{S_T} = 774\,478\,067 \text{ cfu/cm}^2 \approx 7.7 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2$.

Παρατηρούμε ότι:

$$C_{S_U} = 8.3 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2 \approx C_{S_T} = 7.7 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2 \approx 8 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2,$$

που σημαίνει ότι έχουμε σχεδόν ίσες, με πολύ μικρές αποκλίσεις επιφανειακές συγκεντρώσεις βακτηρίων C_{S_U} , C_{S_T} σε ακατέργαστες και κατεργασμένες επιφάνειες, αντίστοιχα.

Για λόγους ευκολίας παρατίθεται ο παρακάτω Πίνακας 5-2, όπου φαίνονται συγκεντρωτικά οι επιφανειακές συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε ακατέργαστες και κατεργασμένες επιφάνειες, για κάθε βακτηριακή συγκέντρωση, εκφρασμένη σε cfu/mL, αλλά και σε $\mu\text{g/mL}$.

Πίνακας 5-2: Αντιστοίχιση συγκέντρωσης χλωροφύλλης a ([Chl a]) και βακτηριακής συγκέντρωσης (cfu/mL) σε επιφανειακή συγκέντρωση (cfu/cm²) για ακατέργαστες και κατεργασμένες επιφάνειες.

Chl a ($\mu\text{g/mL}$)	C ($\times 10^9$ cfu/mL)	Cells (cfu)	C_s ($\times 10^8$ cfu/cm ²)	
			Untreated/Ag or Cu sputtered	SH/SH metal- sputtered
5	0.2	11 617 171	0.4	7.7
50	2.3	116 171 711	4.1	77
100	4.6	232 343 422	8.3	155
200	9.3	464 686 844	16.4	310

5.3 Μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης των επιφανειών

Έχοντας κατανοήσει τη σημασία της κανονικοποίησης της επιφανειακής συγκέντρωσης στην ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων, είναι δυνατή η εξερεύνηση της αντιβακτηριακής δράσης συγκεκριμένων ειδών επιφανειών και ο καθορισμός του εύρους συγκεντρώσεων ανά μονάδα επιφάνειας (cfu/cm²), αλλά και όγκου (cfu/mL), που μπορεί να εκδηλώνεται. Για το λόγο αυτό, θα εξεταστεί ξεχωριστά κάθε είδος επιφάνειας, και συγκεκριμένα, μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες PMMA, ακατέργαστες επικαλυμένες με μέταλλα αργύρου ή χαλκού PMMA, καθώς και συνδυασμός τους, δηλαδή επιμεταλλωμένες, μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες με χρήση του καταλληλότερου μεταλλικού φορέα, σε διάφορες βακτηριακές συγκεντρώσεις.

Απώτερος σκοπός είναι η διερεύνηση του ενδεχόμενου εμφάνισης αντιβακτηριακής δράσης της υπερυδρόφοβης επιφάνειας, η σύγκρισή της με αντίστοιχες επιφάνειες PMMA με επικάλυψη μετάλλων, και η πιθανότητα ενίσχυσης της δράσης της αυτής με τη μερική επικάλυψη του ισχυρότερου αντιβακτηριακού μετάλλου.

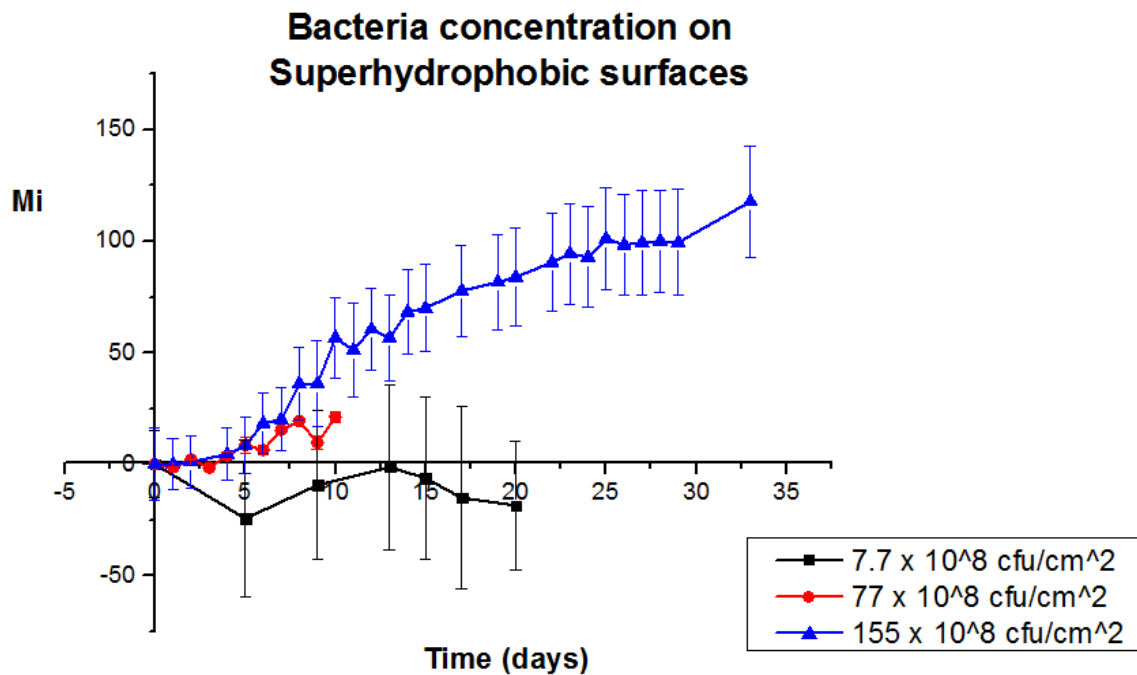
5.3.1 Μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες

Ξεκινάμε τη μελέτη μας με την απόκριση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων επιφανειών σε διάφορες συγκεντρώσεις *Synechococcus* sp PCC 7942. Δεδομένης της συμπίκνωσης που παρουσιάζει μια σταγόνα κατά την εναπόθεσή της πάνω σε υπερυδρόφοβη επιφάνεια, θεωρήθηκε απαραίτητη η εξέταση της επίδρασής της σε μικρές βακτηριακές πυκνότητες. Για το λόγο αυτό, εκτός των υψηλών συγκεντρώσεων 77×10^8 cfu/cm² (2.3×10^9 cfu/mL) και 155×10^8 cfu/cm² (4.6×10^9 cfu/mL), δοκιμάστηκε και συγκέντρωση 7.7×10^8 cfu/cm² (0.2×10^9 cfu/mL).

Ως υπόστρωμα για την παρασκευή των υπερυδρόφοβων επιφανειών χρησιμοποιήθηκαν οι πολυμερικές επιφάνειες PMMA, οι οποίες στην περίπτωση των υψηλών συγκεντρώσεων (77×10^8 cfu/cm² και 155×10^8 cfu/cm²) ήταν τα τετραγωνικά πλακίδια διαστάσεων 2×2 cm², ενώ στη χαμηλή συγκέντρωση (7.7×10^8 cfu/cm²), ήταν τα πηγάδια διαστάσεων $5 \times 5 \times 1.5$ mm³. Και τα δύο είδη επιφανειών

υποβλήθηκαν σε κατεργασία πλάσμα υπό κοινές συνθήκες, όπως παρουσιάζονται στην παράγραφο 3.6.1.2. Διαφοροποίηση στην παρασκευή τους πραγματοποιήθηκε κατά την επιλογή της υδρόφοβης επικάλυψης που προσδίδει στην επιφάνεια την κατάλληλη χημεία προς εξασφάλιση χαμηλής επιφανειακής ενέργειας. Συγκεκριμένα, στις τετραγωνικές επιφάνειες, έγινε αέρια εναπόθεση φθοριωμένου μονοστρώματος από διάλυμα 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas), ενώ στα πηγάδια εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα (6.75 ± 0.28 nm) από πλάσμα αερίου C₄F₈ διάρκειας 5 s. Η διαφοροποίηση αυτή στο εναποτιθέμενο στρώμα δε διαταράσσει την ομοιογένεια των πειραματικών συνθηκών, δεδομένου ότι οι παράμετροι που επιλέχθηκαν για το κάθε είδος εναπόθεσης (χρόνος εναπόθεσης και συνθήκες), κατέστησαν την οποιαδήποτε απόκλιση στις γωνίες επαφής των επιφανειών αμελητέα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει τη συγκριτική μελέτη των επιφανειών για τις διάφορες συγκεντρώσεις σε κοινή βάση.

Ως προς την πειραματική διεργασία, είναι η ίδια που πραγματοποιήθηκε και στις προηγούμενες περιπτώσεις επιφανειών, που περιλαμβάνει δηλαδή την τοποθέτηση 50 μL καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC7942, που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και στις συγκεντρώσεις που επιλέχθηκαν, στις αντίστοιχες επιφάνειες και την μετέπειτα μέτρηση φθορισμού καθημερινά μέχρι αφίξεως στη σταθερή φάση. Στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 5.5) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματά μας για το δείκτη M_i των υπερυδρόφοβων επιφανειών στις διάφορες συγκεντρώσεις.



Εικόνα 5.5: Απόκριση κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 συγκεντρώσεων 7.7 , 77 και 155×10^8 cfu/cm² πάνω σε μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες.

Από το διάγραμμα της παραπάνω εικόνας, παρατηρούμε ότι οι μεγάλες συγκεντρώσεις κυανοβακτηρίων (77×10^8 cfu/cm² και 155×10^8 cfu/cm²) παρουσιάζουν ξεκάθαρη ανάπτυξη πάνω στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες. Συγκεκριμένα, εστιάζοντας στη συγκέντρωση των 77×10^8 cfu/cm², παρ'όλο που το πείραμα παύει τη 10^η ημέρα, είναι αδιαμφισβήτητη η αυξητική τάση των βακτηρίων, με τιμές δείκτη M_i σχεδόν να συμβαδίζουν με τις αντίστοιχες της συγκέντρωσης των 155×10^8 cfu/cm² μέχρι και τις πρώτες 7 ημέρες. Έτσι, τη 7^η ημέρα ο δείκτης M_i φθάνει να ξεπερνά το 15, με τον αντίστοιχο στη διπλάσια συγκέντρωση των 155×10^8 cfu/cm² να ισούται με 20, διαφορά σχεδόν αμελητέα. Κατά τη 10^η ημέρα εξακολουθεί να αυξάνεται ξεπερνώντας το 21, γεγονός που επιβεβαιώνει ότι εφόσον στις πρώτες 10 ημέρες πειράματος τα κυανοβακτήρια έχουν κατορθώσει όχι μόνο να επιβιώσουν από τη φάση προσαρμογής τους στο καινούριο περιβάλλον της επιφάνειας, αλλά και να πολλαπλασιαστούν, τότε θα συνεχίσουν ανεμπόδιστα να αυξάνουν τον πληθυσμό τους. Αντίστοιχα, η συγκέντρωση των 155×10^8 cfu/cm², συνεχίζει να αυξάνεται ραγδαία με δείκτη M_i να προσεγγίζει το 100 στο τέλος του πειράματος (27^η ημέρα).

Στρεφόμενοι στη μικρή συγκέντρωση των 7.7×10^8 cfu/cm², δηλαδή δύο τάξεις μεγέθους μικρότερη σε σχέση με τη μέγιστη συγκέντρωση (155×10^8 cfu/cm²), βλέπουμε μια διαμετρικά αντίθετη βακτηριακή συμπεριφορά. Ο πληθυσμός τους εμφανίζεται να μειώνεται, γεγονός που εκδηλώνεται από τις αρνητικές τιμές του δείκτη M_i , οι οποίες διατηρούνται μέχρι και το τέλος του πειράματος την 20^η ημέρα. Πιο αναλυτικά, την 5^η ημέρα ο δείκτης πέφτει στο -24, ένδειξη των απωλειών στο βακτηριακό πληθυσμό λόγω προσαρμογής στην επιφάνεια, με τις επόμενες μέρες μέχρι και τη 13^η να μειώνεται με μικρότερο ρυθμό λαμβάνοντας τιμή κοντά στο -1, για να αρχίσει τις επόμενες μέρες να φθίνει μονότονα μέχρι και την 20^η, όπου γίνεται περίπου ίσος με -19.

Αξίζει εδώ να σημειωθεί, ότι ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης των κυανοβακτηρίων, παρατηρήθηκε σε αρκετές περιπτώσεις κατά την επανάληψη των πειραματικών κύκλων, αποκόλληση της σταγόνας. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι ακόμη και μετά το στέγνωμα της σταγόνας, η ίδια η φύση της επιφάνειας εξαναγκάζει τη συρρίκνωσή της και τη συγκέντρωσή της στα ελάχιστα δυνατά σημεία επαφής με την επιφάνεια. Πρόκειται για μία πολύ σημαντική διαπίστωση, δεδομένου ότι ακόμη και σε αυτές τις πειραματικές συνθήκες, όπου η σταγόνα εξαναγκάζεται να παραμείνει πάνω στην υπερυδρόφοβη επιφάνεια, η ίδια αποτρέπει την προσκόλλησή της σε αυτή και η ύπαρξη ελάχιστων σημείων επαφής ευνοεί την πλήρη αποκόλλησή της, ακόμη και μια απλή κίνηση ανατροπής. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε από μόνο του να ερμηνευτεί ως μια έκφραση αντιβακτηριακής συμπεριφοράς των υπερυδρόφοβων επιφανειών.

Από όλα τα παραπάνω, μπορούμε να συμπεράνουμε με σιγουριά ότι σε υψηλές συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 77×10^8 cfu/cm², η υπερυδρόφοβη επιφάνεια δεν επηρεάζει την ανάπτυξη των βακτηρίων, επιτρέποντάς τους να πολλαπλασιάζονται ανεμπόδιστα πάνω της. Αντιθέτως, σε συγκεντρώσεις χαμηλές, μικρότερες είτε ίσες των 7.7×10^8 cfu/cm² εκδηλώνεται η επίδραση της, αφού παρουσιάζεται να μην ευνοεί την ανάπτυξή τους. Δεδομένου ότι δε δοκιμάστηκαν, λόγω περιορισμένου χρονικού περιθωρίου, περισσότερες συγκεντρώσεις δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί η οριακή μέγιστη τιμή συγκέντρωσης για την οποία η επιφάνεια εξουδετερώνει τα κυανοβακτήρια. Αντί αυτού όμως, μπορεί να γίνει μια προσέγγιση του μέγιστου αριθμού βακτηριακών στρωμάτων για τον οποίο η επιφάνεια διατηρεί τη βακτηριοκτόνο δράση της.

Η τοπογραφία που δημιουργείται στις επιφάνειες με τις συνθήκες και το χρόνο κατεργασίας πλάσμα που χρησιμοποιήθηκαν, δεν ξεπερνά τα 2 μm και λαμβάνοντας υπόψη ότι το πάχος ενός βακτηρίου *Synechococcus* sp PCC 7942 προσεγγίζει το 1 μm (0.75 μm) (παράγραφος 3.9), η τοπογραφία αυτή μπορεί να φθάσει μέχρι τα 2-3 στρώματα βακτηρίων.

Ενδεικτικά, προς καλύτερη κατανόηση του αριθμού στρωμάτων που αντιστοιχούν σε κάθε συγκέντρωση, εστιάζουμε αρχικά στη συγκέντρωση των $155 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2$. Για τον υπολογισμό τους, αρκεί η εύρεση του εμβαδού ενός κυανοβακτηρίου *Synechococcus* καθώς και του εμβαδού που καταλαμβάνει η σταγόνα μετά το στέγνωμά της πάνω στην υπερυδρόφοβη επιφάνεια. Όπως αναφέρθηκε στην αρχή του κεφαλαίου (παράγραφος 5.2), το εμβαδόν της σταγόνας πάνω σε υπερυδρόφοβη επιφάνεια προκύπτει με βάση τη διάμετρο της πραγματικής επιφάνειας επαφής (*contact line*) των βακτηρίων με την επιφάνεια μετά το στέγνωμα. Έτσι λοιπόν, για εμβαδόν σταγόνας $E_\sigma = 1.5 \text{ mm}^2$ και εμβαδόν *Synechococcus* ίσο με $E_s = 2.4 \mu\text{m}^2$, κάνοντας παράλληλα τη σύμβαση της ομοιόμορφης κατανομής των βακτηρίων στη σταγόνα μετά το στέγνωμά της, μπορούμε να ξεκινήσουμε τον υπολογισμό των στρωμάτων.

Αρχικά βρίσκουμε τον απόλυτο αριθμό βακτηρίων που τοποθετείται πάνω στην επιφάνεια, χρησιμοποιώντας την αντίστοιχη συγκέντρωση κυανοβακτηρίων ($4.6 \times 10^9 \text{ cfu/mL}$) που αντιστοιχεί στην επιφανειακή συγκέντρωση των $155 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2$. Έτσι, συγκεκριμένα για $4\ 646\ 868\ 438 \text{ cfu/mL}$ και όγκο σταγόνας 50 μL πάνω στην επιφάνεια, θα έχουμε:

$$N_s = 4\ 646\ 868\ 438 \text{ cfu/mL} \times 50 \times 10^{-3} \text{ mL} = 232\ 343\ 422 \text{ cfu}$$

Χρησιμοποιώντας την επιφάνεια E_σ της σταγόνας βακτηρίων, μετά την αποξήρανσή της πάνω σε υπερυδρόφοβη επιφάνεια, καθώς και την επιφάνεια E_s ενός βακτηρίου *Synechococcus* sp PCC 7942, είναι δυνατή η εύρεση του αριθμού των κυττάρων σε 1 στρώμα σταγόνας, ως εξής:

$$n = \frac{E_\sigma}{E_s} = 0.625 \times 10^6 \cong 625\ 000 \text{ cfu}$$

Προς εύρεση, τέλος, του αριθμού των στρωμάτων (N) επί του συνόλου της σταγόνας, υπολογίζουμε:

$$N = \frac{N_s}{n} = \frac{232\ 343\ 422}{625\ 000} \cong 372 \text{ στρώματα}$$

Ο παραπάνω αριθμός καταλαβαίνουμε ότι ξεπερνά κατά πολύ το μέγιστο όριο των 2-3 στρωμάτων στα οποία μπορεί να εκδηλωθεί η διατρητική επίδραση της τοπογραφίας μιας υπερυδρόφοβης επιφάνειας. Συνεπώς, αιτιολογείται απόλυτα η αυξητική συμπεριφορά της συγκέντρωσης των 155×10^8 cfu/cm² των κυανοβακτηρίων πάνω στην επιφάνεια. Δεν είναι όμως μόνο ο ούτως ή άλλως μεγάλος αριθμός n βακτηρίων που τοποθετούμε πάνω στην επιφάνεια για τόσο μεγάλη συγκέντρωση, αλλά και η ίδια η συμπύκνωση που υφίσταται η σταγόνα πάνω σε αυτή λόγω της μεγάλης γωνίας επαφής, που εξαναγκάζει τη στοιβαξή τους σε πολλά στρώματα. Για το λόγο αυτό, προτιμώνται μικρές συγκεντρώσεις όπου ο μικρός βαθμός διασποράς της σταγόνας δε θα προκαλεί τη διαστρωμάτωσή τους σε πολλαπλές στοιβάδες.

Στον αντίποδα, με τον ίδιο τρόπο υπολογίζουμε τον αριθμό στρωμάτων που αντιστοιχούν στη χαμηλή συγκέντρωση των 7.7×10^8 cfu/cm² (0.2×10^9 cfu/mL). Για ακριβή συγκέντρωση 232 343 422 cfu/mL και όγκο σταγόνας 50 μL, ο απόλυτος αριθμός βακτηρίων που τοποθετούμε πάνω στην επιφάνεια είναι:

$$N_s' = 232\ 343\ 422 \text{ cfu/mL} \times 50 \times 10^{-3} \text{ mL} = 11\ 617\ 171 \text{ cfu}$$

Για ίδιο αριθμό βακτηρίων $n = 625\ 000$ cfu που περιέχονται σε 1 στρώμα βακτηρίων πάνω σε υπερυδρόφοβη επιφάνεια, μπορούμε να βρούμε το σύνολο N' των στρωμάτων σε ολόκληρη τη σταγόνα:

$$N' = \frac{N_s'}{n} = \frac{11\ 617\ 171}{625\ 000} \cong 19 \text{ στρώματα}$$

Ο αριθμός αυτός των στρωμάτων, αν και δεν είναι εντός του ορίου δράσης της τοπογραφίας της υπερυδρόφοβης επιφάνειας, δεν αποκλείει την εκδήλωση της επίδρασής της, καθώς έως και τρία στρώματα σε σύνολο περίπου είκοσι, αντιστοιχούν προσεγγιστικά σε 15% εξουδετέρωση του βακτηριακού πληθυσμού. Αν αναλογιστούμε επιπλέον ότι η κατανομή των βακτηρίων στη σταγόνα, σε πραγματικές συνθήκες δεν είναι ομοιόμορφη, η διατηρητική δράση της τοπογραφίας στις κατά τόπους ανομοιογένειες με μικρότερη διαστρωμάτωση, θα είναι πιο έντονη. Επιπλέον, δεδομένου ότι η τοπογραφία δρα άμεσα, η εξουδετέρωση του βακτηριακού πληθυσμού, έστω και σε ποσοστό 15%, στην αρχική φάση ανάπτυξής του, μπορεί να δράσει αποτρεπτικά στη μετέπειτα εξέλιξή του.

Είναι επομένως κατανοητό ότι η βακτηριοκτόνος συμπεριφορά των υπερυδρόφοβων επιφανειών είναι δυνατόν να εκδηλωθεί σε συγκεντρώσεις κυανοβακτηρίων τέτοιες ώστε να εξασφαλίζεται μικρή διαστρωμάτωση για να μπορεί η εν λόγω τοπογραφία να παρεισφρύσει στα βακτήρια, διασπώντας το κυτταρικό τους τοίχωμα και με αυτό τον τρόπο, εξουδετερώνοντάς τα.

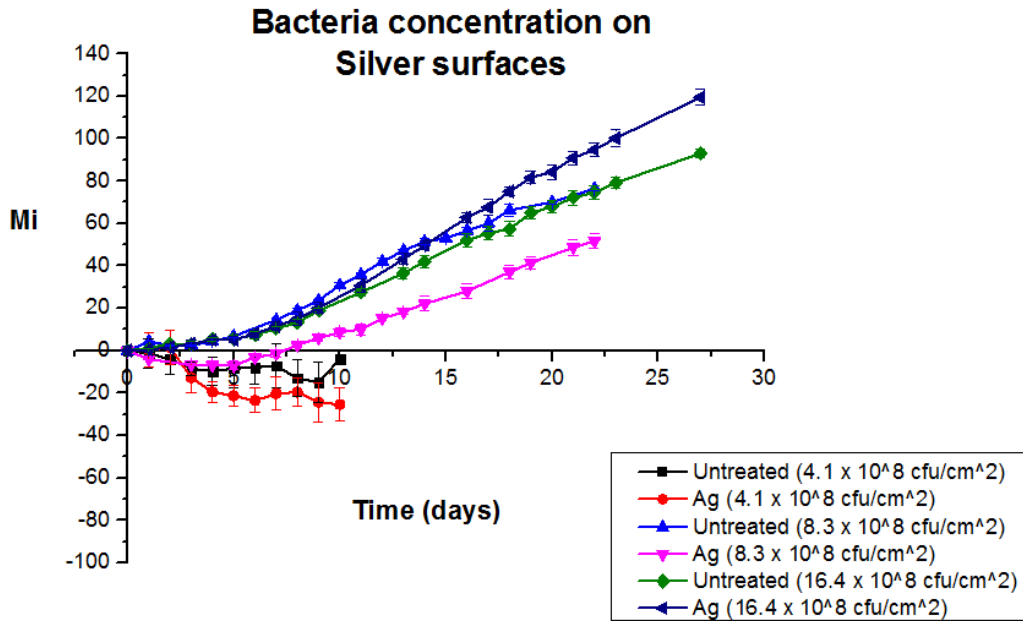
5.3.2 Επιφάνειες PMMA μετά από εναπόθεση μετάλλου

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.3, μια από τις βασικές μεθόδους απόδοσης αντιβακτηριακών ιδιοτήτων σε επιφάνειες, είναι η εναπόθεση κατάλληλων μετάλλων. Από την ίδια παράγραφο, διακρίνουμε ως συνηθέστερα χρησιμοποιούμενα μέταλλα με αποτελεσματική βακτηριοκτόνο δράση, τον άργυρο (Ag) και το χαλκό (Cu). Τα δύο αυτά μέταλλα επιλέγουμε να εισαγάγουμε στις πολυμερικές επιφάνειες PMMA, με τη διαδικασία της ιονοβολής (παράγραφος 3.6.1.4) και να διερευνήσουμε τη δράση τους ως προς τα κυανοβακτήρια *Synechococcus* sp PCC 7942. Ως λογικό επακόλουθο της όλης πειραματικής μελέτης εμφανίζεται η επιλογή του μετάλλου εκείνου με την ισχυρότερη βακτηριοκτόνο δράση, προς μετέπειτα εναπόθεσή του σε κατεργασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες.

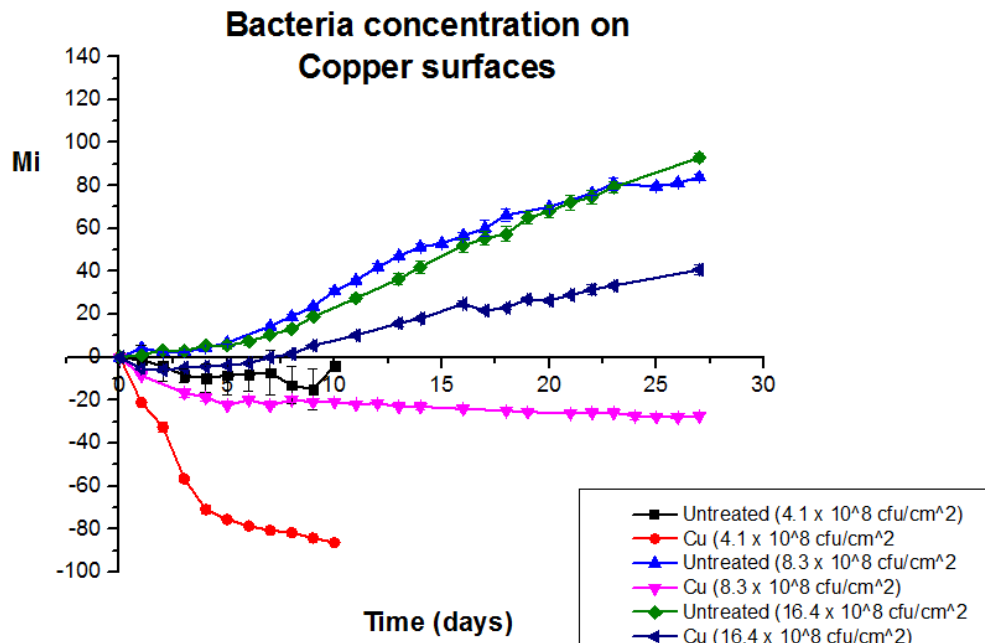
Στην κατεύθυνση αυτή λοιπόν, χρησιμοποιούμε ακατέργαστες πολυμερικές επιφάνειες PMMA, διαστάσεων 2 x 2 cm², οι οποίες υπόκεινται σε ιονοβολή (sputtering) του

αντίστοιχου μετάλλου. Προκειμένου να διαφανεί το εύρος συγκεντρώσεων της αντιβακτηριακής δράσης κάθε μεταλλικής επιφάνειας, καθώς και ο μεταξύ τους συσχετισμός ως προς την ισχύ της δράσης τους, δοκιμάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις *Synechococcus*, των 4.1, 8.3 και 16.4 x 10⁸ cfu/cm². Σε κάθε μεταλλική επιφάνεια εναποτέθηκαν 50 μL και μετρήθηκε ο φθορισμός της χλωροφύλλης *a* των κυανοβακτηρίων, μέχρι να εγκαταλείψουν την εκθετική φάση ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα των υπολογισμών του δείκτη M_i για κάθε μεταλλική επιφάνεια, παρατίθενται στα διαγράμματα των Εικόνων 5.6, 5.7, και αποδίδονται συναρτήσει των αντίστοιχων τιμών του στις ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά.

Μελετώντας αρχικά την κάθε επιφάνεια ξεχωριστά, ξεκινάμε με τις επιφάνειες αργύρου. Με μια πρώτη ματιά του διαγράμματος της Εικόνας 5.6, διακρίνουμε ότι η αντιβακτηριακή δράση του αργύρου μειώνεται με την αύξηση της βακτηριακής συγκέντρωσης με την πλήρη εξάλειψή της στη συγκέντρωση των 16.4 x 10⁸ cfu/cm². Πιο αναλυτικά, στη συγκέντρωση των 4.1 x 10⁸ cfu/cm², όπου λόγω χαμηλής επιφανειακής συγκέντρωσης των βακτηρίων, παρουσιάζεται αδυναμία ανάπτυξης των βακτηρίων ακόμη και πάνω στην ακατέργαστη επιφάνεια PMMA (παράγραφος 5.2), η επιβίωσή τους δυσχεραίνεται περισσότερο παρουσία αργύρου. Οι τιμές του δείκτη M_i μειώνονται με την εξέλιξη του πειράματος, πέφτοντας στο -25 κατά τη 10^η ημέρα πειράματος, με τις αντίστοιχες τιμές στην επιφάνεια PMMA να φθάνουν έως το -15.



Εικόνα 5.6: Συγκεντρώσεις των 4.1 , 8.3 και 16.4×10^9 cfu/cm² *Synechococcus* sp PCC 7942 σε επιφάνειες αργύρου (Ag).



Εικόνα 5.7: Συγκεντρώσεις των 4.1 , 8.3 και 16.4×10^9 cfu/cm² *Synechococcus* sp PCC 7942 σε επιφάνειες χαλκού (Cu).

Συνεχίζοντας με τη διπλάσια συγκέντρωση των 8.3×10^8 cfu/cm², για την οποία τα βακτήρια αναπτύσσονται αδιάκοπα πάνω στις ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, ο δείκτης M_i λαμβάνει αρνητικές τιμές μέχρι και την 7^η ημέρα πειράματος, ένδειξη ότι εξουδετερώνει τα βακτήρια. Με περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης στα 16.4×10^8 cfu/cm², η βακτηριοκτόνος ιδιότητα του αργύρου εξαφανίζεται, καθώς ο δείκτης M_i στη μεταλλική επιφάνεια, όπως μπορούμε να δούμε και από το διάγραμμα της Εικόνας 5.6, αυξάνεται παράλληλα και σχεδόν ταυτόχρονα με την ακατέργαστη επιφάνεια. Μάλιστα, μπορούμε να πούμε πως σε κάποιες περιπτώσεις οι τιμές του πάνω στην επιφάνεια αργύρου ξεπερνούν εκείνες στην ακατέργαστη, το οποίο βέβαια μπορεί να αποδοθεί σε στατιστικά σφάλματα, καθώς κατά την επανάληψη των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές καλλιέργειες κι εδώ αποδίδεται η μέση τιμή των τιμών κάθε πειραματικού κύκλου.

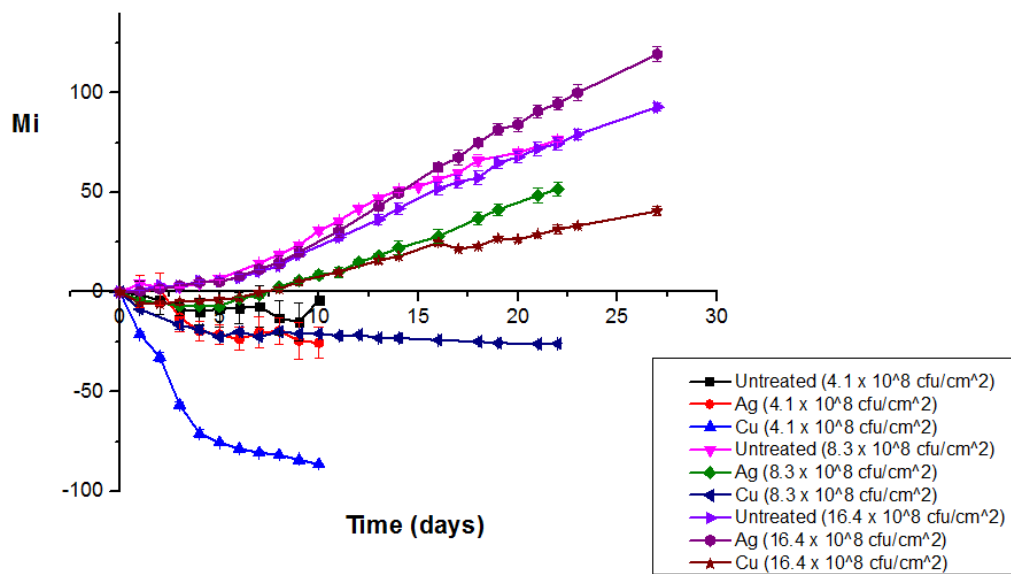
Στρεφόμενοι στη συνέχεια στο χαλκό, όπως μπορούμε να συμπεράνουμε και από το διάγραμμα της Εικόνας 5.7, η δράση του είναι έντονα κατασταλτική προς τη βακτηριακή ανάπτυξη, καθώς ανεξαρτήτως της συγκέντρωσής τους, διατηρεί την ιδιότητά του να τα εξουδετερώνει. Συγκεκριμένα, στη συγκέντρωση των 4.1×10^8 cfu/cm², συνδυαστικά με την ανεπαρκή επιφανειακή συγκέντρωση για την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες ανυδρίας και απουσίας θρεπτικού μέσου, τα ιόντα Cu^{+2} επιταχύνουν την πλήρη εξάλειψη του βακτηριακού πληθυσμού. Το γεγονός αυτό γίνεται εμφανές με τις τιμές του δείκτη M_i να λαμβάνουν διαρκώς μειούμενες τιμές που καταλήγουν στο -86 στο τέλος του πειράματος την 10^η ημέρα, με τις αντίστοιχες της ακατέργαστης επιφάνειας να μην ξεπερνούν το -15.

Προχωρώντας εν συνεχεία στη συγκέντρωση των 8.3×10^8 cfu/cm², εξακολουθεί να υφίσταται η βακτηριοκτόνος δράση του χαλκού, που εκδηλώνεται και διαρκή εμφάνιση αρνητικών τιμών του δείκτη M_i , δηλωτικών θανάτου των βακτηρίων, την ίδια στιγμή όπου στην ακατέργαστη επιφάνεια PMMA, τα βακτήρια αναπτύσσονται με ραγδαίο ρυθμό. Η δράση του χαλκού εμφανίστηκε από τις πρώτες μέρες πειράματος, διατηρώντας περίπου σταθερό ρυθμό εξουδετέρωσης βακτηρίων, εκκινώντας από τιμή M_i κοντά στο -22 την 7^η ημέρα πειράματος, ενώ η αντίστοιχη στην control επιφάνεια ξεπερνούσε το 14, και πέφτοντας στο -27 την 27^η και τελευταία ημέρα πειράματος, όπου αντίστοιχα στην επιφάνεια αναφοράς η ανάπτυξη των βακτηρίων ήταν τέτοια, που ο δείκτης κυμαινόταν στο 84.

Παρόμοια εικόνα συναντάμε στη συγκέντρωση των 16.4×10^8 cfu/cm², όπου τα ιόντα χαλκού συνεχίζουν να δρουν καταστρεπτικά επί των βακτηρίων με ελαφρώς μειωμένη ένταση σε σχέση με τις προηγούμενες συγκεντρώσεις των 4.1 και 8.3×10^8 cfu/cm², αν κρίνουμε από την απόσταση μεταξύ των διαγραμμάτων του δείκτη M_i για ακατέργαστες και χάλκινες επιφάνειες κάθε συγκέντρωσης ξεχωριστά (Εικόνα 5.7), όπου για τη συγκέντρωση των 16.4×10^8 cfu/cm², εμφανίζεται να είναι μειωμένη. Αν εξετάσουμε και πιο αναλυτικά τις τιμές του δείκτη, βλέπουμε ότι παραμένουν αρνητικές μέχρι και την 6^η ημέρα, ενώ στη συνέχεια αυξάνονται με σαφέστατα βέβαια μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τις αντίστοιχες στις επιφάνειες αναφοράς. Παρατηρείται συνεπώς μία μείωση στην αντιβακτηριακή δράση του χαλκού με την εξέλιξη του πειράματος, η οποία όμως είναι λογική αν σκεφτούμε το μέγεθος της συγκέντρωσης βακτηρίων που έχουμε εναποθέσει, το οποίο φθάνει περίπου στα 10^9 cfu/cm² (10^{10} cfu/mL). Σε τόσο μεγάλες συγκεντρώσεις, με το πέρασμα των ημερών τα βακτήρια υποθέτουμε ότι προλαβαίνουν να αναπτυχθούν σε πολλαπλά στρώματα πάνω στην επιφάνεια, με αποτέλεσμα ο φθορισμός που μετράται να προέρχεται ενδεχομένως από τα ανώτερα στρώματα που παραμένουν ανεπηρέαστα από το τι συμβαίνει στα κατώτερα αυτών. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε ότι η αντιβακτηριακή δράση του χαλκού ξεκίνησε από $\Pi_8 \approx 85\%$ την 8^η ημέρα και κατέληξε σε $\Pi_{27} \approx 56\%$ την 27^η και τελευταία ημέρα, δίολου αμελητέα τιμή, αν συνεξετάσουμε και τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω.

Αν και με τα μέχρι στιγμής παρατεθέντα, είναι εμφανές το πλεονέκτημα του χαλκού επί του αργύρου ως προς τις βακτηριοκτόνες ιδιότητές τους, παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον η άμεση σύγκριση των δύο μετάλλων για τις διάφορες συγκεντρώσεις και ασφαλώς συναρτήσει της ακατέργαστης επιφάνειας αναφοράς PMMA. Για το λόγο αυτό, παραθέτουμε σε ένα κοινό διάγραμμα τους δείκτες M_i των δύο μεταλλικών επιφανειών στην Εικόνα 5.8, και από την αντιπαραβολή που θα πραγματοποιηθεί, θα προκύψει αβίαστα ο χαλκός ως το μέταλλο μερικής επικάλυψης στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες προς εξέταση της προκύπτουσας αντιβακτηριακής συμπεριφοράς.

Antibacterial activity of metallic surfaces



Εικόνα 5.8: Συγκριτική παρουσίαση αντιβακτηριακής δράσης μεταλλικών επιφανειών αργύρου (Ag) και χαλκού (Cu) για διάφορες συγκεντρώσεις κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 (4.1, 8.3 και 16.4 x 10⁹ cfu/cm²).

Το διάγραμμα της παραπάνω εικόνας, αρκεί για να αναγνωριστεί η ισχυρότερη δράση του χαλκού στην εξουδετέρωση των βακτηρίων εν συγκρίσει με τον άργυρο. Όπως αναλύθηκε και παραπάνω για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά, ο χαλκός διατηρεί την ιδιότητά του να σκοτώνει τα βακτήρια σε όλες τις συγκεντρώσεις των 4.1, 8.3 και 16.4 x 10⁸ cfu/cm², σε αντίθεση με τον άργυρο που παύει να είναι αποτελεσματικός στα 16.4 x 10⁸ cfu/cm².

Εκτός αυτού όμως, και από την ίδια την απόσταση μεταξύ των διαγραμμάτων των ακατέργαστων και των μεταλλικών επιφανειών για κάθε συγκέντρωση ξεχωριστά της Εικόνας 5.8, διακρίνουμε ότι ακόμη και σε περιπτώσεις εμφάνισης αντιβακτηριακής δράσης του αργύρου, ο χαλκός είναι αδιαμφισβήτητα περισσότερο βακτηριοκτόνος και αποτελεσματικός. Για παράδειγμα, στη συγκέντρωση των 8.3 x 10⁸ cfu/cm², ενώ στον άργυρο οι τιμές του δείκτη M_i την πρώτη εβδομάδα πειράματος προσεγγίζουν το -7, στο χαλκό έχουν ήδη ξεπεράσει το -22, με τις αντίστοιχες τιμές στην ακατέργαστη επιφάνεια να ξεπερνούν το 14.

Πέραν όμως της μεγαλύτερης έντασης αντιβακτηριακής συμπεριφοράς του χαλκού, εμφανίζει επιπρόσθετα και μεγαλύτερης διάρκειας δράση σε σχέση με τον άργυρο. Έτσι, συνεχίζοντας στην ίδια συγκέντρωση των 8.3×10^8 cfu/cm², ενώ η αντιβακτηριακή δράση του αργύρου πέφτει από $\Pi_8 \approx 87\%$ την 8^η ημέρα σε $\Pi_{22} \approx 32\%$ την 22^η και τελευταία ημέρα πειράματος, οι τιμές του M_i για το χαλκό παραμένουν σταθερά αρνητικές και πτωτικές, κυμαινόμενες από το -20 την 8^η ημέρα στο -26 την 22^η με τις αντίστοιχες τιμές M_i στην επιφάνεια αναφοράς να αυξάνονται ραγδαία από το 19 στο 76, για τις ίδιες μέρες.

Δεν τίθεται καν θέμα σύγκρισης για την υψηλότερη συγκέντρωση των 16.4×10^8 cfu/cm², όπου ο άργυρος αδυνατεί να δράσει, σε αντίθεση με το χαλκό που διατηρεί την αντιβακτηριακή του δράση μέχρι και το τέλος του πειράματος, φθάνοντας, όπως είδαμε, σε $\Pi_{27} \approx 56\%$ την 27^η ημέρα. Ενδεχομένως, με αύξηση της επιφανειακής κάλυψης σε μέταλλο, να αυξανόταν η αντιβακτηριακή δράση των επιφανειών σε συγκεντρώσεις τόσο υψηλές, τάξης μεγέθους των $\approx 10^9$ cfu/cm² (10^{10} cfu/mL).

Δεν αποτελεί έκπληξη η επίδοση του χαλκού στην εξουδετέρωση των βακτηρίων. Η ικανότητά του να διαρρηγνύει τη βακτηριακή μεμβράνη, όπως έχει παρουσιαστεί στην παράγραφο 1.3, ενισχύεται από την ιδιαίτερη ικανότητα των ιόντων του (Cu^{+2}) να αναστέλλουν τη φωτοσυνθετική ιδιότητα των αυτότροφων φωτοσυνθετικών οργανισμών, μέσω παρεμπόδισης της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το Φωτοσύστημα II. Το γεγονός αυτό μάς δίνει μία επιπλέον αιτιολογία για την αποτελεσματικότερη και αμεσότερη βακτηριοκτόνη δράση του σε σχέση με τον άργυρο. Αξίζει όμως να τονίσουμε εδώ ότι, δεδομένης της αποδεδειγμένης ικανότητας του χαλκού να εξουδετερώνει αρνητικά ([78], [155]), καθώς και θετικά ([77], [74]) κατά Gram βακτήρια, η μείωση της συγκέντρωσης του *Synechococcus* sp PCC 7942, μπορεί να αιτιολογηθεί μόνο στα πλαίσια μιας γενικευμένης δράσης του χαλκού, που δεν εξαντλείται στην καταστολή των φωτοσυνθετικών του μηχανισμών.

5.3.3 Επιχαλκωμένες μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδροφικές πολυμερικές επιφάνειες

Όπως είδαμε στην παράγραφο 5.3.1, οι μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδροφικές επιφάνειες, δεν εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση σε οποιοδήποτε εύρος συγκεντρώσεων. Αντιθέτως είναι ικανές να εξουδετερώνουν βακτήρια μόνο σε συγκεντρώσεις που δημιουργούν πλήθος στρωμάτων που δεν ξεπερνά τα 2-3 σε αριθμό, δεδομένου ότι αυτό είναι το μέγιστο πλήθος στο οποίο μπορεί η τοπογραφία των επιφανειών να επιδράσει στα κυανοβακτήρια. Αν και σαν τάξη μεγέθους, η συγκέντρωση των 7.7×10^8 cfu/cm², στην οποία αποδείξαμε πειραματικά ότι οι υπερυδροφικές επιφάνειες σκοτώνουν τα βακτήρια, δεν είναι μικρή, θα ήταν ιδιαίτερα ενδιαφέρον να καταφέρουμε να διευρύνουμε το εύρος των συγκεντρώσεων στις οποίες επιδρούν.

Αναδείχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο (παράγραφος 5.3.2) ο χαλκός ως το μέταλλο εκείνο με την αμεσότερη και ισχυρότερη αντιβακτηριακή δράση, όταν επικαλύπτει ακατέργαστες πολυμερικές επιφάνειες PMMA. Η συγκέντρωση των κυανοβακτηρίων δεν αποτέλεσε περιοριστικό παράγοντα στην εκδήλωση της ικανότητάς του να σκοτώνει βακτήρια, αφού η δράση του ήταν εμφανής ακόμη και σε συγκέντρωση που προσέγγισε τα 10^9 cfu/cm².

Ως επόμενο λογικό βήμα, εμφανίζεται συνεπώς η δυνατότητα κατασκευής μιας επιφάνειας που θα εξασφαλίζει τις μη προσκολλητικές ιδιότητες της υπερυδροφικής επιφάνειας που αποδείχτηκαν στο 4^ο κεφάλαιο, και συνάμα θα δίνει τη δυνατότητα εξουδετέρωσης υψηλών συγκεντρώσεων βακτηρίων. Για το λόγο αυτό, σε αυτή την παράγραφο, παρουσιάζεται το εγχείρημα της επικάλυψης με τη γνωστή τεχνική της ιονοβολής χαλκού σε υπερυδροφικές επιφάνειες, προς διερεύνηση της αντιβακτηριακής τους δράσης, του εύρους βακτηριακών συγκεντρώσεων που αυτή εμφανίζεται και τέλος, την ενδεχόμενη διαφοροποίησή της από τις αντίστοιχες ακατέργαστες χάλκινες επιφάνειες, αλλά και τις απλές υπερυδροφικές. Θα επιχειρηθεί δηλαδή, η κατασκευή μικρο-νανοϋφασμένων πολυμερικών επιφανειών, μερικώς επικαλυμμένων με χαλκό και η μετέπειτα υπερυδροφοποίησή τους.

5.3.3.1 Επιλογή υδρόφοβης επικάλυψης προς κατασκευή επιχάλκωμένων μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων επιφανειών

Στην παράγραφο 3.6.1.3 είδαμε ότι μετά την κατεργασία της επιφάνειας προς δημιουργία τοπογραφίας, η υδροφοβικότητα μπορεί να εξασφαλιστεί είτε με την αέρια εναπόθεση φθοριωμένου μονοστρώματος από διάλυμα 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas), είτε λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈. Σε αυτό το στάδιο, επειδή επιδίωξή μας είναι να προστεθεί χαλκός στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες, διερευνάται ο κατάλληλος συνδυασμός πάχους χαλκού και είδους υδρόφοβης επίστρωσης που θα εναποτεθεί στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες, για να αναδειχθούν οι αντιβακτηριακές τους ιδιότητες χωρίς να αλλοιώνονται οι ιδιότητες διαβροχής τους.

Προς αυτή την κατεύθυνση, δοκιμάστηκαν διάφορα πάχη εναπόθεσης χαλκού και για κάθε είδος επίστρωσης ξεχωριστά. Χρησιμοποιήθηκαν τα πολυμερικά πλακίδια διαστάσεων 2 x 2 cm², τα οποία μετά την κατεργασία με πλάσμα, επικαλύφθηκαν με τρία διαφορετικά πάχη εναπόθεσης χαλκού, 2, 5 και 10 nm (μετρημένα σε επίπεδες επιφάνειες, βλ. παράγραφο 3.6.1.4). Για καθένα από αυτά τα πάχη, ακολούθησε εναπόθεση των δύο διαφορετικών υδρόφοβων επιστρώσεων, 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas) για περίπου 2 ώρες και υμενίου φθοράνθρακα C₄F₈ (Teflon) για χρόνο 30 s, που αντιστοιχεί σε πάχος επίστρωσης περίπου ίσο με 33 nm (Πίνακας 3-3, παράγραφος 3.6.1.3).

Μετά την κατασκευή των επιφανειών, οι ιδιότητες διαβροχής τους ελέγχθηκαν με μέτρηση των γωνιών επαφής για τα δύο είδη υπερυδρόφοβης επιφάνειας στα διάφορα πάχη χαλκού, με χρήση του οργάνου GBX Digidrop Contact Angle Measurement System. Τα αποτελέσματά μας φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 5.3):

Πίνακας 5-3: Μέτρηση γωνίας επαφής σε μικρο-νανοδομημένες με πλάσμα υπερυδροφικές πολυμερικές επιφάνειες PMMA με υδρόφοβη επίστρωση 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS) ή φθοράνθρακα C₄F₈ (Teflon) για διάφορα υποκείμενα πάχη εναπόθεσης χαλκού (Cu).

Γωνία επαφής (°)	Πάχος εναπόθεσης Cu (nm)		
	2	5	10
PFOTS	100	50	<50
C ₄ F ₈	157	157	159

Από τον παραπάνω πίνακα, παρατηρούμε ότι η εναπόθεση PFOTS δεν ήταν επιτυχής, δεδομένου ότι δεν εξασφάλισε την αναγκαία συνθήκη για την εμφάνιση υπερυδροφοβικότητας, δηλαδή γωνία επαφής μεγαλύτερη των 150°. Διακρίνουμε επίσης ότι με την αύξηση του πάχους χαλκού, η γωνία επαφής των επιφανειών που είχαν επικαλυφθεί με PFOTS παρουσίαζε περαιτέρω μείωση, καταλήγοντας να λαμβάνει τιμές μικρότερες των 50°, καθιστώντας πλέον την επιφάνεια υδρόφιλη. Αντιθέτως, η εναπόθεση Teflon C₄F₈ εμφανίζεται να διασφαλίζει τον υπερυδροφόβο χαρακτήρα των επιφανειών για όλα τα πάχη χαλκού, με γωνίες επαφής που ξεπερνούν τις 150° και γωνίες υστέρησης μικρότερες των 5°.

Μπορούμε να συμπεράνουμε ότι με την αύξηση του πάχους του χαλκού, αυξάνεται και ο βαθμός επικάλυψης των χημικών ομάδων της επιφάνειας. Όμως, επειδή για την επιτυχή εναπόθεση του φθοριωμένου μονοστρώματος από διάλυμα PFOTS, χρειάζεται η πρόσδεσή του στις δραστικές ρίζες που δημιουργούνται μετά την ενεργοποίηση της επιφάνειας σε plasma O₂ 20 s, η έστω και μερική κάλυψη της επιφάνειας από χαλκό, αποτρέπει τη δημιουργία δεσμών, άρα και το σχηματισμό του μονοστρώματος. Δε συμβαίνει το ίδιο με το υμένιο από C₄F₈, το οποίο είναι πιο εύκολο να σταθεροποιηθεί, αφού εναποτίθεται σε μεγαλύτερα πάχη και δεν προαπαιτεί την ενεργοποίηση προς δημιουργία υποδοχέων στην επιφάνεια προς κάλυψη. Γι' αυτό το λόγο, εμφανίζεται ανεπηρέαστο από το πάχος χαλκού που καλύπτει την επιφάνεια, γεγονός που μαρτυράται από τη σχεδόν σταθερή γωνία επαφής ($\approx 157^\circ$) και υστέρησής του ($< 5^\circ$).

Συμπερασματικά, αν επιθυμούσαμε να επιλέξουμε την επικάλυψη από PFOTS, θα έπρεπε να μειωθεί η περιεκτικότητα της επιφάνειας σε χαλκό και το πάχος εναπόθεσής του να είναι μικρότερο των 2 nm. Επειδή όμως, για τόσο μικρά πάχη εμφυτευόμενου χαλκού, απαιτείται πολύ καλός χειρισμός και βαθμονόμηση του συστήματος

ιονοβολής, αλλά και λόγω του ότι είναι επιθυμητή η ευκολία παρασκευής των προτεινόμενων επιχάλκωμένων υπερυδρόφοβων επιφανειών, έτσι ώστε να μη δυσχεραίνεται η παραγωγή τους σε μαζικό επίπεδο, προτιμάται η χρήση υμενίου από C₄F₈. Άλλωστε, ήδη από το 4^ο κεφάλαιο αποδείχτηκε ότι το υμένιο C₄F₈ πλεονεκτεί σε σχέση με το μονόστρωμα PFOTS, ως προς τη μη προσκολλητική του ικανότητα, γεγονός που ενισχύει την επιλογή μας για χρήση Teflon.

5.3.3.2 Επιλογή χρόνου εναπόθεσης υδρόφοβου υμενίου C₄F₈ προς κατασκευή επιχάλκωμένων μικρο-νανοϋφασμένων υπερυδρόφοβων επιφανειών

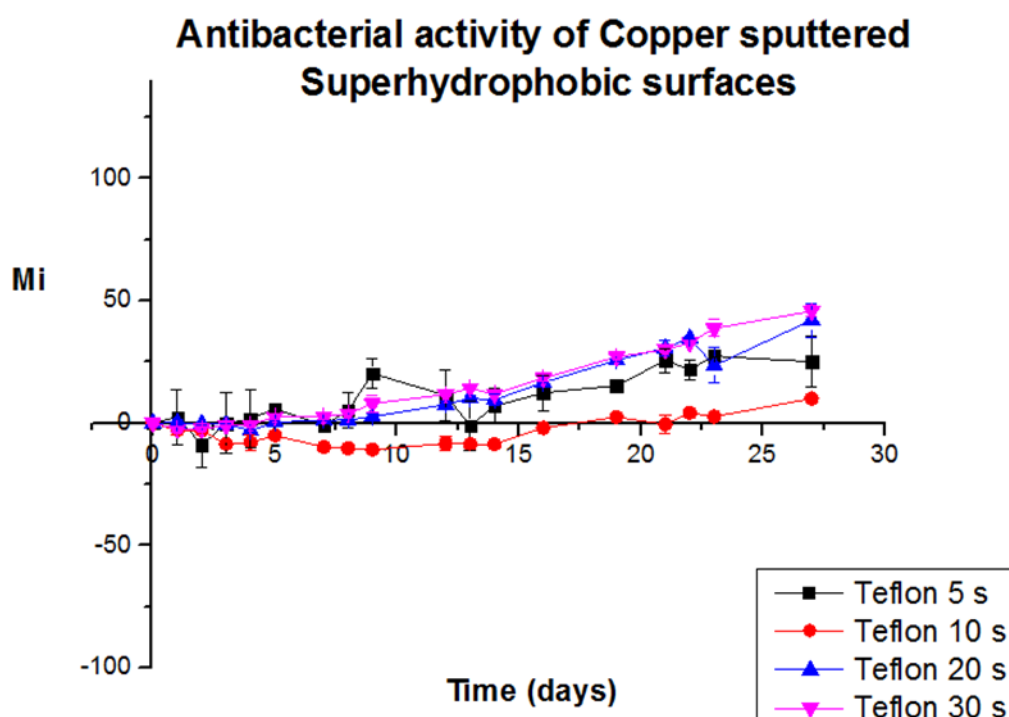
Έχοντας επιλέξει τη χρήση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈, απομένει να διερευνήσουμε το πάχος στο οποίο θα εναποτεθεί, ώστε να μην παρεμποδίζει τη διάχυση του χαλκού προς την επιφάνεια για να μπορέσει να δράσει, ερχόμενος σε άμεση επαφή με τα βακτήρια. Έτσι, διατηρώντας το πάχος χαλκού στα 10 nm, αναζητάται ο κατάλληλος χρόνος εναπόθεσης του υμενίου φθοράνθρακα.

Συνεχίζοντας με το ίδιο υπόστρωμα πλακιδίων PMMA διαστάσεων 2 x 2 cm², η κατεργασία με πλάσμα O₂ και η επιχάλκωση 10 nm, πραγματοποιήθηκαν στις συνήθεις συνθήκες (βλ. παραγράφους 3.6.1.2, 3.6.1.4), με την εναπόθεση από πλάσμα αερίου C₄F₈ να ακολουθεί για τέσσερις διαφορετικούς χρόνους, 5, 10, 20 και 30 s. Με χρήση της συσκευής GBX Digidrop, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της γωνίας επαφής των επιφανειών προς έλεγχο του υπερυδρόφοβου χαρακτήρα τους. Για όλους τους χρόνους εναπόθεσης, η γωνία επαφής βρέθηκε σταθερή με πολύ μικρές αποκλίσεις στις 160° (± 2°), γεγονός που επιτρέπει τον περαιτέρω έλεγχο της αντιβακτηριακής απόδοσης του υποκείμενου χαλκού.

Η δράση κάθε επιφάνειας διερευνάται με τη μέτρηση του εκπεμπόμενου φθορισμού. Παρά το ότι διαθέτουμε υπερυδρόφοβες επιφάνειες, το γεγονός ότι υπόκειται στρώμα χαλκού, μας επιτρέπει τη μελέτη της επίδρασής τους σε υψηλές συγκεντρώσεις κυανοβακτηρίων, αφού, όπως αναλύθηκε στην παράγραφο 5.3.2, η δραστηριότητα του

χαλκού δεν περιορίζεται από τη συγκέντρωση που τοποθετείται. Να σημειώσουμε επίσης, ότι λόγω της φύσης των υπερυδροφобων επιφανειών, ήταν δύσκολη η τοποθέτηση ακριβούς και ίδιας ποσότητας όγκου πάνω σε όλες τις επιφάνειες, καθώς διέφευγε από τα όρια τους.

Συγκεκριμένα λοιπόν, η συγκέντρωση *Synechococcus* που χρησιμοποιήθηκε ήταν 155×10^8 cfu/cm², από την οποία εναποτέθηκε, με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ακρίβεια, όγκος 50 μ L πάνω σε κάθε επιφάνεια. Εν συνεχεία, με τη συσκευή PEA-fluorometer μετρήθηκε ο φθορισμός κάθε επιφάνειας μέχρι το τέλος της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους και η % μεταβολή του παριστάνεται γραφικά στην Εικόνα 5.9. Απουσία επιφάνειας αναφοράς, η αξιολόγηση της αντιβακτηριακής δράσης των επιφανειών, είναι συγκριτική και αφορά στις τιμές και τη γενική τάση του δείκτη M_i .



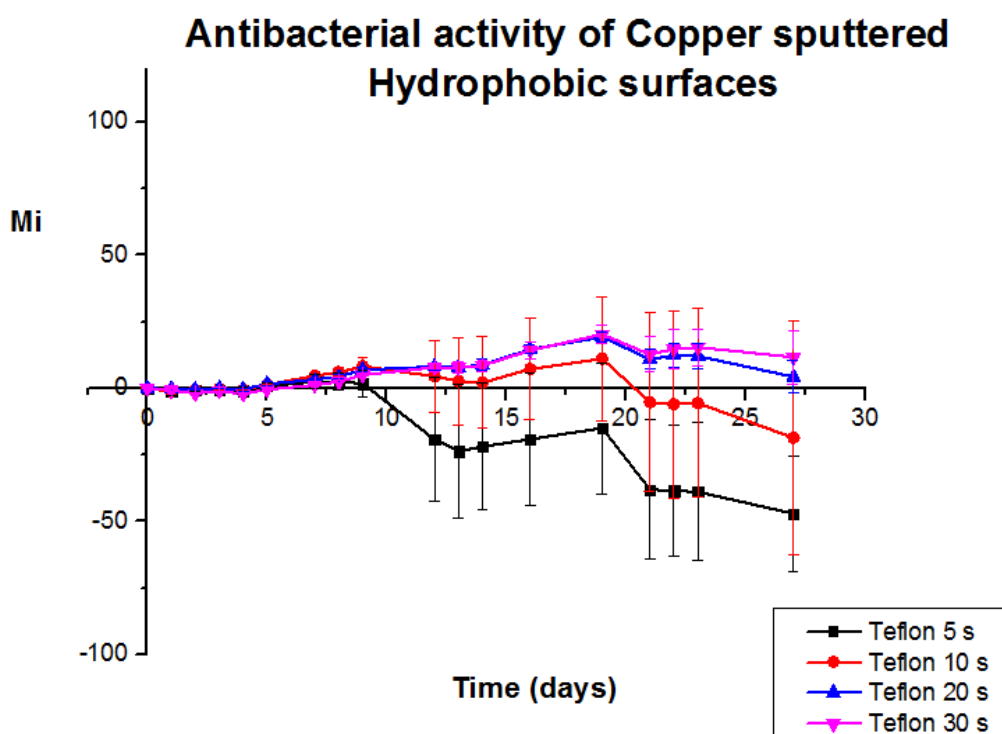
Εικόνα 5.9: Αντιβακτηριακή δράση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδροφобων πολυμερικών επιφανειών για διάφορους χρόνους εναπόθεσης λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈ (5, 10, 20 & 30 s) και μετά την εναπόθεση χαλκού πάχους 10 nm.

Παρατηρώντας την παραπάνω εικόνα, οι επιφάνειες στις οποίες έχει εναποτεθεί C_4F_8 για χρόνους 20 και 30 s, παρουσιάζουν σίγουρα μικρότερη αντιβακτηριακή δράση. Οι αρνητικές τιμές του δείκτη M_i δεν εμφανίζονται για διάστημα μεγαλύτερο των 4 ημερών, γεγονός το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί εν μέρει στο ότι κατά τη διάρκεια αυτών των ημερών, τα βακτήρια διανύουν ακόμη τη φάση υστέρησης. Επιπλέον, στο διάστημα αυτό οι τιμές του δείκτη, δεν έπεσαν κάτω περίπου από το -3 για χρόνο εναπόθεσης 20 s και από το -2.5 για χρόνο 30 s. Με το πέρασμα των ημερών, σημειώθηκε αύξηση του βακτηριακού πληθυσμού, με τιμές δείκτη που ξεπέρασαν το 42 και το 46 για χρόνους 20 και 30 s, αντίστοιχα στο τέλος του πειράματος.

Στρεφόμενοι στους χρόνους των 5 και 10 s, φαίνεται στα 10 s να σημειώνεται εντονότερη αντιβακτηριακή δράση, με το δείκτη M_i να παραμένει αρνητικός για το μεγαλύτερο μέρος του πειράματος, μέχρι δηλαδή και την 23^η ημέρα και να πέφτει έως και περίπου το -11 την 9^η ημέρα. Ως προς το χρόνο των 5 s, παρουσιάζει σίγουρα βελτιωμένη δράση σε σχέση με τους χρόνους των 20 και 30 s, με τιμές M_i χαμηλότερες, αλλά με σημαντικές διακυμάνσεις, οι οποίες αποκλίνουν από τη σταθερή συμπεριφορά που εμφανίζει ο χρόνος των 10 s. Ειδικότερα, οι τιμές του δείκτη πέφτουν έως και περίπου το -9 τη 2^η ημέρα πειράματος και φθάνουν στο 25 την 27^η και τελευταία ημέρα πειράματος με αρκετές αυξομειώσεις και επαναφορά σε αρνητικές τιμές στο ενδιάμεσο.

Ως γενικότερο συμπέρασμα προκύπτει ότι με την αύξηση του χρόνου εναπόθεσης C_4F_8 μεγαλύτερου των 10 s, μειώνεται η αντιβακτηριακή δράση των υπερυδροφωβων επιφανειών, γιατί η αύξηση του πάχους του υμενίου δυσχεραίνει τη διάχυση των ατόμων χαλκού προς την επιφάνεια. Θυμίζουμε ότι για να δράσει ο χαλκός είναι απαραίτητη η άμεση επαφή του με τα βακτήρια, επομένως παρεμπόδιση της ανάδειξής του προς την επιφάνεια για χρόνους 20 και 30 s, συνεπάγεται απουσία αντιβακτηριακής δράσης. Να σημειώσουμε ότι μετά από ορισμένες ημέρες, διαφορετικές σε πλήθος για κάθε επιφάνεια, παρατηρούνταν αύξηση του δείκτη, άρα και του βακτηριακού πληθυσμού, ένδειξη ότι πλέον ο μετρούμενος φθορισμός προερχόταν από τα ανώτερα στρώματα, τα οποία αυξάνονταν ανεξαρτήτως της κατάστασης των κατωτέρων.

Συγκεκριμένα ως προς τους χρόνους εναπόθεσης των 5 και 10 s, επειδή εν γένει οι τιμές τους δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, και λόγω της δυσκολίας να σταθεροποιηθεί ίδιος όγκος σταγόνας στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες, δοκιμάστηκαν οι ίδιοι χρόνοι εναπόθεσης υμενίου Teflon από πλάσμα C_4F_8 σε ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, απουσία δηλαδή τραχύτητας, και για το ίδιο πάχος εναποτιθέμενου χαλκού (10 nm). Σε όλες τις υδρόφοβες επιφάνειες μετρήθηκε επίσης η γωνία επαφής με χρήση της συσκευής GBX Digidrop, η οποία βρέθηκε περίπου ίση με 108° . Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.10, ο χρόνος εναπόθεσης των 5 s, παρουσιάζει καλύτερη αντιβακτηριακή δράση σε σχέση με τον αντίστοιχο των 10 s, με τους μεγαλύτερους χρόνους να εμφανίζουν κι εδώ περισσότερο μειωμένη απόδοση.



Εικόνα 5.10: Αντιβακτηριακή δράση υδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών επικαλυμένων με λεπτό υμένιο φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C_4F_8 για διάφορους χρόνους εναπόθεσης (5, 10, 20 & 30 s), μετά την εναπόθεση χαλκού πάχους 10 nm.

Φαίνεται ότι στην περίπτωση των επιφανειών που στερούνται τραχύτητας, ο μικρότερος χρόνος εναπόθεσης υμενίου Teflon των 5 s, διευκόλυνε τη διάχυση του χαλκού στην επιφάνεια και την αμεσότερη δράση του. Ενδέχεται στην αντίστοιχη περίπτωση των υπερυδροφобων επιφανειών, λόγω παρουσίας τραχύτητας να μη σχηματίστηκε ομοιόμορφο υδρόφοβο υμένιο Teflon, γεγονός που επιβαρύνθηκε από την ενδιάμεση παρεμβολή χαλκού. Συνεπώς, πιθανολογείται η εμφάνιση κατά τόπους ατελειών στις υπερυδροφобες επιφάνειες στα 5 s Teflon, που ευνοεί τη βακτηριακή προσκόλληση, δικαιολογώντας την αστάθεια στην αντιβακτηριακή δράση τους.

Παρά την έλλειψη σταθερότητας της επιχαλκωμένης υπερυδροφобης επιφάνειας με χρόνο εναπόθεσης 5s από πλάσμα C_4F_8 , κι επειδή επιπλέον δεν μπορεί να αμφισβητηθεί η ύπαρξη αντιβακτηριακής δράσης, προκειμένου να εξασφαλίσουμε την ανεμπόδιση διάχυση του χαλκού προς την επιφάνεια, οδηγούμαστε στην επιλογή αυτού του χρόνου για την παρασκευή μικρο-νανοϋφασμένων υπερυδροφобων επιφανειών με χαλκό. Παρουσιάζεται η ανάγκη περαιτέρω πειραμάτων για την κατοχύρωση του χρόνου εναπόθεσης Teflon.

5.3.3.3 Αντιβακτηριακή δράση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδροφобων πολυμερικών επιφανειών με και χωρίς επιχάλκωση

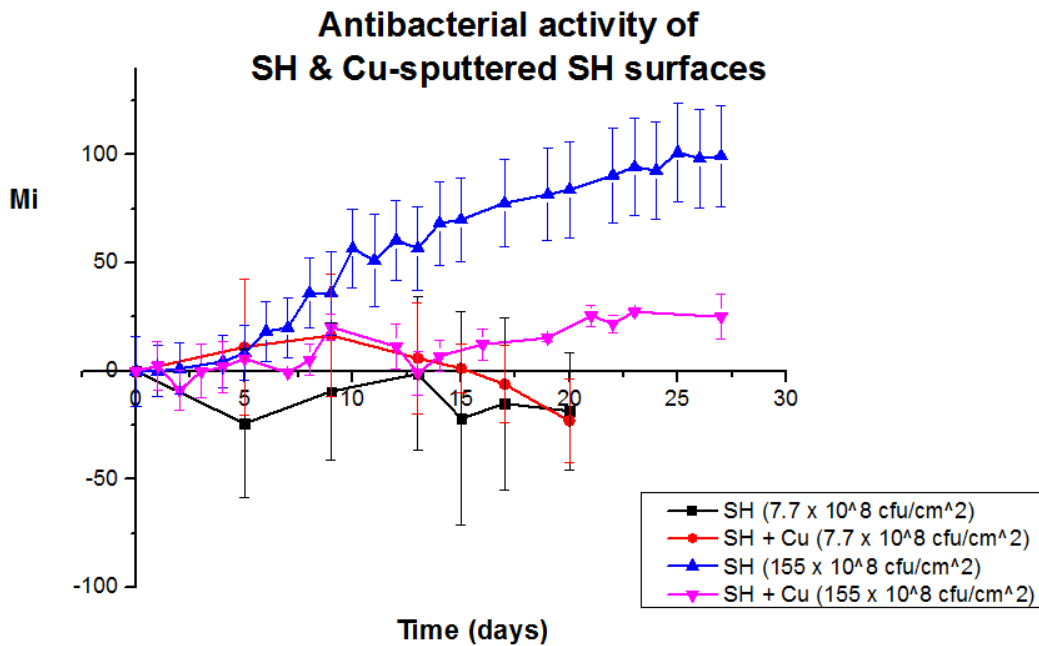
Γεννάται το εύλογο ερώτημα της διαφοροποίησης μιας μικρο-νανοϋφασμένης με πλάσμα υπερυδροφобοποιημένης επιφάνειας PMMA μετά την επιχάλκωση, από την αντίστοιχη απλή υπερυδροφобη χωρίς υποκείμενο χαλκό. Διαφοροποίηση η οποία απαντάται τόσο στον τρόπο εκδήλωσης του αντιβακτηριακού χαρακτήρα κάθε επιφάνειας, όσο και στο εύρος βακτηριακών συγκεντρώσεων που εκδηλώνεται. Για το λόγο αυτό, σε αυτή την παράγραφο θα πραγματοποιηθεί μια αντιπαραβολή των δύο επιφανειών, οι οποίες θα μελετηθούν ως προς την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν βακτήρια σε χαμηλές και υψηλές συγκεντρώσεις *Synechococcus* sp PCC 7942.

Υπενθυμίζουμε από την παράγραφο 3.10.1, ότι οι πολυμερικές επιφάνειες PMMA που χρησιμοποιήθηκαν διέφεραν ως προς την κατασκευή τους, με εκείνες στις χαμηλές

συγκεντρώσεις να είναι τα γνωστά πηγάδια, όγκου $(5 \times 5 \times 1.5) \text{ mm}^3$ και στις υψηλές, οι επίπεδες επιφάνειες εμβαδού $(2 \times 2) \text{ cm}^2$. Ως προς την προετοιμασία τους, υποβλήθηκαν αρχικά σε κατεργασία πλάσμα O_2 10 min στις συνήθεις συνθήκες προς δημιουργία κατάλληλης τοπογραφίας. Στις επιφάνειες που προορίζονταν για επιχάλκωση, ακολούθησε ιονοβολή προς σχηματισμό στρώματος χαλκού πάχους 10 nm, ενώ στη συνέχεια και στα δύο είδη επιφανειών εναποτέθηκε λεπτό υμένιο φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C_4F_8 για χρόνο 5 s, όπως αποφασίστηκε στην προηγούμενη παράγραφο.

Για τις χαμηλές συγκεντρώσεις, επιλέχθηκε εκείνη των $7.7 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2$, ενώ αντίστοιχα, για τις υψηλές συγκεντρώσεις εκείνη των $155 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2$. Να διευκρινίσουμε εδώ, ότι η φύση της επιφάνειας με την οποία έρχονται σε επαφή τα βακτήρια και στις δύο περιπτώσεις επιφανειών είναι κοινή, δεδομένου ότι είναι υπερυδρόφοβες επικαλυμένες με υμένιο C_4F_8 . Συνεπώς, η επιφανειακή συγκέντρωση των βακτηρίων, τόσο στη χαμηλή όσο και στην υψηλή συγκέντρωσή τους, θα είναι ίδια στις δύο επιφάνειες.

Ως προς τον έλεγχο της αντιβακτηριακής δράσης των επιφανειών σε κάθε συγκέντρωση, πραγματοποιήθηκε με μετρήσεις φθορισμού της σταγόνας των 50 μL που εναποτέθηκε σε κάθε επιφάνεια. Συγκεντρωτικά, τα αποτελέσματά μας παραθέτονται στην Εικόνα 5.11, όπου αξίζει να τονιστεί ότι η συγκριτική μελέτη των επιφανειών για τη βακτηριοκτόνο συμπεριφορά τους θα γίνει ποιοτικά και με εστίαση στην εξέλιξη του δείκτη M_i και όχι ποσοτικά λόγω απουσίας επιφάνειας αναφοράς.



Εικόνα 5.11: Αντιβακτηριακή δράση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα επιφανειών PMMA με και χωρίς επιχάλκωση σε χαμηλές (7.7×10^8 cfu/cm²) και υψηλές συγκεντρώσεις (155×10^8 cfu/cm²) *Synechococcus* sp PCC 7942.

Παρατηρώντας τις μεγάλες συγκεντρώσεις, η συμπεριφορά των επιφανειών είναι αρκετά ξεκάθαρη. Χωρίς τον υποκείμενο χαλκό, οι υπερυδρόφοβες δεν εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση, εν αντιθέσει προς εκείνες που έχουν χαλκό, οι οποίες παρουσιάζονται εμφανώς να σκοτώνουν τα βακτήρια. Πιο αναλυτικά, οι απλές υπερυδρόφοβες επιτρέπουν ανεμπόδιστα τον πολλαπλασιασμό των κυανοβακτηρίων, με θετικές τιμές δείκτη M_i που αυξάνονται σχεδόν μονότονα, ξεπερνώντας το 99 την 27^η και τελευταία ημέρα πειράματος. Οι υπερυδρόφοβες με χαλκό, αν και εμφανίζουν ορισμένες αυξομειώσεις, οι τιμές του δείκτη είναι σαφέστατα μειωμένες, ενώ δεν απουσιάζουν και οι αρνητικές τιμές του. Έτσι, σημειώνεται ένα εύρος τιμών από περίπου το -0.2 την 3^η ημέρα έως το 27 την 26^η με σημαντικές αυξομειώσεις στο ενδιάμεσο.

Σε προηγούμενη παράγραφο (παράγραφος 5.3.1) αποδείχθηκε ότι η επίδραση της τοπογραφίας μιας μικρο-νανοϋφασμένης επιφάνειας είναι αδύνατο να εκδηλωθεί στις υψηλές συγκεντρώσεις, όπου έχουμε πολλαπλά στρώματα βακτηρίων, περίπου ίσα με 372, ενώ στο μέγιστο πλήθος που μπορεί να φθάσει η τοπογραφία είναι τα 3 στρώματα. Αρκεί η συνειδητοποίηση του μεγέθους της επιφανειακής συγκέντρωσης βακτηρίων

($155 \times 10^8 \text{ cfu/cm}^2 \approx 10^{11} \text{ cfu/cm}^2$) για να κατανοήσουμε την αδυναμία εκδήλωσης της τοπογραφίας. Δεν ισχύει όμως το ίδιο για τις υπερυδρόφοβες επιφάνειες που έχουν χαλκό, όπου η απουσία επίδρασης της τοπογραφίας υπερκαλύπτεται από τη δραστηριότητα του χαλκού, ο οποίος διαχέεται στα στρώματα των βακτηρίων και τα εξουδετερώνει, αφού όπως αποδείξαμε στην παράγραφο 5.3.2, ο χαλκός είναι αποτελεσματικός σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις που φθάνουν μέχρι και τα 10^9 cfu/cm^2 .

Στις χαμηλές συγκεντρώσεις, οι υπερυδρόφοβες επιφάνειες χωρίς τον εναποτιθέμενο χαλκό εμφανίζουν περισσότερο πτωτική τάση σε σχέση με τις υπερυδρόφοβες χωρίς το χαλκό. Συγκεκριμένα, παρά το ότι στο τέλος του πειράματος οι δύο επιφάνειες παρουσιάζουν σχεδόν ίσο δείκτη M_i , κοντά στο -23, η επιχαλκωμένη υπερυδρόφοβη επιφάνεια από το σύνολο του πειράματος, εμφανίζει μια μικρότερης έντασης αντιβακτηριακή δράση. Κι αυτό γιατί, χρειάστηκαν 7 ημέρες ώστε να αρχίσει να αναστέλλει τη βακτηριακή ανάπτυξη και 17 για να εμφανίσει αρνητικές τιμές δείκτη M_i , σε αντίθεση με τις υπερυδρόφοβες χωρίς χαλκό που διατήρησαν συνολικά αρνητικές τιμές δείκτη. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, επειδή είναι πιθανόν ο χρόνος εναπόθεσης Teflon των 5 s να μην ήταν επαρκής για την ομοιόμορφη επικάλυψη της τραχειάς επιφάνειας, δεδομένης και της παρουσίας χαλκού, η κατά τόπους μείωση της υπερυδροφοβικότητας επιτρέπει τη βακτηριακή προσκόλληση, με το χαλκό βέβαια, αφού διαχυθεί προς την επιφάνεια περίπου την 9^η ημέρα να εξουδετερώνει δραστικά τα προσκολλημένα βακτήρια. Παρ'όλα αυτά, χρειάζονται περαιτέρω πειράματα για την επιβεβαίωση των εξαγόμενων συμπερασμάτων και την ασφαλή σύγκριση των δύο επιφανειών στις χαμηλές συγκεντρώσεις.

Συμπερασματικά, στις χαμηλές συγκεντρώσεις, με βεβαιότητα μπορούμε να εξαγάγουμε ότι η τοπογραφία μπορεί να εμφανίσει βακτηριοκτόνο δράση, χωρίς όμως να είμαστε ακόμη σε θέση να διακρίνουμε αν η εναπόθεση χαλκού προσδίδει ενισχυμένη δράση. Αντιθέτως, στις υψηλές συγκεντρώσεις η παρουσία χαλκού στις υπερυδρόφοβες επιφάνειες είναι απαραίτητη για την εμφάνιση αντιβακτηριακής δράσης.

5.4 Συγκριτική μελέτη αντιβακτηριακής δράσης ακατέργαστων επιμεταλλωμένων και μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδροφобων πολυμερικών επιφανειών με και χωρίς επιχάλκωση

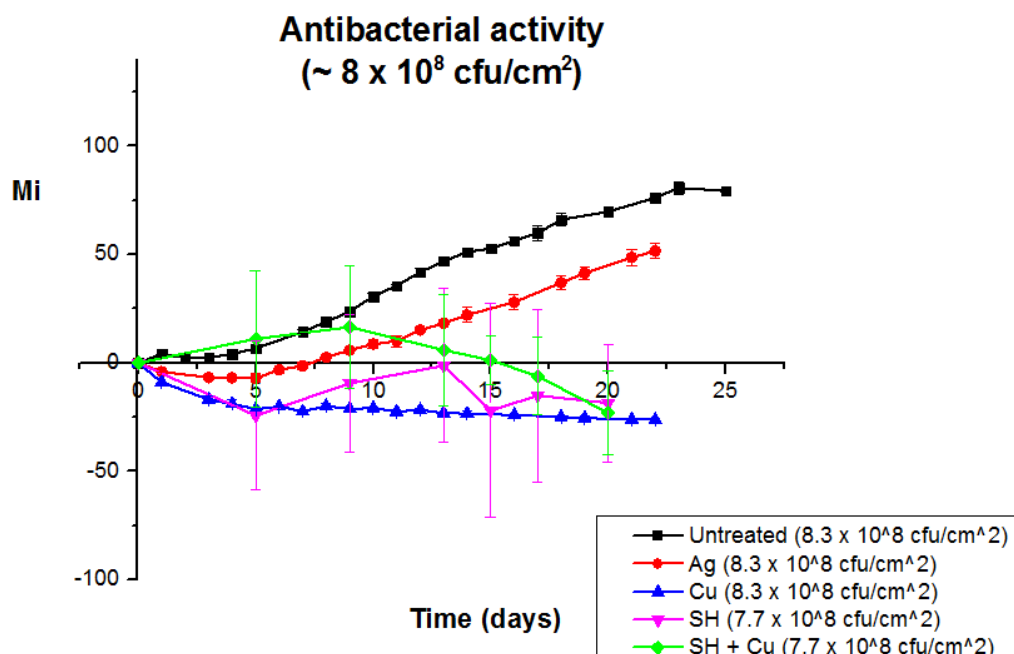
Η μέχρι τώρα μελέτη μας αφορούσε κυρίως την αντιβακτηριακή απόδοση ενός είδους επιφάνειας σε διάφορες συγκεντρώσεις *Synechococcus* sp PCC 7942. Σε αυτό το τελικό στάδιο, έχοντας αποκτήσει πλέον μια εικόνα για τη συμπεριφορά κάθε επιφάνειας ξεχωριστά και προς διάφορα εύρη συγκεντρώσεων, έρχεται ως αναγκαίο επακόλουθο η συγκριτική μελέτη της αντιβακτηριακής συμπεριφοράς όλων των επιφανειών με τις οποίες έχουμε ασχοληθεί σε αυτή την εργασία. Στη μελέτη αυτή συμπεριλαμβάνονται οι επιμεταλλωμένες επιφάνειες, με επιστρώσεις δηλαδή αργύρου και χαλκού, και οι μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδροφобες επιφάνειες, με και χωρίς επικάλυψη χαλκού, με υπόστρωμα σε κάθε περίπτωση, πολυμερικές επιφάνειες PMMA.

Προκειμένου να μπορέσει να γίνει η σύγκριση μεταξύ διαφορετικών επιφανειών, θα πρέπει να εξασφαλιστεί κοινή επιφανειακή συγκέντρωση βακτηρίων. Όπως αποδείχτηκε στην παράγραφο 5.2, για τιμές συγκεντρώσεων $C_U = 4.6 \times 10^9$ cfu/mL σε ακατέργαστες και απλά επιμεταλλωμένες με άργυρο ή χαλκό επιφάνειες, και $C_T = 0.2 \times 10^9$ cfu/mL σε κατεργασμένες υπερυδροφобες επιφάνειες με ή χωρίς επιχάλκωση, είναι δυνατή η επίτευξη κοινής επιφανειακής συγκέντρωσης περίπου ίσης με 8×10^8 cfu/cm².

Κατά την προετοιμασία των επιφανειών, η κατεργασία με πλάσμα O₂ πραγματοποιήθηκε στις συνήθεις συνθήκες και για χρόνο 10 min, η εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα C₄F₈ έγινε για χρόνο 5 s, ενώ η ιονοβολή αργύρου, καθώς και χαλκού τόσο στις ακατέργαστες πολυμερικές επιφάνειες, όσο και στις υπερυδροφобες, πραγματοποιήθηκε έως πάχους εναπόθεσης 10 nm. Οι επιφάνειες PMMA που χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τις κατεργασμένες υπερυδροφобες ήταν τα γνωστά πηγάδια όγκου $5 \times 5 \times 1.5$ mm³, ενώ αντίστοιχα για τις ακατέργαστες, επίπεδα εμβαδού 2×2 cm².

Κατά την πειραματική διαδικασία, σε όλες τις επιφάνειες τοποθετήθηκε σταγόνα όγκου 50 μL από την αντίστοιχη συγκέντρωση αναλόγως της επιφάνειας και με χρήση της

συσκευής PEA-fluorometer μετρήθηκε ο εκπεμπόμενος φθορισμός μέχρι αφίξεως στη σταθερή φάση ανάπτυξης. Το συγκεντρωτικό διάγραμμα απεικόνισης του δείκτη M_i της εξέλιξης του βακτηριακού πληθυσμού φαίνεται στην Εικόνα 5.12 που ακολουθεί.



Εικόνα 5.12: Αντιβακτηριακή δράση μεταλλικών επιφανειών, με επίστρωση αργύρου και χαλκού, και μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών, με και χωρίς επιχάλκωση για κοινή επιφανειακή συγκέντρωση *Synechococcus* sp PCC 7942 των 8×10^8 cfu/cm².

Με μια αρχική επισκόπηση της εικόνας, διακρίνουμε την υπεροχή της ακατέργαστης χάλκινης επιφάνειας ως προς την αντιβακτηριακή της δράση, με τις μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες με και χωρίς χαλκό να ακολουθούν, και τελευταία την ακατέργαστη επιφάνεια με εναποτιθέμενο άργυρο.

Δεν αποτελεί έκπληξη η απόδοση της χάλκινης επιφάνειας, δεδομένου ότι ο χαλκός ερχόμενος σε επαφή με τα βακτήρια προκαλεί την άμεση εξουδετέρωσή τους. Το γεγονός αυτό διαφαίνεται από τις αρνητικές τιμές του δείκτη M_i που κάνουν την εμφάνισή τους από την πρώτη ημέρα πειράματος και διαρκώς μειώνονται μονότονα πέφτοντας κάτω από το -26 την 22^η και τελευταία ημέρα πειράματος.

Απορία γεννάται για τη μη εμφάνιση ανάλογης συμπεριφοράς από την υπερυδρόφοβη επιφάνεια με υποκείμενο στρώμα χαλκού, παρ'όλο που αυτά συναντώνται στην ίδια

περιεκτικότητα με εκείνη πάνω στη χάλκινη. Ειδικότερα, στην υπερυδροφοβη επιφάνεια με υποκείμενο χαλκό, ο βακτηριακός πληθυσμός παρουσιάζει καθυστερημένη μείωση, αφού παρουσιάζει αρχική αύξηση μέχρι την 9^η ημέρα, σχεδόν παράλληλη με την ακατέργαστη επιφάνεια αναφοράς. Στο διάστημα αυτό, ο δείκτης M_i φθάνει το 17 την 9^η ημέρα, με την επιφάνεια αναφοράς να κυμαίνεται στο 24. Μετά την 9^η ημέρα όμως, αρχίζει να ενεργοποιείται η δράση των ατόμων χαλκού, όπου ο δείκτης αρχίζει να μειώνεται σημαντικά συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές στην επιφάνεια αναφοράς, καταλήγοντας να λαμβάνει αρνητικές τιμές, συγκρίσιμες πλέον ακόμη και με εκείνες της χάλκινης επιφάνειας. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε ότι την 20^η ημέρα η τιμή του πέφτει δραματικά στο -23, την ίδια μέρα όπου η αντίστοιχη τιμή του δείκτη στην επιφάνεια αναφοράς ανέρχεται στο 70 και στη χάλκινη βρίσκεται περίπου στο -26. Μπορούμε επομένως με σιγουριά να αποφανθούμε ότι ιδιαίτερα μετά το πέρασμα των πρώτων 9 ημερών, η υπερυδροφοβη επιφάνεια PMMA με υποκείμενο χαλκό παρουσιάζει βακτηριοκτόνο δράση. Ως προς την υστέρησή της σε σχέση με τη χάλκινη επιφάνεια, μπορεί να αποδοθεί στο χρόνο που απαιτούταν για τη διάχυση των ατόμων χαλκού μέσα από το υδροφοβο υμένιο και την ανάδειξή τους στην επιφάνεια, καθώς ως γνωστόν, προκειμένου να δράσουν είναι απαραίτητη η άμεση επαφή τους με τα βακτήρια. Εκτός αυτού όμως, μια άλλη αιτία της υστέρησης φαίνεται να είναι η μικρότερη επιφάνεια επαφής με τα βακτήρια λόγω της υπάρχουσας τραχύτητας.

Συνεχίζοντας με την υπερυδροφοβη επιφάνεια χωρίς το χαλκό, είναι αδιαμφισβήτη η εκδήλωση βακτηριοκτόνου δράσης, την οποία αν και δεν μπορούμε να αξιολογήσουμε ασφαλώς σε σχέση με την υπερυδροφοβη επιφάνεια παρουσία χαλκού, όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο 5.3.3.3, δε συμβαίνει το ίδιο με τη χάλκινη επιφάνεια. Αναλυτικότερα, οι αρνητικές τιμές του δείκτη M_i καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος επιβεβαιώνουν την ικανότητά της να σκοτώνει βακτήρια, εκκινώντας με αρνητικές τιμές το ίδιο υψηλές με εκείνες της χάλκινης επιφάνειας. Χαρακτηριστικά, την 5^η ημέρα ο δείκτης έχει ήδη μειωθεί στο -24, με τον αντίστοιχο στη χάλκινη να βρίσκεται στο -21. Πολύ γρήγορα όμως, οι τιμές στη χάλκινη επιφάνεια ξεχωρίζουν, καθώς συνεχίζουν σταθερά την πτωτική τους πορεία, καταλήγοντας προσεγγιστικά στο -26 την 20^η ημέρα, με τις αντίστοιχες στην υπερυδροφοβη επιφάνεια να μην ξεπερνούν το -19, σημειώνοντας αρκετές αυξομειώσεις στο ενδιάμεσο. Κι εδώ, η καλύτερη αντιβακτηριακή δράση της χάλκινης επιφάνειας, μπορεί να αποδοθεί στο ότι η ανεμπόδιστη επαφή των βακτηρίων με τα άτομα χαλκού, υπερνίκησε την επίδραση της

τοπογραφίας της υπερυδροφόβης επιφάνειας, αναδεικνύοντας για άλλη μια φορά τον καταστρεπτικό ρόλο των ατόμων χαλκού.

Μια πολύ σημαντική διαπίστωση, αποτελεί η καλύτερη αντιβακτηριακή απόδοση των υπερυδροφόβων επιφανειών, με και χωρίς χαλκό, συγκριτικά με τον άργυρο, ένα μέταλλο με αποδεδειγμένη και ευρέως καθιερωμένη αντιβακτηριακή δράση. Το πλεονέκτημα του χαλκού επί του αργύρου έχει ήδη αποδειχτεί πειραματικά, αλλά η βελτιωμένη αντιβακτηριακή δράση των υπερυδροφόβων επιφανειών, τόσο ως προς την ισχύ, όσο και ως προς την ανθεκτικότητά της αποτελεί ιδιαίτερα ενδιαφέρον σημείο αναφοράς.

Έτσι λοιπόν, ενώ η επιφάνεια αργύρου εμφανίζει αντιβακτηριακή δράση καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, γεγονός που μαρτυρούν οι μειωμένες τιμές της σε σχέση με την επιφάνεια αναφοράς, η ικανότητά της να σκοτώνει βακτήρια με ρυθμό μεγαλύτερο από εκείνο που πολλαπλασιάζονται, παύει κατά την πρώτη εβδομάδα πειράματος και σηματοδοτείται με την παράλληλη παύση των αρνητικών τιμών M_i . Συγκεκριμένα, ενώ αγγίζει ένα κατώτατο όριο -7 την 5^η ημέρα, σταδιακά οι τιμές της αρχίζουν να αυξάνονται προσεγγίζοντας το 50 την 20^η ημέρα. Σε αντιπαράβολή, η υπερυδροφόβη επιφάνεια, χωρίς υποκείμενο μέταλλο, την 5^η ημέρα βρίσκεται στο -24 και διατηρεί την αντιβακτηριακή της δραστηριότητα σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, παραμένοντας περίπου στο -19 την 20^η ημέρα. Επομένως, αποδεικνύεται η εντονότερη και μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας βακτηριοκτόνος δραστηριότητα της υπερυδροφόβης επιφάνειας.

Συγκρίνοντας στη συνέχεια την επαργυρωμένη επιφάνεια με την επιχαλωμένη υπερυδροφόβη, παρουσιάζεται αρχικά να έχει αποτελεσματικότερη δράση, που διατηρείται μέχρι και περίπου την 11^η ημέρα. Ενδεικτικά, αναφέρουμε ότι για τιμές δείκτη προσεγγιστικά στο 6 την 9^η ημέρα, η αντίστοιχη τιμή στην υπερυδροφόβη με το χαλκό βρίσκεται περίπου στο 17. Κατά την εξέλιξη όμως του πειράματος μετά την 11^η ημέρα, σημειώνεται ανατροπή των δεδομένων με την υπερυδροφόβη επιφάνεια με το χαλκό, να εξουδετερώνει με γρήγορους ρυθμούς τα βακτήρια, την ίδια στιγμή που στην επιφάνεια αργύρου τα βακτήρια αποκαθιστούν το ρυθμό ανάπτυξης τους. Έτσι, τα άτομα χαλκού στην υπερυδροφόβη επιφάνεια, καταλήγουν να σκοτώνουν περισσότερα βακτήρια απ' όσα ο άργυρος, με αποτέλεσμα, ο πληθυσμός των βακτηρίων σε αυτή να είναι σημαντικά μειωμένος σε σχέση με τον εναπομείναντα στην επιφάνεια αργύρου.

Το γεγονός αυτό φαίνεται και από τις τιμές τους, όπου στο τέλος του πειράματος την 20^η ημέρα, στις υπερυδροφώβες με το χαλκό βρίσκεται στο -23, ενώ στην επιφάνεια αργύρου έχει φθάσει περίπου στο 50. Μπορούμε να αποφανθούμε επομένως, ότι αν και περισσότερο καθυστερημένη η δράση της κατεργασμένης επιφάνειας, σίγουρα αποδίδει καλύτερα αποτελέσματα και με μεγαλύτερη διάρκεια στο χρόνο.

6. Συμπεράσματα και Προτάσεις

Στο 4^ο κεφάλαιο, αποδείχθηκε η απωθητική συμπεριφορά των μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδροφобων πολυμερικών επιφανειών PMMA σε υψηλές βακτηριακές συγκεντρώσεις που φθάνουν τα 10^9 cfu/mL, δηλαδή προσεγγιστικά 1-4 (συνηθέστερα 2) τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη συγκέντρωση απ'ό,τι στην υπάρχουσα βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, παρουσίασαν έως και 90% μείωση στο φθορισμό, ενώ αναδείχθηκε η καλύτερη απωθητική συμπεριφορά της επικάλυψης Teflon σε σχέση με PFOTS, που απέδωσε 0.6% μέγιστη βακτηριακή κάλυψη, τουλάχιστον δηλαδή κατά 3 τάξεις μεγέθους μειωμένη συγκριτικά με τις ακατέργαστες πολυμερικές επιφάνειες.

Στο 5^ο κεφάλαιο, επιχειρήθηκε επέκταση των δυνατοτήτων των κατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών από την αναστολή της βακτηριακής προσκόλλησης, στην εξουδετέρωση του πιθανά εναπομείναντος βακτηριακού πληθυσμού, με την εναπόθεση μετάλλου. Προς εύρεση του αποτελεσματικότερου μεταλλικού φορέα, προηγήθηκε σειρά πειραμάτων, που ανέδειξε τη βακτηριοκτόνο δράση του χαλκού σε σχέση με τον άργυρο, τόσο ως προς την ένταση, όσο και ως προς την ανθεκτικότητά του σε συγκεντρώσεις που αγγίζουν τα 10^9 cfu/mL.

Ακολούθως, αποδείχθηκε η ικανότητα των μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδροφобων επιφανειών να σκοτώνουν βακτήρια σε συγκεντρώσεις μικρότερες είτε ίσες των 0.2×10^9 cfu/mL $\approx 10^8$ cfu/mL, δηλαδή 1-2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από τη σύγχρονη βιβλιογραφία. Με την εναπόθεση χαλκού, επιτεύχθηκε επέκταση του βακτηριοκτόνου χαρακτήρα των υπερυδροφобων επιφανειών σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες των 4.6×10^9 cfu/mL $\approx 10^9$ cfu/mL, προσεγγιστικά δηλαδή και πάλι 1-2 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες από ό,τι στις υπάρχουσες επιφάνειες με συνδυαστική μη προσκολλητική και βακτηριοκτόνο δράση.

Κατασκευάστηκε με αυτό τον τρόπο, μια αντιβακτηριακή επιφάνεια με ολοκληρωμένη αντιβακτηριακή δράση σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10^9 cfu/mL, που εκτός του ότι εμποδίζει την προσκόλληση των βακτηρίων, ακόμη και σε περιπτώσεις που, όπως είδαμε, εξαναγκάζοταν η παραμονή τους σε αυτές, δύναται να εξοντώσει υψηλές συγκεντρώσεις βακτηρίων, με απόδοση καλύτερη από εκείνη του αργύρου, λόγω ενεργοποίησης του χαλκού.

Αξίζει να σημειωθεί εδώ, ότι τα εξαγόμενα αποτελέσματα και συμπεράσματα, λόγω της καθολικότητας της μεθόδου προσδιορισμού της βακτηριακής ανάπτυξης με τη μέτρηση του φθορισμού της χλωροφύλλης *a* των κυανοβακτηρίων, που παρουσιάζει ανεξαρτησία από το είδος των βακτηρίων και την ικανότητά τους να φωτοσυνθέτουν, επεκτείνονται σε όλα τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια.

Δεδομένης της καινοτόμου φύσης των επιφανειών, απαιτείται μια σειρά πειραμάτων για τον πλήρη προσδιορισμό της δράσης τους. Αρχικά, συστήνεται η δοκιμασία ενδιάμεσων συγκεντρώσεων μεγαλύτερων από 0.2×10^9 cfu/mL και μικρότερων από 2.3×10^9 cfu/mL, κυρίως για να προσδιοριστεί το εύρος των συγκεντρώσεων στο οποίο παρουσιάζουν αποτελεσματική βακτηριοκτόνο δράση οι υπερυδροφобες επιφάνειες με και χωρίς τη μερική επιμετάλλωση. Χρειάζεται δηλαδή να εντοπιστεί η οριακή τιμή βακτηριακής συγκέντρωσης, πάνω από την οποία, η υπερυδροφобη επιφάνεια θα χάνει τη δραστηριότητά της. Συνάμα, οι ενδιάμεσες συγκεντρώσεις που θα δοκιμαστούν τόσο στις ακατέργαστες επιφάνειες αναφοράς, όσο και σε επιμεταλλωμένες, με άργυρο και χαλκό, προς μια ολοκληρωμένη συγκριτική μελέτη των επιφανειών στο αντίστοιχο εύρος τιμών συγκέντρωσης. Συστήνεται η χρήση φρεατίων προς καλύτερο έλεγχο του εναποτιθέμενου όγκου καλλιέργειας κυανοβακτηρίων, ειδικότερα λόγω της κύλισης της σταγόνας στις υπερυδροφобες επιφάνειες.

Επιπρόσθετα, είναι σημαντική η δοκιμή χρόνων εναπόθεσης υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα C_4F_8 μεγαλύτερων των 5 s, ώστε να διερευνηθεί η αντιβακτηριακή δράση της επιχάλκωμης υπερυδροφобης επιφάνειας συγκριτικά και με την υπερυδροφобη απουσία χαλκού. Λόγω του ότι στα 5 s, το εναποτιθέμενο υμένιο ενδεχομένως να μην έχει προλάβει να καλύψει ομοιόμορφα σε ικανοποιητικό βαθμό την τραχεία επιφάνεια με το χαλκό, προτείνεται η δοκιμασία χρόνων 7 s και η επανάληψη των χρόνων 5 και 10 s, με ταυτόχρονη μέτρηση της γωνίας επαφής σε διαφορετικά σημεία των επιφανειών προς επιβεβαίωση υπερυδροφобικότητας, με μικρή γωνία υστέρησης.

Ακόμη, θα μπορούσε να γίνει ακριβής προσδιορισμός της διαμέτρου της πραγματικής επιφάνειας επαφής (*contact line*) της σταγόνας πάνω στις επιμεταλλωμένες ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, καθώς και στις επιχάλκωμης υπερυδροφобες, χωρίς να θεωρείται αυτονόητη η εξίσωσή τους με τις ακατέργαστες PMMA και με τις υπερυδροφобες απουσία χαλκού, αντίστοιχα. Με αυτό τον τρόπο, μέσω

προσδιορισμού των αντίστοιχων επιφανειακών συγκεντρώσεων για κάθε επιφάνεια, θα μπορούσε να γίνει μια πιο ορθή σύγκριση με τις υπόλοιπες επιφάνειες.

Τέλος, μια καθαρά διαδικαστική πρόταση που αφορά στις συνθήκες πειράματος, είναι η εξασφάλιση υγρασίας κατά την επώαση των κυανοβακτηρίων στις επιφάνειες. Με αυτό τον τρόπο, θα επιταχυνόταν ο κύκλος ζωής τους και θα ήταν δυνατή η λήψη αποτελεσμάτων σε σημαντικά μικρότερο χρόνο.

Ως μελλοντική πρόταση, συστήνεται αρχικά η εφαρμογή ιονβολής του αντιβακτηριακού μετάλλου, όπως για παράδειγμα χαλκού ή αργύρου, ταυτόχρονα με την κατεργασία πλάσμα (π.χ. O_2 ή Ar) (*co-sputtering*), με την τοποθέτηση του ανάλογου στόχου εντός του αντιδραστήρα. Με αυτό τον τρόπο, επιτυγχάνεται δημιουργία τοπογραφίας από το ίδιο το μέταλλο εξασφαλίζοντας ενισχυμένη συνδυαστική μη προσκολλητική και βακτηριοκτόνο δράση της επιφάνειας. Ενδιαφέρουσα θα ήταν επίσης, η επέκταση της αντιβακτηριακής μελέτης στα θετικά κατά Gram βακτήρια. Σε μεταγενέστερο στάδιο, θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί μετάβαση από τα πλαστικά στα μεταλλικά υποστρώματα, όπως είναι για παράδειγμα το αλουμίνιο, για την εξασφάλιση μεγαλύτερης ανθεκτικότητας της προκαλούμενης τοπογραφίας και τραχύτητας με την τεχνολογία πλάσματος.

7. Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Πέντε στάδια σχηματισμού βιοφίλμ βακτηρίων: (1) Αρχική προσκόλληση, (2) Μη αναστρέψιμη προσκόλληση, (3) Ωρίμανση I, (4) Ωρίμανση II, και (5) Διασπορά.....2

Εικόνα 1.2: Βασικοί μηχανισμοί μη προσκολλητικής προς τα βακτήρια δράσης επιφανειών [17].....7

Εικόνα 1.3: a) Ποσοστιαία επιφανειακή κάλυψη και b) βιωσιμότητα *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 σε ακατέργαστα (Δ - Silicone rubber) και επικαλυμένα με το συμπολυμερές οξειδίου πολυαιθυλενίου-οξειδίου πολυπροπυλενίου-οξειδίου πολυαιθυλενίου (PEO₉₉-PPO₆₅-PEO₉₉) (■ - Brush) φύλλα σιλικόνης, έως και 20 ώρες ανάπτυξής τους, όπως μελετήθηκε από τους Nejadnik et al.9

Εικόνα 1.4: Βασικοί μηχανισμοί δράσης των επιφανειών για την εξουδετέρωση των βακτηρίων [17].12

Εικόνα 1.5: Απεικόνιση βακτηριακού πληθυσμού *S. aureus* ATCC 25923 με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ πάνω σε a) 317L SS και b) 317L-Cu SS μετά από 5 ημέρες.18

Εικόνα 1.6: Εικόνες SEM της τοπογραφίας της επιφάνειας του “μαύρου πυριτίου” σε x 35 000 μεγέθυνση. Μικρογράφημα υπό γωνία 53° ενδεικτικό της παρουσίας αιχμηρών νανοκολώνων. Κλίμακα 200 nm.22

Εικόνα 1.7: Βακτηριοκτόνος δράση “μαύρου πυριτίου”. Μέτρηση ζωντανών βακτηριακών αποικιών για (a) *P. aeruginosa* και (b) *S. aureus* για μέχρι και 30 ώρες επώαση.....23

Εικόνα 1.8: a) Σχηματική απεικόνιση γωνίας υστέρησης νερού κατά τη διαβροχή υπερυδρόφοβης επιφάνειας, b) Μοντέλο Cassie-Baxter, όπου εκτός της μεγάλης γωνίας επαφής θ_{CB} , η μικρή γωνία υστέρησης εξασφαλίζει κύλιση της σταγόνας στην επιφάνεια [158].....26

Εικόνα 1.9: Φύλλο λωτού. (a) Μηδενική μεγέθυνση [112], (b) Εικόνες SEM για τρεις διαφορετικές μεγεθύνσεις, που απεικονίζουν τη μικρο και νανοδόμηση ιεραρχικής κλίμακας [113].....27

Εικόνα 1.10: Εικόνες SEM του *S. aureus* μετά από 4 ώρες σε (a) υδόφιλες (54°) και (b) υπερυδρόφοβες (156°) επιφάνειες από τους Tang et al.29

Εικόνα 1.11: (a) Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου που ακολουθήθηκε από τους Freschauf et al., (b) Top-down AFM 3D εικόνα της μορφολογίας και του προφίλ ύψους των κατεργασμένου πολυστυρενίου (PS), (c) Εικόνα SEM της αποτυπωμένης τοπογραφίας από το πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS). Η κλίμακα για τη μεγάλη εικόνα είναι 10 μm , ενώ για την υπό μεγέθυνση 2 μm31

Εικόνα 1.12: (A) Εικόνα SEM προσκόλλησης *E. coli* σε επιφάνεια “μαύρου πυριτίου”, (B) Εικόνες από ανεστραμμένο μικροσκόπιο φθορισμού, όπου με πράσινο απεικονίζονται τα ζωντανά και με κόκκινο τα νεκρά κύτταρα *E. coli*.33

Εικόνα 1.13: (a) Εικόνα FE-SEM (Field Emission Scanning Electron Microscope) των ραβδόμορφων AgSF συμπλόκων, (b) Έλεγχος βιωσιμότητας *P. aeruginosa* PAO1 στις 9 ώρες μέσω μέτρησης εκπεμπόμενου φθορισμού με χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ. Με πράσινο απεικονίζονται τα ζωντανά και με κόκκινο τα νεκρά βακτηριακά κύτταρα.34

Εικόνα 1.14: Σχηματική απεικόνιση δόμησης της υπερυδρόφοβης επιφάνειας, όπως την κατασκεύασαν οι Heinson et al.[125], σύμφωνα με τους Zhang et al. ([125], [126]). Το φιλμ επταδεκαφθορο-1,1,2,2-τετραϋδροξυδεκύ τριμεθοξυσιλάνιου FAS συνδέεται μέσω ομοιοπολικού δεσμού με το οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3 , αλουμίνα).35

Εικόνα 1.15: (a-b) Βακτηριακή προσκόλληση *E. coli* 25922. (a) Σταγόνα βακτηρίου πάνω σε ακατέργαστο φύλλο ανοξειδωτού ατσαλιού και (b) Πλήρης αφαίρεση της σταγόνας μετά από μονώρη επώαση σε υπερυδρόφοβα Ag-MgO επικαλυμένα φύλλα ατσαλιού. (c-d) Εικόνες SEM *E. coli* 25922. (c) Πλήθος βακτηρίων σε ακατέργαστο φύλλο ανοξειδωτού ατσαλιού, (d) Απουσία βακτηρίων σε υπερυδρόφοβο Ag-MgO επικαλυμένο φύλλο ατσαλιού. Τα βακτήρια επισημαίνονται με κόκκινα βέλη.36

Εικόνα 1.16: (A-B) Εικόνες SEM (A) ακατέργαστου φθοριούχου πολυβινυλιδένιου (PVDF), όπου διακρίνεται κύτταρο *S. aureus*, (B) νανοσύνθετου πολυ(βινυλιδενοφθορίδιο-συν-εξαφθοροπροπυλένιου) (PVDF-HFP) με νανοσωματίδια ZnO , όπου φαίνεται μηδενική προσκόλληση *S. aureus*. (C) Λογαριθμικό διάγραμμα ζωντανών κυττάρων *S. aureus* συναρτήσει του χρόνου □ Επιφάνεια αναφοράς – *S. aureus*, ✕ PVDF, ▲ PVDF-HFP, ▽ PVDF/ ZnO , ◆ PVDF-HFP/ ZnO38

Εικόνα 2.1: Σχηματική απεικόνιση της μορφολογίας και της εσωτερικής οργάνωσης ενός κυανοβακτηρίου [146].47

Εικόνα 3.1: Εικόνες SEM κυανοβακτηρίου *Synechococcus* sp PCC 7942 για διαφορετικές μεγεθύνσεις (από αριστερά: x6 500 και x20 000), από όπου φαίνεται ότι το μήκος του είναι περίπου 3.25 μm , και το πάχος του 0.75 μm54

Εικόνα 3.2: Ο αντιδραστήρας πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP του εργαστηρίου MET της Alcatel και επάνω αριστερά, ο κυρίως θάλαμός του σε μεγέθυνση.	58
Εικόνα 3.3: Σχηματική αναπαράσταση του εσωτερικού του κυρίως θαλάμου ενός αντιδραστήρα ICP.....	61
Εικόνα 3.4: Διεργασία ιονβολής (sputtering), προς εναπόθεση λεπτού υμενίου υλικού-στόχου πάνω σε υπόστρωμα εντός θαλάμου κενού με χρήση πλάσματος από ευγενές αέριο Ar.	63
Εικόνα 3.5: Σύστημα Cooke CVE 401 για εναπόθεση λεπτών μεταλλικών υμενίων με χρήση ιονβολής (sputtering).	64
Εικόνα 3.6: Το μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (SEM) JEOL JSM-7401F FEG του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης του ΕΚΕΦΕ “Δημόκριτος”.....	67
Εικόνα 3.7: Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής GBX Digidrop Contact Angle Measurement του εργαστηρίου πλάσματος του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης.	69
Εικόνα 3.8: Μικροσκόπιο φθορισμού Axioskop 2 plus της Carl Zeiss, που χρησιμοποιήθηκε για την απεικόνιση και καταμέτρηση του φθορισμού της Chl a των κυανοβακτηρίων.	71
Εικόνα 3.9: Σχηματική αναπαράσταση λειτουργίας φασματοφωτόμετρου ορατού-υπεριώδους.....	74
Εικόνα 3.10: Το φασματοφωτόμετρο Jasco UVIDEC-610 που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις συγκέντρωσης Chl a των κυανοβακτηρίων.....	75
Εικόνα 3.11: Συσκευή PEA (PEA, Hansatech Instruments Ltd, Norfolk, UK) μέτρησης φθορισμού Chl a κυανοβακτηρίων, συνοδευόμενη από τους κατάλληλους συνδετήρες με τα κλείστρα για εξασφάλιση συνθηκών σκότους.	76
Εικόνα 3.12: Θάλαμος εναπόθεσης φθοριωμένου μονοστρώματος από διάλυμα 1H,1H,2H,2-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS gas).....	77
Εικόνα 3.13: α) Θερμοπρέσσα της εταιρείας Carver, β) Θάλαμος επώασης LabTech, Daihan LabTech Co., LTD.	78
Εικόνα 3.14: Χώρος εργασίας, όπου εξασφαλίζονται συνθήκες στειρότητας	79

- Εικόνα 3.15:** Σφραγίδα που χρησιμοποιήθηκε για την εντύπωση α) παραλληλόγραμμου πηγαδιού στο πείραμα μελέτης προσκόλλησης και β) τετράγωνου πηγαδιού στο πείραμα μελέτης εξέλιξης κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 πάνω σε πολυμερικά υποστρώματα PMMA..... 81
- Εικόνα 3.16:** Σχηματική απεικόνιση των σταδίων αποτύπωσης πηγαδιών διαστάσεων (5 x 5 x 1.5) mm³ σε πολυμερικά πλακίδια PMMA με εφαρμογή εν θερμώ σφράγισης (hot embossing)..... 81
- Εικόνα 3.17:** Φωτογραφίες μικροσκοπίου SEM υπό κλίση 60° τυχαίας τοπογραφίας επιφανειών PMMA μετά από κατεργασία πλάσμα O₂ για χρόνο 10 min σε συνθήκες ισχύος γεννήτριας 1900 W, ροής O₂ 100 sccm, πίεσης 0.75 Pa, θερμοκρασίας 15 °C και ισχύος ηλεκτροδίου 250 W στον αντιδραστήρα ICP, σε μεγέθυνση α) x 2 500, β) x 5 000 και γ) x 10 000. 83
- Εικόνα 3.18:** Εναπόθεση υδρόφοβου φθορανθρακικού υμενίου από πλάσμα αερίου C₄F₈ στον αντιδραστήρα ICP..... 85
- Εικόνα 3.19:** Σχηματική απόδοση των σταδίων παρασκευής επιχάλκωμένης μικρο-νανοϋφασμένης με πλάσμα O₂ υπερυδρόφοβης επιφάνειας PMMA με εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα C₄F₈. 86
- Εικόνα 3.20:** Καμπύλη αντιστοίχισης συγκέντρωσης Chl a (μg/mL) σε συγκέντρωση κυττάρων (cfu/mL). 89
- Εικόνα 4.1:** Μέσος φθορισμός ακατέργαστης, υπερυδρόφοβων (επικαλυμένων με PFOTS και Teflon) επιφανειών PMMA, καθώς και των ανασταλτικών προσκόλλησης βακτηρίων Thermo Scientific Nunc HydroCell επιφανειών μετά από 24, 48 και 72 ώρες και μετά από ξέπλυμα την τελευταία μέρα. 103
- Εικόνα 4.2:** Φωτογραφίες από ακατέργαστες, υπερυδρόφοβες (με εναπόθεση Teflon) PMMA και εμπορικές επιφάνειες την τελευταία ημέρα του πειράματος (72 ώρες): α) πριν και β) μετά το ξέπλυμα. 104
- Εικόνα 4.3:** % Βακτηριακή κάλυψη σε ακατέργαστη, υπερυδρόφοβες επιφάνειες PMMA και εμπορική ανασταλτική κυτταρικής προσκόλλησης μετά από 24, 48 και 72 ώρες και ξέπλυμα στο τέλος του πειράματος. 104
- Εικόνα 5.1:** Συγκεντρώσεις των 2.3, 4.6 και 9.2 x 10⁹ cfu/mL *Synechococcus* sp PCC 7942 σε ακατέργαστες επιφάνειες PMMA. 111
- Εικόνα 5.2:** Συγκεντρώσεις των 4.6 και 9.2 x 10⁹ cfu/mL κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 σε εμπορικές υδρόφιλες επιφάνειες Cell Bind (Corning) και Cell Culture (Nunc). 113

- Εικόνα 5.3:** Μακροσκοπική απεικόνιση του μεγαλύτερου βαθμού διασποράς της σταγόνας 50 μL καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942 πάνω σε (A) ακατέργαστες επιφάνειες PMMA, συγκριτικά με (B) μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες επιφάνειες PMMA. 116
- Εικόνα 5.4:** Εικόνες από (A) ακατέργαστες και (B) μικρο-νανοϋφασμένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες PMMA, πριν και μετά το στέγνωμα σταγόνας 50 μL καλλιέργειας *Synechococcus* sp PCC 7942, όπου φαίνεται η αισθητή μείωση της διαμέτρου του ίχνους της (*projection line*) στις υπερυδρόφοβες. 118
- Εικόνα 5.5:** Απόκριση κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 συγκεντρώσεων 7.7, 77 και 155×10^8 cfu/cm² πάνω σε μικρο-νανοϋφασμένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες..... 123
- Εικόνα 5.6:** Συγκεντρώσεις των $4.1, 8.3$ και 16.4×10^9 cfu/cm² *Synechococcus* sp PCC 7942 σε επιφάνειες αργύρου (Ag). 129
- Εικόνα 5.7:** Συγκεντρώσεις των $4.1, 8.3$ και 16.4×10^9 cfu/cm² *Synechococcus* sp PCC 7942 σε επιφάνειες χαλκού (Cu)..... 129
- Εικόνα 5.8:** Συγκριτική παρουσίαση αντιβακτηριακής δράσης μεταλλικών επιφανειών αργύρου (Ag) και χαλκού (Cu) για διάφορες συγκεντρώσεις κυανοβακτηρίων *Synechococcus* sp PCC 7942 ($4.1, 8.3$ και 16.4×10^9 cfu/cm²)...... 132
- Εικόνα 5.9:** Αντιβακτηριακή δράση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών για διάφορους χρόνους εναπόθεσης λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈ (5, 10, 20 & 30 s) και μετά την εναπόθεση χαλκού πάχους 10 nm..... 138
- Εικόνα 5.10:** Αντιβακτηριακή δράση υδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών επικαλυμμένων με λεπτό υμένιο φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈ για διάφορους χρόνους εναπόθεσης (5, 10, 20 & 30 s), μετά την εναπόθεση χαλκού πάχους 10 nm. 140
- Εικόνα 5.11:** Αντιβακτηριακή δράση μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα επιφανειών PMMA με και χωρίς επιχάλκωση σε χαμηλές (7.7×10^8 cfu/cm²) και υψηλές συγκεντρώσεις (155×10^8 cfu/cm²) *Synechococcus* sp PCC 7942..... 143
- Εικόνα 5.12:** Αντιβακτηριακή δράση μεταλλικών επιφανειών, με επίστρωση αργύρου και χαλκού, και μικρο-νανοϋφασμένων με πλάσμα υπερυδρόφοβων πολυμερικών επιφανειών, με και χωρίς επιχάλκωση για κοινή επιφανειακή συγκέντρωση *Synechococcus* sp PCC 7942 των 8×10^8 cfu/cm². 146

8. Κατάλογος Πινάκων

- Πίνακας 3-1:** Χαρακτηριστικά μεγέθη και περιοχές λειτουργίας του αντιδραστήρα πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP59
- Πίνακας 3-2:** Χαρακτηριστικά λειτουργίας του συστήματος μέτρησης γωνίας επαφής GBX Digidrop Contact Angle Measurement..... 68
- Πίνακας 3-3:** Εναπόθεση λεπτού υμενίου φθοράνθρακα από πλάσμα αερίου C₄F₈ στον αντιδραστήρα ICP..... 84
- Πίνακας 3-4:** Αντιστοίχιση συγκέντρωσης Chl a (μg/mL) σε συγκέντρωση κυττάρων (cfu/mL). 88
- Πίνακας 4-1:** Ακατέργαστες, Εμπορικές και Υπερυδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA στο τέλος της 1^{ης} ημέρας. *Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.* 94
- Πίνακας 4-2:** Ακατέργαστες, Εμπορικές και Υπερυδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA στο τέλος της 2^{ης} ημέρας. *Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.* 96
- Πίνακας 4-3:** Εμπορικές και Υπερυδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA στο τέλος της 3^{ης} ημέρας. *Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.* 98
- Πίνακας 4-4:** Ακατέργαστες, Εμπορικές και Υπερυδρόφοβες (PFOTS & Teflon επικαλυμένες) επιφάνειες PMMA μετά το ξέπλυμα της τελευταίας ημέρας. *Σημείωση: Η κλίμακα των εικόνων της πρώτης γραμμής συμπίπτει με των υπολοίπων της ίδιας στήλης.*..... 100
- Πίνακας 5-1:** Αντιστοίχιση συγκεντρώσεων Chl a σε βακτηριακή συγκέντρωση με και χωρίς στρογγυλοποίηση..... 110
- Πίνακας 5-2:** Αντιστοίχιση συγκέντρωσης χλωροφύλλης a ([Chl a]) και βακτηριακής συγκέντρωσης (cfu/mL) σε επιφανειακή συγκέντρωση (cfu/cm²) για ακατέργαστες και κατεργασμένες επιφάνειες. 120
- Πίνακας 5-3:** Μέτρηση γωνίας επαφής σε μικρο-νανοδομημένες με πλάσμα υπερυδρόφοβες πολυμερικές επιφάνειες PMMA με υδρόφοβη επίστρωση 1H,1H,2H,2H-υπερφθοροοκτυλοτριχλωροσιλανίου (PFOTS) ή φθοράνθρακα C₄F₈ (Teflon) για διάφορα υποκείμενα πάχη εναπόθεσης χαλκού (Cu). 136

9. Βιβλιογραφία

- [1] D. Rana and T. Matsuura, “Surface modifications for antifouling membranes,” *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 4, pp. 2448–2471, 2010.
- [2] V. C. S. Chandrasekaran, S. G. Advani, and M. H. Santare, “Role of processing on interlaminar shear strength enhancement of epoxy/glass fiber/multi-walled carbon nanotube hybrid composites,” *Carbon N. Y.*, vol. 48, no. 13, pp. 3692–3699, 2010.
- [3] L. Han *et al.*, “A direct route toward assembly of nanoparticle-carbon nanotube composite materials,” *Langmuir*, vol. 20, no. 14, pp. 6019–6025, 2004.
- [4] G. D. Liang, S. P. Bao, and S. C. Tjong, “Microstructure and properties of polypropylene composites filled with silver and carbon nanotube nanoparticles prepared by melt-compounding,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 142, no. 2–3, pp. 55–61, 2007.
- [5] P. C. Ma, B. Z. Tang, and J. K. Kim, “Effect of CNT decoration with silver nanoparticles on electrical conductivity of CNT-polymer composites,” *Carbon N. Y.*, vol. 46, no. 11, pp. 1497–1505, 2008.
- [6] C. M. Bhadra *et al.*, “Antibacterial titanium nano-patterned arrays inspired by dragonfly wings,” *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 16817, 2015.
- [7] G. Donelli *et al.*, *Biofilm-based Healthcare-associated Infections*, vol. 830, no. Chapter 9. 2015.
- [8] A. I. Hochbaum and J. Aizenberg, “Bacteria pattern spontaneously on periodic nanostructure arrays,” *Nano Lett.*, vol. 10, no. 9, pp. 3717–3721, 2010.
- [9] WHO and Unicef, *Drinking Water*. 2012.
- [10] J. Hasan, R. J. Crawford, and E. P. Ivanova, “Antibacterial surfaces: The quest for a new generation of biomaterials,” *Trends Biotechnol.*, vol. 31, no. 5, pp. 295–304, 2013.
- [11] Q. Yu, Z. Wu, and H. Chen, “Dual-function antibacterial surfaces for biomedical applications,” *Acta Biomater.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–13, 2015.
- [12] J. Hasan, S. Raj, L. Yadav, and K. Chatterjee, “Engineering a nanostructured ‘super surface’ with superhydrophobic and superkilling properties,” *RSC Adv.*, vol. 5, pp. 44953–44959, 2015.
- [13] I. Armentano *et al.*, “The interaction of bacteria with engineered nanostructured polymeric materials: A review,” *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014.
- [14] M. Bulwan, K. Wójcik, S. Zapotoczny, and M. Nowakowska, “Chitosan-Based Ultrathin Films as Antifouling, Anticoagulant and Antibacterial Protective Coatings,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 23, no. 15, pp. 1963–1980, 2011.

- [15] D. Leckband, S. Sheth, and a Halperin, "Grafted poly(ethylene oxide) brushes as nonfouling surface coatings.," *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 10, no. 10, pp. 1125–1147, 1999.
- [16] V. Gadenne, L. Lebrun, T. Jouenne, and P. Thebault, "Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 112, pp. 229–236, 2013.
- [17] F. Siedenbiedel and J. C. Tiller, "Antimicrobial polymers in solution and on surfaces: Overview and functional principles," *Polymers (Basel)*, vol. 4, no. 1, pp. 46–71, 2012.
- [18] Harris M. J. and Zalipsky J. M., "ACS Symposium Series," ACS, vol. 680, 1997.
- [19] H. J. A. and Huang N.-P., Michel R., Voros J., Textor M., Hofer R., Rossi A., Elbert D. and N. D. Spencer, "No Title," *Langmuir*, vol. 489, no. 17, 2001.
- [20] K. Holmberg, K. Bergström, C. Brink, E. Österberg, F. Tiberg, and J. M. Harris, "Effects on protein adsorption, bacterial adhesion and contact angle of grafting PEG chains to polystyrene," *J. Adhes. Sci. Technol.*, vol. 7, no. 6, pp. 503–517, 1993.
- [21] C. K. S. Park K. D., Kim Y. S., Han D. K., Kim Y. H. , Lee E. H. B., Suh H., "No Title," *Biomaterials*, vol. 851, no. 19, 1998.
- [22] N. W. Roosjen A., Van Der Mei H. C., Busscher H. J., "No Title," *Langmuir*, vol. 10949, no. 20, 2004.
- [23] M. R. Nejadnik, H. C. van der Mei, W. Norde, and H. J. Busscher, "Bacterial adhesion and growth on a polymer brush-coating," *Biomaterials*, vol. 29, no. 30, pp. 4117–4121, 2008.
- [24] L. G. Harris, S. Tosatti, M. Wieland, M. Textor, and R. G. Richards, "Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted- poly(ethylene glycol) copolymers," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4135–4148, 2004.
- [25] M. L. Arciola C. R., Alvi F. I., An Y. H., Campoccia D., "No Title," *Int. J. Artif. Organs*, vol. 1119, no. 28, 2005.
- [26] F. R. J. An Y. H., Stuart G. W., McDowell S. J., McDaniel S. E., Kang Q., "No Title," *J. Orthop. Res.*, vol. 846, no. 14, 1996.
- [27] M. M., "No Title," *Biomacromolecules*, vol. 1205, no. 6, 2005.
- [28] R. A. Cao X., Pettit M. E., Conlan S. L., Wagner W., Ho A. D., Clare A. S., Callow J. A., Callow M. E., Grunze M., "No Title," *Biomacromolecules*, vol. 907, no. 10, 2009.
- [29] M. L. A. Li J., "No Title," *Int.J.FoodMicrobiol.*, vol. 185, no. 53, 1999.
- [30] D. G., "No Title," *Science (80-)*, vol. 1232, no. 277, 1997.
- [31] D. G. and M. H. Lvov Y., "No Title," *Langmuir*, vol. 481, no. 9, 1993.
- [32] N. T. Lichter J. A. , Thompson M. T. , Delgadillo M. and V. V. K. J. Rubner

- M. F., “No Title,” *Biomacromolecules*, vol. 1571, no. 9, 2008.
- [33] T.-F. Mah, B. Pitts, B. Pellock, G. C. Walker, P. S. Stewart, and G. a O. Toole, “A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance,” *Lett. to Nat.*, vol. 426, no. November, pp. 1–5, 2003.
- [34] D. Davies, “Understanding biofilm resistance to antibacterial agents.,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 2, pp. 114–22, 2003.
- [35] E. Klein, D. L. Smith, and R. Laxminarayan, “Hospitalizations and deaths caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 12, pp. 1840–1846, 2007.
- [36] G. J. Gabriel, A. Som, A. E. Madkour, T. Eren, and G. N. Tew, “Infectious disease: Connecting innate immunity to biocidal polymers,” *Materials Science and Engineering R: Reports*, vol. 57, no. 1–6. pp. 28–64, 2007.
- [37] A. K. S. Lawson M. C., Shoemaker R., Hoth K. B., Bowman C. N., “No Title,” *Biomacromolecules*, vol. 2221, no. 10, 2009.
- [38] A. K. S. Lawson M. C., Bowman C. N., “No Title,” *Clin. Orthop. Relat. Res.*, no. 96, 2007.
- [39] G. K. Wach J. Y., Bonazzi S., “No Title,” *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 7123, no. 47, 2008.
- [40] S. B. Zumtobel M., Assadian O., Leonhard M., Stadler M., “No Title,” *BMC Microbiol.*, no. 9, 2009.
- [41] K. K. D. Matl F. D., Zlotnyk J., Obermeier A. , Friess W., Vogt S., Buchner H., Schnabelrauch H., Stemberger A., “No Title,” *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, vol. 1439, no. 20, 2009.
- [42] L. P. Stigter M., de Groot K., “No Title,” *Biomaterials*, vol. 4143, no. 23, 2002.
- [43] L. P. Stigter M., Bezemer J., de Groot K., “No Title,” *J. Control. Release*, vol. 127, no. 99, 2004.
- [44] K. H. E. Kim H. W., Knowles J. C., “No Title,” *Biomaterials*, vol. 1279, no. 25, 2004.
- [45] H. P. T. Chuang H. F., Smith R. C., “No Title,” *Biomacromolecules*, vol. 1660, no. 9, 2008.
- [46] M. Otto, “Staphylococcal biofilms,” *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol. 322. pp. 207–228, 2008.
- [47] Y. Ma, M. Chen, J. E. Jones, A. C. Ritts, Q. Yu, and H. Sun, “Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by trimethylsilane plasma coating,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 11, pp. 5923–5937, 2012.
- [48] D. E. Fullenkamp *et al.*, “Mussel-inspired silver-releasing antibacterial hydrogels,” *Biomaterials*, vol. 33, no. 15, pp. 3783–3791, 2012.
- [49] P. J. Kelly, H. Li, K. A. Whitehead, J. Verran, R. D. Arnell, and I. Iordanova, “A study of the antimicrobial and tribological properties of TiN/Ag nanocomposite coatings,” *Surf. Coatings Technol.*, vol. 204, no. 6–7, pp. 1137–

- 1140, 2009.
- [50] M. L. A., “No Title,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. S243, no. 163, 2006.
- [51] C. R. Gao Y., “No Title,” *Text. Res. J.*, vol. 60, no. 78, 2008.
- [52] B. D. B. Monteiro D. R., Gorup L. F., Takamiya A. S., Ruvollo A. C., de Camargo E. R., “No Title,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 103, no. 34, 2009.
- [53] M. J. Wu Z. P., Xu Q. F., Wang J. N., “No Title,” *J. Mater. Sci. Technol.*, vol. 20, no. 26, 2010.
- [54] V. S. AshaRani P. V., Low Kah Mun G., Hande M. P., “No Title,” *ACS Nano*, vol. 279, no. 3, 2008.
- [55] A. C. M. Barngrover B. M., “No Title,” *J. Phys. Chem.*, vol. 11818, no. A 115, 2011.
- [56] S. B. I. Parikh A. N., Gillmor S. D., Beers J. D., Beardmore K. M., Cutts R. W., “No Title,” *J. Phys. Chem.*, vol. 2850, no. B 103, 1999.
- [57] L. H. R. Hadrup N., “No Title,” *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 1, no. 68, 2014.
- [58] V.-J. E. Misra S. K., Dybowska A., Berhanu D., Luoma S. N., “No Title,” *Sci. Total Environ.*, vol. 225, no. 438, 2012.
- [59] P. P. P. Rizzello L., “No Title,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 1501, no. 43, 2014.
- [60] B. Le Ouay and F. Stellacci, “Antibacterial activity of silver nanoparticles: A surface science insight,” *Nano Today*, vol. 10, no. 3, pp. 339–354, 2015.
- [61] R. D.-Y. Kim S., “No Title,” *J. Appl. Toxicol.*, vol. 78, no. 33, 2013.
- [62] M. J. M., “No Title,” *Toxicology*, vol. 83, no. 153, 2000.
- [63] N. Rameshbabu, T. S. S. Kumar, T. G. Prabhakar, V. S. Sastry, K. V. G. K. Murty, and K. Prasad Rao, “Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 80, no. 3, pp. 581–591, 2007.
- [64] K. S. Oh, S. H. Park, and Y. K. Jeong, “Durability in antimicrobial effects of silver doped hydroxyapatite depending on the synthesis route,” *Des. Process. Prop. Adv. Eng. Mater. Pts 1 2*, vol. 449–4, pp. 1233–1236, 2004.
- [65] P. N. Lim, L. Chang, and E. S. Thian, “Development of nanosized silver-substituted apatite for biomedical applications: A review,” *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 11, no. 6, pp. 1331–1344, 2015.
- [66] R. M. F. Lee D., Cohen R. E., “No Title,” *Langmuir*, vol. 9651, no. 21, 2005.
- [67] J. Niskanen *et al.*, “Synthesis of copolymer-stabilized silver nanoparticles for coating materials,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 288, no. 5, pp. 543–553, 2010.
- [68] S. Silver, L. T. Phung, and G. Silver, “Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds,” in *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2006, vol. 33, no. 7, pp. 627–634.

- [69] P. Pallavicini, G. Dacarro, Y. A. Diaz-Fernandez, and A. Taglietti, "Coordination chemistry of surface-grafted ligands for antibacterial materials," *Coord. Chem. Rev.*, vol. 275, pp. 37–53, 2014.
- [70] C. E. Santo, P. V. Morais, and G. Grass, "Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 76, no. 5, pp. 1341–1348, 2010.
- [71] C. E. Santo *et al.*, "Bacterial killing by dry metallic copper surfaces," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 3, pp. 794–802, 2011.
- [72] L. Nan, K. Yang, and G. Ren, "Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 51, pp. 356–361, 2015.
- [73] "<http://www.antimicrobialcopper.org/uk>."
- [74] D. Sun *et al.*, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilm by a copper-bearing 317L-Cu stainless steel and its corrosion resistance," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 69, pp. 744–750, 2016.
- [75] G. Grass, C. Rensing, and M. Solioz, "Metallic copper as an antimicrobial surface," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 5, pp. 1541–1547, 2011.
- [76] D. Magnani and M. Solioz, "How bacteria handle copper," *Mol. Microbiol. heavy Met.*, pp. 260–285, 2007.
- [77] J. O. Noyce, H. Michels, and C. W. Keevil, "Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment," *J. Hosp. Infect.*, vol. 63, no. 3, pp. 289–297, 2006.
- [78] J. Elguindi, J. Wagner, and C. Rensing, "Genes involved in copper resistance influence survival of *Pseudomonas aeruginosa* on copper surfaces," *J. Appl. Microbiol.*, vol. 106, no. 5, pp. 1448–1455, 2009.
- [79] N. Cioffi *et al.*, "Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties," *Chem. Mater.*, vol. 17, no. 21, pp. 5255–5262, 2005.
- [80] R. J. Cava, "Structural chemistry and the local charge picture of copper oxide superconductors.," *Science (80-.)*, vol. 247, no. 4943, pp. 656–62, 1990.
- [81] J. M. Tranquada, B. J. Sternlieb, J. D. Axe, Y. Nakamura, and S. Uchida, "Evidence for stripe correlations of spins and holes in copper oxide superconductors," *Nature*, vol. 375, no. 6532, pp. 561–563, 1995.
- [82] G. Ren, D. Hu, E. W. C. Cheng, M. A. Vargas-Reus, P. Reip, and R. P. Allaker, "Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 33, no. 6, pp. 587–590, 2009.
- [83] I. Banerjee, R. C. Pangule, and R. S. Kane, "Antifouling coatings: Recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms," *Advanced Materials*, vol. 23, no. 6, pp. 690–718, 2011.
- [84] D. Y. L. L. Zhang , Y. H. Jiang , Y. L. Ding , M. Povey, "No Title," *J.*

- Nanopart. Res.*, vol. 479, no. 9, 2007.
- [85] H. K. O. Yamamoto , M. Hotta , J. Sawai , T. Sasamoto, “No Title,” *J. Ceram. Soc. Jpn.*, vol. 1007, no. 106, 1998.
- [86] J. D. J. H. Li , R. Y. Hong , M. Y. Li , H. Z. Li , Y. Zheng, “No Title,” *Prog. Org. Coat.*, vol. 504, no. 64, 2009.
- [87] H. W. T. Matsunaga , R. Tomoda , T. Nakajima, “No Title,” *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 211, no. 29, 1985.
- [88] K. Page *et al.*, “Antimicrobial surfaces and their potential in reducing the role of the inanimate environment in the incidence of hospital-acquired infections,” *J. Mater. Chem.*, vol. 19, no. 23, p. 3819, 2009.
- [89] V. Krishna *et al.*, “Photocatalytic disinfection with titanium dioxide coated multi-wall carbon nanotubes,” *Process Saf. Environ. Prot.*, vol. 83, no. 4 B, pp. 393–397, 2005.
- [90] L. Caballero, K. A. Whitehead, N. S. Allen, and J. Verran, “Inactivation of *Escherichia coli* on immobilized TiO₂ using fluorescent light,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 202, no. 2–3, pp. 92–98, 2009.
- [91] C. H. H. C. J. Chung , H. I. Lin , C. M. Chou , P. Y. Hsieh and J. L. H. Z. Y. Shi, “No Title,” *Surf. Coat. Technol.*, vol. 203, p. 1081, 2009.
- [92] G. K. Prasad, G. S. Agarwal, B. Singh, G. P. Rai, and R. Vijayaraghavan, “Photocatalytic inactivation of *Bacillus anthracis* by titania nanomaterials,” *J. Hazard. Mater.*, vol. 165, no. 1–3, pp. 506–510, 2009.
- [93] L. Timofeeva and N. Kleshcheva, “Antimicrobial polymers: Mechanism of action, factors of activity, and applications,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 89, no. 3. pp. 475–492, 2011.
- [94] A. Kanazawa, T. Ikeda, and T. Endo, “Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. IV. Synthesis and antibacterial activity of polymers with phosphonium salts in the main chain,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 31, no. 12, pp. 3031–3038, 1993.
- [95] A. Kanazawa, T. Ikeda, and T. Endo, “Novel polycationic biocides. Synthesis and antibacterial activity of polymeric phosphonium salts,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 31, no. 2, pp. 335–343, 1993.
- [96] A. Kanazawa, T. Ikeda, and T. Endo, “Antibacterial activity of polymeric sulfonium salts,” *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 31, no. 11, pp. 2873–2876, 1993.
- [97] N. Kawabata and M. Nishiguchi, “Antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymers,” *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 54, no. 10, pp. 2532–2535, 1988.
- [98] B. Gottenbos, H. C. Van Der Mei, F. Klatter, P. Nieuwenhuis, and H. J. Busscher, “In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber,” *Biomaterials*, vol. 23, no. 6, pp. 1417–1423, 2002.

- [99] S. L. Warnes and C. W. Keevil, "Mechanism of copper surface toxicity in vancomycin-resistant enterococci following wet or dry surface contact," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 77, no. 17, pp. 6049–6059, 2011.
- [100] S. Takenaka, T. Tonoki, K. Taira, S. Murakami, and K. Aoki, "Adaptation of *Pseudomonas* sp. strain 7-6 to quaternary ammonium compounds and their degradation via dual pathways," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 6, pp. 1799–1802, 2007.
- [101] A. Mandlik, A. Swierczynski, A. Das, and H. Ton-That, "Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development," *Trends in Microbiology*, vol. 16, no. 1, pp. 33–40, 2008.
- [102] G. A. O'Toole and R. Kolter, "Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development," *Mol. Microbiol.*, vol. 30, no. 2, pp. 295–304, 1998.
- [103] a J. Scardino, E. Harvey, and R. De Nys, "Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics," *Biofouling*, vol. 22, no. 1–2, pp. 55–60, 2006.
- [104] S. C. Min, H. Schraft, L. T. Hansen, and R. Mackereth, "Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass," *Food Microbiol.*, vol. 23, no. 3, pp. 250–259, 2006.
- [105] M. L. Carman *et al.*, "Engineered antifouling microtopographies - correlating wettability with cell attachment.,," *Biofouling*, vol. 22, no. 1–2, pp. 11–21, 2006.
- [106] E. P. Ivanova *et al.*, "Bactericidal activity of black silicon.,," *Nat. Commun.*, vol. 4, p. 2838, 2013.
- [107] J. S. Price, A. F. Tencer, D. M. Arm, and G. A. Bohach, "Controlled release of antibiotics from coated orthopedic implants," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 30, no. 3, pp. 281–286, 1996.
- [108] S. J. Lam *et al.*, "Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers," *Nat. Microbiol.*, vol. 1, no. September, p. 16162, 2016.
- [109] K. Koch, B. Bhushan, and W. Barthlott, "Diversity of structure, morphology and wetting of plant surfaces," *Soft Matter*, vol. 4, no. 10, p. 1943, 2008.
- [110] B. S. Cassie ABD, "No Title," *Trans. Faraday Soc.*, vol. 40, p. 546, 1944.
- [111] C. ABD., "No Title," *Discuss Faraday Soc.*, 1948.
- [112] "<http://biodsign.files.wordpress.com/2008/08/lotusan.jpg>." .
- [113] K. Koch, B. Bhushan, Y. C. Jung, and W. Barthlott, "Fabrication of artificial Lotus leaves and significance of hierarchical structure for superhydrophobicity and low adhesion," *Soft Matter*, vol. 5, no. 7, p. 1386, 2009.
- [114] N. J. Shirtcliffe, G. McHale, S. Atherton, and M. I. Newton, "An introduction to superhydrophobicity," *Adv. Colloid Interface Sci.*, vol. 161, no. 1–2, pp. 124–138, 2010.

- [115] E. Gogolides, K. Ellinas, and A. Tserepi, "Hierarchical micro and nano structured, hydrophilic, superhydrophobic and superoleophobic surfaces incorporated in microfluidics, microarrays and lab on chip microsystems," *Microelectron. Eng.*, vol. 132, pp. 135–155, 2015.
- [116] C. R. Crick, S. Ismail, J. Pratten, and I. P. Parkin, "An investigation into bacterial attachment to an elastomeric superhydrophobic surface prepared via aerosol assisted deposition," *Thin Solid Films*, vol. 519, no. 11, pp. 3722–3727, 2011.
- [117] C. Lin *et al.*, "Effect of superhydrophobic surface of titanium on staphylococcus aureus adhesion," *J. Nanomater.*, vol. 2011, 2011.
- [118] B. J. Privett *et al.*, "Antibacterial fluorinated silica colloid superhydrophobic surfaces," *Langmuir*, vol. 27, no. 15, pp. 9597–9601, 2011.
- [119] L. R. Freschauf, J. McLane, H. Sharma, and M. Khine, "Shrink-induced superhydrophobic and antibacterial surfaces in consumer plastics," *PLoS One*, vol. 7, no. 8, pp. 1–7, 2012.
- [120] F. Poncin-Epaillard, J. M. Herry, P. Marmey, G. Legeay, D. Debarnot, and M. N. Bellon-Fontaine, "Elaboration of highly hydrophobic polymeric surface - A potential strategy to reduce the adhesion of pathogenic bacteria?," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 33, no. 3, pp. 1152–1161, 2013.
- [121] E. Fadeeva *et al.*, "Bacterial retention on superhydrophobic titanium surfaces fabricated by femtosecond laser ablation," *Langmuir*, vol. 27, no. 6, pp. 3012–3019, 2011.
- [122] C. Sousa, D. Rodrigues, R. Oliveira, W. Song, J. F. Mano, and J. Azeredo, "Superhydrophobic poly(L-lactic acid) surface as potential bacterial colonization substrate," *AMB Express*, vol. 1, no. 1, p. 34, 2011.
- [123] X. Qi, W. Song, Z. Mao, W. Gao, and Q. Cong, "Fabrication of a bionic needle with both super-hydrophobic and antibacterial properties," *J. Bionic Eng.*, vol. 10, no. 3, pp. 377–382, 2013.
- [124] J. S. Chung *et al.*, "Silver-perfluorodecanethiolate complexes having superhydrophobic, antifouling, antibacterial properties," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 366, no. 1, pp. 64–69, 2012.
- [125] S. H. and J.-P. N. and J. L. and M. R. and O. P. and E. Levänen, "Bacterial growth on a superhydrophobic surface containing silver nanoparticles," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 47, no. 1, p. 12064, 2013.
- [126] X. Zhang, M. Honkanen, E. Levänen, and T. Mäntylä, "Transition alumina nanoparticles and nanorods from boehmite nanoflakes," *J. Cryst. Growth*, vol. 310, no. 15, pp. 3674–3679, 2008.
- [127] X. Zhang, X. Liu, J. Laakso, E. Levänen, and T. Mäntylä, "Easy-to-clean property and durability of superhydrophobic flaky γ -alumina coating on stainless steel in field test at a paper machine," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 258, no. 7, pp. 3102–3108, 2012.
- [128] A. a. Chaudhari *et al.*, "Multi-Functionally Modified Superhydrophobic Aluminium and Fabric Surfaces with Reduced Gram-Negative and Gram-

- Positive Bacterial Attachment: A Possible Approach for Self-Cleaning Aircraft and Crew Cabin Surfaces,” *Mater. Manuf. Process.*, vol. 6914, no. October, p. 150925170734000, 2015.
- [129] K. Yamauchi, Y. Yao, T. Ochiai, M. Sakai, Y. Kubota, and G. Yamauchi, “Antibacterial activity of hydrophobic composite materials containing a visible-light-sensitive photocatalyst,” *J. Nanotechnol.*, vol. 2011, 2011.
- [130] M. Zhang, P. Wang, H. Sun, and Z. Wang, “Superhydrophobic surface with hierarchical architecture and bimetallic composition for enhanced antibacterial activity,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, no. 24, pp. 22108–22115, 2014.
- [131] M. Spasova, N. Manolova, N. Markova, and I. Rashkov, “Superhydrophobic PVDF and PVDF-HFP nanofibrous mats with antibacterial and anti-biofouling properties,” *Appl. Surf. Sci.*, vol. 363, pp. 363–371, 2016.
- [132] M. Katsikogianni and Y. F. Missirlis, “Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions,” *European Cells and Materials*, vol. 8, pp. 37–57, 2004.
- [133] Y. H. An and R. J. Friedman, “Laboratory methods for studies of bacterial adhesion,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 30, no. 2, pp. 141–152, 1997.
- [134] Y. F. Missirlis and A. D. Spiliotis, “Assessment of techniques used in calculating cell-material interactions,” in *Biomolecular Engineering*, 2002, vol. 19, no. 2–6, pp. 287–294.
- [135] M. Ribeiro, F. J. Monteiro, and M. P. Ferraz, “Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions,” *Biomatter*, vol. 2, no. 4, pp. 176–194, 2012.
- [136] R. E. Hall, G. Bender, and R. E. Marquis, “Inhibitory and cidal antimicrobial actions of electrically generated silver ions,” *J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 45, no. 9, pp. 779–784, 1987.
- [137] V. A. Nadtochenko, A. G. Rincon, S. E. Stanca, and J. Kiwi, “Dynamics of E. coli membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 169, no. 2, pp. 131–137, 2005.
- [138] V. a Nadtochenko, O. M. Sarkisov, V. V Nikandrov, P. a Chubukov, and N. N. Denisov, “Inactivation of pathogenic microorganisms in the photocatalytic process on nanosized TiO₂ crystals,” *Russ. J. Phys. Chem. B*, vol. 2, no. 1, pp. 105–114, 2008.
- [139] V. Nadtochenko, N. Denisov, O. Sarkisov, D. Gumy, C. Pulgarin, and J. Kiwi, “Laser kinetic spectroscopy of the interfacial charge transfer between membrane cell walls of E. coli and TiO₂,” *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 181, no. 2–3, pp. 401–407, 2006.
- [140] M. Suwalsky, C. Schneider, H. D. Mansilla, and J. Kiwi, “Evidence for the hydration effect at the semiconductor phospholipid-bilayer interface by TiO₂ photocatalysis,” *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, vol. 78, no. 3, pp. 253–258, 2005.

- [141] A. W. Bauer, W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck, “Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.,” *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 45, no. 4, pp. 493–496, 1966.
- [142] JIS, “Japanese Industrial Standard (JIS) Z 2801 - Antibacterial products - Test for antibacterial activity and efficacy,” 2010.
- [143] P. Fay, *The blue-greens (Cyanophyta, Cyanobacteria). Studies in Biology*. 1983.
- [144] L. R. Mur, O. M. Skulberg, and H. Utkilen, “Chapter 2. Cyanobacteria in the environment,” *Toxic Cyanobacteria Water A Guid. to their public Heal. consequences, Monit. Manag.*, p. 30, 1999.
- [145] M. Singh, S. Singh, S. Prasad, and I. S. Gambhir, “Nanotechnology in Medicine and Antibacterial Effect of,” *Dig. J. Nanomater. Biostructure*, vol. 3, no. 3, pp. 115–122, 2008.
- [146] A. E. W. G. E. Fogg, W. D. P. Stewart, P. Fay, *The blue–green algae*. 1973.
- [147] “<https://en.wikipedia.org/wiki/Cyanobacteria>.” .
- [148] W. F. Vincent, “Cyanobacterial dominance in the polar regions,” in *The ecology of cyanobacteria. Their diversity in time and space.*, 2000, pp. 321–340.
- [149] “<https://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthesis>.” .
- [150] “<https://en.wikipedia.org/wiki/Photosystem>.” .
- [151] Κ. Α. Ρ.-Α. Β. Γαλάτης, Δ. Γανωτάκης, Κ. Γκανή-Στυροπούλου, Γ. Καραμπαρμπουνιώτης, Κ. Κοτζαμπάσης, Ε.-Ι. Κωνσταντινίδου, Ι. Μανέτας, *Φυσιολογία Φυτών από το μόριο στο περιβάλλον*. 2003.
- [152] H. Dickert, “The Uses and Limitations of Disc Diffusion in the Antibiotic Sensitivity Testing of Bacteria,” *Infection*, vol. 9, no. 1, pp. 18–24, 1981.
- [153] A. Klančnik, S. Piskernik, B. Jeršek, and S. S. Možina, “Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 81, no. 2, pp. 121–126, 2010.
- [154] N. S. Heliopoulos, A. Galeou, S. K. Papageorgiou, E. P. Favvas, F. K. Katsaros, and K. Stamatakis, “Modified in situ antimicrobial susceptibility testing method based on cyanobacteria chlorophyll a fluorescence,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 121, pp. 1–4, 2016.
- [155] N. S. Heliopoulos, A. Galeou, S. K. Papageorgiou, E. P. Favvas, F. K. Katsaros, and K. Stamatakis, “An in situ antimicrobial susceptibility testing method based on in vivo measurements of chlorophyll α fluorescence,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 112, pp. 49–54, 2015.
- [156] “Aatcc Technical Manual,” vol. 85, pp. 97–98, 2010.
- [157] E. Sardella, F. Palumbo, G. Camporeale, R. Gristina, and P. Favia, “Plasma Processing for the Preparation of Antibacterial Surfaces,” pp. 1–26.
- [158] Δ. Τσιπλακίδης, “Εργαστηριακή άσκηση Φασματοφωτομετρίας,” in *Φυσική*

*Χημεία ΙΙΙ, Εργαστήριο Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, .*

[159]

“https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Contact_angle_microstates.svg#/media/File:Contact_angle_microstates.svg” .