



**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)**

**"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ**  
**ΥΛΙΚΩΝ"**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ**  
**ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΧΕΙΩΝ ΜΕ**  
**ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟΥΣ**  
**ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΓΙΑ ΑΥΤΟΙΑΣΗ**  
**ΔΟΜΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΛΕΝΗΣ Γ. ΜΗΛΙΩΝΗ**

Διπλωματούχου Χημικού Πανεπιστημίου Πατρών

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ:**

**Κ. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ**

Καθηγητής Ε.Μ.Π.

**ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2013**





**ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ**  
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ  
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ (Δ.Π.Μ.Σ.)

**"ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ  
ΥΛΙΚΩΝ"**

**ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΔΟΧΕΙΩΝ ΜΕ  
ΕΝΣΩΜΑΤΩΜΕΝΟΥΣ  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥΣ ΓΙΑ ΑΥΤΟΙΑΣΗ  
ΔΟΜΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΛΕΝΗΣ Γ. ΜΗΛΙΩΝΗ**

Διπλωματούχου Χημικού Πανεπιστημίου Πατρών

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

Κ. ΧΑΡΙΤΙΔΗΣ, Καθηγητής ΕΜΠ.....  
Λ. ΖΟΥΜΠΟΥΛΑΚΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής.....  
Χ. ΖΕΡΗΣ, Επίκουρος Καθηγητής .....

**ΑΘΗΝΑ, Ιούλιος 2013**



## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη σύνθεσης, χαρακτηρισμού διαφόρων μικροσυστημάτων μεταφοράς καθώς επίσης και της αλληλεπίδρασής τους με μικροοργανισμούς. Σκοπός ήταν η παραγωγή ενός συστήματος όπου θα μπορεί να λειτουργήσει ως μεταφορέας για το μικροοργανισμό. Ένα τέτοιο σύστημα μελετάται για την ικανότητά του να δράσει ως παράγοντας αυτοϊασης,

Ο μηχανισμός αυτόϊασης δομικών υλικών στη συγκεκριμένη εργασία, βασίστηκε στην κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ , μέσω της ουρεολυτικής δράσης των βακτηρίων. Όταν εμφανιστεί ρωγμή στο τσιμέντο, τότε το εγκλωβισμένο σε μικροδοχείο βακτήριο απελευθερώνεται και έρχεται σε επαφή με το νερό. Με αυτόν τον τρόπο ο μικροοργανισμός αρχίζει να μεταβολίζεται και κατακρημνίζει το ορυκτό, με τρόπο που τελικά παρατηρείται επούλωση της ρωγμής. Η μικροβιακή κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ , βασίζεται στην διάσπαση της ουρίας ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) σε  $\text{CO}_3^{2-}$  και  $\text{NH}_4^+$ . Λόγω της υψηλής τιμής  $\text{pK}$  του συστήματος  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  ( $\text{pka}=9.2$ ), η αντίδραση διάσπασης οδηγεί σε αύξηση του  $\text{pH}$ , ευνοώντας την απελευθέρωση ανθρακικών ιόντων ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) και σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε ιόντα ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) πραγματοποιείται κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ .

Συντέθηκαν διάφοροι τύποι οργανικών και ανόργανων μικροσφαιρών που μπορούν να δράσουν ως φορείς για τη μεταφορά βακτηρίων. Οι μικροσφαίρες κατασκευάστηκαν μέσω σταδιακού και ριζικού πολυμερισμού καθώς και με την μέθοδο λύματος-πηκτής. Ο χαρακτηρισμός των συστημάτων αυτών επιτεύχθηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, δυναμική σκέδαση φωτός, υπέρυθη φασματοσκοπία μετασχηματισμού Fourier, περίθλαση ακτινών X και θερμοσταθμική ανάλυση. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι οι μικροσφαίρες έχουν ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους περίπου στο 1  $\mu\text{m}$ .

Επιπλέον μελέτες απέδειξαν ότι η μικροσφαίρες αυτές δεν είναι τοξικές στον άνθρωπο αλλά ούτε και στο βακτήριο. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στην εργασία είναι η *Escherichia coli* και ο *Staphylococcus aureus*. Κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  παρατηρήθηκε και από τα δύο βακτήρια. Καθώς οι μικροσφαίρες δεν επηρεάζουν την καταβύθιση του ορυκτού από τον μικροοργανισμό, επιπρόσθετες μελέτες πραγματοποιήθηκαν για να αξιολογηθεί η αλληλεπίδραση μεταξύ μικροσυστημάτων μεταφοράς και βακτηρίου.



## **Abstract**

This study is focused on synthesis and characterization of various delivery systems and their interaction with bacteria. The aim of this investigation is the production of delivery systems for bacteria that can be used for self-healing processes.

The mechanism of self-healing (sealing) relies on the formation and precipitation of  $\text{CaCO}_3$  based on enzymatic hydrolysis of urea. The immobilized bacteria on fresh crack surfaces will be activated in contact with water after release from the broken containers and start to multiply and precipitate minerals such as  $\text{CaCO}_3$ , which will eventually seal the crack. The mechanism of bacterially mediated calcite precipitation is based on the reaction of urea ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ ) and water that yields  $\text{CO}_3^{2-}$  and  $\text{NH}_4^+$ . Due to the high pK value of the  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  system (ca. 9.2) the reaction results in a pH increase and concomitant shift in the carbonate equilibrium ( $\text{CO}_2$  to  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{CO}_3^{2-}$ ) which results in the precipitation of calcium carbonate ( $\text{CaCO}_3$ ) when sufficient calcium ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ) are present.

Several types of inorganic and organic microspheres have been synthesized and act as carriers of bacteria. The microspheres were fabricated via gradual and radical polymerizations as well as the sol-gel method. The characterization of the produced materials was accomplished with a variety of techniques such as scanning electron microscopy, dynamic light scattering, FT-IR spectroscopy, energy X-ray dispersion spectroscopy and thermogravimetric analysis. The results proved that the microspheres had had size uniformity about  $1\mu\text{m}$ .

Additional studies on the toxicity analysis established that these microspheres are neither toxic to human nor to the bacteria. The bacteria used in this study were *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.  $\text{CaCO}_3$  precipitation was detected for both bacteria. Furthermore, the microbial mineral precipitation was not hampered by the presence of microspheres. Finally, the interaction between microspheres and bacteria was evaluated.





## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Sol-Gel, του Ινστιτούτου Προηγμένων Υλικών, Φυσικοχημικών Διεργασιών, Νανοτεχνολογίας και Μικροσυστημάτων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος».

Θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέπων Καθηγητή Κ. Χαριτίδη, για την επιλογή του θέματος, τη συστηματική κι εποικοδομητική παρακολούθηση, τη συνεχή στήριξη σε επιστημονικό και προσωπικό επίπεδο. Επίσης, ευχαριστώ τον ερευνητή Α' του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. "Δημόκριτος" κ. Γεώργιο Κόρδα για την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στην ομάδα του και να αποκομίσω σημαντικές γνώσεις και εμπειρία στον τομέα της έρευνας.

Παράλληλα, θέλω να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Ελένη Ευθυμιάδου για τις εύστοχες παρατηρήσεις, υποδείξεις, και τις πολύτιμες γνώσεις που αποκόμισα κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Επίσης, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τον Δρ. Ιωάννη Καρτσωνάκη, όπου συνεπικούρησε στην εργασία μου και με βοήθησε με τέτοιο τρόπο όπου έδρασε καταλυτικά για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστίες σε όλους τους συναδέλφους του εργαστηρίου για την βοήθεια που μου προσέφεραν και τη συναδελφικότητα που επέδειξαν όλο αυτό το διάστημα.

Από τις ευχαριστίες δεν θα μπορούσα να παραλείψω τα άτομα του φιλικού μου περιβάλλοντος οι οποίοι με στήριξαν ψυχολογικά όλο αυτό το χρονικό διάστημα και ήταν δίπλα μου σε όλες τις δυσκολίες.

Τέλος, να εκφράσω ένα μεγάλο ευχαριστώ και την απεριόριστη ευγνωμοσύνη από τα βάθη της καρδιάς μου στην οικογένειά μου, η οποία με στήριξε και θα με στηρίζει για μια ζωή σε όλες τις επιλογές μου.



# Περιεχόμενα

|  |           |
|--|-----------|
| ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....   | 1         |
| <b>1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>2</b>  |
| ΑΥΤΟΙΑΣΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ.....   | 2         |
| 1.1 Υλικά αυτοϊάσης (Self-healing materials) .....   | 5         |
| 1.2 Αυτοϊάση τσιμέντου (Self healing in cement) .....  | 7         |
| 1.2.1 Μηχανισμοί αυτοϊάσης τσιμέντου .....   | 8         |
| 1.3 Μέθοδοι αυτοϊάσης του τσιμέντου .....  | 10        |
| 1.3.1 Κοίλες ίνες (Hollow fibers).....   | 10        |
| 1.3.2 Μικροεγκλεισμός (Microencapsulation).....  | 10        |
| 1.3.3 Επεκτατικοί παράγοντες και ανάμειξη ορυκτών (Expansive agents and mineral admixtures)..... | 11        |
| 1.3.4 Βακτήρια (Bacteria).....   | 12        |
| 1.3.5 Υλικά με μνήμη σχήματος (Shape memory materials).....                                      | 12        |
| 1.4 Μέθοδος αυτοϊάσης σε βακτηριακό τσιμέντο.....  | 13        |
| <b>2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>15</b> |
| ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ-ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΩΝ.....  | 15        |
| 2.1 Εισαγωγή στα πολυμερή .....  | 17        |
| 2.1.1 Σταδιακός πολυμερισμός .....   | 17        |
| 2.1.2 Αλυσωτός πολυμερισμός .....  | 18        |
| 2.2 Εισαγωγή στη μέθοδο λύματος-πηκτής (sol-gel).....  | 20        |
| 2.2.1 Αντίδραση όξινης κατάλυσης .....   | 21        |
| 2.2.2 Αντίδραση βασικής κατάλυσης .....  | 21        |
| 2.3 Πολυμερικές μικροσφαίρες.....  | 22        |
| 2.3.1 Μέθοδοι παρασκευής οργανικών νανο/μικρο-σφαιρών .....                                      | 22        |
| 2.3.2 Πολυμερισμός αιωρήματος (suspension polymerization) .....                                  | 22        |
| 2.3.3 Πολυμερισμός γαλακτώματος (emulsion polymerization).....                                   | 23        |
| 2.3.4 Πολυμερισμός διασποράς (dispersion polymerization).....                                    | 23        |
| 2.3.5 Πολυμερισμός καθίζησης (sedimentation polymerization) .....                                | 23        |
| 2.3.6 Πολυμερισμός καταβύθισης (precipitation polymerization) .....                              | 23        |
| 2.3.7 Πολυμερισμός στη μεσεπιφάνεια (interfacial polymerization) .....                           | 23        |
| 2.3.8 Μέθοδος εξάτμισης διαλύτη .....  | 24        |
| 2.3.9 Τεχνική λύματος-πηκτής για υβριδικές οργανικές και ανόργανες νανο/μικρο-σφαίρες .....      | 24        |
| <b>3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>27</b> |
| ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΤΗΝ ΑΥΤΟΙΑΣΗ ΔΟΜΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ.....   | 27        |
| 3.1 Γενικά περί οργανισμών.....  | 29        |
| 3.2 Προκαρυωτικοί οργανισμοί .....   | 30        |
| 3.2.1 Μικροοργανισμοί.....   | 30        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3      | Βακτήρια .....   | 31        |
| 3.3.1    | Ενδοσπόρια .....   | 33        |
| 3.3.2    | Μικροβιακή θρέψη και αύξηση .....  | 34        |
| 3.3.3    | Ο κύκλος της αύξησης .....   | 35        |
| 3.3.4    | Η φυλογενετική των βακτηρίων .....   | 36        |
| 3.4      | Επαγόμενη μικροβιακή κατακρήμνιση ανθρακικών αλάτων-(Microbially induced carbonate precipitation, MICP)..... | 39        |
| 3.4.1    | Μικροβιακή κατακρήμνιση CaCO <sub>3</sub> μέσω της διάσπασης της ουρίας.....                                 | 40        |
| 3.5      | Κρυσταλλικότητα CaCO <sub>3</sub> .....  | 42        |
| <b>4</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>45</b> |
|          | <b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΑΥΤΟΙΑΣΗΣ</b>  |           |
|          | <b>ΣΚΥΡΟΔΕΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ ΒΑΚΤΗΡΙΩ.....</b>   | <b>45</b> |
| 4.1      | Γενικά για την αυτοϊαση σκυροδέματος από βακτήρια .....  | 47        |
| 4.2      | Γενικά για την διάβρωση του σκυροδέματος.....  | 47        |
| 4.3      | Μικροβιακή κατακρήμνιση CaCO <sub>3</sub> για την επούλωση ρωγμών στο σκυρόδεμα .....                        | 47        |
| <b>5</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>51</b> |
|          | <b>ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ.....</b>   | <b>51</b> |
| 5.1      | Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning electron microscopy, SEM) .....                                    | 53        |
| 5.2      | Φασματομετρία Υπερύθρου- (Fourier transform spectroscopy, FT IR) .....                                       | 55        |
| 5.3      | Θερμοστατική ανάλυση (Thermogravimetry analysis, TGA) .....  | 56        |
| 5.4      | Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic light scattering, DLS) .....   | 57        |
| 5.5      | Φασματοσκοπία Περίθλασης Ακτίνων-X (XRD) .....   | 59        |
| 5.6      | Χρωματομετρική μέθοδος MTT .....   | 61        |
|          | <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>  | <b>63</b> |
| <b>6</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>65</b> |
|          | <b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....</b>   | <b>65</b> |
| 6.1      | Αντιδραστήρια-Διαλύτες.....  | 67        |
| 6.2      | Μέσα καλλιέργειας μικροοργανισμών .....  | 68        |
| 6.2.1    | Θρεπτικά διαλύματα .....   | 68        |
| 6.2.2    | Θρεπτικό μέσο LB άγαρ .....  | 69        |
| 6.3      | Ανάπτυξη μικροοργανισμών στα θρεπτικά μέσα.....  | 69        |
| 6.3.1    | Ανάπτυξη στα θρεπτικά διαλύματα .....  | 69        |
| 6.3.2    | Ανάπτυξη σε τρυβλίο Petri .....  | 70        |
| 6.4      | Αποστείρωση γυάλινων σκευών και θρεπτικών μέσων .....  | 70        |
| 6.5      | Καλλιέργειες κυττάρων.....   | 70        |
| 6.6      | Διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων.....   | 73        |
| 6.7      | Οργανολογία.....   | 73        |
| <b>7</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>   | <b>75</b> |
|          | <b>ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ-ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ-ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ</b>   |           |
|          | <b>ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΩΝ.....</b>   | <b>75</b> |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| 7.1       | Εισαγωγή.....   | 77         |
| 7.2       | Παγίδες νερού (water traps) .....   | 79         |
| 7.2.1     | Πειραματική διαδικασία .....  | 79         |
| 7.2.2     | Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα.....   | 82         |
| 7.2.3     | Συζήτηση.....   | 89         |
| 7.3       | Τροποποιημένες παγίδες νερού με $\text{Ca}(\text{OH})_2 @ \text{SiO}_2$ .....                                   | 90         |
| 7.3.1     | Πειραματική διαδικασία .....  | 90         |
| 7.3.2     | Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα.....   | 93         |
| 7.3.3     | Συζήτηση.....   | 97         |
| 7.4       | Μικροσφαίρες $\text{SiO}_2$ .....   | 98         |
| 7.4.1     | Πειραματική διαδικασία .....  | 98         |
| 7.4.2     | Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα.....   | 98         |
| 7.4.3     | Συζήτηση.....   | 102        |
| 7.5       | Μικροσφαίρες PMMA .....   | 103        |
| 7.5.1     | Πειραματική διαδικασία .....  | 103        |
| 7.5.2     | Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα.....   | 105        |
| 7.5.3     | Συζήτηση.....   | 109        |
| 7.6       | Μικροδοχεία με κέλυφος πολυουρίας.....  | 110        |
| 7.6.1     | Πειραματική διαδικασία .....  | 110        |
| 7.6.2     | Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα.....   | 113        |
| 7.6.3     | Συζήτηση.....   | 116        |
| <b>8</b>  | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>  | <b>117</b> |
|           | ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ $\text{CaCO}_3$ .....   | 117        |
| 8.1       | Εισαγωγή.....   | 119        |
| 8.2       | Κατακρήμνιση $\text{CaCO}_3$ από βακτήρια .....   | 120        |
| 8.2.1     | Μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμνισης $\text{CaCO}_3$ από <i>Staphylococcus aureus</i> .....                       | 120        |
| 8.2.2     | Μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμνισης $\text{CaCO}_3$ από <i>Escherichia coli</i> .....                            | 128        |
| 8.3       | Συζήτηση.....   | 130        |
| <b>9</b>  | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ.....</b>  | <b>131</b> |
|           | ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΩΝ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ .....   | 131        |
| 9.1       | Εισαγωγή.....   | 133        |
| 9.2       | Μελέτη τοξικότητας .....  | 134        |
| 9.2.1     | Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των μικροσφαιρών. ....   | 134        |
| 9.2.2     | Μελέτη τοξικότητας των μικροσφαιρών προς στον <i>St. aureus</i> . ....  | 135        |
| 9.3       | Μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμνισης $\text{CaCO}_3$ από <i>Staphylococcus aureus</i> παρουσία μικροσφαιρών ..... | 136        |
| 9.4       | Συζήτηση.....   | 139        |
| <b>10</b> | <b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ .....</b>   | <b>126</b> |
|           | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ.....  | 126        |

|                   |     |
|-------------------|-----|
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 145 |
| ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....    | 148 |

# **ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**





# **1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

*ΑΥΤΟΙΑΣΗ ΔΟΜΙΚΩΝ  
ΥΛΙΚΩΝ*



## 1.1 Υλικά αυτοϊασης (Self-healing materials)

Τα υλικά αυτοϊασης είναι υλικά με ικανότητα να επισκευάζουν διαβρώσεις, ρωγμές, γρατζουνιές και άλλες αλλοιώσεις, με ανεξάρτητο και αυτόνομο τρόπο. Αποτελεί μεγάλο τεχνολογικό επίτευγμα η ανάπτυξη υλικών που έχουν την ικανότητα να αυτό-θεραπεύονται. Η ικανότητα αυτή ονομάζεται αυτοϊαση . Είναι γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή επιφέρει σημαντικά οφέλη για την οικονομία με άμεσο επακόλουθο στην κοινωνική βελτίωση αλλά και σε συγκεκριμένους τομείς της επιστήμης (χημεία, ενέργεια κ.α.). Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται σημαντικά η διάρκεια ζωής των κατασκευών και τα υλικά αυτοϊασης μπορούν να δώσουν μεγάλη ώθηση στην βιωσιμότητα των βιομηχανιών, καθώς με αυθόρμητο τρόπο οι ρωγμές και γενικότερα οι φθορές εξαφανίζονται.

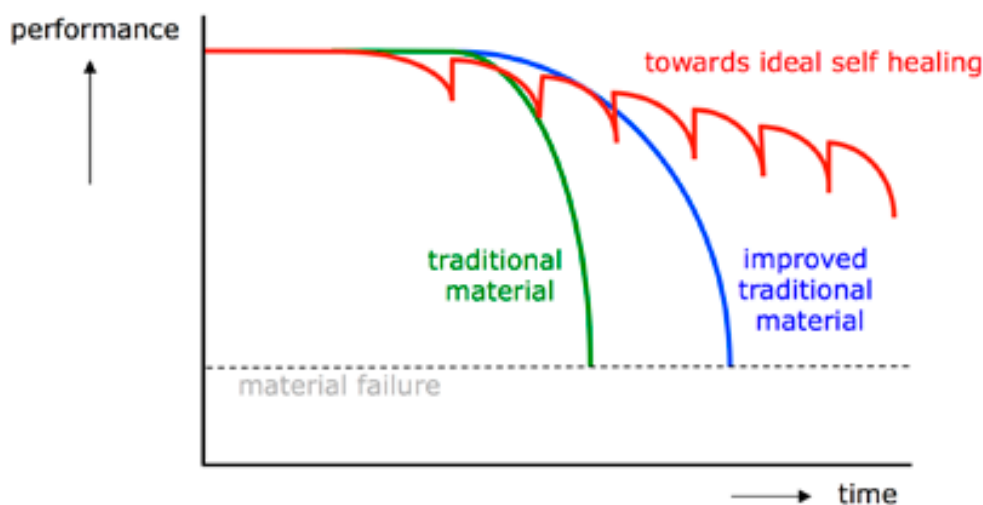
Το πιο σημαντικό πλεονέκτημα των υλικών που έχουν την ικανότητα να «θεραπεύουν» τον εαυτό τους, είναι το μεγάλο προσδόκιμο ζωής. Για παράδειγμα τέτοια υλικά μπορούν να εφαρμοστούν σε περιοχές που είναι δύσκολα προσβάσιμες και επομένως η διαδικασία συντήρησης είναι δύσκολη και δαπανηρή. Το πιο σημαντικό είναι να μην «αποτυγχάνουν» κατά την διάρκεια ζωής τους ως αποτέλεσμα των συνεχόμενων τάσεων που τους εφαρμόζονται κατά τη διαδικασία της αυτοϊασης. Η νέα τάση στα υλικά είναι η «θεραπεία» τους και όχι η βελτίωσή τους.

Στο πέρασμα του χρόνου οι άνθρωποι εξέλιξαν την τεχνολογία με σκοπό την δημιουργία υλικών με βελτιωμένες ιδιότητες και φιλική συμπεριφορά προς το περιβάλλον εφαρμογής τους, με σκοπό την κάλυψη των καθημερινών απαιτήσεων που συνεχώς αυξάνονται και διαφοροποιούνται. Η επιστημονική εξέλιξη οδήγησε στη δημιουργία υλικών ιδιαίτερης ανθεκτικότητας που θα χρησιμοποιούνται για υψηλότερα κτίρια και ανθεκτικότερες γέφυρες, χωρίς όμως την εμφάνιση βλαβών κατά τη διάρκεια της ζωής τους. Απαιτείται να έχουν όσο το δυνατό λιγότερες ατέλειες και μειονεκτήματα από την αρχή της ζωής του, καθώς σε προχωρημένο στάδιο που το υλικό θα υφίσταται καταπονήσεις, τα μειονεκτήματα αυτά θα το οδηγήσουν στην καταστροφή του.

Σκοπός λοιπόν της χρήσης των υλικών που έχουν ιδιότητες αυτοϊασης είναι η αποτροπή της καταστροφής τους. Παρ' όλα αυτά, είναι αδύνατο να μην εμφανιστούν φθορές κατά τη χρήση τους. Αυτό σημαίνει ότι είναι απαραίτητη η συνεχής επιθεώρηση των προϊόντων και κατασκευών από τέτοια υλικά, έτσι ώστε να εκτιμηθεί η εξέλιξη της φθοράς. Μέχρι στιγμής οι επεμβάσεις που γίνονται αφορούν είτε την όσο δυνατή επιδιόρθωση της φθοράς είτε την αντικατάσταση προϊόντος, διαδικασίες χρονοβόρες και ακριβές. Θα ήταν επωφελές να υπάρχει ένα υλικό ικανό να διεξάγει αυτές τις κινήσεις μόνο του χωρίς εξωτερική επέμβαση: ένα υλικό αυτοϊασης (*self-healing material*) [1].

Η ανάπτυξη τεχνητών υλικών αυτοϊασης είναι εμπνευσμένη από τη φύση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα μηχανισμού αυτοϊασης είναι η κατεστραμμένη επιδερμίδα των

δέντρων και η ικανότητα των ζώων να θεραπεύουν τον εαυτό τους [2]. Στην παρακάτω γραφική παράσταση παρουσιάζεται συγκριτικά το προσδόκιμο ζωής των υλικών.



**Εικόνα 1:** Επίδοση των υλικών συναρτήσει του χρόνου.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- Τα παραδοσιακά υλικά (traditional materials) αποτυγχάνουν νωρίς λόγω της συσσώρευσης των φθορών μετά από συγκεκριμένη χρήση.
- Για τα κλασσικά αλλά βελτιωμένα παραδοσιακά υλικά παρόλο που η βελτίωση είναι οριακή οι μηχανισμοί φθοράς παραμένουν ίδιοι.
- Τα υλικά αυτοϊασης μπορούν να παρουσιάζουν μια πρόωρη αλλοίωση, παρ' όλα αυτά όμως ο χαρακτήρας τους πιστοποιεί ότι το υλικό θα αποτύχει μετά από πολύ καιρό.

Για να μπορεί ένα υλικό να χαρακτηριστεί ως υλικό αυτοϊασης, *θα πρέπει να έχει την ικανότητα να εξαφανίζει τις ρωγμές και άλλες ζημιές λίγο πολύ αυθόρμητα, μετά από το κατάλληλο ερέθισμα*. Για το σκοπό αυτό, είναι απαραίτητο να γίνει πλήρωση της ρωγμής με «κάτι» που θα λειτουργήσει μέσω της διαδικασίας της αυτοϊασης και θα επαναφέρει το υλικό στην αρχική του κατάσταση. Αυτό το υλικό πλήρωσης θα πρέπει να προέρχεται μέσα από το ίδιο το υλικό. Πρακτικά, αυτό σημαίνει ότι ένα μικρό κομμάτι του υλικού θα ενεργοποιηθεί και θα πραγματοποιήσει πλήρωση της ρωγμής. Όταν όμως, αυτά τα «ενεργοποιημένα κομμάτια» προσεγγίσουν τις ρωγμές θα πρέπει να είναι ικανά να «θεραπεύσουν» το υλικό (π.χ. να ενώσουν τις δύο επιφάνειες της ρωγμής μεταξύ τους) και να σταθεροποιούνται.

Η ανάπτυξη των υλικών αυτοϊασης έχει επεκταθεί εντυπωσιακά την τελευταία δεκαετία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το πείραμα αυτοϊασης πολυμερικού υλικού που διεξήχθη στην Αμερική το 2001. Η διαδικασία περιελάμβανε την ενσωμάτωση σε πολυμερικό υλικό, μικροκαψουλών που εμπεριείχαν αφρό αυτοϊασης (self healing

fluid). Έτσι όταν μια ρωγμή συναντούσε κάποια κάψουλα, την έθραυε και ο αφρός έρεε πληρώνοντας την, με αποτέλεσμα την epούλωση της. Τελικά η παρουσία του αφρού «θεράπευσε» το υλικό καθώς απέτρεψε την εξέλιξη της ρωγμής.

Στόχος της τεχνολογίας των υλικών αυτοϊασης είναι να στοιχίζουν λιγότερο από τα ομόλογά τους που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας. Θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν αρκετά για να πραγματοποιηθεί κάτι τέτοιο, καθώς πρακτικά τα υλικά αυτά θα είναι πιο ακριβά, λόγω των παραπάνω ενώσεων που προστίθενται σε αυτά ή της παραπάνω παραγωγικής διαδικασίας που χρειάζονται. Καθώς η αξιοπιστία τους θα αυξάνεται, θα απαιτείται και λιγότερη συντήρηση, επομένως το προσδόκιμο ζωής τους θα είναι μεγαλύτερο. Η συντήρηση θα στοιχίζει λιγότερο καθώς το υλικό θα «αυτό-συντηρείται», και το κόστος θα είναι μειωμένο [1].

## 1.2 Αυτοϊαση τσιμέντου (Self healing in cement)

Το τσιμέντο μπορεί να χαρακτηριστεί ως τεχνητή πέτρα με ιδιότητες λίγο πολύ παρόμοιες με αυτές των φυσικών πετρών. Το τσιμέντο είναι ανθεκτικό και σχετικά φτηνό και εδώ και δύο δεκαετίες είναι το περισσότερο χρησιμοποιημένο κατασκευαστικό υλικό παγκοσμίως. Λόγω όμως, της ετερογένειας της σύνθεσης των αρχικών συστατικών, του τσιμέντου, του νερού και των ποικίλων αδρανών υλικών, οι ιδιότητες του τελικού προϊόντος μπορούν να ποικίλουν. Ο εκάστοτε κατασκευαστής ανάλογα με ποιές ιδιότητες θέλει στο τελικό προϊόν, επιλέγει και την κατάλληλη αναλογία των συστατικών του τσιμέντου. Αυτό χαρακτηρίζεται από μεγάλη αντοχή στη θλίψη αλλά όχι στον εφελκυσμό. Παρ' όλα αυτά με την εφαρμογή σπλισμών ή άλλων υλικών ενίσχυσης η αντοχή στον εφελκυσμό μπορεί να βελτιωθεί.

Ποικιλία από πρόσθετα ή υποκατάστατα μπορούν να προστεθούν για να βελτιώσουν τις ιδιότητες του τελικού προϊόντος του τσιμέντου. Επίσης, ορισμένα βιομηχανικά απόβλητα ή ανακυκλώσιμα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να βελτιώσουν το χρόνο ζωής του, ή την φιλικότητά του προς το περιβάλλον ή/και να βελτιώσουν ορισμένες ιδιότητές του.

Η παραγωγή του τσιμέντου είναι μια διαδικασία υψηλής ενεργειακής κατανάλωσης καθώς οι πρώτες ύλες καίγονται στους 1500 °C, απελευθερώνοντας τεράστιες ποσότητες CO<sub>2</sub> παγκοσμίως. Έτσι, για λόγους περιβαλλοντικούς και οικονομικούς η παραγωγή τσιμέντου πρέπει να μειωθεί ή να αντικατασταθεί με υλικά τα οποία μπορούν να λειτουργούν μέσω της διαδικασίας της αυτοϊασης. Κάποια βιομηχανικά απόβλητα, που μπορούν εν μέρει να αναπληρώσουν ακόμα και να βελτιώσουν τις ιδιότητες του τσιμέντου, είναι η ιπτάμενη τέφρα, η σκωρία υψικαμίνου και τα σιδηροπυριτικά άλατα.

Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντοχή του σκυροδέματος και συμβάλλουν στην πρόωμη φθορά του. Μια βασική αιτία που ενεργοποιεί διάφορους μηχανισμούς φθοράς είναι οι ρωγμές που αυξάνουν δραματικά την διαπερατότητα του τσιμέντου. Η μικροδομή

του σκληρυνόμενου τσιμεντοπολλτού είναι πορώδης και περιλαμβάνει απομονωμένους αλλά και διασυνδεδεμένους πόρους. Συγκεκριμένα, οι διασυνδεδεμένοι πόροι καθορίζουν την διαπερατότητα του υλικού καθώς αφήνουν το νερό και τις χημικές ενώσεις να εισχωρήσουν στην μήτρα του σκυροδέματος. Η διαπερατότητα ουσιαστικά αυξάνεται καθώς η ρωγμή συνδέει τους απομονωμένους πόρους με δίκτυα πόρων. Στους περισσότερους μηχανισμούς φθοράς του σκυροδέματος η διαπερατότητα παίζει σημαντικό ρόλο. Η διείσδυση των θεικών ιόντων στη μήτρα, οδηγεί στο σχηματισμό της φάσης του ετρινγκίτη. Η μετατροπή αυτή, μιας υψηλής πυκνότητας σε μια μικρότερη πυκνότητα, προκαλεί περαιτέρω επέκταση των ρωγμών στο υλικό. Έτσι, τα ιόντα των χλωριόντων εισχωρούν στην μήτρα μέσω των δικτυωμένων πόρων, αποσταθεροποιώντας το παθητικό φιλμ του οπλισμού, επιταχύνοντας τελικά την διάβρωση. Με τον ίδιο τρόπο, γίνεται διάχυση του CO<sub>2</sub> μέσω των πόρων, το οποίο αντιδρά με τα αλκαλικά συστατικά του τσιμέντου (π.χ. το Ca(OH)<sub>2</sub>) μια διαδικασία που λέγεται ενανθράκωση. Το αποτέλεσμα είναι η περαιτέρω μείωση του pH και η αποπαθητικοποίηση του προστατευτικού φιλμ του οπλισμού.

Τα παραπάνω καθιστούν ξεκάθαρο πως οι ρωγμές στο σκυρόδεμα πρέπει να μειωθούν και ότι ιδανικά ένας μηχανισμός πρέπει να οδηγεί στην σφράγιση ή εμφράξη των νεοσχηματιζόμενων ρωγμών, έτσι ώστε να περιοριστεί η διαπερατότητα της μήτρας. Ένας μηχανισμός επούλωσης είναι ιδανικός όταν δεν χρειάζεται συνεχή έλεγχο για επισκευή και είναι οικονομικά προσοδοφόρος[3].

Η ικανότητα του σκυροδέματος για αυτοϊαση ή αυτογενή επούλωση των ρωγμών, είχε παρατηρηθεί για πρώτη φορά από την Γαλλική Ακαδημία το 1836. Στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα ο Hyde και Smith παρατήρησαν το φαινόμενο της αυτοϊασης. Μια πιο συστηματική μελέτη πραγματοποιήθηκε το 1926 από τον Glaville. Εκείνη την περίοδο έγινε η διάκριση μεταξύ της αυτοϊασης (self healing) και της αυτοεμφράξης (self sealing). Στην πρώτη περίπτωση, η αρχική αντοχή του σκυροδέματος αποκαθίσταται πλήρως ενώ στην δεύτερη, παρόλο που οι ρωγμές πληρώνονται, δεν παρατηρείται βελτίωση της αντοχής του υλικού. Οι πρώτες μελέτες του Glaville ήταν σε ρωγμές γεφυρών. Οι Jacobsen και Sellevold παρατήρησαν την αυτοϊαση δειγμάτων σκυροδέματος που εκτίθενται σε κύκλους ψύξη-απόψυξης [2].

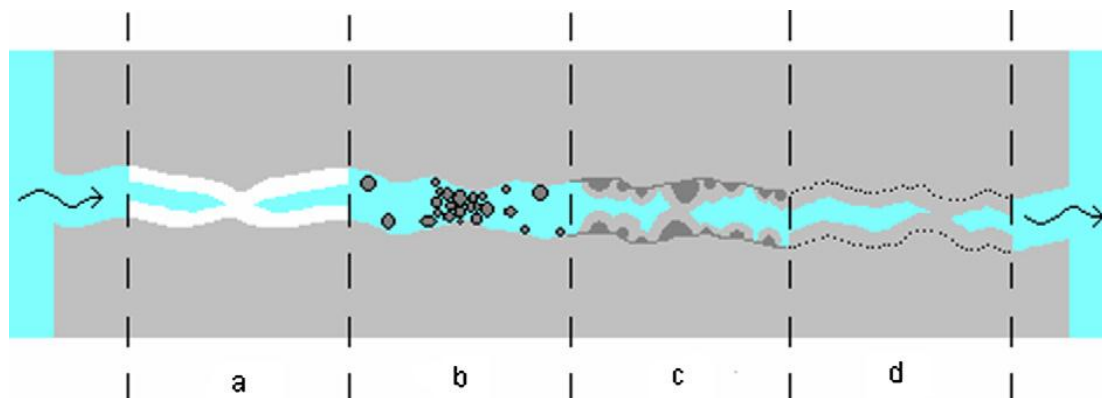
### **1.2.1 Μηχανισμοί αυτοϊασης τσιμέντου**

Ένα υλικό αυτοϊασης ή ένας παράγοντας αυτοϊασης στο τσιμέντο θα πρέπει ιδανικά να τηρεί όλα, ή τουλάχιστον κάποια από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- 1) Να σφραγίζει ή να εμφράζει τις νεοσχηματιζόμενες ρωγμές για να μειώσει την διαπερατότητα.
- 2) Να ενσωματώνεται στη μήτρα του τσιμέντου και να είναι ικανός να δρα αυτόνομα (έτσι ώστε να υπάρχει πραγματικό το φαινόμενο αυτοϊασης).

- 3) Να επιδρά για μεγάλο χρονικό διάστημα καθώς οι κατασκευές πρέπει να αντέχουν πάνω από 50 χρόνια.
- 4) Να δρα ως καταλύτης, και να μην καταναλώνεται στην διαδικασία αυτοϊασης.
- 5) Να μην είναι δαπανηρός για να μπορεί το υλικό να γίνει ανταγωνιστικό [3].

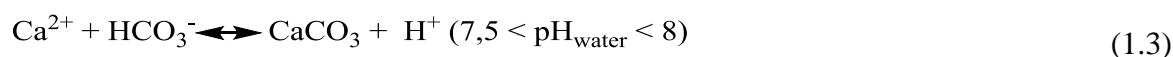
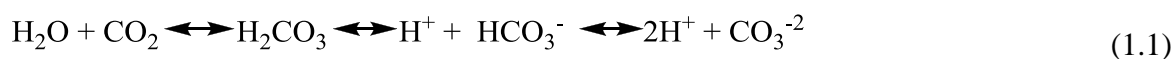
Σύμφωνα με πειραματικές μελέτες, θεωρείται ότι η αυτοϊαση των ρωγμών στο τσιμέντο είναι συνδυασμός περίπλοκων φυσικοχημικών διαδικασιών. Σύμφωνα με πολλές ερευνητικές μελέτες πολλές μπορεί να είναι οι αιτίες εφαρμογής για το φαινόμενο του self healing.



**Εικόνα 2:** Μηχανισμοί αυτοϊασης τσιμέντου.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, στην περίπτωση (a) έχουμε σχηματισμό  $\text{CaCO}_3$  ή  $\text{Ca(OH)}_2$ . Στον (b) μηχανισμό γίνεται φραγή των μηχανισμών από τις ακαθαρσίες του νερού και από σωματίδια που προέκυψαν από τον σχηματισμό της ρωγμής. Στην (c) περίπτωση γίνεται ενυδάτωση του τσιμέντου που δεν αντέδρασε. Τέλος, στον (d) μηχανισμό γίνεται επέκταση της ενυδατωμένης μήτρας του τσιμέντου στο εσωτερικό της ρωγμής (διόγκωση των δεσμών C-S-H).

Από όλους του προτεινόμενους μηχανισμούς που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο βασικότερος συνδέεται με την ανακρυστάλλωση του  $\text{CaCO}_3$ . Όταν τα προϊόντα της ενυδάτωσης του τσιμέντου διαλυθούν σε νερό, το  $\text{Ca(OH)}_2$  απελευθερώνεται και διαχέεται κατά μήκος της επιφάνειας των ρωγμών. Τότε τα ελεύθερα ιόντα  $\text{Ca}^{+2}$  από την ενυδάτωση αντιδρούν με το διαλυμένο  $\text{CO}_2$ . Έτσι, σχηματίζονται «self-healed» κρύσταλλοι που αναπτύσσονται και στις δύο επιφάνειες της ρωγμής, γεμίζοντας τελικά το κενό. Η διαδικασία περιγράφεται παρακάτω με αντιδράσεις:



### 1.3 Μέθοδοι αυτοΐασης του τσιμέντου

Το πληγωμένο δέρμα και ιστός μπορούν να θεραπευτούν, καθώς ο ξενιστής αφομοιώνοντας θρεπτικά υλικά παράγει συστατικά που επουλώνουν τελικά τις πληγές τους. Ανάλογα και στην αυτοΐαση δομικών υλικών, το ζητούμενο είναι η παραγωγή κατάλληλου υλικού ικανό να γεμίσει την ρωγμή, όταν η φθορά εμφανιστεί. Έχουν γίνει πολλές μελέτες για το πώς θα προσδοθούν σε συνθετικά υλικά οι κατάλληλες ιδιότητες αυτοΐασης, βελτιώνοντας και την αποδοτικότητά τους. Μερικές μελέτες αναφέρονται παρακάτω.

#### 1.3.1 Κοίλες ίνες (Hollow fibers)

Αρχικά, στο εσωτερικό των κοίλων ινών αποθηκεύονται κατάλληλα λειτουργικά συστατικά και στη συνέχεια οι ίδιες οι ίνες ενσωματώνονται στη μήτρα του τσιμέντου. Όταν η ρωγμή εμφανιστεί, και κάτω από συγκεκριμένο ερέθισμα, τα λειτουργικά συστατικά ή αλλιώς οι παράγοντες ίασης, θα εκρυσταλλωθούν και μεταγενέστερα θα επουλώσουν την ρωγμή.

##### *Πλεονεκτήματα*

- Ο παράγοντας απελευθερώνεται όταν είναι αναγκαίος.
- Είναι δυνατή η χρήση μεγάλης ποσότητας του παράγοντα αυτοΐασης.
- Αποτελεσματική μέθοδος για πολλαπλές φθορές.

##### *Μειονεκτήματα*

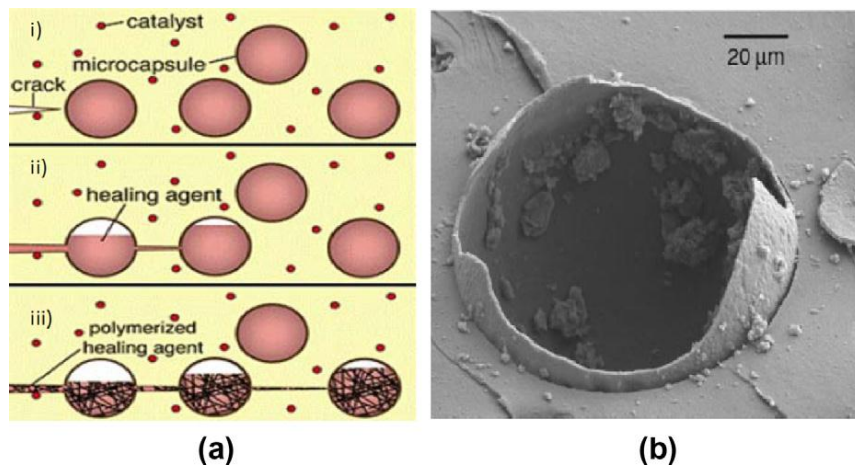
- Εμφανίζεται δυσκολία στην χύτευση.
- Αρνητική επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του τσιμέντου, όταν προστεθεί σε αυτό μεγάλες ποσότητες από κοίλες ίνες.

#### 1.3.2 Μικροεγκλεισμός (Microencapsulation)

Ο μικροεγκλεισμός είναι η διαδικασία κατά την οποία σωματίδια, σταγόνες υγρών ή αερίων εσωκλείονται σε αδρανή κελύφη. Με αυτόν τον τρόπο το εγκλωβισμένο υλικό απομονώνεται και προστατεύεται από ανεπιθύμητες αντιδράσεις του εξωτερικού περιβάλλοντος. Έτσι, όταν η ρωγμή σπάσει το κέλυφος της κάψουλας, ο παράγοντας ίασης απελευθερώνεται στο εσωτερικό της μέσω του τριχοειδούς φαινομένου.

Στην παρακάτω εικόνα περιγράφεται ο μηχανισμός αυτοΐασης όταν ο παράγοντας αυτοΐασης είναι εγκλωβισμένος σε μικροκάψουλες.





**Εικόνα 3:** α) Γενική εικόνα χρήσης των μικροκαψουλών: i) Εμφανίζονται ρωγμές στη μήτρα του σκυροδέματος, ii) η ρωγμή σπάει τις κάψουλες, απελευθερώνοντας τον παράγοντα ίασης μέσα στη ρωγμή μέσω του τριχοειδούς φαινομένου, iii) καθώς ο παράγοντας έρχεται σε επαφή με τον καταλύτη, προκαλείται αντίδραση πολυμερισμού, και τελικά εξασφαλίζεται το κλείσιμο των ρωγμών. β) Εικόνα ESEM που δείχνει την θραύση της κάψουλας.

#### *Πλεονεκτήματα*

- Ο παράγοντας απελευθερώνεται όταν είναι αναγκαίος.
- Ανταποκρίνονται σε βλάβες πολλαπλών σημείων την ίδια στιγμή.
- Αποτελεσματική μέθοδος για πολλαπλές φθορές.

#### *Μειονεκτήματα*

- Δυσκολία στην προετοιμασία των καψουλών και στην χύτευση.
- Περιορισμένη ποσότητα παράγοντα ίασης.
- Η σύνδεση μεταξύ των καψουλών και του τσιμέντου ίσως εμφανίζει πρόβλημα.
- Αρνητική επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες του τσιμέντου, όταν προστεθεί σε αυτό μεγάλες ποσότητες από μικροκάψουλες.

### **1.3.3 Επεκτατικοί παράγοντες και ανάμειξη ορυκτών (Expansive agents and mineral admixtures)**

Έχει παρατηρηθεί πως στις ρωγμές του τσιμέντου σχηματίζονται προϊόντα όπως AFt, AFm και  $\text{CaCO}_3$ . Αυτά τα προϊόντα ενυδάτωσης έχουν εκπλυθεί και ανακρυσταλλωθεί στο νερό που έχει πληρώσει τις ρωγμές. Οι προς μελέτη παράγοντες περιλαμβάνουν επεκτατικούς παράγοντες, γεωυλικά και χημικές προσμίξεις καθώς και συνδυασμός αυτών.

#### *Πλεονεκτήματα*

- Αποτελεσματικότητα στην ίαση.

- Καλή συμβατότητα των προϊόντων ίασης με τη μήτρα του τσιμέντου.

#### *Μειονεκτήματα*

- Ανεπιθύμητη επέκταση εάν δεν γίνει σωστή μεταχείριση.
- Δεν είναι εγγυημένη η παραγωγή των προϊόντων ίασης όταν είναι απαραίτητη.
- Δεν είναι τόσο αποτελεσματική ως μέθοδος για την αντιμετώπιση πολλαπλών φθορών την ίδια στιγμή.

### **1.3.4 Βακτήρια (Bacteria)**

Ορισμένοι ερευνητές προτείνουν την χρήση βιολογικής τεχνικής αποκατάστασης μέσω της εισαγωγής των βακτηριδίων μέσα στο σκυρόδεμα. Η ιδέα στηρίζεται στην ενσωμάτωση βακτηριδίου που μεταβολίζει την ουρία και καταβυθίζει  $\text{CaCO}_3$  στο περιβάλλον της ρωγμής. Η μικροβιακή καταβύθιση  $\text{CaCO}_3$  πιστοποιείται από έναν αριθμό παραγόντων: την συγκέντρωση διαλυμένων ανόργανων ανθρακικών ιόντων, το pH, την συγκέντρωση των ιόντων  $\text{Ca}^{2+}$  και την παρουσία κέντρων πυρήνωσης. Οι πρώτοι τρεις παράγοντες προέρχονται από το μεταβολισμό του βακτηρίου. Τα τοιχώματά του λειτουργούν σαν κέντρα πυρήνωσης.

#### *Πλεονεκτήματα*

- Ως βιολογική διαδικασία είναι φιλική προς το περιβάλλον.

#### *Μειονεκτήματα*

- Κατάλληλα μέτρα για την προστασία βακτηριδίου μέσα στο τσιμέντο.
- Πιθανότητα να έχουν αρνητική επίδραση στις μηχανικές ιδιότητες και στην αποτελεσματικότητα του τσιμέντου.

Για τη δράση των βακτηρίων ως μηχανισμό ίασης στα δομικά υλικά θα αναπτυχθεί σε άλλο κεφάλαιο λεπτομερέστερα.

### **1.3.5 Υλικά με μνήμη σχήματος (Shape memory materials)**

Ακόμα, έχει προταθεί η ενσωμάτωση λειτουργικών υλικών (π.χ. κραμάτων ή πολυμερών με μνήμη σχήματος) στο τσιμέντο ως μέθοδο αυτοίασης. Η βασική ιδέα είναι ότι όταν η ρωγμή αρχίζει να ενεργοποιείται, τα υλικά αυτά, τα οποία έχουν μικρότερη μνήμη σχήματος, θα συρρικνωθούν σε μια συγκεκριμένη κατάσταση. Με αυτόν τον τρόπο θα παραχθεί μια δύναμη συρρίκνωσης, η οποία θα οδηγήσει στο κλείσιμο της ρωγμής.

#### *Πλεονεκτήματα*

- Μπορούν να αντιμετωπίσουν ρωγμές μεγάλου μεγέθους.
- Καλή αποκατάσταση των μηχανικών ιδιοτήτων.

- Αποτελεσματικότητα κάτω από πολλαπλές φθορές.

#### *Μειονεκτήματα*

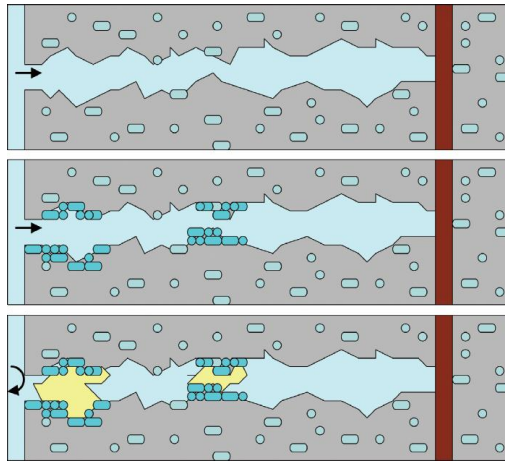
- Υψηλό κόστος.
- Η θέρμανση που υποβάλλεται για να γίνει έναρξη της αυτοϊασης μπορεί να οδηγήσει σε αβεβαιότητα του υλικού.

### **1.4 Μέθοδος αυτοϊασης σε βακτηριακό τσιμέντο**

Από μικροβιολογική σκοπιά η εφαρμογή βακτηριδίων στο τσιμέντο ή το ίδιο το τσιμέντο ως βιότοπος για μερικά βακτήρια, είναι φαινόμενο συμβατό. Το περιβάλλον του σκυροδέματος, σε σύγκριση με το φυσικό σύστημα που αναπτύσσονται τα βακτήρια, είναι αφιλόξενο λόγω της ξηρότητάς και της αλκαλικότητάς του. Παρ' όλα αυτά μέσα σε βράχους, ακόμα και σε βάθος 1 km από το φλοιό της γης, σε έρημους καθώς και σε ακραία αλκαλικά περιβάλλοντα, εμφανίζονται ενεργά βακτήρια. Αυτή η ανθεκτικότητα των βακτηριδίων σε ξηρά ή/και αλκαλικά περιβάλλοντα, οφείλεται στο σχηματισμό των σπορίων. Αυτά είναι εξειδικευμένα κύτταρα, ικανά να αντέχουν σε υψηλές μηχανικές τάσεις και χημικώς έντονες συνθήκες. Τα σπόρια χαρακτηρίζονται από χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και μεγάλο χρόνο ζωής. Έχει βρεθεί ότι μερικά είδη βακτηριδίων παράγουν σπόρια που αντέχουν 200 χρόνια.

Σε πρόσφατες μελέτες έχει αναγνωριστεί και καταγραφεί η δυνατότητα εφαρμογής βακτηριδίων για τον καθαρισμό επιφανειών σκυροδέματος καθώς και για βελτίωση της θλιπτικής δύναμης κονιάματος. Επίσης, έχει μελετηθεί η συγκεκριμένη εφαρμογή και σε φθαρμένη ασβεστόλιθο, διακοσμητική πέτρα και σε κατασκευές σκυροδέματος.

Μέσω της ρυθμιζόμενης κατακρήμνισης πυκνών στρωμάτων  $\text{CaCO}_3$  από τα βακτήρια έχει παρατηρηθεί επούλωση των ρωγμών καθώς και ικανοποιητική μείωση της διαπερατότητας της επιφάνειας του σκυροδέματος.



**Εικόνα 4:** Σχηματική αναπαράσταση της επούλωσης των ρωγμών στο τσιμέντο με ενσωματωμένους μικροοργανισμούς.

Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα, το βακτήριο ενεργοποιείται σε νεοσχηματιζόμενες ρωγμές λόγω της διείσδυσης του νερού. Καθώς αρχίζει να πολλαπλασιάζεται κατακρημνίζει ορυκτά, όπως ασβεστίτης ( $\text{CaCO}_3$ ), όπου τελικά σφραγίζονται οι ρωγμές και προστατεύεται ο σπλισμός από τη διάβρωση που υφίσταται λόγω της εισόδου διαβρωτικών παραγόντων [2].

Περισσότερες λεπτομέρειες για τον μηχανισμό με τον οποίο τα βακτήρια επουλώνουν τις ρωγμές του τσιμέντου, μέσω της κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$ , περιγράφεται στο Κεφάλαιο 3.

# **2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

## *ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ-ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΩΝ*



## 2.1 Εισαγωγή στα πολυμερή

Τα πολυμερή είναι ενώσεις οι οποίες συνίστανται από πολύ μεγάλα μόρια τα οποία είναι φτιαγμένα από ένα μεγάλο αριθμό επαναλαμβανόμενων υπομονάδων.

Ανάλογα με το μηχανισμό και την κινητική των αντιδράσεων οι αντιδράσεις πολυμερισμού χωρίζονται σε σταδιακούς και αλυσωτούς πολυμερισμούς.

**Πίνακας 1:** Βασικά χαρακτηριστικά σταδιακού και αλυσωτού πολυμερισμού.

| Σταδιακός πολυμερισμός  | Αλυσωτός πολυμερισμός   |
|---|---|
| Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μεταξύ οποιωνδήποτε μοριακών ειδών που παρευρίσκονται στο μίγμα αντίδρασης και ανεξάρτητα από το μέγεθος τους.                    | Η αντίδραση λαμβάνει χώρα μόνο μεταξύ μιας αυξανόμενης πολυμερικής αλυσίδας και ενός μορίου μονομερούς.   |
| Η συγκέντρωση του μονομερούς μειώνεται γρήγορα.   | Η συγκέντρωση του μονομερούς μειώνεται αργά.  |
| Το μοριακό βάρος του πολυμερούς αυξάνεται συνεχώς και απεριόριστα συναρτήσει της έκτασης της αντίδρασης.  | Το μοριακό βάρος του πολυμερούς δεν επηρεάζεται από την έκταση της αντίδρασης.                            |
| Ο χρόνος επηρεάζει την έκταση της αντίδρασης και το μοριακό βάρος του πολυμερούς. Για προϊόν μεγάλου μοριακού βάρους απαιτείται μμεγάλος χρόνος αντίδρασης. | Ο χρόνος επηρεάζει μόνο την έκταση της αντίδρασης (όχι το μοριακό βάρος πολυμερούς).                      |
| Μέσα στο μίγμα αντίδρασης συνυπάρχουν όλα τα μετέχοντα και παραγόμενα μοριακά είδη σε ικανές ποσότητες και σε οποιαδήποτε έκταση αντίδρασης.                | Μέσα στο μίγμα συνυπάρχουν μόνο μονομερές, πολυμερές και περίπου 10-8 μέρη αυξανόμενων αλύσων πολυμερούς. |

### 2.1.1 Σταδιακός πολυμερισμός

Γενικά, οι σταδιακές αντιδράσεις χωρίζονται σε δύο κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι αντιδράσεις, στις οποίες λαμβάνουν μέρος δύο μονομερή, που το καθένα διαθέτει δύο όμοιες δραστικές ομάδες, π.χ. :



Στην δεύτερη κατηγορία σταδιακών αντιδράσεων τα μονομερή έχουν δυο διαφορετικές δραστικές ομάδες:



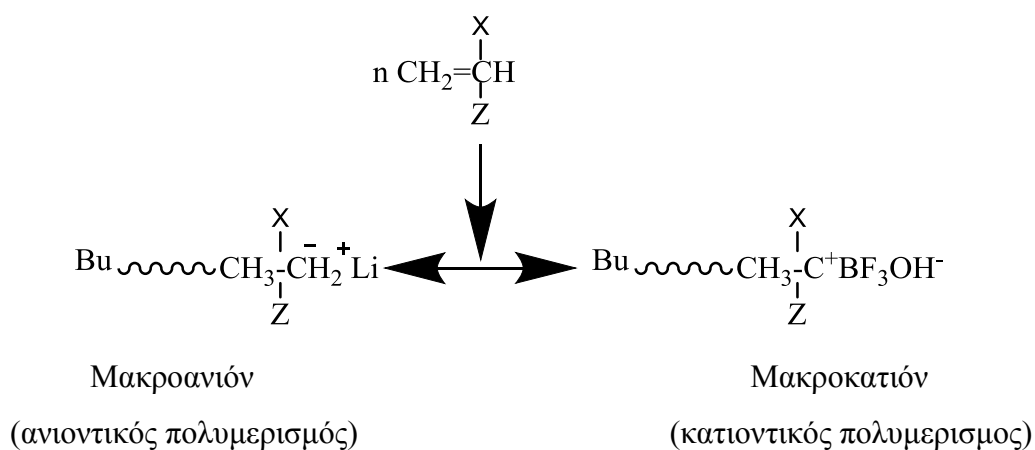
Εκτός από την παραπάνω αντίδραση είναι πιθανή και η αντίδραση σχηματισμού κυκλικού προϊόντος.

### 2.1.2 Αλυσωτός πολυμερισμός

Με αλυσωτές αντιδράσεις πολυμερίζονται κυρίως τα βινυλικά ( $\text{CH}_2=\text{CX}\Psi$ ) και τα διενικά μονομερή ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CX}=\text{CH}_2$ ).

Οι αλυσωτές αντιδράσεις γίνονται με τη βοήθεια ορισμένων χημικών ενώσεων (π.χ. βουτυλολίθιο) που ονομάζονται απαρχητές. Οι απαρχητές προκαλούν ομολυτική ανόρθωση (κάθε άνθρακας του διπλού δεσμού έχει και από ένα π-ηλεκτρόνιο) ή ετερολυτική ανόρθωση (ο ένας από τους δύο άνθρακες του διπλού δεσμού έχει και τα δύο π-ηλεκτρόνια) των π-ηλεκτρονίων του διπλού δεσμού και έτσι αρχίζει ο πολυμερισμός.

Ο ιοντικός πολυμερισμός διακρίνεται σε ανιοντικό, όταν το αναπτυσσόμενο μακρομόριο είναι φορτισμένο αρνητικά, και σε κατιοντικό, όταν το αναπτυσσόμενο μακρομόριο είναι φορτισμένο θετικά.



Η εκλογή του κατάλληλου απαρχητή εξαρτάται από τους υποκαταστάτες X και Z. Επειδή, στα περισσότερα βιομηχανικά μονομερή ο υποκαταστάτης X είναι -H ή -CH<sub>3</sub>, η εκλογή του κατάλληλου απαρχητή εξαρτάται κυρίως από τον υποκαταστάτη Z.

#### 2.1.2.1 Πολυμερισμός με ελεύθερες ρίζες

Από βιομηχανική άποψη ο πολυμερισμός με ελεύθερες ρίζες (free radical polymerization) είναι ο σπουδαιότερος, γιατί τα περισσότερα βιομηχανικά πολυμερή παρασκευάζονται με τη

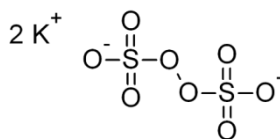


βοήθεια ελεύθερων ριζών. Όλες οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών γίνονται σε τρία στάδια: *έναρξη* (initiation), *διάδοση* (propagation) και *τερματισμός* (termination).

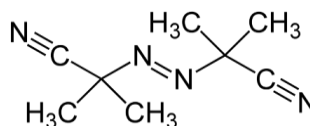
### 2.1.2.2 Μηχανισμός πολυμερισμού με ελεύθερες ρίζες

Η *έναρξη πολυμερισμού* μπορεί να γίνει με τη βοήθεια ορισμένων χημικών ενώσεων που δίνουν ελεύθερες ρίζες (απαρχητές, initiators) ή ακόμα με την επίδραση θερμότητας και φωτός. Παρακάτω παρατίθενται οι απαρχητές υπερθειικό κάλιο, KPS (potassium persulfate) και αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο, AIBN (azobisisobutyronitrile), καθώς και ο μηχανισμός όπου ο τελευταίος δίνει ελεύθερες ρίζες.

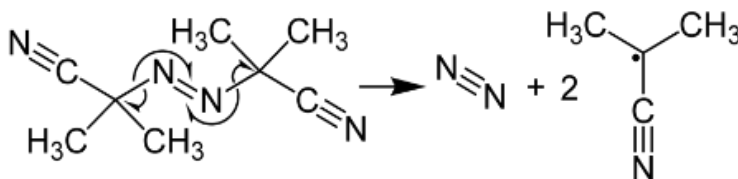
- Υπερθειικό κάλιο, KPS:



- Αζωδισισοβουτυρονιτρίλιο, AIBN:



Παραγωγή ελευθέρων ριζών του AIBN:

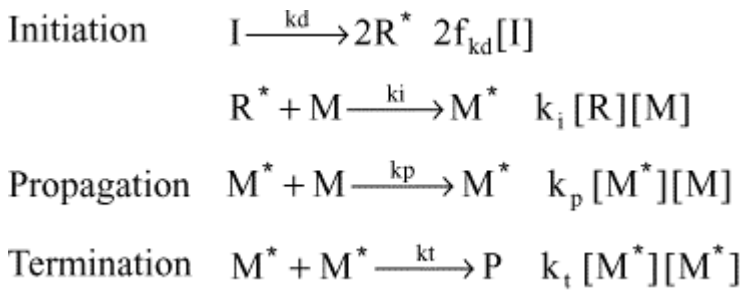


Οι ελεύθερες ρίζες που παράγονται αντιδρούν με το μονομερές και σχηματίζουν τις πρωτογενείς ρίζες, οι οποίες σταθεροποιούνται από τον υποκαταστάτη (M) του άνθρακα με το ελεύθερο ηλεκτρόνιο.

Στο *στάδιο της διάδοσης* μόρια μονομερούς προσθέτονται, με πολλή μεγάλη ταχύτητα, στις πρωταρχικές ρίζες που σχηματίζονται στο στάδιο της *έναρξης* του πολυμερισμού. Η προσθήκη του μονομερούς στη ρίζα γίνεται κυρίως με τον τρόπο *κεφαλή-ουρά*.

Κατά το *στάδιο του τερματισμού* οι μακρόριζες που δημιουργούνται στο στάδιο της *διάδοσης* μπορούν να καταστραφούν οποιαδήποτε στιγμή, είτε με *συνένωση* (combination) δύο μακροριζών είτε με *ανακατανομή* (disproportionation) δηλαδή μεταφορά υδρογόνου από μακρόριζα σε μακρόριζα.

Τα στάδια του πολυμερισμού περιγράφονται και με τις παρακάτω αντιδράσεις.



με  $k_d$ : η σταθερά ταχύτητας σχηματισμού ριζών του απαρχητή

$f_{kd}$ : η δραστηριότητα του απαρχητή

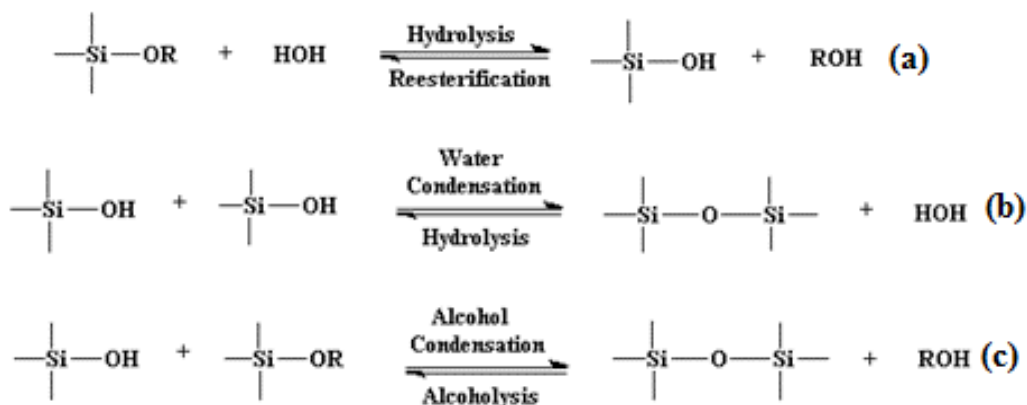
$k_i$ ,  $k_p$  και  $k_t$ : είναι οι σταθερές ταχύτητας αντίδρασης, που αντιστοιχούν στα διάφορα στάδια πολυμερισμού [4].

## 2.2 Εισαγωγή στη μέθοδο λύματος-πηκτής (sol-gel)

Ο όρος «sol-gel» αποδίδεται σε όλες τις διεργασίες κατά τις οποίες ένα διάλυμα ή αλλιώς sol μετατρέπεται σε μία άκαμπτη πορώδη μάζα, δηλαδή μία γέλη ή αλλιώς πήκτωμα (gel). Δηλαδή είναι μία διαδικασία κατά την οποία σχηματίζονται μεγάλα ανόργανα πολυμερή.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα διαδικασίας sol-gel είναι η αντίδραση του μεταλλικού αλκοξειδίου  $\text{Si-OR}_4$  με αιθανόλη και νερό. Αυτά τα τρία αντιδραστήρια σχηματίζουν ένα διάλυμα μίας φάσης το οποίο περνάει μέσω μιας sol-gel μετάβασης σε ένα άκαμπτο σύστημα δύο φάσεων, το οποίο αποτελείται από ένα στερεό οξειδίο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) στους πόρους του οποίου εμπεριέχεται ο διαλύτης.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την sol-gel διαδικασία είναι η υδρόλυση και ο πολυμερισμός ενός αλκοξειδίου του πυριτίου.



Γενικά, η αντίδραση υδρόλυσης (a), μέσω της προσθήκης  $\text{H}_2\text{O}$ , αντικαθιστά τις ομάδες αλκοξειδίων (OR) με τις ομάδες υδροξυλίου (OH). Οι επόμενες αντιδράσεις συμπύκνωσης (b) και (c) περιλαμβάνοντας τις ομάδες σιλανόλης (Si-OH) παράγουν δεσμούς Si-O-Si, συν τα υποπροϊόντα νερό ή αλκοόλη. Στις περισσότερες συνθήκες η συμπύκνωση αρχίζει προτού η υδρόλυση να είναι πλήρης. Εντούτοις, παράγοντες όπως, το pH, ο λόγος  $\text{H}_2\text{O}/\text{Si}$  ( $R_w$ ) και ο

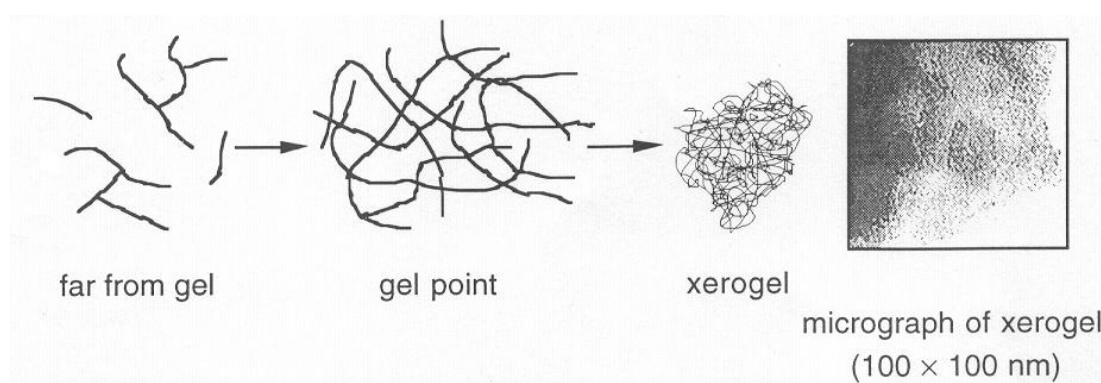
καταλύτης, μπορούν να αναγκάσουν την ολοκλήρωση της υδρόλυσης προτού να αρχίσει η συμπύκνωση. Επιπλέον, επειδή το νερό και τα αλκοξείδια είναι αμιγή, χρησιμοποιείται ένας κοινός διαλύτης, η αλκοόλη. Με την παρουσία αυτού του μέσου ομογενοποίησης της υγρής φάσης, διευκολύνεται η υδρόλυση λόγω της δυνατότητας ανάμιξης του αλκοξειδίου και του νερού. Δεδομένου ότι ο αριθμός δεσμών των σιλοξανών αυξάνεται, τα μεμονωμένα μόρια συνδέονται και από κοινού συναθροίζονται στο κolloειδές διάλυμα. Όταν τα μόρια του κolloειδούς διαλύματος συγκροτηθούν σε ένα δίκτυο, διαμορφώνεται ένα πήκτωμα (gel). Κατά στην ξήρανση, οι παγιδευμένες πτητικές ουσίες (νερό, αλκοόλη, κλπ) απομακρύνονται και το δίκτυο συρρικνώνεται.

### 2.2.1 Αντίδραση όξινης κατάλυσης

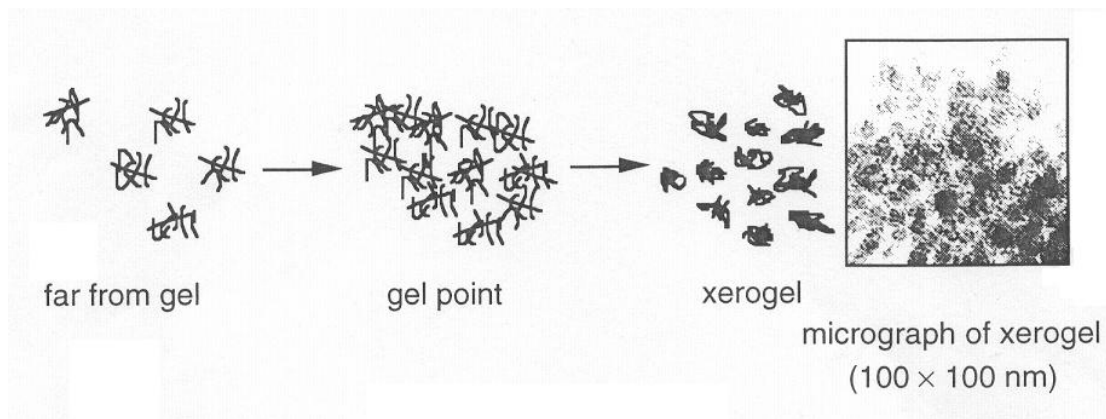
Σε χαμηλό pH, όπου υφίσταται αργή υδρόλυση, τα οξείδια του πυριτίου τείνουν να σχηματίσουν γραμμικά μόρια τα οποία συνήθως παρουσιάζουν χαμηλό βαθμό διασταυρούμενης σύνδεσης μεταξύ των διαφορετικών σχηματιζόμενων αλυσίδων. Οι αλυσίδες καθώς σχηματίζονται μπλέκουν αναμεταξύ τους και δημιουργούν πρόσθετους κλάδους με συνέπεια το σχηματισμό πηκτώματος (Εικόνα 5).

### 2.2.2 Αντίδραση βασικής κατάλυσης

Σε υψηλό pH, όπου κυριαρχούν συνθήκες που ευνοούν γρήγορη υδρόλυση, τα οξείδια του πυριτίου σχηματίζουν διακλαδισμένες μορφές συμπλεγμάτων που δεν αλληλεπιδρούν πριν από την ξήρανση και συμπεριφέρονται έτσι ως απομονωμένα είδη. Κατά την ξήρανση αρχίζει να γίνεται η σύνδεση των διαφορετικών συμπλεγμάτων με συνέπεια τον σχηματισμό πηκτώματος (Εικόνα 6).



**Εικόνα 5:** Μία αναπαράσταση ζελατινοποίησης κάτω από όξινες συνθήκες.



**Εικόνα 6:** Μία αναπαράσταση ζελατινοποίησης κάτω από βασικές συνθήκες[5].

## 2.3 Πολυμερικές μικροσφαίρες

Πολυμερικές νανοσφαίρες ορίζονται ως οι διασπορές σωματιδίων ή τα στερεά σωματίδια με διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 10-1000 nm. Από 1000nm-100μm ορίζονται οι πολυμερικές μικροσφαίρες. Ο τομέας των νανοσωματιδίων επεκτείνεται και παίζει σημαντικό ρόλο σε μια ευρεία περιοχή εφαρμογών, από την ηλεκτρονική, φωτονική τεχνολογία, τα αγώγιμα υλικά, τους αισθητήρες, την ιατρική, την βιοτεχνολογία, μέχρι και τις περιβαλλοντικές τεχνολογίες. Γενικά, οι πολυμερικές νανοσφαίρες μεταφέρουν αποτελεσματικά πρωτεΐνες, φάρμακα και DNA σε κύτταρα και όργανα στόχους.

Οι ιδιότητες των πολυμερικών νανοσφαιρών πρέπει να προσαρμόζονται ανάλογα με την εκάστοτε εφαρμογή τους. Έτσι, με σκοπό την επίτευξη των επιθυμητών ιδιοτήτων, ο τρόπος παρασκευής τους είναι σημαντικός. Γι αυτό, είναι απαραίτητο να υπάρχουν τεχνικές παρασκευής που δίνουν πολυμερικές σφαίρες με κατάλληλες ιδιότητες για συγκεκριμένη εφαρμογή[6].

### 2.3.1 Μέθοδοι παρασκευής οργανικών νανο/μικρο-σφαιρών

Γενικά οι νανο/μικροσφαίρες μπορούν συντεθούν με τις παρακάτω μεθόδους:

- α) Σε τεχνικές σύνθεσης από τον πολυμερισμό των μονομερών.
- β) Σε τεχνικές σύνθεσης από γραμμικά πολυμερή.
- γ) Σε τεχνικές εξάτμισης διαλύτη.

Παρακάτω αναφέρονται οι βασικές τεχνικές πολυμερισμού σύνθεσης πολυμερικών νάνο/μικροσφαιρών.

### 2.3.2 Πολυμερισμός αιωρήματος (suspension polymerization)

Ο πολυμερισμός αιωρήματος, όπου ανήκει στον ριζικό πολυμερισμό, εφαρμόζεται για τη σύνθεση σφαιριδίων μεγέθους της τάξης 50-500 μm. Το μονομερές, το οποίο είναι δυσδιάλυτο σε νερό, διασπείρεται σε υδατική φάση με τον σταθεροποιητή. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα στη φάση του μονομερούς καθώς ο απαρχητής είναι δυσδιάλυτος στο νερό. Το μέγεθος και η ποσότητα

των σταγονιδίων καθορίζονται από το μέγεθος και την ποσότητα των διασπειρόμενων σταγονιδίων των μονομερών και την ταχύτητα της μηχανικής ανάδευσης.

### **2.3.3 Πολυμερισμός γαλακτώματος (emulsion polymerization)**

Τα γαλακτώματα χρησιμοποιούνται κυρίως για το σχηματισμό ομοιόμορφων σφαιρών της τάξης  $10-10^4$  nm. Η μέθοδος περιλαμβάνει την διασπορά δυσδιάλυτου σε νερό μονομερούς σε νερό με υδατοδιαλυτό απαρχητή. Ένας γαλακτωματοποιητής προστίθεται για τον σχηματισμό ομοιόμορφων μικκυλίων. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα μέσα στα μικύλλια και όχι στα διεσπαρμένα σταγονίδια του μονομερούς καθώς ο απαρχητής δεν είναι αναμίξιμος εκεί. Οι τελικές πολυμερικές σφαίρες μπορούν να είναι τόσο ομοιόμορφες στην νάνο κλίμακα, όπου μπορούν να διαθλούν το ορατό φώς.

### **2.3.4 Πολυμερισμός διασποράς (dispersion polymerization)**

Ο πολυμερισμός αιωρήματος χρησιμοποιείται για τη σύνθεση σφαιριδίων μεγέθους της τάξης 0,5-10  $\mu\text{m}$ . Όλα τα αντιδραστήρια, δηλαδή το μονομερές, ο απαρχητής και ο σταθεροποιητής (ένα οργανικό πολυμερές που περιέχει ένα υδροφιλικό και ένα υδροφοβικό μέρος) διαλύονται σε οργανικό μέσο. Ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα μέσα στα σταγονίδια του μονομερούς, καθώς ο απαρχητής είναι διαλυτός στο μονομερές. Αφού τα πολυμερικά σταγονίδια είναι αδιάλυτα σε οργανικούς διαλύτες, καταβυθίζονται, ενώ παράλληλα ο σταθεροποιητής αποτρέπει την κροκίδωσή τους.

### **2.3.5 Πολυμερισμός καθίζησης (sedimentation polymerization)**

Περιγράφει ο πολυμερισμός καθίζησης τον πολυμερισμό των υδατικών πολυμερικών σφαιρών σε ζεστό λάδι παραφίνης. Μετά από καθορισμένο χρόνο (7-9 sec) οι σφαίρες συνεχίζουν να πολυμερίζονται χωρίς να συσσωματώνονται[7].

### **2.3.6 Πολυμερισμός καταβύθισης (precipitation polymerization)**

Ο πολυμερισμός καταβύθισης είναι μοναδικός για τη σύνθεση νανο/μικροσφαιρών με ομοιόμορφο σχήμα και μέγεθος χωρίς τη χρήση επιφανειοδραστικών ενώσεων ή τροποποιητών. Η τεχνική ξεκινά με ένα ομογενές μίγμα από το μονομερές ή τα μονομερή, τον απαρχητή και το διαλυτικό μέσο. Αρχικά τα μονομερή είναι διαλυτά στο διαλυτικό μέσο, όμως κατά την διάρκεια του πολυμερισμού οι πολυμερικές αλυσίδες που σχηματίζονται είναι αδιάλυτες και αρχίζουν να καταβυθίζονται με ενθαλπική ή εντροπική καταβύθιση στην περίπτωση που χρησιμοποιείται διασταυρούμενη σύνδεση[8].

### **2.3.7 Πολυμερισμός στη μεσεπιφάνεια (interfacial polymerization)**

Τα δραστικά μονομερή (διόλη και  $\text{COCl}_2$ , διαμίνη και διχλωρίδιο οξέος κλπ) διαλύονται σε δύο υγρά που δεν αναμιγνύονται, όπου το ένα από τα δύο είναι συνήθως νερό.

Η υδατική φάση περιέχει μια βάση κατά Lewis (διόλη, διαμίνη κλπ) και NaOH (απομάκρυνση του HCl), ενώ η οργανική φάση ( βενζόλιο, τολουόλιο κλπ) περιέχει ένα οξύ κατά Lewis (COCl<sub>2</sub>, διχλωρίδιο οξέος κλπ).

Η αντίδραση γίνεται στη μεσεπιφάνεια των δύο υγρών και το σχηματιζόμενο πολυμερές στη μεσεπιφάνεια απομακρύνεται συνεχώς. Ο πολυμερισμός δεν ακολουθεί την κινητική των σταδιακών αντιδράσεων. Τα μονομερή αντιδρούν με το αναπτυσσόμενο, στη μεσεπιφάνεια των δύο υγρών, μακρομόριο και όχι με τα άλλα μονομερή, γιατί δεν μπορούν να περάσουν τη μεμβράνη του πολυμερούς και να φθάσουν στην άλλη φάση[4].

### **2.3.8 Μέθοδος εξάτμισης διαλύτη**

Η μέθοδος εξάτμισης διαλύτη ήταν η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση PNPs. Σε αυτήν την μέθοδο δημιουργούνται γαλακτώματα, καθώς προστίθενται πτητικοί διαλύτες. Το γαλάκτωμα μετατρέπεται σε αιώρημα σωματιδίων μέσω της εξάτμισης του διαλύτη. Μια από τις συμβατικές μεθόδους για τον σχηματισμό γαλακτώματων, είναι το γαλάκτωμα έλαιο στο νερό (oil in water, O/W). Μετά τον σχηματισμό σταθερού γαλακτώματος ο οργανικός διαλύτης εξατμίζεται είτε μεταβάλλοντας την πίεση, είτε με διαρκή ανάδευση. Το μέγεθος των νανο/μικροσωματιδίων με αυτήν την τεχνική καθορίζεται από την συγκέντρωση του πολυμερούς και από το είδος και την συγκέντρωση του σταθεροποιητικού παράγοντα[6].

### **2.3.9 Τεχνική λύματος-πηκτής για υβριδικές οργανικές και ανόργανες νανο/μικροσφαίρες**

Η τεχνική λύματος-πηκτής βασίζεται στον πολυμερισμό ανόργανων ενώσεων για την παρασκευή ανόργανων υλικών, όπως κεραμικά και γυαλιά. Η χαμηλή θερμοκρασία στην οποία γίνεται ο πολυμερισμός επιτρέπει την σύνθεση οργανοανόργανων υβριδικών υλικών. Με την τεχνική λύματος-πηκτής μπορούν να συντεθούν οργανικά-ανόργανα νανο/μικρο-σωματίδια με ποικιλία ιδιοτήτων. Τέτοια νανο/μικρο-σωματίδια αποτελούν και οι νανο/μικρο-σφαίρες από οργανοαλκοξυσιλάνια (organoalkoxysilanes) τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πρόδρομες ενώσεις για την εισαγωγή οργανικών ομάδων στο ανόργανο δίκτυο με αντίδραση λύματος-πηκτής[9].

Παρακάτω παρατίθενται μερικές βασικές τεχνικές πολυμερισμού με το αντίστοιχο μέγεθος σωματιδίων που προκύπτει.

**Πίνακας 2:** Βασικές τεχνικές σύνθεσης νανο/μικροσφαιρών.

| <b>Μέθοδοι σύνθεσης</b>   | <b>Διακύμανση μεγέθους σωματιδίου</b> |
|---------------------------|---------------------------------------|
| Πολυμερισμός γαλακτώματος | 0,01-1 $\mu\text{m}$                  |
| Πολυμερισμός διασποράς    | 0,5-10 $\mu\text{m}$                  |
| Πολυμερισμός αιωρήματος   | 50-500 $\mu\text{m}$                  |
| Πολυμερισμός καθίζησης    | mm μεγέθη                             |





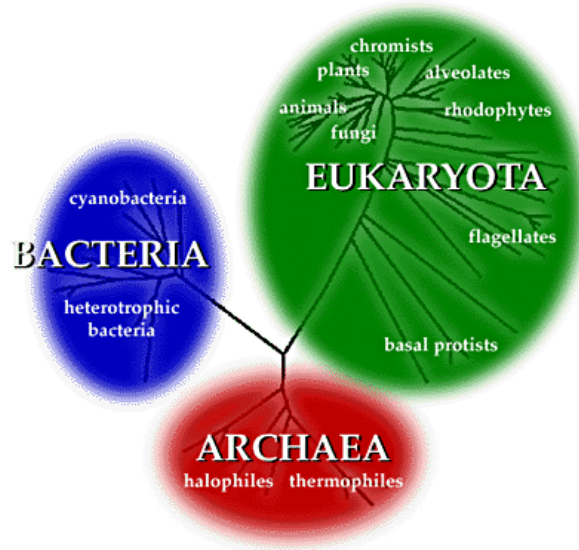
# **3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ**

*ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΣΤΗΝ  
ΑΥΤΟΙΑΣΗ ΔΟΜΙΚΩΝ  
ΥΛΙΚΩΝ*



### 3.1 Γενικά περί οργανισμών

Στη δεκαετία του '90 οι βιολόγοι πρότειναν ένα σύστημα διαίρεσης για τους ζωντανούς οργανισμούς, βασιζόμενοι στην πρωτοδιάταξη των ριβοσωματικών RNAs. Με βάση αυτό πρότειναν ένα ταξινομικό σχήμα που αποδέχθηκαν οι περισσότεροι βιολόγοι. Σύμφωνα με το σχήμα οι οργανισμοί διακρίνονται σε τρεις επικράτειες: τα βακτήρια, τα αρχαία και τα ευκάρυα. Κάθε επικράτεια μπορεί να διαιρείται σε βασιλεία. Τα ευκάρυα διακρίνονται σε πέντε παραδοσιακά βασιλεία: τα μονήρη, τα πρώτιστα, τους μύκητες, τα φυτά και τα ζώα. Ο αριθμός των βακτηρίων και των αρχαίων φαίνεται ότι είναι ανυπολόγιστος και στην πλειοψηφία του άγνωστος[10].



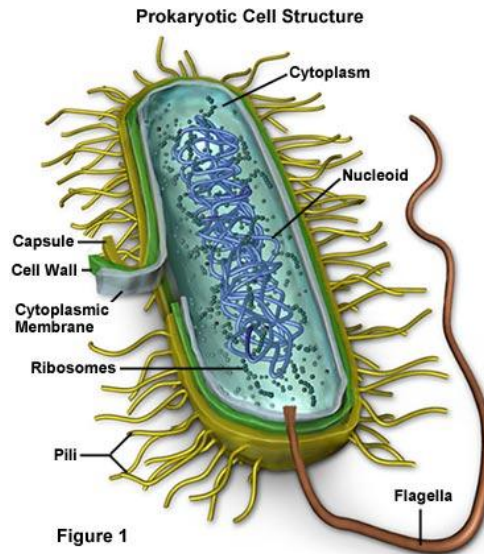
**Εικόνα 7:** Επικράτειες των οργανισμών[11].

Όταν έγινε το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο προσιτό στους βιολόγους για τη μελέτη της δομής των κυττάρων, διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν δύο βασικές κατηγορίες κυττάρων: το προκαρυωτικό και το ευκαρυωτικό. Η ύπαρξη των δύο διαφορετικών κατηγοριών κυττάρων χωρίς κάποιον ενδιάμεσο συνδετικό κρίκο αποτελεί την πιο εξελικτική ασυνέχεια των οργανισμών. Οι οργανισμοί που υπάγονται στα βακτήρια και στα αρχαία δομούνται με βάση το προκαρυωτικό κύτταρο. Όλοι οι άλλοι οργανισμοί, που ανήκουν στα πρώτιστα, στους μύκητες, στα φυτά ή στα ζώα, δομούνται με βάση το ευκαρυωτικό κύτταρο.

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα το γενετικό υλικό βρίσκεται στον πυρήνα (κάρυον = πυρήνας) ενώ στα προκαρυωτικά αν και βρίσκεται σε σταθερή θέση, το DNA δεν περιβάλλεται από μεμβράνη και το όλο σύστημα καλείται πυρηνοειδές. Γενικά, τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι δομημένα από τα ίδια βιομόρια, τα οποία όμως οργανώνονται και δημιουργούν διαφορετικές δομές και οργανίδια, με το ίδιο αποτέλεσμα, την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό τους [10].

## 3.2 Προκαρυωτικοί οργανισμοί

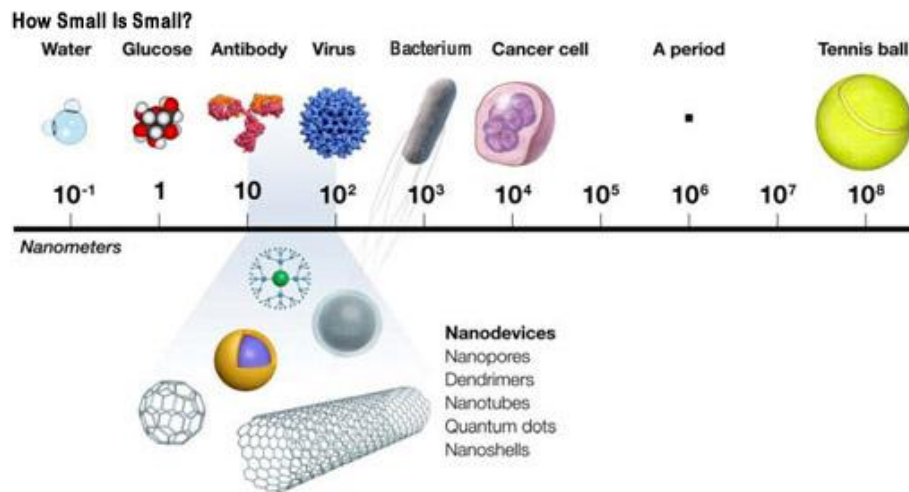
Οι προκαρυωτικοί οργανισμοί είναι απλοί μονοκύτταροι οργανισμοί που περιβάλλονται από ένα αρκετά σταθερό περίβλημα, το κυτταρικό τοίχωμα. Μέσα από το κυτταρικό τοίχωμα υπάρχει η εύπλαστη και ημιδιαπερατή κυτταρική μεμβράνη. Στο εσωτερικό του κυττάρου δεν υπάρχει ιδιαίτερη οργάνωση και τα μόνα μορφώματα που παρατηρούνται είναι τα ριβοσωμάτια. Το σύνολο των κυτταρικών στοιχείων είναι διάσπαρτα και διαλυτά στο εσωτερικό του κυττάρου. Το γενετικό υλικό (DNA) βρίσκεται διάχυτο μέσα στο κύτταρο και όχι συγκροτημένο με τη μορφή πυρήνα [12].



Εικόνα 8: Δομή προκαρυωτικού κυττάρου [13].

### 3.2.1 Μικροοργανισμοί

Οι μικροοργανισμοί είναι μια μεγάλη και πολυποίκιλη ομάδα μικροσκοπικών οργανισμών που διαβιούν είτε ως ανεξάρτητοι μονοκύτταροι οργανισμοί, είτε ως ομάδες κυττάρων. Σε αυτήν την ομάδα ανήκουν και οι ιοί καθώς είναι μικροσκοπικοί, αλλά δεν είναι κύτταρα. Τα μικροβιακά κύτταρα διαφέρουν, επομένως, από τα κύτταρα των ζώων και των φυτών, καθώς είναι ανίκανα να επιβιώσουν παρά μόνον ως τμήματα ενός πολυκύτταρου οργανισμού. Σε αντίθεση με τους μακροοργανισμούς, οι μικροοργανισμοί είναι γενικά ικανοί να επιτελούν τις διαδικασίες της αύξησης, της παραγωγής ενέργειας, και της αναπαραγωγής, ανεξάρτητα από άλλα κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους [14].



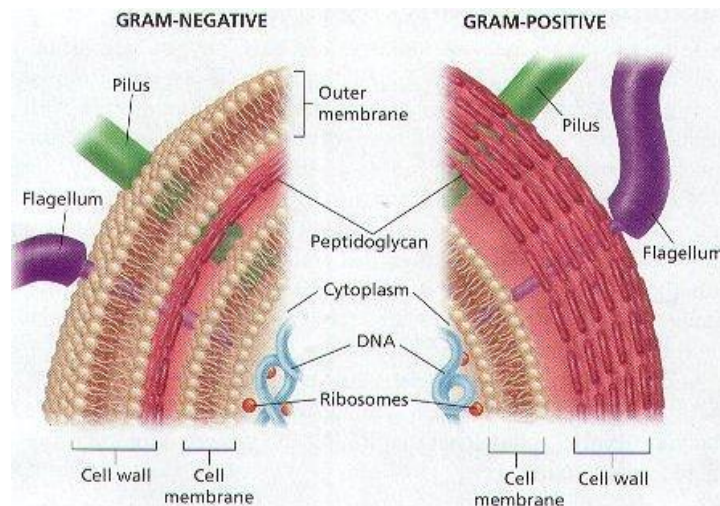
**Εικόνα 9:** Ενδεικτικό διάγραμμα συγκριτικών μεγεθών οργανισμών και μη [15].

### 3.3 Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι απλοί μονοκύτταροι προκαρυωτικοί οργανισμοί που έχουν διάμετρο 0,1-0,2  $\mu\text{m}$  αλλά φτάνουν έως και άνω των 50  $\mu\text{m}$ . Η μορφολογία των βακτηρίων ποικίλει: α) ένα σφαιρικό ή ωοειδές βακτήριο καλείται κόκκος, β) ένα κυλινδρικό καλείται ραβδί, ενώ γ) μερικά ραβδιά που εμφανίζουν καμπυλότητες και συχνά, έλικες, ονομάζονται σπειράματα.

Με βάση την τεχνική χρώση κατά Gram, τα βακτήρια διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: θετικά κατά Gram και αρνητικά κατά Gram. Μετά την εφαρμογή της δοκιμασίας κατά Gram, τα θετικά κατά Gram βακτήρια αποκτούν ιώδες χρώμα, ενώ τα αρνητικά κατά Gram ρόδινο-ερυθρό. Αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στη διαφορά δομής του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ θετικών κατά Gram και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.

Όπως δείχνει και το παρακάτω σχήμα, η διαφορά στην εμφάνιση του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων είναι χαρακτηριστική. Τα τοιχώματα του αρνητικού κατά Gram κυττάρου είναι μια δομή πολύστιβη και πολυσύνθετη, ενώ το τοίχωμα του θετικού κατά Gram κυττάρου είναι παχύτερο και συγκροτείται κυρίως από έναν τύπο μορίου [14].



**Εικόνα 10:** Σχεδιάγραμμα θετικών και αρνητικών κατά Gram κυτταρικών τοιχωμάτων[16].

Τα κυτταρικά τοιχώματα των βακτηρίων έχουν μια στοιβάδα άκαμπτη, που είναι κυρίως υπεύθυνη για τη στερεότητα του τοιχώματος. Εξωτερικά της στοιβάδας αυτής υπάρχει, στα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, και μια σειρά επιπρόσθετων στοιβάδων. Η άκαμπτη στοιβάδα τόσο των αρνητικών κατά Gram όσο και των θετικών κατά Gram βακτηρίων έχουν παραπλήσια χημική σύσταση. Πρόκειται για μια στοιβάδα από πεπτιδογλυκάνη, δηλαδή για ένα λεπτό στρώμα που συντίθεται από δύο παράγωγα σακχάρων, την N-ακετυλογλυκοζαμίνη και το N-ακετυλομουραμικό οξύ και από μια μικρή ομάδα αμινοξέων

Πολλά θετικά κατά Gram βακτήρια έχουν ενσωματωμένους στο κυτταρικό τους τοίχωμα όξινους πολυσακχαρίτες, που ονομάζονται τειχικά οξέα ( teichoic acids). Με τον όρο τειχικά οξέα εννοούνται όλα τα πολυμερή (τοιχώματος, μεμβράνης, ή κάψας) τα οποία περιέχουν κατάλοιπα φωσφορικής γλυκερόλης ή φωσφορικής ριβιτόλης. Λόγω του αρνητικού τους φορτίου τα τειχικά οξέα συνεισφέρουν σημαντικά στο αρνητικό φορτίο που εμφανίζει συνολικά η κυτταρική επιφάνεια και μπορεί να λειτουργούν κατά τρόπο που να επιτρέπει ή όχι την διέλευση ιόντων μέσω του κυτταρικού τοιχώματος.

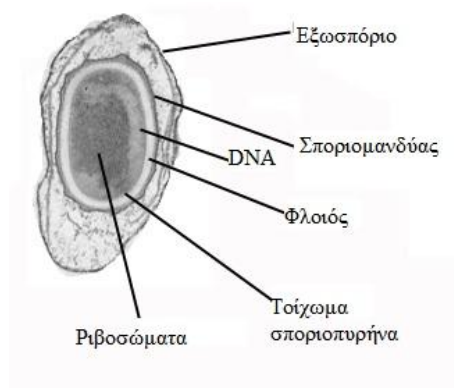
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, εκτός της πεπτιδογλυκάνης περιέχουν και μια πρόσθετη επίστρωση τοιχώματος αποτελούμενη από λιποπόλυσακχαρίτες (LPS). Λόγω των φωσφολιπιδίων, από τους οποίους αποτελείται κυρίως αυτή η μεμβράνη, τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, όπως τα θετικά κατά Gram, είναι στην επιφάνειά τους αρνητικά φορτισμένα.

### 3.3.1 Ενδοσπόρια

Ορισμένα είδη θετικών κατά Gram βακτηρίων παράγουν, κατά τη διεργασία της λεγόμενης σπορίωσης, ειδικές ενδοκυτταρικές δομές που καλούνται ενδοσπόρια. Τα ενδοσπόρια είναι διαφοροποιημένα κύτταρα, με ιδιαίτερη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και ανθεκτικότητα έναντι πολλών χημικών αντιδραστηρίων που καταστρέφουν τα συνήθη κύτταρα. Βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια απαντούν πολύ συχνά μεταξύ των εδαφο-βακτηρίων και, ουσιαστικά κάθε δείγμα χώματος που παίρνει κανείς περιέχει κάποια ποσότητα ενδοσπορίων. Διεξοδικότερα μελετημένα από τα βακτήρια αυτά είναι τα γένη *Bacillus* και *Clostridium*.

Σπόρια σχηματίζουν και άλλοι οργανισμοί, όμως το βακτηριακό ενδοσπόριο έχει μοναδική θερμοαντοχή. Τα ενδοσπόρια είναι επίσης ανθεκτικά σε μια σειρά επιβλαβείς παράγοντες όπως είναι η ξήρανση, η ακτινοβολήση, τα οξέα, και τα χημικά απολυμαντικά, ενώ μπορούν να επιβιώνουν, σε λανθάνουσα φάση, για εξαιρετικά μεγάλες χρονικές περιόδους.

Η δομή του σπορίου είναι διαφορετική από αυτήν του βλαστικού κυττάρου. Είναι δομικά πολυπλοκότερο, καθώς διαθέτει πολλές στοιβάδες που απουσιάζουν από το βλαστικό κύτταρο. Η εξώτατη στοιβάδα είναι το εξωσπόριο, ένα λεπτό, εύθραυστο πρωτεϊνικό κάλυμμα. Το εξωσπόριο περικλείει τους σποριομανδύες, που συνίστανται από τις στοιβάδες ειδικών πρωτεϊνών. Κάτω από τον σποριομανδύα είναι ο φλοιός, από χαλαρά διασυνδεδεμένη πεπτιδογλυκάνη, και – εσωτερικότερα- ο σποριοπυρήνας ή πρωτοπλάστης σπορίου, που περιέχει το σύνηθες κυτταρικό τοίχωμα, κυτταροπλασματική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα, πυρηνοειδές κ.ο.κ. Το σπόριο επομένως, διαφέρει από το βλαστικό κύτταρο κυρίως ως προς τα είδη των δομών που βρίσκονται εξωτερικά του τοιχώματος του σποριοπυρήνα. Μια χημική ουσία χαρακτηριστική των ενδοσπορίων η οποία απουσιάζει από τα βλαστικά κύτταρα, είναι το διπικολινικό οξύ. Η ουσία αυτή βρίσκεται σε όλα τα ενδοσπόρια και εντοπίζεται στον σποριοπυρήνα. Τα σπόρια περιέχουν επίσης υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου, το οποίο είναι συνδεδεμένο- κατά το μεγαλύτερο μέρος του- με διπικολινικό οξύ [14].



**Εικόνα 11:** Δομή βακτηριακού ενδοσπορίου [17].

Ο σποριοπυρήνας του ώριμου ενδοσπορίου διαφέρει σημαντικά από το βλαστικό κύτταρο από το οποίο προέρχεται. Εκτός από το άφθονο διπικολινικό ασβέστιο που περιέχει, ο σποριοπυρήνας βρίσκεται σε μερικώς αφυδατωμένη κατάσταση. Ο σποριοπυρήνας του ώριμου ενδοσπορίου περιέχει μόλις 10-30% της ποσότητας νερού που περιέχει το βλαστικό κύτταρο. Η αφυδάτωση του σποριοπυρήνα αυξάνει σημαντικά την θερμοανθεκτικότητα του ενδοσπορίου και επίσης προσδίδει αντοχή έναντι χημικών παραγόντων. Επίσης, το pH του κυτταροπλάσματος του σποριοπυρήνα είναι 1 μονάδα περίπου χαμηλότερο από το pH του βλαστικού κυττάρου.

Κατά το σχηματισμό του ενδοσπορίου, το βλαστικό κύτταρο μετατρέπεται σε μη αυξανόμενη, θερμοανθεκτική δομή. Η σπορίωση περιλαμβάνει μια πολύπλοκη σειρά συμβάντων κυτταρικής διαφοροποίησης. Βακτηριακή σπορίωση δεν μπορεί να συμβεί κατά την εκθετική φάση των κυτταρικών διαιρέσεων, αλλά μόνον όταν η αύξηση ανασταλεί λόγω εξάντλησης μιας θρεπτικής ουσίας. Κύτταρα του γένους *Bacillus*, παραδείγματος χάριν, ενός τυπικού ενδοσποριογονικού βακτηρίου, σταματούν τη βλαστική φάση αύξησης και αρχίζουν τη διαδικασία σπορίωσης, όταν καταστεί περιοριστική η παροχή μιας σημαντικής θρεπτικής ουσίας, όπως του άνθρακα ή του αζώτου.

Ένα ενδοσπόριο μπορεί να παραμείνει σε λανθάνουσα φάση για πολλά χρόνια, αλλά μπορεί και να μετατρέπεται, με σχετικά μεγάλη ταχύτητα, σε βλαστικό κύτταρο. Η διαδικασία μετατροπής του ενδοσπορίου σε βλαστικό κύτταρο περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια: *ενεργοποίηση, εκβλάστηση και αυξητική έκρηξη*.

### **3.3.2 Μικροβιακή θρέψη και αύξηση**

Τα κύτταρα αποτελούνται κυρίως από νερό και μακρομόρια, όπου τα τελευταία με τη σειρά τους συνίσταται από μικρότερες ομάδες που ονομάζονται μονομερή. Η μικροβιακή θρέψη είναι στην ουσία η τροφοδοσία των κυττάρων με χημικά συστατικά απαραίτητα για τη δόμηση των μονομερών. Τα συστατικά αυτά λέγονται θρεπτικές ουσίες. Οι διάφοροι οργανισμοί χρειάζονται διαφορετικές ομάδες θρεπτικών ουσιών και συχνά χρειάζονται τις ουσίες αυτές στη μια ή στην άλλη συγκεκριμένη χημική δομή. Οι θρεπτικές ουσίες δεν είναι απαραίτητες όλες στις ίδιες ποσότητες: μερικές, που καλούνται μακροτροφικές ουσίες, είναι αναγκαίες σε μεγάλες ποσότητες, ενώ άλλες, οι μικροτροφικές ουσίες, απαιτούνται σε μικρότερες ποσότητες, μερικές φορές ακόμα και σε ίχνη.

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

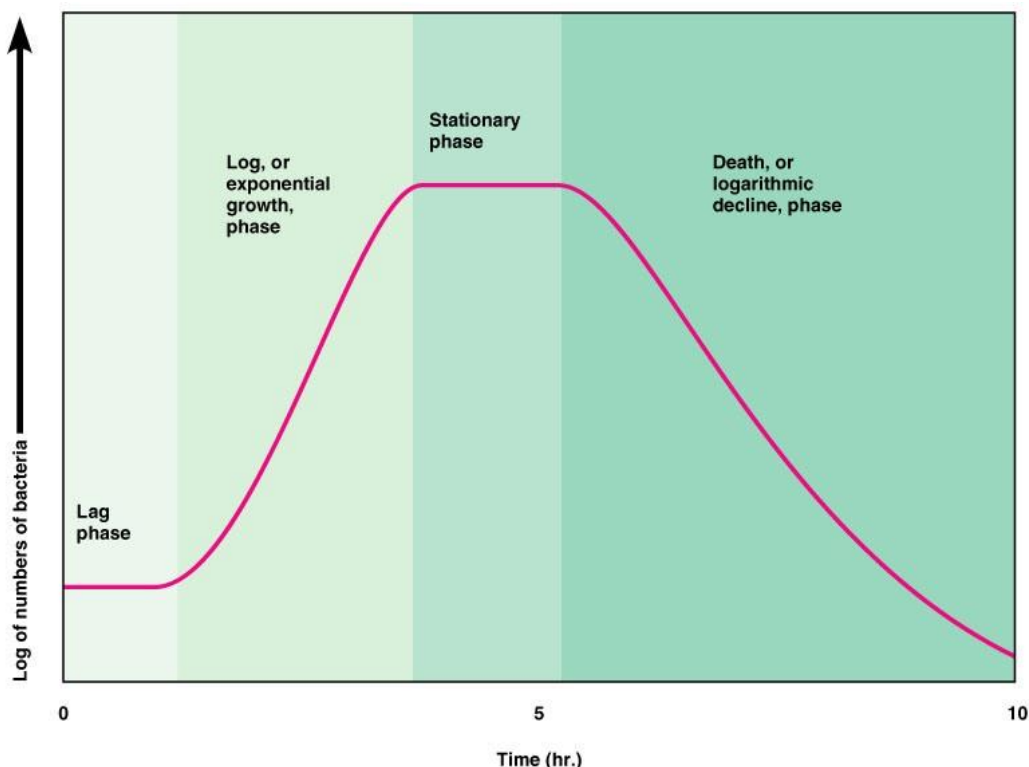


Το βακτηριακό κύτταρο είναι μια σύνθετη μηχανή που έχει την ικανότητα να αναπαράγεται. Η σύνθετη διαδικασία της βακτηριακής αύξησης περιλαμβάνει πάνω από 2000 χημικές αντιδράσεις πολλών ειδών. Οι κύριες αντιδράσεις που οδηγούν στη σύνθεση του κυττάρου είναι αντιδράσεις πολυμερισμού. Μόλις συντεθούν τα πολυμερή, το κύτταρο εισέρχεται στο τελικό στάδιο της κυτταρικής αύξησης: συναρμολόγηση των μακρομορίων και σχηματισμός κυτταρικών δομών, όπως είναι το κυτταρικό τοίχωμα, η κυτταροπλασματική μεμβράνη κ.λπ.

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

### 3.3.3 Ο κύκλος της αύξησης

Σε ένα κλειστό σύστημα καλλιέργειας, που αποκαλείται κλειστή καλλιέργεια, η τυπική καμπύλη αύξησης είναι εκείνη που παρουσιάζεται στο παρακάτω διάγραμμα. Αυτή η καμπύλη αύξησης μπορεί να διακριθεί σε επιμέρους φάσεις, που φέρουν τις ονομασίες: *φάση υστέρησης*, *φάση εκθετικής αύξησης*, *στάσιμη φάση* και *φάση θανάτου* [14].



**Εικόνα 12:** Τυπική καμπύλη αύξησης ενός βακτηριακού πληθυσμού. Log βιώσιμων οργανισμών/ml συναρτήσει του χρόνου [18].

#### Φάση υστέρησης (lag phase)

Όταν ένας μικροβιακός πληθυσμός ενοφθαλμίζεται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο, η ανάπτυξη δεν αρχίζει αμέσως, αλλά ύστερα από μια περίοδο που ονομάζεται φάση υστέρησης. Η φάση αυτή μπορεί να είναι σύντομη ή παρατεταμένη, ανάλογα με το ιστορικό και τις συνθήκες της καλλιέργειας. Αν μια καλλιέργεια που αυξάνεται εκθετικά ενοφθαλμιστεί στο ίδιο θρεπτικό μέσο και υπό τις ίδιες συνθήκες, τότε δεν παρατηρείται η φάση υστέρησης, αλλά η εκθετική αύξηση αρχίζει αμέσως.

#### Φάση εκθετικής αύξησης (log, ή exponential growth, phase)

Η φάση κατά την οποία ο αριθμός των κυττάρων διπλασιάζεται στη μονάδα του χρόνου. Δηλαδή, κάθε κύτταρο διαιρείται για να δώσει νέα κύτταρα, που το κάθε ένα ξαναδιαίρεται για να δώσει δύο πρόσθετα κύτταρα κ.ο.κ. Τα κύτταρα της εκθετικής φάσης βρίσκονται συνήθως στην πλέον υγιή τους κατάσταση, επομένως τα κύτταρα στο μέσο της φάσης αυτής είναι ιδεώδη για τη μελέτη των ενζύμων ή άλλων κυτταρικών συστατικών.

#### Στάσιμη φάση (stationary phase)

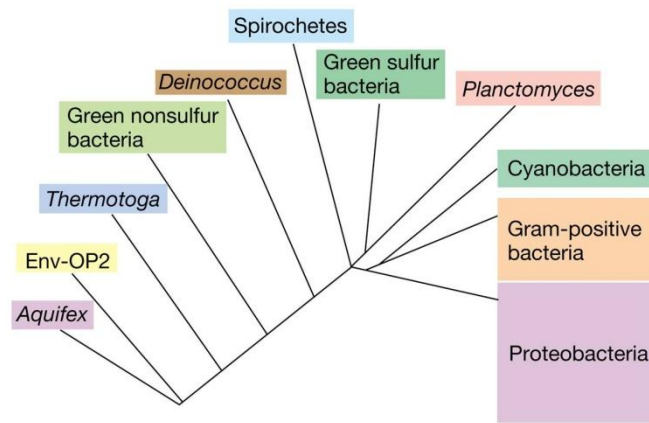
Όταν εξαντληθεί ένα ουσιώδες θρεπτικό συστατικό ή γίνει συσσώρευση κάποιου άχρηστου κατάλοιπου των λειτουργιών του οργανισμού σε τέτοιο βαθμό ώστε να δρα ανασταλτικά ή γίνουν και τα δύο, η εκθετική αύξηση τερματίζεται, και ο μικροβιακός πληθυσμός φθάνει στην στάσιμη φάση. Στην φάση αυτή δεν παρατηρείται καθαρή αύξηση ή μείωση του αριθμού των κυττάρων. Ωστόσο, αν και δεν παρατηρείται αύξηση, πολλές κυτταρικές λειτουργίες ενδεχομένως συνεχίζονται.

#### Φάση θανάτου (death, ή logarithmic decline, phase)

Αν η επώαση συνεχίζεται και αφού ο πληθυσμός φθάσει στη στάσιμη φάση, τα κύτταρα μπορεί είτε να παραμείνουν ζωντανά και να συνεχίζουν το μεταβολισμό, είτε να νεκρωθούν. Αν συμβεί αυτό, τότε ο πληθυσμός βρίσκεται στη φάση θανάτου. Σε πολλές περιπτώσεις ο θάνατος συνοδεύεται από τη λύση των κυττάρων.

### **3.3.4 Η φυλογενετική των βακτηρίων**

Από μελέτες καλλιέργειών στο εργαστήριο είναι γνωστές τουλάχιστον 17 μείζονες γενεαλογικές γραμμές (φύλα) βακτηρίων, ενώ πολλές άλλες έχουν ταυτοποιηθεί με την απομόνωση και την αλληλούχιση ριβοσωματικών βακτηριακών γονιδίων RNA από φυσικά ενδιαίτηματα. Η παρακάτω εικόνα προσφέρει μια γενική φυλογενετική επισκόπηση των βακτηρίων.



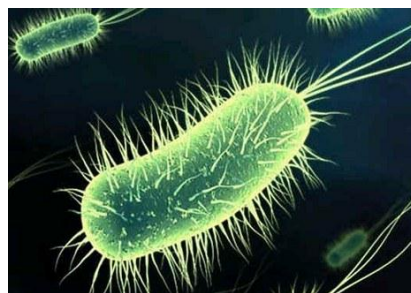
**Εικόνα 13:** Γενική φυλογενετική επισκόπηση βακτηρίων, βασισμένο σε συγκρίσεις των αλληλουχιών του ριβοσωματικού RNA 16S.

### 3.3.4.1 Εντερικά βακτήρια

Τα εντερικά βακτήρια είναι αρνητικά κατά Gram, μη σποριογόνια, ραβδόμορφα, ακίνητα ή αυτοκινητόμενα με περίτριχα μαστίγια, προαιρετικώς αερόβια. Μεταξύ των εντερικών βακτηρίων υπάρχουν παθογόνα για τον άνθρωπο, για ζώα, ή για φυτά, καθώς και άλλα στελέχη βιομηχανικής σημασίας. Αναμφίβολα, για την *Escherichia coli* διατίθενται οι περισσότερες γνώσεις από κάθε άλλο είδος βακτηρίου.

#### 3.3.4.1.1 *Escherichia coli*

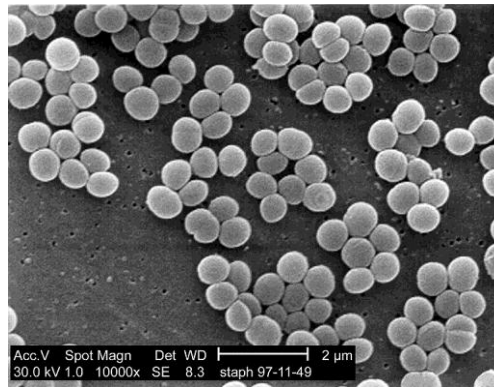
Μέλη του γένους *Escherichia* είναι κάτοικοι του εντερικού συστήματος του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων, με σχεδόν παγκόσμια εξάπλωση, αν και σε καμία περίπτωση δεν είναι οι κυρίαρχοι οργανισμοί των ενδιαιτημάτων αυτών. Το γένος *Escherichia* μπορεί να παίξει κάποιο ρόλο στη θρέψη, συνθέτοντας βιταμίνες, ιδιαίτερα βιταμίνη Κ. Ως προαιρετικά αερόβιος, ο οργανισμός αυτός ίσως βοηθά στην κατανάλωση του οξυγόνου, καθιστώντας έτσι το παχύ έντερο ανοξικό. Στελέχη άγριου τύπου του γένους αυτού σπάνια έχουν απαιτήσεις για αυξητικούς παράγοντες, ενώ είναι ικανά να αναπτυχθούν με μεγάλη ποικιλία πηγών άνθρακα και ενέργειας, όπως π.χ. σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και άλλα. Ορισμένα στελέχη του γένους αυτού είναι παθογόνα. Τα τελευταία έχουν συσχετισθεί με διάρροιες σε βρέφη και περιστασιακά προκαλούν επιδημίες σε μαιευτήρια και γυναικολογικές κλινικές [14].



**Εικόνα 14:** *Escherichia coli*[19].

### 3.3.4.2 Το γένος *Staphylococcus*

Τα είδη του γένους *Staphylococcus* είναι θετικά κατά Gram, προαιρετικά αερόβια με τυπικό αναπνευστικό μεταβολισμό βακτήρια. Οι θετικοί κατά Gram κόκκοι είναι σχετικά ανθεκτικοί στο μειωμένο υδατικό δυναμικό και ανέχονται αρκετά καλά την ξήρανση και τις υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων. Οι σταφυλόκοκκοι είναι συνήθη παράσιτα των ανθρώπων και άλλων θηλαστικών, και περιστασιακά προκαλούν σοβαρές μολύνσεις [14].



Εικόνα 15: *Staphylococcus*[20].

### 3.3.4.3 Το γένος *Bacillus*

Τα είδη του γένους *Bacillus* είναι θετικά κατά Gram, ραβδόμορφα, αερόβια ή προαιρετικά αερόβια βακτήρια με δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων. Πολλά είδη αυτού του γένους παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα φυσικών ιδιοτήτων που τους επιτρέπουν να ζουν σε κάθε περιβάλλον[21].

Τα βακτήρια του γένους *Bacillus* αναπτύσσονται συνήθως καλά σε τεχνητά μέσα που περιέχουν κάποια πηγή άνθρακα από μια ποικιλία τέτοιων πηγών. Παράγουν εξωκυτταρικά υδρολυτικά ένζυμα που διασπών σύνθετα πολυμερή, όπως πολυσακχαρίτες, νουκλεϊκά οξέα, και λιπίδια, επιτρέποντας στους οργανισμούς αυτούς να χρησιμοποιούν τα συγκεκριμένα προϊόντα ως πηγές άνθρακα και δότες ηλεκτρονίων. Πολλοί βάκιλλοι παράγουν αντιβιοτικά, όπως π.χ. βακιτρακίνη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η παραγωγή αντιβιοτικών σχετίζεται με τη διαδικασία της σπορίωσης: το αντιβιοτικό απελευθερώνεται όταν η καλλιέργεια εισέλθει στη στάσιμη φάση της ανάπτυξης, αφού ξεκινήσει η σπορίωση.

Όλα τα βακτήρια που σχηματίζουν ενδοσπόρια, όπως και το γένος *Bacillus*, συνδέονται φυλογενετικά με τα “χαμηλού ποσοστού G+C” θετικά κατά Gram βακτήρια. Τα βακτήρια του γένους αυτού απαντούν κυρίως στο έδαφος. Παρόλο που το περιβάλλον του εδάφους παρουσιάζει μεγάλη ποικιλομορφία ως προς τα επίπεδα θρεπτικών ουσιών, τη θερμοκρασία και την ενεργότητα του νερού, τα βακτήρια επιβιώνουν λόγω της ικανότητάς τους να σχηματίζουν ενδοσπόρια.

### 3.4 Επαγόμενη μικροβιακή κατακρήμνιση ανθρακικών αλάτων (Microbially induced carbonate precipitation, MICP)

Όπως και άλλες βιολογικές μεταλλογενέσεις, έτσι και η κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου ( $\text{CaCO}_3$ ) μπορεί να συμβεί μέσω δύο μηχανισμών:

- 1) Τον ελεγχόμενο από το βακτήριο (βιολογικά ελεγχόμενο).
- 2) Το εξωτερικά ελεγχόμενο (επαγόμενος έλεγχος).

Στον βιολογικά ελεγχόμενο μηχανισμό ο ίδιος ο οργανισμός ελέγχει σε μεγάλο βαθμό την διαδικασία της κατακρήμνισης, δηλαδή την πυρήνωση και την ανάπτυξη των σωματιδίων του ορυκτού. Ο οργανισμός συνθέτει ορυκτά σε μια μορφή που είναι μοναδική για κάθε είδος, ανεξάρτητα από τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Από την άλλη μεριά, η παραγωγή ανθρακικού ασβεστίου από το βακτήριο χαρακτηρίζεται ως επαγόμενη, όταν ο τύπος του ορυκτού που παράγεται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Διαφορετικοί τύποι βακτηριδίων, καθώς και αβιοτικοί παράγοντες (όπως η αλατότητα και η σύνθεση του θρεπτικού υλικού) φαίνεται να συνεισφέρουν στις διαφορετικούς μηχανισμούς κατακρήμνισης στα διάφορα περιβάλλοντα.

Η κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  είναι μια αμφίδρομη χημική διαδικασία ελεγχόμενη κυρίως από τέσσερις παράγοντες:

1. Την συγκέντρωση του ασβεστίου.
2. Την συγκέντρωση των διαλυμένων ανόργανων ανθρακικών ιόντων (Dissolved inorganic carbon, DIC).
3. Το pH.
4. Την διαθεσιμότητα των κέντρων πυρήνωσης.

Η συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων σχετίζεται με την συγκέντρωση των DIC και το pH του υδατικού διαλύματος. Επιπλέον, η συγκέντρωση των διαλυμένων ανόργανων ανθράκων εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η μερική πίεση του  $\text{CO}_2$  (για συστήματα εκτεθειμένα στην ατμόσφαιρα). Οι αντιδράσεις και οι σταθερές ισορροπίας που ρυθμίζουν την διάλυση  $\text{CO}_2$  σε υδατικά διαλύματα ( $25^\circ\text{C}$ , 1 atm) δίνονται από τις παρακάτω εξισώσεις:





Με  $\text{H}_2\text{CO}_3 = \text{CO}_2(\text{aq.}) + \text{H}_2\text{CO}_3$

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να επηρεάσουν την κατακρήμνιση του ανθρακικού ασβεστίου αλλάζοντας σχεδόν καθένα από τους παραπάνω παράγοντες που περιγράφηκαν είτε ξεχωριστά τον καθένα, είτε σε συνδυασμό διαφόρων από αυτούς. Παρ' όλα αυτά, πρωταρχικό ρόλο παίζει η ικανότητά τους να δημιουργούν αλκαλικό περιβάλλον μέσω διαφόρων φυσικών δραστηριοτήτων. Για τη δημιουργία τέτοιου περιβάλλοντος συμμετέχουν τόσο αυτοτροφικές όσο και ετεροτροφικές πορείες[22].

Γενικά, υπάρχουν τρεις μηχανισμοί που σχετίζονται με την βίο-κατακρήμνιση του ανθρακικών ιόντων. Ο πρώτος είναι η οξειδωτική απαμίνωση αμινοξέων (ODAA: oxidative deamination of amino acids). Δεύτερος μηχανισμός είναι η αξιοποίηση οργανικών οξέων (OAU: organic acid utilization). Ο τελευταίος μηχανισμός σχετίζεται με τον κύκλο του αζώτου, και έχει να κάνει με την υδρόλυση της ουρίας (HU: hydrolysis of urea)[23].

Τα βακτήρια μπορούν να επηρεάσουν την κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου από τη δράση τους ως κέντρα πυρηνοποίησης ή από τον εμπλουτισμό τους με  $\text{Ca}^{2+}$ . Λόγω της παρουσίας αρνητικών φορτισμένων ομάδων στην επιφάνεια των κυττάρων σε ουδέτερο pH, θετικά φορτισμένα ιόντα μπορούν να συνδεθούν στην επιφάνεια των βακτηριδίων.

Τέτοια μεταλλικά ιόντα (π.χ.  $\text{Ca}^{2+}$ ) μπορούν ύστερα να αντιδράσουν με ανιόντα (π.χ.  $\text{CO}_3^{2-}$ ) και να σχηματιστούν αδιάλυτα άλατα (π.χ.  $\text{CaCO}_3$ ). Όταν υπάρχει επαρκής περίσσεια των απαιτούμενων κατιόντων και ανιόντων, ξεκινά στην επιφάνεια του κυττάρου ο σχηματισμός του ορυκτού, καθώς ο οργανισμός δρα ως κέντρο πυρηνοποίησης. Τα ανιόντα μπορούν είτε να είναι προϊόντα του μεταβολισμού του βακτηριδίου είτε να υπάρχουν στο εξωτερικό περιβάλλον[22].

### 3.4.1 Μικροβιακή κατακρήμνιση $\text{CaCO}_3$ μέσω της διάσπασης της ουρίας

Η βακτηριακή διάσπαση της ουρίας αυξάνει τοπικά το pH και οδηγεί στην μικροβιακή εναπόθεση του  $\text{CO}_2$  ως  $\text{CaCO}_3$  σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε ασβέστιο.

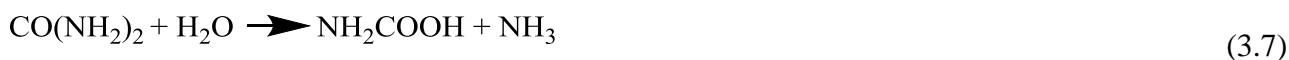
Η βασική αντίδραση είναι:



Ο υπεύθυνος παράγοντας για την κατακρήμνιση του  $\text{CaCO}_3$  είναι ο βαθμός υπερκορεσμού S, ο οποίος προσδιορίζεται από την αναλογία των ιοντικών παραγόντων:

$$S = [\text{Ca}^{2+}] \cdot [\text{CO}_3^{2-}] / K_{s0} \quad (3.6)$$

Μέσω της δράσης της μικροβιακής ουρεάσης, 1 mol ουρίας υδρολύεται στο εσωτερικό του κυττάρου σε 1 mol NH<sub>3</sub> και 1mol καρβαμιδίου, το οποίο στη συνέχεια αυθόρμητα υδρολύεται και δίνει 1 επιπλέον mol NH<sub>3</sub> και ανθρακικό οξύ.



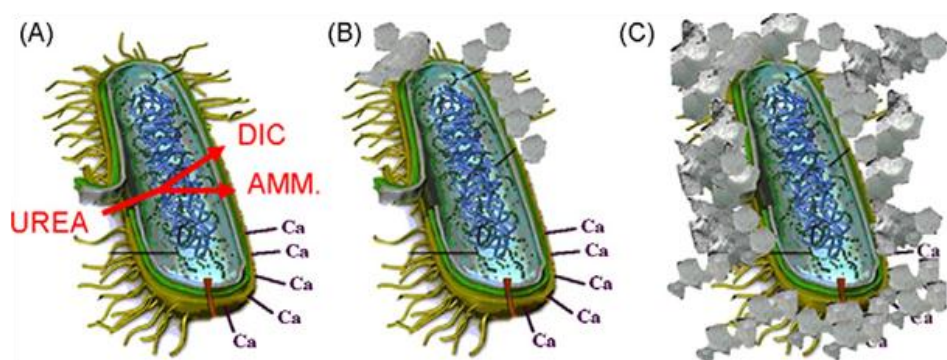
Στη συνέχεια, αυτά τα προϊόντα δίστανται στο νερό προς σχηματισμό ενός mol όξινου ανθρακικού ιόντος και 2 mol αμμωνίου και ιόντων υδροξυλίου (εξισώσεις 3.9 και 3.10).



Οι τελευταίες αντιδράσεις αυξάνουν ακόμα περισσότερο το pH, το οποίο βοηθάει στο σχηματισμό ανθρακικών ιόντων (εξίσωση 3.11). Αυτή η αύξηση του pH λαμβάνει πρώτα χώρα στο τοπικό μικρο-περιβάλλον του βακτηριακού τοιχώματος, και στη συνέχεια διαδίδεται στο κύριο διάλυμα του βακτηριακού αιωρήματος.



Έτσι, καθώς η συγκέντρωση των ανθρακικών ιόντων αυξάνεται, προκαλείται και μια αύξηση του S σύμφωνα με την εξίσωση 3.6. Τελικά, σε ένα περιβάλλον με διαλυτά Ca<sup>2+</sup> παρατηρείται κατακρήμνιση CaCO<sub>3</sub> περιμετρικά του κυττάρου[24].



**Εικόνα 16:** Απλοποιημένη αναπαράσταση της κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> μέσω διάσπασης της ουρίας.

Σύμφωνα με την Εικόνα 16, προσθέτοντας ουρία (urea) σε βακτηριακό διάλυμα, διαλυτά ανόργανα ανθρακικά ιόντα (DIC) και αμμώνια (AMM) απελευθερώνονται στο μικρο-περιβάλλον του βακτηρίου (στάδιο Α). Λόγω του αρνητικού φορτίου του τοιχώματος του βακτηρίου, πρόσθεση  $\text{Ca}^{2+}$  σε ένα τέτοιο διάλυμα, οδηγεί τα τελευταία στην προσκόλλησή τους στα τοιχώματα των βακτηρίων. Έτσι, παρουσία των  $\text{Ca}^{2+}$  μπορεί να εμφανιστεί τοπικός υπερκορεσμός που οδηγεί στην ετερογενή κατακρήμνιση του  $\text{CaCO}_3$  στα τοιχώματα του βακτηρίου (στάδιο Β). Μετά από λίγο, όλο το κύτταρο εγκλωβίζεται, περιορίζοντας έτσι την μεταφορά θρεπτικών ουσιών, οδηγώντας το σε θάνατο (στάδιο C)[22].

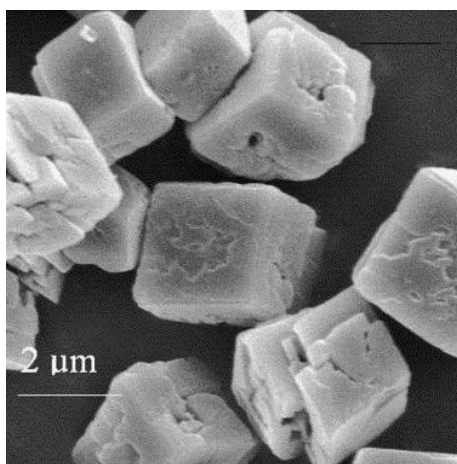
### 3.5 Κρυσταλλικότητα $\text{CaCO}_3$

Όταν ξεκινήσει η πυρήνωση του ορυκτού, το  $\text{CaCO}_3$  μπορεί να κατακρημνιστεί σε διάφορες μορφές: α) ως αυξανόμενος κρύσταλλος (δηλαδή καθαρή μορφή ορυκτού), β) ως άμορφο ίζημα (μίγμα ορυκτού και οργανικών μορίων, ή γ) ως ένας συνδυασμός και των δύο[25].

Το  $\text{CaCO}_3$  μπορεί να υφίσταται σε έξι διαφορετικές κρυσταλλικές δομές. Η άμορφη και οι δύο ένυδρες (διένυδρη-εξαένυδρη) αποτελούν μορφές οι οποίες είναι πιο σπάνιες στην εμφάνισή τους λόγω της χημικής αστάθειά τους. Οι υπόλοιπες τρεις μορφές είναι άνυδρες κρυσταλλικές και χαρακτηρίζονται από την συχνή τους εμφάνιση στη φύση και στους ζωντανούς οργανισμούς.

Οι τρεις άνυδρες κρυσταλλικές μορφές του ανθρακικού ασβεστίου κατά σειρά φθίνουσας θερμοδυναμικής σταθερότητας και αυξανόμενης διαλυτότητας, είναι οι ακόλουθες: ασβεστίτης (calcite), αραγωνίτης (aragonite) και βατερίτης (vaterite)[26].

Η θερμοδυναμικά σταθερότερη φάση του άνυδρου κρυσταλλικού  $\text{CaCO}_3$ , ο ασβεστίτης αποτελεί περίπου το 7% του γήινου φλοιού είτε με τη μορφή του μαρμάρου, είτε με τη μορφή ορυκτών ασβεστολιθικών πετρωμάτων και συναντάται στον πυθμένα λιμνών-θαλασσών λόγω διαλυτοποίησης ασβεστιτικών πετρωμάτων [27].

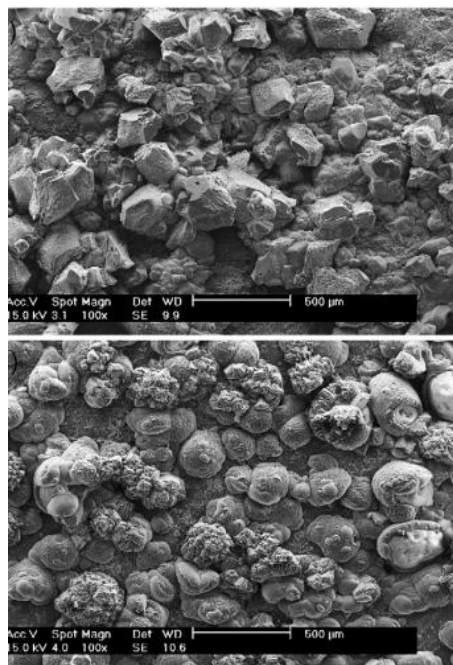


**Εικόνα 17:** Εικόνα SEM του  $\text{CaCO}_3$ [28].



Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω τα βακτήρια για να αναπτυχθούν χρειάζονται το κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Προσθέτοντας στο θρεπτικό υλικό ουσίες κατάλληλες μπορούμε να προκαλέσουμε την καταβύθιση ορυκτών, και στη συγκεκριμένη περίπτωση  $\text{CaCO}_3$ . Όταν το βακτήριο βρίσκεται σε περιβάλλον που περιέχει ουρία και  $\text{Ca}^{2+}$  τότε με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω παρουσιάζεται καταβύθιση του ανθρακικού ασβεστίου.

Ανάλογα με την πηγή ασβεστίου που χρησιμοποιείται η μορφή του κρυστάλλου  $\text{CaCO}_3$  αλλάζει. Στην περίπτωση που χρησιμοποιείται  $\text{CaCl}_2$  ως πηγή ασβεστίου τότε εμφανίζονται ρομβοεδρικοί κρύσταλλοι. Ενώ, προσθέτοντας  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  παρατηρούνται σφαιροειδή κρύσταλλοι. Στην παρακάτω εικόνα φαίνεται καθαρά η διαφορά των μορφών του κρυστάλλου  $\text{CaCO}_3$  χρησιμοποιώντας διαφορετική πηγή ασβεστίου.



**Εικόνα 18:** SEM κρύσταλλοι  $\text{CaCO}_3$  σε διαφορετική πηγή ασβεστίου. Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιείται ως πηγή ασβεστίου το  $\text{CaCl}_2$ , ενώ στη δεύτερη το  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ [22].



# 4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

*ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ  
ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΑΥΤΟΙΑΣΗΣ  
ΣΚΥΡΟΔΕΜΑΤΟΣ ΜΕΣΩ  
ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ*



## 4.1 Γενικά για την αυτοϊαση σκυροδέματος από βακτήρια

Καθώς τα συνθετικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται στις μέρες μας για την αποκατάσταση φθορών στο τσιμέντο μπορεί να μολύνουν το περιβάλλον, μια βιολογική προσέγγιση μπορεί να είναι μια πολλά υποσχόμενη λύση. Ουρεολυτικό βακτήριο, όπως ο *Bacillus sphaericus*, είναι ικανό να κατακρημνίζει  $\text{CaCO}_3$  στο μικρο-περιβάλλον του μέσω της διάσπαση της ουρίας σε  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{CO}_3^{2-}$ . Η διάσπαση της ουρίας αυξάνει τοπικά το pH και προάγει τη καταβύθιση του  $\text{CO}_3^{2-}$  ως  $\text{CaCO}_3$  σε ένα περιβάλλον πλούσιο σε ιόντα ασβεστίου. Με τον τρόπο αυτό πληρούνται οι ρωγμές του τσιμέντου και τελικά επιτυγχάνεται επούλωσή του [29].

## 4.2 Γενικά για την διάβρωση του σκυροδέματος

Η ανάπτυξη ρωγμών στο τσιμέντο είναι κοινό φαινόμενο, λόγω της σχετικά χαμηλής αντοχής σε εφελκυσμό. Υψηλές τάσεις εφελκυσμού μπορεί να είναι αποτέλεσμα από εξωτερικά φορτία, επιβαλλόμενες παραμορφώσεις (μέσω των εναλλαγών θερμοκρασίας, την περιορισμένη συστολή και την διαφορική καθίζηση) και εκτεταμένους παράγοντες (όπως λόγω της διάβρωσης του οπλισμού, κ.α.). Χωρίς την άμεση αντιμετώπισή τους και τον κατάλληλο χειρισμό τους, οι ρωγμές μπορούν να διαδοθούν περαιτέρω και η επισκευή να κοστίζει ακριβά. Αν οι μικρο-ρωγμές μεγαλώσουν και φτάσουν τον οπλισμό, όχι μόνο το τσιμέντο θα υποστεί βλάβη αλλά και ο ίδιος ο οπλισμός θα διαβρωθεί όταν εκτεθεί στο νερό και στο οξυγόνο, και πιθανόν στο διοξείδιο του άνθρακα και στα χλωριούχα άλατα. Επομένως, οι μικρο-ρωγμές αποτελούν πρόδρομο φαινόμενο στο να αποτύχει μια κατασκευή[30].

## 4.3 Μικροβιακή κατακρήμνιση $\text{CaCO}_3$ για την επούλωση ρωγμών στο σκυρόδεμα

Για την αντιμετώπιση των ρωγμών, χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές με τις παραδοσιακές τεχνικές να έχουν πληθώρα ελαττωμάτων, όπως διαφορετικούς θερμικούς συντελεστές διαστολής μεταξύ του σκυροδέματος και του περιβάλλοντος καθώς και επιπτώσεις στην υγεία. Έτσι λοιπόν, η βακτηριακή επαγόμενη κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου είχε προταθεί ως μια εναλλακτική και φιλική προς το περιβάλλον τεχνική. Το 1995 ο Gollapudi και οι συνεργάτες του, ήταν οι πρώτοι που εφάρμοσαν αυτήν την πρωτοποριακή τεχνική αντιμετώπισης των ρωγμών με φιλικές προς το περιβάλλον βιολογικές διαδικασίες [31, 32].

Όπως αναφέρθηκε στην Παράγραφο 3.4, η μικροβιακή κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου καθορίζεται από τα αδιάλυτα ανόργανα άλατα, το pH, την συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου και από τον αριθμό κέντρων πυρήνωσης. Οι τρεις πρώτοι παράγοντες παρέχονται από τον μεταβολισμό του βακτηρίου ενώ το ίδιο το κύτταρο του μικροοργανισμού παίζει του ρόλο του κέντρου πυρήνωσης [22, 24].

Το ουρεολυτικό βακτήριο διασπώντας την ουρία προσδίδει στο περιβάλλον  $\text{NH}_4^+$  και  $\text{CO}_3^{2-}$ . Οι αντίστοιχες αντιδράσεις αναπτύσσονται στην Παράγραφο 3.4.1. Έτσι λοιπόν, όπως έχει ήδη αναφερθεί, καθώς το κυτταρικό τοίχωμα του βακτηρίου είναι αρνητικά φορτισμένο, το βακτήριο έλκει κατιόντα από το περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων και των ιόντων ασβεστίου, και τα εναποθέτει στην κυτταρική επιφάνειά τους. Τα  $\text{Ca}^{2+}$  στη συνέχεια αντιδρούν με τα  $\text{CO}_3^{2-}$ , οδηγώντας έτσι στην κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  στην κυτταρική επιφάνεια η οποία χρησιμεύει ως κέντρο πυρήνωσης (εξισώσεις 4.1 και 4.2).



Διάφορα βακτήρια έχουν την ικανότητα να κατακρημνίσουν ανθρακικό ασβέστιο. Αυτά τα βακτήρια μπορούν να βρεθούν στο χώμα, στην άμμο, σε φυσικά ορυκτά, κ.α [33]. Σε αυτήν την μελέτη ο Jonker και οι συνεργάτες του [33, 34], χρησιμοποίησαν ως βακτήριο τον *Bacillus cohnii* για την καταβύθιση  $\text{CaCO}_3$ . *Bacillus pasteurii* χρησιμοποιήθηκε από τον Santhosh και τους συνεργάτες του [35], τον Day και τους συνεργάτες του [36], τον Bang και τους συνεργάτες του [37] και τον Ramakrishnan και τους συνεργάτες του [38], ενώ ο Dick και οι συνεργάτες του [24] χρησιμοποίησαν τους *Bacillus lentus* και *Bacillus sphaericus*. Η επιλογή αυτού του γένους βακτηρίου με την ικανότητα να σχηματίζει ενδοσπόρια μελετήθηκε σε συγκεκριμένη μελέτη [24]. Αυτό το είδος παρουσιάζει έντονη ουρεολυτική δραστηριότητα, συνεχόμενο σχηματισμό πυκνών κρυστάλλων  $\text{CaCO}_3$  και ένα πολύ αρνητικό ζ-δυναμικό.

Σε προαναφερθείσες μελέτες, η καταβύθιση ανθρακικού ασβεστίου χρησιμοποιήθηκε για την σταθεροποίηση κολώνων άμμου, για την επούλωση ρωγμών σε γρανίτη ή ως επιφανειακή εφαρμογή σε ασβεστόλιθο. Για αυτές τις εφαρμογές η χρήση βακτηρίου, για την κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου απέδειξε την αποτελεσματικότητά του. Παρόλα αυτά, όταν χρησιμοποιείται βακτήριο για την επούλωση ρωγμών στο σκυρόδεμα, ο καθοριστικότερος παρεμποδιστικός παράγοντας είναι το έντονο αλκαλικό pH του τσιμέντου, όπου παρεμποδίζει την ανάπτυξη του βακτηρίου. Γι αυτό το λόγο, είναι σημαντικό να σταθεροποιείται το βακτήριο και να προστατεύεται από το υψηλό pH του σκυροδέματος. Πολυουρεθάνες (PU) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως φορείς για την σταθεροποίηση ενζύμων αλλά και ολόκληρων κυττάρων, λόγω της μηχανικής αντοχής και την βιοχημική αδράνεια που παρουσιάζουν [36-39]. Ο Bang [37] χρησιμοποίησε κυλινδρικού σχήματος αφρό πολυουρεθάνης ( διαμέτρου 10 mm και μήκος 50mm) με ενσωματωμένα βακτηριακά κύτταρα. Οι λωρίδες αφρού πολυουρεθάνης τοποθετήθηκαν σε προσομοιωμένες ρωγμές και με αυτόν τον τρόπο χρησιμοποιήθηκαν ως μέθοδος αποκατάστασης ρωγμών. Από τη στιγμή που αυτή η μέθοδος είναι εξαρτώμενη από τον χρόνο και μόνο για φαρδύς ρωγμές (ο Bang και οι συνεργάτες του δημιούργησαν ρωγμές φάρδους 3,18 mm), εφαρμόστηκε σε άλλη μελέτη πυριτικό τζελ (silica gel) για την σταθεροποίηση βακτηρίων [40]. Το τζελ, με τα

ενσωματωμένα βακτήρια, μπορεί να ψεκαστεί απ' ευθείας στην ρωγμή με σήραγγα. Η silica gel είχε χρησιμοποιηθεί και παλιότερα ως πληρωτικό υλικό για την επούλωση ρωγμών πριν αρχίσει και χρησιμοποιείται η κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες για την βακτηριακή κατακρήμνιση ανθρακικού ασβεστίου με χλωριούχο ασβέστιο ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ως πηγή ασβεστίου [41]. Καθώς τα ιόντα χλωρίου μπορεί να είναι ζημιογόνα για τον οπλισμό η χρήση νιτρικού ασβεστίου ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) και οξικού ασβεστίου ( $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ως εναλλακτικές πηγές ασβεστίου μελετήθηκαν σε εργασία [41].





# 5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## *ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ*



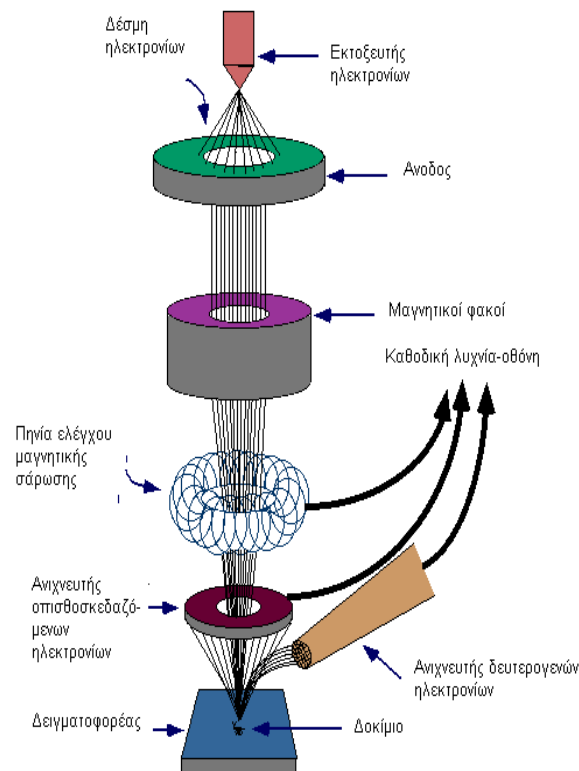
## 5.1 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning electron microscopy, SEM)

Η Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) είναι μία από τις σύγχρονες και ευέλικτες μεθόδους ανάλυσης της μικροδομής μεγάλου αριθμού υλικών.

Στο σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο η επιφάνεια στερεού δείγματος σαρώνεται παλινδρομικά με δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Με την διαδικασία αυτή λαμβάνονται πολλά είδη σημάτων από την επιφάνεια, όπως οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, ηλεκτρόνια Auger, φωτόνια φθορισμού ακτίνων X και άλλα φωτόνια διαφόρων ενεργειών. Όλα τα σήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για μελέτες επιφανειών, όμως τα πιο συνηθισμένα είναι τα οπισθοσκεδαζόμενα και τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία αποτελούν την βάση της τεχνικής SEM [42].

### Οργανολογία

Στην εικόνα 19 παρουσιάζεται το διάγραμμα ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.



**Εικόνα 19:** Σχηματικό διάγραμμα ενός σαρωτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

[43]

Ηλεκτρονική οπτική. Το μαγνητικό σύστημα εστίασης με τον συγκεντρωτικό και τον αντικειμενικό φακό χρησιμεύει για την σμίκρυνση του ειδώλου σε τελικό μέγεθος κουκίδας από 5 έως 200 nm επάνω στο δείγμα. Το σύστημα του συγκεντρωτικού φακού, το οποίο μπορεί να αποτελείται από έναν ή περισσότερους φακούς, είναι υπεύθυνο για την διάδοση της ηλεκτρονικής

δέσμης που φθάνει στον αντικειμενικό φακό. Στον αντικειμενικό φακό ρυθμίζεται το εύρος της ηλεκτρονικής δέσμης που προσπίπτει στην επιφάνεια του δείγματος. Κάθε φακός έχει σχήμα κυλίνδρου ύψους 10 έως 15 cm. Η σάρωση στο SEM επιτυγχάνεται με δύο ζεύγη ηλεκτρομαγνητικών πηνίων, που βρίσκονται στον αντικειμενικό φακό.

Δείγμα και υποδοχέας δείγματος. Οι θάλαμοι δείγματος έχουν σχεδιαστεί έτσι, ώστε να επιτρέπουν την γρήγορη αλλαγή δειγμάτων. Χρησιμοποιούνται αντλίες κενού μεγάλης απόδοσης για να επιταχυνθεί η μείωση της πίεσης περιβάλλοντος στα  $10^{-4}$  torr ή και χαμηλότερα. Η υποδοχή του δείγματος μπορεί να μετακινείται στις διευθύνσεις x,y,z και να περιστρέφεται γύρω από κάθε άξονα. Τα ηλεκτρικώς αγωγά δείγματα είναι ευκολότερο να εξετασθούν, επειδή η ανεμπόδιστη ροή των ηλεκτρονίων προς τη γείωση ελαχιστοποιεί τα προβλήματα που προκύπτουν απ την συσσώρευση ηλεκτρικού φορτίου. Για τα μη αγωγά δείγματα έχουν αναπτυχθεί τεχνικές, όπως η επικάλυψη των δειγμάτων με λεπτό μεταλλικό φιλμ, που παράγεται με επιμετάλλωση ή με εξάχνωση μετάλλου σε κενό.

Μεταλλάκτες σήματος. Το συνηθέστερο είδος μεταλλάκτη σήματος για ηλεκτρόνια στα σαρωτικά ηλεκτρονικά μικροσκόπια είναι οι σπινθηριστές. Ο ανιχνευτής αποτελείται από ένα στόχο υάλου ή πλαστικού με φθορίζουσες προσμίξεις, που εκπέμπει μία σειρά από φωτόνια ορατής περιοχής, κατά την πρόσκρουση ηλεκτρονίων. Τα φωτόνια οδηγούνται με ένα φωτοαγωγό, σε ένα φωτοπολλαπλασιαστή, που βρίσκεται έξω απ την περιοχή υψηλού κενού του οργάνου. Τυπικές ενισχύσεις με μεταλλάκτες σπινθηριστή είναι από  $10^5$  έως  $10^6$ . Επίσης χρησιμοποιούνται ημιαγωγά μεταλλάκτες, οι οποίοι αποτελούνται από επίπεδους δίσκους ημιαγωγιμου υλικού. Όταν ένα ηλεκτρόνιο υψηλής ενέργειας προσκρούει στον ανιχνευτή παράγονται ζεύγη ηλεκτρονίων-οπών, με αποτέλεσμα την αύξηση της αγωγιμότητάς τους. Η ενίσχυση ρεύματος με συνηθισμένους ημιαγωγιμους μεταλλάκτες είναι  $10^3$  έως  $10^4$ .

Η ακτινοβολία X που παράγεται χρησιμεύει ως βάση για τον ηλεκτρονικό δειγματολήπτη EDX (Energy dispersive X-ray spectroscopy). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται μαζί με το SEM. Ο ανιχνευτής είναι ένας ημιαγωγός, ο οποίος πολώνεται σε υψηλό δυναμικό όταν ένα φωτόνιο χτυπήσει την επιφάνειά του και έτσι μετατρέπει τις ακτίνες X σε ηλεκτρική τάση. Οι ακτίνες X είναι χαρακτηριστικές για κάθε στοιχείο οπότε με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η μέτρηση του ενεργειακού φάσματος και άρα η στοιχειομετρική ανάλυση του δείγματος.

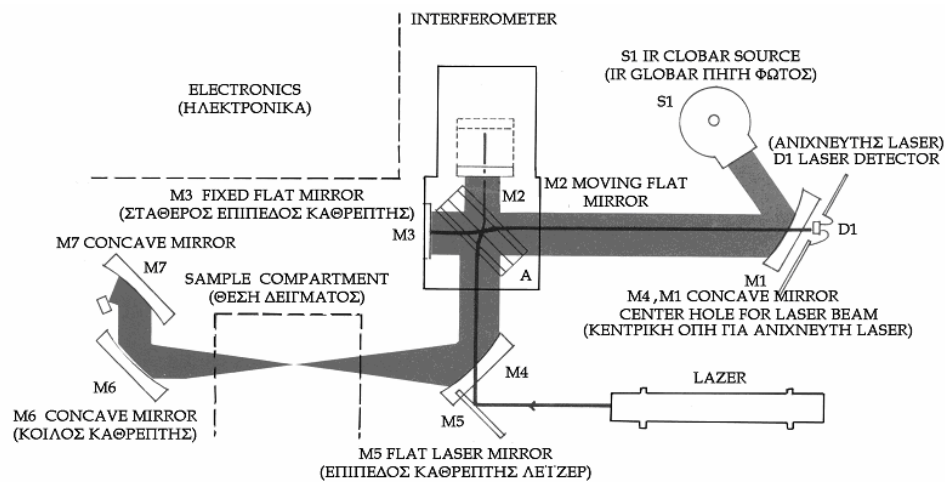
## 5.2 Φασματομετρία Υπερύθρου- (Fourier transform spectroscopy, FT IR)

Η υπέρυθη περιοχή του φάσματος περιλαμβάνει ακτινοβολίες των οποίων οι κυματάρητοι κυμαίνονται από  $12.800$  έως  $10\text{ cm}^{-1}$  ή τα μήκη κύματός τους από  $0.78$  έως  $1000\text{ }\mu\text{m}$ . Από την πλευρά τόσο των εφαρμογών όσο και της οργανολογίας, το φάσμα υπέρυθρου χωρίζεται σε εγγύς, μέσο και άπω υπέρυθρο. Τα φάσματα απορρόφησης, εκπομπής και ανάκλασης υπέρυθρου των διάφορων ουσιών μπορούν να ερμηνευθούν θεωρώντας ότι οφείλονται σε μία ποικιλία ενεργειακών μεταβολών. Οι μεταβολές αυτές είναι αποτέλεσμα μεταπτώσεων των μορίων από μία δονητική ή περιστροφική ενεργειακή κατάσταση σε μία άλλη. Στα διαγράμματα που παίρνουμε από τα φασματομέτρα υπέρυθρου, ο άξονας των τεταγμένων είναι γραμμικός ως προς την διαπερατότητα και ο άξονας των τετημένων είναι γραμμικός ως προς τους κυματάρητους, οι οποίοι εκφράζονται σε  $\text{cm}^{-1}$ . Η κλίμακα των κυματάρητων προτιμάται λόγω της γραμμικής σχέσης αυτής της μονάδας, τόσο με την ενέργεια όσο και με την συχνότητα. Η συχνότητα της απορροφημένης ακτινοβολίας, αποτελεί με την σειρά της, την μοριακή συχνότητα δόνησης στην οποία οφείλεται η απορρόφηση.

Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζεται στα μόρια στα οποία παρουσιάζονται μικρές ενεργειακές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων. Ένα μόριο για να απορροφήσει υπέρυθη ακτινοβολία, πρέπει να υποστεί μεταβολή της διπολικής ροπής του ως αποτέλεσμα της δονητικής ή της περιστροφικής κίνησής του. Οι σχετικές θέσεις των ατόμων σε ένα μόριο είναι απόλυτα καθορισμένες, αλλά κυμαίνονται συνεχώς ως συνέπεια των πολλών διαφορετικών ειδών δονήσεων και περιστροφών γύρω από τους δεσμούς τους με το μόριο.

Υπάρχουν δύο βασικές μορφές δονήσεων: δονήσεις έκτασης (stretching) και δονήσεις κάμψης (bending). Η δόνηση έκτασης χαρακτηρίζεται από μια συνεχή μεταβολή των αποστάσεων μεταξύ των ατόμων κατά μήκος του άξονα του δεσμού τους. Η δόνηση κάμψης χαρακτηρίζεται από αλλαγή στη γωνία μεταξύ δύο δεσμών και μπορεί να είναι τεσσάρων ειδών: ψαλλιδοειδής (scissoring), λικνιζόμενη (rocking), παλλόμενη (wagging) ή συστρεφόμενη (twisting) [42].

Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας μαθηματικής συνάρτησης ή μιας πειραματικά λαμβανομένης καμπύλης με τη μορφή μιας τριγωνομετρικής σειράς. Η μέθοδος βασίζεται στην καταγραφή του φάσματος με συμβολομετρικές μετρήσεις (interferometric measurements) που υπερτερούν των κοινών μηχανισμών σάρωσης του φάσματος. Η διάταξη του μηχανισμού στο φασματοφωτόμετρο για τη διεργασία Fourier είναι η παρακάτω:



**Εικόνα 20:** Σχηματική εικόνα ενός τυπικού φασματοφωτόμετρου FT-IR των πηγών, καθρεπτών και ανιχνευτή.

Το συμβολόμετρο (interferometer) είναι μια πλάκα (A) κατασκευασμένη από ημιδιαφανές υλικό, συνήθως KBr που δεν απορροφά την IR, και κατεργασμένη κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ανακλά το 50% της ακτινοβολίας που πέφτει πάνω της. Η πλάκα διαιρεί την ακτινοβολία σε δύο ίσα μέρη και στέλνει το 1/2 στον καθρέπτη M1 και το άλλο 1/2 στον καθρέπτη M2. Οι δύο δέσμες ανακλώνται στους καθρέπτες και γυρνούν στην πλάκα-διαχωριστή (plate-beam splitter) της δέσμης του φωτός, όπου συνενώνονται πάλι σε μια δέσμη φωτός με κατεύθυνση το δείγμα της ουσίας και μετά στον ανιχνευτή[44].

### 5.3 Θερμοστατική ανάλυση (Thermogravimetry analysis, TGA)

Σε μια θερμοστατική ανάλυση καταγράφεται συνεχώς η μάζα του δείγματος σε μια ελεγχόμενη ατμόσφαιρα, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας ή το χρόνου, καθώς η θερμοκρασία του δείγματος αυξάνει (συνήθως γραμμικά με το χρόνο). Το διάγραμμα της μάζας ή του ποσοστού της μάζας ως συνάρτηση του χρόνου ονομάζεται θερμογράφημα ή καμπύλη θερμοτικής διάσπασης.

Τα σύγχρονα όργανα για θερμοσταθμικές αναλύσεις αποτελούνται από: 1) έναν ευαίσθητο αναλυτικό ζυγό, 2) ένα φούρνο, 3) ένα σύστημα καθαρισμού με διαβίβαση αερίου που εξασφαλίζει αδρανή ατμόσφαιρα και 4) έναν μικροϋπολογιστή/μικροεπεξεργαστή για έλεγχο του οργάνου και για συλλογή και παρουσίαση των δεδομένων. Η μέγιστη θερμοκρασία που μπορεί να φτάσει ένα όργανο είναι 1500 °C ενώ ο ρυθμός ψύξης ή θέρμανσης μπορεί να φθάσει και τους 200 °C/min.

Η σημαντικότερη εφαρμογή των θερμοστατικών μεθόδων βρίσκεται στη μελέτη των πολυμερών. Τα θερμογραφήματα παρέχουν πληροφορίες για τους μηχανισμούς αποσύνθεσης των διαφόρων πολυμερικών υλικών. Επιπλέον, τα διαγράμματα αποσύνθεσης είναι χαρακτηριστικά για κάθε είδος πολυμερούς και σε μερικές περιπτώσεις μπορούν για χρησιμοποιηθούν για την ταυτοποίησή τους [42].

## 5.4 Δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic light scattering, DLS)

Με την τεχνική Δυναμικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering) δίνεται η δυνατότητα να υπολογιστούν τρία θεμελιώδη χαρακτηριστικά των σωματιδίων ή των μορίων σε ένα υγρό μέσο: το μέγεθος των σωματιδίων, το ζ-δυναμικό και το μοριακό τους βάρος.

### *Μέτρηση Μεγέθους*

Ως μέγεθος ορίζεται η διάμετρος σφαίρας, η οποία διαχέεται με ταχύτητα ίδια με του σωματιδίου που μελετάται. Η ιδιότητα αυτή προσδιορίζεται μετρώντας πρώτα την κίνηση Brown των σωματιδίων σε ένα δείγμα χρησιμοποιώντας την τεχνική DLS και στη συνέχεια ερμηνεύει το μέγεθος χρησιμοποιώντας καθιερωμένες θεωρίες.

Η κίνηση Brown γενικά προσδιορίζεται ως:

«Η τυχαία κίνηση σωματιδίων σε ένα υγρό λόγω του βομβαρδισμού τους από τα μόρια που τα περιβάλλουν».

Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα σωματίδια χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό του μεγέθους τους. Όπως είναι γνωστό τα μικρά σωματίδια σε ένα υγρό κινούνται γρήγορα ενώ τα μεγάλα αργά. Εάν η μετακίνηση των σωματιδίων είναι μικρή και η αρχική και τελική τους θέση είναι παρόμοιες, τότε τα σωματίδια είναι μεγάλα. Για τα μικρά σωματίδια ισχύει το αντίστροφο, δηλαδή η μετακίνηση είναι μεγάλη και οι δύο θέσεις είναι τελείως διαφορετικές, Αυτή είναι μία απλουστευμένη θεωρία.

Με την τεχνική DLS μετριέται η κίνηση Brown και συσχετίζεται αυτή με το μέγεθος των σωματιδίων. Αυτό πραγματοποιείται ακτινοβολώντας τα σωματίδια με ένα laser και αναλύοντας τη διακύμανση της συχνότητας του σκεδαζόμενου φωτός.

Όταν τα σωματίδια βρίσκονται σε μία διαρκή κίνηση, η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός μεταβάλλεται συνεχώς. Η σχέση μεταξύ του μεγέθους ενός σωματιδίου και της ταχύτητάς του λόγω της κίνησης Brown προσδιορίζεται μέσω της εξίσωσης Stokes-Einstein:

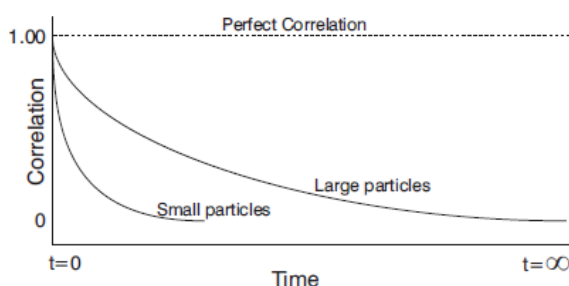
$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

- $d(H)$  : υδροδυναμική διάμετρος
- $D$  : συντελεστής διάχυσης
- $k$  : σταθερά Boltzmann
- $T$  : απόλυτη θερμοκρασία

- $\eta$ : ιξώδες

Ένα από τα στοιχεία του οργάνου μετράει το βαθμό της ομοιότητας μεταξύ δύο σημάτων μετά από μία χρονική περίοδο,  $\delta t$ . Συνεπώς λαμβάνονται μετρήσεις αρχικά σε χρόνο  $t$ ,  $t+\delta t$ ,  $t+2\delta t$ ,  $t+3\delta t$ ,  $t+4\delta t$  κλπ, ώσπου η συσχέτιση μεταξύ των σημάτων θα φτάσει κοντά στο 0.

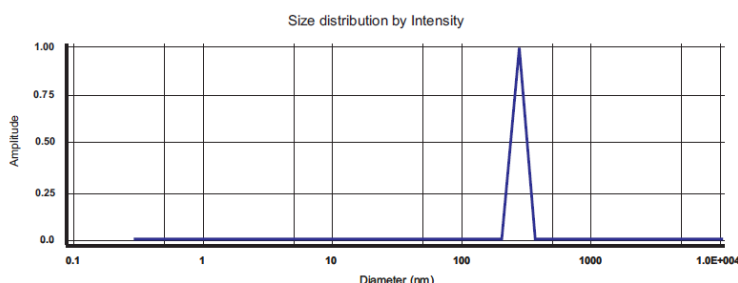
Όπως ειπώθηκε και πριν, η ταχύτητα της κίνησης Brown ενός σωματιδίου είναι συνάρτηση του μεγέθους του. Αυτό έχει συνέπεια και στη μορφή της γραφικής παράστασης της συσχέτισης μεταξύ των σημάτων που λαμβάνονται. Για μεγάλα σωματίδια που κινούνται αργά, η ένταση διακυμαίνεται αργά. Το αντίθετο ισχύει για τα μικρά σωματίδια. Το παρακάτω γράφημα απεικονίζει τη συνάρτηση της συσχέτισης για τα μεγάλα και τα μικρά σωματίδια. Όπως είναι φανερό, ο ρυθμός της μείωσης της συσχέτισης σχετίζεται με το μέγεθος των σωματιδίων, δηλαδή ο ρυθμός αυτός είναι πολύ μεγαλύτερος για τα μικρά από ότι για τα μεγάλα σωματίδια.



**Εικόνα 21:** Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για μεγάλα και μικρά σωματίδια.

Αφού έχει μετρηθεί η συσχέτιση αυτή, η πληροφορία χρησιμοποιείται ώστε να υπολογιστεί η κατανομή του μεγέθους. Το όργανο χρησιμοποιεί αλγορίθμους ώστε να εξάγει τους ρυθμούς μείωσης για έναν αριθμό τάξεων μεγέθους και να παράγει την κατανομή μεγεθών.

Τελικά, λαμβάνεται ένα γράφημα όπως το παρακάτω. Ο άξονας x δείχνει την κατανομή των τάξεων μεγέθους ενώ ο y τη σχετική ένταση του σκεδαζόμενου φωτός. Για το λόγο αυτό το γράφημα αυτό είναι γνωστό ως κατανομή συχνοτήτων.



**Εικόνα 22:** Ένταση σκεδαζόμενης ακτινοβολίας vs υδροδυναμική διάμετρος.



### Μέτρηση ζ-δυναμικού

Η ταχύτητα ενός σωματιδίου μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο αναφέρεται γενικά ως «ηλεκτροφορητική ικανότητα». Όταν την γνωρίζουμε μπορούμε να υπολογίσουμε το ζ-δυναμικό εφαρμόζοντας την εξίσωση Henry:

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta}$$

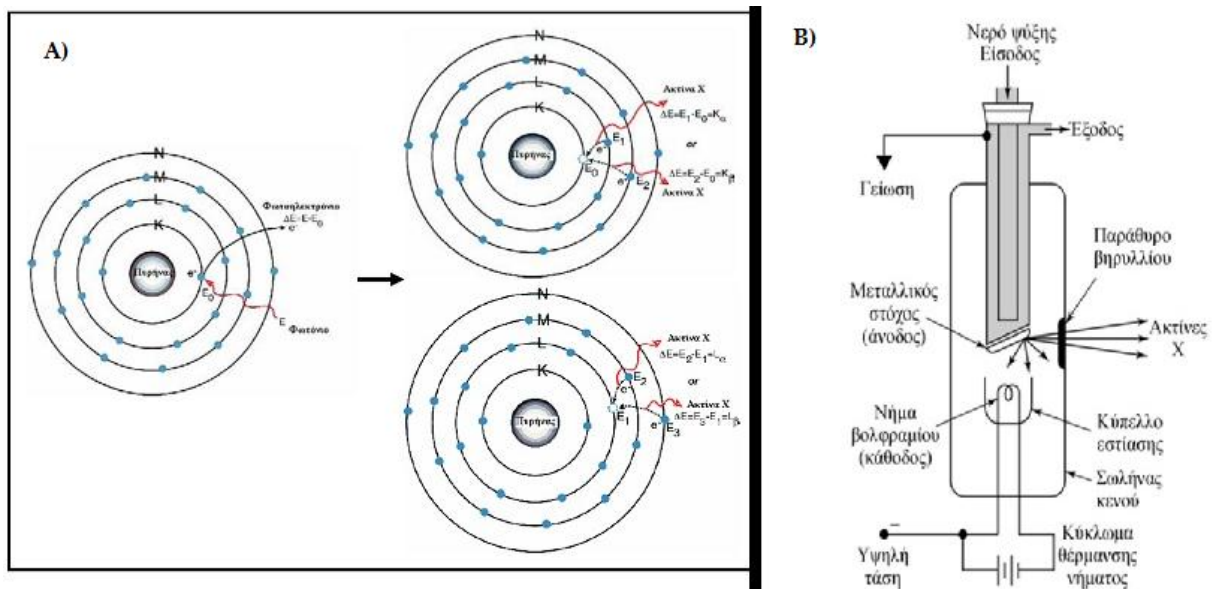
- $z$  : ζ-δυναμικό
- $U_E$  : ηλεκτροφορητική ικανότητα
- $\varepsilon$  : διηλεκτρική σταθερά
- $\eta$  : ιξώδες
- $f(ka)$  : συνάρτηση Henry

Η μέτρηση της ηλεκτροφορητικής ικανότητας γίνεται σε ένα κελί με ηλεκτρόδια στις δύο πλευρές του, όπου και εφαρμόζεται το δυναμικό. Τα σωματίδια κινούνται προς το ηλεκτρόδιο που έχει το αντίθετο φορτίο, και η ταχύτητά τους μετρείται και εκφράζεται ως ηλεκτροφορητική ικανότητα. [45]

## 5.5 Φασματοσκοπία Περίθλασης Ακτίνων-X (XRD)

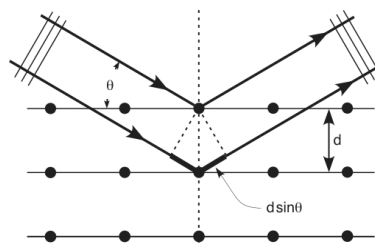
Οι ακτίνες-X ανακαλύφθηκαν το 1895 από τον Wilhelm Roentgen στο πανεπιστήμιο του Wurzburg στη Γερμανία. Παρατήρησε πως μερικοί κρύσταλλοι του συμπλόκου βαρίου με κυανιούχο λευκόχρυσο (barium platino-cyanide) που βρίσκονταν δίπλα σε ένα σωλήνα εκκένωσης, καλυμμένοι με μαύρο χαρτί, άρχισαν να φθορίζουν όταν δημιουργήθηκε εκκένωση. Εξετάζοντας τις σκιές που δημιουργήθηκαν από τις ακτίνες, ο Roentgen εντόπισε την προέλευση των ακτινών στα τοιχώματα του σωλήνα εκκένωσης. Η ονομασία, ακτίνες X (άγνωστες), δόθηκε από την ερευνητική ομάδα του Roentgen, καθώς οι ακτίνες είχαν ξεκάθαρες ομοιότητες με το φώς αλλά δεν είχαν καμία παρόμοια ιδιότητα με αυτές της θεμελιωμένης κυματικής οπτικής, πόλωση, περίθλαση, ανάκλαση και διάθλαση. Για τη σημαντική του ανακάλυψη τιμήθηκε με το πρώτο Νόμπελ Φυσικής το 1901, ενώ ακολούθησαν ακόμα πέντε απονομές.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ακτινών X είναι η πρόσκρουση ηλεκτρονίων υψηλής ενεργείας στην επιφάνεια ενός μετάλλου (στόχο) με μεγάλο ατομικό αριθμό. Τα ηλεκτρόνια αυτά προσπίπτοντας στο στόχο διεγείρουν τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων του μετάλλου προκαλώντας την απόσπασή τους. Το «κενό» αυτό στην εσωτερική στοιβάδα του ατόμου καλύπτεται από ηλεκτρόνια υψηλότερων εξωτερικών ενεργειακά στοιβάδων. Η παραπανίσια ενεργεία, δηλαδή η ενεργειακή διαφορά των δυο στοιβάδων, ελευθερώνεται με την εκπομπή φωτονίου (ακτίνες X).



**Εικόνα 23:** Α) Παραγωγή ακτινών-X και Β) Μονάδα περίθλασης ακτινών-X.

Περίθλαση μιας ακτινοβολίας (μήκους κύματος  $\lambda$ ) συμβαίνει όταν αυτή προσπέσει σε φράγμα που αποτελείται από παράλληλες σχισμές ίσου πλάτους  $d$ , και μόνο όταν ισχύει  $\lambda > d$ . Οι ακτίνες X έχουν μήκη κύματος που κυμαίνονται συνήθως μεταξύ  $0,1 - 10 \text{ \AA}$ , επομένως είναι αδύνατο να κατασκευαστεί μηχανικό φράγμα για την περίθλαση, αφού με την υπάρχουσα τεχνολογία το  $d$  μπορεί να φτάσει τα  $1000 \text{ \AA}$ . Ο Von Laue το 1912 πρότεινε τη χρήση φυσικών κρυστάλλων σαν φράγματα περίθλασης, αφού η διάταξη των ατόμων μπορεί να θεωρηθεί σαν μια σειρά από παράλληλα δικτυωτά επίπεδα, τα οποία απέχουν μεταξύ τους αποστάσεις της τάξης του  $1 \text{ \AA}$  και είναι ίσες μεταξύ τους. Έτσι γνωρίζοντας το  $d$  μπορεί να υπολογιστεί το  $\lambda$  και ο κρύσταλλος να χρησιμοποιηθεί σαν φράγμα περίθλασης. Τα φάσματα περίθλασης μπορούν να αποτυπωθούν είτε σαν ομόκεντροι κύκλοι σε κατάλληλο φωτογραφικό φιλμ, είτε σαν τρισδιάστατα πλέγματα από φωτεινά σημεία. Η αναγκαία συνθήκη για αν υπάρχει συμβολή μέγιστης έντασης, βρέθηκε από τους W.H και W. L. Bragg και είναι :  $n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \eta\mu\theta$ , όπου  $n$  ακέραιος αριθμός που παίρνει τιμές 0,1,2,3,4 και αναφέρεται στα διαδοχικά νοητά κρυσταλλικά επίπεδα.

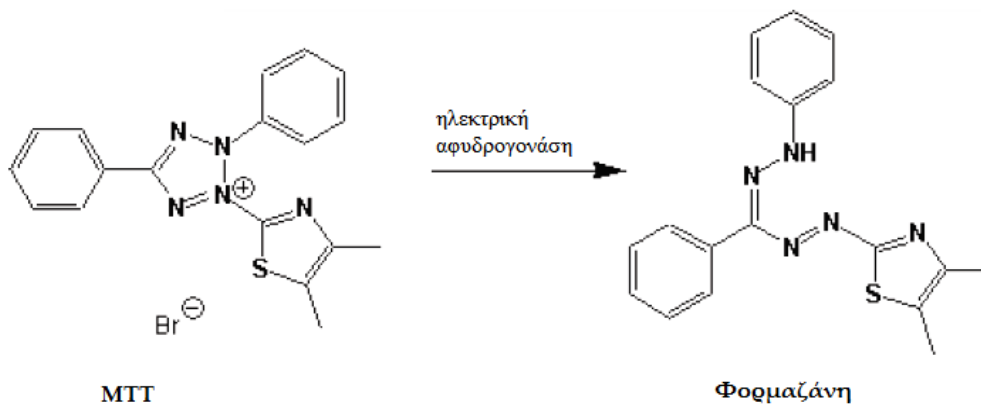


**Εικόνα 24:** Νόμος του Bragg στα κρυσταλλικά πλέγματα.

## 5.6 Χρωματομετρική μέθοδος MTT

Η μέθοδος MTT (MTT colorimetric assay) περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Mosmann το 1983 και βασίζεται στην μετατροπή των αλάτων τετραζολίου σε μη διαλυτά παράγωγα φορμαζάνης.

Το κίτρινο χρώματος άλας τετραζολίου, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) οξειδώνεται από τις αφυδρογονάσες των μιτοχονδρίων των ζωντανών κυττάρων και παράγονται πορφυρού χρώματος κρύσταλλοι φορμαζάνης, οι οποίοι συσσωρεύονται στα μιτοχόνδρια του κυττάρου.



Η φορμαζάνη απορροφά σε διαφορετικό μήκος κύματος (550-570 nm, χρώση ιώδες) από αυτό του MTT (400 nm, χρώση κίτρινο). Η οξείδωση του MTT πραγματοποιείται μόνο όταν τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι μεταβολικά ενεργά και συνεπώς η παραγωγή κρυστάλλων φορμαζάνης είναι απευθείας ανάλογη του αριθμού βιώσιμων κυττάρων. Θεωρείται ο ακριβέστερος δείκτης, με υψηλή ευαισθησία, ποιότητα και επαναληψιμότητα[46].



# ***ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ***



# 6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

*ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ  
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ*



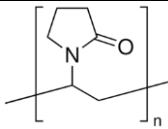
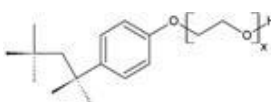


## 6.1 Αντιδραστήρια-Διαλύτες

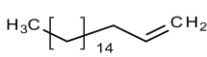
Τα αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στους παρακάτω πίνακες.

**Πίνακας 3:** Χρησιμοποιούμενα αντιδραστήρια.

| Αντιδραστήρια   | Συντακτικός ή Μοριακός τύπος |
|---|------------------------------|
| Μεθακρυλικός Μεθυλεστέρας<br><i>Methyl Methacrylate (MMA)</i>                         |                              |
| Μεθυλεστέρας πολύ αιθυλενογλυκόλης<br><i>Poly(Ethylene glycol) methacrylate (PEG)</i> |                              |
| Αμμωνιακό Διάλυμα<br><i>Ammonia Solution (30%)</i>                                    | $\text{NH}_3$                |
| Υπερθειικό Κάλιο<br><i>Potassium persulfate (KPS)</i>                                 |                              |
| 2,2, αζοδισ-ισοβουτρονιτρίλιο<br><i>2,2-Azobis(2-methylpropionitrile) (AIBN)</i>      |                              |
| Δωδεκυλ- σουλφονικό νάτριο<br><i>Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)</i>                    |                              |
| Μεθακρυλικό οξύ<br><i>Methacrylic acid (MAA)</i>                                      |                              |
| Διμεθακρυλικός εστέρας γλυκολικού οξέος<br><i>Ethylene dimethacrylate (EGDMA)</i>     |                              |
| Διϊσοκυανικό τολουόλιο<br><i>Toluene Diisocyanate (TDI)</i>                           |                              |
| Ορθοπυριτικό τετρααιθοξείδιο<br><i>Tetraethyl orthosilicate (TEOS)</i>                |                              |
| Αιθυλενοδιαμίνη<br><i>Ethylene diamine (EDA)</i>                                      |                              |
| Διαιθυλεντριαμίνη<br><i>Diethylene triamine (DETA)</i>                                |                              |

|  |   |
|--|---|
| Πολυβινυλοπυρρολιδόνη<br><i>Polyvinylpyrrolidone (PVP)</i> |  |
| Triton x-100   |   |
| Χλωριούχο αμμώνιο<br><i>Chloride ammonium</i>              | $\text{NH}_4\text{Cl}$  |
| Τρυπτόνη<br><i>Tryptone</i>                                | $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$                               |
| Εκχύλισμα μυκήτων<br><i>Yeast extract</i>                  | -   |
| Χλωριούχο νάτριο<br><i>Sodium chloride</i>                 | $\text{NaCl}$   |

**Πίνακας 4:** Χρησιμοποιούμενοι διαλύτες.

| Διαλύτες                                   | Συντακτικός ή Μοριακός τύπος  |
|--|---|
| Απεσταγμένο νερό<br><i>Distilled water</i> | $\text{H}_2\text{O}$  |
| Ακετονιτρίλιο<br><i>Acetonitrile</i>       | $\text{CH}_3\text{CN}$  |
| Ακετόνη<br><i>Acetone</i>                  | $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$  |
| Αιθανόλη<br><i>Ethanol</i>                 | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$   |
| 1-Δεκαοκτένιο<br><i>1-Octadecene</i>       |  |
| Παραφίνη<br><i>Paraffin</i>                | $\text{C}_{40}\text{H}_{82}$  |

## 6.2 Μέσα καλλιέργειας μικροοργανισμών

### 6.2.1 Θρεπτικά διαλύματα

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων καλλιεργήθηκαν σε υδατικό μέσο καλλιέργειας Luria Broth (LB).

**Πίνακας 5:** Σύσταση του μέσου καλλιέργειας LB.

| Υλικά         | Luria Broth (LB) |
|---------------|------------------|
| NaCl          | 0,5 % w/v        |
| Tryptone      | 1 % w/v          |
| Yeast extract | 0,5 % w/v        |

## 6.2.2 Θρεπτικό LB άγαρ μέσο

Σε τρυβλίο Petri, τοποθετείται θρεπτικό υλικό στο οποίο αναπτύσσονται τα κύτταρα των μικροοργανισμών των πειραμάτων. Η σύσταση του θρεπτικού υλικού περιγράφεται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6:** Σύσταση θρεπτικού LB άγαρ μέσου σε 100 ml νερού (4 τρυβλία Petri).

| Αντιδραστήρια                     | Ποσότητες |
|-----------------------------------|-----------|
| Άγαρ                              | 1,5 g     |
| NaCl                              | 0,5 g     |
| Τρυπτόνη                          | 0,5 g     |
| Εκχύλισμα μυκήτων (yeast extract) | 0,3 g     |
| Απεσταγμένο νερό                  | 100 ml    |

Το κάθε τρυβλίο γεμίζεται μερικώς με θερμό LB άγαρ μέσο που περιέχει μείγμα ουσιών που περιγράφηκαν στον παραπάνω πίνακα. Συγκεκριμένα, ο ρόλος του κάθε συστατικού είναι ο εξής:

- Άγαρ: πηκτωματογόνος παράγοντας
- NaCl: ηλεκτρολύτης
- Τρυπτόνη: πηγή πρωτεϊνών και αζώτου
- Εκχύλισμα μυκήτων: πηγή μετάλλων και υδατανθράκων

## 6.3 Ανάπτυξη μικροοργανισμών στα θρεπτικά μέσα

### 6.3.1 Ανάπτυξη στα θρεπτικά διαλύματα

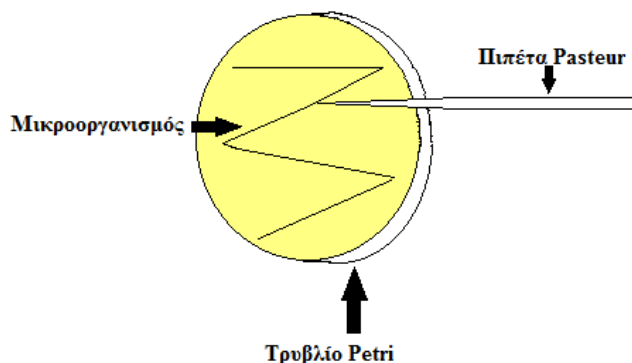
Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θρεπτικά διαλύματα ακολουθείται η εξής πειραματική διαδικασία:

Η ανακαλλιέργεια του μικροοργανισμού πραγματοποιείται μετά από ανάκτηση του από αμπούλα η οποία φυλάσσεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Το θρεπτικό μέσο εμβολιάζεται με μικροποσότητα της αμπούλας του μικροοργανισμού. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε άσηπτες συνθήκες, συνθήκες που επιτυγχάνονται με τη χρήση αναγωγικής φλόγας με σκοπό την αποφυγή τυχόν επιμόλυνσης του δείγματος. Ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού γίνεται με αποστειρωμένη πιπέτα Pasteur, όπου η μύτη της έχει αποστειρωθεί σε φλόγα. Το θρεπτικό διάλυμα με τον μικροοργανισμό επωάζεται σε ειδικό θάλαμο ανάδευσης στους  $37^{\circ}\text{C}$ , στις 100 rpm περίπου για 24 ώρες με σκοπό την βέλτιστη ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

### 6.3.2 Ανάπτυξη σε τρυβλίο Petri

Για την ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε τρυβλίο Petri, η πειραματική διαδικασία είναι η εξής :

Αμπούλα του μικροοργανισμού εμβολιάζεται σε τρυβλίο Petri με τρόπο που περιγράφεται στην παρακάτω εικόνα. Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε άσηπτες συνθήκες με τη χρήση αναγωγικής φλόγας, για να αποφευχθούν τυχόν επιμολύνσεις του δείγματος. Ο μικροοργανισμός εμβολιάζεται στο τρυβλίο με αποστειρωμένη Pasteur πιπέτα, όπου η μύτη της έχει αποστειρωθεί. Στη συνέχεια το εμβολιασμένο τρυβλίο τοποθετείται σε επωαστικό φούρνο στους 37 °C για περίπου 24 ώρες.



Εικόνα 25: Εμβολιασμός μικροοργανισμού σε τρυβλίο Petri.

### 6.4 Αποστείρωση γυάλινων σκευών και θρεπτικών μέσων

Όλα τα σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα μικροοργανισμών αποστειρώθηκαν για να αποφευχθεί οποιαδήποτε επιμόλυνση των μικροβιακών διαλυμάτων. Η ίδια διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τα θρεπτικά συστατικά τους. Όλα τα γυάλινα σκεύη και θρεπτικά μέσα αποστειρώθηκαν για 20 min στους 120 °C.

### 6.5 Καλλιέργειες κυττάρων

Ο τύπος κυττάρων που κάλυψε τις ανάγκες αυτής της εργασίας, είναι τα HEK-293. Είναι ανθρώπινα κύτταρα του εμβρυϊκού ιστού. Για τη συντήρησή τους περιέχουν αδενοϊό και γι' αυτό το λόγο πρέπει η διαχείρισή τους να είναι πολύ προσεκτική. Χρησιμοποιούνται για δοκιμές αποτελεσματικότητας, για δοκιμές επιμόλυνσης σε ξενιστές και για ιοκτόνες δοκιμές [47]. Οι συνθήκες ανάπτυξης τους εξαρτώνται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά.

### Υλικά κυτταροκαλλιέργειας

- Θρεπτικό διάλυμα ανάπτυξης κυττάρων: DMEM εμπλουτισμένο με 2 mM γλουταμίνης, 0.85 g/L NaHCO<sub>3</sub>, 25 mM HEPES, 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 6.8<pH<7.2. 0.2% w/v στρεπτομυκίνη, 2×10<sup>3</sup> U/mL πενικιλίνη, σε PBS (1×).
- Διάλυμα διαχωρισμού κυττάρων: 0.02% EDTA-θρυψίνη,. Χρησιμοποιείται για την αποκόλληση και το διαχωρισμό των μονόστιβων καλλιιεργειών.

### Ανακαλλιέργεια κυττάρων

#### Εναιωρήματα

- Αραίωση της καλλιέργειας με φρέσκο θρεπτικό διάλυμα, σε τελική συγκέντρωση 2-4×10<sup>5</sup> κύτταρα/mL, και διατήρησή τους στους 37 °C.

#### Μονόστιβες

- Αφαίρεση θρεπτικού υλικού από την καλλιέργεια.
- Προσθήκη διαλύματος διαχωρισμού κυττάρων (4 mL/φιάλη 75 mL ) και επώαση στους 37 °C για 4 min.
- Απομάκρυνση του διαλύματος
- Προσθήκη εκ νέου 0.4 mL διαλύματος διαχωρισμού κυττάρων και επώαση στους 37 °C για 15-20 min, προκειμένου να γίνει αποκόλληση του ταπητίου και διαχωρισμός των κυττάρων.
- Προσθήκη θρεπτικού διαλύματος DMEM και ανάπτυξη των κυττάρων στους 37 °C.

Διατήρηση κυττάρων σε υγρό άζωτο.

Οι κυτταρικές σειρές μπορούν να υποστούν ανεξέλεγκτες αλλαγές που αφορούν την μορφολογία, την ανάπτυξη, τη ζωτικότητα και τον καρύοτυπο τους, λόγω παρατεταμένων ανακαλλιιεργειών ή τυχών άτυχων επιμολύνσεων. Ο κίνδυνος αυτός αποφεύγεται με τη δημιουργία μίας ανανεώσιμης τράπεζας κυτταρικών σειρών, μετά από ψύξη των κυττάρων και διατήρησή τους σε υγρό άζωτο για μεγάλα χρονικά διαστήματα (χρόνια). Σε ψύξη οδηγούνται τα κύτταρα που βρίσκονται σε λογαριθμική φάση ανάπτυξης ή πλησιάζουν στην συμπλήρωση μονόστιβου ταπήτου. Η μεθοδολογία που ακολουθείται συνοψίζεται παρακάτω:

- Εμφύτευση κυττάρων σε συγκέντρωση 4×10<sup>5</sup> κύτταρα/ml.
- Σε 48 h, όπου τα κύτταρα βρίσκονται στην ολοκλήρωση της λογαριθμικής φάσης ανάπτυξης, αποκόλληση και φυγοκέντρηση σε 1000 rpm για 5 min.

- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε DMEM παρουσία 10% DMSO σε FBS (κρυοπροστατευτική ουσία), σε τελική συγκέντρωση  $4 \times 10^6$  -  $10 \times 10^6$  κύτταρα/ mL (ανάλογα με την κυτταρική σειρά).
- Μεταφορά σε αμπούλες οι οποίες στη συνέχεια τοποθετούνται βαθμιαία σε κατάψυξη, έτσι ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων και συνεπώς κυτταρική λύση.
- Τέλος γίνεται τοποθέτηση σε συσκευή διατήρησης κυττάρων ( $-196$  °C, υγρό άζωτο) για αρκετά χρόνια.

Η επαναφορά κυττάρων, που ήταν αποθηκευμένα σε υγρό άζωτο, σε τρέχουσα καλλιέργεια ( $36.5$ - $37$  °C) πραγματοποιείται με :

- Γρήγορη απόψυξη του δείγματος της αμπούλας στους  $37$  °C (αποφυγή μετουσίωσης του πρωτεϊνικού περιεχομένου του κυττάρου).

Φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση του κρύοπροστατευτικού υλικού (DMSO) από την καλλιέργεια. Η γρήγορη απομάκρυνση DMSO είναι ιδιαίτερα σημαντική, διότι δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και σε ορισμένες περιπτώσεις ενεργοποιεί διαφοροποίηση, απόπτωση ή ακόμα και νέκρωση, ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο

- Επαναδιάλυση των κυττάρων σε θρεπτικό διάλυμα και ανάπτυξη των καλλιεργειών στους  $37$  °C.
- Συχνές ανακαλλιέργειες των κυττάρων στην αρχή είναι απαραίτητες, για την πλήρη επαναφορά του φυσιολογικού ρυθμού ανάπτυξης της καλλιέργειας.

Μολυσματικοί παράγοντες του περιβάλλοντος, οι πιο συνήθεις των οποίων είναι οι μύκητες και τα βακτήρια, αποτελούν συχνά εμπόδιο στη διατήρηση μιας καλλιέργειας κυττάρων *in vitro*. Για το λόγο αυτό όλοι οι χειρισμοί των κυτταροκαλλιεργειών πραγματοποιούνται εντός θαλάμου νηματικής ροής προκειμένου να επιτευχθούν στείρες συνθήκες για τα κύτταρα.

Η αποστείρωση του χώρου των κυτταροκαλλιεργειών επιτυγχάνεται σε καθημερινή βάση με έκθεση αυτού σε υπεριώδη ακτινοβολία για τουλάχιστον 15 λεπτά, ενώ για τοπική αποστείρωση του χώρου χρησιμοποιείται διάλυμα αιθανόλης (70% v/v). Τα χρησιμοποιούμενα υλικά αποστειρώνονται σε ειδικό κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους  $120$  °C και πίεση  $1$   $\text{kp/cm}^2$  για 20 λεπτά.

## 6.6 Διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων

Η διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη και αναγκαία προϋπόθεση σε περιπτώσεις μελέτης κυτταροτοξικής δράσης πολυμερικών μικροσφαιρών όπου θα χρησιμοποιηθούν σε υλικά που θα έρθουν σε άμεση επαφή με τον άνθρωπο. Πραγματοποιείται προσδιορίζοντας ζωτικής σημασίας λειτουργίες των κυττάρων. Η ζωτικότητα κυττάρων αναφέρεται στο ποσοστό των υγιών κυττάρων σε μία καλλιέργεια. Ο δείκτης αυτός, εξ' ορισμού ασαφής, προσδιορίζεται συνήθως ελέγχοντας ζωτικής σημασίας λειτουργίες όπως:

- Τη μεταβολική δραστηριότητα των κυττάρων (MTT)

Διαλύματα

- I. Διάλυμα MTT (5 mg/ml σε PBS 1x, pH= 7,5): Διατήρηση στους 4 °C, για σύντομη χρήση, σε σκουρόχρωμη φιάλη. Κατάψυξη σε μικρές ποσότητες για μεγαλύτερης διάρκειας διατήρηση.
- II. Διάλυμα λύσης κυττάρων DMSO

Πειραματική διαδικασία

- Επώαση κυττάρων στους 37 °C παρουσία/απουσία πολυμερικών μικροσφαιρών για ποικίλες συγκεντρώσεις.
- Απομάκρυνση του υπερκείμενου θρεπτικού υλικού των κυττάρων.
- Προσθήκη 100  $\mu$ L διαλύματος MTT σε κάθε πηγαδάκι το οποίο αποκτά κίτρινο χρωματισμό, και επώαση στους 37 °C για 4 h. Στο τέλος της 4ώρης επώασης τα δείγματα έχουν αποκτήσει ιώδη χρωματισμό (λόγω μετατροπής του τύπου MTT σε φορμαζάνη).
- Προσθήκη διαλύματος λύσης ( DMSO) και επώαση στους 37 °C όλη τη νύχτα με ήπια ανάδευση.
- Φωτομέτρηση σε ELIZA reader στα 540 nm με μήκος κύματος αναφοράς τα 620 nm.
- Δείκτης ζωτικότητας MTT : OD δείγματος/OD μάρτυρα αντίστοιχου χρόνου  $\times 100$

## 6.7 Οργανολογία

Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης με μικροσκόπιο Inspect της εταιρείας FEI πραγματοποιήθηκε με νήμα βολφραμίου στα 25kV. Για τη φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier χρησιμοποιήθηκε φασματόμετρο Spectrum100 της εταιρείας Perkin Elmer όπου το εύρος σάρωσης ήταν από 4000  $\text{cm}^{-1}$  έως 400  $\text{cm}^{-1}$ . Για τη μελέτη της κρυσταλλικής δομής έγινε χρήση περιθλασίμετρου Siemens D-500, εξοπλισμένο με λάμπα CuK $\alpha$  μήκους κύματος 1.5418 Angstrom ενώ οι θερμικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τον αναλυτή Pyris Diamand S II της εταιρείας Perkin Elmer. Ο ρυθμός αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 10 °C/min μέχρι τους

700 °C. Οι μετρήσεις δυναμικής σκέδασης φωτός πραγματοποιήθηκαν στο Zetasizer Nano της εταιρείας Malvern και η κάθε μέτρηση αντιπροσωπεύει το μέσο όρο 3 μετρήσεων. Οι φυγοκεντρήσεις για το διαχωρισμό των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν με μία φυγόκεντρο Sorvall Evolution RC ενώ για την διασπορά των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων Elma Sonic, S 30H. Οι αποστειρώσεις πραγματοποιήθηκαν με τον Steam sterilizer της εταιρείας Trade Rayra. Οι επώσεις των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν α) σε φούρνο της εταιρείας MMM Medcenter και β)σε αναδευτήρα της εταιρείας New Brunswick Scientific.



# 7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

*ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ  
ΥΒΡΙΔΙΚΩΝ-ΑΝΟΡΓΑΝΩΝ-  
ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ  
ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΩΝ*



## 7.1 Εισαγωγή

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ειδίκευσης σύνθεσης των οργανικών-ανόργανων μικρο-συστημάτων μεταφοράς είναι η δημιουργία ενός υλικού, όπου θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τη βιομηχανία με απώτερο σκοπό την αυτοϊαση του σκυροδέματος. Για τον λόγο αυτό, συντέθηκαν πολυμερικές μικροσφαίρες, μεταβάλλοντας παραμέτρους στην πειραματική διαδικασία με σκοπό την επίτευξη συγκεκριμένου μεγέθους μικροσωματιδίων, περίπου στο 1  $\mu\text{m}$ . Σκοπός της χρήσης μικροσφαιρών σε αυτό το μέγεθος ήταν η αλληλεπίδρασή τους με τους μικροοργανισμούς *St. aureus* και *E-coli*, (μέγεθος βακτηρίων 0.5-1.5  $\mu\text{m}$ ).

Στο πρώτο μέρος της σύνθεσης των οργανοανόργανων μικροσφαιρών, μελετούνται μικροσφαίρες με ικανότητα απορρόφησης/συγκράτησης νερού, οι παγίδες νερού (water traps). Υλικά με ικανότητα να απορροφούν νερό είναι γνωστά από τα μέσα του 1960. Από τότε έχουν πραγματοποιηθεί πολλές μελέτες με σκοπό την ανάπτυξη υπερ-απορροφούμενων πολυμερών (super absorbent polymers, SAPs), τα οποία συγκρατούν νερό από μερικές έως χιλιάδες φορές το βάρος τους. Τα SAPs είναι τρισδιάστατα πολυμερικά δίκτυα, μερικώς σταυροδεμένα, με ικανότητα να διαστέλλονται κατά τη διάρκεια της απορρόφησης. Χρησιμοποιούνται σε πολλούς τομείς, όπως παιδικές πάνες, αγροτικά προϊόντα κ.α. Κάποια από τα μειονεκτήματα αυτών των υλικών είναι η απώλεια της ικανότητας τους να απορροφούν νερό μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους απορρόφησης-ξήρανσης, η υπερβολική αύξηση του μεγέθους τους κατά την απορρόφηση, και το ανώμαλο σχήμα τους κατά την ξηρή αλλά και την διασταλμένη τους μορφή [48]. Η τροποποίηση των μικροσφαιρών σε παγίδες νερού γίνεται με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  συγκεκριμένα. Ο λόγος που πραγματοποιείται κάτι τέτοιο είναι γιατί, καθώς χρησιμοποιείται  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρία, υλικά όπου οδηγούν στην βιο-κατακρήμιση  $\text{CaCO}_3$ , το  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  θα παρέχει περισσότερα  $\text{Ca}^{2+}$  στο μικροπεριβάλλον του μικροοργανισμού.

Η μέθοδος λύματος-πηκτής (sol-gel) εφαρμόστηκε στις παγίδες νερού με σκοπό την επικάλυψή τους. Συντέθηκε ανόργανο κέλυφος  $\text{SiO}_2$  καθώς το συγκεκριμένο οξείδιο είναι συμβατό στο κλίνκερ του τσιμέντου λόγω των ασβεστοπυριτικών ενώσεων που περιέχονται [49]. Οι παγίδες νερού όταν θα έρθουν σε επαφή με τα βακτήρια, θα παρατηρηθεί αύξηση του μεγέθους τους λόγω της προσρόφησης/συγκράτησης του μικροοργανισμού με το θρεπτικό υλικό. Ο απώτερος σκοπός είναι ένα τέτοιο είδος συστήματος να εφαρμοστεί στο τσιμέντο και να μελετηθεί η ικανότητά του για αυτοϊαση. Είναι σημαντικό ένα τέτοιο κέλυφος να είναι ανθεκτικό καθώς οι τάσεις που αναπτύσσονται στο σκυρόδεμα είναι ιδιαίτερες έντονες. Έτσι, ουσιαστικά οι παγίδες νερού παίζουν τον ρόλο του φορέα για τα βακτήρια, ενώ η επικάλυψη με  $\text{SiO}_2$  προστατεύει αυτό το σύστημα με ένα ανθεκτικό κέλυφος.

Στο δεύτερο μέρος, μελετάται η σύνθεση ανόργανων και οργανικών μικροσφαιρών, SiO<sub>2</sub> και του PMMA (polymethyl methacrylate), αντίστοιχα. Και σε αυτές τις περιπτώσεις η μελέτη γίνεται με σκοπό τη σύνθεση συγκεκριμένου μεγέθους μικροσφαίρας (≥1μm). Όλα τα παραπάνω συστήματα μελετήθηκαν παρουσία μικροοργανισμού με σκοπό την διερεύνηση της ικανότητας του τελευταίου στην μικροβιακή κατακρήμνιση CaCO<sub>3</sub> (Κεφάλαιο 9).

Στο τελευταίο μέρος του κεφαλαίου, μελετήθηκε η σύνθεση μικροσφαιρών με κέλυφος πολυουρίας σε γαλάκτωμα ελαίου σε νερού (O/W emulsion). Το κέλυφος πολυουρίας, σχηματίζεται γύρω από τις σταγόνες λαδιού. Η διερεύνηση ενός τέτοιου συστήματος έγινε με την προοπτική ότι στη φάση του λαδιού να βρίσκονται διασκορπισμένοι οι σπόροι του μικροοργανισμού, και μέσω του πολυμερισμού στη μεσεπιφάνεια, να εγκλωβίζονται μέσα σε ένα ανθεκτικό κέλυφος. Η συγκεκριμένη μελέτη βελτιστοποίησε κάποιες από τις παραμέτρους της συνθετικής πορείας με σκοπό τη σύνθεση ομοιόμορφων μικροσφαιρών με κέλυφος πολυουρίας.

Για τον ακριβή προσδιορισμό του μεγέθους των μικροσφαιρών μετρήθηκαν 100 μικροσωματίδια, σε μια εικόνα SEM, από το κάθε είδος που συντέθηκε, προκύπτοντας έτσι ένας μέσος όρος με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση κάθε φορά. Ένα μέτρο που δείχνει την ύπαρξη καλής διασποράς μεγέθους σε ένα δείγμα είναι ο δείκτης πολυδιασποράς (polydispersity index, U). Όσο πιο κοντά στο 1 βρίσκεται ο δείκτης αυτός τόσο πιο ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους σωματιδίων εμφανίζει το δείγμα.

Ο δείκτης πολυδιασποράς, U, δίνεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$U = \frac{D_w}{D_n} \quad (7.1)$$

με D<sub>w</sub> να είναι η κατά βάρος μέσος όρος διάμετρος και D<sub>n</sub> η κατά αριθμό μέσος όρος διάμετρος, όπου δίνονται από τους εξής τύπους:

$$D_w = \frac{\sum_{i=1}^k n_i D_i^4}{\sum_{i=1}^k n_i D_i^3} \quad (7.2)$$

$$D_n = \frac{\sum_{i=1}^k n_i D_i}{\sum_{i=1}^k n_i} \quad (7.3)$$

με N= τον ολικό μετρούμενο αριθμό μικροσφαιρών

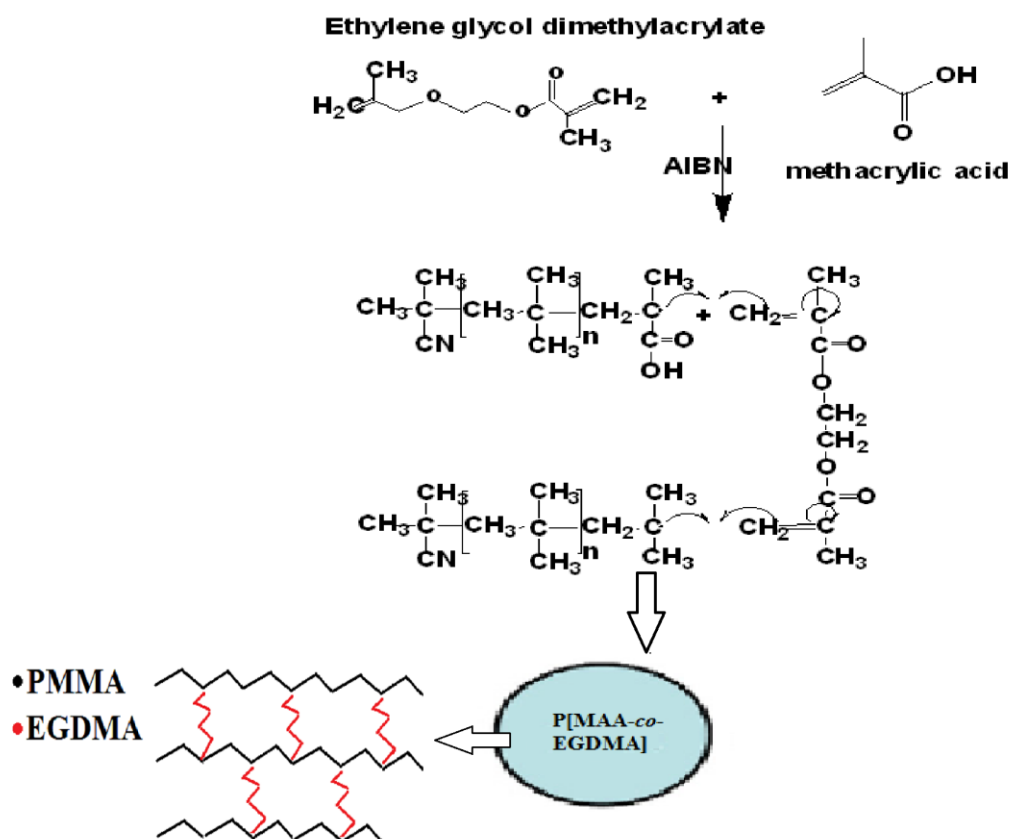
και D<sub>i</sub>= η διάμετρος σωματιδίου [50].

## 7.2 Παγίδες νερού (water traps)

### 7.2.1 Πειραματική διαδικασία

Σφαιρικές μικρο-παγίδες νερού (water traps) συντέθηκαν με διαδικασία δύο βημάτων, όπου περιλαμβάνει αρχικά τις σταυροδεμένες σφαίρες πολυμεθακρυλικού οξέος (PMAA) μέσω του πολυμερισμού καταβύθισης μετά από απόσταξη, και στη συνέχεια την μετατροπή των καρβοξυλικών ομάδων στα αντίστοιχα άλατα ασβεστίου μέσω της κατεργασίας των μικρο-παγίδων με διάλυμα  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Η συγκεκριμένη τεχνική πολυμερισμού που πραγματοποιήθηκε δίνει ομοιόμορφες πολυμερικές μικροσφαίρες με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες. Ως μονομερή χρησιμοποιήθηκαν το μεθακρυλικό οξύ (MAA) και ο διμεθακρυλικός εστέρας γλυκολικού οξέος (EGDMA) σε ρόλο σταυροδέτη, σε διαλύτη ακετονιτρίλιου με απαρχητή τον αζωδισοβουτυρονιτρίλιο (AIBN). Το ακετονιτρίλιο, όντας μη πρωτικός, πολικός διαλύτης, ευνοεί της αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-πολυμερούς, δηλαδή τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών άκρων των αλυσίδων του πολυμερούς. Παρά τις αλληλεπιδράσεις πολυμερούς-διαλύτη, το πολυμερές καταβυθίζεται. Με την προσέγγιση αυτή σχηματίζεται ένας πυρήνας με τη μορφή σφαίρας. Με την προσέγγιση αυτή μπορούμε να εισάγουμε μια συγκεκριμένη λειτουργία απόκρισης στο σύστημα, σε ορισμένα ερεθίσματα [51-54]. Παρακάτω περιγράφεται ο μηχανισμός της αντίδρασης σύνθεσης των παγίδων νερού.



**Εικόνα 26:** Μηχανισμός σύνθεσης P(MMA-co-EGDMA) σφαιρών.

Συντέθηκαν τέσσερις διαφορετικού μεγέθους μικρο-παγίδες νερού, αλλάζοντας τη συγκέντρωση των μονομερών σε κάθε περίπτωση.

**Πίνακας 7:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των παγίδων νερού.

| Ιδιότητα    | Αντιδραστήρια                                   |
|-------------|---|
| Μονομερές   | Μεθακρυλικό οξύ (MAA)                           |
| Crosslinker | Διμεθακρυλικός εστέρας γλυκολικού οξέος (EGDMA) |
| Απαρχητής   | AIBN  |
| Διαλύτης    | Ακετονιτρίλιο                                   |

Οι λεπτομερείς αναλογίες των αντιδραστηρίων περιγράφονται στον Πίνακα i του Παραρτήματος. Παρακάτω περιγράφεται η πορεία σύνθεσης των παγίδων νερού, όπου ακολουθήθηκε για όλες τις περιπτώσεις δειγμάτων.

### 1<sup>ο</sup> βήμα: Σύνθεση μικρο-σφαιρών P[MAA-co-EGDMA]

Οι PMAA σφαίρες κατασκευάστηκαν μέσω ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης μετά από απόσταξη. Για τη σύνθεση τους η τυπική πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

Το MAA μαζί με το EGDMA διαλύονται σε ακετονιτρίλιο σε μία 250ml τρίστομη σφαιρική φιάλη. Στη φιάλη αυτή έχει τοποθετηθεί ψυκτήρας, θερμομέτρο και παροχή N<sub>2</sub>. Μετά από μια ώρα ανάδευσης, προστίθεται ο απαρχητής (AIBN) ο οποίος έχει διαλυθεί σε μια ποσότητα διαλύτη πριν. Η ανάδευση συνεχίζει στην ίδια θερμοκρασία για 1 ώρα ακόμα. Με σκοπό να γίνει απόσταξη του διαλύτη η θερμοκρασία του πειράματος αυξάνεται μέχρι το σημείο βρασμού του ακετονιτρίλιου (80 °C). Αφού συλλεχθεί συγκεκριμένη ποσότητα διαλύτη η αντίδραση τερματίζεται και το τελικό διάλυμα που προκύπτει έχει τη μορφή γαλακτώματος. Τέλος, αφού το διάλυμα αφήνεται να πιάσει θερμοκρασία περιβάλλοντος το δείγμα φυγοκεντρείται δύο φορές, εκπλένεται με ακετονιτρίλιο και ύστερα ξηραίνεται.

### 2<sup>ο</sup> βήμα: Προετοιμασία παγίδων νερού

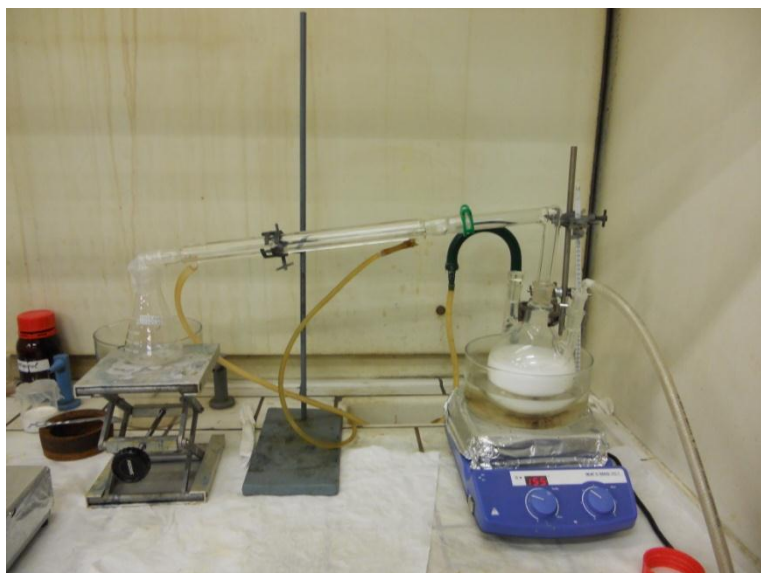
Οι PMAA σφαίρες αποκτούν την ικανότητα να απορροφούν νερό όταν γίνει η μετατροπή των καρβοξυλικών ομάδων στα αντίστοιχα άλατα ασβεστίου. Η πειραματική διαδικασία είναι η ακόλουθη:

2 g σφαίρες PMAA διασπείρονται σε ακετονιτρίλιο μέσω υπερήχων. Αφού γίνει ομογενής διασπορά του δείγματος, προστίθεται 0,74 g διαλύματος 0,1 M Ca(OH)<sub>2</sub>. Το μίγμα γίνεται διαυγές (ανάλογα με την αναλογία των μονομερών- όσο λιγότερο EGDMA προστίθεται τόσο περισσότερο διαυγές γίνεται το διάλυμα). Μετά από ανάδευση 30 λεπτών, το δείγμα φυγοκεντρείται, εκπλένεται με ακετονιτρίλιο και αφήνεται για ξήρανση.

### 3<sup>ο</sup> βήμα: Μελέτη ικανότητας συγκράτησης νερού

Για την διερεύνηση της ικανότητας των παγίδων νερού να απορροφούν νερό, με αύξηση του μεγέθους τους, έγινε μελέτη με τη βοήθεια της δυναμικής σκέδασης φωτός, (DLS). Σε κολλοειδές διάλυμα συγκεκριμένης συγκέντρωσης ξεχωριστού δείγματος κάθε φορά, μετράται η μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου με την προσθήκη νερού. Οι ποσότητες νερού που προστίθενται είναι 2, 5, 5, 10, 15 και 20% v/v.

Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε στα τρία πρώτα δείγματα παγίδων νερού που συντέθηκαν.



**Εικόνα 27:** Τυπική διάταξη ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης μετά από απόσταξη.

### 7.2.2 Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα

Με τη χρήση των εξισώσεων 7.1-7.3 υπολογίζεται ο δείκτης πολυδιασποράς των δειγμάτων των παγίδων νερού που συντέθηκαν, καθώς και το αντίστοιχο μέγεθος κάθε φορά. Σύμφωνα, με αυτά προκύπτει ο παρακάτω πίνακας.

**Πίνακας 8:** Μοριακά κλάσματα (molar ratio), η κατά βάρος μέσος όρος διάμετρος  $D_w$ , η κατά αριθμό μέσος όρος διάμετρο  $D_n$ , δείκτης πολυδιασποράς ( $U$ ) και το μέγεθος σε κάθε μια περίπτωση σύνθεσης παγίδων νερού.

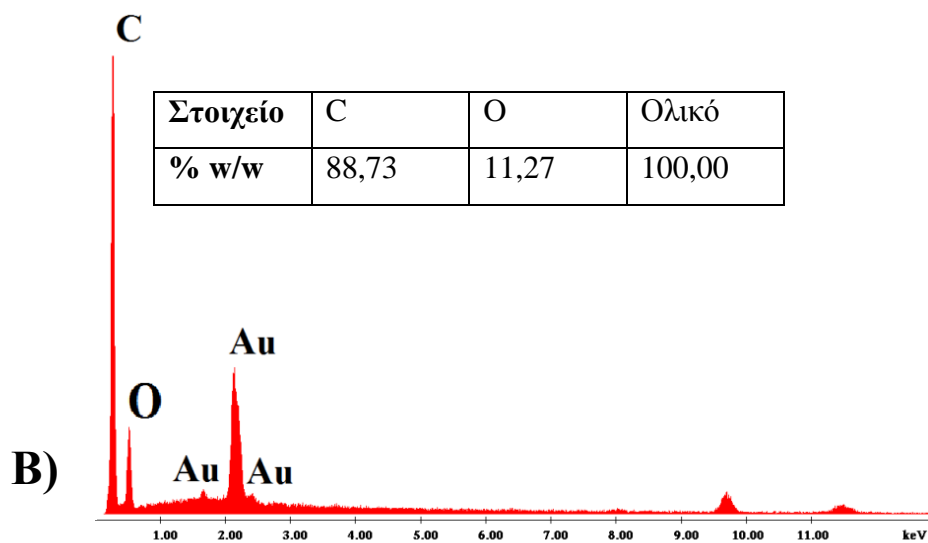
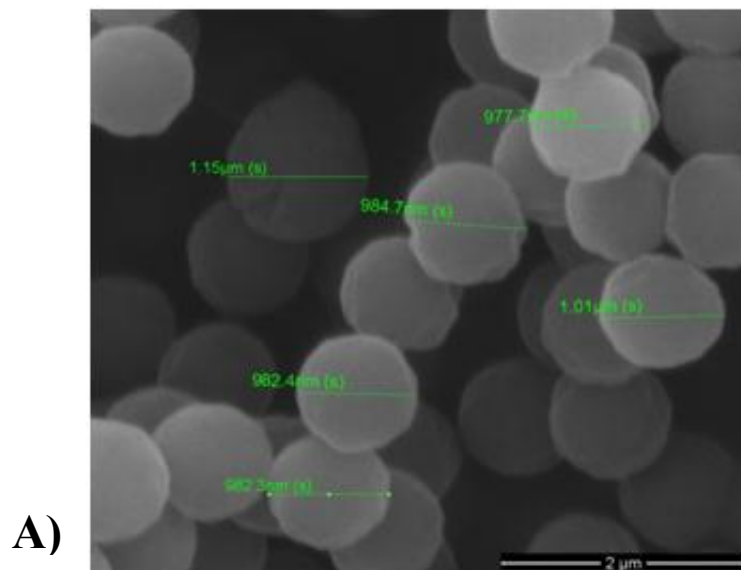
| Δείγματα | [EGDMA]/[MAA]<br>Molar ratio | $D_n$ (nm) | $D_w$ (nm) | $U$ (nm) | Μέγεθος<br>(nm)* |
|----------|------------------------------|------------|------------|----------|------------------|
| 1        | 0,085                        | 614        | 617        | 1,004    | 626±58           |
| 2        | 0,056                        | 1149       | 1161       | 1,011    | 1150±72          |
| 3        | 0,060                        | 826        | 834        | 1,006    | 830±40           |
| 4        | 0,05                         | 1004       | 1011       | 1,007    | 1004±55          |

\*Προσδιορισμένο από την τεχνική SEM

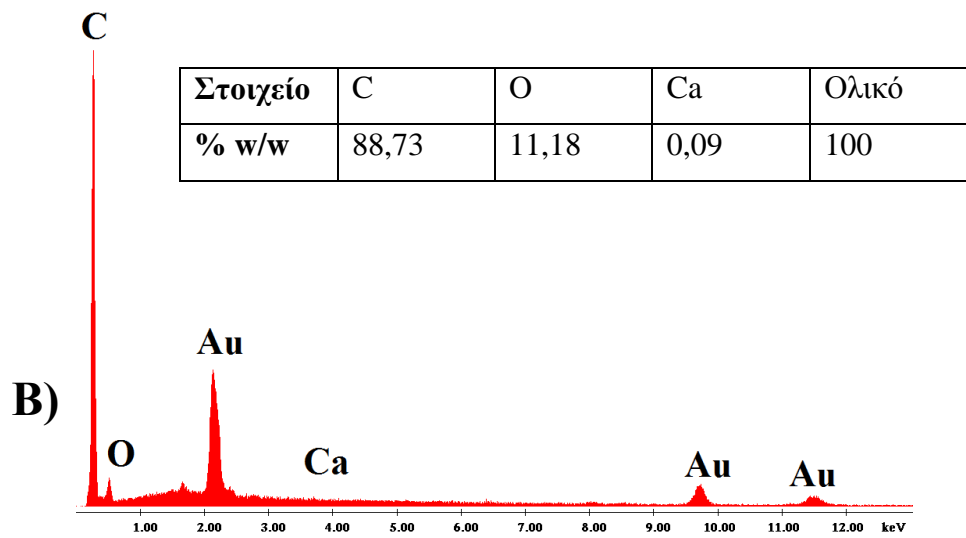
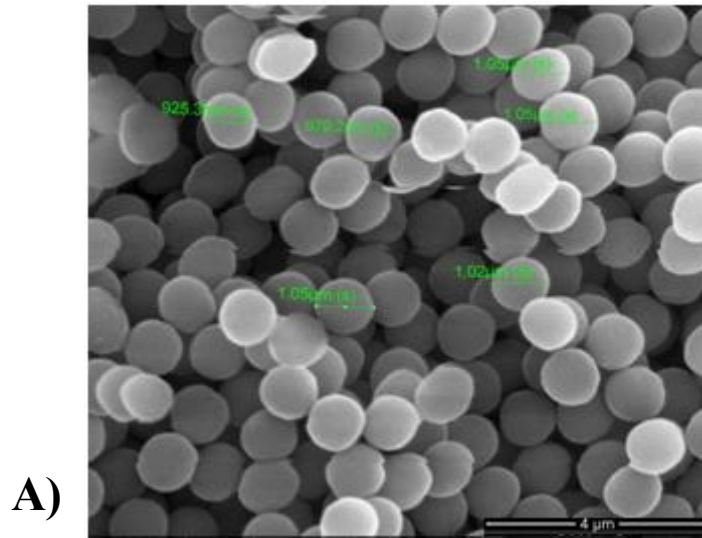
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω για τη συγκεκριμένη σύνθεση χρησιμοποιήθηκε ο ριζικός πολυμερισμός καταβύθισης μετά από απόσταξη, μια τεχνική όπου δίνει ομοιόμορφες πολυμερικές μικροσφαίρες με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες.

Παρακάτω παρατίθενται οι εικόνες SEM και η στοιχειακή ανάλυση του δείγματος 4 πριν και μετά την επεξεργασία με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .





**Εικόνα 28:** A) Εικόνα SEM και B) EDS ανάλυση του δείγματος 4 καθώς και οι %w/w των στοιχείων πριν την τροποποίηση με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

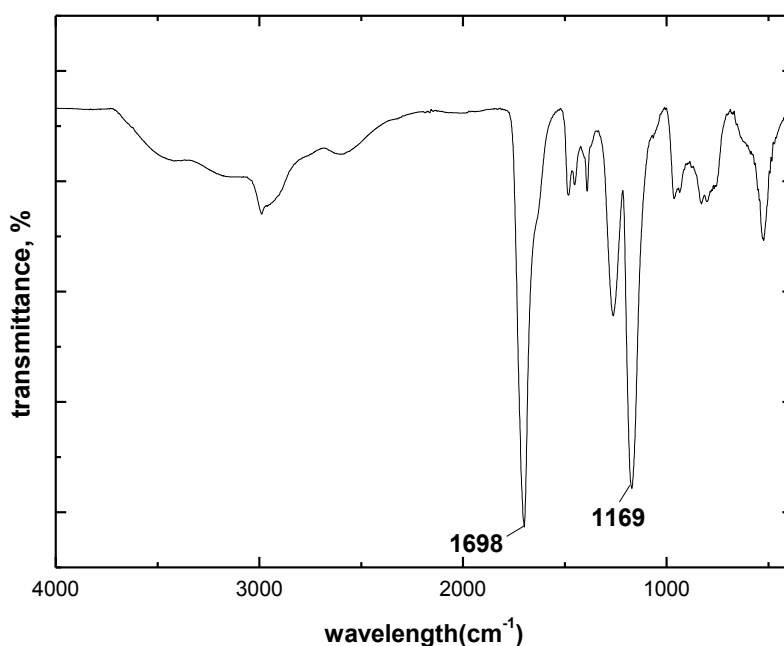


**Εικόνα 29:** A) Εικόνα SEM και B)EDS ανάλυση του δείγματος 4 καθώς και η % w/w των στοιχείων μετά την τροποποίηση με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ .

Σύμφωνα με τις παραπάνω εικόνες SEM και τα δεδομένα του Πίνακα 8 παρατηρείται ότι η πειραματική διαδικασία σύνθεσης παγίδων νερού, εμφανίζει επαναληψιμότητα δίνοντας σφαιρικά σωματίδια, με παρόμοια διάμετρο και μικρή κατανομή μεγέθους. Πρέπει να σημειωθεί ότι το μέγεθος που παρουσιάζεται στον Πίνακα 8, εκτιμήθηκε από τον υπολογισμό του μέσου όρου των διαμέτρων εκατοντάδων παγίδων νερού με την αντίστοιχη τυπική απόκλιση του καθένα. Ο δείκτης πολυδιασποράς, U, για όλες τις περιπτώσεις είναι κοντά στο ένα, και αποδεικνύει ότι υπάρχει καλή κατανομή μεγέθους.

Επίσης, η στοιχειακή ανάλυση σε κάθε μια περίπτωση δείγματος, επιβεβαιώνει την ύπαρξη Ca, μετά την τροποποίηση του, πράγμα που σημαίνει ότι οι μικρο-παγίδες νερού είναι πλέον ικανές να απορροφήσουν νερό. Η ύπαρξη χρυσού οφείλεται στην επεξεργασία επιχρύσωσης του δείγματος με σκοπό να γίνει αγωγίμο ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί με την τεχνική SEM. Τα παραπάνω επιβεβαιώνονται και μέσω της δυναμικής σκέδασης φωτός όπως περιγράφεται παρακάτω.

Ενδεικτικά, στις Εικόνες i-ii του Παραρτήματος παρατίθενται οι εικόνες SEM του 2<sup>ο</sup> δείγματος πριν και μετά την τροποποίηση με Ca(OH)<sub>2</sub> με τις αντίστοιχες στοιχειακές αναλύσεις. Ο χαρακτηρισμός των υπόλοιπων δειγμάτων παρουσιάζει τα ίδια αποτελέσματα με αυτών των δειγμάτων που παρατίθενται. Παρακάτω περιγράφεται το φάσμα FT-IR των παγίδων νερού.



**Εικόνα 30:** Φάσμα FT-IR των παγίδων νερού.

Η κορυφή στους 1698 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στη χαρακτηριστική δόνηση του καρβονυλίου που βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο του PMAA. Η κορυφή αυτή είναι ιδιαίτερα έντονη καθώς το

MAA είναι η κύρια δομική μονάδα της σφαίρας των μικροπαγίδων νερού. Η κορυφή στους 1169  $\text{cm}^{-1}$  αποδίδεται στον αιθερικό δεσμό του EGDMA. Αποδεικνύεται ότι η σύνθεση των μικροσφαιρών P[MAA-co-EGDMA] έγινε επιτυχώς.

Για να πιστοποιηθεί η λειτουργία των μικροπαγίδων νερού στην ικανότητά τους να απορροφούν νερό αρκετά παραπάνω από το βάρος τους χωρίς να χαλάει η δομή τους, έγινε μελέτη με την τεχνική DLS στα δείγματα προσθέτοντας διαφορετικές ποσότητες νερού. Με αυτόν τον τρόπο μελετάται η αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στη Παράγραφο 5.4 η δυναμική σκέδαση φωτός (DLS) χρησιμοποιείται συνήθως ως συμπληρωματική μέθοδος και μας δίνει πληροφορίες σχετικά με το μέγεθος, την κατανομή μεγέθους, τη διασπορά, το βαθμό συσσωμάτωσης και τη σταθερότητα ενός κolloειδούς διαλύματος (μέσω του ζ-δυναμικού).

Τα δείγματα τα οποία μελετώνται πρέπει να πληρούν συγκεκριμένες προϋποθέσεις μία εκ των οποίων είναι και η κατάλληλη συγκέντρωση. Στη μέθοδο DLS το δείγμα πρέπει να είναι αρκετά αραιό ώστε να αποφεύγεται το φαινόμενο της πολλαπλής σκέδασης αλλά και παράλληλα αρκετά πυκνό ώστε να είναι ικανοποιητικές οι σκεδάσεις στο υπό μελέτη διάλυμα. Το ανώτατο όριο της συγκέντρωσης εξαρτάται και από το σημείο εκείνο όπου αυτή δεν επηρεάζει την διάχυση των σωματιδίων, λόγω των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων[45]. Γι το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε αρχικά μελέτη της μεταβολής της υδροδυναμικής διαμέτρου συναρτήσει διαφόρων συγκεντρώσεων ώστε να βρεθεί η βέλτιστη συγκέντρωση διαλύματος.

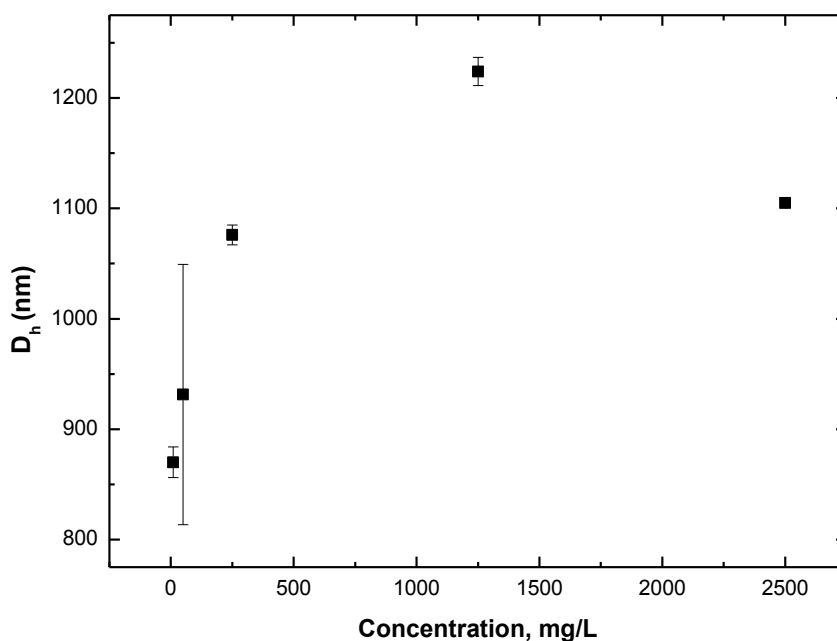
Η πρώτη μελέτη για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης για μέτρηση με τη δυναμική σκέδαση φωτός έγινε με το πρώτο δείγμα σύνθεσης παγίδων νερού, όπου έχει βρεθεί ότι το μέγεθος σωματιδίων είναι  $626 \pm 58$  nm μέσω της τεχνικής SEM.

**Πίνακας 9:** Διαφορετικές συγκεντρώσεις  $1^{\text{ου}}$  δείγματος για μελέτη στη δυναμική σκέδαση φωτός.

| <b>Συγκέντρωση δείγματος<br/>(mg/L)</b> | <b>Υδροδυναμική<br/>διάμετρος, <math>D_h</math> (nm)</b> | <b>PDI</b>        |
|---|--|-------------------|
| 10                                      | $870 \pm 13,92$  | $0,291 \pm 0,07$  |
| 50                                      | $931,5 \pm 117,9$  | $0,202 \pm 0,046$ |
| 250                                     | $1076 \pm 9,074$   | $0,197 \pm 0,058$ |
| 1250                                    | $1224 \pm 12,7$  | $0,18 \pm 0,008$  |
| 2500                                    | $1105 \pm 2,082$   | $0,22 \pm 0,006$  |

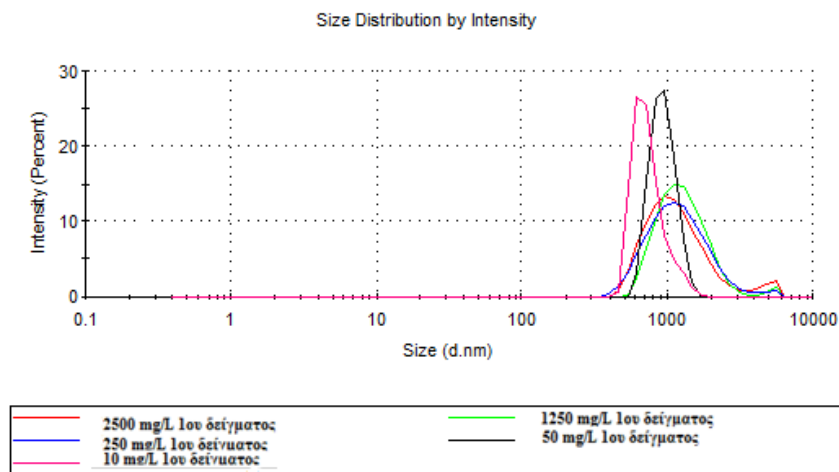
Ο δείκτης πολυδιασποράς (Polydispersity Index, PDI) είναι ένας αδιάστατος δείκτης ο οποίος χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη διασπορά (μικρή, μεσαία, μεγάλη) σε ένα κολλοειδές διάλυμα. Σύμφωνα με το πρόγραμμα του DLS όταν οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς είναι μικρότερες του 0,5 τότε το δείγμα θεωρείται ότι είναι μονοδιάσπαρτο ενώ όταν οι τιμές είναι μεγαλύτερες του 0,7 (με μέγιστη τιμή το 1) τότε θεωρείται ότι έχει μία ευρεία κατανομή μεγέθους.

Στα περισσότερα δείγματα οι τιμές του δείκτη πολυδιασποράς κυμαίνονται μεταξύ αυτών των δύο τιμών[55].



**Εικόνα 31:** Υδροδυναμική διάμετρος του 1<sup>ου</sup> δείγματος συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων διαλυμάτων.

Από τις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις δείγματος που μελετήθηκαν επιλέχθηκε η 50 mg/L ως η βέλτιστη συγκέντρωση για τη μελέτη των παγίδων νερού. Το συγκεκριμένο σύστημα δεν έχει μελετηθεί πλήρως, και κάποιοι παράμετροι που ισχύουν για άλλα δείγματα μπορούν να μην ισχύουν για τη συγκεκριμένη περίπτωση. Παρ' όλα αυτά, μπορεί να προκύψει ενδεικτικό συμπέρασμα επιλογής της συγκεκριμένης συγκέντρωσης ως ικανοποιητική για μετρήσεις DLS παρατηρώντας κάποια από τα διαγράμματα της μέτρησης. Παρακάτω, παρατίθενται το διάγραμμα της κατανομής της σκέδασης συναρτήσει του μεγέθους.



**Εικόνα 32:** Κατανομή κατά Gauss κατανομής μεγέθους του 1<sup>ου</sup> δείγματος σε διάφορες συγκεντρώσεις σε διαλύτη ακετονιτριλίου.

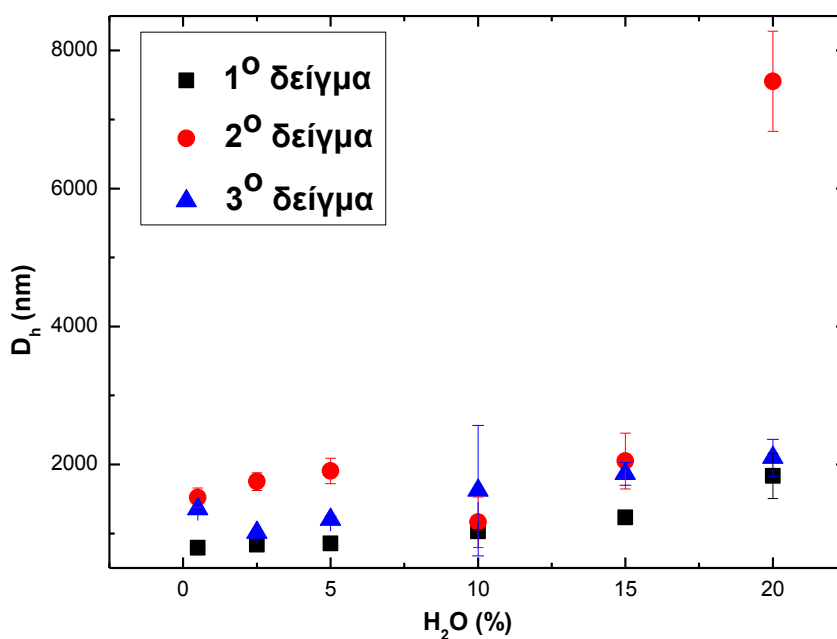
Για να έχει ένα δείγμα ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους, θα πρέπει η κατανομή κατά Gauss του διαγράμματος της σκέδασης συναρτήσει του μεγέθους, να δείχνει έναν πληθυσμό. Στο παραπάνω σχήμα, μπορούν να απορριφθούν οι συγκεντρώσεις 2500 mg/L και 1250 mg/L, καθώς εμφανίζουν δύο πληθυσμούς (κορυφές κοντά στα 10000 nm). Ίσως, στις συγκεντρώσεις αυτές οι αλληλεπιδράσεις των σωματιδίων να είναι έντονες, με τρόπο έτσι ώστε να δημιουργούν συσσωματώματα.

Οποιαδήποτε από τις υπόλοιπες τρεις συγκεντρώσεις, δηλαδή 10 mg/L, 50 mg/L και 250mg/L, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των παγίδων νερού. Επιλέχθηκε η 50 mg/L ως η συγκέντρωση εκείνη για την μελέτη της ικανότητας των παγίδων νερού να συγκρατούν νερό, χωρίς να σημαίνει ότι και αν οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις να είχαν μελετηθεί θα ήταν λάθος.

Στη συνέχεια μελετήθηκε, η μεταβολή της υδροδυναμικής διαμέτρου συναρτήσει διαφορετικών ποσοτήτων νερού. Στον παρακάτω πίνακα, παρατίθενται οι ποσότητες νερού που προστίθενται κάθε φορά σε κάθε δείγμα, την αντίστοιχη αύξηση υδροδυναμικής διαμέτρου ( $D_h$ ) και οι δείκτες πολυδιασποράς (PDI) κάθε φορά.

**Πίνακας 10:** Μεταβολή υδροδυναμικής διαμέτρου με την προσθήκη νερού, και οι αντίστοιχοι PDI.

| Συγκέντρωση νερού, % | Δείγμα 1    |       | Δείγμα 2   |       | Δείγμα 3   |       |
|----------------------|-------------|-------|------------|-------|------------|-------|
|                      | $D_h$ (nm)  | PDI   | $D_h$ (nm) | PDI   | $D_h$ (nm) | PDI   |
| 2,5                  | 835,2±12,4  | 0,233 | 1752±128,3 | 0,234 | 1010±17,86 | 0,437 |
| 5                    | 855,3±59,73 | 0,293 | 1907±184,2 | 0,292 | 1202±47,09 | 0,335 |
| 10                   | 1032±21,93  | 0,128 | 1163±364,9 | 0,064 | 1621±945,8 | 0,369 |
| 15                   | 1233±23,67  | 0,079 | 2051±403,5 | 0,675 | 1864±163,1 | 0,868 |
| 20                   | 1834±329,8  | 0,055 | 7553±726,1 | 0,657 | 2097±268,3 | 0,451 |



**Εικόνα 33:** Μεταβολή υδροδυναμικής διαμέτρου συναρτήσει διαφόρων ποσοτήτων νερού για το 1<sup>ο</sup> δείγμα (μαύρο τετράγωνο), το 2<sup>ο</sup> δείγμα (κόκκινος κύκλος) και το 3<sup>ο</sup> δείγμα (μπλε τρίγωνο).

### 7.2.3 Συζήτηση

Οι παγίδες νερού συντέθηκαν με ριζικό πολυμερισμό καταβύθισης μετά από απόσταξη, μια τεχνική όπου δίνει ομοιόμορφες πολυμερικές μικροσφαίρες. Η διαδικασία σύνθεσης είναι δύο βημάτων, όπου περιλαμβάνει αρχικά τις σταυροδεμένες σφαίρες πολυμεθακρυλικού οξέος (PMAA) μέσω του ριζικού πολυμερισμού καταβύθισης, και στη συνέχεια την μετατροπή των καρβοξυλικών ομάδων των δομικών μονάδων στα αντίστοιχα άλατα ασβεστίου μέσω της τροποποίησης των μικροπαγίδων με διάλυμα Ca(OH)<sub>2</sub>.

Οι εικόνες SEM επιβεβαιώνουν την ομοιομορφία στην κατανομή μεγέθους σωματιδίων και την επαναληψιμότητα (Εικόνες 28 και 29). Η στοιχειακή ανάλυση EDS, μετά την ενεργοποίηση των παγίδων νερού με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  επιβεβαιώνει την ύπαρξη του ασβεστίου στις σφαίρες. Η επιτυχία της τροποποίησης επιβεβαιώνεται και με τα αποτελέσματα μετά την πρόσθεση νερού σε κάθε δείγμα που μελετήθηκε.

Παρόλο που η συγκεκριμένη μελέτη συμπεριφοράς ενεργοποιημένων με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  παγίδων νερού, είναι ενδεικτική και χρειάζεται περαιτέρω έρευνα, είναι δυνατόν να εξαχθούν κάποια συμπεράσματα: Από την Εικόνα 33 παρατηρείται ότι η υδροδυναμική διάμετρος των παγίδων νερού μεταβάλλεται όσο αυξάνεται η ποσότητα του νερού στο διάλυμα. Για μικρές ποσότητες νερού, μέχρι και 10 % v/v της συνολικής ποσότητας του διαλύτη οι διαφορές στην υδροδυναμική διάμετρο δεν είναι σημαντικές, αλλά καθώς το ποσοστό αυξάνεται παρατηρείται μία αρκετά μεγάλη διαφορά και στο μέγεθος και στην πολυδιασπορά. Η διαφορά αυτή είναι εμφανής όταν το ποσοστό του νερού ξεπερνά το 15% και αυτό οφείλεται πιθανόν στην αλληλεπίδραση των παγίδων-νερού με το νερό. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να αφορούν την ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου μεταξύ των σωματιδίων και του νερού αλλά και μεταξύ των ίδιων των σωματιδίων, που τελικά οδηγούν σε κροκίδωση του δείγματος. Αυτό μπορεί να αποδοθεί, στην μεγάλη αύξηση της υδροδυναμικής διαμέτρου και στον υψηλό δείκτη πολυδιασποράς (PDI).

Η ενεργοποίηση των παγίδων νερού με κάποια βάση, όπως  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  στη συγκεκριμένη περίπτωση, είναι ένας μηχανισμός που ακόμα δεν έχει διαλευκανθεί πλήρως. Περαιτέρω μελέτη καθίσταται απαραίτητη για την κατανόηση του μηχανισμού.

## **7.3 Τροποποιημένες παγίδες νερού με $\text{Ca}(\text{OH})_2@ \text{SiO}_2$**

### **7.3.1 Πειραματική διαδικασία**

Η διαδικασία σύνθεσης κελύφους  $\text{SiO}_2$  έγινε με τη μέθοδο sol-gel. Όπως έχει αναφερθεί στην Παράγραφο 2.2 του θεωρητικού μέρους, ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει τις αντιδράσεις υδρόλυσης και συμπύκνωσης είναι ο λόγος  $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{Si}]$ ,  $R_w$ . Για την αποτελεσματικότερη και πληρέστερη επικάλυψη των ενεργοποιημένων παγίδων νερού, πραγματοποιήθηκαν έξι πειράματα αυξάνοντας κάθε φορά την ποσότητα του αντιδραστήριου TEOS.



**Πίνακας 11:** Αντιδραστήρια για την επικάλυψη των μικρο-παγίδων νερού.

| <b>Ιδιότητα</b>       | <b>Αντιδραστήρια</b>  |
|-----------------------|---|
| Διαλύτης              | Ακετονιτρίλιο   |
| Πρόδρομη ένωση        | TEOS  |
| Καταλύτης             | 30% NH <sub>3</sub>   |
| Δείγμα προς επικάλυψη | Μικροδοχεία της 4 <sup>ης</sup> περίπτωσης σύνθεσης τροποποιημένων μικροπαγίδων νερού (μεγέθους 1004±55 nm) |

Οι αναλυτικές ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν καταγράφονται στον Πίνακα ii του Παραρτήματος.

Η πειραματική διαδικασία είναι ίδια και στα έξι πειράματα που πραγματοποιήθηκαν και είναι η εξής:

Σε 150 ml ποτήρι ζέσεως η ποσότητα των παγίδων διαλύεται σε ακετονιτρίλιο, και το διάλυμα αφήνεται στους υπερήχους για 20 λεπτά και μετά για άλλο τόσο στην ανάδευση, με σκοπό να γίνει καλή διασπορά του δείγματος στο διαλύτη. Στη συνέχεια, προστίθεται η αμμωνία και η ανάδευση συνεχίζεται για άλλα 15 λεπτά. Ύστερα, στο εκάστοτε δείγμα προστίθεται στάγδην το TEOS και το διάλυμα αφήνεται υπό ανάδευση για περίπου 20 ώρες. Τέλος, το κάθε δείγμα φυγοκεντρείται, εκπλένεται και αφήνεται το ίζημα για ξήρανση. Όλη η πειραματική διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

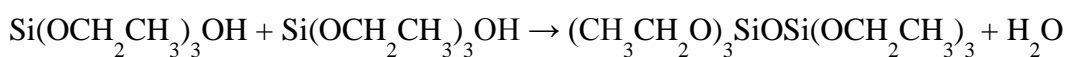
Για την επικάλυψη των παγίδων νερού με κέλυφος SiO<sub>2</sub> σχηματίστηκε ένα γαλάκτωμα νερού σε έλαιο (W/O emulsion). Λόγω του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε (ακετονιτρίλιο), όταν προστεθεί σε αυτόν υδατικό διάλυμα με ισχυρή ανάδευση, δημιουργούνται σταγόνες νερού. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, λόγω της ικανότητας των παγίδων νερού να συγκρατούν νερό, ο ρόλος της υδατικής φάσης σε ένα W/O γαλάκτωμα αντιπροσωπεύεται από τα σωματίδια που έχουν προσροφήσει νερό. Το νερό προέρχεται από το διάλυμα της NH<sub>3</sub> 30%. Έτσι, στη μεσεπιφάνεια των παγίδων νερού και ακετονιτρίλιου, όταν προστεθεί η πρόδρομη ένωση TEOS, η υδρόλυση και η συμπύκνωσή του λαμβάνει χώρα εκεί. Με αυτόν τον τρόπο γίνεται η επικάλυψη των παγίδων νερού με κέλυφος πυριτίας.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά την sol-gel διαδικασία είναι η υδρόλυση και ο πολυμερισμός όπως έχει ήδη αναφερθεί στην Παράγραφο 2.2 Η υδρόλυση συμβαίνει όταν το Si(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub> και το νερό αναμιχθούν:

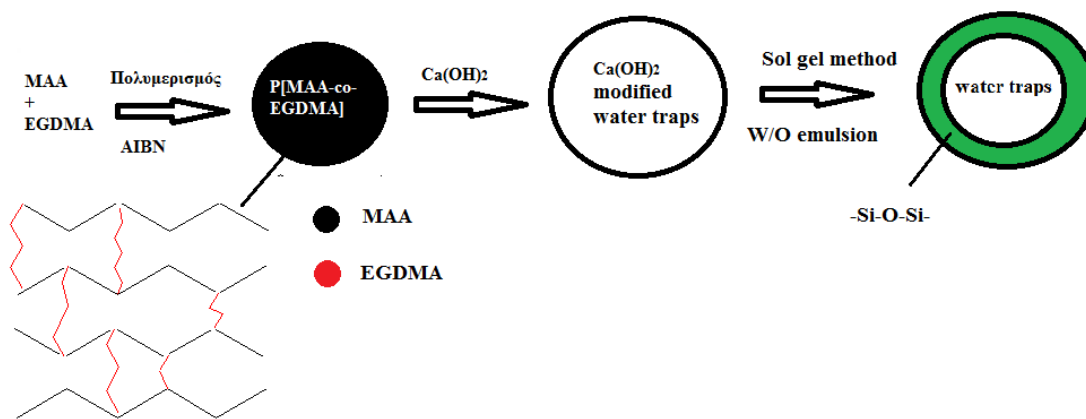


Η παραπάνω αντίδραση συμβαίνει στη μεσεπιφάνεια των παγίδων νερού και του οργανικού διαλύτη.

Τα ενδιάμεσα προϊόντα που υπάρχουν λόγω της μερικής υδρόλυσης αποτελούνται από μόρια που εμπεριέχουν ομάδες Si-OH, τα οποία ονομάζονται σιλανόλες. Η πλήρης αντίδραση του  $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$  σε  $\text{Si}(\text{OH})_4$  θα απέδιδε το πυριτικό οξύ αλλά στην πραγματικότητα δεν υφίσταται πλήρης υδρόλυση. Αντ' αυτού, μπορεί να συμβεί συμπύκνωση μεταξύ δύο σιλανολών ή μίας σιλανόλης και μίας αιθόξυ ομάδας προς το σχηματισμό ενός γεφυρωμένου οξυγόνου ή μίας ομάδας σιλοξάνης (-Si-O-Si-) με ταυτόχρονη απομάκρυνση μορίων νερού ή αιθανόλης. Παρακάτω περιγράφεται η αντίδραση συμπύκνωσης ανάμεσα σε δύο σιλανόλες με ταυτόχρονη απομάκρυνση νερού:



Στη συνέχεια, η υδρόλυση του  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_3\text{SiOSi}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$  θα οδηγήσει για παράδειγμα στον σχηματισμό του  $(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{O})_2\text{Si}(\text{OH})\text{OSi}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_3$  το οποίο μπορεί να υποστεί με τη σειρά του και άλλον πολυμερισμό κ.ο.κ.



**Εικόνα 34:** Σχηματική αναπαράσταση της επικάλυψης των τροποποιημένων παγίδων νερού με SiO<sub>2</sub> σε ένα W/O γαλάκτωμα.

### 7.3.2 Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα

Διατηρώντας στα πειράματα σταθερές όλες τις παραμέτρους εκτός από την ποσότητα του προστιθέμενου TEOS, προκύπτει ο παρακάτω πίνακας με τις αναλογίες  $H_2O/Si$ ,  $R_w$  για κάθε μια περίπτωση. Η αναλογία αυτή προκύπτει από το προστιθέμενο νερό σε κάθε πείραμα. Δηλαδή, σε 1 ml  $NH_3$  περιέχονται 0,3 ml  $H_2O$  (30%  $NH_3$ ).

**Πίνακας 12:** Η αντίστοιχη αναλογία  $R_w$  για κάθε μια περίπτωση πειράματος σύνθεσης τροποποιημένων μικρο-παγίδων νερού με  $Ca(OH)_2@SiO_2$ .

| Πείραμα | Ποσότητα TEOS (ml) | $[H_2O]/[Si]$ , $R_w$ |
|---------|--------------------|-----------------------|
| (α)     | 6                  | 1,44                  |
| (β)     | 9                  | 0,97                  |
| (γ)     | 12                 | 0,73                  |
| (δ)     | 15                 | 0,58                  |
| (ε)     | 18                 | 0,48                  |
| (στ)    | 21                 | 0,41                  |

Να σημειωθεί ότι η ποσότητα των τροποποιημένων μικροπαγίδων νερού που επικαλύφθηκε ήταν ίδια σε όλα τα πειράματα, (0,5g).

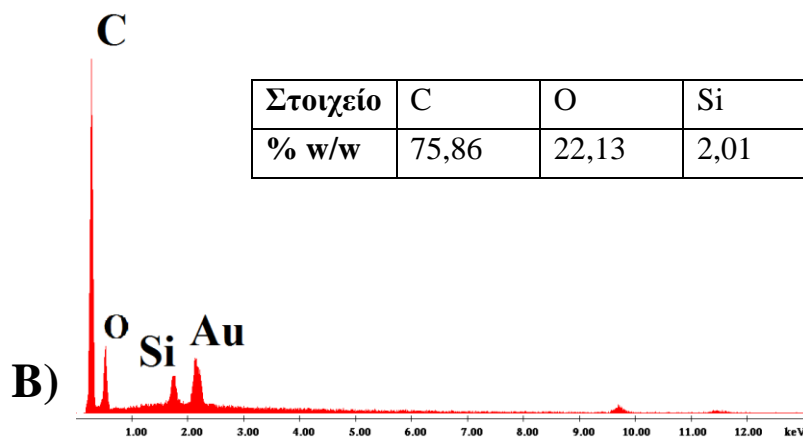
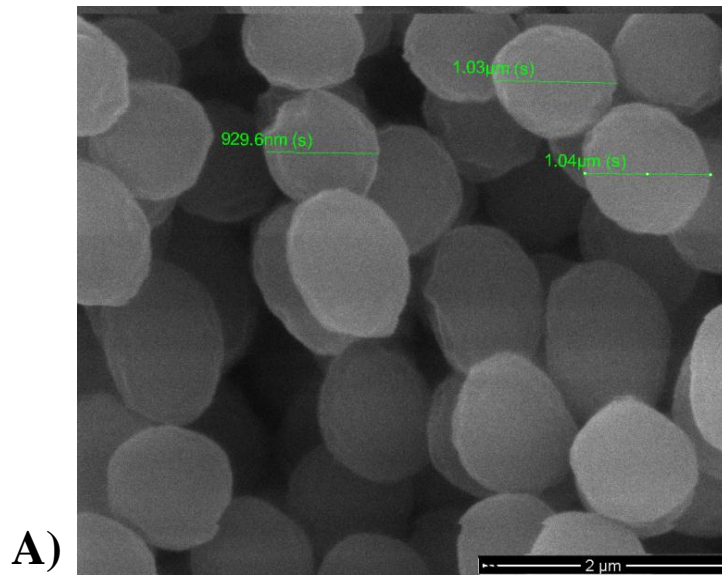
Στον αμέσως επόμενο πίνακα, παρατίθενται τα μεγέθη των μικροδοχείων που προέκυψαν.

**Πίνακας 13:** Η ποσότητα προστιθέμενου TEOS, η κατά βάρος μέσος όρος διάμετρος  $D_w$ , η κατά αριθμό μέσος όρος διάμετρο  $D_n$ , δείκτης πολυδιασποράς ( $U$ ) και το μέγεθος των επικαλυμμένων παγίδων νερού με κέλυφος  $SiO_2$  για όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

| Πείραμα | Ποσότητα TEOS (ml) | $D_n$ (nm) | $D_w$ (nm) | $U$ (nm) | Μέγεθος (nm)* |
|---------|--------------------|------------|------------|----------|---------------|
| (α)     | 6                  | 1017,71    | 1021,19    | 1,00     | 1021±36       |
| (β)     | 9                  | 1006,84    | 1008,67    | 1,00     | 1006±26       |
| (γ)     | 12                 | 1080,53    | 1100,72    | 1,01     | 1080±88       |
| (δ)     | 15                 | 1031,86    | 1040,36    | 1,00     | 1031±59       |
| (ε)     | 18                 | 967,39     | 973,18     | 1,00     | 967±47        |
| (στ)    | 21                 | 938,82     | 949,06     | 1,01     | 938±60        |

\*Προσδιορισμένο από την τεχνική SEM.

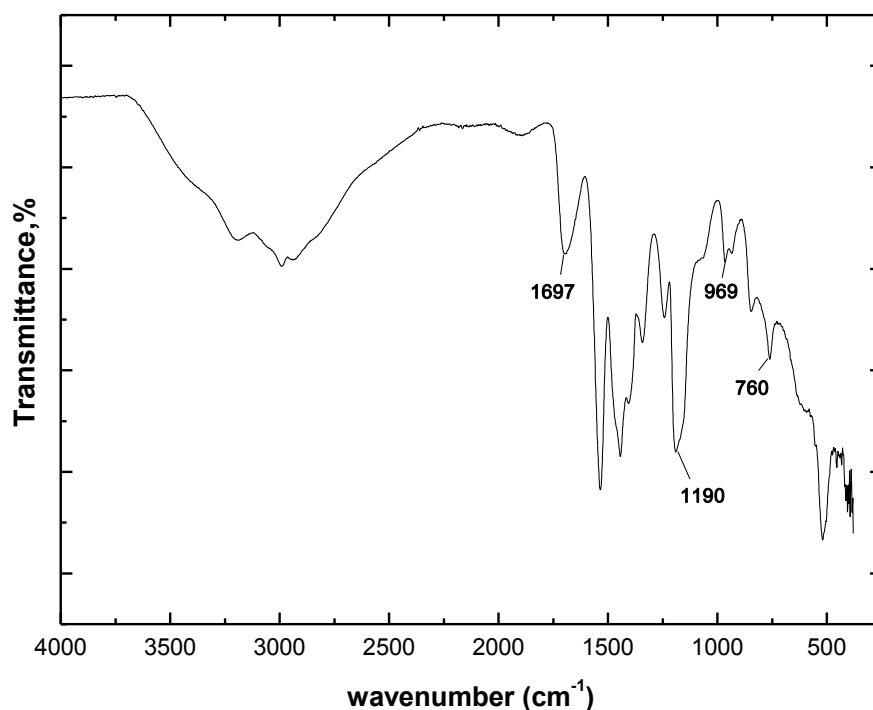
Η επόμενη εικόνα SEM και η αντίστοιχη στοιχειακή ανάλυση EDS αναφέρεται για το δείγμα του (στ) πειράματος, δηλαδή εκείνου με τη μεγαλύτερη προστιθέμενη ποσότητα TEOS.



**Εικόνα 35:** A) SEM δείγματος και B) EDS ανάλυση του (στ) πειράματος (21 ml TEOS) καθώς και οι %w/w του κάθε στοιχείου.

Μέσω της στοιχειακής ανάλυσης επιβεβαιώνεται η ύπαρξη Si στο δείγμα. Οι εικόνες SEM και η ανάλυση EDS των δειγμάτων των πειραμάτων (α) και (δ) παρατίθενται στις Εικόνες vii και vii, αντίστοιχα, του Παραρτήματος. Ο χαρακτηρισμός των υπόλοιπων δειγμάτων παρουσιάζει τα ίδια αποτελέσματα με αυτών των δειγμάτων που παρατίθενται. Από την Εικόνα 35 για το δείγμα του (στ) πειράματος, προκύπτει ότι το τελικό προϊόν της αντίδρασης είναι σφαίρες μεγέθους περίπου  $938 \pm 60$  nm. Η πειραματική διαδικασία σύνθεσης των επικαλυμμένων παγίδων νερού, εμφανίζει επαναληψιμότητα δίνοντας σφαιρικά σωματίδια, με παρόμοια διάμετρο και μικρή κατανομή μεγέθους. Επιπλέον, δεν παρατηρούνται συσσωματώματα και από την ανάλυση EDS επιβεβαιώνεται η ύπαρξη Si. Τονίζεται ότι δεν παρατηρείται καταστροφή των μικροπαγίδων νερού καθώς και ούτε αλλοίωση του σχήματός τους.

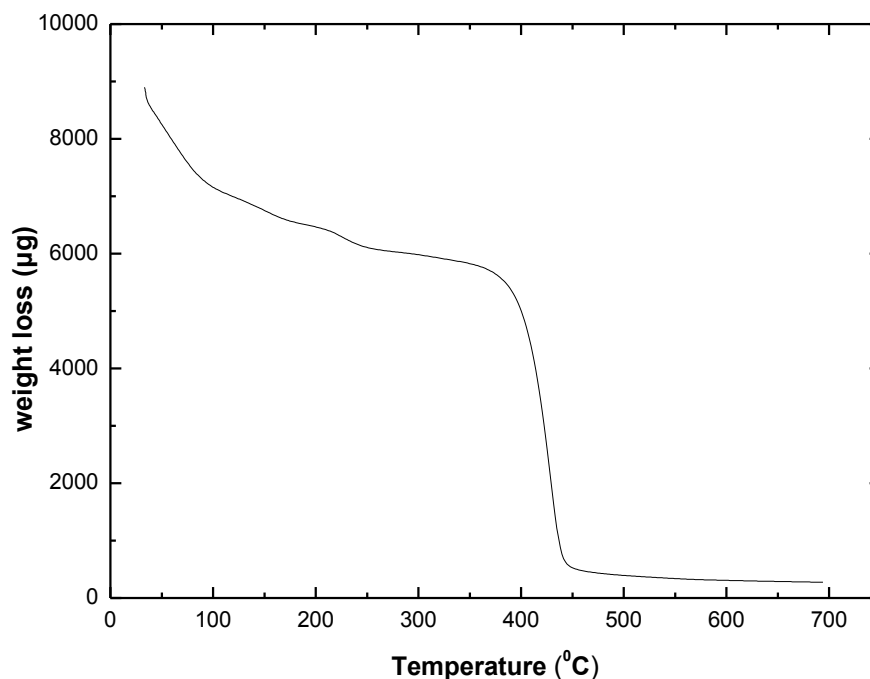
Παρακάτω απεικονίζεται το φάσμα FT-IR των τροποποιημένων με  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  παγίδων νερού με επικάλυψη  $\text{SiO}_2$ .



**Εικόνα 36:** Φάσμα FT-IR τροποποιημένων παγίδων νερού με  $\text{Ca}(\text{OH})_2@ \text{SiO}_2$ .

Η κορυφή στους  $1697 \text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στη χαρακτηριστική δόνηση του καρβονυλίου που βρίσκεται στο καρβοξυλικό άκρο του PMAA. Η κορυφή στους  $1190 \text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στον αιθερικό δεσμό του EGDMA. Η κορυφή στα  $969 \text{ cm}^{-1}$  αντιστοιχεί στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού Si-OH ενώ στα  $792 \text{ cm}^{-1}$  η κορυφή αποδίδεται στην συμμετρική δόνηση του δεσμού Si-O[56].

Για τον προσδιορισμό ανόργανου υλικού στο δείγμα που επικαλύφθηκε, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της θερμοσταθμικής ανάλυσης (TGA). Παρακάτω παρουσιάζεται το θερμογράφημα του δείγματος στο οποίο προστέθηκε η μεγαλύτερη ποσότητα TEOS, δηλαδή του δείγματος από το πείραμα (στ). Τα διαγράμματα θερμοσταθμικής ανάλυσης και των υπόλοιπων δειγμάτων έχουν την ίδια μορφή.



**Εικόνα 37:** Θερμοσταθμικός προσδιορισμός SiO<sub>2</sub> στις επικαλυμμένες παγίδες νερού.

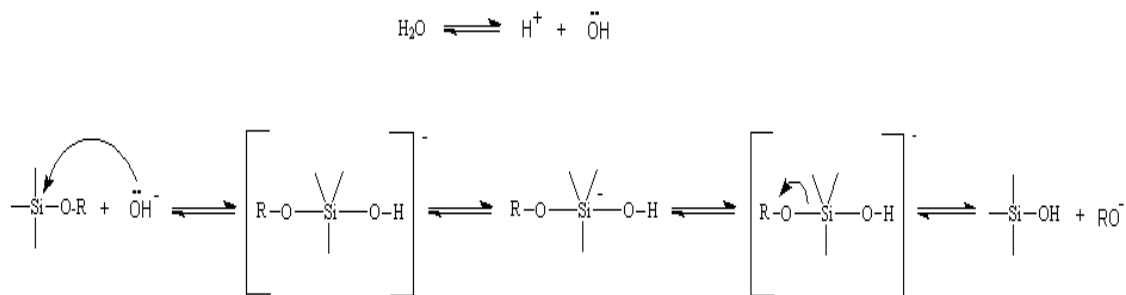
Το θερμογράφημα των επικαλυμμένων παγίδων νερού με SiO<sub>2</sub> (Εικόνα 37) υποδεικνύει την πρώτη απώλεια μάζας μεταξύ 30-150 °C, όπου αποδίδεται στην εκρόφιση της αιθανόλης και του φυσικού προσροφημένου νερού. Η δεύτερη απώλεια μάζας μεταξύ 150-250 °C αποδίδεται στην εκρόφιση του χημικώς προσροφημένου νερού, δηλαδή στο μονομοριακό στρώμα μορίων νερού που αλληλεπιδρά απευθείας με την στερεή επιφάνεια όπως με τα κατιόντα πυριτίου και τα υδροξύλια. Στην περιοχή 250-350 °C εμφανίζεται η τρίτη απώλεια μάζας που αποδίδεται από υδροξυλίωση (απελευθέρωση των -OH ομάδων από το σύστημα). Η τέταρτη απότομη απώλεια μάζας στην περιοχή 350-480 °C αποδίδεται στην αποσύνθεση του οργανικού πυρήνα, δηλαδή των παγίδων νερού.

Μετά την πλήρη αποσύνθεση και του οργανικού πυρήνα έχει απομείνει ένα 4,19% του συνολικού βάρους του δείγματος, που αντιστοιχεί στην ύπαρξη ανόργανου υλικού στο δείγμα, και συγκεκριμένα του SiO<sub>2</sub> [57].

### 7.3.3 Συζήτηση

Η επικάλυψη των μικροπαγίδων νερού πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο sol-gel σε διαλύτη ακετονιτριλίου. Και αυτό γιατί, σε ένα τέτοιο διαλύτη συντέθηκαν οι παγίδες νερού και εκεί έχουν την συσπειρωμένη μορφή τους. Όταν προστεθεί νερό σε ένα τέτοιο σύστημα, όπως έχει αναφερθεί στην Παράγραφο 7.2.2 παρατηρείται μεταβολή μεγέθους των μικροδοχείων.

Η υδρόλυση με βασική κατάλυση, των πυριτικών αλκοξειδίων προχωρά πιο αργά από την υδρόλυση με όξινη κατάλυση, αλλά τείνει να είναι πλήρης και οριστική. Τα άτομα του οξυγόνου του βασικού αλκοξειδίου τείνουν να αποκρούσουν το πυρηνόφιλο  $\text{-OH}$ . Όμως, μόλις εμφανιστεί μια αρχική υδρόλυση, οι επόμενες αντιδράσεις συνεχίζονται σταδιακά και κάθε επόμενη ομάδα αλκοξειδίου αφαιρείται ευκολότερα από ότι η προηγούμενη. Δημιουργείται ένας μηχανισμός τύπου  $S_N2$  στο οποίο το  $\text{-OH}$  αντικαθιστά το  $\text{-OR}$  με την αντιστροφή του τετραέδρου του πυριτίου.[58]



**Εικόνα 38:** Υδρόλυση με βασική κατάλυση.

Με βάση τον Πίνακα 12, παρατηρείται ότι οι τιμές τις  $R_w < 2$  για όλες τις περιπτώσεις των πειραμάτων καθώς προστίθεται περισσότερη ποσότητα TEOS η αναλογία  $R_w$  μειώνεται. Σύμφωνα με τη θεωρία (Παράγραφο 2.2) όταν υπάρχουν υποστοιχειομετρικές προσθήκες νερού ευνοείται ο μηχανισμός συμπύκνωσης με παράγωγο την αλκοόλη, χωρίς να έχει ολοκληρωθεί η υδρόλυση όλων των αλκοξομάδων.

Από την στοιχειακή ανάλυση EDS, παρατηρείται η ύπαρξη Si. Επιπλέον, το φάσμα FT-IR απεικονίζει τις χαρακτηριστικές κορυφές των δεσμών Si-OH και Si-O, που αποδεικνύουν την ύπαρξη του δικτύου πυριτίας.

Το θερμογράφημα ενός επικαλυμμένου τέτοιου συστήματος πιστοποιεί την ύπαρξη ανόργανου κελύφους και συγκεκριμένα κελύφους  $\text{SiO}_2$ .

Μελλοντικά θα διερευνηθεί για τα συστήματα της κάθε μια περίπτωσης που συντέθηκαν, η αντοχή των κελυφών τους. Σκοπός είναι να βρεθεί εκείνη η ποσότητα TEOS που δίνει ανθεκτικότερο κέλυφος, και θα προστατέψει στο μέλλον το εγκλωβισμένο σπόρο βακτηρίου από τις έντονες τάσεις του τσιμέντου και το έντονο αλκαλικό περιβάλλον αλλά θα μπορεί να σπάσει και σχετικά εύκολα για να προωθηθεί το φαινόμενο της αυτοΐασης.

## 7.4 Μικροσφαίρες SiO<sub>2</sub>

### 7.4.1 Πειραματική διαδικασία

Μέσω της μεθόδου sol-gel συντέθηκαν μικροσφαίρες SiO<sub>2</sub> σε 2 σειρές πειραμάτων .

- Στην 1<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων αυξήθηκε η ποσότητα TEOS που προστίθεται.
- Στην 2<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων αυξήθηκε ο όγκος του διαλύτη.

Και στις δύο περιπτώσεις μεταβάλλεται ο λόγος [H<sub>2</sub>O]/[Si], R<sub>w</sub> και διερευνήθηκε η μεταβολή μεγέθους της μικροσφαίρας .

**Πίνακας 14:** Αντιδραστήρια για τη σύνθεση μικροσφαιρών SiO<sub>2</sub>.

| Ιδιότητα       | Αντιδραστήρια       |
|----------------|---------------------|
| Διαλύτες       | Αιθανόλη<br>Νερό    |
| Πρόδρομη ένωση | TEOS                |
| Καταλύτης      | 30% NH <sub>3</sub> |

Η πειραματική διαδικασία σύνθεσης σφαιρών SiO<sub>2</sub> είναι η εξής:

Σε 150 ml ποτήρι ζέσεως αναμιγνύονται η EtOH και το H<sub>2</sub>O, και αφήνονται σε ανάδευση για περίπου 10 λεπτά. Αφού προστίθεται η NH<sub>3</sub>, το διάλυμα αναδεύεται για 20 λεπτά. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη του TEOS υπό στάγδην. Το τελικό διάλυμα αφήνεται για περίπου 20 ώρες υπό τις ίδιες συνθήκες, και ύστερα φυγοκεντρείται και ξηραίνεται. Όλη η πειραματική διαδικασία λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Οι αντιδράσεις της μεθόδου sol gel περιγράφονται στην Παράγραφο 7.3.1.

### 7.4.2 Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα

Και για τις δύο σειρές πειραμάτων προκύπτουν οι παρακάτω πίνακες με τις αναλογίες [H<sub>2</sub>O]/ [Si], R<sub>w</sub> για κάθε μια περίπτωση. Η αναλογία αυτή προκύπτει από το προστιθέμενο νερό σε κάθε πείραμα. Το νερό προέρχεται από το διάλυμα 30% NH<sub>3</sub>. Δηλαδή, στο 1 ml NH<sub>3</sub> περιέχονται 0,3 ml H<sub>2</sub>O.



**Πίνακας 15:** Η αναλογία  $R_w$  που προκύπτει μεταβάλλοντας την ποσότητα του TEOS στην 1<sup>η</sup> περίπτωση πειραμάτων, κρατώντας σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους.

| Πείραμα | Ποσότητα TEOS (ml) | $[H_2O]/[Si]$ , $R_w$ |
|---------|--------------------|-----------------------|
| 1       | 4                  | 2,14                  |
| 2       | 8                  | 1,07                  |
| 3       | 10                 | 0,88                  |
| 4       | 12                 | 0,72                  |

**Πίνακας 16:** Η αναλογία  $R_w$  που προκύπτει μεταβάλλοντας την ποσότητα των διαλυτών στην 2<sup>η</sup> περίπτωση πειραμάτων, κρατώντας σταθερές τις υπόλοιπες παραμέτρους.

| Πείραμα | Ποσότητα EtOH (ml) | Ποσότητα H <sub>2</sub> O (ml) | $[H_2O]/[Si]$ , $R_w$ |
|---------|--------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1       | 100                | 11                             | 0,88                  |
| 2       | 200                | 22                             | 0,87                  |

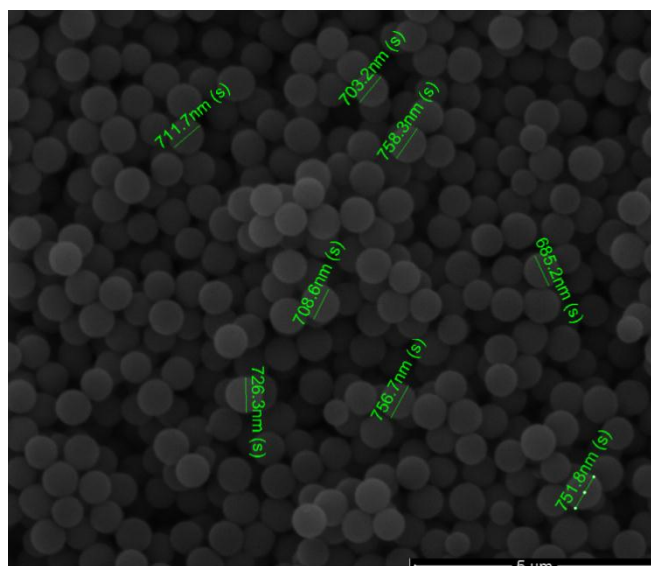
Οι αναλυτικές ποσότητες των πειραμάτων περιγράφονται στους Πίνακες iii και iv του Παραρτήματος.

Παρακάτω παρατίθενται πίνακας με τις περιπτώσεις των πειραμάτων που οδήγησαν στη σύνθεση μικροσφαιρών SiO<sub>2</sub> με το μεγαλύτερο μέγεθος και στις δύο σειρές πειραμάτων.

**Πίνακας 17:** Το μεγαλύτερο μέγεθος μικροσφαιρών με τα αντίστοιχα  $D_n$ ,  $D_w$  και U, που προκύπτουν και από τις δύο σειρές πειραμάτων.

|                                 | Μέγεθος (nm)* | $D_n$ (nm) | $D_w$ (nm) | U     |
|---------------------------------|---------------|------------|------------|-------|
| 1 <sup>η</sup> σειρά πειραμάτων | 725±84        | 724,701    | 750,925    | 1,036 |
| 2 <sup>η</sup> σειρά πειραμάτων | 587±38        | 586,7      | 770,8      | 1,024 |

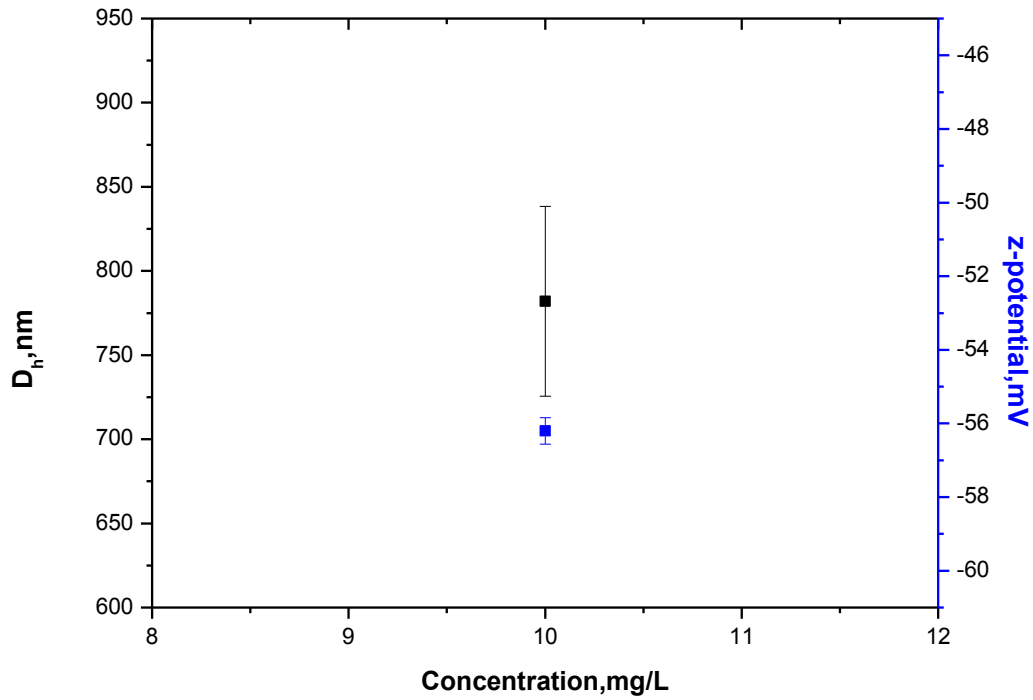
\*Προσδιορισμένο από την τεχνική SEM



**Εικόνα 39:** Εικόνα SEM των μικροσφαιρών SiO<sub>2</sub> μεγέθους 725±84 nm.

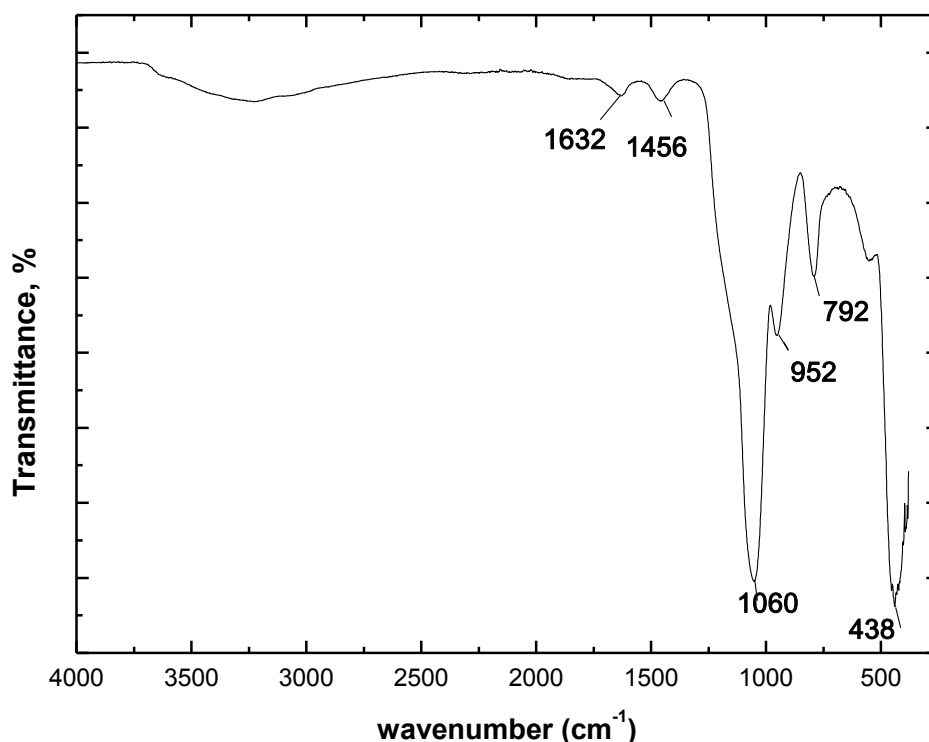
Σύμφωνα με την παραπάνω εικόνα SEM και τα δεδομένα του Πίνακα 17 παρατηρείται ότι η πειραματική διαδικασία σύνθεσης μικροσφαιρών SiO<sub>2</sub>, εμφανίζει επαναληψιμότητα δίνοντας σφαιρικά σωματίδια, με παρόμοια διάμετρο και μικρή κατανομή μεγέθους. Ο δείκτης διασποράς, U, είναι κοντά στο ένα, και αποδεικνύει ότι υπάρχει καλή κατανομή μεγέθους.

Ο υδροδυναμικός όγκος και το ζ-δυναμικό των SiO<sub>2</sub> μικροσφαιρών χαρακτηρίστηκαν με DLS. Όπως, περιγράφηκε και στην Παράγραφο 7.2.2 στην περίπτωση των παγίδων νερού, έγινε μελέτη για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης δείγματος για την σωστή μέτρηση στο DLS. Στη συγκεκριμένη περίπτωση βρέθηκε ότι βέλτιστη συγκέντρωση είναι 10mg/L. Στο παρακάτω διάγραμμα εκτός από το μέγεθος των μικροσφαιρών που προκύπτει από την μέτρηση, παρατίθεται και το ζ-δυναμικό του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο μελετάται η σταθερότητα του αιωρήματος. Σύμφωνα με την βιβλιογραφία [45], ένα αιώρημα θεωρείται σταθερό (δηλαδή δεν κροκιδώνεται) όταν εμφανίζει δυναμικό θετικότερο από +30mV και αρνητικότερο από -30mV.



**Εικόνα 40:** Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φωτός για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου (μαύρο τετράγωνο) και ζ-δυναμικού (μπλε τετράγωνο) του δείγματος μικροσφαιρας  $\text{SiO}_2$  που προκύπτει.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, το μέγεθος των μικροσφαιρών  $\text{SiO}_2$  που προκύπτει από την μέτρηση του DLS, είναι  $782 \pm 46$  nm, κάτι το οποίο έρχεται και σε συμφωνία με τη μέτρηση της τεχνικής SEM. Το ζ-δυναμικό είναι  $-56 \pm 0,361$ , κάτι που πιστοποιεί την σταθερότητα του δείγματος που συντέθηκε.



**Εικόνα 41:** Φάσμα FT IR των SiO<sub>2</sub> μικροσφαιρών.

Σύμφωνα με το παραπάνω φάσμα FT IR, η κορυφή στα 1049 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού Si-O, η κορυφή στα 952 cm<sup>-1</sup> στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού Si-OH ενώ στα 792 cm<sup>-1</sup> η κορυφή αποδίδεται στην συμμετρική δόνηση του δεσμού Si-O[56].

### 7.4.3 Συζήτηση

Η σύνθεση ανόργανου μικρο-συστήματος μεταφοράς μεγέθους περίπου 1μm, επιτεύχθηκε με τη μέθοδο sol gel. Συντέθηκαν μικροσφαίρες μεγέθους 725±84 nm, όπου χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, δυναμική σκέδαση φωτός και φασματοσκοπία υπερύθρου. Οι μικροσφαίρες τέτοιου μεγέθους προέκυψαν από την πρώτη σειρά πειραμάτων και με τη μεγαλύτερη προστιθέμενη ποσότητα TEOS.

Συντέθηκε ένα τέτοιο σύστημα, για να μελετηθεί αργότερα η αλληλεπίδραση ενός ανόργανου συστήματος με τον μικροοργανισμό. Η μέθοδος sol gel, είναι μια διαδικασία εύκολη, οικονομική και ελεγχόμενη. Το πλεονέκτημα της σύνθεσης μικροσφαιρών SiO<sub>2</sub>, σε σχέση με τις επικαλυμμένες παγίδες νερού με SiO<sub>2</sub>, είναι η χρησιμοποίηση του μη τοξικού διαλύτη αιθανόλη αντί για τον τοξικό διαλύτη ακετονιτρίλιο. Επιπλέον, η διαδικασία αυτή, είναι πιο προσιτή στη βιομηχανία καθώς η αιθανόλη εμπορίου είναι πιο οικονομική από το ακετονιτρίλιο. Και στη

συγκεκριμένη σύνθεση, ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε η αμμωνία που όπως αναφέρθηκε και στη Παράγραφο 7.3.3, οδηγεί σε πιο ελεγχόμενη διαδικασία σε σύγκριση με την όξινη κατάλυση.

## 7.5 Μικροσφαίρες PMMA

### 7.5.1 Πειραματική διαδικασία

Πολυμερικές μικροσφαίρες πολυμεθακρυλικού μεθυλεστέρα (PMMA) συντέθηκαν με ριζικό πολυμερισμό και συγκεκριμένα με πολυμερισμό γαλακτώματος. Στον παρακάτω πίνακα περιγράφονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση των μικροδοχείων PMMA.

Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε είναι το νερό (πολικός πρωτικός). Το MMA είναι αρκετά διαλυτό σε νερό, καθώς αναπτύσσονται δεσμοί υδρογόνου με ένα από τα άτομα του οξυγόνου του εστέρα και του υδρογόνου του μορίου του νερού. Επίσης, δημιουργούνται δεσμοί διασποράς αλλά και δεσμοί δίπολου-δίπολου μεταξύ εστέρα και νερού. Καθώς η πολυμερική αλυσίδα αυξάνεται τα μέρη των υδρογονανθράκων του πολυεστέρα δρουν με τέτοιο τρόπο που αναγκάζουν τα μόρια του νερού να απομακρυνθούν, σπάζοντας τους δεσμούς υδρογόνου. Με αυτόν τον τρόπο μειώνεται η διαλυτότητα του πολυμερούς με την τελική καταβύθιση των μικροσωματιδίων.

**Πίνακας 18:** Αντιδραστήρια για τη σύνθεση PMMA μικροδοχείων.

| Ιδιότητα  | Αντιδραστήρια                   |
|-----------|---------------------------------|
| Μονομερές | Μεθακρυλικός μεθυλεστέρας (MMA) |
| Απαρχητής | KPS                             |
| Διαλύτης  | H <sub>2</sub> O                |

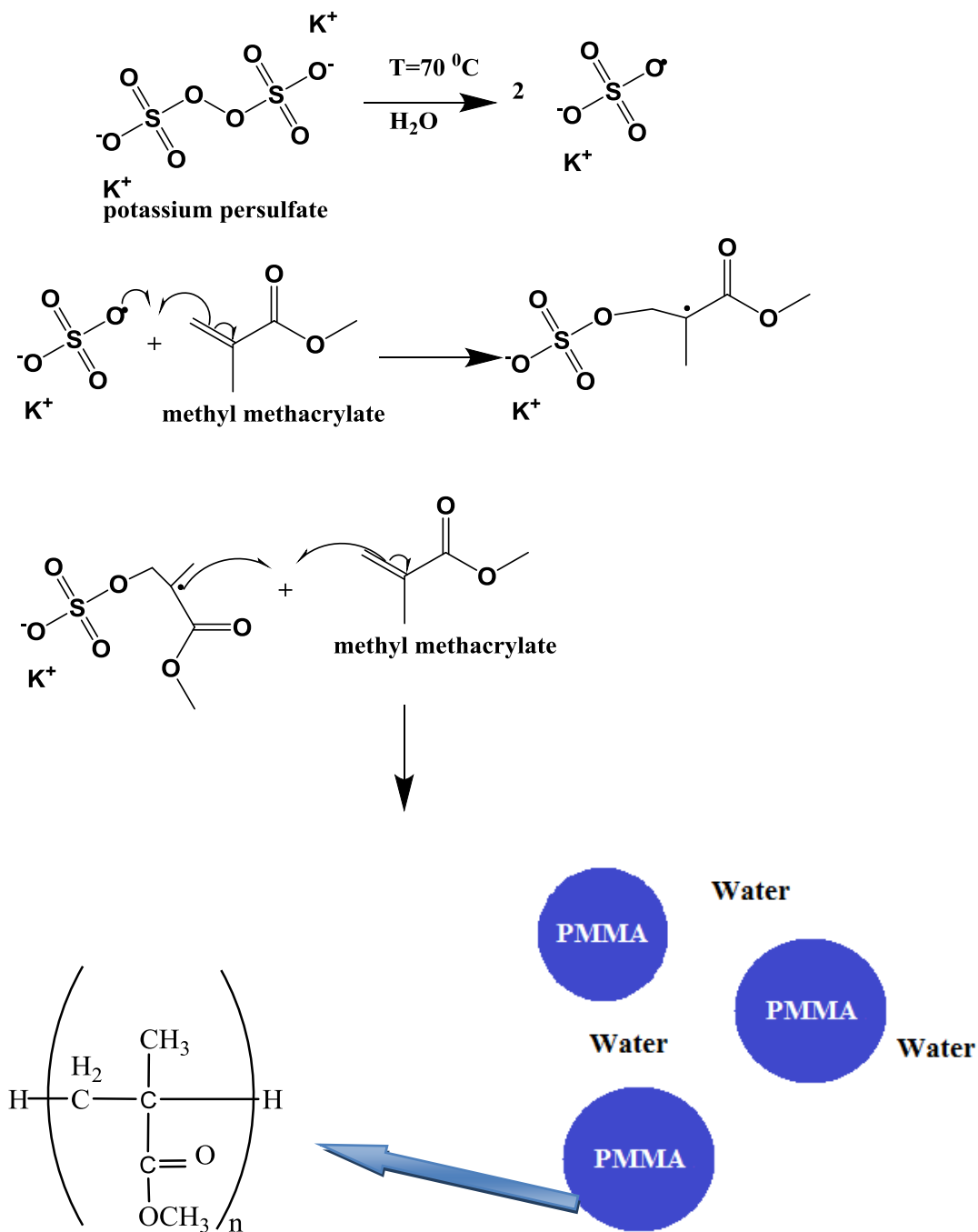
Καθώς το επιθυμητό μέγεθος σφαίρας είναι περίπου στο 1μm, έγιναν σειρές πειραμάτων μεταβάλλοντας τις εξής παραμέτρους του πειράματος: α) την ποσότητα του διαλύτη, β) την ποσότητα του απαρχητή και γ) την ποσότητα του απαρχητή.

Οι ακριβείς ποσότητες αντιδραστηρίων για το κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε παρατίθενται στους Πίνακες v-vii του Παραρτήματος.

Η πειραματική διαδικασία για όλες τις περιπτώσεις είναι η εξής:

Σε σφαιρική φιάλη των 100 ml, προστέθηκε ο διαλύτης όπου με τη βοήθεια θερμαντικής πλάκας υπό ανάδευση, η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους 70 °C. Στη συνέχεια προστέθηκε το μονομερές και μετά την πάροδο 20min ανάδευσης, προστέθηκε ο απαρχητής. Το κολλοειδές διάλυμα αφέθηκε υπό ανάδευση περίπου 20 h. Ο πολυμερισμός έλαβε χώρα υπό ατμόσφαιρα αζώτου.

Παρακάτω περιγράφεται ο μηχανισμός σύνθεσης του PMMA ο οποίος αποτελείται από το στάδιο έναρξης όπου ο απαρχητής δίνει ελεύθερες ρίζες και αντιδρά με το μονομερές, το στάδιο της διάδοσης όπου παρατηρείται ανάπτυξη του πολυμερούς. Ο πολυμερισμός τερματίζεται είτε με ανακατανομή είτε με συνένωση λαμβάνοντας ως προϊόν το PMMA.



**Εικόνα 42:** Μηχανισμός σύνθεσης μικροσφαιρών PMMA.

## 7.5.2 Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα

Με σκοπό τη σύνθεση μικροδοχείων με επιθυμητό μέγεθος στο 1 $\mu$ m, πραγματοποιήθηκαν τρεις σειρές πειραμάτων όπου μεταβλήθηκαν οι ποσότητες των αντιδραστηρίων για τη σύνθεση μικροσφαιρών PMMA.

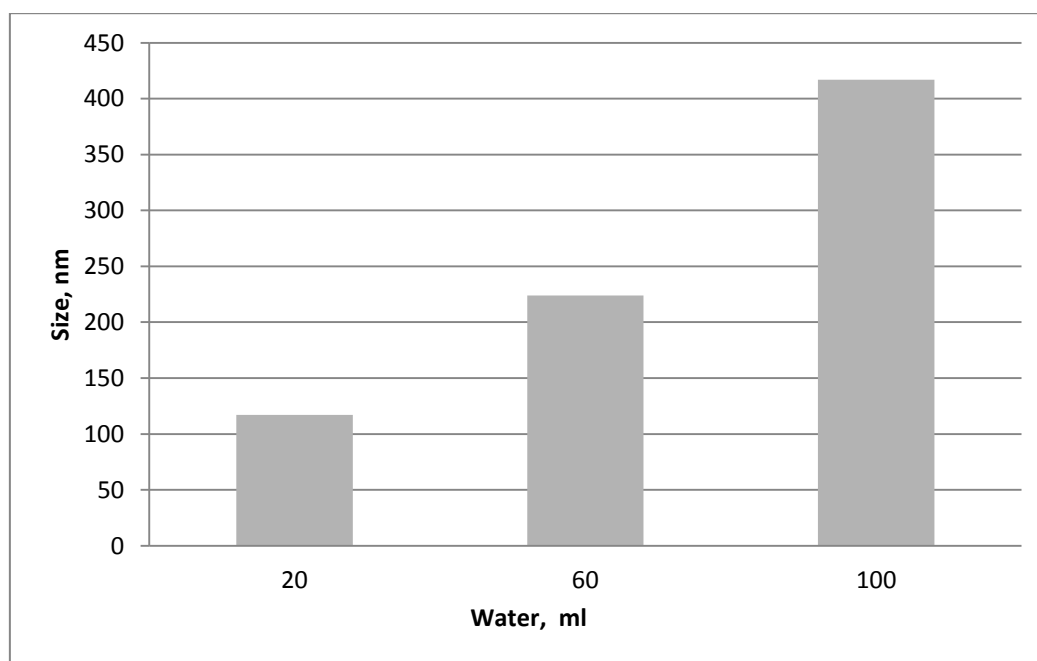
Παρακάτω παρατίθενται πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που οδήγησαν στη σύνθεση μικροσφαιρών PMMA με το μεγαλύτερο μέγεθος, σε κάθε μια σειρά πειραμάτων.

**Πίνακας 19:** Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε σειρά πειραμάτων με το αντίστοιχο μέγεθος,  $D_n$ ,  $D_w$  και  $U$  που προκύπτει κάθε φορά.

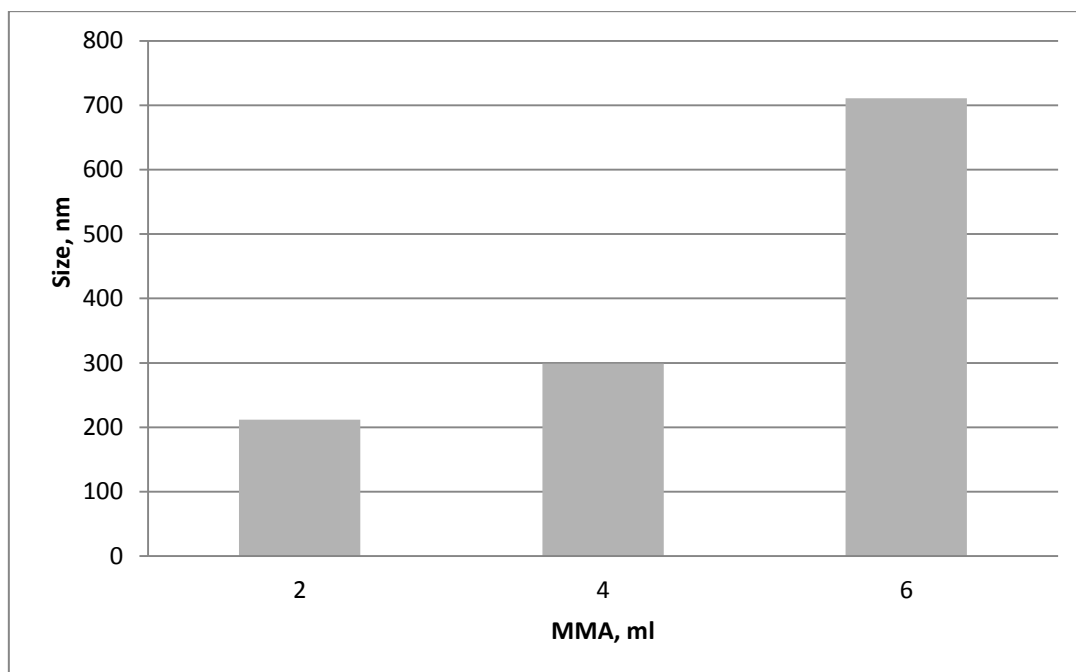
|                     | MMA(ml) | KPS(mg) | Water(ml) | Μέγεθος(nm)* | $D_n$   | $D_w$   | $U$   |
|---------------------|---------|---------|-----------|--------------|---------|---------|-------|
| Μεταβολή Διαλύτη    | 4ml     | 40mg    | 100       | 417 $\pm$ 23 | 417,112 | 420,330 | 1,008 |
| Μεταβολή Μονομερούς | 6ml     | 40mg    | 30ml      | 711 $\pm$ 90 | 711,224 | 742,458 | 1,300 |
| Μεταβολή Απαρχητή   | 4ml     | 40mg    | 30ml      | 299 $\pm$ 26 | 298,901 | 304,799 | 1,020 |

\*Προσδιορισμένο από την τεχνική SEM.

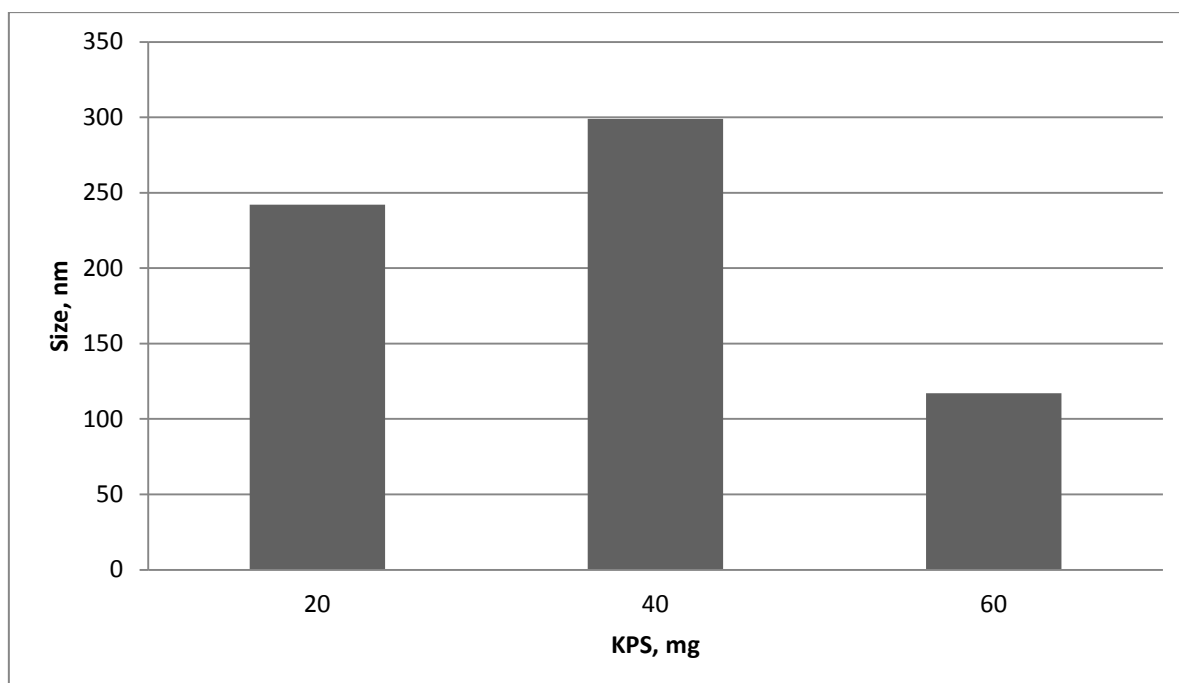
Στη συνέχεια περιγράφεται σε διαγράμματα, η μεταβολή μεγέθους των μικροσφαιρών που προέκυψε σε κάθε μια σειρά πειραμάτων κάθε φορά.



**Εικόνα 43:** Μέγεθος μικροσφαιρών PMMA μεταβάλλοντας την ποσότητα του διαλύτη.



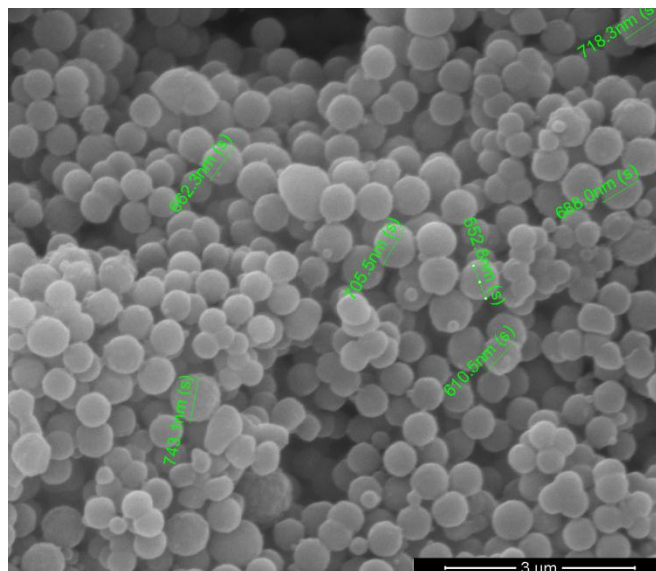
**Εικόνα 44:** Μέγεθος μικροσφαιρών PMMA μεταβάλλοντας την ποσότητα του μονομερούς.



**Εικόνα 45:** Μέγεθος μικροσφαιρών PMMA μεταβάλλοντας την ποσότητα του απαρχητή.

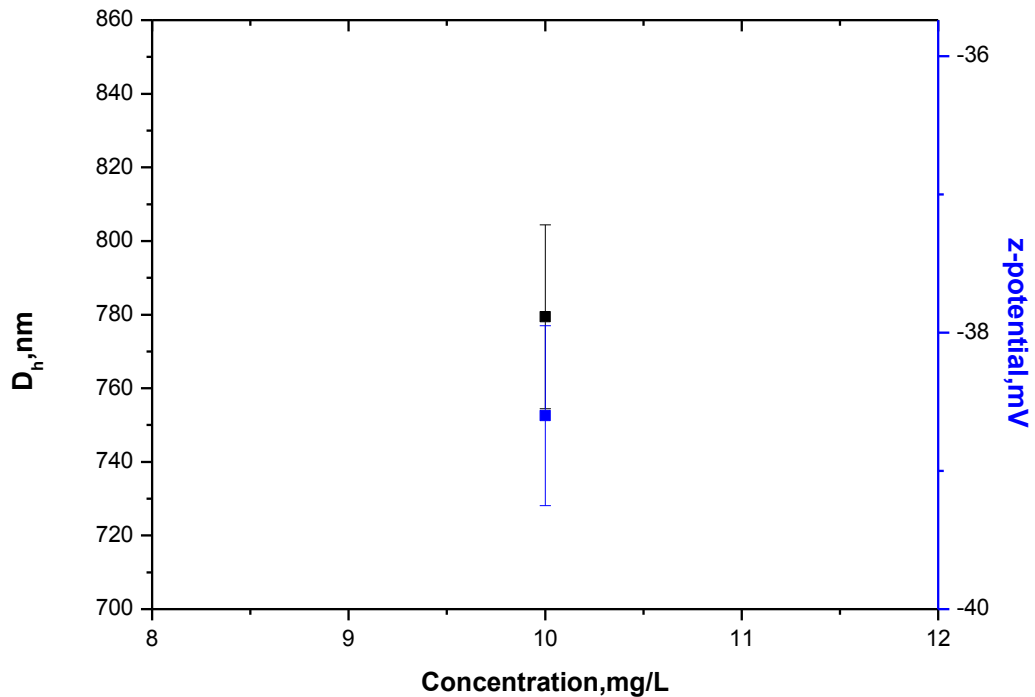


Σύμφωνα με τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι το μεγαλύτερο μέγεθος μικροσφαιρών PMMA που συντίθεται προκύπτει από την δεύτερη σειρά πειραμάτων, μεταβάλλοντας δηλαδή την ποσότητα του μονομερούς κρατώντας τις υπόλοιπες παραμέτρους του πειράματος σταθερές.



**Εικόνα 46:** Εικόνα SEM μικροσφαιρών PMMA με μέγεθος  $711\pm 90$  nm.

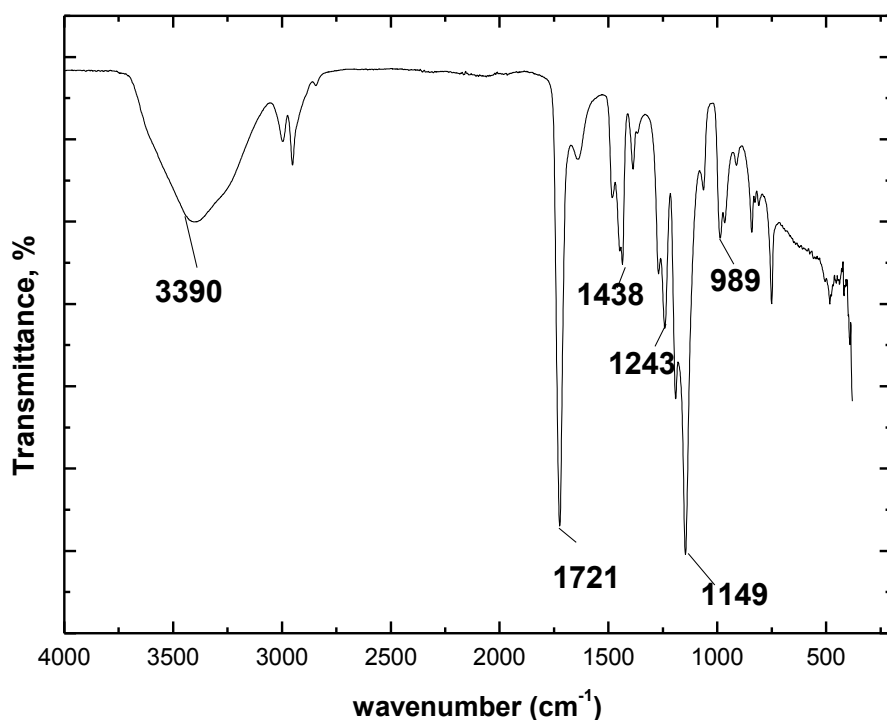
Η παραπάνω εικόνα SEM παρουσιάζει το μέγεθος των μικροσφαιρών PMMA με τη μεγαλύτερη διάμετρο που επετεύχθη. Όπως παρατηρείται το δείγμα παρουσιάζει πολυδιασπορά. Όταν το διάλυμα είναι πυκνό τότε οι πρώτες ρίζες του απαρχητή αντιδρούν με περισσότερο μονομερές αποδίδοντας μεγάλες σφαίρες αρχικά. Αφού καταναλώνεται μεγάλη ποσότητα μονομερούς από την αρχή, οι ρίζες που απομένουν δεν βρίσκουν αρκετή ποσότητα MMA για να αντιδράσουν, με αποτέλεσμα να προκύπτουν και μικρές σφαίρες. Ο χαρακτηρισμός του μεγέθους των PMMA μικροσφαιρών έγινε ακολούθως με DLS. Όπως, περιγράφηκε και στην περίπτωση των μικροσφαιρών  $\text{SiO}_2$ , έγινε μελέτη για την εύρεση της βέλτιστης συγκέντρωσης δείγματος για την κατάλληλη μέτρηση του DLS. Στη συγκεκριμένη περίπτωση βρέθηκε ότι βέλτιστη συγκέντρωση είναι η 10mg/L. Το παρακάτω διάγραμμα εκτός από το μέγεθος των μικροσφαιρών που προκύπτει από την μέτρηση, παρατίθεται και το ζ-δυναμικό του δείγματος. Με αυτόν τον τρόπο μελετάται κατά πόσο είναι σταθερό το αιώρημα ή όχι.



**Εικόνα 47:** Διάγραμμα δυναμικής σκέδασης φώτος για τον προσδιορισμό της υδροδυναμικής διαμέτρου (μαύρο τετράγωνο) και ζ-δυναμικού (μπλε τετράγωνο) δείγματος μικροσφαίρας PMMA.

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα, το μέγεθος των PMMA που προκύπτει από την μέτρηση του DLS, είναι  $780 \pm 25$  nm, κάτι το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τη μέτρηση του SEM. Το ζ-δυναμικό είναι  $-38,6 \pm 0,651$ , κάτι που πιστοποιεί την σταθερότητα του δείγματος που συντέθηκε.

Για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των μικροδοχείων PMMA έγινε φασματοσκοπία υπεριώθρου όπου περιγράφεται παρακάτω.



**Εικόνα 48:** Φάσμα FT-IR των μικροσφαιρών PMMA.

Η κορυφές στους  $1149\text{ cm}^{-1}$  και  $1243\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται στις δονήσεις έκτασης του δεσμού O-C-O. Επίσης, χαρακτηριστική κορυφή απορρόφησης του PMMA εμφανίζεται στους  $989\text{ cm}^{-1}$ . Η κορυφή στους  $1721\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην ακρυλική καρβοξυλική ομάδα του PMMA. Τέλος, η κορυφή στους  $3390\text{ cm}^{-1}$  είναι χαρακτηριστική για ομάδες -OH. Αυτό συμβαίνει γιατί το δείγμα έχει απορροφήσει υγρασία περιβάλλοντος [59].

### 7.5.3 Συζήτηση

Η σύνθεση μικροσφαιρών PMMA είναι οικονομική, εύκολα διαχειρίσιμη και λαμβάνει χώρα σε υδατικό περιβάλλον. Για την παραγωγή ενός προϊόντος, στη βιομηχανία οι παραπάνω παράγοντες είναι πολύ σημαντικοί.

Μεταβάλλοντας παραμέτρους του πειράματος, συντέθηκαν μικροσφαίρες μεγέθους κοντά στο  $1\text{ }\mu\text{m}$  και στη συνέχεια χαρακτηρίστηκαν με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, δυναμικής σκέδασης φωτός και φασματοσκοπία υπερύθρου. Σύμφωνα με τα διαγράμματα των Εικόνων 43-45, μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίου προκύπτει από την προσθήκη μεγαλύτερης ποσότητας μονομερούς, κάτι που έρχεται σε συμφωνία με την παρακάτω εξίσωση:

$$v = \frac{k_p[M]}{2(k_d f[I]k_t)^{1/2}} \quad (7.4)$$

Με:

$v$ : το μέσο κινητικό μήκος μακρόριζας

$[M]$ : η συγκέντρωση σε μονομερές

$[I]$ : η συγκέντρωση σε απαρχητή

$f$ : η δραστηκότητα του απαρχητή

$k_p$ ,  $k_d$  και  $k_t$  : οι σταθερές ταχύτητας αντίδρασης που αντιστοιχούν στα διάφορα στάδια πολυμερισμού, όπως περιγράφηκαν στην Παράγραφο 2.1.2.2.

Σύμφωνα με την Εξίσωση 7.4, αυξανόμενης της ποσότητας του μονομερούς, παρατηρείται αύξηση του μήκους της πολυμερικής αλυσίδας. Επομένως, στη συγκεκριμένη μελέτη πιστοποιήθηκε ότι αυξάνοντας την ποσότητα του MMA, οι σφαίρες που προκύπτουν παρουσιάζουν το μεγαλύτερο μέγεθος (Εικόνα 44). Από την εικόνα 45, παρατηρείται μια αύξηση του μεγέθους των μικροσφαιρών με αύξηση της ποσότητας του απαρχητή, αλλά ύστερα μια μείωση. Κάτι τέτοιο, έρχεται σε αντίθεση με την εξίσωση 7.4, όπου καθώς αυξάνεται συνεχώς η ποσότητα του απαρχητή θα πρέπει να παρατηρείται και μια συνεχή μείωση του μεγέθους των μικροσφαιρών. Είναι ξεκάθαρο ότι με μεγαλύτερη πληθώρα πειραμάτων, η περίπτωση όπου το μέγεθος της μικροσφαίρας αυξάνεται με αύξηση της ποσότητας του απαρχητή, θα μπορεί να απορριφθεί.

Σύμφωνα με την Εικόνα 43, παρατηρείται αύξηση του μεγέθους των μικροσφαιρών αυξανόμενης της ποσότητας του διαλύτη. Αυτό έρχεται σε αντίθεση με την εξίσωση 7.4, όπου αυξανόμενης της ποσότητας του διαλύτη, η συγκέντρωση του μονομερούς και του απαρχητή μειώνεται με αποτέλεσμα να παρατηρείται μείωση του μεγέθους των μικροσφαιρών. Μπορεί να υποτεθεί ότι επειδή ο όγκος του μονομερούς είναι κοντά στον όγκο του διαλύτη, τα διαλύματα που προκύπτουν να είναι πυκνά και να μην ισχύει για την συγκεκριμένη περίπτωση η εξίσωση 7.4. Η μεταβολή του μήκους της αλυσίδας θα ήταν πιο ξεκάθαρη χρησιμοποιώντας μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη [4].

## **7.6 Μικροδοχεία με κέλυφος πολυουρίας**

### **7.6.1 Πειραματική διαδικασία**

Η σύνθεση μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας επιτυγχάνεται μέσω του πολυμερισμού στη μεσεπιφάνεια δύο υγρών που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Στη συγκεκριμένη μελέτη διερευνήθηκε ένα γαλάκτωμα ελαίου στο νερό (O/W emulsion). Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα. Οι ακριβείς αναλογίες παρατίθενται στον Πίνακα viii του παραρτήματος.

**Πίνακας 20:** Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τον σχηματισμό μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας.

| <b>Ιδιότητα</b>                 | <b>Αντιδραστήρια</b>   |
|---------------------------------|--|
| Οργανοδιαλυτό μονομερές         | Δίισοκυανικό τολουόλιο, <i>TDI</i>   |
| Υδατοδιαλυτό μονομερές          | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Αιθυλενοδιαμίνη, <i>EDA</i></li> <li>• Διαιθυλενοδιαμίνη, <i>DETA</i></li> </ul>  |
| Ελαιώδης φάση (oil phase)       | <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1-Δεκαοκτένιο</li> <li>• Παραφίνη</li> </ul>  |
| Υδατική φάση (water phase)      | H <sub>2</sub> O   |
| Γαλακτωματοποιητής (emulsifier) | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Δωδεκυλ σουλφονικό νάτριο, <i>SDS</i></li> <li>• Μεθυλεστέρας πολύ αιθυλενογλυκόλης, <i>PEG</i></li> <li>• Πολυβινυλοπυρρολιδόνη, <i>PVP</i></li> <li>• Triton x-100</li> </ul> |
| Παράγοντας πυρήνωσης            | NH <sub>4</sub> Cl   |
| Διαλύτης                        | Ακετόνη  |

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις σειρές πειραμάτων αλλάζοντας κάποιες παραμέτρους, κρατώντας τις υπόλοιπες σταθερές, με σκοπό την σύνθεση μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε και στις τέσσερις σειρές πειραμάτων είναι η εξής:

Για τη σύνθεση του ελαιώδους διαλύματος σε ποτήρι ζέσεως αναμειγνύεται το οργανοδιαλυτό μονομερές με την οργανική φάση και την ακετόνη. Η ανάδευση κρατά μερικά λεπτά. Το γαλάκτωμα ελαίου στο νερό σχηματίζεται όταν προστίθενται το διάλυμα του λαδιού σε 50ml υδατικού διαλύματος που περιέχει 5 % w/w γαλακτωματοποιητή. Η ανάδευση του συστήματος λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και στις 300 rpm/min για 5min. Στη συνέχεια, το υδατοδιαλυτό μονομερές διαλύεται σε 5 ml νερού που περιέχει 0,1 % w/w γαλακτωματοποιητή. Το διάλυμα υδατοδιαλυτού μονομερούς στο γαλάκτωμα προστίθεται στάγδην, και η ανάδευση γίνεται στις 600 rpm. Ύστερα, προστίθενται 5 % w/w NH<sub>4</sub>Cl, και η ανάδευση συνεχίζεται για 3h στους 60 °C. Τελικά, το ίζημα φυγοκεντρείται, πλένεται με 30% EtOH και αφήνεται για ξήρανση[60].

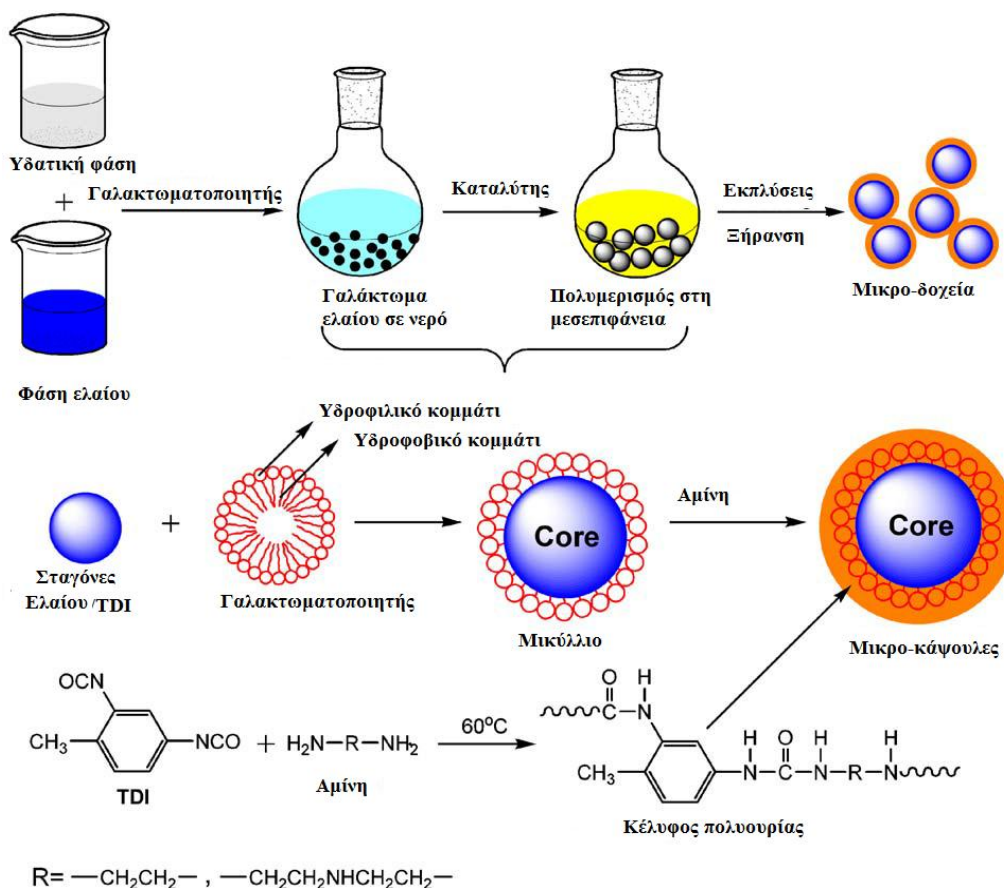
Στην 1<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων μελετάται η δυνατότητα σχηματισμού μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά υδατοδιαλυτά μονομερή (*EDA* και *DETA*) με γαλακτωματοποιητή το *SDS*. Όλοι οι άλλοι παράγοντες του πειράματος παραμένουν σταθεροί.

Στην 2<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων, μελετάται η δυνατότητα διαφορετικών γαλακτωματοποιητών (SDS, PEG, PVP και Triton x-100) για το σχηματισμό μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας, χρησιμοποιώντας ως υδατοδιαλυτό μονομερές την DETA. Όλοι οι άλλοι παράγοντες του πειράματος παραμένουν σταθεροί.

Η 3<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων, μελετά την δράση διαφορετικών φάσεων λαδιού (1-Δεκαοκτένιο και παραφίνη) χρησιμοποιώντας ως γαλακτωματοποιητή το Triton x-100 και ως υδατοδιαλυτό μονομερές την DETA. Όλοι οι άλλοι παράγοντες του πειράματος παραμένουν σταθεροί.

Η 4<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων, μελετά την εξάρτηση της σύνθεσης των μικροδοχείων με την ποσότητα του γαλακτωματοποιητή PEG. Ως ελαιώδη φάση χρησιμοποιήθηκε η παραφίνη και ως υδατοδιαλυτό μονομερές την DETA. Όλοι οι άλλοι παράγοντες του πειράματος παραμένουν σταθεροί.

Παρακάτω περιγράφεται ο σχηματισμός των μικροδοχείων πολυουρίας.

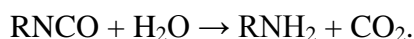


**Εικόνα 49:** Σχηματική αναπαράσταση σύνθεσης μικροδοχείων πολυουρίας με διαφορετικές αμίνες.

Το μίγμα της φάσης του ελαίου, που περιέχει το έλαιο και το TDI, διασπείρεται στην υδατική φάση με τον γαλακτωματοποιητή, σχηματίζοντας έτσι ένα γαλάκτωμα ελαίου σε νερό (O/W emulsion).

Αρχικά, στην υδατική φάση οι υδροφοβικές ομάδες του γαλακτωματοποιητή καλύπτονται από τις υδροφιλικές του ομάδες, με τέτοιο τρόπο να σχηματίζονται μικύλλια (Εικόνα 49). Προσθέτοντας το διάλυμα του λαδιού, οι υδροφιλικές ομάδες διαχέονται μέσα στο λάδι, ενώ οι υδροφιλικές κατά μήκος της σταγόνας, καλύπτοντάς την.

Ο σχηματισμός του κελύφους ξεκινά όταν περιφερειακές ισοκυανικές ομάδες του TDI, υδρολύονται στη μεσεπιφάνεια λαδιού-νερού σχηματίζοντας αμίνες, σύμφωνα με την αντίδραση



Οι αμίνες αυτές αντιδρούν με μη υδρολυμένες ισοκυανικές ομάδες, και με αυτόν τρόπο σχηματίζεται ένα δίκτυο πολυουρίας.

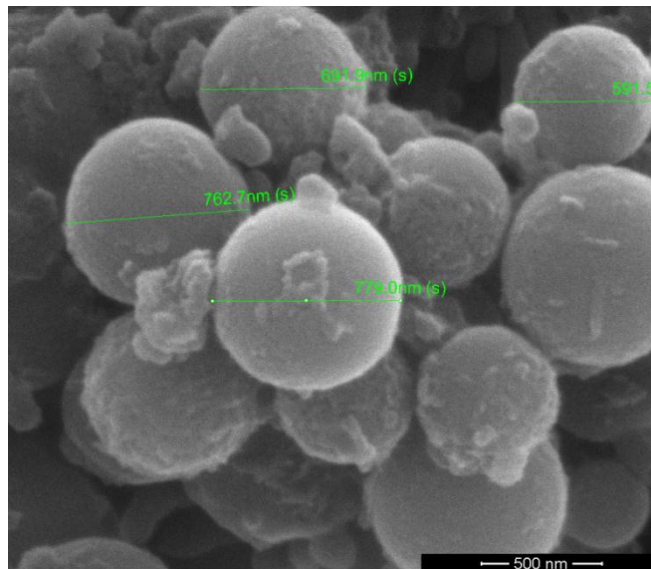
Όταν σχηματιστεί το αρχικό κέλυφος, η προστιθέμενη αμίνη (το υδατοδιαλυτό μονομερές) πρέπει να διαπεράσει τη μεμβράνη και να εισχωρήσει στη φάση του λαδιού για να αντιδράσει με το TDI (το οργανοδιαλυτό μονομερές). Με αυτόν τον τρόπο γίνεται πυκνότερο και ανθεκτικότερο το κέλυφος πολυουρίας.

Σαν αποτέλεσμα, παρατηρείται ο σχηματισμός ενός πολυμερικού κελύφους (που αποτελείται από δίκτυο πολυουρίας), στην μεσεπιφάνεια του γαλακτωματοποιητή και της φάσης του λαδιού, λόγω της αντίδρασης μεταξύ της αμίνης και του TDI. Η θερμοκρασία που λαμβάνει χώρα η αντίδραση είναι η θερμοκρασία περιβάλλοντος [60].

## 7.6.2 Χαρακτηρισμός-Αποτελέσματα

Οι σειρές πειραμάτων σύνθεσης των μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας, έγιναν με σκοπό να βρεθούν οι καταλληλότερες πειραματικές συνθήκες για ένα αποδοτικό αποτέλεσμα. Έτσι, τα πειράματα σχετίζονται μεταξύ τους ακολουθώντας κάθε φορά το πιο υποσχόμενο αποτέλεσμα.

Έτσι στην 1<sup>η</sup> σειρά χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής το SDS και χρησιμοποιούνται ως αμίνες η EDA και η DETA. Μεταξύ των δύο αμινών, οι υπόλοιπες μελέτες χρησιμοποίησαν την DETA, καθώς αυτή έδειξε τον καλύτερο σχηματισμό μικροδοχείων. Από την 2<sup>η</sup> μελέτη προέκυψε ότι το PEG και το Triton x οδηγούν σε σχηματισμό μικροδοχείων. Παρακάτω παρατίθεται η εικόνα SEM του δείγματος εκείνου όπου ως αμίνη έχει χρησιμοποιηθεί η DETA ενώ ως γαλακτωματοποιητής το PEG.



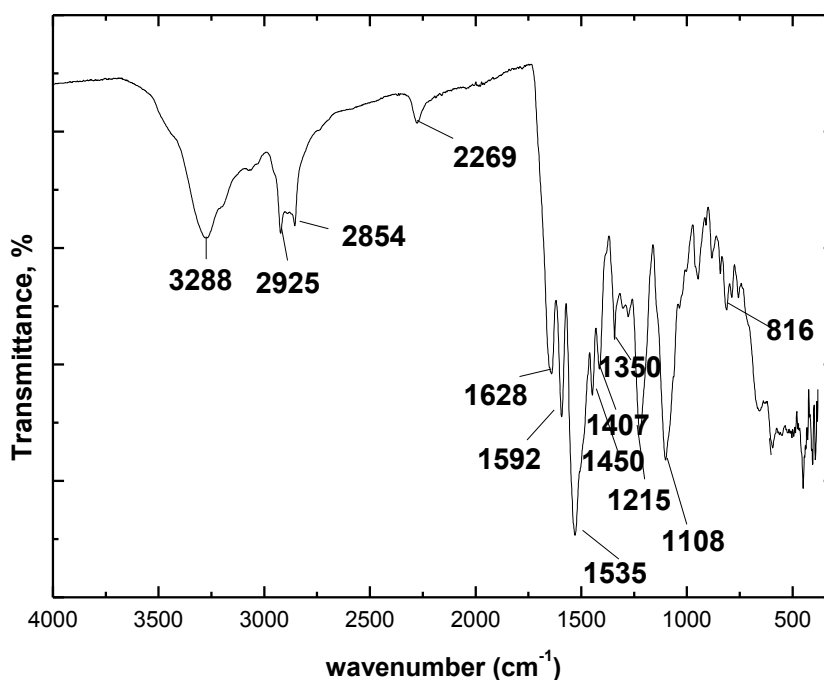
**Εικόνα 50:** Εικόνα SEM του δείγματος μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας από την δεύτερη σειρά πειραμάτων, με γαλακτωματοποιητή το PEG.

Καθώς, η μελέτη των συγκεκριμένων μικροσφαιρών είναι ενδεικτική δεν έχει βρεθεί ένα μέσο μέγεθος μικροσφαιρών όπως σε όλες τις προηγούμενες μελέτες μικροσφαιρών. Η παραπάνω εικόνα δεν είναι αντιπροσωπευτική για όλο το δείγμα.

Στις Εικόνες v και vi του Παραρτήματος παρατίθενται οι εικόνες SEM δείγματος από την 2<sup>η</sup> σειρά και 4<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων, αντίστοιχα.

Παρακάτω, αναλύεται το φάσμα FT-IR του δείγματος εκείνου που έχει παρατεθεί και η αντίστοιχη εικόνα SEM (Εικόνα 50).





**Εικόνα 51:** Φάσμα FT IR των μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας χρησιμοποιώντας το PEG ως γαλακτωματοποιητή και την DETA ως αμίνη (2<sup>η</sup> σειρά πειραμάτων).

Το φάσμα αυτό δίνει μια σειρά από έντονες κορυφές που αποδίδονται στην δόνηση έκτασης του δεσμού υδρογόνου N-H στους  $3288\text{ cm}^{-1}$  και  $1535\text{ cm}^{-1}$ . Οι δονήσεις έκτασης του C-H της αλειφατικής αμίνης παρουσιάζονται στις κορυφές στους  $2854\text{ cm}^{-1}$  και  $2925\text{ cm}^{-1}$ . Η κορυφή στους  $2269\text{ cm}^{-1}$  ανήκει στον δεσμό N=C=O του TDI που δεν αντέδρασε όλο. Παρόλα αυτά η κορυφή στους  $1628\text{ cm}^{-1}$  ανήκει στην δόνηση έκτασης του δεσμού C=O της πολυουρίας ενώ η κορυφή στους  $1350\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στην δόνηση έκτασης του δεσμού N-C-N. Συμπερασματικά, παρατηρείται σχηματισμός των μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας. Οι υπόλοιπες κορυφές που περιλαμβάνονται στο κέλυφος της πολυουρίας είναι στους  $1592\text{ cm}^{-1}$ ,  $1407\text{ cm}^{-1}$  και  $816\text{ cm}^{-1}$  και ανήκουν στη δόνηση έκτασης του C=C, στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-C και στη δόνηση κάμψης του δεσμού C-H των αρωματικών ομάδων, αντίστοιχα. Τέλος, η κορυφή στους  $1108\text{ cm}^{-1}$  και στους  $1215\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται, αντίστοιχα, στην δόνηση έκτασης του δεσμού C-O-C και στη δόνηση έκτασης του δεσμού C-O του PEG [60].

Από τα παραπάνω προκύπτει, ότι το PEG ως γαλακτωματοποιητής και η DETA ως αμίνη, με όλες τις άλλες παραμέτρους σταθερές, μπορούν να οδηγήσουν σε σχηματισμό μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας. Παρ' όλα αυτά, από το φάσμα IR παρατηρείται η κορυφή του TDI που δεν αντέδρασε.

### 7.6.3 Συζήτηση

Στη συγκεκριμένη ενότητα έγινε ενδεικτική μελέτη σύνθεσης μικροσφαιρών με κέλυφος πολυουρίας. Η πολυουρία έχει πολύ καλή αντοχή και είναι αδιάλυτη στους περισσότερους διαλύτες.

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα μεταβάλλοντας παραμέτρους του πειράματος. Υποσχόμενα αποτελέσματα δίνουν εκείνες οι περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται ως γαλακτωματοποιητές το PEG και το Triton x με αμίνη την DETA, και ως φάση λαδιού το 1-Δεκαοκτένιο. Με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας διέλευσης (TEM), θα διερευνηθεί ότι η σύνθεση μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας, οδηγεί σε κούφια μικροκάψουλες.

Ένα τέτοιο σύστημα αξίζει να μελετηθεί περαιτέρω για τον εγκλωβισμό των σπόρων του βακτηρίου, και να λειτουργήσουν με αυτό τον τρόπο τα μικροδοχεία ως μικροκάψουλες.

# 8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

*ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ  
ΚΑΤΑΚΡΗΜΝΙΣΗ  $\text{CaCO}_3$*



## 8.1 Εισαγωγή

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η εφαρμογή βακτηρίων στο σκυρόδεμα με σκοπό την αυτοϊαση του σε περίπτωση εμφάνισης ρωγμών, δεν είναι αδύνατη. Έχουν γίνει πολλές μελέτες που αποδεικνύεται η αποτελεσματικότητά τους στην επούλωση των ρωγμών. Τα βακτήρια που μπορούν να αντέξουν το ακραίο περιβάλλον του σκυροδέματος (υψηλές τάσεις και έντονη αλκαλικότητα), είναι εκείνα του γένους *Bacillus* (θετικά κατά Gram βακτήρια). Τα είδη του γένους αυτού έχουν την δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων, μορφές ανθεκτικές σε μη φιλικά προς το βακτήριο περιβάλλοντα. Όταν τα ενδοσπόρια βρεθούν σε κατάλληλες συνθήκες, τότε ενεργοποιούνται (διαδικασία γνωστή και ως εκβλάστηση), και αρχίζουν να αναπτύσσονται. Η βιο-κατακρήμνιση ενός ορυκτού από μικροοργανισμού, γίνεται όταν αυτός βρεθεί σε περιβάλλον με κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Στην περίπτωση αυτοϊασης τσιμέντου, το ορυκτό που επιλέγεται είναι το  $\text{CaCO}_3$ .

Παρόλο που το καταλληλότερο βακτήριο για την εργασία αυτή είναι κάποιο είδος από το γένος *Bacillus*, η παρούσα μελέτη εξέτασε δύο άλλα είδη βακτηρίων:

- Την *Escherichia coli* (αρνητικό κατά Gram)
- Τον *Staphylococcus aureus* (θετικό κατά Gram)

Έτσι, μελετήθηκε η δυνατότητα καταβύθισης άλατος  $\text{CaCO}_3$  από ένα αρνητικό κατά Gram και ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, με κύρια έμφαση στον *Staphylococcus aureus*. Ο λόγος που έγινε αυτό είναι γιατί ο *St. aureus* έχει δομή κυττάρου παρόμοια με αυτού του *Bacillus*, παρόλο που δεν έχει την δυνατότητα σχηματισμού ενδοσπορίων.

Να τονισθεί, ότι τα βακτήρια που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν παθογόνα και ακολουθήθηκαν όλοι οι κανόνες ασφάλειας κατά τη χρήση τους.

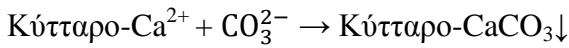
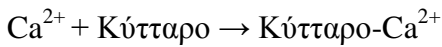
Όπως αναφέρθηκε στην Παράγραφο 3.4 η κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  είναι μια αμφίδρομη χημική διαδικασία ελεγχόμενη κυρίως από τέσσερις παράγοντες:

- Την συγκέντρωση του ασβεστίου.
- Την συγκέντρωση των διαλυμένων ανόργανων ανθρακικών ιόντων (DIC).
- Το pH.
- Την διαθεσιμότητα των κέντρων πυρηνοποίησης.

Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί που σχετίζονται με την βιο-κατακρήμνιση και στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο μηχανισμός διάσπασης της ουρίας (hydrolysis of urea, HU) μέσω του ενζύμου ουρεάσης. Μια πορεία εύκολα διαχειρίσιμη και ελεγχόμενη. Η γενική αντίδραση είναι η παρακάτω:



Το βακτήριο παίζει το ρόλο του κέντρου πυρήνωσης με τον παρακάτω μηχανισμό:



Ο κύκλος ζωής των μικροοργανισμών περιγράφεται στο Εικόνα 12 της Παραγράφου 3.2.3. Η φάση εκθετικής αύξησης είναι η ιδεώδης φάση για να την μελέτη οποιασδήποτε κυτταρικής λειτουργίας.

## 8.2 Κατακρήμιση $\text{CaCO}_3$ από βακτήρια

### 8.2.1 Μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμισης $\text{CaCO}_3$ από *Staphylococcus aureus*

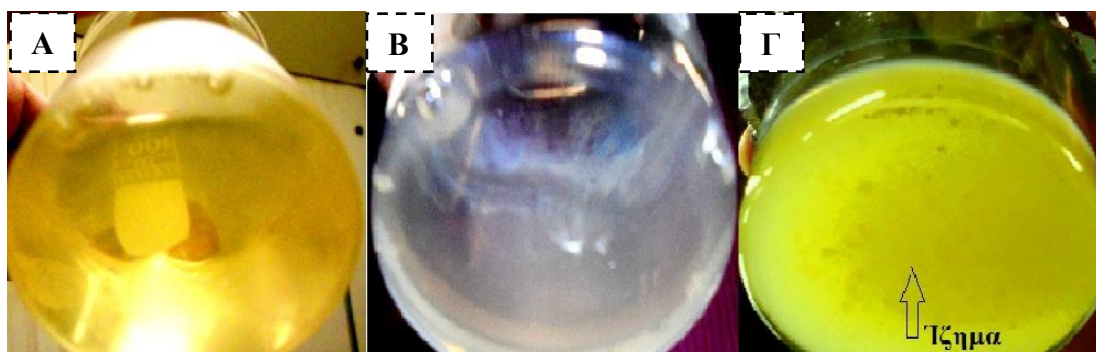
Για να διερευνηθεί η δυνατότητα κατακρήμισης  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. Aureus*, παρασκευάστηκαν τέσσερα διαλύματα μικροοργανισμού με διαφορετική ποσότητα  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας. Με τον τρόπο αυτό, μελετήθηκε ποιοτικά η δυνατότητα του βακτηρίου αυτού να κατακρημνίζει το άλας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις θρεπτικού υλικού.

**Πίνακας 21:** Σύνθεση διαλυμάτων *St. aureus* με διαφορετική συγκέντρωση  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας.

| Υλικά                                     | 1 <sup>ο</sup> διάλυμα | 2 <sup>ο</sup> διάλυμα | 3 <sup>ο</sup> διάλυμα | 4 <sup>ο</sup> διάλυμα | 5 <sup>ο</sup> διάλυμα |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | -                      | 0,05 g                 | 0,1 g                  | 0,25 g                 | 0,5 g                  |
| Ουρία                                     | -                      | 0,05 g                 | 0,1 g                  | 0,25 g                 | 0,5 g                  |
| Καλλιέργεια <i>St. aureus</i>             | 20 ml                  | 20 ml                  | 20 ml                  | 20 ml                  | 20 ml                  |

Η καλλιέργεια του βακτηρίου *St. aureus* έγινε με τη διαδικασία που αναφέρθηκε στην Παράγραφο 6.3.1. Για την παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων, απομονώθηκε ποσότητα διαλύματος μικροοργανισμού και προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας, σύμφωνα με τον Πίνακα 21, κάθε φορά.

Τα διαλύματα επώστηκαν στους 37 °C στους 100 rpm, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην Παράγραφο 6.5. Ύστερα από 72 h σε αυτές τις συνθήκες τα διαλύματα απομακρύνθηκαν και συγκρίθηκαν. Το διάλυμα του μικροοργανισμού που περιείχε την περισσότερη ποσότητα  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας εμφάνισε την μεγαλύτερη θολερότητα από τα υπόλοιπα διαλύματα με εμφανή την κατακρήμιση  $\text{CaCO}_3$ . Να σημειωθεί ότι τα διαλύματα που συγκρίθηκαν μεταξύ τους αναπτύχθηκαν στους ίδιους χρόνους επώασης.



**Εικόνα 39:** Μεταβολή θολερότητας διαλύματος *St. aureus*. Α) Διάλυμα LB, Β) Διάλυμα μικροοργανισμού μετά την επώασή τους σε LB και Γ) κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  από το 5<sup>ο</sup> διάλυμα του βακτηρίου.

Παρατηρείται εμφανής μεταβολή θολερότητας των διαλυμάτων, όπως διακρίνεται από τις εικόνες παραπάνω. Η μεταβολή διαύγειας μεταξύ του θρεπτικού διαλύματος LB και του διαλύματος μετά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού, πιστοποιεί ότι ο μικροοργανισμός έχει επωαστεί κατάλληλα για να μελετηθεί οποιαδήποτε μεταβολική του διεργασία.

Μεταξύ του 5<sup>ου</sup> διαλύματος και του διαλύματος του μικροοργανισμού παρατηρείται εμφανής κατακρήμνιση ιζήματος (Εικόνα 52, Γ). Το διάλυμα του *St. aureus* γίνεται πιο θολερό ενώ με την καταβύθιση  $\text{CaCO}_3$  πιστοποιείται η ικανότητά του να διασπά την ουρία και οδηγεί στην κατακρήμνιση του ορυκτού.

Για να χαρακτηριστεί πληρέστερα η κατακρήμνιση του  $\text{CaCO}_3$ , από το μικροοργανισμό γίνεται κινητική μελέτη σε διαλύματά του α) σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας και β) σε LB άγαρ μέσο (τρυβλίο Petri) παρουσία  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας. Παίρνοντας δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και μέσω των φασμάτων FT-IR, μελετάται η ύπαρξη του ορυκτού σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα.

Παρακάτω περιγράφεται η σύνθεση των διαλυμάτων μικροοργανισμού σε θρεπτικό διάλυμα LB και LB άγαρ μέσο για την κινητική μελέτη κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$ . Επιλέχθηκαν οι μέγιστες συγκεντρώσεις  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας από τον ποιοτικό έλεγχο κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$ , καθώς σε αυτές τις ποσότητες το ορυκτό ήταν περισσότερο εμφανές.

**Πίνακας 22:** Ποσότητες υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$  από διάλυμα μικροοργανισμού σε θρεπτικό υλικό LB.

| Υλικά                                     | Ποσότητες |
|---|-----------|
| LB  | 49,5 ml   |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,5 g     |
| Ουρία                                     | 2,5 g     |
| Διάλυμα <i>St. aureus</i>                 | 0,5 ml    |

Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υλικό LB με τις παραπάνω ποσότητες υλικών, γίνεται με τη διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 6.3.1. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, ο *St. Aureus* που αναπτύσσεται, τοποθετείται σε επωαστήρα ανάδευσης για περίπου 24 μέρες σε συγκεκριμένες συνθήκες (37 °C, 100 rpm). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα απομονώνεται δείγμα, φυγοκεντρείται, αποστειρώνεται και μετράται το φάσμα FT IR, με σκοπό την πιστοποίηση της παρουσίας CaCO<sub>3</sub>.

**Πίνακας 23:** Ποσότητες υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από διάλυμα μικροοργανισμού σε LB άγαρ μέσο σε τρυβλίο Petri.

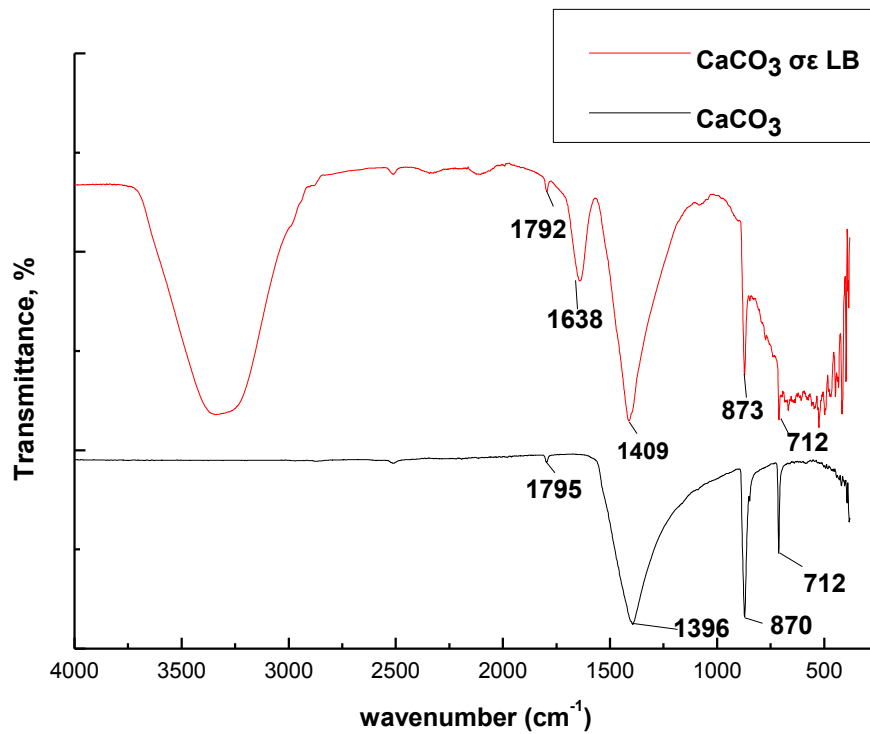
| Υλικά                                | Ποσότητες                              |
|--------------------------------------|--|
| Θρεπτικό άγαρ μέσο                   | 25 ml σε τρυβλίο Petri                 |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0,5 g                                  |
| Ουρία                                | 0,5 g                                  |
| Διάλυμα <i>St. aureus</i>            | Ικανό για την ανάπτυξή του στο τρυβλίο |

Ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού σε τρυβλίο Petri, με τις παραπάνω ποσότητες υλικών, γίνεται με τη διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 6.2.2. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, ο *St. aureus* που αναπτύσσεται, αφήνεται στον φούρνο επώασης για περίπου 21 μέρες σε συγκεκριμένες συνθήκες (37 °C). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα απομονώνεται δείγμα, φυγοκεντρείται, αποστειρώνεται και μετράται το φάσμα FT IR, με σκοπό την πιστοποίηση της παρουσίας CaCO<sub>3</sub>.

Το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται το ορυκτό είναι αρκετά σύνθετο, με πολλές και διαφορετικές ενώσεις, οι οποίες προέρχονται από το θρεπτικό υλικό και τον μικροοργανισμό. Οι ενώσεις αυτές εμφανίζουν κορυφές στα φάσματα IR. Συνεπώς για να επαληθευτεί η ύπαρξη CaCO<sub>3</sub> στις περιπτώσεις που γίνεται η μελέτη, έγινε σύγκριση του φάσματος του καθαρού CaCO<sub>3</sub> με το φάσμα CaCO<sub>3</sub> σε θρεπτικό διάλυμα LB (Εικόνα 53), έτσι ώστε να εντοπιστούν οι κορυφές του ορυκτού στο θρεπτικό υλικό του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια, αφού προσδιοριστούν οι κορυφές των ανθρακικών ιόντων στο φάσμα IR, σε κάθε ένα φάσμα κινητικής μελέτης συμπεριλαμβάνεται εκτός από τα φάσματα των δειγμάτων που απομονώνονται, του CaCO<sub>3</sub> σε LB και το φάσμα του μικροοργανισμού. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι κορυφές που αντιστοιχούν στο CaCO<sub>3</sub> σε κάθε περίπτωση αλλά και οι κορυφές που αντιστοιχούν στο μικροοργανισμό και στο θρεπτικό υλικό.

Τα αποτελέσματα παρατίθενται παρακάτω.

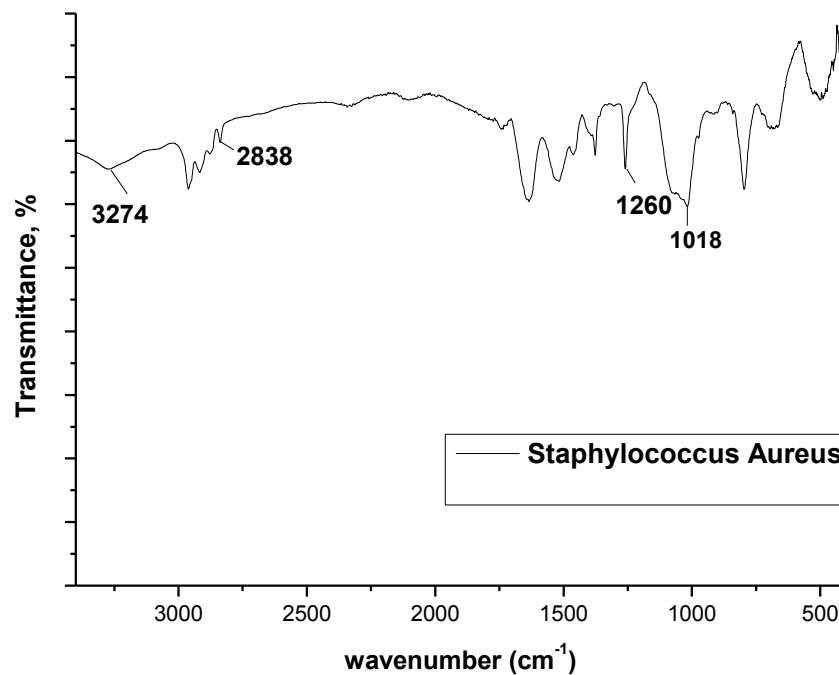




**Εικόνα 53:** Φάσμα FT-IR του κρυσταλλικού CaCO<sub>3</sub> και του CaCO<sub>3</sub> στο θρεπτικό μέσο LB.

Οι κορυφές των ανθρακικών ιόντων στο φάσμα IR είναι οι εξής: μια έντονη ευρεία κορυφή στην περιοχή 1530-1320 cm<sup>-1</sup>, κορυφές μεσαίας έντασης στα 1160 cm<sup>-1</sup> και στην περιοχή 890-800 cm<sup>-1</sup>, καθώς και μια κορυφή στην περιοχή 745-670 cm<sup>-1</sup>[61].

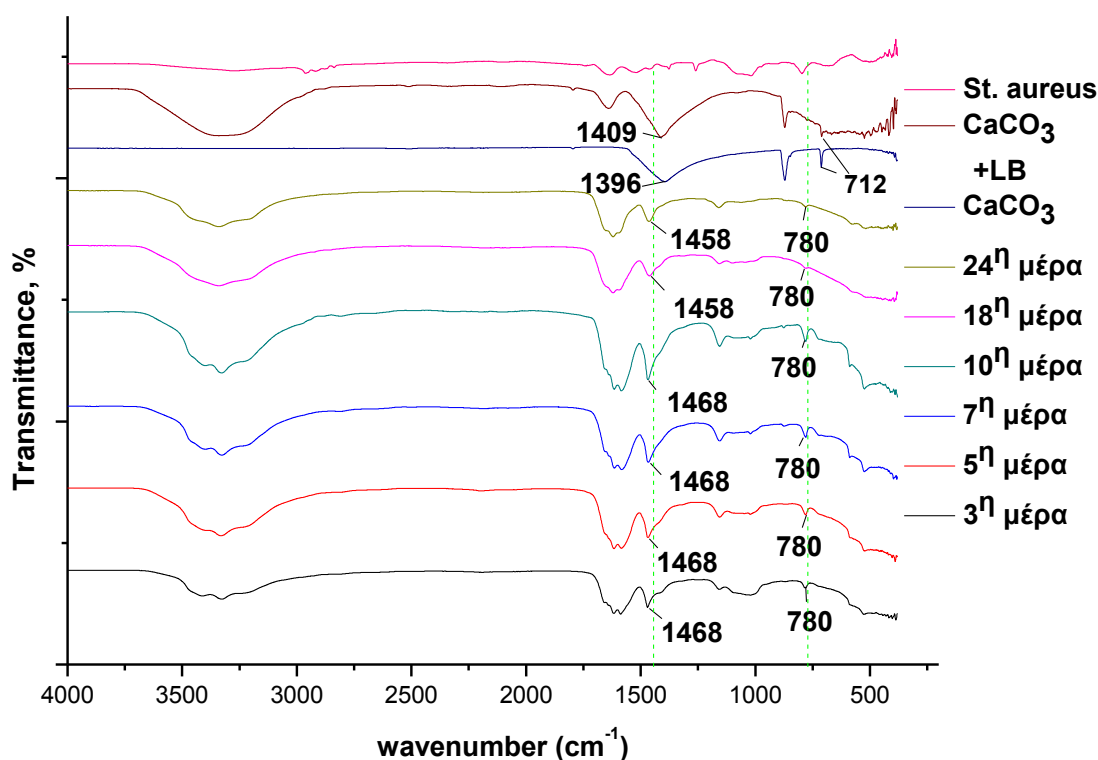
Με βάση τα παραπάνω και το φάσμα IR της Εικόνας 53, παρατηρούμε ότι το CaCO<sub>3</sub> σε διάλυμα LB, εμφανίζει κορυφές στους 712 cm<sup>-1</sup>, 873 cm<sup>-1</sup> και 1409 cm<sup>-1</sup>. Η κορυφή στα 1638 cm<sup>-1</sup> μπορεί να αποδοθεί σε κάποιο από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου LB. Τέλος, η κορυφή που εμφανίζεται στην περιοχή 3000-3500 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται στο νερό του υδατικού διαλύματος.



**Εικόνα 54:** Φάσμα FT-IR *St. aureus* στο θρεπτικό μέσο LB.

Ένα ενδεικτικό φάσμα IR βακτηρίου παρουσιάζεται στην Εικόνα 54. Με βάση το φάσμα του βακτηρίου μπορούμε να αντιστοιχίσουμε κάποιες κορυφές στα διάφορα συστατικά που συνθέτουν τον μικροοργανισμό. Η κορυφή στους  $1018\text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται στις ενώσεις πολυσακχαριτών, η κορυφή στους  $1260\text{ cm}^{-1}$  στην ασύμμετρη δόνηση του δεσμού  $\text{PO}_2^-$ , στους  $3274\text{ cm}^{-1}$  παρατηρούμε την δόνηση του N-H, ενώ στους  $2838\text{ cm}^{-1}$  παρατηρούμε την συμμετρική δόνηση του δεσμού  $\text{CH}_2$ [61].

Στη συνέχεια, παρατίθεται το φάσμα IR της κινητικής μελέτης κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. aureus* στο θρεπτικό μέσο LB.



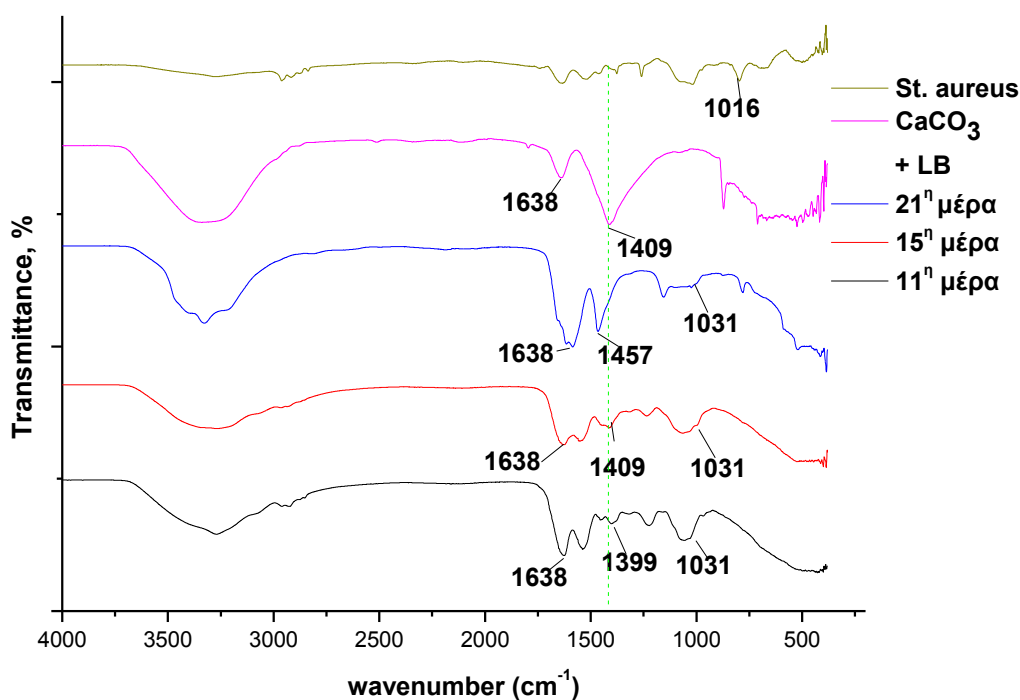
**Εικόνα 55:** Φάσμα FT IR της κινητικής μελέτης κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. aureus* σε θρεπτικό υλικό LB.

Συγκρίνοντας τα φάσματα των δειγμάτων που απομονώνονται κάθε φορά, με τα φάσμα του μικροοργανισμού αλλά και του  $\text{CaCO}_3$  στο LB προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

Από την 3<sup>η</sup> μέρα επώασης του μικροοργανισμού με  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρία, παρατηρείται κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ . Αυτό πιστοποιείται από την κορυφή στους  $1468 \text{ cm}^{-1}$ , η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω ανήκει στην περιοχή εμφάνισης  $1530\text{-}1320 \text{ cm}^{-1}$  για τα ανθρακικά ιόντα. Η κορυφή στους  $780 \text{ cm}^{-1}$  αποδίδεται επίσης στα ανθρακικά ιόντα. Παρόλο που η κορυφή αυτή δεν αντιστοιχεί σε κάποια περιοχή εμφάνισης των ανθρακικών ιόντων, μπορεί να αποδοθεί στην περιοχή  $745\text{-}670 \text{ cm}^{-1}$ , αλλά ως μετατοπισμένη. Οι υπόλοιπες κορυφές που παρουσιάζουν τα φάσματα των δειγμάτων μπορούν να αποδοθούν σε ενώσεις του μικροοργανισμού και του θρεπτικού υλικού.

Τελικά, από την συγκριτική μελέτη των διάφορων φασμάτων FT-IR, προκύπτει ότι ο *St. aureus* είναι ικανός να κατακρημνίζει  $\text{CaCO}_3$  σε θρεπτικό διάλυμα LB, όταν έχει διαλυθεί αρκετή ποσότητα  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρία. Λόγω της ουρεολυτικής δράσης του μικροοργανισμού απελευθερώνονται ανθρακικά ιόντα, και σε περιβάλλον πλούσιο σε ασβέστιο παρατηρείται κατακρήμνιση του ορυκτού.

Παρακάτω παρατίθεται το φάσμα IR της κινητικής μελέτης κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από τον *St. aureus* στο θρεπτικό μέσο σε τρυβλίο Petri.



**Εικόνα 56:** Φάσμα FT IR της κινητικής μελέτης κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από τον *St. aureus* σε LB άγαρ μέσο.

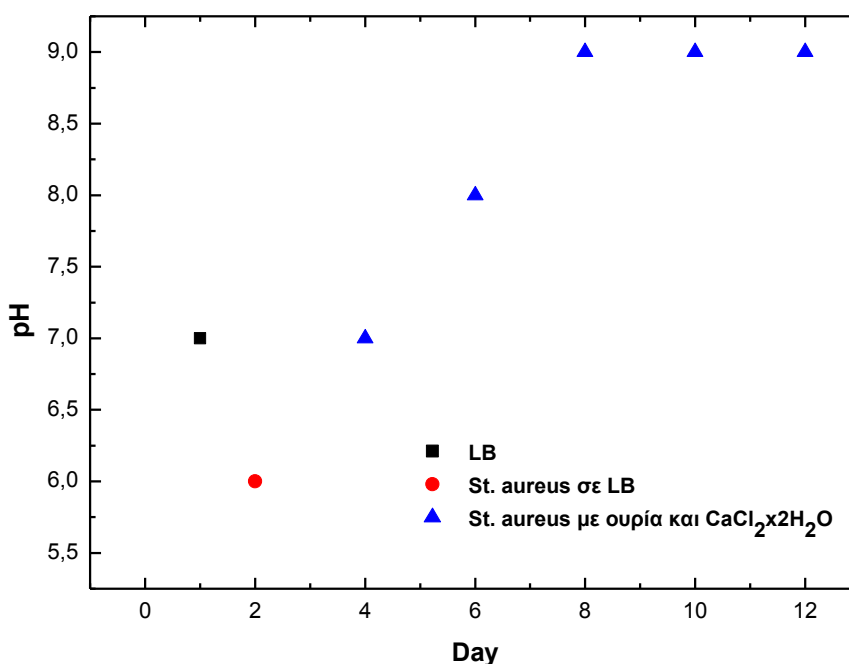
Από τη συγκριτική μελέτη κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από τον *St. aureus* σε LB άγαρ μέσο παρατηρήθηκαν οι κορυφές των ανθρακικών που αντιστοιχούν στα ανθρακικά ιόντα στα δείγματα που απομονώθηκαν. Έτσι λοιπόν, σύμφωνα με το παραπάνω φάσμα FT IR η κορυφή στους 1638 cm<sup>-1</sup> αποδίδεται σε συστατικά του θρεπτικού υλικού και η κορυφή στους 1031 cm<sup>-1</sup> στους πολυσακχαρίτες του μικροοργανισμού. Η κορυφή που αποδίδεται στα ανθρακικά ιόντα είναι στην περιοχή 1399-1457 cm<sup>-1</sup>, καθώς περιλαμβάνεται στην περιοχή 1530-1320 cm<sup>-1</sup> όπου εμφανίζονται τα συγκεκριμένα ιόντα. Μπορούμε να συμπεράνουμε, ενδεικτικά, ότι ο *St. aureus* έχει την δυνατότητα να κατακρημνίζει CaCO<sub>3</sub> σε τρυβλίο Petri.

Όπως αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 3.4.1 η διάσπαση της ουρίας από το μικροοργανισμό είναι μια διαδικασία όπου οδηγεί στην αύξηση του pH, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, σύμφωνα με την αντίδραση:



Η παραγωγή των NH<sub>4</sub><sup>+</sup> είναι που οδηγεί σε αύξηση του pH, και προκαλεί την απελευθέρωση CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Η μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από τον *St. aureus* επεκτάθηκε παρατηρώντας την μεταβολή του pH. Συγκεκριμένα σε διάλυμα μικροοργανισμού με CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O

και ουρία παρατηρήθηκε η μεταβολή του pH του διαλύματος σε διάστημα 12 ημερών επώασης. Ανά δύο μέρες λαμβανόταν τιμή pH και προέκυψε το παρακάτω διάγραμμα.



**Εικόνα 57:** Τιμές pH του LB διαλύματος (μαύρο τετράγωνο), του *St. aureus* σε LB (κόκκινος κύκλος) και του *St. aureus* με CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O και ουρία (μπλε τρίγωνο).

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα το pH του θρεπτικού υλικού είναι 7, ενώ όταν σε αυτό αναπτυχθεί ο *St. aureus* το pH γίνεται 6. Η βέλτιστη περιοχή pH όπου μπορεί να αναπτυχθεί ο *St. aureus* είναι μεταξύ 7-7,5 [62]. Παρ' όλα αυτά, επειδή η ελάχιστη επιτρεπόμενη τιμή pH ανάπτυξής του είναι 4,2, στη συγκεκριμένη περίπτωση η ανάπτυξη έγινε σε βιώσιμες συνθήκες. Στη συνέχεια παρατηρείται πως, όταν προστίθεται στο διάλυμα του βακτηρίου CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O και ουρία, το pH αυξάνεται μέχρι που παραμένει σταθερό στην τιμή 9. Η μεταβολή αυτή προκαλείται από την παραγωγή των NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, μέσω της διάσπασης της ουρίας, και αποτελεί έμμεση απόδειξη της ύπαρξης CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> στο περιβάλλον του μικροοργανισμού. Επομένως, αφού έχουν προστεθεί στο διάλυμα Ca<sup>2+</sup>, έχει πραγματοποιηθεί κατακρήμνιση CaCO<sub>3</sub>. Το pH του διαλύματος δεν αυξάνεται περεταίρω καθώς η μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή pH όπου μπορεί να αναπτυχθεί ο *St. aureus* είναι 9,2 [62]. Ύστερα ο μικροοργανισμός πιθανόν να εισέρχεται στη στάσιμη φάση, όπου σταματούν πολλές μεταβολικές δραστηριότητές του, και ύστερα στη φάση θανάτου (Παράγραφος 3.3.3).

## 8.2.2 Μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από *Escherichia coli*

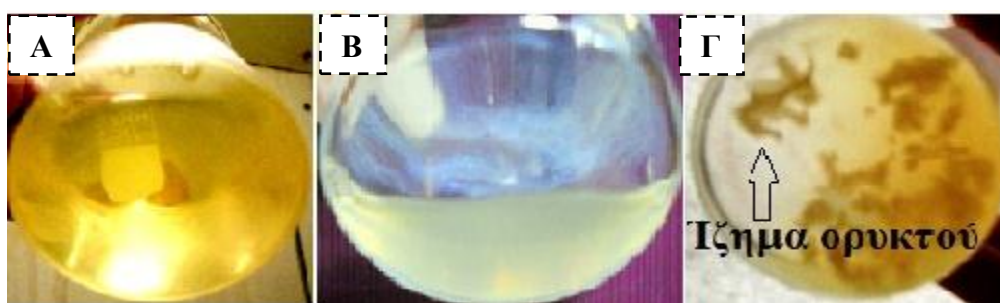
Για να διερευνηθεί η δυνατότητα κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από την *Escherichia coli*, ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 8.2.1. Με τον τρόπο αυτό, μελετήθηκε ποιοτικά η δυνατότητα του βακτηρίου αυτού να κατακρημνίζει το άλας.

**Πίνακας 24:** Σύνθεση διαλυμάτων *E-coli* με διαφορετική συγκέντρωση CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O και ουρίας.

| Υλικά                     | 1 <sup>ο</sup> διάλυμα | 2 <sup>ο</sup> διάλυμα | 3 <sup>ο</sup> διάλυμα | 4 <sup>ο</sup> διάλυμα | 5 <sup>ο</sup> διάλυμα |
|---------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| CaCl <sub>2</sub>         | -                      | 0,05 g                 | 0,1 g                  | 0,25 g                 | 0,5 g                  |
| Ουρία                     | -                      | 0,05 g                 | 0,1 g                  | 0,25 g                 | 0,5 g                  |
| Καλλιέργεια <i>E-coli</i> | 20 ml                  | 20 ml                  | 20 ml                  | 20 ml                  | 20 ml                  |

Η καλλιέργεια του βακτηρίου *E-coli* έγινε με την ίδια διαδικασία όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 6.3.1. Για την παρασκευή των παραπάνω διαλυμάτων απομονώθηκε ποσότητα διαλύματος μικροοργανισμού και προστέθηκε η αντίστοιχη ποσότητα CaCl<sub>2</sub> και ουρίας σύμφωνα με τον Πίνακα 24, κάθε φορά.

Τα διαλύματα αυτά, επώστηκαν στους 37 °C και στις 100 rpm, με τον τρόπο που περιγράφηκε στην Παράγραφο 6.5. Το διάλυμα του μικροοργανισμού που περιείχε την περισσότερη ποσότητα CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O και ουρίας εμφάνισε την μεγαλύτερη θολερότητα από τα υπόλοιπα διαλύματα με εμφανή την κατακρήμνιση CaCO<sub>3</sub>. Ύστερα από 72 h σε αυτές τις συνθήκες τα διαλύματα απομακρύνθηκαν και συγκρίθηκαν. Παρακάτω παρατίθενται οι φωτογραφίες του θρεπτικού διαλύματος, του διαλύματος του βακτηρίου μετά από επώαση και του 5<sup>ου</sup> διαλύματος.



**Εικόνα 58:** Μεταβολή θολερότητας της καλλιέργειας *E-coli*: Α) Διάλυμα LB , Β) Διάλυμα μικροοργανισμού μετά την επώασή τους σε LB και Γ) Κατακρήμνιση CaCO<sub>3</sub>.

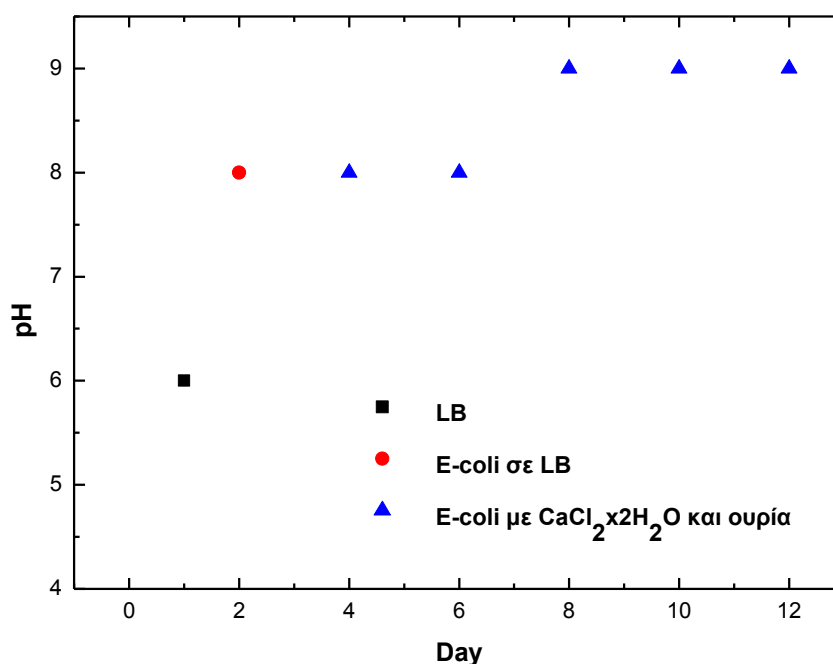
Όπως φαίνεται παραπάνω μετά την ανάπτυξη του μικροοργανισμού *E-coli* γίνεται συγκριτική μελέτη και παρατηρείται εμφανής μεταβολή θολερότητας των διαλυμάτων LB και

μικροοργανισμού. Πιστοποιείται έτσι, ότι ο μικροοργανισμός έχει επωαστεί κατάλληλα για να μελετηθεί οποιαδήποτε μεταβολική του διεργασία.

Από την Εικόνα 58-Γ παρατηρείται έντονη θολερότητα στο διάλυμα του μικροοργανισμού που περιείχε την περισσότερη ποσότητα  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρίας, σε σχέση με το διάλυμα επώασης του μικροοργανισμού. Το ίζημα που καταβυθίζεται μπορεί να αποδοθεί στην δημιουργία  $\text{CaCO}_3$  από την *E-coli*.

Από τον οπτικό χαρακτηρισμό της κατακρήμνισης ανθρακικού ασβεστίου, προκύπτει ότι η *E-coli* μέσω της ουρεολυτικής διάσπασης καταβυθίσει  $\text{CaCO}_3$ .

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω στην περίπτωση του *St. aureus*, η διάσπαση της ουρίας από το μικροοργανισμό είναι μια διαδικασία όπου οδηγεί στην αύξηση του pH, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την παραγωγή  $\text{CO}_3^{2-}$ . Σε διάλυμα *E-coli* με  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρία παρατηρήθηκε η μεταβολή του pH του διαλύματος σε διάστημα 10 ημερών επώασης. Ανά δύο μέρες λήφθηκε τιμή pH και προκύπτοντας το παρακάτω διάγραμμα.



**Εικόνα 59:** Τιμές pH του LB διαλύματος (μαύρο τετράγωνο), της *E-coli* σε LB (κόκκινος κύκλος) και της *E-coli* με  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρία (μπλε τρίγωνο).

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα το pH του θρεπτικού υλικού είναι 7, ενώ όταν σε αυτό αναπτυχθεί ο *E-coli* το pH γίνεται 6. Η βέλτιστη περιοχή pH όπου μπορεί να αναπτυχθεί ο *E-coli* είναι μεταξύ 6-7. Παρ' όλα αυτά, επειδή η μέγιστη επιτρεπόμενη τιμή pH ανάπτυξης του μικροοργανισμού είναι 9 [62], η ανάπτυξη του μικροοργανισμού έγινε σε βιώσιμες συνθήκες. Στη συνέχεια παρατηρείται πως, όπως και στη περίπτωση του *St. aureus*, όταν προστίθεται στο διάλυμα

του βακτηρίου  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  και ουρία, το pH αυξάνεται μέχρι που παραμένει σταθερό στην τιμή 9. Η παραγωγή  $\text{NH}_4^+$ , μέσω της διάσπασης της ουρίας, αποτελεί έμμεση απόδειξη της ύπαρξης  $\text{CO}_3^{2-}$  στο περιβάλλον του μικροοργανισμού. Επομένως, αφού έχουν προστεθεί στο διάλυμα  $\text{Ca}^{2+}$ , έχει πραγματοποιηθεί κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ . Η τιμή pH παραμένει σταθερή ύστερα καθώς ο μικροοργανισμός πιθανόν να εισέρχεται στη στάσιμη φάση, όπου σταματούν πολλές μεταβολικές δραστηριότητές του, και ύστερα στη φάση θανάτου (Παράγραφος 3.3.3).

### 8.3 Συζήτηση

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν δύο είδη βακτηρίων, *E-coli* και *St. aureus*, για την ικανότητά τους, μέσω της διάσπασης της ουρίας και την δράση της ουρεάσης, να κατακρημνίζουν  $\text{CaCO}_3$  σε ένα περιβάλλον πλούσιο με  $\text{Ca}^{2+}$ . Μέσω των ελέγχων που πραγματοποιήθηκαν, οπτικός και μεταβολή pH, παρατηρήθηκε ότι και τα δύο βακτήρια κατακρημνίζουν το επιθυμητό ορυκτό. Περαιτέρω χαρακτηρισμός πραγματοποιήθηκε με τον *St. aureus*, όπου πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για την ύπαρξη του  $\text{CaCO}_3$ , σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα θρεπτικού μέσου του μικροοργανισμού. Και στις δύο περιπτώσεις επιβεβαιώθηκε η κατακρήμνιση του ορυκτού.

Τα συγκεκριμένα εν δύναμη βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο φαινόμενο αυτοϊάσης του τσιμέντου, καθώς είναι εμφανής η ικανότητά τους να κατακρημνίζουν  $\text{CaCO}_3$  κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες.



# 9. ΚΕΦΑΛΑΙΟ

*ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ  
ΜΕΤΑΞΥ ΜΙΚΡΟΣΦΑΙΡΩΝ  
ΚΑΙ ΑΝΘΡΩΠΟΥ/  
ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ*



## 9.1 Εισαγωγή

Σε αυτό το κεφάλαιο γίνεται μελέτη συμπεριφοράς βακτηρίων παρουσία των μικροσφαιρών που έχουν συντεθεί και περιγράφονται στο Κεφάλαιο 7. Συγκεκριμένα, μελετάται η αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροσφαιρών και βακτηρίων *in vitro*.

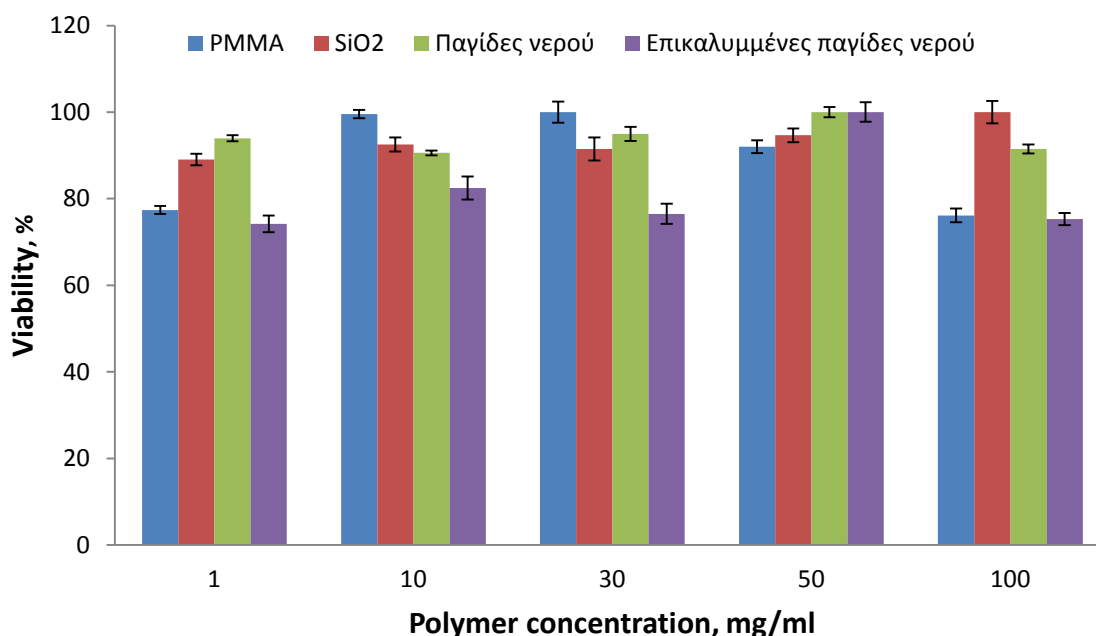
Με απώτερο σκοπό τα μικροδοχεία αυτά να εισαχθούν στο τσιμέντο ως φορείς βακτηρίων, είναι απαραίτητο να μελετηθεί κατά πόσο οι πολυμερικές σφαίρες παρουσιάζουν τοξικότητα στον άνθρωπο και στα βακτήρια. Από τα πέντε είδη πολυμερικών μικροσφαιρών που συντέθηκαν, μελετήθηκαν α) οι μικρο-παγίδες νερού, β) οι επικαλυμμένες μικρο-παγίδες νερού με  $\text{SiO}_2$ , γ) οι μικροσφαίρες  $\text{SiO}_2$  και δ) οι μικροσφαίρες PMMA για την αλληλεπίδρασή τους με τα βακτήρια. Το πέμπτο είδος πολυμερικών μικροσφαιρών με κέλυφος πολυουρίας, χρειάζεται περαιτέρω βελτιστοποίηση, πριν την οποιαδήποτε σύζευξή του με μικροοργανισμό.

Στην συνέχεια αυτού του κεφαλαίου, μελετάται αν οι μικροσφαίρες επιδρούν στην ουρεολυτική δράση των βακτηρίων για την καταβύθιση  $\text{CaCO}_3$ . Δηλαδή, μελετάται αν τα βακτήρια εξακολουθούν να είναι ικανά να καταβυθίζουν το ορυκτό και μετά την επαφή τους με τα μικρο-συστήματα μεταφοράς.

## 9.2 Μελέτη τοξικότητας

### 9.2.1 Μελέτη της κυτταροτοξικής δράσης των μικροσφαιρών.

Η διερεύνηση της ζωτικότητας των κυττάρων αποτελεί χαρακτηριστικό δείκτη και αναγκαία προϋπόθεση σε περιπτώσεις μελέτης κυτταροτοξικής δράσης πολυμερικών ανόργανων-οργανικών μικροσφαιρών όπου θα χρησιμοποιηθούν σε υλικά που θα έρθουν σε άμεση επαφή με τον άνθρωπο, όπως π.χ. το τσιμέντο. Με τη μέθοδο MTT μελετάται η κυτταροτοξική δράση των μικροσφαιρών στα κύτταρα HEK-293. Η διαδικασία μελέτης της κυτταροτοξικότητας περιγράφεται στην Παράγραφο 6.7. Μελετήθηκε, η κυτταροτοξική δράση των μικροσφαιρών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Τα ποσοστά της ζωτικότητας κυττάρων μετά από επώαση με τα εν λόγω υλικά παρουσιάζονται στο παρακάτω σχήμα.



**Εικόνα 60:** Ποσοστά ζωτικότητας κυττάρων HEK-293, παρουσία μικροσφαιρών σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Από το διάγραμμα ζωτικότητας, προκύπτει ότι οι μικροσφαίρες που μελετήθηκαν δεν είναι τοξικές στον άνθρωπο. Γενικά συμπεραίνουμε ότι ανεξαρτήτως συγκέντρωσης του πολυμερούς η μεταβολική λειτουργία των κυττάρων δεν επηρεάζεται παρουσία των μικρο-συστημάτων μεταφοράς.

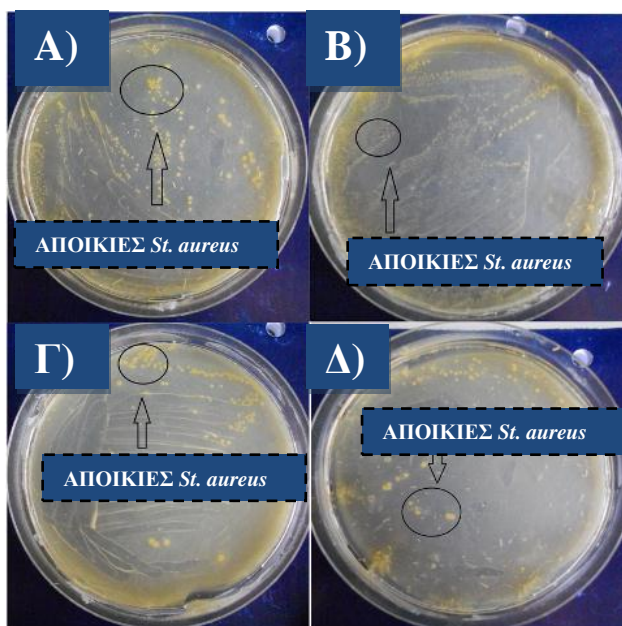
### 9.2.2 Μελέτη τοξικότητας των μικροσφαιρών προς στον *St. aureus*.

Αφού αποδείχθηκε πως οι μικροσφαίρες δεν είναι τοξικές προς τον άνθρωπο, στη συνέχεια διερευνάται κατά πόσο οι μικροσφαίρες επηρεάζουν την ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Δηλαδή, γίνεται ποιοτικός έλεγχος της τοξικότητας των μικρο-συστημάτων μεταφοράς στον *St. aureus*.

Ο ποιοτικός έλεγχος γίνεται με τον εμβολιασμό του μικροοργανισμού σε τρυβλία Petri, παρουσία των μικροσφαιρών. Η πειραματική διαδικασία ανάπτυξης του *St. aureus* σε τρυβλίο περιγράφεται στην Παράγραφο 6.3.2.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, πριν γίνει ο εμβολιασμός του μικροοργανισμού στο τρυβλίο, παρασκευάστηκαν διαλύματα *St. aureus* στα οποία προστέθηκε ποσότητα από την κάθε μια περίπτωση μικροσφαιρών σε κάθε ένα. Το ίζημα που προέκυψε, μικροοργανισμού και μικροσφαιρών, εμβολιάστηκε σε τρυβλίο Petri. Έτσι, παρατηρήθηκε η ανάπτυξη του *St. aureus* σε περιβάλλον που περιέχει τα μικρο-συστήματα μεταφοράς.

Παρακάτω παρατίθενται οι φωτογραφίες των τρυβλίων Petri του *St. aureus* για την κάθε μια περίπτωση μικροσφαίρας που μελετάται.



**Εικόνα 61:** Ανάπτυξη *St. aureus* σε τρυβλία Petri παρουσία Α) μικροσφαιρών PMMA, Β) μικροσφαιρών SiO<sub>2</sub>, Γ) μικρο-παγίδων νερού και Δ) μικροπαγίδων νερού με επικάλυψη SiO<sub>2</sub>.

Σύμφωνα με την Εικόνα 61, πιστοποιείται ότι οι μικροσφαίρες δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του *St. aureus*. Είναι ευδιάκριτες σε όλες τις περιπτώσεις τρυβλίων οι αποικίες που σχηματίζει ο μικροοργανισμός. Οι αποικίες αυτές αποδεικνύουν ότι ο *St. aureus* παραμένει ενεργός μεταβολικά ακόμα και παρουσία των μικροσφαιρών. Από τον ποιοτικό αυτό έλεγχο, προκύπτει τελικά ότι οι τεσσάρων ειδών μικροσφαίρες, δεν είναι τοξικές στον μικροοργανισμό.

Ο επόμενος έλεγχος αφορά το κατά πόσο παρουσία μικροσφαιρών επηρεάζεται η κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. aureus*.

### 9.3 Μελέτη χαρακτηρισμού κατακρήμνισης $\text{CaCO}_3$ από *Staphylococcus aureus* παρουσία μικροσφαιρών

Η επίδραση των μικρο-συστημάτων μεταφοράς στην κατακρήμνιση του  $\text{CaCO}_3$  από το μικροοργανισμό, διερευνήθηκε μέσω κινητικής μελέτης σε διαλύματα *St. aureus* παρουσία  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , ουρίας και μικρο-παγίδων νερού. Λαμβάνοντας δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, και μέσω των φασμάτων της υπέρυθρης φασματοσκοπίας (FT-IR), διερευνάται η ύπαρξη του ορυκτού.

Παρακάτω περιγράφεται η σύνθεση των διαλυμάτων του μικροοργανισμού σε θρεπτικό διάλυμα LB για την κινητική μελέτη κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$ .

**Πίνακας 25:** Ποσότητες υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την κινητική μελέτη κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$  από διάλυμα μικροοργανισμού σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία μικρο-παγίδων νερού.

| Υλικά                                      | Ποσότητες |
|--|-----------|
| LB   | 49,5 ml   |
| $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 2,5 g     |
| Ουρία                                      | 2,5 g     |
| Διάλυμα <i>St. aureus</i>                  | 0,5 ml    |
| Μικρο-παγίδες νερού                        | 1 g       |

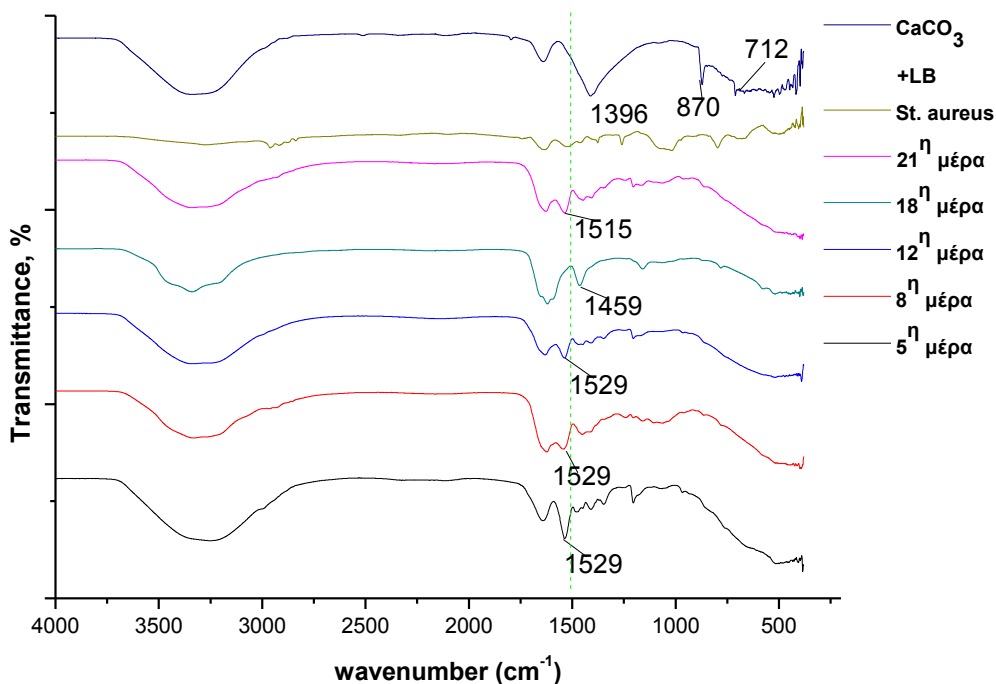
Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού σε θρεπτικό υλικό LB με τις παραπάνω ποσότητες υλικών, γίνεται με τη διαδικασία που περιγράφεται στην Παράγραφο 6.3.1. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως, ο *St. aureus* που αναπτύσσεται, τοποθετείται στον επωαστήρα ανάδευσης για περίπου 24 μέρες σε συγκεκριμένες συνθήκες ( $37^\circ\text{C}$ , 100rpm). Ανά τακτά χρονικά διαστήματα απομονώνεται δείγμα, φυγοκεντρείται, αποστειρώνεται και τελικά χαρακτηρίζεται μέσω FT-IR, για την πιστοποίηση ύπαρξης  $\text{CaCO}_3$ .

Η μελέτη των φασμάτων που προέκυψαν πραγματοποιήθηκε με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε στην Παράγραφο 8.2.1. Δηλαδή, για να εντοπιστούν οι κορυφές των ανθρακικών ιόντων στα φάσματα FT-IR των δειγμάτων που απομονώνονται, γίνεται συγκριτική μελέτη μεταξύ των φασμάτων των δειγμάτων, του μικροοργανισμού και του  $\text{CaCO}_3$  στο θρεπτικό υλικό LB.

Από την Παράγραφο 8.2.1. προέκυψε ότι το  $\text{CaCO}_3$  σε διάλυμα LB, εμφανίζει κορυφές στους  $712\text{ cm}^{-1}$ ,  $873\text{ cm}^{-1}$  και  $1409\text{ cm}^{-1}$  (Εικόνα 53). Ενώ, οι κορυφές που αντιστοιχούν στον μικροοργανισμό παρατηρούνται: στους  $1018\text{ cm}^{-1}$  για τις ενώσεις πολυσακχαριτών, στους  $1260$

$\text{cm}^{-1}$  για την ασύμμετρη δόνηση του δεσμού  $\text{PO}_2^- \text{cm}^{-1}$ , στους  $3274 \text{ cm}^{-1}$  για τη δόνηση του N-H, ενώ στους  $2838 \text{ cm}^{-1}$  για την συμμετρική δόνηση του δεσμού  $\text{CH}_2$  (Εικόνα 54).

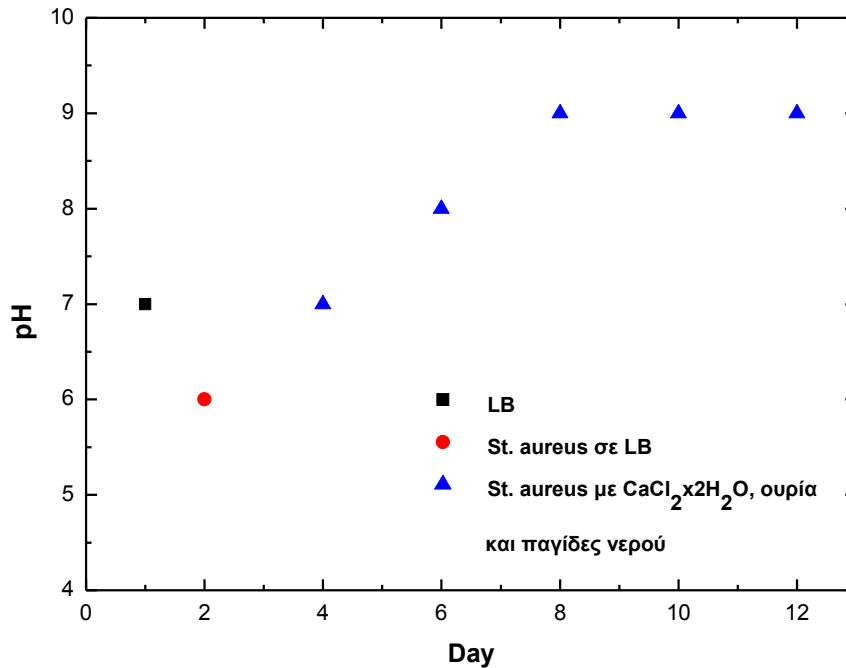
Η παραγωγή  $\text{CaCO}_3$  πιστοποιήθηκε με τις χαρακτηριστικές κορυφές των ανθρακικών ιόντων να παρουσιάζονται από το παρακάτω φάσμα FT IR.



**Εικόνα 62:** Φάσμα FT IR της κινητικής μελέτης κατακρήμνισης  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. aureus* στο θρεπτικό υλικό LB παρουσία των παγίδων νερού.

Με βάση το παραπάνω φάσμα FT IR, προκύπτει ότι κατακρημνίζεται  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. aureus* σε θρεπτικό υλικό LB παρουσία των παγίδων νερού. Αυτό, αποδεικνύεται με την κορυφή στους  $1529 \text{ cm}^{-1}$  όπου ανήκει στην περιοχή εμφάνισης ανθρακικών  $1530\text{-}1320 \text{ cm}^{-1}$ . Οι υπόλοιπες κορυφές των φασμάτων των δειγμάτων, αποδίδονται σε συστατικά του ίδιου του μικροοργανισμού και του θρεπτικού υλικού LB.

Όπως περιγράφηκε και στην Παράγραφο 8.2.1, επειδή κατά τη διάσπαση της ουρίας παράγονται 2 moles  $\text{NH}_4^+$ , παρατηρείται έκλυση των ανθρακικών ιόντων λόγω αύξησης του pH του διαλύματος. Αυτή η αύξηση του pH οδηγεί, παρουσία  $\text{Ca}^{+2}$  στο διάλυμα, στην κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ . Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα της μεταβολής του pH σε διάλυμα *St. aureus* παρουσία  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , ουρίας και των μικρο-παγίδων νερού, σε διάστημα μελέτης 12 ημερών.



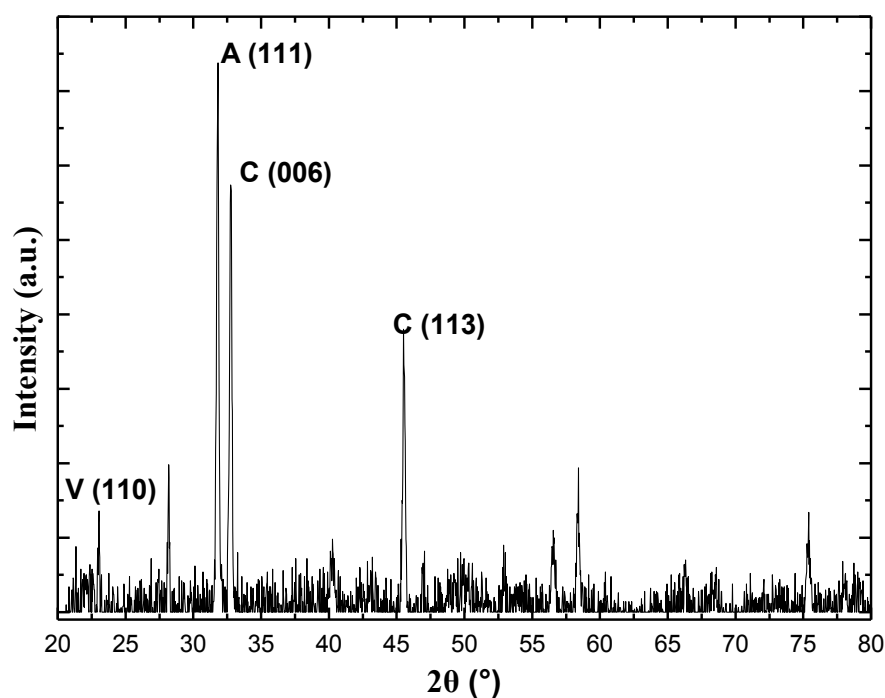
**Εικόνα 63:** Τιμές pH του LB διαλύματος (μαύρο τετράγωνο), του *St. aureus* σε LB (κόκκινος κύκλος) και του *St. aureus* με CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, ουρία και παγίδες νερού (μπλε τρίγωνο).

Σύμφωνα με το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η μεταβολή του pH σε διάλυμα μικροοργανισμού παρουσία CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, ουρίας και παγίδων νερού, είναι ίδια με το διάγραμμα της Εικόνας 58. Δηλαδή, η αύξηση του pH αποδίδεται στην παραγωγή NH<sub>4</sub><sup>+</sup> όπου αποτελεί έμμεση απόδειξη της ύπαρξης ανθρακικών ιόντων. Τελικά, παρουσία Ca<sup>2+</sup> παρατηρείται κατακρήμνιση CaCO<sub>3</sub>. Όπως έχει αναφερθεί, περεταίρω αύξηση του pH δεν παρουσιάζεται καθώς ο μικροοργανισμός πιθανόν να εισέρχεται στη στάσιμη φάση, όπου σταματούν πολλές μεταβολικές δραστηριότητές του, και ύστερα στη φάση θανάτου (Παράγραφος 3.3.3).

Τέτοια μεταβολή του pH παρατηρήθηκε και σε διαλύματα του *St. aureus* με CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, ουρίας παρουσία και των υπολοίπων μικροσφαιρών που συντέθηκαν.

Περαιτέρω χαρακτηρισμός της κατακρήμνισης CaCO<sub>3</sub> από τον *St. aureus* παρουσία μικροπαγίδων νερού, πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο XRD.





**Εικόνα 64:** Διάγραμμα περίθλασης ακτινών X για το δείγμα του *St. aureus* παρουσία μικροπαγίδων νερού μετά από την κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ .

Σύμφωνα με την κρυσταλλογραφία ακτινών-X του δείγματος πιστοποιείται η ύπαρξη  $\text{CaCO}_3$  με την συνύπαρξη και των τριών του κρυσταλλικών του μορφών: α) του ασβεστίτη, C με τα κρυσταλλικά επίπεδα (006) και (113), β) του βατερίτη, V (110) και του αραγωνίτη, A (111).

#### 9.4 Συζήτηση

Οι προς μελέτη μικρόσφαιρες αποδείχθηκαν πως δεν είναι τοξικές στον άνθρωπο, κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι μπορούν να εφαρμοστούν σε υλικά που έρχονται σε άμεση επαφή με τον άνθρωπο.

Καθώς τα συγκεκριμένα μικρο-συστήματα μεταφοράς, δεν είναι τοξικά ούτε στο μικροοργανισμό, μελετήθηκε κατά πόσο επηρεάζουν την βιο-κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  από τον *St. aureus*. Μέσω της κινητικής μελέτης των φασμάτων FT IR, μεταβολής του pH και του φάσματος XRD αποδεικνύεται πως οι παγίδες νερού δεν επηρεάζουν την μεταβολική δραστηριότητα του μικροοργανισμού όπου οδηγεί στην κατακρήμνιση του ορυκτού. Παρόλο που διερευνήθηκαν μόνο οι μικρο-παγίδες νερού, η συμπεριφορά του βακτηρίου είναι ίδια σε όλες τις περιπτώσεις μικροσφαιρών που συντέθηκαν.



# 10 . ΚΕΦΑΛΑΙΟ

## *ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ- ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ*



Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός ενός οικονομικού και εύκολα διαχειρίσιμου υλικού, το οποίο θα αλληλεπιδρά με μικροοργανισμούς αποδίδοντας σε συγκεκριμένες συνθήκες  $\text{CaCO}_3$ , ορυκτό το οποίο οδηγεί στην επούλωση ρωγμών σε δομικά υλικά.

Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η σύνθεση μικροσφαιρών διαφόρων τύπων όπως α) μικροπαγίδες νερού, β) επικαλυμμένες μικροπαγίδες νερού με  $\text{SiO}_2$ , γ) μικροσφαίρες  $\text{SiO}_2$  και δ) μικροσφαίρες PMMA και η αλληλεπίδραση τους με μικροοργανισμούς, θετικούς και αρνητικούς κατά Gram, οι οποίοι κάτω από κατάλληλες συνθήκες προκαλούν την κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$ . Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία το καταλληλότερο βακτήριο στη μελέτη μιας τέτοιας περίπτωσης, είναι του γένους *Bacillus* (θετικό κατά Gram, αλκαλοφιλικό, σποριόμορφο βακτήριο). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε δύο είδη βακτηρίων, *Escherichia coli* (αρνητικό κατά Gram) και *Staphylococcus aureus* (θετικό κατά Gram). Πιο λεπτομερώς, διερευνήθηκε ο *St. aureus* καθώς είναι ένα θετικό κατά Gram βακτήριο, και η δομή του ταυτίζεται με βακτήριο του γένους *Bacillus*.

Μελετήθηκαν συστήματα μεταφορά βακτηριδίων τα οποία μπορούν να δράσουν είτε ως φορείς των βακτηριδίων είτε ως κέντρα εγκλωβισμού των βακτηριδίων. Το πρώτο σύστημα που συντέθηκε είναι παγίδες νερού και αφορά σύστημα κέντρου εγκλωβισμού των βακτηριδίων. Συντέθηκαν μικροσφαίρες μεγέθους  $1\mu\text{m}$ , με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους και από την μελέτη απορρόφησης νερού, αποδείχθηκε ότι μπορούν να ανταποκριθούν σε υδατικά ερεθίσματα αυξάνοντας το μέγεθός τους λόγω διόγκωσης. Ένα τέτοιο σύστημα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απορρόφηση των σπόρων του μικροοργανισμού. Στη συνέχεια, οι παγίδες νερού επικαλύφθηκαν με  $\text{SiO}_2$  με σκοπό να προσδοθεί στις παγίδες νερού ένα ανθεκτικό κέλυφος, έτσι ώστε μελλοντικά όταν προστεθεί στο σκυρόδεμα να προστατέψει το προσροφημένο βακτήριο από το ακραίο περιβάλλον του τσιμέντου.

Το δεύτερο και τρίτο σύστημα μεταφοράς βακτηριδίων αφορά τη σύνθεση μικροσφαιρών, όπου παρατηρείται η δημιουργία ενός οργανικού (PMMA) και ενός ανόργανου ( $\text{SiO}_2$ ) συστήματος όπου και τα δύο δρουν ως φορείς των βακτηριδίων. Και τα δύο είδη μικροσφαιρών συντέθηκαν σε υδατικό περιβάλλον, κάτι το οποίο επιλέγεται από τη βιομηχανία για την παραγωγή ενός υλικού, ως μια οικονομική σύνθεση. Αυτό έρχεται σε αντίθεση, με τη σύνθεση των μικροπαγίδων νερού και των επικαλύψεων τους καθώς η σύνθεση πραγματοποιήθηκε σε οργανικό διαλύτη (ακετονιτρίλιο), γεγονός οικονομικά ασύμφορο για την παραγωγή. Η σύνθεση των μικροσφαιρών PMMA και  $\text{SiO}_2$  οδήγησε σε σύνθεση μεγέθους περίπου  $1\mu\text{m}$ , με ομοιόμορφη κατανομή μεγέθους.

Το τέταρτο σύστημα, αφορά την σύνθεση μικροσφαιρών με κέλυφος πολυουρίας με σκοπό τον εγκλωβισμό ουσίας στο εσωτερικό τους. Παρατηρήθηκε, επιτυχής σύνθεση καψουλών με κέλυφος ουρίας όταν χρησιμοποιείται ως γαλακτωματοποιητής ο PEG και ο Triton-x. Το σύστημα

μεταφοράς βακτηριών με εγκλωβισμό σε κέλυφος πολυουρίας μπορεί να αποδειχθεί πολύ χρήσιμο για τις ανάγκες της βιομηχανίας, καθώς έχει μεγάλη αντοχή και είναι σταθερό.

Στο δεύτερο μέρος την εργασίας, μελετήθηκε η ικανότητα των *Escherichia coli* και *Staphylococcus aureus* να κατακρημνίζουν  $\text{CaCO}_3$ . Η καταβύθιση του ορυκτού πιστοποιείται από οπτικό χαρακτηρισμό, με φασματοσκοπία FT-IR και με τη μεταβολή του pH σε διαλύματα των μικροοργανισμών. Αποδείχθηκε, επίσης, ότι οι μικροσφαίρες δεν είναι τοξικές για τον άνθρωπο (μέσω της μεθόδου MTT) αλλά και για τα βακτήρια (οπτικός έλεγχος επανακαλλιέργειας μετά από εμβολιασμό σε τρυβλίο Petri). Στη συνέχεια, διερευνήθηκε αν οι μικροσφαίρες επηρεάζουν την καταβύθιση του  $\text{CaCO}_3$  από το μικροοργανισμό. Όπως παρατηρήθηκε από τα δεδομένα της παρούσας μελέτης, ο μικροοργανισμός παραμένει μεταβολικά ενεργός, γεγονός που οδηγεί στην κατακρήμνιση του ορυκτού, παρουσία των μικροσφαιρών υπό συγκεκριμένες συνθήκες επώασης.

Παρόλο που ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης βακτηρίου-μικροσφαιρών δεν έχει πλήρως μελετηθεί στην παρούσα εργασία, προκύπτει, ότι η σύνθεση μικρο-συστημάτων μεταφοράς βακτηριών με σκοπό την αυτοϊαση δομικών υλικών είναι ένας πολλά υποσχόμενος τρόπος για την προστασία του βακτηρίου μέσα στο τσιμέντο. Βιβλιογραφικά έχει παρατηρηθεί ότι η βιωσιμότητα των σπόρων του γένους *Bacillus*, μέσα στο τσιμέντο μειώνεται με την πάροδο του χρόνου [63]. Έτσι, η σύνθεση ενός υλικού το οποίο δύναται να προστατέψει το βακτήριο μέσα στο σκυρόδεμα, είναι ελπιδοφόρα στον τομέα της αυτοϊασης. Με αυτό τον τρόπο, θα αυξάνεται η απόδοση του βακτηρίου στην κατακρήμνιση και θα παρατηρείται αποτελεσματικότερη επούλωση της ρωγμής. Ένας επιπλέον στόχος για τη σύνθεση ενός τέτοιου υλικού είναι το προϊόν που προκύπτει να είναι όσον το δυνατόν διαχειρίσιμο και εύκολο στην εφαρμογή του, με σκοπό να γίνει και βιομηχανικά ανταγωνιστικό.

Ένας από τους βασικούς μελλοντικούς στόχους είναι η μελέτη της αλληλεπίδρασης των μικροσφαιρών με βακτήριο του γένους *Bacillus*. Επίσης, να εξεταστεί ο ενδεχόμενος εγκλωβισμός του ενδοσπορίου του μικροοργανισμού μέσα σε μικροδοχεία, με σκοπό την εισαγωγή ενός τέτοιου συστήματος στο σκυρόδεμα. Με αυτόν τον τρόπο, θα διερευνηθεί κατά πόσο είναι αποδοτικό το μικρο-σύστημα μεταφοράς στην προστασία του μικροοργανισμού. Με την προσομοίωση των περιβαλλοντικών συνθηκών του σκυροδέματος, να μελετηθεί η απόδοση του βακτηρίου στην κατακρήμνιση  $\text{CaCO}_3$  με απώτερο στόχο την επούλωση των σχηματιζόμενων ρωγμών.

# ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Verhagen, M., Self healing materials:concept and applications. NL Agency.
2. Min Wua, B.J., Mette Geiker A review: Self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material.
3. Jonkers, H.M., Self Healing Concrete: A Biological Approach. self healing materials, ed. S.v.d. Zwaag. Springer.
4. Ν. ΧΑΤΖΗΧΡΗΣΤΙΔΗΣ, Ε.Ι., Σ. ΠΙΣΠΑΣ, Μ. ΠΙΤΣΙΚΑΛΗΣ, Σ. ΣΙΟΥΛΑ, ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΟΛΥΜΕΡΩΝ. ΑΘΗΝΑ 1998: ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
5. Κ. Κορδάτος, Λ.Ε., ΤΕΧΝΙΚΗ SOL-GEL ΎΔΡΟΛΥΣΗ ΤΟΥ  $\text{Si}(\text{OCH}_2\text{CH}_3)_4$  ΚΑΙ ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΩΝ ΧΕΡΟΓΕΛΣ-Προχωρημένη Ανόργανη Χημεία – Εργαστηριακές Ασκήσεις.
6. NAGAVARMA B V N, H.K.S.Y., AYAZ A, VASUDHA L.S, SHIVAKUMAR H.G, DIFFERENT TECHNIQUES FOR PREPARATION OF POLYMERIC NANOPARTICLES- A REVIEW. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.
7. Freiberg, S. and X. Zhu, Polymer microspheres for controlled drug release. International Journal of Pharmaceutics, 2004. **282**(1-2): p. 1-18.
8. Bai, F., X. Yang, and W. Huang, Synthesis of Narrow or Monodisperse Poly(divinylbenzene) Microspheres by Distillation–Precipitation Polymerization. Macromolecules, 2004. **37**(26): p. 9746-9752.
9. Wilkes, J.W.a.G.L., Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol-Gel Approach.
10. ΒΑΣΙΛΗΣ ΜΑΡΜΑΡΑΣ, Μ.Α., ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΚΥΤΤΑΡΟΥ-ΜΟΡΙΑΚΗ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗ. Vol. 5η 2005.
11. Archaea: Systematics: <http://www.ucmp.berkeley.edu/archaea/archaeasy.html>.
12. Ματθόπουλος, Δ., ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.
13. Davidson, M.W.: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/bacteriacell.html>.
14. Michael T. Madigan, J.M.M., Jack Parker, Brock Biology of Microorganisms (10th Edition).
15. the strange and spectacular world of biochemistry: <http://theStrangeandSpectacularWorldofBiochemistry.wordpress.com/>.
16. Bacterial Derived Plastics: <http://www.americanaquariumproducts.com/images/graphics/bacteria.jpg>.
17. Todar, K.; Available from: [http://www.textbookofbacteriology.net/structure\\_10.html](http://www.textbookofbacteriology.net/structure_10.html).
18. Microbial Growth: <http://www.hypertextbookshop.com/biofilmbook/v004/r003/contents/chapters/chapter002/section002/black/page001.html>.
19. Multiple and flexible: cell line, expression mode and process type: <http://www.novasep.com/technologies/Upstream-expression-system.asp>.
20. <http://www.cdc.gov/>.
21. S, B., Medical Microbiology. 1996: University of Texas Medical Branch at Galveston.
22. De Muynck, W., N. De Belie, and W. Verstraete, Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. Ecological Engineering, 2010. **36**(2): p. 118-136.
23. Wang, J.Y., et al., Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. Construction and Building Materials, 2012. **26**(1): p. 532-540.
24. Dick, J., et al., Bio-deposition of a calcium carbonate layer on degraded limestone by Bacillus species. Biodegradation, 2006. **17**(4): p. 357-67.
25. Decho, A.W., Overview of biopolymer-induced mineralization: What goes on in biofilms? Ecological Engineering, 2010. **36**(2): p. 137-144.

26. Plummer N., W.T.a.P.D., American Journal of Science.
27. F., L., Sedimentary Carbonate Materials.
28. He, Y., et al., Tuning the wettability of calcite cubes by varying the sizes of the polystyrene nanoparticles attached to their surfaces. Applied Surface Science, 2007. **253**(12): p. 5320-5324.
29. Kim Van Tittelboom, N.D.B., Willem De Muynck, Willy Verstraete, Use of bacteria to repair cracks in concrete. Cement and Concrete Research, 2009.
30. N. DeBelie, W.D., Crack repair in concrete using biodeposition. International conference on concrete repair, rehabilitation and retrofitting.
31. U.K. Gollapudi, C.L.K., S.S. Bang, M.R. Islam, , A new method for controlling leaching through permeable channels. Chemosphere, 1995: p. 695–705.
32. S.S. Bang, V.R., Microbiologically-enhanced crack remediation (MECR). the International Symposium on Industrial Application of Microbial Genomes, 2001.
33. H.M. Jonkers, A.T., E. Schlangen, Ontwikkeling van zelfherstellend beton met behulp van bacteriën. Cement 4, 2008: p. 78–81.
34. H.M. Jonkers, A.T., O. Copuroglu, E. Schlangen. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. in Proceedings of the 1st International Conference on BioGeoCivil Engineering. 23–25 June 2008.
35. K. Santhosh, S.K.R., V. Ramakrishnan, S.S. Bang, Remediation of concrete using microorganisms. American Concrete Institute Materials Journal 98, 2001: p. 3–9.
36. J.L. Day, V.R., S.S. Bang, Microbiologically induced sealant for concrete crack remediation, in 16th EngineeringMechanics Conference. 16–18 July 2003.
37. S.S. Bang, J.K.G., V. Ramakrishnan, Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized Bacillus pasteurii. Enzyme and Microbial Technology 28, 2001: p. 404–409.
38. V. Ramakrishnan, R.K.P., S.S. Bang, Improvement of concrete durability by bacterial mineral precipitation, in Proceedings of 11th International Conference on Fracture. 20–25 March 2005.
39. K.L. Bachmeier, A.E.W., J.R. Warmington, S.S. Bang, Urease activity in microbiologically-induced calcite precipitation. Journal of Biotechnology 9, 2002: p. 171–181.
40. H. Böttcher, U.S., M. Mertig, W. Pompe, Biocers: ceramics with incorporated microorganisms for biocatalytic, biosorptive and functional materials development. Journal of Materials Chemistry 14, 2004: p. 2176–2188.
41. W. De Muynck, D.D., N. De Belie, W. Verstraete, Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. Cement and Concrete Research 2008. **38**: p. 1005–1014.
42. SKOOG, H., NIEMAN, APXEΣ THΣ ENOPΓANHΣ ANAΛYΣHΣ. Εκδόσεις Κωσταράκη.
43. Klesel, J. Welcome to the world of scanning electron microscopy: <http://www-archive.mse.iastate.edu/microscopy/home.html>.
44. ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ: ΥΠΕΡΥΘΡΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ: [http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki\\_1/fasm\\_org/Chapter\\_3\\_4.pdf](http://www.chem.uoa.gr/courses/organiki_1/fasm_org/Chapter_3_4.pdf).
45. Ltd., M.I., Zetasizer Nano Series, User Manual. 2004.
46. Efthimiadou, E.K., Karaliota A., Psomas, G., Polyhedron 2008: p. 349–356.
47. STANDARDS, A.-I.P.W.L: [http://www.lgstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo\\_country=gr#357C3571006A4259B64650D34DF19048](http://www.lgstandards-atcc.org/products/all/CRL-1573.aspx?geo_country=gr#357C3571006A4259B64650D34DF19048).
48. Anastasis Karatzas, P.B., Ioannis A. Kartsonakis, George C. Kordas, Reversible spherical organic water microtraps. Journal of Non-Crystalline Solids, 2011.
49. Κώστας, Κ.Τ., ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΤΣΙΜΕΝΤΟΥ ΚΑΙ ΣΚΥΡΟΔΕΜΑΤΟΣ. Αθήνα, Μάιος 2010.
50. I.A. Kartsonakis, P.K., G.S.Pappas, G. Kordas, Photocatalytic action of cerium molybdate and iron-titanium oxide hollow nanospheres to escherichia coli.



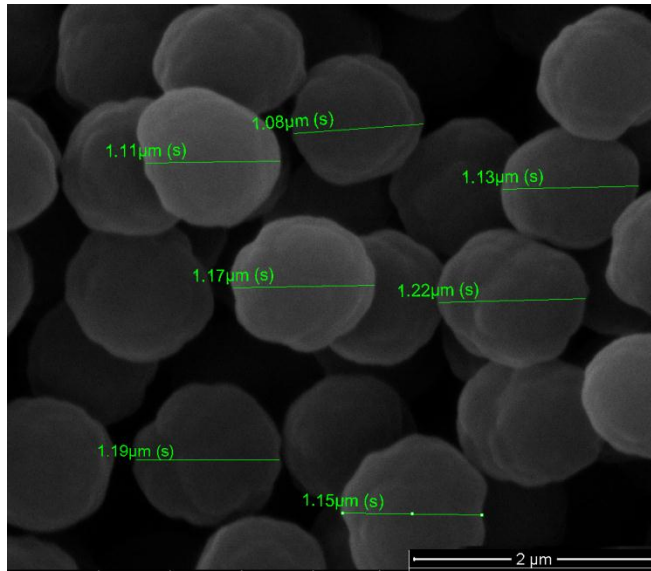
51. Qu Y, L.J., Yang K, Liang Z, Zhang L, Zhang Y, Boronic Acid functionalized core-shell polymer nanoparticles prepared by distillation precipitation polymerization for glycopeptide enrichment.
52. Bo Huang, F.B., Xin-lin Yang 杨新林, Wen-qiang Huang, Synthesis of monodisperse hollow polymer microspheres with functional groups by distillation precipitation polymerization. Chinese Journal of Polymer Science March 2010. **28**: p. 277-285
53. Feng Bai, B.H., Xinlin Yang, Wenqiang Huang, Synthesis of monodisperse poly(methacrylic acid) microspheres by distillation–precipitation polymerization. European Polymer Journal 43, 2007: p. 3923-3932.
54. xFeng Bai , X.Y., and Wenqiang Huang, Synthesis of Narrow or Monodisperse Poly(divinylbenzene) Microspheres by Distillation–Precipitation Polymerization.
55. Malvern, DYNAMIC LIGHT SCATTERING COMMON TERMS DEFINED. 2011
56. Aldona BEGANSKIENĖ, Valdas SIRUTKAITIS, and M.K. , Remigijus JUŠKĖNAS, Aivaras KAREIVA, FTIR, TEM and NMR Investigations of Stöber Silica Nanoparticles. MATERIALS SCIENCE. **10**.
57. I.A. Kartsonakis, P.L., I. Danilidis, D. Bouzarelou, G. Kordas, Synthesis, characterization and antibacterial action of hollow titania spheres. 2007.
58. Kelts, L.W.E., N.J.; Melpolder, S.M. J. , Non-Crystalline Solids. 1986: p., 353-374
59. Duan G, Z.C., Li A, Yang X, Lu L, Wang X Preparation and Characterization of Mesoporous Zirconia Made by Using a Poly (methyl methacrylate) Template. 2008.
60. Zhang, H. and X. Wang, Synthesis and properties of microencapsulated n-octadecane with polyurea shells containing different soft segments for heat energy storage and thermal regulation. Solar Energy Materials and Solar Cells, 2009. **93**(8): p. 1366-1376.
61. SOCRATES, G., INFRARED AND RAMAN CHARACTERISTIC GROUP FREQUENCIES-TABLES AND CHARTS, ed. T. EDITION. 2001.
62. Kenneth Todar, P. Nutrition and Growth of Bacteria: [http://textbookofbacteriology.net/nutgro\\_4.html](http://textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html).
63. Wiktor, V. and H.M. Jonkers, Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. Cement and Concrete Composites, 2011. **33**(7): p. 763-770.

# ***ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ***



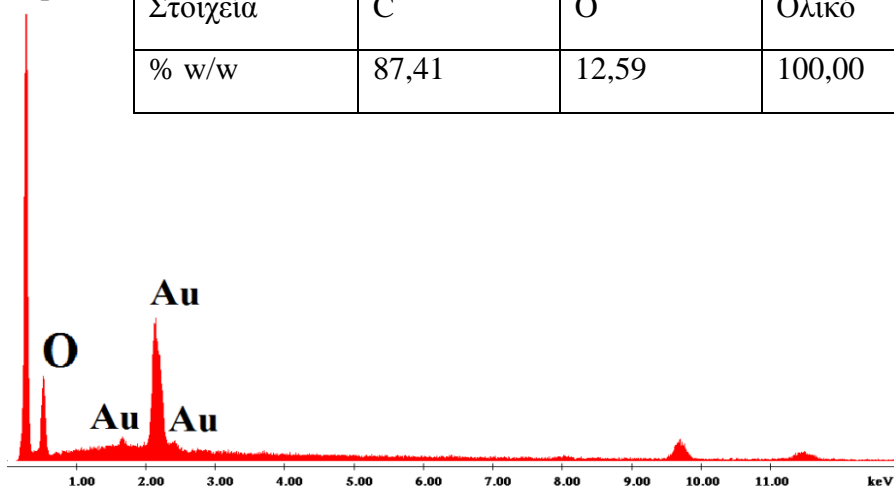
**Πίνακας i:** Ποσότητες αντιδραστηρίων για τη σύνθεση των παγίδων νερού.

| <b>Αντιδραστήρια</b> |  | <b>MW<br/>(gr mol<sup>-1</sup>)</b> | <b>Δείγμα 1</b> | <b>Δείγμα 2</b> | <b>Δείγμα 3</b> | <b>Δείγμα 4</b> |
|----------------------|--|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <b>Διαλύτης</b>      | Ακετονιτρίλιο                            | 41.05                               | 1500 ml         | 600 ml          | 600 ml          | 600 ml          |
| <b>Μονομερές</b>     | Μεθακρυλικό οξύ( <i>MAA</i> )            | 86.06                               | 32 ml           | 32 ml           | 24 ml           | 16 ml           |
| <b>Crosslinker</b>   | Ethylene dimethacrylate ( <i>EGDMA</i> ) | 198.22                              | 6 ml            | 4 ml            | 3 ml            | 2 ml            |
| <b>Απαρχητής</b>     | AIBN                                     | 164.21                              | 10,125 g        | 4,8 g           | 4,8 g           | 4,8 g           |

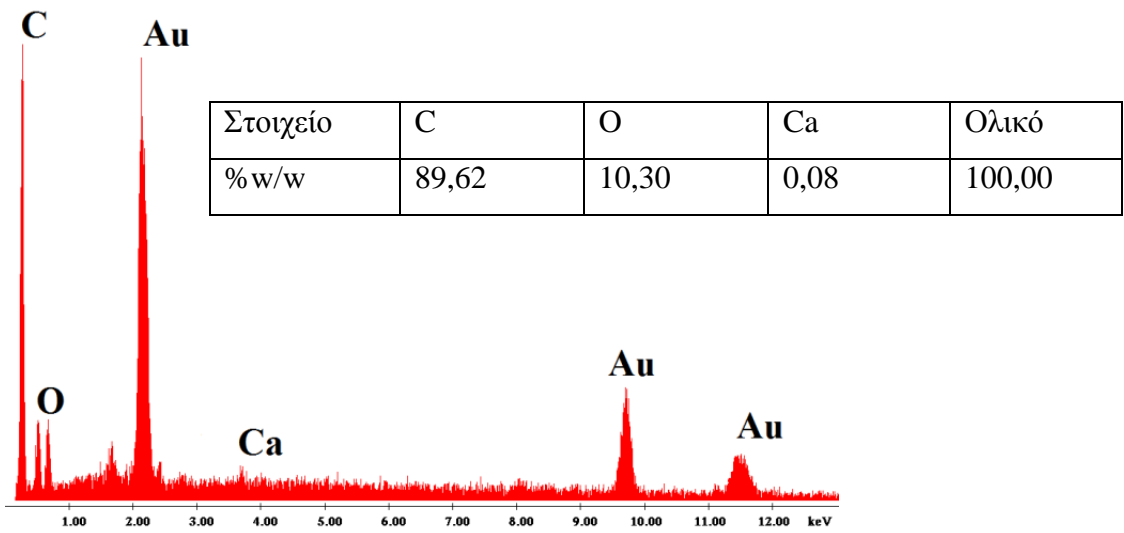
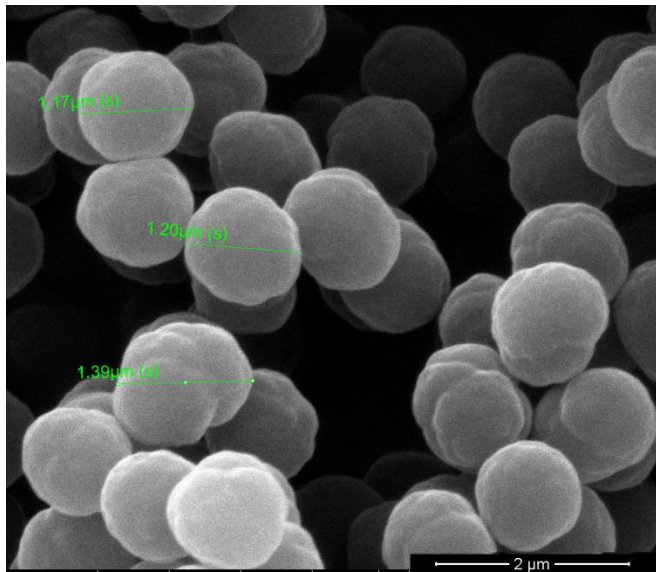


**C**

| Στοιχεία | C     | O     | Ολικό  |
|----------|-------|-------|--------|
| % w/w    | 87,41 | 12,59 | 100,00 |



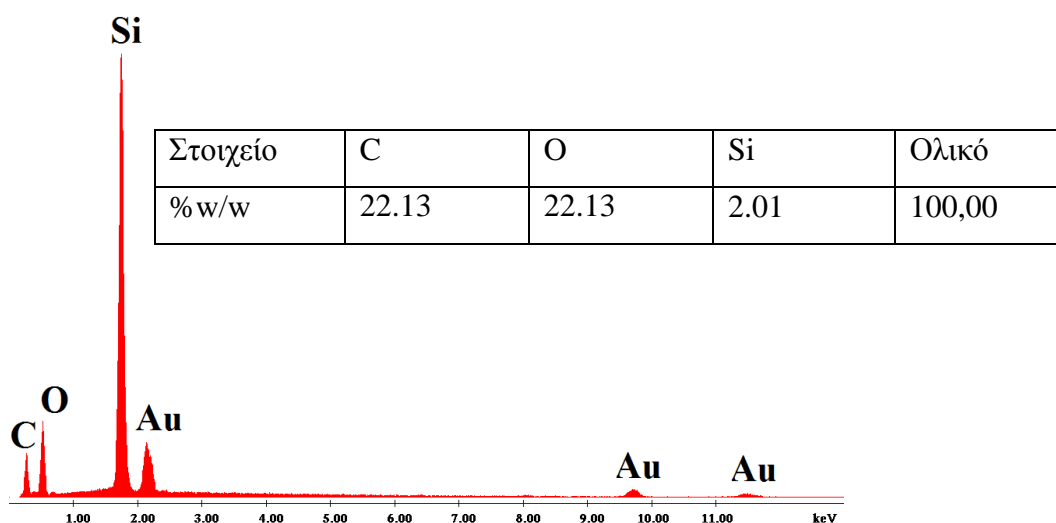
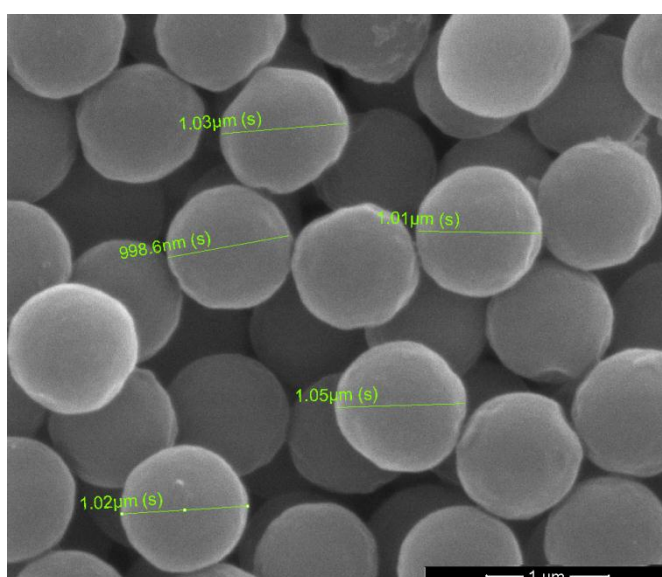
**Εικόνα i:** Εικόνα SEM, EDS ανάλυση του 2<sup>ου</sup> δείγματος πριν την τροποποίηση με Ca(OH)<sub>2</sub> καθώς και η %w/w του κάθε στοιχείου.



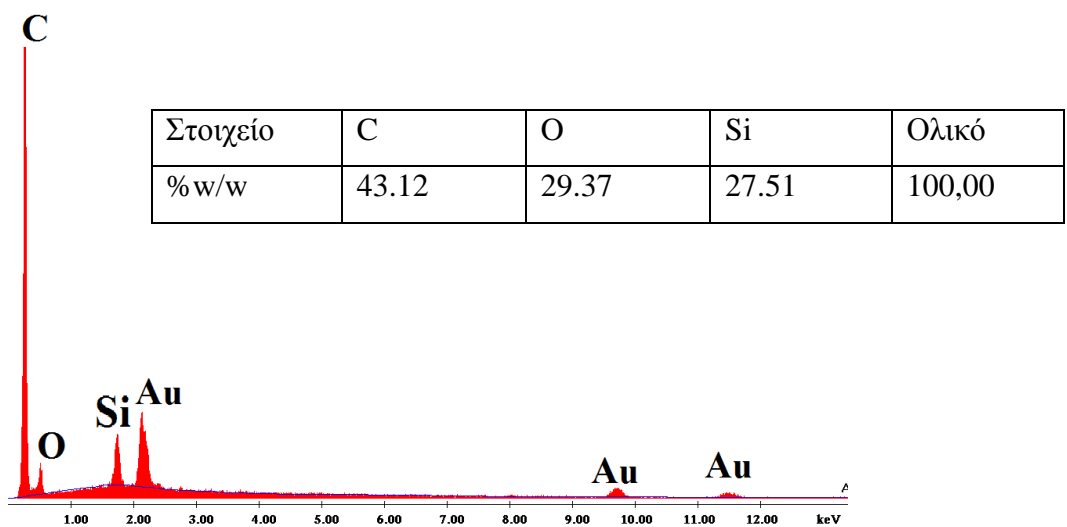
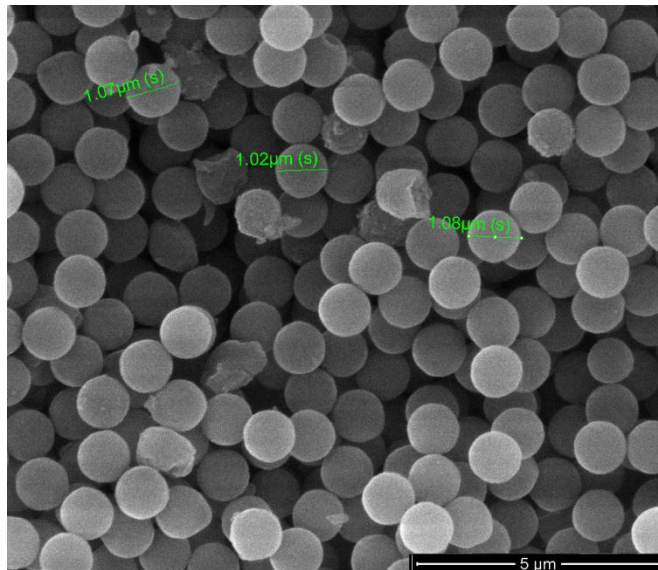
**Εικόνα ii:** Εικόνα SEM, EDS ανάλυση του 2<sup>ου</sup> δείγματος μετά την τροποποίηση με Ca(OH)<sub>2</sub> καθώς και η %w/w του κάθε στοιχείου.

**Πίνακας ii:** Ποσότητες αντιδραστηρίων για την σύνθεση τροποποιημένων παγίδων νερού με  $\text{Ca}(\text{OH})_2 @ \text{SiO}_2$ .

| Αντιδραστήρια                | Πείραμα (α) | Πείραμα (β) | Πείραμα (γ) | Πείραμα (δ) | Πείραμα (ε) | Πείραμα (στ) |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| Ακετονιτρίλιο                | 100 ml      | 100 ml      | 100 ml      | 100 ml      | 100 ml      | 100 ml       |
| $\text{NH}_3$                | 1 ml        | 1 ml        | 1 ml        | 1 ml        | 1 ml        | 1 ml         |
| TEOS                         | 6 ml        | 9 ml        | 12 ml       | 15 ml       | 18 ml       | 21 ml        |
| Τροποποιημένες παγίδες νερού | 0,5 g       | 0,5 g       | 0,5 g       | 0,5 g       | 0,5 g       | 0,5 g        |



**Εικόνα iii:** SEM δείγματος του (α) πειράματος (6 ml TEOS) και η αντίστοιχη EDS ανάλυση.



**Εικόνα iv:** SEM δείγματος του (δ) πειράματος (15ml TEOS) και η αντίστοιχη EDS ανάλυση.



**Πίνακας iii:** Πρώτη σειρά πειραμάτων με τις ποσότητες αντιδραστηρίων για την σύνθεση μικροδοχείων SiO<sub>2</sub> με τη μέθοδο sol-gel.

| Αντιδραστήρια         | Πείραμα 1 | Πείραμα 2 | Πείραμα 3 | Πείραμα 4 |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>EtOH</b>           | 100 ml    | 100 ml    | 100 ml    | 100 ml    |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | 11ml      | 11ml      | 11 ml     | 11 ml     |
| <b>NH<sub>3</sub></b> | 6ml       | 6ml       | 6ml       | 6ml       |
| <b>TEOS</b>           | 4ml       | 8ml       | 10 ml     | 12 ml     |

**Πίνακας iv:** Δεύτερη σειρά πειραμάτων με τις ποσότητες αντιδραστηρίων για την σύνθεση μικροδοχείων SiO<sub>2</sub> με τη μέθοδο sol-gel.

| Αντιδραστήρια         | Πείραμα 1 | Πείραμα 2 |
|-----------------------|-----------|-----------|
| <b>EtOH</b>           | 100 ml    | 200 ml    |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | 11 ml     | 22 ml     |
| <b>NH<sub>3</sub></b> | 6ml       | 6ml       |
| <b>TEOS</b>           | 10 ml     | 10 ml     |

**Πίνακας v:** Ποσότητες αντιδραστηρίων στην σειρά πειραμάτων που μεταβάλλεται η ποσότητα του διαλύτη για την σύνθεση μικροδοχείων PMMA.

| Αντιδραστήρια | 1 <sup>ο</sup> πείραμα | 2 <sup>ο</sup> πείραμα | 3 <sup>ο</sup> πείραμα |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>MMA</b>    | 4ml                    | 4ml                    | 4ml                    |
| <b>KPS</b>    | 40mg                   | 40m                    | 40mg                   |
| <b>Water</b>  | 20ml                   | 60ml                   | 100ml                  |

**Πίνακας vi:** Ποσότητες αντιδραστηρίων στην σειρά πειραμάτων που μεταβάλλεται η ποσότητα του μονομερούς για την σύνθεση μικροδοχείων PMMA.

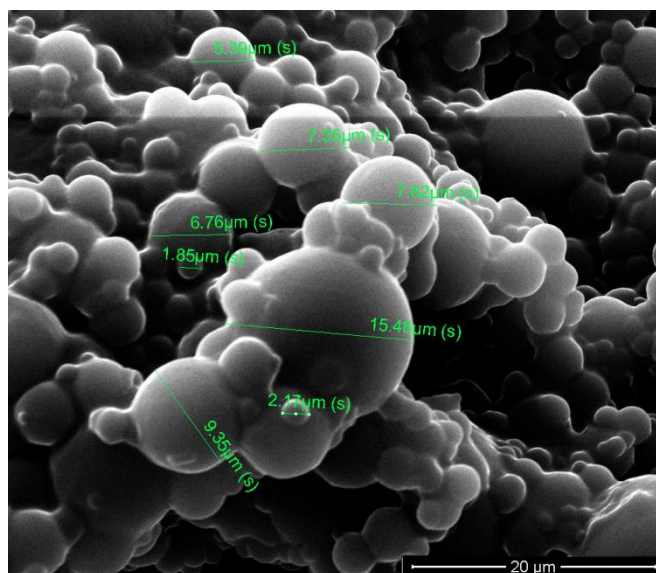
| Αντιδραστήρια | 1 <sup>ο</sup> πείραμα | 2 <sup>ο</sup> πείραμα | 3 <sup>ο</sup> πείραμα |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>MMA</b>    | 2ml                    | 4ml                    | 6ml                    |
| <b>KPS</b>    | 40mg                   | 40mg                   | 40mg                   |
| <b>Water</b>  | 30ml                   | 30ml                   | 30ml                   |

**Πίνακας vii:** Ποσότητες αντιδραστηρίων στην σειρά πειραμάτων που μεταβάλλεται η ποσότητα του απαρχητή για την σύνθεση μικροδοχείων PMMA.

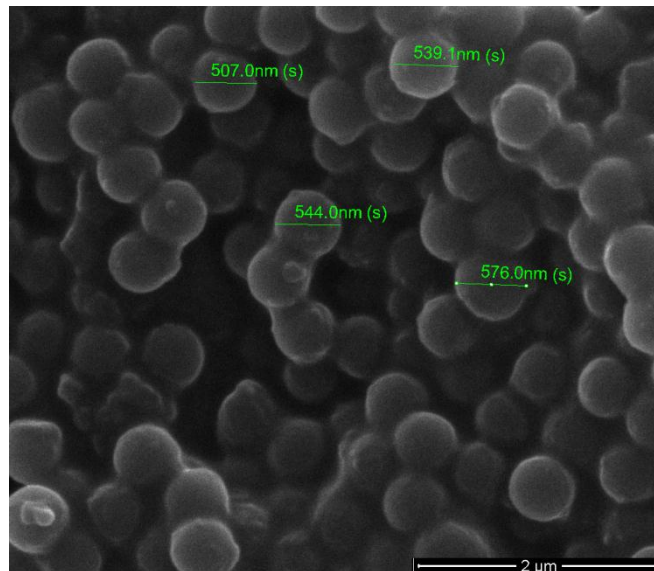
| Αντιδραστήρια | 1 <sup>ο</sup> πείραμα | 2 <sup>ο</sup> πείραμα | 3 <sup>ο</sup> πείραμα |
|---------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| <b>MMA</b>    | 4ml                    | 4ml                    | 4ml                    |
| <b>KPS</b>    | 20mg                   | 40mg                   | 60mg                   |
| <b>Water</b>  | 30ml                   | 30ml                   | 30ml                   |

**Πίνακας viii:** Ποσότητες αντιδραστηρίων για όλες τις σειρές πειραμάτων σχηματισμού μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας.

| Αντιδραστήρια             | 1 <sup>η</sup> σειρά πειραμάτων | 2 <sup>η</sup> σειρά πειραμάτων | 3 <sup>η</sup> σειρά πειραμάτων | 4 <sup>η</sup> σειρά πειραμάτων |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| TDI, g                    | 3,0                             | 3,0                             | 3,0                             | 3,0                             |
| EDA, g                    | 5,0                             | -                               | -                               | -                               |
| DETA, g                   | 5,0                             | 5,0                             | 5,0                             | 5,0                             |
| 1-Δεκαοκτένιο, g          | 9,0                             | 9,0                             | 9,0                             |                                 |
| Παραφίνη, g               | -                               | -                               | 9,0                             | 9,0                             |
| H <sub>2</sub> O, ml      | 50                              | 50                              | 50                              | 50                              |
| SDS, % w/w                | • 5<br>• 2,5                    | • 5<br>• 2,5                    | -                               | -                               |
| PEG, % w/w                | -                               | • 5<br>• 2,5                    | -                               | • 5<br>• 2,5<br>• 10<br>• 5     |
| PVP, % w/w                | -                               | • 5<br>• 2,5                    | -                               | -                               |
| Triton x-100, % w/w       | -                               | • 5<br>• 2,5                    | • 5<br>• 2,5                    | -                               |
| NH <sub>4</sub> Cl, % w/w | 5                               | 5                               | 5                               | 5                               |
| Ακετόνη, ml               | 5                               | 5                               | 5                               | 5                               |



**Εικόνα v:** Εικόνα SEM του δείγματος μικροδοχείων με κέλυφος πολυουρίας από την δεύτερη σειρά πειραμάτων, με γαλακτωματοποιητή το Triton x.



**Εικόνα vi:** Εικόνα SEM του δείγματος μικροδοχείων με κέλυφος πολουρίας από την τέταρτη σειρά πειραμάτων, με γαλακτωματοποιητή το PEG σε ποσότητα της πρώτης περίπτωσης.