



ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΣΧΟΛΗ
ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ
ΣΠΟΥΔΩΝ «ΜΙΚΡΟΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΙΑΤΑΞΕΙΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΞΕΣΦΥΓΓΗ ΥΒΟΝΝΗ

«Μικρορευστονική διάταξη με αντιβακτηριακή επιφάνεια ZnO
για τη λύση βακτηρίων»

Επιβλέπουσα

Τσερέπη Αγγελική, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Τσερέπη Αγγελική, Ερευνήτρια Α', ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Κόκκορης Γεώργιος, Συνεργαζόμενος ερευνητής, ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος"

Τσουκαλάς Δημήτριος, Καθηγητής, ΣΕΜΦΕ ΕΜΠ

Αθήνα, Ιούλιος 2022

Ξεσφύγγη Υβόννη

© (2022) 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-Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος».

Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα μου, Δρ. Αγγελική Τσερέπη για την πολύτιμη καθοδήγησή της, τις επιστημονικές γνώσεις και τις εποικοδομητικές υποδείξεις που με προσέφερε στο συγκεκριμένο θέμα μελέτης καθ'όλη την διάρκεια της εργασίας μου, καθώς και για τον χρόνο που μου αφιέρωσε.

Ιδιαίτερος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μαρία Γεωργούτσου-Σπυρίδωνος για την καταλυτική συνεισφορά της στα βιολογικά πειράματα της εργασίας και το ειλικρινές της ενδιαφέρον από την αρχή έως το τέλος.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Δημήτριο Μαστέλλο, υπεύθυνο του Εργαστηρίου Ανοσοχημείας του Τομέα Βιοδιαγνωστικών Επιστημών και Τεχνολογιών του ΙΠΡΕΤΕΑ, για την παραχώρηση του εργαστηρίου του προς πραγματοποίηση των πειραμάτων, καθώς και τις παραγωγικές υποδείξεις του κατά την εξέλιξη των πειραμάτων.

Επιπλέον, να ευχαριστήσω τον Δρ. Γεώργιο Κόκκορη για την συμβουλευτική καθοδήγηση του. Επίσης, ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια Διδάκτορα Διονυσία Κεφαλληνού για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση της.

Τέλος, ευχαριστώ τον Δρ. Αθανάσιο Μηλιώνη, τον Δρ. Abinash Tripathy και τον Δρ. Δήμο Πουλικάκο για τα δείγματα μελέτης του ZnO και τις μετρήσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) που έλαβαν μέρος στο Ινστιτούτο του ΕΤΗ, καθώς και της σημαντικής συμβολής τους καθ' όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν μικρο-κανάλια από οξειδίο του ψευδαργύρου (ZnO), με τις ιδιότητες του νανοδομημένου αυτού υλικού να αποτελούν ένα αποτελεσματικό εργαλείο για την αντιβακτηριακή δράση του, συγκεκριμένα στην κυτταρική λύση των βακτηρίων *E.coli*. Με την εκμετάλλευση των χημικών ιδιοτήτων του αλλά και της τοπογραφίας στην επιφάνεια του, μελετάται σαν αντιβακτηριακό υλικό και αναλύονται οι πιθανοί μηχανισμοί που οδηγούν στην κυτταρική λύση βακτηρίων, διερευνώντας κυτταρικούς πληθυσμούς υπό στατικές συνθήκες και συνθήκες ροής, σε διάφορους χρόνους παραμονής των βακτηρίων κοντά σε επιφάνειες ZnO.

Στα μικρο-ρευστονικά συστήματα, ιδιαίτερα όταν αυτά αφορούν ένα ολοκληρωμένο σύστημα διάγνωσης με βάση την ανίχνευση του γενετικού υλικού (molecular diagnostics) του μικροοργανισμού του ενδιαφέροντος μας, το στάδιο της λύσης των κυττάρων είναι πρωταρχικής ανάγκης για την έκλυση του γενετικού υλικού και την επεξεργασία του σε επόμενα στάδια μέχρι την ανίχνευση του. Συνήθως, οι τεχνικές λύσης περιλαμβάνουν ένα σύνολο από χημικά αντιδραστήρια ή θερμική κατεργασία, αλλά πιο πρόσφατα και σε ερευνητικό επίπεδο περιλαμβάνουν έξυπνες γεωμετρίες που ενσωματώνονται σε υποστρώματα κατασκευής μικρορευστονικών με στόχο τη λύση των κυττάρων.

Στα υπό εξέταση μικρο-κανάλια, που περιέχουν επιφάνειες νανοδομημένου ZnO, αποδεικνύεται ότι σε στατικές συνθήκες και σε μικρό χρόνο παραμονής (15 min) επιτυγχάνεται εντυπωσιακά υψηλός ρυθμός θανάτωσης των βακτηρίων, με το βακτηριακό τοίχωμα να αλληλεπιδρά τόσο με την νανοδομημένη τοπογραφία του υλικού, αλλά επίσης με υψηλή συγκέντρωση δραστικών ριζών οξυγόνου που παράγονται από το ZnO εξαιτίας της ενεργής επιφάνειάς του. Αυτό οδηγεί σε έκλυση του ενδοκυτταρικού περιεχομένου και επομένως του γενετικού υλικού (DNA) που θέλουμε να αναλύσουμε στη συνέχεια. Αρχικά μελετήθηκε η αντιβακτηριακή δράση νανοδομημένων επιφανειών ZnO σε σύγκριση με συνήθεις πολυμερικές επιφάνειες (PMMA). Η μέθοδος επίστρωσης τρυβλίων και καταμέτρηση ζωντανών αποικιών σε διάφορους χρόνους παραμονής χρησιμοποιήθηκε για το χαρακτηρισμό της αντιβακτηριακής δράσης της επιφάνειας ZnO. Στη συνέχεια, χαρακτηρίστηκε η αποτελεσματικότητα της κυτταρικής λύσης μέσα στο μικροκανάλι με βάση την ανίχνευση του DNA με την ημιποσοτική μέθοδο ενίσχυσης DNA με βάση την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA μέσω απορρόφησης στο UV στο ακατέργαστο προϊόν λύσης που συλλέχθηκε στην έξοδο του μικρο-καναλιού. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το εκλυμένο DNA μέσω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) και επιβεβαίωσε την παρουσία του DNA στο κυτταρόλυμα που παράχθηκε μέσα στα μικρο-κανάλια ZnO. Τέλος, ο ρυθμός θανάτωσης των βακτηρίων μελετήθηκε στατικά και υπό ροή μέσα στα κανάλια, για να εξακριβωθεί ο μηχανισμός θανάτωσης των βακτηρίων, σαν αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτών με τη νανοδομημένη επιφάνεια ZnO στο κανάλι.

Abstract

In the present study, we investigated a zinc oxide (ZnO) micro-channel as an effective tool for antibacterial applications, specifically for bacterial cell lysis. By exploiting the chemical properties of ZnO as well as the topography of its surface, we studied it as an antibacterial material and we analyzed the possible mechanisms that lead to bacteria lysis. We investigated the bacteria populations in the microchannel under static and flow conditions, as well at different residence times in contact with the ZnO surfaces.

In microfluidic systems, especially those concerning integrated systems for molecular diagnostics, based on the detection of the genetic material of a microorganism of interest, the stage of cell lysis is of primary importance for the release of the genetic material and its subsequent processing until its detection. Typical lysis techniques usually involve chemical or thermal treatment. More recently, at the research level, smart geometries are incorporated into substrates and microfluidics with the aim of accommodating cell lysis.

We demonstrate that in the microchannels under investigation, containing nanostructured ZnO surfaces, a remarkably high bacterial killing rate occurs both in static and flow conditions, even at short residence time (15 min). The bacterial membrane interacts in a destructive way both with the nanostructured topography of ZnO, and a high concentration of reactive oxygen species (ROS) produced by ZnO due to its active surface. This leads to the release of the intracellular content and therefore the genetic material (DNA) that is to be analyzed. In this work, the antibacterial activity of nanostructured ZnO surfaces was initially studied in comparison to conventional polymeric surfaces (PMMA). The method of colony-forming units (CFU) counting on plates was used for characterization of the antibacterial activity of ZnO surfaces, at different residence times. Next, the effectiveness of cell lysis in microchannels was characterized by the semi-quantitative method of DNA amplification based on Polymerase Chain Reaction (PCR), and the quantification of DNA concentration by UV absorbance of the crude lysate collected at the outlet of the microchannel. In addition, eluted DNA was characterized by fluorescence of ethidium bromide (EtBr) added in the cell lysate produced inside the ZnO micro-channels. Finally, the bacterial killing rate was studied both at static and under flow conditions in the microchannel to ascertain the mechanism of bacterial killing as a result of the interaction between the cells and the nanostructured ZnO microchannel surface.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 14 |
| 1.1 Μικροσυστήματα | 14 |
| 1.2 Μικρορευστονικές διατάξεις και Αναλυτικά Μικροεργαστήρια (Lab-on-chip, LOC)..... | 14 |
| 1.2.1 Υλικά μικρορευστονικών..... | 16 |
| 1.2.2 Μέθοδοι σχηματοποίησης και τεχνικές αντιγραφής | 17 |
| 1.3 Μικρορευστονικές διατάξεις στη διάγνωση μέσω μοριακών αναλύσεων | 19 |
| 1.3.2 Επίδραση τοπογραφίας επιφανειών στην προσκόλληση και λύση βακτηρίων | 23 |
| 1.4 Μηχανική λύση κυττάρων σε επιφάνειες μικρορευστονικών διατάξεων..... | 27 |
| 1.5 Σκοπός της εργασίας | 33 |
| ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ | 34 |
| 2.1 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιβακτηριακής δράσης επιφανειών | 34 |
| 2.1.1 Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους <i>E.coli</i> TOP10 και προετοιμασία της απαιτούμενης βακτηριακής συγκέντρωσης..... | 34 |
| 2.1.2 Μελέτη βιωσιμότητας του στελέχους <i>E.coli</i> με την τεχνική μέτρησης αποικιών σε (cfu/ml) | 37 |
| 2.2 Ανίχνευση του εκκλύμενου DNA | 39 |
| 2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοφωτομετρική ανάλυση υπεριώδους ορατού (UV/Vis)..... | 39 |
| 2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου | 41 |
| 2.2.3 Ανίχνευση DNAμέσω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου | 42 |
| 2.2.4 Ανίχνευση του DNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(PCR) | 43 |
| 2.3 Παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)..... | 50 |
| 2.3.1 Τεχνικές ανίχνευσης των δραστικών ριζών οξυγόνου | 51 |
| 2.3.2 Πρωτόκολλο μέτρησης των δραστικών ειδών οξυγόνου | 51 |
| 2.4 Υποστρώματα και μέθοδοι νανοδόμησης αυτών | 52 |
| 2.4.1 Υπόστρωμα πολύ (μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) PMMA | 52 |
| 2.4.2 Υπόστρωμα ψευδαργύρου(Zn) και οξειδίου του ψευδαργύρου(ZnO)..... | 53 |
| 2.4.3 Επιφανειακή τροποποίηση υποστρωμάτων με την τεχνολογία του πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP(Inductively Coupled Plasma) | 53 |
| 2.4.4 Επιφανειακή τροποποίηση υποστρωμάτων με την τεχνολογία εγχάραξης πλάσματος με δραστικά ιόντα RIE(Reactive Ion Etcher) | 53 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 2.4.5 | Νανοδόμηση υποστρωμάτων ZnO με χρήση θερμού ύδατος..... | 54 |
| 2.5 | Κατασκευή απλής μικρορευστονικής διάταξης | 57 |
| 2.5.1 | Διαστασιολόγηση και κατασκευή καναλιού..... | 57 |
| 2.5.2 | Σφράγιση του καναλιού..... | 57 |
| | Κεφάλαιο 3 ^ο :ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ και ΣΥΖΗΤΗΣΗ | 60 |
| 3.1 | Χαρακτηρισμός νανοδόμησης στις επιφάνειες και στα μικρο-κανάλια σε υποστρώματα ZnO..... | 60 |
| 3.2 | Μελέτη βιωσιμότητας των βακτηρίων στις επιφάνειες | 62 |
| 3.2.1 | Υπολογισμός των επιζώντων κυττάρων <i>E.coli</i> σε εγχαραγμένο PMMA με RIE και ICP τεχνολογία πλάσματος..... | 62 |
| 3.2.2 | Υπολογισμός του ρυθμού θανάτωσης στα νανοδομημένα υποστρώματα PMMA και ZnO..... | 64 |
| 3.2.3 | Υπολογισμός ζωντανών κυττάρων που παραμένουν προσκολλημένα στις επιφάνειες | 73 |
| 3.3 | Μελέτη βιωσιμότητας των βακτηρίων σε κανάλι υπό στατικές συνθήκες | 76 |
| 3.4 | Μελέτη βιωσιμότητας των βακτηρίων σε κανάλι υπό συνθήκες ροής..... | 77 |
| 3.4.1 | Πειραματική διάταξη με αντλία σε μικρο-κανάλια..... | 77 |
| 3.4.2 | Αποτελέσματα μέτρησης βιωσιμότητας βακτηρίων υπό ροή στα κανάλια | 79 |
| 3.5 | Προσδιορισμός εκλυόμενου DNA | 82 |
| 3.5.1 | Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας(OD) στα κυτταρικά διαλύματα των επιφανειών | 82 |
| 3.5.2 | Αποτελέσματα της τεχνικής PCR σε δείγματα από τα μικρο-κανάλια PMMA και ZnO | 83 |
| 3.5.3 | Ανάλυση PCR με εισαγωγή καθαρού DNA στα μικροκανάλια | 86 |
| 3.5.4 | Απενεργοποίηση του ανεπιθύμητου DNA στο κιτ TwistDx™ | 88 |
| 3.6 | Ανίχνευση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)..... | 89 |
| 3.7 | Προσδιορισμός των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) | 92 |
| 3.7.1 | Αποτελέσματα παραγωγής ROS σε υποστρώματα PMMA και ZnO | 92 |
| 3.7.2 | Αποδόμηση του DNA στο περιβάλλον του ZnO | 94 |
| | Κεφάλαιο 4 ^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ και ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ | 99 |
| 4.1 | Συμπεράσματα | 99 |
| 4.2 | Μελλοντικές προτάσεις | 102 |
| | Παράρτημα | 104 |
| 5. |Βιβλιογραφία | |
| | | 106 |

Κατάλογος Σχημάτων

- Σχήμα 1.3.2.1: Ποσοστό προσκολλημένων κυττάρων ανά cm^2 χρησιμοποιώντας εστιακή μικροσκοπία λέιζερ (CLSM). Με πράσινο σημειώνονται τα βιώσιμα κύτταρα και με κόκκινο τα μη βιώσιμα για χαρακτηριστικούς χρόνους εγχάραξης του Ti 5 min, 10 min, 20 min 30 min, και 40 min[61]. 25
- Σχήμα 1.3.2.2: α) Τα κύτταρα διεισδύουν στις νανοκολώνες στην επιφάνεια των φτερών με κλίμακα 1 μm . β) Φωτογραφία SEM εικόνα ενός κυττάρου *P. aeruginosa* που βυθίζεται σε μεγέθυνση 65.000 \times και κλίμακας 200nm. γ) Εστιακή μικροσκοπία λέιζερ CLSM για εικόνες φθορισμού με το βιολογικό πρωτόκολλο SYTO 9, πράσινο χρώμα στα ζωντανά κύτταρα, ενώ τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται με ιωδιούχο προπίδιο, που υποδεικνύεται με κόκκινο, σε κλίμακα 5 μm [65]. 26
- Σχήμα 1.3.2.3: α) Κυτταρική βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων HeLa που επώαστηκαν σε διάφορα υποστρώματα για 24h. β) Αντιβακτηριακή δραστηριότητα των *E.coli* που επώαστηκαν για 24 h σε υποστρώματα SiO_2 και ZnO-SiO_2 νανοσυρμάτα[71]. 27
- Σχήμα 1.4.1: Πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις (mg/mL) λυμένων κυττάρων HaCaT, HeLa και Jurkat με μηχανική μέθοδο που χρησιμοποιεί μικροσυστοιχίες νανοσυρμάτων ZnO σε μικροκανάλια σε σύγκριση με χημική λύση [72]. 28
- Σχήμα 1.4.2: (a)-(c) Εικόνες μεσυνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, όπου με πράσινο απεικονίζονται τα ζωντανά και με κόκκινο τα νεκρά κύτταρα *Pseudomonasaeruginosa*. (b)-(d) Εικόνα SEM προσκόλλησης κυττάρων σε επιφάνεια ελέγχου επίπεδου πυριτίου και στην επιφάνεια του μαύρου πυριτίου (blacksilicon-bSi)[73]. 29
- Σχήμα 1.4.3: Φωτογραφία της ολοκληρωμένης συσκευής με κάλυμμα PDMS πάνω από το τσιπ πυριτίου. (β) Εικόνες SEM τριών ξεχωριστών μικροκαναλιών που το καθένα περιέχει μια συστοιχία μικροκολώνων με διαφορετικές διατάξεις πυλώνων. (γ) Εικόνα SEM τριγωνικού σχήματος μικροκολώνων με πλευρικές και κορυφαίες αιχμές πυριτίου [74]. 30
- Σχήμα 1.4.4: (a) Σχηματική απεικόνιση του εγκλωβισμού της κυτταρικής μεμβράνης ενός κυττάρου *B. subtilis* που προκαλείται από τα νανοςύρματα (b) Η ένταση φθορισμού των μορίων DNA μετά τη ρήξη της μεμβράνης υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου[75]. 31
- Σχήμα 1.4.5: a) Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων επιφάνειας-βακτηρίων σε επίπεδο υπόστρωμα Zn, σε νανοδομημένες υπερυδρόφιλες επιφάνειες ZnO, και σε νανοδομημένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες ZnO. b) Μορφολογία *E.coli* σε (i) γυάλινη καλυπτρίδα, (ii) σε επίπεδη επιφάνεια Zn και (iii) σε νανοδομημένη υπερυδρόφιλη επιφάνεια ZnO [76]. 32

| | |
|--|----|
| Σχήμα 2.1.1.1: Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy-SEM) σε καλλιέργεια και προσκόλληση σε καλυπτρίδα (coverslip) . | 35 |
| Σχήμα 2.1.2.1: Επίστρωση τρυβλίων Petri από διαλύματα διαδοχικών αραιώσεων της βακτηριακής καλλιέργειας | 38 |
| Σχήμα 2.2.2.1: Σταγόνα δείγματος 2μl στον αισθητήρα του φασματοφωτόμετρου Nanodrop..... | 41 |
| Σχήμα 2.2.4.1: Βήματα ενίσχυσης ενός μορίου DNA με τη μέθοδο της PCR [100] | 45 |
| Σχήμα 2.2.4.2: Θερμοκρασίες ενός κύκλου θερμικής ενίσχυσης του DNA και θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία | 47 |
| Σχήμα 2.2.4.3: Τα τμήματα θραύσης του DNA σε συγκέντρωση ng του μάρτυρα (marker) NEB 100bp και Nippon 100bp. | 49 |
| Σχήμα 2.4.4.1: Εικόνες SEM σε υπόστρωμα PMMA a) εγχαραγμένο με πλάσμα O ₂ σε αντιδραστήρα πλάσματος ICP και b) εγχαραγμένο σε αντιδραστήρα RIE [125].. | 55 |
| Σχήμα 2.4.5.1: Διαδικασία HWT και βήματα που εμπλέκονται στο σχηματισμό των νανοδομημένων οξειδίων μετάλλων (MONSTR). (a) θερμική επεξεργασία με θερμό νερό (HWT), (b) σχηματισμός ενώσεων κατά τη διάρκεια της HWT στη διεπιφάνεια μετάλλου/νερού και (c) βήματα που εμπλέκονται στον σχηματισμό των οξειδίων κατά τη διάρκεια HWT. Ο κύριος μηχανισμός σχηματισμού της νανοδομής περιλαμβάνει το «plugging» και την διάχυση στην επιφάνεια [137]. | 56 |
| Σχήμα 2.5.1.1: Διαστάσεις μικρο-καναλιού στα υποστρώματα μελέτης νανοδομημένου ZnO και επίπεδου PMMA | 57 |
| Σχήμα 2.5.2.1: Εικόνες από το μικρο-κανάλι που είναι σχηματισμένο στο υπόστρωμα ZnO με κάλυμμα από PDMS και τοποθέτηση του σε chip holder για μηχανική συγκράτηση | 60 |
| Σχήμα 3.1.1: : Εικόνες SEM με (a) το επίπεδο Zn υπόστρωμα (κλίμακα 1μm), (b) το νανοδομημένο με θερμική επεξεργασία ZnO υπόστρωμα στο εσωτερικό του καναλιού (1μm), (c)-(f) το νανοδομημένο υπόστρωμα με την θερμική επεξεργασία σε διαφορετικές μεγεθύνσεις..... | 63 |
| Σχήμα 3.1.2: Νανοδομημένο ZnO από 2 διαφορετικές παρτίδες κατασκευής με την ίδια μέθοδο. Στο δείγμα από δεξιά διακρινόταν με γυμνό μάτι λευκή σκόνη στην επιφάνεια, ενώ το δείγμα από αριστερά φαινόταν πιο λείο | 63 |
| Σχήμα 3.2.1.1: Επιβίωση των κυττάρων <i>E.coli</i> TOP 10 (σε CFU/ml), σε επιφάνειες επίπεδου PMMA και εγχαραγμένου με ICP πλάσμα μετά από παραμονή 1,2 και 4 h αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης $4.6 \cdot 10^5$ CFU/ml | 64 |
| Σχήμα 3.2.1.2: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA και εγχαραγμένου με RIE πλάσμα, με παραμονή 1 h της βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml | 65 |

| | |
|---|----|
| Σχήμα 3.2.2.1: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου με ICP πλάσμα και του επίπεδου ZnO με χρόνο παραμονής 1 και 2 h της βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml..... | 66 |
| Σχήμα 3.2.2.2: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου με ICP πλάσμα, του επίπεδου Zn, και του νανοδομημένου ZnO, με χρόνο παραμονής 1 και 2 h της βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml. | 67 |
| Σχήμα 3.2.2.3: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου με RIE πλάσμα, επίπεδου Zn, και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 1h της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml..... | 68 |
| Σχήμα 3.2.2.4: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP 10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, επίπεδου Zn, νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 1h της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml. | 69 |
| Σχήμα 3.2.2.5: Επιφάνειες PMMA, επίπεδου Zn και νανοδομημένου ZnO σε plate με 2ml διαλύματος κυττάρων σε NaCl ₂ 0.9% που προορίζονται για τον κλίβανο επώασης. | 70 |
| Σχήμα 3.2.2.6: Επιφάνειες PMMA, επίπεδου Zn και νανοδομημένου ZnO σε plate με 2ml διαλύματος βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα NaCl ₂ 0.9% μετά την παραμονή στο κλίβανο επώασης. Το θολό εναιώρημα που προκύπτει είναι εμφανές στις επιφάνειες του υποστρώματος ZnO. | 70 |
| Σχήμα 3.2.2.7: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP 10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, επίπεδου Zn, και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 15 min της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml. | 71 |
| Σχήμα 3.2.3.1: Καθαρισμός επιφανειών με διάλυμα NaCl ₂ 0.9% προς ανάκτηση των κυττάρων που έχουν διατηρηθεί προσκολλημένα στις επιφάνειες. | 74 |
| Σχήμα 3.2.3.2: Ανάκτηση των <i>E.coli</i> TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, και εγχαραγμένου PMMA με RIE πλάσματος, που έχουν παραμείνει προσκολλημένα. | 74 |
| Σχήμα 3.2.3.3: Ανάκτηση των <i>E.coli</i> TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου PMMA με RIE πλάσματος, και του επίπεδου Zn με τα μικρο-κανάλια, που έχουν παραμείνει προσκολλημένα μετά την επώαση της καλλιέργειας στις επιφάνειες..... | 75 |
| Σχήμα 3.3.1: Επιβίωση των <i>E.coli</i> TOP 10 σε CFU/ml, σε μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO με παραμονή 15 min της βακτηριακής συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml. | 77 |
| Σχήμα 3.4.1: Διάταξης μικροαντλίας για την είσοδο βακτηρίων στο μικροκάνάλι υπό σταθερή ροή | 79 |
| Σχήμα 3.4.2.1: Συγκέντρωση των βακτηρίων σε CFU/ml σε διαφορετικούς χρόνους παραμονής στο νανοδομημένο ZnO υπό συνθήκες ροής σε χρόνους παραμονής 5,10 και 15 min. | 80 |

| | |
|---|----|
| Σχήμα 3.4.2.2: Συγκέντρωση των βακτηρίων σε CFU/ml σε διαφορετικούς χρόνους παραμονής στο νανοδομημένο ZnO και το επίπεδο PMMA υπό συνθήκες ροής με αρχική συγκέντρωση $2,2 \cdot 10^5$ CFU/ml. Συνθήκες: st=stationary, fl=flow..... | 81 |
| Σχήμα 3.5.2.1: Ενισχυμένο DNA από το διάλυμα των κυττάρων (σε αραιώσεις) που επώαστηκε στα μικρο-κανάλια του επιπέδου PMMA και του νανοδομημένου ZnO για 15 min. *Κάθε πηγάδι του PMMA και του ZnO αντιστοιχεί σε διαφορετικές αραιώσεις (χωρίς αραιώση, (1:10, 1:30) του αρχικού δείγματος που λήφθηκε από την έξοδο του καναλιού. | 84 |
| Σχήμα 3.5.2.2: Ενισχυμένο DNA από διάλυμα κυττάρων που επώαστηκε σε μικρο-κανάλια επιπέδου PMMA και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 15 min. *Κάθε πηγάδι για το PMMA και το ZnO αντιστοιχεί σε διαφορετικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος (1:30, 1:60) που λήφθηκε από την έξοδο του καναλιού. | 85 |
| Σχήμα 3.5.3.1: Ενισχυμένο DNA από καθαρό DNA που παρέμεινε στα μικρο-κανάλια επιπέδου PMMA και νανοδομημένου ZnO για 15 min. *Κάθε πηγάδι που αντιστοιχεί στο PMMA και το ZnO προέρχεται από διαφορετικές αραιώσεις (1:60, 1:30) του αρχικού δείγματος DNA που λήφθηκε από την έξοδο του μικρο-καναλιού. | 87 |
| Σχήμα 3.5.4.1: Ενίσχυση του γονιδίου ybbw του βακτηρίου <i>E.coli</i> που περιέχεται στο αντιδραστήριο του RPAkit (Σχήμα αριστερά) και απενεργοποίηση του γονιδίου ybbw του αντιδραστήριου RPAkit μετά την παραμονή του σε μικρο-κανάλια νανοδομημένου ZnO σε χρόνο 0,5 h (Σχήμα δεξιά). *RPA, RPA αναφέρονται στο ενισχυμένο αντιδραστήριο της RPAkit, RPAZ1, RPAZ2 αναφέρονται στο ενισχυμένο αντιδραστήριο της RPA μετά την παραμονή του στο μικρο-κανάλι. . | 88 |
| Σχήμα 3.6.4.1: Ένταση φθορισμού EtBr σε διαλύματα κυττάρων <i>E.coli</i> μετά την παραμονή τους στα μικρο-κανάλια επιπέδου PMMA, επιπέδου και νανοδομημένου ZnO, για χρόνο 10 min, υπό την επίδραση φωτός και σκότους (L για Light Conditions και D για Dark Conditions). | 90 |
| Σχήμα 3.7.1.1 Τα υποστρώματα επιπέδου PMMA και νανοδομημένων ZnO καναλιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ROS στο περιβάλλον του δείγματος. | 92 |
| Σχήμα 3.7.1.2: Σχετική ποσοστιαία συγκέντρωση ROS (%) σε σχέση με τον χρόνο παραμονής των υποστρωμάτων μικρο- καναλιών επιπέδου PMMA και νανοδομημένου ZnO υπό συνθήκες φωτός..... | 93 |
| Σχήμα 3.7.1.3: Σχετική ποσοστιαία συγκέντρωση ROS (%) σε σχέση με τον χρόνο παραμονής των υποστρωμάτων μικρο-καναλιών επιπέδου PMMA και νανοδομημένου ZnO σε συνθήκες σκότους..... | 94 |
| Σχήμα 3.7.2.1 Αλυσίδα χημικών αντιδράσεων για την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο μεταλλικό οξείδιο του ZnO μετά από ενεργοποίηση με ακτινοβολία [152]. | 95 |

| | |
|---|----|
| Σχήμα 3.7.2.2 Πιθανοί μηχανισμοί διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης από τις σχηματισμένες νανοδομές των μεταλλικών οξειδίων[154]. | 96 |
| Σχήμα 3.7.2.3 Σχηματισμός συμπλόκων μορίων του ZnO και θετικά φορτισμένων ιόντων ανάλογα με το εύρος τιμών του pH του περιβάλλοντος μέσου[155]..... | 97 |

Κατάλογος Πινάκων

| | |
|---|-----|
| Πίνακας 2.2.3.1: Αναλογίες αντιδραστηρίων στο πρωτόκολλο του βρωμιούχου αιθιδίου με το εκλυόμενο DNA από τα κανάλια..... | 43 |
| Πίνακας 2.4.2.2: Αλληλουχίες των Primers του γονιδίου ybbW του βακτηρίου <i>E. coli</i> | 47 |
| Πίνακας 2.4.3: Συνθήκες αερίου πλάσματος για την κατεργασία υποστρώματος PMMA | 53 |
| Πίνακας 3.2.2.1: Συγκέντρωση των κυττάρων σε (CFU/ml) στις επιφάνειες επίπεδου PMMA, επίπεδου ZnO και νανοδομημένου ZnO, σε χρόνο επώασης 15 min και 1h. | 72 |
| Πίνακας 3.3.1: Συγκέντρωση των κυττάρων σε (CFU/ml) από δύο ανεξάρτητα πειράματα που ενσωματώνεται στο Διάγραμμα 3.3.1 και απεικονίζουν τον μέσο όρο των κυττάρων επιβίωσης στις επιφάνειες επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO, σε χρόνο επώασης 15 min, σε φως και σκότος | 77 |
| Πίνακας 3.4.1: Ρυθμός θανάτωσης βακτηρίων σε νανοδομημένο ZnO, σε διαφορετικές ογκομετρικές ροές και σε στατικές συνθήκες, σε δύο ανεξάρτητα πειράματα με αρχική συγκέντρωση $1,6 \cdot 10^6$ και $2,2 \cdot 10^5$ CFU/ml..... | 81 |
| Πίνακας 3.5.1: Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) δείγματος DNA από το υπερκείμενο διάλυμα των βακτηρίων, παραμονής 1h πάνω στις αντίστοιχες επιφάνειες..... | 82 |
| Πίνακας 3.5.2.1: Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA λόγω έκλυσης από τα νεκρά κύτταρα <i>E.coli</i> στα μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 15 min σε στατικές συνθήκες και υπό την επίδραση του φωτός | 86 |
| Πίνακας 3.5.3.1: Μέτρηση της συγκέντρωσης καθαρού DNA πριν και μετά την εισαγωγή σε μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO, με χρόνο παραμονής 15 min, σε στατικές συνθήκες και υπό την επίδραση του φωτός. | 87 |
| Πίνακας 3.5.4.1: Λόγοι εντάσεων από τα ενισχυμένα δείγματα των πειραμάτων του Σχήματος 3.5.4: | 89 |
| Πίνακας 4.1.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μέσων ρυθμών θανάτωσης (CFU/cm ² h) | 100 |

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μικροσυστήματα

Τα μικροσυστήματα και η επιστήμη της μικρο-τεχνολογίας έχουν αναγνωρισθεί ως μία από τις πιο πολλά υποσχόμενες τεχνολογίες τον 21ο αιώνα καθιστώντας όλο και πιο χρήσιμη την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα, μέσω της ψηφιοποίησης και της αυτοματοποίησης σε πλήθος προϊόντων της καθημερινότητας μας.

Οι προσδοκίες της μικρο-τεχνολογίας επεκτείνονται στα συστήματα μικρο-μηχανικής, μικροηλεκτρονικής, μικρο-ρευστονικής και μικρο-οπτικής. Από το 1947, με την πρώτη εμφάνιση του τρανζίστορ από τους ερευνητές του εργαστηρίου Bells Labs μεγέθους 1,5 cm, σήμερα φτάνουμε να αποτιμούμε από μερικές εκατοντάδες εκατομμύρια έως δισεκατομμύρια τρανζίστορ σε ένα ολοκληρωμένο κύκλωμα ενός υπολογιστή. Το πεδίο των μικρο-ηλεκτρομηχανικών συστημάτων (micro-electromechanical systems, MEMS) βασίστηκε στην τεχνολογία κατασκευής και στην προτυποποίηση ολοκληρωμένων κυκλωμάτων(integrated circuit, IC) με την ενσωμάτωση μηχανικών, ηλεκτρικών εξαρτημάτων σε υποστρώματα ημιαγωγικών υλικών με διαστάσεις από μερικά μικρόμετρα έως χιλιοστά. Το πρώτο εγχείρημα ενός ενιαίου ολοκληρωμένου κυκλώματος πραγματοποιήθηκε το 1958 από την εφευρετικότητα του Kilby, με την δημιουργία ενός Στερεού κυκλώματος από υπόστρωμα γερμανίου[1]. Η εξελισσόμενη ανάπτυξη των MEMs μέχρι σήμερα έχει προσφέρει ευρεσιτεχνίες που εφαρμόζονται πλέον από όλες τις βιομηχανίες και τα ερευνητικά εργαστήρια για περαιτέρω βελτιστοποίηση τους. Η μικροηλεκτρονική εξελίχθηκε από μικρο-τεχνολογία σε νανο-ηλεκτρονική και νανο-τεχνολογία, με την δημιουργία "ολοκληρωμένων αναλυτικών μικρο-συστημάτων" (micro total analysis systems, μ -TAS) με εφαρμογές που εκτείνονται από την αναλυτική χημεία, την οργανική σύνθεση, τη κλινική διάγνωση έως τη κυτταρική βιολογία και τη μηχανική ιστών.

1.2 Μικρορευστονικές διατάξεις και Αναλυτικά Μικροεργαστήρια (Lab-on-chip, LOC)

Τα συστήματα μικρο-εργαστηρίων σε ψηφίδα (Lab-on-a-Chip, LoC) είναι ένα υποσύνολο συσκευών Μικρο-Ηλεκτρο-Μηχανικών Συστημάτων(MEMS) και μερικές φορές ονομάζονται "μικροσύστημα ολικής ανάλυσης" (μ TAS). Η ικανότητα χειρισμού μικρών όγκων ρευστού μέσα σε διάφορους τύπους καναλιών της κλίμακας του μικρομέτρου επιτρέπει τη μείωση των χρόνων επεξεργασίας, της ανάλυσης, της κατανάλωσης αντιδραστηρίων, της μείωσης παραγωγής συστατικών αποβλήτων με τον παράλληλο έλεγχο της παρακολούθησης των χημικών ή βιολογικών διεργασιών τους.

Ο όρος «lab-on-a-chip» αποδίδεται στον Andreas Manz[2], ο οποίος είχε τη προσδοκία για μια σύγχρονη στρατηγική επίλυσης αναλυτικών προβλημάτων. Τα μικροεργαστήρια σε ψηφίδα είναι μικροσυστήματα ικανά να ενσωματώνουν ολόκληρες βιολογικές ή χημικές διεργασίες στη κλίμακα του μικρομέτρου με την

ενσωμάτωση μικρο-καναλιών και ενεργών ή παθητικών εξαρτημάτων, όπως φίλτρα, βαλβίδες και αναμικτήρες στη διάταξη[3].

Τα συστήματα μTAS είναι κατάλληλα για αυτοματοποίηση διεργασιών και έχουν δυνατότητα να είναι φορητά σε οποιοδήποτε σημείο ενδιαφέροντος. Ειδικά σε ορισμένες περιπτώσεις όπου η απόκτηση αποτελεσμάτων μπορεί να επιτευχθεί γρήγορα. Στην τεχνολογία κατασκευής των μTAS διατάξεων παρατηρείται το ενδιαφέρον της εφαρμογής υλικών της ναοκλίμακας όπως οι κβαντικές κουκίδες, τα νανοσωματίδια, οι νανοσωλήνες άνθρακα και η τεχνολογία του γραφενίου, προσφέροντας την αξιοποίηση των χαρακτηριστικών τους σε πολλές εφαρμογές[4].

Το πρώτο εγχείρημα ενός μικροσυστήματος ανάλυσης πραγματοποιήθηκε το 1979 από τους Terry, S., et al. [5], όπου ένα μικροσκοπικό σύστημα ανάλυσης αερίου κατασκευάστηκε με βάση τις αρχές της αέριας χρωματογραφίας (GC) για διαχωρισμό συστατικών σε χρόνο μερικών δευτερολέπτων σε αντίθεση με ένα συμβατικό σύστημα αέριας χρωματογραφίας. Αργότερα, το 1993 υλοποιήθηκε ένα μTAS σε διάταξη από γυαλί για την ηλεκτροφόρηση αμινοξέων μέσα σε λίγα δευτερόλεπτα[6]. Τα αποτελέσματα ανέδειξαν τη δυνατότητα δημιουργίας ενός μικροσκοπικού εργαστηρίου σε ένα τσιπ που θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σύνθετες αναλύσεις σε πολύ μικρό χρόνο. Τα κύρια μέρη του ολοκληρωμένου μικροσυστήματος για αναλυτικούς σκοπούς απαρτιζόταν από υπόστρωμα πυριτίου χρησιμοποιώντας τεχνικές φωτολιθογραφίας και χημικής εγχάραξης, οι οποίες οδήγησαν σε διάταξη τρεις τάξεις μεγέθους μικρότερη σε σύγκριση με τα συμβατικά εργαστηριακά όργανα και σε μικρότερους χρόνους επεξεργασίας.

Ακόμα, τα πλεονεκτήματα που προσφέρουν τα μικροσυστήματα αυτά επεκτείνονται σε ένα ευρύ φάσμα επίλυσης προβλημάτων στο πεδίο των μTAS και στηρίζονται στην κατασκευή πολυεπίπεδων συστημάτων. Η δυνατότητα ανάλυσης μTAS καθιστά εφικτή την επιτόπια ανάλυση και τη ταυτόχρονη παρακολούθηση των περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως η μόλυνση των υδάτων, η ατμοσφαιρική ρύπανση και η διάβρωση του εδάφους[7]. Επίσης, στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών σε δείγματα τροφίμων, η ταχεία ανίχνευση και ταυτοποίηση παθογόνων και άλλων μικροβιακών μολυσματικών ουσιών στα τρόφιμα, είναι αναγκαία από τη βιομηχανία τροφίμων και τους οργανισμούς ασφάλειας τροφίμων[8]. Επίσης, η ανάπτυξη κυτταροκαλλιιεργειών σε μTAS για τη μίμηση ιστών και ολόκληρων οργάνων δημιουργεί ελεγχόμενα περιβάλλοντα μελέτης για αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και κυττάρου-περιβάλλοντος[9].

Τα τέσσερα κύρια μέρη ενός συστήματος μTAS είναι 1) η μονάδα προετοιμασίας του δείγματος, όπου τα δείγματα εγχέονται στο σύστημα. 2) Η μονάδα όπου λαμβάνει χώρα η αντίδραση (ανάλογα, αυτή μπορεί να είναι αντίδραση ενίσχυσης DNA, διαχωρισμού, διαλογής, κοκ ή και καλλιέργεια κυττάρων), 3) η μονάδα ανίχνευσης/ανάλυσης, όπου τα αποτελέσματα συλλέγονται από αισθητήρες και τέλος 4) η μονάδα επεξεργασίας δεδομένων, όπου τα αποτελέσματα μετατρέπονται σε σήμα εξόδου με την ψηφιοποίηση [6].

1.2.1 Υλικά μικρορευστονικών

Η πραγματοποίηση μιας σειράς διεργασιών απαιτεί διαφορετικές ιδιότητες των υλικών και υποστρωμάτων εφαρμογής ανάλογα το αντικείμενο μελέτης, όπως η σκληρότητα, η αγωγιμότητα, η υδροφοβικότητα, η μετάδοση φωτός, η αντοχή στη διάβρωση και η βιοσυμβατότητα. Τα μικρορευστονικά τσιπ πρώτης γενιάς παρασκευάστηκαν από ανόργανα υλικά, όπως πυρίτιο (Si) ή το γυαλί, σύμφωνα με την τεχνολογία MEMS που περιλαμβάνει τη εναπόθεση λεπτών υμενίων, τη φωτολιθογραφία και την εγχάραξη. Η μικρό-μηχανική του πυριτίου και του γυαλιού που επιλέχθηκε αρχικά περιλαμβάνει τεχνικές, οι οποίες απαιτούν τη χρήση των εγκαταστάσεων και ακριβού εξοπλισμού σε καθαρούς χώρους. Το πυρίτιο δεν είναι εύκολο στον χειρισμό λόγω της σκληρότητάς του, η οποία αποτελεί εμπόδιο για τη δημιουργία εξαρτημάτων όπως βαλβίδων και αντλιών. Επίσης, το πυρίτιο δεν είναι οπτικά διαπερατό στην ορατή περιοχή και υπάρχουν περιορισμοί στις μεθόδους οπτικής ανίχνευσης με βάση το βιολογικό φθορισμό και την απεικόνιση των δικτύων ροής[10]. Συνεπώς, δημιουργήθηκε η ανάγκη για επιλογή υλικών που να εφαρμόζονται αποτελεσματικά σε διατάξεις μικρο-ρευστονικών συστημάτων και παράλληλα να διατηρούν χαμηλό το κόστος. Τα υλικά κατασκευής μπορούν να χωριστούν στις εξής κατηγορίες: τα ανόργανα υλικά, τα πολυμερικά υλικά και ελαστομερή, την υδρογέλη και τα χάρτινα υποστρώματα[11]. Η εφαρμογή μερικών από αυτά τα υλικά σε συστοιχίες διατάξεων είναι περιορισμένη λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων τους. Τα ανόργανα υλικά αντικαταστάθηκαν την τελευταία δεκαετία από μια ποικιλία φυσικών και συνθετικών πολυμερών υλικών, τόσο από θερμοπλαστικά όσο και από θερμοσκληρυνόμενα πολυμερή που χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορους τομείς εξαιτίας της μηχανικής αντοχής, της σταθερότητας τους σε υψηλές θερμοκρασίες και της ανθεκτικότητας σε διαλύτες. Ορισμένες νέες διατάξεις με βάση την υδρογέλη[12] και το χαρτί (lab-on-paper)[13], έχουν προταθεί για την κατασκευή μικρορευστονικών διατάξεων και έχουν εφαρμοστεί για τη μελέτη αλληλεπίδραση επιφάνειας και κυττάρων. Ειδικότερα, τα υποστρώματα από χαρτί είναι εύκολα διαθέσιμα υλικά με πλεονεκτήματα όπως την υδροφιλικότητα, της καθαρότητας τους, της αναπαραγωγιμότητας στην χρήσεις τους και της βιοσυμβατότητας, κατά τον διαχωρισμό και την ικανότητα δέσμευσης βιομορίων[14]. Τα πολυμερικά υλικά χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο εξαιτίας της βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν με τους μικροοργανισμούς και της τροποποίησης των επιφανειών τους για βελτιωμένες ιδιότητες.

Το 1998 οι Whitesides, G., et al. [15] έκαναν δυνατό για πρώτη φορά τον σχεδιασμό και την κατασκευή μικρορευστονικού συστήματος σε ένα ελαστομερές υλικό το πολύ διμεθυλοσιλοξάνιο (PDMS) γρήγορα και με χαμηλό κόστος χρησιμοποιώντας εκτύπωση υψηλής ανάλυσης και λιθογραφία με επαφή, χύτευση του PDMS και στεγανοποίηση μέσω οξείδωσης με άλλες επιφάνειες. Σήμερα, το PDMS είναι ένα πολυμερές που χρησιμοποιείται ευρέως, επειδή είναι φθηνό, υδρόφοβο, διαυγές με αποτελεσματική αξιοποίηση των μηχανικών, οπτικών και ηλεκτρικών ιδιοτήτων του.

Γενικά, δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν άρτια όλα τα διαθέσιμα υλικά στην κατασκευή μικρορευστονικών συσκευών. Τρεις βασικές ιδιότητες απαιτούνται για την

πραγματοποίηση των περισσότερων εφαρμογών τους. Πρώτον, τα χαρακτηριστικά τραχύτητας της επιφάνειας, όπως η υδροφοβικότητα και η υδροφιλικότητα της επιφάνειας που επιλέγεται ανάλογα με την χρήση της κάθε διάταξης, Δεύτερον, απαιτούνται ισχυρά πολυμερικά υλικά για τη μείωση της επίδρασης των τριχοειδών δυνάμεων που περιβάλλουν τα εσωτερικά τοιχώματα των καναλιών για τη τυχόν πιθανή κατάρρευση του συστήματος λόγω των δυνάμεων αδράνειας(εσωτερική πίεση ρευστού) μεταξύ των επιφανειών. Επιπλέον, προτιμάται η οπτική διαφάνεια ή ημιδιαφάνεια, λαμβάνοντας υπόψη την ενσωμάτωση ανιχνευτών για λήψη εικόνων [16].

1.2.2 Μέθοδοι σχηματοποίησης και τεχνικές αντιγραφής

Η ευρεία ανάπτυξη των τεχνικών μικροκατασκευής και νανοκατασκευής, καθώς και η ανάπτυξη τεχνικών αυτοσυναρμολόγησης δίνουν συνεχή επέκταση στην βελτιστοποίηση των μικρορευστονικών διατάξεων που προορίζονται για βιολογικούς σκοπούς. Η κατασκευή τοπογραφίας γίνεται είτε με την εναπόθεση υμενίων σε μια επιφάνεια ή την εγχάραξη τμήματος μιας επιφάνειας μέσω μασκών. Συνδυασμός τεχνικών εγχάραξης και σχηματοποίησης σε πολυμερικά υλικά χρησιμοποιούνται κατά κόρον σε σχέση με την μικροτεχνία του πυριτίου που εφαρμόζεται τις τελευταίες δεκαετίες στον τομέα της μικροηλεκτρονικής [17].

Η ευρέως γνωστή μέθοδος που ανταποκρίνεται σε πλήθος παραγωγής διαφορετικών προτύπων δόμησης των επιφανειών είναι η μαλακή λιθογραφία, μέσω καθορισμένων και ελεγχόμενων σταδίων προσφέρει επιφανειακές διεργασίες με συμβατότητα σε βιολογικές εφαρμογές[18]. Οι τεχνικές της μαλακής λιθογραφίας χρησιμοποιούν οργανικά ή πολυμερικά υλικά τα οποία χαρακτηρίζονται ως μαλακή ύλη από την φυσικής σκοπιάς [17]. Επίσης, η τεχνική της μαλακής λιθογραφίας για την τοπογραφική διαμόρφωση των νανοδομών επιτυγχάνεται με μεγάλη ακρίβεια και χαμηλό κόστος. Σε αντίθεση με τις τεχνικές φωτολιθογραφίας ή λιθογραφίας με δέσμη ηλεκτρονίων, όπου φωτόνια ή ηλεκτρόνια τροποποιούν τις χημικές και φυσικές ιδιότητες των επιφανειών μέσω σειριακών διαδικασιών, η μαλακή λιθογραφία μπορεί να παράγει πολλά αντίγραφα αντιγράφων λειτουργώντας σε ένα με ένα ευρύ φάσμα πολυμερών. Η μαλακή λιθογραφία παράγει χαρακτηριστικά μεγέθη στην περιοχή από 30 nm έως 500 μm [19].

Γενικά, η μαλακή λιθογραφία περιλαμβάνει την κατασκευή προπλάσματος/μήτρας για τεχνολογίες μικρο- και νανο-κατασκευής μέσω κατασκευής σφραγίδων ελαστομερούς με τις τεχνικές αντιγραφής προτύπου (replica molding, REM), αποτύπωση μικρο-επαφής (Microcontact printing, μCP), μικρο-μεταφοράς προτύπου (microtransfer molding) χαρακτηριστικών από τις σφραγίδες σε υποστρώματα ενδιαφέροντος, ελαφριά λιθογραφία μικρο-αποτύπωσης σε κανάλια (Micromolding in capillary, MIMIC), καθώς και την μικρο-αποτύπωση υποβοηθούμενη με διαλύτη (Solvent-assisted micromolding, SAMIM) [20],[21],[22],[23].

Η αντιγραφή προτύπου είναι μια παλιά, απλή και αξιόπιστη μέθοδος κατά την οποία τα μικρο- ή τα νανο-μοτίβα που είναι σχηματισμένα στην επιφάνεια ενός καλουπιού ή

μήτρας μπορούν και αντιγράφονται στο πολυμερές υλικό που έρχεται σε επαφή με αυτό μέσω διάφορων τεχνικών αποτύπωσης [24]. Η τεχνική σχεδίασης που περιλαμβάνει την αποτύπωση σχήματος (hot embossing) [25] με χρήση μήτρας μέσω θέρμανσης, οδηγεί σε υψηλό λόγο των γεωμετρικών διαστάσεων, και παραγωγή νανοδομών σε διάφορα μαλακά υλικά. Στην τεχνική αυτή της λιθογραφίας νανοαποτυπώματος (nanoimprint lithography-NIL) ένα πολυμερικό φιλμ που θερμαίνεται στην θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης, εγγέεται πάνω σε μήτρα από κάποιο υλικό μέταλλο ή γυαλί που περιέχει τις μικροδομές. Με την θέρμανση για την ρευστοποίηση του πολυμερούς μαζί με την μήτρα στο σημείο υαλώδους μετάπτωσης του πολυμερούς και μετέπειτα με την ψύξη του επάνω στην μήτρα, το πολυμερικό υλικό πλαστικοποιείται και αποκτά την τοπογραφία της μήτρας.

Επίσης, η έγχυση σε μήτρα (injection molding) με το ελαστομερές PDMS να πρωταγωνιστεί στην κατασκευή των μικρο-ρευστονικών διατάξεων αποδεικνύεται ιδιαίτερα ευέλικτη στην διαδικασία παραγωγής[26]. Το ρευστοποιημένο πολυμερές εγγέεται στη μήτρα που ήδη έχει θερμανθεί και το σύστημα πολυμερές-μήτρα αφήνεται να ψυχθεί ώστε το υλικό να σκληρύνει αποτυπώνοντας τις δομές ης μήτρας. Αφού κρυώσει, το αντικείμενο αφαιρείται. Για τις δύο διαδικασίες παραπάνω, απαιτείται ο σχεδιασμός του καλουπιού που καθορίζει την γεωμετρία της διάταξης.

Συγκεκριμένα, οι διαδικασίες της εκτύπωσης μικροεπαφών ή της χύτευσης μικρομεταφοράς είναι συνήθεις τρόποι δημιουργίας μικροδομών από μια σφραγίδα PDMS που δημιουργείται μέσω της χύτευσης αντιγράφου. Κάθε διαδικασία μπορεί να χρησιμοποιεί το αρνητικό ανάγλυφο μιας σφραγίδας PDMS για να αποτυπώσει και να αντιγράψει το επιθυμητό σχέδιο στη διάταξη [21]. Το PDMS λειτουργεί ικανοποιητικά για την αναπαραγωγή δομών σε κλίμακα μεγέθους των 500 nm και άνω. Το πρώτο εγχείρημα εκτύπωσης μικρο-επαφών (μCP) με χρήση σφραγίδας με μαλακή λιθογραφική μέθοδο για ταχεία προτυποποίηση κατασκευής συγκρίσιμης με την UV φωτολιθογραφία, πραγματοποιήθηκε το 1993, από τους Kumar et al. [24] με την σχεδίαση μοτίβων από χρυσό Au με χρήση PDMS ως σφραγίδα με χαρακτηριστικές διαστάσεις 1-100μm σε υποστρώματα πυριτίου. Το PDMS εμποτισμένο σε διάλυμα αλκανοθειολών ως αυτό-συγκροτούμενα μονοστρώματα (Self-assembled monolayers, SAMs) που εμφανίζει ισχυρή χημεία με τον χρυσό, ήρθε σε επαφή με το υπόστρωμα του χρυσού, επιτυγχάνοντας διάφορους τύπους χαρακτηριστικών μοτίβων στο υπόστρωμα πυριτίου.

Προσπάθειες έχουν γίνει σε τεχνολογίες αυτοσυναρμολόγησης, στηριζόμενες σε τεχνικές όπως τη διαχωρισμένη φάση συμπολυμερούς κατά συστάδες (phase-separated block copolymer), μίξη πολυμερών (polymer dimixing) και την κολλοειδή λιθογραφία προσφέροντας ένα σύνολο νανομοτίβων κάτω των 100 nm, διαστάσεων εφαρμοσμένων κατάλληλα σε βιολογικές έρευνες[27]. Για την σχηματοποίηση νανοδομών χρησιμοποιείται η κολλοειδής λιθογραφία μέσω εναπόθεσης ή εγχάραξης σε επίπεδα και μη επίπεδα υποστρώματα με χαμηλό κόστος και υψηλή απόδοση. Στην κολλοειδή λιθογραφία, πραγματοποιείται αυτό-οργάνωση κολλοειδών σωματιδίων σε διαστάσεις 2D ή 3D. Τα σχέδια μπορούν να μεταφερθούν από την κολλοειδή μάσκα

στην επιφάνεια του υποστρώματος μέσω πολλών τεχνικών ψεκασμού, θερμικής εξάτμισης, ηλεκτροχημικής εναπόθεσης, της εναπόθεσης χημικών ατμών ή και με αντιδραστική εγχάραξη ιόντων (RIE)[28]. Παρόμοια, η αυτό-συναρμολόγηση συμπολυμερούς (nanostructured block copolymer (BCP) self-assembly) με την ικανότητα σύνθετων γεωμετριών και μεγεθών επάνω σε ένα υπόστρωμα, παρέχει την ικανότητα χειρισμού πολλών νανομοτίβων με έλεγχο του προσανατολισμού τους[29]. Τα BCP αποτελούνται από δύο ή περισσότερες διαφορετικές ομάδες πολυμερών συνδεδεμένες ομοιοπολικά μεταξύ τους, και εμφανίζονται στο εύρος των δεκάδων νανόμετρων.

Επίσης, χρησιμοποιούνται και άλλες τεχνικές νανοδόμησης που δεν χρησιμοποιούν αντιγραφή μήτρας αλλά απευθείας σχηματοποίηση (direct fabrication) της επιφάνειας[30]. Η οπτική λιθογραφία είναι η πιο κοινή τεχνική λιθογραφίας, όπου η κατασκευή μικρο- και νανο- δομών βασίζεται στη μεταφορά μοτίβων από μια μάσκα σε ένα υμένιο φωτοευαίσθητου υλικού που υφίσταται μια χημική αντίδραση μετά από έκθεση σε μια πηγή φωτός, συνήθως υπεριώδους 254–365 nm. Περιλαμβάνει όλες τις απαραίτητες διαδικασίες εμφάνισης, προσθήκης, αφαίρεσης υλικού μέχρι την τελική διαμόρφωση του [31]. Ακολουθεί η τεχνική της ξηρής εγχάραξης (dry etching) με την χρήση πλάσματος που βασίζεται σε τρεις μηχανισμούς, την χημική εγχάραξη με πλάσμα, την φυσική εγχάραξη με δραστικά ιόντα και στο συνδυασμό χημικής και φυσικής εγχάραξης ενισχυμένης με δραστικά ιόντα. Στην τεχνική αυτή, η επιφάνεια βομβαρδίζεται με ιόντα με φυσικό τρόπο, μέσω χημικών αντιδράσεων ή συνδυασμό φυσικών και χημικών μηχανισμών. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί η μέθοδος αποκόλλησης υλικού με λέιζερ (laser ablation) που πραγματοποιείται με την αφαίρεση συγκεκριμένου τμήματος της επιφάνειας του υλικού μέσω λέιζερ υψηλής ενέργειας[32].

1.3 Μικρορευστονικές διατάξεις στη διάγνωση μέσω μοριακών αναλύσεων

Η εφαρμογή των μικρορευστονικών διατάξεων στο πεδίο των βιολογικών μικροηλεκτρομηχανικών συστημάτων (bioMEMS), που διαθέτουν μικρο-κανάλια και μικρο-δομές, σημειώνουν μείζονος σημασίας οφέλη στην απόδοση χειρισμού όλων των τύπων κυττάρων, στον διαχωρισμό τους και την ανίχνευση γενετικών ενδείξεων που προορίζονται για βιολογικές αναλύσεις. Η προσπάθεια για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων κυττάρου και των υποστρωμάτων εφαρμογής στις διατάξεις αυτές, πρόκειται να δώσει περαιτέρω αξιοποίηση των τεχνολογιών αυτών. Για την μελέτη βακτηρίων έχουν χρησιμοποιηθεί διατάξεις που στηρίζονται στην δέσμευση τους [33], τον διαχωρισμό τους[34], την ανίχνευση[35] ή τον συνδυασμό αυτών[36]. Η ακριβής και υψηλή απόδοση ανίχνευση είναι σημαντική σε εφαρμογές που απαιτούν έγκαιρη την ταυτοποίηση μικροοργανισμών σε ακατέργαστα δείγματα, όπως σε βιοχημικές αναλύσεις για ιατρικούς σκοπούς είτε αν αναφέρονται σε δείγματα τροφίμων που περιέχουν παθογόνα μικρόβια. Μέσα σε ένα μικρο-τσίπ μπορεί να λάβει χώρα ο συνδυασμός εργαστηριακών μακροσκελών και δαπανηρών πρωτοκόλλων για την μοριακή ανίχνευση του DNA μετά από λύση βακτηρίων, την εξαγωγή του DNA από αυτά και την ενίσχυση του με μεθόδους μοριακής ενίσχυσης.

Οι Huang G. et al. [37] κατασκεύασαν μια μικρορευστονική πλατφόρμα με πολλές λειτουργικές μονάδες στο εσωτερικό της, με σκοπό την ανάλυση δειγμάτων για την αναγνώριση πολλαπλών παθογόνων που σχετίζονται με την πνευμονία έχοντας την δυνατότητα μεταφοράς σε σημεία φροντίδας (point of care) με όγκο χειρισμού 1,45 μL . Ανιχνεύει ταυτόχρονα 24 είδη παθογόνων μέσω παράλληλων αντιδράσεων σε χρονικό διάστημα 45 λεπτών. Η απόδοση του συστήματος έφτασε το 99,56% μέσω της αξιολόγησης των 229 κλινικών δειγμάτων για τρία παθογόνα: *Mpn*, *S. aureus* (*Sau*) και ένα στέλεχος *MRSA*. Το πλεονέκτημα έναντι της κλασσικής μεθόδου με την μοριακή μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι η μικρή ποσότητα δείγματος αντιδραστηρίων (αντίδραση 1,45 μL όγκος), που έρχεται σε αντίθεση με τις αντιδράσεις των 25 μL για κάθε δείγμα ενίσχυσης που χρησιμοποιούνται στην PCR.

Αναφερόμενοι στην ενίσχυση του DNA που στοχεύει στην ταυτοποίηση του γενοτικού υλικού των μικροοργανισμών μέσω ακατέργαστων δειγμάτων, η ενσωμάτωση της τεχνικής PCR στο εσωτερικό των μικρο-ρευστονικών διατάξεων ήταν απαραίτητη. Η πρώτη εφαρμογή της PCR σε μια μικρο-ρευστοποιημένη συσκευή αναπτύχθηκε το 1998[38]. Ένα δείγμα διοχετεύθηκε σε κανάλι από γυαλί, περνώντας επανειλημμένα από τις τρεις ζώνες λειτουργίας στα θερμοκρασιακά εύρη της PCR. Ένα δείγμα 10 μL εκτελέστηκε για 20 κύκλους ενίσχυσης από 90 δευτερόλεπτα έως 18.7 λεπτά. Η δυνατότητα συνδυασμού προετοιμασίας δείγματος, PCR και ανίχνευσης στην ίδια αυτοματοποιημένη συσκευή υπόσχεται επίσης μείωση του χρόνου χειρισμού καθώς και την πρόληψη της μόλυνσης του δείγματος με την αποφυγή χρήσης των πολλαπλών βημάτων ενίσχυσης στον εργαστηριακό πάγκο.

Για την ανίχνευση του γενετικού υλικού των βακτηριακών κυττάρων, έχουν προταθεί ποικίλοι τρόποι κατασκευής μικρο-διατάξεων PCR ενσωματώνοντας όλα τα βήματα προετοιμασίας που απαιτούνται στην κάθε περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχει η κατηγορία συσκευών με τη δυνατότητα ενίσχυσης του γενετικού υλικού δια της κίνησης του δείγματος μέσω μικρο-καναλιών σε διαφορετικές θερμοκρασιακές ζώνες, και ταυτόχρονα είναι εφικτή η λειτουργία συσκευών στατικής PCR με τα δείγματα να παραμένουν ακίνητα εφαρμόζοντας θερμικούς και ψυχτικούς κύκλους σε ολόκληρη την διάταξη με εξάρτηση από τον χρόνο παραμονής[39].Στις διατάξεις PCR, η παράμετρος των θερμοκρασιακών ευρών είναι κρίσιμη για την απόδοση της διεργασίας. Η εξάλειψη των βημάτων θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της PCR οδηγεί σε α σημαντική απλοποίηση της PCR με την άρση των απαιτήσεων των συστημάτων θέρμανσης και ψύξης. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την ισοθερμική μεθόδους ενίσχυσης του νουκλεϊκού οξέος (Loop-mediated Isothermal Amplification) [40].

Στην περίπτωση χωρικής PCR κατά την κίνηση του υγρού στις θερμοκρασιακές ζώνες, οι Moschou, D. et al. [41] κατασκεύασαν μια πολυμερική μικρο-διάταξη με ένα μαιανδρικό κανάλι μήκους 145 cm με μικροθερμαντικά στοιχεία σε υπόστρωμα PI-χαλκού, εξασφαλίζοντας ενίσχυση DNA σε 5 λεπτά μετά από 30 θερμικούς κύκλους καθώς το δείγμα ρέει από τις θερμοκρασιακές ζώνες στις οποίες η κατανομή της θερμοκρασίας είναι ομοιόμορφη. Επίσης, από τους Tsougeni, K. et al. [42] μελετήθηκε σε ένα ενιαίο μικρορευστονικό θάλαμο η ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *S.*

Typhimurium καθώς η παρουσία του αποτελεί κίνδυνο σε πολλά είδη τροφίμων. Η διάταξη αποτελείται από νανουφασμένη επιφάνεια καναλιών με τεχνολογία πλάσματος και ενσωματωμένα αντισώματα για την ανοσοσύλληψη του DNA των βακτηρίων ακολουθούμενη από την ισοθερμική μέθοδο ενίσχυσης (LAMP). Τέλος, η εφαρμογή ενός βιοαισθητήρα ακουστικών κυμάτων(SAW) ανιχνεύει το σήμα των προϊόντων της μεθόδου ενίσχυσης LAMP, ολοκληρώνοντας την δημιουργία ενός τσιπ για την γρήγορη ανάλυση μικρού όγκου δειγμάτων τροφίμων.

Η ενοποίηση των βημάτων λύσης, εξαγωγής και ανίχνευσης DNA σε ένα θάλαμο αντίδρασης αποτελεί βασικό στόχο των μεμονωμένων εγχειρημάτων βελτιστοποίησης της κάθε διαδικασίας ξεχωριστά. Οι Ma, S. et al. [43] εισάγουν την λύση των κυττάρων, των καθαρισμό και την ενίσχυση του DNA μέσω της PCR σε ένα θάλαμο επεξεργασίας με βάση την αρχή διαχυτικότητας των μορίων. Με την εισαγωγή όλων των αντιδραστηρίων στο ίδιο θάλαμο, η βαθμίδα διάχυσης αλλάζει μεταξύ όλων των βιομορίων και αναλυτών καθιστώντας εφικτή την απομόνωση του DNA από καταστολείς στον ίδιο χώρο.

1.3.1 Μέθοδοι κυτταρικής λύσης σε μικρορευστονικές διατάξεις

Η λύση των κυττάρων για την εξαγωγή των νουκλεϊκών οξέων ή των πρωτεϊνών τόσο στην μακροσκοπική όσο και στην μικροσκοπική αποτελεί κρίσιμο βήμα λειτουργίας στη βιομοριακή ανάλυση. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου λύσης κρίνεται από τα στάδια καθαρισμού των τύπων κυττάρων, τα μόρια-στόχους προς ανάλυση και την ποιότητα των τελικών προϊόντων εξαγωγής[44]. Το 2020, η παγκόσμια αγορά για τα αντιδραστήρια και τον εξοπλισμό κυτταρικής λύσης έφτασε σε αξία σχεδόν 3,64 δισεκατομμύρια δολάρια, με το ρυθμό ανάπτυξης να αυξηθεί κατά 8,47% μεταξύ 2021 και 2026[45].

Σύμφωνα με τις μοριακές αναλύσεις και την εξαγωγή του γενετικού υλικού στις μικρορευστονικές διατάξεις, έχουν προταθεί συστήματα με διαφορετικούς τρόπους προσέγγισης για την διάτρηση και την εξαγωγή του DNA από τα κύτταρα. Μεταξύ αυτών, τα μικροσυστήματα για τη λύση των κυττάρων διακρίνονται ομαδοποιώντας τα σε κατηγορίες με βάση τους μηχανισμούς λύσης τους: χημική, μηχανική, θερμική ή ηλεκτρική. Η αποτελεσματικότητα λύσης αντανακλάται από το χρόνο λύσης, το ποσοστό λύσης με τον αριθμό των διάτρητων κυττάρων, την πολυπλοκότητα κατασκευής και λειτουργίας, καθώς και το κόστος των απαιτούμενων οργάνων[44].

Για την επιτυχία του επόμενου σταδίου της απομόνωσης του DNA από τα κυτταρικά κατάλοιπα, η ταξινόμηση των τεχνικών καθαρισμού νουκλεϊκού οξέος πραγματοποιείται σύμφωνα με τον μηχανισμό που συνδέει τα νουκλεϊκά οξέα με τα υποστρώματα που αλληλεπιδρά όπως η επιφανειακή συγγένεια ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, η διήθηση με νανοπορώδη μεμβράνη και άλλα λειτουργικά μικροσωματίδια εγκλωβισμού. Συμβατικά, οι διαδικασίες εξαγωγής του DNA προέρχονται από εργαστηριακά πρωτόκολλα με χρονοβόρες διαδικασίες και απαίτηση ακριβούς εξοπλισμού περιλαμβάνοντας την διήθηση δείγματος, την φυγοκέντρωση, τη απόσταξη, την αραίωση και την εκχύλιση. Συνεπώς, η επιτυχής κυτταρική λύση σε

συνδυασμό με την απόδοση εξαγωγής του DNA στα μικρο-συστήματα είναι ένα σημαντικό ζήτημα.

Η χημική λύση γίνεται με τη χρήση ρυθμιστικού διαλύματος λύσης που περιέχουν τασιενεργά συστατικά για τη διαλυτοποίηση των λιπιδίων και πρωτεϊνών της κυτταρικής μεμβράνης, δημιουργώντας πόρους στην επιφάνεια της μεμβράνης. Τα ρυθμιστικά διαλύματα λύσης κυττάρων διατίθενται στο εμπόριο και για την υψηλή απόδοση τους σε μικρορευστονικές διατάξεις και έχουν σχεδιαστεί ώστε να μειώνουν την απώλεια δείγματος κατά την χρήση τους και να είναι παράλληλα συμβατά με ενζυματικές αντιδράσεις όπως η αντίστροφη μεταγραφή στο πρωτόκολλο, όπως στην τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ή της ισοθερμικής μεθόδου ενίσχυσης (LAMP). Μια εφαρμογή της χημικής λύσης ως μέρος ενός ολοκληρωμένου μικρορευστονικού κυκλώματος που ενσωματώνει τη λύση των Gram-αρνητικών βακτηριακών κυττάρων (*E. coli*), με την εκχύλιση και ανίχνευση ενός ενδοκυτταρικού ένζυμου, της β-γαλακτοσιδάσης, αναφέρεται από τους Schilling E. A. et al. [46]. Τα κύτταρα εγχέονται σε ένα κανάλι εισόδου μέχρι να συναντήσουν το διάλυμα που περιέχει χημικό παράγοντα λύσης. Καθώς το μίγμα ρέει κατά το μήκος του καναλιού, το αντιδραστήριο έχει το χρόνο για να διαχυθεί στο δείγμα των κυττάρων και να διαταράξει τις μεμβράνες. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος απομακρύνεται και υπολογίζεται ποσοτικά με βιογενετικό ενζυμικό πρωτόκολλο.

Η μηχανική λύση γίνεται με διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών χρησιμοποιώντας μηχανικές δυνάμεις, που περιλαμβάνουν την καταπόνηση με διάτμηση των μεμβρανών, τις δυνάμεις τριβής μεταξύ κυττάρων-υποστρώματος. Οι Kim et al. [47] χρησιμοποίησαν μηχανική μέθοδος για τη λύση των κυττάρων σε ένα περιστρεφόμενο μικρό-CD, περιλαμβάνοντας τις δυνάμεις της τριβής ως συγκρούσεις μεταξύ των κυττάρων και των κοκκωδών σωματιδίων που περιέχονται στο διάλυμα.

Η θερμική λύση περιλαμβάνει τη χρήση υψηλής θερμοκρασίας για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών εντός των κυτταρικών μεμβρανών, καταστρέφοντας τις κυτταρικές μεμβράνες. Παράδειγμα, υψηλής απόδοσης θερμικής λύσης *Escherichia coli* σε ποσοστό 90% σε χρονικό διάστημα 60 s και θερμοκρασία > 60 °C μέσα σε ένα απλό μαιανδρικό κανάλι με ενσωματωμένο ένα θερμοαντίσταση, πραγματοποιήθηκε από τους Packard, M. M. et al. [48], με την θερμοκρασία να ρυθμίζεται εξωτερικά στο εύρος 25-90°C. Η λύση επιβεβαιώθηκε με δοκιμασίες βιωσιμότητας φθορισμού, με δοκιμασία βιοφωταύγειας, και απελευθέρωση DNA που μετρήθηκε με φθορισμομετρία και qPCR. Η ηλεκτρική διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών είναι ακόμη μια κοινή μέθοδος για την απελευθέρωση γενετικού υλικού. Όταν τα κύτταρα εκτίθενται σε εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο, υπάρχει ένα δυναμικό που δημιουργείται σε όλη την κυτταρική μεμβράνη, γνωστό ως διαμεμβρανικό δυναμικό (TMP). Η δημιουργία μικρορευστονικών με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ρεύματος (DC) μεταξύ ηλεκτροδίων που εισέρχονται μέσα στο κανάλι, μπορεί να επιφέρει υψηλή αποτελεσματικότητα λύσης με μικρό κόστος κατανάλωσης ενέργειας[49].

Πέραν των μεθόδων που αναφέρονται παραπάνω, οι προσπάθειες λύσης των κυττάρων εστιάζονται στην χρήση φυσικών αρχών οπτικής και ηχητικών κυμάτων, αναφερόμενοι στους υπερήχους. Σύμφωνα με τους Hellman, A. N. et al. [50] εξετάστηκε η βιοφυσική επίδραση της ακτινοβολίας που προκύπτει από μικροδέσμη λέιζερ σε συσσωματώματα κυττάρων. Όταν ο παλμός λέιζερ εστιάζει στο κυτταρικό διάλυμα, θα δημιουργήσει μια τοπική φουσαλίδα σπηλαιώσης. Η επέκταση και η κατάρρευση της φουσαλίδας μπορεί να δημιουργήσει ένα ωστικό κύμα, το οποίο βοηθά στη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης. Ακόμα, η κατεργασία με υπερήχους είναι μια συμβατική μέθοδος για τη λύση των κυττάρων. Οι Marentis et al. [51] παρουσίασαν με την χρήση υπερήχων, πως η ακουστική ισχύς προσαρμοσμένη σε σταθερό σήμα παλμού εύρους 380MHz οδηγεί σε διάτρηση των κυττάρων καθώς αυτά ρέουν μέσα σε μικροκανάλι. Αυτή η συσκευή δεν χρειάζεται φυσική ή χημική προ-επεξεργασία των κυττάρων, ούτε την ενσωμάτωση σωματιδίων. Εφαρμόζοντας την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) αξιολογήθηκε η λύση βακτηρίων μέσω των υπερήχων και βρέθηκε αποτελεσματική σε ποσοστό 50% των σπορίων του *B. subtilis* μέσα σε 30 δευτερόλεπτα, με δεδομένη την δυσκολία λύσης που έχουν τα σπόρια βακτηρίων λόγω της δόμησης της εξωτερικής τους μεμβράνης. Ένα επιφανειακό ακουστικό κύμα (SAW) που επιδρά στα βιολογικά μόρια είναι ένα κινούμενο κύμα πλάτους της τάξης των νανομέτρων που διαδίδεται στην επιφάνεια ενός υποστρώματος μέσω του πιεζοηλεκτρικού φαινομένου. Στην εργασία τους, οι Wang, S et al. [52], σε μικροτσιπ που αποτελείται απλώς από ένα κομμάτι κρυσταλλικού υποστρώματος LiNbO_3 , όταν ένα σταγονίδιο κυτταρικού εναιωρήματος πέφτει στην επιφάνεια του μικροτσιπ που περιέχει σταγονίδια από μικροσωματίδια, τα κύτταρα και τα μικροσωματίδια επιταχύνονται και συγκρούονται μεταξύ τους. Η κυτταρική μεμβράνη καταστρέφεται αποτελεσματικά και οι πρωτεΐνες, καθώς και τα νουκλεϊκά οξέα του κυττάρου απελευθερώνονται.

1.3.2 Επίδραση τοπογραφίας επιφανειών στην προσκόλληση και λύση βακτηρίων

Με την προσθήκη της τοπογραφίας των νανοδομών πάνω στις επιφάνειες με διαστάσεις που πλησιάζουν αυτές των κυττάρων, η μεταξύ τους αλληλεπίδραση μπορεί να φανεί χρήσιμη για την ακριβέστερη μελέτη των μεμονωμένων κυττάρων και της διαδικασίας της κυτταρικής λύσης σε ολοκληρωμένες μικρορευστονικές διατάξεις. Το αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης των βακτηρίων με επιφάνειες καθορίζεται από φυσικοχημικούς παράγοντες (επιφανειακό φορτίο, υδροφοβικότητα) και την τοπογραφία (τραχύτητα, σκληρότητα) του υλικού υποστρώματος, καθώς και του περιβάλλοντος που βρίσκεται πλησιέστερα στην κυτταρική μεμβράνη [53]. Συγκεκριμένα, η τοπογραφία έχει αντίκτυπο στη συμπεριφορά των βακτηρίων, όπως στην προσκόλληση αυτών και ανάπτυξη βιο-φιλμ στην επιφάνεια [54]. Ο όρος τοπογραφία αντιπροσωπεύει την διαμόρφωση της επιφάνειας στο τρισδιάστατο χώρο και σε πολλές περιπτώσεις, η επιθυμητή τοπογραφία προσδιορίζεται από την λειτουργικότητα/χρήση της επιφάνειας που μας ενδιαφέρει. Οι Bos, R. et al. [34], με την κατασκευή τοπογραφίας με λιθογραφική μέθοδο, αποτελούμενη από μικρο-μοτίβα υδρόφοβων και υδρόφιλων τμημάτων πλάτους 10μm και 20μm, αντίστοιχα, σε μικρο-θάλαμο υπό υδροδυναμικές

συνθήκες, ανέδειξαν διαφοροποιήσεις στον πληθυσμό των βακτηρίων που προσκολλώνται στα δύο τμήματα, με την υδροφοβικότητα του υποστρώματος να είναι κύριος παράγοντας κατακράτησης των βακτηρίων.

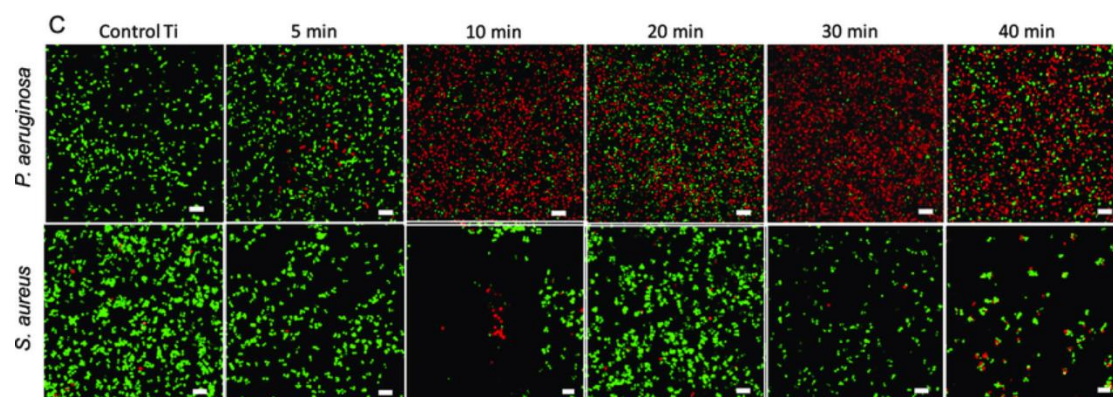
Η αλλαγή της τοπογραφίας συνοδεύεται με αλλαγή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας. Επίσης, το μέγεθος και το σχήμα των μοτίβων της κάθε τοπογραφίας που διαμορφώνονται στην επιφάνεια οδηγεί σε διαφορετική αλληλεπίδραση των διάφορων τύπων κυττάρων με την επιφάνεια[55]. Στην μικρο-και νανο-κλίμακα έχει αποδειχθεί ότι τα κύτταρα και οι μηχανισμοί ανάπτυξης τους είναι σε θέση να ανταποκριθούν στις δομές αυτές. Συγκεκριμένα, κατά την προσκόλληση σε ένα υπόστρωμα, ο κυτταρικός πληθυσμός ανιχνεύει το περιβάλλον του στο οποίο κινείται σε διαστάσεις νανοκλίμακας, καθώς και η δική τους επιφάνεια είναι δομημένη στο επίπεδο της νανοκλίμακας με υποδοχείς και κυτταρικές προεξοχές, όπως τα φιλοπόδια που έχουν μεγέθη στην περιοχή νανομέτρων 250–400 nm [56]. Τα βακτήρια προσκολλώνται στην επιφάνεια των υλικών με δυνάμεις όπως η δύναμη Coulomb, η δύναμη Van-der-Waals ή δεσμών υδρογόνου. Η συσσωμάτωση των βακτηρίων με τον συνδυασμό των δυνάμεων αυτών μπορεί να οδηγεί σε μη αναστρέψιμη προσκόλληση στην επιφάνεια, σε επαγωγή μηχανισμών του σχηματισμού βιοφίλμ, αλλαγή της κινητικότητας τους μέσω των μαστιγίων που διαθέτουν, καθώς και να προκύψει αποσύνθεση συστατικών της εξωκυττάριας μήτρας μέσω αποκρίσεων με το γύρω περιβάλλον που σηματοδοτεί την έναρξη στρεσογόνων συνθηκών[57].

Σύμφωνα με τους A J Scardino et al. [58] τα βακτήρια επιλέγουν τις θέσεις της τοπογραφίας σε συγκεκριμένα σημεία προσκόλλησης. Όταν οι οργανισμοί είναι μικρότεροι από το χαρακτηριστικό μέγεθος των επιφανειών, τότε τα κύτταρα παρέχουν μεγάλη διαθέσιμη επιφάνεια επαφής, με την προσαρμογή τους στις επιφάνειες αυτές. Παράλληλα, οι Vadillo-Rodríguez, V. et al. [59] έδειξαν ότι τα βακτήρια τείνουν να προσκολλώνται, κατά προτίμηση σε τετραγωνισμένες γωνίες και κυρτά σημεία, μεγάλης τραχύτητας, παρά σε επίπεδα ή κοίλα υποστρώματα, δοκιμάζοντας τα γένη *Staphylococcus S. epidermidis* και *S. aureus* σε τοπογραφικά χαρακτηριστικά που περιλαμβάνουν διαφορετικά μοτίβα επιφάνειας σε PDMS υπόστρωμα.

Επίσης, η μηχανική της τοπογραφίας που οδηγεί σε μη προσκολλητικές ιδιότητες ή ιδιότητες προσρόφησης και συσσώρευσης των βακτηρίων δεν οδηγεί απαραίτητα και σε κυτταρικό θάνατο. Ο συνδυασμός υλικού υποστρώματος με αντιβακτηριακή δράση μαζί με άλλους μηχανισμούς που περιγράφονται παραπάνω είναι πιθανό να επιφέρει διάτρηση των κυττάρων. Ένα παράδειγμα μελέτης που συνδυάζει την βακτηριακή προσκόλληση, με την ανάπτυξη και την βιωσιμότητα των βακτηρίων, περιγράφεται από τους Ge, X. et al. [60] όπου προτείνουν ένα μοντέλο υποστρώματος με διπλό συνδυασμό. Ο συνδυασμός των μηχανισμών αποτελείται από α) περιοδικών σε συστοιχία μικρο/νανο-κολώνων TiO_2 για την κατανόηση των τοπογραφικών στατικών επιδράσεων και της β) φωτοκαταλυτική βακτηριοκτόνο δράση του TiO_2 όταν αυτή εφαρμόζεται στα γένη βακτηρίων *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) και του *Escherichia coli* (*E. coli*). Το αποτέλεσμα της μελέτης αποδεικνύει ότι η αντιβακτηριακή ιδιότητα οφείλεται στην συστοιχία μικρο/νανο-κολώνων που μειώνει

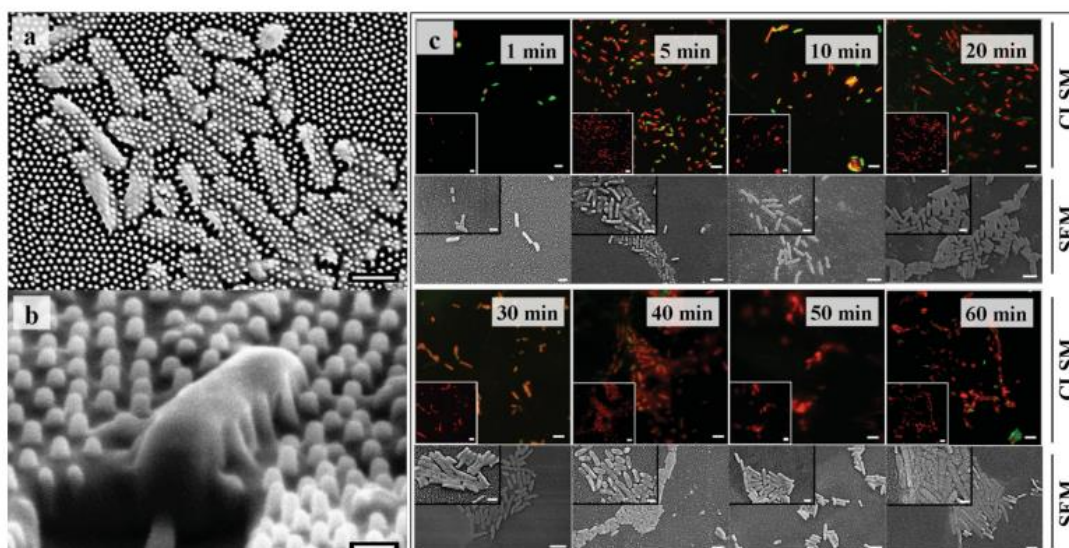
σημαντικά την προσκόλληση των βακτηριακών πληθυσμό σε 24 h, χωρίς την επίδραση της φωτοκαταλυτικής δράση του TiO₂ εφόσον τα κύτταρα επεξεργάστηκαν υπό συνθήκες σκότους.

Επίσης, αναφέρονται περιπτώσεις που ο κυτταρικός εμβολιασμός σε επιφάνειες μικροϋφασμένες χωρίς κάποια χημική επέμβαση στο μεταλλικό υπόστρωμα μπορεί να επιφέρει σημαντικές τάσεις παραμόρφωσης στις μεμβράνες των κυττάρων, μεγαλύτερες από τις δυνάμεις ελαστικότητας των μεμβρανών, με τελικό αποτέλεσμα την ρήξη τους. Η διάτρηση των κυττάρων συμβαίνει μηχανικά και ανεξάρτητα της χημείας των επιφανειών, όπως περιγράφεται στην μελέτη των Linklater, D. P. et al.[61]. Με τεχνική εγχάραξης πλάσματος σε υπόστρωμα τιτανίου Ti δημιουργήθηκαν κάθετες ευθυγραμμισμένες μικρο-κολώνες για διαφορετικούς ρυθμούς εγχάραξης με τραχύτητα επιφάνειας σε διαφορετικά προφίλ ύψους από 1,5 έως 0,5 μm. Για τη μελέτη των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων των επιφανειών χρησιμοποιήθηκαν παθογόνα βακτήρια *P. aeruginosa* και *S. aureus* με διάρκεια επώασης 18 ωρών. Ως αποτέλεσμα βρέθηκε ότι η μέγιστη απόδοση θανάτωσης ήταν 87 % για τα υποστρώματα που υποβλήθηκαν σε εγχάραξη 30 λεπτών στα κύτταρα *S. Aureus*, ενώ ο πληθυσμός των βακτηρίων *P. aeruginosa* συνέχισε να αυξάνεται όσο αυξανόταν ο χρόνος χάραξης, υποδεικνύοντας πως και ο τύπος κυττάρου παίζει ρόλο στο μηχανισμό αλληλεπίδρασης με την τοπογραφία.



Σχήμα 1.3.2.1: Ποσοστό προσκολλημένων κυττάρων ανά cm² χρησιμοποιώντας με εστιακή μικροσκοπία λέιζερ(CLSM). Με πράσινο σημειώνονται τα βιώσιμα κύτταρα και με κόκκινο τα μη βιώσιμα για χαρακτηριστικούς χρόνους εγχάραξης του Ti 5 min, 10 min, 20 min 30 min, και 40 min[61].

Μελέτες για την θανάτωση κυττάρων έχουν γίνει σε τοπογραφίες χαρακτηριστικές των φτερών εντόμων τεττιγοειδών(Cicadoidea ή cicadas) μέσω λιθογραφικών μεθόδων σε μεταλλικά, οργανικά και πολυμερικά υποστρώματα[62],[63]. Οι επιφάνειες των πτερυγίων των cicadas καλύπτονται με πυκνά δομές νανοκολώνων που επιτρέπουν τη διείσδυση των βακτηρίων ανάμεσα στις κολώνες με αποτέλεσμα τη διάτρηση των μεμβρανών τους[64]. Οι Ivanova, E. P., [65] για το στέλεχος *Pseudomonas aeruginosa* στο(Σχήμα 1.3.2.2) δείχνουν την προσκόλληση των βακτηρίων και την μείωση της βιωσιμότητας του πληθυσμού με τον χρόνο παραμονής.

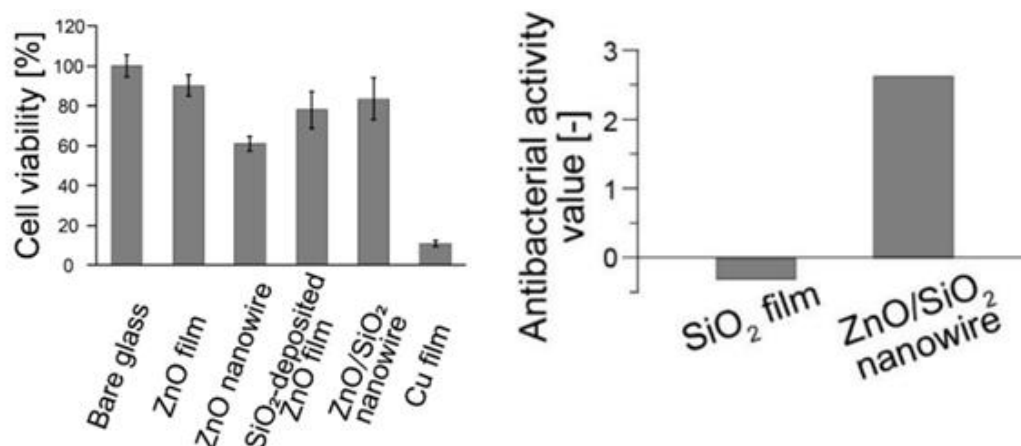


Σχήμα 1.3.2.2: α) Τα κύτταρα διεισδύουν στις νανοκολώνες στην επιφάνεια των φτερών με κλίμακα 1 μm . β) Φωτογραφία SEM εικόνα ενός κυττάρου *P. aeruginosa* που βυθίζεται σε μεγέθυνση 65.000 \times και κλίμακας 200nm. γ)Εστιακή μικροσκοπία λέιζερ CLSM για εικόνες φθορισμού με το βιολογικό πρωτόκολλο SYTO 9, πράσινο χρώμα στα ζωντανά κύτταρα, ενώ τα νεκρά κύτταρα χρωματίζονται με ιωδιούχο προπίδιο, που υποδεικνύεται με κόκκινο, σε κλίμακα 5 μm [65].

Για την μεταφορά τοπογραφικών χαρακτηριστικών στην κατασκευή μικρο-διατάξεων έχουν προταθεί νανούλικά με αντιβακτηριακή δράση, όπως είναι τα νανοδοματίδια(NPs) μεγέθους 1-100nm[66] και ο σχηματισμός νανοσυρμάτων (nanowires) από αντιβακτηριακά υλικά όπως ο αργυρός (Ag) με την εφαρμογή λιθογραφικών τεχνικών σε υποστρώματα [67]. Επίσης γενικότερα έχουν προταθεί νανοδομές όπως νανοςύρματα (nanowires), νανοϊνες (nanofibers), νανοςωλήνες, (nanotubes), νανοζώνες (nanobelts)και νανοφύλλα (nanosheets), λαμβάνοντας υπόψη τους διαφορετικούς προσανατολισμούς, μορφολογίες και χαρακτηριστικά τους [68]. Τα υλικά για την κατασκευή των επιθυμητών νανοδομών προκύπτουν κυρίως από μια σειρά οξειδίων των μετάλλων όπως το οξείδιο τιτανίου(TiO_2), το χρυσό(Au),οξείδιο του χαλκού(CuO), και οξείδιο ψευδαργύρου(ZnO), και τον χρυσό(Au), και το πυρίτιο(Si)[[69],[70]].

Οι Shimada, T. et al [71] με την τεχνολογία νανοδόμησης από κάτω προς τα άνω ('bottom-up') ανέπτυξαν τοπογραφίες νανοσυρμάτων ZnO/SiO_2 με διάμετρο 71 nm και ύψος στο εύρος των 800 με 1200 nm, με μέση απόσταση μεταξύ αυτών 110 nm και πυκνότητα νανοσυρμάτων ανά επιφάνεια ίση με 83 νανοςύρματα/ μm^2 . Συγκεκριμένα, η μέθοδος νανοκατασκευής αποτελείται από την δημιουργία νανοσυρμάτων (core-shell) ZnO-SiO_2 με υδροθερμική σύνθεση του πυρήνα ZnO, ακολουθούμενη από εναπόθεση με SiO_2 . Όταν το στέλεχος *E.coli* DH5a επώαστηκε στις αντιβακτηριακές αυτές επιφάνειες για 24 ώρες, πάνω από το 99% των βακτηρίων δεν επέζησαν, ενώ περισσότερο από το 80% των κυττάρων HeLa που παρέμειναν στην επιφάνεια για 24

ώρες εξακολουθούσαν να μένουν ζωντανά. Ως αποτέλεσμα της αρχιτεκτονικής αυτής, η μηχανική ρήξη των μεμβρανών στα βακτήρια ήταν αρκετά ικανοποιητική σε σχέση με τα επιθηλιακά κύτταρα HeLa.



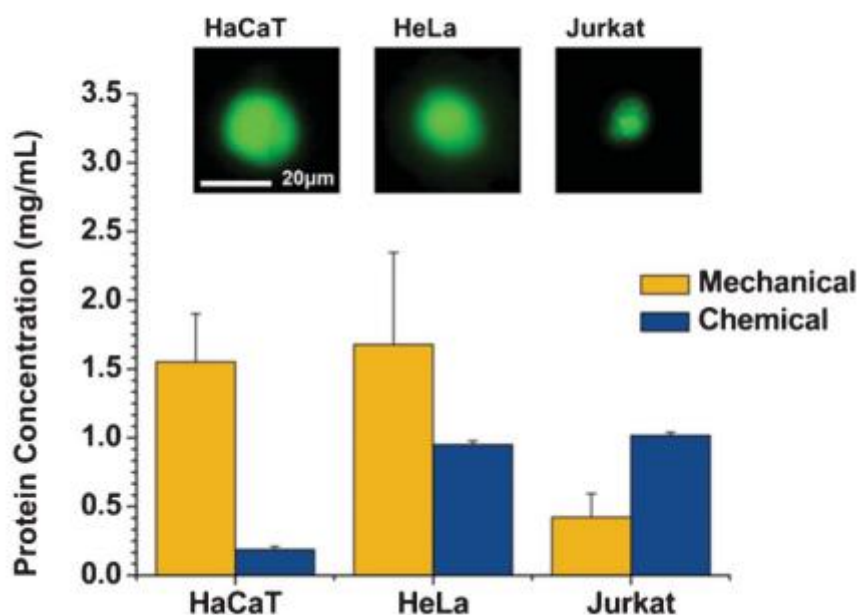
Σχήμα 1.3.2.3: α) Κυτταρική βιωσιμότητα των επιθηλιακών κυττάρων HeLa που επώαστηκαν σε διάφορα υποστρώματα για 24h. β) Αντιβακτηριακή δραστηριότητα των *E.coli* που επώαστηκαν για 24 h σε υποστρώματα SiO₂ και ZnO-SiO₂ νανοσυρμάτων [71].

1.4 Μηχανική λύση κυττάρων σε επιφάνειες μικρορευστονικών διατάξεων

Στηριζόμενοι στο ρόλο της τοπογραφίας των επιφανειών που αναφέρθηκαν στην Ενότητα 1.3 από την βιβλιογραφία, είναι εμφανείς οι προσπάθειες βελτιστοποίησης των ήδη αναπτυγμένων μικρο-ρευστονικών διατάξεων στις βιολογικές εφαρμογές ανάλυσης και ανίχνευσης μικροοργανισμών, όσο και την εύρεση νέων πρότυπων διατάξεων. Παρακάτω, θα αναφερθούν από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση διατάξεις λύσης θηλαστικών και βακτηριακών κυττάρων με έμφαση στην μηχανική λύση μέσω διατάξεων που στοχεύουν στην επιτυχή έκλυση των ενδοκυττάρων βιομορίων, DNA ή πρωτεϊνών προς ανάλυση. Το ενδιαφέρον στη μηχανική λύση με επίκεντρο την τοπογραφία που αναπτύσσεται στα υποστρώματα ενδιαφέροντος βασίζεται στο γεγονός ότι σε σχέση με συμβατικές μεθόδους (χημικής, υπερήχων, ηλεκτρικής ή θερμικής) λύσης, ακολουθείται μια διαδικασία αποδεσμευμένη από χημικά αντιδραστήρια, κατανάλωση ενέργειας ή τη χρήση σύνθετων εξαρτημάτων.

Οι Kim et al [72] συνέθεσαν νανοσύρματα (nanowires) ZnO με δύο διαφορετικές τεχνικές α) μέσω της υδροθερμικής μεθόδου *in situ* μέσα σε μικροκανάλια, και β) μέσω της ανάπτυξης των νανοσυρμάτων σε θερμό ύδωρ με χαρακτηριστικές μηχανικές και γεωμετρικές ιδιότητες. Σημαντικό παράγοντα αποτελεί το μήκος των νανοσυρμάτων για την αποτελεσματικότητα της μηχανικής λύσης των κυττάρων εξαιτίας του διαθέσιμου χώρου που δημιουργείται μεταξύ της συστοιχίας των νανοσυρμάτων και

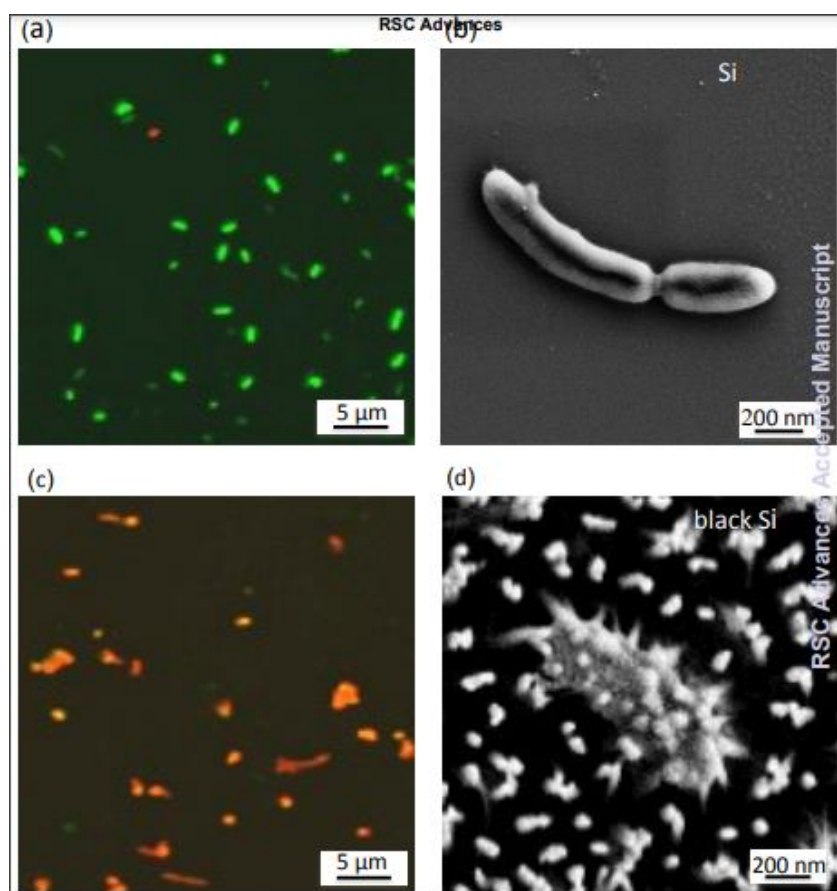
των κυττάρων καθώς αυτά ταξιδεύουν μέσα στο κανάλι, καθώς και η γεωμετρία και διευθέτηση στο χώρο των ZnO. Τα αποτελέσματα από την μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεϊνών των κυττάρων HaCaT, HeLa και Jurkat στα μικροκανάλια, υποδεικνύουν ότι τα κύτταρα έχουν την ικανότητα να λύνονται μετά από διάτμηση των μεμβρανών τους, με απόδοση μεγαλύτερη της χημικής μεθόδου που εξετάστηκε για τον κάθε τύπο κυττάρων με χαρακτηριστική διάμετρο 20, 10 και 15 μm , αντίστοιχα (Σχήμα. 1.4.1).



Σχήμα 1.4.1: Πρωτεϊνικές συγκεντρώσεις (mg/mL) λυμένων κυττάρων HaCaT, HeLa και Jurkat με μηχανική μέθοδο που χρησιμοποιεί μικροσυστοιχίες νανοσυρμάτων ZnO σε μικροκανάλια σε σύγκριση με χημική λύση[72].

Οι Wang, X. et al. [73] σε νανοϋφασμένο κανάλι κατασκευής με τοπογραφία νανοακίδων (nanospikes) μαύρου πυριτίου (bSi), έδειξαν 99% ποσοστό θανάτωσης ενάντια των βακτηρίων *Pseudomonas aeruginosa* και *E.coli* K12. Παράλληλα, διαπίστωσαν καλύτερης απόδοσης έκλουση στην συγκέντρωση πρωτεϊνών μέσω της μηχανικής λύσης έναντι της χημικής και της λύσης υπερήχων που χρησιμοποιήθηκαν κατά την σύγκριση και την αξιολόγηση του συστήματος. Εκτιμήθηκε ο βαθμός θανάτωσης των *E.coli* K12 ίσος με $2,3 \times 10^3 \text{CFU}/\text{min}/\text{cm}^2$, όπως προέκυψε από μέτρηση βιωσιμότητας του αριθμού των επιζώντων κυττάρων σε τρυβλία, ορίζοντας αρχική συγκέντρωση βακτηρίων $10^8 \text{CFU}/\text{ml}$. Σε συνθήκες ροής το διάλυμα των βακτηρίων εισέρχεται μέσω διαδοχικών κύκλων πλήρωσης του στο κανάλι, διαστάσεων 15 μm ύψους και με εμβαδού επιφάνειας του μαύρου πυριτίου ίσο με 1x2 cm^2 . Στην επιφάνεια του μαύρου πυριτίου, ως αποτέλεσμα της εγχάραξης πλάσματος, παρήχθησαν νανοακίδες σε μορφή μολυβιού με διάμετρο 20nm και ύψος 500nm. Με πρωτόκολλα τεχνικών χρώσης με ιωδιούχο προπίδιο (κόκκινο) για μη βιώσιμα και SYTO 9 (πράσινο) των βιώσιμων κυττάρων αποδείχτηκε η βακτηριοκτόνος δράση του μαύρου πυριτίου, και με SEM παρουσιάζεται η αλλαγή στην μορφολογική

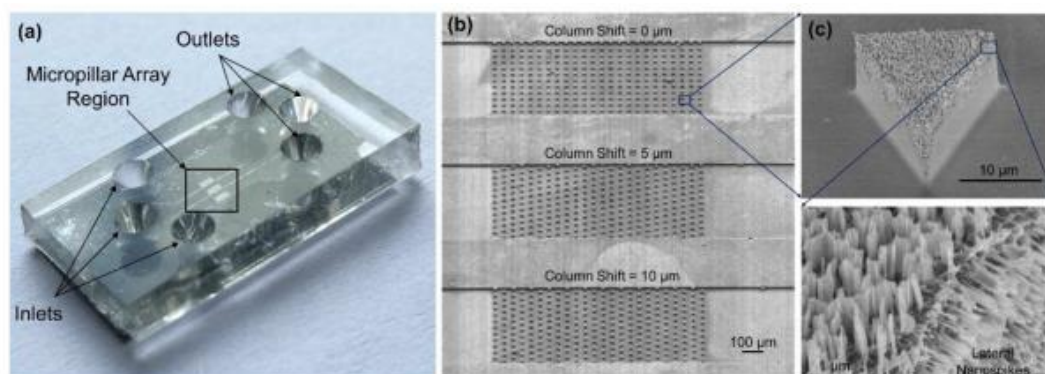
συμπεριφορά των κυττάρων(Σχήμα 1.4.2), όπου τα κύτταρα εγκλωβίζονται στις αιχμηρές ακίδες του μαύρου πυριτίου και τεντώνονται μέχρι να επέλθει η ρήξη τους.



Σχήμα 1.4.2: (a)-(c) Εικόνες με συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού, όπου με πράσινο απεικονίζονται τα ζωντανά και με κόκκινο τα νεκρά κύτταρα *Pseudomonas aeruginosa*. (b)-(d) Εικόνα SEM προσκόλλησης κυττάρων σε επιφάνεια ελέγχου επίπεδου πυριτίου και στην επιφάνεια του μαύρου πυριτίου (black silicon-bSi)[73].

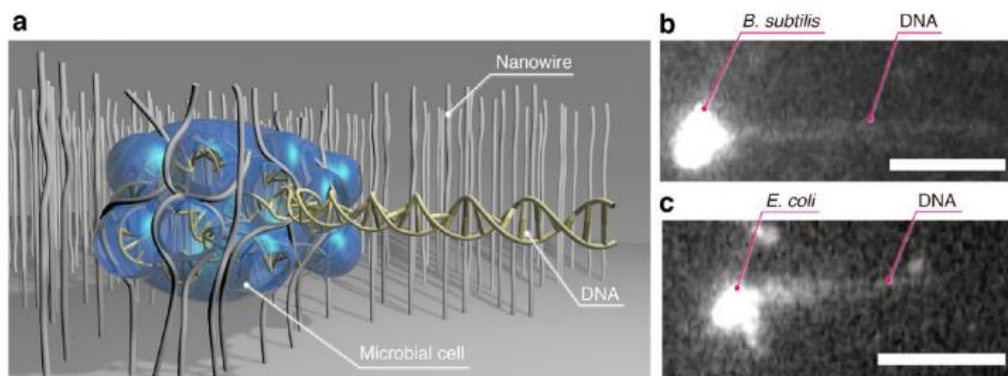
Οι Li. L et al.[74] χρησιμοποιώντας την λιθογραφία UV με βαθιά εγχάραξη ιόντων σε υποστρώματα πυριτίου και οξειδίου του πυριτίου κατασκεύασαν πλευρικές νανοακίδες πυριτίου σε σειρά μικροκολώνων μέσα σε κανάλι. Μετά από προσομοιώσεις στο προφίλ της ταχύτητας των βακτηρίων κατά το πέρασμα τους από το κανάλι, με χαρακτηριστικό μέγεθος στο εύρος των 2μm, κατασκευάστηκαν οι συστοιχίες των μικροκολώνων με τρεις τριγωνικές μετατοπίσεις ως προς την οριζόντια κατεύθυνση της ροής, 0, 5 και 15μm, για τον έλεγχο της βιωσιμότητας(Σχήμα 1.4.3). Ως προς την βακτηριοκτόνο δράση για το *E.coli* DH5a, παρουσιάστηκε μείωση στον αριθμό CFU κατά 80% στο κανάλι με τις νανοακίδες πυριτίου ενώ στο απλό κανάλι μόνο με την συστοιχία των μικροκολώνων εμφανίστηκε μείωση 19%, με αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων $\sim 10^6$ CFU/ml. Για την ανίχνευση των ενδοκυττάρων προϊόντων λύσης με πρωτόκολλο μέτρησης του βακτηριακού ATP (adenosine triphosphate) μέσω

φωτόμετρου εμφανίστηκε υπερδιπλάσια αύξηση της συγκέντρωσης του σε σύγκριση με τη συσκευή χωρίς την ύπαρξη των νανοακίδων.



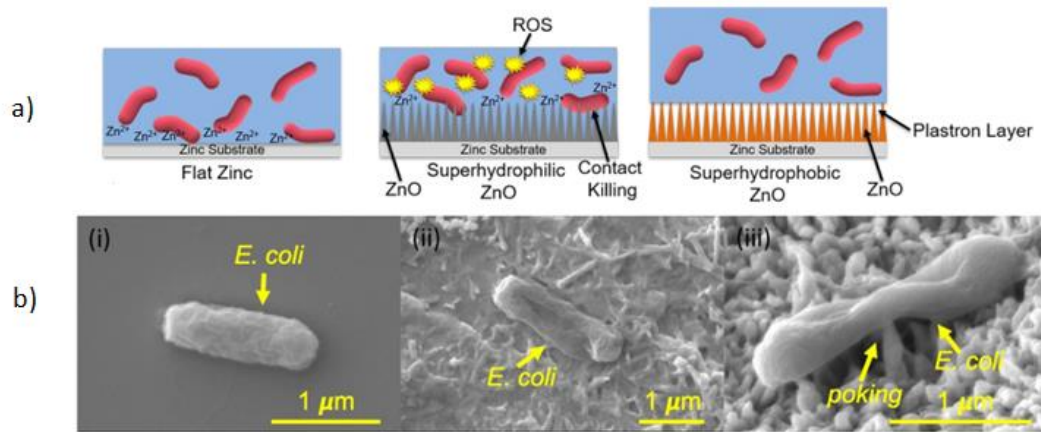
Σχήμα 1.4.3: Φωτογραφία της ολοκληρωμένης συσκευής με κάλυμμα PDMS πάνω από το τσιπ πυριτίου. (β) Εικόνες SEM τριών ξεχωριστών μικροκαναλιών που το καθένα περιέχει μια συστοιχία μικροκολώνων με διαφορετικές διατάξεις πυλώνων. (γ) Εικόνα SEM τριγωνικού σχήματος μικροκολώνων με πλευρικές και κορυφαίες αιχμές πυριτίου [74].

Μια λεπτομερής περιγραφή της μηχανικής λύσης μέσω της δράσης των νανοσυρμάτων στην διάτμηση των κυτταρικών μεμβρανών αναφέρεται από τους Yasui, T. et al. [75], που στοχεύουν στην μηχανική ρήξη των κυττάρων *Bacillus subtilis* και *Escherichia coli* μέσω ευέλικτων νανοσυρμάτων SiO_2 διαμέτρου 30 nm και μήκους 2 μm με πυκνότητα ~ 60 νανοςύρματα/ μm^2 , καθώς και νανοςύρματα από SnO_2 με διάμετρο 10 nm. Πραγματοποιήθηκαν διάφορων διαστάσεων κατασκευή νανοσυρμάτων και χαρακτηρίζονται από το ποσοστό βιωσιμότητας των κυττάρων. Εφαρμόζοντας εξωτερικές δυνάμεις, ηλεκτρικού πεδίου και ροής σε μικροκανάλι με δομές ψαροκόκκαλου, ανιχνεύτηκε ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο τα βακτηριακά κύτταρα διαρρηγνύονται. Ο εγκλωβισμός, η τάση διάτμησης και η ανομοιόμορφη τοποθέτηση των κυττάρων καθώς αυτά προσκολλώνται στην ενδιάμεση απόσταση των νανοσυρμάτων (Σχήμα 1.4.4), οδηγούν σε ρήξη των μεμβρανών και έκλυση των μορίων DNA (χωρίς την απευθείας ρήξη των μεμβρανών από τις αιχμηρές εξοχές των νανοσυρμάτων).



Σχήμα 1.4.4: (a) Σχηματική απεικόνιση του εγκλωβισμού της κυτταρικής μεμβράνης ενός κυττάρου *B. subtilis* που προκαλείται από τα νανοσύρματα (b) Η ένταση φθορισμού των μορίων DNA μετά τη ρήξη της μεμβράνης υπό την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου[75].

Οι Milionis et al. [76] αναφέρουν ότι το επίπεδο Zn και το νανοδομημένο ZnO παρουσιάζουν αντιμικροβιακές ιδιότητες όταν τα βακτήρια έρχονται σε επαφή με την επιφάνεια τους. Από το (Σχήμα 1.4.5 a)) φαίνεται ότι η αντιβακτηριακή δράση οφείλεται στην απελευθέρωση ιόντων ψευδαργύρου (Zn^{2+})για το επίπεδο Zn. Επιπρόσθετα, στην περίπτωση του υπερυδροφίλου ZnO, οι αιχμηρές νανοδομές του ZnO είναι σε θέση να προκαλέσουν τη διάτρηση των κυτταρικών τοιχωμάτων, παρουσιάζοντας έναν επιπλέον μηχανισμό θανάτωσης, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.4.5 a). Με εικόνες SEM (Σχήμα 1.4.5b)) εντοπίζεται η βακτηριοκτόνος δράση που οφείλεται στο διπλό μηχανισμό των θετικών ιόντων και της νανοδόμησης του υποστρώματος. Στο Σχήμα 1.4.5 b(i) παρατηρείται η μορφολογία του *E. coli* να παραμένει άθικτη χωρίς καμία βλάβη στο κυτταρικό της τοίχωμα επάνω στην γυάλινη καλυπτρίδα ως επιφάνεια αναφοράς. Αντίθετα, στο (Σχήμα 1.4.5 b(ii))σε επίπεδα δείγματα ψευδαργύρου(Zn)φαίνεται η παραμόρφωση του κυτταρικού τοιχώματος να είναι πιο τραχιά. Αυτό οφείλεται στην ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των απελευθερωμένων ιόντων ψευδαργύρου με το κυτταρικό τοίχωμα κοντά στην επίπεδη επιφάνεια του Zn. Επίσης, οι αιχμηρές νανοδομές προκαλούν την παραμόρφωση των κυττάρων του *E. coli*. και οδηγούν σε διάτρηση του κυτταρικού τοιχώματος στις νανοδομές της υπερυδροφίλης επιφάνειας ZnO από το Σχήμα 1.4.5 b(iii).



Σχήμα 1.4.5: a) Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων επιφάνειας-βακτηρίων σε επίπεδο υπόστρωμα Zn, σε νανοδομημένες υπερυδρόφιλες επιφάνειες ZnO, και σε νανοδομημένες υπερυδρόφοβες επιφάνειες ZnO. b) Μορφολογία *E.coli* σε (i) γυάλινη καλυπτρίδα, (ii) σε επίπεδη επιφάνεια Zn και (iii) σε νανοδομημένη υπερυδρόφιλη επιφάνεια ZnO [76]

1.5 Σκοπός της εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας επικεντρώνεται στη χρήση νανοδομημένων επιφανειών ZnO για τη δημιουργία αντιβακτηριακών επιφανειών και τη χρήση αυτών σε μικροκανάλια για τη λύση βακτηρίων, καθώς και τη μελέτη του μηχανισμού λύσης των βακτηριακών κυττάρων. Μέσω της αναζήτησης στη βιβλιογραφία για μικρορευστονικές διατάξεις όπου έχει επιτευχθεί λύση βακτηρίων εντοπίζουμε διάφορους μηχανισμούς που λαμβάνουν μέρος μεταξύ κυττάρων και επιφανειών, στοχεύοντας στη διερεύνηση του ρόλου του υποστρώματος οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) στην αντιβακτηριακή δράση και την κυτταρική θνησιμότητα που επιφέρει υπό συγκεκριμένες συνθήκες. Ξεκινώντας από την αντιβακτηριακή δράση επιφανειών που μελετάμε και μέσω χρήσης βιολογικών πρωτοκόλλων ανίχνευσης του εκλυόμενου DNA, εν συνεχεία κατασκευάζουμε ένα απλό μαιανδρικό κανάλι με νανοδομημένη επιφάνεια σε υπόστρωμα ZnO συνολικής ενεργής επιφάνειας $2,8 \text{ cm}^2$. Αφού αποδείχθηκε η αντιβακτηριοκτόνος δράση επιφανειών νανοδομημένου ZnO, κατασκευάστηκε μικρο-κανάλι με ενσωματωμένη λειτουργική επιφάνεια ZnO ώστε να διερευνηθεί εάν η βακτηριοκτόνος δράση μεταφέρεται αποτελεσματικά σε ένα κανάλι ροής. Η χρήση ενός τέτοιου μικρορευστονικού καναλιού με την συγκεκριμένη τεχνολογία, καθώς και με τη δυνατότητα έκλυσης DNA, θα μπορούσε να βρει εφαρμογή σε τομείς της βιομηχανίας τροφίμων ή της περιβαλλοντικής ασφάλειας, για την ανίχνευση και ανάλυση βακτηρίων.

Η μέθοδος δημιουργίας της τοπογραφίας στο ZnO είναι μια απλή, γρήγορη μέθοδος παραγωγής νανοακίδων στην επιφάνεια με την χρήση θερμού ύδατος. Η αντιβακτηριακή δράση πηγάζει από την τοπογραφία και τη χημική συμπεριφορά της επιφάνειας. Παράγοντες όπως η τραχύτητα των νανοδομών, η έκλυση χημικών μορίων και συμπλόκων του Zn^{+2} , καθώς και η παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) με την επίδραση του φωτός, μπορούν συνεργατικά η μη να οδηγούν στο επιθυμητό αποτέλεσμα της λύσης βακτηρίων μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Εισάγοντας διαφορετικές βακτηριακές συγκεντρώσεις cfu/ml, με διάφορους χρόνους παραμονής του κυτταρικού πληθυσμού στα μικρο-κανάλια, στατικά ή υπό ροή, εξάγουμε συμπεράσματα για την αντιβακτηριακή δράση των υποστρωμάτων και τη λύση των βακτηρίων, και προσπαθούμε όσο το δυνατόν καλύτερα να κατανοήσουμε τους παραπάνω μηχανισμούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

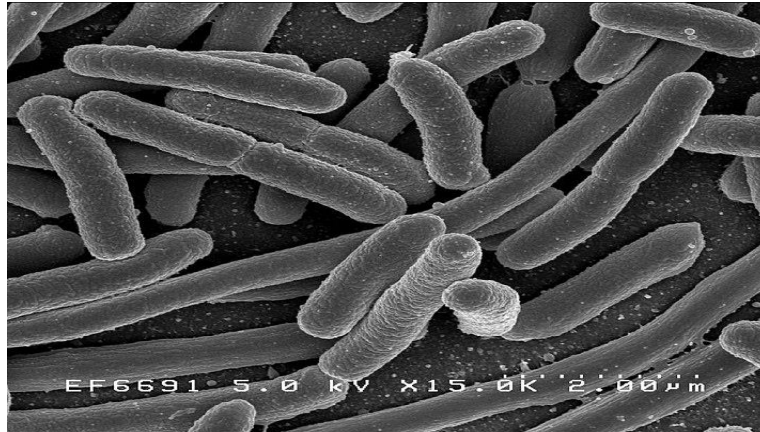
2.1 Μέθοδοι προσδιορισμού αντιβακτηριακής δράσης επιφανειών

Η αντιβακτηριακή δράση νανοδομημένων επιφανειών ή νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων στους μικρο-οργανισμούς, έχουν μελετηθεί εκτενώς από την ερευνητική κοινότητα. Οι περισσότερες τεχνικές και μέθοδοι που βασίζονται σε πρωτοκόλλα αντιβακτηριδιακών δοκιμών[77,78] περιλαμβάνουν: τη μέτρηση οπτικής πυκνότητας με φασματοφωτόμετρο[79], τις συσκευές κυτταρομετρίας ροής[80], το εμβολιασμό των κυττάρων και τη μέτρηση αποικιών σε στερεό θρεπτικό άγαρ(CFU plate counting)[81], τον προσδιορισμό με την βοήθεια φθορίζουσών χρωστικών για την διάκριση ζωντανών-νεκρών κυττάρων και την οπτικοποίηση του δείγματος[82], τον σχηματισμό των ζωνών αναστολής σε στερεό θρεπτικό υλικό[83], καθώς και τις χρωματογραφικές μεθόδους ελέγχου κυτταροτοξικότητας με αντιδραστήρια MTS/MTT/XTT για την αξιολόγηση της μεταβολικής δραστηριότητας των κυττάρων[84]. Επίσης, υπάρχουν οι ποσοτικές μέθοδοι της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και σε πραγματικό χρόνο αντίδρασης (RT-PCR) στοχεύοντας στην ενίσχυση των μορίων DNA από ένα μίγμα βιομορίων και την ανίχνευση τους σε μικρές συγκεντρώσεις DNA[85].

Οι τεχνικές που ακολουθήσαμε στην ανάλυση των δειγμάτων προς την βιωσιμότητα των κυττάρων περιγράφονται στις ενότητες και περιλαμβάνουν την μέτρηση αποικιών σε τρυβλία Petri (2.1.2), την φασματοφωτομετρική μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (2.2.1&2.2.2), την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR (2.2.4) για την ποσοτικοποίηση του DNA σε ng/μl, καθώς και την ενσωμάτωση του αντιδραστήριου βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr) (2.2.3) για την μέτρηση της έντασης εκπομπής κατά την σύνδεση των μορίων DNA-EtBr.

2.1.1 Καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους *E.coli* TOP10 και προετοιμασία της απαιτούμενης βακτηριακής συγκέντρωσης

Το *Escherichia coli* είναι μέλος της οικογένειας των *Enterobacteriaceae* και ανήκει σε ένα από τα πέντε είδη που αναγνωρίζονται από το γένος *Escherichia*. Το *E.coli* αποτελεί ένα Gram-αρνητικό βακτήριο επειδή το κυτταρικό του τοίχωμα αποτελείται από ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης και μια εξωτερική μεμβράνη. Η μορφολογία του είναι συνήθως ραβδοειδής με μήκος περίπου 2,0 μm και διάμετρο 0,25–1,0 μm,. Εμφανίζονται μεμονωμένα ή και σε μεγάλες συστάδες σαν συσσωματώματα με την ανάπτυξη τους να επιτυγχάνεται με ή χωρίς την παρουσία οξυγόνου.



Σχήμα 2.1.1.1: Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy-SEM) σε καλλιέργεια και προσκόλληση σε καλυπτρίδα (coverslip) [34].

Τα βακτήρια *E.coli* TOP10 αναπτύσσεται σε υγρό θρεπτικό υλικό Luria-Bertani (LB) μέσα στον κλίβανο επώασης στους 37°C σε συνθήκες συνεχούς ανάδευσης για την εξασφάλιση του ομαλού πολλαπλασιασμούς τους. Καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας είναι απαραίτητη η εφαρμογή φλόγας στο πάγκο πειραμάτων για τη διατήρηση των συνθηκών στειρότητας των αντιδραστηρίων και των εργαλείων του πειράματος, ο πρώτο βήμα εφόσον έχουν γίνει οι αποστειρώσεις και η παρασκευή του θρεπτικού υλικού, είναι ο εμβολιασμός του στελέχους *E.coli* TOP10 σε θρεπτικό υλικό LB. Τα αποθέματα των κυττάρων διατηρούνται σε κρυοφιαλίδια (cryovials) στην κατάψυξη στους -80°C. Λαμβάνοντας το κρυοφιαλίδιο που περιέχει το στέλεχος *E.coli* μέσα από το καταψύκτη με σύντομες κινήσεις για την αποφυγή στρεσογόνων συνθηκών για την βιωσιμότητα των κυττάρων, γίνεται ο εμβολιασμός του σε 10 ml LB υγρό θρεπτικό καλλιέργειας σε φάλλον των 50ml. Το φιαλίδιο των κυττάρων πριν τον εμβολιασμό τοποθετείται σε πάγο. Η καλλιέργεια *E.coli*TOP10 που δημιουργείται και αφού ομογενοποιηθεί με ταχεία ανάδευση σε vortex, τοποθετείται σε κλίβανο επώασης στους 37°C για 24h στα 200 rpm αναγράφοντας πάνω στην ετικέτα overnight culture(O/N). Το φιαλίδιο με το στέλεχος *E.coli* τοποθετείται ξανά στη κατάψυξη στους -80°C.

Για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού ακολουθείται η εξής αναλογία αντιδραστηρίων, ορίζοντας ένα συνολικό όγκο παρασκευής 800 mL θρεπτικού υλικού LB: Σε αναλυτικό ζυγό ζυγίζονται 8gr τρυπτόνη, 4 gr ζυμομύκητας και 8 gr χλωριούχο νάτριο(NaCl). Σε ποτήρι ζέσεως των 800 ml μεταφέρεται το αποσταγμένο νερό ddH₂O και με ελαφριά ανάδευση προστίθενται οι ποσότητες των αντιδραστηρίων. Αφού το μείγμα ομογενοποιηθεί, το διάλυμα από το ποτήρι ζέσεως διαχωρίζεται σε γυάλινα βαζάκια των 100 ml και των 600ml. Στον δοχείο των 600 ml προστίθενται το βακτηριακό άγαρ σε ποσότητα 9gr. Το βακτηριακό άγαρ στερεοποιεί το θρεπτικό υλικό σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η χρήση του αφορά την έγχυση του σε τρυβλία Petri όπου θα γίνεται ο εμβολιασμός των κυττάρων προς την τεχνική μέτρησης αποικιών.

Εφόσον παρασκευαστούν τα θρεπτικά υλικά, υγρό(LB) και στερεό άγαρ, μεταφέρονται στον κλίβανο αποστείρωσης και ρυθμίζεται η αποστείρωση στους 120°C για μισή ώρα. Στην συνέχεια αφήνονται να ψυχθούν ώστε να χρησιμοποιηθούν για την επίστρωση τρυβλίων ή για την καλλιέργεια βακτηρίων σε υγρό θρεπτικό LB.

Εφόσον τα κύτταρα έχουν εμβολιαστεί σε θρεπτικό μέσο, με ακόλουθη την διαδικασία επώασης των 24h στον επωαστικό κλίβανο, το εναιώρημα που προκύπτει εμφανίζεται θολό μετά το πέρας του χρονικού διαστήματος, με τα κύτταρα να έχουν πολλαπλασιαστεί ικανοποιητικά, και να μεταφέρονται στο πάγκο εργασίας για το επόμενο βήμα της επεξεργασίας τους. Από την καλλιέργεια αυτή(Over-Night), 180μl εμβολιάζονται σε φρέσκο θρεπτικό υλικό των 10ml. Εάν απαιτείται μικρός όγκος βακτηρίων και χαμηλή οπτική πυκνότητα (δηλαδή OD <5), τότε όγκος θρεπτικού υλικού των 10ml είναι αρκετός. Γίνεται ανάδευση με χρήση vortex και 1ml από την καλλιέργεια μεταφέρεται για μέτρηση στο φασματοφωτόμετρο με την εύρεση της οπτικής πυκνότητας των ζωντανών κυττάρων. Η ανάπτυξη των κυττάρων μελετάται σε υγρή καλλιέργεια και για την παρασκευή της επιθυμητής συγκέντρωσης σε κάθε πειραματική διαδικασία εφαρμόζεται η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) σε φασματοφωτόμετρο και η συσχέτιση της τιμής απορρόφησης (600nm) με τον αριθμό των κυττάρων που υπάρχουν στο δείγμα. Από την καμπύλη ανάπτυξης των *E.coli* σε σχέση με τον χρόνο, είναι γνωστό ότι στην αρχή(σημείο αναφοράς) τα κύτταρα έχουν οπτική πυκνότητα(OD) στο εύρος 0.05-0.08. Στην συνέχεια, τα βακτήρια αφήνονται για 2 ώρες στον κλίβανο επώασης στα 200rpm και αναμένεται η ανάπτυξη τους. Στην εκθετική τους φάση και αφού όλα διατηρούνται ζωντανά, πλησιάζοντας σε τιμές του OD στο εύρος 0.35-0.5, τερματίζεται ο χρόνος επώασης. Χρησιμοποιώντας την πρότυπη καμπύλη απορρόφησης έναντι του αριθμού των κυττάρων, ο αριθμός κυττάρων υπολογίζεται σε Colony Forming Units (CFU/ml). Συγκεκριμένα, τα βήματα από την καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί για 2 ώρες στον κλίβανο επώασης μέχρι την παρασκευή της κατάλληλης συγκέντρωσης είναι τα εξής: 1) Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας OD ώστε να γίνει επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα έχουν αναπτυχθεί κατά την εκθετική φάση 2) Φυγοκέντρηση για 10min στις 4rpm και απόρριψη του υπερκείμενου 3)Επαναιώρηση του ιζήματος των κυττάρων σε NaCl₂ 0.9% 4) Φυγοκέντρηση και επαναιώρηση των κυττάρων σε 10ml NaCl₂ 0.9%. 5)Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας και 6) Υπολογισμός των cfu/ml από την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης. Με την αριθμομηχανή της εταιρείας Agilentbio-calculator γίνεται ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των κυττάρων σε σχέση με την ένδειξη της οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) που λαμβάνεται με ένα φασματοφωτόμετρο. Για καλλιέργειες βακτηριακών κυττάρων, η οπτική πυκνότητα OD₆₀₀ ίση με 1,0 αντιστοιχεί σε 8 10⁸ κύτταρα/ml. Επίσης, χρησιμοποιείται ισοτονικό διάλυμα NaCl₂ 0.9% για την διατήρηση των ζωντανών κυττάρων μετά την καλλιέργεια τους για το λόγο της σταθερότητας και της βιωσιμότητας που εμφανίζουν σε σχέση με άλλα μέσα, όπως το νερό.

Η δημιουργία διαλύματος με δεδομένη συγκέντρωση για όλα τα δείγματα διευκολύνει την προσθήκη ίσης ποσότητας DNA που περιέχονται στον κυτταρικό πληθυσμό σε

όλες τις πειραματικές διατάξεις κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών δειγμάτων.

2.1.2 Μελέτη βιωσιμότητας του στελέχους *E.coli* με την τεχνική μέτρησης αποικιών σε (cfu/ml)

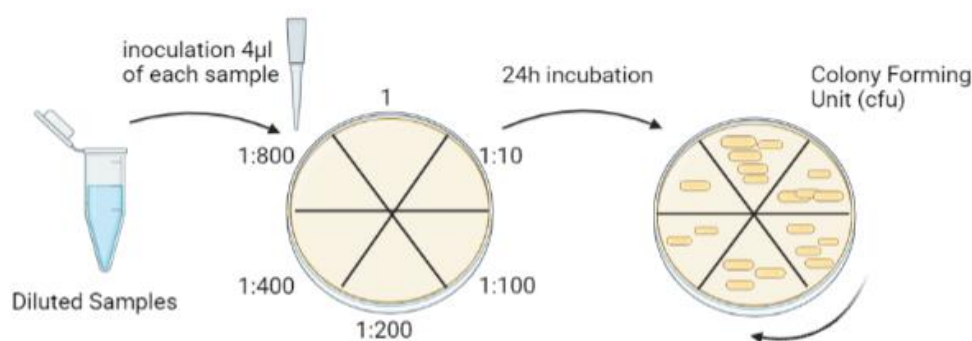
Ο αριθμός των αποικιών για την μελέτη της βιωσιμότητας βακτηρίων βασίζεται στην εκτίμηση των ορατών βακτηριακών αποικιών που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, μετά από έκθεση των κυττάρων σε επιφάνειες που μελετώνται. Χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική, ο ρυθμός πολλαπλασιασμού μπορεί να εκτιμηθεί μετρώντας την κυτταρική πυκνότητα σε ένα εύρος χρονικών σημείων κατά την πορεία της καλλιέργειας. Καθώς τα βακτήρια πολλαπλασιάζονται στο μέσο κυτταροκαλλιέργειας, η αύξηση του πληθυσμού τους εμποδίζει όλο και περισσότερο το φως που διέρχεται στο δείγμα. Όταν λιγότερο φως μπορεί να διαπεράσει ένα δείγμα, η πυκνότητα των βακτηρίων στο δείγμα είναι μεγαλύτερη. Οι τιμές της οπτικής πυκνότητας είναι ανάλογες της πυκνότητας των κυττάρων. Μετά από ένα κατάλληλο χρόνο επώασης, οι αποικίες βακτηρίων μπορούν να προσδιοριστούν με μεγαλύτερη ακρίβεια ως προς τον αριθμό μονάδων σχηματισμού αποικιών (CFUs) που υπάρχουν σε κάθε δείγμα.

Με δεδομένο αριθμό κυττάρων (CFU/ml) από την αρχική καλλιέργεια, γίνονται οι απαραίτητες αραιώσεις για την παρατήρηση των αποικιών σε κάθε τρυβλίο. Ο τύπος που εφαρμόζεται για τον υπολογισμό της αραιώσης δίνεται από την σχέση:

$$CFU/ml = \frac{\text{Αριθμός αποικιών σε κάθε τρυβλίο} * \text{Αραιώση}}{\text{Ποσότητα υγρού επίστρωσης}}$$

Το αποτέλεσμα της εκτιμήσεως των μικροβιακών πληθυσμών εκφράζεται σε Μονάδες Σχηματισμού Αποικιών (Colony Forming Units - CFU)/g ή ml δείγματος. Η άγνωστη μεταβλητή είναι η αραιώση που προκύπτει για δεδομένο αριθμό αποικιών και ποσότητα υγρού επίστρωσης (0.1 ml ή 4μL). Κατά τη διάρκεια της επώασης των εμβολιασμένων τρυβλίων, κάθε κύτταρο ή συσσωμάτωμα κυττάρων που υπήρχε μέσα στη ποσότητα του υγρού επίστρωσης της αραιώσης, θα πολλαπλασιαστεί και θα δημιουργήσει μία αποικία. Μετρώντας τον αριθμό των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε κάθε τρυβλίο γνωρίζουμε αυτομάτως και τον αριθμό των cfu που υπήρχαν μέσα στη ποσότητα της αντίστοιχης αραιώσης. Συνεπώς, υπολογίζεται η αραιώση που χρειάζεται για να μετρηθούν συγκεκριμένος αριθμός αποικιών σε δεδομένη ποσότητα. Όπως φαίνεται στο (Σχήμα 2.1.1.2), το πρωταρχικό βήμα για την ακριβή καταμέτρηση των κυττάρων σε ένα τρυβλίο αποτελεί η αραιώση του αρχικού δείγματος που πρόκειται να μελετηθεί, με μια σειρά αραιώσεων που καθορίζεται πειραματικά για το κάθε υπόστρωμα ή υλικό μελέτης. Οι αραιώσεις είναι απαραίτητες να γίνουν στις περιπτώσεις που στο πείραμα χρησιμοποιούνται μεγάλες συγκεντρώσεις ενός αρχικού πληθυσμού βακτηρίων και είναι υπαρκτός ο κίνδυνος να μην μπορεί να γίνει σαφής διάκριση των αποικιών. Ικανοποιητική είναι η μέτρηση αποικιών στο εύρος 30-300.

Όταν παρατηρείται μειωμένος αριθμός CFU, σε μια πλάκα στερεού θρεπτικού υλικού άγαρ σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό, μετά από μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν την βιωσιμότητα των κυττάρων, αποδεικνύεται αντιβακτηριακή δράση των υλικών. Αν και αποτελεί κυρίαρχη τεχνική, η πραγματοποίηση επαναλήψεων των πειραματικών πρωτοκόλλων είναι απαραίτητη για να βρεθεί το στατιστικό σφάλμα από τυχαίες συνθήκες που δεν μπορούν να ληφθούν υπόψη. Είναι μια τεχνική που επιτρέπει μόνο τη μέτρηση βιώσιμων κυττάρων που είναι ικανά να σχηματίσουν αποικίες σε θρεπτικά μέσα, χωρίς να ανιχνεύονται τα νεκρά κύτταρα ή κύτταρα που δεν μπόρεσαν να αναδυθούν βιώσιμα υπό τις ειδικές συνθήκες ανάπτυξης[86].



Σχήμα 2.1.2.1: Επίστρωση τρυβλίων Petri από διαλύματα διαδοχικών αραιώσεων της βακτηριακής καλλιέργειας

Από τα ήδη καθιερωμένα πρωτόκολλα που υπάρχουν για την μελέτη των αντιβακτηριδιακών επιφανειών, στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε το υπό τροποποίηση πρωτόκολλο του ιαπωνικού βιομηχανικού πρότυπου (JIS) Z 2801 που είναι εναρμονισμένου με τον Διεθνή οργανισμό τυποποίησης ISO 22196. Η αντιβακτηριακή ποσοτική εκτίμηση αφορά πλαστικές, μεταλλικές, κεραμικές ή άλλες σκληρές επιφάνειες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ή τους σκοτώνουν μέσα σε 24 h. Τα στελέχη που χρησιμοποιούνται είναι το *E.coli* και το *S.aureus*. Για να αναφερθούν οι διαφοροποιήσεις που ακολουθήθηκαν στο πειραματικό στάδιο της εργασίας, αναλύονται τα βήματα του πρωτόκολλου(JIS) Z 2801[87].

Αρχικά, πραγματοποιείται η προετοιμασία των επιφανειών με διαστάσεις 5x5cm² με τρία δείγματα από τις επιφάνειες που είναι επεξεργασμένες και σε τρία δείγματα από ακατέργαστες επιφάνειες, ως επιφάνειες ελέγχου. Ακολουθεί αποστείρωση όλων των επιφανειών με εφαρμογή αιθανόλης περιεκτικότητας 70% για να απομακρυνθούν οποιαδήποτε υπολείμματα ή καθαρίζεται όλη η επιφάνεια με απορροφητικό βαμβάκι βυθισμένο σε αιθανόλη 2 ή 3 φορές και αφήνεται έως ότου στεγνώσει. Αφού έχουν καθαριστεί, η τοποθέτηση τους γίνεται σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri και γίνεται ο εμβολιασμός 0.4ml κυττάρων σε ένα στενό στρώμα πάνω από κάθε επιφάνεια με συγκέντρωση διαλύματος βακτηρίων 2.5-10 10⁶ cfu/ml. Για όσον το δυνατόν καλύτερη επαφή του δείγματος, χωρίς εμφάνιση διαρροών από τις καθορισμένες διαστάσεις επιφάνειας καθώς και την αποφυγή εξάτμισης του υγρού στις συνθήκες επώασης,

τοποθετούνται λεπτά αποστειρωμένα φιλμ διαστάσεων 4x4cm². Συγκεκριμένα, το τυπικό μέγεθος της αποστειρωμένης μεμβράνης θα πρέπει να βρίσκεται στο εύρος 40 mm ±2 mm ή να μπορεί να βρίσκεται περισσότερο από 2,5 mm προς το εσωτερικό της επιφάνειας. Στο σημείο αυτό της διαδικασίας, αναφέρεται ότι σε περίπτωση που είναι δύσκολο να προσκολληθεί η μεμβράνη επικάλυψης, καθώς το σχήμα του δοκιμίου δεν είναι επίπεδο ή εμφανίζει υδροφιλικότητα με το μέσο, τότε η διαδικασία κάλυψης του με την ταινία μπορεί να παραλειφτεί. Η επώαση των βακτηρίων γίνεται σε θερμοκρασία 35 °C ± 1 °C και σχετική υγρασία όχι λιγότερο από 90 % για 24 h ± 1 h στον κλίβανο επώασης. Το τελευταίο βήμα πριν την επίστρωση των δειγμάτων από τις επιφάνειες σε στερεό θρεπτικό άγαρ και την μέτρηση των αποικιών, αποτελεί ο καθαρισμός των επιφανειών για την ανάκτηση των κυττάρων. Στα τρία ακατέργαστα δείγματα γίνεται αμέσως μετά τον εμβολιασμό στις τρεις μη επεξεργασμένες επιφάνειες ο εμβολιασμός, με την τοποθέτηση της επιφάνειας με το καλυπτικό φιλμ σε ένα αποστειρωμένο σάκο (Stomach bag), και χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λεπίδα, ώστε να μην διαφύγει το διάλυμα που περιέχεται ανάμεσα. Προστίθενται 10ml ζωμού σόγιας (SoyaCaseinDigestLecithinPolysorbateBroth-SCDLP) με μια πιπέτα για πλήση επιφανειών. Στις επιφάνειες αυτές μετά την ανάκτηση του διαλύματος από το καθαρισμό, γίνεται απευθείας η στρώση σε στερεό θρεπτικό στην χρονική στιγμή 0h. Οι επεξεργασμένες επιφάνειες ακολουθούν τον ίδιο καθαρισμό αφού περάσουν οι 24h επώασης στον κλίβανο στους 35 °C. Επίσης, αν τα 10 ml του ζωμού δεν είναι αρκετά για τον πλήρη καθαρισμό μπορεί να προστεθεί μεγαλύτερος όγκος του μέσου. Στο τελευταίο στάδιο, μετριούνται οι αποικίες και υπολογίζεται η μείωση των μικροοργανισμών σε σχέση με τις αρχικές συγκεντρώσεις και την επιφάνεια ελέγχου.

Τέσσερις κρίσιμοι παράγοντες που επηρεάζουν το αποτέλεσμα του αντιβακτηριδιακού πρωτοκόλλου ISO 22196 / JISZ 2801 εντοπίζονται στις εξής παραμέτρους σύμφωνα με τους Wiegand C, et al.[89]: 1)ο χρόνος επώασης, 2) η αρχική συγκέντρωση βακτηρίων, 3) η φάση των βακτηρίων, στάσιμη ή εκθετική φάση ανάπτυξης, που χρησιμοποιήθηκαν και 4) η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών. Για να καταστεί δυνατή η αξιολόγηση των αποτελεσμάτων χρειάζεται να αναφέρονται οι αλλαγές των παραμέτρων που συμβαίνουν κατά την επανάληψη των πειραμάτων.

2.2 Ανίχνευση του εκλυόμενου DNA

2.2.1 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοφωτομετρική ανάλυση υπεριώδους ορατού (UV/Vis)

Η οπτική πυκνότητα ή η απορρόφηση ενός υλικού είναι μια λογαριθμική αναλογία της έντασης του φωτός που πέφτει πάνω στο υλικό αναφοράς, προς το φως που μεταδίδεται μέσω του υλικού που μελετάται και υπολογίζεται από την σχέση:

$$A(\lambda) = -\log_{10} \frac{I_0}{I_1} \quad (2)$$

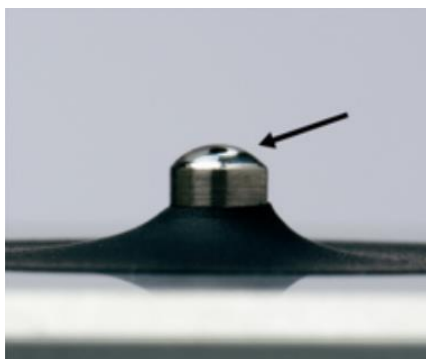
όπου I_0 και I_1 είναι οι εντάσεις του προσπίπτοντος και του εκπεμπόμενου φωτός, αντίστοιχα. Η απορρόφηση εξαρτάται από το μήκος κύματος και συχνά μετράται ως συνάρτηση του μήκους κύματος ακτινοβολίας, το οποίο ονομάζεται φάσμα απορρόφησης. Το φάσμα απορρόφησης είναι ένα πολύ σημαντικό ποσοτικό μέτρο για την αξιολόγηση των οπτικών ιδιοτήτων των διαλυμάτων. Παρέχει διάφορους τύπους πληροφοριών, όπως τη συγκέντρωση μιας διαλυμένης ουσίας, τα μεγέθη των αιωρούμενων σωματιδίων που περιέχονται σε αυτό καθώς και βιολογικά χαρακτηριστικά. Τα νουκλεϊκά οξέα έχουν την ιδιότητα να απορροφούν υπεριώδες φως (UV) και εκδηλώνουν μέγιστο απορρόφησης στα 260 nm, επομένως σε ένα υδατικό διάλυμα ο υπολογισμός της οπτικής πυκνότητας (Optical density, OD_{260}) δίνει την συγκέντρωση του DNA ή RNA χωρίς να τα διαχωρίζει. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του DNA από ένα διάλυμα κυττάρων απαραίτητη είναι η καθαρότητα και η προετοιμασία του δείγματος.

Για να εκτιμηθεί το ποσό που περιέχει μια μονάδα απορρόφησης OD, χρησιμοποιείται ο τύπος $A = \epsilon lc$, όπου A είναι η μετρούμενη απορρόφηση, ϵ είναι ο συντελεστής απόσβεσης της αναλυόμενης ουσίας, l είναι το μήκος διαδρομής του φωτός και c είναι η συγκέντρωση των απορροφητικών ειδών. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό του dsDNA χρησιμοποιείται συνήθως ένας μέσος συντελεστής απόσβεσης, ϵ_{dsDNA} . Το ϵ_{dsDNA} ισούται με $0,020 (\mu\text{g}/\text{mL})\text{cm}^{-1}$. Για την μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) ίση με 1 μονάδα απορρόφησης (A_{260} ή $OD = 1$) σε μήκος διαδρομής του 1 cm, η συγκέντρωση του DNA ισούται με $50\mu\text{g}/\text{ml}$ [90].

Όσον αφορά την ανάπτυξη καλλιέργειας, η απορρόφηση αυξάνεται καθώς αυξάνεται η θολότητα (turbidity) της καλλιέργειας, εξαιτίας του πληθυσμού των κυττάρων όταν η διαδρομή μιας δέσμης φωτός περνά διαμέσου της καλλιέργειας. Η αλλαγή μπορεί επομένως να μετρηθεί ποσοτικά σαν αλλαγή της "οπτικής πυκνότητας" (optical density) του εναιωρήματος. Η μέτρηση απορρόφησης γίνεται στο μέγιστο 600nm για τον κυτταρικό πληθυσμό. Εφόσον οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε κλειστά συστήματα, σε υγρά θρεπτικά μέσα, χωρίς να υπάρχει ανανέωση αυτών, η καλλιέργεια φτάνει σε μια στατική φάση ανάπτυξης όπου τότε η συγκέντρωση των θρεπτικών αρχίζει να μειώνεται και αυξάνεται το ποσοστό προϊόντων μεταβολισμού των κυττάρων. Η επιθυμητή συγκέντρωση των κυττάρων *E.coli* καθορίζεται από την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης τους, όπου παρουσιάζεται σε λογαριθμική κλίμακα του αριθμού κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο. Σε εκθετική φάση (exponential phase) εξασφαλίζεται ότι τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ικανοποιητικά ώστε να διατηρούνται ζωντανά. Κατά την φάση αυτή τα κύτταρα διαιρούνται σε προκαθορισμένο χρονικό διάστημα και μέσου του χρόνου διπλασιασμού τους και υπολογίζεται ο βακτηριακός πληθυσμός. Σύμφωνα με τον ορισμό βιωσιμότητας ενός πληθυσμού[91], ένας πληθυσμός που παρουσιάζει μικροβιακή βιωσιμότητα μπορεί να οριστεί ως ένας πληθυσμός που περιλαμβάνει έναν ανιχνεύσιμο αριθμό κυττάρων ικανών για πολλαπλασιασμό.

2.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός του DNA με φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου

Στηριζόμενοι στην ίδια αρχή λειτουργίας και μεθόδου του φασματοφωτόμετρου, χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο μικρού όγκου. Η λειτουργία για τα φασματοφωτόμετρα υπεριώδους-ορατού (UV/Vis) μικρού όγκου στηρίζεται στο συνδυασμό δύο τεχνολογιών, την τεχνολογία οπτικών ινών και σε συστήματα συγκράτησης του δείγματος μικρού όγκου ανάμεσα σε δύο επιφάνειες βασισμένα στην επιφανειακή τάση. Υπάρχει ανεξαρτησία του δείγματος από συμβατικά φασματοφωτόμετρα που απαιτούν π.χ. κυψελίδες και μεγάλους όγκους επεξεργασίας. Η απαιτούμενη ποσότητα δείγματος είναι πολύ μικρή (1-2 μl) και το δείγμα χρησιμοποιείται χωρίς καμία προηγούμενη αραιώση. Η διάταξη επιτρέπει την ακριβή μέτρηση διαλυμάτων με μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, από 2 $\text{ng}/\mu\text{l}$ έως 4000 $\text{ng}/\mu\text{l}$. Η μείωση των αραιώσεων για το επιθυμητό αποτέλεσμα οφείλεται στο ότι το σύστημα χρησιμοποιεί μικρότερα μήκη διαδρομής με ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων ανίχνευσης[92]. Να σημειωθεί ότι για την εξακρίβωση αν το δείγμα είναι καθαρό, δίπλα σε κάθε μέτρηση που πραγματοποιήθηκε, το λογισμικό nanodrop υπολογίζει τον λόγο A260/A280. Αυτό ισχύει και στα άλλα φασματοφωτόμετρα μετρείται η απορρόφηση του δείγματος στα 260 nm και στα 280 nm με λόγο OD260/OD280. Οι πρωτεΐνες απορροφούν και αυτές το υπεριώδες φως με μέγιστο απορρόφησης στα 280 nm και έτσι ένας μειωμένος λόγος OD260/OD280 είναι ένδειξη προσμίξεων.



Σχήμα 2.2.2.1: Σταγόνα δείγματος 2 μl στον αισθητήρα του φασματοφωτόμετρου Nanodrop

Οι αναλογίες απορρόφησης 260/280 και 260/230 χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της καθαρότητας του DNA και της παρουσίας μολυσματικών ουσιών στα βιολογικά δείγματα κατά τη διαδικασία εξαγωγής DNA. Τα καθαρά νουκλεϊκά οξέα τυπικά αποδίδουν μια αναλογία 260/280 \sim 1,8 και μια αναλογία 260/280 \sim 2,0 για DNA και RNA, αντίστοιχα. Αυτή η αναλογία εξαρτάται από το pH και την ιοντική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος που χρησιμοποιείται για την πραγματοποίηση των μετρήσεων μεταξύ του τυφλού και του δείγματος. Σημαντικά διαφορετικές αναλογίες καθαρότητας μπορεί να υποδεικνύουν την παρουσία ρύπων που απορροφούν έντονα στα 280 nm ή κοντά. Η αναλογία καθαρότητας 260/230 είναι μια δεύτερη μέτρηση της καθαρότητας του DNA με τιμές για ένα "καθαρό" DNA στην περιοχή 1.8-2.2. Οι λόγοι καθαρότητας που είναι σημαντικά χαμηλότεροι από το εύρος των τιμών αυτών μπορεί να υποδεικνύουν ότι η τεχνική απομόνωσης απαιτεί περαιτέρω βελτιστοποίηση[93].

Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει:

1. Καθαρισμό της επάνω και της κάτω οπτικής επιφάνειας του συστήματος και μεταφορά με πιπέτα 2 έως 3 μL καθαρού απιονισμένου νερού στην κάτω οπτική επιφάνεια.
2. Κλείσιμο του βραχίονα και παρακολούθηση ότι το πάνω βάθρο έρχεται σε επαφή με το απιονισμένο νερό. Αμέσως, σηκώνουμε τον βραχίονα του μοχλού και σκουπίζονται οι δύο οπτικές επιφάνειες με ένα καθαρό, στεγνό κάθε εργαστηριακό μαντηλάκι χωρίς χνούδι.
3. Άνοιγμα του λογισμικού NanoDrop και επιλογή της εφαρμογής Nucleic Acid. Με μια μικρού όγκου βαθμονομημένη πιπέτα τοποθετείται το διάλυμα αναφοράς-τυφλό που περιέχεται στο ολικό διάλυμα στην κάτω οπτική επιφάνεια. Στην περίπτωση που τα βακτήρια βρίσκονται σε εναιώρημα 9% NaCl ή το PBS διάλυμα, τότε αυτό είναι το διάλυμα αναφοράς.
4. Από το πρόγραμμα γίνεται επιλογή "Κενό" και μόλις ολοκληρωθεί η μέτρηση του τυφλού διαλύματος, αφαιρείται και προστίθεται το δείγμα που μας ενδιαφέρει.

2.2.3 Ανίχνευση DNA μέσω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου

Για την ποσοτικοποίηση των δεοξυριβονουκλεϊκών οξέων χρησιμοποιήθηκε το βρωμιούχο αιθίδιο, μια φθορίζουσα χρωστική ένωση που εδώ και χρόνια βοηθάει στην οπτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω των πρωτόκολλων φθορισμομετρίας. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώθηκε για πρώτη φορά το 1969 ως παράγοντας χρώσης στην ηλεκτροφόρηση των νουκλεϊκών οξέων στο τζελ αγαρόζης[94]. Όταν εκτίθεται σε υπεριώδες φως εκπέμπεται ένα πορτοκαλί χρώμα, που αντικατοπτρίζει την παρεμβολή του DNA, δηλαδή την εισαγωγή μορίων-ενώσεων μεταξύ των επίπεδων βάσεων του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος. Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ανιχνευθεί στα περισσότερα βιολογικά δείγματα προς μελέτη χρησιμοποιώντας τις κορυφές του φάσματος διέγερσής του, με μέγιστη απορρόφηση στα μήκη κύματος των 210 nm και 285 nm στο φάσμα υπεριώδους(UV) και με την κορυφή εκπομπής να βρίσκεται στα 616nm, εκλύοντας το πορτοκαλί χρώμα. Από δεδομένα φάσματος απορρόφησης και εκπομπής του EtBr, τα μέγιστα των μηκών κύματος διέγερσης μεταφέρονται στο φάσμα του υπεριώδους, ανάλογα με το μέσο του διαλύματος[95].

Όσον αφορά την σχέση σύνδεσης των EtBr με το DNA, οι κύριοι τρόποι δέσμευσης του βρωμιούχου αιθιδίου περιλαμβάνουν την παρεμβολή του μεταξύ των ζευγών βάσεων των δύο κλώνων του DNA και την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με τις εναλλασσόμενες ομάδες φωσφορικών που περιέχονται στα τμήματα της διπλής έλικας του DNA[96]. Ταυτόχρονα, από την θερμοδυναμική σχηματισμού του συμπλόκου EtBr-DNA, είναι δυνατή η αλληλεπίδραση με το μονόκλωνο μόριο ssDNA και δίκλωνο dsDNA. Πειραματικά, οι Vardevanyan, P. O., et al.[97] απέδειξαν την δέσμευση του Etbr σε διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης σε ακέραιο δίκλωνο μόριο DNA και σε μετουσιωμένες θέσεις, με την συμβολή των αλλαγών της θερμοκρασίας και του PH του μονόκλωνου DNA, καθορίζοντας τις σταθερές κινητικής των αντιδράσεων για την

κάθε περίπτωση. Ακόμα, πέρα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου, στο τζελ ηλεκτροφόρησης η ύπαρξη του EtBr οδηγεί σε μειωμένη κινητικότητα και αλλαγή των συντελεστών τριβής των θραυσμάτων DNA, εξαιτίας της ακαμψίας στη διάταξη του που δημιουργείται κατά την σύνδεση του στο πήκτωμα [98].

Χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του DNA και την καταγραφή του σήματος φθορισμού η συσκευή μέτρησης φθορισμού και χημειοφωταύγειας σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης, Fluorescence multi-mode microplatereader Spark® (TECHAN), που βρίσκεται στο εργαστήριο Ανοσοχημείας του Ινστιτούτο Πυρηνικών και Ραδιολογικών Επιστημών και Τεχνολογίας, Ενέργειας και Ασφάλειας (ΙΠΡΕΤΕΑ). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε στηρίζεται στην εργασία των Aly et al.[99], οι οποίοι ανέλυσαν το DNA που αντλήθηκε από κανάλια πορώδους μονολιθικού πολυμερούς. Οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χειριστήκαμε στα πειράματα μας συμπεριλαμβάνουν τον συνολικό όγκο αντίδρασης 200μl για κάθε φρεάτιο στο microplate που μεταφέρεται στο μηχάνημα TECHAN για την μέτρηση του φθορισμού, περιέχοντας 20μl από τα δείγματα DNA των μικρο-καναλιών, 180μl απιονισμένου νερού και τα 30μl EtBr. Η συγκέντρωση για το EtBr που παρασκευάστηκε είναι 0,4 mg/L.

Πίνακας 2.2.3.1 Αναλογίες αντιδραστηρίων στο πρωτόκολλο του βρωμιούχου αιθιδίου με το εκλυόμενο DNA από τα κανάλια

| Αναλογίες αντίδρασης | dH ₂ O | NaCl ₂ 0.9% | DNA καναλιού | EtBr |
|-----------------------|-------------------|------------------------|--------------|------|
| Διάλυμα από το κανάλι | 180 | - | 20 | 30 |
| Control με EtBr | 180 | 20 | - | 30 |
| Control χωρίς EtBr | 200 | - | - | - |

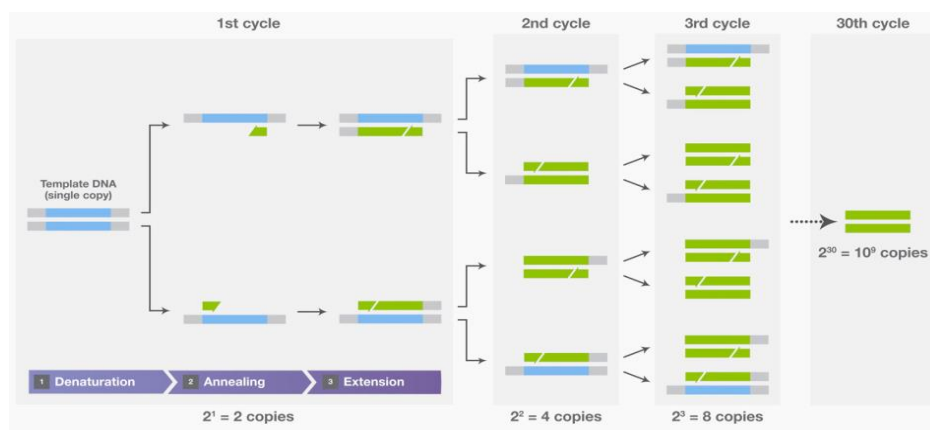
2.2.4 Ανίχνευση του DNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης(PCR)

Στο πλαίσιο χαρακτηρισμού του DNA που εκλύεται κατά την διάρκεια παραμονής βακτηρίων μέσα σε μικρο-κανάλια, έγινε ποιοτικός χαρακτηρισμός με PCR, για να εκτιμηθεί ο βαθμός που το DNA μπορεί να εκλύεται από τα διάτρητα κύτταρα και να διατηρείται μέσα στο περιβάλλον του καναλιού χωρίς να χάνει την λειτουργικότητα του. Η λύση των κυττάρων είναι όπως αναφέρθηκε στην πρώτη ενότητα, το πιο σημαντικό σκαλοπάτι για κάθε βιολογική αναλυτική διαδικασία, και η ελαχιστοποίηση των βημάτων της διαδικασίας και η κατανόηση των φαινομένων στις μικρο-ρευστομηχανικές διατάξεις είναι μέχρι σήμερα υπό μελέτη.

2.2.4.1 Αρχή λειτουργίας της μεθόδου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια in vitro μέθοδος που επιτρέπει την ενίσχυση από ένα ή μερικά αντίγραφα ενός κομματιού DNA προς την δημιουργία χιλιάδων έως και εκατομμυρίων αντιγράφων από την

συγκεκριμένη αλληλουχία DNA. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermocycler). Ο θερμικός κυκλοποιητής είναι ένα όργανο που αυτοματοποιεί τους θερμοκρασιακούς κύκλους και τους χρόνους παραμονής σε κάθε θερμοκρασία για την PCR.



Σχήμα 2.2.4.1 Βήματα ενίσχυσης ενός μορίου DNA με τη μέθοδο της PCR[13]

Όπως φαίνεται στο (Σχήμα 2.2.4.1), η ενίσχυση επιτυγχάνεται με μια σειρά τριών σταδίων: (1) Την αποδιάταξη του DNA, (2) την υβριδοποίηση με τους δύο εκκινητές (που καθορίζουν την αλληλουχία που θα πολλαπλασιαστεί (3) και την επιμήκυνση των εκκινητών από την DNA πολυμεράση, στην οποία η πολυμεράση DNA επεκτείνει το 3' άκρο κάθε εκκινητή κατά μήκος των κλώνων του εκμαγείου. Αυτά τα βήματα επαναλαμβάνονται 25-35 φορές για να παραχθούν εκθετικά ακριβή αντίγραφα του DNA στόχου[100].

Η τεχνική της PCR για την αξιολόγηση των μικρο-διατάξεων βασίζεται σε δύο καίρια σημεία, την βελτιστοποίηση της λειτουργικότητας της κατά την ενίσχυση του DNA από διατάξεις που στοχεύουν στην απομόνωση δειγμάτων DNA με πλήθος αναστολέων από τα υλικά και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται για κάθε σκοπό, καθώς και με την τελική ενσωμάτωση μιας μικρο-ρευστομηχανικής διάταξης PCR ενσωματωμένης σε πλατφόρμα λύσης κυττάρων.

Η επεξεργασία ακατέργαστων δειγμάτων που περιέχουν το γενετικό υλικό με επιπρόσθετα σύμπλοκα ή χημικές ενώσεις που προκύπτουν από την φύση των υλικών που χρησιμοποιούνται σε κάθε πειραματική διάταξη οδηγούν σε έκλυση μορίων DNA χαμηλής συγκέντρωσης που μπορεί να καλυφθούν από τους αναστολείς της PCR κατά την ενίσχυση και την ανίχνευση, αυξάνοντας τον κίνδυνο ψευδώς αρνητικών[101]. Είναι σημαντική η προετοιμασία των δειγμάτων όσο το δυνατόν σε μικρούς χρόνους για να αποφευχθεί η υποβάθμιση του δείγματος. Παραμένει μια μεγάλη πρόκληση στην μοριακή ανάλυση βιολογικών δειγμάτων που ανακτήθηκαν από το περιβάλλον, η αναστολή της PCR όταν δεν υπάρχουν επαρκή αντίγραφα του DN Θεωρητικά, οι

ανασταλτικοί παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν κάθε συστατικό της αντίδρασης PCR συμπεριλαμβανομένου του εκμαγείου DNA, των νουκλεοτιδίων των εκκινητών ενίσχυσης, των ιόντων Mg^{+2} , των τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοσιδίων (dNTPs), το ισοτονικό διάλυμα της αντίδρασης και του ενζύμου πολυμεράσης Taq [102].

Πλήθος βιολογικών αντιδραστηρίων και πρωτοκόλλων χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του δείγματος που λαμβάνεται στην έξοδο μιας μικρο-ρευστονικής διάταξης, με στόχο την ποσοτικοποίηση του DNA που διατηρείται. Οι Aly MA et al. [103] χρησιμοποίησαν την τεχνική PCR ακολουθούμενη με διαδικασία της ηλεκτρόφορησης ανίχνευσαν τις ενισχυμένες αλληλουχίες DNA του στελέχους *E.coli*, που έχουν εξήχθη εξαιτίας μηχανικής διάτμησης στις μεμβράνες του μέσω ενός καναλιού, με μικρού διαμέτρου πόρων πολυμερούς μονόλιθου (porous polymeric monolith -PPM) ενσωματωμένο σε διασταυρούμενο πολύ (μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) (X-PMMA) υπόστρωμα. Τα κύτταρα που αλληλεπιδράσαν με τους πόρους και διέσχισαν το κανάλι ενισχύθηκαν επιτυχώς χωρίς την ύπαρξη αναστολέων που αποτελούν εμπόδιο για την λειτουργία των αντιδραστηρίων της PCR.

Η ιδέα να αναπτυχθεί στην ίδια διάταξη η ταυτόχρονη λύση και ενίσχυση του DNA, παρέχει μια ολοκληρωμένη και αποτελεσματική μέθοδο ταυτόχρονης κυτταρικής λύσης και ενίσχυσης που απέχουν από χρονοβόρες, δαπανηρές και περίπλοκες πειραματικές διαδικασίες. Οι Wan, W., et al. [104] κατασκεύασαν ένα σύστημα που βασίζεται στη χρήση επιφανειακά τροποποιημένων νανοσωματιδίων χρυσού για κυτταρική λύση ακολουθούμενη από την μικρο-διάταξη PCR και έναν αυτοματοποιημένο μηχανισμό ελέγχου θερμοκρασίας χωρίς την αφαίρεση των νανοσωματιδίων από το διάλυμα PCR. Οι δύο διατάξεις βρίσκονται στον ίδιο θάλαμο επεξεργασίας. Το κύριο ζήτημα που προσπαθεί η εργασία αυτή να λύσει είναι το πρόβλημα της μη ειδικής ενίσχυσης PCR εξαιτίας αναστολέων όπως είναι στην συγκεκριμένη περίπτωση τα νανοσωματίδια χρυσού.

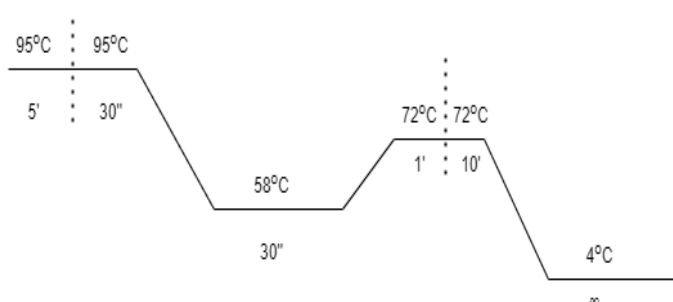
2.2.4.2 Αντιδραστήρια και πορεία της PCR

Η αντίδραση της PCR γίνεται με την χρήση της Fast Start™ Master Mix πολυμεράσης. Το kit Master Mix περιέχει 2x συμπυκνωμένο μείγμα από το ένζυμο Fast Start Taq DNA πολυμεράσης, το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης και νουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP).

Για κάθε μια αντίδραση που πρόκειται να επιτευχθεί χρησιμοποιούνται οι εξής αναλογίες στο tube της αντίδρασης. Σε ένα σωληνάκι Eppendorf του 1.5ml ετοιμάζεται το μίγμα (master mix, n+1), όπου n = αντιδράσεις PCR προσθέτοντας με τη σειρά:

- 13,4 μ l ddH₂O
- 25 μ l Fast Start Master
- 1.5 μ l forward primer 10 μ mol/ μ l (F primer)
- 1.5 μ l reverse primer 10 μ mol/ μ l (R primer)
- 1 μ l ακατέργαστου DNA από τα δείγματα των μικρο-καναλιών

Το DNA προς ανάλυση προστίθεται πάντα στο τέλος της αντίδρασης. Η προσθήκη όλων των υπόλοιπων συστατικών γίνεται στο θάλαμο βιολογικής ασφάλειας που είναι νηματικής ροής και όχι σε χώρο καλλιέργειας μικροοργανισμών. Πριν και μετά την επεξεργασία των δειγμάτων είναι απαραίτητη η αποστείρωση του χώρου εργασίας με UV για μισή ώρα. Στα δείγματα υπάρχει ένα δείγμα αρνητικού ελέγχου, στο οποίο προστίθεται ποσότητα απιονισμένου νερού αντί των δειγμάτων DNA και αποτελεί ένδειξη για το αν υπάρχει επιμόλυνση κατά την διεξαγωγή του πειράματος.



Σχήμα 2.2.4.2: Θερμοκρασίες ενός κύκλου θερμικής ενίσχυσης του DNA και θερμικός κυκλοποιητής που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία

Η μέθοδος στηρίζεται σε εφαρμογή διαδοχικών και πολλαπλών κύκλων θερμικής κατεργασίας για ικανοποιητική απόδοση της ενίσχυσης των επιλεγμένων τμημάτων DNA. Σε κάθε κύκλο της PCR, με την έναρξη λειτουργίας στα πρώτα 5 λεπτά γίνεται αποδιάταξη του DNA και διαχωρισμός των κλώνων, ακολουθεί ενδιάμεση αντίδραση για 30 sec με την πρόσδεση των εκκινήτων στις αποδιαταγμένες αλληλουχίες, ενώ σε θερμοκρασία 72°C γίνεται η σύνθεση νέων κλώνων από το ένζυμο, την Taq πολυμεράση. Κάθε κύκλος ολοκληρώνεται με την επιστροφή στην αρχική θερμοκρασία των 95°C βαθμών οδηγώντας εκ νέου στην αποδιάταξη των δίκλωνων μορίων DNA που έχουν ήδη παραχθεί στον προηγούμενο κύκλο.

Πίνακας 2.4.2.2 : Αλληλουχίες των Primers του γονιδίου *ybbW* του βακτηρίου *E. coli*

| Primer | Αλληλουχία ολιγονουκλεοτιδίων | Μήκος | GC% |
|------------------------|--|-------|------|
| Forward <i>ybbW</i> | 5'-TGA-TTG-GCA-AAA-TCT-GGC- CGG-GAT-TTT-TAA-CT-3' | 31 | 38.7 |
| Reverse <i>ybbW</i> | 5'-GAA-ATC-GCC-CAA-ATC-GCC- ATA-CCG-CCG-AAA-AC-3' | 32 | 53.1 |

2.2.4.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για την εμφάνιση των αποτελεσμάτων ενίσχυσης DNA ακολουθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης. Το πρωτόκολλο για την εμφάνιση του σήματος στο τζέλ ηλεκτροφόρησης είναι η παρασκευή του διαλύματος της ηλεκτροφόρησης το οποίο είναι το ρυθμιστικό διάλυμα TBE, ειδικό για τον διαχωρισμό μικρών θραυσμάτων DNA. Το TBE παρασκευάζεται στο εργαστήριο με τις εξής ποσότητες των αντιδραστηρίων: Tris base 54gr, Boric acid 27.5g και EDTA 37.5 gr σε 500ml dH₂O. Συγκεκριμένα, στη διάταξη χρησιμοποιείται το TBE σε συγκέντρωση 0.5x(αραίωση 1:10 του συμπυκνωμένου αποθέματος). Αραιώνεται το διάλυμα 10 φορές σε απιονισμένο νερό. Από το διάλυμα αυτό μια ποσότητα τοποθετείται στη συσκευη-δοχείο ηλεκτροφόρησης ενώ μια άλλη ποσότητα οδηγείται για την παρασκευή του τζελ. Έπειτα παρασκευάζεται η πηκτή αγαρόζης με 2g αγαρόζης που ζυγίζονται σε αναλυτικό ζυγό και προστίθενται στη κωνική φιάλη που περιέχουν το 10 ml 0.5x αραιωμένου TBE. Η κωνική πωματίζεται και τοποθετείται σε φούρνο μικροκυμάτων για 2 λεπτά προκειμένου να διαλυθεί η αγαρόζη. Παράλληλα, ισοσταθμίζεται η ειδική βάση πάνω στην οποία θα γίνει η πηκτή της αγαρόζης και τοποθετείται το ειδικό χτενάκι για να δημιουργηθούν τα φρεάτια στα οποία θα τοποθετηθούν τα δείγματα. Μετά τη διαλυτοποίηση της αγαρόζης η κωνική ψύχεται με την βοήθεια νερού βρύσης για 2 λεπτά μέχρι να γίνει πηκτή και προστίθενται τα 5 μl βρωμιούχου αιθιδίου EtBr από το αντιδραστήριο συγκέντρωσης των 10mg/ml με ήπια ανάδευση. Αφού ομογενοποιηθεί το μείγμα, μεταφέρεται το πήκτωμα στο δοχείο ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται η χτένα που θα σχηματίσουν τα πηγάδια των δειγμάτων.

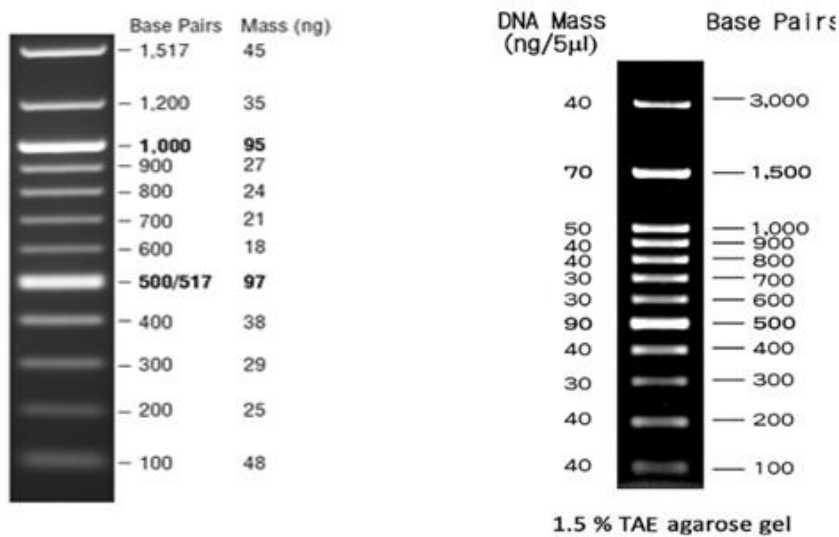
Η προετοιμασία των δειγμάτων για την ηλεκτροφόρηση, όπου είναι και το τελευταίο βήμα μετά το τέλος της διαδικασίας της PCR περιλαμβάνει τα εξής:

Σε ένα μικρό σωλήνα προστίθενται 2μl απιονισμένο νερό, 2μl χρωστικής ουσίας και 2μl δείγματος DNA. Για το δείγμα του μάρτυρα (marker) προστίθενται 4μl απιονισμένο

νερό, 2μl χρωστικής ουσίας και 2μl μάρτυρας συγκέντρωσης 250ng/μl. Με την χρήση μικροπιπέτας τοποθετούνται τα δείγματα στα φρεάτια και ξεκινάει η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης στα 90 mA για 15 λεπτά προκειμένου να επιτευχθεί πλήρως ο διαχωρισμός των προϊόντων PCR. Η κινητικότητα των γραμμικών τμημάτων DNA είναι ανάλογη της τάσης που χρησιμοποιείται.

Η συγκέντρωση της αγαρόζης που χρησιμοποιήθηκε (2%) διαχωρίζει DNA μεγέθους 0.1-2 kb. Η κινητικότητα ενός τμήματος DNA διαφέρει σε πηκτώματα διαφορετικής συγκέντρωσης. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, η πηκτή τοποθετείται σε συσκευή με UV ακτινοβολία προκειμένου να γίνουν εμφανή τα προϊόντα της αντίδρασης. Μετά το σύντομο χρονικό διάστημα των δύο λεπτών, με ψηφιακή φωτογράφιση από το πρόγραμμα GelAnalyzer φωτογραφίζεται η πηκτή ώστε να ποσοτικοποιηθεί το σήμα που εκπέμπεται από κάθε πηγάδι.

Στα πειράματα που ακολουθούν ηλεκτροφορήθηκε DNA γνωστού μοριακού βάρους για να μπορεί να γίνει σύγκριση με τα δείγματα άγνωστης ποσότητας DNA που προκύπτει από το εναιώρημα των κυττάρων που συλλέγεται από τα μικρο-κανάλια και την προσπάθεια ποσοτικοποίησης της συγκέντρωσης αυτής μέσω προγράμματος ImageJ. Το ImageJ είναι ένα πρόγραμμα επεξεργασίας εικόνας που μπορεί να εμφανίζει, να επεξεργάζεται και να αποθηκεύει εικόνες 8 bit σε grayscale και 16 bit και 32 bit εικόνες. Το ImageJ για τις εικόνες που λαμβάνονται από το GelAnalyzer υπολογίζει στατιστικά στοιχεία για την περιοχή και την τιμή pixel των αντικειμένων που ορίζονται από τον χρήστη. Για την ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται ο marker NEB 100bp και ο Nippon 100bp με τον καθένα να αποδίδει συνολικά 12 και 13 θραύσματα κατάλληλα για χρήση ως πρότυπα μοριακού βάρους, αντίστοιχα. Κάθε θραύσμα(lane) ή πηγάδι αποτελείται από ένα συγκεκριμένο αριθμό ζευγών βάσεων (bp) ορισμένης μάζας. Απεικονίζονται στην εικόνα τα συνολικά θραύσματα με τον αντίστοιχο αριθμό ζευγών βάσεων καθώς και την αντίστοιχη μάζα (ng). Με βάση την ένταση από τα πηγάδια και δεδομένης της γνωστής συγκέντρωσης ng ανά μl που χρησιμοποιούνται εκτιμάται η συγκέντρωση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης.



Σχήμα 2.2.4.3: Τα τμήματα θραύσης του DNA σε συγκέντρωση ng του μάρτυρα(marker) NEB 100bp και Nippon 100bp.

2.2.4.4 Ισοθερμική ενίσχυση του DNA

Η τεχνολογία ισοθερμικής ενίσχυσης νουκλεϊκού οξέος (Recombinase Polymerase Amplification, RPA), της εταιρείας Twist Dx™, αντιπροσωπεύει μια εξαιρετικά ευέλικτη εναλλακτική λύση έναντι της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ανάπτυξη γρήγορης ανίχνευσης των νουκλεϊκών οξέων. Το 2006, οι Piepenburg et al.[105] ανέπτυξαν την τεχνολογία RPA χρησιμοποιώντας πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη σύνθεση, τον ανασυνδυασμό και την ενίσχυση του κυτταρικού DNA, η οποία διατίθεται σήμερα στο εμπόριο από την εταιρεία Twist Dx.

Η τεχνική αυτή εκτελεί την ενίσχυση των νουκλεϊκών οξέων σε χαμηλή θερμοκρασία του εύρος των 37 με 42°C, και απαιτεί ελάχιστη προετοιμασία δείγματος, με ικανότητα ενίσχυσης από 1 μέχρι 10 αντίγραφα βιομορίων στόχου DNA σε λιγότερο από 20 λεπτά[106]. Έχει χρησιμοποιηθεί συνολικά για την ενίσχυση διαφορετικών στόχων, συμπεριλαμβανομένων των μονόκλωνων (ssDNA) και δίκλωνων (dsDNA) μορίων DNA και RNA, των miRNA, από μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών και δειγμάτων. Στην βιβλιογραφία είναι αντιληπτή η προτίμηση της μεθόδου έναντι άλλων μεθόδων ενίσχυσης, εστιάζοντας την εφαρμογή της σε συσκευές σημείων φροντίδας (Point-of-care)[107].

Το kit TwistAmp RPA περιέχει μικρές ποσότητες *E. coli* DNA εξαιτίας μεθόδων παραγωγής του. Οι McQuillan, J. S. et al.[108], εκτίμησαν μέσω της ποσοτικής ανάλυσης PCR σε πραγματικό χρόνο (Quantitative PCR, qPCR), την ποσότητα του DNA του *E. coli*, της αλληλουχίας στόχου *ybbW* γονιδίου, σε μεμονωμένα διαλύματα αντιδραστηρίων του kit. Με την ενίσχυση του γονιδίου σε στελέχη *E.coli* κατάφεραν σε χρονικό διάστημα 2 λεπτών της μεθόδου σε σταθερή θερμοκρασία των 37°C, με

ένα αντιδραστήριο RPA από το kit TwistAmp να πετύχουν θετικά αποτελέσματα με ενισχυμένα αντίγραφα αλληλουχίας έως 10^7 . Σε αντίθεση, με την qPCR που απαιτούσε 40 κύκλους συνολικού χρόνου 56min για να μπορούν να παραχθούν θετικά αποτελέσματα. Ως αποτέλεσμα, η μέθοδος RPA θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση τουλάχιστον 100 αντιγράφων του γονιδιώματος *E. coli*, ενώ η ποσοτική μέθοδος qPCR μπορούσε να εντοπίσει μόλις 10 αντίγραφα. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος RPA έχει σύντομο χρόνος ανάλυσης, ο οποίος απαιτεί λιγότερο από 13 λεπτά για να επιστρέψει ένα θετικό προκύπτουν από ένα δείγμα που περιέχει 100 αντίγραφα από την αλληλουχία στόχο.

2.3 Παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)

Τα δραστικά είδη (reactive species) αφορούν τόσο τις ελεύθερες ρίζες όσο και τα δραστικά είδη οξυγόνου (reactive oxygen species), τα οποία περιλαμβάνουν δραστικές ρίζες, όπως το ανιόν υπεροξειδίου (O_2^-), τη ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), καθώς και δραστικά μη ριζικά μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το απλό στοιχειακό οξυγόνο ($^1\text{O}_2$). Το μοριακό οξυγόνο (O_2), με την ικανότητα του να μεταφέρεται γρήγορα μεταξύ των κυτταρικών μεμβρανών, αποτελεί την κύρια πηγή των οξειδωτικών ριζών κατέχοντας δύο μη ζευγαρωμένα ηλεκτρόνια σε διακριτά π^* τροχιακά και λειτουργώντας ως δέκτης ηλεκτρονίων [109]. Με την σειρά τους, οι παραγόμενες ρίζες με τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στο μόριο τους, αποσπών με μεγάλη ταχύτητα τα ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια του περιβάλλοντος τους με αποτέλεσμα την παραγωγή άλλων ενδιάμεσων μορίων με οξειδοαναγωγική συμπεριφορά. Τα παράγωγα ROS μπορούν να μετατρέπονται από μια μορφή των ριζών σε άλλη, σύμφωνα με την διαδοχική αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων στην σταδιακή αντίδραση αναγωγής του μοριακού οξυγόνου στα μιτοχόνδρια [110]. Εφόσον, το μεγαλύτερο ποσοστό οξυγόνου χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενέργειας στα μιτοχόνδρια, η παραγωγή των ελεύθερων ριζών εντείνει την βλάβη των μιτοχονδρίων και οδηγεί μέσω πολλαπλών μονοπατιών σε μια νέα κατάσταση παθολογίας και φυσιολογίας των οργανισμών.

Οι αερόβιοι μικροοργανισμοί απαιτούν τον ορθή διαχείριση των δραστικών ειδών κατά την διάρκεια του κύκλου ζωής τους και της αναπτυξιακής τους διαδικασίας, καθώς δημιουργούν οξειδωτικές αντιδράσεις με επιβλαβή επιπτώσεις σε σχεδόν όλους τους τύπους οργανικών βιομορίων, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων, των νουκλεϊκών οξέων, των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και ειδικών μεταλλοπρωτεϊνών που περιέχουν σίδηρο, του DNA, και άλλων αμινοξέων [110,111]. Συνεπώς, η παραγωγή των ROS από τα μιτοχόνδρια και άλλες κυτταρικές δομές έχουν θεωρηθεί ως τοξικά παραπροϊόντα του μεταβολισμού και αποτελούν σηματοδότες για την απορρύθμιση τόσο των ευκαρυωτικών όσο και των προκαρυωτικών κυττάρων [112].

Η ενεργοποίηση του οξειδωτικού στρες που οδηγεί στην χημική ανισορροπία των οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων στα ποικίλα χημικά μακρομόρια και οργανίδια των κυττάρων, διαθέτει πλήθος μηχανισμών ενεργοποίησης των εμπλεκόμενων στοιχείων,

και η μελέτη του ως προς το σύνολο των μεταβολικών διαδικασιών δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί. Η επίδραση των δραστικών ειδών οξυγόνου μελετάται ως συνάρτηση της ισχύος και της χρονικής διάρκειας έκθεσης στις στρεσογόνες συνθήκες του περιβάλλοντος τους. Με υψηλή και συνεχή έκθεση σε επίπεδα ROS, διακόπτεται ο κυτταρικός κύκλος και ενεργοποιούνται οι μηχανισμοί απόπτωσης[113]. Από την πλευρά των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των κυττάρων, για την αντιμετώπιση των στρεσογόνων καταστάσεων του μεταβολισμού, τα ένζυμα όπως το υπεροξειδίου δισμουτάσης (superoxide dismutase-SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθιόνης (glutathione peroxidase-GPx) καταλύουν τα παράγωγα των δραστικών στοιχείων για την αποκατάσταση της ισορροπίας στο κυτταρικό μεταβολισμό[110].

2.3.1 Τεχνικές ανίχνευσης των δραστικών ριζών οξυγόνου

Τα δραστικά είδη οξυγόνου χαρακτηρίζονται με υψηλή ενέργεια μεταφοράς ηλεκτρονίων (ΔG), ανάλογα με το είδος της κάθε διεργασίας, καθώς και με τις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις να είναι εξαιρετικά ασταθείς, με αποτέλεσμα η ανίχνευση των ROS να βασίζεται στη μέτρηση των τελικών προϊόντων σχηματισμού μετά από την αντίδραση τους με συγκεκριμένα αντιδραστήρια[114]. Τα τελικά προϊόντα μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με μέτρηση της έντασης φθορισμού, τη χρωματομετρική μέθοδο, την ανάλυση της χημειοφωταύγεια τους, τη χρήση ηλεκτροχημικών αισθητήρων, ή ακόμα την μέθοδο φασματοσκοπίας συντονισμού σπιν ηλεκτρονίου (ESR)[115,116,117]. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται κατά τον φθορισμό είναι πολύ ευαίσθητα αντιδραστήρια στα είδη οξυγόνου. Τα γνωστά ευρέως αντιδραστήρια είναι το διυδροαιθίδιο (Dihydroethidium (DHE)), το διοξεικό 2, 7-διγλωροδιϋδρο (Dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA)), τα οποία είναι χημικά μόρια μη διαπερατά από τις μεμβράνες των κυττάρων. Οι περισσότεροι από αυτούς τους ανιχνευτές οξειδώνονται από ένα μηχανισμό ελεύθερων ριζών καταλήγοντας σε προϊόντα φθορισμού[115]. Επίσης, η ανάλυση χημειοφωταύγειας με το νιτρικό δις-N-μεθυλακριδίνιο-λουσιγενίνη χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του ανιόντος υπεροξειδίου, κατά την οποία η αντίδραση με τη ρίζα ($\cdot O_2^-$) εκπέμπει φωτόνιο ανιχνεύσιμο από το φωτόμετρο χωρίς να είναι απαραίτητη η χρήση πηγής διέγερσης. Η αντίδραση για την παραγωγή του φωτονίου ανίχνευσης περιλαμβάνει πολλαπλά στάδια αντιδράσεων[118]. Μεταξύ αυτών των χημικών ενώσεων χημειοφωταύγειας, η Λουμινόλη παραμένει η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ένωση σε πρωτόκολλα ανίχνευσης των ROS σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Επίσης, εξαιτίας της υψηλής διαχυτότητας που έχει, μπορεί και αντιδρά με το σύνολο των ενδογενών και των εξωγενών δραστικών ριζών σε κυτταρικό επίπεδο[119].

2.3.2 Πρωτόκολλο μέτρησης των δραστικών ειδών οξυγόνου

Για την ποσοτικοποίηση των συνολικών δραστικών ειδών οξυγόνου στα δείγματα που εξετάστηκαν, χρησιμοποιήθηκε η διυδροροδαμίνη (DHR-123), ένα μη φθορίζον μόριο με ευαισθησία στα παράγωγα των αντιδραστικών ριζών οξυγόνου, που διαχέεται διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης εξαιτίας της λιποφιλικότητας της. Εντάσσεται στα πρωτόκολλα φθορισμού ως χρωστική ουσία με βάση την ροδαμίνη. Εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια και οξειδώνεται ως προς το φθορίζον παράγωγο τη ροδαμίνη-123

εντός των κυττάρων παρουσία των μιτοχονδριακών ενεργών ειδών οξυγόνου ROS[120]. Συγκεκριμένα, το μόριο οξειδώνεται προς τη φθορίζουσα ροδαμίνη123 με διέγερση στα 505 nm και εκπομπή στα 529 nm καθώς παγιδεύεται μέσα στα κύτταρα με αυτή τη μορφή. Η DHR123 δεν οξειδώνεται μόνο με το υπεροξείδιο ή το H₂O₂, αλλά μπορεί να ανιχνεύσει το H₂O₂ παρουσία ενδογενών υπεροξειδασών[121]. Τα επίπεδα του κυτταρικού ROS οδηγούν σε αύξηση του φθορίζοντος σήματος και ανιχνεύονται με κυτταρομετρία ροής.

Το πρωτόκολλο του πειράματος περιλαμβάνει τα βήματα:

- ✓ Παρασκευή δείγματος ενός 1 mL με 10 mM Dihydrorhodamine-123.
- ✓ Τοποθέτηση των δειγμάτων (επιφανειών ή καναλιών) σε wallplate.
- ✓ Προσθήκη 4 mL απιονισμένου νερού στα πηγάδια του plate των δειγμάτων και προσθήκη 200 μL με 10 mM Dihydrorhodamine 123.
- ✓ Μέτρηση ROS στην χρονική στιγμή που εισέρχονται τα αντιδραστήρια στα δείγματα των καναλιών, το οποίο λαμβάνεται ως μέτρηση αναφοράς στην αρχή της κλίμακας του χρόνου παραγωγής των ROS.
- ✓ Και επανάληψη των μετρήσεων στα επιθυμητά χρονικά διαστήματα.

Τα κύτταρα μπορούν να εμποτίζονται με το μόριο DHR123 σε συνθήκες σκότους, είτε υπό την επίδραση του φωτός σε εύρος συγκέντρωσης 50–150 mM. Για να αποφευχθούν συνθήκες κορεσμού με τον ανιχνευτή θα πρέπει να γίνεται βαθμονόμηση σε ένα εύρος συγκεντρώσεων κυττάρων και έντασης σήματος, υπολογισμένο σε σχετική ποσοστιαία ποσότητα ROS%.

2.4 Υποστρώματα και μέθοδοι νανοδόμησης αυτών

Για τον χαρακτηρισμό των αντιβακτηριδιακών ιδιοτήτων και την μελέτη των μηχανισμών που οδηγούν στην διάτρηση των κυττάρων *E.coli* TOP10 χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγματα αναφοράς (control samples) υποστρώματα PMMA επίπεδα και ακατέργαστα, καθώς και εγχαραγμένα. Το υλικό ενδιαφέροντος της μελέτης αυτής είναι το οξείδιο του ψευδαργύρου(ZnO) που θα αναλυθεί σε επίπεδο επιφανειών με εμβαδό 1x1cm² και 1.5x1.5cm² για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας, καθώς και η αξιολόγηση του σαν υπόστρωμα μικρο-καναλιού με επιφάνεια S=2.8cm².

2.4.1 Υπόστρωμα πολύ (μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) PMMA

Ο πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας(PMMA) είναι ένα θερμοπλαστικό υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως σε κατασκευές για μικρο-ρευστονικές συσκευές. Αυτό το θερμοπλαστικό πολυμερές είναι υψηλής ακαμψίας, οπτικά διαπερατό και αρκετά εύκολο στην επεξεργασία του λόγω των μηχανικών και χημικών ιδιοτήτων του. Έχει χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή μικρο-αναμικτών και αντιδραστήρων PCR ακόμα και στην παραγωγή αντλιών και βαλβίδων στην ενσωμάτωση τους σε ρευστονικές διατάξεις[122]. Το PMMA επιτρέπει την ομαλή συγκόλληση του με άλλα

διαφορετικά πολυμερή υλικά όπως το PDMS, όπου θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω για το σφράγισμα των καναλιών.

2.4.2 Υπόστρωμα ψευδαργύρου (Zn) και οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO)

Το οξείδιο ψευδαργύρου επιλέχθηκε ως το πρότυπο υλικό για την αντιβακτηριακή δράση των επιφανειών καθώς είναι ευρέως γνωστή η αποτελεσματικότητά του ως αντιβακτηριδιακός παράγοντας[123]. Το οξείδιο του ψευδαργύρου ZnO, μεταξύ των τύπων ημιαγωγών II-VI, αποτελεί ένα υλικό με σημαντικές της χημικές και φυσικές ιδιότητες του, και καλύπτει πλήθος εφαρμογών, όπως την συμβολή του σε μικρο-και νανο-διατάξεις. Είναι ευέλικτο υλικό ως προς τις μεθοδολογίες που τροποποίησης της επιφανείας του σε κλίμακες που κυμαίνονται από μικρο- έως νανο-επίπεδου, αναδεικνύοντας μια ποικιλία μεθόδων ανάπτυξης που έχουν ως αποτέλεσμα μια σειρά από διαφορετικές τοπογραφίες και ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων του υλικού [124].

2.4.3 Επιφανειακή τροποποίηση υποστρωμάτων με την τεχνολογία του πλάσματος επαγωγικής σύζευξης ICP (Inductively Coupled Plasma)

Ο αντιδραστήρας υψηλής πυκνότητας ICP (Inductively Coupled Plasma) του Ινστιτούτο μικροηλεκτρονικής από την Alcatel, έχει την ονομασία MET (Micromachining Etch Tool) και χρησιμοποιείται για διεργασίες εγχάραξης ή απόθεσης διαφόρων υλικών. Χρησιμοποιήθηκε για την κατεργασία PMMA υποστρωμάτων. Οι κύριες πειραματικοί παράμετροι του αντιδραστήρα είναι η ισχύς πλάσματος (W), η τάση δυναμικού πόλωσης(V),η ισχύς δυναμικού πόλωσης (W),η πίεση αερίου(mTorr), η θερμοκρασία ηλεκτροδίου(°C) και η ροή αερίουO₂(sccm)[ενώ μετράτε ο ρυθμός εγχάραξης (μm/min) στις συνθήκες λειτουργίας του αντιδραστήρα]. Για την κατεργασία των υποστρωμάτωνPMMAχρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες:

Πίνακας 2.4.3: Συνθήκες πλάσματοςICP για την κατεργασία υποστρώματος PMMA.

| | |
|--------------------|-------------|
| Πίεση | 0.75 Pa |
| Ισχύς | 1900W-100 V |
| Δυναμικό πόλωσης | |
| Χρόνος | 10 min |
| Ροή O ₂ | 100 sccm |

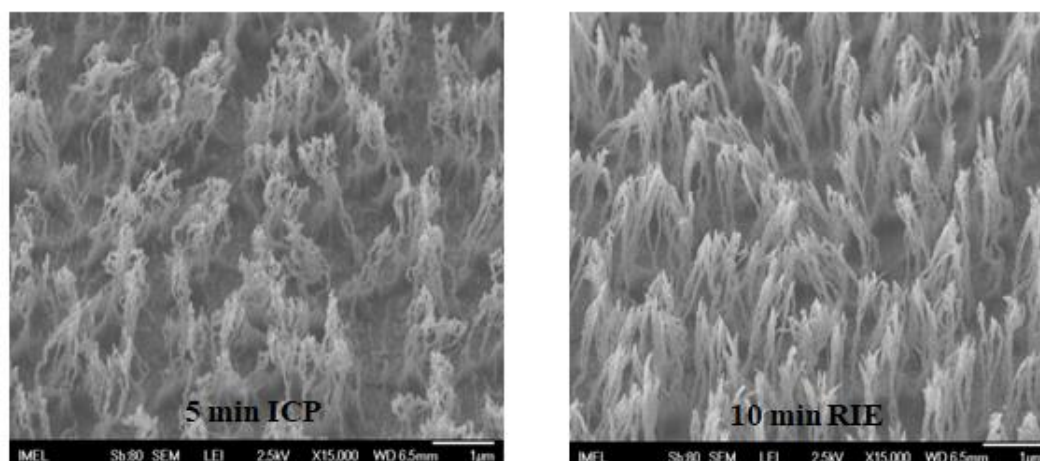
2.4.4 Επιφανειακή τροποποίηση υποστρωμάτων με την τεχνολογία εγχάραξης πλάσματος με δραστικά ιόντα RIE(Reactive Ion Etcher)

Ο αντιδραστήραςRIE (Reactive Ion Etcher) χρησιμοποιεί τον βομβαρδισμό δραστικών ιόντων για την ενίσχυση της εγχάραξης με ανισοτροπία και ομοιομορφία των δειγμάτων. Η επιλεκτικότητα και ο ρυθμός εγχάραξης εξαρτώνται από τα αέρια διεργασίας. Στα υποστρώματα του PMMAχρησιμοποιήθηκαν οι εξής συνθήκες:

Πίνακας 2.4.4: Συνθήκες πλάσματος RIE για την κατεργασία υποστρώματος PMMA

| | |
|--------------------|----------|
| Πίεση | 10 mTorr |
| Ισχύς | 400 W |
| Χρόνος | 20 min |
| Ροή O ₂ | 50 sccm |

Οι συνθήκες πλάσματος στους δύο αντιδραστήρες διαφέρουν και οδηγούν σε διαφορετικούς ρυθμούς εγχάραξης και τοπογραφίας της επιφάνειας. Από την εργασία τους οι Tsougeni et al.[125] στο εργαστήριο πλάσματος του Ινστιτούτου Νανοτεχνολογίας και Νανοεπιστήμης διέκριναν το σχηματισμό πυκνών και υψηλών νανο- και μικρο-κολώνων (1μm) σε υπόστρωμα PMMA με χρόνο εγχάραξης 5 min σε αντιδραστήρα πλάσματος ICP και τον σχηματισμό νανο- και μικρο-κολώνων σε ύψος 1,3μm σε χρόνο 1 min στον αντιδραστήρα RIE (Σχήμα 3.2.4).



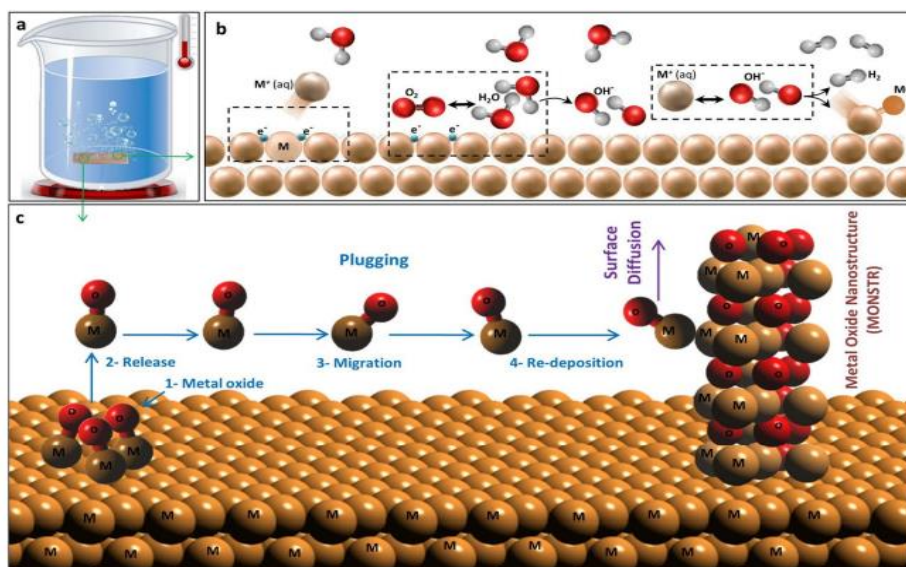
Σχήμα 2.4.4.1: Εικόνες SEM σε υπόστρωμα PMMA α) εγχαραγμένο με πλάσμα O₂ σε αντιδραστήρα πλάσματος ICP και β) εγχαραγμένο σε αντιδραστήρα RIE [125].

2.4.5 Νανοδόμηση υποστρωμάτων ZnO με χρήση θερμού ύδατος

Νανοδομές ZnO μπορούν να αναπτυχθούν από μια ποικιλία διαφορετικών μεθόδων, από τεχνικές βασισμένες σε τεχνολογία πλάσματος, έως και χημικές μεθόδους με χρήση χημικών αντιδραστηρίων[126]. Η τεχνολογία του πλάσματος μέσω της εναπόθεσης ατμών στοχεύει στην εναπόθεση στρωμάτων υλικού από άτομο προς άτομο πάνω σε μια στερεή επιφάνεια και τον έλεγχο της διάχυσης των σωματιδίων. Αυτές οι διεργασίες λειτουργούν σε πιέσεις πολύ κάτω από την ατμοσφαιρική πίεση (δηλ. το κενό). Γενικά, οι τυπικές μεθοδολογίες που επιτρέπουν καλύτερο έλεγχο τόσο του μεγέθους όσο και των μορφολογιών ενός λεπτού φιλμ ZnO περιλαμβάνουν πλήθος τεχνικών όπως: την τεχνική κολλοειδούς γέλης και περιστροφής (sol-gel, spin-coating) [127], την υδροθερμική σύνθεση[128], τη μέθοδο καύσης (combustion method)[129], την χημική εναπόθεση ατμών (CVD)[130], τη πυρόλυση[131], τον βομβαρδισμό ιόντων με διαμόρφωση μαγνητικού πεδίου (magnetron sputtering)[132], την οργανική

χημική εναπόθεση ατμού μετάλλων (MOCVD)[133], την εναπόθεση με παλμικό λέιζερ (PLD)[134], τη μέθοδο συγκαταβύθισης (co-precipitation method)[135], την φυσική εναπόθεση υμενίων φυσικών ατμών(PVD)[136], την μέθοδο εναπόθεσης σε ηλεκτρολυτικό λουτρό(chemical bath deposited)[137], της εναπόθεσης ψεκασμού με τη χρήση υπερήχων (Ultrasonic Spray Pyrolysis, USP) [138], με βομβαρδισμό από ιόντα (sputtering) και δέσμες ηλεκτρονίων(e-beam)[139]. Η πιο διαδεδομένη τεχνική είναι της κολλοειδούς γέλης(sol-gel) για την ανάπτυξη νανοδομών και υμενίων.

Η νανοδόμηση που εμφανίζουν οι επιφάνειες και τα τοιχώματα του νανοδομημένου καναλιού ZnO που μελετάται στην παρούσα εργασία, στηρίζεται στην τεχνική του θερμού νερού (water-bath treatment). Οι Saadi, N. S., et al. [137], αναπτύσσοντας αυτή την τεχνική, αποδεικνύουν ότι ένα ευρύ φάσμα μετάλλων έχει την ικανότητα να σχηματίζει νανοδομές μετάλλων μετά την αλληλεπίδραση της επιφάνειας τους με θερμό νερό. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει ένα μόνο στάδιο με ελεγχόμενη επιμήκυνση των νανοδομών, προσφέροντας χαμηλό κόστος και φιλικές συνθήκες προς το περιβάλλον. Η τελική μορφοποίηση της νανοδομής που εμφανίζουν τα διαφορετικά οξειδία μετάλλων υπό αυτή την τεχνική καθορίζεται από την κρυσταλλικότητα του πλέγματος, τον μηχανισμό διάχυσης στην επιφάνεια και την επιφανειακή ενέργεια ελαχιστοποίησης. Σε κάθε στάδιο που περιγράφεται παρακάτω ο ρυθμός οξείδωσης, η χημεία του νερού σε επίπεδο pH και αγωγιμότητας, καθώς και το διαλυμένο οξυγόνο, είναι παράμετροι που εξαρτώνται από το κάθε οξύδιο. Ως προς τα βασικά βήματα της νανο-κατασκευής που εκτελείται στο λουτρό του νερού με τους μηχανισμούς αυτούς, το πρώτο περιλαμβάνει το σχηματισμό των μορίων μεταλλικού οξειδίου στην επιφάνεια του υποστρώματος προς σχηματισμό ενός φιλμ. Κατά την διαδικασία αυτή κάποια μόρια του οξειδίου του μετάλλου μπορούν να διαχέονται στην επιφάνεια. Σε επόμενο βήμα, παρατηρείται από το(Σχήμα 2.4.5.1) ο μηχανισμός κατακρήμνισης με την ονομασία –plugging-που περιγράφει την διάβρωση των μετάλλων στην επιφάνεια τους. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει την απελευθέρωση του μορίου του μεταλλικού οξειδίου (Απελευθέρωση) από την επιφάνεια στο υγρό ακολουθούμενη από μεταφορά μέσω νερού (Μετανάστευση) και καθίζηση (Εναπόθεση) σε άλλη θέση επιφάνειας. Η διαδικασία εκτελείται στους 75°C ή 95°C με παρατήρηση των τοπολογιών που δημιουργούνται στο χρονικό ορίζοντα των 10 λεπτών (10min) έως είκοσι τεσσάρων ωρών (24 h).



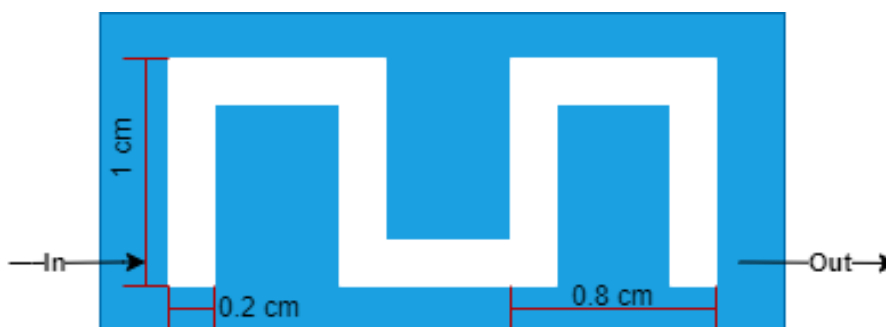
Σχήμα 2.4.5.1: Διαδικασία HWT στο σχηματισμό των νανοδομημένων οξειδίων μετάλλων(MONSTR). (a) θερμική επεξεργασία με θερμό νερό(HWT), (b) σχηματισμός ενώσεων κατά τη διάρκεια της HWT στη διεπιφάνεια μετάλλου/νερού και (c) βήματα που εμπλέκονται στον σχηματισμό των οξειδίων κατά τη διάρκεια HWT. Ο κύριος μηχανισμός σχηματισμού της νανοδομής περιλαμβάνει το «plugging» και την διάχυση στην επιφάνεια[137].

Ο μηχανισμός πίσω από τη διάταξη των νανοδομών όπως περιγράφεται από τους Wai Kian Tan et al.[140] είναι η επιφανειακή οξείδωση του ZnO με τα μόρια του νερού όπου κυριαρχεί έναντι της επιφανειακής διάχυσης, με την πρώτη να προάγει τη μη επίπεδη ανάπτυξη στη μεταλλική επιφάνεια Zn. Οι κόκκοι(grains) των ZnO δρουν ως θέσεις πυρήνων. Συγκεκριμένα, για την επιφανειακή οξείδωση που κυριαρχεί αυτό που συμβαίνει είναι ότι τα μόρια του νερού είναι εξαιρετικά πολικά με το αρνητικό μερικό φορτίο στο οξυγόνο τα οποία έλκονται από τα άτομα Zn και προσροφώνται στην επιφάνεια. Η γρήγορη προσρόφηση και η διάσπαση των μορίων του νερού στην επιφάνεια του Zn επιταχύνει την κινητική της οξείδωσης προς σχηματισμό νανοκρυστάλλων ZnO[141]. Στη συνέχεια, περισσότερα ιόντα Zn διαχέονται στην επιφάνεια για να αντιδράσουν με το νερό και σχηματίζουν νανοδομές ZnO. Οι νανοκρύσταλλοι ZnO προτιμούν μια εξαγωνική δομή που είναι θερμοδυναμικά σταθερότερη με αποτέλεσμα την ανάπτυξη νανοδομών ZnO με ιδανική εξαγωνική κρυσταλλική δομή.

2.5 Κατασκευή απλής μικρορευστονικής διάταξης

2.5.1 Διαστασιολόγηση και κατασκευή καναλιού

Αφού διαπιστώθηκε η αντιβακτηριακή δράση των υποστρωμάτων ZnO, μικροκανάλια από υποστρώματα επίπεδου Zn και νανοδομημένου ZnO κατασκευάστηκαν σύμφωνα με τους σκοπούς της εργασίας.



Σχήμα 2.5.1.1: Διαστάσεις μικρο-καναλιού στα υποστρώματα μελέτης νανοδομημένου ZnO και επίπεδου PMMA

Για να γίνεται χρήση μικρού όγκου εναιωρήματος κυττάρων χρησιμοποιήθηκε τυπικός όγκος των 26μl με εμβαδόν επιφάνειας αντίστοιχης των ανοιχτών επιφανειών διαστάσεων 1.5x1.5 cm². Οι μετρήσεις με τα πρωτόκολλα βιωσιμότητας των κυττάρων καθώς και άλλων πρωτοκόλλων ανίχνευσης του DNA διεξήχθησαν σε σταθερής διατομής μικροκανάλι με τις εξής διαστάσεις: πλάτος $W=0.2$ cm, ύψος $H=200\mu\text{m}$ και μήκος μαιανδρικού καναλιού $L=6.4$ cm. Η επιφάνεια του καναλιού υπολογίζεται $S=2,8$ cm². Οι διαστάσεις αυτές υπολογιστικά επιλέχθηκαν σύμφωνα με τον υπολογισμό του ρυθμού θανάτωσης που είναι της τάξης του 10^7 CFU/cm²h, σε μικρούς χρόνους παραμονής των κυττάρων σε στατική συνθήκη μέσα στο κανάλι. Οι χρόνοι παραμονής στα πειράματα που ακολουθούν είναι η 0.5h και 0.25h. Η κοπή και εγχάραξη του καναλιού έγινε σε υποστρώματα PMMA επίπεδα ή εγχαραγμένα για την χρησιμοποίησή τους ως υποστρώματα αναφοράς (controls) με την μέθοδο CNC milling με βάση του σχέδιο του σχήματος (Σχήμα 2.5).

2.5.2 Σφράγιση του καναλιού

Μετά την κατασκευή των υποστρωμάτων με τα εγχαραγμένα ορθογώνια μαιανδρικά κανάλια με την μέθοδο CNC, απαραίτητο βήμα για την χρησιμοποίησή τους ήταν η κάλυψη του καναλιού, για την αποφυγή διαρροών, με ένα άλλο υλικό λεπτού φιλμ, παρόμοιου πάχους περίπου 4mm. Το υλικό που επιλέχθηκε ήταν το PDMS. Συνηθισμένες τεχνικές σφράγισης των καναλιών όταν αυτά είναι από πλαστικό υλικό, είναι η θέρμανση των υλικών όταν έρχονται σε επαφή και φτάνουν την θερμοκρασία της υαλώδους μετάπτωσης. Στην περίπτωση του ZnO αυτό δεν μπορούσε να πραγματοποιηθεί, συνεπώς η χρήση ενός πολυμερούς και εύκαμπτου υποστρώματος όπως του PDMS όπου εφάπτεται σε όλη την επιφάνεια πραγματοποιήθηκε στις πρώτες δοκιμές. Με την βοήθεια chipholder τα πλακίδια ZnO-PDMS παραμένουν σταθερά σε επαφή μέσω μηχανικής πίεσης περιμετρικά στην επιφάνεια, δίνοντας καλά

αποτελέσματα έναντι των πιθανών διαρροών από το κανάλι. Το ίδιο αποτέλεσμα εμφάνισαν κατά την επαφή τους τα πλακίδια Zn-PDMS,

Η πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS) είναι ένα ελαστομερές πολυμερές που χρησιμοποιείται ευρέως στις μικρο-ρευστομηχανικές διατάξεις συσκευών. Σε σύγκριση με το άλλα πολυμερή, το PDMS έχει χαμηλή θερμοκρασία μετάπτωσης υάλου ($T_g \approx -125^\circ\text{C}$), καλή αντοχή σε κάμψη, καθώς και λειτουργικότητα σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (τουλάχιστον από -50°C έως $+200^\circ\text{C}$). Επίσης, αποτελεί μη τοξικό προϊόν για την φύση. Η τεχνική αντιγραφής της μήτρας/καλουπιού (replica moulding) για την κατασκευή διατάξεων PDMS αποτελεί μια απλή διαδικασία. Επιπλέον, η χαμηλή θερμοκρασία σκλήρυνσης ($<100^\circ\text{C}$) το καθιστά εξαιρετικό υλικό για τη συγκόλληση πολυμερικών υποστρωμάτων). Γενικά, το PDMS είναι ένα σημαντικό υλικό για τις μικρο-συσκευές λόγω της βιο-συμβατότητάς του, του χαμηλού κόστους και της γρήγορης αναπαραγωγής του [142].

Για την κατασκευή των πλακιδίων, υπήρχε ανάγκη για την παρασκευή καλουπιών διαστάσεων 2×3.5 cm και ύψους 3mm με οπές 1.5mm στα σημεία εξόδου και εισόδου του καναλιού στο (Σχήμα 2.5.1.1). Στα καλούπια έγινε χύτευση του ρευστοποιημένου PDMS, αρνητικού αντιγράφου των καναλιών, μέχρι τον χρόνο πολυμερισμού του και σταθεροποίησης του. Επειδή το PDMS χρειάζεται θερμοκρασία κοντά στους $60-80^\circ\text{C}$ και συγκριμένο χρονικό διάστημα μέχρι της τελικής στερεοποίησης του, τα καλούπια χρειάζεται να αντέχουν τις θερμοκρασίες πολυμερισμού του και της θερμοσκλήρυνσής του.

Η εκτύπωση των καλουπιών έγινε με στερεολιθογραφία (SLA) 3D τρισδιάστατης εκτύπωσης από την εταιρεία ΚΩΣ ΕΛΛΑΣ. Όσον αφορά την χρήση των ρητινών για την εκτύπωση του καλουπιού χρησιμοποιήθηκε η λευκή τυπική ρητίνη (standard white), ένα ημιδιαφανές υλικό σε υγρή μορφή. Ένας τρισδιάστατος εκτυπωτής με τεχνολογία SLA χρησιμοποιεί μια πλατφόρμα βυθισμένη σε μια διαφανή δεξαμενή που είναι γεμάτη με υγρή ρητίνη. Η διαδικασία αρχίζει όταν μια κεφαλή laser υπεριωδών ακτινών χαμηλής ισχύος κινούμενη οριζοντίως και καθέτως σχεδιάζει το αντικείμενο, σύμφωνα με το ψηφιακό σχέδιο.

Επίσης, στα χαρακτηριστικά που αναγράφονται για τις ιδιότητες της ρητίνης που χρησιμοποιείται στην εκτύπωση, αποτελεί η διάλυση με συμβατό διαλύτη. Σύμφωνα με την αναφορά για την συμβατότητα της ρητίνης σε ένα σύνολο διαλυτών ύστερα από 24 ώρες βύθισης στον καθένα, η ακετόνη μπορεί να δημιουργήσει ραγίσματα (cracked) στην κατασκευή. Στο εργαστήριο για τον καθαρισμό των δειγμάτων υπάρχει η αιθανόλη 70%, η ακετόνη και η ισοπροπανόλη. Κάποια δείγματα από τα καλούπια που χρησιμοποιήθηκαν έδειξαν κάποιες αστοχίες ως προς την αφαίρεση των μικρο-κολόνων (microposts) που ήταν εκτυπωμένα και αντιπροσώπευαν τις θέσεις εισόδου και εξόδου (οπές) στο PDMS. Επίσης, πριν την χύτευση του PDMS στο καλούπι, τα καλούπια θερμάνθηκαν στο φούρνο στους 60°C για 24 ώρες. Η αιτία που ακολουθήθηκε το βήμα αυτό ήταν ότι το PDMS κατά την διαδικασία αποκόλλησης από τα καλούπια, άφηνε πίσω του υπολείμματα τα οποία ήταν δύσκολο να αφαιρεθούν

ακόμα και με έκπλυση διαλυτών. Επιπλέον, η πλευρά του PDMS που ερχόταν σε επαφή με τη ρητίνη του καλουπιού εμφάνιζε μια θολερότητα, η οποία οφειλόταν στην τραχύτητα που δημιουργούταν λόγω δυσκολίας κατά την αποκόλληση του και δημιουργίας υπολειμμάτων.

Για την κατασκευή της συγκράτησης του πλακιδίου που είναι εγχαραγμένο το κανάλι με το πλακίδιο που λειτουργεί ως καπάκι κάλυψης του, χρησιμοποιήθηκε το chipholder που φαίνεται στο (Σχήμα 2.5.2.1). Παρασκευάστηκε στο Μηχανουργείο του ΕΚΕΦΕ και είναι έγινε εύκολο στην εφαρμογή του, αφού μπορεί να ανοίγεται και να καθαρίζεται όποτε είναι απαραίτητο. Η πίεση που ασκεί στα πλακίδια είναι σταθερή για την επαφή των υποστρωμάτων χωρίς την εμφάνιση διαρροών του υγρού κατά την μεταφορά του από την είσοδο του καναλιού προς την έξοδο. Το σημείο που χρήζει ιδιαίτερης προσοχής είναι το ακάλυπτο μέρος του chipholder όπου αν ασκηθεί περισσότερη δύναμη στα άκρα λόγω ισχυρού βιδώματος, δημιουργείται ένα κοίλο προς τα άνω από το PDMS και το υγρό διαχέεται έξω από το κανάλι. Τα πλακίδια πρέπει να δέχονται την ίδια εγκάρσια δύναμη πίεσης σε όλα τα σημεία με τις βίδες να το σταθεροποιούν.

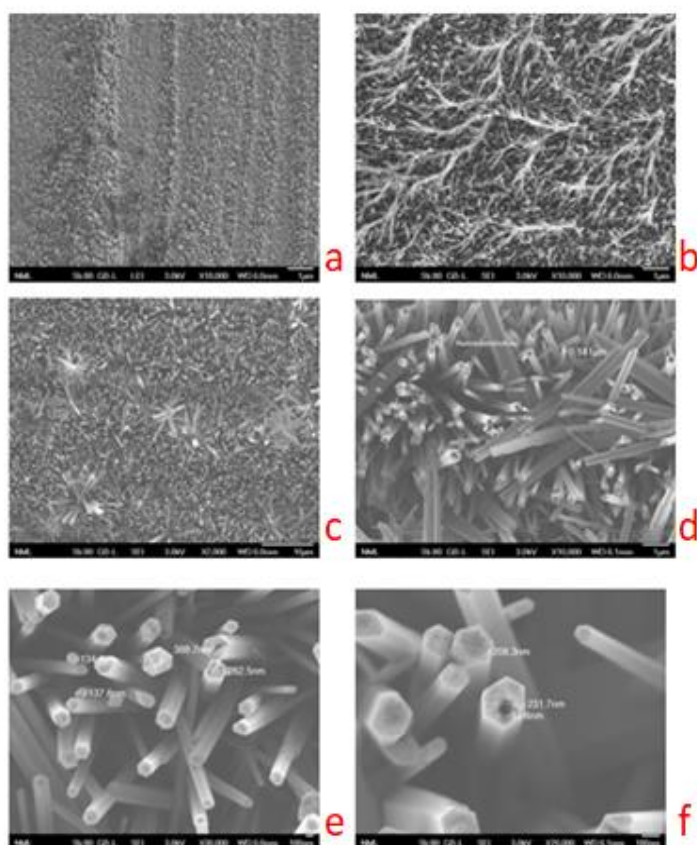


Σχήμα 2.5.2.1: Εικόνες από το μικρο-κανάλι που είναι σχηματισμένο στο υπόστρωμα ZnO με κάλυμμα από PDMS και τοποθέτηση του σε chipholder για μηχανική συγκράτηση.

Κεφάλαιο 3: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ και ΣΥΖΗΤΗΣΗ

3.1 Χαρακτηρισμός νανοδόμησης στις επιφάνειες και στα μικρο-κανάλια σε υποστρώματα ZnO

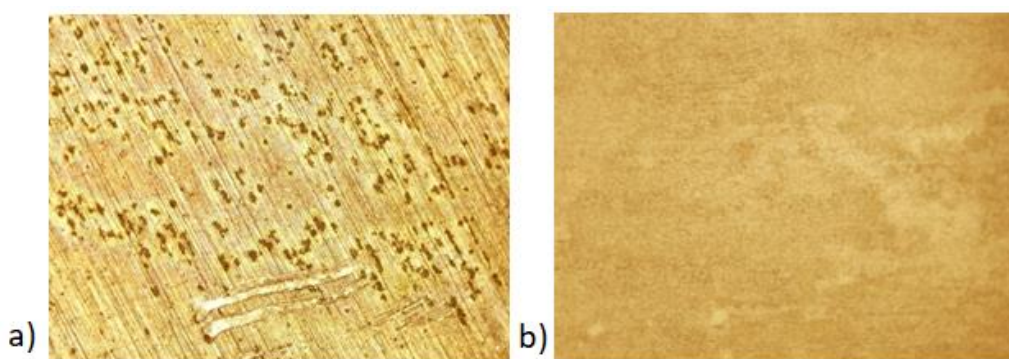
Για την παρατήρηση και μελέτη της μορφολογίας των δομών που μελετάμε σε υποστρώματα ZnO (που μας εστάλησαν από το ETH, Zurich), χρησιμοποιήθηκε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Οι νανοδομές ZnO που σχηματίζονται μετά από παραμονή απλών υποστρωμάτων ZnO στο θερμό ύδωρ, παρουσιάζονται στο (Σχήμα 3.1.1). Από το μικροσκόπιο SEM που βρίσκεται στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης & Νανοτεχνολογίας (Τομέας Νανοηλεκτρονικής-Φωτονικής-Μικροσυστήματα) και είναι το LEO 440 (Zeiss-Leica), ελήφθησαν οι παρακάτω φωτογραφίες, σε διαφορετικές μεγεθύνσεις σε διάφορα σημεία σάρωσης στην επιφάνεια. Προκύπτει ότι οι σχηματιζόμενες δομές στην επιφάνεια των υποστρωμάτων είναι νανομετρικών διαστάσεων και εντοπίζονται σε ολόκληρη την επιφάνεια των πλακιδίων ZnO αλλά και των τοιχωμάτων στο μικρο-κανάλι.



Σχήμα 3.1.1: Εικόνες SEM με (a)το επίπεδο ZnO υπόστρωμα (κλίμακα 1μm), (b) το νανοδομημένο με θερμική επεξεργασία ZnO υπόστρωμα στο εσωτερικό του καναλιού (1μm), (c)-(f)το νανοδομημένο υπόστρωμα με την θερμική επεξεργασία σε διαφορετικές μεγεθύνσεις.

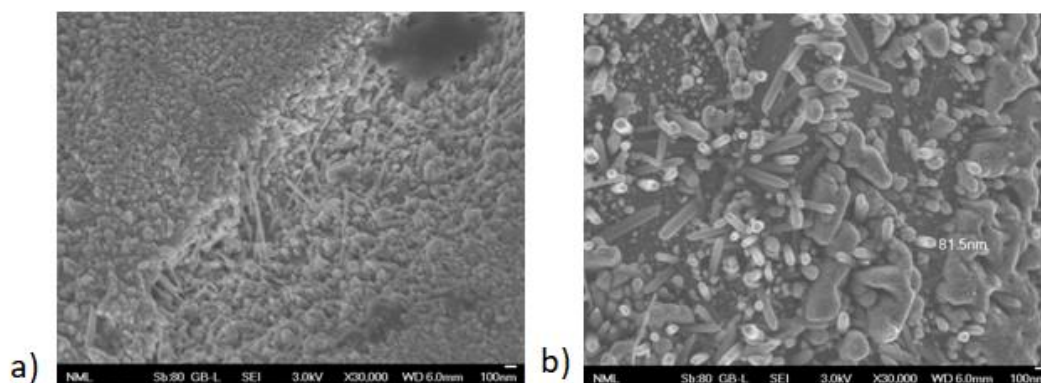
Στα σχήματα 3.5 (b)-(f), παρουσιάζεται η νανοδομημένη επιφάνεια του ZnO που προέκυψε από την διαδικασία θερμικής επεξεργασίας σε λουτρό νερού σε απλή επίπεδη επιφάνεια του οξειδίου (a). Στην Εικόνα 3.5 (b) διακρίνεται ότι η τοπογραφία της νανοδομημένης επιφάνειας του οξειδίου αναπαράγεται ομοιόμορφα στην επιφάνεια σε σχέση με το επίπεδο 3.5(a) στην κλίμακα 1μm.

Κατά την εμφάνιση και διατήρηση του υποστρώματος στο θερμό ύδωρ, αναπτύσσονται νανοδομές μετά από 24h, εισάγοντας τραχύτητα στην επιφάνεια του με την τοπογραφία που απεικονίζεται στις εικόνες 3.5(b)-(f). Στην 3.5(e) φαίνονται σε μεγαλύτερη μεγέθυνση(x30.000) και κλίμακα 100nm οι πυκνές εξαγωνικές νανοράβδοι του ZnO, καθώς διασταυρώνονται υπό γωνία μεταξύ τους, δημιουργώντας σημαντική τραχύτητα στο εσωτερικό του καναλιού. Εμφανίζονται νανοκολώνες με διάμετρο 390nm, ενώ κάποιες εμφανίζουν εσωτερικές οπές διαμέτρου 58 nm, όπως απεικονίζεται στην 3.5 (f). Στην εικόνα 3.5 (c) σαρώνοντας μεγαλύτερο εμβαδόν επιφάνειας στην κλίμακα των 10μm, παρατηρείται ότι σε κάποια σημεία οι εξαγωνικές νανοράβδοι διακλαδώνονται πιο έντονα σε συγκεκριμένα σημεία, όχι ομοιόμορφα στην επιφάνεια, σχηματίζοντας δομές τύπου αχινού (spikes). Στην εργασία που δημοσίευσαν οι Milionis, A., et al. [76], σύμφωνα με την τεχνική του θερμού ύδατος που παρασκευάστηκαν οι επιφάνειες που εξετάζονται σε αυτή την εργασία, περιγράφονται τα στάδια της διαδικασίας εναπόθεσης των νανοδομών πάνω στο υπόστρωμα του ZnO σύμφωνα με τον χρόνο βύθισης και παραμονής στο θερμό λουτρό. Στην δική μας μελέτη, τα υποστρώματα που χειριζόμαστε παρασκευάζονται με χρόνο βύθισης 24h. Τέλος, απαραίτητη κρίνεται πριν τη λήψη των φωτογραφιών η προσεκτική προετοιμασία των δειγμάτων και η καθαρότητα της επιφάνειας τους για να πάρουμε όσο τον δυνατόν εικόνες υψηλής ποιότητας. Για την μελέτη της μορφολογίας, χρησιμοποιήθηκε επίσης το οπτικό μικροσκόπιο με εύκολο χειρισμό των δειγμάτων και μεγέθυνση της τάξης x10, σε επιφάνειες ZnO. Σε μια παρτίδα των νανοδομημένων ZnO επιφανειών που μας εστάλησαν είχε γίνει αντιληπτή με γυμνό μάτι λευκή σκόνη πάνω στην επιφάνεια, όπου σε συνδυασμό με το θρεπτικό μέσο στα πρωτόκολλα επιβίωσης των βακτηρίων μετατρέπονταν σε λευκό ίζημα μέσα στο διάλυμα. Για να κατανοηθούν οι διαφορές σε σχέση με επιφάνειες που δεν εμφάνιζαν το χαρακτηριστικό αυτό, οι επιφάνειες παρατηρήθηκαν με οπτικό μικροσκόπιο. Πριν την φωτογράφιση των επιφανειών, οι επιφάνειες καθαρίστηκαν με μεθανόλη 70% και απομακρύνθηκαν οποιαδήποτε σωματίδια με ροή αζώτου.



Σχήμα 3.1.2: Νανοδομημένο ZnO από 2 διαφορετικές παρτίδες κατασκευής με την ίδια μέθοδο. Στο δείγμα b) διακρινόταν με γυμνό μάτι λευκή σκόνη στην επιφάνεια, ενώ το δείγμα a) φαινόταν πιο λείο.

Στο (Σχήμα 3.1.2b), η επιφάνεια φαίνεται θολή εξαιτίας της μεγαλύτερης τραχύτητας της επιφάνειας που διαχέει πιο έντονα το φως. Με την λήψη των εικόνων SEM στις δύο παρτίδες παρατηρείται η διαφοροποίηση των νανοδομών (κλίμακα 100nm) με την πρώτη παρτίδα να αποτελείται από μικρότερες νανοδομές σε σχέση με την δεύτερη (Σχήμα 3.1.3.)

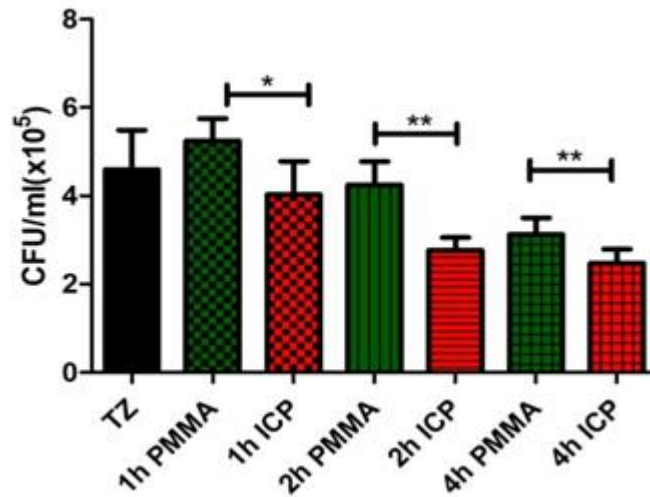


Σχήμα 3.1.3: Εικόνες SEM του νανοδομημένου ZnO (κλίμακα 100 nm) από τις δύο διαφορετικές παρτίδες με την ίδια μέθοδο κατασκευής, a) της πρώτης παρτίδας και b) της δεύτερης παρτίδας.

3.2 Μελέτη βιωσιμότητας των βακτηρίων στις επιφάνειες

3.2.1 Υπολογισμός των επιζώντων κυττάρων *E.coli* σε εγχαραγμένο PMMA με RIE και ICP τεχνολογία πλάσματος

Για την μελέτη των επιζώντων κυττάρων σε νανοδομημένες επιφάνειες, ως υποστρώματα αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια από επίπεδη πολυμερική επιφάνεια PMMA με πάχος 3mm. Στην πρώτη φάση των πειραμάτων, οι επιφάνειες που μελετήθηκαν για την επιβίωση των κυττάρων ήταν επίπεδα και ακατέργαστα υποστρώματα PMMA, καθώς επίσης υποστρώματα μετά από εγχάραξη της επιφάνειας με ICP και RIE τεχνολογίες πλάσματος. Ο χαρακτηρισμός των υποστρωμάτων PMMA ως προς το ποσοστό της επιβίωσης βακτηρίων *E. coli* πραγματοποιείται με σκοπό τη χρήση των επιφανειών αυτών συγκριτικά με υποστρώματα ZnO.

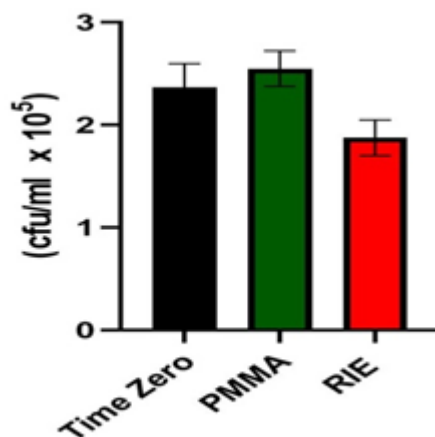


Σχήμα 3.2.1.1: Επιβίωση των κυττάρων *E.coli* TOP 10 (σε CFU/ml), σε επιφάνειες επίπεδου PMMA και εγχαραγμένου με ICP πλάσμα μετά από παραμονή 1,2 και 4 αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης $4.6 \cdot 10^5$ CFU/ml.

Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων που χρησιμοποιήθηκε για την κάλυψη όλων των επιφανειών ήταν $4.6 \cdot 10^5$ CFU/ml (TZ), όπως αναφέρεται στο (Σχήμα 3.2.1.1), που προκύπτει από την μέτρηση των αποικιών τους διαλύματος κυττάρων αρχικής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml. Η εκτέλεση των πειραμάτων με την μέθοδο Microplating assay απεικονίζει τον μέσο όρο των αποικιών που επιζούν πάνω από μια επιφάνεια, δείγμα από το οποίο επιστρώνονται τρία τρυβλία. Να σημειωθεί ότι χρησιμοποιήθηκαν δύο επιφάνειες κάθε υποστρώματος σε όλους τους χρόνους παραμονής, συνεπώς υπήρχαν έξι συνολικά τρυβλία από κάθε δείγμα για την καταμέτρηση των αποικιών. Η τυπική απόκλιση των τιμών που λαμβάνονται για κάθε δείγμα εμφανίζεται ως ράβδος σφάλματος. Το περιβάλλον στο οποίο περιέχονται τα κύτταρα στην αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού (TZ) είναι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Με επώαση στους 37°C της αρχικής συγκέντρωσης κυττάρων σε διαφορετικούς χρόνους παραμονής πάνω στις επιφάνειες διαστάσεων $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$, η διαφορά στην τάξη μεγέθους της επιβίωσης του πληθυσμού είναι σημαντική. Κατά την επώαση τα κύτταρα στις επιφάνειες δεν παραμένουν μόνο σε σταθερή θερμοκρασία, αλλά υπόκεινται σε μέτρια ανάδευση των 50 rpm μέσα στον επωαστήρα. Η μηχανική ανάδευση κατά την διαδικασία παραμονής των κυττάρων πάνω στις επιφάνειες συμβάλει στην ομοιόμορφη διασπορά τους. Τα επίπεδα PMMA που αναγράφονται στο άξονα x αναφέρονται ως επιφάνειες ελέγχου για κάθε χρόνο παραμονής, εφόσον δεν εμφανίζουν αντιβακτηριακή δράση. Από την στατιστική ανάλυση η συνεισφορά των εγχαραγμένων PMMA στο ICP στην κυτταρική θνητότητα είναι σημαντική με τον δείκτη $p < 0.01$ και κατά 23% μείωση του πληθυσμού συγκριτικά με το επίπεδο μη επεξεργασμένο PMMA εντός της 1h επώασης και ανάδευσης. Σε μεγαλύτερο χρόνο παραμονής 2h η διαφορά είναι αρκετά σημαντική με $p < 0.001$ μεταξύ του επίπεδου PMMA και του εγχαραγμένου, με ποσοστό θανάτωσης 34% και 20% για τις δύο και τέσσερις ώρες επώασης, αντίστοιχα. Παρατηρείται ότι τα βακτήρια που επωάζονται πάνω στις επιφάνειες σε μεγαλύτερους χρόνους στο επίπεδο PMMA εμφανίζουν

μείωση στον πληθυσμό τους κατά 7,6% στις δύο ώρες παραμονής και 32% στις τέσσερις ώρες παραμονής. Αν και είναι εμφανής η μείωση του πληθυσμού ακόμα και στο απλό επίπεδο PMMA, η διαφορά στον αριθμό των επιζώντων κυττάρων μεταξύ επιπέδου PMMA ελέγχου και εγχαραγμένου PMMA είναι διακριτή σε όλους τους χρόνους. Ο έλεγχος και η επαλήθευση των αποτελεσμάτων με τα υποστρώματα ελέγχου PMMA επιτρέπει την αξιολόγηση και σύγκριση με τα υποστρώματα ZnO που θα εξεταστούν για την αντιβακτηριακή τους δράση στις επόμενες ενότητες.

Επίσης, πραγματοποιώντας την ίδια μέθοδο επώασης των κυττάρων και επίστρωσης του διαλύματος βακτηρίων από τις επιφάνειες με την μέθοδο Microplating, ακολούθησε η μέτρηση των επιζώντων αποικιών στα τρυβλία για δύο επιφάνειες επιπέδου και εγχαραγμένου PMMA με τεχνολογία πλάσματος RIE. Καθώς το εργαστήριο διαθέτει δύο αντιδραστήρες πλάσματος, μελετήθηκε η συμπεριφορά του εγχαραγμένου PMMA και με τις δύο τεχνολογίες.



Σχήμα 3.2.1.2: Επιβίωση των *E.coli* TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επιπέδου PMMA και εγχαραγμένου με RIE πλάσμα, με παραμονή 1 h της βακτηριακής συγκέντρωσης 10⁶ CFU/ml.

Όπως φαίνεται στο (Σχήμα3.2.1.2), υπάρχει μείωση στην επιφάνεια RIEPMMA παρόμοια με την ICPPMMA σε σχέση με το επίπεδο PMMA. Οι συνθήκες του πειράματος που επιλέχθηκαν είναι η 1 h επώασης των κυττάρων πάνω στις επιφάνειες και η αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού είναι της τάξης 10⁶ CFU/ml. Τα κύτταρα είναι επαναιωρημένα σε NaCl 0.9%, αντί του PBS. Ο ρυθμός θανάτωσης (rate of killing) όπως θα αναλυθεί στην παρακάτω Ενότητα 3.2.2, βοηθά στην σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των πειραμάτων. Ο μέσος όρος του ρυθμού θανάτωσης N ανεξάρτητων πειραμάτων υπολογίζεται για το RIE PMMA ίσος με 1,5 10⁵ CFU/cm²h (N=2) , και για την επιφάνεια ICP PMMA, με 6 10⁴CFU/cm²h (N=3).

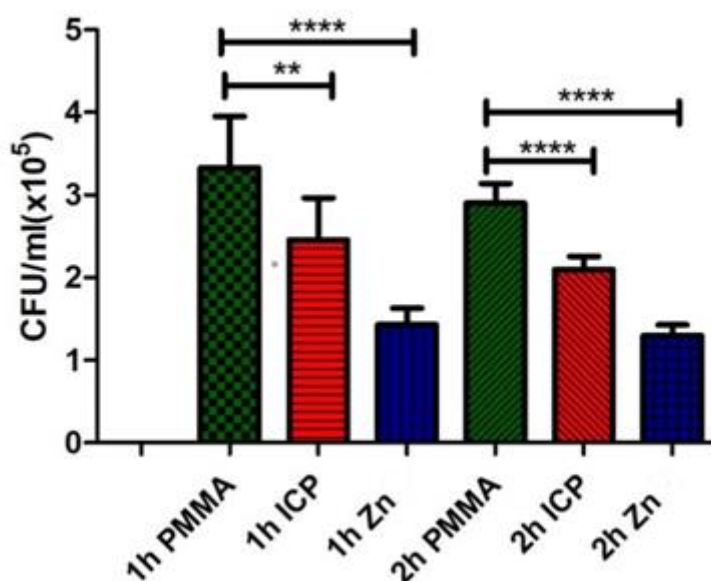
3.2.2 Υπολογισμός του ρυθμού θανάτωσης στα νανοδομημένα υποστρώματα PMMA και ZnO

Για την αξιολόγηση όλων των επιφανειών εκτός από το ποσοστό επιβίωσης ή το ποσοστό θανάτωσης του πληθυσμού σε κάθε επιφάνεια υπό συγκεκριμένες συνθήκες

ανάπτυξης, υπολογίζεται ο ρυθμός βακτηριακής θανάτωσης- rate of killing των βακτηρίων *E.coli* TOP 10 που αναπτύσσονται σε χρόνο t(s) σε επιφάνεια με διαστάσεις A(cm²) και περιγράφεται με τον λόγο :

$$\text{rate of killing} \left(\frac{\text{cells}}{\text{cm}^2\text{h}} \right) = \frac{\left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)_{\text{Control}} - \left(\frac{\text{CFU}}{\text{ml}} \right)_{\text{Surface}}}{A \text{ (cm}^2\text{) } t \text{ (h)}} \quad (1)$$

Για το πείραμα που παρουσιάζεται στο (Σχήμα 3.2.2.1) εμφανίζεται ο ρυθμός θανάτωσης σε όλους τους χρόνους επώασης να είναι ίδιος και ίσος της τάξης του 10⁵. Οι επιφάνειες επιπέδου Zn και νανοδομημένου ZnO, που είχαμε προμηθευτεί από το Ινστιτούτο του ΕΤΗ, χρησιμοποιήθηκαν σε μικρότερες διαστάσεις 1x1 cm² σε σχέση με τις επιφάνειες PMMA. Τα αποτελέσματα των πρώτων πειραμάτων με τις επίπεδες επιφάνειες Zn χωρίς κάποια επιφανειακή τροποποίηση φανερώνουν την εξαιρετικά σημαντική διαφορά (p<0.0001) στον αριθμό επιβίωσης κυττάρων σε σχέση με τις επίπεδες επιφάνειες PMMA.

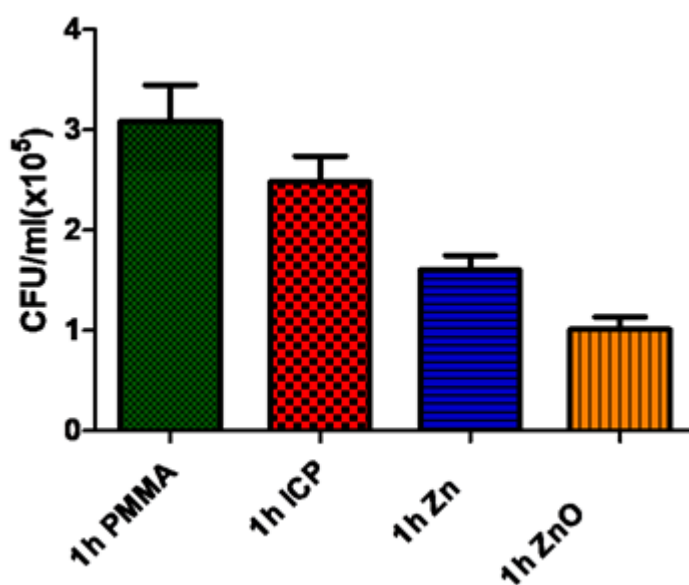


Σχήμα 3.2.2.1: Επιβίωση των *E.coli* TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου με ICP πλάσμα και του επίπεδου Zn με χρόνο παραμονής 1 και 2 h της βακτηριακής συγκέντρωσης 10⁶ CFU/ml.

Συγκεκριμένα, τα βακτήρια που επώαστηκαν στις επίπεδες επιφάνειες Zn για 1h εμφάνισαν 56% ποσοστό θανάτωσης σε σχέση με το επίπεδο PMMA, και ακολουθεί το ποσοστό να φτάνει στο 55.6% στην διάρκεια των 2h, διατηρώντας μια παρόμοια αντιβακτηριδιακή δράση μεταξύ της πρώτης και δεύτερης ώρας επώασης. Για το εγχαραγμένο PMMA/ICP σε σύγκριση με το επίπεδο PMMA, τα ποσοστά θανάτωσης για την πρώτη και δεύτερη ώρα επώασης ήταν 26,3% και 27,6 %, αντίστοιχα.

Παρότι οι επιφάνειες δεν έχουν τις ίδιες διαστάσεις μεταξύ των δειγμάτων που μελετήθηκαν, ο ρυθμός θανάτωσης στις επιφάνειες που υπολογίζεται ανά μονάδα επιφάνειας από την σχέση (1) και ανά h επώασης επιτρέπει τη σύγκριση μεταξύ επιφανειών και είναι $7,8 \cdot 10^4$ CFU/cm²h για το PMMA με ICP πλάσμα και $3,8 \cdot 10^5$ CFU/cm²h για το επίπεδο Zn, που αποτελεί την πρώτη ένδειξη μιας ισχυρότερης αντιβακτηριακής δράσης του επίπεδου Zn σε σχέση με το νανοδομημένο PMMA. Στο πείραμα για κάθε είδος επιφάνειας (PMMA, PMMA ICP, Zn), χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές επιφάνειες ως δείγματα για στατιστική ακρίβεια και έλεγχο επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων.

Σε συνέχεια της μελέτης των υποστρωμάτων Zn και ZnO, προστέθηκε μια νανοδομημένη επιφάνεια ZnO σύμφωνα με τη μέθοδο δημιουργίας της τοπογραφίας της που αναφέρεται στην Ενότητα 2.4.4, εξασφαλίζοντας ενισχυμένη αντιβακτηριακή δράση μέσω των αναπτυγμένων νανοδομών στην επιφάνεια της. Οι νανοδομημένες επιφάνειες ZnO κατασκευάζονται σύμφωνα με τη μέθοδο θερμού ύδατος που στηρίζεται στις μελέτες [137,76]. Η ανάπτυξη των νανοδομών γίνεται ως συνάρτηση του χρόνου βύθισης του υποστρώματος ZnO σε θερμό νερό (hot bath treatment) σε θερμοκρασία των 90°C για 24 h.

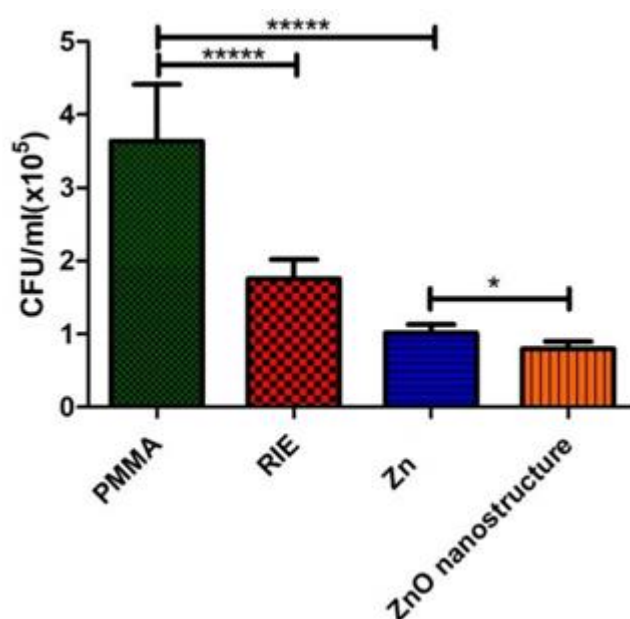


Σχήμα 3.2.2.2: Επιβίωση των *E.coli* TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου με ICP πλάσμα, του επίπεδου Zn, και του νανοδομημένου ZnO, με χρόνο παραμονής 1 και 2 h της βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml.

Το νανοδομημένο τοπογραφικά ZnO εμφάνισε 20% επιπλέον αύξηση στην θανάτωση των κυττάρων σε σχέση με το επίπεδο Zn και με ρυθμό θανάτωσης να εμφανίζεται 1.4 φορές υψηλότερος από το επίπεδο Zn και ίσος με $4,2 \cdot 10^5$ CFU/cm²h. Επίσης εμφανίζεται μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερος από το PMMA ICP, που έχει ρυθμό $5,4 \cdot 10^4$ CFU/cm²h. Το ποσοστό θανάτωσης (%) των επιφανειών νανοδομημένου ZnO πλησιάζει το 70% συγκριτικά με το επίπεδο PMMA, και σημειώνει ένα επιπλέον ποσοστό αύξησης κατά 36% μεγαλύτερο σε σχέση με τις επίπεδες επιφάνειες Zn. Η

αύξηση αυτή οφείλεται στους πιθανούς μηχανισμούς αλληλεπίδρασης με τα βακτήρια και στις φυσικοχημικές ιδιότητες του ZnO και της νανοδομημένης επιφάνειάς του, που χαρακτηρίζεται από εξαγωνικές δομές με μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής, και αυξημένη διάχυση ιόντων Zn^{2+} στο περιβάλλον των κυττάρων, όπως περιγράφονται αναλυτικότερα στην Ενότητα 3.7.2. Εκτός από την άμεση επαφή με τα βακτήρια, η ενεργοποίηση των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) που μπορούν και μεταφέρονται αποτελεσματικά μέσω του υδάτινου θρεπτικού μέσου των κυττάρων είναι ένας σημαντικός παράγοντας που μπορεί να οδηγεί στην διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων.

Το πείραμα επαναλήφθηκε, αφού διαπιστώθηκε ότι οι νανοδομημένες επιφάνειες ZnO είναι πιο δραστικές στις μεμβράνες των κυττάρων, με τη διαφορά μόνο ότι το PMMA εγχαραχτηκε με τεχνολογία πλάσματος RIE. Οι διαστάσεις των επιφανειών ήταν $A=2,25 \text{ cm}^2$ για το εγχαραγμένο και επίπεδο PMMA, και $A=1 \text{ cm}^2$ για το επίπεδο Zn και νανοδομημένο ZnO. Ο λόγος επιφάνειας μεταξύ των δύο υποστρωμάτων είναι $\frac{A_{PMMA}}{A_{ZnO}} = 2,25$. Για την μια ώρα επώασης των κυττάρων πάνω στις επιφάνειες η μείωση στον πληθυσμό είναι εξαιρετικά σημαντική για όλες τις επιφάνειες σε σχέση με το επίπεδο PMMA που θεωρείται επιφάνεια αναφοράς.

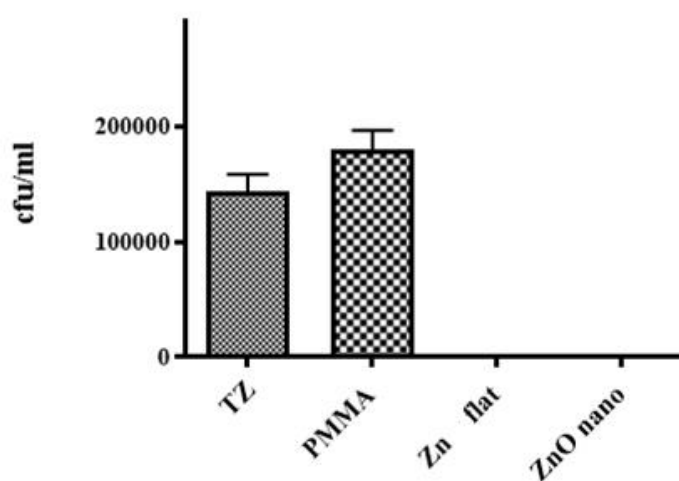


Σχήμα 3.2.2.3: Επιβίωση των *E.coli* TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου με RIE πλάσμα, επίπεδου Zn, και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 1h της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml.

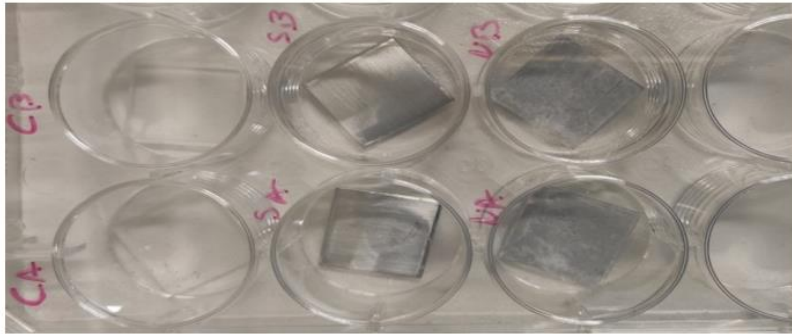
Παρατηρήθηκε ότι το % ποσοστό μη επιβίωσης στις επιφάνειες PMMA με τεχνολογία πλάσματος RIE είναι περίπου 50%, σημαντικά πιο υψηλό σε σύγκριση με την εγχάραξη με ICP. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η τοπογραφία δημιουργήθηκε σε διαφορετικά μηχανήματα. Στην επιφάνεια RIE και σε χρόνο διεργασίας των 20 λεπτών εγχάραξης,

το ύψος των κορυφών είναι ίδιο με την ICP σε χρόνο εγχάραξης των 10 λεπτών, όπως παρουσιάζεται στο (Σχήμα 3.2.2.4). Το επί της % ποσοστό θανάτωσης των νανοδομημένων ZnO φτάνει στο 78% σε σχέση με το απλό επίπεδο PMMA και σε ποσοστό 21% μεγαλύτερο από τις επίπεδες επιφάνειες Zn. Ο ρυθμός θανάτωσης στο νανοδομημένο ZnO υπολογίζεται ίσος με $7,1 \cdot 10^5$ CFU/cm²h. Αντίστοιχα στο RIE, βρίσκεται χαμηλότερος από τα υποστρώματα ZnO με $2,3 \cdot 10^5$ CFU/cm²h.

Στα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν επίπεδες επιφάνειες Zn και νανοδομημένες ZnO με διαστάσεις ίδιες με της κοπής των PMMA, $A = 1.5 \times 1.5$ cm². Με αυτόν τον τρόπο το σφάλμα που υπήρχε εξαιτίας της διαφοράς του μεγέθους του εμβαδού αφαιρείται και όπως φαίνεται από το (Σχήμα 3.2.2.3), η αλλαγή της παραμέτρου οδηγεί σε ολική εξαφάνιση των επιζώντων βακτηρίων στις επίπεδες Zn και νανοδομημένες ZnO επιφάνειες. Στις επιφάνειες αυτές όπως αναφέρεται στο (Σχήμα 3.1.2) και στο (Σχήμα 3.1.3) της υποενότητας 3.1, με τη χρήση του οπτικού μικροσκοπίου και την χρήση SEM, παρατηρήθηκε μια εντονότερη τοπογραφία της επιφάνειας. Επίσης, από το παρακάτω (Σχήμα 3.2.2.2) δημιουργήθηκε μέσα στο διάλυμα ένα είδος λευκού ιζήματος. Η αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού είναι η ίδια με όλα τα προηγούμενα πειράματα και ίση με 10^6 CFU/ml.



Σχήμα 3.2.2.5: Επιβίωση των *E.coli* TOP 10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, επίπεδου Zn, νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 1h της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^6 CFU/ml.



Σχήμα 3.2.2.6: Επιφάνειες PMMA, επίπεδου Zn και νανοδομημένου ZnO σε plate με 2ml διαλύματος κυττάρων σε NaCl₂ 0.9% που προορίζονται για τον κλίβανο επώασης.

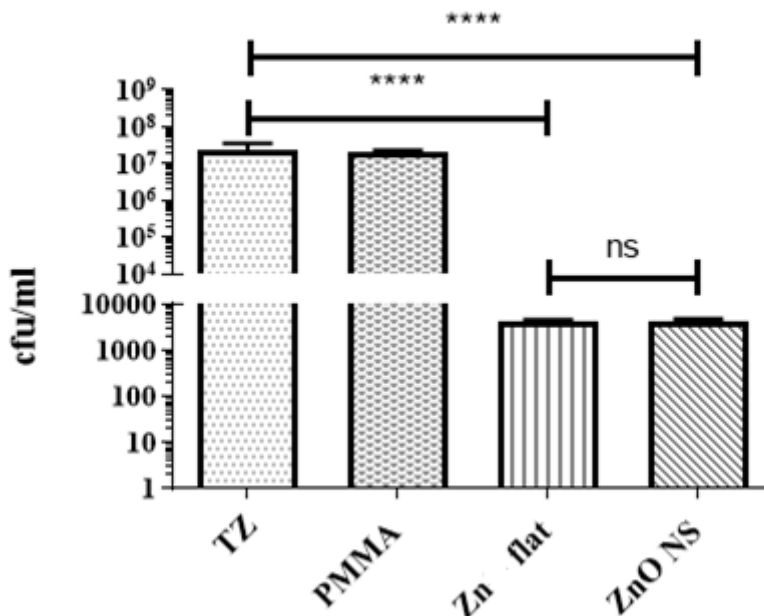
Τα αποτελέσματα αυτά οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι σε 1h και με την συγκέντρωση εμβολιασμού 10^6 CFU/ml σε διαστάσεις επιφάνειας 1.5×1.5 cm², το ποσοστό θανάτωσης σε επιφάνειες ZnO είναι 100%. Δεδομένου ότι ο στόχος είναι να αποσαφηνιστεί ο μηχανισμός λύσης των τοιχωμάτων των βακτηρίων, επιχειρήσαμε να αλλάξουμε μεθοδικά μια σειρά από παραμέτρους των πειραμάτων εξάγοντας τα αποτελέσματα που θα μας οδηγούσαν στο είδος της διαταραχής των κυττάρων που το ZnO προκαλεί. Στο παραπάνω πείραμα είχε παρατηρηθεί ένα λευκό ίζημα γύρω από τις επιφάνειες ZnO στα wallplates μέσα στο διάλυμα 0.9% NaCl₂ που περιέχονται τα κύτταρα. Η διάλυση του οξειδίου ZnO παράγει δισθενή μεταλλικά ιόντα (Zn^{2+}) που είναι γνωστό ότι ευθύνονται για την τοξικότητα στα βακτήρια. Συνεπώς, υπάρχει ένας συνδυασμός αλληλεπίδρασης μεταξύ της διαλυμένης συγκέντρωσης μετάλλου στο διάλυμα και της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης [143]. Σύμφωνα με τις μελέτες [137,79] που ακολούθησαν την διαδικασία μορφοποίησης της επιφάνεια των νανοδομών ZnO, αναφέρεται ότι όταν οι δομές «nanorods» των ZnO ξεπεράσουν ένα συγκεκριμένο μήκος της διαμόρφωσης τους από το υπόστρωμα τότε κατά τη διάχυση των θετικά φορτισμένων ιόντων Zn^{+2} ο μηχανισμός σχηματισμού αλλάζει. Η διάλυση του επιφανειακού ZnO έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υδροξειδίου του Zn ($Zn(OH)$) στην επιφάνεια των δειγμάτων.



Σχήμα 3.2.2.7: Επιφάνειες PMMA, επίπεδου Zn και εγχαραγμένου ZnO σε plate με 2ml διαλύματος βακτηριακών κυττάρων σε διάλυμα NaCl 0.9% μετά την παραμονή στο κλίβανο επώασης. Το θολό εναιώρημα που προκύπτει είναι εμφανές στις επιφάνειες του υποστρώματος ZnO.

Οι Degen, A et al. [144] στόχευαν στην αξιολόγηση ακαθαρσιών σε επιφάνειες που προκύπτουν εξαιτίας της φύσης του ZnO και του επιφανειακού φορτίου που δημιουργούν τα σωματίδια του οξειδίου καθώς διασπείρονται σε υγρό περιβάλλον κάτω από συγκεκριμένο pH. Η δημιουργία επιφανειακού φορτίου στην μεταλλική επιφάνεια του οξειδίου σε επαφή με το νερό μπορεί να εμφανίζεται εξαιτίας δύο μηχανισμών: Την προσρόφηση πρωτονίων ή την ενσωμάτωση υδροξυλίων σε θέσεις επιφανείας. Η διαλυτοποίηση του Zn μέσω ενός συνόλου αντιδράσεων πάνω στην επιφάνεια οδηγεί στον μοριακό σχηματισμό του $Zn(OH)_2(s)$. Συνεπώς, γίνεται αντιληπτό ότι οι μηχανισμοί που οδηγούν στην θανάτωση των βακτηρίων περιλαμβάνουν και χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται στο αποτέλεσμα της καθαρά μηχανικής λύσης των βακτηριακών μεμβρανών.

Για να διαπιστωθεί ο ακριβής βαθμός της βακτηριοκτόνου δράσης των ZnO, αυξήθηκε η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων κατά τον εμβολιασμό πάνω στις επιφάνειες δύο τάξεις μεγέθους (πλησιάζοντας την συγκέντρωση 10^8 CFU/ml) με χρόνο παραμονής 0.15 min και διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες πειράματος σταθερές, συμπεριλαμβανομένης της επίδρασης του φωτός και των συνθηκών ανάδευσης στον επωαστικό κλίβανο.



Σχήμα 3.2.2.8: Επιβίωση των *E.coli* TOP 10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, επίπεδου Zn, και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 15 min της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml.

Δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ της αρχικής συγκέντρωσης των κυττάρων (Time-Zero) και του επιπέδου PMMA. Στα τρυβλία των αποικιών για το επίπεδο Zn και το νανοδομημένο ZnO, η κάθε επίστρωση περιείχε το εναιώρημα των επωασμένων κυττάρων σε όγκο εμβολιασμού 4μl στο στερεό θρεπτικό υλικό. Σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού, οι ελάχιστες αποικίες που βρέθηκαν στα υποστρώματα Zn και ZnO σε σύγκριση με τις αποικίες που βρέθηκαν στο επίπεδο PMMA, έδωσαν βαθμό θανάτωσης δύο τάξεις μεγέθους μεγαλύτερο σε σχέση με όλα τα προηγούμενα πειράματα. Το νανοδομημένο ZnO με το επίπεδο Zn παρουσίασαν ίδιο ρυθμό θανάτωσης και ίσο με $3,2 \cdot 10^7$ CFU/cm²h.

Παρακάτω παρατίθεται ο Πίνακας 3.2.2.1 με τον μέσο όρο των τιμών του ρυθμού θανάτωσης για όλα τα υποστρώματα των N ανεξάρτητων πειραμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στα παραπάνω πειράματα.

Πίνακας 3.2.2.1: Ρυθμός θανάτωσης (CFU/cm²h) στις επιφάνειες επίπεδου PMMA, επίπεδου Zn και νανοδομημένου ZnO, σε χρόνο επώασης 1h και 15 min, αρχική συγκέντρωση 10⁶-10⁸ CFU/ml.

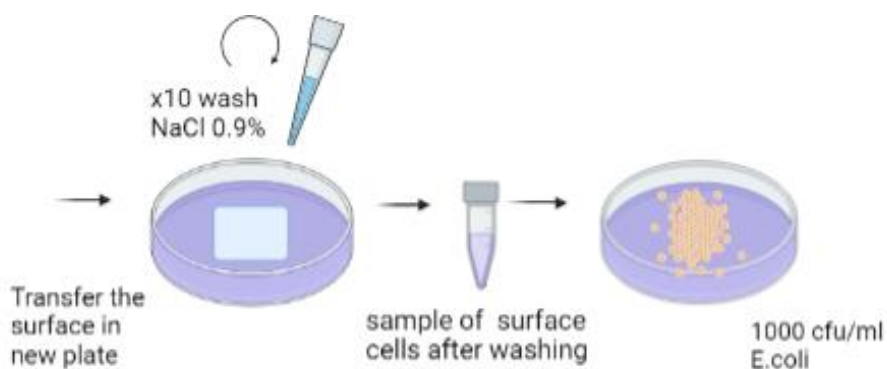
| Αρχική συγκέντρωση (TZ-CFU/ml) και χρόνος επώασης | Υπόστρωμα ανοιχτής επιφάνειας | Ρυθμός θανάτωσης (CFU/cm ² h) |
|---|---|--|
| 10 ⁶ &1h | PMMA RIE | 1,5 10 ⁵ (N=2) |
| | PMMA ICP | 6 10 ⁴ (N=3) |
| | Επίπεδο Zn (1 ^η παρτίδα) | 3,4 10 ⁵ (N=3) |
| | Νανοδομημένο ZnO (1 ^η παρτίδα) | 5,7 10 ⁵ (N=2) |
| 10 ⁶ & 15 min | Επίπεδο Zn (2 ^η παρτίδα) | Καμία αποικία |
| | Νανοδομημένο ZnO (2 ^η παρτίδα) | Καμία αποικία |
| 10 ⁷ & 15 min | Επίπεδο Zn (2 ^η παρτίδα) | 3,13 10 ⁷ (N=1) |
| | Νανοδομημένο ZnO (2 ^η παρτίδα) | 3,12 10 ⁷ (N=1) |

Λαμβάνοντας υπόψιν από την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων τόσο μεταξύ των δειγμάτων που χρησιμοποιούνται σε κάθε πείραμα αλλά και των ανεξάρτητων πειραμάτων, υπολογίζονται τα σφάλματα σε μεγάλο ποσοστό 70% της μέση τιμής του ρυθμού θανάτωσης. Από το Πίνακα 3.2.2.1 παρατηρούμε ότι σε μικρότερες επιφάνειες (1^η παρτίδα) υπάρχει σαφής διαφορά μεταξύ του επίπεδου Zn και του νανοδομημένου ZnO με τον ρυθμό θανάτωσης στο υπόστρωμα ZnO να είναι αυξημένος κατά 40%. Αντίθετα, χρησιμοποιώντας μεγαλύτερη επιφάνεια (2^η παρτίδα) δεν υπάρχει διαφοροποίηση μεταξύ του απλού υποστρώματος Zn και της νανοδομημένης τοπογραφίας του ZnO. Η εξήγηση του γεγονότος αυτού οφείλεται στο μεγαλύτερο εμβαδόν επιφάνειας που χρησιμοποιούμε στην 2^η παρτίδα καθώς τα σφάλματα που προκύπτουν για τον μεγάλο ρυθμό θανάτωσης της τάξης των 10⁷ να είναι ακόμα

μεγαλύτερα με αποτέλεσμα η επίδραση της νανοδόμησης στα κύτταρα να καλύπτεται από την χημεία της επιφάνειας του υλικού Zn και ZnO.

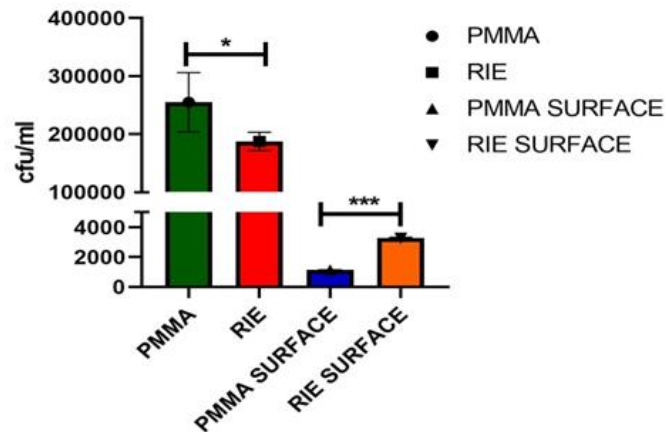
3.2.3 Υπολογισμός ζωντανών κυττάρων που παραμένουν προσκολλημένα στις επιφάνειες

Προκειμένου να υπολογιστούν βακτήρια που παραμένουν τυχόν προσκολλημένα στην επιφάνεια των δειγμάτων, δοκιμάσαμε έκπλυση των επιφανειών στο πρωτόκολλο επίστρωσης αποικιών των επωασμένων κυττάρων στις επιφάνειες σύμφωνα με το Microplating assay. Μετά την απομάκρυνση των βακτηρίων από τις επιφάνειες διαπιστώνεται αν ο συνολικός αριθμός αποικιών που μελετάται από τις επιφάνειες αντικατοπτρίζει την πραγματική συγκέντρωση των επιζώντων κυττάρων. Στο πείραμα μελέτης με τις επιφάνειες των επίπεδων PMMA και των εγχαραγμένων με RIEPMMA, το πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε μετά το τέλος του βασικού πειράματος ήταν το ακόλουθο, όπως απεικονίζεται στο (Σχήμα 3.2.3.1): 1) Αφαιρέθηκε όλο το υπερκείμενο με τα βακτήρια E.coli που περιείχαν τα wellplates, 2) Οι επιφάνειες μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα σε καθαρό plate, 3) Έγινε έκπλυση αυτών με 1 ml του διαλύματος 0.9% NaCl₂, και 4) Από το υγρό έκπλυσης, επιστρώθηκε το 0,1 ml σε τρυβλίο με τη μέθοδο της κλασσικής επίστρωσης με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας, ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του στερεού θρεπτικού άγαρ.



Σχήμα 3.2.3.1: Καθαρισμός επιφανειών με διάλυμα NaCl₂ 0.9% προς ανάκτηση των κυττάρων που έχουν διατηρηθεί προσκολλημένα στις επιφάνειες.

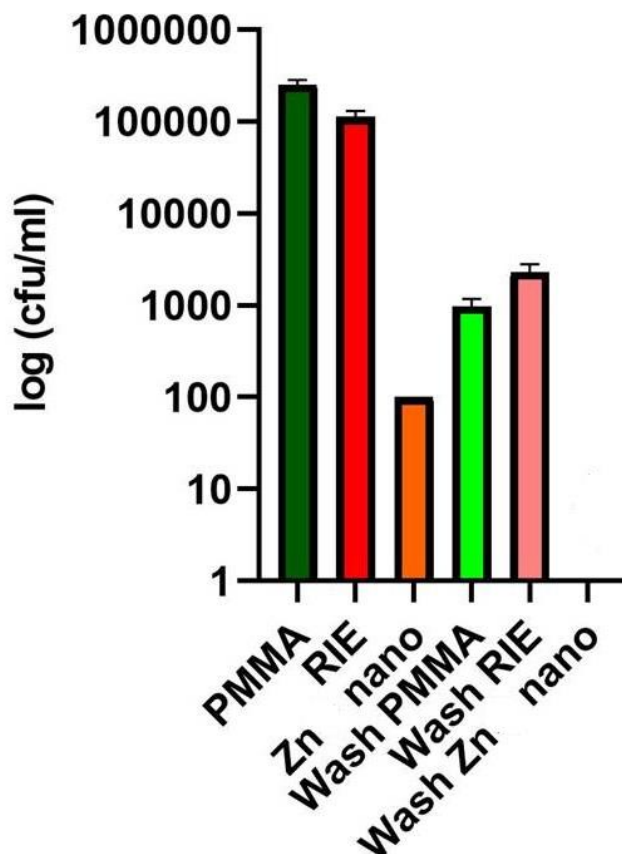
Συνολικά για κάθε επιφάνεια, εμβολιάστηκαν τρία τρυβλία για την ορθότερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Μετά από 24 ώρες παραμονής στον κλίβανο στους 37°C, ανιχνεύτηκε μικρός αριθμός αποικιών. Οι αποικίες που μετρήθηκαν από την έκπλυση των επιφανειών είναι πολλές τάξεις μεγέθους χαμηλότερες από αυτές που μετρήθηκαν από το υπερκείμενο υγρό, και πιο συγκεκριμένα από την επιφάνεια PMMA είναι 1,2 10³CFU/ml σημαντικά λιγότερες σε σύγκριση με την επιφάνεια RIE πλάσματος, 3,3 10³CFU/ml.



Σχήμα 3.2.3.2: Ανάκτηση των *E.coli* TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, και εγχαραγμένου PMMA με RIE πλάσματος, που έχουν παραμείνει προσκολλημένα.

Από το (Σχήμα 3.2.3.1) φαίνονται οι συγκεντρώσεις των βακτηρίων που έχουν παραμείνει στις επιφάνειες μετά το τέλος του πειράματος επώασης 1 h. Σαφώς, παρατηρώντας τις δύο τάξεις μεγέθους κάτω για τις αποικίες (CFU/ml) που συλλέχθηκαν από τις επιφάνειες, αποδεικνύεται ότι η ύπαρξη ζωντανών βακτηρίων προσκολλημένων στην επιφάνεια δεν παίζει σημαντικό ρόλο για τις μετρήσεις των επιζώντων κυττάρων στο βασικό πρωτόκολλο επιβίωσης στις επιφάνειες, και επομένως το βήμα της έκπλυσης επιφανειών δεν χρησιμοποιήθηκε στο πρωτόκολλο μέτρησης των επιζώντων αποικιών.

Στην υποενότητα 3.2.2 και συγκεκριμένα για το Σχήμα 3.2.2.4, με δοκιμή των επίπεδων Zn επιφανειών με τοπογραφία μικρο-καναλιών για 1h, αναφέρθηκε ότι καμία αποικία κυττάρων δεν μπόρεσε να επιβιώσει. Για να επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα, έγινε και σε αυτή την περίπτωση έκπλυση των επιφανειών.



Σχήμα 3.2.3.3: Ανάκτηση των *E.coli* TOP10 σε CFU/ml, σε επιφάνειες επίπεδου PMMA, εγχαραγμένου PMMA με RIE πλάσματος, και του επίπεδου Zn με τα μικρο-κανάλια, που έχουν παραμείνει προσκολλημένα μετά την επώαση της καλλιέργειας στις επιφάνειες.

Όπως και με τον προηγούμενο χαρακτηρισμό των επιφανειών που πλύθηκαν με NaCl 0.9%, ο πληθυσμός που παραμένει πάνω στις επιφάνειες είναι αρκετά περιορισμένος συγκριτικά με τον πληθυσμό που ήταν ορατός στα τρυβλία αμέσως μετά την επώαση. Οι επιφάνειες Zn με τα μικρο-κανάλια δεν παρουσιάζουν καμία αποικία. Οι αποικίες που μετρήθηκαν προσκολλημένες στο επίπεδο PMMA ($0,97 \cdot 10^3$ CFU/ml) είναι σημαντικά λιγότερες σε σύγκριση με αυτές στην επιφάνεια RIE ($2,29 \cdot 10^3$ CFU/ml). Προφανώς, οι νανοδομές που υπάρχουν στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες PMMA οδηγούν σε μεγαλύτερη παγίδευση/προσκόλληση των βακτηρίων σε σχέση με επίπεδες επιφάνειες.

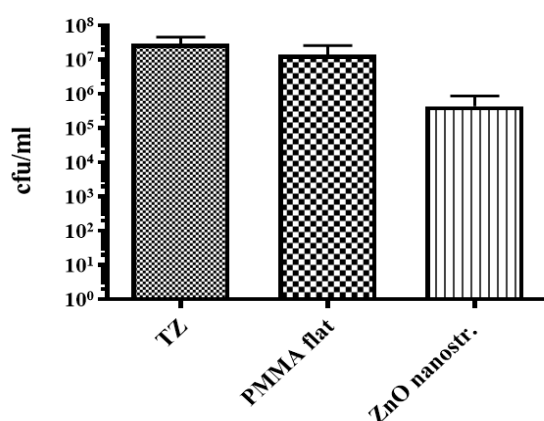
Συμπερασματικά, γίνεται κατανοητό ότι δεν προσκολλώνται πολλά ζωντανά κύτταρα σε καμία από τις επιφάνειες στον πειραματικό χρόνο της 1h επώασης, εφόσον ο πληθυσμός από το καθαρισμό των επιφανειών είναι σαφώς δύο τάξεις μεγέθους μικρότερος από τις αποικίες που υπολογίζονται από το διάλυμα των κυττάρων που απομονώνουμε μετά την επώαση.

3.3 Μελέτη βιωσιμότητας των βακτηρίων σε κανάλι υπό στατικές συνθήκες

Παρατηρώντας το μεγάλο ρυθμό θανάτωσης (rate of killing), καθώς και την μείωση του κλάσματος επιβίωσης των κυττάρων από 10^8 σε 10^3 CFU/ml, με ποσοστό κατά 99,99% μη επιζώντα κύτταρα μετά μια ώρα επώασης στις επιφάνειες, η διάκριση μεταξύ των μηχανισμών λύσης χρειάζονται επιπλέον στάδια μελέτης παρά το γεγονός της αυξημένης αντιμικροβιακής δράσης. Με δεδομένο ότι στο κανάλι, καθώς η κλίμακα μικραίνει και η γεωμετρία αλλάζει, η επίδραση του υλικού πάνω στα δείγματα κυττάρων οδηγούν σε επιφανειακές δυνάμεις που γίνονται κυρίαρχες με την υψηλή αναλογία επιφάνειας(S) προς όγκο(V) και την εμφάνιση άλλων δυνάμεων αλληλεπίδρασης

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων στατικά μέσα σε μικροκανάλια με τον εμβολιασμό διάφορων αρχικών συγκεντρώσεων κυττάρων (10^6 - 10^8 CFU/ml), που έχουν δοκιμαστεί στις ανοιχτές επιφάνειες. Στα μικρο-κανάλια τα κύτταρα επωάζονται υπό στατικές συνθήκες υπό την επίδραση του φωτός ή σε σκότος. Δοκιμές πραγματοποιήθηκαν σε χρόνους επώασης (15 min-1h), μέχρι τον εντοπισμό ορατών βιώσιμων αποικιών από όλα τα υποστρώματα. Στο (Σχήμα 3.3.1) απεικονίζεται ο μέσος όρος της συγκέντρωσης των κυττάρων από δύο ανεξάρτητα πειράματα, κατά τα οποία το ένα εκτελέστηκε υπό την παρουσία φωτός και το άλλο υπό σκότος, στον ίδιο χρόνο παραμονής (15 min) και με την προετοιμασία της ίδιας αρχικής συγκέντρωσης της τάξης των 10^8 CFU/ml. Να σημειωθεί ότι στα τρυβλία αναφοράς και αρχικής συγκέντρωσης (TZ), αν και η συγκέντρωση προετοιμασίας είναι 10^8 , οι αποικίες που μετράμε και συνεχίζουμε τους υπολογισμούς μας είναι μιας τάξης λιγότερες 10^7 .

E.coli survival in stationary conditions



Σχήμα 3.3.1: Επιβίωση των *E.coli* TOP 10 σε CFU/ml, σε μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO με παραμονή 15 min της βακτηριακής συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml.

Στον Πίνακα 3.3.1, φαίνονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις από τα δύο ανεξάρτητα πειράματα με το ρυθμό θανάτωσης των βακτηρίων να παραμένει ίδιος και για τα δύο,

αλλά και συγκρίσιμος με τον ρυθμό θανάτωσης που υπολογίστηκε στις ανοιχτές επιφάνειες. Εξασφαλίζεται στο σημείο αυτό ότι τα μικρο-κανάλια σε στατική συνθήκη με ή χωρίς την παρουσία του φωτός για το νανοδομημένο ZnO, επιτυγχάνουν λύση των κυττάρων *E.coli* εκδηλώνοντας την αντιβακτηριακή δράση των ανοιχτών επιφανειών. Επίσης, από την συγκέντρωση των κυττάρων (CFU/ml) που μετρήθηκαν στα τρυβλία φαίνεται ότι υπό συνθήκες φωτός στο νανοδομημένο ZnO και το επίπεδο PMMA, οι συγκεντρώσεις είναι 1-2 τάξεις μεγέθους μικρότερη σε σχέση με τις αντίστοιχες επιφάνειες υπό σκότος. Παρότι ο ρυθμός θανάτωσης υπολογίζεται στην ίδια τάξη μεγέθους και στις δύο συνθήκες, φαίνεται ότι το φως παίζει ρόλο στη θανάτωση των βακτηρίων τόσο στο νανοδομημένο ZnO όσο και στο επίπεδο PMMA, παρατηρώντας την συγκέντρωση των κυττάρων (CFU/ml) στον Πίνακα 3.3.1.

Πίνακας 3.3.1: Συγκέντρωση των κυττάρων σε (CFU/ml) από δύο ανεξάρτητα πειράματα που ενσωματώνεται στο Διάγραμμα 3.3.1 και απεικονίζουν τον μέσο όρο των κυττάρων επιβίωσης στις επιφάνειες επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO, σε χρόνο επώασης 15 min, σε φως και σκότος.

| Αρχική συγκέντρωση (TZ-CFU/ml) | Μικρο-κανάλι | Συγκέντρωση των κυττάρων (CFU/ml) | Ρυθμός θανάτωσης (CFU/cm ² h) | Συνθήκη φωτός |
|--------------------------------|------------------|-----------------------------------|--|---------------|
| 4,6 10 ⁷ | Επίπεδο PMMA | 2,610 ⁷ | | Υπό σκότος |
| | Νανοδομημένο ZnO | 8,810 ⁵ | 3,58 10 ⁷ | |
| 1,1 10 ⁷ | Επίπεδο PMMA | 8,3 10 ⁶ | | Υπό φως |
| | Νανοδομημένο ZnO | 4,6 10 ³ | 4,8 10 ⁷ | |

3.4 Μελέτη βιωσιμότητας των βακτηρίων σε κανάλι υπό συνθήκες ροής

3.4.1 Πειραματική διάταξη με αντλία σε μικρο-κανάλια

Έχοντας αποδείξει υψηλή απόδοση λύσης των κυττάρων σε στατικό κανάλι του νανοδομημένου ZnO, επιχειρήθηκε με την χρήση μικροαντλίας να μελετηθεί η αλληλεπίδραση των επιφανειών με τα κύτταρα υπό ροή σε χρόνους παραμονής από 5 έως 15 λεπτών. Σε κανάλι ροής χορηγήθηκαν δείγματα κυττάρων *E.coli* σε εναιώρημα διαλύματος NaCl₂ 0.9%, σε εύρος συγκεντρώσεων (CFU/ml), υπό συνθήκες σκότους.

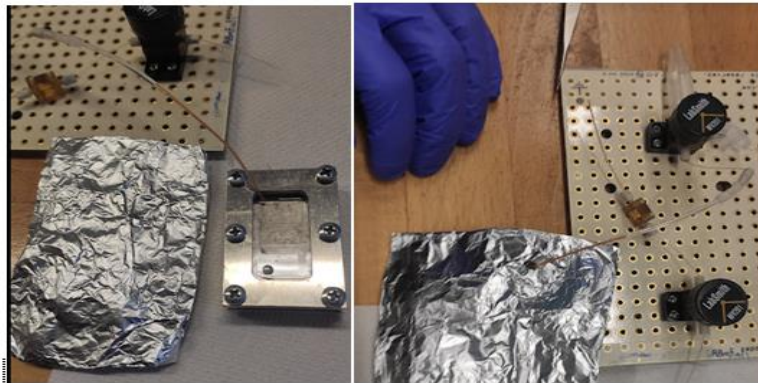
Μια αντλία ροής SPS01 Programmable Syringe Pump, της εταιρείας Lab Smith, με εγκατάσταση και χρήση του λογισμικού uProcess Software, χρησιμοποιήθηκε για την

εισαγωγή των δειγμάτων στο μικρο-κανάλι. Στις υπάρχουσες διατάξεις του chip-holder που συγκρατεί το υπόστρωμα που είναι εγχαραγμένο το κανάλι ZnO και PMMA, χρειάστηκε να διανοιχθούν καινούργιες οπές στο PDMS ώστε να εφαρμόζουν ακριβώς τα σωληνάκια που περιέχει το σύστημα της αντλίας. Εκ νέου παρασκευάστηκε το ελαστομερές PDMS, που λειτουργεί ως κάλυμμα, και ψήθηκε επάνω σε γυαλί για δύο ώρες στους 80°C. Οι ροϊκές διασυνδέσεις και τα εξαρτήματα της αντλίας, και πιο συγκεκριμένα τα σωληνάκια(tubes) που θα χρησιμοποιηθούν για την μεταφορά του ρευστού, πρέπει να εξασφαλίζουν την σταθερότητα και την στεγανοποίηση της διάταξης χωρίς διαρροές υγρού ή δημιουργία κενού με την εισχώρηση φυσαλίδων αέρα. Τα εξαρτήματα της αντλίας ροής περιλαμβάνουν επιπλέον τα "fittings" σύνδεσης, τα οποία εφαρμόζουν μεταξύ των σωλήνων διαφορετικών διαμέτρων για την σταθεροποίησή τους.

Με την βοήθεια ενός tip με εξωτερική διάμετρο 1,27 mm δημιουργήθηκαν οι οπές στο PDMS για το πέρασμα του μικροσωλήνα με παρόμοια εξωτερική διάμετρο, που θα διοχετεύει το ρευστό στην είσοδο του καναλιού. Ο μικροσωλήνας εφαρμόζει ακριβώς στο εσωτερικό της οπής του PDMS, χωρίς την εμφάνιση διαρροών ή διαφυγής του ρευστού σε άλλες κατευθύνσεις. Στην έξοδο του καναλιού δεν χρησιμοποιείται κάποιο εξάρτημα, και αφήνεται το υγρό να μαζευτεί εξωτερικά της οπής εξόδου του PDMS ώστε να συλλεχτεί με την χρήση πιπέτας. Το δείγμα μεταφέρεται απευθείας σε τρυβλία και επιστρώνεται για την 24ωρη επώαση των κυττάρων στο κλίβανο επώασης στους 37°C.

Το κυτταρικό εναιώρημα συγκεκριμένης συγκέντρωσης εισάγεται μέσω της συσκευής της μικροαντλίας με ογκομετρική ροή 5μl/min στο μικροκανάλι, σύμφωνα με τον επιθυμητό χρόνο παραμονής στο μικρο-κανάλι (5min). Το εύρος ογκομετρικών ροών επιλέχθηκε με βάση το ποσοστό θνησιμότητας στα στατικά κανάλια που περιγράφονται στην Ενότητα 3.3. Ο μέγιστος χρόνος παραμονής είναι τα 15min, τα οποία αντιστοιχούν σε ροή 1,73μl/min, σύμφωνα με τον υπολογισμό με βάση τον όγκο του καναλιού που είναι ίσος με 26 μl. Οι υπόλοιποι χρόνοι παραμονής που επιλέχθηκαν είναι τα 10 min (2,6μl/min), τα 7min (3,7μl/min), τα 5 min(5,2μl/min) και τα 2,25 min(10μl/min). Η μικρο-αντλία αυτή μπορεί να χειριστεί ροές από 0.05 μl/min έως 2800 μl/min, με επιθυμητό εύρος ροής στα πειράματα αυτά να κυμαίνεται από 2 έως 15 μl/min.

Έχοντας διαπιστώσει από προηγούμενα αποτελέσματα την επίδραση του φωτός στην βιωσιμότητα των κυττάρων, αποφασίσαμε να καλύψουμε την διάταξη σε όλη τη σειρά πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν με χρήση αλουμινόχαρτου όπως φαίνεται στο(Σχήμα 3.4.1).



Σχήμα 3.4.1: Διάταξης μικροαντλίας για την είσοδο βακτηρίων στο μικροκανάλι υπό σταθερή ροή

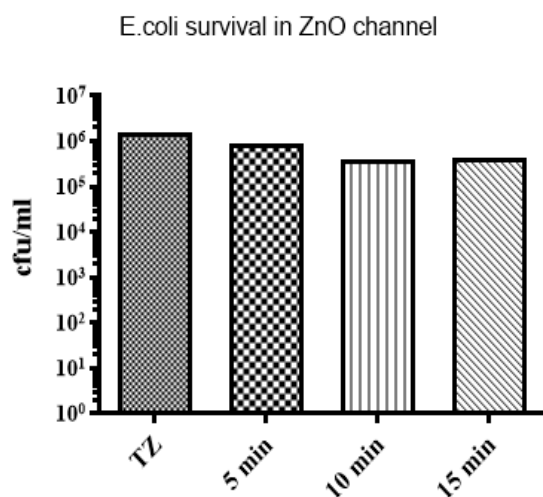
3.4.2 Αποτελέσματα μέτρησης βιωσιμότητας βακτηρίων υπό ροή στα κανάλια

Σε αυτό το μέρος της εργασίας πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις αποικιών με την εφαρμογή διαφορετικών ογκομετρικών ροών στα μικροκανάλια που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Παρακάτω παραθέτουμε τα αποτελέσματα σε διαγράμματα επιζώντων κυττάρων συναρτήσει του χρόνου παραμονής και της ροής σε κάθε περίπτωση που χρησιμοποιείται στην διάταξη του μικρο-καναλιού. Εξετάστηκαν συγκεντρώσεις της τάξης από 10^7 έως 10^5 CFU/ml, για την κατανόηση της συμπεριφοράς των βακτηρίων στις δεδομένες συγκεντρώσεις και υπό διαφορετικούς χρόνους παραμονής. Σε όλα τα πειράματα συνεχίζουμε με το ίδιο υπόστρωμα του επίπεδου μικρο-καναλιού PMMA και του νανοδομημένου ZnO. Συγκριτικά με τα μικρο-κανάλια σε στατικές συνθήκες, η παράμετρος της θερμοκρασίας είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, κατά την παραμονή των κυττάρων στο στατικό κανάλι, η διάταξη φυλάσσεται στον κλίβανο επώασης σε σταθερή θερμοκρασία (37°C). Αντίθετα, με την χρήση αντλίας δεν είναι εφικτή η ενσωμάτωση όλου του συστήματος σε κλίβανο, προτιμώντας να εκτελεστεί στον πάγκο του εργαστηρίου. Εκτιμάται ότι η μέση θερμοκρασία των ημερών που έγιναν τα πειράματα είναι στο εύρος $20\text{-}25^\circ\text{C}$.

Αρχικά στο νανοδομημένο ZnO και το επίπεδο PMMA που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον στα προηγούμενα πειράματα, υπολογίζεται η βιωσιμότητα των κυττάρων με την μέτρηση των αποικιών. Στο (Σχήμα 3.4.1) παρουσιάζονται σε τρεις διαφορετικές ροές με τον αντίστοιχο χρόνο παραμονής η συγκέντρωση των κυττάρων που επιβίωσαν. Να σημειωθεί ότι οι ρυθμοί θανάτωσης στον Πίνακα 3.4.1 έχουν υπολογιστεί συγκριτικά μεταξύ των δύο καναλιών στην κάθε ροή, με τις τιμές αναφοράς για την κάθε ροή να μετρούνται στα μικρο-κανάλια του PMMA.

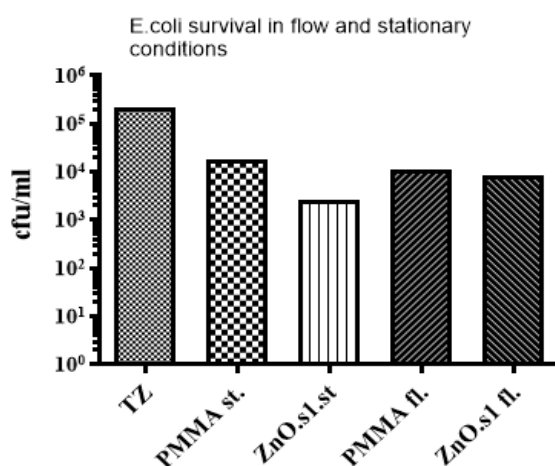
Η αρχική συγκέντρωση των κυττάρων επιλέχθηκε να είναι της τάξης των $1,6 \cdot 10^6$ CFU/ml, εφόσον σε αυτή τη συγκέντρωση μπορούσαμε να μετρήσουμε τις αποικίες στα τρυβλία χωρίς ενσωμάτωση πολλών διαδοχικών αραιώσεων για την αποφυγή

επιπλέον σφάλματος που προκύπτει κατά την μεταφορά του δείγματος από την μια αραιώση στην άλλη. Ακολούθως, εκτιμάται ο ρυθμός θανάτωσης και παρατηρείται ότι είναι της ίδιας τάξης μεγέθους για όλες τις ροές 1,73, 2,26 και 5,2 μl/min. Στην ελάχιστη ροή 1,73μl/min ο ρυθμός θανάτωσης φαίνεται διπλάσιος, πιθανόν λόγω του μεγαλύτερου χρόνου παραμονής (15 min). Πράγματι, η μικρότερη ογκομετρική ροή αυξάνει την αλληλεπίδραση ανάμεσα στα βακτήρια και την επιφάνεια του ZnO, οδηγώντας σε δραστικότερη θανάτωση των βακτηρίων.



Σχήμα 3.4.2.1: Συγκέντρωση των βακτηρίων σε CFU/ml σε διαφορετικούς χρόνους παραμονής στο νανοδομημένο ZnO υπό συνθήκες ροής σε χρόνους παραμονής 5,10 και 15 min.

Από το (Σχήμα 3.4.2.1) ο ρυθμός θανάτωσης για το νανοδομημένο ZnO εμφανίζεται ίδιας τάξης μεγέθους για τις τρεις διαφορετικές ροές και σημαντικός της τάξης του 10⁶ (CFU/cm²h) ακόμα και στον χρόνο των 5 min παραμονής.



Σχήμα 3.4.2.2: Συγκέντρωση των βακτηρίων σε CFU/ml σε διαφορετικούς χρόνους παραμονής στο νανοδομημένο ZnO και το επίπεδο PMMA υπό συνθήκες ροής με αρχική συγκέντρωση $2,2 \cdot 10^5$ CFU/ml. Συνθήκες: st=stationary, fl=flow

Μειώνοντας μια τάξη μεγέθους την συγκέντρωση στα 10^5 CFU/ml, στο (Σχήμα 3.4.2.2) παρατηρείται, μεταξύ στατικής και ροϊκής κατάστασης για το νανοδομημένο ZnO, μεγαλύτερη αντιβακτηριακή δράση στο στατικό κανάλι. Να σημειωθεί, ότι ο ρυθμός στην περίπτωση του στατικού καναλιού στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων για την εξέταση του καναλιού υπό ροή βρίσκεται μικρότερος από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε άλλες σειρές πειραμάτων. Παρατηρούμε ότι εξαιτίας της μείωσης της αντιβακτηριακής δράσης στο μικρο-κανάλι στην περίπτωση του στατικού καναλιού, είναι η πιθανή η αλλοίωση της νανοδομημένης επιφάνειας ZnO σε αυτό.

Πίνακας 3.4.1: Ρυθμός θανάτωσης βακτηρίων σε νανοδομημένο ZnO, σε διαφορετικές ογκομετρικές ροές και σε στατικές συνθήκες, σε δύο ανεξάρτητα πειράματα με αρχική συγκέντρωση $1,6 \cdot 10^6$ και $2,2 \cdot 10^5$ CFU/ml.

| Αρχική συγκέντρωση (CFU/ml) | Χρόνος Παραμονής (min) | Ρυθμός Θανάτωσης (CFU/cm ² h) |
|-----------------------------|------------------------|--|
| $1,6 \cdot 10^6$ | 5 (5,2 μl/min) | $1,43 \cdot 10^6$ |
| | 10 (2,6 μl/min) | $1,3 \cdot 10^6$ |
| | 15 (1,73 μl/min) | $2,57 \cdot 10^6$ |
| $2,2 \cdot 10^5$ | 15 στατικό κανάλι | $2,2 \cdot 10^4$ |
| | 15 (1,73 μl/min) | $1,75 \cdot 10^4$ |

3.5 Προσδιορισμός εκλυόμενου DNA

3.5.1 Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας(OD) στα κυτταρικά διαλύματα των επιφανειών

Στα προαναφερθέντα πειράματα επιβίωσης των βακτηρίων στις επιφάνειες, εκτός της μέτρησης των επιζώντων κυττάρων και του υπολογισμού του ρυθμού θανάτωσης των βακτηρίων, είναι απαραίτητο για το σκοπό της εργασίας να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη DNA και αυτό να ποσοτικοποιηθεί μέσα στο εναίωμα των κυττάρων που έχουν υποστεί λύση μέσω της αλληλεπίδρασης τους με τις επιφάνειες. Σύμφωνα με το πείραμα που απεικονίζεται στο (Σχήμα 3.2.2.2), μετά την επώαση των βακτηρίων για 1h στις επιφάνειες επίπεδου και εγχαραγμένου με ICP πλάσμα PMMA, της επίπεδης Zn και της νανοδομημένης επιφάνειας ZnO, απομονώθηκε ποσότητα ενός 1ml του διαλύματος των επωασμένων κυττάρων στις επιφάνειες, και φυγοκεντρήθηκε με 8000 στροφές ανά λεπτό για χρόνο 2min στην μικρή φυγόκεντρο. Το υπερκείμενο υγρό οδηγήθηκε στο φασματοφωτόμετρο για μετρήσεις της συγκέντρωσης του DNA που προήλθε από το κάθε υπόστρωμα, όπως παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα 3.5.1.

Πίνακας 3.5.1: Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) δείγματος DNA από το υπερκείμενο διάλυμα των βακτηρίων, παραμονής 1h πάνω στις αντίστοιχες επιφάνειες

| Επιφάνειες | Μέση τιμή OD _{260nm} | Τυπική απόκλιση |
|------------------|----------------------------------|--------------------|
| Επίπεδο PMMA | 0,010 | 0,002 |
| PMMA ICP | 0,015 | 0,001 |
| Επίπεδο Zn | 0,024 | 0,002 |
| Νανοδομημένο ZnO | 0,17 | 0,204 |

Οι τιμές οπτικής πυκνότητας είναι αρκετά μικρότερες τις μονάδας. Η απορρόφηση του δείγματος είναι παρόμοια με εκείνη του λευκού-της κυψελίδας αναφοράς. Κάθε τιμή προκύπτει από τριπλή επανάληψη της μέτρησης του ίδιου δείγματος στο φασματοφωτόμετρο.

Μιλώντας για τον καθαρισμό των δειγμάτων που συλλέχθηκαν μετά την επαφή τους με τις επιφάνειες, χρειάζεται το DNA να διαχωριστεί όσο το δυνατόν καλύτερα από τα υπόλοιπα συστατικά του διαλύματος. Η βασική εργαστηριακή τεχνική που επιτυγχάνει τον διαχωρισμό είναι η φυγοκέντρωση, σύμφωνα με το μέγεθος και τη πυκνότητα των συστατικών που περιέχει το δείγμα προς εξέταση. Το δείγμα προς ανάλυση υποβάλλεται σε φυγόκεντρο δύναμη και ρυθμίζεται κατάλληλα σε συγκεκριμένο χρόνο με συγκεκριμένο αριθμό περιστροφών ανά λεπτό (RPM-revolution per minute) που απαιτούνται για τον διαχωρισμό. Στα δείγματα των πειραμάτων η ρύθμιση της περιστροφής γίνεται ανάλογα τον όγκο του υγρού που θέλω να διαχωρίσω. Στις ποσότητες όγκου μέχρι 1 ml, οι 8000 στροφές για 2 λεπτά μπορούν και διαχωρίσουν

ικανοποιητικά το δείγμα. Κατά την φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο (supernatant) με το DNA παραμένει πάνω από το ίζημα, ενώ το ίζημα (pellet) που σχηματίζεται στον πυθμένα του tube αποτελείται από τις μεμβράνες, τα υποκυτταρικά οργανίδια και τις λοιπές ακαθαρσίες. Οι παραπάνω τιμές οπτικής πυκνότητας αφορούν το υπερκείμενο υγρό των δειγμάτων όπου περιέχεται το DNA και είναι ανάλογο της ποσότητας αυτού αφού το DNA απορροφά με μέγιστο στα 260 nm.

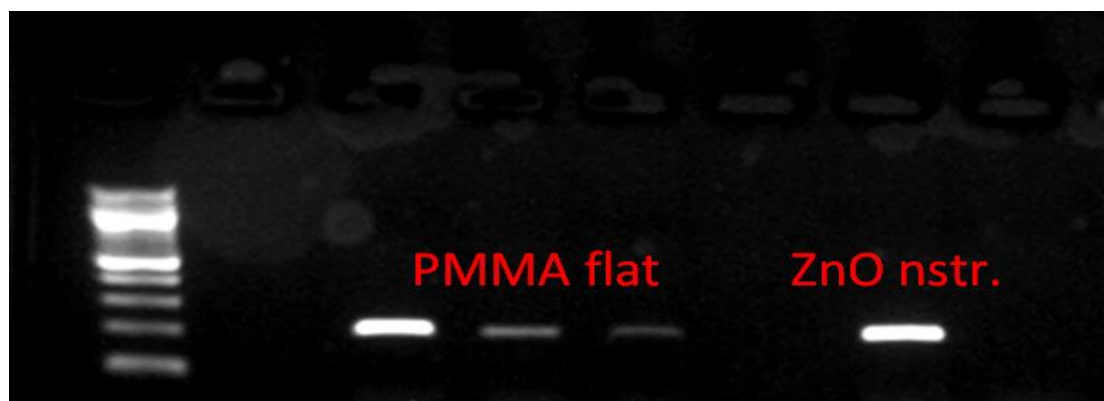
3.5.2 Αποτελέσματα της τεχνικής PCR σε δείγματα από τα μικρο-κανάλια PMMA και ZnO

3.5.2.1 Εφαρμογή της PCR σε δείγματα κυττάρων από το κανάλι

Η τεχνική της PCR χρησιμοποιήθηκε στην προσπάθεια ποσοτικοποίησης του DNA που έχει εκλυθεί από τα μικρο-κανάλια με βασικό χαρακτηριστικό ως πρώτο βήμα να αποτελεί η ορθή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR και η επιτυχής ενίσχυση του DNA από τα δείγματα ενδιαφέροντος. Τα αποτελέσματα της PCR δείχνουν ενισχυμένο DNA σε όλα τα υποστρώματα των καναλιών που χρησιμοποιήθηκαν, υποδεικνύοντας τη λύση των κυττάρων σε μικρούς χρόνους παραμονής στο τσιπ. Αξίζει να σημειωθεί εδώ ότι η PCR πραγματοποιήθηκε χωρίς την προσθήκη βήματος καθαρισμού πριν την εισαγωγή των κυτταρολυμάτων στην PCR, αφού δεν παρατηρήθηκε αναστολή της αντίδρασης. Η αρχική βακτηριακή συγκέντρωση που επιλέχθηκε είναι ίση με 10^7 CFU/ml, στηριζόμενοι στα πειράματα επιβίωσης των κυττάρων σε τρυβλία petri στερεού θρεπτικού υλικού άγαρ με επίτευξη 99,9 % ποσοστού θανάτωσης των κυττάρων υπό συνθήκη φωτός στο νανοδομημένο ZnO σε σχέση με το επίπεδο κανάλι PMMA ελέγχου.

Από τις εντάσεις των σημάτων του κάθε πηγαδιού στην πηκτή ηλεκτροφόρησης, και με την χρήση του προγράμματος GelAnalyzer, αποτυπώνονται ενισχυμένα τμήματα DNA (σε αυτή την περίπτωση, του γονιδίου ybbW του E. coli) από τα εναιωρήματα των κυττάρων που έχουν συλλεχθεί από την έξοδο των καναλιών επίπεδου ακατέργαστου PMMA και του νανοδομημένου οξειδίου ZnO. Τα πηγάδια (lanes) που αντιστοιχούν σε δείγμα DNA από το επίπεδο PMMA και το νανοδομημένο ZnO παρουσιάζουν ενίσχυση του DNA στο (Σχήμα 3.4.3.1) κατά σειρά αυξανόμενης αραιώσεως, με το πρώτο πηγάδι να παραμένει αναραίωτο, απευθείας χρήση του από την έξοδο του καναλιού, ακολουθούμενο από αραιώσεις 1:10 και 1:30. Μέσω των αραιώσεων οδηγούμαστε σε ακριβέστερη εκτίμηση των διαφορετικών συγκεντρώσεων DNA που απομονώνονται από το κάθε μικρο-κανάλι. Τα δείγματα του νανοδομημένου μικρο-καναλιού ZnO με τις εν λόγω αραιώσεις δεν εμφάνισαν ενισχυμένες αλληλουχίες του γονιδίου, υπονοώντας την απουσία του DNA σε μεγαλύτερες αραιώσεις σε σχέση με το PMMA. Το κάθε πηγάδι των δειγμάτων από τα δύο υποστρώματα συγκρίνεται με το πηγάδι στην ίδια οριζόντια ευθεία, του μάρτυρα (marker) Nippon, στον οποίο περιέχονται 40 ng DNA σε όγκο 5μl φόρτωσης του πηγαδιού. Σε όλα τα υπόλοιπα πηγάδια άγνωστης συγκέντρωσης των PMMA και του νανοδομημένου ZnO, στο στάδιο εμβολιασμού των δειγμάτων στην πηκτή ηλεκτροφόρησης, χρησιμοποιήθηκε 1μl δείγματος που είχε συλλεχθεί ως μήτρα

(template). Να σημειωθεί ότι η άγνωστη συγκέντρωση DNA που χρησιμοποιήθηκε προέκυψε από συνολικό όγκο των 20μl που συλλέχθηκαν από το κάθε κανάλι. Εν συνεχεία, από τον λόγο του εμβαδού της έντασης που καταγράφεται από την φωτογραφία, παράχθηκαν οι αναλογίες για την σχετική εκτίμηση της άγνωστης συγκέντρωσης.

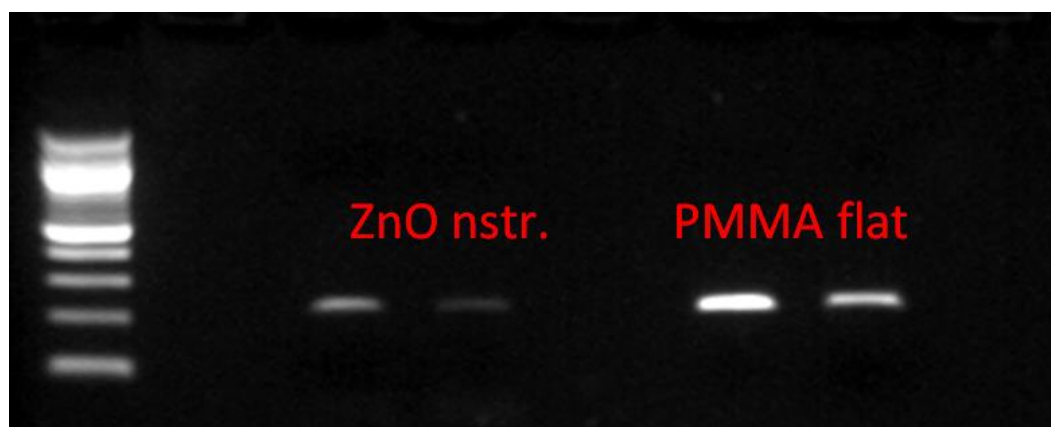


Σχήμα 3.5.2.1: Ενισχυμένο DNA από το διάλυμα των κυττάρων (σε αραιώσεις) που επωάστηκε στα μικρο-κανάλια του επίπεδου PMMA και του νανοδομημένου ZnO για 15 min. *Κάθε πηγάδι του PMMA και του ZnO αντιστοιχεί σε διαφορετικές αραιώσεις (χωρίς αραιώση, (1:10,1:30) του αρχικού δείγματος που λήφθηκε από την έξοδο του καναλιού.

Μέσω του υπολογισμού των λόγων της εντάσεως των πηγαδιών με του μάρτυρα Ladder Nirron, στο lane 1 του επίπεδου PMMA η ένταση του πηγαδιού εμφανίζεται 2,9 φορές υψηλότερο από του μάρτυρα, καθώς επίσης και το lane 1 του ZnO είναι 3 φορές πιο έντονο από τον μάρτυρα, υποδεικνύοντας περίπου ίση ποσότητα εκλυμένου DNA στα δύο μικροκανάλια PMMA και ZnO. Χρησιμοποιώντας το δεύτερο πηγάδι για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων, με αραιώση 1:10, προκύπτει ο λόγος $\frac{PMMA}{ZnO}$ να είναι ίσος με 3,5, με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ενισχυμένου DNA να επιβεβαιώνει ότι ανιχνεύεται στο μικρο-κανάλι του επίπεδου PMMA.

Το πείραμα επαναλήφθηκε με τον ίδιο μάρτυρα Nirron και με αραιώσεις των αρχικών δειγμάτων εξαγωγής από τα μικρο-κανάλια 1:30 και 1:60 του νανοδομημένου ZnO και του επίπεδου PMMA. Στο ZnO εμφανίστηκε ενισχυμένο DNA και στις δύο αραιώσεις σε σχέση με το προηγούμενο πείραμα, ως αποτέλεσμα μεγαλύτερου όγκου επεξεργασίας από τα κανάλια που προήλθε από συνολικό όγκο 40μl, συγκεκριμένα από την έξοδο δύο καναλιών για κάθε υπόστρωμα. Μετά την PCR ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min και συλλέχθηκε το υπερκείμενο περίπου 30 μl, στο οποίο περιέχεται το DNA. Το ίζημα των κυττάρων επαναιωρήθηκε σε 40μl και οδηγήθηκε για επίστρωση των τρυβλίων και την εκτίμηση του ρυθμού θανάτωσης $1,8 \cdot 10^7$ (CFU/cm²h).. PMMA στην αραιώση 1:30 δείχνει 3 φορές μεγαλύτερη ένταση από το ZnO, υποδεικνύοντας, όπως και το προηγούμενο πείραμα (Σχήμα 3.5.2.1), ότι το κανάλι PMMA δίνει μεγαλύτερη ποσότητα DNA (πιθανόν 3-πλάσια) σε σχέση με το κανάλι ZnO. Να σημειωθεί, ότι σύμφωνα με τα αποτελέσματα της επίστρωσης των

τρυβλίων, η βακτηριακή συγκέντρωση υπολογίζεται 3 τάξεις μεγέθους μεγαλύτερες για το PMMA, σε σχέση με το νανοδομημένο ZnO, γεγονός που φανερώνει την απενεργοποίηση του DNA στο ZnO υπόστρωμα.



Σχήμα 3.5.2.2: Ενισχυμένο DNA από διάλυμα κυττάρων που επώαστηκε σε μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 15min. *Κάθε πηγάδι για το PMMA και το ZnO αντιστοιχεί σε διαφορετικές αραιώσεις του αρχικού δείγματος (1:30, 1:60) που λήφθηκε από την έξοδο του καναλιού.

Ταυτόχρονα με την ανάλυση αυτή, πραγματοποιήθηκε μέτρηση του εκκλύμενου DNA στο νανο-φασματοφωτόμετρο με υπολογισμό της συγκέντρωσης (σε ng/μl) από τα δείγματα στο Πίνακα 3.2.2.1. Ο λόγος $\frac{PMMA}{ZnO}$ που προκύπτει με αραιώση 1:30 στο δεύτερο σε σειρά πηγάδι των δύο δειγμάτων είναι ίσος με 3. Διακρίνουμε ότι η ποσότητα DNA από το νανοδομημένο ZnO είναι μειωμένη περίπου στο 1/3 σε σχέση με το DNA από το μικρο-κάνάλι αναφοράς, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Σχήματος 3.5.2.2 της PCR, εφόσον το ενισχυμένο DNA στο πηγάδι που αντιστοιχεί στο ZnO είναι μειωμένο και μικρότερης συγκέντρωσης (περίπου στο 1/3). Φαίνεται το κανάλι του ZnO, εξαιτίας της τοπογραφίας του, εξασφαλίζει μεγάλο ρυθμό θανάτωσης των βακτηρίων (από την μέτρηση αποικιών στα τρυβλία), με κάποιο τρόπο (π.χ. με τη συνεισφορά του φωτός) η παραγωγή ROS συνεισφέρει στην απενεργοποίηση μεγάλης συγκέντρωσης μορίων DNA, εφόσον από τον αρχικό πληθυσμό της κυτταρικής καλλιέργειας περιμέναμε δείγματα πλούσια σε γενετικό υλικό των βακτηρίων. Για το ακατέργαστο και επίπεδο PMMA, αν και δεν πραγματοποιείται λύση των κυττάρων που προκαλείται από την τοπογραφία του υλικού, απελευθερώνεται DNA με άλλο μηχανισμό. Πιθανά αίτια για τη λύση των κυττάρων στο υπόστρωμα αναφοράς είναι η παραγωγή ROS και στην περίπτωση του PMMA, όπως θα περιγράψουμε παρακάτω. Επίσης είναι πιθανό ότι μέρος του κυτταρικού πληθυσμού, μετά από παραμονή 15 λεπτών σε στατική συνθήκη στον επωαστικό κλίβανο, μπορεί να οδηγείται σε θάνατο και διάτρηση των μεμβρανών τους.

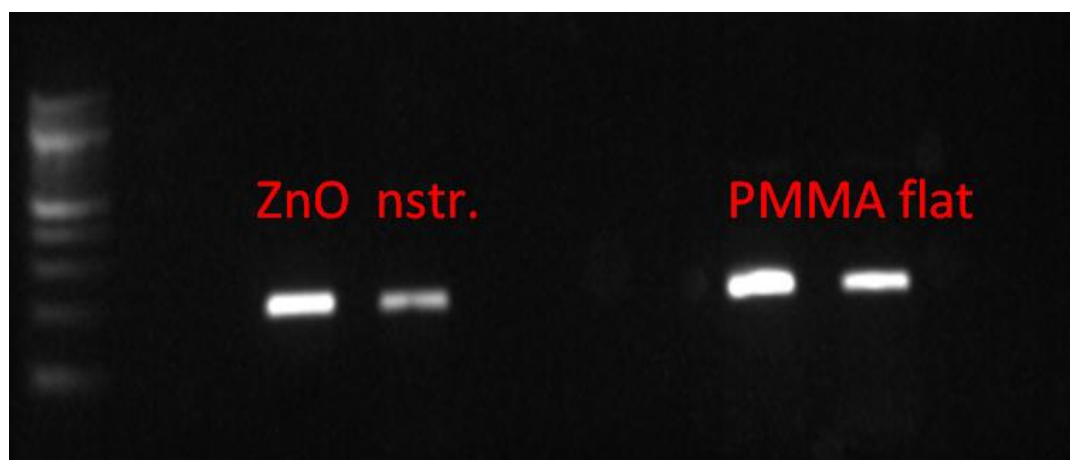
Πίνακας 3.5.2.1: Μέτρηση της συγκέντρωσης DNA λόγω έκλυσης από τα νεκρά κύτταρα *E.coli* στα μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO με χρόνο παραμονής 15 min σε στατικές συνθήκες και υπό την επίδραση του φωτός.

| Μικρο-κανάλι | Συγκέντρωση νανογραμμαρίων (ng/ul) DNA | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
|------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Επίπεδο PMMA | 21 | 1,34 | 0,4 |
| Νανοδομημένο ZnO | 6 | 1,68 | 0,50 |

Για την αποσαφήνιση του λόγου καταστροφής του DNA στο νανοδομημένο ZnO μικρο-κανάλι, καθώς και για την κατανόηση του μηχανισμού έκλυσης DNA στο μικρο-κανάλι PMMA στο οποίο τα κύτταρα δεν λύνονται λόγω της τοπογραφίας της επιφάνειας, τοποθετείται στα κανάλια καθαρό DNA του γονιδίου *Ybbw* του βακτηριακού στελέχους *E.coli*.

3.5.3 Ανάλυση PCR με εισαγωγή καθαρού DNA στα μικροκανάλια

Χρησιμοποιήθηκε καθαρό DNA (2ng) του *E.coli* TOP 10 για να διαπιστωθεί σε καθαρό περιβάλλον, χωρίς την ύπαρξη των κυτταρικών μεμβρανών και τα ενδοκυττάρια προϊόντα των κυττάρων, η δράση των υποστρωμάτων από τα μικρο-κανάλια. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε ήταν η απευθείας εισαγωγή του καθαρού DNA γνωστής συγκέντρωσης το οποίο διατηρείτο στην κατάψυξη στους -20°C.



Σχήμα 3.5.3.1: Ενισχυμένο DNA από καθαρό DNA που παρέμεινε στα μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO για 15 min. *Κάθε πηγάδι που

αντιστοιχεί στο PMMA και το ZnO προέρχεται από διαφορετικές αραιώσεις (1:60, 1:30) του αρχικού δείγματος DNA που λήφθηκε από την έξοδο του μικρο-καναλιού.

Από τον όγκο του κάθε μικρο-καναλιού που περιέχει το καθαρό DNA ελήφθη όγκος 1 μl ως μήτρα DNA-templata και εισήχθη στα μικροδοχεία της PCR που περιέχουν τα αντιδραστήρια. Οι κύκλοι ενίσχυσης του DNA και η διαδικασία ήταν ίδια με εκείνη που ακολουθήθηκε στα προηγούμενα πειράματα επεξεργασίας της κυτταρικής καλλιέργειας. Στο πείραμα αυτό η διαφορά βρίσκεται στη χρήση διαφορετικού μάρτυρα NEB 100kb που περιέχει 25ng/μl στο πηγάδι-θραύσμα του. Γνωρίζοντας τη συγκέντρωση DNA που υπάρχει πριν την εισαγωγή στα κανάλια, μπορούμε να υπολογίσουμε το ποσοστό μείωσης του DNA.

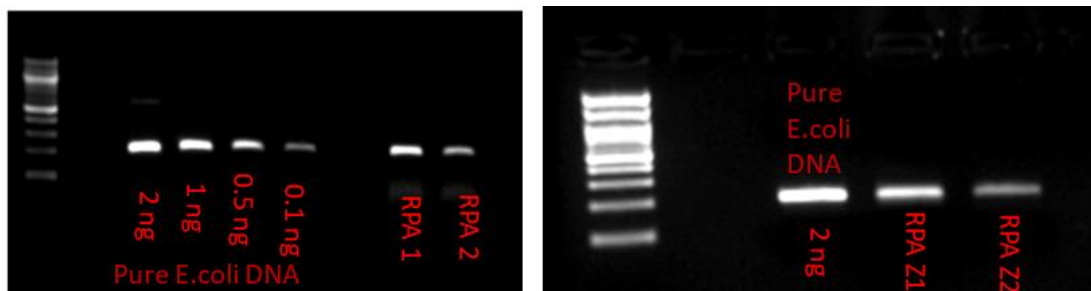
Λαμβάνοντας υπόψη την ένταση από το δείγμα στο κανάλι PMMA που προκύπτει από την αραιώση 1:60 από τον αρχικό όγκο συλλογής των 20 μl στην έξοδο του καναλιού, φαίνεται ότι εξακολουθεί το DNA στο μικροκανάλι PMMA να είναι 1.5 φορές περισσότερο αυτού στο ZnO. Επομένως, αποδεικνύεται ότι το DNA καταστρέφεται εν μέρει στο μικροκανάλι του ZnO. Από μετρήσεις στο φασματοφωτόμετρο, όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.5.3.1, μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι το νανοδομημένο ZnO συνεισφέρει στην καταστροφή του DNA ύστερα από παραμονή του στο στατικό κανάλι για 15 λεπτά και σε συνθήκες φωτός. Η ποσότητα του DNA στο επίπεδο PMMA είναι σχεδόν ίδια με την μέτρηση αναφοράς που δεν εισήλθε στο κανάλι. Στο νανοδομημένο ZnO, η ποσότητα του DNA μειώθηκε στο 50% της αρχικής ποσότητας DNA, γεγονός που αποδεικνύει καθαρά την απενεργοποίηση του DNA στο νανοδομημένο ZnO.

Πίνακας 3.5.3.1: Μέτρηση της συγκέντρωσης καθαρού DNA πριν και μετά την εισαγωγή σε μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO, με χρόνο παραμονής 15 min, σε στατικές συνθήκες και υπό την επίδραση του φωτός.

| Καθαρό DNA και μικρο-κανάλια | Συγκέντρωση νανογραμμαρίων (ng/ul) DNA | A ₂₆₀ /A ₂₈₀ | A ₂₆₀ /A ₂₃₀ |
|------------------------------|--|------------------------------------|------------------------------------|
| Καθαρό DNA | 52 | | |
| Επίπεδο PMMA | 54,9 | 1,79 | 1,51 |
| Νανοδομημένο ZnO | 24,5 | 1,55 | 0,69 |

3.5.4 Απενεργοποίηση του ανεπιθύμητου DNA στο κιτ TwistDx™

Αφού έχουμε δείξει ότι το DNA απενεργοποιείται εν μέρει κατά την παραμονή του μέσα σε μικροκανάλι ZnO, δοκιμάσαμε να απενεργοποιήσουμε DNA του βακτηρίου *E. coli* το οποίο βρίσκεται χωρίς να είναι επιθυμητό μέσα σε εμπορικό κιτ RPA (TwistDx). Παρακάτω στο Σχήμα 3.5.4α παρατίθενται τα αποτελέσματα ενίσχυσης διαφόρων συγκεντρώσεων DNA του βακτηρίου *E. coli* μέσω PCR για την αξιολόγηση της ποσότητας DNA στο RPA kit καθώς και της ποσότητας DNA που καταστρέφεται στο νανοδομημένο μικρο-κανάλι ZnO (Σχήμα 3.5.4β). Επειδή στο κάθε αντιδραστήριο της RPA kit δεν γνωρίζουμε την ακριβή συγκέντρωση στο γονίδιο του *E. coli*, έγινε προσπάθεια εκτίμησης της από γνωστή συγκέντρωση DNA δειγμάτων του *E. coli*, μετά από την ενίσχυση τους με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).



Σχήμα 3.5.4.1: Ενίσχυση του γονιδίου *ybbw* του βακτηρίου *E. coli* που περιέχεται στο αντιδραστήριο του RPA kit (Σχήμα αριστερά) και απενεργοποίηση του γονιδίου *ybbw* του αντιδραστήριου RPA kit μετά την παραμονή του σε μικρο-κανάλια νανοδομημένου ZnO σε χρόνο 0,5 h (Σχήμα δεξιά). *RPA, RPA αναφέρονται στο ενισχυμένο αντιδραστήριο της RPA kit, RPA Z1, RPA Z2 αναφέρονται στο ενισχυμένο αντιδραστήριο της RPA μετά την παραμονή του στο μικρο-κανάλι.

Για την σύγκριση των δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα ImageJ στον υπολογισμό των εντάσεων που έχει το κάθε πηγάδι. Τα πηγάδια των ενισχυμένων δειγμάτων συγκρίθηκαν με τον μάρτυρα του πειράματος ώστε να εξαγάγουμε τους λόγους εντάσεως μεταξύ τους. Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας τους λόγους εντάσεων για τα δύο πειράματα, και συγκρίνοντας με τον λόγο του μάρτυρα προς το δείγμα κάθε πειράματος, από τα δύο ανεξάρτητα πειράματα εκτιμήθηκε το ποσοστό απενεργοποίησης του RPA μέσα στα μικρο-κανάλια. Στο Σχήμα 3.5.4α αριστερά έχουν χρησιμοποιηθεί δείγματα καθαρού DNA του *E. coli* σε συγκεντρώσεις των 0,1, 0,5, 1, και 2 ng για τον ποσοτικό προσδιορισμό του DNA που περιέχεται στα RPA1 και RPA2 αντιδραστήρια της RPA kit.

Στα ενισχυμένα RPA 1 και RPA 2 χωρίς την ενσωμάτωσή τους στο κανάλι χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπος όγκος 1 μl των 16 μl διαλύματος σε αραιώσεις (1:10, 1:4), αντίστοιχα. Τα ενισχυμένα RPA Z1 και RPA Z2 από τα μικρο-κανάλια για την ενίσχυσή τους με την PCR χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπος όγκος 1 μl των 30 μl που ήταν διαλυμένο το αντιδραστήριο της PCR. Συνεπώς, από την εκτίμηση του λόγου εντάσεων του πηγαδιού 0,1 ng καθαρού DNA με τα αντιδραστήρια της RPA 1,2 σε

σχέση με την ένταση αναφοράς του μάρτυρα υπολογίζεται η ποσότητα των ng σε αυτά (Πίνακας 3.5.4). Τα δείγματα του RPA1 και RPA2 υπολογίζεται ότι περιέχουν 0,33 και 0,2 ng, αντίστοιχα στον όγκο του 1μl. Στην συνέχεια, ο υπολογισμός της ποσότητας που βρίσκεται στα RPAZ1 και RPAZ2 των μικρο-καναλιών γίνεται από τον λόγο του μάρτυρα NEB και Nippon και την ποσότητα της συγκέντρωσης του RPA1 που υπολογίσαμε. Ως αποτέλεσμα προκύπτουν η αναλογία των $\frac{RPAZ1}{RPA1}$ και $\frac{RPAZ2}{RPA1}$ να είναι είναι ίση με 0,66 και 0,29, αντίστοιχα. Με δεδομένο την ποσότητα των 0,33 ng στο RPA1, το ποσοστό (%) απενεργοποίησης μέσα στα μικρο-κανάλια RPAZ1 και RPA2 για χρόνο παραμονής 15min είναι 33,3% και 69,7%, αντίστοιχα.

Πίνακας 3.5.4.1: Λόγοι εντάσεων από τα ενισχυμένα δείγματα των πειραμάτων του Σχήματος 3.5.4:

| | Λόγος εντάσεων |
|-------------------------------|----------------|
| RPA 1(1:10)/Ladder NEB | 11,4 |
| RPA 2(1:4)/LadderNEB | 5,48 |
| 0.1 ng DNA/Ladder | 3.44 |
| | |
| RPA Z1/Ladder Nippon | 2,3 |
| RPA Z2/Ladder Nippon | 1,1 |

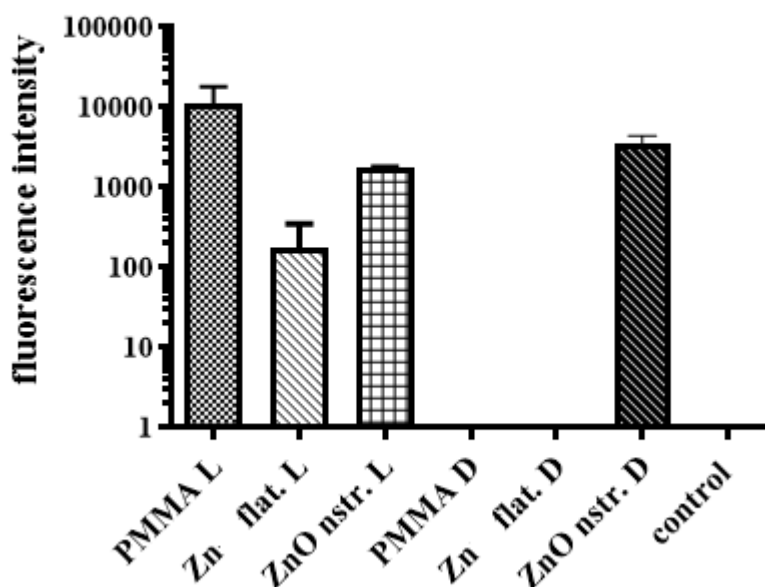
3.6 Ανίχνευση του DNA με βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr)

Η παρουσία του DNA και η επίδραση κάθε καναλιού (σε επίπεδο PMMA, επίπεδο Zn και νανοδομημένο ZnO) στον πληθυσμό των κυττάρων *E.coli* μπορεί να διερευνηθεί άμεσα (και όχι έμμεσα μέσω ενίσχυσης, όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 3.5.2) με την μέτρηση της εκπομπής φθορισμού μετά την πρόσδεση μέσω παρεμβολής του βρωμιούχου αιθιδίου στις βάσεις του μορίου του DNA. Η συγκέντρωση των κυττάρων που εισάχθηκε στα κανάλια είναι ίση με 10^8 CFU/ml με συνολικό όγκο 26μl. Η παραμονή των κυττάρων μέσα στα κανάλια πραγματοποιήθηκε στον κλίβανο στους 37°C σε στατική κατάσταση. Ο ρόλος του φωτός διερευνήθηκε με πειράματα σε συνθήκες φωτός και σκότους.

Για τη σύγκριση των μετρήσεων και τελικό υπολογισμό της έντασης του φωτός που είναι ανάλογη με την συγκέντρωση του DNA, χρησιμοποιήθηκαν δύο δείγματα αναφοράς (control). Το ένα περιείχε απιονισμένο νερό, το διάλυμα χλωριούχου νατρίου (NaCl₂) με περιεκτικότητα 0.9%, το οποίο αποτελεί το περιβάλλον των κυττάρων, και το διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου για την αφαίρεση του υποβάθρου στα διαλύματα των κυττάρων που έχει εκλυθεί το DNA. Το δεύτερο δείγμα αναφοράς των μετρήσεων περιλαμβάνει μόνο το απιονισμένο νερό για την επαλήθευση και την εγκυρότητα των

μετρήσεων στο μηχάνημα μέτρησης φθορισμού και χημειοφωταύγειας στα φρεάτια μικροτιτλοδότησης (Tecan-Spark).

Με την συσκευή Tecan-Spark υπολογίζεται η ένταση του φθορισμού των δειγμάτων που προκύπτουν σαν αποτέλεσμα της πρόσδεσης του βρωμιούχου αιθιδίου στο DNA που προέρχεται από τα τρία προαναφερόμενα κανάλια σε υποστρώματα PMMA, Zn&ZnO. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο (Σχήμα 3.6.1) απεικονίζουν τη μέση τιμή του φθορισμού που μετρήθηκε σε μια σειρά τεσσάρων ανεξάρτητων πειραμάτων, εκ των οποίων τα δύο πραγματοποιήθηκαν υπό συνθήκες φωτός και τα δύο υπό συνθήκες σκότους. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια δείγματα υποστρωμάτων καθαρισμένα μετά από κάθε πείραμα, εφόσον δεν έχουν υποστεί αλλοιώσεις στο υλικό τους, με τη λειτουργικότητα των νανοδομών του οξειδίου του ψευδαργύρου να μπορεί να διατηρείται.



Σχήμα 3.6.1: Ένταση φθορισμού EtBr σε διαλύματα κυττάρων *E.coli* μετά την παραμονή τους στα μικρο-κανάλια επίπεδου PMMA, επίπεδου Zn και νανοδομημένου ZnO, για χρόνο 10 min, υπό την επίδραση φωτός και σκότους (L για Light Conditions και D για Dark Conditions).

Παρατηρώντας το (Σχήμα 3.6.1), οι τιμές της έντασης φθορισμού διαφέρουν σημαντικά, τόσο μεταξύ των διαφόρων υποστρωμάτων των μικρο-καναλιών όσο και μεταξύ των συνθηκών φωτός και σκότους. Αρχίζοντας από το επίπεδο μικρο-κάνάλι PMMA, η μεγάλη τιμή έντασης φθορισμού (άρα και συγκέντρωσης DNA) υπό φως σε σχέση με την απουσία φθορισμού υπό σκότος, μπορεί να αποδοθεί στο ρόλο των δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) που ενεργοποιούνται με την παρουσία του φωτός και αποσαφηνίζονται στην Ενότητα 3.5.1, σύμφωνα με την μέτρηση και την εκτίμηση

των ROS στην επιφάνεια των υποστρωμάτων PMMA. Το PMMA που χρησιμοποιείται ευρέως σε συστήματα μελέτης κυττάρων δεν έχει κατηγορηθεί στη βιβλιογραφία για τοξικότητα ως προς βακτηριακά κύτταρα για μικρούς χρόνους παραμονής. Ωστόσο η παρουσία (μέσω φθορισμού του βρωμιούχου αιθιδίου) του DNA στα μικρο-κανάλια με επίπεδο PMMA, υποδεικνύει διάτρηση των μεμβρανών, κατά πάσα πιθανότητα μέσω ROS που αναπτύσσονται υπό την αλληλεπίδραση του PMMA με το φως. Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε πλήρη συμφωνία με την Ενότητα 3.5 των αποτελεσμάτων της τεχνικής PCR όπου ανιχνεύεται ενισχυμένο DNA στα δείγματα από το PMMA υπό φως, καθώς και από τις μετρήσεις του φασματοφωτόμετρου της συγκέντρωσης του DNA.

Στο μικρο-κανάλι με επιφάνεια νανοδομημένου ZnO, η μέση τιμή της έντασης φθορισμού είναι διπλάσια στη συνθήκη σκότους σε σχέση με το φως, αλλά σε κάθε περίπτωση, σε αντίθεση με το αναμενόμενο, είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με το φθορισμό στο κανάλι PMMA. Στηριζόμενοι στην αρκετά μεγάλη μείωση του πληθυσμού των κυττάρων στα υποστρώματα του νανοδομημένου ZnO, αναμέναμε μεγάλη ποσότητα εκλυμένου DNA, και άρα μεγαλύτερη τιμή φθορισμού στο νανοδομημένο ZnO σε σύγκριση με το επίπεδο PMMA. Στο σκότος, ο κύριος μηχανισμός έλκυσής DNA στα μικρο-κανάλια νανοδομημένου ZnO είναι η διάτρηση των κυτταρικών μεμβρανών, ενώ στο φως μέρος αυτού του DNA απενεργοποιείται σημαντικά εξαιτίας των δραστικών ριζών οξυγόνου (αυτές θα εκτιμηθούν, τόσο υπό συνθήκη φωτός όσο και υπό συνθήκη σκότους, στην Ενότητα 3.6.1). Οι δραστικές ρίζες και τα παράγωγα των ριζών μέσω αντίδρασης με το ZnO επεμβαίνουν τόσο στην διάτρηση των μεμβρανών όσο και στην απενεργοποίηση/αποδόμηση του ενδοκυτταρικού DNA.

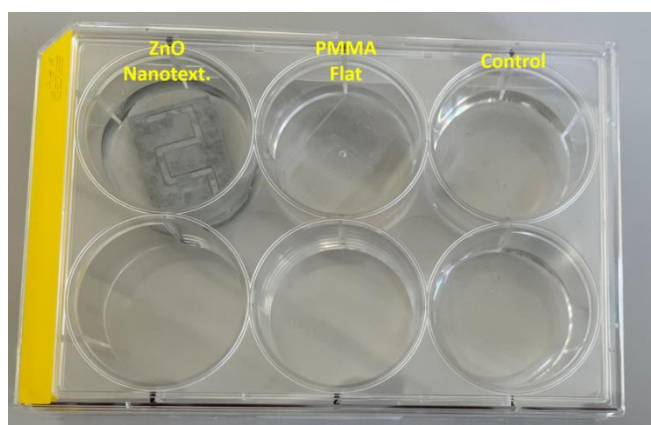
Στο μικροκανάλι με το επίπεδο Zn υπό φως αποδίδει πέντε φορές μικρότερο σήμα σε σχέση με το νανοδομημένο ZnO. Σκεπτόμενοι τα αποτελέσματα της Ενότητας 3.1, είναι αναμενόμενο το επίπεδο Zn να μην οδηγεί σε μηχανική διάτρηση των μεμβρανών μέσω των επιφανειακών ακίδων, συνεπώς δεν περιμέναμε σημαντικό φθορισμό. Υπό φως, ο φθορισμός είναι πιθανόν να οφείλεται στη δράση των θετικών ιόντων του Zn που παράγονται επάνω στην επιφάνεια του υλικού και οδηγούν επίσης σε χημική διάτρηση των μεμβρανών.

Ως προς τη μεγαλύτερη ποσότητα DNA που εκλύεται στα μικρο-κανάλια του νανοδομημένου ZnO, γίνεται αντιληπτό πως αυτό διατηρείται καλύτερα υπό την κάλυψη του μικρο-καναλιού στο πλήρες σκότος (για σημαντική μείωση των δραστικών ριζών που απενεργοποιούν το DNA). Αν και η τραχύτητα του νανοδομημένου ZnO ενισχύει τη θανάτωση των κυττάρων μέσω μηχανικής διάτρησης των μεμβρανών, ο μηχανισμός των ROS ενισχύεται στο φως και μπορεί να συμβάλει επίσης στη χημική ρήξη των μεμβρανών αλλά και στην φθορά των μορίων του DNA, οδηγώντας τελικά σε μείωση του DNA στα μικροκανάλια που εκτίθενται στο φως.

3.7 Προσδιορισμός των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS)

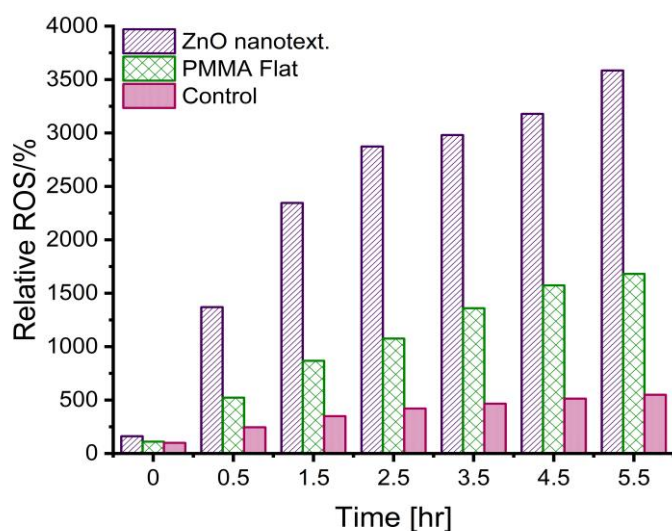
3.7.1 Αποτελέσματα παραγωγής ROS σε υποστρώματα PMMA και ZnO

Από την συμπεριφορά του ZnO και του PMMA κατά τα αποτελέσματα της μέτρησης αποικιών επιζώντων κυττάρων, του DNA μέσω PCR και απορρόφησης των νουκλεϊκών οξέων στο νανο-φασματοφωτόμετρο, κρίνεται απαραίτητη η μέτρηση των ROS στο διάλυμα των δειγμάτων για να επιβεβαιωθεί ότι κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της παραμονής των βακτηρίων και σε αλληλεπίδραση με τα υποστρώματα που περιέχονται τα κανάλια, παίζουν το ρόλο που συζητήθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Laboratory of Thermodynamics in Emerging Technologies του ΕΤΗ. Τα δείγματα προς εξέταση ήταν το νανοδομημένο κανάλι ZnO και το επίπεδο κανάλι PMMA.



Σχήμα 3.7.1.1: Τα υποστρώματα επίπεδου PMMA και νανοδομημένων ZnO καναλιών που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή ROS στο περιβάλλον του δείγματος.

Τα δείγματα βρίσκονταν στο φως κατά την διάρκεια των μετρήσεων. Σε αυτό το σημείο της εργασίας, μαζί με αποτελέσματα πειραμάτων που ακολούθησαν για ανίχνευση του DNA με το πρωτόκολλο του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), παρατηρήθηκε η επίδραση του φωτός ακόμα και σε μικρούς χρόνους παραμονής μέσα στα κανάλια και των δύο διαφορετικών υποστρωμάτων. Όπως φαίνεται από το (Σχήμα 3.7.1.2), η συγκέντρωση των ROS (% Relative ROS) αυξάνεται σημαντικά από την χρονική στιγμή 1s μέχρι την 0.5h, ενώ στη συνέχεια ανεβαίνει σχεδόν γραμμικά και για τα δύο υποστρώματα. Στο πρώτο χρονικό διάστημα 0-0,5h που είναι το διάστημα μελέτης για τα πειράματα στα μικρο-κανάλια, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση στο ZnO βρίσκεται 3 φορές υψηλότερη σε σχέση με το PMMA.

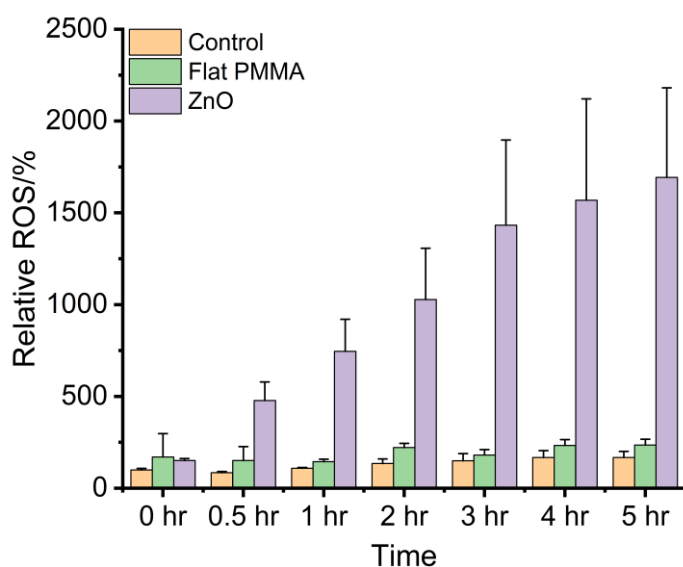


Σχήμα 3.7.1.2: Σχετική ποσοστιαία συγκέντρωση ROS (%) σε σχέση με τον χρόνο παραμονής των υποστρωμάτων μικρο- καναλιών επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO υπό συνθήκες φωτός.

Να σημειωθεί ότι (Σχήμα 3.7.1.2) η επιφάνεια των δειγμάτων που ήταν εμποτισμένη στο αντιδραστήριο DHR-123 είχε διαστάσεις $2 \times 3.5 \text{ cm}^2$ συγκριτικά με την επιφάνεια 1.6 cm^2 που έχει το κάθε κανάλι προς μελέτη.

Σε επόμενο βήμα, πραγματοποιήθηκε πείραμα με το αντιδραστήριο DHR-123 σε συνθήκες σκότους, με τα δείγματα να καλύπτονται κατάλληλα κατά την παραμονή τους στον επωαστικό κλίβανο, αφαιρώντας την συμβολή του φωτός ως παράμετρο στην παραγωγή των ROS. Οι επιφάνειες είχαν διαστάσεις $1 \times 1 \text{ cm}^2$ στο νανοδομημένο ZnO και επίπεδο PMMA που χρησιμοποιήθηκαν σε σχέση με τα δείγματα που εξετάστηκαν στο προηγούμενο πείραμα.

Στο (Σχήμα 3.7.1.3) σε σχέση με τα αποτελέσματα του σχήματος (Σχήμα 3.7.1.2), αποδεικνύεται το γεγονός ότι στο επίπεδο PMMA χωρίς την επίδραση του φωτός δεν υπάρχει παραγωγή των ROS και ακολούθως καμία μεταβολή της συγκέντρωσης τους. Αντίθετα, για το ZnO, από το διάστημα παραμονής 0.5h παρουσιάζεται σχεδόν γραμμική αύξηση των ROS με το χρόνο. Αν και οι επιφάνειες που έγιναν οι μετρήσεις ήταν 7 φορές μεγαλύτερες σε σχέση με τις επιφάνειες του καναλιού, ωστόσο η σταθερά μικρή παραγωγή ROS στο PMMA υπό σκότος είναι ένδειξη ότι *το φως* ενεργοποιεί τη διαδικασία παραγωγής των ROS με αποτέλεσμα τη χημική λύση των κυτταρικών μεμβρανών και την έκλυση του DNA.

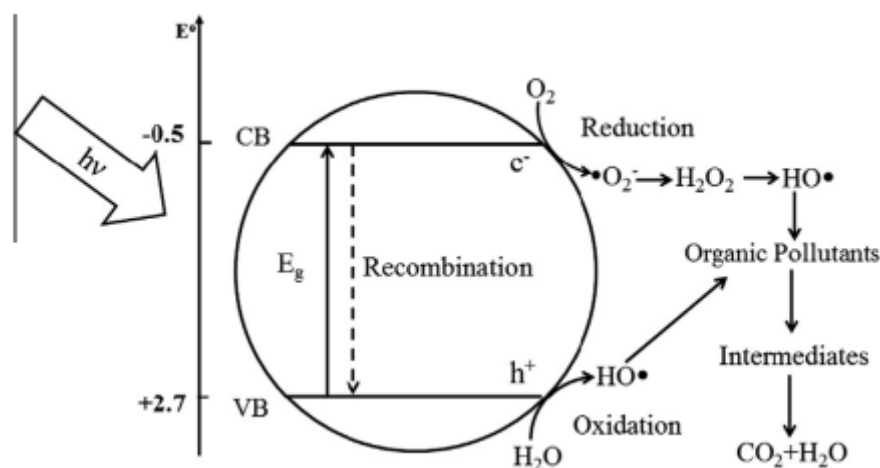


Σχήμα 3.7.1.3: Σχετική ποσοστιαία συγκέντρωση ROS (%) σε σχέση με τον χρόνο παραμονής των υποστρωμάτων μικρο-καναλιών επίπεδου PMMA και νανοδομημένου ZnO σε συνθήκες σκότους.

3.7.2 Αποδόμηση του DNA στο περιβάλλον του ZnO

Η εξήγηση του φαινομένου στο μικροκανάλι ZnO όπου η συγκέντρωση του DNA που ανιχνεύεται δεν συμφωνεί με το μεγάλο ρυθμό θανάτωσης των κυττάρων και την συγκέντρωση του εκλυόμενου DNA που περιμέναμε, μπορεί να οφείλεται σε ένα σύνολο μηχανισμών που προκαλούνται εξαιτίας της φύσης του συγκεκριμένου υποστρώματος ZnO. Όπως πολλές δημοσιεύσεις αναφέρουν, με έμφαση σε δομές νανοσωματιδίων, η τοξικότητα των νανοϋλικών από οξειδία μετάλλων αποδίδεται συχνά σε βλάβες στις μεμβράνες των κυττάρων εξαιτίας των ROS [145,146]. Το οξειδωτικό στρες που προκαλείται σε βακτήρια από τη δημιουργία ενεργών ειδών οξυγόνου (ROS) σε συστήματα που περιέχουν οξειδία μετάλλων είναι ο κύριος μηχανισμός της αντιβακτηριδιακής δράσης των νανοσωματιδίων αυτών. Συγκεκριμένα, η αναστολή και κυτταρικών λειτουργιών και βλάβη στις κυτταρικές μεμβράνες υπό την επίδραση και την έκθεση σε φως παρουσία νανοσωματιδίων μεταλλικών οξειδίων, όπως του ZnO και του TiO₂, που χρησιμοποιούνται ευρέως ως φωτοκαταλύτες για την αποικοδόμηση μικροοργανισμών αναφέρονται τεκμηριωμένα σε μελέτες [147, 148, 149]. Στην περίπτωση του ZnO, τα ROS μπορεί να παραχθούν όχι μόνο με υπεριώδες φως, αλλά και στο ορατό καθώς είναι ένας ημιαγωγός με ένα μεγάλο ενεργειακό διάκενο ζώνης (3,37 eV) και ισχυρή φωταύγεια σε θερμοκρασία δωματίου [150]. Επιπλέον, υποτίθεται ότι ακόμη και κάτω από το συνηθισμένο φωτισμό σε ένα δωμάτιο με συνολική ένταση φωτός 10 μW/cm², η ένταση της υπεριώδους ακτινοβολίας φως, που είναι ~1 μW/cm², επαρκεί για να προκαλέσει (ROS) [151].

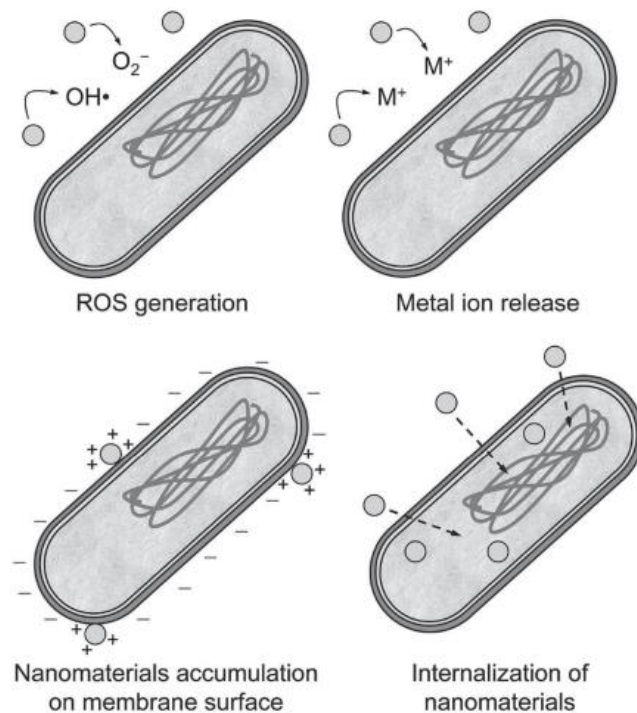
Το οξείδιο του ψευδαργύρου είναι ένας ημιαγωγός τύπου n με μεγάλο διάκενο ζώνης των 3,2 eV. Από τα πιο διαδεδομένα φωτοαποκρινόμενα υλικά, που ανήκουν στους ημιαγωγούς, είναι τα μεταλλικά οξείδια ψευδαργύρου (ZnO). Κατά την ακτινοβολήση με UV, με μήκη κύματος κοντά στα 287nm, το ZnO μπορεί να διεγερθεί για να δημιουργήσει αρνητικά ηλεκτρόνια στη ζώνη αγωγιμότητας και θετικές οπές στη ζώνη σθένους, τα οποία δημιουργούν κενές θέσεις οξυγόνου και ενδοπλεγματικές Zn^{+2} ατέλειες. Τα φωτοεπαγόμενα ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών μπορούν είτε να ανασυνδυαστούν μεταξύ τους είτε να συλληφθούν από άλλα μόρια, όπως το νερό ή το οξυγόνο, σχηματίζοντας δραστικά είδη οξυγόνου (ROS). Ο μηχανισμός των χημικών αντιδράσεων όπως αποτυπώνονται από τους Feng, X., et al. [152] απεικονίζεται στο (Σχήμα 3.7.2.1).



Σχήμα 3.7.2.1 Αλυσίδα χημικών αντιδράσεων για την παραγωγή των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στο μεταλλικό οξείδιο του ZnO μετά από ενεργοποίηση με ακτινοβολία [152].

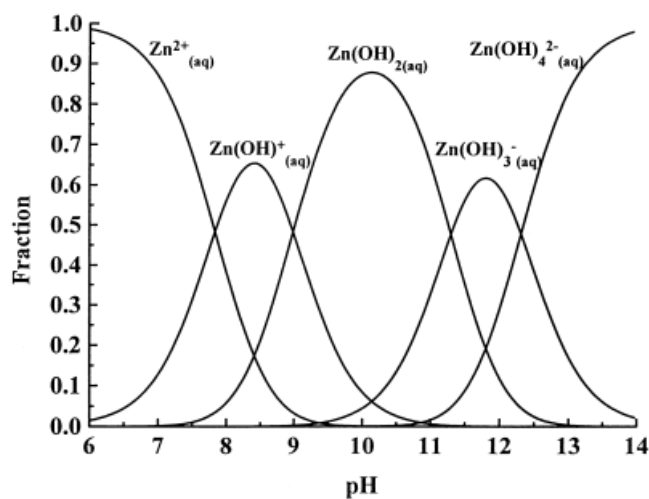
Το ηλεκτρόνιο μπορεί να αντιδράσει με το μοριακό οξυγόνο παράγοντας ένα ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$) μέσω μιας αναγωγικής διαδικασίας [153]. Η οπή μπορεί να αφαιρέσει ηλεκτρόνια από το νερό με τα ιόντα υδροξυλίου να σχηματίσουν πλήθος των ριζών υδροξυλίου ($\cdot OH$) μέσω οξειδωτικής διεργασίας. Επίσης, το υπεροξειδίο ($\cdot OH$) που παράγεται από τον κύκλο αντιδράσεων αποτελεί ένα ισχυρό και μη εκλεκτικό οξειδωτικό.

Όπως αναφέρεται στην βιβλιογραφική ανασκόπηση των μηχανισμών από τους Djurišić, A.B., et al. [154], αν και όλοι οι μηχανισμοί των μεταλλικών οξειδίων, συμπεριλαμβανόμενου του ZnO, δεν έχουν μελετηθεί ακόμα, η απεικόνιση των κυριότερων μηχανισμών που δικαιολογούν την αντιβακτηριακή δράση των νανο-υλικών σε μικροοργανισμούς φαίνονται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα3.7.2.2: Πιθανοί μηχανισμοί διάτρησης της κυτταρικής μεμβράνης από τις σχηματισμένες νανοδομές των μεταλλικών οξειδίων[154].

Επίσης, για το ZnO άλλος ένας κύριος μηχανισμός είναι τα θετικά ιόντα του ψευδαργύρου. Η τοξικότητα του ZnO σχετίζεται με την συγκέντρωση των ελεύθερων ιόντων Zn^{2+} ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της διαμόρφωσης του ZnO και του είδους του μέσου που είναι εκτεθειμένος. Οι Degen, A., et al.[144] διατύπωσαν ότι σε pH7.6 μέτριας αλκαλικότητας το $Zn^{2+}_{(aq)}$ είναι το κυρίαρχο είδος στο διάλυμα σε σχέση με την συνεισφορά από $Zn(OH)^+_{(aq)}$. Το ZnO είναι σταθερό μόνο σε πολύ στενό εύρος τιμών pH και απελευθερώνει Zn^{2+} σε υδατικό διάλυμα[155].



Σχήμα3.7.2.3 Σχηματισμός συμπλόκων μορίων του ZnO και θετικά φορτισμένων ιόντων ανάλογα με το εύρος τιμών του pH του περιβάλλοντος μέσου [155].

Φυσικά, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες, όπως οι πειραματικές συνθήκες, το μέσο που αναπτύσσονται οι μικροοργανισμοί, οι ιδιότητες των υλικών ανάλογα με τον τρόπο κατασκευής τους. Συγκεκριμένα, οι ιδιότητες της επιφάνειας των νανοϋλικών είναι εξαιρετικά σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την τοξικότητα και την αλληλεπίδρασή τους με ζωντανούς οργανισμούς [154]. Η επιφανειακή επικάλυψη (surface coatings) του υλικού, η οποία μπορεί να διαφέρει ανάλογα από τις συνθήκες του περιβάλλοντος που χρησιμοποιείται, μπορεί να προάγει τη μικροβιακή τοξικότητα. Η κατανόηση των μετασχηματισμών τοπογραφιών και του τρόπου με τον οποίο μπορεί να σχεδιαστεί η επιφάνεια των νανοϋλικών για τον έλεγχο της τοξικότητας αποτελεί βασικό κομμάτι μελέτης. Για την ερμηνεία της επίδρασης υλικών στο περιβάλλον, είναι απαραίτητη η περαιτέρω κατανόηση της σχέσης μεταξύ των ιδιοτήτων των υλικών μελέτης και των αποκρίσεων που παράγουν σε μοριακό και κυτταρικό επίπεδο.

Στην μελέτη των Li, M., et al. [156] αναφέρεται ότι όσον αφορά το μέσο επεξεργασίας που το ZnO εκτίθεται, όπως τα μόρια νερού που περιέχονται σε ένα διάλυμα νανοσωματιδίων ZnO, οδηγούν στην εμφάνιση τοξικότητας των κυττάρων *E. Coli*. Στην εργασία τους για την επίδραση του ZnO παρουσία πέντε διαφορετικών μέσων καλλιέργειας και συντήρησης των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων του καθαρού νερού, του χλωριούχου νατρίου 0,85%, του φυσιολογικού ορού φωσφορικά (PBS), του θρεπτικού (MD) και του Luria-Bertani (LB), αποκάλυψαν ότι η τοξικότητα μειώνεται με την εξής σειρά: εξαιρετικά καθαρό νερό > χλωριούχο νάτριο > MD > LB > PBS. Η δημιουργία ιζημάτων και συμπλεγμάτων ψευδαργύρου μπορεί να μειώσουν δραστικά τη συγκέντρωση των ιόντων Zn^{2+} , μειώνοντας έτσι την παρατηρούμενη τοξικότητα σε αυτά τα μέσα.

Επίσης, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες βελτιώνονται για το ZnO καθώς το μέγεθος μειώνεται σε διαστάσεις νανομέτρων, καθώς το ZnO σε νανομετρικές διαστάσεις μπορεί να αλληλεπιδράσει τόσο με το εξωτερικό όσο και με το εσωτερικό των κυττάρων. Οι Yamamoto, O. et al. [157] μετρώντας τις μεταβολές στην ηλεκτρική αγωγιμότητα σε βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli* βρέθηκε ότι η αντιβακτηριακή δράση αυξήθηκε με τη μείωση του μεγέθους των σωματιδίων της κεραμικής σκόνης ZnO με ειδικό εμβαδόν επιφάνειας σε m^2/g που είχε ενσωματωθεί μέσα σε διάταξη με ειδικά πηγάδια που περιείχαν το εναιώρημα του βακτηρίων. Από τις πρώτες εκτιμήσεις για τις κεραμικές σκόνες του ZnO στην ανάπτυξη των βακτηρίων *E.coli*, οι Sawai, J. et al.[158] αναφέρουν ότι από τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης των μορίων υπεροξειδίου του υδρογόνου, H_2O_2 , από την επιφάνεια του ZnO, καθιστά το H_2O_2 έναν από τους κύριους αντιβακτηριακούς μηχανισμούς, εφόσον διεισδύοντας στην κυτταρική μεμβράνη του *E. coli* το τραυματίζει.

Τέλος, η παραπάνω ανασκόπηση των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων του ZnO δίνει μερικές από τις κατευθύνσεις που έχει η φύση του υλικού ως προς την αντιβακτηριακή του δράση σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Η απελευθέρωση αντιμικροβιακών ιόντων και η παραγωγή αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) είναι οι κρίσιμοι μηχανισμοί της αντιβακτηριακής δράσης.

Κεφάλαιο 4^ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ και ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

4.1 Συμπεράσματα

Σε αυτήν την εργασία μελετήθηκαν υποστρώματα του οξειδίου του ψευδάργυρου (ZnO) ως προς τις αντιβακτηριακές ιδιότητες τους και διερευνήθηκε η ενσωμάτωση τους σε μικρο-κανάλια μικρορευστονικών διατάξεων με στόχο τη διάτρηση των κυττάρων ενδιαφέροντος και έκλυση του γενετικού τους υλικού για περαιτέρω χρήση και ανάλυση.

Αρχικά ως πρώτο βήμα για την μελέτη επίπεδων και νανοδομημένων υποστρωμάτων ZnO που μελετώνται στην εργασία, η πειραματική μελέτη της επιβίωσης βακτηρίων *E.coli* διενεργήθηκε σε επιφάνειες επίπεδου Zn, νανοδομημένου ZnO και του πολυμερικού υλικού PMMA σαν επιφάνεια αναφοράς, με την επίστρωση τρυβλίων και την μέτρηση των ζωντανών αποικιών. Καταλήξαμε, μέσω διαφορετικών συνθηκών χρόνου παραμονής, αρχικής συγκέντρωσης εμβολιασμού και παρουσία φωτός, στον υπολογισμό του ρυθμού θανάτωσης στις επιφάνειες νανοδομημένου ZnO.

Βρίσκοντας τις συνθήκες που υπολογίζει ο ρυθμός θανάτωσης στις ανοιχτές επιφάνειες, ακολούθησε ο σχεδιασμός μικροκαναλιού. Σε στατικές συνθήκες επώασης μέσα στο κανάλι και με συγκέντρωση εμβολιασμού της τάξης 10^7 , ως μέσος όρος από ανεξάρτητα πειράματα δοκιμών, ο μέσος ρυθμός θανάτωσης παρουσιάζεται $2,38 \cdot 10^7$, γεγονός που εξασφαλίζει την απόδοση λύσης στα μικροκανάλια σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ανοιχτών επιφανειών. Οι ζωντανές αποικίες που μετρήθηκαν στα νανοδομημένα ZnO μικροκανάλια παρουσίασαν δύο και τρεις τάξεις μεγέθους μικρότερη συγκέντρωση υπό συνθήκη σκότους και φωτός, αντίστοιχα. Στο σημείο αυτό παρατηρήθηκε ότι υπό την παρουσία φωτός τα κύτταρα παρουσιάζουν μεγαλύτερη θνησιμότητα στα υποστρώματα του ZnO, καθώς και μια μικρή μείωση εμφανίζεται στο υπόστρωμα ελέγχου PMMA. Στον Πίνακα 4.1.1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα του ρυθμού θανάτωσης στις συνθήκες συγκέντρωσης 10^6 και 10^7 (CFU/ml), σε χρόνο παραμονής 1 και 15min και σε συνθήκες υπό φως ή σκότος. Οι ρυθμοί θανάτωσης προκύπτουν από τον μέσο όρο των τιμών ανεξάρτητων πειραμάτων (N) για κάθε είδος επιφάνειας και συνθηκών.

Πίνακας 4.1.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα των μέσων ρυθμών θανάτωσης (CFU/cm²h)

| | Εμβαδόν Επιφανείας (cm ²) | Συνθήκες αρχικής συγκέντρωσης βακτηρίων <i>E.coli</i> (CFU/ml), | Χρόνος παραμονής | Συνθήκες φωτός | Ρυθμός θανάτωσης (CFU/cm ² h) |
|------------------|---------------------------------------|---|------------------|----------------|--|
| PMMA RIE | (1,5x1,5) | ~10 ⁶ | 1 h | ✓ | 1,5 10 ⁵ (N=2) |
| PMMA ICP | (1,5x1,5) | ~10 ⁶ | 1 h | ✓ | 6 10 ⁴ (N=3) |
| Επίπεδο Zn | (1x1) 1 ^η παρτίδα | ~10 ⁶ | 1 h | ✓ | 3,4 10 ⁵ (N=3) |
| | (1x1) 1 ^η παρτίδα | ~10 ⁶ | 15 min | ✓ | Καμία αποικία |
| | (1,5x1,5) 2 ^η παρτίδα | ~10 ⁷ | 15 min | ✓ | 3,13 10 ⁷ (N=1) |
| Νανοδομημένο ZnO | (1x1) 1 ^η παρτίδα | ~10 ⁶ | 1 h | ✓ | 5,7 10 ⁵ (N=3) |
| | (1x1) 1 ^η παρτίδα | ~10 ⁶ | 15 min | ✓ | Καμία αποικία |
| | (1,5x1,5) 2 ^η παρτίδα | ~10 ⁷ | 15 min | ✓ | 3,1 10 ⁷ (N=1) |
| | (2,8) | ~10 ⁷ | 15 min | ✓ | 4,8 10 ⁷ (N=1) |
| | | ~10 ⁷ | 15 min | - | 3,58 10 ⁷ (N=1) |

Με αναφορά στην Ενότητα 2.4.5, παρασκευής της τοπογραφίας του ZnO με την μέθοδο του θερμού ύδατος, όπου κατασκευάστηκε και χαρακτηρίστηκε στο Ινστιτούτο ΕΤΗ, γίνεται αντιληπτό πως η τεχνική αυτή είναι αρκετά απλή. Περιλαμβάνει μόνο ένα στάδιο επεξεργασίας, της επώασης των απλών επίπεδων υποστρωμάτων Zn σε θερμό ύδωρ μέχρι τον σχηματισμό των νανοακίδων στο ZnO. Ακόμα, παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι άλλων χημικών ή φυσικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για νανομετρικές διαστάσεις σε μικρορευστονικά συστήματα και είναι χαμηλού κόστους. Επίσης, κατά την εξέταση των μικροκαναλιών, η τοποθέτηση τους σε chip-holder και

η κάλυψη τους με το PDMS ως καπάκι δεν εμφάνισε προβλήματα διαρροής καταφέροντας να χειριζόμαστε τα δείγματα ικανοποιητικά.

Στη συνέχεια, εφόσον χαρακτηρίστηκε το μικροκανάλι ως προς την ιδιότητα να λύει τα κύτταρα, χρησιμοποιήθηκαν πειραματικές ποσοτικές και ποιοτικές δοκιμασίες για την αξιολόγηση του DNA που εκλύεται μέσω του μικροκαναλιού νανοδομημένου ZnO. Στο 2^ο κεφάλαιο αναφέρονται τα πειραματικά πρωτόκολλα που έδωσαν αποτελέσματα στην αποσαφήνιση των μηχανισμών λύσης των μεμβρανών αλλά και αλληλεπίδρασης με το ενδοκυτταρικό γενετικό υλικό DNA που μας ενδιαφέρει να ανιχνεύσουμε, και που αποτελεί έναν από τους στόχους της εργασίας αυτής.

Από τα αποτελέσματα των πειραμάτων του 3^{ου} κεφαλαίου προκύπτουν όλα τα σημαντικά πορίσματα που αναφέρονται παρακάτω:

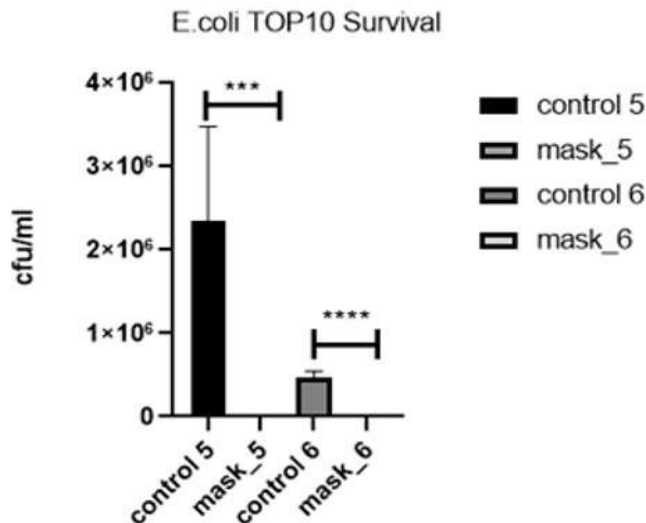
- Μικροκανάλια με νανοδομημένο ZnO, ακόμη και σε μικρό χρόνο παραμονής (15min), σε στατικές συνθήκες επώασης και υπό την παρουσία φωτός, παρουσιάζουν ρυθμό θανάτωσης βακτηρίων της τάξης $\sim 10^7$ CFU/cm²h, δηλ. ίδιας με αυτό που εμφανίζεται σε ανοιχτές επιφάνειες ZnO. Συνεπώς, η αντιβακτηριακή απόδοση του ZnO είναι υψηλή, ακόμη και με επεξεργασία πολύ μικρών όγκων (τάξης μl) υγρών επιμολυσμένων με βακτήρια.
- Παρατηρήθηκε ενίσχυση του DNA, που εκλύθηκε σε μικροκανάλια από ZnO, από βακτήρια *E. Coli* (συγκεκριμένα ενισχύθηκε το γονίδιο *ybbW*). Ωστόσο, σε αντίθεση με το αναμενόμενο, σε μικροκανάλια επίπεδου PMMA το ενισχυμένο DNA ήταν 2-3 φορές μεγαλύτερο από ό,τι σε μικροκανάλια νανοδομημένου ZnO. Επιβεβαιώθηκε η λύση των βακτηρίων υπό φως που πραγματοποιείται εξίσου στο PMMA υπόστρωμα σύμφωνα με τα αποτελέσματα ενίσχυσης DNA, των μετρήσεων DNA με φασματοφωτομετρία και με χρήση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), που εξηγείται με βάση την ποσοστιαία συγκέντρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου, %ROS. Διαπιστώθηκε, υπό την επίδραση του φωτός και η ενεργοποίηση του μηχανισμού αποικοδόμησης του DNA που οφείλεται στη δημιουργία δραστικών ριζών οξυγόνου (ROS) στο νανοδομημένο ZnO.
- Διερευνήθηκε η λύση βακτηρίων σε μικρές ροές που προσεγγίζουν το χρόνο παραμονής σε στατικά μικροκανάλια. Στο μικρότερο χρόνο παραμονής 5 min υπό ροή εμφανίζεται υψηλή αντιβακτηριακή δράση της τάξης των 10^6 CFU/cm²h.
- Στη μεγάλη επιφάνεια (2 cm² ή μεγαλύτερη) του ZnO που χρησιμοποιήσαμε, η χημική συμπεριφορά του υλικού ZnO ως προς την λύση των κυττάρων υπερσχύει έναντι της μηχανικής λύσης που δημιουργεί η νανοδομημένη τοπογραφία στο μικροκανάλι ZnO, και αποτελεί τον βασικό μηχανισμό λύσης των κυττάρων.

4.2 Μελλοντικές προτάσεις

- Εκμεταλλευόμενοι τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του οξειδίου του ψευδαργύρου σε ένα απλό μικροκανάλι μπορούμε να επεκτείνουμε την αποτελεσματικότητα των μηχανισμών λύσης που μελετήσαμε σε διαφορετικά στελέχη βακτηρίων όπως Gram-θετικά ή ζυμομύκητες.
- Η λύση των βακτηρίων και η ανίχνευση του DNA μπορεί να μελετηθεί με βιολογικές τεχνικές πραγματικού χρόνου (real-time PCR) για να μελετηθεί με ακρίβεια ο ρυθμός που το DNA που παράγεται σε μικρούς χρόνους ανάλυσης των δειγμάτων.
- Θα μπορούσε να δοκιμαστεί η ενσωμάτωση της παρούσας τεχνικής για λύση κυττάρων με την τεχνική ενίσχυσης (π.χ. ισοθερμοκρασιακή ενίσχυση) και ανίχνευσης DNA σε ένα ολοκληρωμένο τσιπ.
- Το εμβαδόν επιφάνειας του νανοδομημένου ZnO μικρο-καναλιού που χρησιμοποιήθηκε (2.8 cm^2) οδηγεί στην λύση των βακτηριακών κυττάρων αλλά και σε σημαντική καταστροφή του DNA που εκλύεται από τα κύτταρα εξαιτίας της χημικής συνεισφοράς του υλικού. Η κατασκευή ενός μικρο-καναλιού με μικρότερες διαστάσεις επιφανείας του νανοδομημένου ZnO μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερη ποσότητα DNA χωρίς να υφίσταται απενεργοποίηση από την χημική συμπεριφορά του υλικού, όπως διαπιστώσαμε στο μικροκανάλι του ZnO.
- Θα μπορούσε να κατασκευαστεί μικροκανάλι ZnO με δομές ψαροκόκκαλου (herring-bone), λειτουργώντας ως αναμικτήρας στις συνθήκες ροής των βακτηρίων μέσα στο μικροκανάλι, με σκοπό την ενίσχυση της λύσης βακτηρίων λόγω αποδοτικότερης αλληλεπίδρασης τους με τις νανοδομές και έκλυση μεγαλύτερης συγκέντρωσης γενετικού υλικού.

Παράρτημα

Κατά την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας στο εργαστήριο Ανοσοχημείας του ΙΠΠΕΤΕΑ, σε συνεργασία με τον Δρ. Γιαννακόπουλο Κωνσταντίνο, Ερευνητή του Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας, πραγματοποιήθηκε η μελέτη των αντικών και αντιβακτηριακών ιδιοτήτων масκών προσώπου. Για την αξιολόγηση της βακτηριοκτόνου δράσης, διεξήχθησαν πειράματα μέτρησης ζωντανών αποικιών σε τρυβλία των επεξεργασμένων масκών με αντιβακτηριακές ιδιότητες. Πραγματοποιήθηκε η επεξεργασία κοινών φίλτρων αέρα μάσκας προσώπου (χειρουργικές μάσκες) με την τοποθέτηση νανοσωματιδίων με βάση τον χαλκό, συγκεκριμένα του οξειδίου του χαλκού (CuO, τενορίτης) και τον χαλκό (Cu). Ο σχηματισμός των νανοσωματιδίων έγινε με την τεχνική Spark Discharge Aerosol Generation (SDAG) που προσφέρει χαμηλό κόστος κατασκευής νανοσωματιδίων χωρίς τη χρήση χημικών ή κενού, παράγοντας σωματίδια αερολύματος μεγέθους λίγων νανομέτρων με υψηλή καθαρότητα. Η συντριπτική πλειοψηφία των παραγόμενων σωματιδίων είναι CuO (πρωτογενή σωματίδια με σχηματισμό συσσωματωμάτων) ενώ υπάρχει και η παραγωγή πολύ μικρότερου αριθμού μεγαλύτερων σωματιδίων Cu (σφαιρικά). Τα σωματίδια εναποτίθενται σε διάφορα υποστρώματα, κυρίως ινώδη φίλτρα. Αυτή η μελέτη περιλαμβάνει μετρήσεις της αντιβακτηριακής δράσης κατά του *Escherichia coli* (*E.coli*).



Σχήμα Παραρτήματος 1: Επιβίωση κυττάρων *E.coli* σε μάσκες mask_5 και mask_6 με νανοσωματίδια χαλκού συγκριτικά με τις απλές μάσκες ελέγχου control 5 και control 6.

Πέραν του τεχνικού χαρακτηρισμού των νανοσωματιδίων αυτών, που αναφέρονται στην εργασία που πρόκειται να δημοσιευτεί ‘*Copper-based nanoparticles produced by spark discharge aerosol generators: Structural and optical characterisation; application on the antiviral (against SARS- CoV-2) and antibacterial modification of face masks*’, παραπάνω στο Σχήμα του παραρτήματος φαίνεται η αντιβακτηριακή δράση των масκών με τα νανοσωματίδια χαλκού.

Οι ιδιότητες των επεξεργασμένων масκών 5 και 6 σε σχέση με τις απλές μάσκες ελέγχου παρουσιάζονται στον παρακάτω Πίνακα που περιέχει τις παραμέτρους εναπόθεσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα αέρα. Να σημειωθεί ότι μία χειρουργική μάσκα αποτελείται από τρία ινώδη φίλτρα.

Το δείγμα Mask_5 εμφάνισε 100% μείωση στη βιωσιμότητα των κυττάρων (**p< 0,001) σε σύγκριση με το δείγμα που δεν έχει επεξεργαστεί (Control_5) και το Mask_6 έδειξε μείωση 99% με τιμή p (****p< 0,0001), σε σύγκριση στο δείγμα που δεν έχει επεξεργαστεί (Control_6). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι ακόμη και με λιγότερο υλικό εναπόθεσης στις μάσκες θα μπορούσαμε να έχουμε επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα και αυξημένη βακτηριοκτόνο δράση.

Πίνακας Παραρτήματος 1: Παράμετροι της τεχνικής αερολύματος με SDG των χειρουργικών масκών με σπινθήρα Cu/CuO. Οι εναποθέσεις πραγματοποιήθηκαν στις πλήρεις 3 στρώσεις των масκών (mask_5) ή μόνο στο μεσαίο στρώμα(mask_6). Η τιμή σωματιδίων/cm² προϋποθέτει 100% απόδοση φιλτραρίσματος

| Sample Name | Mask Layers | Deposition time (h) | V _{dis} (kV) | f (Hz) | F _{in} (L/min) | Particles /cm ² | Cell Viability (%) |
|-------------|-------------------|---------------------|-----------------------|---------|-------------------------|----------------------------|--------------------|
| Control_5 | 3 layers | - | - | - | - | - | 100 |
| Mask_5 | 3 layers | 21 | 2.9 | 12 8 | 5 | 2.57x 10 ⁸ | 0 |
| Control_6 | Middle layer only | - | - | - | - | - | 100 |
| Mask_6 | Middle layer only | 9.5 | 2.9 | 12 8 | 5 | 1.16x 10 ⁸ | 1 |

Η αντιβακτηριακή δράση παρατηρήθηκε αυξημένη στα φίλτρα αέρα με ίνες που περιέχουν Cu σε σύγκριση με τις μάσκες ελέγχου (χωρίς επεξεργασία).

5. Βιβλιογραφία

- [1] Kilby J. S., "Miniaturized Electronic Circuits" U. S. Patent 3138743 (Filed February 6, 1959. Issued June 23, 1964).
- [2] Manz, A., Graber, N. and Widmer, H., 1990. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1(1-6), pp.244-248.
- [3] Minas, G. and Catarino, S., 2013. Lab-on-a-Chip Devices for Chemical Analysis. *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, pp.1-22.
- [4] Keçili, R., Büyüktiryaki, S. and Hussain, C., 2020. Micro total analysis systems with nanomaterials. *Handbook of Nanomaterials in Analytical Chemistry*, pp.185-198.
- [5] Terry, S., Jerman, J. and Angell, J., 1979. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *IEEE Transactions on Electron Devices*, 26(12), pp.1880-1886.
- [6] Harrison, D., Fluri, K., Seiler, K., Fan, Z., Effenhauser, C. and Manz, A., 1993. Micromachining a Miniaturized Capillary Electrophoresis-Based Chemical Analysis System on a Chip. *Science*, 261(5123), pp.895-897.
- [7] Jaywant, S. and Arif, K., 2019. A Comprehensive Review of Microfluidic Water Quality Monitoring Sensors. *Sensors*, 19(21), p.4781.
- [8] Jin, S., Yin, B. and Ye, B., 2009. Multiplexed Bead-Based Mesofluidic System for Detection of Food-Borne Pathogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), pp.6647-6654.
- [9] Culbertson, C., Mickleburgh, T., Stewart-James, S., Sellens, K. and Pressnall, M., 2013. Micro Total Analysis Systems: Fundamental Advances and Biological Applications. *Analytical Chemistry*, 86(1), pp.95-118.
- [10] Roy, E., Pallandre, A., Zribi, B., Horny, M., Delapierre, F., Cattoni, A., Gamby, J. and Haghiri-Gosnet, A., 2016. Overview of Materials for Microfluidic Applications. *Advances in Microfluidics - New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences*,.

- [11] Sebastian, V. and Arruebo, M., 2019. Microfluidic production of inorganic nanomaterials for biomedical applications. *Microfluidics for Pharmaceutical Applications*, pp.179-216.
- [12] Beebe, D., Moore, J., Bauer, J., Yu, Q., Liu, R., Devadoss, C. and Jo, B., 2000. Functional hydrogel structures for autonomous flow control inside microfluidic channels. *Nature*, 404(6778), pp.588-590.
- [13] Yetisen, A., Akram, M. and Lowe, C., 2013. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. *Lab on a Chip*, 13(12), p.2210.
- [14] Tai, W.-C., Chang, Y.-C., Chou, D., & Fu, L.-M. (2021). *Lab-on-Paper Devices for Diagnosis of Human Diseases Using Urine Samples—A Review*. *Biosensors*, 11(8), 260. doi:10.3390/bios11080260
- [15] Duffy, D., McDonald, J., Schueller, O. and Whitesides, G., 1998. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70(23), pp.4974-4984.
- [16] Torres-Alvarez, D. and Aguirre-Soto, A., 2020. Polydimethylsiloxane chemistry for the fabrication of microfluidics—Perspective on its uniqueness, limitations and alternatives. *Materials Today: Proceedings*,.
- [17] Li, P., Dou, X., & Schönherr, H. (2019). *Micro- and nanopatterning with polymeric materials for advanced biointerface-controlled systems*. *Polymer International*. doi:10.1002/pi.5770
- [18] Anselme, K., Davidson, P., Popa, A. M., Giazon, M., Liley, M., & Ploux, L. (2010). *The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale*. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 3824–3846. doi:10.1016/j.actbio.2010.04.001
- [19] Lakshminarayanan, S. (2018). *Micro/Nano Patterning on Polymers Using Soft Lithography Technique*. *Micro/Nanolithography - A Heuristic Aspect on the Enduring Technology*. doi:10.5772/intechopen.72885
- [20] Xia, Y., McClelland, J. J., Gupta, R., Qin, D., Zhao, X.-M., Sohn, L. L., ... Whitesides, G. M. (1997). *Replica molding using polymeric materials: A practical step toward nanomanufacturing*. *Advanced Materials*, 9(2), 147–149. doi:10.1002/adma.19970090211
- [21] Qin, D., Xia, Y., & Whitesides, G. M. (2010). *Soft lithography for micro- and nanoscale patterning*. *Nature Protocols*, 5(3), 491–502. doi:10.1038/nprot.2009.234

- [22] Kim, E., Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1996). *Micromolding in Capillaries: Applications in Materials Science*. *Journal of the American Chemical Society*, 118(24), 5722–5731. doi:10.1021/ja960151v
- [23] Kim, E., Xia, Y., & Whitesides, G. M. (1996). *Micromolding in Capillaries: Applications in Materials Science*. *Journal of the American Chemical Society*, 118(24), 5722–5731. doi:10.1021/ja960151v
- [24] Gates, B. D. (2005). *Nanofabrication with molds & stamps*. *Materials Today*, 8(2), 44–49. doi:10.1016/s1369-7021(05)00701-7
- [25] Yun, D., Kim, J., Kim, M., Kim, D.-Y., Kwon, J., & Hwang, J. (2018). *Impact Print-Type Hot Embossing Process Technology*. *Advanced Engineering Materials*. doi:10.1002/adem.201800386
- [26] D. J. Lipomi, R. V. Martinez, L. Cademartiri, and G. M. Whitesides. (2012). “*Soft Lithographic Approaches to Nanofabrication*.” In *Polymer Science: A Comprehensive Reference*, edited by K. Matyjaszewski and M. Möller, 7: Pp. 211-231. Amsterdam: Elsevier BV
- [27] M. A. Wood, C. D. W. Wilkinson and A. S. G. Curtis, "The effects of colloidal nanotopography on initial fibroblast adhesion and morphology," in *IEEE Transactions on NanoBioscience*, vol. 5, no. 1, pp. 20-31, March 2006, doi: 10.1109/TNB.2005.864015.
- [28] Wood, M. A. (2006). *Colloidal lithography and current fabrication techniques producing in-plane nanotopography for biological applications*. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(12), 1–17. doi:10.1098/rsif.2006.0149
- [29] Kim, J. K., Yang, S. Y., Lee, Y., & Kim, Y. (2010). *Functional nanomaterials based on block copolymer self-assembly*. *Progress in Polymer Science*, 35(11), 1325–1349. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.
- [30] Roy, S. (2007). Fabrication of micro- and nano-structured materials using mask-less processes. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 40(22), R413–R426.
- [31] Alrifaiy, A., Lindahl, O. A., & Ramser, K. (2012). *Polymer-Based Microfluidic Devices for Pharmacy, Biology and Tissue Engineering*. *Polymers*, 4(3), 1349–1398. doi:10.3390/polym4031349
- [32] Naser, H., Alghoul, M. A., Hossain, M. K., Asim, N., Abdullah, M. F., Ali, M. S., ... Amin, N. (2019). The role of laser ablation technique parameters in synthesis of nanoparticles from different target types. *Journal of Nanoparticle Research*, 21(11).
- [33] Guo, P., Hall, E. W., Schirhagl, R., Mukaibo, H., Martin, C. R., & Zare, R. N. (2012). *Microfluidic capture and release of bacteria in a conical nanopore array*. *Lab Chip*, 12(3), 558–561. doi:10.1039/c2lc21092d

- [34] Ishikawa, T., Shioiri, T., Numayama-Tsuruta, K., Ueno, H., Imai, Y., & Yamaguchi, T. (2014). *Separation of motile bacteria using drift velocity in a microchannel*. *Lab Chip*, *14*(5), 1023–1032. doi:10.1039/c3lc51302e
- [35] Etayash, H., Khan, M. F., Kaur, K., & Thundat, T. (2016). *Microfluidic cantilever detects bacteria and measures their susceptibility to antibiotics in small confined volumes*. *Nature Communications*, *7*, 12947. doi:10.1038/ncomms12947
- [36] Alexandre, L., Pereiro, I., Bendali, A., Tabnaoui, S., Srbova, J., Bilkova, Z., ... Descroix, S. (2018). *A microfluidic fluidized bed to capture, amplify and detect bacteria from raw samples*. *Microfluidics in Cell Biology Part B: Microfluidics in Single Cells*, 59–75. doi:10.1016/bs.mcb.2018.07.001
- [37] Huang, G., Huang, Q., Xie, L., Xiang, G., Wang, L., Xu, H., ... Zhang, L. (2017). *A rapid, low-cost, and microfluidic chip-based system for parallel identification of multiple pathogens related to clinical pneumonia*. *Scientific Reports*, *7*(1). doi:10.1038/s41598-017-06739-2
- [38] Kopp, M. U. (1998). *Chemical Amplification: Continuous-Flow PCR on a Chip*. *Science*, *280*(5366), 1046–1048. doi:10.1126/science.280.5366.104
- [39] Park, S., Zhang, Y., Lin, S., Wang, T. H., & Yang, S. (2011). *Advances in microfluidic PCR for point-of-care infectious disease diagnostics*. *Biotechnology advances*, *29*(6), 830–839. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.06.017
- [40] Zhang, H., Xu, Y., Fohlerova, Z., Chang, H., Iliescu, C., & Neuzil, P. (2019). *LAMP-on-a-Chip: Revising Microfluidic Platforms for Loop-Mediated DNA Amplification*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. doi:10.1016/j.trac.2019.01.015
- [41] Moschou, D., Vourdas, N., Kokkoris, G., Papadakis, G., Parthenios, J., Chatzandroulis, S., & Tserepi, A. (2014). *All-plastic, low-power, disposable, continuous-flow PCR chip with integrated microheaters for rapid DNA amplification*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *199*, 470–478. doi:10.1016/j.snb.2014.04.007
- [42] Tsougeni, K., Kaprou, G., Loukas, C. M., Papadakis, G., Hamiot, A., Eck, M., ... Gogolides, E. (2020). *Lab-on-Chip platform and protocol for rapid foodborne pathogen detection comprising on-chip cell capture, lysis, DNA amplification and surface-acoustic-wave detection*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, *128345*. doi:10.1016/j.snb.2020.128345
- [43] Ma, S., Loufakis, D. N., Cao, Z., Chang, Y., Achenie, L. E. K., & Lu, C. (2014). *Diffusion-based microfluidic PCR for “one-pot” analysis of cells*. *Lab Chip*, *14*(16), 2905–2909. doi:10.1039/c4lc00498a
- [44] Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. (2017). *A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods*. *Micromachines*, *8*(3), 83. doi:10.3390/mi8030083

- [45] Expert market research.com. 2022. *Global Cell Lysis & Disruption Market Report and Forecast 2022-2027*. [online] Available at: <<https://www.expertmarketresearch.com/reports/cell-lysis-and-disruption-market>>
- [46] Schilling, E. A., Kamholz, A. E., & Yager, P. (2002). *Cell Lysis and Protein Extraction in a Microfluidic Device with Detection by a Fluorogenic Enzyme Assay*. *Analytical Chemistry*, 74(8), 1798–1804. doi:10.1021/ac015640e
- [47] Kim, J., Johnson, M., Hill, P., & Gale, B. K. (2009). *Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification*. *Integrative Biology*, 1(10), 574. doi:10.1039/b905844c
- [48] Packard, M. M., Wheeler, E. K., Alcocilja, E. C., & Shusteff, M. (2013). Performance Evaluation of Fast Microfluidic Thermal Lysis of Bacteria for Diagnostic Sample Preparation. *Diagnostics (Basel, Switzerland)*, 3(1), 105–116. doi.org/10.3390/diagnostics3010105
- [49] Ameri, S. K., Singh, P. K., Dokmeci, M. R., Khademhosseini, A., Xu, Q., & Sonkusale, S. R. (2014). *All electronic approach for high-throughput cell trapping and lysis with electrical impedance monitoring*. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 462–467. doi:10.1016/j.bios.2013.11.031
- [50] Hellman, A. N., Rau, K. R., Yoon, H. H., & Venugopalan, V. (2008). *Biophysical Response to Pulsed Laser Microbeam-Induced Cell Lysis and Molecular Delivery*. *Journal of Biophotonics*, 1(1), 24–35. doi:10.1002/jbio.200710010
- [51] Marentis, T. C., Kusler, B., Yaralioglu, G. G., Liu, S., Hæggström, E. O., & Khuri-Yakub, B. T. (2005). *Microfluidic sonicator for real-time disruption of eukaryotic cells and bacterial spores for DNA analysis*. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 31(9), 1265–1277. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2005.0
- [52] Wang, S., Lv, X., Su, Y., Fan, Z., Fang, W., Duan, J., ... Liu, H. (2019). *Cell Lysis: Piezoelectric Microchip for Cell Lysis through Cell-Microparticle Collision within a Microdroplet Driven by Surface Acoustic Wave Oscillation (Small 9/2019)*. *Small*, 15(9), 1970050. doi:10.1002/smll.201970050
- [53] Whitehead, K. A., Colligon, J., & Verran, J. (2005). *Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 41(2-3), 129–138. doi:10.1016/j.colsurfb.2004.11.0
- [54] Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). *Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation*. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1027–1034. doi:10.1177/0022034515587690
- [55] Anselme, K., Davidson, P., Popa, A. M., Giazzon, M., Liley, M., & Ploux, L. (2010). *The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometre scale*. *Acta Biomaterialia*, 6(10), 3824–3846. doi:10.1016/j.actbio.2010.04.001

- [56] Albuschies, J., & Vogel, V. (2013). *The role of filopodia in the recognition of nanotopographies*. *Scientific Reports*, 3(1). doi:10.1038/srep01658
- [57] Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). *Biofilm dispersion*. *Nature Reviews Microbiology*. doi:10.1038/s41579-020-0385-0
- [58] Scardino AJ, Guenther J, de Nys R. Attachment point theory revisited: the fouling response to a microtextured matrix. *Biofouling*. 2008;24(1):45-53. doi: 10.1080/08927010701784391. PMID: 18066730.
- [59] Vadillo-Rodríguez, V., Guerra-García-Mora, A. I., Perera-Costa, D., González-Martín, M. L., & Fernández-Calderón, M. C. (2018). *Bacterial response to spatially organized microtopographic surface patterns with nanometer scale roughness*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 169, 340–347. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.05.038
- [60] Ge, X., Ren, C., Ding, Y., Chen, G., Lu, X., Wang, K., ... Leng, Y. (2019). *Micro/nano-structured TiO₂ surface with dual-functional antibacterial effects for biomedical applications*. *Bioactive Materials*, 4, 346–357. doi:10.1016/j.bioactmat.2019.10.
- [61] Linklater, D. P., Juodkazis, S., Crawford, R., & Ivanova, E. (2018). *Mechanical inactivation of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa by titanium substrata with hierarchical surface structures*. *Materialia*, 100197. doi:10.1016/j.mtla.2018.100197
- [62] Diu, T., Faruqui, N., Sjöström, T., Lamarre, B., Jenkinson, H. F., Su, B., & Ryadnov, M. G. (2014). *Cicada-inspired cell-instructive nanopatterned arrays*. *Scientific Reports*, 4(1). doi:10.1038/srep07122
10.1038/srep07122
- [63] Pogodin, S., Hasan, J., Baulin, V. A., Webb, H. K., Truong, V. K., Phong Nguyen, T. H., Boshkovikj, V., Fluke, C. J., Watson, G. S., Watson, J. A., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2013). Biophysical model of bacterial cell interactions with nanopatterned cicada wing surfaces. *Biophysical journal*, 104(4), 835–840.
- [64] Jeon, H., Simon, C. G., & Kim, G. (2014). *A mini-review: Cell response to microscale, nanoscale, and hierarchical patterning of surface structure*. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 102(7), 1580–1594. doi:10.1002/jbm.b.33158
- [65] Ivanova, E. P., Hasan, J., Webb, H. K., Truong, V. K., Watson, G. S., Watson, J. A., ... Crawford, R. J. (2012). *Natural Bactericidal Surfaces: Mechanical Rupture of Pseudomonas aeruginosa Cells by Cicada Wings*. *Small*, 8(16), 2489–2494. doi:10.1002/sml.201200528

- [66] Varier, K. M., Gudeppu, M., Chinnasamy, A., Thangarajan, S., Balasubramanian, J., Li, Y., & Gajendran, B. (2019). Nanoparticles: Antimicrobial Applications and Its Prospects. *Advanced Nanostructured Materials for Environmental Remediation*, 25, 321–355.
- [67] Ji-Hyeon Kim, Junfei Ma, Sungjin Jo, Seunghun Lee, and Chang Su Kim *ACS Applied Bio Materials* 2020 3 (4), 2117-2124 DOI: 10.1021/acsabm.0c00003
- [68] Nasrollahzadeh, M., Issaabadi, Z., Sajjadi, M., Sajadi, S. M., & Atarod, M. (2019). *Types of Nanostructures. An Introduction to Green Nanotechnology*, 29–80. doi:10.1016/b978-0-12-813586-0.00002-x
- [69] Kumaravel, V., Nair, K. M., Mathew, S., Bartlett, J., Kennedy, J. E., Manning, H. G., ... Pillai, S. C. (2021). *Antimicrobial TiO₂ nanocomposite coatings for surfaces, dental and orthopaedic implants. Chemical Engineering Journal*, 416, 129071. doi:10.1016/j.cej.2021.129071
- [70] Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). *Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. Materials Science and Engineering: C*, 44, 278–284. doi:10.1016/j.msec.2014.08.031
- [71] Shimada, T., Yasui, T., Yonese, A., Yanagida, T., Kaji, N., Kanai, M., ... Baba, Y. (2020). *Mechanical Rupture-Based Antibacterial and Cell-Compatible ZnO/SiO₂ Nanowire Structures Formed by Bottom-Up Approaches. Micromachines*, 11(6), 610. doi:10.3390/mi11060610
- [72] Kim, J., Hong, J. W., Kim, D. P., Shin, J. H., & Park, I. (2012). *Nanowire-integrated microfluidic devices for facile and reagent-free mechanical cell lysis. Lab on a Chip*, 12(16), 2914. doi:10.1039/c2lc40154a
- [73] Wang, X., Bhadra, C., Yen Dang, T., Buividas, R., Wang, J., & Crawford, R. et al. (2016). A bactericidal microfluidic device constructed using nano-textured black silicon. *RSC Advances*, 6(31), 26300-26306. doi: 10.1039/c6ra03864f
- [74] Li, L., Tian, F., Chang, H., Zhang, J., Wang, C., Rao, W., & Hu, H. (2019). *Interactions of Bacteria With Monolithic Lateral Silicon Nanospikes Inside a Microfluidic Channel. Frontiers in Chemistry*, 7. doi:10.3389/fchem.2019.00483
- [75] Yasui, T., Yanagida, T., Shimada, T., Otsuka, K., Takeuchi, M., Nagashima, K., ... Baba, Y. (2019). *Engineering Nanowire-Mediated Cell Lysis for Microbial Cell Identification. ACS Nano*. doi:10.1021/acsnano.8b08959
- [76] Millionis, A., Tripathy, A., Donati, M., Sharma, C. S., Pan, F., Maniura-Weber, K., ... Poulidakos, D. (2020). *Water-based Scalable Methods for Self-Cleaning Antibacterial ZnO-Nanostructured Surfaces. Industrial & Engineering Chemistry Research*. doi:10.1021/acs.iecr.0c01998

- [77] Djurišić, A. B., Leung, Y. H., Ng, A. M. C., Xu, X. Y., Lee, P. K. H., Degger, N., & Wu, R. S. S. (2014). *Toxicity of Metal.Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts*. *Small*, 11(1), 26–44. doi:10.1002/sml.201303947
- [78] Webster, T. J., & Seil, I. (2012). *Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature*. *International Journal of Nanomedicine*, 2767. doi:10.2147/ijn.s24805
- [79] Beal, J., Farny, N. G., Haddock-Angelli, T., Selvarajah, V., Baldwin, G. S., ... Workman, C. T. (2020). *Robust estimation of bacterial cell count from optical density*. *Communications Biology*, 3(1). doi:10.1038/s42003-020-01127-5
- [80] Bankier, C., Cheong, Y., Mahalingam, S., Edirisinghe, M., Ren, G., Cloutman-Green, E. and Ciric, L., 2018. A comparison of methods to assess the antimicrobial activity of nanoparticle combinations on bacterial cells. *PLOS ONE*, 13(2), p.e0192093.
- [81] O. Miller JH (1972) Determination of viable cell counts: bacterial growth curves. In: JH Miller. *Experiments in Molecular Genetics*. New York: Cold Spring Harbor. pp. 31-36
- [82] s aida, H., Ytow, N. and Seki, H., 1998. Photometric Application of the Gram Stain Method To Characterize Natural Bacterial Populations in Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(2), pp.742-747.
- [83] Mukherjee, I., Ghosh, A., Bhadury, P., & De, P. (2018). *Leucine-Based Polymer Architecture-Induced Antimicrobial Properties and Bacterial Cell Morphology Switching*. *ACS Omega*, 3(1), 769–780. doi:10.1021/acsomega.7b01674
- [84] Logos Biosystems. n.d. *QUANTOM Tx Microbial Cell Counter | Bacteria | Logos Biosystems*. [online] Available at: <https://logosbio.com/automated-cell-counters/microbial/bacteria/quantom-tx>
- [85] Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (2000). *How Quantitative is Quantitative PCR with Respect to Cell Counts? Systematic and Applied Microbiology*, 23(4), 556–562. doi:10.1016/s0723-2020(00)80030-2
- [86] Álvarez, G., González, M., Isabal, S., Blanc, V., & León, R. (2013). *Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide*. *AMB Express*, 3(1), 1. doi:10.1186/2191-0855-3-1
- [87] Microchem Laboratory. n.d. *JIS Z 2801 Test for Antimicrobial Activity of Plastics - Microchem Laboratory*. [online] Available at: <https://microchemlab.com/test/jis-z-2801-test-antimicrobial-activity-plastics/> [Accessed 18 January 2022].
- [89] Wiegand C, Völpel A, Ewald A, Remesch M, Kuever J, Bauer J, et al.(2018) Critical physiological factors influencing the outcome of antimicrobial testing

according to ISO 22196 / JIS Z 2801. PLoS ONE 13(3): e0194339.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194339>

[90] Biotek.com.n.d.[online] Available at:

https://www.biotek.com/assets/tech_resources/DNA_Quant_Tech_Note.pdf

[91] Kell, D. B., Kaprelyants, A. S., Weichart, D. H., Harwood, C. R., & Barer, M. R. (1998). *Antonie van Leeuwenhoek*, 73(2), 169–187. doi:10.1023/a:1000664013047

[92] nanodrop Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). *NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of Visualized Experiments*, (-1). doi:10.3791/2565

[93] Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). *NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. Journal of Visualized Experiments*, (-1). doi:10.3791/2565

[94] Borst, P. (2005). *Ethidium DNA agarose gel electrophoresis: How it started. IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 57(11), 745–747. doi:10.1080/15216540500380855

[95] Sigmaaldrich.com. n.d. [online] Available at:
<https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/258/965/e7637pis.pdf>

[96] Vardevanyan, P. O., Antonyan, A. P., Hambardzumyan, L. A., Shahinyan, M. A., & Karapetian, A. T. (2013). *Thermodynamic analysis of DNA complexes with methylene blue, ethidium bromide and Hoechst 33258. Biopolymers and Cell*, 29(6), 515–520. doi:10.7124/bc.000843

[97] Vardevanyan, P. O., Arakelyan, V. B., Parsadanyan, M. A., Antonyan, A. P., Hovhannisyanyan, G. G., & Shahinyan, M. A. (2014). *Analysis of experimental binding curves of EtBr with single- and double-stranded DNA at small fillings. Modern Physics Letters B*, 28(22), 1450178. doi:10.1142/s0217984914501784

[98] Sigmon, J., & Larcom, L. L. (1996). *The effect of ethidium bromide on mobility of DNA fragments in agarose gel electrophoresis. Electrophoresis*, 17(10), 1524–1527. doi:10.1002/elps.1150171003

[99] Aly, M. A. S., Gauthier, M., & Yeow, J. (2014). *Lysis of gram-positive and gram-negative bacteria by antibacterial porous polymeric monolith formed in microfluidic biochips for sample preparation. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(24), 5977–5987. doi:10.1007/s00216-014-8028-9

[100] Sciences, L., Education, M., Education, P., Enzymes, P., & Basics, P. PCR Basics | Thermo Fisher Scientific - UK. Retrieved 8 January 2022.

[101] Nikdoost, A., Doostmohammadi, A., Romanick, K., Thomas, M., & Rezai, P. (2021). *Integration of microfluidic sample preparation with PCR detection to*

investigate the effects of simultaneous DNA-Inhibitor separation and DNA solution exchange. *Analytica Chimica Acta*, 1160, 338449. doi:10.1016/j.aca.2021.33844

[102] Alaeddini, R. (2012). *Forensic implications of PCR inhibition—A review. Forensic Science International: Genetics*, 6(3), 297–305. doi:10.1016/j.fsigen.2011.08.006

[103] Aly MA, Gauthier M, Yeow J. Lysis of gram-positive and gram-negative bacteria by antibacterial porous polymeric monolith formed in microfluidic biochips for sample preparation. *Anal Bioanal Chem*. 2014;406(24):5977-5987. doi:10.1007/s00216-014-8028-9

[104] Wan, W., & Yeow, J. T. W. (2011). *Integration of nanoparticle cell lysis and microchip PCR for one-step rapid detection of bacteria. Biomedical Microdevices*, 14(2), 337–346. doi:10.1007/s10544-011-9610-y

[105] Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., & Armes, N. A. (2006). DNA Detection Using Recombination Proteins. *PLoS Biology*, 4(7), e204. doi:10.1371/journal.pbio.0040204

[106] Craw, P., & Balachandran, W. (2012). Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review. *Lab on a Chip*, 12(14), 2469.

[107] Lobato, I. M., & O'Sullivan, C. K. (2018). Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances. *Trends in analytical chemistry : TRAC*, 98, 19–35.

[108] McQuillan, J. S., & Wilson, M. W. (2020). Recombinase Polymerase Amplification for Fast, Selective, DNA-based Detection of Faecal Indicator *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*.

[109] Thannickal, V. J., & Fanburg, B. L. (2000). Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 279(6), L1005–L1028. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.l1005

[110] Zorov, D. B., Juhaszova, M., & Sollott, S. J. (2014). *Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. Physiological Reviews*, 94(3), 909–950. doi:10.1152/physrev.00026.2013

[111] Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), 443–454. doi:10.1038/nrmicro3032

[112] Mailloux, R. J. (2020). *An Update on Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. Antioxidants*, 9(6), 472. doi:10.3390/antiox9060472

- [113] Lee, J., & Song, C.-H. (2021). *Effect of Reactive Oxygen Species on the Endoplasmic Reticulum and Mitochondria during Intracellular Pathogen Infection of Mammalian Cells. Antioxidants*, 10(6), 872. doi:10.3390/antiox10060872
- [114] Jambunathan, N. (2010). *Determination and Detection of Reactive Oxygen Species (ROS), Lipid Peroxidation, and Electrolyte Leakage in Plants. Plant Stress Tolerance*, 291–297. doi:10.1007/978-1-60761-702-0_18
- [115] Pavelescu LA. On reactive oxygen species measurement in living systems. *J Med Life*. 2015;8 Spec Issue(Spec Issue):38-42. PMID: 26361509; PMCID: PMC4564046.
- [116] Zhang, Y., Dai, M., & Yuan, Z. (2018). *Methods for Detection of Reactive Oxygen Species. Analytical Methods*. doi:10.1039/c8ay01339j
- [117] He, W., Liu, Y., Wamer, W. G., & Yin, J.-J. (2014). *Electron spin resonance spectroscopy for the study of nanomaterial-mediated generation of reactive oxygen species. Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 49–63. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.004
- [118] Munzel, T. (2002). *Detection of Superoxide in Vascular Tissue. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(11), 1761–1768. doi:10.1161/01.atv.0000034022.117
- [119] Kim, J.-S., Jeong, K., Murphy, J. M., Rodriguez, Y. A. R., & Lim, S.-T. S. (2019). *A Quantitative Method to Measure Low Levels of ROS in Nonphagocytic Cells by Using a Chemiluminescent Imaging System. Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 1–11. doi:10.1155/2019/1754593
- [120] Salman, S. R. (1999). *Chemical Reactions Studied by Electronic Spectroscopy. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, 246–252. doi:10.1016/b978-0-12-374413-5.00143-3
- [121] Paige Davis Volk, A., & Moreland, J. G. (2014). *ROS-Containing Endosomal Compartments. Endosome Signaling Part B*, 201–224. doi:10.1016/b978-0-12-397925-4.00013-4
- [122] Tan, H. Y., Loke, W. K., & Nguyen, N.-T. (2010). *A reliable method for bonding polydimethylsiloxane (PDMS) to polymethylmethacrylate (PMMA) and its application in micropumps. Sensors and Actuators B: Chemical*, 151(1), 133–139. doi:10.1016/j.snb.2010.09.035
- [123] Sharma, D. K., Shukla, S., Sharma, K. K., & Kumar, V. (2020). *A review on ZnO: Fundamental properties and applications. Materials Today: Proceedings*. doi:10.1016/j.matpr.2020.10.238
- [124] Djurišić, A. B., Chen, X., Leung, Y. H., & Man Ching Ng, A. (2012). *ZnO nanostructures: growth, properties and applications. Journal of Materials Chemistry*, 22(14), 6526. doi:10.1039/c2jm15548f

- [125] Tsougeni, K., Petrou, P. S., Awsiuk, K., Marzec, M. M., Ioannidis, N., Petrouleas, V., ... Gogolides, E. (2015). Direct Covalent Biomolecule Immobilization on Plasma-Nanotextured Chemically Stable Substrates. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 7(27), 14670–14681. doi:10.1021/acsami.5b01754
- [126] Mizuta, T., Ishibashi, T., Minemoto, T., Takakura, H., & Hamakawa, Y. (2006). *Chemical deposition of zinc oxide thin films on silicon substrate*. *Thin Solid Films*, 515(4), 2458–2463. doi:10.1016/j.tsf.2006.06.035
- [127] Znaidi, L. (2010). *Sol-gel-deposited ZnO thin films: A review*. *Materials Science and Engineering: B*, 174(1-3), 18–30. doi:10.1016/j.mseb.2010.07.001
- [128] Synthesis and optical properties of chemical bath deposited ZnO thin film, P.B. Taunk, R. Das, D.P. Bisen, R.K. Tamrakar, NootanRathor, *Karbala International Journal of Modern Science* 1 (2015) 159e165.
- [129] Christy, S. R., Priya, L. S., Durka, M., Dinesh, A., Babitha, N., & Arunadevi, S. (2019). *Simple Combustion Synthesis, Structural, Morphological, Optical and Catalytic Properties of ZnO Nanoparticles*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 19(6), 3564–3570. doi:10.1166/jnn.2019.16141
- [130] Lupan, O., Emelchenko, G. A., Ursaki, V. V., Chai, G., Redkin, A. N., Gruzintsev, A. N., ... Yakimov, E. E. (2010). *Synthesis and characterization of ZnO nanowires for nanosensor applications*. *Materials Research Bulletin*, 45(8), 1026–1032. doi:10.1016/j.materresbull.2010.
- [131] Lehraki, N., Aida, M. S., Abed, S., Attaf, N., Attaf, A., & Poulain, M. (2012). *ZnO thin films deposition by spray pyrolysis: Influence of precursor solution properties*. *Current Applied Physics*, 12(5), 1283–1287. doi:10.1016/j.cap.2012.03.012
- [132] Piezoelectric films for 100-MHz ultrasonic transducers, P. M. Martin, M.-S. Good, J.-W. Johnston, G.-J. Posakony, L.-J. Bond, S.-L. Crawford, *Thin Solid Films* 379 (2000) 253–258.
- [133] Hongsingthong, A., AfdiYunaz, I., Miyajima, S., & Konagai, M. (2011). *Preparation of ZnO thin films using MOCVD technique with D2O/H2O gas mixture for use as TCO in silicon-based thin film solar cells*. *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 95(1), 171–174. doi:10.1016/j.solmat.2010.04.025
- [134] Franklin, J. B., Zou, B., Petrov, P., McComb, D. W., Ryan, M. P., & McLachlan, M. A. (2011). *Optimised pulsed laser deposition of ZnO thin films on transparent conducting substrates*. *Journal of Materials Chemistry*, 21(22), 8178. doi:10.1039/c1jm10658a
- [135] Effect of Fe-doping on the structural, optical and magnetic properties of ZnO nanostructures synthesized by coprecipitation method, S. Fabbiyola, L. JohnKennedy, T. Ratnaji, J.J. Vijaya, U. Aruldoss, M. Bououdin, *Ceram. Int.* 42 (2016) 1588–1596

- [136] Jimenez-Cadena, G., Comini, E., Ferroni, M., Vomiero, A., & Sberveglieri, G. (2010). *Synthesis of different ZnO nanostructures by modified PVD process and potential use for dye-sensitized solar cells. Materials Chemistry and Physics, 124(1), 694–698.* doi:10.1016/j.matchemphys.2010.0
- [137] Saadi, N. S., Hassan, L. B., & Karabacak, T. (2017). *Metal oxide nanostructures by a simple hot water treatment. Scientific Reports, 7(1).* doi:10.1038/s41598-017-07783-8
- [138] Ergin, B., Ketenci, E., & Atay, F. (2009). *Characterization of ZnO films obtained by ultrasonic spray pyrolysis technique. International Journal of Hydrogen Energy, 34(12), 5249–5254.* doi:10.1016/j.ijhydene.2008.09.10
- [139] Structural and optical properties of ZnO fabricated by reactive e-beam and rf magnetron sputtering techniques, R. Al Asmar, G. Ferblantier, F. Mailly, A. Foucaran, *Phys. Status Solidi C 2* (2005)1331–1335.
- [140] Tan, W. K., Abdul Razak, K., Lockman, Z., Kawamura, G., Muto, H., & Matsuda, A. (2013). *Formation of highly crystallized ZnO nanostructures by hot-water treatment of etched Zn foils. Materials Letters, 91, 111–114.* doi:10.1016/j.matlet.2012.08.103
- [141] Chen, R., Zou, C., Yan, X., Alyamani, A., & Gao, W. (2011). *Growth mechanism of ZnO nanostructures in wet-oxidation process. Thin Solid Films, 519(6), 1837–1844.* doi:10.1016/j.tsf.2010.10.012
- [142] Chow, W. W. Y., Lei, K. F., Shi, G., Li, W. J., & Huang, Q. (2005). *Microfluidic channel fabrication by PDMS-interface bonding. Smart Materials and Structures, 15(1), S112–S116.* doi:10.1088/0964-1726/15/1/018
- [143] Esteban-Tejeda L, Palomares FJ, Cabal B, López-Píriz R, Fernández A, Sevillano D, Alou L, Torrecillas R, Moya JS. Effect of the Medium Composition on the Zn²⁺ Lixiviation and the Antifouling Properties of a Glass with a High ZnO Content. *Materials* (Basel). 2017 Feb 13;10(2):167. doi: 10.3390/ma10020167. PMID: 28772526; PMCID: PMC5459169.
- [144] Degen, A., & Kosec, M. (2000). *Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. Journal of the European Ceramic Society, 20(6), 667–673.* doi:10.1016/s0955-2219(99)00203-4
- [145] von Moos, N. & Slaveykova, V. I. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae—state of the art and knowledge gaps. *Nanotoxicology* 8, 605–630 (2014).
- [146] Li, Y., Zhang, W., Niu, J., & Chen, Y. (2012). *Mechanism of Photogenerated Reactive Oxygen Species and Correlation with the Antibacterial Properties of Engineered Metal-Oxide Nanoparticles. ACS Nano, 6(6), 5164–5173.* doi:10.1021/nn300934k

- [147] Guo MY, Ng AMC, Liu FZ, Djurišić AB, Chan WK (2011a) Photocatalytic activity of metal oxides—the role of holes and OH• radicals. *Appl Catal, B* 107:150–157
- [148] Guo MY, Ng AMC, Liu FZ, Djurišić AB, Chan WK, Su HM, Wong KS (2011b) Effect of native defects on photocatalytic properties of ZnO. *J Phys Chem C* 115:11095–11101
- [149] Huang Z, Maness PC, Blake DM, Wolfrum EJ, Smolinski SL, Jacoby WA (2000) Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J PhotochemPhotobiol A* 130:163–170
- [150] Lipovsky, A., Tzitrinovich, Z., Friedmann, H., Applerot, G., Gedanken, A., & Lubart, R. (2009). *EPR Study of Visible Light-Induced ROS Generation by Nanoparticles of ZnO. The Journal of Physical Chemistry C*, 113(36), 15997–16001. doi:10.1021/jp904864g
- [151] Daneshvar, N., Rasoulifard, M. H., Khataee, A. R., & Hosseinzadeh, F. (2007). *Removal of C.I. Acid Orange 7 from aqueous solution by UV irradiation in the presence of ZnO nanopowder. Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 95–101. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.08.072
- [152] Feng, X., Guo, H., Patel, K., Zhou, H., & Lou, X. (2014). *High performance, recoverable Fe₃O₄/ZnO nanoparticles for enhanced photocatalytic degradation of phenol. Chemical Engineering Journal*, 244, 327–334. doi:10.1016/j.cej.2014.01.075
- [153] Lin, H. F.; Liao, S. C.; Hung, S. W. The DC Thermal Plasma Synthesis of ZnO Nanoparticles for Visible-Light Photocatalyst. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2005, 174, 82–87
- [154] Djurišić, A. B., Leung, Y. H., Ng, A. M. C., Xu, X. Y., Lee, P. K. H., Degger, N., & Wu, R. S. S. (2014). *Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles: Mechanisms, Characterization, and Avoiding Experimental Artefacts. Small*, 11(1), 26–44. doi:10.1002/smll.201303947
- [155] Morales Navarrete, P. and Yuan, J., 2020. A Single-Layer PDMS Chamber for On-Chip Bacteria Culture. *Micromachines*, 11(4), p.395.
- [156] Li, M., Lin, D., & Zhu, L. (2013). *Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to Escherichia coli. Environmental Pollution*, 173, 97–102. doi:10.1016/j.envpol.2012.10.026
- [157] Yamamoto, O. (2001). *Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide. International Journal of Inorganic Materials*, 3(7), 643–646. doi:10.1016/s1466-6049(01)00197-0

[158] Sawai, J., Shoji, S., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T., Shimizu, M., & Kojima, H. (1998). *Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86(5), 521–522. doi:10.1016/s0922-338x(98)80165-7