



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Θέμα: «Μελέτη της επίδρασης τροποποιημένων
νανοσωματιδίων στην λειτουργία βιολογικών συστημάτων»

Νικολίνα Βούρβου

Φοιτήτρια Δ.Π.Μ.Σ. «Ιατρική Χημεία»



Επιβλέπων καθηγητής: Χαράλαμπος Σταμάτης

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Χαράλαμπος Σταμάτης, Καθηγητής

Πέτρος Καταπόδης, Επίκουρος Καθηγητής

Δημήτριος Γουρνής, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2016

*«Και έχει αποδειχθεί πως όταν το πρώτο
καθρέφτισμα στα μάτια της μάνας,
σου αντιγυρίζει μια εικόνα
εμπιστοσύνης, αγάπης, πίστης,
τότε τα βήματά σου στην ζωή
είναι σταθερά, δυνατά, επιτυχημένα.»*

Γιάννης Ρίτσος

*Αφιερωμένο στην μητέρα μου που
δεν «έφυγε» ποτέ...*

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού προγράμματος «Ιατρική Χημεία», στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά την χρονική περίοδο από το Μάρτιο του 2015 έως τον Ιούλιο του 2016. Η διεξαγωγή της πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του καθηγητή Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας, του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Χαράλαμπο Σταμάτη.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Χαράλαμπο Σταμάτη που με δέχθηκε στο εργαστήριό του και μου έδωσε την ευκαιρία να εκπαιδευτώ και να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου. Η βοήθειά του ήταν καθοριστικής σημασίας καθώς με υπομονή και συμπάρασταση με καθοδήγησε και συντέλεσε στην κατανόηση του αντικειμένου μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ακόμα τον κύριο Πέτρο Καταπόδη για τις επιπλέον γνώσεις που μου προσέφερε καθώς επίσης και για τις προσπάθειες να μου μεταλαμπαδεύσει τον κριτικό τρόπο σκέψης. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή «Χημείας Φυλλόμορφων Υλικών» του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Δημήτριο Γουρνή για την καθοδήγησή του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τους συνεργάτες από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών για το ευχάριστο και φιλικό περιβάλλον κατά την διάρκεια της συνεργασίας μας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κυρία Αγγελική Πολύδερα για την απεριόριστη στήριξη που μου προσέφερε καθώς επίσης και τους φίλους και συνεργάτες Αθηνά Παπαδοπούλου, Βασιλική-Μιχαέλα Πατίλα και Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου για την άριστη συνεργασία και στήριξή τους. Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους και συνεργάτες του εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών της Σχολής Θετικών Επιστημών του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, για την βοήθειά τους ώστε να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου στον τομέα της επιστήμης των υλικών αλλά και για το ευχάριστο περιβάλλον και την άψογη συνεργασία.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω την απεριόριστη ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την ψυχολογική υποστήριξη, την υπομονή και την βοήθειά τους κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας.

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
Abstract	iv
1.Εισαγωγή	0
1.1.Βακτήρια.....	1
1.1.1.Δομή Βακτηριακού Κυττάρου	4
1.1.2.Βακτηριακή ανάπτυξη.....	5
1.2.Ένζυμα	8
1.2.1.Συμπαράγοντες ενζύμων	8
1.3.Νανοϋλικά	9
1.3.1.Κατηγορίες Νανοϋλικών	9
1.3.2.Χρήσεις των νανοϋλικών.....	11
1.3.3.Κύρια χαρακτηριστικά για χρήση των Νανοϋλικών σε Βιολογικά συστήματα	11
1.3.4.Νανοϋλικά και καταστροφή των κυττάρων.....	13
1.3.5.Νανοϋλικά και Καρκίνος	14
1.3.6.Νανοβιοκατάλυση.....	18
1.3.7.Χρήση των νανοϋλικών ως Βιοαισθητήρες.....	19
1.3.8.Νανοϋλικά και αντιμικροβιακή δράση	23
1.4.Σκοπός της διπλωματικής εργασίας	27
2.Υλικά και Μέθοδοι	28
2.1.Βακτηριακά Στελέχη.....	29
2.1.1.BL21DE3.....	29
2.1.2.Brevibacterium	30
2.1.3. Corynebacterium	31
2.2.Ένζυμα	33
2.2.1.Horseradish peroxidase (HRP).....	33
2.2.2.Κυτόχρωμα C	34
2.2.3.Οξειδάση της Γλυκόζης	36
2.2.4.Καταλάση	37
2.2.5.Λακκάση	37
2.3.Νανοδομές	38
2.3.1.Γραφένιο.....	40

2.3.2.Φουλερένια	41
2.3.3.Άλλα Νανοϋλικά.....	42
2.3.4.Σύνθεση Γερμανανίου	43
2.4.Ενζυμικά Συστήματα	44
2.5.Προκαλλιέργειες	46
2.6.Πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης.....	46
2.7.Συσχέτιση βακτηριακού πληθυσμού με την απορρόφηση	46
2.8.Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης παρουσία Θρεπτικού Μέσου	47
2.9.Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης απουσία Θρεπτικού Μέσου	47
2.10.Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης μέσω υμενίων Γραφενίου	49
2.11.Αντιμικροβιακή δράση Γερμανανίου παρουσία αντιβιοτικού	50
3.Αποτελέσματα	51
3.1.Αντιμικροβιακή δράση νανοδομών	52
3.1.1.Πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών.....	52
3.1.2.Συσχέτιση απορρόφησης καλλιέργειας με βακτηριακό πληθυσμό	53
3.1.3.Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης παρουσία Θρεπτικού Μέσου (LB).....	54
3.1.4.Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης απουσία θρεπτικού μέσου (LB).....	62
3.1.5.Αντιμικροβιακή δράση υμενίων Γερμανανίου	76
3.1.6.Έλεγχος συνεργατικής δράσης Γερμανανίου και καναμυκίνης.....	80
3.2.Νανοβιοκατάλυση.....	84
HRP	84
Κυτόχρωμα C	85
Οξειδάση της Γλυκόζης	86
Καταλάση	87
Λακκάση	87
3.3.Συμπεράσματα	89
Συζήτηση	91
Βιβλιογραφία	93

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα βακτήρια αποτελούν μικροσκοπικούς μονοκύτταρους οργανισμούς οι οποίοι συναντώνται στο εσωτερικό άλλων οργανισμών όπως ο άνθρωπος αλλά και στο περιβάλλον. Παρά το μικρό τους μέγεθος έχουν μεγάλη σημασία και για αυτό χαρακτηρίζονται ως μικρά εργοστάσια παραγωγής μορίων και χρησιμοποιούνται ευρέως στο τομέα της Βιοτεχνολογίας. Ένα ακόμα σημαντικό εργαλείο στον τομέα της Βιοτεχνολογίας αποτελούν επίσης και τα ένζυμα. Τα ένζυμα είναι μόρια τα οποία καταλύουν σημαντικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο μεταβολισμό των οργανισμών και για αυτό ονομάζονται και βιοκαταλύτες. Αντίστοιχα στον τομέα της νανοτεχνολογίας τα νανοϋλικά αποτελούν μικροσκοπικές δομές της τάξης μεγέθους των nm με πολύ σημαντικές ιδιότητες οι οποίες τα καθιστούν εύχρηστα εργαλεία σε πολλές μελέτες. Λόγω του μικρού τους μεγέθους μπορούν να χρησιμοποιούνται στην μεταφορά μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων αλλά και σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι εχθρικά ως προς αυτά όπως συμβαίνει στην περίπτωση των βακτηρίων. Για τον λόγω αυτό στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε έλεγχος της αντιμικροβιακής δράσης μιας σειράς νανοδομών. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν προκύπτει πως σημαντική αντιμικροβιακή δράση ως προς τρία βακτηριακά στελέχη (BL21DE3, *Brevibacterium* και *Corynebacterium*) διαθέτουν το Γερμανάνιο, τα Κυβοειδή, το PLM-3, το SLM-2, η Αδαμαντιλαμίνη και το Βρωμιωμένο Φουλερένιο. Επιπλέον αντιμικροβιακή δράση έναντι του στελέχους *Brevibacterium* εμφανίζουν το MoS_2 καθώς επίσης και το SSLM ενώ αντίστοιχα του στελέχους *Corynebacterium* το φθωριωμένο Γραφένιο. Περεταίρω μελέτες έδειξαν πως το Γερμανάνιο εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση και σε μορφή υμενίων προκαλώντας αναστολή της ανάπτυξης σε ποσοστό 78% στο στέλεχος BL21DE3, 98% στο στέλεχος *Brevibacterium* και 61% στο στέλεχος *Corynebacterium*. Μετά τις παραπάνω μελέτες και στα πλαίσια βελτιστοποίησης της δράσης του Γερμανανίου ελέγχθηκε η πιθανή συνεργατική δράση του με το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Βρέθηκε όμως πως το Γερμανάνιο δεν εμφανίζει κάποια συνεργατική δράση παρουσία του αντιβιοτικού της καναμυκίνης. Μετά τον έλεγχο της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης των νανοδομών πραγματοποιήθηκε και μελέτη αυτών σε ενζυμικά συστήματα. Από τα αποτελέσματα που εξήχθησαν προέκυψε πως το οξείδιο του Γραφενίου μπορεί να πενταπλασιάζει την ταχύτητα με την οποία το Κυτόχρωμα C καταλύει την αντίδρασή του ενώ το Φουλερένιο να τριπλασιάζει την ταχύτητα του Κυτοχρώματος. Αντίθετα το Οξείδιο του Γραφενίου, το Φουλερένιο, το Γερμανάνιο και οι τροποποιήσεις αυτών αναστέλλουν πλήρως την αντίδραση που καταλύει το ένζυμο της Λακκάσης. Περεταίρω διερεύνηση της δράσης αυτών σχεδιάζεται για το μέλλον.

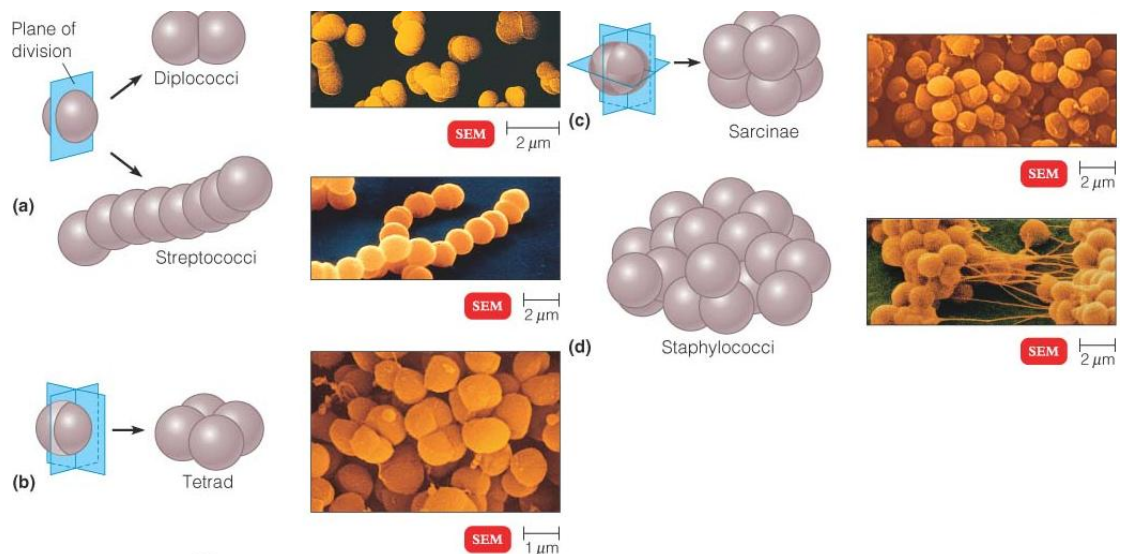
Abstract

Bacteria constitute a large domain of prokaryotic microorganisms. They are present in human and the environment too and they also characterized as “factories for molecule production” that is why they used widely in the field of Biotechnology. Also enzymes are very important molecules. Most enzymes are proteins, although a few of them are catalytic RNA molecules. It is known that they catalyze many biochemical reaction types. In the other hand, nanomaterials are objects or structures at a very small scale on the level of 100 nanometers or less, which have unique optical, electronic or mechanical properties. Due to these properties they used widely in biomedical applications like drug delivery and they also show antimicrobial properties against bacterial microorganisms. In this diploma thesis we study the potential antimicrobial activity of nanostructures. These nanostructures were tested in three bacterial strains: BL21DE3 which is Gram negative, Brevibacterium and Corynebacterium which they are Gram positive. From the results we summarize that Germanane, Cuboids, Adamantane, $C_{60}Br_{24}$, PLM-3 and SLM-2 are those nanostructures which exhibit antimicrobial activity against all bacterial strains. In addition MoS+Se₂ and SSLM nanostructures exhibit antimicrobial activity against Brevibacterium strain and Fluorographene against Corynebacterium strain. We also investigate the potential antimicrobial activity of Germanane films. The results show that Germanane films can surprisingly inhibit the growth of all bacterial strains. The growth inhibition rate is 78% for BL21DE3 strain, 98% for Brevibacterium strain and 61% for Corynebacterium strain. Because of these results an attempt was made to optimize the antimicrobial activity of Germanane. So we used antibiotic Kanamycin to investigate if there is a synergistic antimicrobial effect in the presence with Germanane. Unfortunately it seems like there is no any synergistic effect between Kanamycin and Germanane. We also investigate the potential effect of these nanomaterials in the action of enzymes. From the results we summarize that Graphene Oxide can quintupled the rate of reaction that catalyze the Cytochrome C while Fullerenol triples the rate of reaction. In the other hand Graphene Oxide, Fullerenol, Germanane and modifications of these nanomaterials, inhibit the reaction which is catalyzed by Laccase. Further investigation for the effects of these is planned for the future.

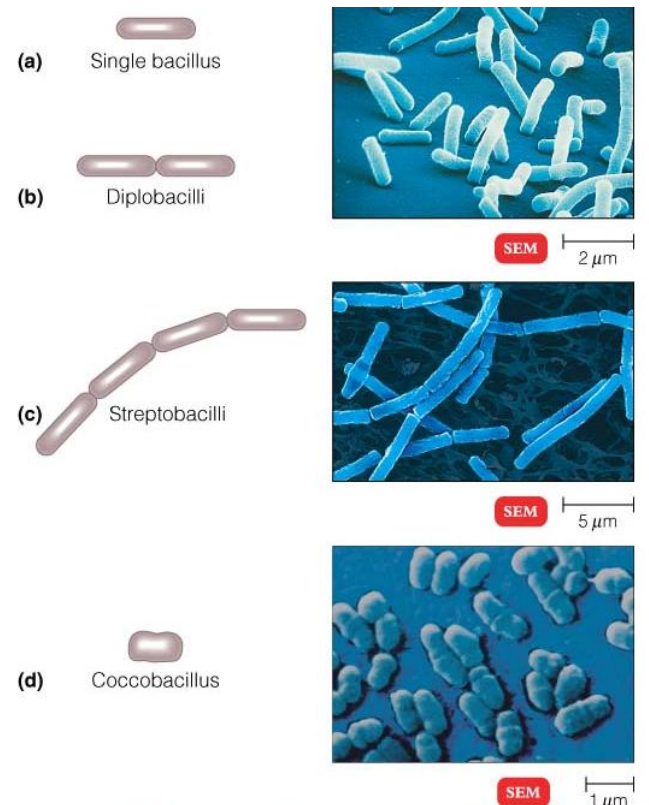
1.Εισαγωγή

1.1.Βακτήρια

Τα βακτήρια είναι πολύ μικροί οργανισμοί, συνήθως μονοκύτταροι, οι οποίοι αποτελούν τους μικρότερους οργανισμούς που υπάρχουν στον πλανήτη Γη, με εξαίρεση τους ιούς. Η πρώτη παρατήρηση των μικροοργανισμών αυτών έγινε από τον Anton van Leeuwenhoek μεταξύ του 1674 και 1723. Βρίσκονται στον αέρα, τα υγρά και τα στερεά στοιχεία όπως επίσης και στο εσωτερικό του σώματός μας καθώς και στο δέρμα μας. Συναντώνται σε πολύ μεγάλους αριθμούς όπως σε δισεκατομμύρια γόνιμου κηποχώματος ή σε εκατομμύρια σε μια σταγόνα σάλιου. Μερικά εξ αυτών είναι αυτότροφα και περιέχουν βακτηριοχλωροφύλλες και βακτηριοβιριδίνη εκτελώντας αναερόβια φωτοσύνθεση. Σήμερα τα βακτήρια κατατάσσονται στο βασίλειο των Προκαρυωτών και μπορούν να εμφανίζονται με διάφορα σχήματα όπως σφαιρικό (όπου χαρακτηρίζονται ως κόκκοι), ραβδοειδές (όπου χαρακτηρίζονται ως βάκιλοι) και σπειροειδές (όπου χαρακτηρίζονται ως σπειρίλια). Μια ακόμα διάκριση ανάλογα με το σχήμα τους είναι και οι καμπυλόγραμμες ράβδοι, όπου τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως δονάκια. Οι κόκκοι μπορεί μετά την κυτταρική διχοτόμηση για τον σχηματισμό τους να μένουν ενωμένοι μεταξύ τους και να σχηματίζουν διπλόκοκκους, στρεπτόκοκκους μέχρι και σταφυλόκοκκους (**εικόνα 1**). Αντίστοιχες ομάδες ανάλογα με την διχοτόμηση των βακτηριακών κυττάρων συναντώνται και στην κατηγορία των βάκιλων (**Εικόνα 2**).



Εικόνα 1: Απεικόνιση των βακτηριακών κόκκων που δημιουργούνται ανάλογα με την διχοτόμηση των βακτηριακών κυττάρων. (a) Diplococci όταν οι κόκκοι μένουν σε ομάδα των δυο και Streptococci όταν οι κόκκοι μένουν σε μορφή αλυσίδας (b) Tetrad όταν οι κόκκοι μένουν σε ομάδα των τεσσάρων (c) Sarcinae όταν οι κόκκοι μένουν σε ομάδα των οκτώ και (d) Staphylococci όταν οι κόκκοι μένουν σε ομάδες σχηματίζοντας φύλλα (Διαδικτυακή πηγή: <http://classes.midlandstech.edu>).



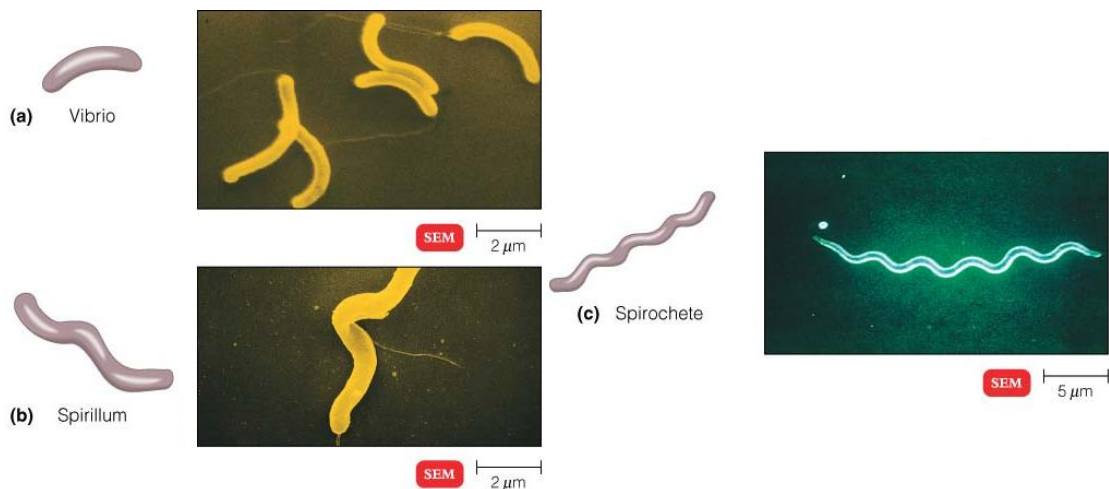
Εικόνα 2: Εικόνες μικροσκοπίου για τις διάφορες κατηγορίες βακίλων ανάλογα με την διχοτόμηση των βακτηριακών κυττάρων. (a) Οι περισσότεροι βάκιλοι εμφανίζονται ως μονή ράβδος (b) Οι διπλοβάκιλοι εμφανίζονται μετά την διχοτόμηση των κυττάρων ως ένα ζεύγος μονών βακίλων. (c) Οι Στρεπτοβάκιλοι εμφανίζονται ως αλυσίδα βάκίλων και τέλος (d) οι Κοκκοβάκιλοι είναι οι βάκιλοι εκείνοι που είναι κοντοί και πιο παχουλοί από τους κλασικούς βάκίλους με αποτέλεσμα να μοιάζουν με κόκκοι (Διαδικτυακή πηγή: <http://classes.midlandstech.edu>).

Σε ότι αφορά την κατηγορία των σπειροειδών βακτηρίων η κατηγοριοποίησή τους γίνεται ανάλογα με τον βαθμό της περιστροφής τους (**Εικόνα 3**) ενώ τέλος υπάρχουν και άλλες κατηγορίες βακτηρίων με διαφορετικές μορφολογίες από ότι οι συνηθισμένες όπως οι αστεροειδείς (**Εικόνα 4**).

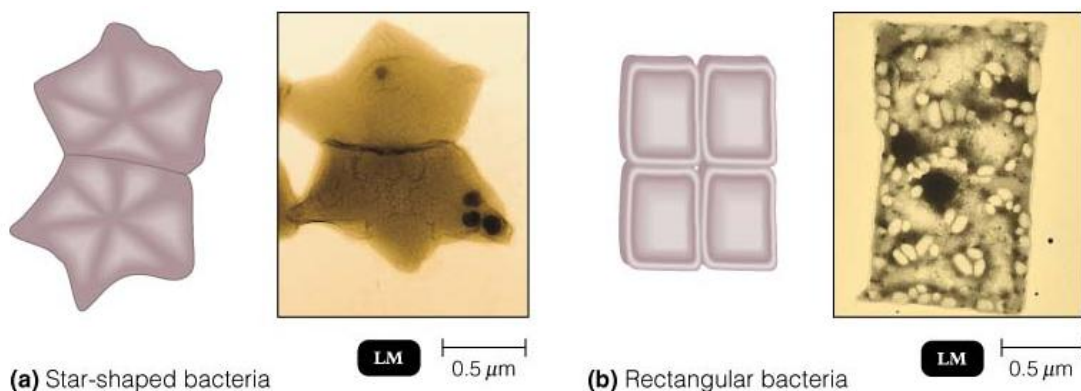
Ορισμένα από τα βακτήρια αυτά μένουν ακίνητα ενώ άλλα έχουν την ικανότητα να κινούνται, αναπτύσσοντας δομές όπως μαστίγια. Ανάλογα με την εμφάνιση των μαστιγίων αυτών τα βακτήρια μπορούν να διακρίνονται σε μονότριχα, που αποτελούν τα βακτήρια τα οποία διαθέτουν ένα μαστίγιο στο άκρο τους, τα περίτριχα, που αποτελούν τα βακτήρια όπου ολόκληρη η επιφάνειά τους επικαλύπτεται από μαστίγια και τέλος τα λοφότριχα, που αποτελούν τα βακτήρια που διαθέτουν έναν αριθμό μαστιγίων σε ένα τμήμα της επιφάνειάς τους ως θύσανος.

Επίσης τα Βακτήρια μπορούν να διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες τα «θετικά κατά Gram» αν η χρώση τους είναι κυανοϊώδης και τα «Αρνητικά κατά Gram» αν η χρώση τους είναι κόκκινη. Η χρώση κατά Gram αποτελεί μια μέθοδο προσθήκης διαλυμάτων Α (κρυσταλλοϊώδες σε οινόπνευμα) και Β (Lugol: υδατικό διάλυμα) και τέλος φουξίνης. Ο χρωματισμός των βακτηρίων εξαρτάται από τη σύσταση και τη στρωμάτωση του βακτηριακού τοιχώματος και αποτελεί ιδιότητα που συνδέεται με την διαφορετική

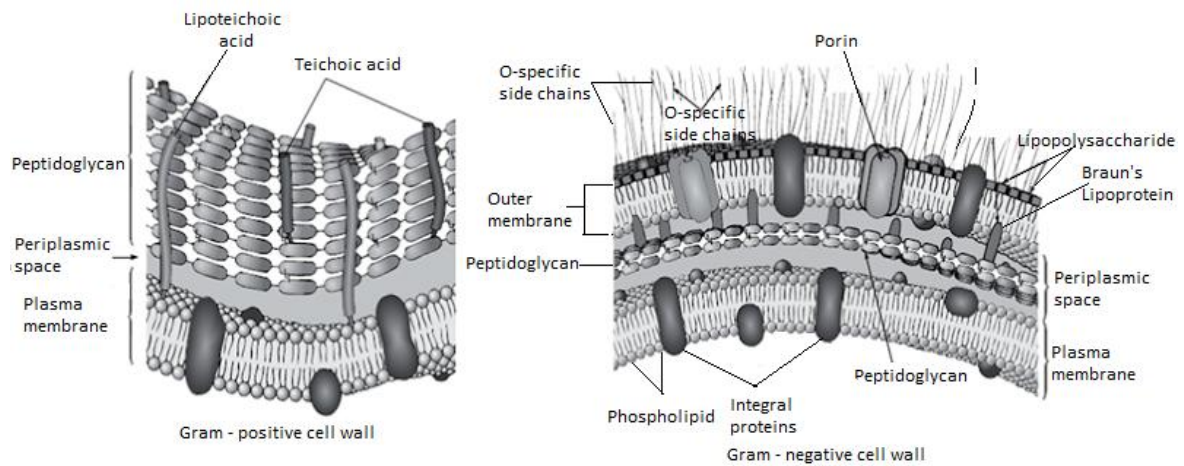
συμπεριφορά σε ότι αφορά την παθογένεια και την αντοχή σε αντιβιοτικά ή/και άλλους παράγοντες. Τα Gram θετικά βακτήρια διαθέτουν πλασματική μεμβράνη, παχύ στρώμα πεπτιδογλυκανών (περίπου 40 φύλλα) και έπειτα την βακτηριακή κάψουλα. Αντίστοιχα τα Gram αρνητικά βακτήρια διαθέτουν πλασματική μεμβράνη, λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκανών (1 έως 2 φύλλα), εξωτερική μεμβράνη, κάψουλα καθώς και τον περιπλασματικό χώρο, δηλαδή τον χώρο που παρεμβάλλεται μεταξύ της εσωτερικής και εξωτερικής μεμβράνης του βακτηρίου (**Εικόνα 5**). Η διαφορά στην χρώση των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων οφείλεται ιδιαίτερα στην ύπαρξη ή μη πεπτιδογλυκανών. Έτσι τα Gram θετικά βακτήρια διαθέτουν τοίχωμα υψηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη και χαμηλότερη σε λιπίδια για αυτό και το χρώμα τους είναι κυανοϊώδες.



Εικόνα 3: Εικόνες μικροσκοπίου των υποκατηγοριών των σπειροειδών βακτηρίων. (a) *Vibrio* που αποτελεί σπειροειδές βακτήριο που καμπυλώνει. (b) *Spirillum* που αποτελεί σπειροειδές βακτήριο που εμφανίζει μια μορφή έλικας και (c) *Spirochete* που αποτελεί σπειροειδές βακτήριο που διαθέτει ελικοειδής μορφή και ευέλικτους φορείς. Οι σπειροχάιτες έχουν την δυνατότητα να κινούνται με την βοήθεια μαστιγίων που καλύπτουν το ευέλικτο περίβλημά του (Διαδικτυακή πηγή: <http://classes.midlandstech.edu>).



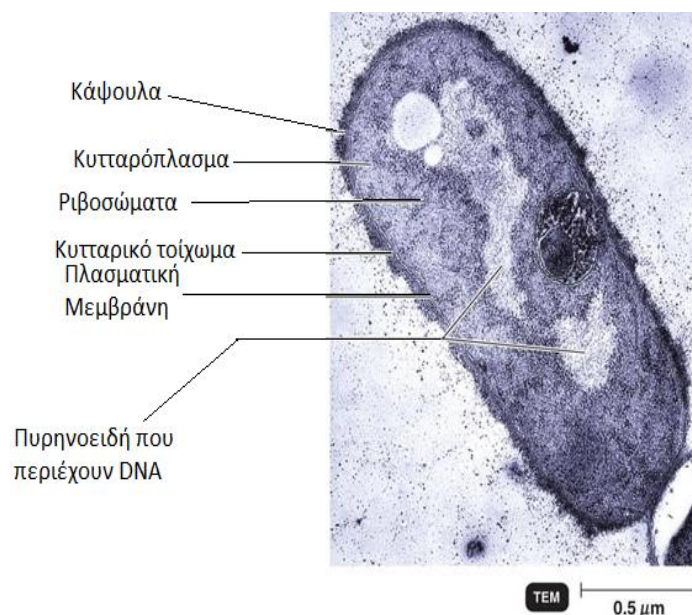
Εικόνα 4: Εικόνες μικροσκοπίου για την διαφορετική μορφολογία δυο βακτηρίων (a) *Stella* το οποίο εμφανίζει μια αστεροειδή μορφή και (b) *Haloarcula* το οποίο εμφανίζει μορφολογία ορθογώνιου (Διαδικτυακή πηγή: <http://classes.midlandstech.edu>).



Εικόνα 5: Διαφορές στην σύσταση των μεμβρανών μεταξύ των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια (αριστερά) διαθέτουν παχύ στρώμα πεπτιδογλυκανών και την πλασματική μεμβράνη σε αντίθεση με τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια (δεξιά), τα οποία διαθέτουν την εσωτερική και εξωτερική μεμβράνη, οι οποίες διαχωρίζονται από τον περιπλασματικό χώρο και ένα λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκανών.

1.1.1. Δομή Βακτηριακού Κυττάρου

Κάθε βακτήριο τυπικά αποτελείται από μια κάψουλα που καλύπτει εξωτερικά τον οργανισμό και αποτελεί ένα ζελατινώδη περίβλημα πολυσακχαριτών και/ή πολυπετιδίων. Η ακριβής σύστασή της διαφέρει από οργανισμό σε οργανισμό και ο κύριος ρόλος της είναι η δόμηση της εξωτερικής επιφάνειας του κυττάρου, η προστασία του οργανισμού από αφυδάτωση και η παροχή θρεπτικών συστατικών στον μικροοργανισμό. Προς το εσωτερικό της κάψουλας αυτής βρίσκονται το κυτταρικό τοίχωμα και η πλασματική μεμβράνη, η οποία με την σειρά της περιβάλλει το κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα διάχυτα βρίσκονται πλήθος ριβοσωμάτων, ενδοσωμάτων και ορισμένα βακτήρια μπορούν να περιέχουν και διάφορα πλασμίδια. Τέλος στο κυτταρόπλασμα υπάρχει επίσης και πυρηνοειδείς σχηματισμοί που περιέχουν το γενετικό υλικό του κυττάρου (**Εικόνα 6**).



Εικόνα 6: Τυπική δομή ενός βακτηριακού κυττάρου. Αποτελείται από την κάψουλα που περικλείει το κυτταρικό τοίχωμα καθώς επίσης και την πλασματική μεμβράνη, τα οποία με την σειρά τους περικλείουν το κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα διάχυτα βρίσκονται τα ριβοσώματα, και πυρηνοειδή που περιέχουν DNA. Όσα βακτήρια περιέχουν και πλασμίδια, βρίσκονται και αυτά στο κυτταρόπλασμα.

1.1.2.Βακτηριακή ανάπτυξη

Ένα βακτηριακό στέλεχος όταν βρεθεί σε περιβάλλον το οποίο διαθέτει τις απαραίτητες συνθήκες ανάπτυξής του, μπορεί να αναπτύσσεται με γρήγορους ρυθμούς. Στο ερευνητικό εργαστήριο συχνά δημιουργείται η ανάγκη ανάπτυξης ορισμένων βακτηρίων καθώς τα βακτήρια είναι πολύ χρήσιμα εργαλεία σε πολλούς τομείς της επιστήμης όπως της Γενετικής, της Μικροβιολογίας και της Βιοτεχνολογίας. Έτσι υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης των μικροοργανισμών αυτών σε θρεπτικά μέσα ανάλογα με τις ενεργειακές απαιτήσεις του εκάστοτε βακτηρίου. Τα θρεπτικά υλικά χαρακτηρίζονται από την επιλεκτικότητά τους και από το αν είναι διαφοροποιημένα. Η επιλεκτικότητα ενός θρεπτικού υλικού εξασφαλίζει την επιβίωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων της καλλιέργειας με ορισμένες ιδιότητες, όπως είναι η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και η ικανότητα σύνθεσης ενός συγκεκριμένου μεταβολίτη. Ως διαφοροποιημένο χαρακτηρίζεται ένα θρεπτικό υλικό όταν μπορεί να διακρίνει ένα είδος μικροοργανισμού από ένα άλλο, όταν αυτά αναπτύσσονται στο ίδιο μέσο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι το μέσο χρησιμοποιεί τα βιοχημικά χαρακτηριστικά ενός μικροοργανισμού που αυξάνεται παρουσία συγκεκριμένων θρεπτικών συστατικών ή δεικτών. Αυτός ο τύπος μέσων καλλιέργειας χρησιμοποιείται για την ανίχνευση μικροοργανισμών και ανίχνευση ανασυνδυασμένων στελεχών βακτηρίων.

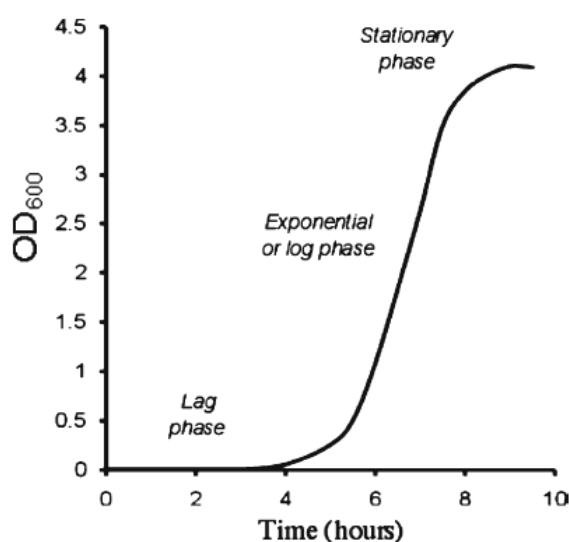
Όταν η ανάπτυξη πραγματοποιείται σε στερεό θρεπτικό μέσο τότε παρατηρείται ο σχηματισμός πολυάριθμων αποικιών. Οι αποικίες αυτές αποτελούν συναθροίσεις βακτηρίων και μπορούν να περιέχουν χιλιάδες βακτήρια κάθε μια από αυτές. Ανάλογα με το είδος του βακτηρίου το οποίο αναπτύσσεται η μορφολογία των αποικιών αυτών μπορεί να διαφέρει σε μέγεθος και σχήμα. Όταν η ανάπτυξη των μικροοργανισμών αυτών γίνεται σε υγρή καλλιέργεια δεν παρατηρούνται οι αποικίες αυτές αλλά το διαυγές θρεπτικό μέσο σταδιακά θολώνει ως αποτέλεσμα της βακτηριακής ανάπτυξης.

Η βακτηριακή ανάπτυξη αποτελείται από ορισμένες φάσεις. Οι φάσεις αυτές είναι **(Εικόνα 7)**:

1. Η Λανθάνουσα φάση
2. Η Εκθετική φάση
3. Η Στατική φάση
4. Η Φάση θανάτου

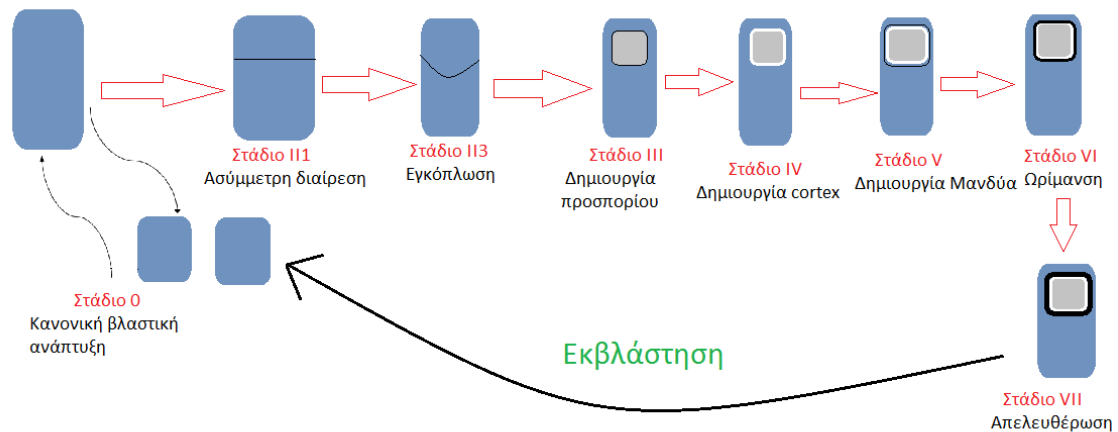
Η Λανθάνουσα φάση αποτελεί την φάση στην οποία ο μικροοργανισμός δεν αναπτύσσεται αλλά προσπαθεί να εγκλιματιστεί στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Κατά την εκθετική φάση μετά την προσαρμογή των βακτηρίων στο περιβάλλον και λόγω του πλήθους των θρεπτικών στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται, αρχίζουν να αναπτύσσονται εκθετικά και ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνεται κατά το μέγιστο. Περνώντας στην στατική φάση ο βακτηριακός πληθυσμός τείνει να σταθεροποιείται πλέον και τα βακτήρια δεν αναπτύσσονται όπως στην προηγούμενη φάση εκθετικά. Αυτό αποτελεί απόρροια της κατανάλωσης των θρεπτικών υλικών (εφόσον δεν πραγματοποιείται ανανέωση του μέσου) αλλά και λόγω των τοξινών που κάθε βακτήριο εκκρίνει κατά την ανάπτυξή του. Ένας άλλος

σημαντικός λόγος που η βακτηριακή ανάπτυξη σχεδόν σταματά στην φάση αυτή, είναι η έλλειψη χώρου για το κάθε βακτήριο καθώς ο πληθυσμός τους έχει αυξηθεί υπερβολικά. Τα βακτήρια διαθέτουν την λεγόμενη αίσθηση απαρτίας ή αίσθηση μεγέθους του πληθυσμού. Με τον όρο αυτό αναφερόμαστε σε ρυθμιστικές οδούς των βακτηρίων που ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα τα οποία προέρχονται από την πυκνότητα του μικροβιακού πληθυσμού. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω μορίων που αντιπροσωπεύουν για τα κύτταρα σήματα τα οποία τους επιτρέπουν να «συνομιλούν» μεταξύ τους με σκοπό πρώτον να κάνουν αισθητή την παρουσία τους στα άλλα κύτταρα και δεύτερον να πληροφορηθούν για το πλήθος των άλλων κυττάρων. Η τελική φάση είναι αυτή του θανάτου όπου τα βακτήρια λόγω των προαναφερθέντων συνθηκών οδηγούνται στο θάνατο.



Εικόνα 7: Απεικόνιση των φάσεων της βακτηριακής ανάπτυξης μετρώντας την απορρόφηση υγρής καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600nm και σε χρονικό διάστημα 10 ωρών (Victoria Murray et al, 2012).

Πολλά βακτήρια όμως όταν βρεθούν σε συνθήκες πείνας πραγματοποιούν την λεγόμενη ενδοσπορίωση. Η ενδοσπορίωση αποτελεί παράδειγμα κυτταρικής διαφοροποίησης σε βακτήρια. Χαρακτηριστικό παράδειγμα βακτηρίου που πραγματοποιεί ενδοσπορίωση είναι ο βάκιλλος *Bacillus Subtilis*. Η διαδικασία της ενδοσπορίωσης ξεκινά με το να βρεθούν οι μικροοργανισμοί σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Αμέσως τα κύτταρα προχωρούν στον σχηματισμό σπορίων τα οποία βρίσκονται από μεταβολικής κατάστασης σε συνθήκες νάρκης και τα οποία προκύπτουν από ασύμμετρη διαίρεση που παράγει δύο τύπους κυττάρων με διαφορετική μορφολογία (**Εικόνα 8**). Τα σπόρια αυτά είναι πολύ ανθεκτικά σε περιβαλλοντικές πιέσεις και η αναγέννησή τους σε βλαστικά κύτταρα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως.



Εικόνα 8: Σκιαγραφική απεικόνιση των σταδίων της ενδοσπορίωσης, ως απόκριση του μικροοργανισμού σε συνθήκες πείνας και υψηλών πιέσεων.

Υπάρχουν όμως και τα βακτήρια τα οποία φυσιολογικά ζουν και αναπτύσσονται σε ακραίες συνθήκες διαβίωσης συγκριτικά με τις ιδανικές συνθήκες για την διαβίωση του ανθρώπου. Τα βακτήρια αυτά ονομάζονται ακραιόφιλα και καταφέρνουν να επιβιώνουν παράγοντας ένζυμα τα οποία μπορούν να δρουν σε αυτές τις ακραίες συνθήκες. Τα βακτήρια αυτά έχουν τραβήξει την προσοχή των ερευνητών καθώς καταφέρνουν και επιβιώνουν σε ακραίες συνθήκες και έτσι παρουσιάζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον από γενετικής πλευράς άρα και βιοτεχνολογικής αξιοποίησης. Επίσης αποτελούν το έναυσμα της μελέτης για τη ζωή σε άλλους πλανήτες καθώς οι συνθήκες ανάπτυξής τους επικρατούσαν πριν από χιλιάδες χρόνια στην Γη και επικρατούν και σήμερα σε συγκεκριμένες περιοχές του πλανήτη αλλά επικρατούν κυρίως και σε άλλους πλανήτες. Πολλοί από τους ακραιόφιλους μικροοργανισμούς είναι βακτήρια, ευβακτήρια, αρχαιοβακτήρια υπάρχουν όμως και ευκαρυωτικοί ακραιόφιλοι μικροοργανισμοί. Οι κύριες κατηγορίες των ακραιόφιλων είναι:

1. Θερμόφιλα και Υπέρθερμόφιλα
2. Ψυχρόφιλα και Υπέρψυχρόφιλα
3. Οξεόφιλα
4. Βασεόφιλα ή αλκαλόφιλα
5. Μέτρια αλόφιλα και υπέρ-αλόφιλα

1.2. Ένζυμα

Τα ένζυμα όπως γνωρίζουμε αποτελούν μια οικογένεια μεγάλου μεγέθους πρωτεϊνών ($MW = 10^4 - 10^6$) οι οποίες συντίθενται από οργανισμούς και καταλύουν βιολογικές αντιδράσεις για αυτό ονομάζονται βιοκαταλύτες. Βρίσκονται υπό την μορφή διαλύματος στο εσωτερικό αλλά και εξωτερικό του κυττάρου ενώ άλλα βρίσκονται προσηλωμένα σε μεμβράνες. Τα ένζυμα παράγονται ή καταστρέφονται από τα κύτταρα ανάλογα με τις ανάγκες τους. Επιταχύνουν έτσι τις χημικές αντιδράσεις χωρίς ωστόσο να συμμετέχουν στα αντιδρώντα αυτής ή να υποστούν κάποια δομική αλλοίωση. Σε σχέση με άλλους κοινούς καταλύτες εμφανίζουν εξειδίκευση, καθώς καταλύουν συνήθως μια και μόνο αντίδραση αναγνωρίζοντας ένα μοναδικό υπόστρωμα το οποίο προσδέτετε στο ενεργό κέντρο του ενζύμου με μια σχέση «κλειδιού – κλειδαριάς».

Τα περισσότερα ένζυμα δρουν επιταχύνοντας την αντίδραση εκατομμύρια φορές σε σχέση με την ταχύτητά της χωρίς αυτά. Όπως και οι περισσότεροι καταλύτες έτσι και αυτά λειτουργούν αυξομειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης που καταλύουν. Οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν μια ενζυμική αντίδραση είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος, η θερμοκρασία, το pH και η ύπαρξη παρεμποδιστών που μπορεί να είναι χημικές ενώσεις ή ιόντα που η παρουσία τους εμποδίζει την δράση των ενζύμων.

1.2.1. Συμπαράγοντες ενζύμων

Πολλά ένζυμα για να λειτουργήσουν απαιτούν την ύπαρξη και κάποιας άλλης χημικής ένωσης ή κάποιου στοιχείου που ονομάζεται συμπαράγοντας. Πρόκειται για μη πρωτεϊνικά μόρια, οργανικά ή ανόργανα που είναι απαραίτητα για την λειτουργία του ενζύμου. Το σύμπλοκο ενζύμου – συμπαράγοντα ονομάζεται ολοένζυμο. Συμπαράγοντες των ενζύμων μπορούν να είναι οι εξής:

- Ανόργανα Ιόντα: Ενεργοποίηση αμυλάσης του σάλιου με ιόντα χλωρίου
- Προσθετικές ομάδες, οι οποίες είναι μη πρωτεϊνικά οργανικά μόρια που αποτελούν τμήμα του ενζύμου: Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (FAD) περιέχει την ριφοβλαβίνη που σχετίζεται με την μεταφορά του υδρογόνου κατά την κυτταρική αναπνοή.
- Συνένζυμα: Οργανικοί συμπαράγοντες που δεν αποτελούν τμήμα του ενζύμου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν το ATP, το συνένζυμο A, NAD, NADP και οι περισσότερες βιταμίνες είναι συνένζυμα.

1.3.Νανοϋλικά

Το 1950 παρατηρήθηκε για πρώτη φορά ο σχεδιασμός μικρών δομών, ανάλογων σε μέγεθος των βιολογικών μορίων (Feynman RP, 1960). Στα χρόνια που ακολούθησαν, σημαντικές μελέτες πραγματοποιήθηκαν έτσι ώστε να είναι δυνατή η απεικόνιση καθώς και ο χειρισμός αυτών των μικρών σωματιδίων (Binning G. , 1982, 1986; Bramley DA, 2001). Τα μικρά αυτά σωματίδια ονομάστηκαν νανοϋλικά καθώς τα κύρια συστατικά αυτών έχουν διαστάσεις μεταξύ ενός και εκατό δισεκατομμυριοστών του μέτρου (1-100nm) (European Commission 2011). Σε αυτήν την κλίμακα οι φυσικοχημικές καθώς και οι βιολογικές ιδιότητες των υλικών αυτών διαφέρουν ριζικά. Έτσι αρχικά υπήρχε η αντίληψη ότι τα νανοϋλικά ήταν βιολογικά αδρανή. Αργότερα όμως διάφορες βιβλιογραφικές αναφορές επεσήμαναν την τοξικότητά τους και τον πιθανό κίνδυνο κατά την ευρεία χρήση τους. Αποτελέσματα που εξήχθησαν από το πεδίο της τοξικολογίας επιβεβαιώνουν ότι η χρήση ορισμένων νανοϋλικών έχει ως αποτέλεσμα ένα ευρύ φάσμα επιβλαβών επιπτώσεων (Oberdoster G. et al, 2012 ; Gangmal S. et al,2011). Οι επιβλαβείς αυτές επιπτώσεις, στις περισσότερες περιπτώσεις οφείλονται στην αυξημένη παραγωγή ROS (Reactive Oxygen Species), η οποία με την σειρά της οδηγεί σε οξειδωτικό στρες που μπορεί να πυροδοτήσει διάφορες προφλεγμονώδεις απαντήσεις του οργανισμού (Nel A. et al, 2006 ; Xia T. et al, 2009 ; Petersen E.J. et al, 2010 ; Shvedova A. et al, 2010, 2012 ; Orrenius S. et al, 2011 ; Horie M. et al, 2012).

Παρά τις ενδείξεις για την πιθανή τοξικότητά τους διάφορα βιολογικά συστήματα διαθέτουν ορισμένα φυσικά και λειτουργικά νανοϋλικά. Τέτοια παραδείγματα αποτελούν η δομή των τρηματοφόρων (κυρίως η κιμωλία), η δομή του καψιδίου ορισμένων ιών, οι κρύσταλλοι κεριού που καλύπτουν ένα είδος λωτού καθώς και τα φύλλα του φυτού νεροκάρδαμου (Phys. Org. 2013), το μετάξι της αράχνης, το δέρμα, τα νύχια, τα ράμφη ακόμα και η μήτρα των ανθρώπινων οστών αποτελούν όλα φυσικά οργανικά νανοϋλικά. Αντίστοιχα πολλά ανόργανα νανοϋλικά έχουν προκύψει από τις διάφορες μεταβολές των χημικών συνθηκών στο φλοιό της γης. Για παράδειγμα η ανισοτροπία της κρυσταλλικής δομής του αργίλου σε συνδυασμό με μια ηφαιστειακή δραστηριότητα μπορεί να οδηγήσει στον σχηματισμό οπάλιου, μιας ενυδατωμένης άμορφης δομής διοξειδίου του πυριτίου.

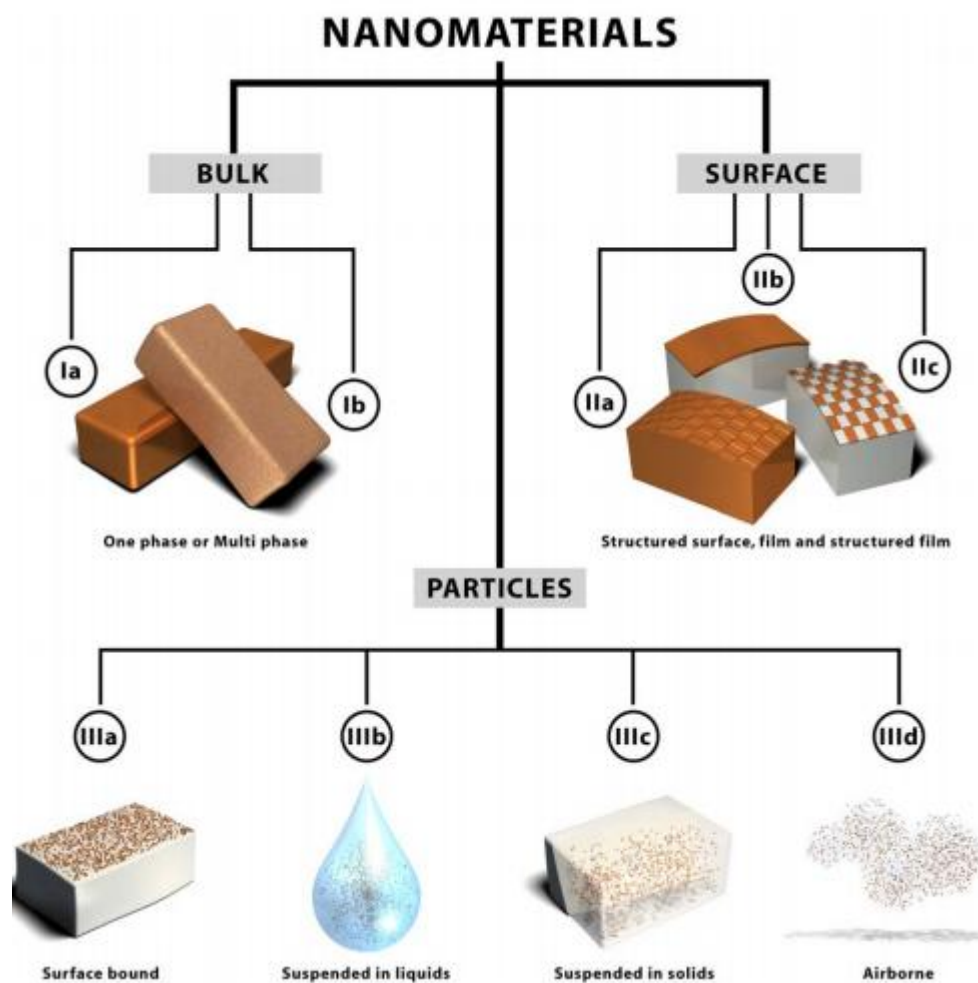
1.3.1.Κατηγορίες Νανοϋλικών

Τα νανοϋλικά μπορούν να διακρίνονται σε επιφάνειες, σωματίδια αλλά και συμπαγή υλικά. Η κατηγορία των επιφανειών περιλαμβάνει δομημένες επιφάνειες και δομημένες ή μη μεμβράνες. Οι δομημένες αυτές μεμβράνες μπορεί να έχουν αυξημένο πάχος εν συγκρίσει με αυτό της νανοκλίμακας ενώ άλλες εντός των ορίων της νανοκλίμακας. Αντίστοιχα τα σωματίδια μπορούν είτε να βρίσκονται δεσμευμένα σε κάποια επιφάνεια, είτε αιωρούμενα σε υγρά, είτε αιωρούμενα σε στερεά, είτε διάχυτα στον αέρα (αερομεταφερόμενα) (Εικόνα 9). Τέλος τα συμπαγή νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κατηγορίες: τα Μονοφασικά, όπως για παράδειγμα οι νανοκρυσταλλικές δομές χαλκού και στα Πολυφασικά, όπως οι κεραμικοί ζεόλιθοι αλλά και συμπολυμερή δυο συστάδων.

Επίσης τα νανοϋλικά μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες όπως για παράδειγμα σε εκείνα με βάση τον άνθρακα, σε εκείνα με βάση τα δενδριμερή και τέλος σε

εκείνα με βάση τα συνθετικά υλικά. Ακόμη ένας τύπος ταξινόμησης σχετικά με την μορφολογία τους είναι σε:

1. Νανοδομάτια
2. Νανοϊνες και νανοσωλήνες
3. Νανο-φίλμ
4. Νάνο-μπλοκ
5. Κράματα νανοκρυστάλλων
6. Νανοδομημένα
7. Στερεούς νανοκρυστάλλους



Εικόνα 9: Σχηματική απεικόνιση των διαφορετικών κατηγοριών νανοϋλικών.

Σε ότι αφορά τα νανοδομάτια, πρόκειται για πολύ μικρού μεγέθους υλικά που διατίθενται ως μαγνητικά υλικά καταγραφής υψηλής απόδοσης, ως ρευστά μαγνητικά υλικά, ως υλικά ανθεκτικά στην ακτινοβολία καθώς επίσης και ως υλικά μπαταριών. Στην κατηγορία των νανοσωλήνων ανήκουν υλικά της τάξης μεγέθους των νανομέτρων (nm) και είναι μακρόστενα γραμμικά υλικά όπως οι μικροί αγωγοί, οι μικροϊνες και άλλα οπτικά υλικά. Τα νανοφίλμ χρησιμοποιούνται κυρίως στην κατάλυση αερίων ενώ τα νάνο-μπλοκ

είναι υλικά που προκύπτουν από νανοσωματίδια υψηλής ακρίβειας σχηματισμού ή από νανοσωματίδια ελεγχόμενης κρυστάλλωσης. Αντίστοιχα τα κράματα νανοκρυστάλλων αποτελούνται από κόκκους διαμέτρου από 1 έως 50nm, ενώ τα νανοσυνθετικά είναι υλικά που διαθέτουν ενισχύσεις νανοκλίμακας αντί για τα συμβατικά σωματίδια και ίνες. Τέλος οι στερεοί νανοκρύσταλλοι είναι πολυκρύσταλλοι το μέγεθος των οποίων είναι 1-10nm, έτσι ώστε το 50% ή και περισσότερο της δομής να αποτελείται από εγγενή διεπαφή μεταξύ κρυστάλλων διαφορετικού προσανατολισμού.

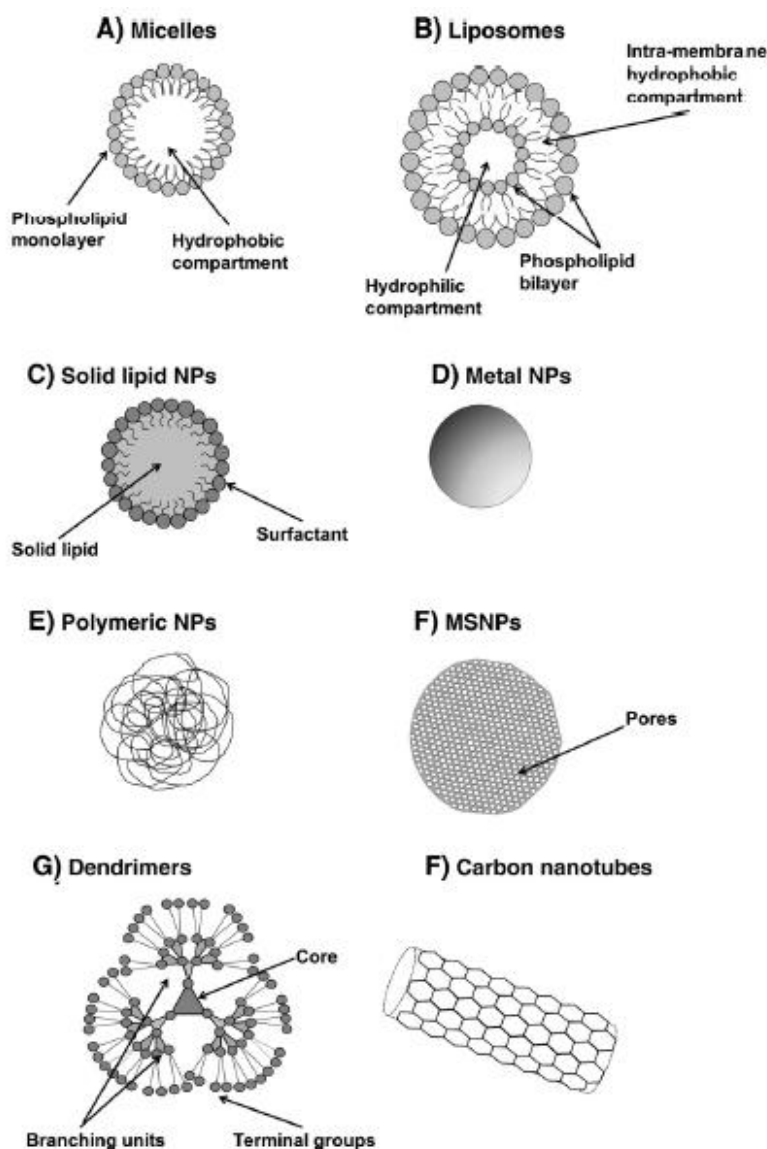
1.3.2.Χρήσεις των νανοϋλικών

Στην παρούσα εργασία γίνεται εκτενέστερη αναφορά για τις λειτουργίες και χρήσεις των διάφορων οικογενειών νανοϋλικών. Είναι γνωστό ότι πολλές από τις λειτουργίες των νανοϋλικών οφείλονται στις ιδιότητες αυτών. Τα νανοϋλικά εκτός από τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, όπως είναι η δομή, η σύσταση και το σχήμα τους χαρακτηρίζονται από το μικρό τους μέγεθος και την μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης που διαθέτουν. Αυξάνοντας την ενέργεια της επιφάνειας του νανοϋλικού και έπειτα από χημική τροποποίησή της είναι δυνατόν να μεταβληθούν οι οπτικές, οι μαγνητικές καθώς και οι ιδιότητες κατάλυσής τους (E. C., 2004 ; Ashby MF et al,2009 ; Cao G. et al, 2011). Οι ιδιότητες αυτές είναι που κάνουν τα νανοϋλικά ένα χρήσιμο εργαλείο σε βιολογικά συστήματα καθώς επίσης και για την διάγνωση και αντιμετώπιση ασθενειών.

1.3.3.Κύρια χαρακτηριστικά για χρήση των Νανοϋλικών σε Βιολογικά συστήματα

Τα νανοϋλικά σε βιολογικά συστήματα θεωρούνται προσαρμόσιμες και πολύ-λειτουργικές πλατφόρμες, για μη επεμβατική μεταφορά οποιουδήποτε τύπου βιολογικού φορτίου, το οποίο έχει σχεδιαστεί ώστε να σημάνει, να ενισχύσει ή να καταστείλει κάποια ενδεχόμενη δραστηριότητα. Στόχος του σχεδιασμού μιας τέτοιας πλατφόρμας είναι η περαιτέρω διερεύνηση για χρήση των νανοϋλικών ως διαγνωστικό ή θεραπευτικό μέσο. Ένα πρώτο βασικό χαρακτηριστικό των νανοϋλικών που οδήγησαν στην ευρεία χρήση τους στο πεδίο της Βιοϊατρικής είναι όπως προαναφέρθηκε, το μικρό τους μέγεθος το οποίο συγκριτικά με το μέγεθος των βιομορίων παρουσιάζει ευκολότερη μεταφορά μέσω της πλασματικής μεμβράνης και μετανάστευση εντός των ενδοκυττάρων διαμερισμάτων. Επίσης τα νανοϋλικά χαρακτηρίζονται από υψηλή σταθερότητα, με αποτέλεσμα να παραμένουν δραστικά και σε μεγαλύτερες αποστάσεις από το σημείο χορήγησης. Η σταθερότητα των νανοϋλικών αυτών μπορεί να ενισχυθεί μέσω χρήσης βιοσυμβατών επιφανειακών επικαλύψεων όπως οργανικές αυτοσυγκροτούμενες μονοστιβάδες (SAMs), πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) και πολυαιθυλενοϊμίνη (PEI). Νεότερης γενιάς νανοϋλικά έχουν την ικανότητα να ελέγχουν την απελευθέρωση του φορτίου τους, αποκρινόμενα σε συγκεκριμένα ενδογενή ή εξωγενή ερεθίσματα όπως το pH, η θερμοκρασία, το φως και οι υπέρηχοι. Κατά τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί επίσης και η συμβατότητα μιας μεγάλης ομάδας από νανοφορείς με μια ποικιλία κυτταρικών τύπων στα θηλαστικά (**Εικόνα 10**). Τα νανοϋλικά εμφανίζουν ακόμα και τεράστιες δυνατότητες παθητικής και ενεργούς στόχευσης. Η παθητική στόχευση βασίζεται στο φαινόμενο συσσώρευσης χορηγούμενων νανοϋλικών σε περιοδικούς ρυθμούς, από ιστούς με αυξημένη μικροαγγειακή διαπερατότητα, κυρίως κακοήθειες. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούνται κυρίως στον καρκίνο (Matsumura et al, 1986). Στον αντίποδα η ενεργός μεταφορά στην μοριακή

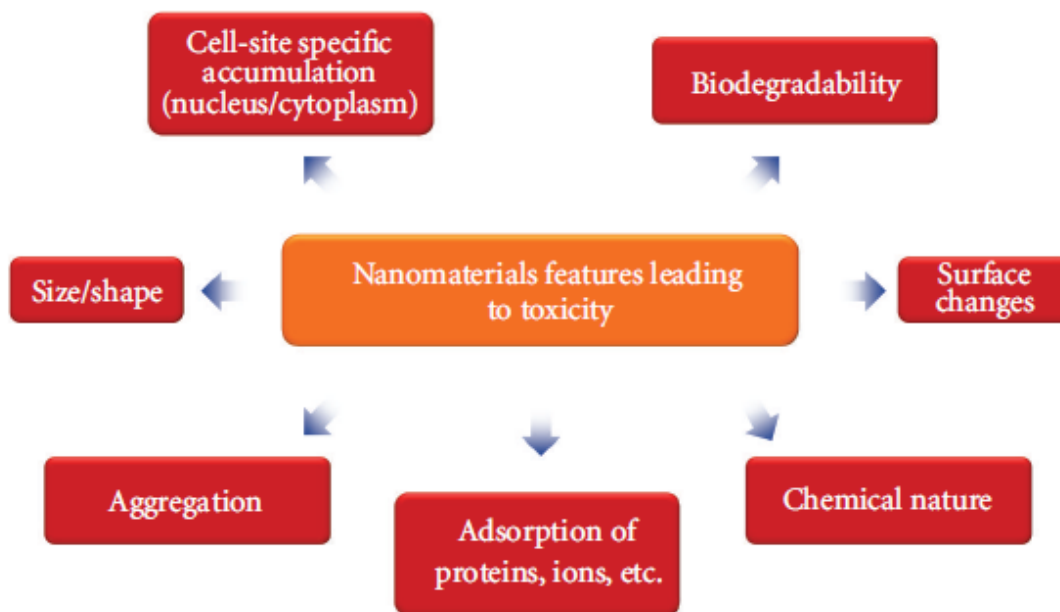
αναγνώριση, επιτυγχάνεται με εμπλουτισμό της επιφάνειας των νανοϋλικών με διάφορους μοριακούς συνδέτες όπως είναι τα αντισώματα και τα πεπτίδια. Άμεσο αποτέλεσμα είναι η μεταφορά του φορτίου του νανοϋλικού σε συγκεκριμένη περιοχή, κυτταρικό πληθυσμό ή ενδοκυττάριο διαμέρισμα με υψηλή επιλεκτικότητα (Nieheman et al, 2012 ; Marrache S. et al, 2012). Τέλος η προσαρμοστική ικανότητα καθώς και η ικανότητα πρόσδεσης μορίων στην επιφάνεια των νανοϋλικών, επιτρέπουν την πρόσδεση όπως επίσης και την στοχευμένη μεταφορά μεγάλου όγκου ωφέλιμου φορτίου. Η χρήση τους συνεπώς για την μεταφορά ακριβών φαρμακευτικών συσκευασμάτων όπως επίσης και ως μέσο διάγνωσης λόγω της υψηλής επιλεκτικότητάς τους, είναι ωφέλιμη στο πεδίο της Βιοϊατρικής (Lammers T. et al, 2010 ; Xie Jet et al, 2010).



Εικόνα 10: Κοινές βιο-ιατρικές εφαρμογές νανοϋλικών. (Α) Μικκύλια (Β) Λιποσώματα (C) Στερεά νανοσωματίδια λιπιδίου (Δ) Ανόργανα (μεταλλικά) νανοσωματίδια κβαντικές κουκίδες. Νανοσωματιδίων (Ε) Πολυμερή (F) Μεσοπορώδη νανοσωματίδια διοξειδίου του πυριτίου. (G) Δενδριμερή. (H) Νανοσωλήνες άνθρακα.

1.3.4. Νανοϋλικά και καταστροφή των κυττάρων

Όπως ήδη αναφέρθηκε τα νανοϋλικά διαθέτουν ένα ευρύ φάσμα φυσικοχημικών ιδιοτήτων όπου οφείλονται οι βιολογικές και τοξικολογικές επιδράσεις τους (Εικόνα 11). Στις επιδράσεις αυτές ανήκουν και οι επιδράσεις που εμφανίζουν τα νανοϋλικά σε ένα κυτταρικό πληθυσμό. Έτσι μελέτες οδηγήθηκαν στο συμπέρασμα ότι η προσθήκη νανοϋλικών σε ένα πληθυσμό είτε διαφοροποιημένων είτε αδιαφοροποίητων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στον κυτταρικό θάνατο ή σε άλλα τοξικά αποτελέσματα τα οποία εξαρτώνται από το μέγεθος του προστιθέμενου νανοϋλικού (C.E. Jones and D.W. Grangers 2009). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η προσθήκη ενός συμπλέγματος χρυσού της τάξης των nm (1.4nm), το οποίο εισέρχεται στην μεγάλη αύλακα του DNA και με τον τρόπο αυτό επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα (M. Tsoli et al, 2005). Έρευνες που ακολούθησαν έδειξαν ότι και ο βαθμός συσσωμάτωσης των νανοϋλικών παίζει σημαντικό ρόλο στις επιπτώσεις που αυτά επιφέρουν. Καθοριστικό ρόλο έχει και η προσροφητική ικανότητα του νανοϋλικού καθώς επηρεάζει τις επιδράσεις του στο κύτταρο. Για παράδειγμα η υψηλή προσροφητική ικανότητα του νανοϋλικού έχει ως αποτέλεσμα την δέσμευση διάφορων βιομορίων στην επιφάνεια του νανοϋλικού όπως για παράδειγμα βακτηριακές ενδοτοξίνες. Έτσι όταν το νανοϋλικό διασπείρεται στο μέσο της καλλιέργειας έχει την ικανότητα να προσροφά πρωτεΐνες όπως αλβουμίνη του ορού ή ασβέστιο τα οποία έπειτα μπορούν να αλλάξουν την βιολογική του δράση. Η προσρόφηση αυτή πιθανόν εξαρτάται από το μέγεθος του νανοϋλικού καθώς επίσης και τον χρόνο παραμονής του (M. Horie et al, 2011; M. Lanquist et al, 2011). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η τοξική επίδραση των νανοϋλικών εξαρτάται και από την ποσότητα του εισαγόμενου νανοϋλικού (N. Lewinski et al, 2008; S.T. Stern and S.E. Mc Neil, 2008). Ο βαθμός αναγνώρισης και εισχώρησης του νανοϋλικού επηρεάζει την διασπορά του και καθορίζει την τοξική του ικανότητα. Επίσης η τοξικότητα φαίνεται να σχετίζεται με την κυτταρική μοίρα και μέσω των κρυσταλλικών δομών (C. M. Seyes, 2006). Πρέπει να σημειωθεί ακόμα ότι και ο βαθμός αποικοδόμησης των νανοϋλικών σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο. Μη αποικοδομήσιμα νανοϋλικά μπορούν να συσσωρευτούν σε κύτταρα ή όργανα και να προκαλούν βλάβες. Το ίδιο ισχύει και για τα προϊόντα αποδόμησης αυτών (K. L. Aillon et al, 2009).



Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση των επιδράσεων του νανοϋλικού στην κυτταρική μοίρα (.Daniela De Stefano,Rosa Carnuccio, andMaria ChiaraMaiuri, 2012).

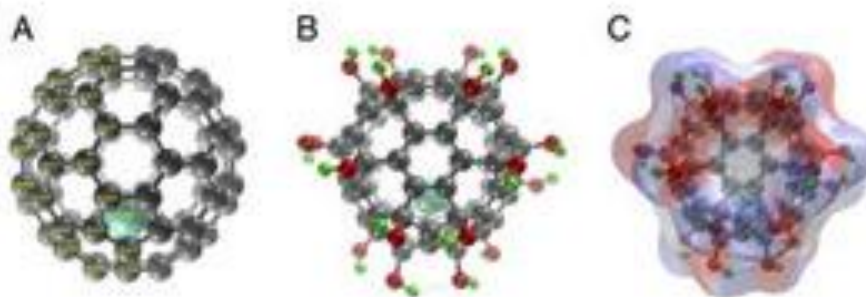
1.3.5.Νανοϋλικά και Καρκίνος

Όπως αναφέραμε και προηγουμένως τα νανοϋλικά αποτελούν πολύ-λειτουργικές πλατφόρμες, με ποικίλες εφαρμογές σε βιολογικά συστήματα. Λόγω του μικρού τους μεγέθους είναι δυνατή η μεταφορά τους στο εσωτερικό των κυττάρων καθώς και σε επιμέρους εσωτερικά οργανίδια αυτού. Έτσι η επικρατέστερη εφαρμογή τους στην προσπάθεια θεραπείας του καρκίνου ήταν αυτή της μεταφοράς τυπικών αντικαρκινικών φαρμάκων, στοχευμένα στην περιοχή του όγκου με την βοήθεια αυτών των νανοσωματιδίων. Η μεταφορά αυτών των φαρμάκων, των ολιγονουκλεοτιδίων ή των βιο-ενεργών μορίων μέσω των νανοϋλικών, είναι σημαντική καθώς βελτιώνει την βιο-διαθεσιμότητα των μεταφερόμενων μορίων (Ge, Z, & Liu, S., 2013).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν πρόσφατα αποτελέσματα που δίνουν την δυνατότητα ενεργούς στόχευσης κυττάρων του όγκου μέσω σύζευξης απταμερών στην επιφάνεια νανοϋλικών, με την βοήθεια κάποιου στοχευμένου συνδέτη, που σχετίζεται με την υπερέκφραση αντιγόνων ή υποδοχέων στα στοχοποιημένα κύτταρα. Τα απταμερή είναι μικρά, συνθετικά, μεμονωμένα ολιγονουκλεοτίδια που συνδέονται ειδικά σε μια ποικιλία μοριακών στόχων συμπεριλαμβανομένου μικρών μορίων, πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων ακόμη και κυττάρων και όγκων με μεγάλη ειδικότητα και αποτελεσματικότητα(Sefah, K. et al., 2009; Fang et al., 2010). Τα απταμερή προκύπτουν από μια επαναλαμβανόμενη διαδικασία που ονομάζεται συστημική εξέλιξη συνδετών και αντιπροσωπεύουν μια μοναδική τάξη μορίων που είναι μεγαλύτερα από μικρά μόρια – φάρμακα, αλλά μικρότερα από τα αντισώματα (Ni, X. et al.,2011; Chang et al, 2013). Συγκριτικά με τους παραδοσιακούς συνδέτες όπως τα αντισώματα, τα πεπτίδια και τα μικρά μόρια, τα απταμερή διαθέτουν πολλά πλεονεκτήματα όπως το χαμηλό κόστος και τα χαμηλά επίπεδα

ανοσογονικότητας και τοξικότητας. Επίσης σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί και το μικρό μέγεθός τους καθιστώντας ευκολότερη την διείσδυση στο εσωτερικό συμπαγών όγκων καθώς επίσης και αποτελεσματικότερη την σύνδεση με το κύτταρο-στόχο (Zhang et al, 2011; Li et al, 2013). Έτσι με την σύζευξη των απταμερών στην επιφάνεια των νανοϋλικών συνδυάζονται τα μοναδικά χαρακτηριστικά των νανοϋλικών με την ειδική ικανότητα αναγνώρισης των απταμερών, καθιστώντας τα νανοϋλικά με τα συζευγμένα απταμερή μια πιο αποτελεσματική και λιγότερο επιβλαβής στρατηγική στην μάχη κατά του καρκίνου (Chen et al., 2011).

Υπάρχει όμως και ένας μικρός όγκος αποτελεσμάτων που αποδεικνύει ότι τα νανοϋλικά διαθέτουν ιδιότητες που τους προσδίδουν αντικαρκινική δράση. Παράδειγμα αυτών αποτελεί ένα νανοϋλικό με βάση το φουλερένιο που διαθέτει ένα σπάνιο γαιο-μέταλλο το Γαδολίνιο, το οποίο εγκοιλώνεται στο εσωτερικό από ένα κελί ογδόντα δυο (82) ανθράκων (Miyamoto et al. 2006, Tang J et al. 2013). Η επιφάνεια του κελιού των ανθράκων έχει τροποποιηθεί από είκοσι δυο (22) υδροξυλικές ομάδες προς σχηματισμό $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ (Εικόνα 12), το οποίο εμφανίζει μια μορφολογία παρόμοια με αυτή των ιών (Xu L. et al, 2013). Το μέγεθος του νανοϋλικού αυτού είναι 1nm, και μπορεί να σχηματίζει συσσωματώματα με αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, μέσα σε ένα διάλυμα, με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων, τα μεγέθη των οποίων κυμαίνονται από 20 έως 120nm, και τα οποία εξαρτώνται από την συγκέντρωση και το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται (Kang, S. et al, 2012). Πρέπει να σημειωθεί ότι η συμμετρία των ανθράκων του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ είναι μικρότερη από εκείνη του $C_{60}(OH)_{22}$. Ως αποτέλεσμα της μικρής του συμμετρίας του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$, το κελί των ογδόντα δύο ανθράκων του θα περιμέναμε να διατηρεί μια ανομοιογενής κατανομή φορτίου. Έτσι θεωρητικά θα περιμέναμε το $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ και το $C_{60}(OH)_{22}$ να δρουν διαφορετικά σε αντιδράσεις υδροξυλίωσης, παράγοντας φουλερένια με διαφορετικές γεωμετρίες και φυσικές ιδιότητες. Αυτό πράγματι συμβαίνει, καθώς η πιο θερμοδυναμικά σταθερή δομή του $C_{60}(OH)_{22}$ είναι εκείνη όπου όλες οι υδροξυλικές ομάδες συγκεντρώνονται στην ισημερινή περιοχή του κελιού των ανθράκων (He, H. et al., 2011). Σε αντίθεση όμως με τις θεωρητικές προβλέψεις η πιο, θερμοδυναμικά, σταθερή δομή του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ είναι εκείνη όπου τα υδροξύλια κατανέμονται με ομοιογενή τρόπο γύρω από το κελί των ανθράκων (Zhang, J. et al.,2010).

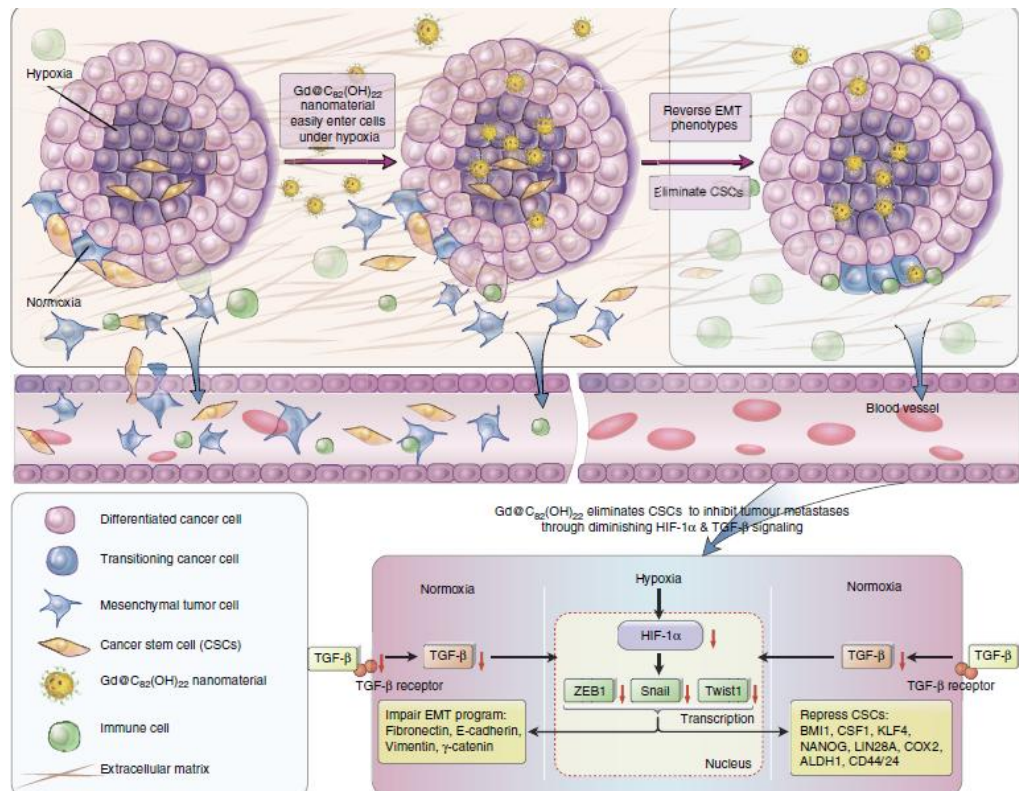


Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση των $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ νανοσωματιδίων. (Α)Ατομική δομή του $Gd@C_{82}$ (Β)Ατομική δομή του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τους δεσμούς υδρογόνου μεταξύ ατόμων υδρογόνου και άνθρακα. (C) Ατομική δομή του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$. Τα χρώματα στην μοριακή επιφάνεια δείχνουν κατά προσέγγιση το ηλεκτροστατικό δυναμικό (Ying Liu et al, 2015).

Παρόλα αυτά τροχοπέδη στην ανάπτυξη θεραπειών με στόχο καρκινικά βλαστικά κύτταρα αποτελούν, η ετερογένεια εντός του όγκου καθώς και η πιθανή τοξικότητα των υπό δοκιμή νανοϋλικών, στους φυσιολογικούς ιστούς (Park, C. Y. et al.,2009; Clevers, H.,2011; Malik, F. et al., 2012). Στην συγκεκριμένη περίπτωση ένα από τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά των νανοσωματιδίων αυτών είναι ότι εμφανίζουν μια εντυπωσιακά χαμηλή κυτταροτοξικότητα, παρά την υψηλή αντικαρκινική τους ικανότητα σε μια ποικιλία συμπαγών όγκων (Liu, Y. et al.,2012; Meng, H. et al.,2012). Έτσι για να διασαφηνιστεί ο μηχανισμός με τον οποίο τα νανοσωματίδια $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ επιδρούν εκλεκτικά έναντι των καρκινικών κυττάρων χρησιμοποιήθηκαν δυο κυτταρικές σειρές εμπλουτισμένες με χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την μετατροπή επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT) καθώς επίσης και με φαινοτύπους καρκινικών βλαστικών κυττάρων μαστού (Thierry J.P. et al.,2009; Ganesan S. et al., 2010; Alkatout I. et al.,2012). Μετά από επώαση αυτών των κυττάρων σε διάλυμα παρουσία του νανοϋλικού εξήχθησαν μια σειρά αποτελεσμάτων χωρίς όμως να είναι δυνατόν να διασαφηνιστεί πλήρως ο μηχανισμός δράσης του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$. Παρόλα αυτά τα αποτελέσματα που προέκυψαν αποδεικνύουν ότι τα νανοσωματίδια αυτά διαθέτουν την ικανότητα να αντιστρέφουν την μετατροπή των καρκινικών επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά και με αυτό τον τρόπο να μειώνουν σημαντικά τα καρκινικά βλαστικά κύτταρα. Ο λόγος για τον οποίο πιθανολογείται ότι συμβαίνει αυτό είναι η ειδικότητα του νανοσωματιδίου να σταματά την αυτό-ανανέωση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων και να τα οδηγεί σε μια τελική διαφοροποίηση. Η επίδρασή του αυτή δεν παρατηρείται στα φυσιολογικά βλαστικά κύτταρα. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι στο εσωτερικό των όγκων οι συνθήκες που επικρατούν χαρακτηρίζονται ως ακραίες λόγω των μειωμένων επιπέδων οξυγόνου και θρεπτικών. Υπό τις συνθήκες αυτές υποξίας, παλαιότερες μελέτες έχουν δείξει ότι ο πληθυσμός καρκινικών βλαστικών κυττάρων αυξάνεται, σε μια διαδικασία στην οποία διαμεσολαβεί ο HIF-1α υποδοχέας. Στην μελέτη αυτή διαπιστώθηκε ότι στις συνθήκες αυτές υποξίας η προσρόφηση των νανοσωματιδίων $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ από τα κύτταρα αυξάνεται με αποτέλεσμα την εξάλειψη καρκινικών κυττάρων και κυττάρων με φαινοτύπους εξαλλαγής από επιθηλιακά σε μεσεγχυματικά. Η

εξάλειψη αυτή των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιείται μέσω αναστολής των σηματοδοτικών μονοπατιών των υποδοχέων HIF-1α και TGF-β (εικόνα 13). Η αναστολή των σηματοδοτικών μονοπατιών του HIF-1α και του TGF-β έγκειται στην αποτελεσματικότητα του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ να εξαλείφει τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Lao, F. et al., 2009; Yin, J. J. et al., 2009), που είναι γνωστές ως δυνητικοί επαγωγείς της έκφρασης των HIF-1α και TGF-β στα καρκινικά κύτταρα (Jain, M. et al., 2013).

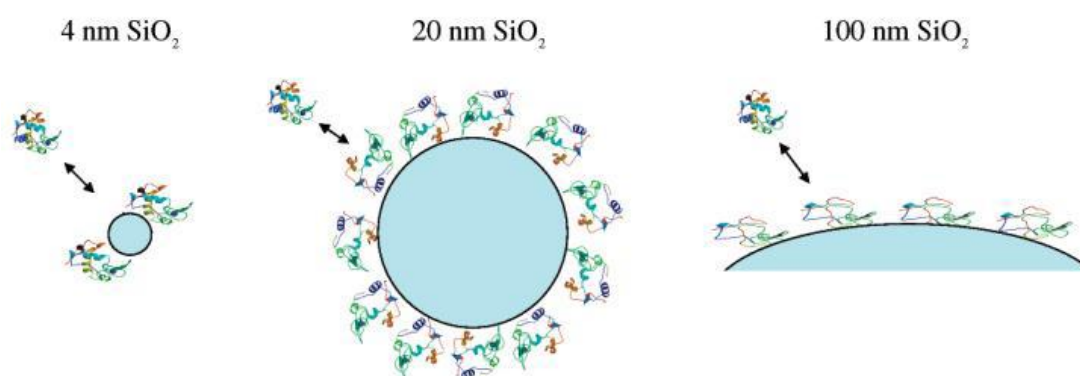
Συnergατικό ρόλο στην ενίσχυση της προσρόφησης του νανοϋλικού στα κύτταρα παίζει και το pH του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται τα νανοσωματίδια. Γνωρίζουμε ότι το μόριο του φουλερενίου σε υδατικά διαλύματα σχηματίζει πολυανιονικά νανοσωματίδια, ενώ το μέγεθός του μειώνεται σε πιο όξινα διαλύματα (Wang, Z. Z. et al., 2014). Επίσης έχει αναφερθεί ότι μικρότερα σε μέγεθος σωματίδια διεισδύουν ευκολότερα στους όγκους (Aleksandar, D. & Gordana, B., 2008) ενώ μείωση του pH συμβαίνει όταν μέσα σε ένα υδατικό διάλυμα προστίθεται σκόνη φουλερενίου (Brant et al, 2007). Ακόμα το κελί των ανθράκων του $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ διαθέτει ελκτικές (C-OH) και αποστικές (C-O⁻) ομάδες. Τα όξινα πρωτόνια τους συμμετέχουν στον σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με άλλα νανοσωματίδια $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ και αυτό συντελεί στον καθοδηγούμενο σχηματισμό νανοσωματιδίων (Vileno, B. et al., 2006). Η ποικιλία των μεγεθών σε σχέση με την κλιμάκωση του pH παρατηρήθηκε και προκύπτει ότι σε διαλύματα με pH 4.3 το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι περίπου 40nm, σε pH 5.1 το μέσο μέγεθος είναι περίπου 116nm και σε pH 7.4 το μέσο μέγεθος είναι 175nm. Όταν το pH αυξάνεται στο 8.5 το μέσο μέγεθος των νανοσωματιδίων μειώνεται στο 84nm ενώ σε pH 9.7 στα 38nm (Ying Liu et al., 2015).



Εικόνα 13: Σχηματική απεικόνιση του μονοπατιού σύμφωνα με το οποίο τα νανοσωματίδια $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ αναστέλλουν την ανάπτυξη του όγκου (Ying Liu et al., 2015).

1.3.6. Νανοβιοκατάλυση

Ένα βασικό χαρακτηριστικό των νανοσωματιδίων είναι η τάση τους να συσσωματώνονται και/ή να προσροφώνται το ένα πάνω στο άλλο, καθώς και σε άλλα οργανικά ή ανόργανα υποστρώματα (Borm P. 2006; Shakeel and Qayyum, 2011). Επιπρόσθετα τα νανοϋλικά διαθέτουν μια τεράστια επιφάνεια αλληλεπίδρασης αναλογικά με την μάζα τους, γεγονός που μπορεί να αυξήσει την δραστηρότητά τους σε σχέση με συμβατικά υλικά, με την ίδια χημική σύσταση. Έτσι πολλές δοκιμές ενσωματώνουν αντιδράσεις που καταλύονται από ένζυμα, με την χρήση ποσοτικών μεθόδων που βασίζονται στα χαρακτηριστικά της απορρόφησης ή του φθορισμού ενός δείγματος. Παράδειγμα αποτελεί ο προσδιορισμός της κυτταροτοξικότητας μέσω απελευθέρωσης της γαλακτικής αφυδρογονάσης. Είναι γνωστό ότι πολλά από τα συστατικά για την σύνθεση των νανοϋλικών, εμφανίζουν πιθανά κάποια βιο-δραστηρότητα. Πρωτεΐνες όπως η λυσοζύμη, η καταλάση και η θρυψίνη απορροφώνται έντονα από νανοσωματίδια SiO_2 (το μέγεθος των οποίων κυμαίνεται από 9 – 40nm). Κατά την διαδικασία αυτή, οι πρωτεΐνες υφίστανται μερική απώλεια της δομής και γενικά μια σημαντική απώλεια της ενζυμικής τους δράσης. Καθοριστικό ρόλο στις τροποποιήσεις αυτές έχει μια σειρά από παράγοντες όπως το μέγεθος των προστιθέμενων νανοϋλικών, ο σχηματισμός συσσωματωμάτων καθώς και το μέγεθος των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων. Μελέτες έχουν δείξει πως, ισχυρότερη προσρόφηση των πρωτεϊνών συμβαίνει μετά από προσθήκη μεγαλύτερου μεγέθους νανοϋλικών, με τελικό αποτέλεσμα μια ποιοτική αλλαγή της προσροφητικής συμπεριφοράς κατά την μετάβαση από σωματίδια των 4nm (στοιχειομετρικά συζυγή), μέσω σωματιδίων των 20nm (μονοστρωματική προσρόφηση), σε σωματίδια των 100nm (πολυστρωματική προσρόφηση) (**Εικόνα 14**). Ακόμα μελέτες της δραστηρότητας της λυσοζύμης αποδεικνύουν ότι μετά την απορρόφηση της από νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους το περιεχόμενό της σε α -έλικες μειώνεται σημαντικά από ότι όταν απορροφάται από νανοσωματίδια μικρότερου μεγέθους. Έτσι ένα πρώτο συμπέρασμα που προκύπτει από τα παραπάνω είναι ότι κατά την απορρόφηση της λυσοζύμης από νανοσωματίδια μεγαλύτερου μεγέθους οδηγεί σε μεγαλύτερο ξεδίπλωμα της δομής της (Vertegel et al, 2004).



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της προσρόφησης της λυσοζύμης σε σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου, διαφορετικών μεγεθών. Ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ σωματιδίων και πρωτεϊνών, υπάρχουν στη περίπτωση των μεγαλύτερων νανοσωματιδίων, με αποτέλεσμα μεγαλύτερο ξεδίπλωμα των πρωτεϊνών και μικρότερη ενζυμική δραστηρότητα (Vertegel et al, 2004).

Ευρεία χρήση εμφανίζουν τα νανοϋλικά και στην ακινητοποίηση των ενζύμων. Τα ένζυμα είναι ευέλικτοι βιοκαταλύτες και είναι χρήσιμα σε πολλούς τομείς όπως η βιολογική σύνθεση, ο ανοσοπροσδιορισμός και η ανίχνευση του υποστρώματος. Η χήμειο-, τόπο- και στέreo-εκλεκτικότητα των ενζύμων αποδεικνύουν την επικράτησή τους επί των άλλων καταλυτικών χημικών αντιδράσεων (Feng Jia et al., 2013). Ωστόσο η επαναχρησιμοποίηση και η μακροχρόνια σταθερότητά τους είναι περιορισμένη στην βιολογική σύνθεση.

Η χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων απλοποιεί την ανάκτηση των ενζύμων από υδατικά διαλύματα μέσω διαχωρισμού στερεάς φάσης. Η τεχνική ισχυρού δεσμού που χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση των ενζύμων σε στερεά συστήματα, βασίζεται στον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις ακινητοποίησης, τα ένζυμα συνδέονται με στερεά μέσω αμιδικού δεσμού ή βάσεις Schiff, με αποτέλεσμα σημαντική απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας (Hermanson et al, 2008). Το πρόβλημα αυτό μπορεί να υπερνικηθεί με ανάπτυξη τεχνικής με προσανατολισμένη και τοπο-ειδική ακινητοποίηση.

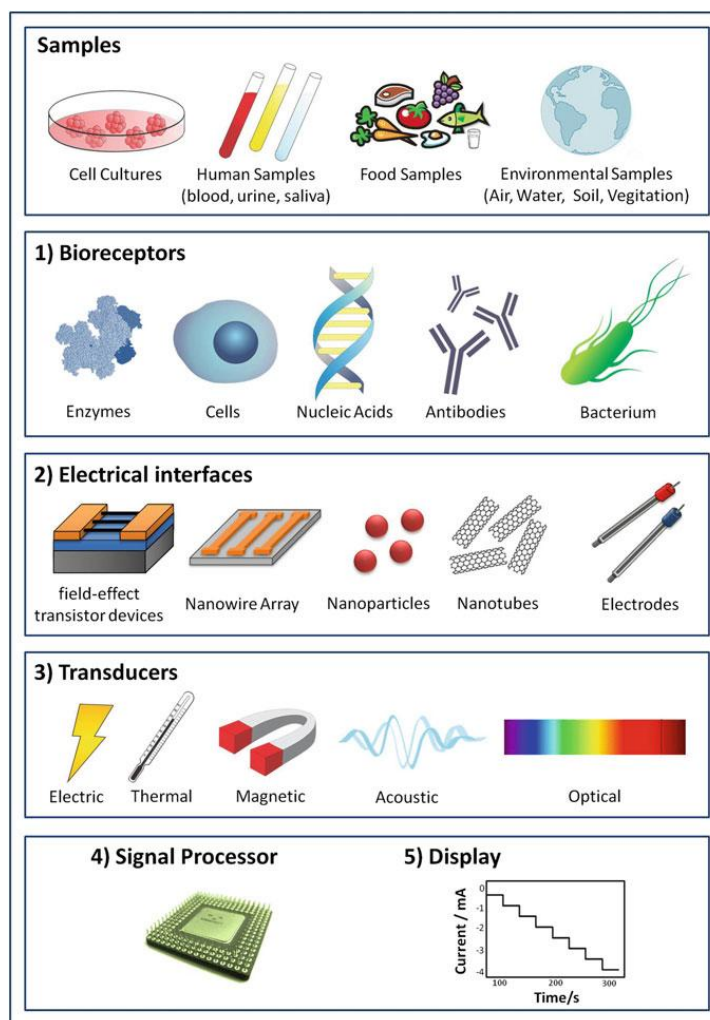
Η ακινητοποίηση των ενζύμων και των πρωτεϊνών βελτιώνει την σταθερότητά τους, διευκολύνει τον διαχωρισμό τους από το μείγμα τις αντίδρασης, πολλές φορές μπορεί να διαφοροποιεί τις καταλυτικές ιδιότητές τους, διευκολύνει την πρόληψη της μικροβιακής ανάπτυξης και σε ορισμένες περιπτώσεις αυξάνει την δραστηριότητα και την εκλεκτικότητά τους (Fernandez , 2008; Shaowei Ding et al, 2014). Ένας από τους λόγους των θετικών επιδράσεων της ακινητοποίησης των ενζύμων σε νανοσωματίδια είναι η μείωση του ενζύμου που χρησιμοποιείται ώστε να επιτευχθεί κάποια αντίδραση, καθώς η ακινητοποίηση βελτιώνει την αποτελεσματικότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Επίσης τα μικρά σωματίδια προσφέρουν μεγαλύτερη επιφάνεια προσρόφησης των ενζύμων και των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το ενζυμικό φορτίο ανά μονάδα μάζας των σωματιδίων (Shakeel and Qayyum, 2011). Παρόλα αυτά δεν είναι δυνατή η ακινητοποίηση οποιουδήποτε μορίου-φορτίο στην επιφάνεια των νανοϋλικών καθώς η ακινητοποίηση πρέπει να μην επηρεάζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Hwang and Gu, 2013) καθώς επίσης και οι συνθήκες ακινητοποίησης να είναι οι βέλτιστες και για τις νανοδομές αλλά και για το μόριο-φορτίο (Jesionowski et al., 2014).

1.3.7.Χρήση των νανοϋλικών ως Βιοαισθητήρες

Με τον όρο βιοαισθητήρες αναφερόμαστε σε αναλυτικά εργαλεία, τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση ή την αναγνώριση συγκεκριμένων στοιχείων. Οι πρώτοι βιοαισθητήρες αναπτύχθηκαν το 1962 (Clark and Lyons, 1963), και λόγω των μεγάλων δυνατοτήτων τους μελετήθηκαν ευρέως και χρησιμοποιήθηκαν σε πολλές καταστάσεις. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την θεμελιώδη πλατφόρμα τους. Οι πλατφόρμες αυτές μπορούν να περιλαμβάνουν αντισώματα (Kusterbeck et al., 1990), υποδοχείς πρωτεϊνών (Kricka et al., 2006), ένζυμα (Wilson and Hu, 2000; Ispras et al., 2012) και μικροοργανισμούς (D'Souza, 2001; Lei et al., 2006; Su et al., 2011). Στην πρακτική και κλινική χρήση όμως οι περισσότεροι βιοαισθητήρες βασίζονται σε ένζυμα και νουκλεϊκά οξέα ολιγονουκλεοτιδίων, λόγω της υψηλής ευαισθησίας τους (Ispras et al., 2012). Παρόλα αυτά, χρησιμοποιούνται ως βιοαισθητήρες, επίσης και μικροοργανισμοί καθώς εμφανίζουν μια σειρά από πλεονεκτήματα όπως η ικανότητά τους να αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, η δυνατότητα μαζικής παραγωγής τους,

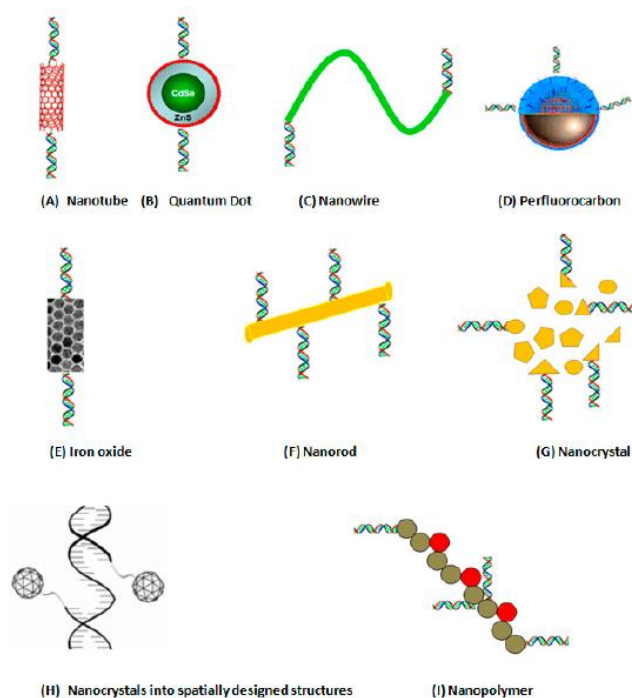
το μειωμένο κόστος τους καθώς επίσης και η ευκολότερη γενετική τροποποίησή τους ((D'Souza, 2001; Lei et al, 2006; Su et al, 2011). Διάφοροι περιορισμοί όμως εμποδίζουν την ευρεία χρήση τους. Σε γενικές γραμμές ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από πέντε μέρη (εικόνα 15):

- ❖ Τον Βιο-υποδοχέα, ο οποίος δεσμεύει την ειδική μορφή για τον αναλυτή
- ❖ Μια ηλεκτροχημικά ενεργή διεπαφή, όπου συγκεκριμένες βιολογικές διαδικασίες συμβαίνουν και διεγείρουν ένα σήμα
- ❖ Ένα στοιχείο μετατροπέα, που μετατρέπει την ειδική βιοχημική αντίδραση σε ένα ηλεκτρικό σήμα, από ένα κύκλωμα ανιχνευτή
- ❖ Έναν επεξεργαστή σήματος (όπως λογισμικό υπολογιστή), για την μετατροπή του ηλεκτρικού σήματος σε μια φυσική παράμετρο που περιγράφει την διαδικασία η οποία διερευνάται
- ❖ Μια κατάλληλη διεπαφή, η οποία παρουσιάζει τα αποτελέσματα για τον χειριστή.



Εικόνα 15: Απεικόνιση των τμημάτων από τα οποία αποτελείται ένας κοινός βιοαισθητήρας.

Τα νανοϋλικά λόγω των εξαιρετικών ηλεκτροχημικών τους ιδιοτήτων, που απορρέουν από την μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης που διαθέτουν, σε σχέση με την ποσότητα και την ταχύτητα μεταφοράς ηλεκτρονίων, έχουν τραβήξει την προσοχή πολλών ερευνητών για την πιθανή χρήση τους ως βιοαισθητήρες στον τομέα της Βιοϊατρικής. Πρόκληση συνεπώς αποτελεί η ανάπτυξη νέων ηλεκτροχημικών συσκευών υψηλής ευαισθησίας και επιλεκτικότητας, με βάση νανοϋλικά, οι οποίες θα παρέχουν την δυνατότητα ανίχνευσης μικρών ποσοτήτων μορίων. Διάφορα είδη νανοϋλικών έχουν χρησιμοποιηθεί στον τομέα αυτό, όπως μεταλλικά νανοσωματίδια (He et al, 2008), οξειδωμένα νανοσωματίδια (De Dios et al, 2010), μαγνητικά νανοϋλικά (Haun et al, 2010), υλικά άνθρακα (Rasling et al, 2009; Kim et al, 2010) και μέταλλο – φθαλοκυανιδίνες, για την βελτίωση του ηλεκτροχημικού σήματος των βιοκαταλυτικών γεγονότων που συμβαίνουν στο ηλεκτρόδιο. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η χρήση λεπτών μεμβρανών στις επιφάνειες των ηλεκτροδίων για την αύξηση της ευαισθησίας των αισθητήρων και βιοαισθητήρων. Η τεχνική Langmuir-Blodgett, αποτέλεσε την πρωτοποριακή τεχνική για την κατασκευή αυτών των λεπτών μεμβρανών, οι οποίες σχηματίστηκαν με την μεταφορά ενός αμφίφιλου υλικού, που διασπείρεται στην διεπιφάνεια αέρα /νερού σε ένα στερεό υπόστρωμα. Ο σχηματισμός αυτών των λεπτών μεμβρανών αποτελεί πόλο έλξης για την ακινητοποίηση ενζύμων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων (Iost et al, 2011). Έτσι η χρήση των νανοδομών σε τροποποιημένα ηλεκτρόδια για την *in vivo* παρακολούθηση βιομορίων (Njagi et al, 2010) καθώς και η δυνατότητα εντοπισμού βιομορίων σε ζωντανό οργανισμό και σε πραγματικό χρόνο (Ward et al, 2002), βελτίωσαν την ηλεκτροχημική απόδοση των βιοαισθητήρων. Τα ευρήματα αυτά οδήγησαν επίσης, πολλούς ερευνητές στην πρόκληση για την κατασκευή ηλεκτροχημικών συσκευών της τάξης των nM, για την ανίχνευση απλών μορίων (Crespiello et al, 2009). Πολλοί τύποι νανοσωματιδίων χρησιμοποιούνται για την κατασκευή πολλών βιοαισθητήρων για την σύνδεση με DNA/ πρωτεΐνες (εικόνα 16).



Εικόνα 16: Νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται ευρέως, όπου πάνω είναι δυνατό να δεσμεύονται DNA και πρωτεΐνες.

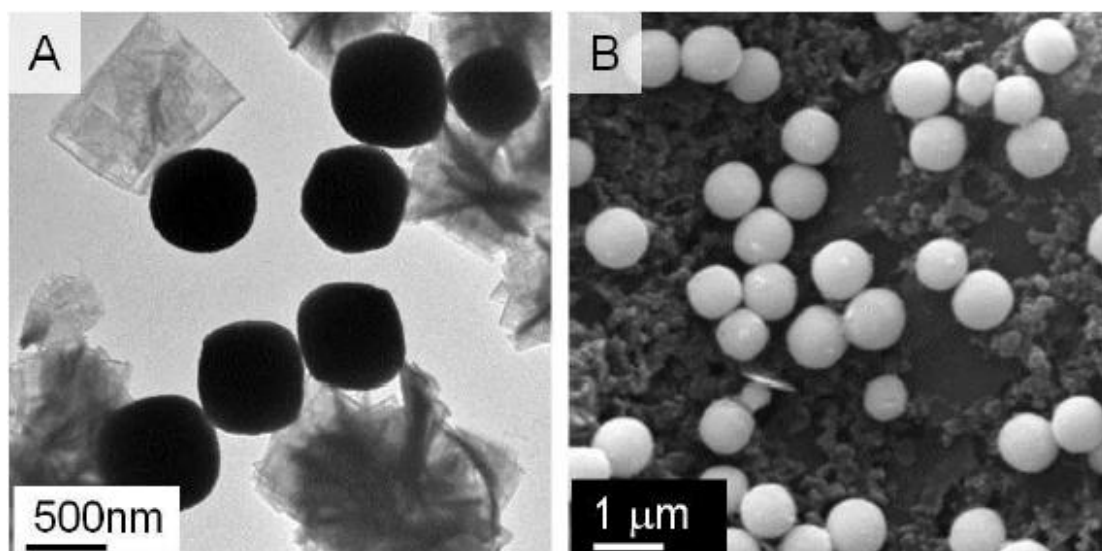
Χαρακτηριστικά παραδείγματα χρήσης νανοϋλικών στον τομέα των Βιοαισθητήρων αποτελούν τα νανοσωματίδια Au (Q.N. Xu et al, 2012), Zn (L.N. Feng et al, 2012), CdS (L.N. Feng et al, 2012), PbS (H.W. Gao et al, 2009) και νανοσωματίδια Ag (B.P. Ting et al, 2009). Τα νανοσωματίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν για την σήμανση DNA, πρωτεϊνών ή/και άλλων βιομορίων με αποτέλεσμα την αύξηση της φόρτωσης ηλεκτροχημικά ενεργών ειδών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και κατά συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας του. Η αναλυτική απόδοση η οποία περιλαμβάνει, την δυναμική περιοχή συγκέντρωσης καθώς και το χαμηλό όριο ανίχνευσης (LOD), ορισμένων ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων αυτού του τύπου, ανάλογα με το νανοϋλικό που χρησιμοποιήθηκε, συνοψίζονται στον **Πίνακα 1** που ακολουθεί. Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι πολλές φορές είναι δύσκολο να ανιχνευθούν νανοσωματίδια χρησιμοποιώντας άμεσα ηλεκτροχημικές τεχνικές. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι πολλά νανοσωματίδια είναι ηλεκτροχημικά ανενεργά στο διαθέσιμο δυναμικό του υδατικού μέσου του ηλεκτρολύτη ή μπορεί μόνο να οξειδώνονται/ ανάγονται στην δυναμική περιοχή, κοντά στο όριο του δυναμικού του διαλύτη όπου οι διαδικασίες στο υδατικό μέσο (παρασκήνιο) είναι κυρίαρχες. Το γεγονός αυτό συχνά σχετίζεται με το ότι τα νανοσωματίδια συχνά επικαλύπτονται με σταθεροποιητές. Έτσι προκειμένου να ανιχνευθούν οι επισημάνσεις των νανοϋλικών, στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, διαλύονται σε διάλυμα χρησιμοποιώντας ένα ισχυρό οξειδωτικό αντιδραστήριο, και έπειτα μέσω της τεχνικής της βολτομετρίας ανιχνεύονται τα διαλυμένα μεταλλικά ιόντα (N. Zhou et al, 2013; Y. Wei et al, 2012; G. Aragay et al, 2012). Οι συγκεντρώσεις των νανοσωματιδιακών ετικετών που χρησιμοποιούνται είναι ανάλογες των συγκεντρώσεων του DNA και των πρωτεϊνών που αυτές δεσμεύουν, και συνεπώς η αναγνώρισή τους από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου δηλώνει και την αντίστοιχη ποσότητα των DNA/πρωτεϊνών στο δείγμα.

Πίνακας 1: Συγκεντρωτικός πίνακας ορισμένων ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων παρουσία νανοϋλικών (Liang Ding et al, 2013).

Nanoparticle label	Analyte	Dynamic range	LOD
Au	Human serum albumin	0.5–200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1 ng mL^{-1}
Au	Human IgG	0.26–1000 ng mL^{-1}	0.26 ng mL^{-1}
Au	DNA	5–500 pM	5 pM
Au	Human IgG	0.01–10 ng mL^{-1}	9 pg mL^{-1}
Ag	Oligonucleotide	0.001–10 nM	1 pM
Ag	Oligonucleotide	10 fM–10 nM	10 fM
PbS	oligonucleotide	2.25 pM–2.25 nM	0.3 pM
PbS	35S promoter	0.8–160 pM	0.25 pM
CdS	Human α -fetoprotein	0.02–3.5 ng mL^{-1}	9.6 pg/mL
CdS	Thrombin	2.3 pM–2.3 nM	0.43 pM
CdS	DNA hybridization	0.01–300 nM	10 pM
CdS	Oligonucleotides	0.1–100 fM	0.06 fM
CdS	Human IgG	0.5–1000 ng mL^{-1}	0.16 ng mL^{-1}
ZnS–CdS	Cardiac troponin I	0.05 pg mL^{-1} to 0 ng mL^{-1}	1 fg/mL
ZnS–CdS–PbS	Human heart-type fatty-acid-binding protein	0.05 pg mL^{-1} to 50 ng mL^{-1}	3 fg/mL
ZnS–CdS–PbS	DNA	13.5–67.5 nM	0.27 nM

Ακόμα ευρέως χρησιμοποιούνται νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), για την ενίσχυση του σήματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, δεδομένου ότι είναι λειτουργικά και εύκολα στην παρασκευή τους καθώς επίσης και εξαιρετικά σταθερά (S.W. Zeng et al, 2011; V.K.K. Upadhyayula, 2012). Λόγω όμως της εξαιρετικής σταθερότητάς τους, η ηλεκτρο-οξείδωση των AuNPs συμβαίνει στην περιοχή κοντά στο όριο του δυναμικού, του υδατικού μέσου του ηλεκτρολύτη και συνεπώς εκεί όπου κυριαρχούν οι διαδικασίες στο υπόβαθρο. Για το λόγο αυτό, στις πρώτες αναφορές, τα δεσμευμένα AuNPs οξειδώθηκαν χημικά με την χρήση HBr/Br₂ (M. Dequaire et al, 2000), ή ηλεκτροχημικά με HCl (J.A.A. Ho et al, 2010). Πολλά

υποσχόμενο υλικό εμφανίζεται και το βισμούθιο (BiNPs) (**Εικόνα 17**). Το βισμούθιο έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην χρήση του σε αισθητήρες που βασίζονται στην ηλεκτροχημική απογύμνωση, την βολτομετρία και την αμπερομετρία (Mayorga-Martinez et al., 2013). Τα δυο κύρια χαρακτηριστικά που το καθιστούν ευρέως διαδεδομένο είναι η φιλικότητά του προς το περιβάλλον, σε σχέση με τον υδράργυρο που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο, καθώς επίσης και η εξαιρετική του απόδοση στον εντοπισμό βαρέων μετάλλων. Συνεπώς χάρη στα παραπάνω το Βισμούθιο έγινε ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υλικό αντί του υδραργύρου σε ότι αφορά την ηλεκτροχημική απογύμνωση (Arduini, F. et al., 2010).



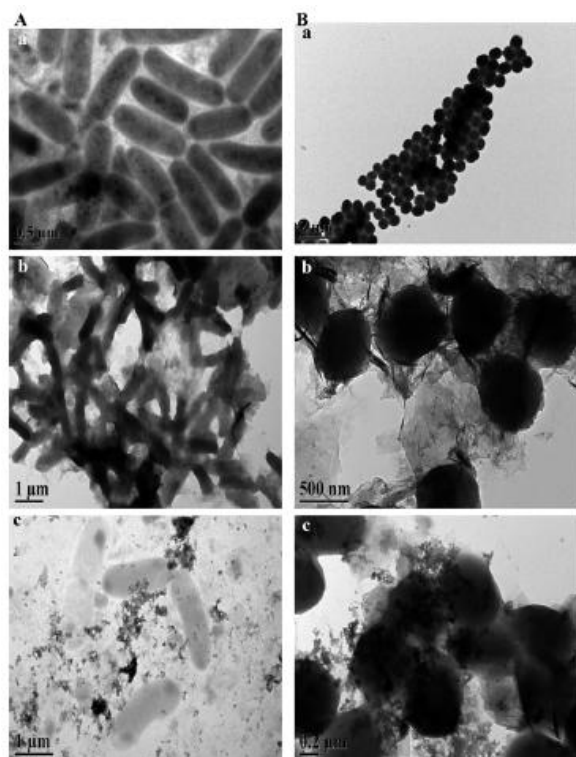
Εικόνα 17:(A) Εικόνα από μικροσκόπιο μεταφοράς ηλεκτρονίων (Transmission electron Microscopy) νανοσωματιδίων Βισμούθιου που συντίθενται με 0.1 g Bi(NO₃)₃, 0.27g KOH and 0.1 g PVP και (B)εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης των νανοσωματιδίων Βισμούθιου που βρίσκονται εντυπωμένα στην επιφάνεια ηλεκτροδίου άνθρακα (Miquel Cadavall et al., 2015).

1.3.8.Νανοϋλικά και αντιμικροβιακή δράση

Όπως προαναφέρθηκε τα νανοϋλικά διαθέτουν μεγάλο αριθμό ιδιοτήτων που τα καθιστούν χρήσιμες και πολύ-λειτουργικές πλατφόρμες. Ορισμένα από αυτά λόγω αυτών των ιδιοτήτων τους εμφανίζουν εκτός των άλλων και ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Η δράση αυτή μπορεί να είναι αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με την εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων με επακόλουθη μεταβολή του ηλεκτρονιακού φορτίου εκατέρωθεν της μεμβράνης και δημιουργίας οξειδωτικού στρες, όπως επίσης και μεταφορά του νανοσωματιδίου στο εσωτερικό του κυττάρου, λόγω του μικρού του μεγέθους επιφέροντας ανάλογες επιπτώσεις στην σωστή λειτουργία του. Ακόμα ορισμένα από τα νανοϋλικά αυτά μπορούν να σχηματίζουν αιχμηρές άκρες με τις οποίες να διαρρηγνύουν την πλασματική μεμβράνη των βακτηρίων και να επιφέρουν τον κυτταρικό θάνατο.

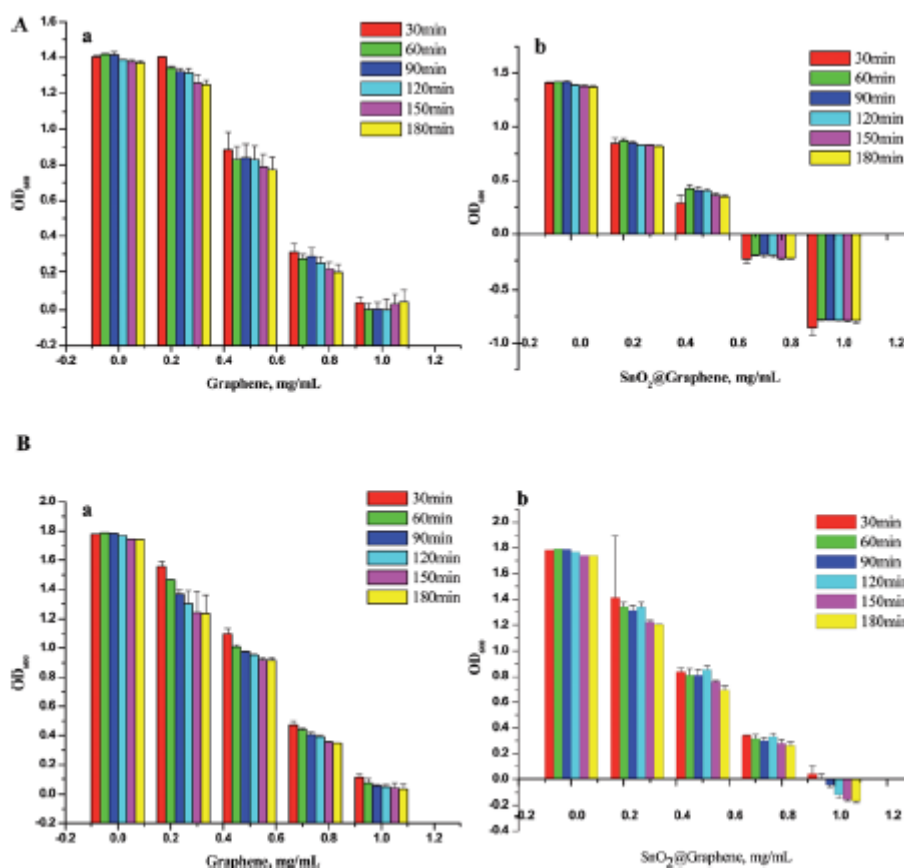
Παράδειγμα νανοϋλικών με αντιμικροβιακή δράση αποτελεί το γραφένιο. Το Γραφένιο εμφανίζει αντιμικροβιακές, κυτταροτοξικές και γονιδιοτοξικές ιδιότητες και για το λόγο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ναοϊατρική. Οι εντυπωσιακές ιδιότητές του, όπως η υψηλή ηλεκτρονιακή κινητικότητα, η υψηλή μηχανική αντοχή του, η ευελιξία και η

διαφάνειά του, έχει κατευθύνει πολλές ερευνητικές προσπάθειες για την παραγωγή του υλικού αυτού σε μεγάλη κλίμακα (Geim, 2009; Allen et al, 2010; Paton et al, 2014). Το γραφένιο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στις μεμβράνες των κυττάρων, μέσω της άμεσης επαφής του με τα βακτήρια, λόγω των αιχμηρών ακμών του (Akhavan et al, 2010; S. Park et al, 2010), (εικόνα 18). Η αντιμικροβιακή δράση του γραφενίου μπορεί να ενισχυθεί με διάφορες μεθόδους όπως, με ακτινοβολία εγγύς υπερύθρου και γλουταραλδεΐδη, τα οποία λειτουργούν ως παράγοντες αιχμαλωσίας των βακτηρίων και των δυο τύπων, Gram αρνητικά και Gram θετικά (Akhavan et al, 2013).



Εικόνα 18: Απεικόνιση (A) *P. aeruginosa* και (B) *S. aureus* μετά από επώαση με (a) 0, και 1.00 mg/ mL (b) γραφενίου και (c) γραφενίου με οξείδιο του κασσίτερου για 30 min (Sgum et al, 2013).

Πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από μελέτες του γραφενίου σε καλλιέργειες Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων, και ύστερα από μετρήσεις οπτικής πυκνότητας των καλλιεργειών αυτών στα 600nm, προκύπτει το συμπέρασμα ότι η οπτική πυκνότητα των καλλιεργειών μειώνεται με την πάροδο του χρόνου καθώς και την αύξηση του προστιθέμενου γραφενίου. Επειδή το γραφένιο συχνά μπορεί να συνδυάζεται και με άλλα νανοϋλικά, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με προσθήκη γραφενίου σε συνδυασμό με οξείδιο του κασσίτερου (SnO_2). Αυτό που παρατηρήθηκε από τις δοκιμές αυτές ήταν πως με την χρήση του γραφενίου σε συνδυασμό με το οξείδιο του κασσίτερου, η αντιμικροβιακή δράση αυξάνεται κατά ένα μεγάλο βαθμό (Εικόνα 19). Είναι έτσι προφανές, ότι λειτουργικά παράγωγα γραφενίου με άλλες νανοδομές, παρέχουν συνεργατικά αποτελέσματα με πρωτοφανείς δυνατότητες.



Εικόνα 19: Γραφική απεικόνιση των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας (A) *P. aeruginosa* και (B) *S. aureus* μετά από επώασή τους με α) γραφένιο και β) γραφένιο – οξειδίο του κασσίτερου (Sgum et al, 2013).

Οι προσπάθειες για να μελετηθεί η τοξικότητα του γραφενίου, όπως αναφέρθηκαν μέχρι τώρα, και τις επιπτώσεις του στα βακτήρια, έχουν οδηγήσει και σε αντιφατικά αποτελέσματα σχετικά με την πιθανή αντιβακτηριακή τους δραστηριότητα. Σε αντίθεση λοιπόν με τα παραπάνω αποτελέσματα, άλλες μελέτες έχουν δείξει πως δεν παρατηρείται καμία επίδραση των φύλλων γραφενίου στα βακτήρια (H. Chen et al, 2008; S. Park et al, 2010), ενώ φώτο-αδρανολοποίηση του *E.coli* αναφέρθηκε επί της επιφάνειας των σύνθετων γραφενίου-τιτανίου (TiO₂), (O. Akhavan et al, 2009). Οι επιπτώσεις των διαφόρων τύπων των υλικών του γραφενίου, δηλαδή γραφίτη, οξειδίο του γραφίτη, οξειδίο του γραφενίου (GO) και μειωμένο οξειδίο του γραφενίου (RGO) σε ένα βακτηριακό μοντέλο (*Escherichia coli*) έχουν επίσης αξιολογηθεί (S. Liu et al, 2011). Η υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση παρατηρήθηκε με χρήση GO ακολουθούμενο από το RGO, και πιστεύεται ότι η δράση αυτή, ταυτίζεται υποχρεωτικά με τη σοβαρότητα της βλάβης στη μεμβράνη των βακτηρίων και στο επακόλουθο οξειδωτικό στρες που προκαλείται. Σε αντίθεση με τις μελέτες αυτές, άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν ότι η βακτηριακή ανάπτυξη ήταν ταχύτερη σε καλλιέργειες παρουσία GO, και έδειξαν μια καλύτερη πρόσφυση και προσκόλληση σε μεμβράνες που περιείχαν GO από ότι σε άλλες χωρίς GO, γεγονός που υποδηλώνει ότι το GO δεν είναι ούτε βακτηριοκτόνο ούτε βακτηριοστατικό (O. N. Ruiz et al, 2011). Ομοίως έχει αναφερθεί το GO όταν προστεθεί σε θρεπτικό μέσο, που έχει προηγουμένως εμβολιαστεί με βακτήρια, δεν αναστέλλει την βακτηριακή ανάπτυξη σε σύγκριση με πιάτα όπου το

θρεπτικό μέσο περιέχει γραφένιο με άργυρο, όπου παρατηρείται αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης. Πρέπει να σημειωθεί όμως εδώ, ότι ο άργυρος είναι γνωστός για την αντιμικροβιακή του δραστηριότητα (V. K. Sharma et al, 2009) και έτσι το αποτέλεσμα της αναστολής αυτής να μην μπορεί να αποδοθεί στο GO.

1.4.Σκοπός της διπλωματικής εργασίας

Η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία αποσκοπεί στην μελέτη:

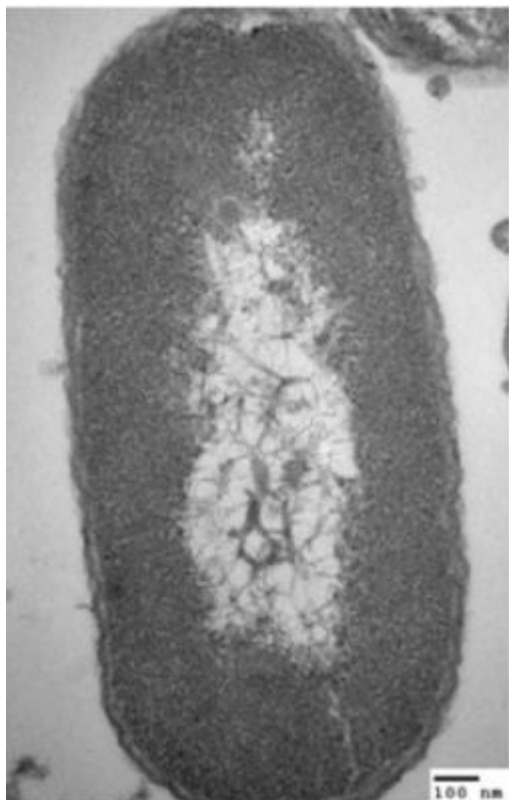
- ✓ της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, και των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αυτών και των βακτηριακών κυττάρων
- ✓ των επιδράσεων των νανοϋλικών αυτών στην δραστικότητα ορισμένων ενζύμων.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1.Βακτηριακά Στελέχη

2.1.1.BL21DE3

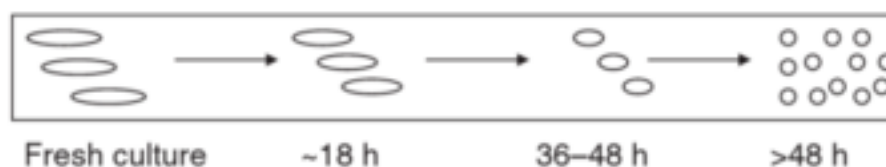
Το στέλεχος BL21DE3 (**Εικόνα 20**) προέρχεται από το στέλεχος *E. coli* B και στερείται της Iον πρωτεάσης καθώς επίσης και της ompT μεμβρανικής πρωτεάσης. Η μεμβρανική αυτή ompT πρωτεάση έχει την ικανότητα να μειώνει τις εκφρασμένες πρωτεΐνες. Τα BL21 (DE3) κύτταρα περιέχουν το γονίδιο της T7 RNA πολυμεράσης που ελέγχεται από τον υποκινητή *lacUV5* στο χρωμοσωμικό τους DNA. Η T7 RNA πολυμεράση εκφράζεται κατά την προσθήκη ισοπροπυλο-1-θειο-β-D-γαλακτοπυρανοσίδης (IPTG), η οποία επάγει υψηλά ποσοστά έκφρασης της πρωτεΐνης υπό τον έλεγχο του T7 υποκινητή. Ακόμα τα BL21DE3 κύτταρα φέρουν το λ (DE3) λυσογόνο. Οι ανασυνδυασμένες πρωτεΐνες οι οποίες είναι μη τοξικές για τα *E.coli* κύτταρα γενικά εκφράζονται σε πολύ υψηλά επίπεδα στα BL21(DE3) κύτταρα. Συνοψίζοντας ο γονότυπος των BL21(DE3) κυττάρων είναι *E. coli* str. B F⁻ *ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S)*. Αυτό το πρότυπο μοντέλο βακτηριακού στελέχους ανήκει στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων.



Εικόνα 20: Απεικόνιση ενός BL21(DE3) βακτηριακού κυττάρου. Έχει διάμετρο 1μm και μήκος 2μm και ανήκει στην κατηγορία των αρνητικών κατά Gram βακτηρίων (Wu. W et al.,2011).

2.1.2. *Brevibacterium*

Το στέλεχος *Brevibacterium* ανήκει στην οικογένεια *Brevibacteriaceae* καθώς επίσης και στην τάξη των Ακτινομυκηταλών (*Actinomycetales*). Είναι Gram θετικοί οργανισμοί και έχουν απομονωθεί από διάφορους οικότοπους όπως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα πουλερικά, καθιζήματα, το έδαφος, διάφορα τμήματα του ανθρώπινου σώματος, τα έντομα αλλά και από τα υδάτινα περιβάλλοντα. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η οικογένεια αυτή των βακτηρίων εμφανίζει μεγάλη ετερογένεια διότι μέχρι στιγμής το γένος *Brevibacterium* περιλαμβάνει είκοσι πέντε είδη. Τα βακτήρια της οικογένειας αυτής είναι μη κινούμενα, δεν σχηματίζουν σπόρια και είναι υποχρεωτικά αερόβια με θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξης από 21° C έως 28° C. Τα στελέχη εκείνα τα οποία έχουν απομονωθεί από το ανθρώπινο δέρμα ή τα πουλερικά έχουν βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37° C. Η μορφολογία τους παρομοιάζει με εκείνη των απλών ράβδων, σε ζεύγη ή σε αλυσίδες από 0.6 έως 2.5μm. Μετά από χρονικό διάστημα δύο ημερών επώασής τους σε θρεπτικό μέσο, οι ραβδοειδείς αποικίες αντικαθίσταται από κόκκους μεγέθους από 0,6 έως 1μm (**Εικόνα 21**). Οι ραβδοειδείς αποικίες είναι εκείνες που σχηματίζονται κατά την εκθετική φάση ενώ οι κόκκοι κατά την στατική φάση ανάπτυξης. Η αλλαγή της κυτταρικής μορφολογίας συνδέεται με την συγκέντρωση μεθειονίνης, το pH του μέσου ανάπτυξης, την θερμοκρασία ανάπτυξης καθώς επίσης και των αερισμό της καλλιέργειας. Όταν αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό μέσο, οι αποικίες είναι αδιαφανείς και μικρές (0,5 έως 1mm διάμετρο) και είναι κυρτές με γυαλιστερή και λεία επιφάνεια. Μετά από 4 έως 7 ημέρες επώασης οι αποικίες μεγαλώνουν και η διάμετρός τους αυξάνεται 2-4mm. Κατά την διάρκεια της ανάπτυξής τους με την αερόβια αναπνοή ο οργανισμός αυτός σχηματίζει μια κυτταρική μεμβράνη που σχετίζεται με καροτενοειδή χρωστική, η οποία παρουσιάζει ποικίλους χρωματισμούς αποικιών από λευκές μέχρι βαθύ κόκκινες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στις συνθήκες ανάπτυξης του οργανισμού. Εδώ πρέπει να σημειωθεί ότι το *Brevibacterium* είναι θερμοκρασιακά ασταθής οργανισμός, είναι ανθεκτικός στην ξηρασία και επιβιώνει υπό συνθήκες έλλειψης υδατανθράκων. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι οι κυτταρικοί πολυσακχαρίτες παραμένουν σταθεροί μετά από 56 ημέρες πλήρης απουσίας θρεπτικών όπως επίσης σταθερός μένει και ο βασικός αναπνευστικός ρυθμός τους (0,003% CO₂ h⁻¹). Ο χαμηλός ενδογενής μεταβολισμός του *Brevibacterium* παίζει σημαντικό ρόλο στον χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης των περισσότερων ειδών. Τα βακτήρια αυτά επίσης ανάγουν τα νιτρικά σε νιτρώδη, είναι θετικά σε λιπάσες, καταλάσες και DNAσες ενώ είναι αρνητικά σε ουρεάσες και ποικίλουν σε οξειδάσες. Επίσης το κυτταρικό τους τοίχωμα περιέχει τοιχοϊκά οξέα τα οποία διαθέτουν ουδέτερα σάκχαρα, άμινο-σάκχαρα καθώς επίσης και σάκχαρα αλκοολών. Τα συστατικά αυτά κατέχουν κύριο ρόλο στην στήριξη του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.



Εικόνα 21: Απεικόνιση της αλλαγής στην μορφολογία των κυττάρων του βακτηριακού στελέχους *Brevibacterium* κατά την διάρκεια της 48ωρης ανάπτυξής του (Encyclopedia of Food Microbiology).

2.1.3. *Corynebacterium*

Το βακτηριακό στέλεχος *Corynebacterium* ανήκει στην τάξη των Ακτινομυκηταλών και την οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Πρόκειται για αερόβια ή προαιρετικά αερόβια, Gram θετικά και θετικά σε καταλάσες βακτήρια τα οποία διαθέτουν ένα ραβδοειδές σχήμα και σε μερικές περιπτώσεις είναι ελαφρώς κυρτά. Συχνά αποκαλούνται και ως «διφθεροειδή» και απαντώνται στην μικροχλωρίδα των ζώων καθώς επίσης και του ανθρώπου (John R. Murthy, 1996). Γενικά έχουν χαρακτηριστεί ως αβλαβή, όμως συνεχώς αυξάνεται ο αριθμός των σημαντικών μολύνσεων των οποίων αποτελούν αιτιολογία (Πίνακας 2) καθώς μπορούν εκμεταλλευόμενα την άτυπη πρόσβασή τους σε ιστούς να προκαλέσουν ασθένειες στον άνθρωπο καθώς επίσης και αποδυνάμωση της άμυνας του ξενιστή (Kathryn Bernard, 2012). Χαρακτηριστική ασθένεια που προκαλούν στον άνθρωπο αποτελεί η διφθερίτιδα. Η διφθερίτιδα χαρακτηρίζεται από πονόλαιμο, χαμηλό πυρετό, και την εμφάνιση μιας μεμβράνης προσκολλημένης στον φάρυγγα, στις αμυγδαλές ή/και στην ρινική κοιλότητα. Ηπιότερη μορφή της μπορεί να περιορίζεται στο δέρμα ενώ λιγότερο κοινές συνέπειές της αποτελούν οι μυοκαρδίτιδα και η περιφερική νευροπάθεια (John R. Murthy, 1996).

Πίνακας 2: Συγκεντρωτικός πίνακας ειδών του βακτηρίου *Corynebacterium* και των ασθενειών που προκαλούν.

Είδος	Λοιμώξεις σε ανθρώπους ή ζώα/Θέση ανάκτησης
<i>C. accolens</i> (Λιπόφιλο)	οστεομυελίτιδα και απόστημα /Αίμα
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>afermentans</i> (FR)	Απόστημα/Αίμα
<i>C. afermentans</i> subsp. <i>lipophilum</i> (FR) (Λιπόφιλο)	Απόστημα/Αίμα
<i>C. ammoniagenes</i>	Περιττώματα ζώων
<i>C. amycolatum</i> (Ζωονοσογόνο) (FR)	Κυτταρίτιδα, πληγές, σήψη, ενδοκαρδίτιδα, περιτονίτιδα/ Αίμα και αποστειρωμένους χώρους
<i>C. appendicis</i> (Λιπόφιλο)	Απόστημα
<i>C. argenteratense</i>	Λαιμός, Αναπνευστικό σύστημα, καλλιέργειες αίματος
<i>C. atypicum</i>	-
<i>C. aurimucosum</i>	Επιπλοκές εγκυμοσύνης/καλλιέργειες αίματος, ουρογεννητικές περιοχές
<i>C. auris</i>	Αυτιά υγιών και ασθενών
<i>C. bovis</i> (Λιπόφιλο) (FR)	Μαστίτιδα σε αγελάδες/ Καλλιέργειες ανθρώπινου αίματος
<i>C. canis</i>	Πληγές μετά από δάγκωμα σκύλου
<i>C. confusum</i>	Απόστημα/οστά και αίμα
<i>C. coyleae</i>	Απόστημα, σηψαιμία, έλκος / Καλλιέργειες αίματος
<i>C. diphtheriae</i> (FR)	Διφθερίτιδα, απόστημα, δερματικές βλάβες/ λαιμό και καλλιέργειες αίματος
<i>C. durum</i>	Λαιμό και καλλιέργειες αίματος

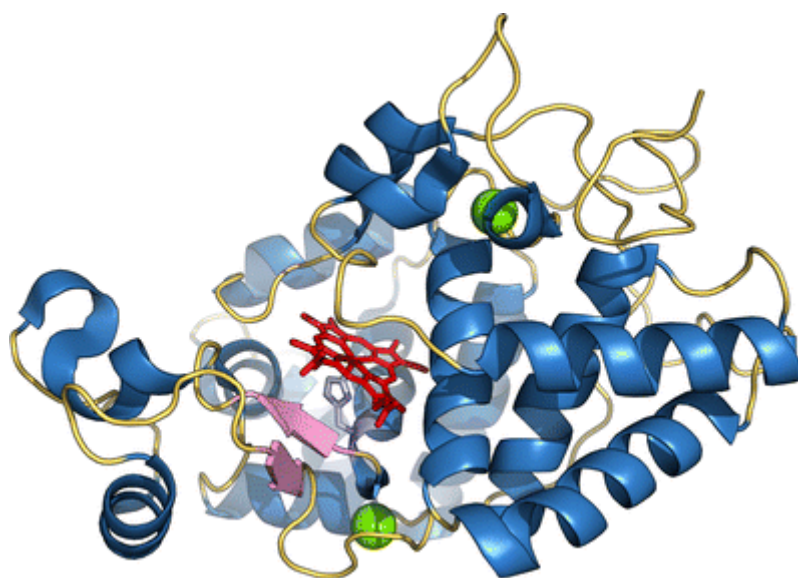
<i>C. falsenii</i>	Καλλιέργειες αίματος, στόμα του αετού
<i>C. freiburgense</i>	Πληγές στον άνθρωπο μετά από δάγκωμα σκύλου
<i>C. freneyi</i>	Πληγές, απόστημα έλκος/ Σπέρμα, γεννητικό σύστημα Θηλυκού, αίμα
<i>C. glucuronolyticum</i>	Προστατίτιδα, Ουρηθρίτιδα/ Ουρογεννητικό σύστημα Αρσενικού(άνθρωπο και χοίρους), σπέρμα, αίμα, περιτοναϊκό υγρό
<i>C. hansenii</i>	Πύον
<i>C. imitans</i>	Φαρυγγίτιδα/ Καλλιέργειες αίματος, λαιμό
<i>C. jeikeium</i>	Ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία, λοιμώξεις λόγω προσθετικών συσκευών/καλλιέργειες αίματος, βαλβίδες καρδιάς, μυελό των οστών, χολή
<i>C. kroppenstedtii</i>	Κοκκιωματώδη μαστίτιδα, απόστημα του μαστού και ωτίτιδα
<i>C. kutscheri</i>	Μόλυνση δέρματος στον άνθρωπο μετά από δάγκωμα αρουραίου/ ποντίκια και αρουραίους
<i>C. lipophiloflavum</i>	Κολπική έκκριση
<i>C. macginleyi</i> (Λιπόφιλο) (FR)	Επιπεφυκίτιδα, οφθαλμικές λοιμώξεις, βακτηριαίμια, ενδοκαρδίτιδα, αορτικό απόστημα/ ούρα, περιοχή τραχειοστομίας
<i>C. massiliense</i>	Υγρό από ορθοπεδικό τεχνητό μέλος
<i>C. mastitidis-like</i> (Λιπόφιλο)	Καταρράκτη, διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια/οφθαλμικές περιοχές
<i>C. matruchotii</i>	Στοματική κοιλότητα
<i>C. minutissimum</i> (FR)	Βακτηριαίμια, Μηνιγγίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, κυτταρίτιδα, αποστήματα, περιτονίτιδα, πυελονεφρίτιδα
<i>C. mucifaciens</i>	Βακτηριαίμια, τραύματα, απόστημα, σπηλαιώδη πνευμονία/αρθρικό υγρό, περιτοναϊκό υγρό
<i>C. mycetoides</i>	Έλκος δέρματος
<i>C. pilbarensis</i>	-
<i>C. propinquum</i>	Ενδοκαρδίτιδα / καλλιέργειες αίματος, δείγματα από την αναπνευστική οδό, υπεζωκοτική συλλογή
<i>C. pseudodiphtheriticum</i> (FR)	Εξιδρωματική φαρυγγίτιδα, πληγές, κερατίτιδα, επιπεφυκίτιδα / αυτί, αίμα, περιτοναϊκό υγρό
<i>C. pseudotuberculosis</i>	Λεμφαδενίτιδα, Διφθερίτιδα

2.2. Ένζυμα

Λόγω των ιδιοτήτων των νανοϋλικών που αναφέραμε και προηγουμένως, δημιουργήθηκε το ερώτημα για τις επιπτώσεις αυτών στον τομέα της βιοκατάλυσης. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν ορισμένα ένζυμα για να διασαφηνιστεί η επίδραση των νανοϋλικών στις ενζυμικές αντιδράσεις που αυτά καταλύουν.

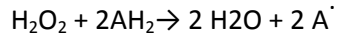
2.2.1. Horseradish peroxidase (HRP)

Το ένζυμο Horseradish peroxidase (HRP), βρίσκεται στις ρίζες του ραπανιού και χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα της Βιοχημείας, κυρίως για την ικανότητά του να ενισχύει ένα ασθενές σήμα και να αυξάνει την ανιχνευσιμότητα ενός μορίου-στόχου. Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην διαγνωστική και την ιστοχημεία όπου διαθέτει μέχρι και σήμερα σημαντικό ρόλο σε πολλές εφαρμογές. Οι περισσότερες έρευνες για την HRP έχουν ως αντικείμενο μελέτης τον χαρακτηρισμό του ενζύμου, την ανασυνδυασμένη παραγωγή του σε διάφορα συστήματα έκφρασης και τέλος τις εφαρμογές της και την βελτιστοποίησή της. Οι μελέτες για το ένζυμο HRP έχουν επικεντρωθεί στο ισοένζυμο C της HRP (Näätsaari et al. 2014). Το ένζυμο HRP περιέχει μια αίμη (**Εικόνα 22**) η οποία χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου για την οξειδωση μιας μεγάλης ποικιλίας οργανικών και ανόργανων ενώσεων. Η HRP αποτελεί ένα πολυπεπτιδίο 308 αμινοξικών καταλοίπων η αλληλουχία του οποίου προσδιορίστηκε από τον Welinder (1976). Το N-τερματικό άκρο του πεπτιδίου μπλοκάρεται από πυρο-γλουταμινικό ενώ το C-τερματικό άκρο είναι ετερογενές με μερικά μόρια να στερούνται το τερματικό κατάλοιπο Ser308 (Nigel C. Veitch, 2004). Διαθέτει τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης 11 έως 91, 44 έως 49, 97 έως 301 και 177 έως 209 και μια γέφυρα άλατος μεταξύ Asp99 και Arg123.



Εικόνα 22: Τρισδιάστατη απεικόνιση της δομής της HRP (ισοένζυμο C), μέσω ακτίνων Χ. Είναι εμφανής η ομάδα της αίμης (κόκκινο τμήμα), το οποίο βρίσκεται μεταξύ των περιοχών που διαθέτουν ένα άτομο ασβεστίου (πράσινες σφαίρες). (Kraimer et al., 2015).

Ο μηχανισμός δράσης της HRP στις περισσότερες αντιδράσεις που καταλύει συνοψίζεται στην παρακάτω αντίδραση:

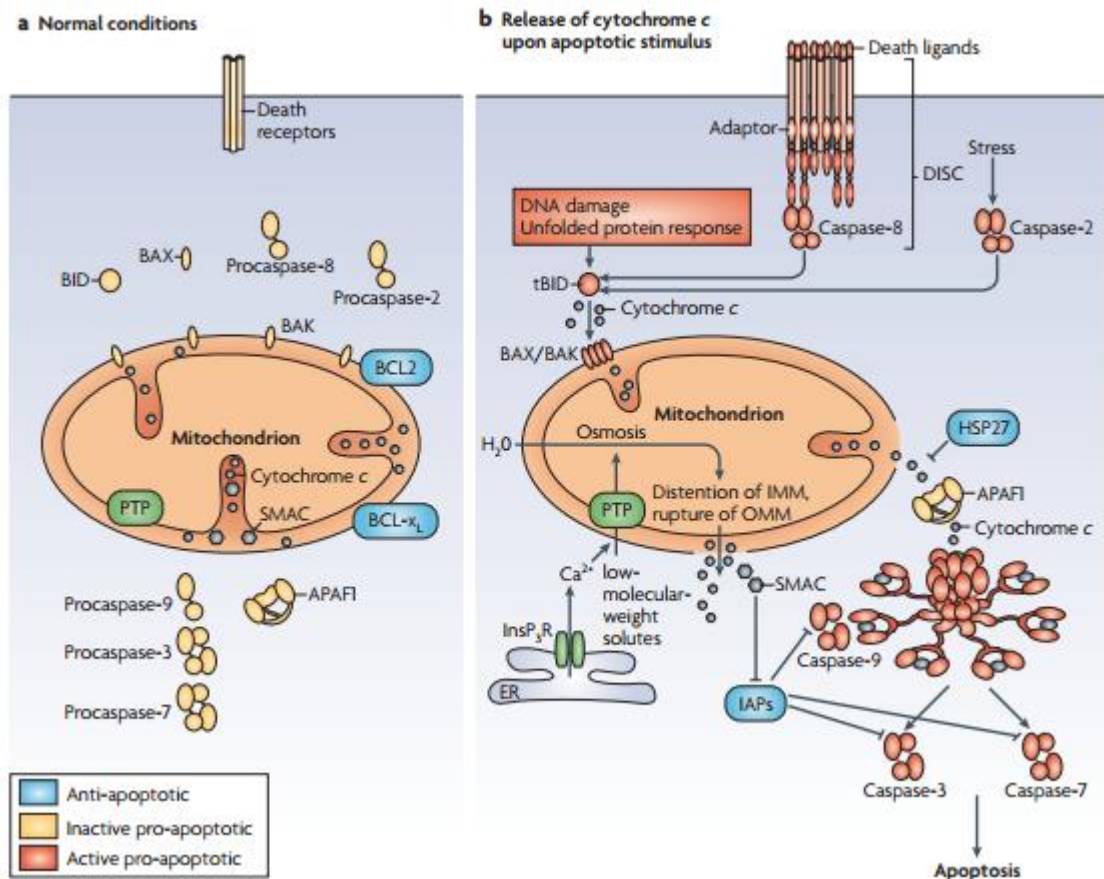


Όπου AH_2 και 2A^\cdot αντιπροσωπεύουν την μείωση του υποστρώματος και τον επακόλουθο σχηματισμό των προϊόντων. Η μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου προς νερό δεν αποτελεί την κύρια λειτουργία όλων των φυτικών υπεροξειδασών όπως το ισοένζυμο HRP C. Άλλα ένζυμα συμπεριλαμβανομένης της ασκορβικής υπεροξειδάσης χρησιμοποιούνται από τα φυτά για την ρύθμιση των επιπέδων του ενδοκυτταρικού υπεροξειδίου του υδρογόνου.

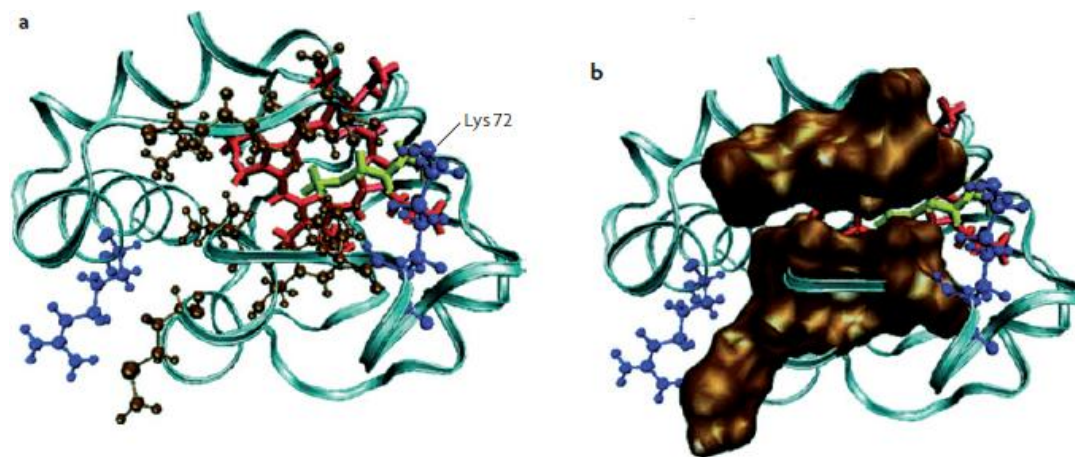
2.2.2.Κυτόχρωμα C

Η απόπτωση, που αποτελεί τον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο είναι μια σημαντική διαδικασία η οποία ρυθμίζεται από πρωτεάσες Κυστεΐνης οι οποίες ονομάζονται κασπάσες. Οι κασπάσες αυτές με την σειρά τους ρυθμίζονται και ελέγχονται από ορισμένους παράγοντες συμπεριλαμβανομένου και του κυτοχρώματος C. Το κυτόχρωμα C αποτελεί μια πρωτεΐνη 13KDa, η οποία περιέχει μια αίμη και κωδικοποιείται από γονίδιο του πυρήνα (Yong-Ling et al., 2008). Φυσιολογικά εντοπίζεται στους χώρους εντός των ακρολοφιών της εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων μέσω της οποίας συμμετέχει στην μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, χρησιμοποιώντας την αίμη που διαθέτει ως οξειδοαναγωγικό ενδιάμεσο. Έτσι υπό φυσιολογικές συνθήκες το κυτόχρωμα C παραμένει απομονωμένο στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου (**Εικόνα 23a**). Αντίθετα σε απόκριση του κυττάρου σε ερεθίσματα όπως η καταστροφή του DNA, η λανθασμένη αναδίπλωση πρωτεϊνών και το στρες, μια σειρά από γεγονότα λαμβάνουν χώρα με τελικό αποτέλεσμα τον σχηματισμό πόρων στην μιτοχονδριακή μεμβράνη και την έξοδο του κυτοχρώματος από αυτό. Το κυτόχρωμα C που βρίσκεται πλέον διάσπαρτο στο κυτοσόλιο δεσμεύει τον APAF1 επιτρέποντας τον επταμερισμό του και την πρόσδεσή του στην προκασπάση-9 και ενεργοποιεί τις κασπάσες 9, 3 και 7 (**Εικόνα 23b**).

Η δομή του κυτοχρώματος C αποτελείται κυρίως από ένα υδροφοβικό κανάλι και μια Lys72. Η Lys72 είναι ιδιαίτερα σημαντική για την σταθερότητα του συμπλέγματος κυτόχρωμαC-APAF1. Το κυτόχρωμα C αγκυροβολεί στο εσωτερικό της μιτοχονδριακής μεμβράνης μέσω του ανιονικού φωσφολιπιδίου καρδιολιπίνη ((Yong-Ling et al., 2008) (**Εικόνα 24**).



Εικόνα23: Ρόλος του κυτοχρώματος C στον προγραμματισμένο κυτταρικό θάνατο. α) Σε φυσιολογικές συνθήκες το κυτόχρωμα C βρίσκεται απομονωμένο στα μιτοχόνδρια. β) Σε απόκριση του κυττάρου σε αποπτωτικά ερεθίσματα το κυτόχρωμα C μέσω πόρων απελευθερώνεται στο κυτοσόλιο όπου προσδένεται στον APF1 και επιτρέπει τον επταμερισμό του και την σύνδεση με την προκασπάση-9. Αποτέλεσμα είναι η ενεργοποίηση των κασπαών 9, 3 και 7 που οδηγούν το κύτταρο στην απόπτωση (Yong-Ling et al., 2008).



Εικόνα 24: Δομή του κυτοχρώματος C. α) Τα βασικά δομικά στοιχεία του κυτοχρώματος C είναι το υδρόφοβο κανάλι του (καφέ) καθώς επίσης και η Lys72. β) Σύμφωνα με το μοντέλο πλήρωσης χώρου παρατηρούμε τις δυο υδροφοβικές επιμηκύνσεις που συγκροτούν το υδρόφοβο κανάλι του κυτοχρώματος C (Yong-Ling et al., 2008).

2.2.3.Οξειδάση της Γλυκόζης

Η οξειδάση της Γλυκόζης αποτελεί ένα ένζυμο με ιδιαίτερη σημασία λόγω της υψηλής ειδικής δραστηριότητάς της, το χαμηλό κόστος της και την αξιοπιστία της. Πρόκειται για μια σφαιρική πρωτεΐνη η οποία εξάγεται από δυο είδη μυκήτων το *Aspergillus* και *Penicillium*. Η αντίδραση την οποία καταλύει είναι η οξείδωση της γλυκόζης σε Dγλυκονο-1,5-λακτόνη, χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο ως αποδέκτη ηλεκτρονίων (Barbara Mecheri et al, 2015). Διαθέτει δυο πανομοιότυπες υπομονάδες όπου η κάθε μια αναδιπλώνεται σε δυο πεδία (**Εικόνα 25**). Από αυτά τα δυο πεδία το ένα εξ αυτών συνδέεται με το υπόστρωμα ενώ το άλλο συνδέεται μη ομοιοπολικά με το διουκλεοτίδιο φλαβίνη-αδενίνη στο οξειδοαναγωγικό κέντρο. Η δραστηκή πλευρά του ενζύμου αυτού περιέχει αμινοξέα τα οποία συμμετέχουν στην κατάλυση όπως η His516 και Glu412 τα οποία συνδέονται με δεσμούς Υδρογόνου με την His559. Τα αμινοξέα αυτά εντοπίζονται «θαμμένα» κάτω από την επιφάνεια της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα το κέντρο οξειδοαναγωγής να είναι προστατευμένο και η οξειδάση της Γλυκόζης να μην μπορεί να θεωρηθεί ικανή για την άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων σε ένα ηλεκτρόδιο.



Εικόνα 25: Απεικόνιση της δομής της οξειδάσης της Γλυκόζης η οποία λήφθηκε με την μέθοδο περίθλασης ακτίνων Χ (Διαδικτυακή πηγή: <http://www.rcsb.org>, RSCB Protein Data Bank).

2.2.4. Καταλάση

Η καταλάση είναι ένα ένζυμο το οποίο καταλύει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου σε νερό και οξυγόνο. Η καταλάση συναντάται κατεξοχήν σε οργανισμούς που ζουν σε περιβάλλον με οξυγόνο. Η δράση της είναι η παρεμπόδιση της συσσώρευσης υπεροξειδίου προστατεύοντας έτσι κυτταρικά οργανίδια και ιστούς από τις ζημιогόνες επιδράσεις του υπεροξειδίου, το οποίο συγκεντρώνεται ως προϊόν πολλών μεταβολικών αντιδράσεων στους οργανισμούς. Στα θηλαστικά η καταλάση βρίσκεται κυρίως στο ήπαρ. Η καταλάση αποτελεί ένα τετραμερές τεσσάρων αλυσίδων, όπου η κάθε μια από αυτές διαθέτει μέγεθος 500 αμινοξικών καταλοίπων. Για να είναι δυνατή η αντίδρασή της με το υπεροξείδιο διαθέτει μια αίμη ενώ το βέλτιστο pH για να καταλύει την αντίδραση διάσπασης του υπεροξειδίου κυμαίνεται από pH 4 έως 11 (**Εικόνα 26**).



Εικόνα 26: Δομή του ενζύμου καταλάση η οποία καταλύει την αντίδραση διάσπασης του Υπεροξειδίου σε νερό και οξυγόνο. (Διαδικτυακή πηγή: RSCB Protein Data Bank).

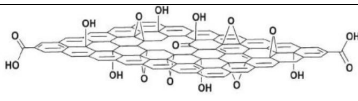
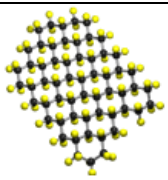
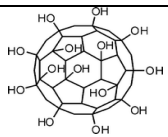

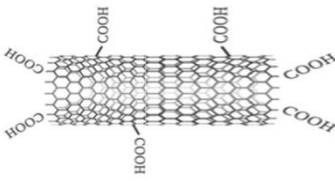
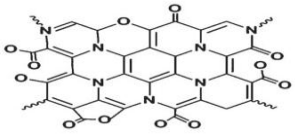
2.2.5. Λακκάση

Η Λακκάση αποτελεί ένα ένζυμο που διαθέτει έξι πιθανές θέσεις πρόσδεσης του χαλκού και ανακαλύφθηκε στο θαλάσσιο βακτήριο *Marinomonas mediterranea* (Sanchez-Amat A et al., 2001). Μπορεί επίσης να συμμετέχει στην αποικοδόμηση της λιγνίνης και έτσι μπορεί να συμπεριληφθεί στην γενική κατηγορία των λιγνινασών. Επίσης χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο μπορεί να καταλύει την αντίδραση οξειδωσης του δακτυλίου αρωματικών και μη ενώσεων (Thurston, 1994). Πιο συγκεκριμένα η Λακκάση καταλύει την αναγωγή των τεσσάρων ηλεκτρονίων του μοριακού οξυγόνου προς παραγωγή νερού με ένα ηλεκτρόνιο από την οξείδωση ενός μειούμενου υποστρώματος. Παρότι η Λακκάση δείχνει να προτιμά κυρίως φαινολικά υποστρώματα, το φάσμα των υποστρωμάτων της Λακκάσης είναι αρκετά μεγάλο.

2.3.Νανοδομές

Για την μελέτη της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης καθώς επίσης και της δράσης στο πεδίο της βιοκατάλυσης, χρησιμοποιήθηκε ένας αριθμός νανοδομών όπως φαίνεται στον **Πίνακα 3**.

Πίνακας 3: Συγκεντρωτικός πίνακας των νανοδομών που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της επίδρασής τους σε βιολογικά συστήματα.

Νανοϋλικά	Δομή
*Οξείδιο του Γραφενίου (GO)	
*Οργανικά τροποποιημένο Οξείδιο του Γραφενίου(org-GO)	-
Φθοριωμένο Οξείδιο του Γραφενίου (Fluorated GO)	
*Φουλερένιο (C ₆₀ (OH) ₂₄)	
*Βρωμιωμένο Φουλερένιο (C ₆₀ Br ₂₄)	
*Οξειδωμένοι πολύτοιχοι νανοσωλήνες άνθρακα (OXMWCNTs)	
Κυβοειδή	
Κυβοειδή+Παλλάδιο (Cub-Pd)	-
Κυβοειδή+Χαλκό (Cub-Cu)	-

*Γερμανάνιο (GeH)	
*Βουτυλιομένο Γερμανάνιο	Γερμανάνιο με βουτύλια
Λαπονίτης	
Αδαμαντιλαμίνη	
C-dots	
MoS+Se ₂	
Ni-phylo-silicate	-
NbSe ₂	
CNDs-Adam	Δίσκοι, σαν τη μορφή του γραφενίου, και πάνω έχουν αδαμαντάνιο
PSLM-Na ⁺	-
PLM-3	-
SLM-2	-
SSLM	-

Σε μια προσπάθεια ομαδοποίησης όλων των νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός τους σε δυο κατηγορίες: σε εκείνα με βάση τον άνθρακα και σε εκείνα με βάση άλλα στοιχεία.

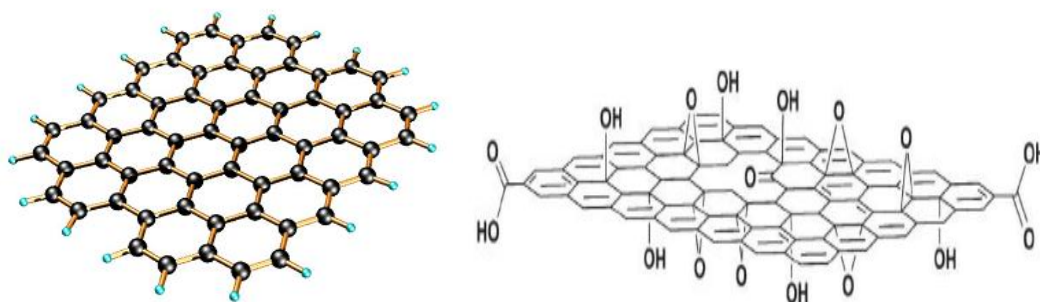
2.3.1.Γραφένιο

Ένα από τα σημαντικότερα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία είναι το Γραφένιο. Το Γραφένιο ανήκει στην οικογένεια των δισδιάστατων υλικών τα οποία είναι υλικά που συνήθως σχηματίζονται από πολυεπίπεδα κρυσταλλικών στερεών. Το υλικό αυτό αρχικά τράβηξε την προσοχή των επιστημόνων λόγω των μοναδικών ιδιοτήτων του όπως το μικρό του πάχος, η υψηλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητά του και η ψηλή μηχανική του αντοχή. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών αποτέλεσε ένα πολλά υποσχόμενο νανοϋλικό για ποικίλες εφαρμογές όπως:

- ✓ Στην κατασκευή ηλεκτρονικών διατάξεων, στο χώρο της νανοηλεκτρονικής (Schedin, F. et al., 2007 ; Mazdak, T., 2009).
- ✓ Ως διαφανή αγώγιμα ηλεκτρόδια για την χρήση τους σε φωτοβολταϊκά αλλά και σε διατάξεις υγρών κρυστάλλων (Li, X. et al., 2009 ; Cai, W. et al., 2009).
- ✓ Ως χημικοί αισθητήρες για την ανίχνευση μορίων αλλά και DNA (Akhavan et al., 2012).
- ✓ Ως φορείς φαρμάκων (Zhang et al., 2010).
- ✓ Ως αντιμικροβιακά φάρμακα λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους (Liu et al., 2011).

Η ανάπτυξη διαδικασιών για να διευκολυνθεί η αποφλοιώση του γραφενίου, καθώς και η σταθεροποίηση των φύλλων μετά την αποφλοιώση είναι σημαντική στην προώθηση της πολυμορφίας των εφαρμογών του γραφενίου. Επίσης σημαντικό είναι να αποφευχθεί η χρήση των σκληρών χημικών αντιδραστηρίων ή η παραγωγή των τοξικών υποπροϊόντων, για την ανάπτυξη βιώσιμων τεχνολογιών για το μέλλον. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναφερθεί για την παραγωγή του γραφενίου, από χημική εναπόθεση ατμών (Reina et al, 2003), μείωση του οξειδίου του γραφίτη (Stankovich et al, 2007), μικρομηχανική διάσπαση του γραφίτη (Novoselov et al, 2004), υπερ-υπερήχηση σε έναν οργανικό διαλύτη όπως N-μεθυλ-2-πυρρολιδόνη (Hernandez et al , 2008), ή σε νερό με την προσθήκη ενός επιφανειοδραστικού (Zhang et al, 2010; D. W. Lee et al, 2011; X. Chen et al, 2012; Zhang et al, 2013), με διάλυση σε οξύ (Behabtu et al, 2010), και με τη χρήση δυνάμεων υψηλής διάτμησης (X. Chen, 2012). Πρόσφατα πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του γραφενίου πολλαπλών στρώσεων, σε νερό χρησιμοποιώντας διατμήσεις μέσα σε ένα λεπτό φιλμ μιας ειδικής συσκευής, χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη κάποιου σταθεροποιητικού επιφανειοδραστικού (Wahid et al, 2013).

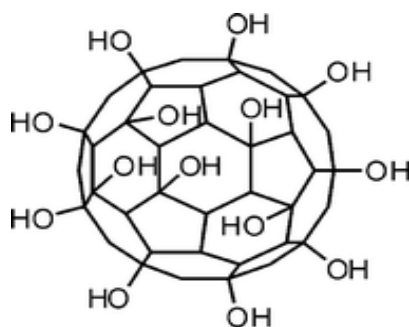
Σε ότι αφορά την δομή του, το Γραφένιο αποτελείται από ένα δισδιάστατο μονοατομικού πάχους φύλλο ανθράκων σε εξαγωνική διάταξη και με υβριδισμό sp^2 (Εικόνα 27). Το μονοατομικό αυτό φύλλο ανθράκων αποτελεί και την βασικό δομικό στοιχείο του γραφίτη, των νανοσωλήνων άνθρακα και των φουλερενίων. Διάφορες τροποποιήσεις στο υλικό του Γραφενίου οδηγούν στην παραγωγή νέων τροποποιημένων υλικών με ποικίλες ιδιότητες. Παράδειγμα αποτελεί η οξείδωση του γραφίτη με άμεση παραγωγή οξειδίου του Γραφενίου που αποτελεί ένα φυλλόμορφο υλικό το οποίο διαθέτει στην επιφάνειά του μεγάλη ποσότητα οξυγόνου υπό την μορφή λειτουργικών ομάδων (Εικόνα 27). Οι λειτουργικές αυτές ομάδες προσδίδουν υδροφιλικότητα στο οξείδιο του Γραφενίου με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η διασπορά του στο νερό αλλά και σε άλλους πολικούς διαλύτες (Liang, Y. et al., 2009).



Εικόνα 27: Ιδανική μορφή ενός φύλλου γραφενίου (αριστερά) και ενός φύλλου οξειδίου του Γραφενίου (Δεξιά)

2.3.2. Φουλερένια

Τα Φουλερένια αποτελούν μια ομάδα ενώσεων, που αντιπροσωπεύουν μια κατηγορία μορίων σε σχήμα σφαίρας κατασκευασμένο εξ ολοκλήρου από άτομα άνθρακα. Τα φουλερένια που ανακαλύφθηκαν από τον Peter Harris και τους συνεργάτες του, είναι εντελώς κλειστές και συγκριτικά μεγάλες αρωματικές δομές, καθώς περιέχουν περίπου 6.000 έως 10.000 άτομα άνθρακα το καθένα (Djordjevic et al., 2006). Το μόριο του φουλερενίου έχει το σχήμα ενός εικοσάεδρου, που περιέχει 12 πεντάγωνα και 20 εξαγωνα, στο οποίο κάθε άτομο άνθρακα είναι συνδεδεμένο με τρία άλλα γειτονικά άτομα μέσω sp^2 υβριδισμού (**Εικόνα 28**) (Kratschmer et al., 1990). Τα Φουλερένια είναι υδρόφοβα μόρια και για το λόγο αυτό διαλύονται καλύτερα σε οργανικούς διαλύτες, έτσι πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές περιορίζονται από την εξαιρετικά φτωχή τους διαλυτότητα σε πολικούς διαλύτες. Διαφορετικές μέθοδοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της μειωμένης υδατοδιαλυτότητας του φουλερενίου, όπως η προσθήκη τεχνητών ή φυσικών επιφανειοδραστικών μορίων (Deguchi et al., 2001), ή μέσω μακροχρόνιας ανάδευσης σε νερό (Brant et al., 2006), και την ενσωμάτωση υδατοδιαλυτών υπερμοριακών δομών όπως η α -κυκλοδεξτρίνη (Makha et al., 2006). Επιπρόσθετα, λιποσώματα με ενσωματωμένα φουλερένια (C₆₀) και φωτοδραστικά C₆₀ παρασκευάστηκαν επίσης προκειμένου να διευκολυνθεί η κακή διαλυτότητα του μόριου αυτού (Husebo et al., 2004). Ωστόσο, αυτές οι διαδικασίες οδήγησαν σε σχηματισμό σταθερών συσσωματωμάτων, νερού και C₆₀ (Zhao et al., 2008).



Εικόνα 28: Χαρακτηριστική δομή ενός Φουλερενίου.

2.3.3. Άλλα Νανοϋλικά

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εκτός των υλικών με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν και άλλα νανοϋλικά όπως το Γερμανάνιο και τροποποίηση αυτού, το Βουτυλιωμένο Γερμανάνιο καθώς επίσης και νανοδομές όπως ο Λαπονίτης, τα Κυβοειδή και της ομάδας των φυλλόμορφων αργύλων καθώς και τροποποιήσεις αυτών όπως τα νανοϋλικών με φωσφορικές και θειϊκές ομάδες τα PSLM-Na⁺, PLM-3, PLM-2 και SSLM.

Άργιλοι

Οι φυλλόμορφοι Άργιλοι ή Πηλοί αποτελούν φυλλόμορφα αργιλοπυριτικά ορυκτά με ορισμένη κρυσταλλική δομή. Διαθέτουν ένα συνδυασμό ιδιοτήτων κατιοανταλλαγής, ένθεσης και διόγκωσης και για αυτό το λόγο αποτελούν μοναδικά υλικά (Γουρνής 1988). Το βασικό δομικό στοιχείο τους αποτελείται από δυο τετραεδρικά φύλλα πυριτίου Si(O,OH)₄ και από ένα οκταεδρικό φύλλο μετάλλου M(O,OH)₆, όπου M: Al³⁺, Mg²⁺, Fe^{2+,3+}, το οποίο παρεμβάλλεται μεταξύ των τετραεδρικών φύλλων. Η κύρια δομική μονάδα των φυλλόμορφων αργίλων είναι το τετραεδρικό φύλλο οξειδίου του πυριτίου (SiO₄). Το άτομο του Si (με ατομική ακτίνα r=0,24 Å) βρίσκεται στο κέντρο του τετραέδρου στις τέσσερις κορυφές του οποίου, βρίσκεται τοποθετημένο ένα άτομο οξυγόνου (με ατομική ακτίνα r=1,4 Å).

Διχαλκογονίδια Μετάλλων Μετάπτωσης

Τα διχαλκογονίδια των μετάλλων μετάπτωσης αντιπροσωπεύουν μια μεγάλη οικογένεια φυλλόμορφων υλικών με γενικό τύπο MX₂, όπου το M είναι ένα μέταλλο μετάπτωσης που βρίσκεται στην IV, V ή VI ομάδα του περιοδικού πίνακα, (όπως για παράδειγμα τα στοιχεία Ti, V, Nb, Mo, Hf, Ta, W), και το X είναι ένα άτομο χαλκογόνου (chalcogen) (S, Se ή Te). Σε αντίθεση με το γραφένιο τα υλικά αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως καταλύτες χωρίς καμία τροποποίηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το Θειούχο Μολυβδένιο (MoS₂), το οποίο εμφανίζει υψηλή δραστηριότητα ως καταλύτης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην επιστήμη του υδρογόνου (Hinnemann, B. et al., 2005 ; Li, Y. et al., 2011).

Κυβοειδή

Πρόκειται για πορώδη άνθρακες, μια από τις πιο κοινές κατηγορίες των πορώδη στερεών για τον βιολογικό διαχωρισμό των ατμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μια νέα κατηγορία πορώδους κύβων άνθρακα (PCC), με εξαιρετικές υδρόφιλες ιδιότητες οι οποίες βοηθούν στην μεγιστοποίηση των συνεργατικών επιδράσεων μεταξύ της ετερογένειας της επιφάνειάς τους και της αρχιτεκτονικής των μικροπόρων (Guang-Ping Hao et al., 2014). Δομικά έχει επιτευχθεί μια στενή κατανομή των μικροπόρων στα PCC σε μια διάμετρο 7.6. Η χημική μελέτη των PCC δείχνει έναν υψηλό αριθμό ετεροατόμων σε ενεργές θέσεις, με αναλογίες N : C και C : O 1:5 και 2:5 αντίστοιχα (Guang-Ping Hao et al., 2014).

Γερμανάνιο

Το γερμανάνιο είναι ένα νέο δισδιάστατο υλικό με άμεσο ενεργειακό χάσμα (direct band gap) (Kaltsas, D., et al., 2013). Επιπλέον, είναι σταθερό στον αέρα και παρουσιάζει υψηλή κινητικότητα (ευκινησία) ηλεκτρονίων της τάξης των ~18000 cm² V⁻¹ s⁻¹, σε θερμοκρασία δωματίου καθιστώντας το ιδανικό υλικό για ηλεκτρονικές και οπτικο-ηλεκτρονικές εφαρμογές. Η παραπάνω τιμή της κινητικότητας των ηλεκτρονίων είναι 5 φορές υψηλότερη

από εκείνη του στερεού γερμανίου και 10 φορές μεγαλύτερη από το πυρίτιο, γεγονός που υποδεικνύει πως αποτελεί ένα πολύ υποσχόμενο υλικό στον τομέα της φωτοκατάλυσης⁹¹. Διαθέτει δομή παρόμοια με εκείνη του γραφίτη με την διαφορά ότι τα δυο εξαγωνικά υπό-πλέγματά του είναι ελαφρώς μετατοπισμένα κατακόρυφα κατά 0.64 Å.

Συμπερασματικά, το γερμανάνιο είναι ένας μονοατομικός κρύσταλλος (single layer crystal) που αποτελείται από γερμάνιο με ένα υδρογόνο συνδεδεμένο στην κατεύθυνση Z για κάθε άτομο γερμανίου. Στην επιστήμη των υλικών, τέτοια υλικά αποτελούν μια νέα γενιά ημιαγωγών με δυνητικές εφαρμογές σε ηλεκτρονικά κυκλώματα υπολογιστών, ηλιακά κύτταρα, φωτοκατάλυση, κβαντικούς υπολογιστές.

2.3.4. Σύνθεση Γερμανανίου

Η σύνθεση του Γερμανανίου αλλά και όλων των νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε από τα μέλη του εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών της σχολής Θετικών Επιστημών, του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών. Η σύνθεση του γερμανανίου περιλαμβάνει αρχικά την παρασκευή της φάσης β -CaGe₂ από ασβέστιο (Ca) και γερμάνιο (Ge). Η σύνθεση της φάσης αυτής πραγματοποιείται με κατάλληλες στοιχειομετρικές ποσότητες ασβεστίου και γερμανίου, οι οποίες τοποθετούνται και σφραγίζονται σε σωλήνα χαλαζία (quartz) πάνω σε κυλινδρικό χωνευτήρι αλούμινας. Η διαδικασία διεξάγεται σε glovebox σε αδρανή ατμόσφαιρα N₂. Το μίγμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία 1025 °C και στη συνέχεια ψύχεται για 7 ημέρες. Το γερμανάνιο συντέθηκε με τη μέθοδο της τοποτακτικής απένθεσης (topotatic deintercalation) της φάσης β -CaGe₂ σε υδατικό διάλυμα υδροφθορίου, HF (40% w/w) σε θερμοκρασία δωματίου για λίγα λεπτά (υπό ανάδευση). Ακολουθεί έκπλυση με νερό και μεθανόλη και στην συνέχεια ξήρανση σε συνθήκες περιβάλλοντος.

Εκτός από την σύνθεση των σωματιδίων Γερμανανίου, τα μέλη του εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών προχώρησαν και στην κατασκευή υμενίου επιστρωμένου με Γερμανάνιο. Για την κατασκευή των υμενίων η μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε είναι συνοπτικά η εξής:

- Τροποποίηση υδρόφοβων υποστρωμάτων σε υδρόφιλα: Γίνεται εμβάπτιση των υμενίων σε μια δεξαμενή LB όπου προηγουμένως διασπείρεται σε αυτήν οκταδεκυλαμίνη (ODA), διαλυμένη σε μικτό σύστημα διαλυτών το οποίο αποτελείται από μεθανόλη (MeOH) και χλωροφόρμιο (CH₃Cl) σε αναλογία 9:1.
- Ισόθερμες καμπύλες αιωρημάτων Γερμανανίου σε διάφορες συγκεντρώσεις: Προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων γερμανανίου. Πλήρης συμπίεση σχηματιζόμενων μονοστρωμάτων γερμανανίου στην διεπιφάνεια υγρού αέρα, με ρυθμό 5mm/sec και καταγραφή της ισοθερμικής καμπύλης στον ηλεκτρονικό υπολογιστή του οργάνου για κάθε ποσότητα από τα αιωρήματα γερμανανίου.
- Σχηματισμός φυλλόμορφων μονομοριακών υμενίων Γερμανανίου: Προσθήκη διάφορων συγκεντρώσεων γερμανανίου και οριζόντια εμβάπτιση υδρόφιλων και υδρόφοβων υποστρωμάτων. Έκπλυση των υποστρωμάτων με υπερκάρθαρο νερό και στέγνωμα σε αέριο άζωτο.

2.4. Ενζυμικά Συστήματα

Για τον έλεγχο των επιδράσεων των προαναφερθέντων νάνο-δομών σε ενζυμικά συστήματα εργαστήκαμε ως εξής:

- ✓ Υπολογισμός ταχύτητας με την οποία τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν καταλύουν τις αντιδράσεις
- ✓ Προσθήκη νανοϋλικού και εκ νέου μέτρηση της ταχύτητας της αντίδρασης
- ✓ Σύγκριση των αποτελεσμάτων

HRP

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από την HRP, σχεδιάστηκε η παρακάτω αντίδραση και μετρήθηκε η απορρόφησή της για 10min στα 492nm:

- ✓ 2.085 U/ml HRP
- ✓ 50mM ABTS
- ✓ 10mM H₂O₂
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M και pH 7.0

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές υπό τις ίδιες συνθήκες και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η HRP. Έπειτα επαναλήφθηκε η ίδια αντίδραση με προσθήκη νανοϋλικού 5, 10, 25, 50,75 και 100μg/ml. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης των αντιδράσεων για 10min στα 492nm. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοϋλικού.

Κυτόχρωμα C

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από το κυτόχρωμα C, σχεδιάστηκε η παρακάτω αντίδραση και μετρήθηκε η απορρόφησή της για 10min στα 405nm:

- ✓ 0,15625 U/ml Κυτόχρωμα C
- ✓ 100mM ABTS
- ✓ 500mM H₂O₂
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM και pH 7.0

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές υπό τις ίδιες συνθήκες και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το Κυτόχρωμα C. Έπειτα επαναλήφθηκε η ίδια αντίδραση με προσθήκη νανοϋλικού 5, 10, 25, 50,75 και 100μg/ml. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης των αντιδράσεων για 10min στα 405nm. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοϋλικού.

Οξειδάση της Γλυκόζης

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από την Οξειδάση της Γλυκόζης, σχεδιάστηκε η παρακάτω αντίδραση και μετρήθηκε η απορρόφησή της για 10min στα 550nm:

- ✓ 3.57 U/ml HRP
- ✓ 0,098 u/ml GOx
- ✓ 131mM Glucose
- ✓ 0,2mM 4-Αμινοαντιπυρίνη
- ✓ 10mM 4-Υδροβενζοϊκό Οξύ
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M και pH 7.0

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές υπό τις ίδιες συνθήκες και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η Οξειδάση της Γλυκόζης. Έπειτα επαναλήφθηκε η ίδια αντίδραση με προσθήκη νανοϋλικού 5, 10, 25, 50,75 και 100μg/ml. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης των αντιδράσεων για 10min στα 550nm. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοϋλικού.

Καταλάση

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από την Καταλάση, σχεδιάστηκε η παρακάτω αντίδραση και μετρήθηκε η απορρόφησή της για 10min στα 240nm:

- ✓ 500 U/ml Καταλάση
- ✓ 10% H₂O₂
- ✓ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50mM και pH 7.0

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές υπό τις ίδιες συνθήκες και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η καταλάση. Έπειτα επαναλήφθηκε η ίδια αντίδραση με προσθήκη νανοϋλικού 5, 10, 25, 50,75 και 100μg/ml. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης των αντιδράσεων για 10min στα 240nm. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοϋλικού.

Λακκάση

Για τον υπολογισμό της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης που καταλύεται από την Λακκάση, σχεδιάστηκε η παρακάτω αντίδραση και μετρήθηκε η απορρόφησή της για 10min στα 415nm:

- ✓ 0,85 μg/ml Λακκάση
- ✓ 1mM ABTS
- ✓ Οξικό Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1M και pH 4.58

Η αντίδραση αυτή επαναλήφθηκε τρεις φορές υπό τις ίδιες συνθήκες και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η Λακκάση. Έπειτα επαναλήφθηκε η ίδια αντίδραση με προσθήκη νανοϋλικού 5, 10, 25, 50,75 και 100μg/ml. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απορρόφησης των αντιδράσεων για 10min στα 415nm. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές και από τα αποτελέσματα που προέκυψαν υπολογίστηκε η ταχύτητα της αντίδρασης παρουσία των διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοϋλικού.

2.5. Προκαλλιέργειες

Επιλογή μονής καλλιέργειας που αναπτύχθηκε στο τρυβλίο και εμβολιασμός της σε 5ml LB. Επώαση της υγρής καλλιέργειας στους 37 °C O/N (over night) υπό ανάδευση 180 rpm.

2.6. Πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης

Για την μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης των νανοδομών που προαναφέρθηκαν είναι απαραίτητη η μελέτη της ανάπτυξης των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν. Έτσι πραγματοποιήθηκε 24ωρη παρακολούθηση της ανάπτυξης των στελεχών BL21DE3, *Brevibacterium* και *Corynebacterium*. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης ανάπτυξης για κάθε βακτηριακό στέλεχος εργαστήκαμε ως εξής:

- I. Εμβολιασμός φρέσκου θρεπτικού μέσου 5ml LB από τις προκαλλιέργειες (η νέα καλλιέργεια να έχει απορρόφηση περίπου 0,080).
- II. Επώαση των καλλιεργιών στους 37 °C, υπό ανάδευση 180 rpm και μέτρηση της απορρόφησής τους κάθε ώρα για 24 ώρες.
- III. Κατασκευή της καμπύλης βακτηριακής ανάπτυξης.

2.7. Συσχέτιση βακτηριακού πληθυσμού με την απορρόφηση

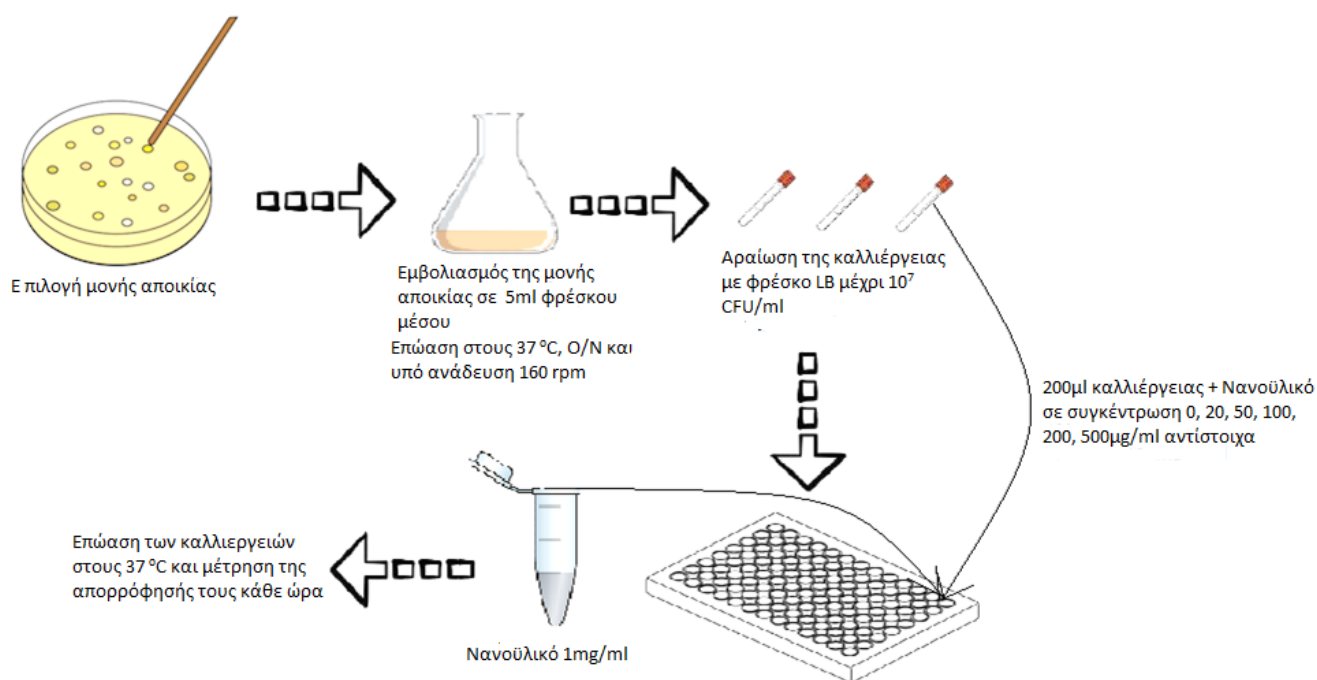
Για να συσχετίσουμε τον βακτηριακό πληθυσμό σε μια αναπτυσσόμενη καλλιέργεια με την απορρόφηση που αυτή έχει σε δεδομένο χρόνο ανάπτυξης εργαστήκαμε ως εξής:

- I. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμός της σε 5ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB.
- II. Επώαση της καλλιέργειας στους 37 °C, O/N και υπό ανάδευση 180 rpm.
- III. Μέτρηση της απορρόφησης της προκαλλιέργειας στα 600nm και αραιώσή της με φρέσκο θρεπτικό μέσο LB ώστε να έχει απορρόφηση OD~ 0,080.
- IV. Επώαση της νέας καλλιέργειας στους 37 °C για 2 ώρες, υπό ανάδευση 180 rpm.
- V. Διαδοχικές αραιώσεις μέχρι 10⁸ της καλλιέργειας.
- VI. Εμβολιασμός 100μl σε στερεό φρέσκο θρεπτικό μέσο LB (πιάτα Petri) από τις διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας 10³, 10⁵ και 10⁸.
- VII. Επώαση των πιάτων Petri στους 37 °C, O/N.
- VIII. Μέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα πιάτα Petri.

2.8. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης παρουσία Θρεπτικού Μέσου

Αρχικά υπήρξε η σκέψη να γίνει προσθήκη των νανοδομών σε αναπτυσσόμενες καλλιέργειες και ύστερα από σύγκριση με φυσιολογικές καλλιέργειες (απουσία νανοϋλικού) να αξιολογηθεί η επίπτωση της παρουσίας των νανοδομών στον ρυθμό ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών. Όπως φαίνεται και στην **εικόνα 29**, η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- I. Επιλογή μονής αποικίας και εμβολιασμό της σε 5ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB.
- II. Επώαση της καλλιέργειας στους 37 °C, O/N, υπό ανάδευση 180rpm.
- III. Διαδοχικές αραιώσεις της καλλιέργειας μέχρι 10^7 CFU/ml.
- IV. Φόρτωση 200μl από την αραιωμένη καλλιέργεια σε πηγαδάκι πλάκας Eliza όπου γίνεται και η προσθήκη του νανοϋλικού στην κατάλληλη συγκέντρωση (0, 20, 50, 100, 200 και 500μg/ml).
- V. Επώαση των μικρο-καλλιεργείων στους 37 °C, μέτρηση της απορρόφησής τους κάθε ώρα.
- VI. Κατασκευή καμπύλης βακτηριακής ανάπτυξης.



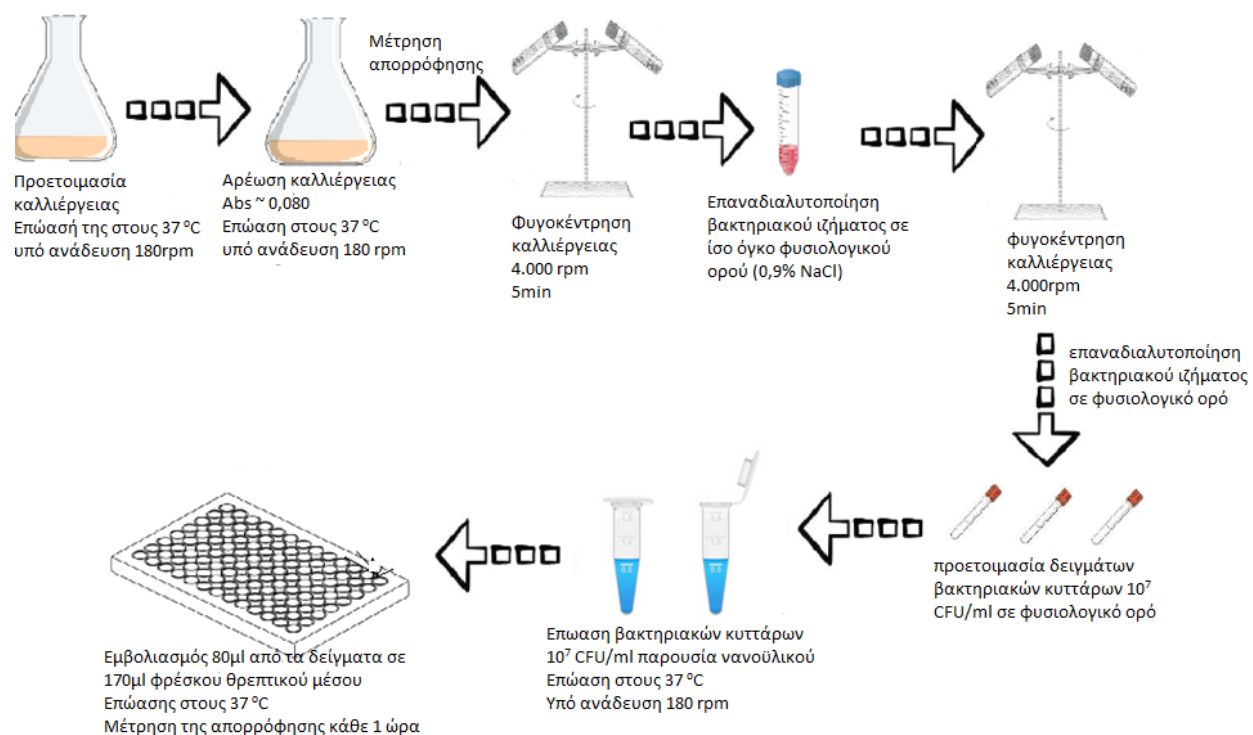
Εικόνα 29: Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης νανοδομών παρουσία θρεπτικού μέσου.

2.9. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης απουσία Θρεπτικού Μέσου

Μια δεύτερη προσέγγιση για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των νανοδομών είναι μετά από αλληλεπίδραση νανοϋλικών – βακτηριακών κυττάρων απουσία θρεπτικού

μέσου, έτσι ώστε να μην υπάρχει δυνατότητα πολλαπλασιασμού των βακτηρίων και ο αρχικός αριθμός τους να αλληλεπιδρά με τα σωματίδια των νανοδομών. Η προσέγγιση αυτή έγκειται στον περιορισμό της δράσης των νανοδομών σε περίπτωση πολλαπλασιασμού του βακτηριακού πληθυσμού, καθώς πιθανόν σε ορισμένες περιπτώσεις να υπάρχει συγκεκριμένη αναλογία νανοσωματιδίων – βακτηρίων για να μπορέσουν να οδηγήσουν τον βακτηριακό πληθυσμό στο θάνατο. Υπό την σκέψη αυτή χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις νανοϋλικών σε ένα σταθερό βακτηριακό πληθυσμό παρουσία φυσιολογικού ορού αντί θρεπτικού μέσου. Τα βήματα που ακολουθήθηκαν στην μεθοδολογία αυτή ήταν τα εξής (**Εικόνα 30**):

- I. Προετοιμασία προκαλλιέργειας βακτηρίων: εμβολιασμός μονής αποικίας σε 5ml φρέσκου θρεπτικού μέσου.
- II. Επώση της προκαλλιέργειας στους 37 °C, O/N και υπό ανάδευση 180 rpm.
- III. Μέτρηση της απορρόφησης της προκαλλιέργειας στα 600nm και αραιώσή της με φρέσκο θρεπτικό μέσο ώστε να έχει απορρόφηση περίπου 0,080.
- IV. Επώση της νέας καλλιέργειας στους 37 °C για 2 ώρες, ώστε να αποκτήσει απορρόφηση από 0,2 έως 0,5.
- V. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας για 5 λεπτά στις 4.000 rpm.
- VI. Απόρριψη υπερκείμενου και επανα-διαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος σε φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl).
- VII. Διαδοχικές πλύσεις του βακτηριακού ιζήματος με φυσιολογικό ορό, μέσω φυγοκέντρησης και τελική επανα-διαλυτοποίησή του σε ίσο όγκο (με αυτόν της καλλιέργειας) φυσιολογικού ορού.
- VIII. Επώση βακτηριακών κυττάρων 10^7 CFU/ml παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων νανοϋλικών από 0 έως 50μg/ml, στους 37 °C, υπό ανάδευση 180 rpm για 12 ώρες.
- IX. Εμβολιασμός 80μl από τα παραπάνω δείγματα σε 170μl φρέσκου θρεπτικού μέσου LB, σε πηγαδάκι πλάκας Eliza.
- X. Επώση των μικροκαλλιιεργειών στους 37 °C και μέτρηση της απορρόφησής τους (Eliza), κάθε μια ώρα.
- XI. Κατασκευή της καμπύλης ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών παρουσία των νανοϋλικών και σύγκριση με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης αυτών.



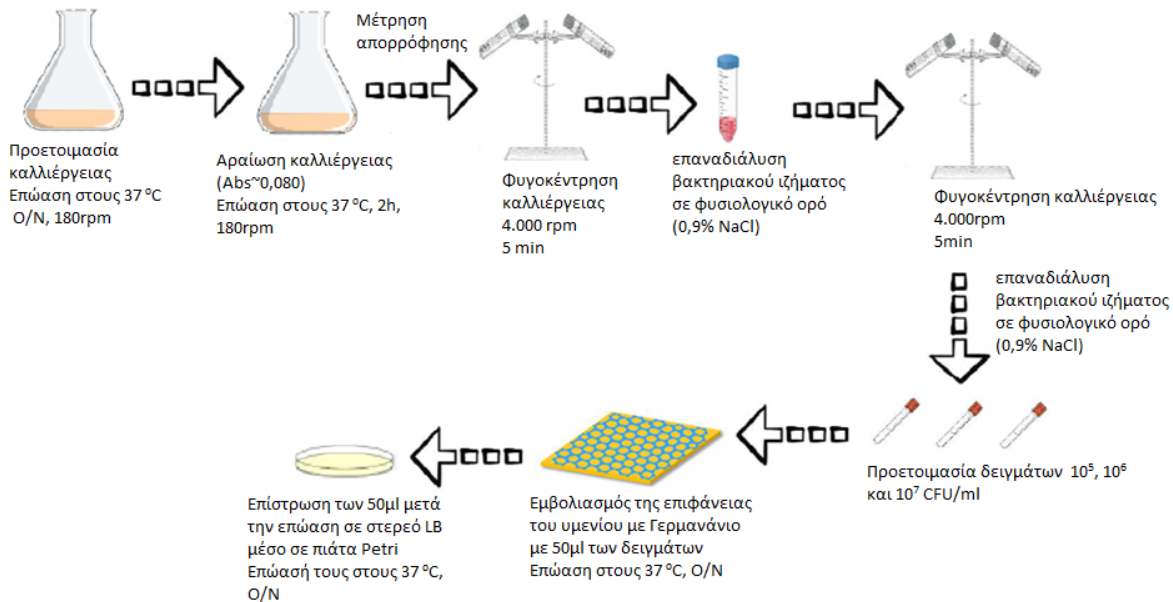
Εικόνα 30: Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των νανούλικών απουσία θρεπτικού μέσου.

2.10. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης μέσω υμενίων Γραφενίου

Εκτός από τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης του Γερμανάνιου σε μορφή σκόνης, ελέγχθηκε και η πιθανή του αντιμικροβιακή δράση σε μορφή υμενίων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής(**Εικόνα 31**):

- I. Εμβολιασμός μονής αποικίας σε 5ml φρέσκου θρεπτικού μέσου LB και επώαση της καλλιέργειας στους 37 °C, O/N, υπό ανάδευση 180 rpm.
- II. Αραιώση της προκαλλιέργειας με φρέσκο θρεπτικό μέσο LB ώστε να έχει απορρόφηση περίπου 0,080.
- III. Επώαση της νέας καλλιέργειας στους 37 °C, για 2 ώρες, υπό ανάδευση 180 rpm.
- IV. Φυγοκέντρηση της καλλιέργειας και απόρριψη του υπερκείμενου.
- V. Επαναδιαλυτοποίηση του βακτηριακού ιζήματος με φυσιολογικό ορό (0,9% NaCl) ίσου όγκου.
- VI. Πλύσεις της καλλιέργειας μέσω φυγοκέντρησης με φυσιολογικό ορό και τελική επαναδιαλυτοποίησή του σε ίσο όγκο φυσιολογικού ορού.
- VII. Προετοιμασία δειγμάτων με 10^5 , 10^6 και 10^7 CFU/ml.
- VIII. Εμβολιασμός 50μl από τα παραπάνω δείγματα στην επιφάνεια του υμενίου με Γερμανάνιο.
- IX. Επώαση του υμενίου με τα βακτηριακά κύτταρα στην επιφάνειά του στους 37 °C, για 12 ώρες.

- X. Επίστρωση των 50μl που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου με το Γερμανάνιο, σε πιάτα Petri με στερεό υπόστρωμα LB.
- XI. Επώαση των πιάτων Petri στους 37 °C, O/N.
- XII. Καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν με το δείγμα ελέγχου που δεν επώαστηκε στην επιφάνεια υμενίου Γερμανανίου αλλά επάνω σε γυάλινη επιφάνεια.



Εικόνα 31: Μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης υμενίων Γερμανάνιου.

2.11.Αντιμικροβιακή δράση Γερμανάνιου παρουσία αντιβιοτικού

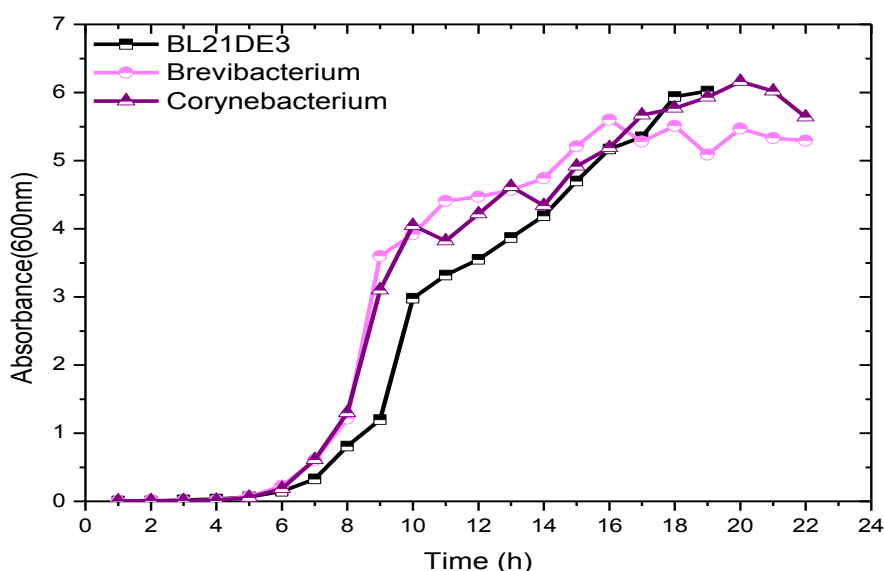
Για να ελεγχθεί αν μπορεί να υπάρξει συνεργατική δράση μεταξύ του Γερμανανίου και κάποιου αντιβιοτικού έναντι της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών, μελετήσαμε ποια συγκέντρωση του αντιβιοτικού καναμυκίνη δεν είναι ικανή να προκαλέσει τον θάνατο των βακτηρίων. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του αντιβιοτικού, που προστέθηκε σε βακτηριακές καλλιέργειες και παρακολούθηθηκε η ανάπτυξη αυτών. Έπειτα η συγκέντρωση εκείνη που δεν προκάλεσε το θάνατο των βακτηριακών κυττάρων χρησιμοποιήθηκε σε βακτηριακές καλλιέργειες παρουσία του Γερμανανίου και παρακολούθηθηκε η βακτηριακή ανάπτυξη σύμφωνα με την ίδια μεθοδολογία για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των νανοδομών όπως αυτή περιγράφηκε στην ενότητα 2.9.

3.Αποτελέσματα

3.1.Αντιμικροβιακή δράση νανοδομών

3.1.1.Πρότυπες καμπύλες ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών

Μετά την παρακολούθηση της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 2.6 της προηγούμενης ενότητας, κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες ανάπτυξης για κάθε βακτηριακό στέλεχος (**Εικόνα 32**). Από τις καμπύλες ανάπτυξης εξήχθησαν ορισμένα συμπεράσματα όπως το ότι η βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας που αντιστοιχεί περίπου στο μέσο της εκθετικής φάσης της καμπύλης βακτηριακής ανάπτυξης είναι για όλα τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (BL21DE3, *Brevibacterium* και *Corynebacterium*), περίπου $OD \sim 3.0$. Επίσης από τις καμπύλες ανάπτυξης παρατηρούμε ότι την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας επιτυγχάνεται από τα στελέχη αυτά περίπου στις 10 ώρες επώασης των καλλιεργειών στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.



Εικόνα 32: Γραφική απεικόνιση των πρότυπων καμπυλών ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Και για τα τρία βακτηριακά στελέχη, BL21DE3 (μαύρο), *Brevibacterium* (ροζ) και *Corynebacterium* (μωβ) η βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας είναι η τιμή 3.0. Η τιμή αυτή, όπως προκύπτει από το παραπάνω γράφημα, επιτυγχάνεται σε 10 ώρες επώασης των καλλιεργειών στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξής τους. Τέλος φαίνεται επίσης ότι στις 16 ώρες επώασης τα βακτηριακά στελέχη εισέρχονται στην στατική φάση ανάπτυξης.

3.1.2. Συσχέτιση απορρόφησης καλλιέργειας με βακτηριακό πληθυσμό

Για την συσχέτιση του βακτηριακού πληθυσμού με την αντίστοιχη απορρόφηση της καλλιέργειας εργαστήκαμε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.7 της προηγούμενης ενότητας και τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά την καταμέτρηση των αποικιών στα τρυβλία ήταν τα εξής:

BL21DE3

Η καλλιέργεια του στελέχους BL21DE3 όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη ενότητα επωάστηκε για 2 ώρες. Όταν ολοκληρώθηκε η επώαση των 2 ωρών έγινε φωτομέτρηση της καλλιέργειας και η οπτική πυκνότητά της ήταν $OD \sim 0.612$. Από την επίστρωση των τρυβλίων με 100μl της καλλιέργειας μετά από διαδοχικές αραιώσεις έγινε καταμέτρηση των αποικιών στο τρυβλίο με αραιώση 10^9 . Από την καταμέτρηση αυτή προέκυψε ότι 322 αποικίες αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο αυτό. Αυτό υποδηλώνει ότι αναπτύχθηκαν 322 αποικίες σε 10^9 αραιώση/ 100μl. Συνεπώς μια καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους BL21DE3 με οπτική πυκνότητα 0.612 περίπου, αντιστοιχεί σε 322×10^6 CFU/μl ή 322×10^9 CFU/ml.

Brevibacterium

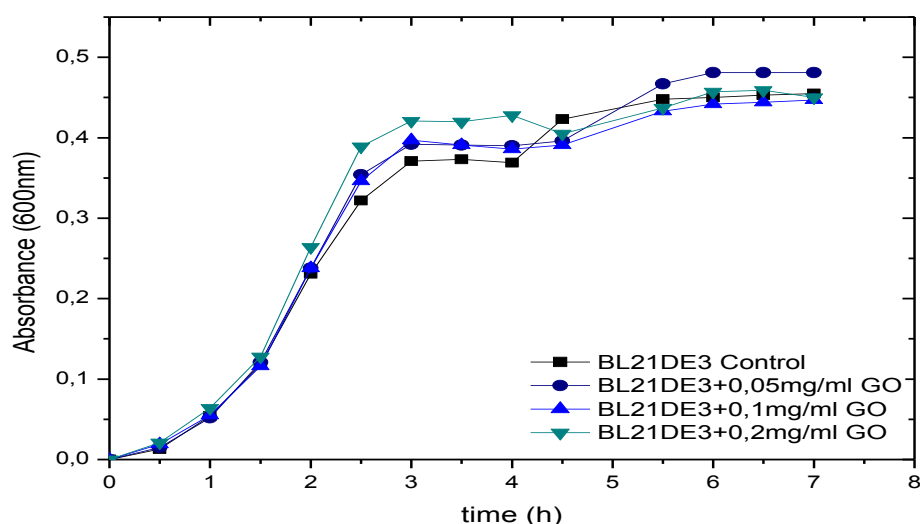
Η καλλιέργεια του στελέχους Brevibacterium επωάστηκε επίσης για 2 ώρες. Με την ολοκλήρωση της επώασης των 2 ωρών έγινε φωτομέτρηση της καλλιέργειας και η οπτική πυκνότητά της ήταν $OD \sim 0,356$. Από την επίστρωση των τρυβλίων με 100μl της καλλιέργειας μετά από διαδοχικές αραιώσεις έγινε καταμέτρηση των αποικιών στο τρυβλίο με αραιώση 10^6 . Από την καταμέτρηση αυτή προέκυψε ότι 170 αποικίες αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο αυτό. Έτσι έχουμε ότι 170 αποικίες αναπτύχθηκαν σε 10^6 αραιώση/ 100μl. Συνεπώς μια καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους Brevibacterium με οπτική πυκνότητα 0.356 περίπου, αντιστοιχεί σε 170×10^4 CFU/ml ή 170×10^7 CFU/ml.

Corynebacterium

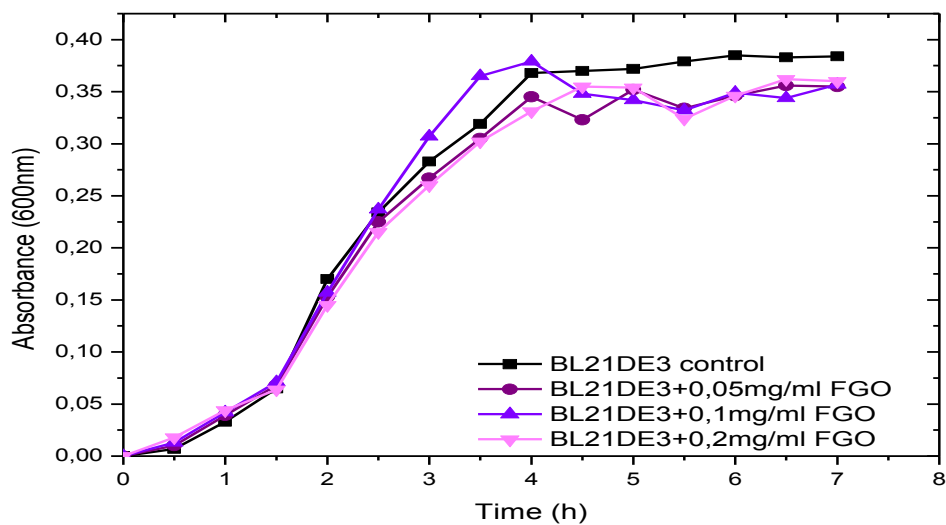
Η καλλιέργεια του στελέχους Corynebacterium επωάστηκε όπως και οι προηγούμενες για 2 ώρες. Με την ολοκλήρωση της επώασης των 2 ωρών έγινε φωτομέτρηση της καλλιέργειας και η οπτική πυκνότητά της ήταν $OD \sim 0,259$. Από την επίστρωση των τρυβλίων με 100μl καλλιέργειας μετά από διαδοχικές αραιώσεις έγινε καταμέτρηση των αποικιών στο τρυβλίο με αραιώση 10^6 . Από την καταμέτρηση αυτή προέκυψε ότι 41 αποικίες αναπτύχθηκαν στο τρυβλίο αυτό. Έχουμε δηλαδή ότι 41 αποικίες αναπτύχθηκαν σε 10^6 αραιώση/100μl. Συνεπώς μια καλλιέργεια του βακτηριακού στελέχους Corynebacterium με οπτική πυκνότητα 0.259 περίπου, αντιστοιχεί σε 41×10^4 CFU/μl ή 41×10^7 CFU/ml.

3.1.3. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης παρουσία Θρεπτικού Μέσου (LB)

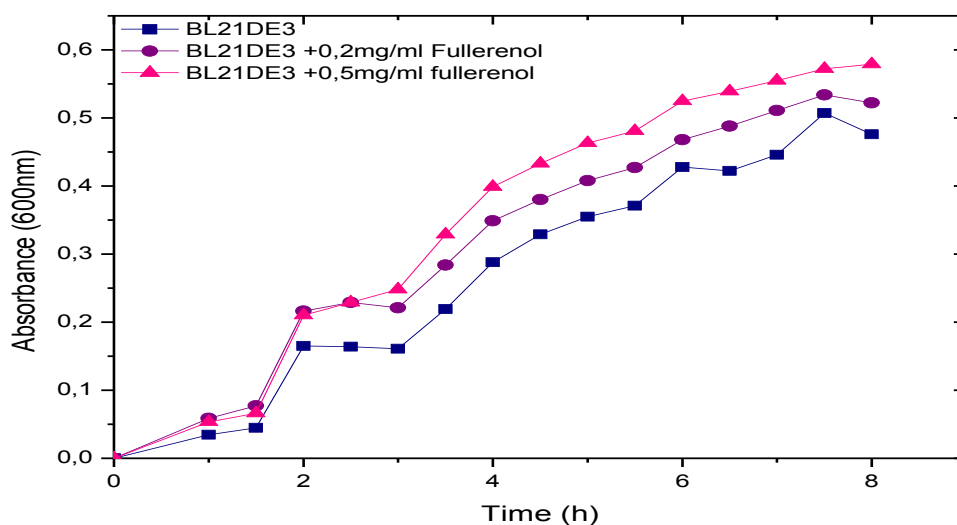
Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.8 της προηγούμενης ενότητας η πρώτη προσέγγιση για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης νανοδομών έγινε μετά από προσθήκη αυτών σε υγρές καλλιέργειες βακτηρίων, και παρακολούθηθηκε η βακτηριακή ανάπτυξη παρουσία των νανοδομών αυτών. Έτσι δοκιμάστηκαν ορισμένα νανοϋλικά όπως το Οξειδίο του Γραφενίου (GO), το φθοριωμένο Οξειδίο του Γραφενίου (FGO), το Φουλερένιο ($C_{60}(OH)_{24}$), το Βρωμιωμένο Φουλερένιο ($C_{60}Br_{24}$) και ο φυλλόμορφος άργιλος (Ni-rhylllo-silicate). Γνωρίζοντας τον τρόπο ανάπτυξης των τριών στελεχών από το πείραμα της προηγούμενης ενότητας πραγματοποιήθηκε σύγκριση αυτών με τον τρόπο ανάπτυξης των καλλιεργειών μετά την προσθήκη νανοδομών. Η προσθήκη των νανοϋλικών αυτών στις υγρές βακτηριακές καλλιέργειες και σε συγκεντρώσεις των 50, 100 και 200 μ g/ml δεν επέφεραν καμία αλλαγή στην βακτηριακή ανάπτυξη των τριών βακτηριακών στελεχών. Στα γραφήματα που ακολουθούν, **εικόνα 32** έως **εικόνα 44** γίνεται εκτενέστερος σχολιασμός της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών παρουσία των προαναφερθέντων νανοϋλικών.



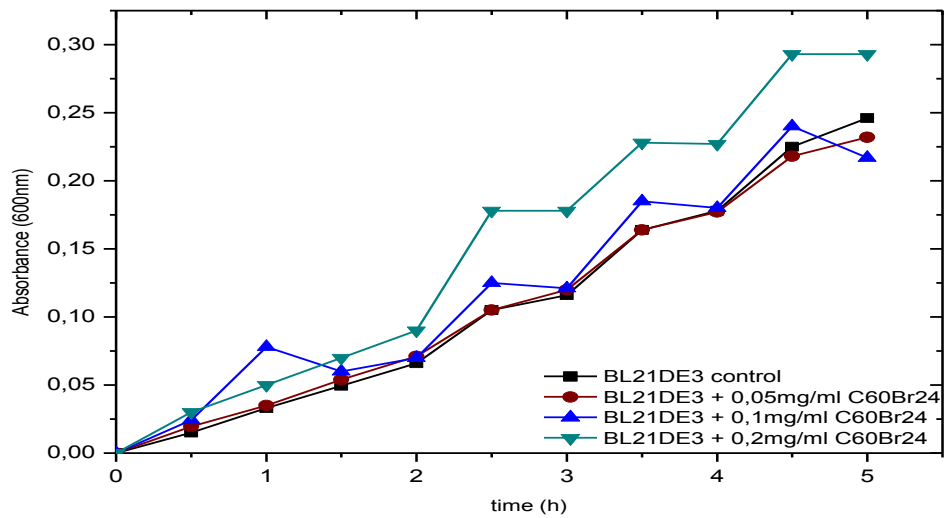
Εικόνα 32: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50, 100 και 200 μ g/ml GO. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του GO (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50 μ g/ml GO (μπλε σκούρο), των 100 μ g/ml (μπλε ανοιχτό) και των 200 μ g/ml (πράσινο). Παρατηρούμε επίσης ότι όλες οι βακτηριακές καλλιέργειες αποκτούν την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας που αντιστοιχεί περίπου στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, στον ίδιο χρόνο. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο χρόνος αυτός αντιστοιχεί στις 2.5 ώρες.



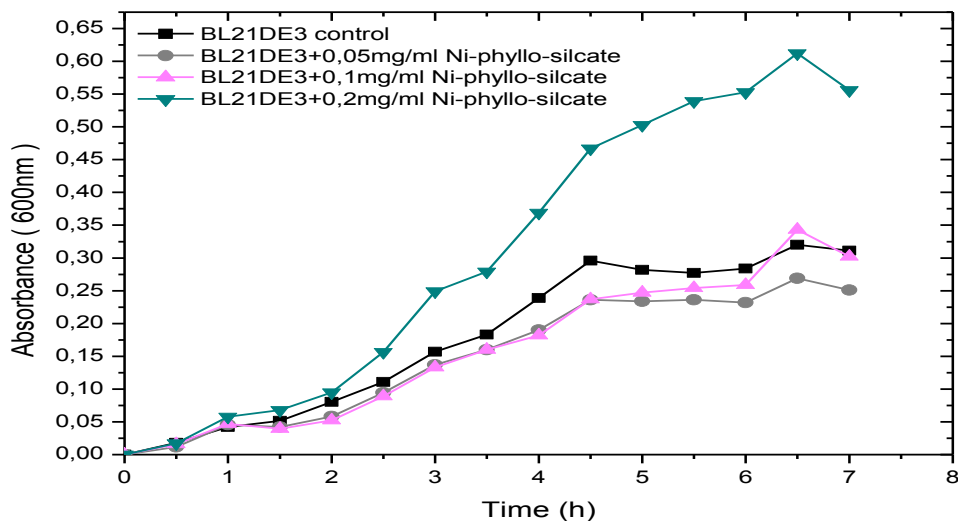
Εικόνα 33: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50, 100 και 200µg/ml FGO. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του FGO (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50µg/ml FGO (ροζ σκούρο), των 100µg/ml (μωβ) και των 200µg/ml (ροζ ανοιχτό). Παρατηρούμε επίσης ότι όλες οι βακτηριακές καλλιέργειες αποκτούν την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας που αντιστοιχεί περίπου στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, στον ίδιο χρόνο. Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο χρόνος αυτός αντιστοιχεί στις 3 ώρες.



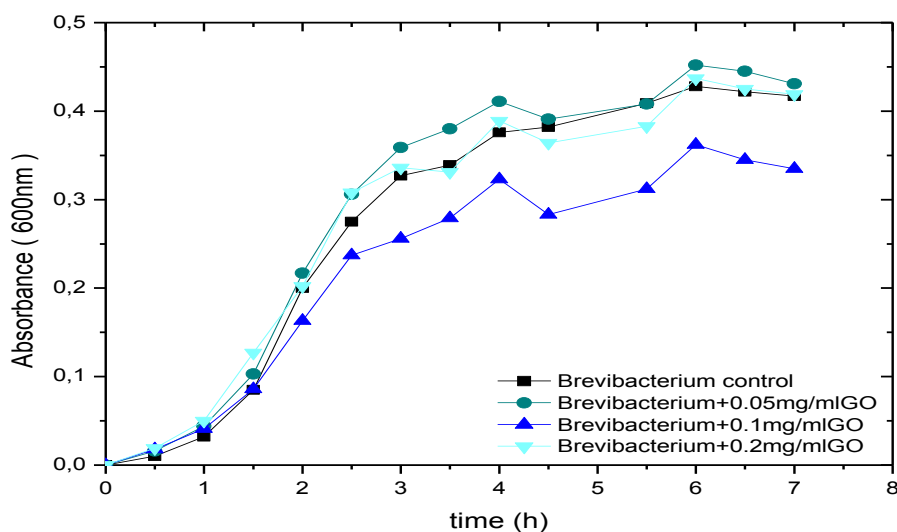
Εικόνα 34: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 200 και 500µg/ml $C_{60}(OH)_{24}$. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του $C_{60}(OH)_{24}$ (μπλε) και αναπτύσσεται φυσιολογικά δεν παρουσιάζει σημαντικές διαφορές με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 200µg/ml (μωβ) και των 500µg/ml (ροζ ανοιχτό). Αντίθετα βλέπουμε ότι οι καμπύλες ανάπτυξης παρουσία του $C_{60}(OH)_{24}$ είναι εμφανώς μετατοπισμένες πιο ψηλά από εκείνη του δείγματος ελέγχου. Δηλαδή η ανάπτυξη δεν επηρεάζεται αρνητικά από την ύπαρξη του $C_{60}(OH)_{24}$ αλλά θα λέγαμε ότι ευνοείται ελαφρώς.



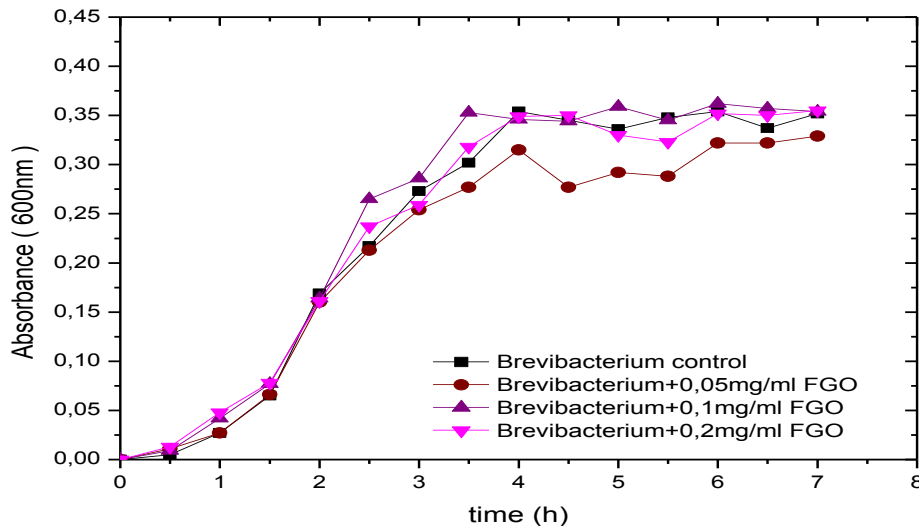
Εικόνα 35: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50, 100 και 200μg/ml C₆₀Br₂₄. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του C₆₀Br₂₄ (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml C₆₀Br₂₄ (καφέ), των 100μg/ml (μπλε) και των 200μg/ml (πράσινο). Βλέπουμε οι καμπύλες ανάπτυξης είναι εμφανώς μετατοπισμένες πιο ψηλά από εκείνη του δείγματος ελέγχου, γεγονός που δείχνει ότι πιθανόν η βακτηριακή ανάπτυξη να ευνοείται από την παρουσία του C₆₀Br₂₄.



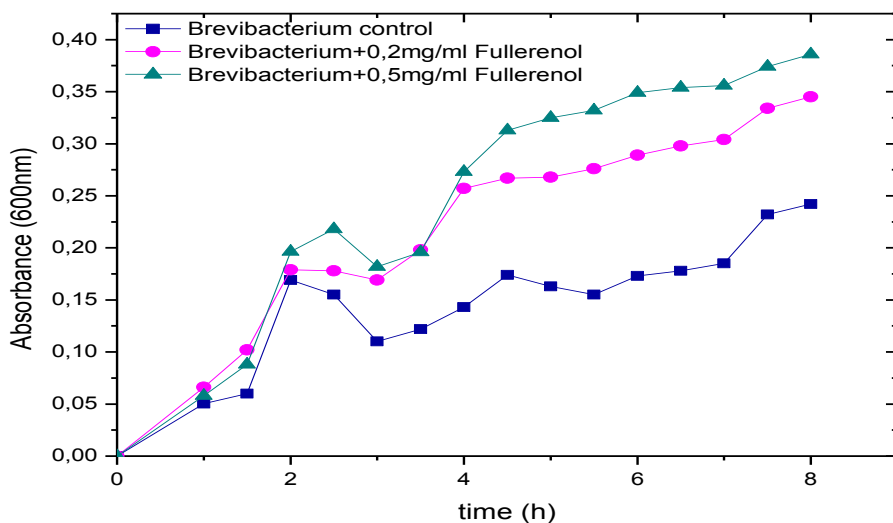
Εικόνα 36: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50, 100 και 200μg/ml Ni-phyllo-silicate. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του Ni-phyllo-silicate (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml Ni-phyllo-silicate (γκρι) και των 100μg/ml (ροζ) ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο και με την συγκέντρωση των 200μg/ml (πράσινο). Η καμπύλη ανάπτυξης των 200μg/ml Ni-phyllo-silicate αναπτύσσεται ταχύτερα από ότι οι υπόλοιπες καλλιέργειες. Παρατηρούμε επίσης ότι η ανάπτυξη παρουσία των 200μg/ml Ni-phyllo-silicate σε κάθε μέτρηση είναι σχεδόν διπλάσια της αντίστοιχης τιμής του δείγματος ελέγχου.



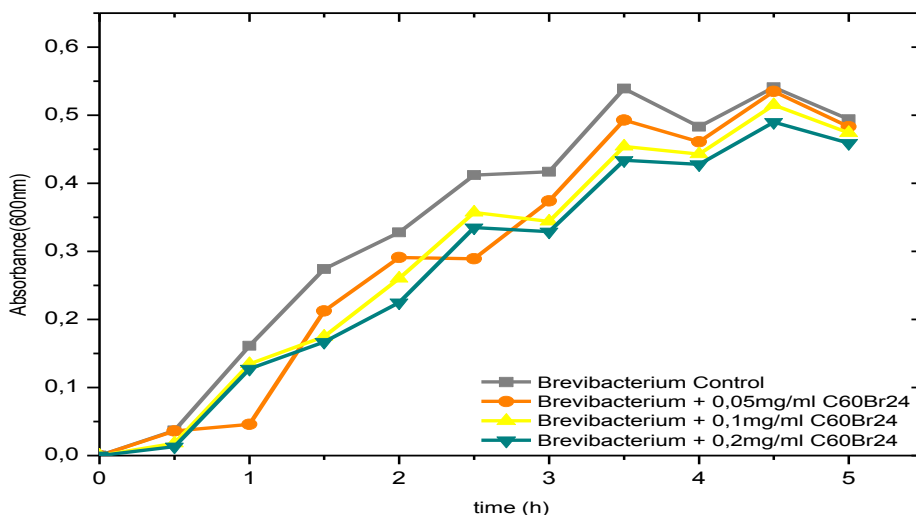
Εικόνα 36: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50, 100 και 200µg/ml GO. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του GO (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50µg/ml GO (πράσινο), των 100µg/ml (μπλε) και των 200µg/ml (γαλάζιο). Επίσης βλέπουμε ότι ο χρόνος στον οποίο η βακτηριακή ανάπτυξη φτάνει την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας, η οποία αντιστοιχεί στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, είναι ίδιο σε όλες τις καλλιέργειες απουσία και παρουσία GO. Ο χρόνος αυτός στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι 2.5 ώρες.



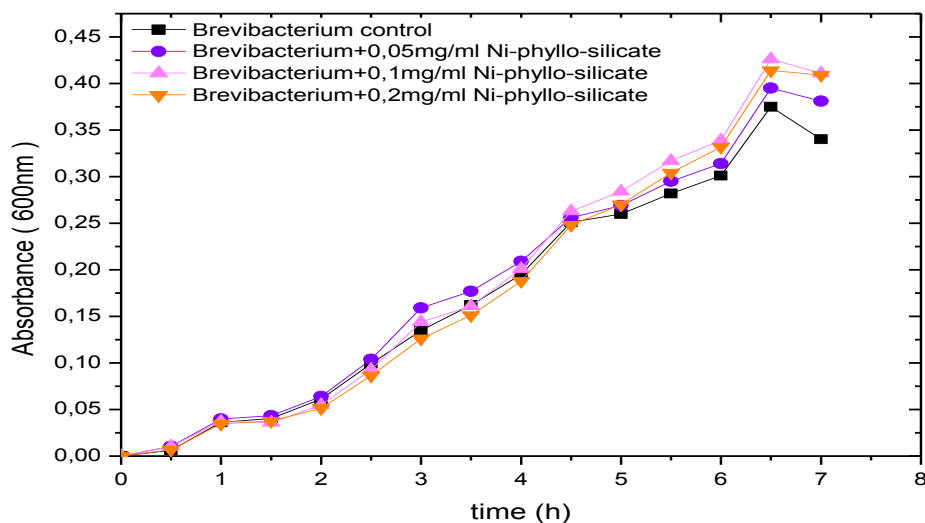
Εικόνα 37: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50, 100 και 200µg/ml FGO. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του FGO (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50µg/ml FGO (κόκκινο), των 100µg/ml (μωβ) και των 200µg/ml (ροζ). Επίσης βλέπουμε ότι ο χρόνος στον οποίο η βακτηριακή ανάπτυξη φτάνει την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας, η οποία αντιστοιχεί στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, είναι ίδιο σε όλες τις καλλιέργειες απουσία και παρουσία FGO. Ο χρόνος αυτός στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι 2.5 ώρες.



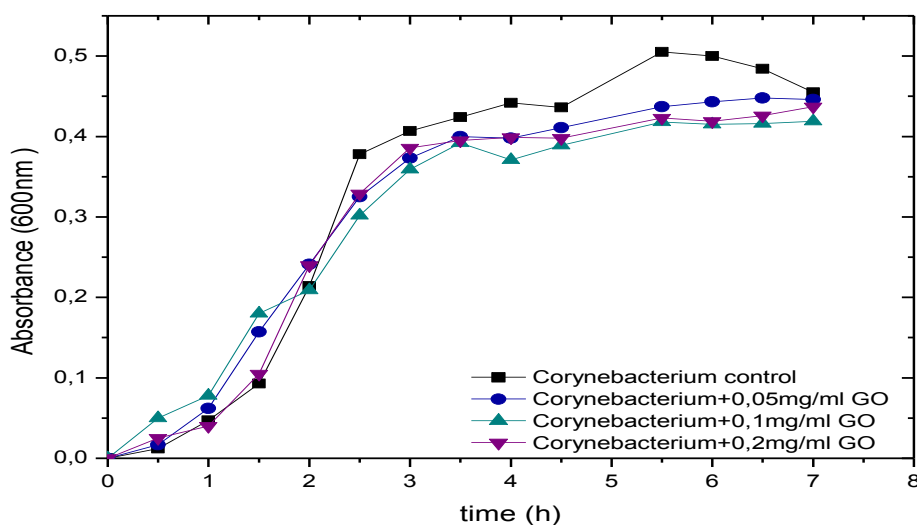
Εικόνα 38: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 200 και 500μg/ml $C_{60}(OH)_{24}$. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του $C_{60}(OH)_{24}$ (μπλε) και αναπτύσσεται φυσιολογικά δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 200μg/ml $C_{60}(OH)_{24}$ (ροζ) και των 500μg/ml (πράσινο). Παρατηρούμε επίσης ότι οι καμπύλες ανάπτυξης των καλλιιεργειών παρουσία των δυο συγκεντρώσεων $C_{60}(OH)_{24}$ είναι μετατοπισμένες πάνω από την καμπύλη ανάπτυξης του δείγματος ελέγχου. Αυτό δείχνει ότι η παρουσία του $C_{60}(OH)_{24}$ ευνοεί την ανάπτυξη του στελέχους και το βοηθά να αναπτύσσεται με ταχύτερους ρυθμούς.



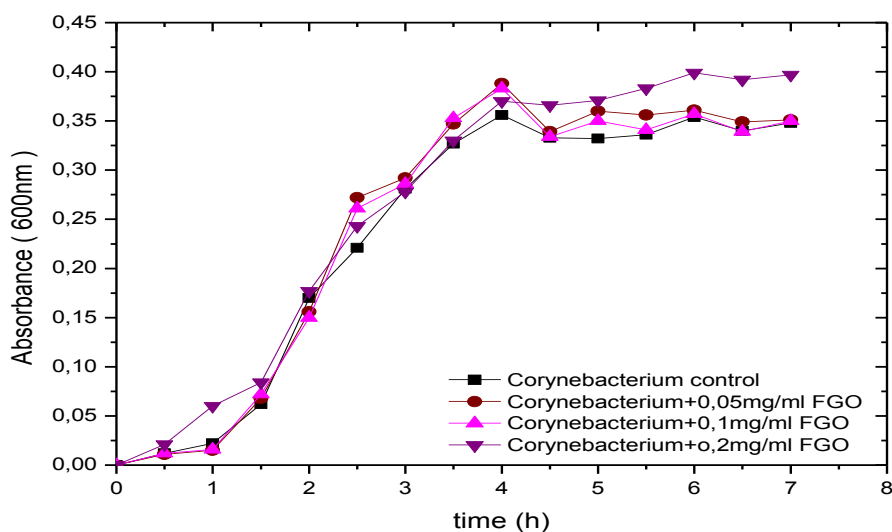
Εικόνα 39: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50, 100 και 200μg/ml $C_{60}Br_{24}$. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του $C_{60}Br_{24}$ (γκρι) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml $C_{60}Br_{24}$ (πορτοκαλί), των 100μg/ml (κίτρινο) και των 200μg/ml (πράσινο). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιιεργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στην περίπτωση αυτή ο χρόνος αυτός είναι οι 2 ώρες.



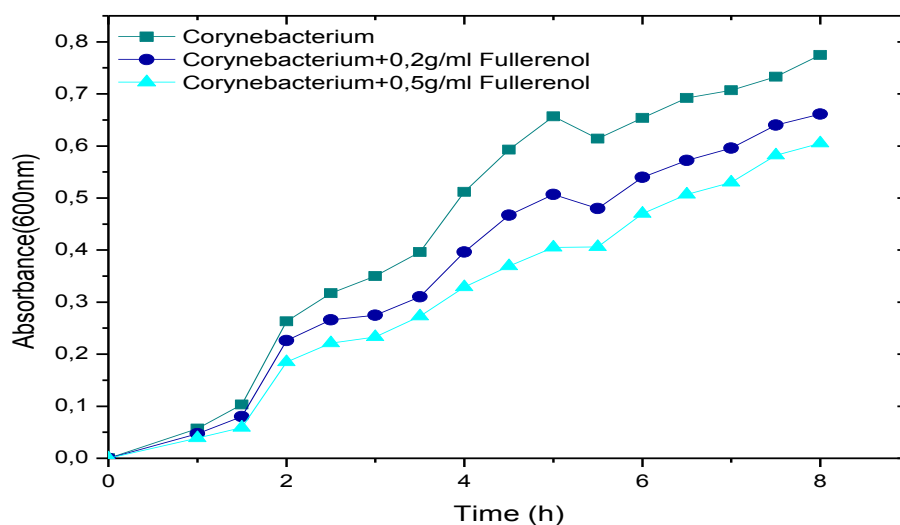
Εικόνα 40: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50, 100 και 200μg/ml Ni-phylo-silicate. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του Ni-phylo-silicate (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml Ni-phylo-silicate (μωβ), των 100μg/ml (ροζ) και των 200μg/ml (πορτοκαλί). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιιεργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στην περίπτωση αυτή ο χρόνος αυτός είναι οι 4.5 ώρες.



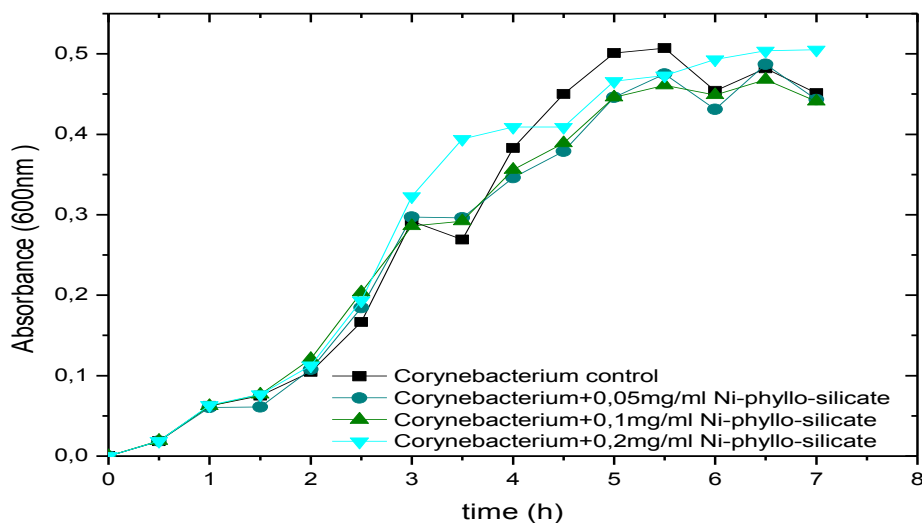
Εικόνα 41: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 50, 100 και 200μg/ml GO. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του GO (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml GO (μπλε), των 100μg/ml (πράσινο) και των 200μg/ml (μωβ). Επίσης βλέπουμε ότι ο χρόνος στον οποίο η βακτηριακή ανάπτυξη φτάνει την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας, η οποία αντιστοιχεί στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, είναι ίδιο σε όλες τις καλλιέργειες απουσία και παρουσία GO. Ο χρόνος αυτός στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι 2.5 ώρες.



Εικόνα 42: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 50, 100 και 200 μ g/ml FGO. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του FGO (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50 μ g/ml FGO (κόκκινο), των 100 μ g/ml (ροζ) και των 200 μ g/ml (μωβ). Επίσης βλέπουμε ότι ο χρόνος στον οποίο η βακτηριακή ανάπτυξη φτάνει την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας, η οποία αντιστοιχεί στο μέσο της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, είναι ίδιο σε όλες τις καλλιέργειες απουσία και παρουσία FGO. Ο χρόνος αυτός στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι 2.5 ώρες.



Εικόνα 43: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 200 και 500 μ g/ml $C_{60}(OH)_{24}$. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του $C_{60}(OH)_{24}$ (πράσινο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά δεν παρουσιάζει μεγάλες διαφορές με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 200 μ g/ml $C_{60}(OH)_{24}$ (μπλε) και των 500 μ g/ml (γαλάζιο). Παρατηρούμε επίσης ότι οι καμπύλες ανάπτυξης των καλλιεργειών παρουσία και απουσία $C_{60}(OH)_{24}$, έχουν όμοιο ρυθμό ανάπτυξης και ο χρόνος που η βακτηριακή ανάπτυξη φτάνει την τιμή της βέλτιστης οπτικής πυκνότητας είναι ίδιος σε όλες τις καλλιέργειες. Ο χρόνος αυτός στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι οι 4 ώρες.



Εικόνα 44: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 50, 100 και 200μg/ml Ni-phylllo-silicate. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία του Ni-phylllo-silicate (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml Ni-phylllo-silicate (μπλε), των 100μg/ml (πράσινο) και των 200μg/ml (γαλάζιο). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιέργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στην περίπτωση αυτή ο χρόνος αυτός είναι οι 3 ώρες.

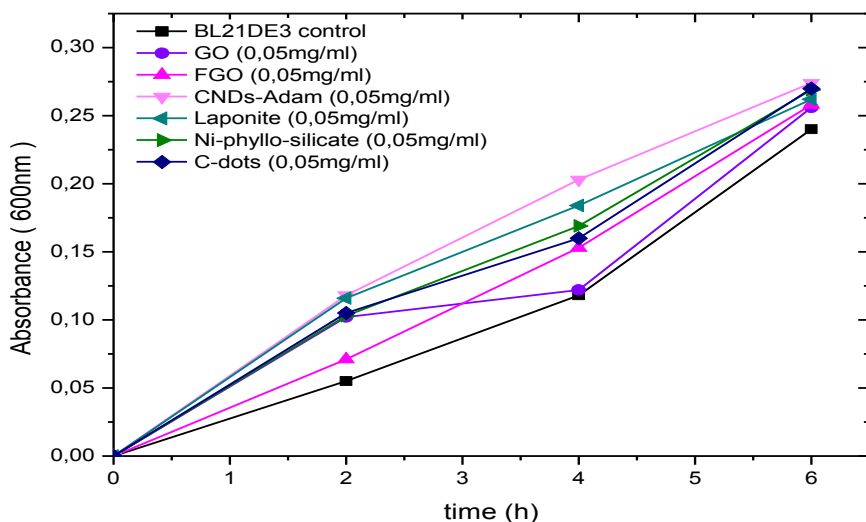
Όπως αναφέρθηκε και στην εισαγωγή το οξείδιο του Γραφενίου καθώς και το Φουλερένιο, γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία πως όταν προστίθενται σε αναπτυσσόμενες βακτηριακές καλλιέργειες του στελέχους *E.coli* αλλά και άλλων βακτηριακών στελεχών προκαλούν αναστολή της ανάπτυξής αυτών. Αντίθετα τα αποτελέσματα που εξήχθησαν παραπάνω φαίνεται πως δεν διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση καθώς δεν προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης σε κανένα βακτηριακό στέλεχος. Επίσης γνωρίζουμε ότι για το Οξείδιο του Γραφενίου υπάρχει και μια σειρά αποτελεσμάτων που δείχνουν πως το υλικό αυτό δεν διαθέτει κάποια αντιμικροβιακή δράση. Συγκριτικά λοιπόν με τα αντιφατικά συμπεράσματα για το Οξείδιο του Γραφενίου βλέπουμε πως τα παραπάνω αποτελέσματα συμπίπτουν με την παραδοχή πως το Οξείδιο του Γραφενίου δεν έχει αντιμικροβιακή δράση. Αντίστοιχα βλέπουμε πως τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται σε αντίθεση με προηγούμενες μελέτες όπου υποστηρίζεται η αντιμικροβιακή δράση του Φουλερενίου. Για τα δυο νανοϋλικά, το βρωμιωμένο Φουλερένιο και τον φυλλόμορφο άργιλο, δεν υπάρχουν προηγούμενες αναφορές για την πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση όμως από τα αποτελέσματα αυτά γίνεται σαφές πως κανένα από τα δυο δεν διαθέτει αντιμικροβιακή δράση καθώς τα στελέχη παρουσία αυτών αναπτύσσονται φυσιολογικά. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί πως πιθανόν η δράση των προστιθέμενων νανοδομών να εξαρτάται από το πλήθος των βακτηριακών κυττάρων και να απαιτείται συγκεκριμένη αναλογία κυττάρων-νανοϋλικού για να αλληλεπιδρούν και να επέλθει κάποιο αποτέλεσμα.

3.1.4. Έλεγχος αντιμικροβιακής δράσης απουσία θρεπτικού μέσου (LB)

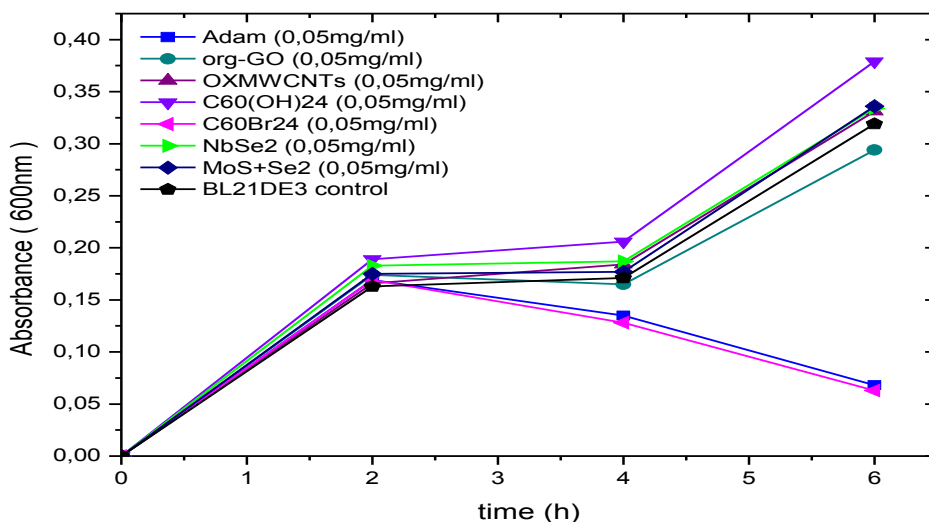
Για να διατηρείται λυιόν στοιχειομετρικά η αναλογία βακτηριακών κυττάρων και σωματιδίων νανοϋλικού, έτσι ώστε να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και η αναλογία αυτή να μην διαταράσσεται, όπως θα συνέβαινε στην περίπτωση πολλαπλασιασμού των βακτηρίων παρουσία του θρεπτικού μέσου, τα βακτήρια αφήνονται να αλληλεπιδράσουν με τα νανοϋλικά απουσία του θρεπτικού μέσου. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε περιγράφηκε εκτενώς στην παράγραφο 2.9 της προηγούμενης ενότητας και με την μεθοδολογία αυτή ελέγχθηκε η πιθανή αντιμικροβιακή δράση είκοσι δυο νανοϋλικών η δράση των οποίων αναφέρονται στην συνέχεια.

BL21DE3

Σε ότι αφορά την δράση των νανοϋλικών στο βακτηριακό στέλεχος BL21DE3, το οποίο είναι κατά Gram αρνητικό, φαίνεται στα τα γραφήματα που ακολουθούν (**Εικόνα 45, 46 και 47**). Στο γράφημα της εικόνας **45** στις καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά του οξειδίου του Γραφενίου, του φθοριωμένου Γραφενίου, του λαπονίτη και των λοιπών νανοϋλικών, ο τρόπος ανάπτυξής τους είναι όμοιος με εκείνον της καλλιέργειας απουσία νανοϋλικών που αναπτύσσεται φυσιολογικά και σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης που αναφέρθηκε παραπάνω. Στον ίδιο χρόνο επώασης των καλλιεργειών η οπτική πυκνότητάς τους είναι περίπου ίδια με εκείνη της πρότυπης καμπύλης ανάπτυξης. Το ίδιο μοτίβο ανάπτυξης ακολουθούν και οι καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκαν τα νανοϋλικά όπως το Φουλερένιο, το NbSe₂, το MoS+Se₂, των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα και του οργανικά τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου, όπως φαίνεται στην εικόνα **46**. Στο γράφημα της εικόνας **46** φαίνεται επίσης και η διαφοροποίηση του τρόπου ανάπτυξης των καλλιεργειών όπου προστέθηκαν τα νανοϋλικά Αδαμαντιλαμίνη και Βρωμιωμένο Φουλερένιο. Και στις δυο αυτές καλλιέργειες παρουσία των νανοϋλικών αυτών παρατηρούμε ότι μέχρι και έξι ώρες (6h) επώασης στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, το στέλεχος δεν έχει περάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης αλλά παραμένει στην λανθάνουσα φάση, η οποία αποτελεί την φάση προσαρμογής του στο περιβάλλον του. Αντίθετα το δείγμα ελέγχου, που αποτελεί η καλλιέργεια απουσία νανοϋλικού έχει περάσει στην εκθετική φάση ανάπτυξης έπειτα από δυο ώρες (2h) επώασης της στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Υποδηλώνεται έτσι μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη των καλλιεργειών παρουσία των νανοϋλικών Αδαμαντιλαμίνη και Βρωμιωμένου Φουλερένιου, της τάξης των τεσσάρων ωρών (4h). Παρότι για τα παραπάνω νανοϋλικά δεν έχουν υπάρξει προηγούμενες αναφορές για την πιθανή αντιμικροβιακή τους δράση το συμπέρασμα που εξάγεται από τα αποτελέσματα της μελέτης μας είναι πως μόνο τα νανοϋλικά Αδαμαντιλαμίνη και Βρωμιωμένο Φουλερένιο διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση.



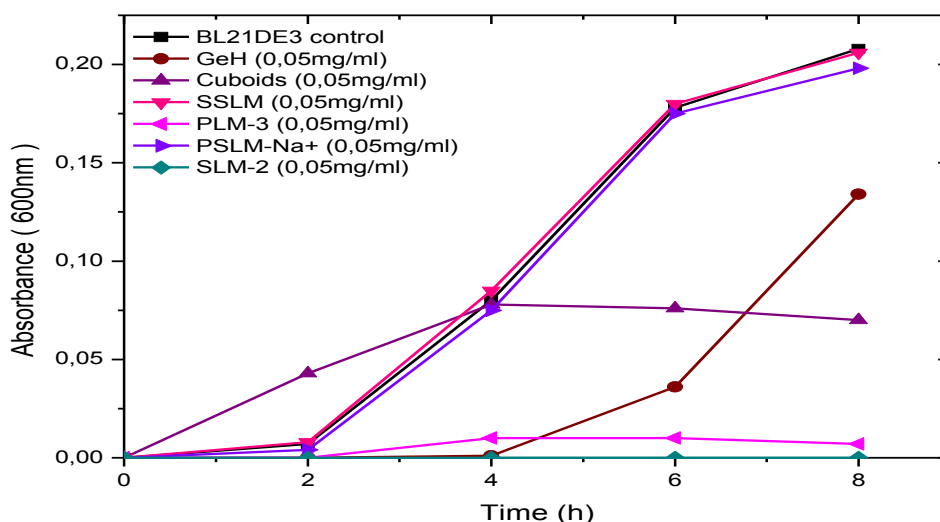
Εικόνα 45: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50µg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία των νανοϋλικων (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50µg/ml GO (μωβ), FGO (ροζ), CNDs-Adam (ανοιχτό ροζ), Laponite (πετρολ), Ni-phylllo-silicate (πράσινο) και C-dots (μπλε). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιέργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο.



Εικόνα 46: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50µg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50µg/ml org-GO (πράσινο), OXMWCNTs (κόκκινο), C₆₀(OH)₂₄ (μωβ), NbSe₂ (πράσινο) και MoS+Se₂ (μπλε). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιέργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά Adam και C₆₀Br₂₄ ο ρυθμός ανάπτυξης

τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία των νανοϋλικών αυτών μέχρι και έξι ώρες επώασης μετά δεν έχει περάσει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Επίσης παρόμοια εικόνα παρατηρούμε και στο γράφημα της **εικόνα 47** που ακολουθεί. Το δείγμα ελέγχου μετά τις δυο ώρες επώασης περνάει στην εκθετική φάση και αποκτά την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας στις οκτώ ώρες επώασής του στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Το ρυθμό αυτό ανάπτυξης του δείγματος ελέγχου ακολουθούν και οι καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκαν τα νανοϋλικά SSLM και PSLM-Na⁺. Αντίθετα με τον ρυθμό ανάπτυξης αυτόν, ο οποίος συνάδει πλήρως με αυτόν της πρότυπης καμπύλης ανάπτυξης του στελέχους αυτού, οι καλλιέργειες οι οποίες επώαστηκαν παρουσία Κυβοειδών και των νανοϋλικών PLM-3 και SLM-2 μετά από οκτώ ώρες επώασης στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης δεν έχουν μπει στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Παραμένουν στην λανθάνουσα φάση, όπου δεν πολλαπλασιάζονται. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια καθυστέρηση των έξι ωρών στην ανάπτυξη των καλλιεργειών αυτών εν συγκρίσει με την δείγμα ελέγχου που ακολουθεί την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους. Στην καλλιέργεια όπου προστέθηκε Γερμανάνιο, παρατηρούμε πως η καθυστέρηση αυτή είναι της τάξης των τεσσάρων ωρών, ενώ μετά από έξι ώρες επώασης η καλλιέργεια αρχίζει να εισέρχεται σταδιακά στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

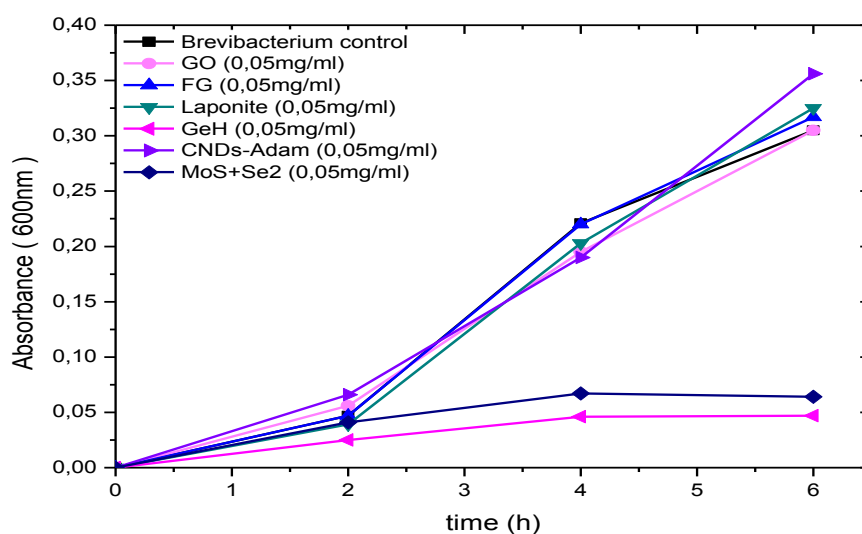


Εικόνα 47: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους BL21DE3 παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml SSLM (κόκκινο) και PSLM-Na⁺ (μωβ). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά GeH, Cuboids, PLM-3 και SLM-2 ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία των νανοϋλικών αυτών μέχρι και οκτώ ώρες επώασης μετά δεν έχει περάσει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Η πιθανή αντιμικροβιακή δράση των νανοϋλικών ελέγχθηκε επίσης και σε δυο κατά Gram θετικά βακτηριακά στελέχη, το *Brevibacterium* και το *Corynebacterium*.

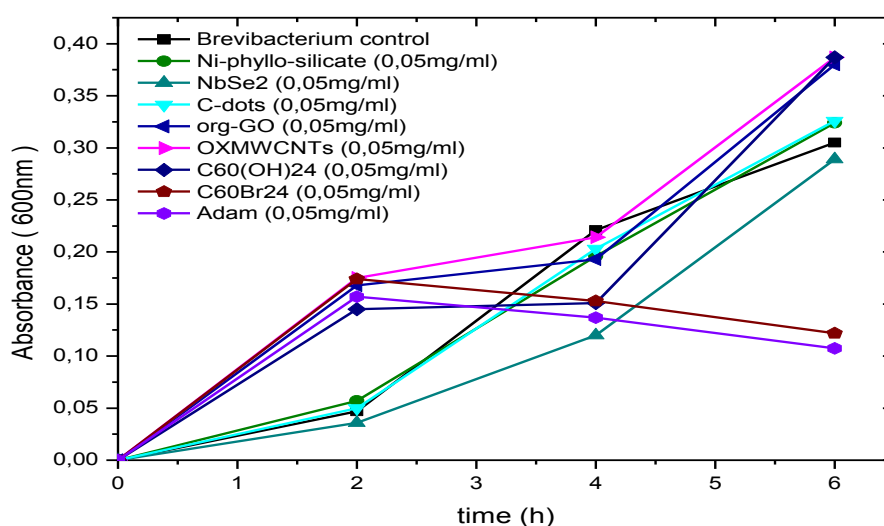
Brevibacterium

Στα γραφήματα που ακολουθούν φαίνονται οι δοκιμές για τον έλεγχο της αντιμικροβιακής δράσης των νανοϋλικών στο βακτηριακό στέλεχος *Brevibacterium*. Στο γράφημα της **εικόνας 48** παρατηρούμε ότι οι καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία Οξειδίου του γραφενίου, Φθωρωμένου Γραφενίου, Λαπονίτη και CNDs-Adam η ανάπτυξη του στελέχους δεν επηρεάζεται και συμφωνεί με την ανάπτυξη του δείγματος ελέγχου. Αντίθετα στις καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία των νανοϋλικών Γερμανανίου και MoS+Se₂, η βακτηριακή ανάπτυξη διαφοροποιείται από εκείνη του δείγματος ελέγχου. Η καλλιέργεια που αποτελεί το δείγμα ελέγχου από τις δυο ώρες επώασης στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους, εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και φτάνει την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας στις έξι ώρες επώασης. Αντίθετα οι καλλιέργειες παρουσία Γερμανανίου και MoS+Se₂ έξι ώρες μετά δεν έχουν εισέλθει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης και παραμένουν στην λανθάνουσα φάση. Σημειώνεται μια καθυστέρηση της ανάπτυξης στις καλλιέργειες αυτές της τάξης των τεσσάρων ωρών.



Εικόνα 48: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml GO (ανοιχτό ροζ), FG (μπλε), Laponite (πράσινο) και CNDs-Adam (μωβ). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά GeH και MoS+Se₂ ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία των νανοϋλικών αυτών μέχρι και έξι ώρες επώασης μετά δεν έχει εισέλθει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

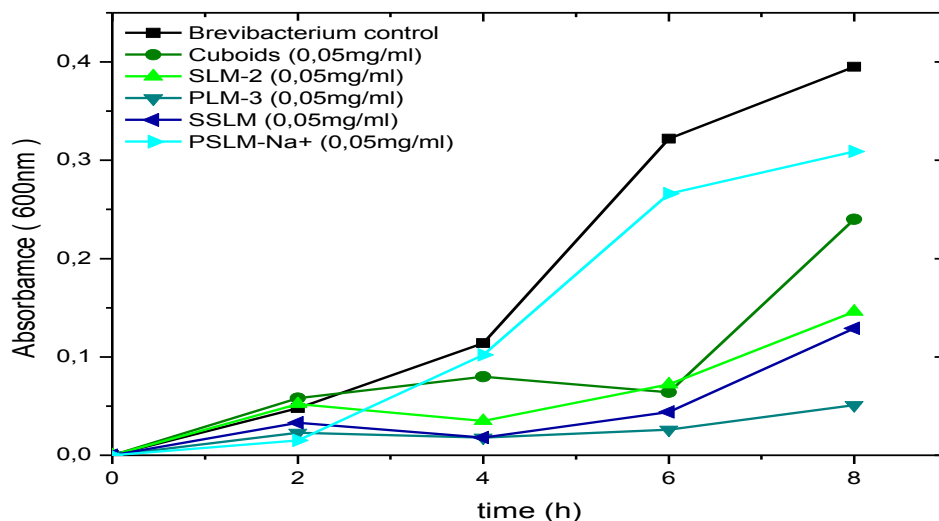
Την ίδια εικόνα όπως φαίνεται στην **εικόνα 49**, παρουσιάζουν οι καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία των νανοϋλικών: άργυλου, Νιόβιου σεληνίου (NbSe_2), κουκίδες άνθρακα (C-dots), οργανοποιημένου οξειδίου του Γραφενίου (org-GO), οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα (OXMWCNTs) και του Φουλερενίου ($\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$). Η προσθήκη τους στις καλλιέργειες του βακτηριακού στελέχους *Brevibacterium* δεν επηρέασαν τον τρόπο ανάπτυξης αυτού. Οι καμπύλες ανάπτυξης των καλλιεργειών αυτών συμπίπτει με την καμπύλη ανάπτυξης της καλλιέργειας που αποτελεί το δείγμα ελέγχου. Σε αντίθεση οι καλλιέργειες που επώαστηκαν με τα νανοϋλικά βρωμιομένο Φουλερένιο ($\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$) και Αδαμαντιλαμίνη (Adam), εμφανίζουν διαφορετικό τρόπο ανάπτυξης. Ενώ το δείγμα ελέγχου έπειτα από δυο ώρες επώασής του στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης του στελέχους, εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης οι καλλιέργειες παρουσία των παραπάνω νανοϋλικών δεν εισέρχονται στην εκθετική φάση ακόμα και μετά από έξι ώρες επώασής τους στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης.



Εικόνα 49: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml Ni-phylllo-silicate (πράσινο), NbSe_2 (πετρολ), C-dots (τουρκουάζ), org-GO (μπλε), OXMWCNTs (ροζ) και $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ (μπλε σκούρο). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά $\text{C}_{60}\text{Br}_{24}$ και Adam ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία των νανοϋλικών αυτών μέχρι και έξι ώρες επώασης μετά δεν έχει εισέλθει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Επίσης καλλιέργειες του στελέχους *brevibacterium* επώαστηκαν παρουσία των νανοϋλικών: Κυβοειδή, SLM-2, PLM-3, SSLM και PSLM- Na^+ . Από το γράφημα της **εικόνας 50** παρατηρούμε ότι η καλλιέργεια του στελέχους που επώαστηκε παρουσία του νανοϋλικού PSLM- Na^+ αναπτύσσεται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης το στελέχους. Σε αντίθεση με τις καλλιέργειες που επώαστηκαν με τα κυβοειδή καθώς επίσης και με τα νανοϋλικά SLM-2, PLM-3 και SSLM. Στην καλλιέργεια παρουσία των κυβοειδών τα βακτηριακά κύτταρα μετά από έξι ώρες επώασης στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης ξεκινά

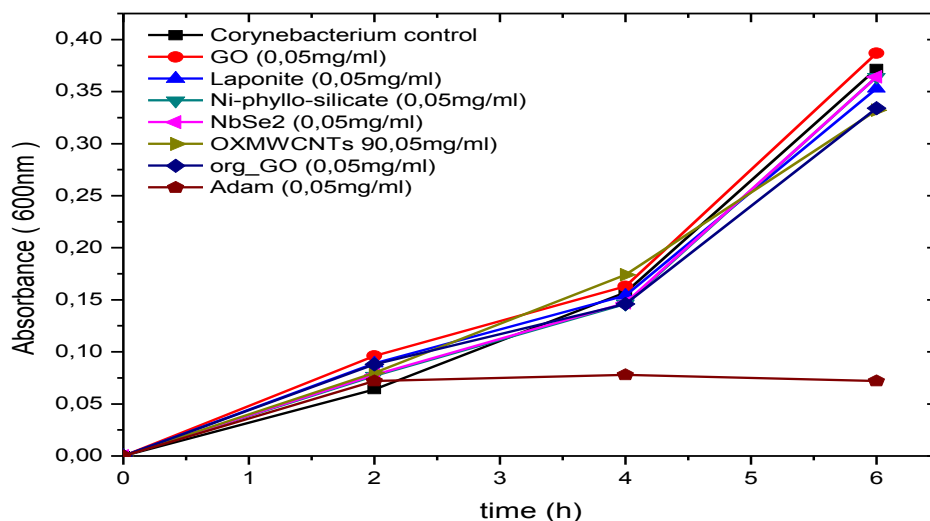
να εισέρχεται σταδιακά στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Οι καλλιέργειες οι οποίες επώαστηκαν παρουσία των SLM-2, PLM-3 και SSLM δεν έχουν εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης μετά από οκτώ ώρες επώασής τους στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό δηλώνει μια καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους της τάξης των τεσσάρων ωρών, στην περίπτωση προσθήκης των κυβοειδών και 6 ωρών αντίστοιχα στην περίπτωση προσθήκης των SLM-2, PLM-3 και SSLM.



Εικόνα 50: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Brevibacterium* παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml PSLM-Na⁺ (γαλάζιο). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά Cuboids, SLM-2, PLM-3 και SSLM ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία των νανοϋλικών αυτών μέχρι έξι και οκτώ ώρες επώασης μετά, αντίστοιχα, δεν έχει εισέλθει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

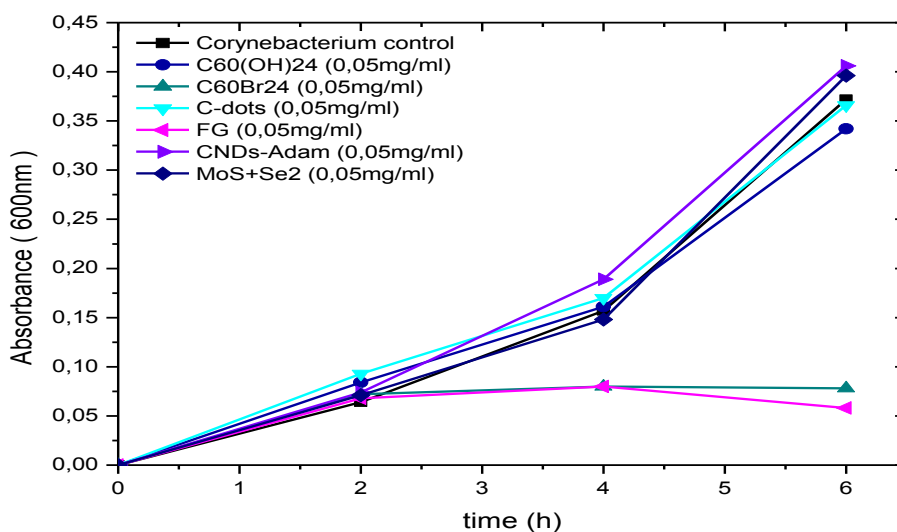
Corynebacterium

Έλεγχος για την πιθανή αντιμικροβιακή δράση πραγματοποιήθηκε και στο κατά Gram θετικό βακτηριακό στέλεχος *Corynebacterium*. Στα γραφήματα που ακολουθούν αναλύονται τα αποτελέσματα του ελέγχου αυτού. Έτσι όπως φαίνεται στο γράφημα της **εικόνας 51** οι καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία του οξειδίου του Γραφενίου, του Λαπονίτη, του Νιόβιου Σελήνιο (NbSe₂), των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα καθώς επίσης και του οξειδίου του Γραφενίου έπειτα από οργανική τροποποίηση, αναπτύσσονται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους. Δεν παρατηρείται καμία διαταραχή του ρυθμού ανάπτυξης και η βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας επιτυγχάνεται στον ίδιο χρόνο. Εξαίρεση αποτελεί η καλλιέργεια που επώαστηκε παρουσία Αδαμαντιλαμίνης, όπου παρατηρούμε ότι και μετά από έξι ώρες επώασής της στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, η βακτηριακή καλλιέργεια δεν εισέρχεται στην εκθετική φάση.

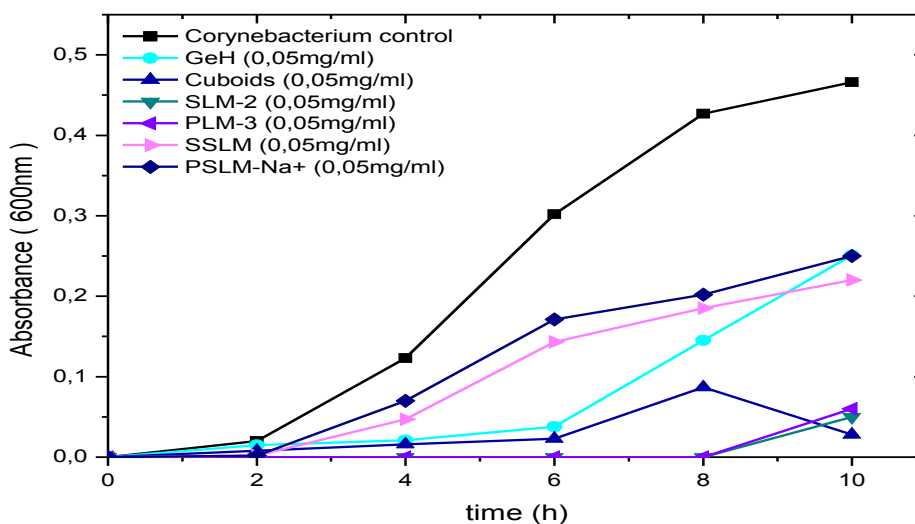


Εικόνα 51: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml GO (κόκκινο), Laponite (μπλε), Ni-phylllo-silicate (πράσινο), NbSe₂ (ροζ), OXMWCNTs (λαδί) και org-GO (μπλε σκούρο). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιέργειών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στη βακτηριακή καλλιέργεια που προστέθηκε το νανοϋλικό Adam ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία του νανοϋλικού αυτού μέχρι έξι ώρες επώασης μετά δεν έχει εισέλθει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.

Ομοίως από το γράφημα της **εικόνας 52** προκύπτει ότι οι καλλιέργειες που επώαστηκαν παρουσία φουλερενίου, C-dots, MoS₂+Se₂ και CNDs-Adam αναπτύσσονται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης του στελέχους σε αντίθεση με τις καλλιέργειες οι οποίες επώαστηκαν παρουσία του βρωμιομένου Φουλερενίου και του φθοριωμένου Γραφενίου. Στις τελευταίες καλλιέργειες το στέλεχος δεν ακολουθεί την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης καθώς μετά από έξι ώρες επώασης στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, δεν αναπτύσσεται και δεν εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης αλλά παραμένει στην λανθάνουσα φάση. Επίσης το ίδιο παρατηρούμε και στο γράφημα της **εικόνας 53** όπου παρατηρούμε ότι οι καλλιέργειες στις οποίες προστέθηκε Γερμανάνιο, Κυβοειδή, SLM-2, PLM-3, SSLM και PSLM-Na⁺, δεν ακολουθούν ακριβώς την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης όπως το δείγμα ελέγχου. Έτσι παρατηρούμε ότι στην καλλιέργεια παρουσία του PSLM-Na⁺ το βακτηριακό στέλεχος καθυστερεί δυο ώρες να εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης, καθώς ενώ το δείγμα ελέγχου εισέρχεται στην εκθετική φάση μετά από χρόνο επώασης δυο ωρών η καλλιέργεια παρουσία του PSLM-Na⁺ εισέρχεται στην εκθετική φάση μετά από χρόνο επώασης τεσσάρων ωρών. Το ίδιο συμβαίνει και στην καλλιέργεια παρουσία του SSLM. Μια καθυστέρηση τεσσάρων ωρών παρατηρείται στην καλλιέργεια παρουσία του Γερμανάνιου καθώς αυτή εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης μετά από χρόνο επώασης έξι ωρών. Αντίστοιχα καθυστέρηση οκτώ ωρών εμφανίζουν οι καλλιέργειες παρουσία κυβοειδών, SLM-2 και PLM-3. Στις περιπτώσεις αυτές οι βακτηριακές καλλιέργειες εισέρχονται στην εκθετική φάση μετά από χρόνο επώασης δέκα ωρών.

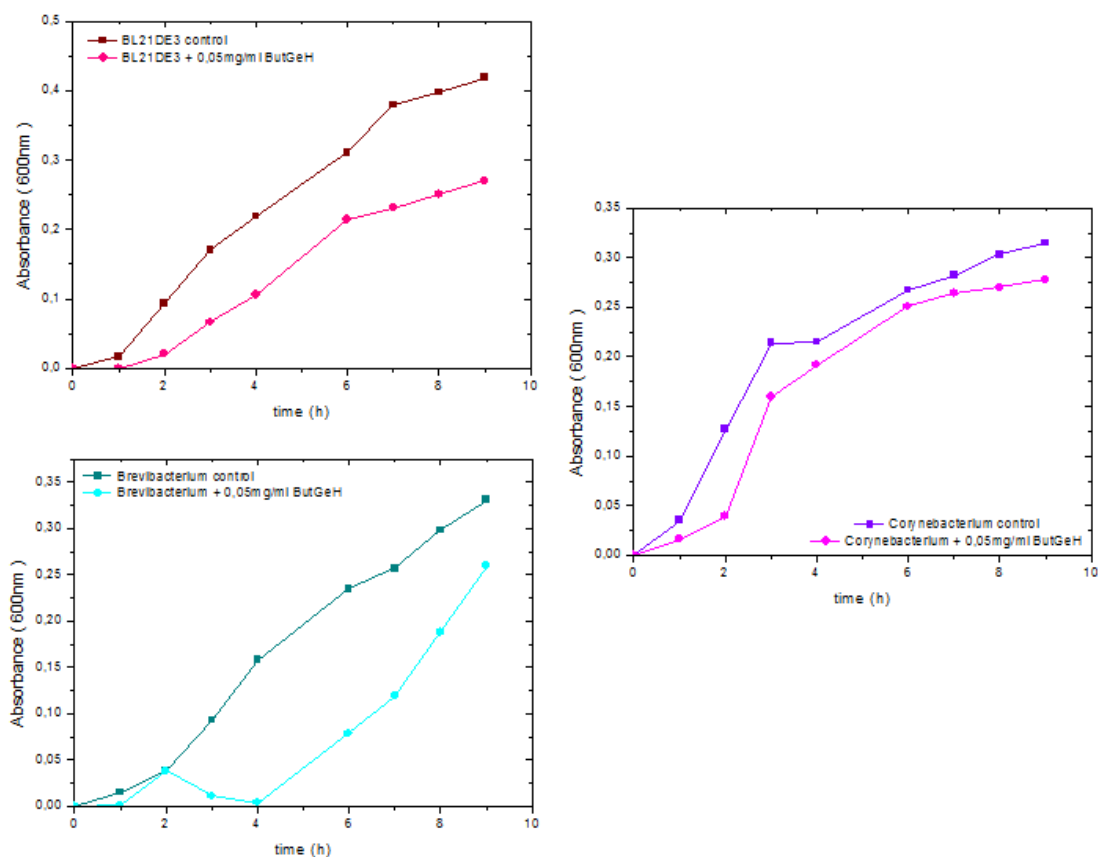


Εικόνα 52: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου που αποτελεί η ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο) και αναπτύσσεται φυσιολογικά ταυτίζεται με την ανάπτυξη του στελέχους παρουσία των 50μg/ml C₆₀(OH)₂₄ (μπλε), C-dots (γαλάζιο), CNDs-Adam (μωβ) και MoS+Se₂ (μπλε σκούρο). Παρατηρούμε επίσης ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργιών είναι ίδιος και οι καλλιέργειες αποκτούν την τιμή της βέλτιστης τιμής οπτικής πυκνότητας στον ίδιο χρόνο. Στις βακτηριακές καλλιέργειες που προστέθηκαν τα νανοϋλικά FG και C₆₀Br₂₄ ο ρυθμός ανάπτυξής τους είναι διαφορετικός. Το βακτηριακό στέλεχος παρουσία των νανοϋλικών αυτών μέχρι έξι ώρες επώασης μετά δεν έχει εισέλθει ακόμα στην εκθετική φάση ανάπτυξης.



Εικόνα 53: Γραφική απεικόνιση της βακτηριακής ανάπτυξης του στελέχους *Corynebacterium* παρουσία 50μg/ml νανοϋλικών. Το δείγμα ελέγχου αποτελεί την ανάπτυξη του στελέχους απουσία νανοϋλικών (μαύρο). Οι καλλιέργειες που επωάστηκαν παρουσία 50μg/ml SSLM και PSLM-Na⁺ καθυστερούν να εισέλθουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης δυο ώρες. Αντίστοιχα παρατηρούμε ότι οι καλλιέργειες που επωάστηκαν παρουσία 50μg/ml GeH καθυστερούν να εισέλθουν στην εκθετική φάση τέσσερις ώρες. Τέλος οι καλλιέργειες που επωάστηκαν παρουσία των SLM-2, PLM-3 και κυβοειδών καθυστερούν να εισέλθουν στην εκθετική φάση ανάπτυξης οκτώ ώρες.

Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι πραγματοποιήθηκε έλεγχος της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης τροποποιημένου Γερμανάνιου με βουτύλο- ομάδες. Το βουτυλιωμένο Γερμανάνιο δοκιμάστηκε και αυτό στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml και στα τρία βακτηριακά στελέχη (**Εικόνα 54**). Παρατηρούμε λοιπόν ότι το βουτυλιωμένο Γερμανάνιο προκαλεί μια μικρή αναστολή δυο ωρών στην ανάπτυξη των στελεχών BL21DE3 και *Corynebacterium* ενώ προκαλεί μια μεγαλύτερη αναστολή των τεσσάρων ωρών στο βακτηριακό στέλεχος *Brevibacterium*.

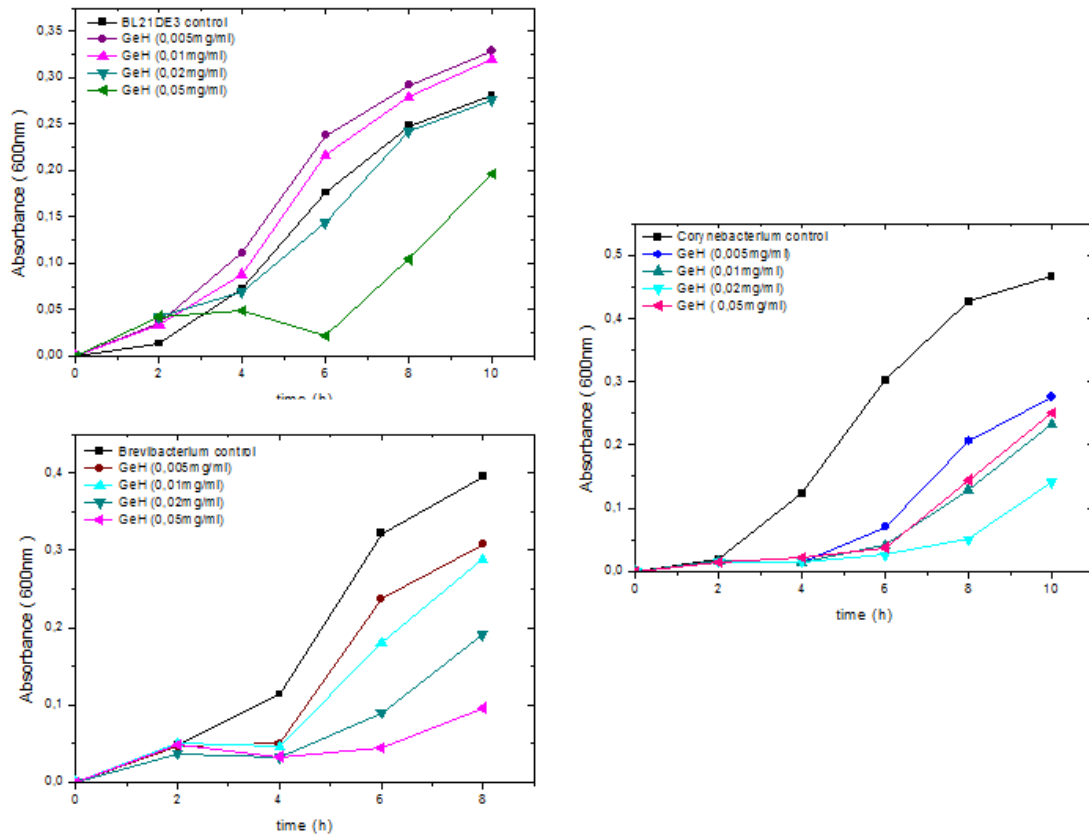


Εικόνα 54: Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης του βουτυλιωμένου Γερμανάνιου στα τρία βακτηριακά στελέχη BL21DE3, *Brevibacterium* και *Corynebacterium*. Παρατηρούμε ότι στα βακτηριακά στελέχη BL21DE3 (πάνω αριστερά) και *Corynebacterium* (δεξιά) προκαλεί μια αναστολή της ανάπτυξης για δυο ώρες ενώ αντίστοιχα στο στέλεχος *Brevibacterium* (κάτω αριστερά) προκαλεί μια μεγαλύτερη αναστολή των τεσσάρων ωρών.

Έυρεση ελάχιστης συγκέντρωσης αναστολής (MIC)

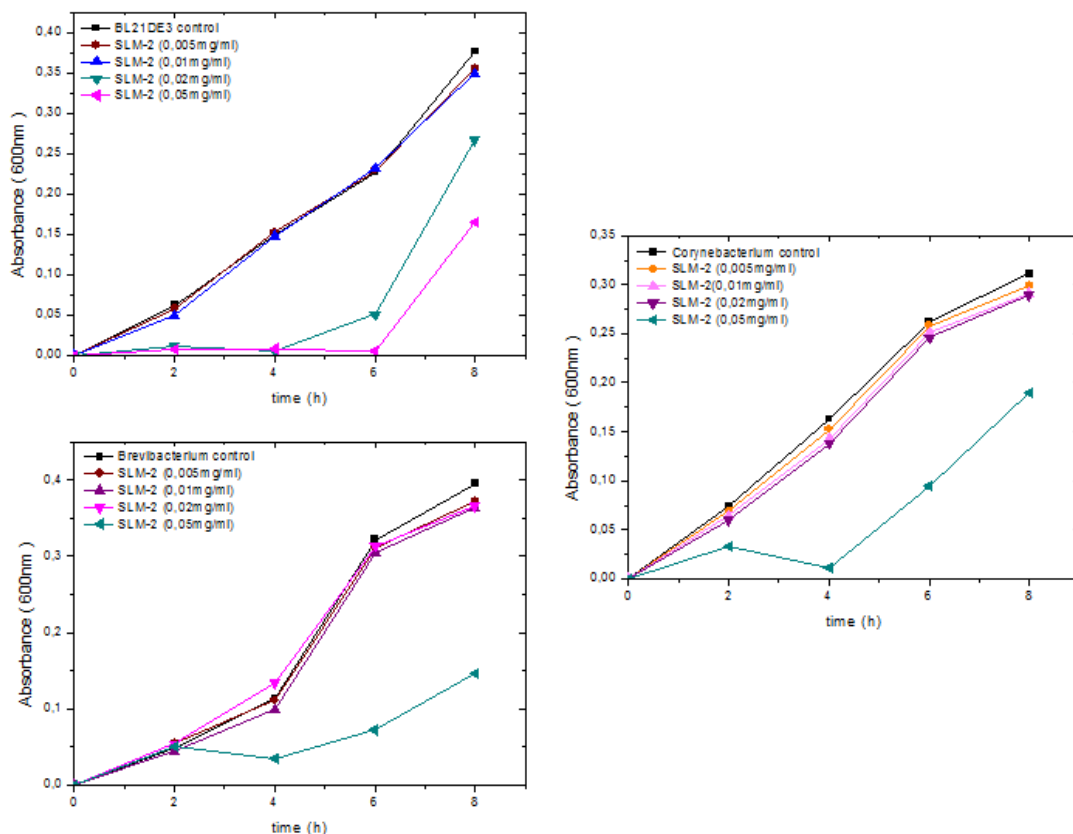
Για τα νανοϋλικά εκείνα που εμφανίζουν την μεγαλύτερη επίδραση στις βακτηριακές καλλιέργειες, καθυστερώντας την ανάπτυξή τους, ελέγχθηκε ποια είναι εκείνη η μικρότερη συγκέντρωση που μπορεί να προστεθεί το νανοϋλικό και είναι ικανή να προκαλέσει το αποτέλεσμα αυτό. Τα νανοϋλικά αυτά με την μεγαλύτερη επίδραση είναι το Γερμανάνιο, τα κυβοειδή καθώς επίσης και τα PLM-3 και SLM-2. Έτσι σύμφωνα με την μεθοδολογία που πραγματοποιήθηκαν και οι παραπάνω μελέτες για τον έλεγχο της επίδρασης των νανοϋλικών στις βακτηριακές καλλιέργειες, προστέθηκαν τα νανοϋλικά στις εξής συγκεντρώσεις: 5μg/ml, 10μg/ml, 20μg/ml και 50μg/ml. Στις δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν στα τρία βακτηριακά στελέχη αποδεικνύεται ότι το φαινόμενο αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης από το Γερμανάνιο είναι ανάλογο της ποσότητας του νανοϋλικού που προστίθεται στις καλλιέργειες των στελεχών. Το φαινόμενο δηλαδή είναι δόσο-εξαρτώμενο.

Παρατηρούμε ότι στο στέλεχος BL21DE3 μόνο η συγκέντρωση των 50μg/ml είναι ικανή να επιφέρει αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης για τέσσερις ώρες και έπειτα το στέλεχος εισέρχεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης όπου και πολλαπλασιάζεται (**Εικόνα 55**). Αντίστοιχα στο στέλεχος *Brevibacterium* οι συγκεντρώσεις των 5 και 10μg/ml Γερμανάνιου προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για δυο ώρες, η συγκέντρωση των 20μg/ml προκαλεί αναστολή τεσσάρων ωρών ενώ η συγκέντρωση των 50μg/ml προκαλεί αναστολή έξι ωρών (**Εικόνα 55**). Ακόμα στο στέλεχος *Corynebacterium* οι συγκεντρώσεις των 5, 10 και 50μg/ml προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για τέσσερις ώρες ενώ η συγκέντρωση των 20μg/ml προκαλεί αναστολή έξι ωρών (**εικόνα 55**). Μια δεύτερη παρατήρηση είναι ότι στο στέλεχος BL21DE3 μόνο η συγκέντρωση των 50μg/ml είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης ενώ στα άλλα δυο βακτηριακά στελέχη τα οποία είναι κατά Gram θετικά (*Brevibacterium* και *Corynebacterium*) και οι μικρότερες συγκεντρώσεις των 5 και 10μg/ml Γερμανανίου είναι ικανές να προκαλέσουν αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης για μικρότερο χρόνο.



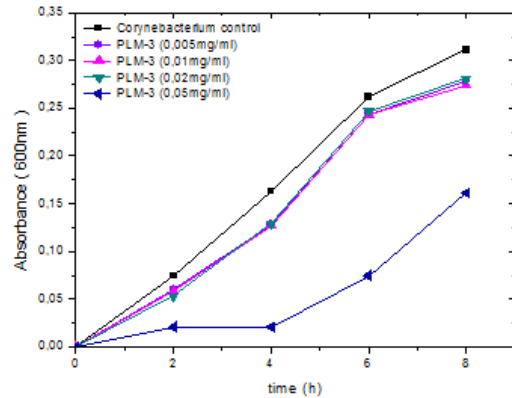
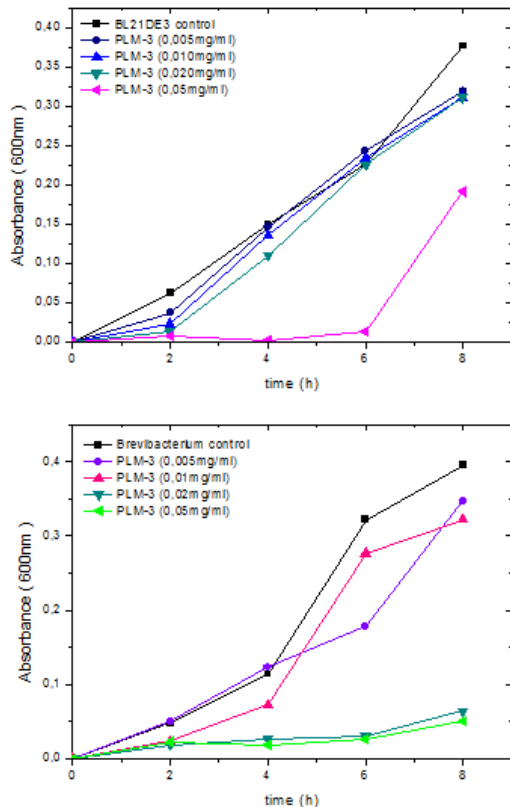
Εικόνα 55: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του Γερμανάνιου στα τρία βακτηριακά στελέχη BL21DE3, Brevibacterium και Corynebacterium. Στις δοκιμές που έγιναν στο στέλεχος BL21DE3 (πάνω αριστερά), παρατηρούμε ότι όλες οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν επηρεάζουν τον τρόπο ανάπτυξης του στελέχους παρά μόνο η συγκέντρωση των 50μg/ml GeH. Η συγκέντρωση αυτή προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους για τέσσερις ώρες. Αντίστοιχα στο στέλεχος Brevibacterium (κάτω αριστερά), παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις του προστιθέμενου GeH 5 και 10μg/ml προκαλούν καθυστέρηση του στελέχους να εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης για δυο ώρες. Τα 20μg/ml προκαλεί καθυστέρηση του στελέχους να εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης για τέσσερις ώρες ενώ τα 50μg/ml έξι ώρες. Τέλος στο στέλεχος Corynebacterium παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των 5, 10 και 50μg/ml προκαλούν καθυστέρηση να εισέλθει το στέλεχος στην εκθετική φάση ανάπτυξης για τέσσερις ώρες, ενώ η συγκέντρωση των 20μg/ml έξι ώρες.

Οι ίδιες συγκεντρώσεις δοκιμάστηκαν στα βακτηριακά στελέχη και για το νανοϋλικό SLM-2 (Εικόνα 56). Σε ότι αφορά το στέλεχος BL21DE3 οι συγκεντρώσεις 5 και 10μg/ml δεν επηρεάζουν την ανάπτυξη του στελέχους σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις των 20 και 50μg/ml που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για έξι ώρες. Στα στελέχη Brevibacterium και Corynebacterium το SLM-2 προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης μόνο στην περίπτωση που προστίθεται στην καλλιέργεια σε συγκέντρωση 50μg/ml. Η συγκέντρωση αυτή προκαλεί και στα δυο στελέχη αναστολή της ανάπτυξής τους τεσσάρων ωρών.



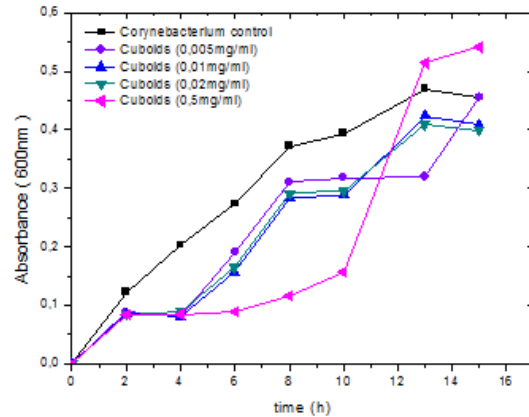
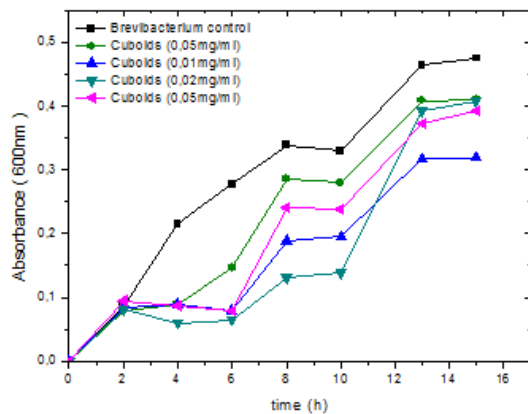
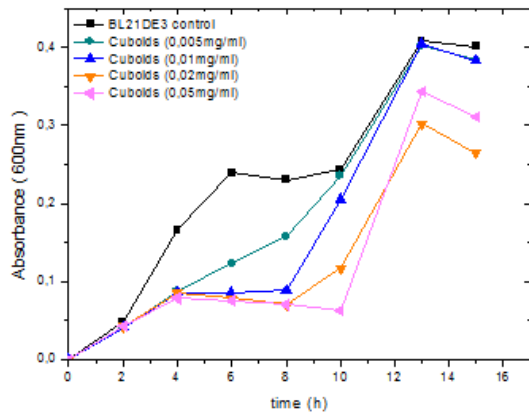
Εικόνα 56: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του SLM-2 στα τρία βακτηριακά στελέχη BL21DE3, Brevibacterium και Corynebacterium. Στις δοκιμές που έγιναν στο στέλεχος BL21DE3 (πάνω αριστερά), παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις που επηρεάζουν τον τρόπο ανάπτυξης του στελέχους είναι αυτές των 20 μ g/ml και των 50 μ g/ml SLM-2. Οι συγκεντρώσεις αυτές προκαλούν καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους για τέσσερις ώρες. Αντίστοιχα στο στέλεχος Brevibacterium (κάτω αριστερά), παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις του προστιθέμενου SLM-2 5,10 και 20 μ g/ml δεν προκαλούν καθυστέρηση του στελέχους να εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης παρά μόνο η συγκέντρωση των 50 μ g/ml που προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης για έξι ώρες. Τέλος στο στέλεχος Corynebacterium παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις των 5, 10 και 20 μ g/ml δεν προκαλούν καθυστέρηση να εισέλθει το στέλεχος στην εκθετική φάση ανάπτυξης αλλά η συγκέντρωση των 50 μ g/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης για δυο ώρες.

Για το επόμενο υλικό που πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος είναι το PLM-3 (Εικόνα 57). Παρατηρούμε έτσι ότι στο στέλεχος BL21DE3 μόνο η προσθήκη του PLM-3 σε συγκέντρωση 50 μ g/ml είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για έξι ώρες. Το ίδιο βλέπουμε να συμβαίνει και με το στέλεχος Corynebacterium στο οποίο το PLM-3 όταν προστεθεί στην συγκέντρωση των 50 μ g/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για τέσσερις ώρες. Αντίστοιχα στο στέλεχος Brevibacterium βλέπουμε ότι και οι δυο συγκεντρώσεις των 20 και 50 μ g/ml PLM-3 είναι ικανές να προκαλέσουν αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για οκτώ ώρες, σε αντίθεση με τις δυο μικρότερες συγκεντρώσεις των 5 και 10 μ g/ml PLM-3 που δεν επηρεάζουν την ανάπτυξή του.



Εικόνα 57: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης του PLM-3 στα τρία βακτηριακά στελέχη BL21DE3, Brevibacterium και Corynebacterium. Στις δοκιμές που έγιναν στο στέλεχος BL21DE3 (πάνω αριστερά), παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση που επηρεάζει τον τρόπο ανάπτυξης του στελέχους είναι αυτή των 50μg/ml PLM-3. Η συγκέντρωση αυτή προκαλεί καθυστέρηση στην ανάπτυξη του στελέχους για τέσσερις ώρες. Αντίστοιχα στο στέλεχος Brevibacterium (κάτω αριστερά), παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις του προστιθέμενου PLM-3, 5 και 10μg/ml δεν προκαλούν καθυστέρηση του στελέχους να εισέλθει στην εκθετική φάση ανάπτυξης σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις των 20 και 50μg/ml που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για έξι ώρες. Τέλος στο στέλεχος Corynebacterium παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις των 5, 10 και 20μg/ml δεν προκαλούν καθυστέρηση να εισέλθει το στέλεχος στην εκθετική φάση ανάπτυξης αλλά η συγκέντρωση των 50μg/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης για τέσσερις ώρες.

Από τον έλεγχο της προσθήκης διαφορετικών συγκεντρώσεων κυβοειδών στις καλλιέργειες των βακτηριακών στελεχών προκύπτουν τα γραφήματα της **εικόνας 58**. Παρατηρούμε λοιπόν ότι στο στέλεχος BL21DE3 η συγκέντρωση των 5μg/ml Κυβοειδή δεν προκαλεί κάποια διαταραχή στην ανάπτυξη του στελέχους σε αντίθεση με τις συγκεντρώσεις των 10 και 20μg/ml που προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του για οκτώ ώρες ενώ η συγκέντρωση των 50μg/ml προκαλεί αναστολή των δέκα ωρών. Αντίστοιχα στο στέλεχος Brevibacterium συγκέντρωση των 5μg/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για δυο ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις των 10,20 και 50μg/ml Κυβοειδή προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για έξι ώρες. Ακόμα στο στέλεχος Corynebacterium οι συγκεντρώσεις των Κυβοειδών 5, 10 και 20μg/ml προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης τους για τέσσερις ώρες ενώ η συγκέντρωση των 50μg/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για δέκα ώρες.



Εικόνα 58: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης των Κυβοειδών στα τρία βακτηριακά στελέχη BL21DE3, Brevibacterium και Corynebacterium. Στις δοκιμές που έγιναν στο στέλεχος BL21DE3 (πάνω αριστερά), παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των 10 και 20μg/ml Cuboids επηρεάζουν τον τρόπο ανάπτυξης του στελέχους αναστέλλοντας την ανάπτυξή του για οκτώ ώρες. Ακόμα η συγκέντρωση των 50μg/ml Cuboids προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για δέκα ώρες. Αντίστοιχα στο στέλεχος Brevibacterium (κάτω αριστερά), παρατηρούμε ότι η συγκέντρωση των 5μg/ml Cuboids προκαλεί μια μικρή αναστολή της ανάπτυξης για δυο ώρες, ενώ οι συγκεντρώσεις των 10,20 και 50μg/ml προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για έξι ώρες. Τέλος στο στέλεχος Corynebacterium παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις των 5, 10 και 20μg/ml δεν προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για τέσσερις ώρες ενώ η συγκέντρωση των 50μg/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης για δέκα ώρες.

3.1.5. Αντιμικροβιακή δράση υμενίων Γερμανάνιου

Όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 2.10 της προηγούμενης ενότητας, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της πιθανής αντιμικροβιακής δράση υμενίων Γερμανάνιου. Σύμφωνα με την μεθοδολογία που ακολουθήσαμε και περιγράφηκε προηγουμένως επιστρώνονται 50ml από τα κύτταρα που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου, σε στερεό θρεπτικό μέσο το οποίο επώαστηκε στους 37 °C για δώδεκα περίπου ώρες (12h) και έπειτα έγινε καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε αυτό. Από την καταμέτρηση των αποικιών προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα (**Εικόνα 59, 60 και 61**):

1^η Μέτρηση στέλεχος BL21DE:

- Δείγμα ελέγχου:
 - 10⁵ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 400 αποικιών
 - 10⁶ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 218 αποικιών
 - 10⁷ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 230 αποικιών
 - 10⁸ κυτταρικός πληθυσμός: πλήρης ανάπτυξη στο στερεό μέσο και μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών
- BL21DE3 + 50μg/ml GeH:
 - 10⁵ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 89 αποικιών
 - 10⁶ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 87 αποικιών
 - 10⁷ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 300 αποικιών
 - 10⁸ κυτταρικός πληθυσμός: πλήρης ανάπτυξη στο στερεό μέσο και μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών

1^η Μέτρηση στέλεχος Brevibacterium:

- Δείγμα ελέγχου:
 - 10⁵ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 106 αποικιών
 - 10⁶ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 200 αποικιών
 - 10⁷ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 375 αποικιών
- Brevibacterium + 50μg/ml GeH:
 - 10⁵ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 2 αποικιών
 - 10⁶ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 2 αποικιών
 - 10⁷ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 19 αποικιών

1^η Μέτρηση στέλεχος Corynebacterium:

- Δείγμα ελέγχου:
 - 10⁵ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 286 αποικιών
 - 10⁶ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 411 αποικιών
 - 10⁷ κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 700 αποικιών

- *Corynebacterium* + 50μg/ml GeH:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 52 αποικιών
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 160 αποικιών
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 749 αποικιών

2^η Μέτρηση στέλεχος BL21DE3:

- Δείγμα ελέγχου:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός:
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός:
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός:
- BL21DE3 + 50μg/ml GeH:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 250 αποικιών
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 180 αποικιών
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 202 αποικιών

Μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών. Πλήρης ανάπτυξη στο στερεό θρεπτικό μέσο .

2^η Μέτρηση στέλεχος *Brevibacterium*:

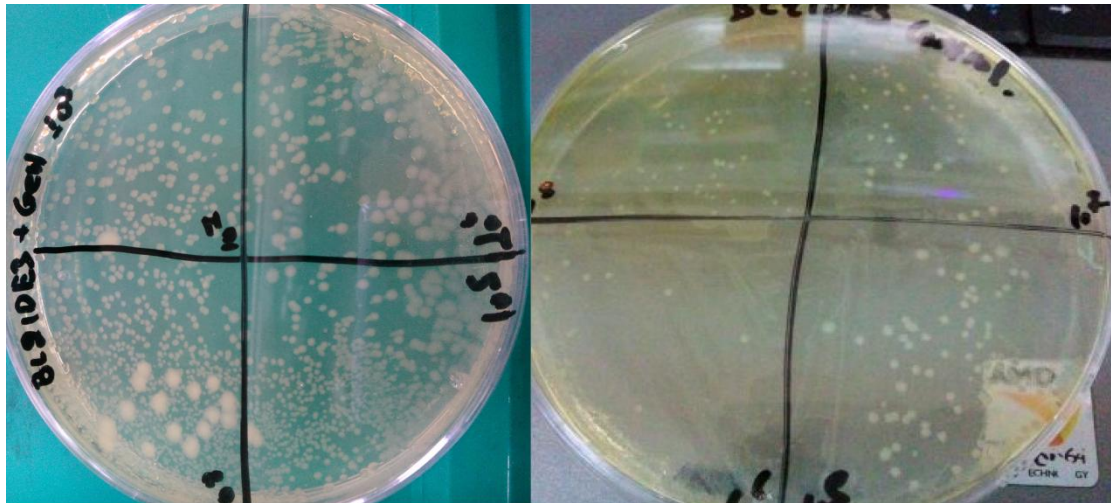
- Δείγμα ελέγχου:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός:
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός:
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός:
- *Brevibacterium* + 50μg/ml GeH:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 1 αποικίας
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 0 αποικιών
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 15 αποικιών

Μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών. Πλήρης ανάπτυξη στο στερεό θρεπτικό μέσο .

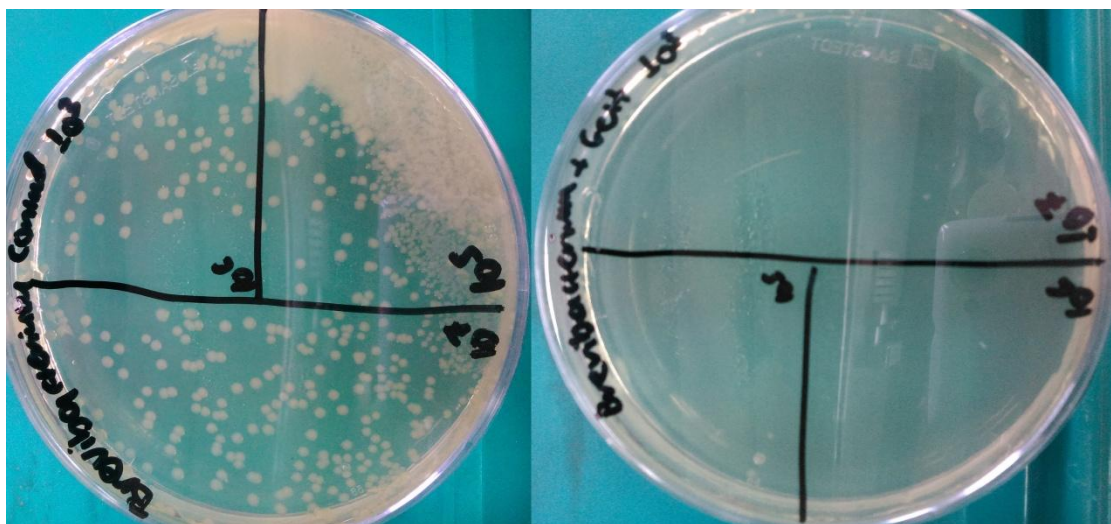
2^η Μέτρηση στέλεχος *Corynebacterium*:

- Δείγμα ελέγχου:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός:
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός:
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός:
- *Corynebacterium* + 50μg/ml GeH:
 - 10^5 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 34 αποικιών
 - 10^6 κυτταρικός πληθυσμός: καταμέτρηση 74 αποικιών
 - 10^7 κυτταρικός πληθυσμός: μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών

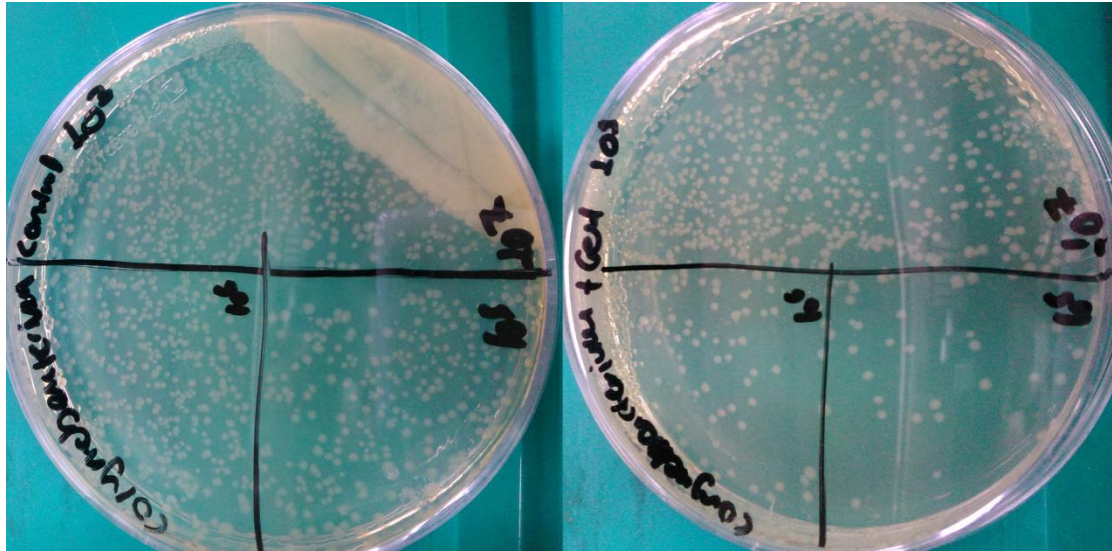
Μη μετρήσιμος αριθμός αποικιών. Πλήρης ανάπτυξη στο στερεό θρεπτικό μέσο .



Εικόνα 59: Λήψεις εικόνων των τρυβλίων στερεού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των κυττάρων του στελέχους BL21DE3 που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου με Γερμανάνιο (αριστερά) και των κυττάρων στην επιφάνεια γυαλιού (δεξιά). Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις (έως 10^3) στα δείγματα των κυττάρων στην επιφάνεια του Γερμανάνιου και έπειτα επίστρωσή τους στο στερεό μέσο. Παρατηρούμε τον αυξημένο κυτταρικό πληθυσμό στο δείγμα ελέγχου σε αντίθεση με τον μειωμένο αριθμό αποικιών στο τρυβλίο των κυττάρων που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου.



Εικόνα 60: Λήψεις εικόνων των τρυβλίων στερεού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των κυττάρων του στελέχους Brevibacterium που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου με Γερμανάνιο (δεξιά) και των κυττάρων στην επιφάνεια γυαλιού (αριστερά). Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις (έως 10^3) στα δείγματα των κυττάρων στην επιφάνεια του Γερμανάνιου και έπειτα επίστρωσή τους στο στερεό μέσο. Παρατηρούμε τον αυξημένο κυτταρικό πληθυσμό στο δείγμα ελέγχου σε αντίθεση με τον μειωμένο αριθμό αποικιών στο τρυβλίο των κυττάρων που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου.



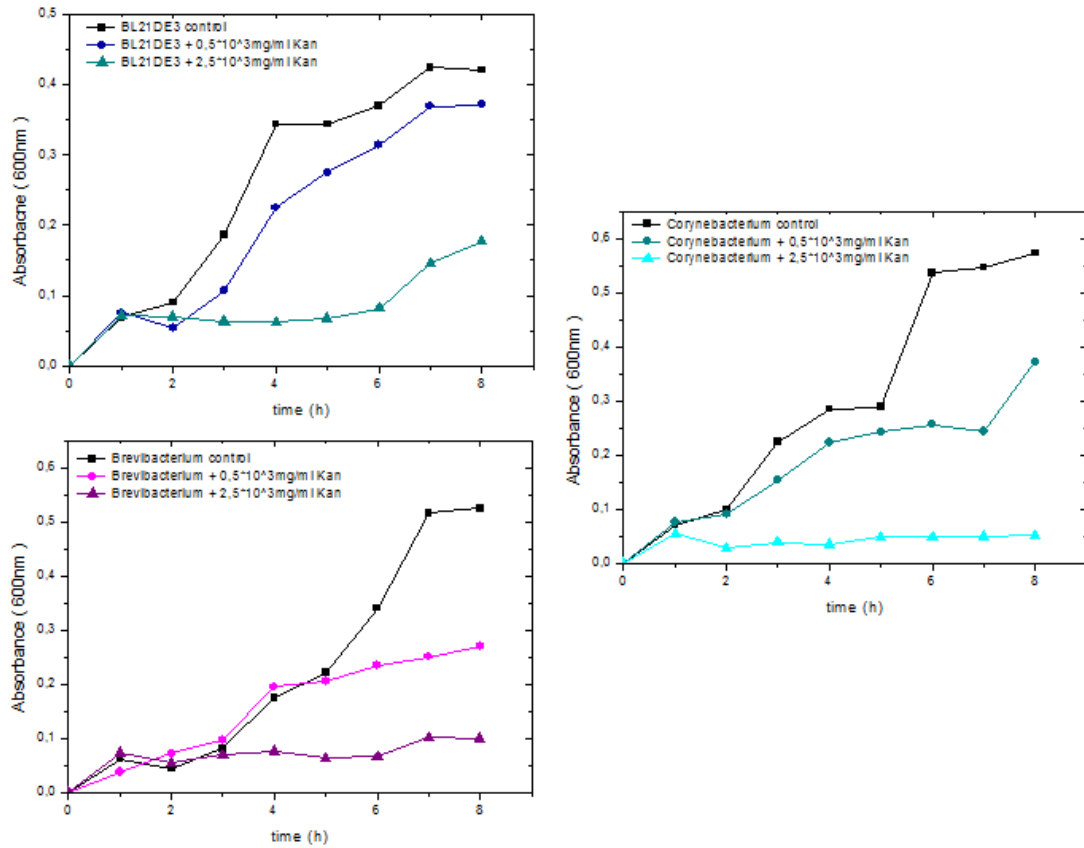
Εικόνα 61: Λήψεις εικόνων των τρυβλίων στερεού θρεπτικού μέσου ανάπτυξης των κυττάρων του στελέχους *Corynebacterium* που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου με Γερμανάνιο (δεξιά) και των κυττάρων στην επιφάνεια γυαλιού (αριστερά). Πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις (έως 10^3) στα δείγματα των κυττάρων στην επιφάνεια του Γερμανάνιου και έπειτα επίστρωσή τους στο στερεό μέσο. Παρατηρούμε τον αυξημένο κυτταρικό πληθυσμό στο δείγμα ελέγχου σε αντίθεση με τον μειωμένο αριθμό αποικιών στο τρυβλίο των κυττάρων που επώαστηκαν στην επιφάνεια του υμενίου.

Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το Γερμανάνιο στο βακτηριακό στέλεχος BL21DE3 μετά την καταμέτρηση των αποικιών στα δείγματα με αραιώση 10^5 εμφανίζει μια αναστολή της ανάπτυξης σε ποσοστό 78%. Αντίστοιχα για το στέλεχος *Brevibacterium* το ποσοστό αναστολή είναι 98% και για το βακτηριακό στέλεχος *Corynebacterium* είναι 61%. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε απόλυτη συμφωνία με τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την προηγούμενη ενότητα και πραγματοποιήθηκαν σε υγρές καλλιέργειες βακτηρίων και το Γερμανάνιο προστέθηκε σε μορφή σωματιδίων. Παρατηρούμε λοιπόν πως το στέλεχος *Brevibacterium* είναι πιο ευαίσθητο στο Γερμανάνιο σε αντίθεση με τα άλλα δυο στελέχη. Θα μπορούσαμε να πούμε πως το γεγονός αυτό δικαιολογείται συγκριτικά με το στέλεχος BL21DE3 καθώς αυτό είναι κατά Gram αρνητικό ενώ το *Brevibacterium* κατά Gram θετικό. Υπάρχει συνεπώς σαφής διαφορά της σύστασης των εξωτερικών μεμβρανών των δυο βακτηριακών κυττάρων. Τα στελέχη όμως *Brevibacterium* και *Corynebacterium* αποτελούν συγγενικά είδη και η διαφορά στην δράση των Γερμανάνιου θεωρείται σημαντική. Συνεπώς αν υποθέταμε πως το Γερμανάνιο διαπερνά την μεμβράνη των κυττάρων για να προκαλέσει τον κυτταρικό θάνατο θα περιμέναμε για τα δυο συγγενή αυτά στελέχη παρόμοια αποτελέσματα γεγονός που δεν συμβαίνει. Από τα παραπάνω πειράματα βεβαιώνεται η αντιμικροβιακή δράση του Γερμανάνιου δεν μπορεί όμως να διασαφηνιστεί ο τρόπος με τον οποίο το Γερμανάνιο επιδρά και επιφέρει την δράση αυτή.

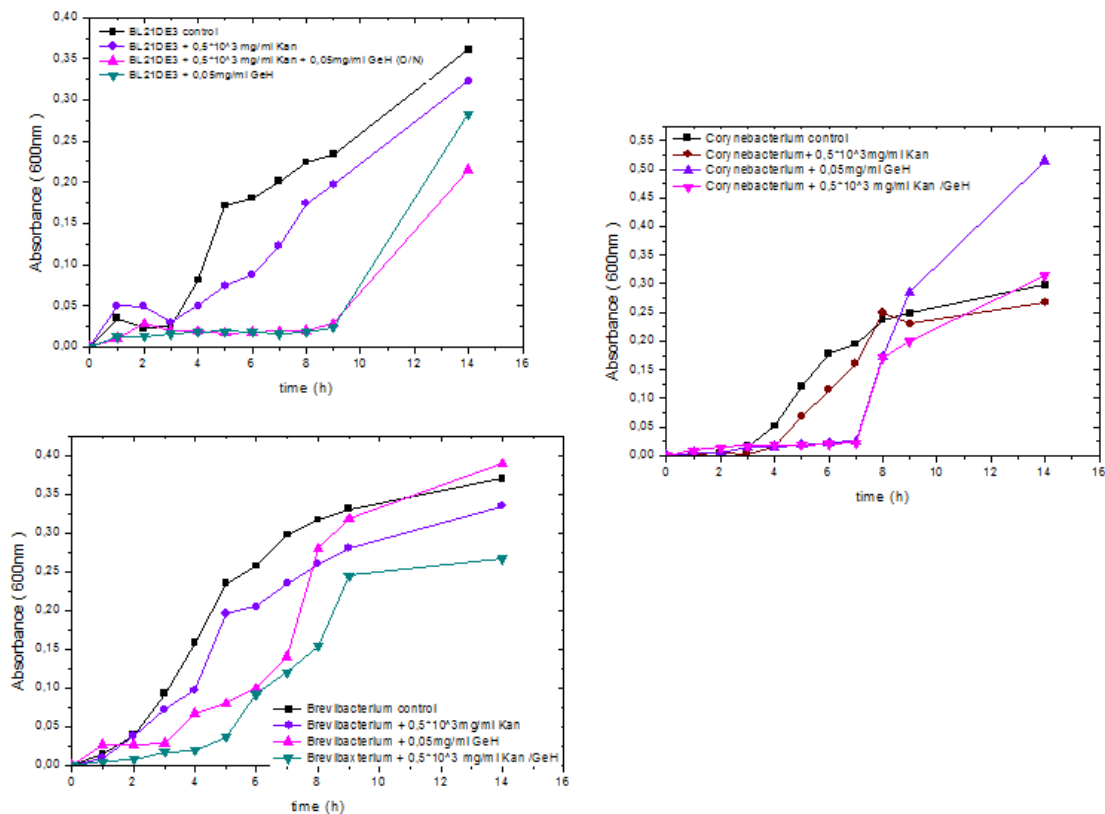
3.1.6. Έλεγχος συνεργατικής δράσης Γερμανανίου και καναμυκίνης

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.11 της προηγούμενης ενότητας πραγματοποιήθηκε έλεγχος για την πιθανή συνεργατική αντιμικροβιακή δράση του Γερμανανίου και κάποιου αντιβιοτικού, στην περίπτωση μας της καναμυκίνης. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν η κατασκευή των καμπύλων ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών παρουσία Γερμανανίου και αντιβιοτικού αφού πρώτα βρέθηκε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν θανατώνει πλήρως τα βακτηριακά κύτταρα. Καθώς γνωρίζουμε ότι το αντιβιοτικό προστίθεται πάντα σε μια βακτηριακή καλλιέργεια σε αναλογία 1/1000 δοκιμάστηκαν οι συγκεντρώσεις των 2.6μg/ml και 0.5μg/ml καναμυκίνη. Από το γράφημα που ακολουθεί (**Εικόνα 62**) συμπεραίνουμε ότι καταλληλότερη συγκέντρωση για το προστιθέμενο αντιβιοτικό είναι αυτή των 0.5μg/ml καθώς επιτρέπει την ανάπτυξη των στελεχών σε μικρότερο χρόνο από ότι η συγκέντρωση των 2.5μg/ml.

Εφόσον βρέθηκε η συγκέντρωση του αντιβιοτικού που δεν προκαλεί πλήρη θανάτωση των βακτηρίων ή σημαντική αναστολή της ανάπτυξης των καλλιεργειών, προστέθηκαν συνδυαστικά 0,5μg/ml Καναμυκίνη και 50μg/ml Γερμανανίου και κατασκευάστηκαν οι καμπύλες ανάπτυξης των στελεχών παρουσία αυτών (**Εικόνα 63**). Από τις καμπύλες ανάπτυξης που προκύπτουν για τα τρία βακτηριακά στελέχη παρατηρούμε ότι στα στελέχη BL21DE3 και *Corynebacterium* η αναστολή που προκαλείται από την συνεργατική δράση καναμυκίνης-γερμανανίου συμπίπτει με την αναστολή που προκαλείται από το Γερμανάνιο απουσία της καναμυκίνης. Το γεγονός αυτό δεν παρατηρείται στο στέλεχος *Brevibacterium* όπου βλέπουμε ότι στο δείγμα παρουσία των καναμυκίνη-γερμανανίου παρατείνεται η αναστολή η οποία διαρκεί έξι ώρες διατηρεί χαμηλότερες τιμές οπτικής πυκνότητας σε σύγκριση με την αναστολή που προκαλείται από το Γερμανάνιο απουσία καναμυκίνης, η οποία διαρκεί ίδιο χρονικό διάστημα.

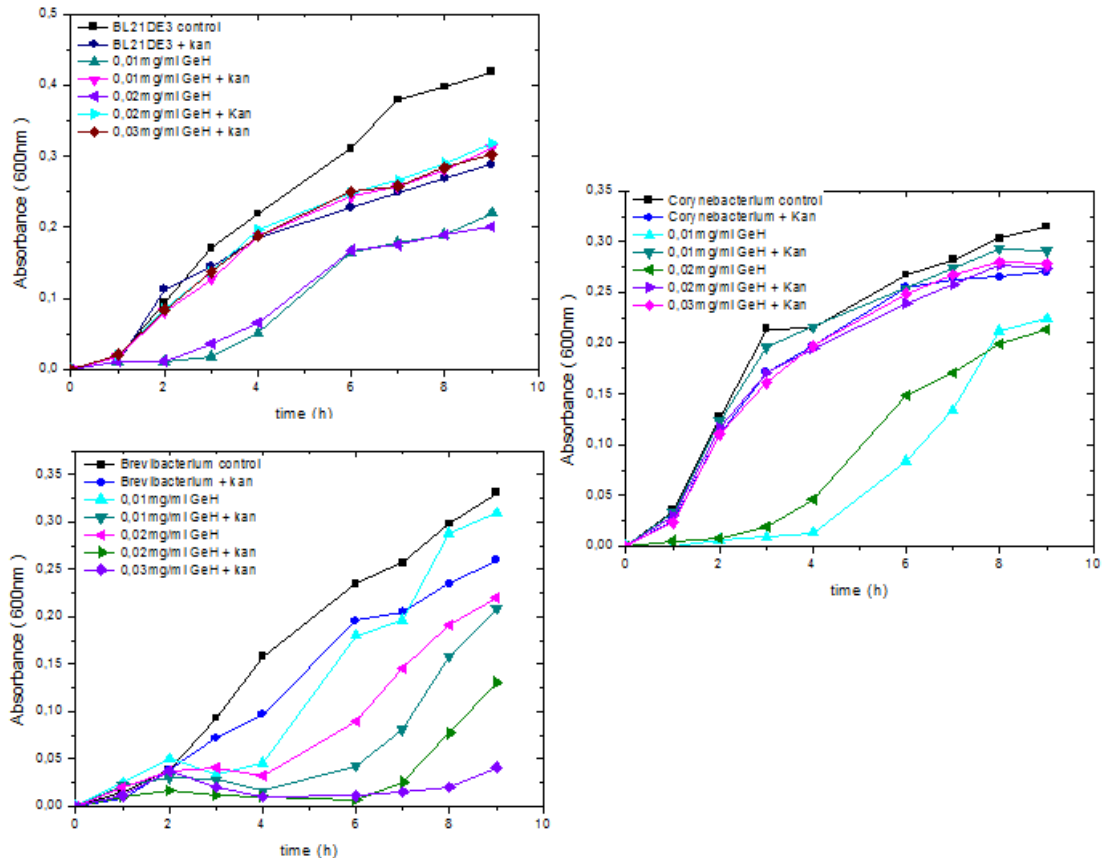


Εικόνα 62: Γραφική αναπαράσταση της ανάπτυξης των τριών βακτηριακών στελεχών BL21DE3, Brevibacterium και Corynebacterium παρουσία 0,5 και 2,5µg/ml Καναμικίνη. Παρατηρούμε ότι σε όλα τα στελέχη η συγκέντρωση της καναμικίνης που επιτρέπει την ανάπτυξη του στελέχους είναι εκείνη των 0,5µg/ml καθώς αυτή των 2,5µg/ml προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης των στελεχών.



Εικόνα 63: Γραφική αναπαράσταση της ανάπτυξης των τριών βακτηριακών στελεχών BL21DE3, Brevibacterium και Corynebacterium παρουσία 0,5μg/ml Καναμικίνης και 50μg/ml Γερμανάνιου. Παρατηρούμε ότι στα στελέχη BL21DE3 και Corynebacterium η αναστολή που προκαλείται παρουσία των Καναμικίνη-Γερμανάνιου ταυτίζεται απόλυτα με την αναστολή που προκαλείται από το Γερμανάνιο απουσία καναμικίνης. Αντίθετα στο στέλεχος Brevibacterium παρότι η αναστολή που προκαλείται είναι η ίδια η παρουσία Καναμικίνης-Γερμανάνιου διατηρεί μικρότερες τιμές πτικής πυκνότητας σε σύγκριση με αυτές που προκαλεί το Γερμανάνιο απουσία Καναμικίνης.

Όπως προέκυψε από τα δοσο-εξαρτώμενα πειράματα της προηγούμενης παραγράφου που πραγματοποιήθηκαν, η κοινή συγκέντρωση Γερμανάνιου σε όλα τα βακτηριακά στελέχη, η οποία είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξής τους για έξι ώρες κατά μέσο όρο είναι εκείνη των 50μg/ml. Επόμενος στόχος λοιπόν ήταν η μελέτη της πιθανής βελτίωσης της αναστολής που προκαλείται από τις μικρότερες συγκεντρώσεις Γερμανάνιου που χρησιμοποιήθηκαν, αυτές των 10, 20 και 30μg/ml Γερμανάνιου, μετά την προσθήκη του αντιβιοτικού. Τα αποτελέσματα που πήραμε από την προσπάθεια διερεύνησης μιας πιθανής βελτίωσης ποικίλουν ανάλογα με το βακτηριακό στέλεχος (Εικόνα 64). Έτσι βλέπουμε ότι στα στελέχη BL21DE3 και Corynebacterium δεν παρατηρείται κάποια βελτίωση στο χρόνο αναστολής, δηλαδή να ισχυροποιείται το φαινόμενο της αναστολής. Αντίθετα παρουσία του αντιβιοτικού βελτιώνεται ο ρυθμός ανάπτυξης των στελεχών τα οποία εισέρχονται πιο γρήγορα στην εκθετική φάση ανάπτυξης. Στον αντίποδα αυτών το βακτηριακό στέλεχος Brevibacterium φαίνεται πως η παρουσία του αντιβιοτικού ισχυροποιεί την δράση του Γερμανάνιου και την αναστολή που αυτό προκαλεί με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για οκτώ ώρες.



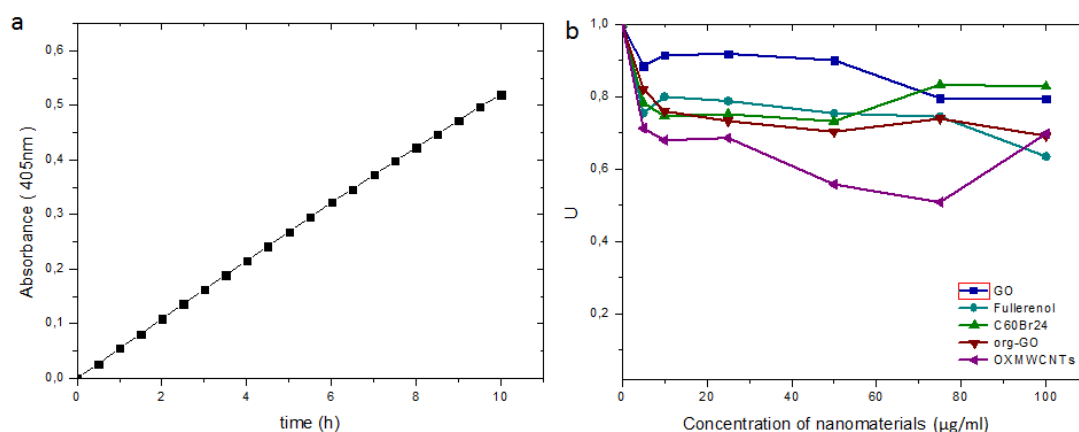
Εικόνα 64: Γραφική απεικόνιση της συνεργατικής δράσης του αντιβιοτικού Καναμικίνη και του Γερμανάνιου. Παρατηρούμε ότι στα στελέχη BL21DE3 (πάνω δεξιά) και *Corynebacterium* (αριστερά) οι καλλιέργειες παρουσία Καναμικίνης-Γερμανάνιου αναπτύσσονται σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη ανάπτυξης των στελεχών αντίστοιχα, την οποία ακολουθεί το δείγμα ελέγχου. Αντίθετα στο στέλεχος *Brevibacterium* παρατηρούμε πως οι καλλιέργειες παρουσία Καναμικίνης-Γερμανάνιου εμφανίζουν μια αύξηση του φαινομένου αναστολής καθώς βλέπουμε ότι η συγκέντρωση των 10μg/ml Γερμανάνιου παρουσία Καναμικίνης αναστέλλει την ανάπτυξή του για έξι ώρες σε σύγκριση με την αναστολή των τεσσάρων ωρών που προκαλεί μόνο το Γερμανάνιο. Αντίστοιχα η συγκέντρωση των 20μg/ml Γερμανάνιου παρουσία Καναμικίνης αναστέλλει την ανάπτυξη για οκτώ ώρες σε σύγκριση με τις τέσσερις ώρες που αναστέλλει την ανάπτυξη το Γερμανάνιο απουσία καναμικίνης. Τέλος η συγκέντρωση των 30μg/ml γερμανάνιου παρουσία καναμικίνης αναστέλλει την ανάπτυξη του στελέχους για οκτώ ώρες.

3.2.Νανοβιοκατάλυση

Τα ένζυμα όπως αναφέραμε, αποτελούν ειδικές πρωτεΐνες ή πρωτεϊνικής βάσης πολύπλοκες οργανικές ενώσεις, που αποτελούνται από πολυμερή των αμινοξέων. Ως τέτοιου είδους μόρια μπορούν να αλληλεπιδρούν με τα νανοϋλικά και είτε να βελτιώνουν τις ιδιότητές τους είτε αλλάζοντας την στερεοδομή τους ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασης αυτής, να αλλοιώνουν τις ιδιότητές τους και να χάνουν την λειτουργικότητά τους. Κύριος ρόλος των ενζύμων είναι η δράση τους ως καταλύτες στις χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό του οργανισμού. Έτσι όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 2.4. της προηγούμενης ενότητας, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της επίδρασης των νανοϋλικών στην κατάλυση της αντίδρασης από το ένζυμο όταν αυτή πραγματοποιείται παρουσία του εκάστοτε νανοϋλικού.

HRP

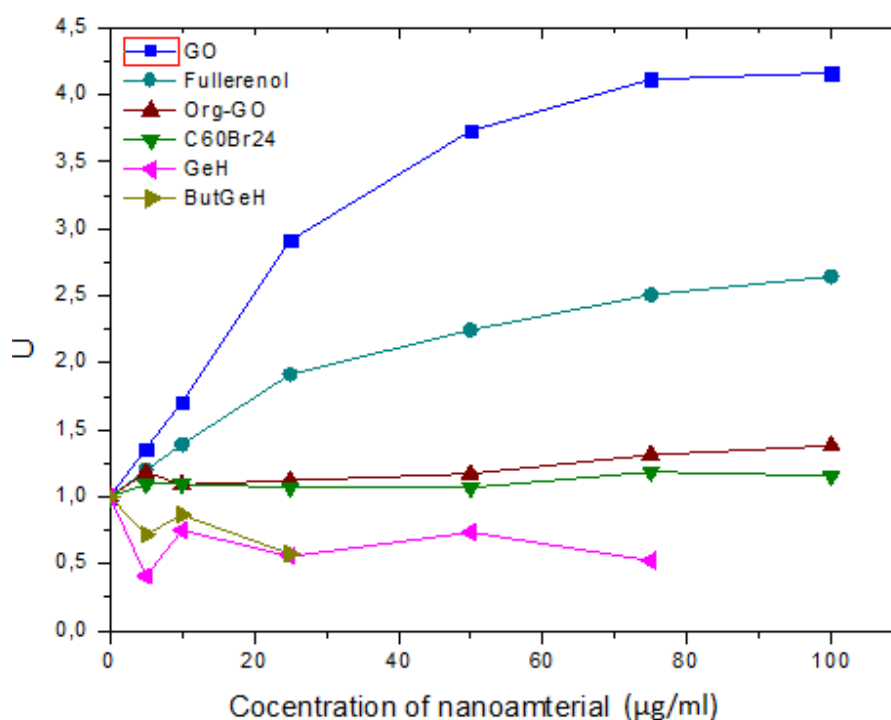
Για το ένζυμο της υπεροξειδάσης ελέγχθηκε αρχικά η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει απουσία κάποιου νανοϋλικού. Η ταχύτητα αυτή αντιστοιχεί στην κλίση της ευθείας που προκύπτει από την λήψη των τιμών της απορρόφησης του δείγματος της αντίδρασης σε χρόνο 10min (**Εικόνα 65a**). Οι μετρήσεις λήφθηκαν και για τον προσδιορισμό της ταχύτητας της αντίδρασης παρουσία των νανοϋλικών όπως το Γραφένιο, το Φουλερένιο, το Βρωμιωμένο Φουλερένιο και τους οξειδωμένους νανασσωλήνες άνθρακα. Παρατηρούμε πώς η προσθήκη του κάθε νανοϋλικού από τα προαναφερθέντα, δεν προκαλεί σημαντική αλλαγή στην ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η HRP, παρά μόνο φαίνεται μια αμελητέα μείωσή της (**Εικόνα 65b**). Συνεπώς τα νανοϋλικά αυτά δεν επηρεάζουν λειτουργικές ομάδες του ενζύμου της HRP ή το ενεργό κέντρο αυτού έτσι ώστε να επηρεάζουν την ενεργότητά του.



Εικόνα 65: Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης των νανοϋλικών του Γραφενίου, του Φουλερενίου και των Οξειδωμένων νανασσωλήνων άνθρακα στην ταχύτητα αντίδρασης που καταλύει το ένζυμο HRP. a) Γραφική αναπαράσταση των τιμών απορρόφησης της αντίδρασης σε χρόνο 10min από την κλίση της οποίας προκύπτει η τιμή της ταχύτητας με την οποία καταλύει την αντίδραση η HRP. b) Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης των νανοϋλικών στην ταχύτητα κατάλυσης της αντίδρασης της HRP.

Κυτόχρωμα C

Στο κυτόχρωμα C παρατηρούμε διαφορετικές επιδράσεις σε αυτό από το εκάστοτε νανοϋλικό (εικόνα 66). Η αντίδραση που καταλύεται από το κυτόχρωμα C παρουσία οξειδίου του γραφενίου πραγματοποιείται πιο γρήγορα από ότι απουσία αυτού. Βλέπουμε ότι η παρουσία του οξειδίου του γραφενίου σε συγκέντρωση 25μg/ml είναι ικανή να τριπλασιάσει την ταχύτητα της αντίδρασης ενώ οι συγκεντρώσεις των 75 και 100μg/ml είναι ικανές να τετραπλασιάσουν την ταχύτητα της αντίδρασης. Αντίστοιχα η παρουσία του Φουλερένιου στις συγκεντρώσεις των 25 έως και 100μg/ml είναι ικανές να διπλασιάσουν την ταχύτητα με την οποία το κυτόχρωμα καταλύει την αντίδραση. Παρατηρούμε όμως ότι το τροποποιημένο Οξείδιο του Γραφενίου καθώς επίσης και το Βρωμιωμένο Φουλερένιο δεν επηρεάζουν καθόλου την ταχύτητα με την οποία το κυτόχρωμα C καταλύει την αντίδραση. Ενώ αντίθετα το Γερμανάνιο και το βουτυλιωμένο Γερμανάνιο φαίνεται να έχουν μια μικρή και όχι σημαντική τάση αναστολής της αντίδρασης. Από τα αποτελέσματα αυτά συμπεραίνουμε πως το Κυτόχρωμα C αλληλεπιδρά με τα οξείδιο του Γραφενίου καθώς επίσης και το Φουλερένιο με τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοεί την σύνδεσή του με το υπόστρωμα και την τελική παραγωγή του προϊόντος.

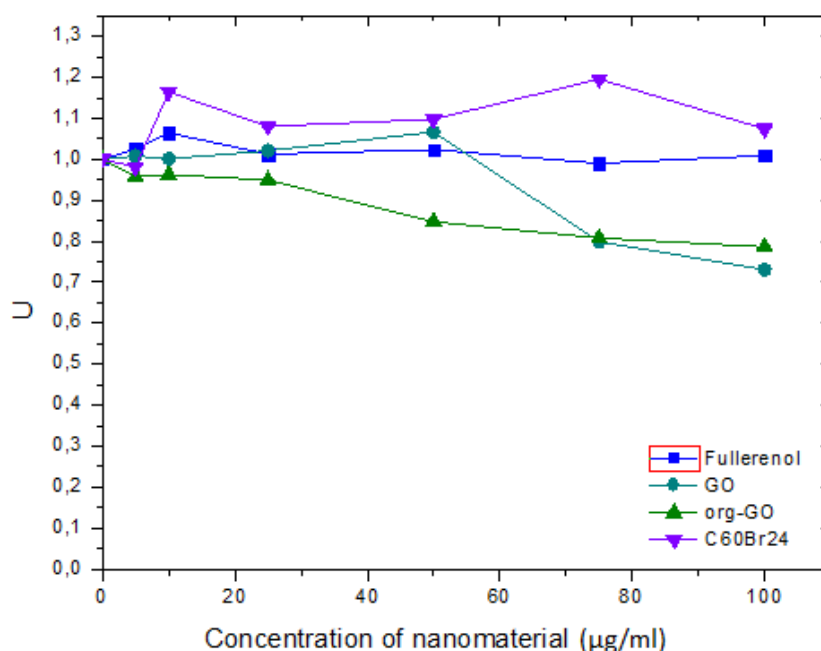


Εικόνα 66: Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης των νανοϋλικών στην ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το κυτόχρωμα C. Παρατηρούμε σημαντική αύξηση της ταχύτητας παρουσία του νανοϋλικού οξειδίου του Γραφενίου όπου σε συγκέντρωση 25μg/ml τριπλασιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης ενώ σε συγκεντρώσεις 75 και 100μg/ml τετραπλασιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Αντίστοιχα το Φουλερένιο σε συγκέντρωση των 25 και 75μg/ml διπλασιάζει την ταχύτητα της αντίδρασης και σε συγκέντρωση 100μg/ml σχεδόν τριπλασιάζει την ταχύτητά της. Αντίθετα το τροποποιημένο Οξείδιο του Γραφενίου και το Βρωμιωμένο Φουλερένιο δεν επηρεάζουν την

ταχύτητα της αντίδρασης όπως επίσης και το Γερμανάνιο και το βουτυλιωμένο Γερμανάνιο που εμφανίζουν μια πολύ μικρή μείωση στην ταχύτητα της αντίδρασης.

Οξειδάση της Γλυκόζης

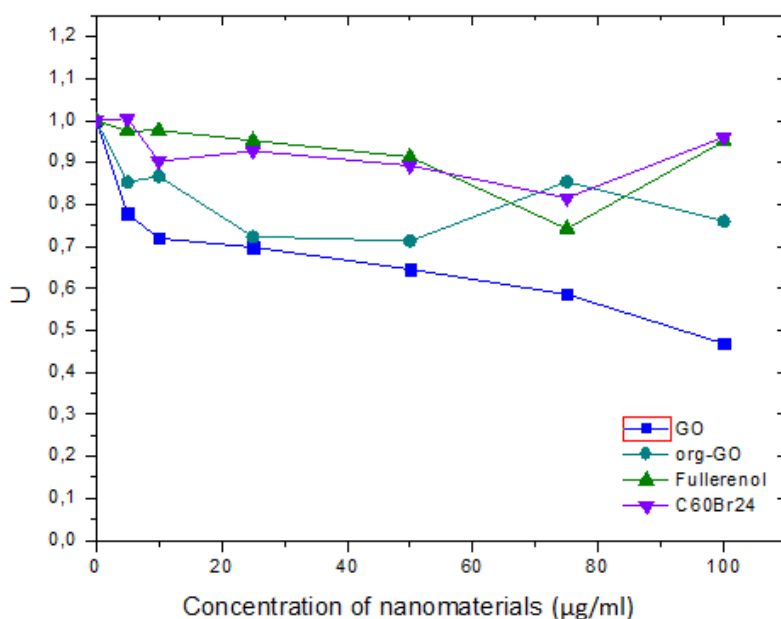
Στην αντίδραση που καταλύεται από την οξειδάση της Γλυκόζης τα νανοϋλικά που δοκιμάστηκαν (Γραφένιο, τροποποιημένο Γραφένιο, Φουλερένιο και Βρωμιωμένο Φουλερένιο) δεν έχουν καμία επίδραση (**Εικόνα 67**). Η ταχύτητα με την οποία πραγματοποιείται η αντίδραση απουσία των νανοϋλικών είναι σχεδόν ίδια με την ταχύτητα παρουσία των νανοϋλικών. Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνουμε πως η παρουσία των νανοϋλικών αυτών δεν παρεμποδίζει αλλά ούτε ευνοεί την σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα και την τελική παραγωγή του προϊόντος. Επίσης συμπεραίνουμε πως τα νανοϋλικά αυτά δεν επιδρούν με τέτοιο τρόπο με την οξειδάση της γλυκόζης ώστε να μεταβάλουν την δομή του ή το ενεργό του κέντρο ώστε να μην μπορεί το ένζυμο αυτό να καταλύει πλέον την αντίδρασή του.



Εικόνα 67: Γραφική αναπαράσταση της επίδρασης των νανοϋλικών στην ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η Οξειδάση της Γλυκόζης. Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις όσο και να αυξήσουμε την συγκέντρωση του νανοϋλικού στην αντίδραση που καταλύει η οξειδάση της Γλυκόζης η ταχύτητά της δεν μεταβάλλεται σημαντικά.

Καταλάση

Και στην περίπτωση της καταλάσης όσο και αν αυξήθηκε η συγκέντρωση των προστιθέμενων νανοϋλικών δεν μεταβλήθηκε η ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει η καταλάση (**Εικόνα 68**). Στην περίπτωση προσθήκης Οξειδίου του Γραφενίου σε συγκέντρωση 100μg/ml μια μικρή μείωση της ταχύτητας της αντίδρασης. Συνεπώς καταλήγουμε πως τα νανοϋλικά που προστέθηκαν δεν προκάλεσαν κάποια αλλαγή σε σημαντικές λειτουργικές ομάδες του ενζύμου ώστε να είναι αδύνατον πλέον να καταλύει την αντίδραση αλλά επίσης δεν υπήρξε κάποια σχέση παρεμπόδισης του υποστρώματος να συνδεθεί με το ένζυμο για την παραγωγή του προϊόντος.

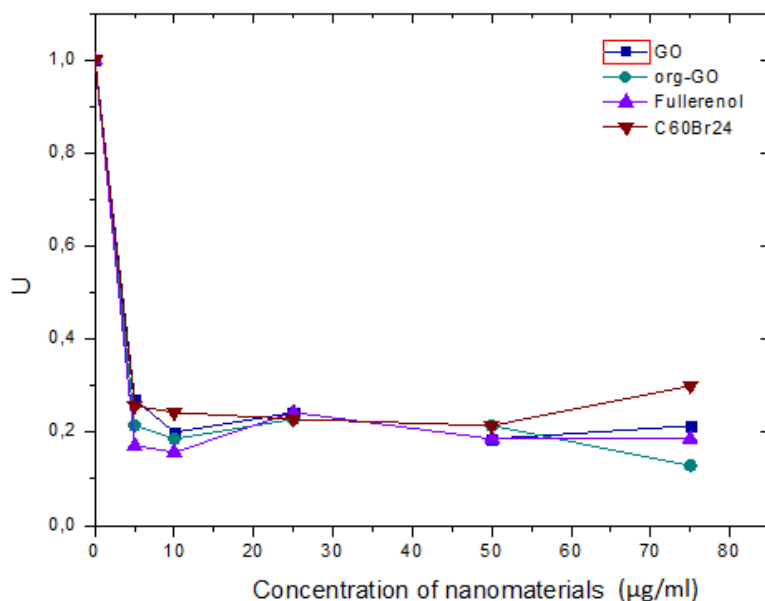


Εικόνα 68: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης των νανοϋλικών Οξειδίου του Γραφενίου, τροποποιημένου Γραφενίου, Φουλερενίου και βρωμιωμένου Φουλερενίου στην ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο καταλάση. Παρατηρούμε ότι η ταχύτητα της αντίδρασης δεν αλλάζει σημαντικά όσο αυξάνουμε την συγκέντρωση του προστιθέμενου νανοϋλικού από 5μg/ml έως 100μg/ml.

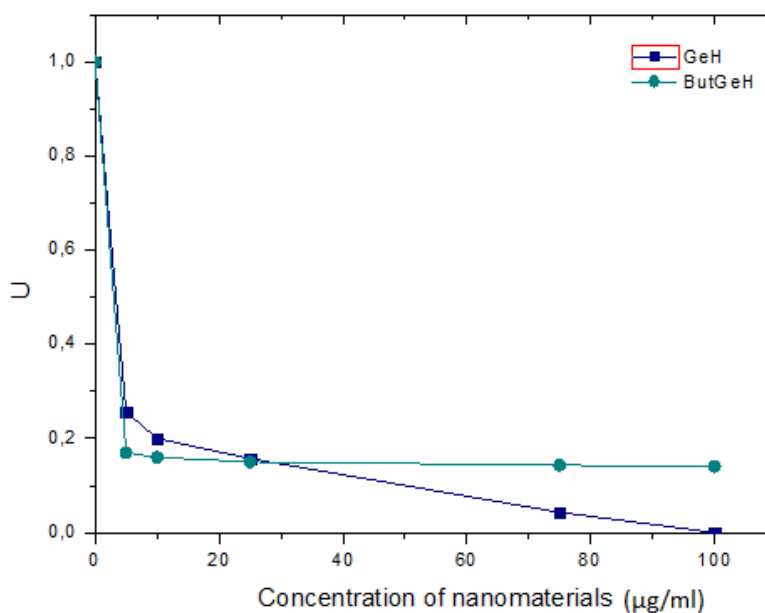
Λακκάση

Η παρουσία των νανοϋλικών στην αντίδραση που καταλύει η Λακκάση, όπως προκύπτει από τις μελέτες που έγιναν φαίνεται να επηρεάζει ισχυρά το ένζυμο της λακκάσης και κατ'επέκταση την ταχύτητα της αντίδρασης. Από το γράφημα της **Εικόνας 69** παρατηρούμε προσθέτοντας την μικρότερη συγκέντρωση νανοϋλικού αυτή των 5μg/ml η ταχύτητα της αντίδρασης υπό-πενταπλασιάζεται. Το γεγονός αυτό παρατηρείται σε όλα τα νανοϋλικά τα οποία προστέθηκαν σε αυτές τις συγκεντρώσεις. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του νανοϋλικού στην αντίδραση η ταχύτητα υπό-πενταπλασιάζεται σε όλες τις περιπτώσεις. Αντίστοιχα όταν προστίθενται 5μg/ml έως και 75μg/ml Γερμανάνιο και βουτυλιωμένο Γερμανάνιο η ταχύτητα της αντίδρασης υπό-πενταπλασιάζεται ενώ όταν προτίθενται 100μg/ml αυτών η αντίδραση ουσιαστικά δεν πραγματοποιείται (**Εικόνα 70**). Από τα αποτελέσματα αυτά οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως τα νανοϋλικά αυτά μετά από

αλληλεπίδραση με το ένζυμο της Λακκάσης προκάλεσαν κάποια αλλαγή στις λειτουργικές ομάδες του ενζύμου ή το ενεργό του κέντρο με αποτέλεσμα την αναστολή της αντίδρασης. Πιθανόν έτσι να πραγματοποιείται παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου του ενζύμου να αναγνωρίζει το υπόστρωμα ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Επίσης κάποια αλληλεπίδραση των νανοϋλικών αυτών με πλευρικές ομάδες του ενζύμου, μπορεί να έχει ως άμεσο αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής του ενζύμου με αποτέλεσμα την συγκάλυψη του ενεργού κέντρου του ενζύμου καθιστώντας έτσι την αναγνώριση του υποστρώματος από αυτό και την παραγωγή του προϊόντος αδύνατη.



Εικόνα 69: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης των νανοϋλικών Γραφενίου και Φουλερενίου και τροποποιήσεων αυτών στην αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο της Λακκάσης. Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις νανοϋλικού όταν αυτά προστίθενται σε συγκεντρώσεις από 5µg/ml έως και 75µg/ml η ταχύτητα της αντίδρασης υπό-πενταπλασιάζεται.



Εικόνα 70: Γραφική απεικόνιση της επίδρασης των νανοϋλικών Γερμανάνιου και βουτυλιωμένου Γερμανάνιου στην αντίδραση που καταλύεται από το ένζυμο της Λακκάσης. Παρατηρούμε ότι σε όλες τις περιπτώσεις νανοϋλικού όταν αυτά προστίθενται σε συγκεντρώσεις από 5μg/ml έως και 75μg/ml η ταχύτητα της αντίδρασης υπό-πενταπλασιάζεται ενώ όταν προστίθενται σε συγκέντρωση 100μg/ml η αντίδραση δεν πραγματοποιείται.

3.3. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε έλεγχος της πιθανής αντιμικροβιακής δράσης μιας σειράς νανοδομών σε τρία βακτηριακά στελέχη, τα BL21DE3 το οποίο είναι κατά Gram αρνητικό και τα *Brevibacterium* και *Corynebacterium* τα οποία είναι κατά Gram θετικά. Ακόμα πραγματοποιήθηκε έλεγχος της επίδρασης ορισμένων από αυτά τα νανοϋλικά στις αντιδράσεις που καταλύονται από τα ένζυμα HRP, Οξειδάση της Γλυκόζης, Καταλάση, Κυτόχρωμα C και Λακκάση. Από την ανασκόπηση των αποτελεσμάτων προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Το Οξείδιο του Γραφένιου παρά την ύπαρξη αντιφατικών αναφορών για την πιθανή αντιμικροβιακή δράση του, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμπίπτουν με την παραδοχή ότι δεν διαθέτει αντιμικροβιακή δράση καθώς τα βακτηριακά στελέχη αναπτύσσονται φυσιολογικά παρουσία αυτού.
- ✓ Τα νανοϋλικά Οξείδιο του Γραφένιου, Φθωριωμένο Γραφένιο, Φουλερένιο, Βρωμιωμένο Φουλερένιο και ο φυλλόμορφος άργιλος δεν διαθέτουν αντιμικροβιακή δράση όταν προστίθενται στις βακτηριακές καλλιέργειες παρουσία θρεπτικού μέσου. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει γιατί ο κυτταρικός πληθυσμός πολλαπλασιάζεται πολύ γρήγορα και αυξάνεται εκθετικά πριν προλάβει να αλληλεπιδράσει με τα προστιθέμενα νανοϋλικά.
- ✓ Αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους BL21DE3 διαθέτουν: Η Αδαμαντιλαμίνη, το Γερμανάνιο, το PLM-3, το SLM-2 και το Βρωμιωμένο Φουλερένιο τα οποία προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους για 6 ώρες, ενώ τα κυβοειδή προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για 10 ώρες.
- ✓ Αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Brevibacterium* διαθέτουν: η Αδαμαντιλαμίνη, τα Κυβοειδή, το SLM-2, το SSLM, το MoS+Se₂ και το Βρωμιωμένο Φουλερένιο τα οποία προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για 6 ώρες. Αντίστοιχα αντιμικροβιακή δράση στο στέλεχος αυτό εμφανίζουν και το Γερμανάνιο όπως επίσης και το PLM-3 τα οποία προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για 8 ώρες.
- ✓ Αντιμικροβιακή δράση έναντι του βακτηριακού στελέχους *Corynebacterium* εμφανίζουν: η Αδαμαντιλαμίνη, το Φθωριωμένο Γραφένιο, το Βρωμιωμένο Φουλερένιο και το PLM-3 τα οποία προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης για 6 ώρες. Αντίστοιχα αναστολή της ανάπτυξης για 8 ώρες εμφανίζει το Γερμανάνιο ενώ αναστολή 10 ωρών εμφανίζουν τα Κυβοειδή. Να αναφέρουμε επίσης πως και το νανοϋλικό SSLM εμφανίζει μια μικρή αναστολή της ανάπτυξης των 4 ωρών.

- ✓ Ενώ το Γερμανάνιο προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης τουλάχιστον για 6 ώρες σε όλα τα βακτηριακά στελέχη το βουτυλιωμένο Γερμανάνιο δεν εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση έναντι των στελεχών BL21DE3 και Corynebacterium παρά μόνο έναντι του στελέχους Brevibacterium, προκαλώντας του μια μικρή αναστολή της ανάπτυξης για 4 ώρες.
- ✓ Η μικρότερη συγκέντρωση προστιθέμενου Γερμανάνιου που είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης διαφέρει ανάλογα με το στέλεχος. Για το στέλεχος BL21DE3 η μικρότερη δυνατή προστιθέμενη συγκέντρωση είναι τα 50μg/ml, ενώ για τα στελέχη Brevibacterium και Corynebacterium είναι τα 20μg/ml.
- ✓ Η μικρότερη δυνατή προστιθέμενη συγκέντρωση του SLM-2 που είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης είναι για το στέλεχος BL21DE3 η συγκέντρωση των 20μg/ml ενώ για τα στελέχη Brevibacterium και Corynebacterium αυτή των 50μg/ml.
- ✓ Η μικρότερη δυνατή προστιθέμενη συγκέντρωση του PLM-3 που είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης για τα στελέχη BL21DE3 και Corynebacterium είναι αυτή των 50μg/ml ενώ για το στέλεχος Brevibacterium είναι εκείνη των 20μg/ml.
- ✓ Η μικρότερη δυνατή προστιθέμενη συγκέντρωση των Κυβοειδών που είναι ικανή να προκαλέσει αναστολή της ανάπτυξης για το στέλεχος BL21DE3 είναι αυτή των 20μg/ml, για το στέλεχος Brevibacterium αυτή των 10μg/ml και για το στέλεχος Corynebacterium αυτή των 50μg/ml.
- ✓ Υψηλή αντιμικροβιακή δράση εμφανίζουν και τα υμένια Γραφενίου. Η καταμέτρηση αποικιών των βακτηρίων που επώαστηκαν στην επιφάνεια των υμενίων δείχνουν 78% αναστολή της ανάπτυξης για το βακτηριακό στέλεχος BL21DE3, 98% αναστολή της ανάπτυξης για το βακτηριακό στέλεχος Brevibacterium και 81,8% αναστολή για το βακτηριακό στέλεχος Corynebacterium.
- ✓ Δεν φαίνεται να υπάρχει συνεργατική ανασταλτική δράση του αντιβιοτικού Καναμυκίνη με το Γερμανάνιο σε κανένα από τα τρία βακτηριακά στελέχη, όταν το Γερμανάνιο προστίθεται σε συγκέντρωση 50μg/ml. Επίσης το αντιβιοτικό καναμυκίνη δεν βελτιώνει την ανασταλτική δράση των μικρότερων προστιθέμενων συγκεντρώσεων γερμανανίου που ελέγχθηκαν, στα βακτηριακά στελέχη BL21DE3 και Corynebacterium. Αντίθετα στο στέλεχος Brevibacterium παρατείνει την αναστολή της ανάπτυξης που προκαλεί η συγκέντρωση των 20μg/ml γερμανανίου από 4 ώρες στις 7 ώρες.
- ✓ Τα νανοϋλικά όπως το οξείδιο του Γραφενίου, το Φουλερένιο, το Βρωμιωμένο Φουλερένιο και το οργανικά τροποποιημένο Οξείδιο του Γραφενίου δεν προκαλούν καμία σημαντική μεταβολή στην ταχύτητα με την οποία καταλύουν τις αντιδράσεις τους τα ένζυμα HRP, η οξειδάση της γλυκόζης και η καταλάση και κατ'επέκταση και τα ένζυμα αυτά.
- ✓ Το οξείδιο του Γραφενίου τριπλασιάζει την ταχύτητα του Κυτοχρώματος C όταν προστίθεται σε συγκέντρωση 25μg/ml, ενώ αντίστοιχα στις συγκεντρώσεις των 75 και 100μg/ml τετραπλασιάζει την ταχύτητά του. Αντίστοιχα το Φουλερένιο διπλασιάζει την ταχύτητα του κυτοχρώματος C όταν προστίθεται σε συγκέντρωση 25μg/ml ενώ σχεδόν την τριπλασιάζει όταν προστίθεται σε συγκέντρωση των

100μg/ml. Αντίθετα με την δράση αυτών το οργανικά τροποποιημένο Οξείδιο του Γραφενίου και το Βρωμιωμένο Φουλερένιο που αποτελούν τροποποιήσεις των παραπάνω νανοϋλικών φαίνεται να μην εμφανίζουν κάποια επίδραση στην ταχύτητα της αντίδρασης που καταλύει το Κυτόχρωμα C και κατ'επέκταση στο ίδιο το κυτόχρωμα. Ακόμα το Γερμανάνιο και το Βουτυλιωμένο γερμανάνιο φαίνεται να εμφανίζουν μια μικρή αναστολή της αντίδρασης του κυτοχρώματος C.

- ✓ Το οξείδιο του Γραφενίου, το Φουλερένιο, το οργανικά τροποποιημένο οξείδιο του Γραφενίου, το Βρωμιωμένο Φουλερένιο όπως επίσης και το βουτυλιωμένο Γερμανάνιο εμφανίζουν υψηλή αναστολή της αντίδρασης που καταλύεται από το ένζυμο της Λακκάσης ενώ το Γερμανάνιο αναστέλλει πλήρως την αντίδραση. Πιθανόν τα νανοϋλικά αυτά να επηρεάζουν λειτουργικές ομάδες του ενζύμου ή το ενεργό του κέντρο.

Συζήτηση

Τα βακτήρια αποτελούν μικροσκοπικούς μονοκύτταρους, προκαρυωτικούς οργανισμούς, οι οποίοι συναντώνται σε πολλούς βιότοπους όπως επίσης και στον άνθρωπο. Η παρουσία τους είναι σημαντική σε πολλές διεργασίες στο ανθρώπινο σώμα όπως επίσης και σε άλλους οργανισμούς αλλά και το περιβάλλον. Για το λόγο αυτό στον τομέα της Βιοτεχνολογίας αποτελούν χρήσιμα εργαλεία στην παραγωγή μορίων αλλά και στην συμβολή τους στην κατάλυση ορισμένων αντιδράσεων. Έτσι αποτελούν ένα μικροοργανισμό-μοντέλο με το οποίο γίνονται οι περισσότερες μελέτες. Από την άλλη πλευρά η συνεχής εξέλιξη του πεδίου της νανοτεχνολογίας έθεσε βάσεις για νέα ερωτήματα πάνω στην χρήση των νανοδομών σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Το μικρό τους μέγεθος σε συνδυασμό με την μεγάλη επιφάνεια αλληλεπίδρασης που διαθέτουν καθώς και άλλα χαρακτηριστικά αυτών τα καθιστούν χρήσιμα εργαλεία για την μεταφορά μορίων στο εσωτερικό των κυττάρων ή και στα εσωτερικά οργανίδια αυτών αλλά και εχθρικά απέναντι σε μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια. Για τον λόγο αυτό στα πλαίσια της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας ελέγχθηκε η πιθανή αντιμικροβιακή δράση μιας σειράς νανοδομών. Στα πλαίσια του στόχου αυτού επιλέχθηκαν τρία βακτηριακά στελέχη με ορισμένες διαφορές στην πλασματική τους μεμβράνη, ένα κατά Gram αρνητικό και δυο κατά Gram θετικά, ώστε να διασαφηνιστούν οι πιθανές διαφορές στην δράση των νανοδομών λόγω της διαφορετικότητας της πλασματικής μεμβράνης των βακτηρίων. Εφόσον έγινε η επιλογή των στελεχών πραγματοποιήθηκε μελέτη του τρόπου ανάπτυξής τους στις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης οι οποίες είναι η επώασή τους στους 37 °C, υπό ανάδευση 180rpm. Από την παρακολούθηση της ανάπτυξης των στελεχών στις συνθήκες αυτές συμπεραίνουμε ότι και τα τρία βακτηριακά στελέχη έχουν όμοιο τρόπο ανάπτυξης και αποκτούν την βέλτιστη τιμή οπτικής πυκνότητας OD ~ 3.0 μετά από επώαση 9 ωρών. Στην συνέχεια έγιναν οι πρώτες μετρήσεις για την ανάπτυξη των στελεχών αυτών παρουσία νανοδομών σε αναπτυσσόμενες καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό μέσο. Παρατηρήθηκε ότι τα νανοϋλικά που προστέθηκαν τα οποία ήταν το Οξείδιο του Γραφενίου, το Φουλερένιο, το Βρωμιωμένο Φουλερένιο καθώς επίσης και άργιλοι δεν προκάλεσαν κάποια διαφοροποίηση στον τρόπο και τον ρυθμό ανάπτυξης των καλλιεργειών αυτών ακόμα και όταν αυξήθηκε η συγκέντρωσή τους στην καλλιέργεια. Ως αποτέλεσμα αυτών υπήρξε η σκέψη ότι πιθανά να απαιτείται συγκεκριμένη αναλογία νανοδομών και βακτηρίων ώστε να

αλληλεπιδρούν και να επηρεάζεται ο τρόπος και ο ρυθμός ανάπτυξης των βακτηρίων. Παρουσία όμως του Θρεπτικού μέσου η αναλογία αυτή δεν υφίσταται καθώς ο κυτταρικός πληθυσμός αυξάνεται ενώ η ποσότητα του προστιθέμενου νανοϋλικού παρέμενε ίδια. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν εκ νέου δοκιμές για την πιθανή αντιμικροβιακή δράση όπου τα βακτήρια αφέθηκαν να αλληλεπιδράσουν με τα νανοϋλικά σε φυσιολογικό ορό και έπειτα εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό μέσο για την παρακολούθηση της ανάπτυξής τους. Από την μελέτη αυτή τα αποτελέσματα που εξήχθησαν εμφάνιζαν διαφορές για κάθε βακτηριακό στέλεχος. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν από τα παραπάνω πειράματα είναι:

- ✓ Τα νανοϋλικά Αδαμαντιλαμίνη, βρωμιωμένο Φουλερένιο, Γερμανάνιο, Κυβοειδή και τα PLM-3 και SLM-2 προκαλούν αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης από 6h έως 10h, στο στέλεχος BL21DE3.
- ✓ Τα νανοϋλικά Κυβοειδή, Γερμανάνιο, PLM-3, SLM-2, SSLM, Φθοριομένο Γραφένιο, MoS+Se₂, Βρωμιωμένο Φουλερένιο, Αδαμαντιλαμίνη και βουτυλιομένο Γερμανάνιο, προκαλούν αναστολή από 4h έως 8h αναστολή στο στέλεχος Brevibacterium.
- ✓ Τα νανοϋλικά Αδαμαντιλαμίνη, φθοριομένο Γραφένιο, Βρωμιωμένο Φουλερένιο, Γερμανάνιο, Κυβοειδή, SLM-2, PLM-3 και SSLM, προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης του στελέχους Corynebacterium από 6h έως 8h.

Η επόμενη σημαντική παρατήρηση που έγινε ήταν πως το Γερμανάνιο εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση σε όλα τα βακτηριακά στελέχη όχι μόνο όταν προστίθεται σε υγρές καλλιέργειες σε μορφή σωματιδίων αλλά και σε μορφή υμενίων. Το γεγονός αυτό άνοιξε το δρόμο και για περεταίρω μελέτες όπως αυτή της συνεργατικής δράσης του Γερμανάνιου με το αντιβιοτικό Καναμυκίνη ώστε να διασαφηνιστεί αν μπορεί η παρουσία και των δυο σε μια υγρή καλλιέργεια να αυξήσει την αναστολή που προκαλεί το Γερμανάνιο μόνο. Από τη μελέτη αυτή όμως δεν προέκυψε πως υπάρχει κάποια συνεργατική δράση μεταξύ του Γερμανανίου και του αντιβιοτικού Καναμυκίνη.

Τέλος πραγματοποιήθηκε μελέτη για την επίδραση των νανοδομών που περιγράφηκαν παραπάνω και σε ενζυμικά συστήματα. Από την μελέτη αυτή εξήχθησαν ορισμένα συμπεράσματα όπως η αύξηση της ταχύτητας με την οποία πραγματοποιεί την αντίδραση το κυτόχρωμα C παρουσία του Οξειδίου του Γραφενίου καθώς επίσης και του Φουλερενίου ενώ αντίθετα η πλήρης αναστολή της αντίδρασης παρουσία των νανοϋλικών του οξειδίου του Γραφενίου, του Φουλερενίου, του Βρωμιωμένου Φουλερενίου, του Γερμανανίου και του Βουτυλιωμένου Γερμανανίου.

Μετά την ανασκόπηση όλων αυτών των αποτελεσμάτων καθώς επίσης και των συμπερασμάτων που εξήχθησαν από αυτά, νέα ερωτήματα προκύπτουν όπως με ποιον ακριβώς τρόπο το Γερμανάνιο και τα κυβοειδή προκαλούν την αντιμικροβιακή δράση αυτή. Πρέπει να διερευνηθεί ο τρόπος δράσης του, το αν δηλαδή διαρρηγνύουν την πλασματική μεμβράνη των κυττάρων ώστε να προκαλέσουν το κυτταρικό θάνατο ή το αν αλληλεπιδρούν με την πλασματική μεμβράνη αυτών προκαλώντας οξειδωτικό στρες. Ένα ακόμα πιθανό θέμα προς μελέτη μετά την έρευνα αυτή είναι επίσης η πιθανότητα ακινητοποίησης κάποιου μορίου με φυσική αντιμικροβιακή δράση στην επιφάνεια του Γερμανανίου και των Κυβοειδών αλλά και νανοϋλικών που δεν εμφανίζουν αντιμικροβιακή

δράση ώστε να δούμε αν βελτιώνουν την δράση όσων έχουν αντιμικροβιακή δράση ή προσδίδουν αντιμικροβιακή δράση σε όσα δεν εμφανίζουν. Ακόμα είναι σημαντικό να μελετηθεί η συνεργατική σχέση των νανοϋλικών αυτών και με άλλα αντιβιοτικά πέραν της καναμυκίνης. Αντίστοιχα σε ότι αφορά τις μελέτες των επιδράσεων των νανοϋλικών αυτών στα ενζυμικά συστήματα είναι σημαντικό να διασαφηνιστεί η επίδραση που έχουν στα ένζυμα αυτά όπως για παράδειγμα στο ένζυμο της Λακκάσης της οποίας την αντίδραση αναστέλλουν πλήρως. Επίσης τροφή για νέες μελέτες θα αποτελούσε και η ακινητοποίηση αυτών των ενζύμων στην επιφάνεια των νανοϋλικών αυτών και ο έλεγχος της δραστηριότητας των ενζύμων.

Βιβλιογραφία

1. Aleksandar, D. & Gordana, B. Fullerenol: A new nanopharmaceutic? *Arch. Oncol.* 16, 42–45 (2008)
2. Alkatout, I. et al. Transcription factors associated with epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells in the tumor centre and margin of invasive breast cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 94, 168–173 (2012)
3. Arduini, F., Calvo, JQ., Palleschi, G., Moscone, D., Amine, A., *TrAC, Trends Anal. Chem.* 2010, 29, 1295-1304
4. B.P. Ting, J. Zhang, Z.Q. Gao, J.Y. Ying, *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 282
5. Brant, J. A., Robichaud, C. O. & Wiesner, M. Fullerol cluster formation in aqueous solutions: Implications for environmental release. *J. Colloid Interface Sci.* 314, 281–288 (2007)
6. Cai, W. W.; Zhu, Y. W.; Li, X. S.; Piner, R. D.; Ruoff, R. S., Large area few-layer graphene/graphite films as transparent thin conducting electrodes. *Applied Physics Letters* **2009**, 95, (12).
7. Chang, Y. M., Donovan, M. J. & Tan, W. Using aptamers for cancer biomarker discovery. *J. Nucleic acids* 2013, 817350 (2013)
8. Chen, C. et al. Multihydroxylated [Gd@C82(OH)22]n nanoparticles:antineoplastic activity of high efficiency and low toxicity. *Nano Lett.* 5,2050–2057 (2005)
9. Chen, T., Shukoor, M. I., Chen, Y., Yuan, Q., Zhu, Z., Zhao, Z., Gulbakan, B. & Tan, W. Aptamers – conjugated nanomaterials for bioanalysis and biotechnology applications. *Nanoscale* 3, 546-556 (2011)
10. Clark Jr, L.C., Lyons, C.: Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102(1), 29–45 (1962)
11. Clevers, H. The cancer stem cell: premises, promises and challenges. *Nat. Med.*17, 313–319 (2011)
12. Crespilho, F.N., et al.: Development of individual semiconductor nanowire for bioelectrochemical device at low overpotential conditions. *Electrochem. Commun.* 11(9), 1744–1747 (2009)
13. De Dios, A.S., Díaz-García, M.E.: Multifunctional nanoparticles: Analytical prospects. *Analytica Chimica Acta* 666(1–2), 1–22 (2010)
14. Elias, D. C.; Nair, R. R.; Mohiuddin, T. M. G.; Morozov, S. V.; Blake, P.; Halsall, M. P.; Ferrari, A. C.; Boukhvalov, D. W.; Katsnelson, M. I.; Geim, A. K.; Novoselov, K. S., Control of graphene's properties by reversible hydrogenation: Evidence for graphane. *Science* **2009**, 323, (5914), 610-613

15. Feng Jia, Balaji Narasimhan, Surya Mallapragada: "Materials-Based Strategies for Multi-Enzyme Immobilization and Co-Localization: A Review". Department of Chemical and Biological Engineering, Iowa State University, Ames. *Biotechnol. Bioeng.* 2014;111: 209–222.
16. Fang, X. & Tan, W. Aptamers generated from cell-SELEX for molecular medicine: a chemical biology approach. *Acc. Chem. Res.* 43, 48-57 (2010)
17. Ganesan, S., Karantza, V., Oza, J. & Toppmeyer, D. Triple-negative breast cancers and the human mammary epithelial cell hierarchy. *Breast Dis.* 32, 49–61 (2010)
18. G. Aragay, A. Merkoci, *Electrochim. Acta* 84 (2012) 49
19. Ge, Z. & Liu, S. Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7289–7325 (2013)
20. A.K. Geim, *Science* 324 (2009) 1530–1534
21. Haun, J.B., et al.: Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* 2(3), 291–304 (2010)
22. H. Chen, M. B. Müller, K. J. Gilmore, G. G. Wallace, D. Li, *Adv. Mater.* **2008**, 20, 3557
23. He, B., Morrow, T.J., Keating, C.D.: Nanowire sensors for multiplexed detection of biomolecules. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12(5), 522–528 (2008)
24. He, H., Zheng, L., Jin, P. & Yang, M. The structural stability of polyhydroxylated C60(OH)₂₄: Density functional theory characterizations. *Comput. Theor. Chem.* 974, 16–20 (2011)
25. Hinnemann, B. et al. Biomimetic Hydrogen Evolution: MoS₂ Nanoparticles as Catalyst for Hydrogen Evolution. *Journal of the American Chemical Society* 127, 5308-5309, doi:10.1021/ja0504690 (2005).
26. Iost, R.M., et al.: Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases. *Frontiers Biosci. (Elite edition)* 3, 663 (2011)
27. Jain, M. et al. Mitochondrial reactive oxygen species regulate transforming growth factor- β signaling. *J. Biol. Chem.* 288, 770–777 (2013)
28. J.A.A. Ho, H.C. Chang, N.Y. Shih, L.C. Wu, Y.F. Chang, C.C. Chen, C. Chou, *Anal. Chem.* 82 (2010) 5944
29. John R. Murphy, *Medical Microbiology*. 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.
30. Kaltsas, D., Tsatsoulis, T., Ziogos, O. G. & Tsetseris, L. Response of silicane and germanane to uni-axial compression: Superstructures, polymorph nano-ribbons, and extreme bending. *The Journal of Chemical Physics* 139, 124709, doi:doi:http://dx.doi.org/10.1063/1.4822263 (2013).
31. Kang, S. G. *et al.* Molecular mechanism of pancreatic tumor metastasis inhibition by Gd@C₈₂(OH)₂₂ and its implication for de novo design of nanomedicine. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 15431–15436 (2012)
32. Kathryn Bernard, *The Genus Corynebacterium and Other Medically Relevant Coryneform-Like Bacteria*, *Journal of Clinical Microbiology*, 2012.
33. Kim, Y.R., et al.: Electrochemical detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using graphene modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.* 25(10), 2366–2369 (2010)
34. Krainer, F.W. & Glieder, A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* (2015) 99: 1611. doi:10.1007/s00253-014-6346-7.
35. Lao, F. et al. Fullerene nanoparticles selectively enter oxidation-damaged cerebral microvessel endothelial cells and inhibit JNK-related apoptosis. *ACS Nano* 3, 3358–3368 (2009)

36. Liu, Y. et al. The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF-alpha mediated cellular immunity. *Biomaterials* 30, 3934–3945 (2009)
37. Liang, Y. Y.; Wu, D. Q.; Feng, X. L.; Mullen, K., Dispersion of Graphene Sheets in Organic Solvent Supported by Ionic Interactions. *Advanced Materials* **2009**, 21, (17), 1679–+.
38. Li, X. S.; Zhu, Y. W.; Cai, W. W.; Borysiak, M.; Han, B. Y.; Chen, D.; Piner, R. D.; Colombo, L.; Ruoff, R. S., Transfer of Large-Area Graphene Films for High-Performance Transparent Conductive Electrodes. *Nano Letters* **2009**, 9, (12), 4359-4363.
39. Li, X., Zhao, Q. & Qui, L. Smart Ligand: aptamers mediated targeted delivery of chemotherapeutic drugs and siRNA for cancer therapy. *J. Control Release* 171, 152-162 (2013)
40. Li, Y. et al. MoS2 Nanoparticles Grown on Graphene: An Advanced Catalyst for the Hydrogen Evolution Reaction. *Journal of the American Chemical Society* 133, 7296-7299, doi:10.1021/ja201269b (2011).
41. L.N. Feng, Z.P. Bian, J. Peng, F. Jiang, G.H. Yang, Y.D. Zhu, D. Yang, L.P. Jiang, J.J. Zhu, *Anal. Chem.* 84 (2012) 7810.
42. L.N. Feng, J. Peng, Y.D. Zhu, L.P. Jiang, J.J. Zhu, *Chem. Commun.* 48 (2012) 4474
43. Malik, F., Korkaya, H., Clouthier, S. G. & Wicha, M. S. Breast cancer heterogeneity: need to review current treatment strategies. *Curr. Breast Cancer Rep.* 4, 225–231 (2012)
44. Mazdak, T., Trends in graphene research. *Materials Today* **2009**, 12, (10), 34-37.
45. Meng, H. et al. Gadolinium metallofullerenol nanoparticles inhibit cancer metastasis through matrix metalloproteinase inhibition: imprisoning instead of poisoning cancer cells. *Nanomedicine* 8, 136–146 (2012)
46. M. Dequaire, C. Degrand, B. Limoges, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5521
47. Mayorga-Martinez, CC. , Cadevall, M., Guix, M., Ros, J., Merkoçi, A., *Biosens. Bioelectron.* 2013, 40, 57-62
48. Miquel Cadevall, Josep Ros and Arben Merkoçi, Bismuth nanoparticles integration into heavy metal electrochemical stripping sensor, 2015
49. Miyamoto, A., Okimoto, H., Shinohara, H. & Shibamoto, Y. Development of water-soluble metallofullerenes as X-ray contrast media. *Eur. Radiol.* **16**, 1050–1053 (2006)
50. Nigel C. Veitch." Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9 3DS, UK. 2004
51. Ni, X., Castanares, M., Mukherjee, A. & Lupold, S. E. Nucleic acid aptamers: clinical applications and promising new horizons. *Curr. Med. Chem.* 18, 4206-4214 (2011)
52. Njagi, J., et al.: Amperometric detection of dopamine in vivo with an enzyme based carbon fiber microbiosensor. *Anal. Chem.* 82(3), 989–996 (2010)
53. Novel natural nanomaterial spins off from spider-mite genome sequencing. *Phys.Org* (May 23, 2013)
54. N. Zhou, J.H. Li, H. Chen, C.Y. Liao, L.X. Chen, *Analyst* 138 (2013) 1091
55. O. Akhavan , E. Ghaderi , *J. Phys. Chem. C* **2009** , 113 , 20214
56. O. Akhavan and E. Ghaderi, *ACS Nano*, 2010, 4, 5731–5736
57. O. Akhavan, E. Ghaderi, H. Emamy and F. Akhavan, *Carbon*, 2013, 54, 419–431.
58. O. N. Ruiz , K. A. S. Fernando , B. J. Wang , N. A. Brown , P. G. Luo , N. D. McNamara , M. Vangsness , Y. P. Sun , C. E. Bunker , *ACS Nano***2011** , 5 , 8100
59. Park, C. Y., Tseng, D. & Weissman, I. L. Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. *Mol. Ther.* 17, 219–230 (2009)
60. Q.N. Xu, F. Yan, J.P. Lei, C. Leng, H.X. Ju, *Chem. A Eur. J.* 18 (2012) 4994.

61. Rusling, J.F., Sotzing, G., Papadimitrakopoulou, F.: Designing nanomaterial-enhanced electrochemical immunosensors for cancer biomarker proteins. *Bioelectrochemistry* 76(1–2), 189–194 (2009)
62. Sefah, K., Tang, Z.W., Shangguan, D. H., Chen, H., Lopez-Colon, D., Li, Y., Parekh, P., Martin, J., Meng, L., Phillips, J. A., Kim, Y. M. & Tan, W. Molecular recognition of acute myeloid leukemia using aptamers. *Leukemia* 23, 235–244 (2009)
63. S. Liu , T. H. Zeng , M. Hofmann , E. Burcombe , J. Wei , R. Jiang , J. Kong , Y. Chen , *ACS Nano* **2011** , 5 , 6971
64. Sanchez-Amat A, Lucas-Elio P, Fernandez E, Garcia-Borron JC and Solano F (2001) Molecular cloning and functional characterization of a unique multipotent polyphenol oxidase from *Marinomonas mediterranea*. *Biochim Biophys Acta* 1547:104–116.
65. Schedin, F.; Geim, A. K.; Morozov, S. V.; Hill, E. W.; Blake, P.; Katsnelson, M. I.; Novoselov, K. S., Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene. *Nature Materials* **2007**, 6, (9), 652–655.
66. S. Park, N. Mohanty, J. W. Suk, A. Nagaraja, J. An, R. D. Piner, W. Cai, D. R. Dreyer, V. Berry and R. S. Ruoff, *Adv. Mater.*, 2010, 22, 1736–1740
67. S.W. Zeng, K.T. Yong, I. Roy, X.Q. Dinh, X. Yu, F. Luan, *Plasmonics* 6 (2011) 491.
68. Tang, J. *et al.* Periodical variation of electronic properties in polyhydroxylated metallofullerene materials. *Adv. Mater.* 18, 1458–1462 (2006)
69. Teofil Jesionowski, Jakub Zdarta, Barbara Krajewska. “ Enzyme immobilization by adsorption: a review”. 2014.
70. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890 (2009)
71. Ying Liu, Chunying Chen, Pengxu Qian, Xuefei Lu, Baoyun Sun, Xiao Zhang, Liming Wang, Xingfa Gao, Han Li, Zhiyun Chen, Jinglong Tang, Weijie Zhang, Jinqian Dong, Ru Bai, Peter E. Lobie, Qingfa Wu, Suling Liu, Huafeng Zhang, Feng Zhao, Max S. Wicha, Tao Zhu & Yuliang Zha. *Gd-metallofullerenol nanomaterial as non-toxic breast cancer stem cell-specific inhibitor*. Jan 2015
72. Yin, J. J. *et al.* The scavenging of reactive oxygen species and the potential for cell protection by functionalized fullerene materials. *Biomaterials* 30, 611–621 (2009)
73. Y. Wei, C. Gao, F.L. Meng, H.H. Li, L. Wang, J.H. Liu, X.J. Huang, *J. Phys. Chem. C* 116 (2012) 1034
74. Victoria Murray , Yuefei Huang , Jianglei Chen , Jianjun Wang , and Qianqian Li A Novel Bacterial Expression Method with Optimized Parameters for Very High Yield Production of Triple-Labeled Proteins. A. Shekhtman; Burz 2012
75. Vileno, B. *et al.* Spectroscopic and photophysical properties of a highly derivatized C60 fullerol. *Adv. Funct. Mater.* 16, 120–128 (2006)
76. V.K.K. Upadhyayula, *Anal. Chim. Acta* 715 (2012) 1
77. V. K. Sharma , R. A. Yngard , Y. Lin , *Adv. Colloid Interface Sci.* **2009** , 145 , 83
78. Wang, Z. Z. *et al.* A precision structural model for fullereneols. *Chem. Sci.* 5, 2940–2948 (2014)
79. Ward, W.K., *et al.*: A new amperometric glucose microsensor: in vitro and short-term in vivo evaluation. *Biosens. Bioelectron.* 17(3), 181–189 (2002)
80. Wu, W, Xing L, Zhou B, Lin Z: Active proteins aggregates induced by terminally attached self-assembling peptide ELK16 in *Escherichia coli*. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, One Tsinghua Garden Road, Beijing 100084, PR China. *Microb. Cell fact* (2011)
81. Xu, L. *et al.* Morphologically virus-like fullereneol nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. *Adv. Mater.* **25**, 5928–5936 (2013)

82. Zhang, J. et al. Most stable structures of polyhydroxylated endohedral metallofullerene Gd@C82(OH)_x (x=1–24) from density function theory. Chem.Phys. Lett. 492, 68–70 (2010)
83. Zhang, Y., Hong, H. & Cai, W. Tumor – targeted drug delivery with aptamers. Curr. Med. Chem. 18, 4185-4194 (2011)
84. Γουρνής, Δ. Μελέτη γ-ραδιόλυσης συστημάτων οργανικών ρυπαντών παρουσία αργίλων. Διδακτορική Διατριβή Αθήνα (1988).