



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ
ΤΜΗΜΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Π.Μ.Σ ΘΕΟΦΡΑΣΤΕΙΟ
«Περιβαλλοντική και Οικολογική Μηχανική»

Ανάλυση Της Κυτταροτοξικότητας των Νανοσωματιδίων Αργύρου στα Βακτήρια Escherichia coli, Streptococcus και Staphylococcus

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΒΑΡΝΟΥ ΠΡΟΚΟΠΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: κος ΜΠΙΣΚΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011



Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον ιατρό βιοπαθολόγο κ. Ευστράτιο Σάκκη τόσο για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού και της υλικής υποδομής όσο και για την πολύτιμη λόγω της επιστημονικής του κατάρτισης, συμπαράσταση κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων από αυτά.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Γεώργιο Μπίσκο, για την καθοδήγησή του και την πολύτιμη συμβολή στη διεκπεραίωσή της.

Περίληψη

Η παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε με σκοπό να μελετήσει την τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου σε τρία βακτήρια: τα *Escherichia coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus*.

Έγιναν πειράματα στα οποία κάθε ένα από τα παραπάνω βακτήρια καλλιεργήθηκε σε ξεχωριστά τρυβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό μαζί με διαφορετικής διαμέτρου νανοσωματίδια. Τα νανοσωματίδια αυτά είχαν προσκολληθεί μέσω εξάχνωσης σε ειδικά φίλτρα. Κάθε φίλτρο είχε διαφορετική συγκέντρωση νανοσωματιδίων. Ακολούθησε επώαση των τρυβλίων στους 37 °C για 48 ώρες. Ταυτόχρονα, σε σταθερά χρονικά διαστήματα των 12 ωρών μετριούνταν οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων όπου είχαν σχηματιστεί. Βάσει αυτών των μετρήσεων έγινε η σύγκριση για την τοξικότητα των νανοσωματιδίων.

Το βασικό συμπέρασμα ήταν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα, προκαλεί αντίστοιχη αύξηση της τοξικότητας των νανοσωματιδίων στα τρία βακτήρια. Επίσης παρατηρήθηκε ότι όταν αλλάζουμε τη διάμετρο και τη χημική σύσταση των νανοσωματιδίων, μεταβάλλεται και η δράση της τοξικότητάς τους.

Κλείνοντας προτείνονται πιθανά θέματα για μελλοντική έρευνα τα οποία στηρίζονται στα συμπεράσματα αυτής της διπλωματικής εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή	σελ. 5
1.1 Νανοςωματίδια	σελ. 6
1.2 Τοξικότητα Νανοςωματιδίων και Νανοϊατρική	σελ. 8
1.3. Μεταλλικά Νανοϋλικά	σελ. 8
1.4. Σκοπός της Παρούσας Εργασίας	σελ. 9
2. Βιβλιογραφική Αναφορά	σελ. 11
2.1. Επίδραση νανοςωματιδίων στα βακτηριακά στελέχη Streptococcus και Staphylococcus	σελ. 11
2.1.1. Νανοςωματίδια Αργύρου	σελ. 11
2.1.2. Άλλοι Τύποι Νανοςωματιδίων	σελ. 13
2.2. Επίδραση νανοςωματιδίων στα βακτηριακά στελέχη Streptococcus και Staphylococcus	σελ. 16
2.2.1. Νανοςωματίδια Αργύρου	σελ. 16
3. Μεθοδολογία	σελ. 31
3.1. Προετοιμασία των νανοςωματιδίων αργύρου	σελ. 32
3.2. Προετοιμασία ανάπτυξης των κυτταρικών στελεχών	σελ. 34
3.3. Έλεγχος της επίδρασης των νανοςωματιδίων αργύρου στα κύτταρα	σελ. 35
4. Αποτελέσματα	σελ. 37
4.1 Αρχικά Αποτελέσματα	σελ. 39
4.2 Ζώνες Αναστολής και Κυτταροτοξικότητα	σελ. 44
4.2.1 Κυτταροτοξικότητα και Συγκέντρωση νανοςωματιδίων στα Φίλτρα	σελ. 44
4.2.2 Κυτταροτοξικότητα και Μέγεθος Σωματιδίων	σελ. 54

4.2.3 Κυτταροτοξικότητα Βακτηρίων E. coli Από Νανοσωματίδια Αργύρου	σελ. 58
4.2.4 Τοξικότητα σε κύτταρα αίματος	σελ. 63
5. Συμπεράσματα	σελ. 66
6. Βιβλιογραφία	σελ. 70

1. Εισαγωγή

Η επιστήμη στις αρχές του 20ου αιώνα ασχολείτο κυρίως με τα άτομα και τα στοιχειώδη σωμάτια, με τη θεμελίωση της κβαντικής θεωρίας και αργότερα με την πυρηνική σχάση. Μετά τον Β' Παγκόσμιο πόλεμο η επικρατέστερη επιστημονική δραστηριότητα ήταν η πυρηνική φυσική. Προς το τέλος του 20ου αιώνα, άλλες επιστήμες όπως η βιολογία και στις αρχές του 21ου αιώνα η βιοτεχνολογία προσελκύουν το ενδιαφέρον λόγω των άμεσων επιδράσεων στον ίδιο τον άνθρωπο. Παράλληλα στην χημεία κυρίως, σε συνδυασμό και με άλλες επιστήμες, γίνεται σύνθεση νέων ενώσεων χρησιμοποιώντας μεμονωμένα άτομα και μόρια, με την παράλληλη ανάπτυξη του φαινομένου της κατάλυσης (δηλ. της επιτάχυνσης ή της επιβράδυνσης μιας χημικής διεργασίας με την παρουσία τρίτου παράγοντα – του καταλύτη – που δεν συμμετέχει άμεσα στην αντίδραση). Η επιστημονική κοινότητα έμεινε έκθαμβη όταν το 1959 ο Καθηγητής Φυσικής Richard Feynman, στη διάλεξή του στο CALTECH "There's plenty of room at the bottom" (<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.htm>) προκάλεσε λέγοντας «Why cannot we write the entire 24 volumes of the Encyclopedia Britannica on the head of a pin?» (γιατί να μην μπορούμε να γράψουμε και τους 24 τόμους της εγκυκλοπαίδειας Britannica στη κεφαλή μιας καρφίτσας;). Υποδεικνύει έτσι πώς να επιτευχθεί αυτό καθώς και άλλες εφαρμογές που βασίζονται στην χρήση ατόμων ή μορίων για την κατασκευή σωματιδίων και δομών διαστάσεων μερικών νανομέτρων! Πολλοί θεωρούν ότι η ομιλία αυτή προκάλεσε τη γέννηση ενός καινούργιου κλάδου, της Νανοεπιστήμης.

Η Νανοεπιστήμη είναι η επιστήμη που αναφέρεται στα φαινόμενα που παρουσιάζονται κατά το χειρισμό των υλικών σε ατομικό, μοριακό και μικρομοριακό επίπεδο, όπου παρατηρούνται διαφορετικές ιδιότητες από ό,τι σε μεγαλύτερη κλίμακα (μακροκλίμακα) (Dr Dunn et al., 2004). Μελετά επίσης συμπεριφορές και ιδιότητες των υλικών σε διαστάσεις νανοκλίμακας που κυμαίνεται κατά προσέγγιση από 1 έως 100 νανόμετρα (nm), που σε πολλές περιπτώσεις διαφέρουν σημαντικά από αυτές των μακροσκοπικών υλικών. Η νανοεπιστήμη θεωρείται η βάση της Νανοτεχνολογίας και περιλαμβάνει τη συνεργασία πολλών επιστημών όπως Φυσική, Χημεία, Επιστήμη Υλικών, Βιολογίας και Πληροφορικής. Η Νανοτεχνολογία περιλαμβάνει τις μεθόδους

εφαρμογής των ανακαλύψεων της νανοεπιστήμης στην πράξη. Χειρίζεται και ελέγχει τα νανοϋλικά με κριτήριο τη βέλτιστη εφαρμογή τους.

Η νανοτεχνολογία και γενικά οι νανοεπιστήμες ασχολούνται με σώματα των οποίων οι διαστάσεις είναι αρκετά μικρότερες των 1000nm και σε πάρα πολλές περιπτώσεις αγγίζουν τα 100nm (νανοσωματίδια). Τα νανοσωματίδια είναι τα «δομικά υλικά» της νανοτεχνολογίας.

1.1 Νανοσωματίδια

Με τον όρο νανοσωματίδια (nanoparticles, NPs) ορίζονται τα στερεά σωματίδια που το μέγεθός τους κυμαίνεται από 1 έως 100 nm. Τα νανοσωματίδια έχουν πρωτότυπες ιδιότητες και λειτουργίες που οφείλονται στο μέγεθός τους, στο σχήμα τους ή στη σύνθεσή τους (Mansoori, 2005). Οι ιδιότητές τους αυτές (οπτικές, ηλεκτρικές, μαγνητικές, χημικές και μηχανικές) είναι συνήθως διαφορετικές από εκείνες ενός μακροσκοπικού υλικού. Δύο λόγοι που συμβαίνει αυτό είναι ότι α. στις νανοδιαστάσεις αρχίζουν να επικρατούν κβαντομηχανικά φαινόμενα και β. ο λόγος της επιφάνειας προς τον όγκο των σωματιδίων αυξάνεται σημαντικά (Holister et al., 2003). Η μεγάλη περιοχή επιφάνειας αφενός μεν αυξάνει το συνδυασμό με άλλα υλικά πράγμα το οποίο είναι σημαντικό κατά τον σχηματισμό σύνθετων υλικών (composite materials), αφετέρου δε αυξάνει και την διαθέσιμη επιφάνεια για την πραγματοποίηση αντιδράσεων.

Τα νανοϋλικά ορίζονται ως τα υλικά τα οποία έχουν στοιχεία (νανοδομές) με τουλάχιστον μία διάσταση με μέγεθος 100 nm ή μικρότερη. Οι νανοδομές ανάλογα με το σχήμα τους (είτε είναι σφαιρικό, κυλινδρικό, ή ακανόνιστο) χωρίζονται ως εξής (Kumara et al. 2009):

(α) Νανοσωματίδια: όταν και οι τρεις διαστάσεις των σωματιδίων βρίσκονται στην νανοκλίμακα. Αναφέρονται ως ισοαξονικά (ισομεγέθη) νανοσωματίδια ή νανοκοκκία ή νανοκρύσταλλοι.

(β) Νανωσωλήνες: όταν οι δύο διαστάσεις βρίσκονται στη νανοκλίμακα και η τρίτη είναι μεγαλύτερη, δημιουργώντας έτσι μια επιμήκη δομή. Αναφέρονται γενικά ως νανωσωλήνες ή νανοϊνες/νανοσύρματα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα: οι νανωσωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes, CNTs).

(γ) Νανομεμβράνες: τα σωματίδια που διαθέτουν μόνο μία διάσταση στη νανοκλίμακα. Για παράδειγμα το γραφένιο και ο άργιλος (διαστρωματωμένα

πυριτικά ορυκτά, layered silicates, διαστρωματωμένο υπεροξείδιο του υδρογόνου - layered double hydroxides, LDHs).

Η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός των νανοσωματιδίων (nanoparticles) είναι τις τελευταίες δεκαετίες ένα από τα πιο ενδιαφέροντα πεδία της βασικής αλλά και της εφαρμοσμένης έρευνας, λόγω της ευρύτητας των εφαρμογών τους. Οι τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των νανοδομών είναι self assembly, sol-gel, νανολιθογραφία και διεργασίες μικρορευστών. Κυρίως εφαρμόζεται αυτή της κolloειδούς ζελατινοποίησης (sol-gel).

Η τεχνολογία των σωματιδίων εκτός των άλλων επιστημών είναι ζωτικής σημασίας σε θέματα που αφορούν την ιατρική και τις εφαρμογές της (μεταφορά ιών και βακτηρίων, διανομή φαρμάκων). Με την ανάπτυξη νέων υλικών και το συνδυασμό της νανοτεχνολογίας με την βιοτεχνολογία είναι πιθανό να δημιουργηθούν τεχνητά όργανα και εμφυτεύματα που μέσω της κυτταρικής ανάπτυξης θα μπορούν να αντικαταστήσουν καταστρεμμένα νευρικά κύτταρα, κατεστραμμένες περιοχές του δέρματος, ακόμα και οστά (Wood et al., 2003). Επιπλέον η σύμπραξη της νανοτεχνολογίας και της ιατρικής έχει ήδη δημιουργήσει διαγνωστικά όργανα μεγάλης ακριβείας για την άμεση διάγνωση σημαντικών ασθενειών. Μία ακόμα εφαρμογή στην ιατρική είναι η μεταφορά φαρμάκων μέσω των νανοσωματιδίων λόγω της καλύτερης διαλυτότητας και απορροφητικότητας τους σε σχέση με μεγαλύτερα σωματίδια. Τα νανοσωματίδια μπορούν να μεταφέρουν και να ελευθερώσουν το φάρμακο σε επιθυμητές δόσεις πάνω από μία επιλεγόμενη περιοχή μειώνοντας έτσι τη διάχυση του φαρμάκου σε γειτονικές περιοχές που ίσως προκαλέσει βλάβες.

Εκτός από μέσα μεταφοράς φαρμάκων, τα νανοσωματίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως ανιχνευτές (probes) προσδένοντας τα πεπτίδια, τα αντισώματα και τα νουκλεϊνικά οξέα με νανοσωματίδια για την μελέτη κυτταρικών κινήσεων και αλλαγών σε μοριακό επίπεδο που σχετίζονται με παθολογικά στάδια (Sandhiya et al, 2009). Επιπλέον, σωματίδια με μέγεθος αρκετά μικρότερο των 2000 nm (μέγεθος των στενότερων τριχοειδών αγγείων) μπορούν να μετακινηθούν άνετα μέσω του κυκλοφορικού συστήματος σε όλο το σώμα. Μικρού μεγέθους φαρμακευτικά νανοσωματίδια απαιτούνται και στις περιπτώσεις της ενδομυϊκής και της υποδόριας χορήγησης.

Άλλες εφαρμογές της νανοϊατρικής περιλαμβάνουν την πρόωμη διάγνωση, παρακολούθηση και συνδυασμένη θεραπεία (π.χ., συνδυασμός διάγνωσης και

θεραπείας) διαφόρων ασθενειών π.χ., καρκίνος (Coombs et al. 1996). Το ιδιαίτερα μικρό μέγεθος των νανοσωματιδίων τα προικίζει με ιδιότητες τέτοιες που μπορεί να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην ογκολογία και ιδιαίτερα στις απεικονιστικές μεθόδους. Κβαντικά σημεία (quantum dots) (δηλαδή ημιαγώγιμα νανοσωματίδια), σε συνδυασμό με μαγνητική απεικόνιση (magnetic resonance imaging, MRI), μπορεί να παράγει εξαιρετικές εικόνες των καρκινικών όγκων.

1.2 Τοξικότητα Νανοσωματιδίων και Νανοϊατρική

Τόσο στον καρκίνο όσο και σε άλλες ιατρικές παθήσεις σημαντικό ρόλο για την αντιμετώπισή τους έχει ο παράγοντας της τοξικότητας των νανοσωματιδίων. Τα νανοσωματίδια έχουν την ικανότητα να επηρεάζουν τη βιωσιμότητα των κυττάρων με την πρόσδεσή τους στον κατάλληλο υποδοχέα της κυτταρικής μεμβράνης, αλλάζοντας τη μορφολογία της. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται η διαπερατότητά της και τα νανοσωματίδια εισέρχονται στο εσωτερικό του κυττάρου. Στην συνέχεια προσκολλώνται στα οργανίδια του και επηρεάζουν τις ζωτικές λειτουργίες του (αναπνοή, ανάπτυξη, αναπαραγωγή). Στο τέλος προκαλούν βλάβη στο DNA, οδηγώντας στον κυτταρικό θάνατο. Σημαντικές παράμετροι της τοξικότητας των νανοσωματιδίων είναι η διάμετρος τους, η συγκέντρωσή τους και η σύνθεσή τους.

Οι τρεις κυριότεροι τύποι νανοϋλικών που εφαρμόζονται στον έλεγχο της τοξικότητας σε μικροοργανισμούς είναι: (1) τα πολυμερή νανοϋλικά (νανοσωματίδια, νανοσωλήνες) που είναι συζευγμένα με διαφορετικά πολυμερή (υδατάνθρακες, αντισώματα, κλπ.), (2) τα νανοϋλικά ως παράγοντες τόνωσης του φθορισμού για την ανίχνευση των παθογόνων παραγόντων σε αμιγείς ή μεικτές καλλιέργειες μικροβίων, (3) τα μεταλλικά νανοϋλικά, όπως Ag, TiO₂, και MgO που χρησιμοποιούνται σε αντιμικροβιακές εφαρμογές.

1.3. Μεταλλικά Νανοϋλικά

Τα μεταλλικά νανοϋλικά είναι μια μοναδική κατηγορία υλικών για την ανάπτυξη νέων συσκευών σε βιολογικές, βιοϊατρικές και φαρμακευτικές εφαρμογές. Συνηθέστερα είναι τα στοιχειακά μέταλλα (π.χ. χρυσός, ασήμι, χαλκός, κλπ.), τα οξειδία των μετάλλων (δηλαδή, MgO, ZnO, TiO₂, κλπ.), και οι μαγνητικές ενώσεις. Τα ανόργανα αυτά νανοϋλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν

για τον έλεγχο ανθεκτικότητας ποικίλων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των μυκήτων (Cioffi 2004, Cioffi 2005, και Kim 2007), των Gram-αρνητικών και θετικών βακτηρίων (Esteban-Cubillo 2006, και Son 2004), των βακτηριακών ενδοσπορίων (Stoimenov et al., 2002), και των ιών (Elechiguerra et al., 2005). Μερικά από τα ανόργανα νανοϋλικά έχουν εγγενή βιοκτόνα ή βιοστατικά αποτελέσματα. Οι αντιμικροβιακές επιδράσεις των διαφόρων νανοϋλικών εξαρτώνται από το μέγεθος των σωματιδίων [(Lok 2007), (Panacek 2006)], το σχήμα [(Morones et al. 2005), (Pal 2007)], και τη συγκέντρωσή τους (Shrivastava et al. 2007). Οι αντιμικροβιακοί μηχανισμοί βασίζονται στην αλλαγή μορφολογίας της κυτταρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας της (Sondi and Salopek-Sondi, 2004), στην παραγωγή ενέργειας λόγω οξειδωσης (Kim 2007, Lok 2007), και στη διαφοροποίηση της βακτηριακής μεταγωγής σήματος, η οποία αναστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων (Shrivastava et al., 2007).

Τα μεταλλικά νανοϋλικά έχουν πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών χημικών αντιμικροβιακών ουσιών επειδή τα μικρόβια δεν είναι εύκολο να αντισταθούν, πράγμα που σημαίνει ότι θα πρέπει να αναπτύξουν ταυτόχρονα πολλαπλές μεταλλάξεις για να προστατεύσουν τον εαυτό τους (Pal et al. 2007).

Νανოსωματίδια αργύρου έχουν δοκιμαστεί σε ποικιλία μικροβίων (Aymonier et al. 2002, Jiang et al. 2004, Kim et al. 2007, Lok et al. 2006). Οι Sondi και Salopek-Sondi (2004) μελέτησαν τη δραστηριότητα των νανοςωματιδίων αργύρου στο κοινό βακτήριο *E. coli*. Τα νανοςωματίδια συνδέονται αποτελεσματικά με την επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης αλλοιώνοντας τη μορφολογία της. Από τη συσσώρευση των νανοςωματιδίων αργύρου, αυξήθηκε η διαπερατότητά της και επηρεάστηκε η κυτταρική αναπνοή, οδηγώντας τελικά στο θάνατο των κυττάρων. Η μελέτη αυτή είναι μία από τις πολλές, που αποδεικνύει ότι γενικά τα νανοςωματίδια αλλά κυρίως τα νανοςωματίδια αργύρου υπόσχονται πολλά ως αντιμικροβιακοί παράγοντες.

1.4. Σκοπός της Παρούσας Εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στη μελέτη της τοξικότητας των νανοςωματιδίων σε τρία διαφορετικά κυτταρικά στελέχη: *Escherichia coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus*. Στόχος της είναι η διερεύνηση του βαθμού τοξικότητας ως συνάρτηση τόσο της διαμέτρου των νανοςωματιδίων,

όσο και της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν μπορούν να εφαρμοσθούν αποτελεσματικά στον έλεγχο των μικροοργανισμών και στην πρόληψη των επιβλαβών μολύνσεων που προκαλούνται εξαιτίας τους. Παρέχεται έτσι η δυνατότητα της διαμόρφωσης νέων τύπων βακτηριοκτόνων υλικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον για την καταπολέμηση και τη θεραπεία πολλών ασθενειών που οφείλονται στην παρουσία των παραπάνω βακτηρίων.

2. Βιβλιογραφική Αναφορά

Τα νανοσωματίδια είναι ευρέως χρησιμοποιούμενα σε όλους τους κλάδους των επιστημών και κυρίως σε αυτόν της ιατρικής, που είναι σημαντικά εξελισσόμενος και τα επιτεύγματα του είναι καθοριστικά για την ανθρώπινη υγεία. Μέσα από πειράματα και δοκιμές γίνεται προσπάθεια να μελετηθεί περισσότερο η επίδραση των νανοσωματιδίων στα κύτταρα τόσο του ανθρώπινου οργανισμού (βρογχικό επιθήλιο, επιδερμίδα κλπ), όσο και στους μικροοργανισμούς που έχουν εισέλθει σε αυτόν και προσβάλλουν τα υπόλοιπα κύτταρα και τους ιστούς, προκαλώντας ασθένειες.

Για την πραγματοποίηση αυτών των πειραμάτων οι ερευνητές έχουν αναπτύξει διάφορες τεχνικές για την παραγωγή νανοσωματιδίων. Σ' αυτές συμπεριλαμβάνονται η συν-κατακρήμνιση (coprecipitation), οι sol-gel αντιδράσεις, οι υδροθερμικές και οι υψηλής θερμοκρασίας αντιδράσεις. Παρακάτω εκθέτονται οι αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων σε πρώτη φάση με τα στελέχη *Streptococcus* και *Staphylococcus* και σε δεύτερη φάση με το *Escherichia coli*.

2.1. Επίδραση νανοσωματιδίων στα βακτηριακά στελέχη *Streptococcus* και *Staphylococcus*

2.1.1. Νανοσωματίδια Αργύρου

Ο μικροοργανισμός *Streptococcus mutans* είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για την εμφάνιση της τερηδόνας. Οι Espinosa-Cristobal et al. (2009) καθόρισαν την αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου στο στέλεχος *S. mutans* για την αντιμετώπιση της τερηδόνας. Χρησιμοποιήθηκαν τρία μεγέθη νανοσωματιδίων αργύρου για να βρεθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) των κυττάρων. Τα στελέχη *S. mutans* καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υλικό που περιείχε νανοσωματίδια αργύρου και τα τρυβλία επώαστηκαν στους 37° C για 24 h για να γίνει σύγκριση μεταξύ των πριν και των μετά τη θεραπεία νανοσωματιδίων αργύρου. Τα αποτελέσματα απέδειξαν ότι και τα τρία διαφορετικά μεγέθη νανοσωματιδίων αργύρου είναι ενεργά βακτηριοκτόνα. Όσο μικρότερα είναι τα νανοσωματίδια, τόσο περισσότερα ιόντα αργύρου απελευθερώνουν και συνεπώς τόσο καλύτερη είναι η αντιβακτηριακή δράση τους.

Οι Hernandez-Sierra, et al. (2008) σύγκριναν την βακτηριοκτόνο και την βακτηριοστατική επίδραση των νανοσωματιδίων αργύρου, οξειδίου του ψευδαργύρου και του χρυσού στο *Streptococcus mutans*. Κάθε είδος νανοσωματιδίων έχει διαφορετικές ιδιότητες που οφείλονται στη μεταβολή της διαμέτρου τους. Η αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων των μετάλλων εξαρτάται από την διαθέσιμη επιφάνεια τους (μικρότερα σωματίδια έχουν μεγαλύτερη επιφάνεια ανά όγκο υλικού). Το αποτέλεσμα είναι η μεγαλύτερη επιφάνεια των νανοσωματιδίων να επιτρέπει ένα ευρύτερο φάσμα αλληλεπιδράσεων με άλλα οργανικά και ανόργανα μόρια. Κατά την πειραματική διαδικασία στελέχη *Streptococcus mutans* καλλιεργούνται σε τρυβλίο Mueller-Hinton με προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων και τύπων νανοσωματιδίων σε μικροπλάκες και επωάζονται στους 37 °C για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια αργύρου, σε σύγκριση με εκείνα του χρυσού και του οξειδίου του ψευδαργύρου, απαιτούν χαμηλότερη συγκέντρωση για να εμποδίσουν την ανάπτυξη των στελεχών *S. mutans* και ως εκ τούτου της τερηδόνας.

Στη μελέτη των Lara et al. (2010) διαπιστώθηκε ότι τα νανοσωματίδια αργύρου (1) αδρανοποιούν μια ομάδα βακτηρίων ανθεκτικών στα φάρμακα (Gram θετικά και Gram αρνητικά), (2) ασκούν την αντιβακτηριακή δράση τους μέσα από ένα βακτηριοκτόνο μηχανισμό και (3) αναστέλλουν το βακτηριακό ρυθμό ανάπτυξης από την στιγμή της πρώτης επαφής μεταξύ των βακτηρίων και των νανοσωματιδίων. Τα συμπεράσματα δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια αργύρου είναι αποτελεσματικά, ευρέως φάσματος βιοκτόνα πράγμα το οποίο τα καθιστά υποψήφια για χρήση σε φαρμακευτικά προϊόντα, με στόχο την πρόληψη της μετάδοσης ανθεκτικών στα φάρμακα παθογόνων παραγόντων. Άργυρος δηλαδή σε μορφή νανοσωματιδίων απελευθερώνει ιόντα Ag πιο αποτελεσματικά και ως εκ τούτου έχει καλύτερη βακτηριοκτόνο δράση λόγω της υψηλής αναλογίας της επιφάνειας προς τον όγκο (Kumar, A. 2008). Έχει αποδειχθεί ότι τα νανοσωματίδια Ag επιδρούν στην εξωτερική μεμβράνη του κυττάρου, επηρεάζοντας τη διαπερατότητά της και προκαλώντας δομικές αλλαγές στο ίδιο το κύτταρο. Στη συνέχεια αδρανοποιούν σημαντικά ένζυμα του κυττάρου αναστέλλοντας το μηχανισμό αντιγραφής του DNA, (Morones, JR (2005) και οδηγούν τελικά σε κυτταρικό θάνατο. Άρα τα νανοσωματίδια Ag έδειξαν άριστες αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά του *S. aureus* και *E. coli*.

Οι Fan, C et al. (2011) μελέτησαν τις ανασταλτικές επιδράσεις των νανοσωματιδίων Ag που είναι προσκολλημένα σε δίσκους ρητίνης, στην ανάπτυξη των *Streptococcus mutans*. Το αποτέλεσμα ήταν να σχηματιστεί μια διάφανη δακτύλιος στην καλλιέργεια των *S. mutans* η οποία υποδηλώνει αναστολή της αύξησης τους λόγω των νανοσωματιδίων. Επομένως, αυτή η πιλοτική μελέτη οδήγησε σε μια νέα μέθοδο που παράγει αντιμικροβιακές ρητίνες – λόγω των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) - για οδοντιατρική και ιατρική χρήση.

2.1.2. Άλλοι Τύποι Νανοσωματιδίων

Οι Beyth, et al (2006). παρατήρησαν πως όταν οδοντιατρικές ρητίνες ενσωματώνονται με νανοσωματίδια πολυαιθυλενοϊμίνης (PEI) σε χαμηλή συγκέντρωση (1%), τότε παρουσιάζουν ισχυρή αντιβακτηριδιακή δράση. Η δράση αυτή οφείλεται σε αύξηση της διαπερατότητας των κυτταρικών μεμβρανών και σε διατάραξη που προκαλείται στα κύτταρα *Streptococcus mutans* λόγω του εμβολιασμού της καλλιέργειάς τους με νανοσωματίδια PEI.

Η υπόθεση αυτή δοκιμάστηκε επίσης με πειράματα σε *S. mutans* και *Enterococcus faecalis*, τα οποία επώαστηκαν σε κάθετο δοκιμαστικό σωλήνα με νανοσωματίδια PEI από τους Shvero, DK et al (2010). Τελικά κι αυτοί κατέληξαν στα ίδια συμπεράσματα αποτροπής της τερηδόνας μέσω της ισχυρής αντιβακτηριδιακής δράσης των νανοσωματιδίων PEI.

Το *Streptococcus pneumoniae* είναι μέρος της εντερικής χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος και αποικίζει το επιθήλιο του βλεννογόνου του ρινοφάρυγγα. Μελέτες έχουν υπογραμμίσει το θεμελιώδη ρόλο του στην άμυνα κατά των πνευμονιοκοκκικών λοιμώξεων. Ως εκ τούτου, η ανοσοποιητική στρατηγική θα πρέπει να μπορεί να προωθήσει αποτελεσματικά την ανοσία του βλεννογόνου. Οι Florindo, HF et al. (2008) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι αερομεταφορείς νανοσωματιδίων απορροφούνται με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα από το επιθήλιο του βλεννογόνου για την καταπολέμηση του στελέχους *Streptococcus* που επηρεάζει το ανώτερο αναπνευστικό σύστημα.

Το στέλεχος *Streptococcus* χρησιμοποίησαν στα πειράματά τους και οι Es-Souni, M et al. (2008) σε αλληλεπίδραση με τα νανوسύνθετα TiO₂-Ag. Τα νανوسύνθετα TiO₂-Ag είναι γνωστά για τη βακτηριοκτόνο δράση τους κατά τη διάρκεια της έκθεσης τους σε κατάλληλη ακτινοβολία UV. Ωστόσο αποδείχτηκε ότι

τα TiO₂-Ag νανοςύνθετα μπορούν να γίνουν ισχυρά βακτηριοκτόνα χωρίς την ακτινοβολήση. Οι βακτηριοκτόνες αυτές ιδιότητες δοκιμάστηκαν in-vitro μέσω ταινιών με τα παραπάνω νανοςύνθετα σε καλλιέργειες αιμολυμένων στρεπτόκοκκων, όπου έγιναν ορατές οι καταλυτικές επιδράσεις των νανοσωματιδίων αργυρού.

Τα νανοσωματίδια αργύρου εμφανίζουν επίσης ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες κατά διαφόρων παθογόνων μικροοργανισμών και χωρίς να σχηματίζουν νανοςύνθετα. Η πιο αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση τους έχει παρατηρηθεί στον ανθεκτικό στη μεθικιλίνη *Staphylococcus aureus*. Σύμφωνα με τους Nanda, A (Nanda, Anima) και Saravanan, M (2009) τα στελέχη *S. aureus* καλλιεργήθηκαν σε τρυβλίο Müller-Hinton και επωάζονται για 24 ώρες στους 37 °C. Τα κύτταρα που αναπτύσσονται φυγοκεντρώνται στις 12.000 rpm για 5 λεπτά και το υπερκείμενο χρησιμοποιείται για να γίνει ανακαλλιέργεια σε τρυβλίο Müller-Hinton. Με μικροπιπέττα προστίθενται 20 μL δείγματος νανοσωματιδίων σε πηγάδια-εμβασύνσεις που έχουν σχηματιστεί σε καθορισμένα σημεία στο άγαρ του τρυβλίου. Επωάζεται στους 35 °C για 18 ώρες. Τέλος μετρήθηκαν οι διαφορετικές διαμέτροι των ζωνών αναστολής. Τα αποτελέσματα συνέπεσαν με εκείνα του Shahverdi et al. (2007) σύμφωνα με τα οποία τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) έχουν αντιμικροβιακή δράση στα *S. aureus* και *E. coli*.

Τα βιοκτόνα αποτελέσματα και η κυτταρική εσωτερική εσοτερική των νανοσωματιδίων ZnO στα βακτήρια *Streptococcus agalactiae* και *Staphylococcus aureus* ερευνήθηκαν από τους Huang, ZB et al. (2008) Τα δύο βακτήρια καλλιεργήθηκαν σε αερόβιες συνθήκες στους 37° C για 24 ώρες. Στη συνέχεια, υγιείς αποικίες ανακαλλιεργήθηκαν σε νέο θρεπτικό υλικό με προσθήκη νανοσωματιδίων ZnO (συγκεντρώσεων από 10⁻¹ έως 10⁻⁴ M) που έχουν τοποθετηθεί σε δίσκους από διηθητικό χαρτί. Επώσθησαν στους 37 °C για μια νύχτα και η βιοκτόνος δράση των νανοσωματιδίων ZnO μελετήθηκε με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δίσκοι με χαμηλές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων ZnO δημιούργησαν μικρούς κύκλους αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων στις καλλιέργειες υποδηλώνοντας μικρή κυτταρική βλάβη, όπως αποδεικνύεται και από άλλους ερευνητές. Αντίθετα η μείωση των βακτηρίων ήταν σημαντικά υψηλότερη σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων, αποδεικνύοντας τη βακτηριοκτόνο δράση τους. Η μετατροπή της επιφάνειας των νανοσωματιδίων ZnO προκαλεί την αύξηση της διαπερατότητας των μεμβρανών, την κυτταρική εσωτερική εσοτερική των νανοσωματιδίων και την αποδιοργάνωση της κυτταρικής μεμβράνης.

Οι Yan, DH et al. (2009) αποκάλυψαν ότι τα ανόργανα νανοσωματίδια ZnO με SF πεπτιδίο δεν ήταν τοξικά για τα στελέχη *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* και *Streptococcus agalactiae*, ωστόσο παρουσίασαν καλή κυτταρική συμβατότητα λόγω του επιφανειακού άνθρακα του πεπτιδίου τους.

Με τη μελέτη των Baek, et al. (2011) αξιολογήθηκε η μικροβιακή τοξικότητα των νανοσωματιδίων οξειδίων των μετάλλων για τους μικροοργανισμούς *Escherichia coli* (Gram αρνητικό), *Bacillus subtilis* και *Streptococcus aureus* (Gram θετικά) σε εργαστηριακά πειράματα. Τα νανοσωματίδια που εξετάστηκαν ήταν CuO, NiO, ZnO και Sb₂O₃ και οι συγκεντρώσεις τους κυμαίνονταν από 125 - 350 mg/L. Τα νανοσωματίδια οξειδίων των μετάλλων διασκορπίστηκαν σε θρεπτικό υλικό και οι μικροοργανισμοί καλλιεργήθηκαν σε Luria-Bertani τρυβλία με θρεπτικό υλικό που περιέχει διάφορες συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων οξειδίου των μετάλλων. Τα βακτήρια επώαστηκαν στους 37° C και καταμετρήθηκαν οι μονάδες που σχηματίζουν αποικίες (CFU). Η CFU μειώθηκε στην καλλιέργεια που περιέχει μεγαλύτερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων οξειδίου του μετάλλου και προσδιορίστηκε η σχέση δόσης-απόκρισης. Τα νανοσωματίδια CuO ήταν το πιο τοξικά, ακολουθούμενα από τα ZnO (εκτός *S. aureus*), NiO και Sb₂O₃ νανοσωματίδια. Διαπιστώθηκε επίσης ότι οι ενδογενείς τοξικές ιδιότητες των βαρέων μετάλλων συνδέονται με την τοξικότητα των νανοσωματιδίων οξειδίων του μετάλλων και ότι η τοξικότητα των ιόντων είναι αμελητέα.

Το στέλεχος *Streptococcus* μπορεί να προκαλέσει στρεπτοκοκκική λοίμωξη και επακόλουθες μεταλοιμώδεις επιπλοκές. Οι Zaman, M et al. (2011) ασχολήθηκαν με την ανάπτυξη εμβολίων βάσει πεπτιδίων για την πρόληψή αυτών των επιπλοκών. Για να διεγείρουν την παραγωγή αντισωμάτων, τα εμβόλια απαιτούν παραδοσιακά σύζευξη με πρωτεΐνη-φορέα και συγχορήγηση με ανοσοενισχυτικό. [(Shaila M.S. 2007), (Batzloff M.R.2003) και (Pandey M. 2009)]. Συνθετικά πολυμερή αποτελούν ένα ιδανικό νανομεταφορέα για παράδοση πεπτιδίου - εμβολίου, παρακάμπτοντας τη χρήση των ανοσοποιητικών μεταφορέων και την επιτόπιο καταστολή που σχετίζεται με τις παραδοσιακές πρωτεΐνες - φορείς. Ως εκ τούτου παρουσιάστηκε μια νέα γενιά εμβολίων με νανοσωματίδια.

Τα εμβόλια αν και αποτελούν την κυριότερη και πιο αποτελεσματική πρόκληση κυτταρικής και χυμικής ανοσολογικής απόκρισης, ενσωματώνοντας ζωντανούς ή εξασθενημένους μικροοργανισμούς σε υγιή οργανισμό. Ωστόσο έχουν πολλά μειονεκτήματα και δεν μπορούν να εφαρμοστούν κατά του καρκίνου που είναι

μια πολύ διαδεδομένη ασθένεια. Γι' αυτό μελετάται η χρήση σύγχρονων εμβολίων με ανοσοποιητικές υπομονάδες, προερχόμενες από ένα συγκεκριμένο παθογόνο και με ένα ειδικό σύστημα παράδοσης για την καλύτερη αποτελεσματικότητά τους. Έτσι, εξετάστηκαν στρατηγικές διανομής εμβολίων βασιζόμενες σε νανοσωματίδια που αποτελούνται από πολυμερή, πεπτίδια, λιπίδια και ανόργανα υλικά όπως αυτό έγινε από τους Skwarczynski et al. (2011). Τα πεπτίδια αποτελούν μερίδες στόχευσης που μπορούν να συνδεθούν με μικροοργανισμούς για την παράδοση δραστικών ουσιών στον οργανισμό – στόχο. Επίσης σε πολλές περιπτώσεις τα πεπτίδια που ενσωματώνονται είναι αντιμικροβιακά και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναστολή ορισμένων μικροοργανισμών.

Είναι κοινά αποδεκτό ότι ο σημερινός τρόπος καταπολέμησης του καρκίνου είναι τα φάρμακα. Παρόλα αυτά μεγάλος αριθμός από ισχυρά φάρμακα έχουν αποκλειστεί από τη θεραπευτική χρήση λόγω της χαμηλής επιλεκτικότητας. Γι αυτό γίνονται προσπάθειες για ανάπτυξη στοχοθετημένων θεραπευτικών στρατηγικών που στηρίζονται στα μονοκλωνικά αντισώματα (Köhler et al. 1975). Νηματοειδής βακτηριοφάγος (φάγων) είναι η κινητήριος δύναμη του αντισώματος που αποκτά όλο και μεγαλύτερη σημασία στη νανοβιοτεχνολογία (Sarikaya et al. 2003). Στη συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζονται στοχευμένοι βακτηριοφάγοι, που μεταφέρουν φάρμακα για τη στοχοθέτηση παθογόνων βακτηρίων.

Το άρθρο των Pera, NP et al. (2010) δείχνει ότι σωματίδια υπομικρομετρικά submicrometer ήταν αναγκαία, δεδομένου ότι με τα μεγαλύτερα μικροσωματίδια η μέθοδος δεν απέδωσε.

2.2. Επίδραση νανοσωματιδίων στα βακτηριακά στελέχη Streptococcus και Staphylococcus

2.2.1. Νανοσωματίδια Αργύρου

Εκτός από τα στελέχη των Streptococcus και Staphylococcus, οι περισσότεροι ερευνητές έχουν μελετήσει τις επιδράσεις των νανοσωματιδίων σε στελέχη Escherichia coli τα οποία είναι πολύ κοινά, εύχρηστα και ευρέως διαδεδομένα. Χρησιμοποιούνται σε πολλές πειραματικές μεθόδους για εντοπισμό, θεραπεία νόσων ή προβλημάτων που προκαλούνται από αυτά, αλλά και για την απόδειξη άλλων προτάσεων που σχετίζονται απλούστερα με κύτταρα που συναντώνται στην

καθημερινότητα μας. Οι περισσότερες από τις μεθόδους αυτές αφορούν συνήθως την απομόνωση και την επιλεκτική καλλιέργεια των κυττάρων και ολοκληρώνονται με αξιόπιστες, εξειδικευμένες, βιοχημικές επιβεβαιώσεις.

Οι Li, WR et al. (2010) μελέτησαν την αντιβακτηριακή δράση και το μηχανισμό δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου (SNPs) σε *Escherichia coli* ATCC 8739 αναλύοντας την ανάπτυξη, τη διαπερατότητα, και τη μορφολογία των βακτηριακών κυττάρων μετά τη θεραπεία με SNPs. Είναι γνωστό ότι το ασήμι και οι ενώσεις του έχουν ισχυρή ανασταλτική δράση, βακτηριοκτόνες επιπτώσεις, καθώς και ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακών δραστηριοτήτων στα βακτήρια, στους μύκητες και τους ιούς από τους αρχαίους χρόνους (Lok et al. (2006), Cho et al. (2005), Silver 2003).

Αν και ο τρόπος δράσης των SNPs στα βακτήρια είναι ακόμα άγνωστος, οι Rai et al. (2009) πρότειναν ένα πιθανό μηχανισμό δράσης τους σύμφωνα με τις μορφολογικές και τις δομικές αλλαγές στα βακτηριακά κύτταρα. Τα SNPs δείχνουν αποτελεσματική αντιμικροβιακή ιδιότητα σε σχέση με άλλα άλατα λόγω της εξαιρετικά μεγάλης επιφάνειας τους, η οποία παρέχει την καλύτερη επαφή με τους μικροοργανισμούς (Rai et al. 2009). Σε σύγκριση με άλλα μέταλλα, τα σωματίδια αργύρου αν και παρουσιάζουν χαμηλότερη τοξικότητα στα κύτταρα των θηλαστικών, έχουν υψηλότερη τοξικότητα στους μικροοργανισμούς, (Zhao and Stevens. 1998).

Το στέλεχος *Escherichia coli* είναι Gram-αρνητικό βακτήριο και διαθέτει μια εξωτερική μεμβράνη που περιβάλλει το στρώμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο λείπει από τους Gram-θετικούς οργανισμούς. Η βασική λειτουργία της εξωτερικής μεμβράνης είναι να χρησιμεύει ως ένας επιλεκτικός φραγμός διαπερατότητας. Προστατεύει τα βακτήρια από επιβλαβείς παράγοντες, όπως τα απορρυπαντικά, φάρμακα, τοξίνες, και ένζυμα αποδόμησης και επιτρέπει τη διεισδύση σε θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη των βακτηρίων. Η εξωτερική μεμβράνη στο *E. coli* δομείται από τη λιπιδική διπλοστιβάδα την οποία συνθέτουν αλυσίδες φωσφολιπιδίων και μόρια λιποπολυσακχαρίτη (LPS) εξωτερικά. Τα πειραματικά στοιχεία έχουν αποδείξει ότι το στρώμα των LPS της εξωτερικής μεμβράνης διαδραματίζει ουσιαστικό ρόλο ως επιλεκτικός φραγμός διαπερατότητας για το *E. coli* και άλλα Gram-αρνητικά βακτήρια.

Οι καμπύλες αύξησης του *E. coli* περιλαμβάνουν τρεις φάσεις: (1) τη φάση υστέρησης στην οποία το βακτήριο προσαρμόζεται στο νέο μέσον, (2) την εκθετική φάση και (3) τη φάση σταθεροποίησης χωρίς καθαρή αύξηση ή μείωση του

πληθυσμού. Με απουσία SNPs, το *E. coli* έφτασε την εκθετική φάση γρήγορα. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των SNPs, τόσο περισσότερο αναστέλλεται η ανάπτυξη και η αναπαραγωγή της *E. coli*. Μια μικρή ποσότητα SNPs είναι δυνατόν να παρατείνει τη λανθάνουσα φάση του *E. coli*.

Με βάση την παρούσα έρευνα, το μοντέλο δράσης των SNPs μπορεί να περιγραφεί ως διακοπή της διαπερατότητας της εξωτερικής μεμβράνης από τα SNPs. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα πρώτον, τη διαρροή των κυτταρικών υλικών και δεύτερον την αναστολή της αναπνοής και της ανάπτυξης των κυττάρων. Η αναστολή αυτή οφείλεται στο γεγονός ότι τα SNPs εισάγονται στην εσωτερική μεμβράνη και στη συνέχεια αδρανοποιούν την αλυσίδα των αναπνευστικών διυδρογονασών. Ταυτόχρονα, τα SNPs μπορούν να επηρεάσουν ορισμένες πρωτεΐνες και φωσφολιπίδια και έτσι να προκαλέσουν κατάρρευση της μεμβράνης, με αποτέλεσμα την διάσπαση των κυττάρων και τελικά τον κυτταρικό θάνατο.

Εν κατακλείδι, τα συνδυασμένα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα SNPs μπορούν να βλάψουν τη δομή της βακτηριακής μεμβράνης και να καταστείλουν τη δραστηριότητα ορισμένων μεμβρανώνδων ένζυμων. Αυτό προκαλεί το θάνατο του βακτηρίου *E. coli* μέσω της καταστροφής της μεμβρανώνδου δομής και της διαπερατότητας των βακτηρίων.

Η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου σε στελέχη *Escherichia coli* έχει μελετηθεί ευρέως (Feng Q.L 2000), (Silvestry-Rodriguez et al. 2007), (Gentry et al 2005), (Poon et al. 2004), (Zhao et al. 1998)]. Τις αντιβακτηριακές ιδιότητες μέσω αδρανοποίησης και αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων σε υδατικά αιωρήματα μελέτησαν και οι Drog-Ehre et al. (2009). Για το σκοπό αυτό σταθερά, μοριακά, θετικά ή αρνητικά φορτισμένα νανοσωματίδια αργύρου αναμίχθηκαν σε 1 έως 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ με *E. coli* κύτταρα για να εξεταστούν οι επιπτώσεις τους στην αδρανοποίηση των βακτηρίων. Χρυσά νανοσωματίδια με παρόμοιο μέγεθος, χρησιμοποιήθηκαν για έλεγχο. Μείωση και πλήρης αδρανοποίηση επιτεύχθηκαν με τα ασημένια νανοσωματίδια, ενώ τα χρυσά νανοσωματίδια δεν προκάλεσαν αδρανοποίηση. Ειδικότερα τα νανοσωματίδια αργύρου προκάλεσαν βλάβη στα κύτταρα και στις λειτουργίες τους, όπως στη διαπερατότητα, στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας, στις κυτταρικές διεργασίες της οξειδωσης και της αναπνοής των κυττάρων, ακόμα και στην αναπαραγωγή τους, λόγω της σύνδεσης των νανοσωματιδίων με το DNA [(Pal et al. 2007), (Sondi and B. Salopek-Sondi et al 2004)]. Αποδείχτηκε τελικά ότι η επίδραση των νανοσωματιδίων στην επιβίωση του

E. coli εξαρτάται από τον αριθμό και το μέγεθος των νανοσωματιδίων, καθώς και τη συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων. Σχετικά με την επίδραση του μεγέθους των νανοσωματιδίων είναι γνωστό ότι μικρά νανοσωματίδια είναι πιο δραστήρια από ό, τι μεγαλύτερα σωματίδια ανά όμοια μονάδα μάζας αργύρου [(Morones et al. 2005), Panacek et al.2005)][6], [8], [10] και [16]. Morones et al. (2005) έδειξε ότι μόνο νανοσωματίδια μικρότερης διαμέτρου από 10 nm, εμφανίζουν μια άμεση αλληλεπίδραση με μερικά βακτηριακά στελέχη, όπως τα *E. coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Οι Xu et al. (2004) από την άλλη πλευρά, έδειξαν ότι νανοσωματίδια Ag με μεγέθη έως και 80 nm, συσσωρεύονται και ζουν μέσα στο *P. aeruginosa*, γεγονός που αποδεικνύει ότι αυτά είχαν μεταφερθεί μέσω των εξωτερικών και των εσωτερικών μεμβρανών των κυττάρων .

Τελικά η μείωση του *E. coli* σχετίζεται με την αναλογία μεταξύ του αριθμού των νανοσωματιδίων και των αρχικών βακτηριακών κυττάρων. Η ηλεκτροστατική έλξη και η άπωση μεταξύ ασημένιων νανοσωματιδίων- *E. coli* δεν συμβάλλουν στη διαδικασία αδρανοποίησης τους.

Οι Margaret et al. (2006) μελέτησαν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα ενώσεων εμποτισμένων με νανοσωματίδια αργύρου στα στελέχη: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, στελέχη *Enterobacter* ATCC 13047, *Proteus vulgaris* ATCC 6380, *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606. Τα νανοσωματίδια αργύρου διαθέτουν αντιμικροβιακές δραστηριότητες κατά των Gram-αρνητικών και Gram-θετικών βακτηρίων. Υπάρχει επίσης ελάχιστη ανάπτυξη της βακτηριακής αντοχής. Από την μελέτη αυτή ωστόσο αποδείχτηκε ότι ασκείται άμεση βακτηριοκτόνος δράση, κυρίως κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως τα είδη *Enterobacter*, *Proteus* και *E. coli*. Η ιδιότητα αυτή του αργύρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ιατροτεχνολογικά προϊόντα τα οποία θα διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα των αντιβιοτικών.

Οι αντιβακτηριακές δραστηριότητες των νανοσωματιδίων αργύρου σχετίζονται και με το μέγεθός τους όπως διαπιστώνουν οι Lok, CN et al. (2007). Έχει ήδη αποδειχτεί ότι η επαφή των κυττάρων *E. coli* με μικρομοριακές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων Ag, οδηγεί σε άμεση διάχυση των πρωτονίων τα οποία αποτελούν την κινητήρια δύναμη καταστροφής των κυττάρων (Lok et al. 2006). Αν και το ασήμι είναι ένας πολύ ισχυρός και ταχείας δράσης αντιβακτηριακός παράγοντας, ωστόσο υπάρχουν ορισμένα ανθεκτικά βακτήρια στα νανοσωματίδια Ag

Silver S. (2003) . Τέτοια ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη έχουν απομονωθεί από ορυχεία αργύρου, από κλινικές καθώς και από το εργαστήριο με σταδιακή αύξηση των συγκεντρώσεων Ag [(Klaus et al. 1999), (Gupta et al. 1999), (Li et al. 1997), (Gibbard J. 1937)]. Οι παράγοντες που καθορίζουν την αντίσταση στα νανοσωματίδια Ag περιλαμβάνουν διάφορους κυτταρικούς μηχανισμούς που μειώνουν τη βιοδιαθεσιμότητα του Ag + [(Li et al. 1997), (Gibbard J. 1937)].

Στη παραπάνω μελέτη κύτταρα *E. coli* καλλιεργήθηκαν στους 37 °C για 12 ώρες. Κατά την ανάπτυξη τους προστέθηκαν νανοσωματίδια Ag ή νιτρικού αργύρου και στο τέλος μετρήθηκε η οπτική απορρόφηση (OD) στα 650nm. Αποδείχτηκε έτσι ότι τα νανοσωματίδια Ag είναι ευαίσθητα στο οξυγόνο και μόνο τα μερικώς οξειδωμένα νανοσωματίδια Ag παρουσιάζουν αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Αυτό εξηγείται επειδή μόνο τα κύτταρα που έλαβαν θεραπεία με οξειδωμένα νανοσωματίδια παρουσίασαν μεγάλες μειώσεις στο σχηματισμό αποικιών. Επίσης το δεύτερο συμπέρασμα ήταν ότι τα νανοσωματίδια μικρότερης διαμέτρου έχουν υψηλότερη δραστηριότητα με βάση το αντίστοιχο περιεχόμενο μάζας αργύρου. Όσο μικρότερα είναι τα νανοσωματίδια, τόσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια τους προς τη μάζα και ως εκ τούτου, υψηλότερες οι συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων Ag. Όταν τα νανοσωματίδια Ag των δύο μεγεθών παρουσίασαν ισοδύναμες αντιβακτηριακές δραστηριότητες (π.χ., 12 µg/mL, το 9,2 nm νανο- Ag έναντι 108 µg / mL για 62 nm νανο-Ag), τα άτομα Ag, που εμφανίζονται στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων ήταν περίπου ισοδύναμα με την ίδια τάξη μεγέθους. Συνολικά, η αντιβακτηριακή δραστηριότητα των νανοσωματιδίων Ag εξαρτάται απόλυτα από την επιφάνεια οξείδωσης και τη βέλτιστη διασπορά των σωματιδίων.

Η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων Ag στα στελέχη της μαγιάς (*Saccharomyces Cerevisiae*), του *Escherichia coli* και του *Staphylococcus aureus* διερευνήθηκε από τους Kim, JS et al. (2007). Είναι γνωστό ότι ιόντα του Ag⁺ και ενώσεις με - Ag είναι ιδιαίτερα τοξικές για τους μικροοργανισμούς και παρουσιάζουν έντονα βιοκτόνα αποτελεσµάτα κυρίως σε 12 είδη βακτηρίων , συμπεριλαμβανομένου του *E. coli* (Zhao et al. 1998).

Στις παρούσες δοκιμές νανοσωματίδια Ag διαφόρων συγκεντρώσεων παρασκευάστηκαν από υγρά διαλύματα. Ακολούθως τρυβλία με άγαρ Muller Hinton (MH2) εμβολιάστηκαν με αποικίες του κάθε μικροοργανισμού και συγκεκριμένη ποσότητα νανοσωματιδίων Ag. Επώαστηκαν για 24 ώρες στους 37° C. Οι

μικροοργανισμοί απομακρύνθηκαν από την επιφάνεια του τρυβλίου με ξέπλυμα και στο τελικό διάλυμα που προέκυψε μετρήθηκε η ζώνη απορρόφησης στα 391 nm.

Ως αποτέλεσμα προέκυψε ότι η ανάπτυξη των στελεχών *Saccharomyces* και *E. coli* αναστάλη αποτελεσματικά ακόμα και από τη χαμηλή συγκέντρωση των νανοσωματιδίων Ag, ενώ οι ανασταλτικές επιδράσεις στην ανάπτυξη του *S. aureus* ήταν ήπιες ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων Ag μπορεί να σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά ορισμένων βακτηριακών ειδών. Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν διαφορές ως προς τη δομή της μεμβράνης τους. Το κύριο χαρακτηριστικό της είναι το πάχος του στρώματος της πεπτιδογλυκάνης. πιστεύεται ότι η χαμηλότερη αποτελεσματικότητα των νανοσωματιδίων Ag κατά του *S. aureus* οφείλεται στη διαφορά της δομής της μεμβράνης. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της μεμβράνης των βακτηριακών ειδών και όχι των κυττάρων των θηλαστικών. Ως εκ τούτου, αν η αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων Ag σχετίζεται με το στρώμα πεπτιδογλυκάνης, θα είναι ευκολότερη η χρήση των νανοσωματιδίων Ag ως αντιβακτηριακός παράγοντας.

Ωστόσο, οι Sondí και Salopek-Sondí (2004). ανέφεραν ότι η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου σε Gram-αρνητικά βακτήρια εξαρτάται από την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων Ag και ότι είναι στενά συνδεδεμένη με το σχηματισμό «κοιλοτήτων» στο κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων. Στη συνέχεια τα νανοσωματίδια Ag που έχουν συγκεντρωθεί στη βακτηριακή μεμβράνη, μεταβάλουν τη διαπερατότητά της με αποτέλεσμα το θάνατο των κυττάρων .

Μια άλλη πιθανότητα είναι ότι η αναστολή της ανάπτυξης μπορεί να σχετίζεται με το σχηματισμό των ελευθέρων ριζών από την επιφάνεια των νανοσωματιδίων Ag. Ανεξέλεγκτη παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να προσβάλλει τα λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης και στη συνέχεια να οδηγήσει σε διακοπή της λειτουργίας της (Mendis et al.2005). Η επίδραση των ελευθέρων ριζών στη μικροβιακή αναστολή της ανάπτυξης διερευνήθηκε με ηλεκτρονική φασματοσκοπία μαγνητικού συντονισμού. Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι τα νανοσωματίδια Ag μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αποτελεσματικοί ανασταλτικοί παράγοντες για την ανάπτυξη διαφόρων μικροοργανισμών, καθιστώντας δυνατή την εφαρμογή τους σε διάφορες ιατρικές συσκευές και αντιμικροβιακά συστήματα ελέγχου.

Η μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των υλικών είναι ένα ακόμα αποτελεσματικό και αξιόπιστο εργαλείο για τη βελτίωση της βιοσυμβατότητας τους (Mirkin et al. 2000). Όσο μικρότερη είναι η διάμετρος των νανοσωματιδίων, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η αντιμικροβιακή τους δράση.

Οι Shahverdi, AR et al. (2007) αξιολόγησαν την επίδραση των νανοσωματιδίων αργύρου στην αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των διάφορων αντιβιοτικών στα στελέχη *Staphylococcus aureus* και *Escherichia coli*. Μια μέθοδος διάχυσης δίσκων χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της βακτηριοκτόνου δράσης του συνδυασμού των νανοσωματιδίων με διαφορετικά αντιβιοτικά κατά των στελεχών *S. aureus* και *E. coli* σε τρυβλίο Müller-Hinton. Μετρήθηκε η διάμετρος των ζωνών αναστολής (σε χιλιοστά) γύρω από τους διάφορους δίσκους αντιβιοτικών με ή χωρίς νανοσωματίδια Ag βάσει δοκιμών. Η μέση επιφάνεια της ζώνης αναστολής υπολογίστηκε για κάθε ελεγχόμενο αντιβιοτικό από τη μέση τιμή της διαμέτρου.

Οι Sintubin, L et al. (2011) διερεύνησαν την αντιβακτηριακή δράση των βιογενών αργύρου σε σύγκριση με τα ιόντα αργύρου και τα χημικά που παράγονται από τα νανοσωματίδια αργύρου στο πόσιμο νερό και σε συνθήκες καλλιέργειας με άλατα και οργανική ύλη. Ο τρόπος δράσης των βιογενών αργύρου οφείλεται κατά κύριο λόγο στην απελευθέρωση των ιόντων αργύρου. Τα νανοσωματίδια αργύρου θεωρούνται ότι είναι αργή πηγή απελευθέρωσης ιόντων αργύρου που αναστέλλουν τη δραστηριότητα των βασικών ενζύμων, αντιδρώντας με τις ομάδες θειόλης των πρωτεϊνών και παρεμβαίνοντας στην αντιγραφή του DNA (Morones et al. 2005, Liao et al. 1997, Feng et al 2000 ,Holt et al. 2005). Το ασήμι είναι επίσης γνωστό ότι δημιουργεί ελεύθερες ρίζες που καταστρέφουν τη μεμβράνη των βακτηρίων (Kim et al. 2007, Kumar et al. 2007). Επιπλέον, η αντιβακτηριακή δράση μπορεί επίσης να προκύψει από άμεση φυσική επαφή μεταξύ των νανοσωματιδίων και των βακτηριακών κυττάρων που προκαλούν δομικές βλάβες στο κυτταρικό τοίχωμα τους (Sondi και Salopek-Sondi 2004, Kim et al 2007). Η άμεση επαφή των νανοσωματιδίων με βακτήρια διαταράσσει τη μορφολογία της μεμβράνης, προκαλώντας ανεξέλεγκτη μεταφορά ουσιών μέσω αυτής. Έτσι, τα νανοσωματίδια τα οποία συσσωρεύονται στο εσωτερικό της μεμβράνης, μπορεί στη συνέχεια να διεισδύσουν στα κύτταρα προκαλώντας περαιτέρω ζημιά (Sondi και Salopek-Sondi 2004).

Κοινό πρόβλημα στην εφαρμογή των νανοσωματιδίων είναι η συνάθροιση η οποία μειώνει την ειδική επιφάνεια των νανοσωματιδίων και, ως εκ τούτου, την αντιμικροβιακή τους δραστηριότητα (Mafune et al. 2000). Τα μεγαλύτερα νανοσωματίδια έχουν μικρότερη επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τα βακτήρια και μειωμένη απελευθέρωση των ιόντων αργύρου (Liu and Hart 2010, Σωτηρίου και Πρατσίνης 2010).

Καταλήγοντας, προκύπτει ότι τα βιογενή νανοσωματίδια αργύρου έχουν ίση αντιμικροβιακή δραστηριότητα με τα ιόντα αργύρου. Τα συγκριτικά αποτελέσματα, μεταξύ βιογενών και ιόντων αργύρου (Ag^+) δείχνουν ότι η απελευθέρωση των ιόντων Ag από τα βιογενή είναι άμεσης σημασίας για την αντιβακτηριακή απόδοση. Η άμεση επαφή και ο ριζοσπαστικός σχηματισμός είναι δευτερεύουσας σημασίας ως προς την αντιβακτηριακή απόδοση των βιογενών αργύρου. Τέλος η παρουσία αλάτων και οργανικών υλών μειώνουν την αντιμικροβιακή δράση του αργύρου.

Οι Choi et al. (2008) μελέτησαν της αλληλεπιδράσεις των νανοσωματιδίων αργύρου σε κύτταρα *Escherichia coli* σε πλαγκτονικές αποικίες και σε αποικίες βιοφίλμ. Τα μικροβιακά κύτταρα στα υδάτινα οικοσυστήματα συχνά ζουν πυκνά συγκεντρωμένα σε επιφανειακές κοινότητες, γνωστές ως βιοφίλμ, για να προστατευθούν από τις περιβαλλοντικές αλλαγές ([Costerton et al., 1995], [Harrison et al., 2007]). Εξωκυττάρια πολυμερείς ουσίες (EPS) που παράγονται από τα κύτταρα συμβάλλουν στη δημιουργία του βιοφίλμ (Tsuneda et al., 2003). Τα βιοφίλμ είναι ανθεκτικά σε τοξικές χημικές ουσίες, όπως βαρέα μέταλλα ([Harrison et al., 2005a], [Harrison et al., 2005b], [Teitzel και Parsek, 2003]) και αντιμικροβιακούς παράγοντες (Mah and O'Toole, 2001). Οι βιομεμβράνες μπορεί να είναι μέχρι και 1000 φορές πιο ανθεκτικές σε τοξικές ουσίες από το πλαγκτονικά κύτταρα (Mah et al., 2003). Η αντίσταση αυτή μπορεί να εξηγηθεί μέσω πολλών μηχανισμών συμπεριλαμβανομένης της αύξησης του αριθμού των ανθεκτικών κυττάρων (Keren et al., 2004), της αίσθησης πληρότητας των συστημάτων (Miller και Bassler, 2001), της βιοαπορρόφησης (Qureshi et al., 2001), της γονιδιακής έκφρασης (Lenz et al. 2008) και των συστημάτων εκροής (Silver και Phung, 1996). Η περιορισμένη μάζα που είναι διάχυτη στο εσωτερικό των βιοφίλμ συμβάλλει επίσης στην μικροβιακή αντοχή (Stewart και Franklin, 2008). Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ένα τροποποιημένο μικροπεριβάλλον με διαφορετικά επίπεδα μεταβολικής δραστηριότητας εντός του βιοφίλμ και χωρική ετερογένεια της μικροβιακής αντοχής

ως προς τη γονιδιακή έκφραση των μικροβιακών κυττάρων [(Stewart & Costerton, 2001), (Lenz et al., 2008)].

Η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αργύρου μπορεί να εξηγηθεί από την αλληλεπίδραση των νανοσωματιδίων με τα μικρόβια, συμπεριλαμβανομένης της απελευθέρωσης ιόντων και της κυτταρικής εσωτερίκευσης τους (Sondi and Salopek-Sondi, 2004), (Navarro et al. 2008)]. Ο τρόπος δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) φανερώνει ότι το μέγεθος των νανοσωματιδίων καθορίζει την τοξικότητα τους [(Carlson et al., 2008), (Choi και Hu, 2008), (Jiang et al., 2008)]. Μικρά σε μέγεθος AgNPs μπορούν να εμποδίσουν την ανάπτυξη βακτηρίων νιτροποίησης περισσότερο από τα ασημένια ιόντα της ίδιας συνολικής συγκέντρωσης αργύρου [(Choi και Hu, 2008), (Choi et al., 2008)]. Ωστόσο, τα AgNPs δεν είναι τόσο αποτελεσματικά όσο τα ιόντα Ag^+ στην απόπτωση του *Escherichia coli* (Choi et al. 2008).

Ως εκ τούτου, η τοξικότητα των νανοσωματιδίων ελέγχεται από το μέγεθος των σωματιδίων (εσωτερίκευση στα κύτταρα), το ρυθμό απελευθέρωσης ιόντων Ag^+ (σταθερότητα των σωματιδίων) και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας (π.χ., επιφανειακή δημιουργία του βιοφίλμ). Επίσης η φυσιολογική ετερογένεια (Stewart and Franklin, 2008) του βιοφίλμ (οξυγόνο, υπόστρωμα και υποπροϊόν, κλίση συγκέντρωσης, εύρος pH, σύνθεση EPS, κ.λπ.) μπορεί να επηρεάσει την περαιτέρω συγκέντρωση, τη διάλυση και τη διάχυτη μεταφορά των νανοσωματιδίων αργύρου.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα ιόντα Ag^+ είναι περισσότερο τοξικά για το *E. coli* από τα αντίστοιχα νανοσωματίδια. Αυτό προκύπτει από τη μέτρηση της ελάχιστης βακτηριοκτόνου συγκέντρωσης (MBC) η οποία ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα που εμποδίζει την ανάπτυξη μικροβίων. Συμβατικά, είναι η συγκέντρωση που σκοτώνει τουλάχιστον το 99,9% των πλαγκτονικών πληθυσμών ή των βακτηριακών πληθυσμών στο βιοφίλμ (Harrison et al. 2007). Συνεπώς αποδεικνύεται ότι η συγκέντρωση των σωματιδίων σε συνδυασμό με την αργή διάχυση των νανοσωματιδίων και των ιόντων Ag^+ από τη διάλυση των πρώτων, προσδίδει στα βιοφίλμ ανθεκτικότητα στα νανοσωματίδια και στα ιόντα Ag^+ άρα και μειωμένη τοξικότητα.

Ανακαλύψεις της τελευταίας δεκαετίας έδειξαν ότι οι ηλεκτρομαγνητικές, οι οπτικές, οι φυσικοχημικές, οι αντιμικροβιακές και οι καταλυτικές ιδιότητες των νανοσωματιδίων αργύρου επηρεάζονται έντονα από τη κατανομή, το σχήμα και το μέγεθος τους. Οι παραπάνω παράμετροι μεταβάλλονται κατά τη σύνθεση των

νανοσωματιδίων (μειώνοντας ουσίες και σταθεροποιητές). Επιπλέον παρουσιάζονται διαφορετικές μέθοδοι προετοιμασίας νανοσωματιδίων αργύρου και η εφαρμογή τους σε διάφορους τομείς.

Μεταλλικά νανοσωματίδια μπορούν να προετοιμαστούν από δύο διαδρομές. Η πρώτη είναι μια φυσική προσέγγιση που χρησιμοποιεί μεθόδους, όπως εξάτμιση / συμπύκνωση και φωτοαποδόμηση. Η δεύτερη είναι μια χημική προσέγγιση στην οποία τα ιόντα των μετάλλων είναι μειωμένα σε συνθήκες που ευνοούν την επακόλουθη δημιουργία μικρών ομάδων μετάλλου [(Khomutov και Gubin, 2002) , (Oliveira et al., 2005), (Egorova and Revina , 2000)].

Σε φυσικές διεργασίες, τα μεταλλικά νανοσωματίδια συντίθενται από εξάτμιση-συμπύκνωση, η οποία πραγματοποιείται με χρήση ενός φούρνου - σωλήνα σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Η πρώτη ύλη μέσα σε μια θήκη στο κέντρο του φούρνου εξατμίζεται.

Επιπλέον, νανοσωματίδια Ag (AgNPs) έχουν συντεθεί με φωτοαποδόμηση μεταλλικών υλικών σε διάλυμα [(Mafune et al., 2000), (Mafune et al., 2001), (Kabashin & Meunier, 2003), (Sylvestre et al., 2004), (Tsujii et al. 2002^a), (Tsujii et al., 2003), (Compagnini et al., 2003), (Chen και Yeh, 2002), (Dolgaev et al., 2002)]. Τα χαρακτηριστικά των μεταλλικών σωματιδίων και η αποτελεσματικότητα της εκτομής εξαρτώνται από το μήκος κύματος του λέιζερ που παρεμβαίνει στο μεταλλικό στόχο, τη διάρκεια των παλμών λέιζερ, τη πυκνότητα της ενέργειας λέιζερ, τη χρονική διάρκεια της εκτομής και το υγρό μέσο ([Hwang et al., 2000a], [Hwang et al., 2000b], [Kim et al., 2005], , [Link et al., 2000], [Link και El-Sagient, 1999], [Smakin et al., 2001], [Lee et al., 2001], [Tarasenko et al., 2006], [Kawasaki & Nishimura , 2006], [Tsujii et al., 2001], [Nichols et al., 2006], [Mafuné et al., 2003], [Semerok et al., 1999]).

Η αντιβακτηριακή δράση των διαφόρων μεταλλικών νανοσωματιδίων είναι στενά συνδεδεμένη με το μέγεθός τους. Όσο μικρότερος είναι ο πυρήνας αργύρου, τόσο μεγαλύτερη είναι η αντιβακτηριακή δράση. Επιπλέον, η καταλυτική δράση αυτών των νανοσωματιδίων εξαρτάται από το μέγεθος, τη δομή, το σχήμα, την κατανομή μεγέθους, και το φυσικό - χημικό περιβάλλον.

Η χημική αναγωγή είναι η πιο συχνή μέθοδος που εφαρμόζεται για την προετοιμασία των AgNPs με τα σταθερά κolloειδή διασποράς σε νερό ή σε οργανικούς διαλύτες. Αρχικά, η μείωση των διαφόρων συγκροτημάτων με Ag⁺ ιόντα οδηγεί στο σχηματισμό των ατόμων του αργύρου (Ag⁰) και τελικά στο σχηματισμό

κολλοειδών σωματιδίων Ag ([Tao et al., 2006], [Wiley et al., 2005], [Lee & Meisel, 1982], [Shirtcliffe et al., 1999], [Nikelio et al., 2000], [Chou και Ren, 2000], [Evanoff and Chumanov, 2004], [Sondi et al., 2003], [Merga et al., 2007], [Creighton et al., 1979], [Ahmadi et al., 1996], [Kapoor et al., 1994]).

Οι Maity, D et al. (2011) προσδιόρισαν έναν απλό και φθηνό τρόπο σύνθεσης σφαιρικών νανοσωματιδίων αργύρου μέσω της υγρής-χημικής μείωσης του AgNO₃ με πολυ (μεθυλο βινυλο αιθέρα-co-μηλεϊνικό ανυδρίτη) (PVM / MA), ως μέσο μείωσης και σταθεροποίησης. Η συνθετική διαδικασία διεξήχθη σε υδατικό διάλυμα, καθιστώντας τη μέθοδο ευέλικτη και φιλική προς το περιβάλλον.

Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την προετοιμασία των νανοσωματιδίων αργύρου όπως η μείωση του κιτρικού οξέος, η ηλεκτροχημική σύνθεση, η φωτοχημεία και η μείωση ακτινοβολίας. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι τα νανοσωματίδια που συντίθενται με τη μέθοδο χημικής αναγωγής, είναι κατάλληλα για διαμόρφωση νέων τύπων βακτηριοκτόνων υλικών. Μείωση του μεγέθους των σωματιδίων των υλικών αυτών είναι ένα αποτελεσματικό και αξιόπιστο εργαλείο για τη βελτίωση της βιοσυμβατότητας τους. Ένα άλλο συμπέρασμα είναι ότι αν και ο ρυθμός σχηματισμού των νανοσωματιδίων Ag αυξάνει με το χρόνο, τα σχήματα και το μέγεθος τους παραμένουν ίδια. Εν κατακλείδι, η συγκέντρωση του πολυμερούς επιδρά σημαντικά στη μορφή των νανοσωματιδίων Ag.

Προηγμένες εφαρμογές απαιτούν την κατάλληλη χημική λειτουργικότητα των νανοσωματιδίων με οργανικά μόρια ή την ενσωμάτωσή τους σε αντίστοιχες μήτρες πολυμερών. Το ενδιαφέρον για τα πολυμερή νανοςύνθετων με νανοσωματίδια αργύρου οφείλεται στην υψηλή αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων καθώς και στα μοναδικά χαρακτηριστικά των πολυμερών. Αυτά περιλαμβάνουν εξαιρετική δομική ομοιομορφία, διακλαδώσεις, διάφορες μορφές, ιδιαίτερα μεταβλητή χημική σύνθεση, χαμηλότερο κόστος κύκλου ζωής, και μοναδικά μεγάλη δυνατότητα εφαρμογής των νανοςύνθετων σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς.

Οι Lara, HH et al. (2011) διαπίστωσαν ότι τα AgNPs είναι αποτελεσματικά ενάντια σε πολλούς ιούς και είδη βακτηρίων. Το μέγεθος και η κατανομή του μεγέθους των νανοσωματιδίων είναι τα πιο σημαντικά χαρακτηριστικά τους επειδή καθορίζουν την in vivo κατανομή, την τοξικότητα και την ικανότητα στόχευσης τους (Panyam et al. 2003). Οι Yen et al. (2009) ανέφεραν ότι τα μικρότερα AgNPs είναι πιο κυτταροτοξικά από τα μεγαλύτερα στην ίδια συγκέντρωση υποστηρίζοντας έτσι τη σημασία του μεγέθους τους.

Με πολυμερικά νανοσύνθετα αργύρου ασχολήθηκαν και οι Dallas, P et al. (2011). Το μέγεθος και το σχήμα των νανοσωματιδίων, η αρκετά υψηλή φόρτωση, η αλληλεπίδραση της επιφάνειας του αργύρου με το πολυμερές και η ελεύθερη επιφάνεια των νανοσωματιδίων που επιτρέπει την αντιμικροβιακή δράση είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των πολυμερικών νανοσύνθετων. Τα πλεονεκτήματα, τους, αν και έχουν περιορισμένες εφαρμογές, είναι ότι έχουν σχετικά μεγάλο δυναμικό, χαμηλό κόστος και ότι διαλύονται στο νερό. Η επισύναψη των πολυμερών με τα νανοσωματίδια αργύρου συμβάλλει στη βελτίωση της διασποράς των νανοσωματιδίων, εμποδίζει μερικώς το σχηματισμό των αδρανών υλικών και οδηγεί σε μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων.

Ο μηχανισμός της αντιμικροβιακής δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου δεν έχει πλήρως κατανοηθεί. Τρεις πιο κοινοί μηχανισμοί είναι: (i) η σταδιακή απελευθέρωση των ιόντων αργύρου, που ακολουθείται από διακοπή της παραγωγής ATP και αντιγραφή του DNA, (ii) τα νανοσωματίδια αργύρου προκαλούν άμεσες ζημιές στις κυτταρικές μεμβράνες, και (iii) νανοσωματίδια αργύρου και ιόντα αργύρου παράγουν αντιδραστικά είδη οξυγόνου. Σύμφωνα με κάποιες μελέτες η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου είναι παρόμοια με αυτή των ιόντων αργύρου.

Οι Amro et al. (2000) έχουν δείξει ότι η μείωση του μετάλλου μπορεί να προκαλέσει ακανόνιστο σχήμα στην εξωτερική μεμβράνη και μεταβολή της διαπερατότητας της μεμβράνης, λόγω της απελευθέρωσης λιποπολυσακχαριτών και μεμβρανικών πρωτεϊνών. Παρόμοιος μηχανισμός υποβαθμίζει τη δομή της μεμβράνης του *E. coli* κατά την επαφή με νανοσωματίδια αργύρου. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η σύνθεση νανοσωματιδίων – πολυμερούς έχει ως στόχο τα ασήμι νανοσωματίδια να μπορούν να διασκορπιστούν ευκολότερα και να έχουν αποτελεσματικότερη αντιμικροβιακή δράση σε σχέση με το μέγεθός τους.

Επίσης οι: Kora AJ (Kora Aruna Jyothi) και Arunachalam J. (2011) παρατήρησαν ότι η βακτηριοκτόνος δράση των νανοσωματιδίων εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωσή τους όσο και από τον αριθμό των παρόντων βακτηρίων. Οι παρατηρήσεις αυτές για τον αντιβακτηριακό μηχανισμό των νανοσωματιδίων αργύρου τεκμηριώνονται από την ένωση των αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και την κυτταρική βλάβη της μεμβράνης.

Επιπλέον, οι Samberg, ME et al. (2011) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντιβακτηριακή αποτελεσματικότητα των Ag-NPS εξαρτάται από τα διαφορετικά μεγέθη, τις συνθήκες επιφάνειας και τις μεθόδους σύνθεσης τους.

Στο άρθρο των Chudasama, B et al. (2010), περιγράφεται μια σύντομη διαδρομή σύνθεσης ενιαίων υδρόφοβων νανοσωματιδίων αργύρου από τη αργή και ελεγχόμενη, θερμική μείωση του AgNO₃ χρησιμοποιώντας oleylamine. Για να ενισχυθεί η ικανότητα διασποράς των υδρόφοβων νανοσωματιδίων αργύρου στο νερό, διατηρώντας ταυτόχρονα τις μοναδικές ιδιότητές τους, έχουν ετοιμαστεί σταθερά υδατικά κolloειδή από βιοσυμβατά συμπολυμερή pluronic F-127.

Οι αντιμικροβιακές δραστηριότητες των υδρόφιλων νανοσωματιδίων αργύρου ελέγχονται σε δύο Gram θετικά (*Bacillus megaterium* και *Staphylococcus aureus*), και τρία Gram αρνητικά (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* και *Shigella sonnei*) βακτήρια. Το *S. aureus* μπορεί να προκαλέσει δευτερογενείς λοιμώξεις του δέρματος, (π.χ. σύνδρομο του δέρματος) και αποστήματα απειλητικών ασθενειών, (πνευμονίας, μηνιγγίτιδας και σηψαιμίας). Επίσης εξακολουθεί να είναι μία από τις πέντε πιο κοινές αιτίες που προκαλούν μετεγχειρητικές λοιμώξεις των τραυμάτων (Kluytmans et al. 1997). Το *E. coli* μπορεί να προκαλέσει γαστρεντερίτιδα, λοιμώξεις του ουροποιητικού και νεογνική μηνιγγίτιδα. Σε σπάνιες περιπτώσεις, ορισμένα στελέχη είναι υπεύθυνα για το αιμολυτικό ουραιμικό σύνδρομο (HUS), τη μαστίτιδα και την gram αρνητική πνευμονία (Todak K. 2007).

Το ασήμι αλληλεπιδρά ευρέως με τους μικροοργανισμούς. Αυτό σημαίνει ότι θα πρέπει να αναπτύξουν μια σειρά από ταυτόχρονες μεταλλάξεις για να προστατευτούν (Pal et al. 2007). Κάτι αρκετά απίθανο. Συνεπώς οι μικροοργανισμοί αδυνατούν να αναπτύξουν αντίσταση ενάντια στο ασήμι όπως κάνουν έναντι των συμβατικών αντιβιοτικών. Οπότε τα νανοσωματίδια αργύρου εισέρχονται στα κύτταρα. Στην περίπτωση των Gram - αρνητικών κυττάρων, τα νανοσωματίδια αργύρου θα διασχίσουν την εξωτερική μεμβράνη μαζί με το λεπτό στρώμα πεπτιδογλυκάνης, όπως προαναφέρθηκε. Τα Gram θετικά έχουν ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης (30 nm) και στερούνται εξωτερικής μεμβράνης (Feng et al. 2000, Nover et al. 1983). Δεδομένου ότι δεν υπάρχει ειδικός μηχανισμός δράσης των νανοσωματιδίων αργύρου έναντι των διαφόρων τύπων βακτηρίων (Vertelov et al. 2008) και διαφορά στο πάχος των κυτταρικών τοιχωμάτων, οι δυνατότητες εισόδου στο κύτταρο δεν εξαρτώνται από την κατηγορία των βακτηρίων (Gram - θετικά ή Gram - αρνητικά). Οι βελτιωμένες αντιβακτηριακές δραστηριότητες των

νανοσωματιδίων αργύρου οφείλονται στο μικρό μέγεθος τους, στη στενή διανομή τους και στο ομοιόμορφο σχήμα. Πιθανή αιτία μπορεί να είναι και η υψηλή σταθερότητα των κολλοειδών, η οποία οδηγεί σε εύκολη εσωτερίκευση των νανοσωματιδίων στα βακτηριακά τοιχώματα (Chudasama et al. 2009).

Ακόμη οι Prema, P & Raju, Rincy (2009) συμπέραναν πως τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν καλύτερη αντιμικροβιακή δράση κατά του *Staphylococcus aureus*, από τα άλλα παθογόνα βακτήρια. Παράλληλα αποκάλυψαν ότι υπάρχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση των νανοσωματιδίων αργύρου με τα στελέχη *Escherichia coli*, *S. aureus* και *Klebsiella*.

Την αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων αργύρου (Ag-NPs) στο *Staphylococcus aureus* ATCC 6538P διερευνήσαν και οι Li et al. (2010). Τα νανοσωματίδια αργύρου έχουν ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης σε Gram-αρνητικά και Gram-θετικά βακτήρια, όπως το *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans* και *Staphylococcus epidermidis* (Sondi & Salopek-Sondi 2004, Yoon et al. 2007, Kim et al. 2007, Lee et al. 2008, Jung et al. 2008, Yamanaka et al. 2005, Espinosa-Cristóbal et al. 2009, Cho et al. 2005).

Η αντιμικροβιακή δράση των νανοσωματιδίων είναι πολύ υψηλή. Το ασήμι είναι το πιο τοξικό στοιχείο για τους μικροοργανισμούς από άλλα μέταλλα με την ακόλουθη σειρά: Ag> Hg> Cu> Cd> Cr> Pb> Συνεργασία> Au> Zn> Fe> Mn> Mo> Sn (Zhao και Stevens 1998). Επίσης το ασήμι έχει χαμηλότερη τάση να προκαλεί μικροβιακή αντοχή από άλλα αντιμικροβιακά υλικά (Kim et al. 2007, Silver 2003, Silver et al. 2006, Franke et al. 2001).

Σε θρεπτικό μέσο Mueller-Hinton προστέθηκαν κύτταρα *S. aureus* και νανοσωματίδια αργύρου. Ακολουθεί επώαση στους 37 °C για 12 ώρες, έπειτα φυγοκέντριση των δειγμάτων και τέλος μέτρηση της οπτικής πυκνότητάς τους (OD) στα 600 nm. Βάσει αυτών των μετρήσεων προσδιορίστηκαν οι καμπύλες αύξησης των *S. aureus* που ήταν εκτεθειμένα σε Ag-NP και εκείνων που δεν ήταν.

Τα αποτελέσματά έδειξαν ότι τα Ag-NPs είναι περισσότερο τοξικά για το *E. coli* από το *S. aureus*. Τα Ag-NPs μπορούν να βλάψουν τη δομή της βακτηριακής μεμβράνης του *S. aureus*, να αναστείλουν την κυτταρική αναπνοή και να ενισχύσουν ή να μειώσουν την έκφραση ορισμένων ενζύμων. Ειδικότερα, τα Ag-NPs επιδρούν στην κυτταρική μεμβράνη, την καταστρέφουν και αδρανοποιούν δραστικά ένζυμα πχ την αφυδρογονάση της αναπνευστικής αλυσίδας. Όσο αυξάνει η συγκέντρωση των

νανοσωματιδίων αργύρου, τόσο μειώνεται η δραστικότητά της. Συνεπώς τα Ag-NPs καταστρέφοντας την αναπνευστική αφυδρογονάση, αναστέλλουν την αναπνοή και εμποδίζουν τη φυσιολογική ανάπτυξη των κυττάρων (Li et al. 2010). Έτσι παρεμβαίνουν στο φυσιολογικό μεταβολισμό του κυττάρου και εμποδίζουν το DNA να αναπαραχθεί. Τελικά γίνεται κυτταρόλυση, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση του κυτταρικού περιεχομένου στο περιβάλλον.

Στο άρθρο των Lee, BU et al. (2008) χρησιμοποιούνται αερομεταφερόμενα νανοσωματίδια αργύρου και δοκιμάζονται οι δυνατότητές τους για αδρανοποίηση των Gram θετικών *Staphylococcus epidermidis* και *Bacillus subtilis* και του Gram-αρνητικού *E. coli*.

Τέλος οι Lkhagvajav, N et al. (2011) παρατήρησαν ότι η αντιμικροβιακή δράση σε επιλεγμένα στελέχη μικροοργανισμών αντιστοιχεί σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση της τάξης 2-4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ του νανο ασήμι .

3. Μεθοδολογία

Νανοσωματίδια αργύρου (SNPs) παρασκευάστηκαν στο πανεπιστήμιο Delft της Ολλανδίας με τη μέθοδο της εξάχνωσης. Οι παράμετροι και οι συνθήκες λειτουργίας της συσκευής σύνθεσης νανοσωματιδίων έχουν επιλεγεί με τέτοιο τρόπο ώστε τα νανοσωματίδια που θα παραχθούν να έχουν μέση διάμετρο 15nm, 22nm, 30nm και 50nm. Τα νανοσωματίδια συλλέχθηκαν σε ειδικά φίλτρα (glass fiber filter) διαμέτρου 47 mm και συγκέντρωσης $6 \cdot 10^{14}$, $3 \cdot 10^{14}$, $1,5 \cdot 10^{14}$, $1,12 \cdot 10^{14}$ και $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια αργύρου/m².

Στελέχη Escherichia coli, Streptococcus και Staphylococcus λήφθηκαν από τις αντίστοιχες κυτταρικές καλλιέργειες που ήταν διαθέσιμες στο μικροβιολογικό ιατρείο του κ. Ευστράτιου Σάκκη. Για τις κυτταροκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν τα διαφορετικά τρυβλία με θρεπτικό άγαρ της εταιρείας Biomerieux: Mac Conkey (MCK), Columbia ANC + 5% αίμα προβάτου (CNA) και Mueller-Hinton (MH2). Καθένα από αυτά τα τρυβλία διαφέρει στη σύσταση του και γι αυτό το λόγο ευνοεί την ανάπτυξη διαφορετικών μικροοργανισμών. Το τρυβλίο με άγαρ Mac Conkey (MCK) περιέχει 17 g πεπτόνη ζελατίνης (βόειος ή χοίρειος), 3 g πεπτόνη κρέατος (βόειος ή χοίρειος), 10 g βόειος λακτόζη, 1,5 g άλατα χολής (βόειος ή χοίρειος), 13,5 g άγαρ, 5 g χλωριούχο νάτριο και 1 L καθαρό νερό. Η σύνθεση του Columbia ANC + 5% αίμα προβάτου (CNA) είναι η εξής: 10 g πεπτόνη κρέατος και καζεΐνης (βόειος ή χοίρειος), 10 g υδρολυμένες ζωικές πρωτεΐνες (βόειος ή χοίρειος), 3 g πεπτόνη καρδιάς (βόειος ή χοίρειος), 1 g άμυλο αραβοσίτου, 50 ml αίμα προβάτου, 13,5 g άγαρ, 5 g χλωριούχο νάτριο και 1 L καθαρό νερό. Το θρεπτικό υλικό του τρυβλίου Mueller-Hinton (MH2) περιέχει τα ακόλουθα: 2,0 g εκχύλισμα βόειου κρέατος, 1,5 g διαλυτού αμύλου (πατάτας), 17,5 g υδρόλυμα οξύ καζεΐνης (βόειος), 17 g άγαρ και 1 L καθαρό νερό (Biomerieux SA). Τέλος πριν από κάθε ανακαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε υγρό θρεπτικό άγαρ TSB – F της εταιρείας Biomerieux.

Στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας έγιναν πειράματα για να ελεγχθεί αν τα νανοσωματίδια επιδρούν στην ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των κυτταρικών στελεχών E. coli. Για το σκοπό αυτό απομονώθηκαν τα κατάλληλα κυτταρικά στελέχη και ανακαλλιεργήθηκαν σε δύο διαφορετικά τρυβλία. Το πρώτο περιείχε θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton (MH2) και το δεύτερο θρεπτικό υλικό σοκολατόχρωμο άγαρ + PolyVitex (PVX). Το υλικό αυτό συντίθεται από 7,5 g πεπτόνη καζεΐνης (βόειος), 7,5 g πεπτόνη κρέατος (βόειος ή χοίρειος), 5 g χλωριούχο νάτριο, 10 g αιμοσφαιρίνη (βόειος), 4 g φωσφορικό δικάλιο, 1 g άμυλο αραβοσίτου, 10 ml PolyVitex, 10 g άγαρ και 1 l νερό (REF:43 101 / 43 109, Biomerieux SA). Τα δυο

τρυβλία χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει εντοπισμός εκείνου που ευνοεί τη διάχυση των νανοσωματιδίων. Τελικά παρατηρήθηκε ότι το πρώτο τρυβλίο (MH2) είναι κατάλληλο, ενώ το δεύτερο (PVX) όχι.

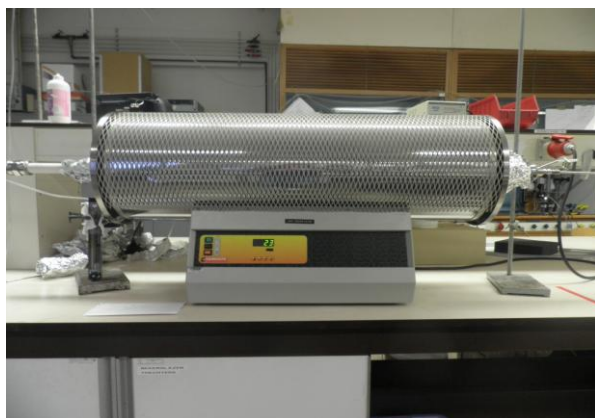
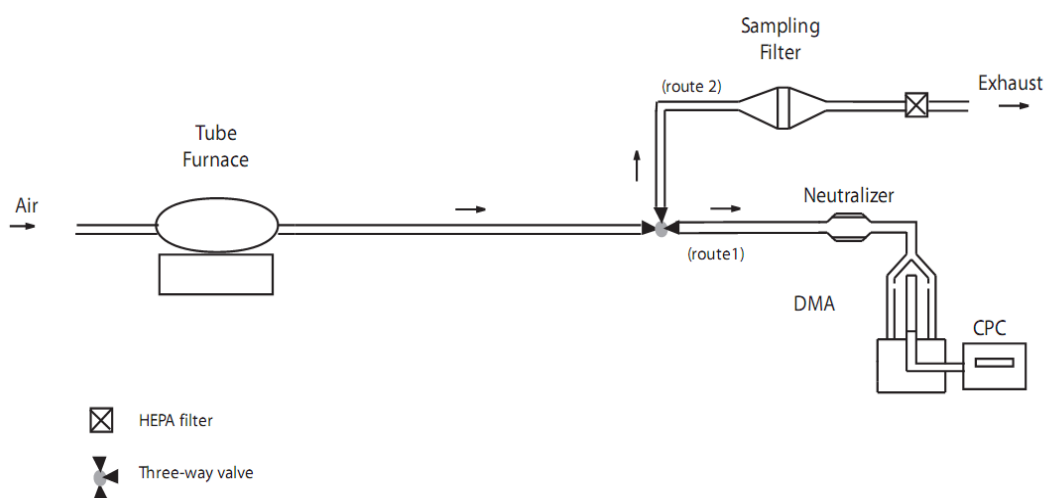
3.1. Προετοιμασία των νανοσωματιδίων αργύρου

Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιείται για την παραγωγή των σωματιδίων Ag που απαιτούνται για τις ανάγκες της παρούσης διπλωματικής εργασίας, φαίνεται στο σχ.1. Κύρια συσκευή της διάταξης αυτής είναι ένας φούρνος, ο οποίος έχει ρυθμιστεί να λειτουργεί 1050°C - 1200°C . Ο φούρνος αυτός περιλαμβάνει ένα σωλήνα από κεραμικό υλικό, ώστε να είναι ανθεκτικό στις υψηλές θερμοκρασίες που επικρατούν σ' αυτόν και να μην εξαχνώνεται. Έτσι δε θα προκύπτουν ατμοί από άλλο υλικό πέρα από αυτό που έχει τοποθετηθεί στο φούρνο για την παραγωγή των νανοσωματιδίων (στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι ο άργυρος). Στο μέσο του σωλήνα τοποθετείται μια θήκη από κεραμικό υλικό. Στη θήκη αυτή τοποθετείται ορισμένη ποσότητα του χημικού στοιχείου (άργυρος) από το οποίο θα προκύψουν τα αντίστοιχα νανοσωματίδια μέσω της εξάχνωσης. Στην προκειμένη περίπτωση τοποθετείται ασήμι. Ο φούρνος θερμαίνεται στους 1050°C - 1200°C . Κάτω από αυτές τις συνθήκες και τις τόσο υψηλές θερμοκρασίες, το ασήμι εξαχνώνεται (δηλ. περνά από την στερεά στην αέρια φάση). Μέσω της διαδικασίας συμπύκνωσης και συσσωμάτωσης δημιουργούνται σωματίδια, των οποίων η διάμετρος ποικίλει από 10 nm έως και μερικά μm . Τα σωματίδια που δημιουργούνται μέσα στον φούρνο, παρασύρονται από ένα ρεύμα αέρα ροής Q και απομακρύνονται από το εσωτερικό του φούρνου. Η κατανομή μεγέθους του παραγόμενου αερολύματος επηρεάζεται από τις παραμέτρους λειτουργίας του φούρνου (T,Q).

Ακολουθώντας την διαδρομή 1 (route 1) πετυχαίνουμε την μέτρηση της κατανομής μεγέθους των σωματιδίων που δημιουργήθηκαν από την προηγούμενη διαδικασία από το σύστημα Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS). Το σύστημα αυτό αποτελείται από 3 μέρη. Τον φορτιστή σωματιδίων (neutralizer), τον ταξινομητή ηλεκτρικής κινητικότητας (Differential Mobility Analyzer, DMA) και τον οπτικό καταμετρητή (Condensation Particle Counter, CPC). Η λειτουργία της διάταξης αυτής, στηρίζεται στον διαχωρισμό των σωματιδίων βάσει της ηλεκτρικής κινητικότητας τους (Z), εφαρμόζοντας ένα ηλεκτρικό πεδίο στο εσωτερικό της στήλης DMA. Η ηλεκτρική κινητικότητα, είναι μια ιδιότητα η οποία εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος

και το φορτίο του σωματιδίου. Τα σωματίδια, εξερχόμενα απο τον φορτιστή, έχουν γνωστό αριθμό φορτίων. Άρα ο διαχωρισμός που συμβαίνει μέσα στην στήλη DMA, καταλήγει να είναι διαχωρισμός βάσει του μεγέθους των σωματιδίων. Στην συνέχεια, τα σωματίδια που εξέρχονται απο το DMA οδηγούνται στον οπτικό καταμετρητή, ο οποίος μετράει την συγκέντρωσή τους.

Ακολουθώντας της διαδρομή 2 (route 2), εκτελείται η συλλογή των σωματιδίων πάνω στα φίλτρα. Τα σωματίδια εν συνεχεία συλλέγονται στο φίλτρο που είναι τοποθετημένο περίπου 1 m κατάντη του φούρνου.



Κατά την αρχική ρύθμιση των συνθηκών λειτουργίας του φούρνου υπάρχουν δύο παράμετροι με τις οποίες μπορεί να ελεγχθεί το μέγεθος και η συγκέντρωση των παραγόμενων σωματιδίων. Αυτές οι δυο παράμετροι είναι η ταχύτητα ροής αέρος που διαρρέει το φούρνο και η θερμοκρασία. Όταν μεταβάλλεται κάποια από αυτές τις παραμέτρους, τότε μεταβάλλεται και η διαδικασία σύνθεσης νανοσωματιδίων. Τέτοια περίπτωση προκύπτει όταν τα νανοσωματίδια δεν οδηγούνται αμέσως στο φίλτρο, αλλά παραμένουν και συνυπάρχουν στο χώρο δημιουργίας τους. Αυτό συμβαίνει

όταν το ρεύμα αέρος είναι μικρό. Με αυτό τον τρόπο δεν απομακρύνει αμέσως μετά την σύνθεσή τους, τα νανοσωματίδια προς την έξοδο του φούρνου. Έτσι τα νανοσωματίδια αλληλοσυγκρούονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διάμετρός τους. Ένας άλλος τρόπος να αυξηθεί η διάμετρος των νανοσωματιδίων, είναι να αυξηθεί η θερμοκρασία του φούρνου κατά την οποία γίνεται η εξάχνωση. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία εξάχνωσης, τόσο αυξάνει η διάμετρος των νανοσωματιδίων που προκύπτουν.

Η ταχύτητα ροής του αέρα και η θερμοκρασία μπορούν επίσης να μεταβάλλουν τη σύνθεση των σωματιδίων, δεδομένου ότι μπορούν να ενισχύσουν την οξειδωση. Με τη μείωση του ρυθμού ροής και την αύξηση της θερμοκρασίας αυτό μπορεί να συμβεί και να παραχθεί αέριο οξυγόνο (το ερώτημα είναι ποια είναι τα ποσοστά συγκέντρωσης και οι θερμοκρασίες περίπου στις οποίες η οξειδωση γίνεται ασήμαντη). Όταν μειώνεται η ταχύτητα ροής του αέρα, τα νανοσωματίδια παραμένουν περισσότερο χρόνο στο σωλήνα εξάχνωσης. Το αποτέλεσμα είναι να έρχονται σε επαφή με το οξυγόνο της ατμόσφαιρας. Αυτό λειτουργεί σαν ένας τρόπος οξειδωσης των νανοσωματιδίων. Είναι εύκολο να διακρίνει κανείς αν είναι οξειδωμένα ή όχι, αν παρατηρήσει το χρώμα των παραγόμενων νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Τα καθαρά νανοσωματίδια αργύρου έχουν ένα ερυθρό-καφέ χρώμα, ενώ τα οξειδωμένα νανοσωματίδια αργύρου έχουν μαύρο χρώμα. Επομένως υπάρχει πιθανότητα και τα νανοσωματίδια που δημιουργούνται να εμφανίζουν διαφορετικές ιδιότητες κάτι το οποίο μπορεί να αποδειχθεί παρακάτω.

3.2. Προετοιμασία ανάπτυξης των κυτταρικών στελεχών

Κατά την πειραματική διαδικασία της παρούσης διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν στελέχη *Escherichia coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus*. Για να αναπτυχθούν τα στελέχη αυτά χρησιμοποιήθηκαν τα τρυβλία Mac Conkey (MCK) και Columbia ANC + 5% αίμα προβάτου (CNA) σε ζεύγη. Το πρώτο τρυβλίο ευνοεί την ανάπτυξη Gram θετικών κυττάρων, ενώ το δεύτερο την ανάπτυξη Gram αρνητικών κυττάρων. Σε διαφορετικά ζεύγη τρυβλίων έγινε επίστρωση μικροποσότητας φαρυγγικού υγρού, πτυέλων και ούρων. Με τη βοήθεια πλαστικού κρίκου μιας χρήσης λήφθηκε η απαιτούμενη μικροποσότητα από το αντίστοιχο δείγμα και απλώθηκε ομοιόμορφα στην επιφάνεια του τρυβλίου. Για την επίστρωση της καλλιέργειας ακολουθήθηκε η μέθοδος της τετραπλής αραιώσης. Στη συνέχεια οι

καλλιέργειες επώαστηκαν σε κλίβανο στους 37° C για 12 ώρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα τα κύτταρα βρίσκονται στη φάση της εκθετικής ανάπτυξης.

Στελέχη *Escherichia coli* αναπτύχθηκαν όταν από δείγμα ούρων έγινε καλλιέργεια σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ Mac Conkey (MCK). Στελέχη *Streptococcus* λήφθηκαν από καλλιέργεια φαρυγγικού ή πτυέλων που έγινε σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ Columbia ANC + 5% αίμα προβάτου (CNA). Τέλος τα στελέχη *Staphylococcus* απομονώθηκαν από καλλιέργεια πτυέλων ή ούρων σε τρυβλίο με θρεπτικό άγαρ Mac Conkey (MCK).

3.3. Έλεγχος της επίδρασης των νανοσωματιδίων αργύρου στα κύτταρα

Από κάθε καλλιέργεια δειγμάτων λαμβάνεται αντίστοιχα μια καθαρή, απομονωμένη αποικία κυττάρων μεσαίου μεγέθους με βαμβακοφόρο στυλεό. Ακολούθως διαλύεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει θρεπτικό υγρό TSB-F. Μετριέται έπειτα η θολρότητα του διαλύματος που προκύπτει. Επιθυμητό αποτέλεσμα είναι η θολρότητα να είναι ίση με 0,5 της κλίμακας Mac Farhland, για να δημιουργηθούν ευκρινείς ζώνες αναστολής μετά την επώαση της καλλιέργειας. Με το βαμβακοφόρο στυλεό που έχει εμποτιστεί από το διάλυμα TSB-F – κυττάρων, γίνεται επίστρωση νέας καλλιέργειας σε τρυβλίο Mueller-Hinton (MH2) ή Mac Conkey (MCK).

Ακολούθως, από τα φίλτρα που περιέχουν τα νανοσωματίδια αργύρου, κόβουμε μικρά σφαιρικά κομμάτια διαμέτρου 0,5 cm με διακορευτή. Αυτά τοποθετούνται με αποστειρωμένη λαβίδα πάνω στην επιφάνεια του τρυβλίου. Η επιφάνεια του φίλτρου στην οποία είναι προσκολλημένα τα νανοσωματίδια, τοποθετείται προς τα κάτω. Με αυτό τον τρόπο τα νανοσωματίδια έρχονται σε επαφή με το θρεπτικό υγρό και θα διαχυθούν σε αυτό μέσω της υγρασίας. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, το τρυβλίο επωάζεται στον κλίβανο στους 37 °C για 12 ώρες. Έπειτα αφαιρείται από τον κλίβανο επώασης και γίνεται έλεγχος για την ύπαρξη ζώνης αναστολής σύμφωνα και με τη μέθοδο Kirby-Bauer. Αν υπάρχουν ζώνες αναστολής, τότε με τη βοήθεια ενός υποδεκάμετρου μετριέται το μήκος της ακτίνας και η διάμετρος της ζώνης αναστολής για κάθε δίσκο νανοσωματιδίων. Στη συνέχεια τοποθετείται ξανά στο κλίβανο και επωάζεται στις ίδιες συνθήκες στους 37 °C για άλλες 12 ώρες. Έπειτα επαναλαμβάνεται η μέτρηση του μήκους της ζώνης αναστολής. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για μια τελευταία φορά (επώαση

στο κλίβανο και μέτρηση του μήκους ζώνης αναστολής). Η μέτρηση αυτή αντιστοιχεί σε 48 ώρες επώασης των κυττάρων των μικροοργανισμών.

4. Αποτελέσματα

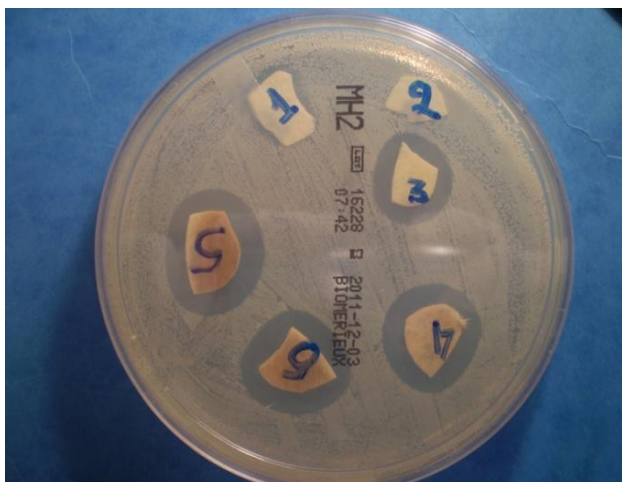
Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας μετρήθηκε η διάμετρος της ζώνης αναστολής που δημιουργείται από τη διάχυση των νανοσωματιδίων στο θρεπτικό υλικό του τρυβλίου. Όταν η επιφάνεια του φίλτρου με τα νανοσωματίδια έρθει σε επαφή με την επιφάνεια του θρεπτικού υλικού του τρυβλίου, το φίλτρο προσροφά νερό που περιέχεται στο θρεπτικό υλικό. Μέσω του νερού τα νανοσωματίδια διαχέονται στον περιβάλλοντα χώρο. Η διάχυση αυτή πραγματοποιείται λόγω της κίνησης των νανοσωματιδίων ή των ιόντων που σχηματίζονται από τα νανοσωματίδια μέσω της διάστασης από την περιοχή μεγαλύτερης πυκνότητας (φίλτρο) στη περιοχή μικρότερης (περιβάλλον θρεπτικό υλικό). Όσο μικρότερο μέγεθος έχει το σωματίδιο (ή το ιόν), τόσο πιο εύκολα διαχέεται στο θρεπτικό άγαρ. Μετά τη διάχυσή τους, διασκορπίζονται στο θρεπτικό υλικό και σταδιακά απορροφούνται από τα βακτηριακά κύτταρα καθώς αυτά αναπτύσσονται. Όταν τα νανοσωματίδια απορροφηθούν από τα βακτήρια και εισέλθουν στο εσωτερικό του κυττάρου, επηρεάζουν τις ζωτικές λειτουργίες του προκαλώντας τη λύση του. Με αυτό τον τρόπο νεκρώνονται τα κύτταρα γύρω από τα φίλτρα και δημιουργείται η ζώνη αναστολής.

Η ζώνη αναστολής σχηματίζεται όταν η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων πάνω στα φίλτρα είναι ίση ή μεγαλύτερη από την ελάχιστη ανασταλτική πυκνότητα των νανοσωματιδίων για τα κύτταρα, η οποία επιδρά σε τμήμα του βακτηριακού πληθυσμού και επιτυγχάνεται η αναστολή της ανάπτυξης του. Το μήκος της ζώνης αναστολής, δηλώνει το βαθμό τοξικότητας των νανοσωματιδίων στα κύτταρα σύμφωνα με τη μέθοδο Kirby – Bauer. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται συνήθως για την εκτίμηση της δράσης των αντιβιοτικών μέσω των ζωνών αναστολής που σχηματίζουν. Όσο μεγαλύτερη είναι η ακτίνα της ζώνης αναστολής που δημιουργείται από τη διάχυση του αντιβιοτικού, τόσο ισχυρότερη και η δράση του στα κύτταρα. Αντίστοιχα, ισχύει και για τη δράση των φίλτρων με τα νανοσωματίδια. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων, αυξάνεται και η απόσταση από το φίλτρο στην οποία παρατηρείται κανονική αύξηση των βακτηρίων (στα αντιβιοτικά η μείωση αυτή είναι λογαριθμική). Για τις μετρήσεις με τα νανοσωματίδια, μια ακόμα παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η διάμετρος των νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται. Η μελέτη αυτής της

παραμέτρου θα αποδείξει το βαθμό επιρροής του μεγέθους των νανοσωματιδίων στην κυτταρική πρόσληψη τους.

Αξίζει ακόμη να σημειωθεί ότι ταυτόχρονα με τη διάχυση των νανοσωματιδίων, τα βακτήρια που έχουν τοποθετηθεί στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού αρχίζουν να πολλαπλασιάζονται. Για τις ζώνες αναστολής των αντιβιοτικών υπάρχουν διεθνείς ερμηνευτικοί πίνακες από το CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), σύμφωνα με τους οποίους ένας μικροοργανισμός μπορεί να χαρακτηριστεί ως ευαίσθητος, μετρίως ευαίσθητος ή ανθεκτικός. Ο χαρακτηρισμός αυτός προκύπτει από τη σύγκριση των διαμέτρων των ζωνών αναστολής με εκείνες που προτείνει το CLSI για κάθε αντιβιοτικό ανάλογα και με το είδος του βακτηρίου. Παρόλο που δεν υπάρχουν αντίστοιχοι πρότυποι πίνακες για τα νανοσωματίδια, μια πιθανή λύση θα ήταν να δανειστεί η κατηγοριοποίηση του CLSI. Το ερώτημα επομένως που τίθεται θα ήταν: οι ζώνες αναστολής που προκύπτουν λόγω της διάχυσης των νανοσωματιδίων είναι αντίστοιχες με εκείνες των αντιβιοτικών; Οι τιμές των μετρήσεων στο CLSI ταυτίζονται με τις παρούσες μετρήσεις, δηλαδή το λόγο D zone / D filter που υπολογίστηκε με τη βοήθεια υποδεκάμετρου. Βάσει αυτών θα γίνει προσπάθεια να εκτιμηθεί η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση των νανοσωματιδίων για την ανάπτυξη των βακτηρίων.

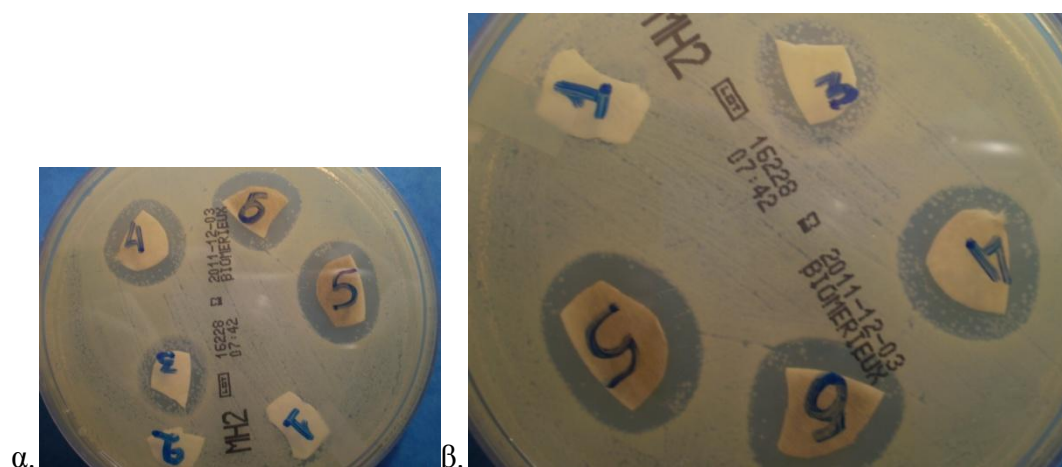
Στο πρώτο στάδιο της πειραματικής διαδικασίας έγιναν πειράματα για να ελεγχθεί αν τα νανοσωματίδια επιδρούν στην ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα των κυτταρικών στελεχών *E. coli*. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικά τρυβλία, το Mueller-Hinton (MH2) και το σοκολατόχρωμο άγαρ + PolyVitex (PVX). Τελικά παρατηρήθηκε ότι το πρώτο τρυβλίο (MH2) ευνοεί τη διάχυση των νανοσωματιδίων ενώ το δεύτερο (PVX) όχι.



Εικ. 1. Καλλιέργεια των κυττάρων *E. coli* σε τρυβλίο Mueller-Hinton (MH2) 12 ώρες μετά την επώαση. Στην καλλιέργεια φαίνεται η επίδραση τμημάτων των φίλτρων με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων.

4.1 Αρχικά Αποτελέσματα

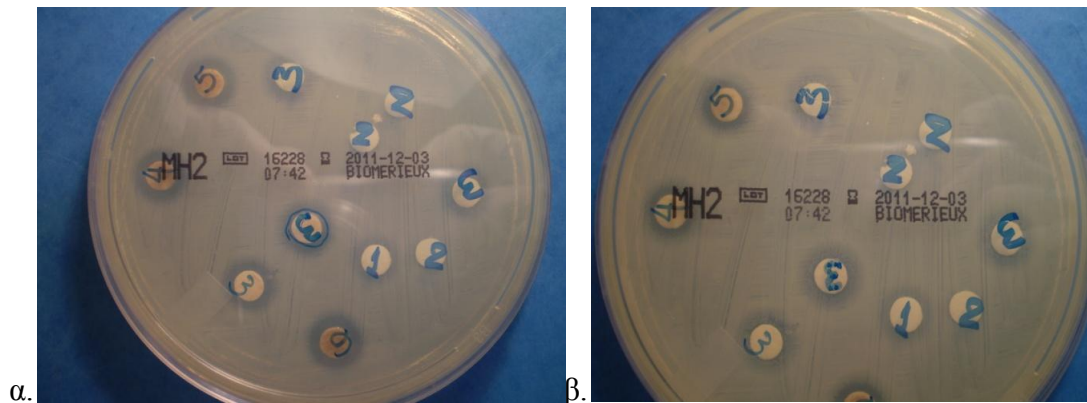
Στο τρυβλίο που φαίνεται στην Εικόνα 1. χρησιμοποιήθηκαν έξι φίλτρα διαφορετικής συγκέντρωσης και διαμέτρου των νανοσωματιδίων. Τα τέσσερα πρώτα (1, 2, 3, 4) περιέχουν νανοσωματίδια που έχουν διάμετρο 22 nm και σχηματίστηκαν σε θερμοκρασία 1100° C, ενώ το πέμπτο και το έκτο (5, 6) παρασκευάστηκαν στους 1200° C και τα νανοσωματίδια τους έχουν διάμετρο 50 nm. Το πρώτο (1) φίλτρο έχει συγκέντρωση $0,34 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το δεύτερο $0,67 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το τρίτο $1,3 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το τέταρτο $2,7 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το πέμπτο $4,0 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m² και το έκτο $6,0 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m². Επομένως από την παραπάνω εικόνα φαίνεται ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο, τόσο περισσότερο αυξάνεται και η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων της καλλιέργειας. Στη συνέχεια η καλλιέργεια επώαστηκε ξανά για χρονικό διάστημα 48 ωρών. Κάθε 12 ώρες γινόταν μέτρηση του μήκους των ζωνών αναστολής. Από τις 24 ώρες και μετά παρατηρήθηκε ότι κάποια βακτηριακά στελέχη είχαν εισέλθει στη ζώνη αναστολής (σχήμα 2. α, β). Αυτό αποδεικνύει ότι τα συγκεκριμένα βακτήρια εμφανίζουν ανθεκτικότητα στα νανοσωματίδια. Όσο περισσότερα αναπτύσσονται στη ζώνη αναστολής, τόσο μεγαλύτερη είναι η ανθεκτικότητά τους.



Εικ. 2. α και β. Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* σε τρυβλίο Mueller-Hinton (MH2) 24 ώρες μετά την επώαση. Ορισμένα κύτταρα έχουν εισέλθει στις ζώνες αναστολής που δημιουργήθηκαν από τα φίλτρα με τα νανοσωματίδια.

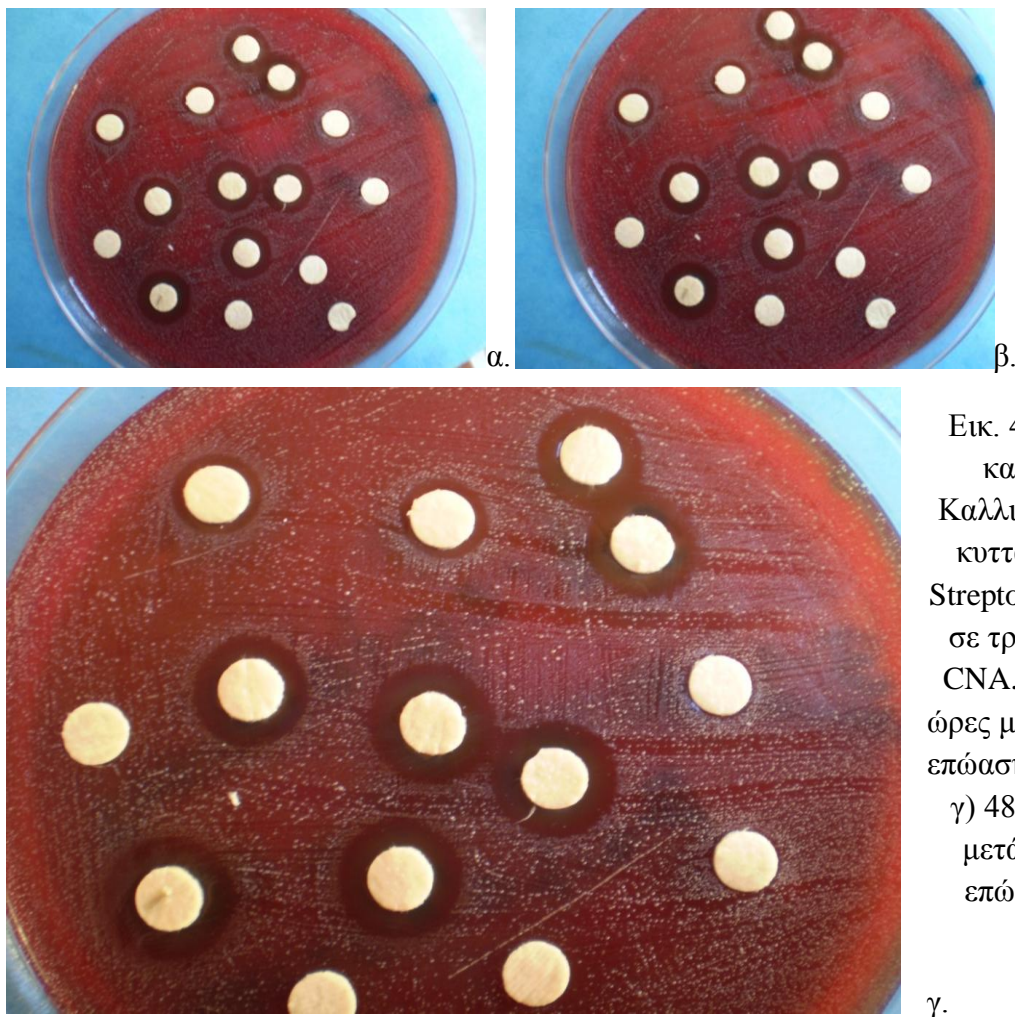
Στη συνέχεια η πειραματική διαδικασία σταθεροποιήθηκε. Τα φίλτρα των νανοσωματιδίων κόπηκαν σε μικρούς δίσκους, διαμέτρου 0,5 cm οι οποίοι τοποθετούνταν στα τρυβλία σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία που

αναφέρθηκε παραπάνω. Ακολούθησε επώαση των καλλιιεργειών και μέτρηση των ζωνών αναστολής στο βακτηριακό στέλεχος *E. coli*.



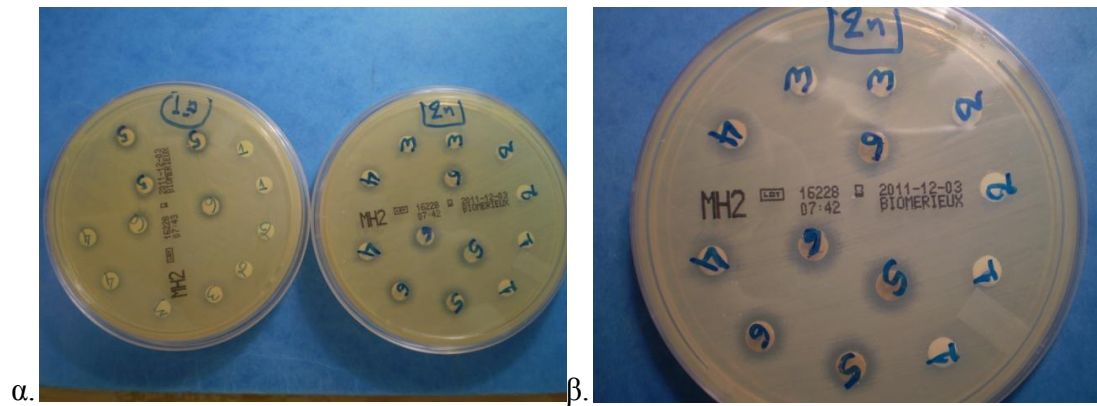
Εικ. 3. α και β. Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* σε τρυβλίο Mueller-Hinton (MH2). α) 12 ώρες μετά την επώαση. β) 48 ώρες μετά την επώαση.

Η ίδια πειραματική διαδικασία επαναλήφθηκε για τα στελέχη *Streptococcus* και *Staphylococcus*.



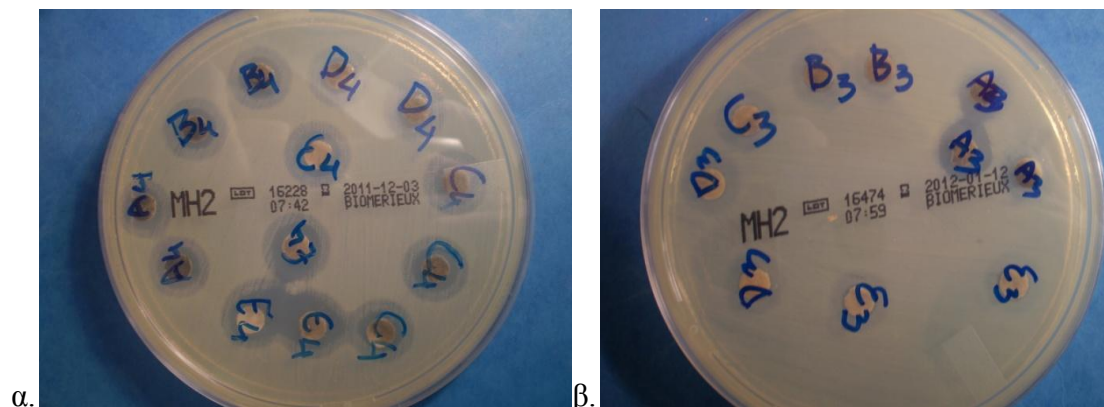
Εικ. 4. α, β και γ. Καλλιέργεια κυττάρων *Streptococcus* σε τρυβλίο CNA. α) 12 ώρες μετά την επώαση, β και γ) 48 ώρες μετά την επώαση.

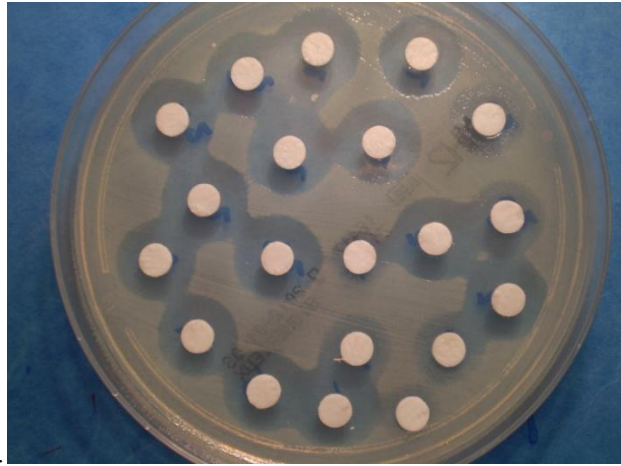
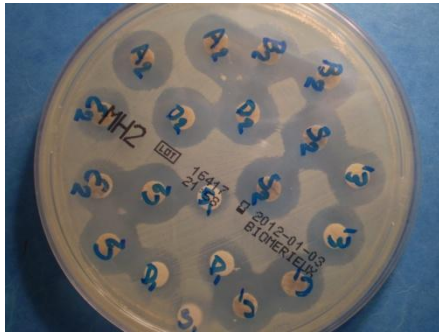
γ.



Εικ. 5. α και β. Καλλιέργεια κυττάρων *Staphylococcus* σε τρυβλίο MH2.

Σύμφωνα με την ίδια πειραματική διαδικασία, πραγματοποιήθηκαν στα ίδια είδη βακτηρίων, νέες δοκιμές με περισσότερα φίλτρα νανοσωματιδίων με νέα, διαφορετικά χαρακτηριστικά για αναλυτικότερα και πληρέστερα αποτελέσματα. Τα φίλτρα αυτά ήταν συνδυασμοί διαφορετικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων και νανοσωματίδια διαφορετικής διαμέτρου. Η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα έχει ως εξής: (A) φίλτρο έχει συγκέντρωση $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 , το (B) φίλτρο $1,12 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 , το (C) φίλτρο $1,5 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 , το (D) φίλτρο $3,0 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 και το (E) φίλτρο $6,0 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 . Τα νανοσωματίδια έχουν διάμετρο 15 nm, 22 nm, 30 nm και 50 nm.

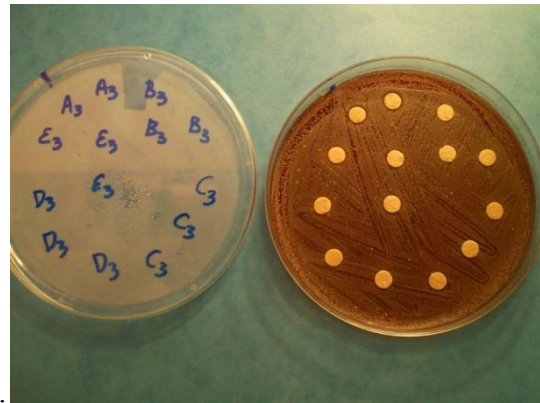
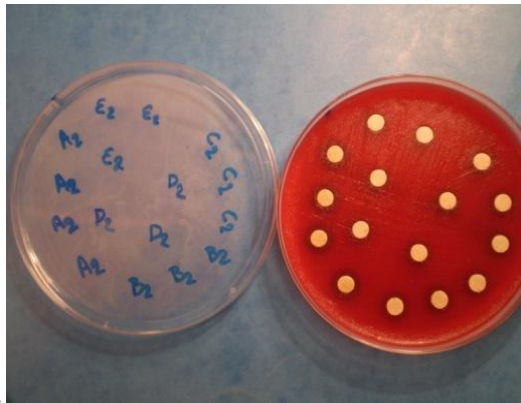




γ.

δ.

Εικ. 5. α, β, γ, και δ. Καλλιέργεια κυττάρων *E. coli* σε τρυβλίο Mueller-Hinton (MH2). Σε κάθε τρυβλίο τοποθετούνται φίλτρα διαφορετικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων με καθορισμένη διάμετρο μεταξύ των τιμών 15 nm, 22 nm, 30 nm και 50 nm.



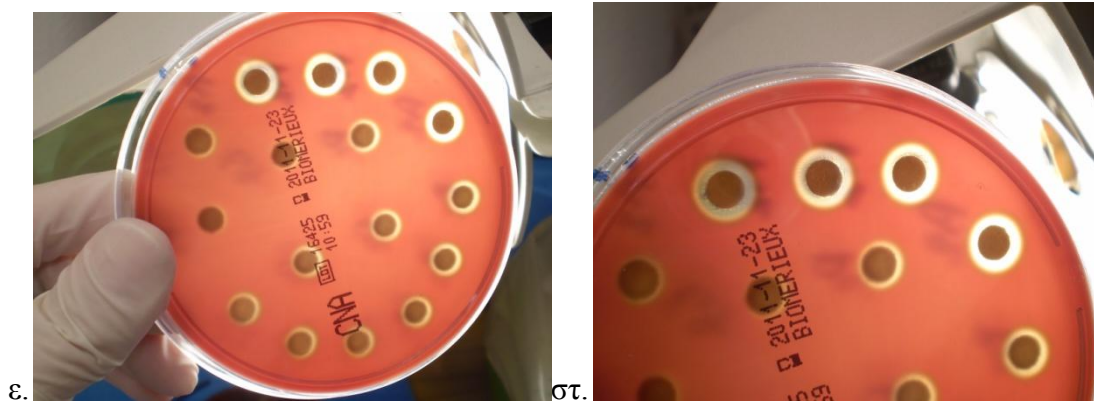
α.

β.

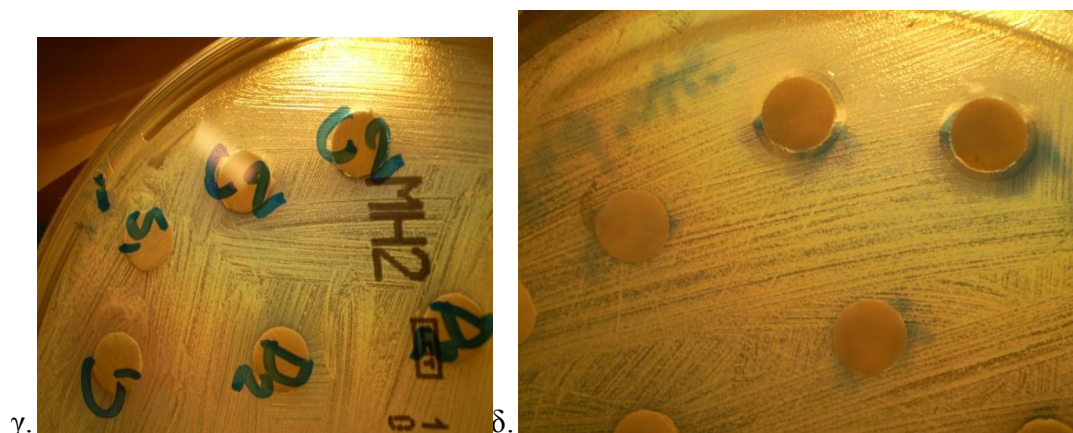
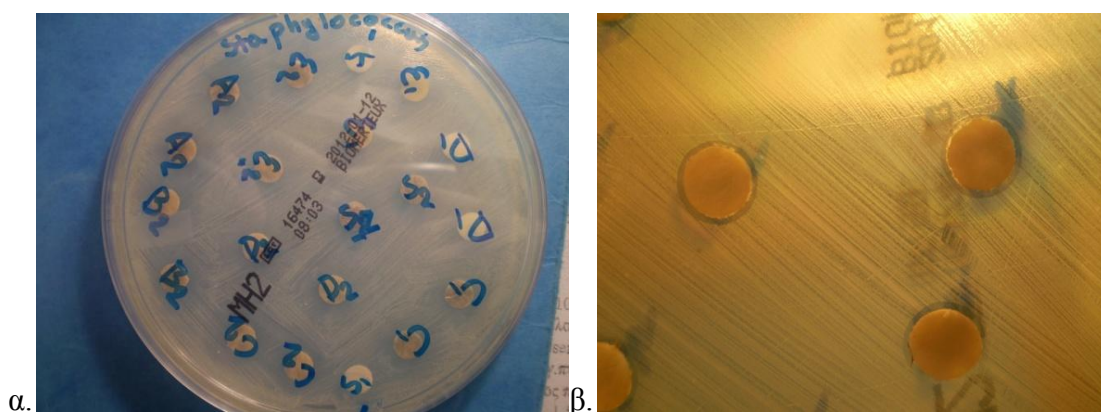


γ.

δ.



Εικ. 6 α, β, γ, δ, ε και στ. Καλλιέργεια κυττάρων *Streptococcus* με νανοσωματίδια διαφορετικής διαμέτρου προσκολλημένα σε φίλτρα διαφορετικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων σε τρυβλίο CNA. α και γ) 12 ώρες μετά την επώαση, β, δ, ε και στ) 48 ώρες μετά την επώαση.



Εικ. 7 α, β, γ και δ. Καλλιέργεια κυττάρων *Staphylococcus* με νανοσωματίδια διαφορετικής διαμέτρου προσκολλημένα σε φίλτρα διαφορετικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων σε τρυβλίο MH2. α και β) 12 ώρες μετά την επώαση, γ και δ) 48 ώρες μετά την επώαση.

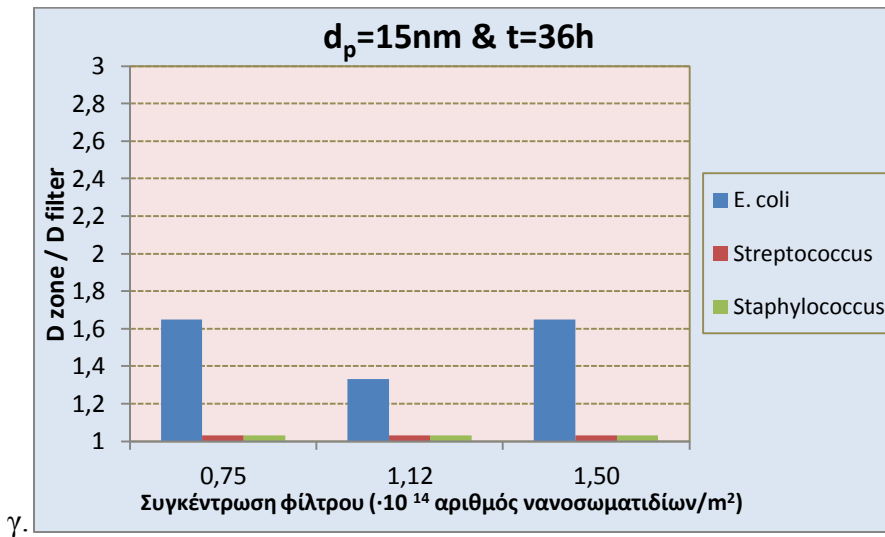
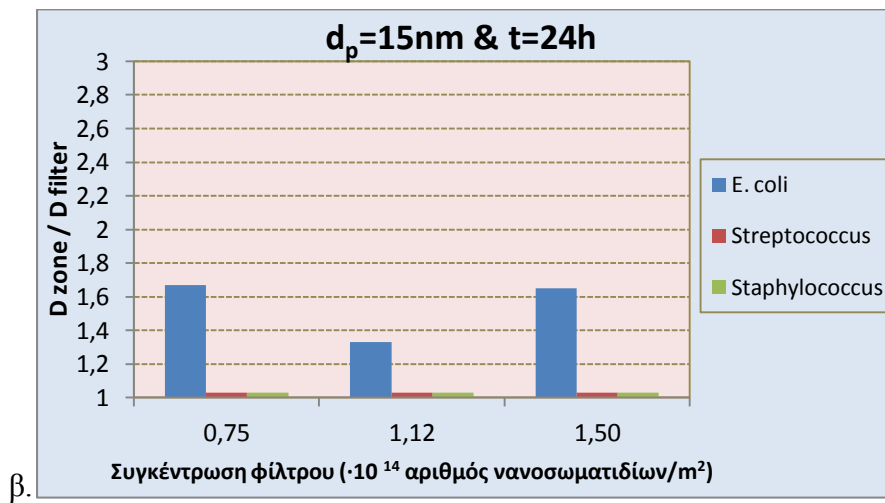
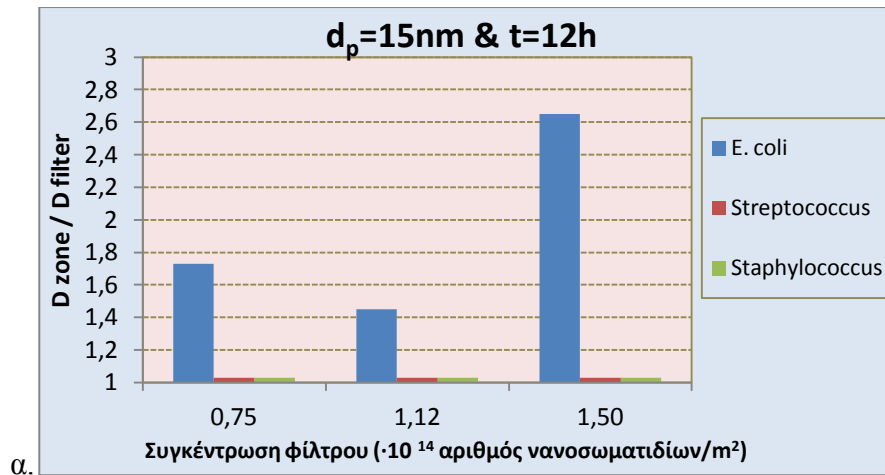
Σε κάθε τρυβλίο καλλιέργειας των κυττάρων μετρήθηκε με υποδεκάμετρο η ακτίνα και η διάμετρος όλων των ζωνών αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων.

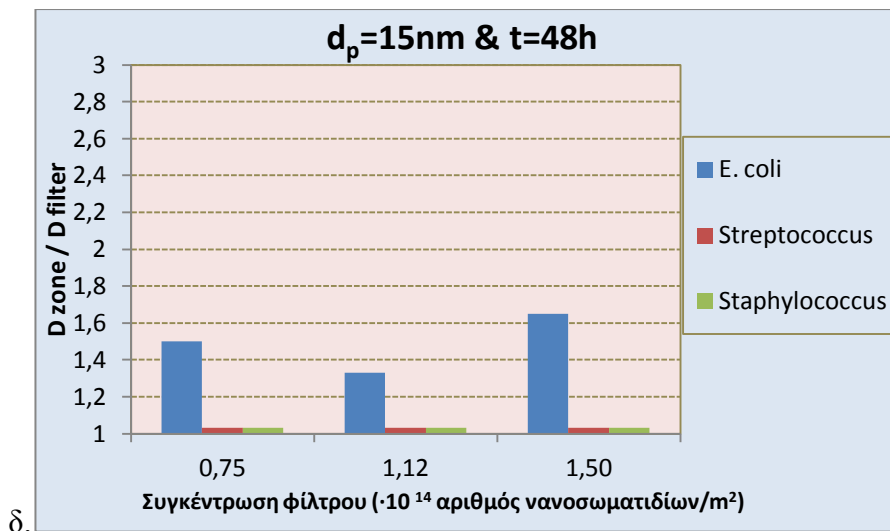
Οι μετρήσεις αυτές τοποθετούνται σε πίνακες και βάσει αυτών προκύπτουν τα παρακάτω διαγράμματα. Σε όλα τα διαγράμματα παρουσιάζεται η μεταβολή της τοξικότητας των διαφορετικών νανοσωματιδίων στα βακτήρια σε συνάρτηση με μια παράμετρο κάθε φορά (συγκέντρωση νανοσωματιδίων στο φίλτρο, διάμετρος νανοσωματιδίων).

4.2 Ζώνες Αναστολής και Κυτταροτοξικότητα

4.2.1 Κυτταροτοξικότητα και Συγκέντρωση νανοσωματιδίων στα Φίλτρα

Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζονται οι τιμές του λόγου της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *E. coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus* προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Τα τέσσερα διαγράμματα (α, β, γ και δ) αντιστοιχούν σε χρονικές στιγμές $t_{\text{c}} = 12, 24, 36$ και 48 ώρες. Η μέση διάμετρος των νανοσωματιδίων, d_p , σε όλα τα φίλτρα είναι ίση με 15 nm. Ενδιαφέρον έχει ότι μόνο το *E. coli* εμφάνισε ζώνες αναστολής στα συγκεκριμένα νανοσωματίδια, ενώ το *Streptococcus* και το *Staphylococcus* αναπτύχθηκαν φυσιολογικά. Αυτό αποδεικνύει ότι το *E. coli* είναι ευαίσθητο σε αυτά τα νανοσωματίδια, σε αντίθεση με τα άλλα δυο βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα. Αξίζει να σημειωθεί ότι στις 12 ώρες οι ζώνες αναστολής έχουν τη μέγιστη διάμετρο. Στις 24 ώρες η διάμετρος τους μειώνεται σημαντικά ($\approx 50\%$ στις δύο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων στα φίλτρα) και από αυτή τη χρονική στιγμή μέχρι τέλους η μεταβολή της είναι αμελητέα. Μικρότερη ζώνη αναστολής δημιουργείται γύρω από το φίλτρο συγκέντρωσης $1,12 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 και ενδιάμεση ζώνη από το φίλτρο συγκέντρωσης $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 .

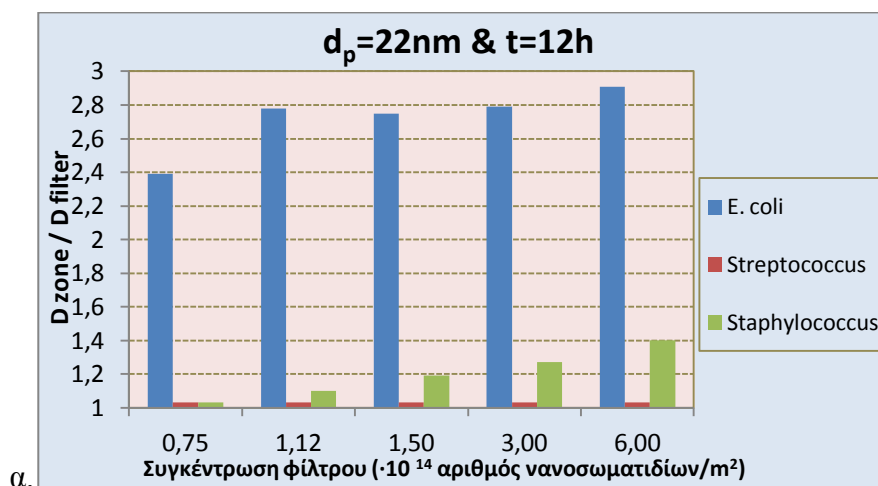


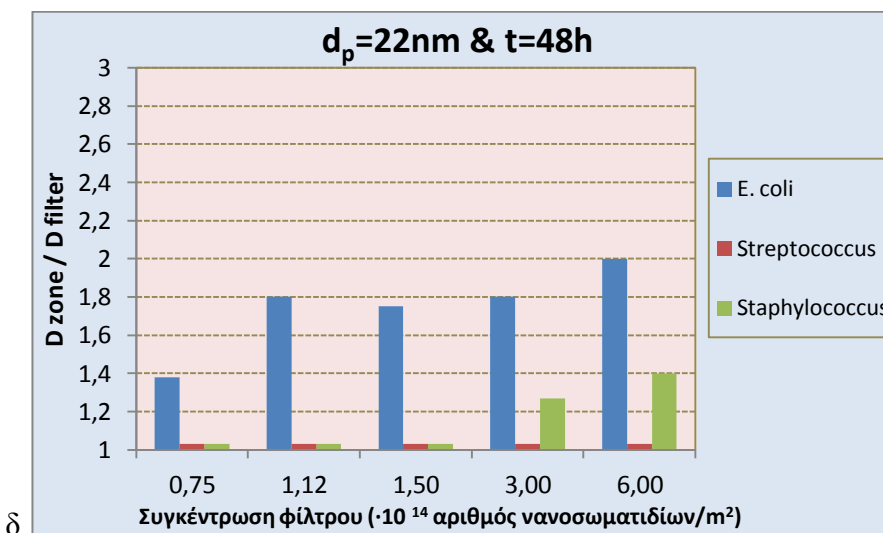
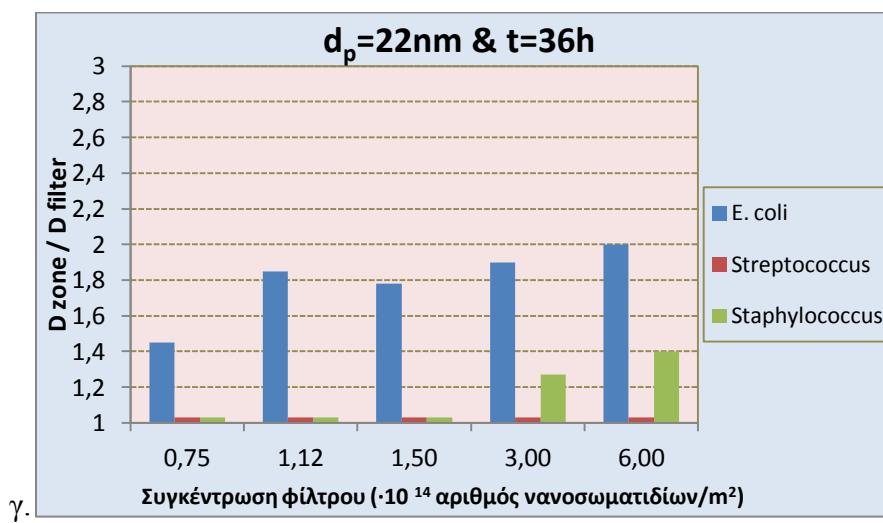
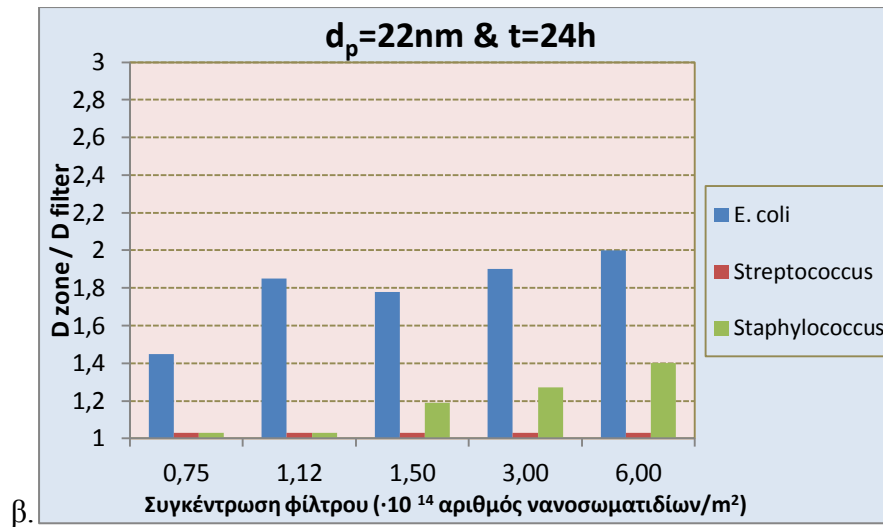


Σχήμα 1. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. Coli (μπλε μπάρες), Streptococcus (κόκκινες μπάρες) και Staphylococcus (πράσινες μπάρες) προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα, όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι $d_p = 15 \text{ nm}$. Μέτρηση λαμβάνεται ανά 12 ώρες. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε χρόνο 12ωρών, το β. σε χρόνο 24 ωρών, το γ. σε χρόνο 36 ωρών και το δ. σε χρόνο 48 ωρών.

Στο σχήμα 2 παρουσιάζονται οι μετρήσεις του λόγου της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. coli, Streptococcus και Staphylococcus προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων στα φίλτρα είναι ίση με 22 nm, ενώ ο χρόνος μεταβάλλεται αντίστοιχα από 12 έως 48 ώρες. Παρατηρείται ότι το E. coli εμφάνισε ζώνες αναστολής στα συγκεκριμένα νανοσωματίδια από την αρχή των μετρήσεων. Οι ζώνες αυτές μειώθηκαν σε μεγάλο ποσοστό ($\approx 50\%$) στις 24 ώρες. Από αυτή τη χρονική στιγμή και μετά η διάμετρος τους παρέμεινε σχεδόν σταθερή. Στο Staphylococcus σε χρόνο 12 ωρών σχηματίστηκαν ζώνες αναστολής σε όλες τις συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων στα φίλτρα εκτός από τη μικρότερη που υπήρχε ($0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2). Με την πάροδο του χρόνου η ζώνη αναστολής στα φίλτρα μικρότερης συγκέντρωσης μειώθηκε και σταδιακά εξουδετερώθηκε. Έτσι στις 36 και 48 ώρες υπήρχαν ζώνες αναστολής μόνο γύρω από τα φίλτρα των δυο μεγαλύτερων συγκεντρώσεων. Η διάμετρος των ζωνών αυτών παρέμεινε σταθερή. Τέλος το Streptococcus δεν εμφάνισε ζώνες αναστολής γύρω από τα φίλτρα,

αποδεικνύοντας ότι είναι ανθεκτικό στα νανοσωματίδια διαμέτρου 22nm ανεξάρτητα της συγκέντρωσής τους στα φίλτρα. Συμπερασματικά, φαίνεται ότι το E. coli είναι περισσότερο ευαίσθητο στα νανοσωματίδια από τα άλλα δυο βακτήρια. Μετρίως ευαίσθητο είναι το Staphylococcus και ανθεκτικό είναι το Streptococcus. Γενικότερα μεγαλύτερη ζώνη αναστολής εμφάνισε το E. coli στο φίλτρο μεγαλύτερης συγκέντρωσης νανοσωματιδίων σε χρόνο $t = 12$ ώρες. Το ίδιο βακτήριο εμφανίζει μικρότερες ζώνες αναστολής για τα φίλτρα μικρότερης συγκέντρωσης (εξαιρέση αποτελεί το φίλτρο συγκέντρωσης $1,50 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m² στο οποίο σχηματίζεται ελαφρώς μικρότερη ζώνη αναστολής από το φίλτρο μικρότερης συγκέντρωσης). Προκύπτει συνεπώς το συμπέρασμα ότι για το E. coli και το Staphylococcus η διάμετρος της ζώνης αναστολής τους αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα τόσο σε χρόνο 12 ωρών όσο και στη συνέχεια. Ωστόσο η σχέση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής στο E. coli με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα δεν είναι ανάλογη. Στις 12 ώρες όλες οι ζώνες έχουν τη μέγιστη τιμή της διαμέτρου τους. Από αυτή τη χρονική στιγμή και μετά η διάμετρος των ζωνών αναστολής μειώνονται. Μικρότερη ζώνη αναστολής δημιουργείται από το φίλτρο μικρότερης συγκέντρωσης $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m² στο E. coli και από το φίλτρο συγκέντρωσης $1,12 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m² στο Staphylococcus.

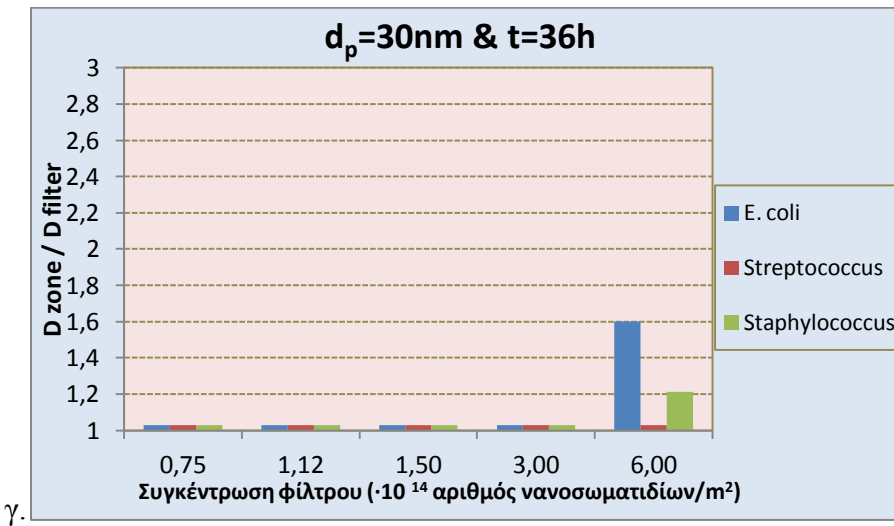
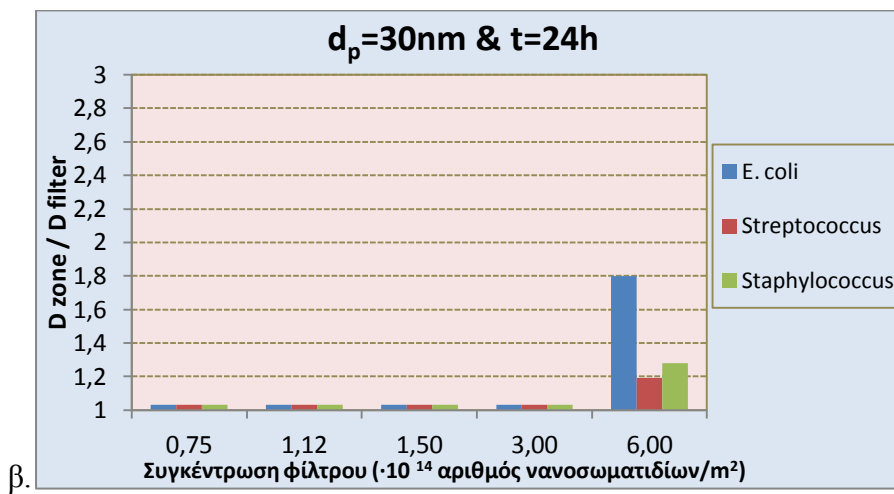
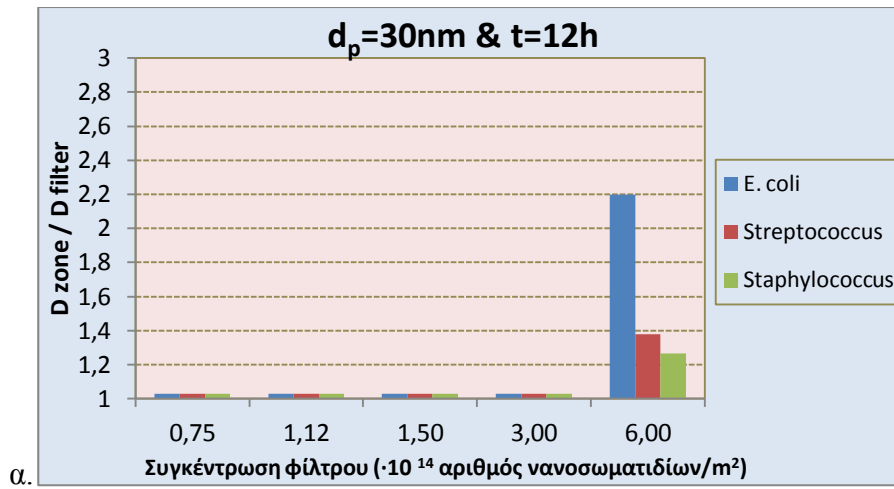


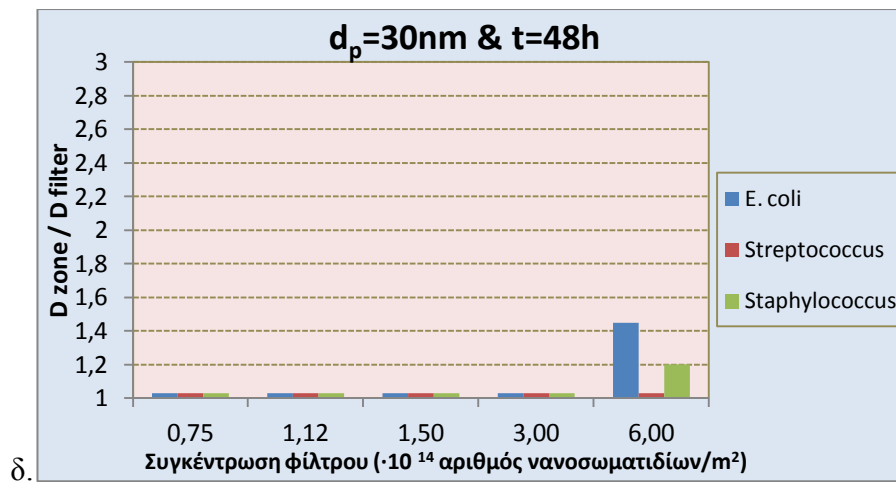


Σχήμα 2. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. Coli (μπλε μπάρες), Streptococcus (κόκκινες μπάρες) και Staphylococcus (πράσινες μπάρες) προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα,

όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι $d_p = 22$ nm. Μέτρηση λαμβάνεται ανά 12 ώρες. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε χρόνο 12ώρες, το β. στις 24 ώρες, το γ. στις 36 ώρες και το δ. στις 48 ώρες.

Στο σχήμα 3 παρουσιάζονται ο τρόπος μεταβολής του λόγου της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *E. coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus* προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων αναφορικά με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Σ' όλα τα διαγράμματα η διάμετρος των νανοσωματιδίων στα φίλτρα είναι 30 nm, ενώ ο χρόνος μεταβάλλεται αντίστοιχα ως εξής $t = 12, 24, 36$ και 48 ώρες. Παρατηρείται ότι μόνο η μεγαλύτερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων στο φίλτρο προκαλεί το σχηματισμό ζώνης αναστολής για τους τρεις μικροοργανισμούς. Το *E. coli* εμφάνισε ζώνη αναστολής μεγαλύτερης διαμέτρου από τα άλλα δύο βακτήρια. Μεσαίας διαμέτρου ζώνη αναστολής σχημάτισε το *Streptococcus* και μικρότερης το *Staphylococcus*. Η διάμετρος της ζώνης αναστολής του *E. coli* μειώνεται κατά 20% κάθε 12 ώρες, ενώ εκείνη του *Staphylococcus* δε παρουσιάζει μεγάλες μεταβολές. Το βακτήριο *Streptococcus* σχηματίζει ζώνη αναστολής στις 12 ώρες η οποία μειώνεται στις 24 ώρες και εξουδετερώνεται στις 36 και 48 ώρες. Από τα παραπάνω είναι φανερό ότι τα νανοσωματίδια διαμέτρου 30 nm είναι τοξικά για τα τρία βακτήρια μόνο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του φίλτρου. Σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων στα φίλτρα τα τρία κυτταρικά στελέχη αποδεικνύονται ανθεκτικά, εφόσον δε σχηματίζονται ζώνες αναστολής. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι και στην περίπτωση αυτών των φίλτρων το *E. coli* παρουσιάζεται περισσότερο ευαίσθητο των άλλων δύο, εφόσον σχηματίζει τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής στη μέγιστη συγκέντρωση νανοσωματιδίων στο φίλτρο.

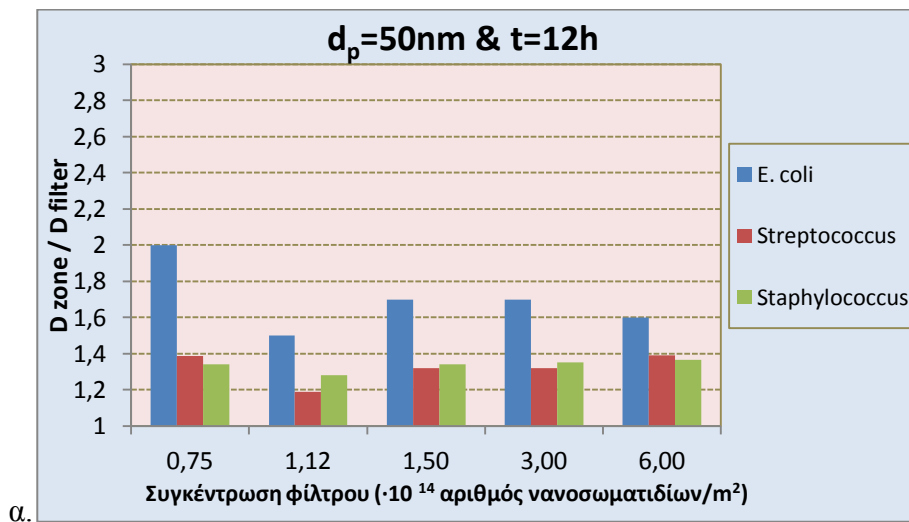


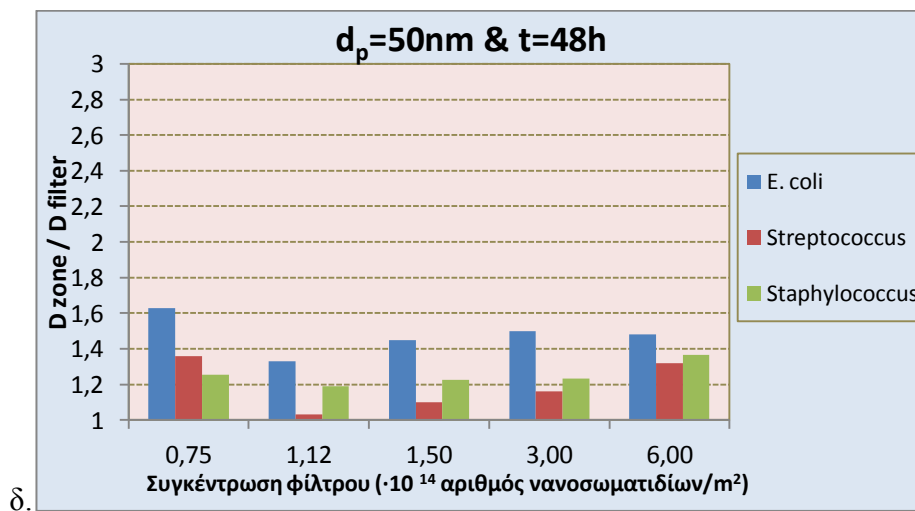
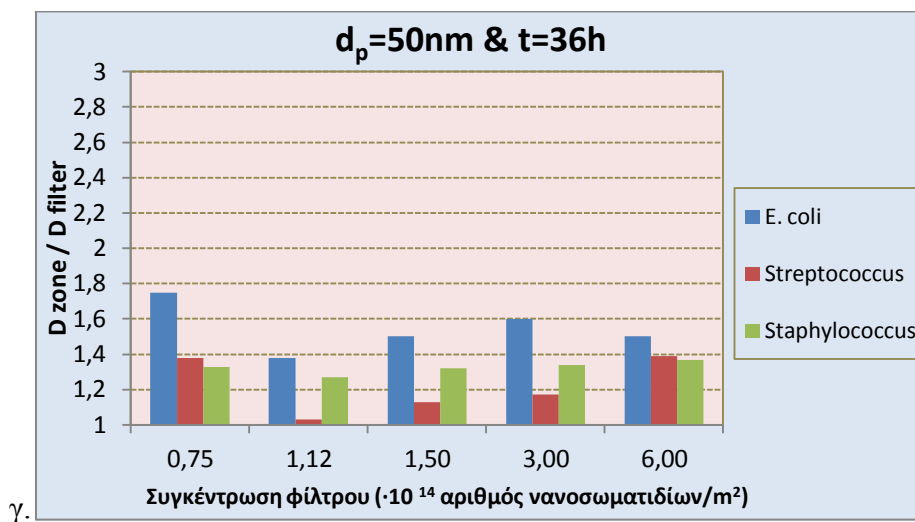
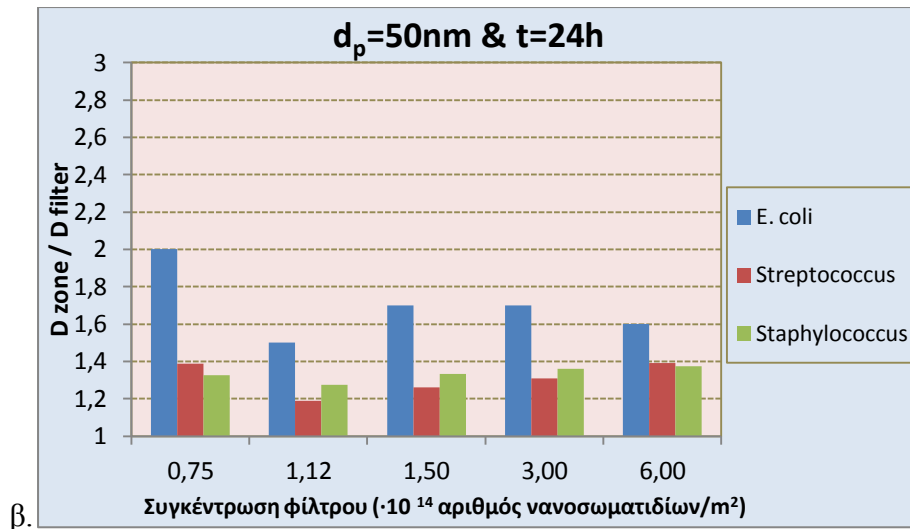


Σχήμα 3. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. Coli (μπλε μπάρες), Streptococcus (κόκκινες μπάρες) και Staphylococcus (πράσινες μπάρες) προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα, όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι $d_p = 30$ nm. Μέτρηση λαμβάνεται ανά 12 ώρες. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε χρόνο 12ώρες, το β. στις 24 ώρες, το γ. στις 36 ώρες και το δ. στις 48 ώρες.

Τα τέσσερα διαγράμματα στο σχήμα 4 παρουσιάζουν τις μεταβολές του λόγου της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. coli, Streptococcus και Staphylococcus προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων με $d_p = 50$ nm σε σχέση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Από τα διαγράμματα αυτά παρατηρείται ότι όλοι οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν ζώνες αναστολής σε κάθε φίλτρο διαφορετικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων. Μεγαλύτερη διάμετρο έχουν οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου E. coli. Αυτό αναδεικνύει πάλι το βακτήριο αυτό σαν πιο ευαίσθητο σε σύγκριση με τα άλλα. Είναι αξιοσημείωτο ότι η μεταβολή της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων διαμέτρου 50 nm στα φίλτρα επηρεάζει σε μικρό βαθμό και δυσανάλογα τις ζώνες αναστολής των τριών βακτηρίων. Μεγαλύτερη ζώνη αναστολής σχηματίζουν τα βακτηριακά στελέχη E. coli σε συγκέντρωση φίλτρου $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m². Στις τρεις ακόλουθες, μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, οι ζώνες αναστολής αν και είναι μικρότερης διαμέτρου, αυξάνονται αναλογικά με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Ωστόσο, στη μέγιστη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο, η ζώνη αναστολής που σχηματίζεται έχει μικρότερη

διάμετρο συγκριτικά των δυο προηγούμενων. Βάσει αυτών προκύπτει ότι τα τρία βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα σε φίλτρα συγκέντρωσης $1,12 \cdot 10^{14}$ και $6 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 και περισσότερο ευαίσθητα στα φίλτρα μικρότερης συγκέντρωσης ($0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2), όταν η διαμετρος των νανοσωματιδίων είναι 50 nm. Παρατηρείται ακόμη ότι η διάμετρος της ζώνης αναστολής που σχηματίζεται σε κάθε φίλτρο δεν μεταβάλλεται στις 24 ώρες, αλλά αρχίζει να μειώνεται σταδιακά στο χρονικό διάστημα των 36 και 48 ωρών. Μεγαλύτερη μείωση πραγματοποιείται στη ζώνη αναστολής των E. coli και Streptococcus, σε αντίθεση με τις ζώνες αναστολής του Staphylococcus που παραμένουν αμετάβλητες. Ειδικότερα για το Streptococcus η ζώνη αναστολής του χάνεται από τις 36 ώρες και μετά, όταν το φίλτρο έχει συγκέντρωση $1,12 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 . Αυτό δείχνει ότι το βακτήριο αυτό είναι ανθεκτικό στη συγκέντρωση αυτή σε χρόνο 36 ωρών και έπειτα. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι γενικότερα τα βακτήρια διατηρούν, σε μικρό βέβαια βαθμό, την ευαισθησία τους στα φίλτρα των νανοσωματιδίων μέχρι το τέλος των μετρήσεων.





Σχήμα 4. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. Coli (μπλε μπάρες), Streptococcus (κόκκινες μπάρες) και Staphylococcus (πράσινες μπάρες) προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα, όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι $d_p = 50 \text{ nm}$. Μέτρηση λαμβάνεται ανά

12 ώρες. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε χρόνο 12ώρες, το β. στις 24 ώρες, το γ. στις 36 ώρες και το δ. στις 48 ώρες.

4.2.2 Κυτταροτοξικότητα και Μέγεθος Σωματιδίων

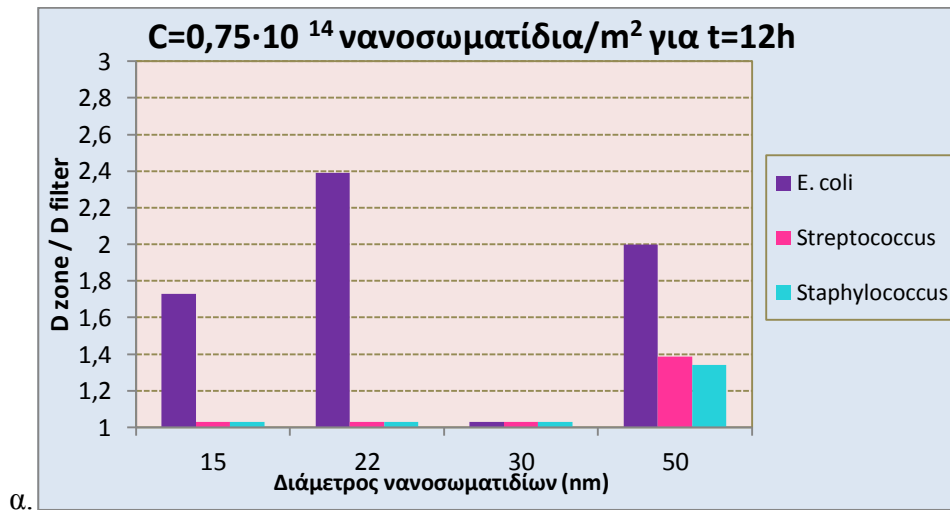
Η μεταβολή του λόγου των διαμέτρων της ζώνης αναστολής προς εκείνη του φίλτρου σε σχέση με τη διάμετρο των νανοσωματιδίων αναπαριστάται στα παρακάτω πέντε διαγράμματα. Στο πρώτο διάγραμμα είναι φανερό ότι και τα τρία βακτήρια είναι ανθεκτικά μόνο στα νανοσωματίδια με διάμετρο 30 nm και ευαίσθητα μόνο στα νανοσωματίδια με διάμετρο 50 nm. Περισσότερο ευαίσθητο των άλλων δύο είναι το *E. coli*. Αυτό είναι και το μοναδικό που σχηματίζει ζώνη αναστολής γύρω από τα φίλτρα με νανοσωματίδια διαμέτρου $d_p = 15\text{nm}$ και 22 nm. Αυτό αποδεικνύει ότι η τοξικότητα στο βακτήριο *E. coli* ενός φίλτρου χαμηλής συγκέντρωσης αυξάνεται, όταν περιέχει νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm, 50 nm και 15 nm αντίστοιχα. Όταν πρόκειται για τα βακτήρια *Streptococcus* και *Staphylococcus*, η τοξικότητα ενός φίλτρου χαμηλής συγκέντρωσης είναι εμφανής μόνο όταν περιλαμβάνει νανοσωματίδια διαμέτρου 50 nm.

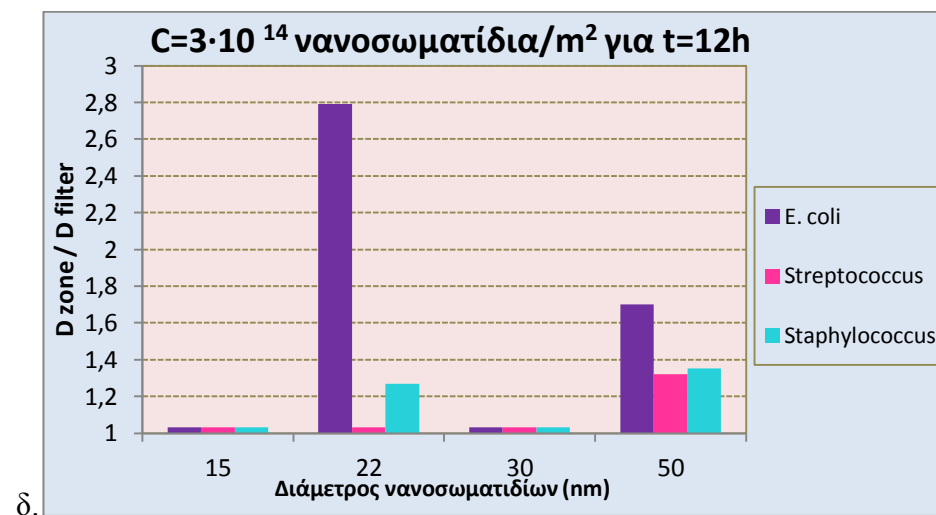
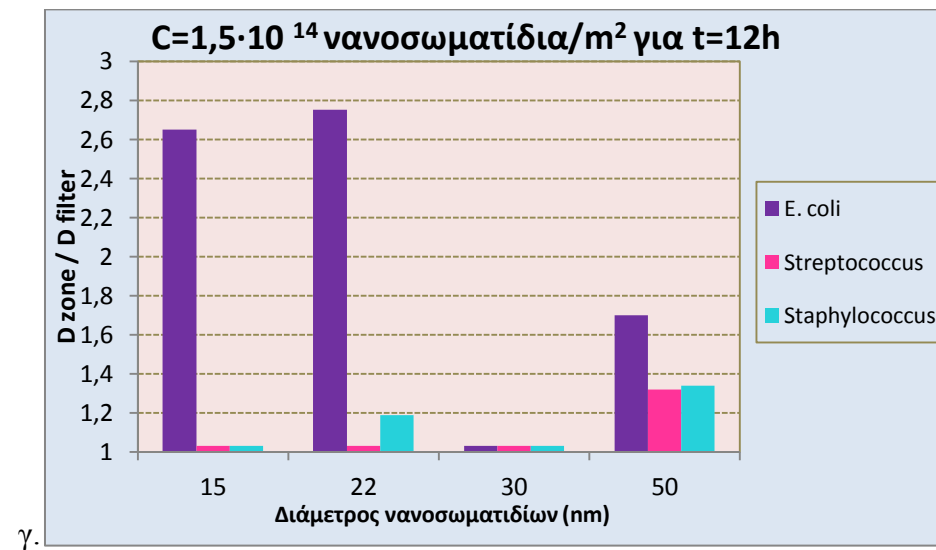
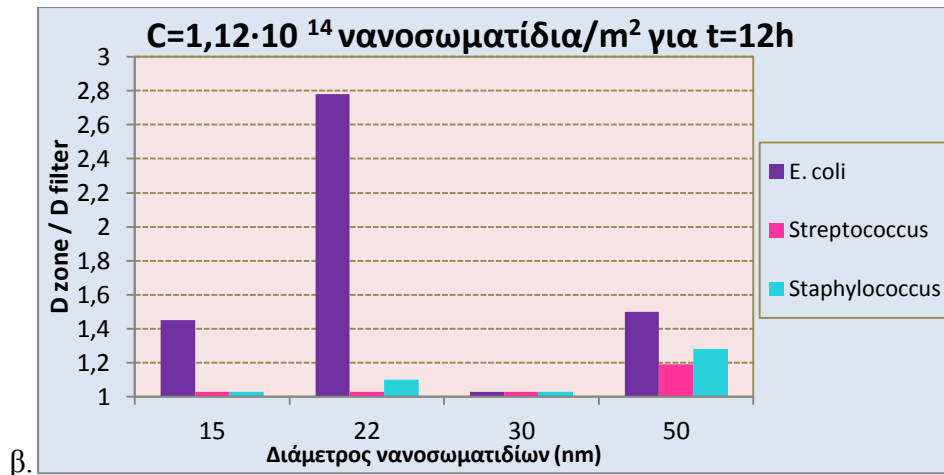
Το φίλτρο με περίπου διπλάσια συγκέντρωση νανοσωματιδίων εμφανίζει παρόμοια αποτελέσματα. Το *E. coli* είναι και στην περίπτωση αυτή περισσότερο ευαίσθητο των άλλων δυο. Εμφανίζει μέγιστη ζώνη αναστολής γύρω από φίλτρα με νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm. Ίδιου μεγέθους ζώνη αναστολής σχηματίζεται από τα φίλτρα με νανοσωματίδια διαμέτρου 15 και 50 nm. Πάλι το φίλτρο με νανοσωματίδια διαμέτρου 30 nm δεν περιβάλλεται από ζώνη αναστολής. Τέλος τα βακτήρια *Streptococcus* και *Staphylococcus* σχηματίζουν ζώνη αναστολής μόνο στα φίλτρα με τα νανοσωματίδια διαμέτρου 50nm. Από όλα αυτά είναι αντιληπτό ότι φίλτρα συγκέντρωσης $1,12 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 είναι τοξικά κυρίως για το *E. coli* όταν περιλαμβάνουν νανοσωματίδια διαμέτρου 22nm και σε μικρότερο βαθμό είναι τοξικά και για τα τρία βακτήρια όταν αποτελούνται από νανοσωματίδια διαμέτρου 50 nm.

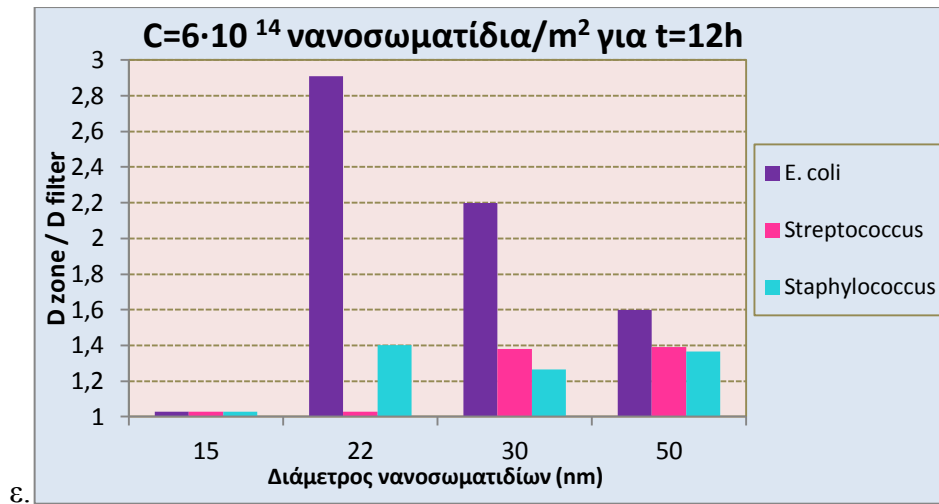
Αν αυξηθεί η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο λίγο παραπάνω, η βασική διαφορά που συμβαίνει είναι ότι αυξάνεται σημαντικά η τοξικότητα των νανοσωματιδίων διαμέτρου 15 nm στο *E. coli*. Επομένως αν αυξηθεί λίγο η συγκέντρωση νανοσωματιδίων 15 nm στο φίλτρο, αυτό γίνεται πιο τοξικό για το *E. coli*. Ωστόσο αν διπλασιασθεί ξανά η συγκέντρωση των

νανοσωματιδίων με διάμετρο $d_p = 15\text{nm}$ στο φίλτρο ($3 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2), τότε δε θα επηρεάσει καθόλου την ανάπτυξη των βακτηρίων *E. coli*, όπως συνέβει προηγουμένως. Στην περίπτωση αυτή το *E. coli* είναι ανθεκτικό και δεν προσλαμβάνει τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια. Στη νέα αυτή συγκέντρωση όλες οι άλλες ζώνες αναστολής δεν θα σημειώσουν αξιόλογη μεταβολή.

Λαμβάνοντας φίλτρα με διπλάσια συγκέντρωση της προηγούμενης ($6 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2) η μόνη μεταβολή που σημειώνεται είναι ότι θα εμφανίσουν ζώνη αναστολής και τα τρία βακτήρια σε φίλτρο με νανοσωματίδια διαμέτρου 30 nm. Στη μεγαλύτερη, διαθέσιμη συγκέντρωση νανοσωματιδίων στο φίλτρο τα τρία βακτηριακά στελέχη *E. coli*, *Streptococcus* και *Staphylococcus* εμφανίζουν ευαισθησία όταν τα φίλτρα περιέχουν νανοσωματίδια διαμέτρου 30 nm και 50 nm. Ενώ όταν τα φίλτρα περιέχουν νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm μόνο το *E. coli* και το *Staphylococcus* σχηματίζουν ζώνη αναστολής, δηλαδή είναι ευαίσθητα στα νανοσωματίδια. Σε φίλτρο με νανοσωματίδια που έχουν διάμετρο 15 nm δεν σχηματίζεται καμία ζώνη αναστολής από τα τρία βακτήρια, ακόμα και αν το φίλτρο αυτό έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων που μελετήθηκε εδώ.



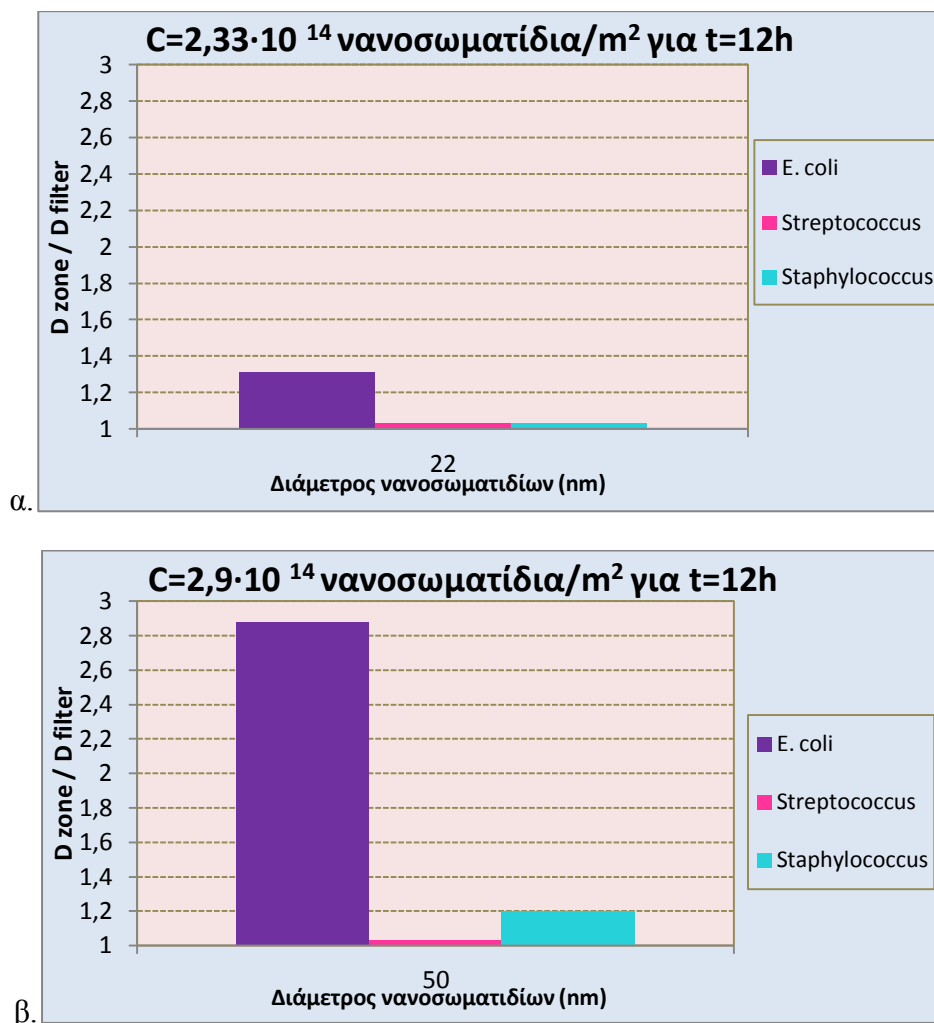




Σχήμα 5. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. Coli (μοβ μπάρες), Streptococcus (ροζ μπάρες) και Staphylococcus (γαλάζιες μπάρες) προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της διαμέτρου των νανοσωματιδίων σε χρονικό διάστημα $t = 12$ ώρες. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το β. σε συγκέντρωση $1,12 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το γ. σε συγκέντρωση $1,5 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το δ. σε συγκέντρωση $3 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m² και το ε. σε συγκέντρωση $6 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m².

Παρακάτω υπάρχουν δυο διαγράμματα τα οποία προέκυψαν από νανοσωματίδια διαφορετικής χημικής σύστασης συγκριτικά με όλα τα προηγούμενα. Τα προηγούμενα νανοσωματίδια αργύρου εμφάνισαν διαφορετικό χρώμα φίλτρων από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για τα ακόλουθα αποτελέσματα. Στα πρώτα νανοσωματίδια τα φίλτρα ήταν σκουρόχρωμα (σχεδόν μαύρα στις μεγάλες συγκεντρώσεις), ενώ στα δεύτερα τα φίλτρα είχαν ερυθρό-καφέ χρώμα. Από αυτό θεωρείται ότι τα πρώτα είναι πιθανόν οξειδία του αργύρου, αντίθετα με τα δεύτερα τα οποία αποτελούνται από νανοσωματίδια καθαρού αργύρου. Επίσης η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα διαφέρει από τα προηγούμενα αλλά και μεταξύ τους. Στο διάγραμμα α. του σχήματος 6. μόνο το E. coli σχημάτισε ζώνη αναστολής στο συγκεκριμένο φίλτρο. Παρομοίως στο διάγραμμα β. του ίδιου σχήματος το E. coli και το Staphylococcus παρουσίασαν ζώνη αναστολής. Βέβαια το E. coli σχημάτισε διπλάσιας διαμέτρου ζώνη αναστολής συγκριτικά τόσο με τη ζώνη του Staphylococcus στο ίδιο διάγραμμα όσο και με τη ζώνη του ίδιου βακτηρίου (E. coli) στο προηγούμενο διάγραμμα. Αυτό φανερώνει ότι το E. coli είναι ιδιαίτερος ευαίσθητο στη συγκέντρωση νανοσωματιδίων του δεύτερου φίλτρου, σε αντίθεση με

το Staphylococcus που είναι πιο ανθεκτικό. Αντίστοιχα το Streptococcus είναι ανθεκτικό και στα δυο φίλτρα νανοσωματιδίων.



Σχήμα 6. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών E. Coli (μοβ μπάρες), Streptococcus (ροζ μπάρες) και Staphylococcus (γαλάζιες μπάρες) προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της διαμέτρου των νανοσωματιδίων σε χρονικό διάστημα $t = 12$ ώρες. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε συγκέντρωση $2,33 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m², το β. σε συγκέντρωση $2,9 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/m²,

4.2.3 Κυτταροτοξικότητα Βακτηρίων E. coli Από Νανοσωματίδια Αργύρου

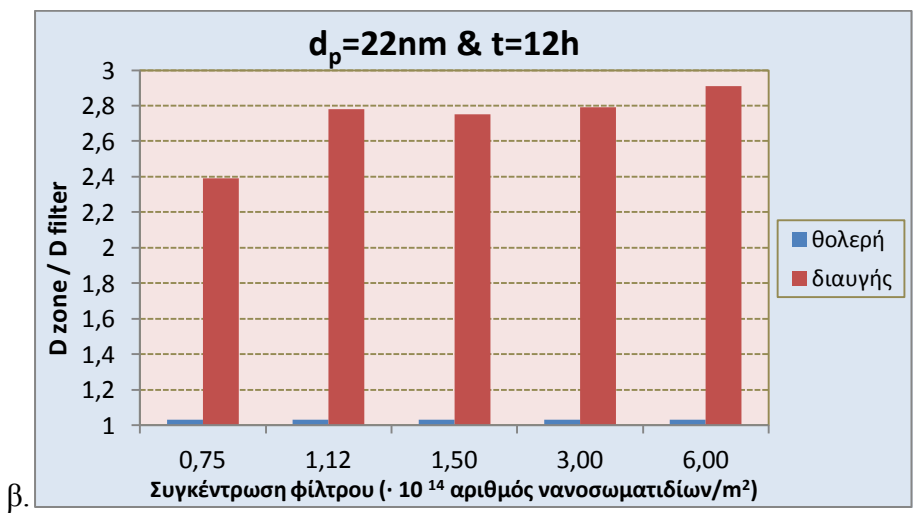
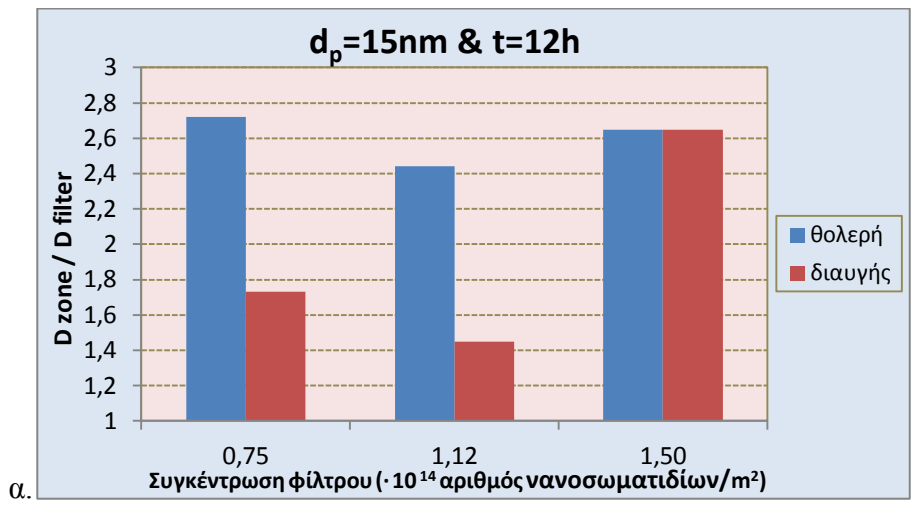
Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων για τον έλεγχο της τοξικότητας των νανοσωματιδίων στα βακτήρια E. coli παρατηρήθηκε ότι μετά την επώαση γύρω από τα φίλτρα των νανοσωματιδίων σχηματίστηκαν ζώνες αναστολής που αποτελούνταν από δύο τμήματα. Το πρώτο ήταν διαυγές και βρισκόταν σε άμεση

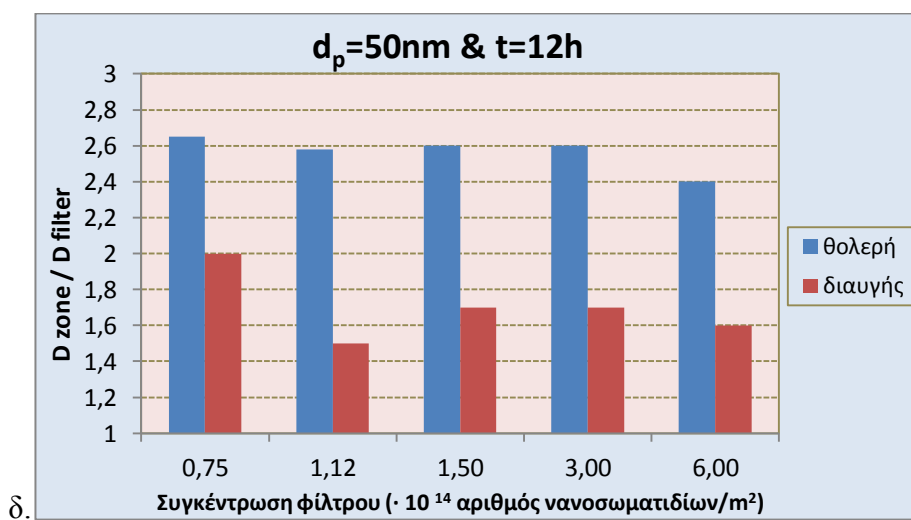
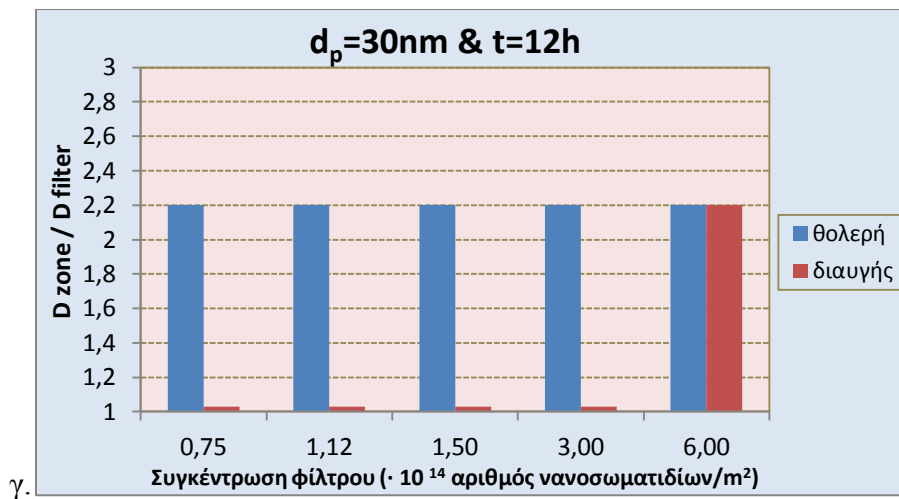
επαφή με το φίλτρο, ενώ το δεύτερο ήταν θολερό και βρισκόταν σε μικρή απόσταση από το φίλτρο. Η διπλή ζώνη αναστολής μπορεί να οφείλεται σε δυο λόγους: α) στην μικτή καλλιέργεια (παρουσία δύο μικροοργανισμών) και β) στη μικρότερη διάχυση των νανοσωματιδίων σε μεγαλύτερη ακτίνα από το φίλτρο. Στο σχήμα 7 απεικονίζεται ο λόγος της διαμέτρου της θολερής και της διαυγούς ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *E. coli* προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων σε σύγκριση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα στο χρονικό διάστημα των 12 ωρών. Παρατηρείται ότι για τα φίλτρα διαφορετικής συγκέντρωσης με νανοσωματίδια διαμέτρου 15 nm η θολερή ζώνη αναστολής έχει αναπτυχθεί σημαντικά και στα τρία. Αντίθετα, η διαυγής ζώνη αναστολής έχει μεγαλύτερη διάμετρο στο φίλτρο μεγαλύτερης συγκέντρωσης νανοσωματιδίων και μικρότερη στο φίλτρο με τη μέση συγκέντρωση. Φαίνεται λοιπόν ότι ο σχηματισμός της θολερής ζώνης αναστολής είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Κάτι που πιθανόν δεν ισχύει και για τη διαυγή ζώνη αναστολής. Αυτό δείχνει ότι τα συγκεκριμένα νανοσωματίδια δεν απορροφούνται με τον ίδιο τρόπο από όλα τα βακτήρια, αν και είναι κοινά μεταξύ τους.

Από το δεύτερο διάγραμμα συμπεραίνεται ότι γύρω από κάθε φίλτρο διαφορετικής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων διαμέτρου 22nm σχηματίζεται μόνο διαυγής ζώνη αναστολής. Αυτό φανερώνει ότι η καλλιέργεια είναι αμιγής και η διάχυση των νανοσωματιδίων ομοιόμορφη γύρω από το φίλτρο. Οι ζώνες αναστολής που σχηματίζονται, είναι αυξανόμενης διαμέτρου σε σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Συνεπώς, όσο αυξάνεται ο αριθμός των νανοσωματιδίων στο φίλτρο, τόσο αυξάνεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής που σχηματίζεται. Αυτό οδηγεί και στο συμπέρασμα ότι τα κύτταρα *E. coli* είναι ιδιαίτερος ευαίσθητα στα νανοσωματίδια αυτά.

Στα φίλτρα με τα νανοσωματίδια διαμέτρου 30 nm δημιουργείται διαυγής ζώνη αναστολής μόνο σε εκείνο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, ενώ όλα, ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης, περιβάλλονται από θολερή ζώνη αναστολής. Ο σχηματισμός αυτών των ζωνών δείχνει μη ομοιόμορφη διάχυση των νανοσωματιδίων διαμέτρου 30 nm από τα φίλτρα στο θρεπτικό υλικό. Είναι πιθανό ακόμη και τα κύτταρα *E. coli* να είναι περισσότερο ανθεκτικά στα συγκεκριμένα νανοσωματίδια.

Τέλος, τα φίλτρα με τα νανοσωματίδια διαμέτρου 50 nm περιβάλλονται και από θολερή και από διαυγή ζώνη αναστολής. Στην περίπτωση αυτή η θολερή ζώνη έχει διπλάσια διάμετρο από ότι η διαυγής. Μάλιστα η διαυγής και η θολερή ζώνη αναστολής έχουν μεγαλύτερη διάμετρο στη χαμηλότερη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο και μικρότερη διάμετρο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο. Φαίνεται λοιπόν ότι τα νανοσωματίδια μεγαλύτερης διαμέτρου δεν διαχέονται και δεν απορροφούνται τόσο εύκολα από τα βακτήρια *E. coli*, όσο εκείνα με τη μικρότερη διάμετρο.



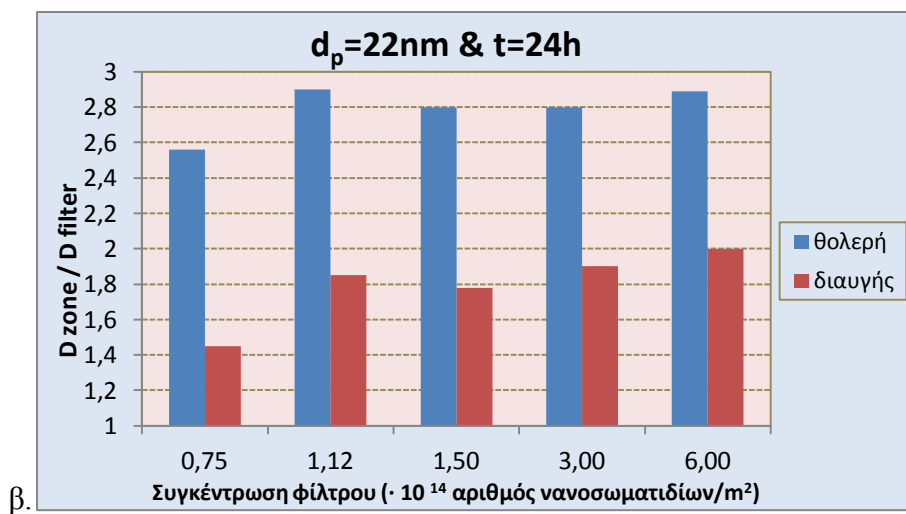
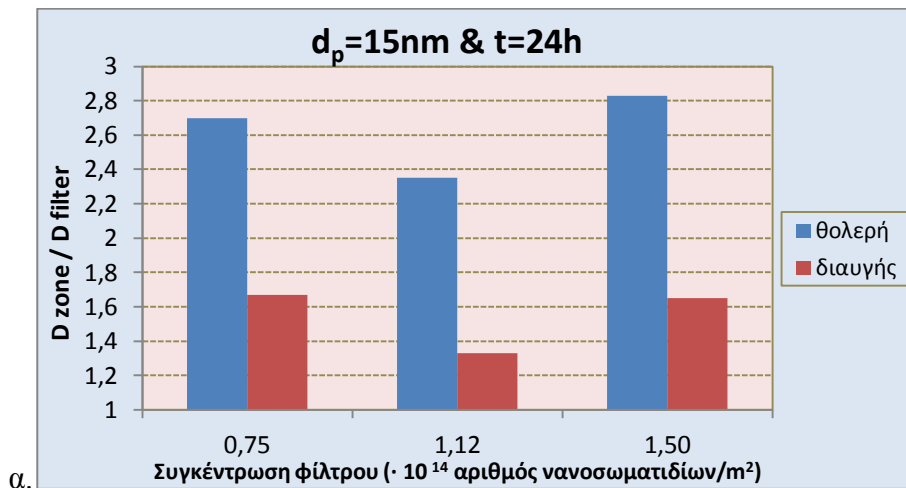


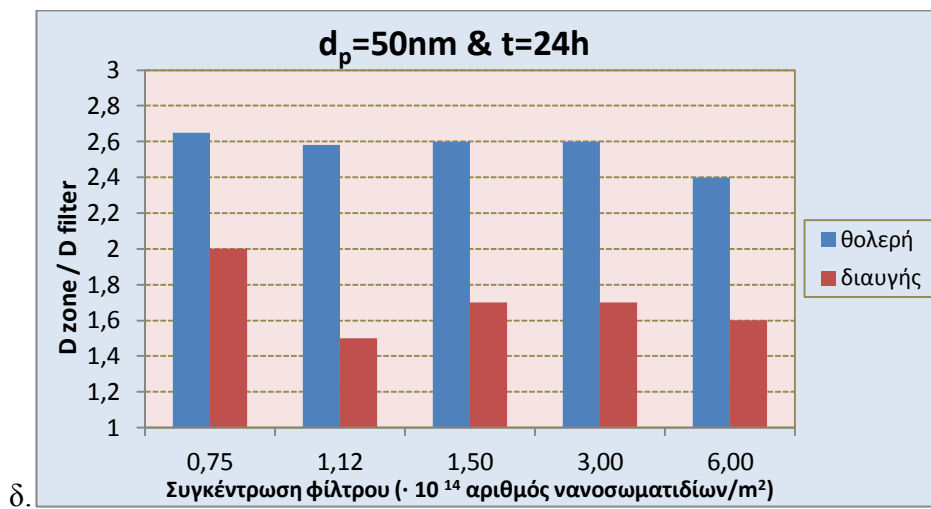
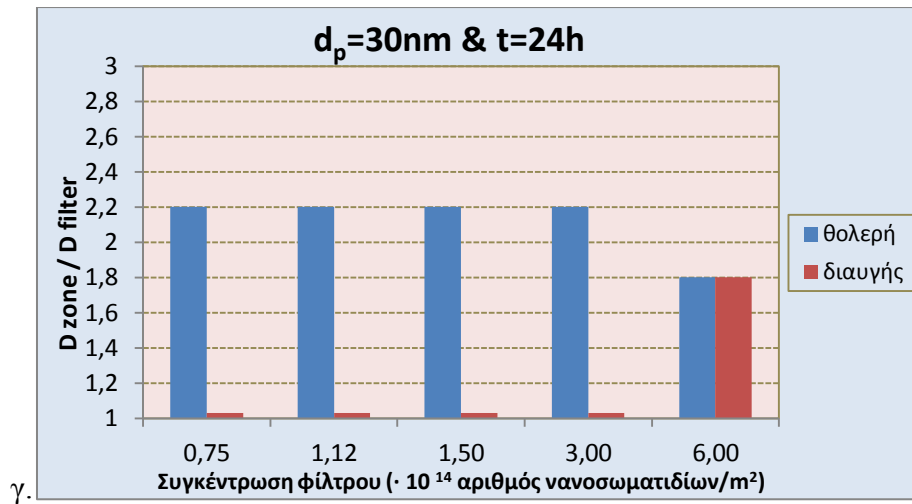
Σχήμα 7. Λόγος της διαμέτρου της θολερής και της διαυγούς ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *E. coli* προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα στο χρονικό διάστημα των 12 ωρών. Καθένα από τα διαγράμματα α, β, γ και δ αναφέρεται σε νανοσωματίδια της ίδιας διαμέτρου (15nm, 22nm, 30nm και 50nm).

Η ομάδα διαγραμμάτων του παρακάτω σχήματος 6. είναι όμοια με την προηγούμενη αλλά αναφέρεται στη διαφορά διαμέτρου της θολερής από τη διαυγή ζώνη σε χρόνο 24 ωρών. Οι τιμές του λόγου των διαμέτρων ζώνης αναστολής προς του φίλτρου δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερες διαφορές. Στα φίλτρα με τα νανοσωματίδια διαμέτρου 15 nm σημειώνεται μείωση της ακτίνας της διαυγούς ζώνης αναστολής γύρω από το φίλτρο με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση, αντίθετα από τη θολερή ζώνη της οποίας η ακτίνα αυξάνεται. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα είτε ότι τα βακτήρια δεν απορροφούν πλέον το ίδιο εύκολα τα νανοσωματίδια που διαχέονται από το φίλτρο ή ότι η δραστηριότητα των νανοσωματιδίων έχει μειωθεί με την πάροδο 12 ωρών.

Στο επόμενο διάγραμμα σημειώνεται ραγδαία ανάπτυξη της θολερής ζώνης αναστολής σε όλα τα φίλτρα και μείωση της διαμέτρου των διαυγών ζωνών αναστολής κατά 40 – 50 %. Είναι αξιοσημείωτο ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα, αυξάνεται και η διάμετρος των δυο ζωνών αναστολής κατ' αντιστοιχία. Αυτή η αύξηση διαμέτρου της θολερής ζώνης δηλώνει τη μείωση τόσο της απορρόφησης των νανοσωματιδίων από τα βακτήρια αλλά και της τοξικότητάς τους σε αυτά.

Τέλος εκτός από το γεγονός ότι τα νανοσωματίδια διαμέτρου $d_p = 30\text{nm}$ στα φίλτρα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση προκαλούν το σχηματισμό μικρότερης διαμέτρου τόσο της θολερής όσο και της διαυγούς ζώνης αναστολής, δεν υπάρχει κάποια άλλη ιδιαίτερη μεταβολή.





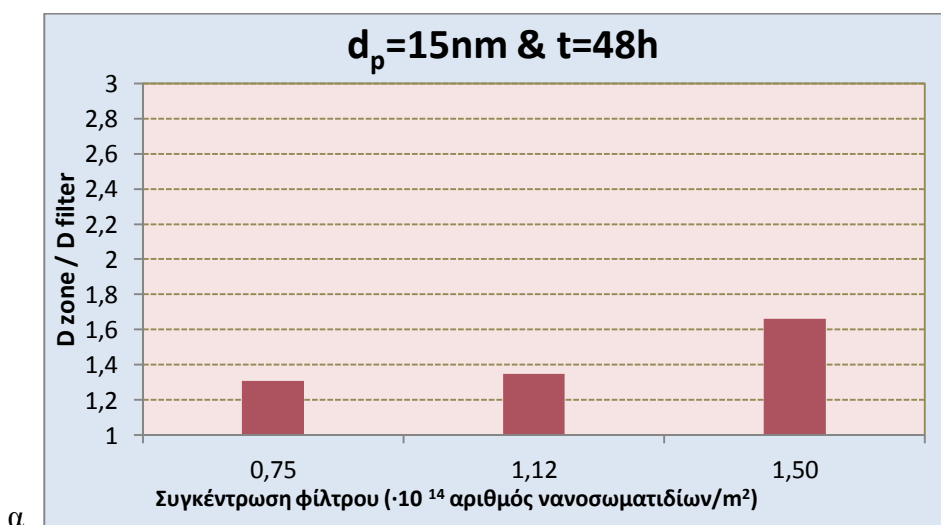
Σχήμα 8. Λόγος της διαμέτρου της θολερής και της διαυγούς ζώνης αναστολής της ανάπτυξης των βακτηριακών στελεχών *E. coli* προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα στο χρονικό διάστημα των 24 ωρών. Καθένα από τα διαγράμματα α, β, γ και δ αναφέρεται σε νανοσωματίδια της ίδιας διαμέτρου (15nm, 22nm, 30nm και 50nm).

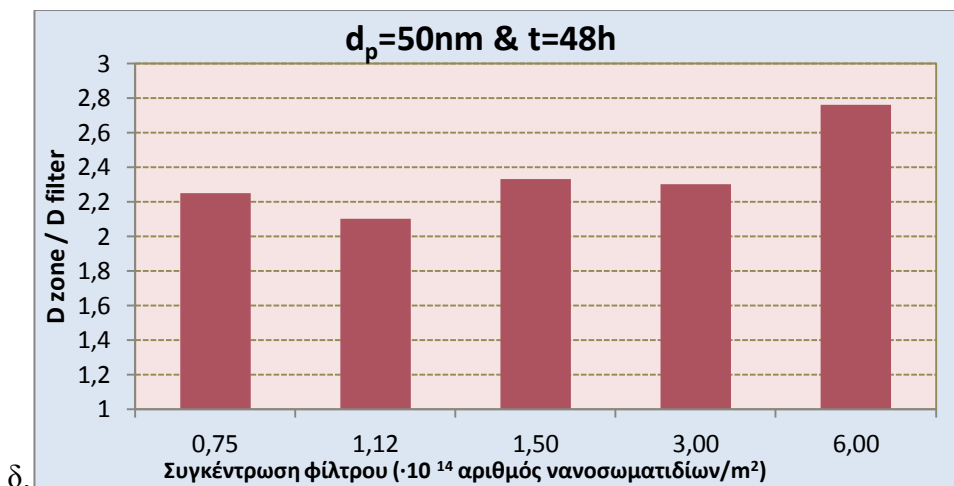
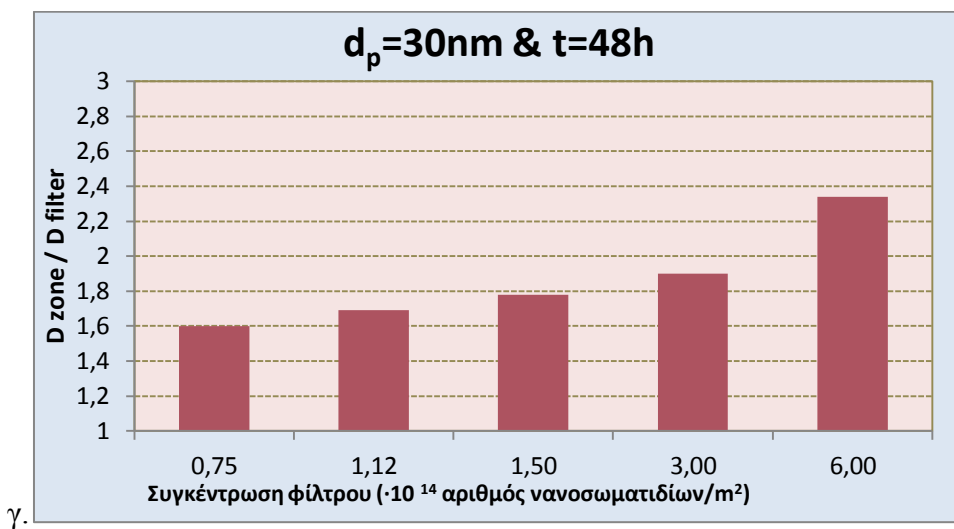
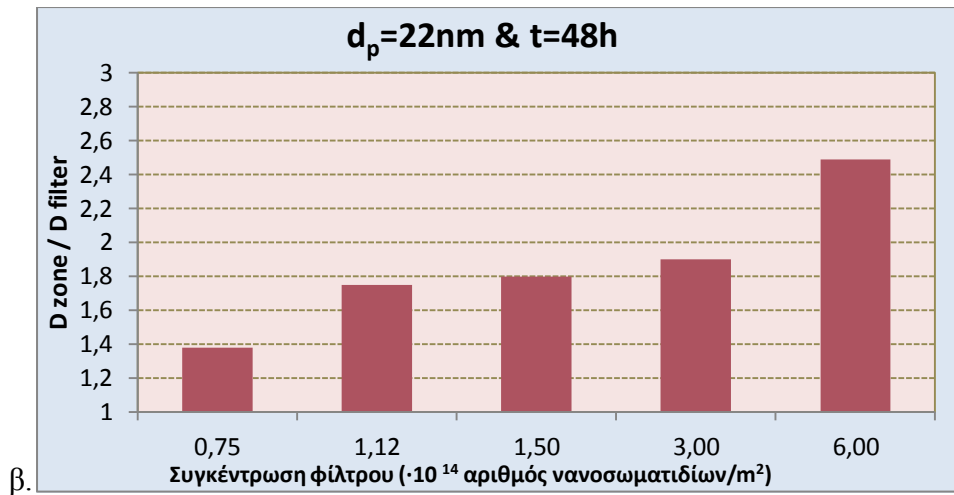
4.2.4 Τοξικότητα σε κύτταρα αίματος

Από την πειραματική διαδικασία της παρούσας διπλωματικής εργασίας ανάμεσα στα άλλα αποτελέσματα, προέκυψαν και ορισμένα τα οποία δεν ήταν αναμενόμενα. Όταν τοποθετήθηκαν φίλτρα νανοσωματιδίων στα τρυβλία CNA για την ανακαλλιέργεια των βακτηριακών στελεχών *Streptococcus* και επώαστηκαν σύμφωνα με τα καθορισμένα χρονικά διαστήματα δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός ζώνης αναστολής σε αυτά. Στις 3 ώρες έγιναν ιδιαίτερος εμφανής ζώνες αναστολής που είχαν σχηματιστεί μέσα στο θρεπτικό υλικό του τρυβλίου. Η εμφάνισή τους οφειλόταν στην απορρόφηση των νανοσωματιδίων από τα κύτταρα αίματος που

περιλαμβάνονταν ως συνθετικά στο θρεπτικό υλικό του τρυβλίου. Έτσι ύστερα από μετρήσεις της ζώνης αναστολής των κυττάρων του αίματος προέκυψαν τα τέσσερα παρακάτω διαγράμματα. Σε αυτά αναπαριστάται η μεταβολή του λόγου της διαμέτρου της ζώνης αναστολής των κυττάρων αίματος προβάτου προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων σε σχέση με τη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα φίλτρα. Η μεγαλύτερη ζώνη αναστολής των κυττάρων του αίματος σχηματίστηκε ύστερα από 48 ώρες επώασης των καλλιιεργειών.

Στο πρώτο διάγραμμα τα κύτταρα αίματος έχουν δημιουργήσει μικρής διαμέτρου ζώνη αναστολής γύρω από τα φίλτρα. Όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο, τόσο αυξάνεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής των κυττάρων του αίματος. Παρόμοια αύξηση της διαμέτρου της ζώνης αναστολής σημειώνεται σε όλα τα διαγράμματα, καθώς αυξάνεται στα φίλτρα η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων οποιασδήποτε διαμέτρου ($d_p = 15, 22, 30$ και 50 nm). Αυτό αποδεικνύει ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα διάφορα φίλτρα, τα κύτταρα αίματος γίνονται όλο και πιο ευαίσθητα στα νανοσωματίδια. Η ευαισθησία αυτή εκδηλώνεται μέσω της κυτταρικής απορρόφησης των νανοσωματιδίων που διαχέονται από τα φίλτρα, η οποία τελικά οδηγεί στην απόπτωση των κυττάρων. Εξαιτίας της απόπτωσης γίνεται ορατός ο σχηματισμός της ζώνης αναστολής. Στο σχήμα 8.δ η ζώνη αναστολής που αντιστοιχεί στο φίλτρο συγκέντρωσης $0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 πιθανόν οφείλεται σε σφάλμα μέτρησης, οπότε και προκύπτει λίγο μεγαλύτερη από τη διάμετρο του φίλτρου με την αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση.





Σχήμα 9. Λόγος της διαμέτρου της ζώνης αναστολής της ανάπτυξης κυττάρων αίματος προβάτου προς τη διάμετρο του φίλτρου των νανοσωματιδίων ως συνάρτηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα σε χρόνο 48 ωρών. Το διάγραμμα α. αντιστοιχεί σε νανοσωματίδια διαμέτρου $d_p = 15 \text{ nm}$, το β. σε νανοσωματίδια με $d_p = 22 \text{ nm}$, το γ. σε νανοσωματίδια με $d_p = 36 \text{ nm}$ και το δ. σε νανοσωματίδια με $d_p = 50 \text{ nm}$.

5. Συμπεράσματα

Από την ερμηνεία των παραπάνω αποτελεσμάτων προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα.

- 1) Η διάμετρος της ζώνης αναστολής αποτελεί ένδειξη της ευαισθησίας ή της ανθεκτικότητας του μικροοργανισμού στα αντίστοιχα νανοσωματίδια αργύρου που είναι προσκολλημένα στο φίλτρο και διαχέονται στο θρεπτικό υλικό. Όσο περισσότερο αυξάνεται η ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του βακτηρίου, τόσο μεγαλύτερη είναι η ευαισθησία του στα αντίστοιχα νανοσωματίδια του φίλτρου. Παρατηρήθηκε ότι η ζώνη αναστολής τείνει να έχει μεγαλύτερη διάμετρο, όταν το φίλτρο έχει μεγαλύτερη συγκέντρωση προσκολλημένων νανοσωματιδίων.
- 2) Για το βακτήριο *E. coli* σχηματίστηκαν ζώνες αναστολής της ανάπτυξης του γύρω από περισσότερα φίλτρα νανοσωματιδίων στα τρυβλία συγκριτικά με τα άλλα δυο βακτήρια, *Streptococcus* και το *Staphylococcus*. Με αυτό τον τρόπο αποδείχτηκε ότι το *E. coli* εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία στα νανοσωματίδια από ότι τα άλλα δυο.
- 3) Αντίστοιχα παρατηρήθηκε ότι το *Streptococcus* εμφάνισε ζώνες αναστολής γύρω από τους δίσκους των φίλτρων σε μικρότερο ποσοστό σε σχέση με τα άλλα δυο (π.χ. στα φίλτρα με νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm και 30 nm). Άρα το *Streptococcus* είναι ανθεκτικότερο των άλλων δύο στα νανοσωματίδια. Το *Staphylococcus* εμφάνισε μεσαίας διαμέτρου ζώνες αναστολής. Άρα είναι μετρίως ευαίσθητο στα νανοσωματίδια.
- 4) Στο σύνολο των πειραμάτων είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι σε κάθε μέτρηση της διαμέτρου των ζωνών αναστολής ανά 12 ώρες το *E. coli* μεταβάλλει σημαντικά τις τιμές της διαμέτρου των ζωνών αναστολής που σχηματίζει. Αντίστοιχα στο *Streptococcus* οι τιμές αυτές δε μεταβάλλονται τόσο πολύ με την πάροδο του χρόνου, ενώ στο *Staphylococcus* οι τιμές αυτές παραμένουν κατά κύριο λόγο σταθερές.
- 5) Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων φάνηκε ότι μετά τις πρώτες 12 ώρες επώασης των βακτηρίων, οι εμφανιζόμενες ζώνες αναστολής της ανάπτυξης τους είχαν την μεγαλύτερη δυνατή διάμετρο. Από αυτή τη χρονική στιγμή και έπειτα, η διάμετρος τους είτε παρέμεινε ίδια είτε μειώθηκε. Στις περισσότερες

περιπτώσεις σχηματισμού των ζωνών αναστολής μετά τις 12 ώρες επώασης, παρατηρήθηκε μείωση της διαμέτρου στις ζώνες αυτές.

- 6) Από την 24 ώρα επώασης και μετά οι ζώνες αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων μειώνονταν στις περισσότερες περιπτώσεις των φίλτρων. Η μείωση αυτή πλησίαζε το 50% της αρχικής τιμής της διαμέτρου της ζώνης αναστολής. Μετά από αυτή την μεταβολή, η διάμετρος δεν άλλαξε σημαντικά ξανά.
- 7) Όταν τα νανοσωματίδια έχουν διάμετρο 30 nm, τότε σχηματίζονται ζώνες αναστολής μόνο γύρω από τα φίλτρα με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων. Μεγαλύτερη απορρόφηση των νανοσωματιδίων από τα βακτήρια, παρατηρήθηκε για τα νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm και 50 nm. Συνεπώς και τα τρία βακτήρια εμφανίζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στα νανοσωματίδια διαμέτρου $d_p = 30$ nm.
- 8) Βάσει των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι τα τρία βακτήρια είναι λιγότερο ευαίσθητα στα φίλτρα συγκέντρωσης $1,12 \cdot 10^{14}$ και $6 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2 και περισσότερο ευαίσθητα στα φίλτρα μικρότερης συγκέντρωσης ($0,75 \cdot 10^{14}$ νανοσωματίδια/ m^2), στην περίπτωση που η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι 50 nm. Όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων είναι μέγιστη, τότε τα φίλτρα με τη μικρότερη συγκέντρωση νανοσωματιδίων είναι πιο τοξικά για τα βακτήρια.
- 9) Πρέπει να σημειωθεί ακόμη πως όταν τα νανοσωματίδια των φίλτρων έχουν διάμετρο 50 nm, τότε και οι τρεις μικροοργανισμοί, ανεξαρτήτου της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων στα φίλτρα, θα εμφανίσουν ζώνη αναστολής της αύξησής τους, είτε αυτή θα έχει μικρή είτε μεγάλη διάμετρο.
- 10) Όταν η διάμετρος των νανοσωματιδίων των φίλτρων είναι 22 nm, μόνο το *E. coli* και το *Staphylococcus* σχηματίζουν ζώνη αναστολής, δηλαδή είναι ευαίσθητα στα νανοσωματίδια. Ειδικότερα *E. coli* σχηματίζει τη μεγαλύτερη ζώνη αναστολής του, όταν τα νανοσωματίδια έχουν διάμετρο 22 nm. Συνεπώς τα νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm είναι ιδιαίτερος τοξικά για το *E. coli*.
- 11) Όταν το φίλτρο έχει τη μέγιστη συγκέντρωση νανοσωματιδίων με τη μικρότερη διάμετρο, τότε η τοξικότητά τους και για τα τρία βακτήρια είναι μηδενική.
- 12) Αξιοσημείωτο είναι ακόμη πως όταν μεταβάλλεται η χημική σύσταση των νανοσωματιδίων (οξειδωμένα ή όχι), τότε αλλάζει και η τοξικότητά τους προς

τα βακτήρια. Όταν αυξηθεί η συγκέντρωση των καθαρών νανοσωματιδίων στα φίλτρα όπου είναι προσκολλημένα, τότε αυξάνεται η τοξικότητα των νανοσωματιδίων αμιγούς χημικής σύστασης. Επιπλέον, όταν αυξηθεί η διάμετρος των καθαρών νανοσωματιδίων, αυξάνεται η δραστικότητα της τοξικότητας τους στα βακτήρια. Στην περίπτωση οξειδωμένων νανοσωματιδίων, δεν ισχύει πάντα το παραπάνω συμπέρασμα.

- 13) Στις κυτταροκαλλιέργειες του *E. coli* με νανοσωματίδια διαμέτρου 15 nm, ή 30 nm ή και 50 nm σχηματιζόταν διπλή ζώνη αναστολής της ανάπτυξης του στις 12 ώρες. Την ζώνη αυτή αποτελούσαν αρχικά ένα διαυγές τμήμα (σε επαφή με το φίλτρο) και έπειτα ένα θολερό τμήμα (σε επαφή με το διαυγές τμήμα) μεγαλύτερης διαμέτρου. Αντίθετα στο φίλτρο με νανοσωματίδια διαμέτρου 22 nm αναπτύχθηκαν μόνο διαυγείς ζώνες αναστολής σε χρόνο 12 ωρών. Οι διαυγείς αυτές ζώνες αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη διάμετρο όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στο φίλτρο.
- 14) Η διπλή ζώνη αναστολής είναι πλέον εμφανής γύρω από όλα τα φίλτρα από τις 24 ώρες επώασης και μετά. Σε αυτά τα χρονικά διαστήματα το θολερό τμήμα της διπλής ζώνης αναστολής είναι μεγαλύτερο σε διάμετρο από το διαυγές.
- 15) Τα νανοσωματίδια των φίλτρων έχουν πιο σημαντική επίδραση στα κύτταρα του αίματος προβάτου που περιέχονται στο θρεπτικό υλικό του τρυβλίου, αφού οδηγούν τελικά στην απόπτωσή τους. Οι ζώνες αναστολής που περιβάλλουν τα φίλτρα των νανοσωματιδίων παίρνουν τη μέγιστη διάμετρό τους στο μεγαλύτερο χρόνο επώασης της καλλιέργειας.
- 16) Το συμπέρασμα είναι ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων οποιασδήποτε διαμέτρου ($d_p = 15, 22, 30$ και 50 nm) στο φίλτρο, τόσο αυξάνεται και η διάμετρος της ζώνης αναστολής των κυττάρων του αίματος. Αυτό αποδεικνύει ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων στα διάφορα φίλτρα, τα κύτταρα αίματος γίνονται όλο και πιο ευαίσθητα στα νανοσωματίδια.
Αυτή η διπλωματική εργασία μπορεί να αποτελέσει εφελκυστήριο νέων πειραματικών ερευνών. Μια τέτοια πιθανή μελέτη είναι ο συνδυασμός της δράσης των αντιβιοτικών με τα νανοσωματίδια, οπότε θα δοθεί η δυνατότητα να μελετηθεί αν η συνεργαστική δράση τους ως προς την κυτταροτοξικότητα

τους είναι περισσότερο ή λιγότερο αποτελεσματική από ότι φάνηκε στην παρούσα εργασία.

Επίσης ένα άλλο θέμα μελλοντικής έρευνας αποτελεί η επίδραση νανοσωματιδίων διαφορετικής χημικής σύστασης στην κυτταροτοξικότητα. Σ' αυτή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν νανοσωματίδια αμιγούς χημικής σύστασης (καθάρια νανοσωματίδια) σε σύγκριση με οξειδωμένα.

Ακόμη αξιόλογη θα ήταν η μελέτη τοξικότητας διαφορετικών ως προς το υλικό σύνθεσης νανοσωματιδίων σε ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό προκειμένου να βρεθεί ποιο είδος νανοσωματιδίων έχει καλύτερη τοξικότητα σε αυτόν.

Ιδιαίτερα σημαντικό ήταν και το αποτέλεσμα που προέκυψε τυχαία στο τέλος της πειραματικής διαδικασίας σχετικά με την επίδραση των νανοσωματιδίων στα κύτταρα του αίματος. Θα μπορούσε ως προς αυτό να συνεχιστεί η έρευνα για τη διεξαγωγή περισσότερων και αναλυτικότερων συμπερασμάτων.

6. Βιβλιογραφία

<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.htm>

Dr Dunn A. and Dr Quinn R. (October 2003 – August 2004). The Royal Society and the Royal Academy of Engineering. Nanoscience and Nanotechnologies, July 2004, pp. 5.

Ali Mansoori. (2005). Molecular-based study of condensed matter in small systems. Principles of Nanotechnology, World Scientific Publ, 2005.

Holister P, Roman V, Harper T, (2003). Fullerenes. Technology White Papers #7. [S.l.] Cientifica, 2003, 12 p.

Kumara AP, Depana D, Tomerb NS, Singha RP. (2009). Nanoscale particles for polymer degradation and stabilization—Trends and future perspectives. Progress in Polymer Science, 2009, 34: 479–515.

http://www.mio-ecsde.org/_uploaded_files/nanovirtualium/html/el/definition.html

Wood BJ, Abraham J, Hvizda JL, Alexander HR, Fojo T. (2003). Radiofrequency ablation of adrenal tumors and adrenocortical carcinoma metastases, Cancer 2003; 97:554-60.

Sandhya S, Rani SS, Pankaj B, Govind MK, Offmann B, et al. (2009) Length Variations amongst Protein Domain Superfamilies and Consequences on Structure and Function. PLoS ONE 4(3): e4981. doi:10.1371/journal.pone.0004981

Coombs RRH, Robinson DW. 1996, Nanotechnology in Medicine and the Biosciences, ISBN 2884490809.

N. Cioffi, L. Torsi, N. Ditaranto, L. Sabbatini, P.G. Zambonin, G. Tantillo, L. Ghibelli, M. D'Alessio, T. Bleve-Zacheo and E. Traversa, Antifungal activity of polymer-based copper nanocomposite coatings. *Appl. Phys. Lett.*, 85 (2004), pp. 2417–2419.

Cioffi, L. Torsi, N. Ditaranto, G. Tantillo, L. Ghibelli, L. Sabbatini, T. Bleve-Zacheo, M. D'Alessio, P.G. Zambonin and E. Traversa, Copper nanoparticle/polymer composites with antifungal and bacteriostatic properties. *Chem. Mater.*, 17 (2005), pp. 5255–5262.

J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim and Y.S. Lee, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*, 3 (2007), pp. 95–101.

Esteban-Cubillo 2006 A. Esteban-Cubillo, C. Pecharroman, E. Aguilar, J. Santaren and J.S. Moya, Antibacterial activity of copper monodispersed nanoparticles into sepiolite. *J. Mater. Sci.*, 41 (2006), pp. 5208–5212.

Son 2004 W.K. Son, J.H. Youk, T.S. Lee and W.H. Park, Preparation of antimicrobial ultrafine cellulose acetate fibers with silver nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.*, 25 (2004), pp. 1632–1637.

Stoimenov 2002 P. Stoimenov, R.L. Klinger, G.L. Marchin and K.J. Klabunde, Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents. *Langmuir*, 18 (2002), pp. 6679–6686. |

Elechiguerra 2005 J.L. Elechiguerra, J.L. Burt, J.R. Morones, A. Camacho-Bragado, X. Gao, H.H. Lara and M.J. Yacaman, Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotech.*, 3 (2005), pp. 1–10.

Lok 2007 C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K. Tam, J.F. Chiu and C.M. Che, Silver nanoparticles: Partial oxidation and antibacterial activities. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 12 (2007), pp. 527–534.

Panacek 2006 A. Panacek, L. Kvitek, R. Pucek, M. Kolar, R. Vecerova, N. Pizurova, V.K. Sharma, T. Nevecna and R. Zboril, Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem. B*, 110 (2006), pp. 16248–16253.

Morones 2005 J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J.B. Kouri, J.T. Ramírez and M.J. Yacaman, The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16 (2005), pp. 2346–2353.

S. Pal, Y.K. Tak and J.M. Song, Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (2007), pp. 1712–1720.

S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash, Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18 225103 (2007), pp. 1–9.

I. Sondi and B. Salopek-Sondi, Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.*, 275 (2004), pp. 177–182.

C. Aymonier, U. Schlotterbeck, L. Antonietti, P. Zacharias, R. Thomann, J.C. Tiller and S. Mecking, Hybrids of silver nanoparticles with amphiphilic hyperbranched macromolecules exhibiting antimicrobial properties. *Chem. Commun.*, 301 (2002), pp. 3018–3019.

H.Q. Jiang, S. Manolache, A.C.L. Wong and F.S. Denes, Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics. *J. Appl. Polym. Sci.*, 93 (2004), pp. 1411–1422.

C.N. Lok, C.M. Ho, R. Chen, Q.Y. He, W.Y. Yu, H. Sun, P.K.H. Tam, J.F. Chiu and C.M. Che, Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *J. Proteome Res.*, 5 (2006), pp. 916–924.

Espinosa-Cristo´bal LF, Martı´nez-Castan˜o´n GA, Martı´nezMartı´nez RE, Loyola-Rodrı´guez JP, Patin˜o-Mari´n N, Reyes-Maci´as JF, Ruiz F (2009) Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Materials Letters* 63:2603–2606

Kumar Ashavani; Vemula, (PK) Praveen Kumar; Ajayan, Pulickel M.; John, George .Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *NATURE MATERIALS* Volume: 7, Issue: 3 Pages: 236-241, Published: MAR 2008

Francisco Hernandez-Sierra Juan; Ruiz Facundo; Cruz Pena Diana Corina; et al. (2008). The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *NANOMEDICINE-NANOTECHNOLOGY BIOLOGY AND MEDICINE*. Volume: 4, Issue: 3. Pages: 237-240. Published: SEP 2008

Lara Humberto H.; Garza-Trevino Elsa N.; Ixtapan-Turrent Liliana; et al. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *JOURNAL OF NANOBIO TECHNOLOGY* Volume: 9, Article Number: 30. Published: AUG 3 2011

Fan Catherine; Chu Lianrui; Rawls H. Ralph; et al. (2011). Development of an antimicrobial resin-A pilot study. *DENTAL MATERIALS*. Volume: 27. Issue: 4. Pages: 322-328.08 Published: APR 2011

Beyth N; Yudovin-Farber I; Bahir R; et al. (2006) Antibacterial activity of dental composites containing quaternary ammonium polyethylenimine nanoparticles against *Streptococcus mutans*. Source: *BIOMATERIALS*. Volume: 27. Issue: 21. Pages: 3995-4002. Published: JUL 2006

Shvero Dana Kesler; Davidi Michael Perez; Weiss Ervin I.; et al. (2010). Antibacterial effect of polyethyleneimine nanoparticles incorporated in provisional cements against *Streptococcus mutans*. JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART B-APPLIED BIOMATERIALS. Volume: 94B. Issue: 2. Pages: 367-371. Published: AUG 2010

Florindo H. F.; Pandit S.; Goncalves L. M. D.; et al. (2008). *Streptococcus equi* antigens adsorbed onto surface modified poly-epsilon-caprolactone microspheres induce humoral and cellular specific immune responses. VACCINE. Volume: 26. Issue: 33. Pages: 4168-4177. Published: AUG 5 2008

Es-Souni Martha; Fischer-Brandies Helge; Es-Souni Mohammed (2008). Versatile Nanocomposite Coatings with Tunable Cell Adhesion and Bactericidity. ADVANCED FUNCTIONAL MATERIALS. Volume: 18. Issue: 20. Pages: 3179-3188. Published: OCT 23 2008

Nanda Anima; Saravanan M. (2009). Biosynthesis of silver nanoparticles from *Staphylococcus aureus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. NANOMEDICINE-NANOTECHNOLOGY BIOLOGY AND MEDICINE. Volume: 5. Issue: 4. Pages: 452-456. Published: DEC 2009

Yan Danhong; Yin Guangfu; Huang Zhongbing; et al. (2009). Characterization and Bacterial Response of Zinc Oxide Particles Prepared by a Biomineralization Process. JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B. Volume: 113. Issue: 17. Pages: 6047-6053. Published: APR 30 2009

Baek Yong-Wook; An Youn-Joo (2011). Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb(2)O(3)) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT. Volume: 409. Issue: 8. Pages: 1603-1608. Published: MAR 15 2011

Zaman Mehruz; Skwarczynski Mariusz; Malcolm Jessica M.; et al. (2011). Self-adjuvanting polyacrylic nanoparticulate delivery system for group A streptococcus (GAS) vaccine. NANOMEDICINE-NANOTECHNOLOGY

BIOLOGY AND MEDICINE. Volume: 7. Issue: 2. Pages: 168-173. Published: APR 2011

Skwarczynski Mariusz; Toth Istvan. (2011). Peptide-Based Subunit Nanovaccines CURRENT DRUG DELIVERY. Volume: 8. Issue: 3. Pages: 282-289. Published: MAY 2011

Köhler, G., and C. Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256:495-497.

Sarikaya, M., C. Tamerler, A. K. Jen, K. Schulten, and F. Baneyx. 2003. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology. Nat. Mater. 2:577-585.

Pera Nuria Parera; Kouki Annika; Haataja Sauli; et al. (2010). Detection of pathogenic Streptococcus suis bacteria using magnetic glycoparticles. ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY. Volume: 8. Issue: 10. Pages: 2425-2429. Published: 2010

Cho KH, Park JE, Osaka T, Park SG (2005) The study of antimicrobial activity and preservative effects of nanosilver ingredient. Electrochim Acta 51:956–960.

G. Zhao and S.E. Stevens. BioMetals, 11 (1998), p. 27.

Dror-Ehre, A, Mamane, H; Belenkova, T; Markovich, G3; Adin, A, (2009). Silver nanoparticle-E. coli colloidal interaction in water and effect on E-coli survival. JOURNAL OF COLLOID AND INTERFACE SCIENCE. Volume: 339. Issue: 2. Pages: 521-526. Published: NOV 15 2009

X.H.N. Xu, W.J. Brownlow, S.V. Kyriacou, Q. Wan and J.J. Viola. Biochemistry, 43 (2004), p. 10400.

Ip Margaret; Lui SL; Poon VKM; et al. (2006). Antimicrobial activities of silver dressings: an in vitro comparison. JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY. Volume: 55. Issue: 1. Pages: 59-63. Published: JAN 2006

J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.H. Park, H.J. Lee and S.H. Kim. Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med., 3 (2007), p. 95.

Shahverdi, Ahmad R.; Fakhimi, Ali; Shahverdi Hamid R.; Minaian Sara (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. NANOMEDICINE-NANOTECHNOLOGY BIOLOGY AND MEDICINE. Volume: 3. Issue: 2. Pages: 168-171. Published: JUN 2007

Sintubin, Liesje; De Gussemme Bart; Van der Meeren Paul; Pycke Benny F. G.; Verstraete Willy; Boon, Nico. (2011). The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Volume: 91. Issue: 1. Pages: 153-162. Published: JUL 2011

Mafune F, J-y K, Takeda Y, Kondow T, Sawabe H (2000) Structure and stability of silver nanoparticles in aqueous solution produced by laser ablation. J Phys Chem B 104:8333–8337.

Liu J, Hurt RH (2010) Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. Environ Sci Technol 44:2169–2175.

Sotiriou GA, Pratsinis SE (2010) Antibacterial activity of nanosilver ions and particles. Environ Sci Technol 44:5649–5654.

Choi et al., 2008 O. Choi, K. Deng, N. Kim, L. Ross and Z. Hu, The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. Water Res., 42 (2008), pp. 3066–3074.

Costerton et al., 1995 J.W. Costerton, Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber and H.M. Lappin-Scott, Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, 49 1 (1995), pp. 711–745.

Harrison et al., 2007 J.J. Harrison, H. Ceri and R.J. Turner, Multimetal resistance and tolerance in microbial biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5 12 (2007), pp. 928–938.

Harrison et al., 2005a J.J. Harrison, H. Ceri, N.J. Roper, E.A. Badry, K.M. Sproule and R.J. Turner, Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiol.*, 151 10 (2005), pp. 3181–3195.

Harrison et al., 2005b J.J. Harrison, R.J. Turner and H. Ceri, Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Microbiol.*, 7 7 (2005), pp. 981–994.

Tsuneda et al., 2003 S. Tsuneda, H. Aikawa, H. Hayashi, A. Yuasa and A. Hirata, Extracellular polymeric substances responsible for bacterial adhesion onto solid surface. *FEMS Microbiol. Lett.*, 223 2 (2003), pp. 287–292.

Teitzel and Parsek, 2003 G.M. Teitzel and M.R. Parsek, Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69 4 (2003), pp. 2313–2320.

Mah and O’Toole, 2001 T.C. Mah and G.A. O’Toole, Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 9 1 (2001), pp. 34–39.

Mah et al., 2003 T.-F. Mah, B. Pitts, B. Pellock, G.C. Walker, P.S. Stewart and G.A. O’Toole, A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, 426 6964 (2003), pp. 306–310.

Keren et al., 2004 I. Keren, N. Kaldalu, A. Spoering, Y. Wang and K. Lewis, Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol. Lett.*, 230 1 (2004), pp. 13–18.

Lenz et al., 2008 A.P. Lenz, K.S. Williamson, B. Pitts, P.S. Stewart and M.J. Franklin, Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74 14 (2008), pp. 4463–4471.

Miller and Bassler, 2001 M.B. Miller and B.L. Bassler, Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55 1 (2001), pp. 165–199.

Qureshi et al., 2001 F.M. Qureshi, U. Badar and N. Ahmed, Biosorption of copper by a bacterial biofilm on a flexible polyvinyl chloride conduit. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 9 (2001), pp. 4349–4352.

Silver and Phung, 1996 S. Silver and L.T. Phung, Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50 (1996), pp. 753–789.

Stewart and Franklin, 2008 P.S. Stewart and M.J. Franklin, Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 6 3 (2008), pp. 199–210.

Navarro et al., 2008 E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg and R. Behra, Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.*, 42 23 (2008), pp. 8959–8964.

Carlson et al., 2008 C. Carlson, S.M. Hussain, A.M. Schrand, K.L. Braydich-Stolle, K.L. Hess, R.L. Jones and J.J. Schlager, Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *J. Phys. Chem., B* 112 43 (2008), pp. 13608–13619.

Khomutov and Gubin, 2002 G. Khomutov and S. Gubin. *Mater. Sci. Eng. C*, 22 (2002), p. 141.

Oliveira et al., 2005 M. Oliveira, D. Ugarte, D. Zanchet and A. Zarbin. J. Colloid Interface Sci., 292 (2005), p. 429.

Egorova and Revina, 2000 E. Egorova and A. Revina. Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects, 168 (2000), p. 87.

Lok Chun-Nam; Ho Chi-Ming; Chen Rong; He Qing-Yu; Yu Wing-Yiu; Sun Hongzhe; Tam Paul Kwong-Hang; Chiu Jen-Fu; Che Chi-Ming (2007). Silver nanoparticles: partial oxidation and antibacterial activities. JOURNAL OF BIOLOGICAL INORGANIC CHEMISTRY. Volume: 12. Issue: 4. Pages: 527-534. Published: MAY 2007

Kora Aruna Jyothi; Arunachalam J. (2011). Assessment of antibacterial activity of silver nanoparticles on Pseudomonas aeruginosa and its mechanism of action. WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY & BIOTECHNOLOGY. Volume: 27. Issue: 5. Pages: 1209-1216. Published: MAY 2011

Samberg Meghan E.; Orndorff Paul E.; Monteiro-Riviere Nancy A. (2011) Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. NANOTOXICOLOGY. Volume: 5. Issue: 2. Pages: 244-253. Published: JUN 2011

Chudasama Bhupendra; Vala Anjana K.; Andhariya Nidhi; Mehta R. V.; Upadhyay R. V. (2010) Highly bacterial resistant silver nanoparticles: synthesis and antibacterial activities. JOURNAL OF NANOPARTICLE RESEARCH. Volume: 12. Issue: 5. Pages: 1677-1685. Published: JUN 2010

Prema P.; Raju Rincy (2009). Fabrication and Characterization of Silver Nanoparticle and its Potential Antibacterial Activity. BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING. Volume: 14. Issue: 6. Pages: 842-847. Published: NOV-DEC 2009

Lkhagvajav N.; Yasa I.; Celik, E ; Koizhaiganova, M ; Sari, O. (2011). ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF COLLOIDAL SILVER NANOPARTICLES PREPARED BY SOL-GEL METHOD. DIGEST JOURNAL OF NANOMATERIALS AND BIOSTRUCTURES. Volume: 6. Issue: 1. Pages: 149-154. Published: JAN-MAR 2011

Skwarczynski Mariusz; Toth Istvan (2011). Peptide-Based Subunit Nanovaccines. CURRENT DRUG DELIVERY. Volume: 8. Issue: 3. Pages: 282-289. Published: MAY 2011

S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao and D. Dash. Nanotechnology, 18 (2007), p. 1.

A. Panacek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, L. Kvitek, R.N. Pizurova, V.K. Tatjana and R. Zboril. J. Phys. Chem. B, 110 (2005), p. 16248.

S. Pal, Y.K. Tak and J.M. Song. Appl. Environ. Microbiol., 73 (2007), p. 1712. | View Record in Scopus || Full Text via CrossRef | Cited By in Scopus (278)

Morones, JR (2005) Morones, JR; Elechiguerra, JL; Camacho, A; Holt, K; Kouri, JB; Ramirez, JT; Yacaman, MJ The bactericidal effect of silver nanoparticles. NANOTECHNOLOGY Volume: 16, Issue: 10, Pages: 2346-2353, DOI: 10.1088/0957-4484/16/10/059, Published: OCT 2005

Shahverdi, A. (2007) A.R. Shahverdi, A. Fakhimi, H.R. Shahverdi and S. Minaian, Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Nanomedicine, 3 (2007), pp. 168–171.

Huang, ZB. (2008) Huang Zhongbing; Zheng Xu; Yan Danhong; et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. LANGMUIR Volume: 24, Issue: 8, Pages: 4140-4144, DOI: 10.1021/la7035949, Published: APR 15 2008

Shaila M.S. (2007). M.S. Shaila, R. Nayak, S.S. Prakash, M. Georgousakis, E. Brandt and D.J. McMillan, et al. Comparative in silico analysis of two vaccine candidates for group A streptococcus predicts that they both may have similar safety profiles. *Vaccine*, 25 (2007), pp. 3567–3573.

Batzloff M.R.(2003). M.R. Batzloff, W.A. Hayman, M.R. Davies, M. Zeng, S. Pruksakorn and E.R. Brandt, et al. Protection against group A streptococcus by immunization with J8-diphtheria toxoid: contribution of J8- and diphtheria toxoid-specific antibodies to protection. *J Infect Dis*, 187 (2003), pp. 1598–1608.

Pandey M. (2009). M. Pandey, M.R. Batzloff and M.F. Good, Mechanism of protection induced by group A streptococcus vaccine candidate J8-DT: contribution of B and T-cells towards protection. *PLoS One*, 4 (2009), p. e5147.

W.R. Li, X.B. Xie, Q.S. Shi, H.Y. Zeng, Y.S. Ou-Yang and Y.B. Chen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 85 (2010), p. 1115.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM (2006) *J Proteome Res* 5:916–924

Q.L. Feng, J. Wu, G.O. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim and J.O. Kim. *J. Biomed. Mater. Res.*, 52 (2000), p. 662.

N. Silvestry-Rodriguez, E.E. Sicairos-Ruelas, C.P. Gerba and K.R. Bright. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 191 (2007), p. 23.

H. Gentry and S. Cope. *Nurs. Stand.*, 19 (2005), p. 51.

V.K. Poon and A. Burd. *Burns*, 30 (2004), p. 140. Article | PDF (326 K)

G. Zhao and S.E. Stevens. *BioMetals*, 11 (1998), p. 27.

S. Pal, Y.K. Tak and J.M. Song. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (2007), p. 1712.

Sondi and B. Salopek-Sondi. *J. Colloid Interface Sci.*, 275 (2004), p. 177.

J.R. Morones, J.L. Elechiguerra, A. Camacho, K. Holt, J. Kouri, J.T. Ramirez and M.J. Yacaman. *Nanotechnology*, 16 (2005), p. 2346.

A. Panacek, R. Prucek, M. Kolar, R. Vecerova, L. Kvitek, R.N. Pizurova, V.K. Tatjana and R. Zboril. *J. Phys. Chem. B*, 110 (2005), p. 16248..

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM (2006) *J Proteome Res* 5:916–924

Silver S (2003) *FEMS Microbiol Rev* 27:341–153.

Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:13611–13614

Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S (1999) *Nat Med* 5:183–188

Li XZ, Nikaido H, Williams KE (1997) *J Bacteriol* 179:6127–6132

Gibbard J (1937) *Am J Public Health* 27:112–119

G. Zhao and S.E. Stevens, Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals*, 11 (1998), pp. 27–32.

Mendis, N. Rajapakse, H.G. Byun and S.K. Kim, Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci*, 77 (2005), pp. 2166–2178.

C.A. Mirkin and T.A. Taton, Semiconductors meet biology. *Nature*, 405 (2000), pp. 626–627.

Panyam J, Labhasetwar V: Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev* 2003, 55:329-347.

Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL: Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small* 2009, 5:1553-1561.

R. Kumar and H. Munstedt. *Biomaterials*, 26 (2005), p. 2081. Article | PDF (479 K) | | View Record in Scopus | | Cited By in Scopus (112)

C. Lok, C. Ho, R. Chen, Q. He, W. Yu and H. Sun et al.. *J Proteome Res*, 5 (2006), p. 916. | View Record in Scopus | | Full Text via CrossRef | Cited By in Scopus (182)

A. Smetana, K. Klabunde, G. Marchin and C. Sorensen. *Langmuir*, 24 (2008), p. 7457.

P.V. Asharani, G.L.K. Mun, M.P. Hande and S. Valiyaveetil. *ACS Nano*, 3 (2009), p. 279.

M. Banerjee, S. Mallick, A. Paul, A. Chattopadhyay and S.S. Ghosh. *Langmuir*, 26 (2010), p. 5901. |

C. Marambio-Jone and E.M.V. Hoek. *J Nanoparticle Res*, 12 (2010), p. 1531.

J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park and H.J. Lee et al.. *Nanomed-Nanotechnol Biol Med*, 3 (2008), p. 95.

Y. Inoue, M. Hoshino, H. Takahashi, T. Noguchi, T. Murata and Y. Kanzaki et al.. *J Inorg Biochem*, 92 (2002), p. 37.

E.T. Hwang, J.H. Lee, Y.J. Chae, Y.S. Kim, B.C. Kim and B.I. Sang et al..
Small, 4 (2008), p. 746.

P.D. Bragg and D.J. Rainnie. Can J Microbiol, 228 (1974), p. 883.

A.L. Semeykina and V.P. Skulachev. FEBS Lett, 269 (1990), p. 69.

P. Dibrov, J. Dzioba, K.K. Gosink and C.C. Hase. Antimicrob Agents
Chemother, 46 (2002), p. 2668.

W.R. Li, X.B. Xie, Q.S. Shi, H.Y. Zeng, Y.S. Ou-Yang and Y.B. Chen.
Appl Microbiol Biotechnol, 85 (2010), p. 1115.

N.A. Amro, L.P. Kotra, K. Wadu-Mesthrige, A. Bulychev, S. Mobashery
and G. Liu. Langmuir, 16 (2000), p. 2789.

Li et al. (2010) Li et al., 2010 W.R. Li, X.B. Xie, Q.S. Shi, H.Y. Zeng, Y.S.
OU-Yang and Y.B. Chen, Antibacterial activity and mechanism of silver
nanoparticles on Escherichia coli. Appl. Microbiol. Biotechnol., 85 (2010), pp.
1115–1122.

Lee BU, Yun SH, Ji JH, Bae GN (2008) Inactivation of *S. epidermidis*, *B.*
subtilis, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne
silver nanoparticles. J Microbiol Biotechnol 18(1):176–182

Panyam J, Labhasetwar V: Biodegradable nanoparticles for drug and gene
delivery to cells and tissue. Adv Drug Deliv Rev 2003, 55:329-347.

Yen HJ, Hsu SH, Tsai CL: Cytotoxicity and immunological response of gold
and silver nanoparticles of different sizes. Small 2009, 5:1553-1561.

Silver S (2003) Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and
misuses of silver compounds. FEMS Microbiol Rev 27:341–353

Silver S, Phung LT, Silver G (2006) Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:627–634