

«Διερεύνηση Διεπιφανειακών Φαινομένων μεταξύ Βακτηρίων και Βιοϋλικών»

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Υποβληθείσα στο Τμήμα Μηχανολόγων και Αεροναυπηγών Μηχανικών
του Πανεπιστημίου Πατρών

Υπό

Μαρίας Γ. Κατσιογιάννη
Πτυχιούχου Χημικού

ΠΑΤΡΑ 2008

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΠΑΤΡΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΟΛΟΓΩΝ ΚΑΙ ΑΕΡΟΝΑΥΠΗΓΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΜΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«Διερεύνηση Διεπιφανειακών Φαινομένων μεταξύ Βακτηρίων και
Βιοϋλικών»**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Μαρίας Γ. Κατσιογιάννη
Πτυχιούχου Χημικού**

ΠΑΤΡΑ 2008

Πρακτικό εξέτασης της διδακτορικής διατριβής
κ^ας Μαρίας Κατσιογιάννη

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή αποτελούμενη από τα μέλη ΔΕΠ:

- Ιωάννη Αικατερινάρη, Καθηγητή του Τμήματος Μηχαν. & Αερον. Μηχαν., Παν. Πατρών
- Γεώργιο Αθανασίου, Επάκουρο Καθηγητή του Τμήματος Μηχαν. & Αερον. Μηχαν., Παν. Πατρών
- Γεώργιο Βογιατζή, κύριο ερευνητή ΕΙΧΗΜΥΘ
- Χαράλαμπος Γώγος, Καθηγητή του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Πατρών
- Δημήτριο Ματαρά, Αναπλ. Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχαν. Παν. Πατρών
- Ιωάννη Μισιρλή, Καθηγητή του Τμήματος Μηχαν. & Αερον. Μηχαν., Παν. Πατρών
- Ιριδα Σπηλιοπούλου-Σδούγκου, Αναπλ. Καθηγήτρια Τμήματος Ιατρικής Παν. Πατρών

που συγκροτήθηκε με την υπ' αριθμ. 6/1-4-2008 Γενική Συνέλευση με Ειδική Σύνοψη του Τμήματος Μηχαν. & Αερον. Μηχανικών, αφού συνήλθε την Τρίτη 8-4-2008 και ώρα 17.00 στην αίθουσα Συνεδριάσεων του Τμήματος, εξέτασε τη διδακτορική διατριβή που ανέπτυξε η υποψηφία διδάκτωρ Μαρία Κατσιογιάννη με τίτλο «Διερεύνηση διεπιφανειακών φαινομένων μεταξύ βακτηρίων και βιοϋλικών».

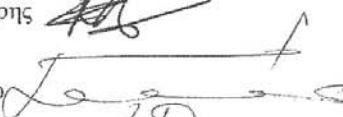
Η Επιτροπή ενέκρινε την διατριβή και βαθμολόγησε αυτή με το βαθμό...**ΑΡΙΣΤΑ**

Η Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ιωάννης Αικατερινάρης



Γεώργιος Αθανασίου



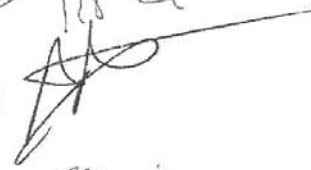
Γεώργιος Βογιατζής




Χαράλαμπος Γώγος



Δημήτριος Ματαράς



Ιωάννης Μισιρλής



Ιριδα Σπηλιοπούλου-Σδούγκου



Στους γονείς μου και τον Wassim

❖ Πρόλογος	1
❖ Σκοπός	3
❖ Δομή της Διατριβής	6
1. Κεφάλαιο 1: Βιοϋλικά, Βακτήρια, Αλληλεπίδραση	
1.1. Βιοϋλικά	12
1.1.1. Κριτήρια Επιλογής Βιοϋλικών	15
1.1.2. Είδη Βιοϋλικών	17
1.1.2.1. Πολυμερή	18
1.1.3. Ιδιότητες Υλικών	24
1.1.3.1. Μηχανικές Ιδιότητες	24
1.1.3.2. Φυσικοχημικές Ιδιότητες	26
1.1.3.3. Τροποποίηση Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων της Επιφάνειας των Βιοϋλικών	29
1.1.3.3.1. Τεχνική Πλάσματος	30
1.1.3.3.2. Αυτό-οργανούμενα Μονοστρωματικά Συστήματα (Self-Assembled Monolayers: SAMs)	37
1.1.4. Εφαρμογές Βιοϋλικών	41
1.1.4.1. Βιοϋλικά-Σκληροί Ιστοί	41
1.1.4.2. Βιοϋλικά-Μαλακοί Ιστοί	42
1.1.4.3. Πρόσθετα Άκρα	45
1.1.4.4. Όργανα για Ιατρική Χρήση	46
1.2. Γενικά Περί Μικροοργανισμών	47
1.2.1. Σταφυλόκοκκοι	52
1.2.2. Ταξινόμηση Σταφυλοκόκκων	54
1.2.3. Ανάπτυξη των Μικροοργανισμών	54
1.2.3.1. Καμπύλη Ανάπτυξης	55
1.2.4. <i>Staphylococcus epidermidis</i>: Συχνότητα και Επιδημιολογία	57
1.2.5. Λοιμώξεις που Προέρχονται από τον <i>Staphylococcus epidermidis</i>	59
1.2.5.1. Γενικά Χαρακτηριστικά των λοιμώξεων	59
1.2.5.2. Ειδικές Λοιμώξεις Προερχόμενες από τον <i>Staphylococcus epidermidis</i>	60
1.2.6. Παθογένεια των λοιμώξεων που προκαλούνται από τον <i>S. epidermidis</i>	63
1.2.7. Στάδια της Προσκόλλησης του <i>S. epidermidis</i> στην	

Επιφάνεια ενός Βιοϋλικού	64
1.2.7.1. Πρώτη Φάση Προσκόλλησης: <i>Μη ειδική προσκόλληση:</i>	
Φυσικοχημικές Αλληλεπιδράσεις Βακτηρίων – Υλικών	65
1.2.7.2. Δεύτερη Φάση Προσκόλλησης: <i>Ειδική προσκόλληση:</i>	
Παραγωγή Εξωκυττάριας Ουσίας (slime)	66
1.3. Παράγοντες που Επιηρεάζουν την Προσκόλληση Βακτηρίων σε Βιοϋλικά	71
1.3.1. Περιβαλλοντικοί Παράγοντες	71
1.3.1.1. Συνθήκες Ροής	71
1.3.1.2. Ιοντική Ισχύς και pH Ρυθμιστικού Διαλύματος	73
1.3.1.3. Αντιβιοτικά	74
1.3.2. Χαρακτηριστικές Επιφανειακές Ιδιότητες Υλικού	74
1.3.2.1. Χημική Σύσταση της Επιφάνειας	74
1.3.2.2. Ηλεκτρικό Φορτίο Επιφάνειας Υλικού	75
1.3.2.3. Υδροφοβικότητα Επιφάνειας Υλικού	75
1.3.2.4. Τραχύτητα επιφάνειας	77
1.3.2.5. Τοπογραφία Επιφάνειας Υλικού	78
1.3.3. Χαρακτηριστικά Επιφάνειας Βακτηρίων	79
1.3.3.1. Υδροφοβικότητα Βακτηρίων	79
1.3.3.2. Ηλεκτρικό Φορτίο Βακτηριακής Επιφάνειας	80
1.3.3.3. Βιολογικοί Παράγοντες Επιφάνειας Βακτηρίου	80
1.3.4. Πρωτεΐνες ορού ή ιστών	80
1.3.4.1. Ινωδεκτίνη	81
1.3.4.2. Αλβουμίνη	81
1.3.4.3. Ινωδογόνο	81
1.3.4.4. Θρομβίνη	82
1.3.4.5. Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP)	82
1.3.4.6. Αιμοπετάλια	82
1.4. Τεχνικές που Χρησιμοποιούνται για την Αξιολόγηση της Βακτηριακής Προσκόλλησης	84
1.4.1. Μικροσκόπια για τον Υπολογισμό και τη Μορφολογική Παρατήρηση των Προσκολλημένων Βακτηρίων	84
1.4.2. Μέθοδοι Μέτρησης Ζώντων Βακτηρίων	87
1.4.3. Άλλες Άμεσες και Έμμεσες Μέθοδοι	88
1.4.4. Μέθοδος Εκτίμησης Βλεννώδους Εξωκυττάριας Ουσίας (Slime) ή Βιομεμβράνης (Biofilm)	88

2. Κεφάλαιο 2: Θεωρητικές Προσεγγίσεις-Τεχνικές	
2.1. Θεωρητικές Προσεγγίσεις των Αλληλεπιδράσεων Βακτηρίων-Υλικών	91
2.1.1. Θεωρίες Κολλοειδών Σωματιδίων	91
2.1.1.1. Θερμοδυναμική Θεωρία	92
2.1.1.1.1. Προσέγγιση Dispersion-Polar (Διασποράς-Πολικής)	93
2.1.1.1.2. Προσέγγιση Lifshitz-van der Waals/Acid-B	95
2.1.1.2. Θεωρία DLVO	97
2.1.1.3. Θεωρία Εκτεταμένης DLVO	99
2.1.1.4. Μετρήσεις	102
2.1.1.5. Αλληλεπιδράσεις Εκτεταμένης DLVO μεταξύ Σφαιρών και Αυξημένης Τραχύτητας Επιφανειών	104
2.1.2. Προσέγγιση Βακτηριακής Προσκόλλησης μέσω Μακρομοριακών Δεσμών	105
2.1.2.1. Δύναμη Προσκόλλησης	107
2.2. Τεχνικές που Χρησιμοποιούνται για τον Υπολογισμό των Αλληλεπιδράσεων Βακτηρίων-Υλικών	110
2.2.1. Στατικές Δοκιμές	110
2.2.2. Αίθουσες Ροής Παράλληλων-Πλακών (Parallel-Plate Flow Chambers)	111
2.2.3. Αίθουσα Ακτινικής Ροής (Radial Flow Chamber, RFC)	112
2.2.4. Περιστρεφόμενος Δίσκος	113
2.2.5. Υδροδυναμικές Δυνάμεις	114
2.2.6. Ισορροπία των Δυνάμεων και των Ροπών	116
2.2.7. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM)	118
3. Κεφάλαιο 3: Υλικά και Μέθοδοι	
3.1. Υλικά	121
3.2. Χαρακτηρισμός Υλικών	121
3.2.1. Μελέτη της Αέριας Φάσης του Πλάσματος και της Αλληλεπίδρασής της με την Επιφάνεια του Πολυμερούς	121
2.1.1.1. Ηλεκτρικές Μετρήσεις	121
2.1.1.2. Οπτικές Μετρήσεις	122
2.1.1.3. Ανακλαστική Συμβολομετρία Laser	122
3.2.2. Μελέτη της Τοπογραφίας και της Τραχύτητας των Υλικών-Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης	122
3.2.3. Μελέτη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφάνειας Υλικών	123
2.3.3.1. Μετρήσεις Γωνιών Διαβροχής-Υπολογισμός Επιφανειακής Ενέργειας	123

3.2.3.2. Φασματοσκοπία Φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS)	123
3.2.3.3. Μικροηλεκτροφόρηση για τον Υπολογισμό του Δυναμικού ζ	123
3.3. Βακτήρια	124
3.3.1. Στελέχη Βακτηρίων	124
3.3.2. Ταυτοποίηση Κλινικού Βακτηριακού Στελέχους	124
3.3.3. Προετοιμασία Βακτηρίων για την Πειραματική Διαδικασία	125
3.3.4. Μελέτη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφάνειας Βακτηρίων	126
3.3.4.1. Μετρήσεις Γωνιών Διαβροχής-Υπολογισμός Επιφανειακής Ενέργειας	126
3.3.4.2. Μικροηλεκτροφόρηση για τον Υπολογισμό του Δυναμικού ζ	126
3.4. Διατάξεις Ροής	127
3.4.1. Αίθουσα Ροής Παράλληλων Πιάτων (Parallel Plate Flow Chamber)	127
3.4.2. Αίθουσα Ακτινικής Ροής (Radial Flow Chamber)	128
3.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης	130
3.5.1. Μέθοδος Μέτρησης του Αριθμού των Ζώντων Προσκολλημένων στην Επιφάνεια Βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs)	130
3.5.2. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy: SEM)	130
3.5.3. Μικροσκόπιο φθορισμού, Image analysed Epifluorescence Microscopy (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)	131
3.5.4. Μικροσκόπιο Συνεστιακής Σάρωσης (Scanning Confocal Laser Microscopy: SCLM)	132
3.5.5. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscope: AFM)	133
3.6. Μελέτη της Έκφρασης των Γονιδίων <i>ica</i> Προσκολλημένων Βακτηρίων και Βακτηρίων του Εναιωρήματος που Έχουν Έρθει σε Επαφή με το προς Μελέτη Υλικό	133
3.7. Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων	134
4. Κεφάλαιο 4:(PVC) Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυβινυλοχλωριδίου με Τεχνικές Πλάσματος και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση των Βακτηρίων.	138
4.1. Υλικά και Μέθοδοι	141
4.1.1. Υλικά	141
4.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών	142

4.1.3. Βακτήρια	143
4.1.4. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης	143
4.2. Αποτελέσματα	144
4.2.1. Υλικά	144
4.2.1.1. Πάχος Υμενίου που Εναποτέθηκε	144
4.2.1.2. Τοπογραφία-Τραχύτητα- Γωνίες Διαβροχής	145
4.2.1.3. Χημική Σύσταση Επιφάνειας-XPS	148
4.2.2. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων – Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων των Υλικών	150
4.2.3. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων – Ρυθμού Διάτμησης	153
5. Κεφάλαιο 5:(PET) Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα με Τεχνική Πλάσματος, του Φαινομένου Γήρανσης και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση των Βακτηρίων.	159
5.1. Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα σε Εκκενώσεις He/O ₂ και CH ₄ /H ₂ στην Προσκόλληση των Βακτηρίων	166
5.1.1. Υλικά και Μέθοδοι	166
5.1.1.1. Υλικά	166
5.1.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών	168
5.1.1.3. Βακτήρια	168
5.1.1.4. Χαρακτηρισμός Βακτηρίων	168
5.1.1.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης	168
5.1.2. Αποτελέσματα	169
5.1.2.1. Υλικά	169
5.1.2.1.1. Ρυθμός Εγχάραξης και Εναπόθεσης	170
5.1.2.1.2. Τοπογραφία-Τραχύτητα- Γωνίες Διαβροχής-Επιφανειακή Ενέργεια	171
5.1.2.2. Προσκόλληση Βακτηρίων	177
5.1.2.3. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων-Επιφανειακής Ενέργειας Υλικών	180
5.1.2.4. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων-Θερμοδυναμικής Θεωρίας: Προσέγγιση Dispersion-Polar	183
5.2. Μελέτη της Επίδρασης του Φαινομένου της Γήρανσης Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα σε Εκκενώσεις He/O ₂ και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση	

των Βακτηρίων	
5.2.1. Υλικά και Μέθοδοι	188
5.2.1.1. Υλικά	188
5.2.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών	189
5.2.1.3. Βακτήρια	189
5.2.1.4. Χαρακτηρισμός Βακτηρίων	189
5.2.1.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης	190
5.2.2. Αποτελέσματα	190
5.2.2.1. Υλικά	190
5.2.2.1.1. Ρυθμός Εγγάραξης- Τοπογραφία-Τραχύτητα	190
5.2.2.1.2. Γωνίες Διαβροχής-Επιφανειακή Ενέργεια	191
5.2.2.1.3. Χημική Σύσταση Επιφάνειας-XPS	194
5.2.2.2. Προσκόλληση Βακτηρίων	201
5.2.2.3. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων-Επιφανειακής Ενέργειας Υλικών-Ρυθμού Διάτμησης	205
5.2.2.4. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων – Θερμοδυναμικής Θεωρίας Προσεγγίσεις Dispersion-Polar και Lifshitz-van der Waals/Acid-Base - Ρυθμού Διάτμησης	211
6. Κεφάλαιο 6: (SAMs) Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Γυαλιού, Επιφανειακά Τροποποιημένου Γυαλιού, με Αυτο-Οργανούμενα Μονοστρωματικά Συστήματα, και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση των Βακτηρίων και στην Έκφραση των Γονιδίων <i>ica</i>.	218
6.1. Υλικά και Μέθοδοι	220
6.1.1. Υλικά	220
6.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών	222
6.1.3. Βακτήρια	223
6.1.4. Χαρακτηρισμός Βακτηρίων	223
6.1.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης	223
6.1.6. Μελέτη της Έκφρασης των Γονιδίων <i>ica</i>	224
6.2. Αποτελέσματα	224
6.2.1. Υλικά	
6.2.1.1. Τοπογραφία-Τραχύτητα	224
6.2.1.2. Γωνίες Διαβροχής-Επιφανειακή Ενέργεια-Δυναμικό ζ	226
6.2.1.3. Χημική Σύσταση Επιφάνειας-XPS	230

6.2.2. Αποτελέσματα Βακτηριακής Προσκόλλησης	233
6.2.2.1. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης- Θερμοδυναμικής Θεωρίας	233
6.2.2.2. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης- Θεωρίας DLVO	236
6.2.2.3. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης- Θεωρίας Εκτεταμένης DLVO	238
6.2.2.4. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης- Ρυθμού Διάτμησης-Θεωρίας Εκτεταμένης DLVO	240
6.2.3. Αποτελέσματα Έκφρασης Γονιδίων <i>ica</i>	247
7. Κεφάλαιο 7 (Συζήτηση)	251

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ:

1. Παράρτημα 1: Ροή

1.1. Η Έννοια του Ρευστού	269
1.2. Ιδιότητες των Ρευστών – Υπόθεση του Συνεχούς Μέσου	272
1.3. Τύποι Ροής	273
1.3.1. Συμπίεστη και Ασυμπίεστη Ροή	273
1.3.2. Γραμμική (στρωτή) και Τυρβώδης (στροβιλώδης) Ροή.	273
1.3.3. Ανιζώδης και Ιζώδης Ροή – Συνθήκη μη Ολίσθησης.	275
1.3.4. Μονοδιάστατη, Διδιάστατη και Τρισδιάστατη Ροή	275
1.3.5. Σταθερή και Μεταβατική Ροή	276
1.4. Θεμελιώδεις Νόμοι της Ρευστομηχανικής	276
1.5. Ρυθμός Μεταβολής της Ροής	277
1.5.1. Ρυθμός μεταβολής της μάζας	277
1.5.2. Παροχή	277
1.5.3. Μέση Ταχύτητα	278

2. Παράρτημα 2: Αντιδραστήρας Πλάσματος

2.1. Αντιδραστήρας Πλάσματος	280
2.2. Ηλεκτρικές Μετρήσεις	280
2.3. Ανακλαστική Συμβολομετρία Laser	281

3. Παράρτημα 3: Μικροσκόπια

3.1. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy: S.E.M.)	283
3.2. Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy: A.F.M.)	284
3.3. Μικροσκόπιο Φθορισμού	287
3.4. Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Scanning Confocal Laser Microscope: SCLM)	289

4. Παράρτημα 4: Γωνιόμετρο, XPS, Z-sizer, Προφιλόμετρο

4.1. Γωνιόμετρο - Μέτρηση Γωνίας Επαφής	295
4.2. Φασματοσκοπία Φωτοηλεκτρονίων από Ακτίνες X (XPS)	298
4.3. Μικροηλεκτροφορηση (Zetasizer)	300
4.4. Προφιλόμετρο Ακίδας	302

5. Παράρτημα 5: Μελέτη έκφρασης γονιδίων *ica*

5. Μελέτη της Έκφρασης των Γονιδίων <i>ica</i> με Αντίστροφη Μεταγραφή και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (RT PCR)	305
5.1. Αποκόλληση Προσκολλημένων Βακτηρίων και Απομόνωση RNA	305
5.2. Σύνθεση cDNA – Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription)	306
5.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)	308
5.4. Ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR (Quantitative Real-Time PCR, QRT-PCR)	309
5.4.1. Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Real-Time Absolute QRT-PCR)	309

Βιβλιογραφία	312
Περίληψη	338
Δημοσιεύσεις	340

Πρόλογος

Η ιατρική πρακτική αξιοποιεί σήμερα ένα μεγάλο αριθμό εμφυτευμάτων, συσκευών και τεχνητών οργάνων με σκοπό τη διάγνωση και θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Βιοϋλικά, με τη μορφή εμφυτευμάτων, όπως αντικαταστάτες αρθρώσεων και συνδέσμων, μοσχεύματα αρτηριών, βαλβίδες καρδιάς, χειρουργικά ράμματα, ενδοφθάλμιοι φακοί, φακοί επαφής και οδοντικά εμφυτεύματα, και με τη μορφή ιατρικών συσκευών, όπως βηματοδότες, καθετήρες, βιοαισθητήρες, τεχνητά αιμοφόρα αγγεία, ακόμα και τεχνητές καρδιές, χρησιμοποιούνται ευρέως για να αντικαταστήσουν ή να βελτιώσουν τη λειτουργία τραυματισμένων ή εκφυλισμένων ιστών ή οργάνων, να βοηθήσουν στη θεραπεία, να διαγνώσουν και να διορθώσουν μη φυσιολογικές αποκρίσεις και επομένως να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών.

Ο όρος «βιοϋλικό» έχει συνδεθεί άμεσα με τον όρο «βιοσυμβατότητα», ο οποίος σημαίνει ότι το υλικό πρέπει να γίνει δεκτό και να ενσωματωθεί στον οργανισμό με τρόπο ελεγχόμενο και προβλέψιμο, χωρίς να προκαλεί αρνητικές αντιδράσεις. Ο όρος «βιοσυμβατότητα» λοιπόν αναφέρεται στην συμβατότητα της επιφάνειας του υλικού με τον ιστό ξενιστή, εννοώντας τη χημική, βιολογική και φυσική καταλληλότητα του εμφυτεύματος για τον κάθε ιστό, προκειμένου να εξασφαλίζεται η αρμονική συμβίωση βιοϋλικού και ζώντος οργανισμού (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”).

Η καταλληλότερη αλληλεπίδραση βιοϋλικού και οργανισμού-ιστού επιτυγχάνεται όταν εξασφαλίζεται παράλληλα η συμβατότητα δομής (*μηχανικές ιδιότητες*) και επιφάνειας του υλικού (*βιοσυμβατότητα*) με τον ιστό τον οποίο πρόκειται να αντικαταστήσει ή να βελτιώσει τη λειτουργία του.

Παρότι τα περισσότερα εμφυτεύματα και οι ιατρικές συσκευές εκπληρώνουν ικανοποιητικά το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιούνται, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών ή ακόμα και σώζοντας ζωές, συχνά δημιουργούν επιπλοκές και προβλήματα που αυξάνουν τη νοσηρότητα, το κόστος νοσηλείας αλλά και τη θνησιμότητα. Τα σημαντικότερα προβλήματα που σχετίζονται με την χρήση εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών, και που εμποδίζουν την μακροχρόνια χρήση τους, προκύπτουν από μηχανική αστοχία του βιοϋλικού (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”, Cooke, 2004), θρόμβωση

περιοχών όπου αυτό έχει εμφυτευθεί (Hanson, Hanson και Ratner 2004), αλλά και από την εμφάνιση νοσοκομειακών σηψαιμικών επεισοδίων σχετιζόμενων με λοιμώξεις που προκαλούνται από την χρήση βιοϋλικών (Ratner και Hoffman, “Non-fouling Surfaces”, 2004; Costerton et al., 2004). Σε αυτές τις περιπτώσεις η απομάκρυνσή τους από το ανθρώπινο σώμα και η τοποθέτηση νέου κρίνεται αναγκαία.

Η αυξανόμενη συχνότητα λοιμώξεων προερχόμενων από πηκτάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους, και κυρίως από τον *S. epidermidis*, σχετίζεται άμεσα με την παρουσία κάποιου βιοϋλικού σε ποσοστό 70% (von Eiff et al., 2002; Vincent, 2003).

Παρότι ο *S. epidermidis*, όπως και οι περισσότεροι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννογόνων, αποτελεί πλέον συχνό αιτιολογικό παράγοντα νοσοκομειακών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. epidermidis* περιλαμβάνουν την ενδοκαρδίτιδα σε προσθετικές βαλβίδες, λοιμώξεις ενδοφλέβιων καθετήρων, προσθετικών αρθρώσεων καθώς και του ουροποιητικού συστήματος παρουσία καθετήρων, άρα σχετίζονται άμεσα με την παρουσία εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών (Δημητρακόπουλος, 1987).

Ο *S. epidermidis*, δεν έχει την ικανότητα παραγωγής τοξινών και ενζύμων, άρα η παθογένεια του αποδίδεται στην ικανότητά του να προσκολλάται στην επιφάνεια του βιοϋλικού, να παραμένει εκεί και να πολλαπλασιάζεται κάτω από ένα προστατευτικό κάλυμμα εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας, που ο ίδιος παράγει και ονομάζεται γλυκοκάλυκας ή “slime”.

Με δεδομένο ότι η εκτεταμένη χορήγηση ευρέος φάσματος αντιβιοτικών, για την πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς, έχει οδηγήσει στην επικράτηση πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών της φυσιολογικής χλωρίδας (Jones et al., 1996), η κατασκευή αντιβακτηριακών ή και βακτηριοστατικών βιοϋλικών κρίνεται επιβεβλημένη.

Για το σκοπό αυτό απαραίτητη είναι η μελέτη και η κατανόηση του μηχανισμού προσκόλλησης των βακτηρίων στην επιφάνεια του βιοϋλικού. Συγκεκριμένα, είναι απαραίτητη η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίων και βιοϋλικών, και των παραγόντων που τις επηρεάζουν, προκειμένου να κατανοηθεί η αιτία της προσκόλλησης αλλά και να βρεθούν τρόποι προκειμένου να αποφευχθεί.

Σκοπός

Δεδομένου ότι η προσκόλληση των βακτηρίων σε βιοϋλικά είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως τις ιδιότητες των βακτηρίων, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του βιοϋλικού, αλλά και τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, δηλαδή τις συνθήκες ροής και την παρουσία πρωτεϊνών, η σχετική συνεισφορά αυτών των παραμέτρων και οι θεμελιώδεις μηχανισμοί που κυβερνούν τη βακτηριακή προσκόλληση είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητοί.

Σε αυτή την κατεύθυνση, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το φαινόμενο της βακτηριακής προσκόλλησης.

Αρχικά έγινε μία εκτενής μελέτη της βιβλιογραφίας, προκειμένου να διαπιστωθεί σε ποιο στάδιο βρίσκεται η κατανόηση των μηχανισμών της βακτηριακής προσκόλλησης, οπότε διαπιστώσαμε ότι η μελέτη της διεπιφάνειας βακτηρίων-βιοϋλικών παραμένει στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος. Αν και ποιοτικά έχουν διερευνηθεί εκτενώς οι αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-βιοϋλικών, η γνώση της σχετικής συνεισφοράς των φυσικοχημικών και βιοφυσικών πτυχών, η ποσοτική πρόβλεψη και ο έλεγχος της βακτηριακής προσκόλλησης δεν έχουν ακόμη επιτευχθεί.

Έχοντας κατανοήσει τι είναι βακτήριο και ποιες είναι οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του βιοϋλικού που πιθανότατα εμπλέκονται στην αλληλεπίδραση βακτηρίων-υλικών, διερευνήσαμε την επίδραση των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών, του ρυθμού διάτμησης και της σχετικής συνεισφοράς τους στην ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στην επιφάνεια του βιοϋλικού αλλά και να ενεργοποιούν τα γονίδια *ica* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της εξωκυττάριας βλενώδους ουσίας (slime) και συγκεκριμένα μιας πολυσακχαρικής φύσεως προσκολλητίνης (polysaccharide intercellular adhesin, PIA). Ελέγξαμε επίσης εάν οι θεωρίες κολλοειδών συστημάτων, και συγκεκριμένα η θερμοδυναμική, η DLVO και η εκτεταμένη DLVO μπορούν να εξηγήσουν τα πειραματικά αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση μειώνεται με την αύξηση της επιφανειακής ενέργειας και του πολικού χαρακτήρα των υλικών, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά από το μη πολικό τους χαρακτήρα. Η θερμοδυναμική θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά τα αποτελέσματα για υψηλής ιοντικής ισχύος διαλύματα, ενώ η

DLVO για χαμηλής. Η εκτεταμένη DLVO θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά την επίδραση της φυσικοχημείας τόσο του διαλύματος όσο και της επιφάνειας στη βακτηριακή προσκόλληση. Η αύξηση του ρυθμού διάτμησης μείωσε την προσκόλληση των βακτηρίων με τρόπο που εξαρτώνταν από τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών, ενώ παράλληλα μείωσε την προβλεψιμότητα των παραπάνω θεωριών. Επομένως, η βακτηριακή προσκόλληση θεωρήθηκε ως αποτέλεσμα του συνδιασμού φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμού μακρομοριακών δεσμών. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ica* έδειξαν ότι η έκφρασή τους αυξάνεται με την μείωση της επιφανειακής ενέργειας του υλικού και την αύξηση του ρυθμού διάτμησης.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις **ευχαριστίες** μου σε όσους στάθηκαν συμπαραστάτες σε αυτή την προσπάθεια.

Στον επιβλέποντα Καθηγητή Ι.Φ. Μισιρλή, για την ανάθεση του θέματος, την εμπιστοσύνη, την καθοδήγηση, την οικονομική υποστήριξη που μου επέτρεψε να ασχοληθώ αποκλειστικά με την εκπόνηση της διατριβής, ακόμα και την πίεση που μου άσκησε όταν αυτή κρίθηκε απαραίτητη. Κυρίως όμως θέλω να τον ευχαριστήσω για το ότι με δίδαξε ένα τρόπο σκέψης και διερεύνησης των φαινομένων σε βάθος.

Στην Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Ι. Σπηλιοπούλου, για το ότι μου μετέδωσε τις γνώσεις και την εμπειρία της στη Μικροβιολογία, το συνεχές ενδιαφέρον της, τη συνεργασία της στη μελέτη των γονιδίων και κυρίως γιατί με φιλοξένησε όλα αυτά τα χρόνια στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας για τα απαραίτητα για την διατριβή πειράματα.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή Δ. Ματαρά, για τη συνεργασία του στο κομμάτι που αφορούσε την τροποποίηση πολυμερών υλικών με τεχνικές πλάσματος.

Στον Καθηγητή Ι. Αικατερινάρη, για τις πολύ χρήσιμες υποδείξεις και διορθώσεις του στο κομμάτι που αφορούσε τη μελέτη της επίδρασης της ροής στην προσκόλληση των βακτηρίων.

Στον Επίκουρο Καθηγητή Γ. Αθανασίου, για τη συμπαράστασή του καθόλη τη διάρκεια της διατριβής, της διορθώσεις και παρατηρήσεις του σχετικά με τη μελέτη της ροής.

Στον Καθηγητή Χ. Γώγο, για τη συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή, τη συμπαράσταση και τις παρατηρήσεις του σχετικά με το μικροβιολογικό τμήμα της διατριβής.

Στον Ερευνητή Γ. Βογιατζή, για τις υποδείξεις και την κριτική διόρθωση του κειμένου.

Στον Καθηγητή Π. Κουτσούκο γιατί μου έδωσε την δυνατότητα να πραγματοποιήσω κάποιες μετρήσεις με το zeta sizer στο ΕΙΧΗΜΥΘ. Στον χειριστή του Μικροσκοπίου Ηλεκτρονικής Σάρωσης Βασίλη Κωτσόπουλο για τις ώρες που αφιέρωσε για τη μελέτη των δειγμάτων μου και στους Δρ. Ε. Αμανατίδη και Dr. Dowling για τη συνεργασία τους στο κομμάτι της τροποποίησης πολυμερών υλικών με τεχνικές πλάσματος.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας καθώς και του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας για το αρμονικό κλίμα εργασίας. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω τις Α. Μουτζούρη και Α. Φωκά για τη συμπαράσταση και συνεργασία.

Τελειώνοντας θα ήθελα να πω ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στους Γονείς μου, τους Θεούς Χριστίνα και Σταύρο και στον Wassim Al Fares για την αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση τους.

Δομή της Διατριβής

Η διατριβή αυτή αποτελείται από Επτά Κεφάλαια.

Το Πρώτο Κεφάλαιο χωρίζεται σε τέσσερα υποκεφάλαια. Στο πρώτο υποκεφάλαιο περιγράφονται η έννοια του βιοϋλικού, τα κριτήρια επιλογής, οι κατηγορίες, οι ιδιότητες, οι τρόποι αλλαγής των επιφανειακών ιδιοτήτων και οι εφαρμογές των βιοϋλικών. Στο δεύτερο υποκεφάλαιο περιγράφονται τα γενικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων, οι τρόποι ταξινόμησής τους, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. epidermidis* και πώς αυτές σχετίζονται με την παρουσία βιοϋλικών, η παθογένεια των λοιμώξεων και τα στάδια προσκόλλησης των βακτηρίων στα βιοϋλικά. Στο τρίτο υποκεφάλαιο περιγράφονται οι παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή προσκόλληση. Σε αυτό το υποκεφάλαιο γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση πειραματικών μελετών που διερευνούν το πώς οι βακτηριακές ιδιότητες, η φυσικοχημεία της επιφάνειας του υλικού και περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως οι συνθήκες ροής, το pH και η ιοντική ισχύς του διαλύματος, η παρουσία πρωτεϊνών ή αντιβιοτικών, επηρεάζουν την βακτηριακή προσκόλληση. Στο τέταρτο υποκεφάλαιο γίνεται μια ανασκόπηση των τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης.

Το Δεύτερο Κεφάλαιο αποτελείται από δύο υποκεφάλαια. Στο πρώτο υποκεφάλαιο περιγράφονται οι θεωρητικές προσεγγίσεις που έχουν προταθεί για την εξήγηση πειραματικών αποτελεσμάτων που σχετίζονται με προσκόλληση βακτηρίων σε υλικά, αλλά και για την πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών. Με δεδομένο ότι τα βακτήρια έχουν διαστάσεις κολλοειδών (περίπου 1 μm διάμετρο) αλλά και ότι, αρχικά τουλάχιστον, αλληλεπιδρούν με το υλικό μέσω φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων, τα μοντέλα που έχουν προταθεί είναι βασισμένα κατά κύριο λόγο στις θεωρίες κολλοειδών συστημάτων και συγκεκριμένα την θερμοδυναμική, την DLVO και την εκτεταμένη DLVO. Εξαιτίας όμως του το ότι οι επιφάνειες των βακτηρίων αποτελούνται από μακρομόρια τα οποία επίσης συμβάλλουν στην προσκόλληση έχουν προταθεί και μοντέλα που περιγράφουν την προσκόλληση μέσω μακρομοριακών δεσμών. Στο δεύτερο υποκεφάλαιο περιγράφονται οι τεχνικές που έχουν προταθεί και χρησιμοποιούνται για την ποσοτικοποίηση των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-βιοϋλικών, και αναπτύσσεται η έννοια της ροής.

Στο Τρίτο Κεφάλαιο περιγράφονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διατριβής. Συγκεκριμένα, περιγράφονται τα βιοϋλικά, τα βακτηριακά στελέχη, οι τεχνικές χαρακτηρισμού των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας βιοϋλικών και βακτηρίων, οι διατάξεις σχηματισμού ροής και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης και της έκφρασης των γονιδίων.

Στο Τέταρτο Κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων, σε διάφορους ρυθμούς διάτμησης, σε υμένια Πολυβινυλοχλωριδίου (Poly Vinyl Chloride: PVC) και επιφανειακά τροποποιημένου PVC σε εκκενώσεις ραδιοσυχνότητας (Radiofrequency: RF): CF_4/H_2 και $\text{C}_2\text{H}_2/\text{He}$, σε εκκενώσεις ατομικής δέσμης (Atom Beam: AB) C_2H_2 και σε εκκενώσεις συνδυασμού ατομικής δέσμης-επιμετάλλωσης προσανατολισμένης με μαγνήτες (Atom Beam-Magnetron Sputtering): Ag και Ag/ C_2H_2 . Η τροποποίηση των υμενίων παραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα πλάσματος που βρίσκεται στο Τμήμα Ηλεκτρολόγων και Μηχανολόγων Μηχανικών του Πανεπιστημίου του Δουβλίνου, από τον Dr D.P. Dowling.

Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών και του ρυθμού διάτμησης στη βακτηριακή προσκόλληση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση ήταν μειωμένη σε όλα τα τροποποιημένα με πλάσμα υλικά εκτός από την περίπτωση του CF_4/H_2 . Η μέγιστη μείωση παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του τροποποιημένου με άργυρο (Ag) PVC. Σε όλα τα υλικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 σε 2000 ανά s.

Στο Πέμπτο Κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων σε υμένια Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα (Polyethylene Terephthalate: PET) και επιφανειακά τροποποιημένου PET σε εκκενώσεις He/O_2 και CH_4/H_2 . Στην περίπτωση των τροποποιημένων υμενίων PET σε εκκενώσεις He/O_2 μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου γήρανσης τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας όσο και στην προσκόλληση των βακτηρίων, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες.

Η τροποποίηση των υμενίων παραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα πλάσματος που βρίσκεται στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πλάσματος του Τμήματος των Χημικών

Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κο Ματαρά και τον Επιστημονικό συνεργάτη-Διδάκτορα Κο Αμανατίδη.

Το κεφάλαιο αυτό χωρίζεται σε δύο υποκεφάλαια. Το πρώτο υποκεφάλαιο (5.1.) περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της βακτηριακής προσκόλλησης, κάτω από στατικές συνθήκες, σε υμένα Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα (PET) και επιφανειακά τροποποιημένου PET σε εκκενώσεις He/O₂ και CH₄/H₂. Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάζεται η επίδραση των συνθηκών της εκκένωσης στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας των υμενίων και στο πώς αυτές επηρεάζουν τη βακτηριακή προσκόλληση.

Στο δεύτερο υποκεφάλαιο (5.2.) μελετάται το φαινόμενο της γήρανσης στο οποίο υπόκεινται τα επιφανειακά τροποποιημένα υμένα PET σε εκκενώσεις He και He/O₂, και το πώς αυτό επηρεάζει την προσκόλληση των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, μελετάται η επίδραση του χρόνου γήρανσης τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού όσο και στην προσκόλληση των βακτηρίων, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες.

Και στα δύο υποκεφάλαια γίνεται μία προσπάθεια εξήγησης των πειραματικών αποτελεσμάτων μέσω της Θερμοδυναμικής Θεωρίας.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση μειώνεται με την αύξηση της επιφανειακής ενέργειας και του πολικού χαρακτήρα των υλικών, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά από το μη πολικό τους χαρακτήρα, ο οποίος άλλωστε δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διαδικασία των τροποποιήσεων αλλά και του χρόνου γήρανσης. Και οι δύο προσεγγίσεις της Θερμοδυναμικής Θεωρίας «dispersion-polar» και «Lifshitz van der Waals- Acid Base» εξήγησαν ικανοποιητικά την παρατηρούμενη προσκόλληση με την «dispersion-polar» να υπερέχει. Η δεύτερη προσέγγιση ανέδειξε τη σημασία του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα υλικών και βακτηρίων στην προσκόλληση. Αύξηση του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα της επιφάνειας των υλικών προκάλεσε μείωση της προσκόλλησης. Ο ρυθμός διάτμησης αποδείχτηκε ως ένας επίσης παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται και μάλιστα μειώνει την προβλεψιμότητα της Θερμοδυναμικής Θεωρίας.

Στο Έκτο Κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων σε γυαλί (OH) και επιφανειακά τροποποιημένο γυαλί με αυτό-οργανούμενα μονοστρωματικά συστήματα (Self-Assembled Monolayers: SAMs) με τελικές ομάδες

αμίνης (NH₂) και μεθυλίου (CH₃). Σκοπός ήταν η μελέτη της σχετικής συνεισφοράς των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών και του ρυθμού διάτμησης στη βακτηριακή προσκόλληση αλλά και στην έκφραση των γονιδίων *ica* που κωδικοποιούν την παραγωγή μιας πολυσακχαριδικής φύσεως προσκολλητίνης (polysaccharide intercellular adhesin, PIA).

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Μικροβιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κα Ίριδα Σπηλιοπούλου και την Υποψήφια Διδάκτορα Κα Αντιγόνη Φωκά.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσκόλληση των βακτηρίων, τόσο του πρότυπου slime-θετικού στελέχους όσο και του πρότυπου slime-αρνητικού, ήταν αυξημένη στο υπόστρωμα CH₃, σε σχέση με το υπόστρωμα NH₂ και κυρίως με το γυαλί. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος αύξησε την βακτηριακή προσκόλληση, κυρίως στο γυαλί, εξαιτίας της μείωσης των απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η θερμοδυναμική θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά τα αποτελέσματα για υψηλής ιοντικής ισχύος διαλύματα, ενώ η DLVO για χαμηλής. Η εκτεταμένη DLVO θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά την επίδραση της φυσικοχημείας τόσο του διαλύματος όσο και της επιφάνειας στη βακτηριακή προσκόλληση. Η αύξηση του ρυθμού διάτμησης μείωσε την προσκόλληση των βακτηρίων με τρόπο που εξαρτώνταν από τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών, ενώ παράλληλα μείωσε την προβλεψιμότητα των παραπάνω θεωριών. Επομένως, η βακτηριακή προσκόλληση θεωρήθηκε ως αποτέλεσμα του συνδιασμού φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμού μακρομοριακών δεσμών.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ica* έδειξαν ότι η έκφρασή τους ήταν συνάρτηση τόσο της φυσικοχημείας του υλικού όσο και του ρυθμού διάτμησης.

Το Έβδομο Κεφάλαιο Περιλαμβάνει τη Συζήτηση.

Ακολουθούν Πέντε Παραρτήματα.

Στο Πρώτο Παράρτημα περιγράφονται κάποια γενικά στοιχεία της ροής των ρευστών. Αυτό, σε συνδυασμό με κάποιους ορισμούς θα βοηθήσει στο να γίνει

αντιληπτό στον αναγνώστη το αντικείμενο της ροής ρευστών χωρίς να υπεισέλθουμε σε λεπτομέρειες.

Στο Δεύτερο Παράρτημα περιγράφεται συνοπτικά ο αντιδραστήρας πλάσματος και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης αέριας φάσης και επιφάνειας υλικού.

Στο Τρίτο Παράρτημα περιγράφονται οι αρχές λειτουργίας των μικροσκοπίων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της διατριβής και συγκεκριμένα του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM), του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), του μικροσκοπίου φθορισμού και του μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης (SCLM).

Στο Τέταρτο Παράρτημα περιγράφονται οι αρχές λειτουργίας των τεχνικών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας βακτηρίων και υλικών και συγκεκριμένα του γωνιομέτρου, της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS), και της μικροηλεκτροφόρησης για τον υπολογισμό του δυναμικού ζ.

Στο Πέμπτο Παράρτημα περιγράφονται οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του RNA και την αντίστροφη μεταγραφή, και η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT PCR).

Στη συνέχεια παρατίθεται η Βιβλιογραφία.

Κεφάλαιο Πρώτο

Βιοϋλικά, Βακτήρια, Παράγοντες που Επηρεάζουν την Προσκόλληση των Βακτηρίων στα Βιοϋλικά και Τεχνικές που Χρησιμοποιούνται για την Αξιολόγηση της Βακτηριακής Προσκόλλησης

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται η έννοια του βιοϋλικού, των βακτηρίων, οι παράγοντες που επηρεάζουν την βακτηριακή προσκόλληση και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγησή της.

1.1. Βιοϋλικά

Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφονται η έννοια του βιοϋλικού, τα κριτήρια επιλογής, οι κατηγορίες, οι ιδιότητες, οι τρόποι αλλαγής των επιφανειακών ιδιοτήτων και οι εφαρμογές των βιοϋλικών.

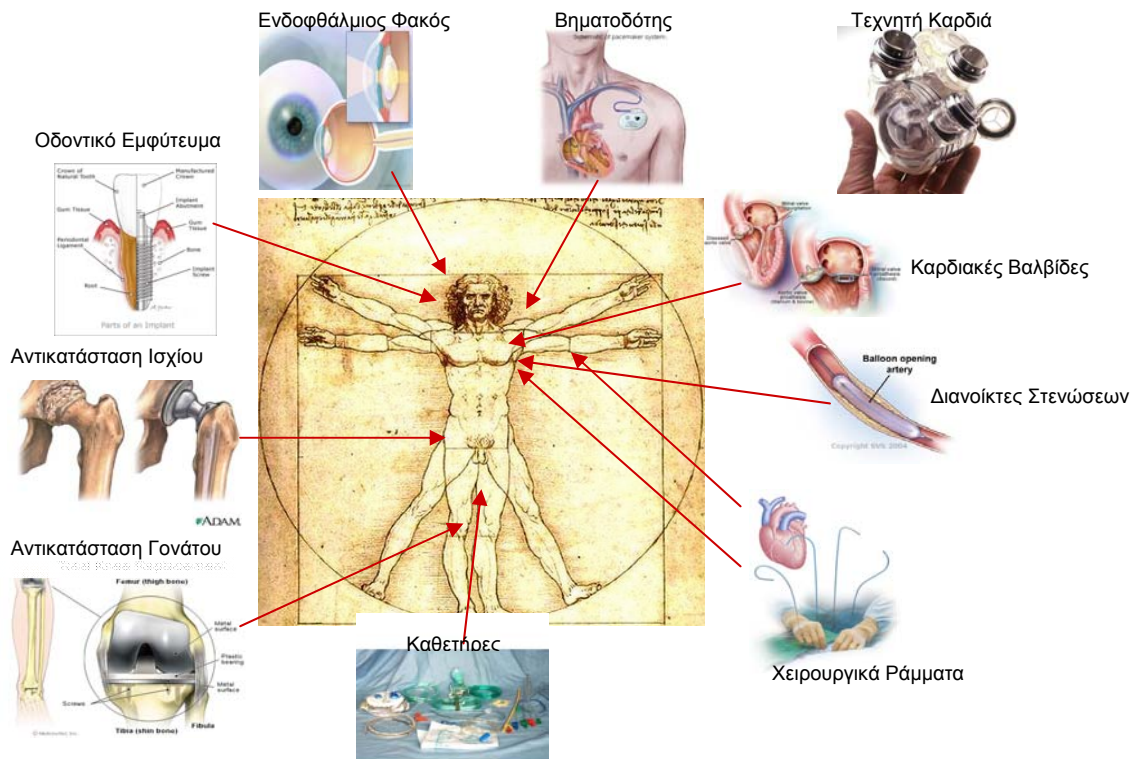
Η επιστήμη των βιοϋλικών μελετά υλικά, φυσικής προέλευσης ή κατασκευασμένα από τον άνθρωπο, που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα ή για να αντικαταστήσουν δυσλειτουργούντες ιστούς στο ανθρώπινο σώμα.

Βιοϋλικό είναι κάθε υλικό, απλό μέλος μιας γενικής κατηγορίας υλικών ή συνδυασμός δύο ή περισσότερων μελών της ίδιας ή διαφορετικών κατηγοριών, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα ζωντανό οργανισμό για κάποιο συγκεκριμένο εμφύτευμα ή ομάδα εμφυτευμάτων και το οποίο δεν προκαλεί αρνητικές αντιδράσεις από τον οργανισμό, είναι σταθερό ή αποδομείται κατά ελεγχόμενο τρόπο.

Η χρήση των βιοϋλικών έχει τις ρίζες της σε αρχαίους ακόμα πολιτισμούς. Τεχνητά μάτια, αυτιά, μύτες και δόντια βρέθηκαν σε αιγυπτιακές μούμιες ενώ οι Κινέζοι και οι Ινδοί χρησιμοποίησαν κόλλες, κεριά και ιστούς για να αντικαταστήσουν μέρη του σώματος που έλειπαν ή παρουσίαζαν κάποια δυσλειτουργία. Με το πέρασμα των αιώνων, η βελτίωση των συνθετικών υλικών, των χειρουργικών τεχνικών και των μεθόδων αποστείρωσης, επέτρεψαν τη χρήση των βιοϋλικών με ολοένα και περισσότερους τρόπους (Ratner, 2004, “A History of Biomaterials”).

Η ιατρική πρακτική αξιοποιεί σήμερα ένα μεγάλο αριθμό συσκευών και εμφυτευμάτων. Βιοϋλικά, με τη μορφή εμφυτευμάτων, όπως χειρουργικά ράμματα, αντικαταστάτες αρθρώσεων και συνδέσμων, μοσχεύματα αρτηριών, βαλβίδες καρδιάς, ενδοφθαλμιοί φακοί, φακοί επαφής και οδοντικά εμφυτεύματα, και με τη μορφή

ιατρικών συσκευών, όπως βηματοδότες, καθετήρες, βιοαισθητήρες, τεχνητές καρδιές, αμοφόρα αγγεία κ.ά., χρησιμοποιούνται ευρέως για να αντικαταστήσουν ή να βελτιώσουν τη λειτουργία τραυματισμένων ή εκφυλισμένων ιστών ή οργάνων, να βοηθήσουν στη θεραπεία, να διορθώσουν μη φυσιολογικές αποκρίσεις και επομένως να βελτιώσουν την ποιότητα ζωής των ασθενών (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”). (Σχήμα 1.1.1.)



Σχήμα 1.1.1. Εφαρμογές Βιοϋλικών

Όπως φαίνεται και από τον πίνακα 1.1.1., ο αριθμός των εμφυτευμάτων και των ιατρικών συσκευών που χρησιμοποιούνται ανά έτος παγκοσμίως είναι πολύ μεγάλος. Σύμφωνα με μια έρευνα των Lysaght, και O’Laughlin, το 2000, η ζωή περισσότερων από είκοσι εκατομμυρίων ανθρώπων είχε διατηρηθεί, υποστηριχθεί ή σημαντικά βελτιωθεί από την αντικατάσταση οργάνων και λειτουργιών τους. Ο αριθμός των ανθρώπων στους οποίους έχει αντίκτυπο η εφαρμογή των βιοϋλικών αυξάνει κατά περίπου 10% ανά έτος.

Πέρα από τον μεγάλο αντίκτυπο που τα βιοϋλικά έχουν στον τομέα της υγείας, επηρεάζουν σημαντικά και τον τομέα της οικονομίας. Το κόστος του πρώτου έτους της ανάρρωσης μετά από αντικατάσταση οργάνου ή τοποθέτηση εμφυτεύματος υπερβαίνει τα 200 δισεκατομμύρια ευρώ το χρόνο παγκοσμίως και αντιπροσωπεύει το μεταξύ 7% και 8% του συνολικού κόστους για τον τομέα της υγείας, ανά τον κόσμο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το κόστος της θεραπείας, που σχετίζεται με την ανάπτυξη της τεχνολογίας για την αντικατάσταση οργάνων, υπερβαίνει το 1% του ακαθάριστου εθνικού προϊόντος. Επομένως, το οικονομικό ενδιαφέρον της εφαρμογής των βιοϋλικών είναι πραγματικά μεγάλο (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”).

Ιατρικές Συσκευές	Αριθμός που Χρησιμοποιείται / Χρόνο Παγκοσμίως
Ενδοφθάλμιοι Φακοί	7 000 000
Φακοί Επαφής	75 000 000
Αγγειακά Μοσχεύματα	400 000
Αντικαταστάτες Ισχίου/Γονάτου	1 000 000
Καθετήρες	300 000 000
Βηματοδότες	200 000
Καρδιακές Βαλβίδες	200 000
Διανοίκτες Στενώσεων	> 2 000 000
Οδοντιατρικά Εμφυτεύματα	500 000

Πίνακας 1.1.1. Αριθμός Ιατρικών Συσκευών που Χρησιμοποιείται ανά Έτος Παγκοσμίως (Lysaght, και O’Laughlin, 2000)

Παρότι τα περισσότερα βιοϋλικά και οι ιατρικές συσκευές εκπληρώνουν ικανοποιητικά το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιούνται, βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής των ασθενών ή ακόμα και σώζοντας ζωές, συχνά δημιουργούν επιπλοκές και προβλήματα, κάνοντας την απομάκρυνσή τους από το ανθρώπινο σώμα και την τοποθέτηση νέου επιβεβλημένη. Τα σημαντικότερα προβλήματα που σχετίζονται με την χρήση εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών προκύπτουν από *μηχανική αστοχία* του

βιοϋλικού (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”, Cooke, 2004), *θρόμβωση* περιοχών όπου αυτό έχει εμφυτευθεί (Hanson, Hanson και Ratner 2004), αλλά από την εμφάνιση νοσοκομειακών σηψαιμικών επεισοδίων σχετιζόμενων με *λοιμώξεις* που προκαλούνται από βιοϋλικά (Ratner και Hoffman, “Non-fouling Surfaces”, 2004; Costerton et al., 2004). Αυτές είναι οι κύριες αιτίες που εμποδίζουν την μακροχρόνια χρήση των βιοϋλικών και αυξάνουν τη νοσηρότητα, το κόστος νοσηλείας αλλά και τη θνησιμότητα.

Επομένως, το πεδίο των βιοϋλικών δεν έχει ακόμα ερευνηθεί πλήρως. Πρόκειται για ένα πεδίο η μελέτη του οποίου εξελίσσεται σταθερά τα τελευταία πενήντα περίπου χρόνια και αυτό που απαιτεί είναι μια πολυδιάστατη και πειθαρχημένη προσέγγιση η οποία να φέρνει κοντά και σε σαφή επικοινωνία ερευνητές με διαφορετικά ακαδημαϊκά υπόβαθρα και γνώσεις. Κάποιες ειδικότητες που θα πρέπει να διασταυρωθούν για την μελέτη, δημιουργία και εφαρμογή υλικών που θα είναι συμβατά, τόσο ως προς την επιφάνεια όσο και ως προς τη δομή τους με τους ιστούς ξενιστές, είναι αυτές του: εμβιομηχανικού, ιατρού, χημικού, χημικού μηχανικού, ηλεκτρολόγου μηχανικού, μηχανολόγου μηχανικού, επιστήμονα των υλικών, βιολόγου (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”).

1.1.1. Κριτήρια Επιλογής Βιοϋλικών

Σύμφωνα λοιπόν και με τα παραπάνω, τα κριτήρια με βάση τα οποία επιλέγεται να χρησιμοποιηθεί ένα υλικό ως βιοϋλικό είναι πολλά.

(1) Καταρχήν, πρέπει να έχει τέτοιες *μηχανικές ιδιότητες* ώστε να αντικαταστήσει τη λειτουργία του οργανικού ιστού ή του οργάνου που έχει υποστεί βλάβη. Δηλαδή πρέπει να είναι συμβατό ως προς τη δομή του, ώστε να προσαρμοστεί, όσο το δυνατό καλύτερα, στη μηχανική συμπεριφορά του ιστού ξενιστή. Έτσι η συμβατότητα δομής αναφέρεται στις μηχανικές ιδιότητες του εμφυτεύματος και τέτοιες είναι το μέτρο ελαστικότητας (Young’s Modulus), η αντοχή, η σκληρότητα και η σωστή μεταφορά τάσης στη διεπιφάνεια εμφυτεύματος –ιστού (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”, Cooke, 2004).

(u) Το υλικό κατά δεύτερο λόγο πρέπει να είναι *βιοσυμβατό*. Οι ερευνητές έχουν συνδέσει τον όρο «βιοϋλικό» με τον όρο «βιοσυμβατότητα», εννοώντας ότι το υλικό πρέπει να γίνει δεκτό και να ενοποιηθεί με τον οργανισμό με ελεγχόμενο και προβλεπόμενο τρόπο, ώστε να εξασφαλίζεται η αρμονική συμβίωση βιοϋλικού και ζώντος οργανισμού. Ο όρος «βιοσυμβατότητα» λοιπόν αναφέρεται στην συμβατότητα της επιφάνειας, εννοώντας τη χημική, βιολογική και φυσική, συμπεριλαμβάνοντας και τη μορφολογία της επιφάνειας, καταλληλότητα του εμφυτεύματος για τον κάθε ιστό ξενιστή. Απαραίτητη επίσης προϋπόθεση της βιοσυμβατότητας είναι το υλικό να μη είναι τοξικό, να μην εκλύει δηλαδή τοξικές ουσίες οι οποίες μπορούν να νεκρώσουν τον ιστό που το περιβάλλει (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”).

Υλικά που έρχονται σε άμεση επαφή με το αίμα δεν πρέπει να καταστρέφουν κύτταρα του αίματος ή να ενισχύουν τη δημιουργία θρόμβων. Όταν το αίμα έρχεται σε επαφή με ξένα υλικά, υπάρχει μια άμεση αντίδραση που οδηγεί στην εναπόθεση πρωτεϊνών και αιμοκυττάρων στο υλικό. Η διαδικασία αυτή συχνά οδηγεί σε θρόμβωση που μπορεί να γενικευτεί και να έχει δυσάρεστη εξέλιξη. Επομένως, η δημιουργία, συν τοις άλλοις, *αντιθρομβωτικών υλικών* αποτελεί αναγκαιότητα ειδικά για εμφυτεύματα που έρχονται σε άμεση επαφή με το αίμα και τέτοια είναι οι ενδοφλέβιοι καθετήρες, οι καρδιακές βαλβίδες, τα τεχνητά αιμοφόρα αγγεία και διανοίκτες αγγείων με στένωση (stents), αλλά ιατρικές συσκευές όπως τα φίλτρα αιμοκάθαρσης (Hanson, Hanson και Ratner 2004).

Επίσης, η εμφάνιση νοσοκομειακών σηψαιμικών επεισοδίων σχετιζόμενων με λοιμώξεις που προκαλούνται από βιοϋλικά που εμφυτεύονται στο ανθρώπινο σώμα, κάτω από άσηπτες συνθήκες, είναι μία από τις κύριες αιτίες που εμποδίζουν την μακροχρόνια χρήση τους και αυξάνουν τη νοσηρότητα, το κόστος νοσηλείας αλλά και τη θνητότητα. Επομένως η χρήση *αντιμικροβιακών υλικών* ή υλικών που αποτρέπουν την προσκόλληση σε αυτά μικροοργανισμών αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου το βιοϋλικό να μην προκαλεί αρνητικές αντιδράσεις (Ratner και Hoffman, “Non-fouling Surfaces”, 2004; Costerton et al., 2004).

Η καταλληλότερη λοιπόν αλληλεπίδραση βιοϋλικού και ξενιστή-οργανισμού επιτυγχάνεται όταν εξασφαλίζεται παράλληλα η συμβατότητα δομής (*μηχανικές ιδιότητες*) και επιφάνειας του υλικού (*βιοσυμβατότητα*). Πρέπει να σημειωθεί όμως ότι η επιτυχία του βιοϋλικού εξαρτάται και από την χειρουργική τεχνική (βαθμός τραύματος κατά την εμφύτευση, αποστείρωση κ.ά.) καθώς και από την γενικότερη κατάσταση της υγείας του ασθενούς και τις δραστηριότητές του.

1.1.2. Είδη Βιοϋλικών

Η κλινική εμπειρία έχει δείξει ότι δεν μπορούν όλα τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται σε μηχανικές κατασκευές να χρησιμοποιηθούν και ως βιοϋλικά. Επειδή λοιπόν κανένα υλικό δεν μπορεί να θεωρηθεί απόλυτα αδρανές για τον οργανισμό, πολλοί κατατάσσουν τα βιοϋλικά σε κατηγορίες με βάση την αλληλεπίδρασή τους με το όργανο, ιστό-ξενιστή, και αυτές είναι:

(i) το υλικό απελευθερώνει κάποιες τοξικές ουσίες που περιέχει και αυτές οδηγούν στη νέκρωση του ιστού που το περιβάλλει (*τοξικό*) (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”).

(ii) το υλικό δεν είναι τοξικό αλλά σταδιακά αναρροφείται και αντικαθίσταται από τον ιστό που το περιβάλλει και που είναι υπό θεραπεία (*βιοαποικοδομήσιμο*) (Kohn et al., 2004).

(iii) το υλικό δεν είναι τοξικό και είναι βιολογικά ανενεργό αλλά δεν μπορεί να αποσυντεθεί από τον οργανισμό (*βιοσταθερό*) (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”).

(iv) το υλικό δεν είναι τοξικό και είναι έντονα δραστικό με τον ιστό που το περιβάλλει, σχηματίζοντας χημικούς δεσμούς που το σταθεροποιούν (πυκνά κεραμικά υδροξυαπατίτη, βιοενεργά γυαλιά, βιοενεργά κεραμικά-γυαλιά και βιοενεργά σύνθετα είναι μερικά παραδείγματα της τελευταίας κατηγορίας) (*βιοσύνθετο-βιοενεργό*) (Hench και Best, 2004).

Τα βιοϋλικά μπορούν επίσης να καταταχθούν με βάση το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένα. Έτσι χωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες:

(i) **μέταλλα και κράματά τους**. Τα μέταλλα που με επιτυχία χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι ο χρυσός και το ανοξείδωτο ατσάλι αλλά και τα κράμματα τιτανίου και κοβαλτίου. Μεταλλικά εμφυτεύματα και συσκευές βρίσκουν εφαρμογή, στην ορθοπεδική, την οδοντιατρική αλλά και σε καρδιαγγειακά εμφυτεύματα όπως τμήματα τεχνητής καρδιάς, βηματοδότες, προσθετικές βαλβίδες, διανοίκτες στενώσεων, καθετήρες (Brunski, 2004).

(ii) **κεραμικά**. Τα κεραμικά που χρησιμοποιούνται με επιτυχία είναι: αλουμίνα, τιτανία, ζirkονία, βιοενεργά γυαλιά, άνθρακας και υδροξυαπατίτης, και χαρακτηρίζονται και από την αρκετά καλή βιοσυμβατότητά τους. Χρησιμοποιούνται για την κατασκευή οπτικών γυαλιών και διαγνωστικών συσκευών, στην ορθοπεδική και την οδοντιατρική (Hench και Best, 2004).

(iii) **πολυμερή**. Τα πολυμερή χρησιμοποιούνται ευρέως για την κατασκευή βιοϋλικών με ποικίλες βιοϊατρικές εφαρμογές. Εκείνα που χρησιμοποιούνται πιο συχνά είναι τα: πολυαιθυλένιο (PE), πολυουρεθάνη (PU), πολυμεθακρυλικός μεθυλεστέρας (PMMA), πολυτερεφθαλικός αιθυλενεστέρας (PET), πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC), σιλικόνη (Si), πολυσουλφόνη (PS), πολυλακτικό οξύ (PLA), πολυγλυκολικό οξύ (PGA) αλλά και πολλά ακόμη (Cooper et al., 2004).

(iv) **σύνθετα**. Τα σύνθετα φτιάχνονται με συνδυασμούς των τριών πρώτων κατηγοριών (Migliaresi και Alexander, 2004).

Επειδή τα υλικά με τα οποία ασχοληθήκαμε κατά τη διάρκεια της διατριβής ήταν πολυμερή μόνο αυτή την κατηγορία θα αναπτύξουμε.

1.1.2.1. Πολυμερή

Τα συστατικά άτομα των κλασσικών πολυμερών είναι συνήθως άνθρακες και ενώνονται σε μια γραμμική, αλυσιδωτή δομή με ομοιοπολικούς δεσμούς. Οι δεσμοί μέσα στην αλυσίδα χρησιμοποιούν δύο ηλεκτρόνια σθένους από κάθε άτομο, αφήνοντας τους

άλλους δύο δεσμούς διαθέσιμους για τη συμπλήρωση από ποικιλία ατόμων (π.χ. H₂), μορίων, λειτουργικών ομάδων κ.ά.

Τα πολυμερή, με βάση την οργάνωση της αλυσίδας τους κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες (Cooper et al., 2004, Cooke, 2004):

ι) Τα *θερμοσκληρυνόμενα*: είναι πολυμερή με πλευρικές αλυσίδες μεταξύ των οποίων δημιουργούνται ενώσεις, σχηματίζοντας μια σταθερή τρισδιάστατη δομή, η οποία όμως μετά από θέρμανση και ψύξη, εξαιτίας των σταυροδεσμών που σχηματίζονται, δεν επανακτά την αρχική της ομοιομορφία (μη αντιστρεπτή διαδικασία)

ιι) Τα *θερμοπλαστικά*: είναι πολυμερή με λίγες ή καθόλου διακλαδώσεις οι οποίες συγκρατούνται κοντά μεταξύ τους με δυνάμεις Van der Waals και υδρογόνου, δηλαδή ασθενείς δυνάμεις, οπότε και τα υλικά αυτά έχουν μικρότερη ισχύ από ότι τα θερμοσκληρυνόμενα. Όμως, μετά από θέρμανση και ψύξη, εξαιτίας της έλειψης σταυροδεσμών, δεν χάνουν τις αρχικές τους ιδιότητες (η θέρμανση-ψύξη μπορεί να επαναληφθεί για 1-2 φορές), δηλαδή είναι επαναμορφοποιήσιμα.

ιιι) Τα *ελαστομερή*: είναι πολυμερή με ελάχιστους σταυροδεσμούς. Μάλιστα με βουλκανισμό (θείωση) αυξάνονται οι δεσμοί αυτοί ώστε να προκύψουν πολυμερή με μεγάλη σκληρότητα και ευκαμψία.

Ένας ακόμη τρόπος με τον οποίο μπορούν να καταταχθούν τα πολυμερή είναι με βάση τη μορφή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες που πρέπει να έχουν για την αντίστοιχη ιατρική εφαρμογή. Έτσι εκτός από τα πολυμερή που διατηρούν τις αρχικές τους ιδιότητες υπάρχουν τα:

ι) Βιοδιασπώμενα Υλικά

Υπάρχουν περιπτώσεις που ένα πολυμερικό εμφύτευμα δε χρειάζεται να αφαιρεθεί με επέμβαση όταν δεν είναι πλέον χρήσιμο. Τα βιοδιασπώμενα πολυμερή έχουν αξία στις εφαρμογές που απαιτούν μόνο την προσωρινή παρουσία του πολυμερικού εμφυτεύματος. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα είναι ότι η χρήση του μπορεί να παρακάμψει κάποια από τα προβλήματα που σχετίζονται με τη μακροχρόνια χρήση των εμφυτευτικών συσκευών. Από μια πρακτική άποψη είναι βολικό να διακριθούν

τέσσερις κύριες κατηγορίες βιοδιασπώμενων εμφυτευμάτων: το προσωρινό ικρίωμα-ικρίωμα ιστοτεχνολογίας, το προσωρινό φράγμα, η συσκευή αποδέσμευσης (διανομής) φαρμάκων και το πολυλειτουργικό μόσχευμα (Kohn et al., 2004; Ratner “Degradation of Materials in the Biological Environment”, 2004; Coury, 2004).

- *Το προσωρινό ικρίωμα-Ικρίωμα ιστοτεχνολογίας*

Η χρήση ενός προσωρινού ικρίωματος μπορεί να εφαρμοστεί σε καταστάσεις όπου το φυσικό στρώμα του ιστού έχει εξασθενήσει από μόλυνση, πληγή ή επέμβαση και απαιτεί κάποια τεχνητή υποστήριξη, ή κάποιο όργανο έχει χάσει τη λειτουργικότητά του. Κάποια παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι ένα σπασμένο οστό, μια πληγή σε στάδιο ανάρρωσης, ένα κατεστραμμένο αγγείο ή όργανο. Τα ράμματα, οι συσκευές σταθεροποίησης οστών (όπως βίδες ή πλάκες), οι ενδοαγγειακοί διανοίκτες και τα ικρίωματα ιστοτεχνολογίας θα μπορούσαν να είναι παραδείγματα των αντίστοιχων συσκευών υποστήριξης. Σε όλα αυτά τα περιστατικά, το βιοδιασπώμενο μόσχευμα παρέχει προσωρινή μηχανική υποστήριξη έως ότου θεραπευτεί ο φυσικός ιστός και ανακτήσει τις δυνάμεις του ή αποκατασταθεί η λειτουργία του οργάνου. Ειδικά στην περίπτωση των ικριωμάτων ιστοτεχνολογίας, κύτταρα καλλιεργούνται στο ικρίωμα (για παράδειγμα ηπατικά, αν στόχος είναι η δημιουργία συκωτιού) ώστε σταδιακά να αποκτήσει τόσο τη δομή όσο και τη λειτουργικότητα του οργάνου που πρόκειται να αντικαταστήσει. Προκειμένου να λειτουργήσει σωστά το προσωρινό ικρίωμα, θα πρέπει να υπάρξει μια σταδιακή μετατόπιση τάσης: καθώς ο φυσικός ιστός θεραπεύεται ή το όργανο αναπτύσσεται, το μόσχευμα θα πρέπει σταδιακά να εξασθενεί.

- *Το προσωρινό φράγμα*

Η κυριότερη ιατρική εφαρμογή ενός προσωρινού φράγματος είναι στην αποφυγή συγκόλλησης. Οι χειρουργικές συγκολλήσεις μεταξύ δύο τμημάτων ιστών προκαλείται από τη θρόμβωση του αίματος στο τμήμα του ιστού έξω από το αγγείο, και συνήθως ακολουθείται από μόλυνση. Οι συγκολλήσεις είναι ένα κοινό πρόβλημα μετά από επεμβάσεις καρδιακές, σπονδυλικές και επεμβάσεις στους τένοντες. Ένα προσωρινό φράγμα μπορεί να πάρει τη μορφή μιας λεπτής πολυμερικής ταινίας ή μιας συσκευής προσομοίωσης δικτυώματος και τοποθετείται κατά τη διάρκεια της επέμβασης, ανάμεσα

στους ιστούς που τείνουν να συγκολληθούν. Άλλες εφαρμογές προσωρινών φραγμάτων είναι το τεχνητό δέρμα για τη θεραπεία εγκαυμάτων και άλλων βλαβών του δέρματος.

- *Η συσκευή διανομής φαρμάκων*

Εφόσον οι εμφυτεύσιμες συσκευές διανομής φαρμάκων είναι από αναγκαιότητα προσωρινές συσκευές, η ανάπτυξη των αντιστοίχων συστημάτων είναι πιθανώς η πιο ευρεία εφαρμογή των βιοδιασπώμενων πολυμερών.

Υπάρχουν διάφορες εφαρμογές των συσκευών αυτών. Ιδιαίτερος αξιοσημείωτη είναι μια ενδοκρανιακή συσκευή που παρέχει ένα χημειοθεραπευτικό παράγοντα σε ασθενείς που υποφέρουν από πολυμορφικό γλιοβλάστωμα, μια θανάσιμη μορφή καρκίνου του εγκεφάλου.

- *Πολυλειτουργικές συσκευές*

Συσκευές που συνδιάζουν κάποιες λειτουργίες. Για παράδειγμα, η διαθεσιμότητα βιοδιασπώμενων οστέινων ήλων και κοχλιών μπορεί να συνδυάσει τη μηχανική υποστήριξη με τη λειτουργία συσκευής διανομής φαρμάκου: ένα βιοδιασπώμενο οστέινο καρφί που συγκρατεί το σπασμένο οστό στη θέση του μπορεί ταυτόχρονα να προκαλέσει την ανάπτυξη ενός νέου οστέινου ιστού στο σημείο της θραύσης, ελευθερώνοντας αργά παράγοντες που αναπτύσσουν το οστό (όπως οστέινη μορφογενητική πρωτεΐνη).

ii) Υδροπηκτές

Οι υδροπηκτές είναι υδρόφιλες, διασταυρούμενες πολυμερικές δομές που παράγονται από την αντίδραση ενός ή περισσότερων μονομερών, ή από τους “συνεταιρικούς” δεσμούς όπως ο δεσμός υδρογόνου και οι ισχυρές van der Waals αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλυσίδων (Peppas, 2004). Παρασκευάζονται με διόγκωση διασταυρούμενων δομών σε νερό ή βιολογικά υγρά που περιέχουν μεγάλα ποσά νερού. Σε πολλές περιπτώσεις, το νερό μπορεί να είναι παρόν μόνο κατά τη διάρκεια της τελικής διαμόρφωσης της διασταυρούμενης δομής.

Το πλήθος των διαθέσιμων υδροπηκτών παρέχει πολλές ευκαιρίες για πολυμερικούς σχηματισμούς. Η καλύτερη προσέγγιση για τη δημιουργία μιας

υδροπηκτής με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά, είναι ο συσχετισμός της μακρομοριακής δομής των πολυμερών με τα μηχανικά χαρακτηριστικά που επιθυμούνται.

Η υδροπηκτική που αρχικά παρουσιάστηκε ως βιοϋλικό ήταν το πολυυδροξυ αίθυλ μεθακρυλικό οξύ (PHEMA). Η δομή του PHEMA επιτρέπει περιεκτικότητα νερού παρόμοια με αυτή των ζωντανών ιστών, είναι αδρανές στις φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, δείχνει αντίσταση στην υποβάθμιση, δεν απορροφάται από τον οργανισμό, αντιστέκεται στην αποστείρωση σε υψηλή θερμοκρασία και μπορεί να παραχθεί σε ποικιλία σχημάτων και μορφών.

Άλλες υδροπηκτές με βιοϊατρικό ενδιαφέρον είναι και τα πολυακρυλαμίδια (PA). Έχουν γίνει μελέτες πάνω στην απότομη διόγκωση και συρρίκνωση μερικώς υδροποιημένων πηκτών ακρυλαμιδίου, με αλλαγές στη σύσταση του παράγοντα διόγκωσης, τη διάρκεια θεραπείας, το βαθμό υδρόλυσης και τη θερμοκρασία. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι οι ιοντικές ομάδες που παράγονται σε μια πηκτή ακρυλαμιδίου κατά την υδρόλυση, δίνουν στην πηκτή μια δομή που δείχνει διακριτή αλλαγή στην ισορροπία του όγκου με αλλαγές στο περιβάλλον.

Οι φυσικές ιδιότητες των υδροπηκτών τις καθιστούν ικανές για μια μεγάλη ποικιλία βιοϊατρικών και φαρμακευτικών εφαρμογών. Επιδεικνύουν ιδιότητες που τις κάνουν επιθυμητές ως βιοσυμβατά και αιμοσυμβατά υλικά. Μη ιοντικές υδροπηκτές που χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές που έρχονται σε επαφή με το αίμα, κατασκευάζονται από πολύ-βινυλική-αλκοόλη (PVA), PA, PHEMA και οξείδια πολυαιθυλενίου (PEO). Ηπαρινοποιημένες πολυμερικές υδροπηκτές είναι επίσης υποσχόμενα υλικά για αιμοσυμβατές εφαρμογές.

Μια από τις πρόσφατες βιοϊατρικές εφαρμογές είναι στους φακούς επαφής. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν υλικά τεχνητού τένοντα, τεχνητές μεμβράνες νεφρού, αρθρικούς χόνδρους, τεχνητό δέρμα, υλικά ανακατασκευής προσώπου και σιαγόνα, καθώς και υλικά αντικατάστασης φωνητικών χορδών.

iii) Φυσικά Πολυμερή

Η μεγάλη ποικιλία των πολυμερών περιλαμβάνει και τα φυσικά πολυμερή όπως η κυτταρίνη, το άμυλο, το φυσικό κόμμι και το DNA, το γενετικό υλικό όλων των ζώντων οργανισμών. Ενώ αυτά τα πολυμερή είναι αναμφισβήτητα ενδιαφέροντα και έχουν

ευρεία χρήση σε πολυάριθμες εφαρμογές, ορισμένες φορές εκλείπουν από την ατέλειωτη ποικιλία των συνθετικών πολυμερών που είναι διαθέσιμα σήμερα (Yannas, 2004).

Τα φυσικά πολυμερή προσφέρουν το πλεονέκτημα του να είναι συχνά όμοια με τις μακρομοριακές ουσίες τις οποίες το βιολογικό περιβάλλον είναι προετοιμασμένο να αναγνωρίσει και να σχετιστεί μαζί τους μεταβολικά. Τα προβλήματα τοξικότητας και διέγερσης μιας χρόνιας μολυσματικής αντίδρασης, η οποία συχνά προκαλείται από πολλά συνθετικά πολυμερή, μπορούν ως εκ τούτου να κατασταλούν. Περαιτέρω, η ομοιότητα με τις φυσικές ουσίες προσφέρει την ικανότητα σχεδιασμού βιοϋλικών που λειτουργούν βιολογικά στο μοριακό παρά στο μακροσκοπικό επίπεδο. Έτσι, αφού η δομή τους είναι πολύ πιο σύνθετη από αυτή των περισσότερων συνθετικών πολυμερών, είναι περισσότερο τεχνολογικά επεξεργάσιμα. Επομένως, τα φυσικά πολυμερή ή οι χημικά επεξεργασμένες εκδόσεις τους προσφέρουν απεριόριστες λύσεις και έχουν πολλές εφαρμογές.

Ένα χαρακτηριστικό των φυσικών πολυμερών είναι η δυνατότητα να αποικοδομούνται από την παρουσία φυσικών ενζύμων. Αυτό είναι μια ορατή εγγύηση ότι το μόσχευμα θα μεταβολιστεί τελικά με φυσιολογικούς μηχανισμούς. Αυτή η ιδιότητα μπορεί, με την πρώτη ματιά, να φαίνεται ως μειονέκτημα αφού μειώνεται έτσι η αντοχή του μοσχεύματος. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί όμως ως πλεονέκτημα στις εφαρμογές στις οποίες είναι επιθυμητή μια συγκεκριμένη λειτουργία για ένα μικρό διάστημα, όπου μετά αναμένεται να απορριφθεί το μόσχευμα από φυσιολογικές μεταβολικές διεργασίες. Αφού λοιπόν είναι εφικτό να ελέγχεται ο ρυθμός αποικοδόμησης του εμφυτευμένου πολυμερούς με χημικές διεργασίες, ο σχεδιαστής έχει τη δυνατότητα να ελέγχει τη διάρκεια ζωής του μοσχεύματος.

Ένα μειονέκτημα της χρήσης των φυσικών πολυμερών ως βιοϋλικά προκύπτει από το γεγονός ότι αυτά τα πολυμερή τυπικά υφίστανται πυρολυτικές τροποποιήσεις σε θερμοκρασίες κάτω από αυτή του σημείου τήξης, επομένως αποκλείουν τις μεθόδους επεξεργασίας που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες, κατά την κατασκευή του εμφυτεύματος, όπως η χύτευση. Παρόλα αυτά έχουν δημιουργηθεί μέθοδοι για την κατασκευή τέτοιων, ευαίσθητων στη θερμοκρασία πολυμερών, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ένα άλλο σημαντικό μειονέκτημα είναι η φυσική ποικιλία στη δομή των μακρομοριακών ουσιών που προέρχονται από ζωικές πηγές. Κάθε ένα από αυτά τα

πολυμερή εμφανίζεται ως μια χημικώς διακριτή οντότητα, όχι μόνο από είδος σε είδος αλλά και από τον ένα ιστό στον άλλο.

Τα περισσότερα από τα φυσικά πολυμερή είναι συστατικά μιας εξωκυττάριας μήτρας συνεκτικών ιστών όπως τένοντες, δέρμα, αγγεία αίματος και οστά. Αυτοί οι ιστοί είναι παραμορφώσιμα, ενισχυμένα με ίνες, σύνθετα υλικά εκπληκτικής αρχιτεκτονικής, που η κύρια λειτουργία τους είναι η συντήρηση του οργάνου, καθώς και του ίδιου του οργανισμού. Οι ιστοί θα μπορούσαν να παραλληλισθούν με τεχνητά σύνθετα υλικά, όπου οι ίνες κολλαγόνου και ελαστίνης ενισχύουν μηχανικά μια μήτρα, που αποτελείται κυρίως από πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια σε νερό. Εκτενείς χημικοί δεσμοί συνδέουν αυτά τα μακρομόρια μεταξύ τους, καθιστώντας τους ιστούς αδιάλυτους και επομένως αδύνατο να χαρακτηριστούν με διαλυτικές μεθόδους, εκτός αν ο ιστός έχει καθαιρεθεί χημικά και φυσικά. Στην τελευταία περίπτωση, τα διαλυόμενα συστατικά αποσπώνται τελικά και χαρακτηρίζονται από βιοχημικές και φυσικοχημικές μεθόδους. Τα πιο γνωστά φυσικά πολυμερή που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι το κολλαγόνο και η χιτίνη.

1.1.3. Ιδιότητες Υλικών

Οι ιδιότητες των υλικών είναι πολλές, μηχανικές, φυσικοχημικές, θερμικές, μαγνητικές κ.τ.λ. Αυτές που κυρίως έχουν ενδιαφέρον για υλικά που χρησιμοποιούνται ως βιοϋλικά είναι οι μηχανικές (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”; Cooke, 2004) και οι φυσικοχημικές (Ratner, 2004 “Surface Properties and Surface Characterization”). Γι αυτές λοιπόν έχουμε:

1.1.3.1. Μηχανικές Ιδιότητες

Κάθε εμφύτευμα και τεχνητό όργανο σχεδιάζεται με βάση τις μηχανικές απαιτήσεις της βιοϊατρικής εφαρμογής για την οποία προορίζεται και εξαρτάται ουσιαστικά από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του υλικού/υλικών από το/τα οποίο/α αποτελείται. Συγκεκριμένα μια εμφύτευση ισχίου πρέπει να είναι άκαμπτη και δεν πρέπει να αστοχεί κάτω από μεγάλα φορτία για τουλάχιστον 10 χρόνια, το βιοϋλικό που θα αντικαταστήσει ένα τένοντα πρέπει να είναι εύκαμπτο. Μια βαλβίδα καρδιάς πρέπει να

είναι εύκαμπτη αλλά και να αντέχει σε πολλούς κύκλους κόπωσης. Οι οφθαλμικοί φακοί πρέπει να είναι εύκαμπτοι και διαυγείς. Οι καθετήρες πρέπει επίσης να είναι εύκαμπτοι.

Πρέπει λοιπόν να διαπιστώνεται εάν ένα υλικό έχει τέτοιες μηχανικές ιδιότητες ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοϋλικό σε μια συγκεκριμένη ιατρική εφαρμογή. Για το σκοπό αυτό, γνωρίζοντας τις προϋποθέσεις που πρέπει να πληρεί, *οι μηχανικές ιδιότητες που ελέγχονται* είναι η αντοχή στον εφελκυσμό, τη θλίψη, τη διάτμηση, τον ερπυσμό και την κόπωση.

Από άποψη μηχανικών ιδιοτήτων, τα *πολυμερή* είναι σε γενικές γραμμές εύκαμπτα αλλά και αδύναμα να αντιμετωπίσουν τις μηχανικές απαιτήσεις τις ορθοπεδικής χειρουργικής στις περιπτώσεις των σκληρών ιστών δηλαδή στα οστά. Αντίθετα, τα *μέταλλα*, και λιγότερο τα *κεραμικά*, είναι ανθεκτικά και με μέτρο ελαστικότητας το οποίο είναι 10-20 φορές μεγαλύτερο από αυτό των σκληρών ιστών, με αποτέλεσμα αυτή η διαφορά στο μέτρο ελαστικότητας να οδηγεί σε μη σωστή μετάδοση τάσεων από το εμφύτευμα στους ιστούς-οστά, οπότε το οστό δέχεται μικρότερες τάσεις από ότι το εμφύτευμα και σταδιακά ατροφεί.

Το πρόβλημα αυτό τείνει να αντιμετωπιστεί με τη χρήση των *σύνθετων υλικών*, δηλαδή πολυμερών ενισχυμένων με ίνες, τα οποία έχουν μεγάλη ανθεκτικότητα, οπότε ενδείκνυται η χρήση τους και σε πολυάριθμες ορθοπεδικές εφαρμογές. Επίσης, καθορίζοντας κάθε φορά τον όγκο των ινών και τη διάταξή τους στο σύνθετο, οι ιδιότητες του εμφυτεύματος μπορούν να ποικίλουν και να προσαρμόζονται κάθε φορά στις μηχανικές και φυσικοχημικές απαιτήσεις των διαφόρων εφαρμογών. Έτσι, τα *σύνθετα υλικά* προσφέρουν μεγαλύτερη δυνατότητα δομικής συμβατότητας με τους ιστούς από ότι τα ομογενή υλικά. Αυτό όμως συμβαίνει και εξαιτίας του ότι οι ιστοί είναι και οι ίδιοι σύνθετα υλικά με ανισότροπες ιδιότητες, οι οποίες εξαρτώνται από τη δομική διάταξη και το ρόλο των διαφόρων συστατικών τους (ελαστίνη, κολαγόνο, υδροξυαπατίτης). Μιμούμενοι λοιπόν τη φύση, τα *σύνθετα υλικά* σχεδιάζονται με παρόμοιο τρόπο προκειμένου να ξεπεραστούν τα διάφορα μειονεκτήματα των ομογενών υλικών και να ανταποκρίνονται στις ανάγκες της κάθε εφαρμογής (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”; Cooke, 2004; Migliaresi και Alexander, 2004).

1.1.3.2. Φυσικοχημικές Ιδιότητες

Τα στερεά ξεχωρίζουν από τις άλλες καταστάσεις (υγρά και αέρια), στο ότι τα άτομα (που τα αποτελούν) συγκρατούνται μεταξύ τους με ισχυρές ενδομοριακές δυνάμεις. Οι ηλεκτρονικές και ατομικές δομές αλλά και οι μηχανικές όπως και πολλές φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών εξαρτώνται από τη φύση και την ισχύ των ενδοατομικών και ενδομοριακών δεσμών. Υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι ενδοατομικών άρα ισχυρών δεσμών, ο ιοντικός και ο ομοιοπολικός, και οι ασθενείς ενδομοριακοί δεσμοί υδρογόνου και van der Waals (Ratner, 2004 “Surface Properties and Surface Characterization”).

• *Ιοντικός δεσμός*

Στον ιοντικό δεσμό, τα άτομα - δότες ηλεκτρονίων (μεταλλικά) δίνουν ένα ή περισσότερα ηλεκτρόνια σε ένα άτομο - δέκτη ηλεκτρονίων (μη μεταλλικό). Τα δύο άτομα, τότε, γίνονται κατιόν (μέταλλο) ή ανιόν (μη μέταλλο), τα οποία έλκονται δυνατά με ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Αυτή η έλξη των κατιόντων και ανιόντων αποτελεί τον ιοντικό δεσμό σύμφωνα με τον John, 1983.

Τα ιοντικά στερεά, διατάσσονται έτσι ώστε το κατιόν να περικλείεται από όσο το δυνατόν περισσότερα ανιόντα, με σκοπό να μειωθεί η αμοιβαία απώθηση των κατιόντων. Αυτό το «στοίβαγμα» μειώνει τη συνολική ενέργεια και οδηγεί σε μια διάταξη μεγάλης τάξης, που ονομάζεται κρυσταλλική δομή.

• *Ομοιοπολικός δεσμός*

Τα στοιχεία που βρίσκονται στο σύνορο μεταξύ μετάλλων και αμέταλλων, όπως ο άνθρακας και το πυρίτιο, έχουν άτομα με τέσσερα ηλεκτρόνια σθένους και περίπου ισοδύναμες τάσεις να δώσουν ή να πάρουν ηλεκτρόνια. Γι' αυτό το λόγο δεν δημιουργούν ισχυρούς ιοντικούς δεσμούς. Οι σταθερές ηλεκτρονικές δομές επιτυγχάνονται με το να μοιράζονται τα ηλεκτρόνια σθένους. Για παράδειγμα, δύο άτομα άνθρακα μπορούν να συνεισφέρουν το καθένα από ένα ηλεκτρόνιο σε ένα κοινό ζεύγος. Αυτό το κοινό ζεύγος ηλεκτρονίων αποτελεί τον ομοιοπολικό δεσμό σύμφωνα με τον Morrison, 1983.

Αν ένα κεντρικό άτομο άνθρακα συμμετέχει σε τέσσερις ομοιοπολικούς δεσμούς (δύο ηλεκτρόνια ανά δεσμό), έχει επιτύχει μια σταθερή εξωτερική στοιβάδα με οκτώ ηλεκτρόνια σθένους. Περισσότερα άτομα άνθρακα μπορούν να προστεθούν, έτσι ώστε κάθε άτομο να έχει τέσσερα γειτονικά άτομα με τα οποία μοιράζεται από ένα δεσμό. Έτσι, σε ένα μεγάλο σύνολο, κάθε άτομο έχει μια σταθερή δομή ηλεκτρονίων και τέσσερα γειτονικά άτομα. Αυτά συχνά δημιουργούν ένα τετράεδρο. Πολλά τέτοια τετράεδρα συναθροίζονται σε ένα επαναλαμβανόμενο πρότυπο (δηλαδή κρύσταλλο). Τέτοια είναι η δομή του διαμαντιού και της σιλικόνης. Το διαμάντι είναι το πιο σκληρό υλικό, γεγονός που δείχνει ότι οι ομοιοπολικοί δεσμοί είναι πολύ ισχυροί.

Σε αντίθεση με τον ιοντικό και τον ομοιοπολικό δεσμό που είναι ισχυροί υπάρχουν οι ασθενείς ή δευτερεύοντες δεσμοί που όμως επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες μερικών στερεών και ειδικά των πολυμερών.

• Δεσμός Υδρογόνου

Δεσμός υδρογόνου ονομάζεται ένα είδος ελκτικής διαμοριακής δύναμης που αναπτύσσεται όταν ένα άτομο υδρογόνου συνδέεται με ένα ισχυρά ηλεκτροαρνητικό στοιχείο, και τέτοιο μπορεί να είναι το οξυγόνο, το άζωτο ή το φθόριο. Τότε, το ηλεκτραρνητικό στοιχείο προσελκύει το ηλεκτρονικό νέφος από την περιοχή γύρω από τον πυρήνα του ατόμου υδρογόνου και, εκτρέποντας το νέφος από το κέντρο, αφήνει το άτομο του υδρογόνου με μερικώς θετικό φορτίο. Λόγω του μικρού μεγέθους του υδρογόνου σε σχέση με άλλα άτομα και μόρια, το προκύπτον φορτίο, αν και μόνο μερικό, εν τούτοις αντιπροσωπεύει μια σημαντική πυκνότητα φορτίου. Ένας δεσμός υδρογόνου προκύπτει όταν αυτή η ισχυρή θετική κατανομή φορτίου στο άτομο του υδρογόνου προσελκύει ένα ασύζευκτο ζεύγος ηλεκτρονίων ενός άλλου ατόμου, που γίνεται ο δέκτης του δεσμού υδρογόνου. Αν και ο δεσμός υδρογόνου είναι ασθενέστερος τόσο του ομοιοπολικού όσο και του ιοντικού δεσμού, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα πολυμερή, τόσο συνθετικά όσο και φυσικά, στη δομή βιολογικών μορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, το DNA αλλά και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βιολογικών υλικών και βιοϋλικών.

• Δεσμοί van der Waals

Οι δεσμοί Van der Waals είναι ασθενέστεροι από όλους τους παραπάνω δεσμούς. Είναι κυρίως δεσμοί μεταξύ μορίων (ή ατόμων που δεν συνδέονται με ιοντικούς ή ομοιοπολικούς δεσμούς) για το σχηματισμό της ύλης. Οφείλονται στις αδύναμες ηλεκτροστατικές έλξεις ανάμεσα στα ουδέτερα αυτά μόρια. Οι δυνάμεις Van der Waals είναι τριών ειδών:

- *Δύναμη διπόλου-διπόλου*: Αλληλεπίδραση μορίων με μόνιμη διπολική ροπή (λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής φορτίου στο κάθε μόριο). Το μόριο αλληλεπιδρά με το ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται από το άλλο μόριο.
- *Δύναμη διπόλου-διπόλου εξ επαγωγής*: Το ηλεκτρικό πεδίο του ενός μορίου-διπόλου πολώνει το δεύτερο μόριο.
- *Δύναμη διασποράς*: Δύναμη μεταξύ μη πολικών μορίων. Λόγω της ανομοιόμορφης κατανομής φορτίου στο κάθε μόριο τα φορτία του ενός, όταν τα μόρια έλθουν κοντά, "βλέπουν" τα φορτία του άλλου.

Οι δεσμοί Van der Waals παρότι ασθενείς είναι αυτοί που καθορίζουν αν μια ουσία θα είναι υγρή ή αέρια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μια ουσία που αποτελείται από μη πολικά μόρια περιμένουμε να είναι αέρια (π.χ. H_2) ενώ μια ουσία που αποτελείται από πολικά μόρια θα είναι υγρή (π.χ. H_2O). Όπως και στην περίπτωση των δεσμών υδρογόνου, οι δεσμοί Van der Waals είναι ιδιαίτερα σημαντικοί τόσο για τα βιολογικά μόρια όσο και για τις αλληλεπιδράσεις βιολογικών υλικών-υλικών.

Το είδος των ενδοατομικών και ενδομοριακών δεσμών είναι αυτό που καθορίζει τόσο τις μηχανικές ιδιότητες όσο και τις φυσικοχημικές. Έτσι λέγοντας φυσικοχημικές ιδιότητες ενός υλικού και συγκεκριμένα της επιφάνειας, μιας και μόνο η επιφάνεια έρχεται σε επαφή με το βιολογικό υλικό είτε αυτό είναι πρωτεΐνες, κύτταρα ή ιστοί συνήθως εννοούνται τα εξής (Ratner, 2004 "Surface Properties and Surface Characterization):

- ι) Χημική σύσταση της επιφάνειας
- υ) Επιφανειακή Ενέργεια
- ιι) Φορτίο
- ιγ) Μορφολογία και Τραχύτητα

Επειδή οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας και το πώς αυτές επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις βιολογικού υλικού/βιοϋλικού αποτελούν αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής, η φυσική σημασία της καθε μιας από τις παραπάνω ιδιότητες αλλά και ο τρόπος που μελετούνται θα παρουσιαστούν διεξοδικά στο κυρίως μέρος της διατριβής.

1.1.3.3. Τροποποίηση Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων της Επιφάνειας των Βιοϋλικών

Με δεδομένο ότι το βιοϋλικό αλληλεπιδρά μέσω της επιφάνειάς του με τις πρωτεΐνες, τα κύτταρα του αίματος, τους διάφορους ιστούς, αλλά και τα βακτήρια που προσπαθούν να το αποικίσουν, έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές προκειμένου να βελτιωθούν οι επιφανειακές ιδιότητες του υλικού, και άρα η βιοσυμβατότητα του, ενώ η κυρίως μάζα του θα παραμένει ανεπηρέαστη (Ratner, 2004 “Surface Properties and Surface Characterization”; Ratner, 2004 “Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine”).

Μέσω της αλλαγής των επιφανειακών ιδιοτήτων των υλικών, οι μηχανικές ιδιότητές τους παραμένουν ανεπηρέαστες. Επίσης, οι τεχνικές αυτές δίνουν τη δυνατότητα στους ερευνητές να μελετήσουν την επίδραση των επιφανειακών ιδιοτήτων στη βιοσυμβατότητα των υλικών. Ανάμεσα στις τεχνικές που έχουν προταθεί κυριαρχούν αυτές του πλάσματος (Chan, 1974; von Engel, 1983) και των αυτο-οργανούμενων μονοστρωματικών συστημάτων (Self-Assembled Monolayers) (Savig 1980; Schreiber F, 2000).

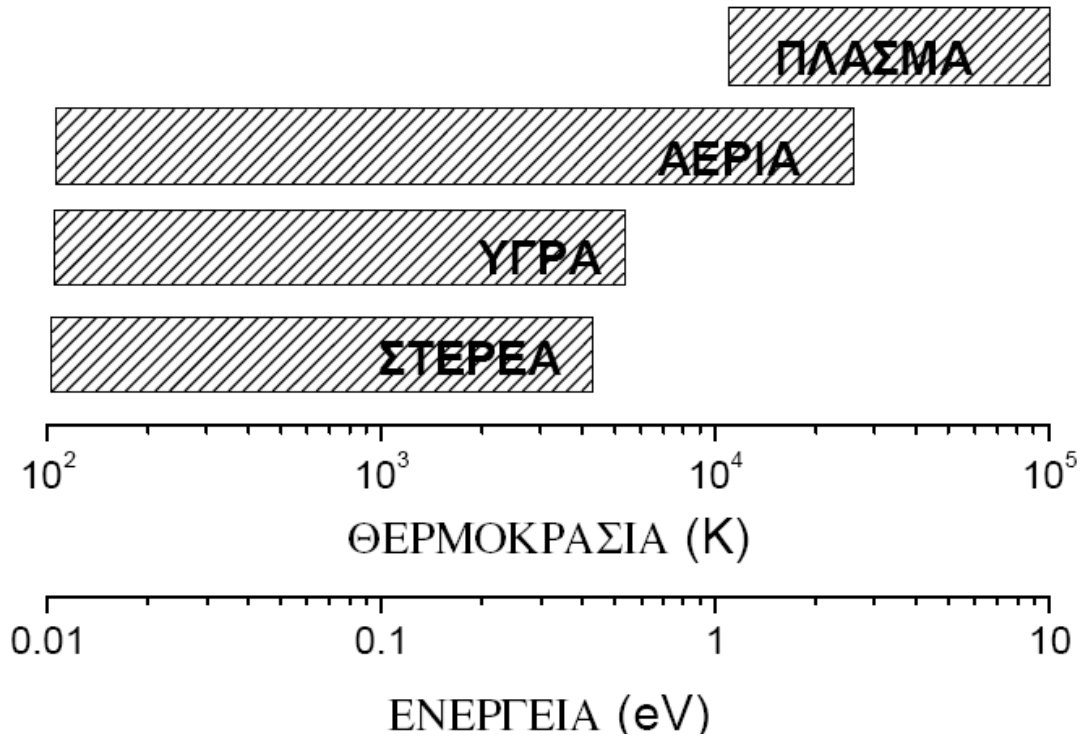
1.1.3.3.1. Τεχνική Πλάσματος

Η επεξεργασία υλικών με τεχνολογία πλάσματος έχει ως αποτέλεσμα την επιφανειακή τροποποίηση του υλικού με τρόπο που εξαρτάται από την σύσταση της αέριας φάσης του πλάσματος. Οι μηχανικές ιδιότητες του υλικού αλλά και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της μάζας του υλικού, πλην της επιφάνειάς του, μένουν ανεπηρέαστες.

Χαρακτηριστικά πλάσματος

Το πλάσμα είναι από ενεργειακή άποψη, (λαμβάνοντας υπόψη την ενέργεια των σωματιδίων που το αποτελούν), η τέταρτη κατάσταση της ύλης μετά τη στερεά, την υγρή και την αέρια. Στο σχήμα 1.1.2 παρουσιάζεται σχηματικά το εύρος της θερμοκρασίας και της ενέργειας των σωματιδίων σε κάθε μια από τις τέσσερις καταστάσεις της ύλης (Chan, 1974; von Engel, 1983; Ratner, 2004 “Physicochemical Surface Modification of Materials Used in Medicine”).

Πιο συγκεκριμένα, μπορούμε να ορίσουμε το πλάσμα ως ένα ψευδο-ουδέτερο αέριο που αποτελείται από φορτισμένα σωματίδια (ιόντα και ηλεκτρόνια) και ουδέτερα σωματίδια και χαρακτηρίζεται από «συλλογική συμπεριφορά». Στο πλάσμα η κίνηση των σωματιδίων μπορεί να προκαλέσει τοπικές συσσωρεύσεις θετικών και αρνητικών φορτίων, τα οποία δημιουργούν ηλεκτρικά πεδία μεγάλης εμβέλειας (αλληλεπιδράσεις Coulomb). Τα ηλεκτρικά αυτά πεδία μπορούν να επηρεάσουν την κίνηση φορτισμένων σωματιδίων που βρίσκονται πολύ μακρύτερα από το σημείο που συσσωρεύτηκαν τα αρχικά φορτία. Κατά αυτόν τον τρόπο προσδίδεται στο πλάσμα η «συλλογική συμπεριφορά», εννοώντας έτσι τη δυνατότητα των σωματιδίων του πλάσματος να επηρεάζουν το ένα το άλλο σε μεγάλες αποστάσεις σε σύγκριση με το μέγεθός τους. Τα ελεύθερα ηλεκτρόνια που υπάρχουν στον αντιδραστήρα αλληλεπιδρούν με το ηλεκτρικό πεδίο που αναπτύσσεται μεταξύ των δυο ηλεκτροδίων και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την επιτάχυνση και τον πολλαπλασιασμό τους μέσω ιονιστικών συγκρούσεων των ηλεκτρονίων με τα μόρια ή άτομα του αερίου.



Σχήμα 1.1.2. Εύρος θερμοκρασίας και ενέργειας των σωματιδίων σε κάθε μια από τις τέσσερις καταστάσεις της ύλης.

Περιγραφή της Αέριας Φάσης

Η περιοχή του πλάσματος αποτελεί μια συλλογή από ενεργά σωματίδια, φορτισμένα ή μη. Ειδικότερα, τα σωματίδια που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον είναι:

- Άτομα, μόρια ή ελεύθερες ρίζες στη θεμελιώδη κατάσταση, A .
- Ηλεκτρονικά διεγερμένα άτομα, μόρια ή ελεύθερες ρίζες, A^*
- Άτομα σε κατάσταση ιονισμού, A^+ ή A^-
- Ηλεκτρόνια, e^-
- Φωτόνια, $h\nu$

Τα παραπάνω είναι ικανά να μετέχουν σε δύο είδη κρούσεων: α) σε ελαστικές κρούσεις και β) σε ανελαστικές. Στις ελαστικές κρούσεις τα ζεύγη τα οποία μετέχουν μπορεί να είναι τα ακόλουθα: (e, A) , (A^+, A) , (A^+, B) κ.ο.κ.

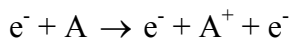
Η επεξεργασία επιφανειών με πλάσμα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις ροές των ελεύθερων ριζών αλλά και των ιόντων από το πλάσμα προς το υλικό. Έτσι, οι

διεργασίες όπως ιονισμός, διάσπαση και διέγερση ατόμων ή μορίων έχουν μεγάλη σημασία. Γενικά, οι αντιδράσεις της αέριας φάσης των εκκενώσεων χαμηλών πιέσεων χαρακτηρίζονται από ποικιλία αντιδράσεων και συγκρούσεων ηλεκτρονίων – μορίων, ριζών – ριζών, ιόντων – ριζών και ιόντων – ιόντων. Στη συνέχεια περιγράφονται οι κύριοι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης επιφάνειας υλικού τοποθετημένες σε πλάσμα με τα ενεργά ενδιάμεσα της αέριας φάσης (Παπακωνσταντίνου, Διατριβή).

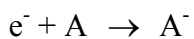
Ο Ρόλος των Ηλεκτρονίων

Τα ηλεκτρόνια είναι τα σωματίδια εκείνα τα οποία είναι υπαίτια για την έναρξη της εκκένωσης και στη συνέχεια με τις συγκρούσεις τους με τα άλλα σωματίδια του πλάσματος μετέχουν σε αντιδράσεις διάσπασης, διέγερσης, μεταφοράς ορμής και φορτίου.

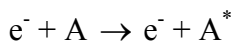
Αναλυτικά, οι αντιδράσεις που συμβαίνουν στην αέρια φάση και εμπλέκονται τα ηλεκτρόνια αναφέρονται στη συνέχεια. Έτσι, ένα ηλεκτρόνιο μετά από τη σύγκρουσή του με ένα άτομο, αποσπά ένα άλλο ηλεκτρόνιο από το άτομο παράγοντας ένα θετικό ιόν και άλλο ένα επιπλέον ηλεκτρόνιο, όπως φαίνεται στην αντίδραση που ακολουθεί, διαδικασία που ευθύνεται για τον πολλαπλασιασμό των ηλεκτρονίων:



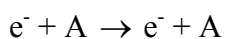
Μια άλλη πιθανή αντίδραση μπορεί να οδηγήσει το συγκρουόμενο ηλεκτρόνιο με το μόριο να συνδεθεί μαζί του δημιουργώντας ένα αρνητικό ιόν. Αυτή η διεργασία είναι γνωστή ως ηλεκτρονική επανασύνδεση:



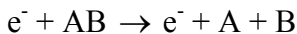
Όταν η ενέργεια που μεταφέρεται από το ηλεκτρόνιο στο άτομο, μόριο ή ρίζα μέσω μιας σύγκρουσης προκαλεί μόνο αλλαγή στην ενεργειακή στάθμη ηλεκτρονίων (μετάβαση σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη) τότε η διεργασία ονομάζεται ηλεκτρονική διέγερση:



Επίσης είναι δυνατή η παρακάτω αντίδραση μεταφοράς ορμής:

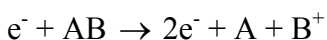


Από την άλλη, όταν το αποτέλεσμα της σύγκρουσης του ηλεκτρονίου με το μόριο είναι η απομάκρυνση τμήματος του μορίου τότε έχουμε διάσπαση:

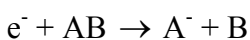


Πρέπει να αναφέρουμε ότι οι διεργασίες διάσπασης στις ηλεκτρικές εκκενώσεις συνήθως έχουν σαν αποτέλεσμα να ενισχύεται κατά πολύ η χημική δραστηριότητα στην εκκένωση, αφού τα προϊόντα της διάσπασης είναι χημικώς πιο δραστικά από τα αντιδρώντα. Αν η αντίδραση διάσπασης συνοδεύεται από ιονισμό, επανασύνδεση ή διάσπαση τότε έχουμε:

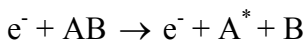
διασπαστικό ιονισμό:



διασπαστική επανασύνδεση:



και διασπαστική διέγερση αντίστοιχα:



Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων – πολυμερικών επιφανειών, στη βιβλιογραφία δεν αναφέρεται να παίζουν σημαντικό ρόλο. Τα ηλεκτρόνια και τα αρνητικά ιόντα δεν εμφανίζουν κάποια άμεση σημαντική επίδραση στη διαμόρφωση της επιφάνειας του πολυμερούς καθώς από τη μάζα του πλάσματος ως την επιφάνεια μεσολαβεί η περιοχή του περιβλήματος, όπου κυριαρχούν θετικά φορτία. Τα ηλεκτρόνια είτε επιβραδύνονται κατά την πορεία τους προς την επιφάνεια και αποκτούν μικρές κινητικές ενέργειες, είτε απωθούνται από την επιφάνεια και παραμένουν παγιδευμένα στην κύρια περιοχή του πλάσματος.

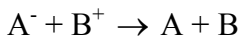
Ο Ρόλος των Ουδέτερων Σωματιδίων

Τα ουδέτερα σωματίδια της αέριας φάσης που υπάρχουν κατά την επεξεργασία πολυμερών επιφανειών σε εκκενώσεις αίγλης ραδιοσυχνότητας διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: (i) τα ουδέτερα άτομα ή μόρια του αερίου που χρησιμοποιείται για τη διεργασία και (ii) τις ελεύθερες ρίζες και τα μικρά μόρια που προκύπτουν από τη διαδικασία αποικοδόμησης των πολυμερών. Τα σωματίδια της δεύτερης κατηγορίας, μετά τη δημιουργία τους, διαχέονται προς τη μάζα του πλάσματος και τα τοιχώματα του αντιδραστήρα. Η παραγωγή τους εξαρτάται από το είδος της επιφάνειας που έρχεται σε επαφή με το πλάσμα και από τις πειραματικές συνθήκες της επεξεργασίας, επομένως οι αντιδράσεις τους είναι εξειδικευμένες. Στην πρώτη κατηγορία των ουδέτερων ειδών που

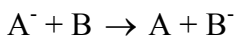
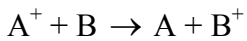
αναφέρθηκε παραπάνω ανήκουν τα ουδέτερα άτομα ή μόρια είτε αυτά βρίσκονται στην θεμελιώδη κατάσταση είτε σε κάποια διεγερμένη (απλή ή μετασταθή).

Αντιδράσεις των Ιόντων στην Αέρια Φάση

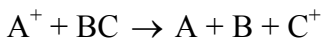
Οι αντιδράσεις ιόντων–ουδετέρων και ιόντων–ιόντων παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στη χημεία του πλάσματος. Σε μια εκκένωση αίγλης αν συνυπάρχουν ανιόντα και κατιόντα είναι δυνατή η αντίδραση:



Οι αντιδράσεις ανταλλαγής φορτίου είναι αυτές που καθορίζουν το πιο ιόν επικρατεί στην εκκένωση. Γενικά τα θετικά ιόντα που επικρατούν στην εκκένωση είναι αυτά των μορίων και ατόμων με το χαμηλότερο δυναμικό ιονισμού. Οι αντιδράσεις ανταλλαγής φορτίου αποτελεί και έναν τρόπο για μεταφορά ενέργειας μεταξύ ιόντων και ριζών

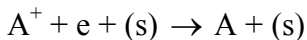


Επιπλέον, στην περίπτωση που η διαφορά στο δυναμικό ιονισμού είναι αρκετά μεγάλη τότε η ενέργεια που απελευθερώνεται από την αντίδραση ανταλλαγής φορτίου μπορεί να προκαλέσει και διάσπαση

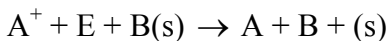


Στις διεργασίες εναπόθεσης και εγχάραξης με πλάσμα η ροή των ιόντων προς την επιφάνεια αλλά και αντιδράσεις τους εκεί παίζουν σημαντικό ρόλο ωστόσο, αυτός ο ρόλος είναι αρκετά πιο σημαντικός για την εγχάραξη και το φαινόμενο sputtering.

Η εξουδετέρωση των θετικών ιόντων μέσω της επανασύνδεσής τους με ηλεκτρόνια στην επιφάνεια αντιπροσωπεύει τον κυριότερο τρόπο απώλειας φορτίων στις ηλεκτρικές εκκενώσεις χαμηλής πίεσης



Από την άλλη, όταν αυτή η αντίδραση συμβαίνει στην επιφάνεια και όχι στον κύριο όγκο του υλικού τότε έχουμε υποβοηθούμενη εκκρόφιση



Τα πράγματα αλλάζουν όταν ο βομβαρδισμός της επιφάνειας γίνεται με ιόντα

χαμηλής ενέργειας οπότε τα ιόντα συμμετέχουν στην ενίσχυση άλλων διεργασιών π.χ εγχάραξης ή εναπόθεσης. Στα πλαίσια της μελέτης της αλληλεπίδρασης πλάσματος – επιφάνειας μετά από την εισαγωγή της τελευταίας στο χώρο του πλάσματος σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν η δραστηριότητα της επιφάνειας, η κινητικότητα των ποικίλων σωματιδίων στην αέρια φάση και η ηλεκτροδυναμική συμπεριφορά του αερίου.

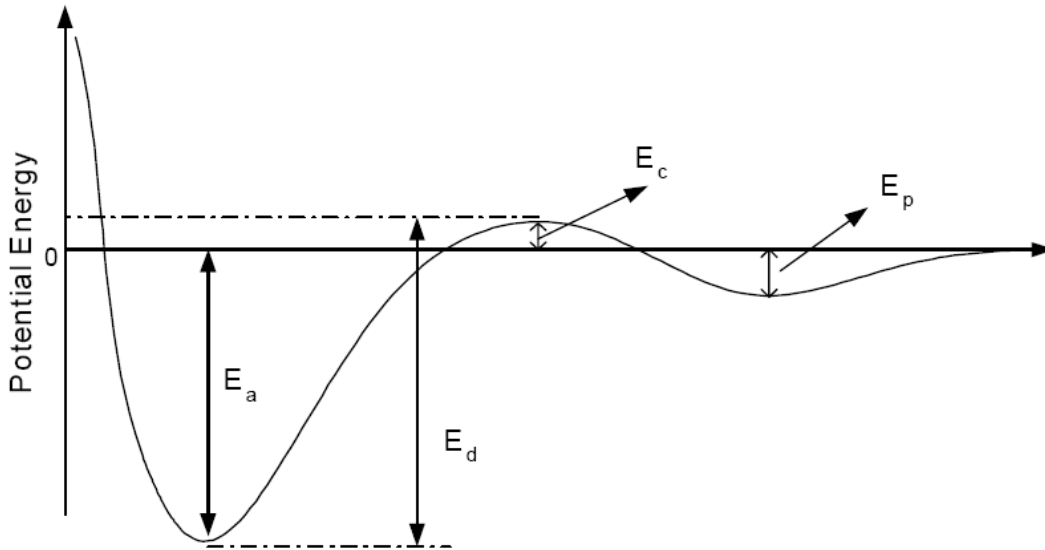
Ο βομβαρδισμός της επιφάνειας με ιόντα γίνεται είτε αυθόρμητα με την επιτάχυνσή τους από το χώρο του περιβλήματος είτε εξαναγκασμένα με τη χρήση δέσμης ιόντων υψηλών ενεργειών.

Αλληλεπίδραση Πλάσματος με Επιφάνειες

Οι αλληλεπιδράσεις στην αέρια φάση, που προαναφέρθηκαν, είναι υπεύθυνες για τη σύσταση του ρεύματος των σωματιδίων που καταλήγουν στην επιφάνεια του υλικού. Ακολουθεί μια σειρά από διεργασίες που έχουν ως αποτέλεσμα είτε την ανάπτυξη υμενίου, είτε την παραγωγή δευτερογενών προϊόντων στην επιφάνεια. Οι διεργασίες αυτές είναι:

- i) Η μεταφορά των ενεργών ενδιάμεσων στη ζώνη ανάπτυξης του υμενίου
- ii) Η προσρόφηση των ενεργών ειδών
- iii) Οι φυσικοχημικές αντιδράσεις και δευτερογενή αέρια προϊόντα
- iv) Η εκρόφιση των δευτερογενών προϊόντων
- v) Η μεταφορά των εκροφούμενων προϊόντων μακριά από την αναπτυσσόμενη επιφάνεια.

Οι διεργασίες που σχετίζονται άμεσα με την αλληλεπίδραση της αέριας φάσης και της στερεής επιφάνειας είναι αυτές που αναφέρονται στα βήματα iii, iv και v.



Σχήμα 1.1.3. Απλό διάγραμμα δυναμικής ενέργειας

Ένα απλό διάγραμμα δυναμικής ενέργειας που συμπεριλαμβάνει τα τρία αυτά στάδια φαίνεται στο σχήμα 1.1.3. Κάποια από τα προσπίπτοντα μόρια *φυσιοροφούνται* στην επιφάνεια (βήμα iii), σχηματίζοντας ένα ασθενή δεσμό με ενέργεια E_p . Κατά τη διάρκεια της παραμονής τους στην κατάσταση αυτή μπορούν να συμβούν ηλεκτρονιακές ή δονητικές διεργασίες οι οποίες επιτρέπουν στα μόρια να υπερπηδήσουν το μικρό ενεργειακό φράγμα E_c (ενέργεια ενεργοποίησης $E_p + E_c$). Με αυτό τον τρόπο το κάθε ροφημένο μόριο βρίσκεται σε ένα πολύ βαθύτερο ενεργειακό πηγάδι E_a , είναι λοιπόν *χημειοροφημένο* (βήμα iv). Η ενέργεια E_a εξαρτάται τόσο από το είδος του μορίου όσο και από το είδος της επιφάνειας στην οποία χημειοροφάται και για αυτό το λόγο παίρνει ένα μεγάλο εύρος τιμών. Αν κατά τη διάρκεια του χρόνου παραμονής του μορίου ως φυσιοροφημένο στην επιφάνεια δε καταφέρει να ξεπεράσει το ενεργειακό φράγμα που απαιτείται για τη χημειορόφηση τότε εκροφάται επιστρέφοντας στην αέρια φάση (βήμα v).

Αξίζει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες από αυτές τις διεργασίες περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση ελευθέρων ριζών με την επιφάνεια. Τα ουδέτερα μόρια στις θερμοκρασίες που πραγματοποιούνται οι εναποθέσεις με πλάσμα (100-500 °C) δεν αλληλεπιδρούν με τις επιφάνειες. Επίσης, η αλληλεπίδραση των ιόντων με τις επιφάνειες περιλαμβάνει κυρίως τη μεταφορά της κινητικής τους ενέργειας στις επιφάνειες και

συμβάλλει κυρίως στην εγχάραξη ή την εναπόθεση. Αυτό είναι κυρίως το αποτέλεσμα της υψηλής κινητικής ενέργειας που έχουν τα ιόντα (λόγω της επιτάχυνσης τους στο ηλεκτρικό πεδίο). Στον πίνακα 1.1.2. παρουσιάζεται συνοπτικά η επίδραση των συστατικών του πλάσματος στην επιφάνεια του πολυμερούς (Παπακωνσταντίνου, Διδακτορική Διατριβή).

Σωματίδιο	Διεργασίες και Επίδραση στο Πολυμερές	Βάθος Αλληλεπίδρασης
Ιόντα, Ουδέτερα	Ελαστικές Συγκρούσεις, Χημικές Αντιδράσεις, Εναποθέσεις	2-5 nm / ή Μονόστρωμα
Ηλεκτρόνια	Ανελαστικές Συγκρούσεις, Ιονισμός και Αποικοδόμηση Επιφάνειας	1 nm
Ενεργά Ουδέτερα	Προσρόφηση, Χημικές Αντιδράσεις, Σχηματισμός Χαρακτηριστικών Ομάδων	Μονόστρωμα
Φωτόνια	Φωτοχημικές Διεργασίες	10-50 nm

Πίνακας 1.1.2. Αλληλεπίδραση Πλάσματος-Πολυμερικής Επιφάνειας

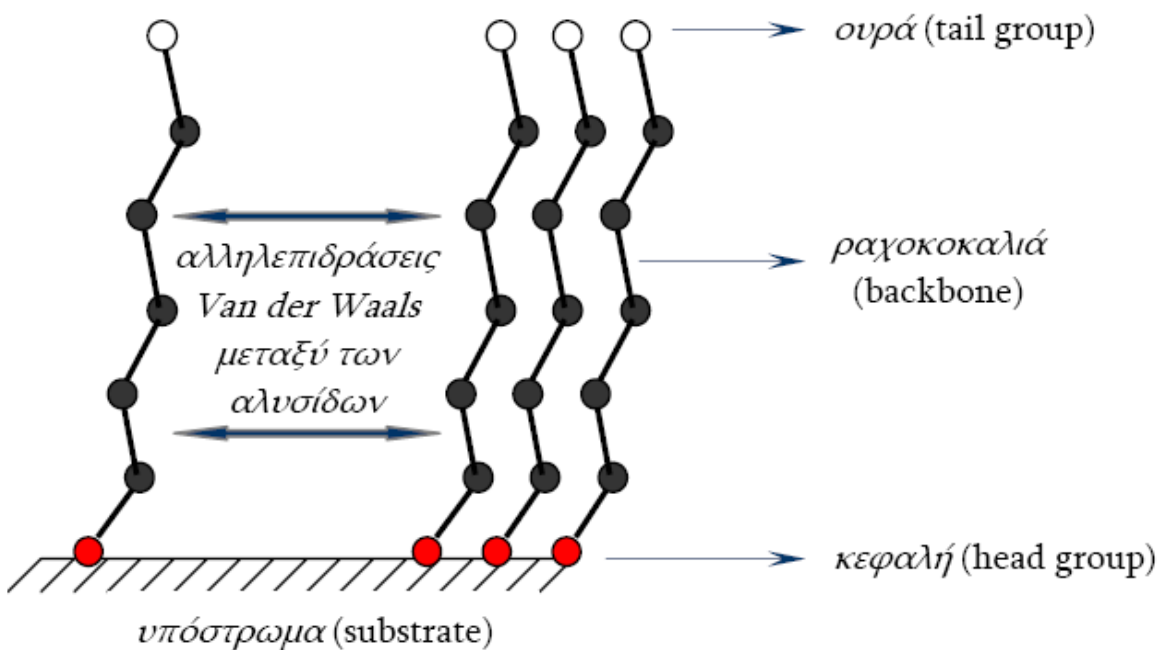
1.1.3.3.2. Αυτό-οργανούμενα Μονοστρωματικά Συστήματα (Self-Assembled Monolayers: SAMs)

Τα αυτό-οργανούμενα μονοστρωματικά συστήματα (SAMs), είτε αυτά προέρχονται από διάλυμα είτε από αέρια φάση, αντιπροσωπεύουν μία κατηγορία οργανικών υμενίων. Το χαρακτηριστικό που διακρίνει αυτήν την κατηγορία είναι η χημειορόφηση μιας χημικής ουσίας σε ένα στερεό υπόστρωμα, ή, πιο γενικά, η ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ τους που οδηγεί στο σχηματισμό χημικού δεσμού (Savig, 1980).

Το φαινόμενο της αυτό-οργάνωσης, κατά μία γενική έννοια, μπορεί να περιγραφεί ως ο “αυθόρμητος” σχηματισμός σύνθετων ιεραρχικών δομών από προσχεδιασμένες δομικές μονάδες που εμπεριέχουν πολλαπλές ενεργειακές κλίμακες και

μεγάλο αριθμό βαθμών ελευθερίας. Στη φύση, η αυτό-οργάνωση αποτελεί μία πολύ γενική αρχή και παρατηρείται π.χ. στο σχηματισμό μεμβρανών από λιπίδια ή και στη δημιουργία ζωντανού ιστού.

Τα SAMs είναι υψηλής τάξης μοριακά συστήματα που σχηματίζονται με προσρόφηση μίας “ενεργής” ένωσης σε κατάλληλο υπόστρωμα (substrate). Οι ενώσεις αυτές είναι αλκάνια μικρού μοριακού μήκους (10-20 μεθυλένια) που έχουν στο ένα άκρο τους ομάδα (head group) {π.χ. ομάδα σιλανίου [-SiCl₃, Si(EtO)₃ κ.α.] ή ομάδα μερκαπτάνης (-SH)} η οποία αλληλεπιδρά ισχυρά με την επιφάνεια και οδηγεί στο σχηματισμό χημικού δεσμού. Στο σχήμα 1.1.4. αναπαρίσταται γραφικά ένα μόριο SAM συμπεριλαμβανομένων και των δομικών μονάδων που το συνθέτουν (κεφαλή, ραχοκοκαλιά, ουρά).



Σχήμα 1.1.4. Η δομή των SAMs. Οι κόκκινες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τη χημειοροφημένη “κεφαλή” που αλληλεπιδρά με το υπόστρωμα και οι λευκές σφαίρες την “ουρά” (τελική ομάδα) του μορίου η οποία ρυθμίζει τις χημικές ιδιότητες του φιλμ.

Ο λόγος για τον οποίον τα οργανικά υλικά είναι διαδεδομένα σε τόσο διαφορετικά πεδία έρευνας είναι η σχετική ευκολία με την οποία μπορούν να ρυθμιστούν

οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας απλά μεταβάλλοντας συγκεκριμένες “ενεργές-τελικές” ομάδες (tail groups) και διατηρώντας το υπόλοιπο μόριο ανέπαφο. Για παράδειγμα, αντικαθιστώντας την τελική ομάδα του μεθυλίου (-CH₃) με την ενεργή ομάδα του υδροξυλίου (-OH) σ’ ένα σύστημα SAM σιλανίων επιτυγχάνουμε αλλαγή του υδρόφοβου χαρακτήρα της εκάστοτε επιφάνειας σε υδρόφιλο.

Διάφορα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για το σχηματισμό SAMs. Το χαρακτηριστικό στοιχείο που διέπει τα SAMs είναι το “ζεύγος” μεταξύ της χημειοροφημένης “κεφαλής” του μορίου και του στερεού υποστρώματος (το υπόλοιπο μόριο μπορεί να επιλέγεται σχεδόν χωρίς κανένα περιορισμό) και με βάση αυτό κατατάσσονται στις διάφορες κατηγορίες. Τυπικά παραδείγματα συστημάτων SAMs παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1.3.

Από τα παρακάτω ζεύγη υποστρώματος - ενεργής ένωσης, ίσως το πιο διαδεδομένο είναι το σύστημα των οργανοπυριτικών ενώσεων [-SiCl₃, Si(EtO)₃] σε υδροξυλιωμένες επιφάνειες (π.χ. SiO₂) (Savig, 1980) αλλά και το σύστημα των αλκανοθειολών [CH₃-(CH₂)_n-SH] σε χρυσό Au(111) (Nuzzo και Allara, 1983). Και τα δύο έχουν μελετηθεί εκτενώς τόσο σε πειραματικό όσο και σε θεωρητικό επίπεδο για τη διερεύνηση συγκεκριμένων δομικών χαρακτηριστικών των μονομοριακών υμενίων καθώς και την επίδραση που υφίσταται η δομή του σχηματιζόμενου φιλμ όταν μεταβάλλεται η χημεία της “ραχοκοκαλιάς” της αλυσίδας και/ή ο τύπος του ατόμου “κεφαλή”.

Ένωση που προσροφάται	Υπόστρωμα
Καρβοξυλικό οξύ (R-COOH)	Άργυρος (Ag), Al ₂ O ₃
Πυριτική ένωση (π.χ. R-SiCl ₃)	Al ₂ O ₃ , SiO ₂
Αλκανοθειόλη (R-SH)	Χρυσός (Au), Άργυρος (Ag), Πλατίνα (Pt)
Σουλφίδιο (R-S-R), δισουλφίδιο (R-S-S-R)	Χρυσός (Au)
Αλκοόλη (R-OH)	Πλατίνα (Pt)
Αμίνη (R-NH ₂)	Πλατίνα (Pt)

Πίνακας 1.1.3. Τυπικά παραδείγματα αυτό-οργανωμένων μονοστρωματικών συστημάτων.

Τα SAMs έχουν αποτελέσει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας διότι προσφέρουν μοναδική ευκαιρία για την κατανόηση του φαινομένου της αυτό-οργάνωσης και των διεπιφανειακών φαινομένων καθώς και των διεργασιών που σχετίζονται με αλληλεπιδράσεις μεταξύ μορίων, μορίων-επιφάνειας και μορίων-διαλύτη, όπως η διαβροχή, επικόλληση, λίπανση και διάβρωση. Επιπλέον, τα SAMs χρησιμοποιούνται σε ένα πλήθος εφαρμογών, όπως στην οπτική και ηλεκτρονική, ως μέσα ελέγχου του υδρόφιλου-υδρόφοβου χαρακτήρα της επιφάνειας, στη μοριακή ταυτοποίηση, στη νανοτεχνολογία, στη μεταφορά φαρμάκων, και πρόσφατα ακόμα και ως βιοαισθητήρες (Schreiber, 2000).

Ειδικότερα, επειδή τα SAMs αποτελούν το συνδετικό κρίκο μεταξύ οργανικής και ανόργανης ύλης, είναι ιδανικά για μελέτες διεπιφανειακών διεργασιών βιολογικών μορίων-υλικών. Η δυνατότητα της επιλεκτικής ρόφησης μεγάλων βιολογικών μορίων έλκει μεγάλο ενδιαφέρον σε διάφορους τομείς που αφορούν βιο-συμβατές εφαρμογές (Higashi et al., 1999; Lahiri et al., 1999; Nyquist et al., 2000)

Άλλες εργασίες σχετικές με βιολογικές εφαρμογές των συστημάτων SAMs αφορούν στην ακινητοποίηση βιο-μορίων μέσω ρόφησης τους σε ένα σύστημα SAM γεγονός που επιτρέπει ένα καλύτερα ορισμένο χαρακτηρισμό αυτών με πειραματικές τεχνικές όπως το AFM (atomic force microscopy), σε σχέση με αυτόν που πραγματοποιείται σε αντίστοιχο διάλυμα αυτών (Weisser et al., 1996; Nelles et al., 1996; Wagner et al., 1997). Η ακινητοποίηση των βιο-μορίων έχει άμεση εφαρμογή και στο σχεδιασμό των βιο-αισθητήρων. Ο βιο-αισθητήρας είναι μία αναλυτική συσκευή που μετατρέπει συγκεκριμένες, ισχυρές βιο-μοριακές αλληλεπιδράσεις σε ενισχυμένα ηλεκτρικά σήματα. Αναγκαία συνθήκη για τη σωστή λειτουργία ενός βιο-αισθητήρα είναι η ακινητοποίηση των μορίων-αισθητήρων πάνω στην επιφάνεια μετατροπής του σήματος και επομένως η μοριακή οργάνωση έχει σημαντικό αντίκτυπο στις ιδιότητες της κυρίως μάζας (bulk) της συσκευής καθώς και στη συγκεκριμενοποίηση και επιτυχημένη μετατροπή του επιθυμητού σήματος. Στην ιδανική του μορφή η αρχιτεκτονική ενός τέτοιου ακινητοποιημένου υμενίου θα περιελάμβανε αδρανή, προσανατολισμένα και

ομοιογενώς κατανεμημένα βιο-μόρια. Επομένως, ο έλεγχος των χαρακτηριστικών ενός βιο-αισθητήρα προϋποθέτει την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων τόσο μεταξύ μορίων όσο και των μορίων με το υπόστρωμα. Τα συστήματα SAMs παρέχουν αυτή τη δυνατότητα διότι σχηματίζουν εξαιρετικά σταθερές και υψηλής τάξης δομές, προετοιμάζονται σχετικά εύκολα και μπορούν να σχεδιαστούν κατ' ουσία με οποιαδήποτε επιθυμητή λειτουργία (Nyquist et al., 2000).

1.1.4. Εφαρμογές Βιοϋλικών

Γενικά οι ιστοί μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: τους *σκληρούς* και τους *μαλακούς*. Σαν *σκληρούς ιστούς* μπορούμε να αναφέρουμε τα οστά και τα δόντια, ενώ σαν *μαλακούς ιστούς* μπορούμε να αναφέρουμε το δέρμα, τα αγγεία και τους συνδέσμους.

Ας δούμε λοιπόν πιο αναλυτικά τους διάφορους ιστούς και πώς ομογενή αλλά και σύνθετα υλικά χρησιμοποιούνται για την επούλωση και αντικατάστασή τους, αλλά και για θεραπευτικούς σκοπούς.

1.1.4.1. Βιοϋλικά-Σκληροί Ιστοί:

I. Οστά

Διάφορα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται για την επούλωση καταγμάτων, ως εμφυτεύματα σπονδυλικής στήλης, για την αντικατάσταση συνδέσμων όπως μηριαίου-λαγόνιου οστού και γόνατος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται βιοϋλικά με τη μορφή δισκίων, βιδών και συνδέσμων. Τα εμφυτεύματα αυτά είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι και κράματα του τιτανίου ή κοβαλτίου αλλά και από κεραμικά υλικά. Χρησιμοποιούνται επίσης τα πολυμερή PMMA, PP, PE, PET, PU και nylon με ίνες άνθρακα. Συχνά χρησιμοποιούνται και υλικά που αποικοδομούνται με το χρόνο οπότε χάνουν σταδιακά τις μηχανικές τους ιδιότητες. Τέτοια υλικά δεν χρειάζονται χειρουργική απομάκρυνση. Ως τέτοια χρησιμοποιούνται μήτρες κατασκευασμένες από poly(lactic acid) και ίνες από calcium phosphate based glass και poly(glycerol acid). Πολλές φορές όμως τα υλικά αυτά έχουν ίνες μη αποικοδομήσιμες όπως άνθρακα και πολυαμιδίου

προκειμένου να βελτιώσουν τις μηχανικές τους ιδιότητες (Brunski, 2004; Cooper et al., 2004; Hench και Best, 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Khohn και Abramson, 2004; Weinberg και King, 2004; Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”, Cooke, 2004).

II. Οδοντικά Εμφυτεύματα

Η αντιμετώπιση προβλημάτων των δοντιών είναι από τις συνηθισμένες περιπτώσεις ασθενειών και περιλαμβάνουν από συμπλήρωση κοιλοτήτων (σφράγισμα) μέχρι αντικατάσταση κομματιών ή αλλοιωμένων δοντιών. Αμαλγάματα, χρυσός, ζirkονία, ακρυλικές ρητίνες και σιλκόνες είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα βιοϋλικά για σφραγίσματα, αλλά και σύνθετα με ρητίνες ως μήτρα και γυαλιά βορίου και σιλκόνες ως συμπληρώματα.

Σε περιπτώσεις που το υπόλειμμα του υγιούς δοντιού είναι μικρό χρησιμοποιούνται θήκες από ανοξείδωτο ατσάλι, κράματα Ni-Cr, Au-Pt, Ti. Στις περιπτώσεις εκείνες που εξαγωγή του δοντιού είναι απαραίτητη, χρησιμοποιούνται οδοντικά εμφυτεύματα αντί για γέφυρες. Πολλά υλικά χρησιμοποιούνται για το σκοπό αυτό όμως τα σύνθετα πλεονεκτούν έναντι των μετάλλων και των κεραμικών ως προς την αντοχή στην κόπωση. Όσον αφορά τις γέφυρες, χρησιμοποιούνται τα σχετικά φθηνά και ευκολόχρηστα σύνθετα με μήτρα το PMMA και ίνες γυαλιού (Brunski, 2004; Cooper et al., 2004; Hench και Best, 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Khohn και Abramson, 2004; Weinberg και King, 2004).

1.1.4.2. Βιοϋλικά-Μαλακοί Ιστοί:

I. Καθετήρες

Οι καθετήρες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο προκειμένου να τροφοδοτήσουν τον οργανισμό με υγρά όπως θρεπτικά υλικά, ισοτονικό ορό, γλυκόζη, φάρμακα, αίμα, και προϊόντα του αίματος. Χρησιμοποιούνται επίσης για τη συλλογή πληροφοριών όπως αρτηριακή πίεση, μέτρηση της συγκέντρωσης αερίων (O₂, CO₂) στο αίμα, καθώς και για τη συλλογή δειγμάτων του αίματος για εργαστηριακή ανάλυση. Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή αυτή είναι PU, SR εξαιτίας της

ευκαμψίας τους και της ευκολίας μορφοποίησής τους σε διάφορα μεγέθη και μήκη προκειμένου να μπορούν να εξυπηρετήσουν κάθε μέγεθος. Ένας ιδανικός λοιπόν καθετήρας πρέπει να είναι αρκετά εύκαμπτος προκειμένου να επιτρέπει την κίνηση της φλέβας και του ασθενούς χωρίς να τραυματίζει τη φλέβα και το περίβλημά της. Επιπλέον, καθώς το υλικό έρχεται σε επαφή με το αίμα πρέπει να εξασφαλίζεται η συμβατότητά του με το αίμα, δηλαδή η μη θρομβογεννησιμότητά του και η βακτηριοστατικότητά του προκειμένου να μην προκαλεί η παρουσία του λοιμώξεις από την προσκόλληση στην επιφάνειά του βακτηρίων (Costerton et al., 2004). Τα καινούρια υλικά αποτελούνται από πολυμερή όπως PU, PVC με ίνες Ni-Ti, οπότε ο καθετήρας αποτελείται από λεπτά τοιχώματα και ελεγχόμενη σκληρότητα (Cooper et al., 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Khohn και Abramson, 2004; Weinberg και King, 2004; Colas και Curtis; 2004).

II. Συμπληρώματα «Χώρου»

Χρησιμοποιούνται για την αποκατάσταση αισθητικών ατελειών, ιδιαίτερα στο κεφάλι και το λαιμό, ατροφιών και απωλειών χόνδρου που συναντούνται στην οστεοαρθρίτιδα. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σύνθετα με ίνες άνθρακα και μήτρα: PET, PTFE, PU, SR. Τα υλικά αυτά δεν φαίνεται να προκαλούν ερεθισμούς (Cooper et al., 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Colas και Curtis, 2004; Weinberg και King, 2004).

III. Επικάλυψη Τραύματος

Σε περιπτώσεις εγκαυμάτων απαιτούνται υλικά για την επικάλυψη του δέρματος που θα είναι εύκαμπτα και ελαστικά. Τα υλικά αυτά πρέπει από τη μια να αποτρέπουν την απώλεια υγρών, ηλεκτρολυτών και βιομορίων καθώς και τη διέλευση βακτηριδίων, από την άλλη όμως πρέπει να είναι σε κάποιο βαθμό διαπερατά προκειμένου να επιτρέπουν αποβολή προϊόντων μεταβολισμού. Επιπλέον πρέπει να απλώνονται στην επιφάνεια του τραύματος χωρίς όμως να προκαλούν νέες πληγές στο νεοσυσταθέντα ιστό ή να αναχαιτίζουν την ανάπτυξή του κατά την απομάκρυνσή τους. Πρέπει επίσης να είναι βακτηριοστατικά και να μην επιτρέπουν την ανάπτυξη βακτηρίων. Σύνθετα υλικά ή

πορώδεις στοιβάδες από πολυμερή όπως κολλαγόνο, PLLA χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση δέρματος. Επιπλέον συνδυασμοί έμβιας ύλης (όπως καλλιέργειες κυττάρων)- άβιας (όπως σύνθετα πολυμερή) σχεδιάζονται προκειμένου να βοηθήσουν την έναρξη, επιτάχυνση και έλεγχο παραγωγής νέου δέρματος (Peppas, 2004; Yannas, 2004).

IV. Πρόσθετα Ουροποιητικού Συστήματος

Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι PVC, PE, SR, PTFE, nylon. Σε γενικές γραμμές πάντως αστοχούν όταν χρησιμοποιούνται για μεγάλα διαστήματα εξαιτίας της δυσκολίας σύνδεσης του εμφυτεύματος στο ζωντανό σύστημα. Επιπλέον συχνά εμφανίζονται προβλήματα βακτηριακής μόλυνσης και απόφραξης λόγω εναπόθεσης ασβεστίου. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ίνες πολυεστέρα σε gel μεθακρυλικής γλυκόλης όμως, παρότι το υλικό είναι αρκετά υδρόφιλο, δεν έχει λυθεί το πρόβλημα της μικροβιακής προσκόλλησης, του μικρού συντελεστή τριβής και της ελεγχόμενης προσρόφησης κυττάρων και πρωτεϊνών (Cooper et al., 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Khohn και Abramson, 2004; Weinberg και King, 2004; Colas και Curtis; 2004).

V. Λειτουργικοί Μεταφορείς Φορτίου και Εμφυτεύματα Στήριξης

Οι τένοντες είναι σκληροί ινώδεις ιστοί που εκτείνονται μεταξύ μυών και οστών, ενώ οι σύνδεσμοι είναι συνδετικοί ιστοί μεταξύ οστών. Και οι δύο λοιπόν συγκρατούν τα οστά σε μια σύνδεση διευκολύνοντας τη σταθερότητα και την κίνηση. Μεταφέρουν επίσης δυνάμεις μεταξύ μυών και οστών. Έτσι η αντικατάστασή τους από εμφυτεύματα είναι ιδιαίτερα απαιτητική. Πρέπει να έχει τέτοια ελαστικότητα, όπως ο ιστός που τα περιβάλλει, ώστε να κάμπτονται στην άρθρωση και να μεταφέρουν το φορτίο στο μυ. Σε γενικές γραμμές είναι δύσκολη η σύνδεσή τους με το οστό, η μη αστοχία μετά από μεγάλα διαστήματα και η μη φλεγμονώδης αντίδραση του οργανισμού. Τα υλικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι UHMWPE, PP, PET, PTFE και PU με ίνες, άνθρακα, και κολλαγόνου (Cooper et al., 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Khohn και Abramson, 2004; Weinberg και King, 2004; Colas και Curtis; 2004).

VI. Αγγειακά Μοσχεύματα

Τα αιμοφόρα αγγεία είναι πολύπλοκες, πολύστρωτες δομές που αποτελούνται από ίνες κολλαγόνου, ελαστίνης, λείους μύες και ενδοθηλιακό τοίχωμα. Τα αγγειακά μοσχεύματα χρησιμοποιούνται για να αντικαταστήσουν τμήματα του αγγειακού συστήματος (επιτυχώς για αγγεία διαμέτρου μεγαλύτερης των 5mm) που λόγω εναποθέσεων αθηρωματικής πλάκας στο εσωτερικό τους δεν επιτρέπουν την ομαλή κυκλοφορία του αίματος. Έτσι βρίσκουν εφαρμογή σε περίπτωση ανευρύσματος, θρομβοφλεβίτιδας και σε εγχειρήσεις bypass για την αποκατάσταση της κυκλοφορίας του αίματος μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι βασικές ιδιότητες που πρέπει να χαρακτηρίζουν αυτά τα υλικά είναι, το πορώδες τους, προκειμένου να ευνοούν την ανάπτυξη του ιστού όχι όμως και την απώλεια αίματος. Για το σκοπό αυτό συμπολυμερίζονται με κολλαγόνο ή ζελατίνη ώστε να καλύπτονται οι πόροι αλλά και να σταθεροποιείται το μόσχευμα. Επιπλέον πρέπει να έχουν καλή διαστολή και αντίσταση στη χαλάρωση καθώς υπόκειται σε συνεχείς παλμούς και στατική πίεση. Πρέπει επίσης κατά την επαφή με το αίμα να μην καταστρέφουν αιμοκύτταρα, να μην προσροφούν πρωτεΐνες και αιμοπετάλια και άρα να μην είναι θρομβογεννητικά. Πρέπει τέλος να επιτρέπουν την ανάπτυξη ενδοθηλιακών κυττάρων στο εσωτερικό τους προκειμένου να μην προκαλούν θρομβώσεις και να ταιριάζει η συμπεριφορά τους κατά τη θλίψη με αυτή των φυσιολογικών ιστών, διαφορετικά παρατηρείται μεγάλη διατμητική τάση και τυρβώδης ροή που μπορεί να προκαλέσει αιμόσταση σε κάποια σημεία και καταστροφή του αρτηριακού τοιχώματος. Προς το παρόν δεν έχει βρεθεί κάποιο υλικό που να πληρεί όλες αυτές τις προϋποθέσεις όμως οι μελέτες στρέφονται σε σύνθετα υλικά με ίνες PU και μήτρα PU, lactic acid και polyethylene glycol (PEG) (Cooper et al., 2004; Migliaresi και Alexander, 2004; Khohn και Abramson, 2004; Weinberg και King, 2004; Colas και Curtis; 2004; Hanson, Hanson και Ratner 2004).

1.1.4.3. Πρόσθετα Άκρα

Αρχικά τα τεχνητά πόδια φτιάχνονταν από μεταλλικά υλικά ή ξύλο όμως αυτά περιορίζονται λόγω του μεγάλου βάρους, της μικρής διάρκειας λόγω της διάβρωσης και της διόγκωσης εξαιτίας της υγρασίας. Σε αντίθεση με τα υλικά αυτά, τα σύνθετα λόγω του μικρού τους βάρους, της αντίστασης στην διάβρωση και την κόπωση, την καλή

απόκριση στα φορτία, την αισθητική τους και την ευκολία στο χειρισμό, εμφανίζονται ως η ιδανική επιλογή για την κατασκευή πρόσθετων άκρων. Τα θερμοπλαστικά πολυμερικά σύνθετα με ίνες άνθρακα ή γυαλιού είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα. Το πιο κρίσιμο σημείο των πρόσθετων άκρων είναι η περιοχή της σύνδεσης με το ελλιπές άκρο. Η καλύτερη διαδικασία είναι αυτή της κατασκευής του αμέσως πριν την εφαρμογή προκειμένου να προσαρμοστεί με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Για το πέλμα χρησιμοποιούνται εποξειδικά με ίνες άνθρακα και σχεδιάζονται να είναι επίπεδα, να προστατεύουν από τα τραντάγματα και να απελευθερώνουν την ενέργεια που αποθήκευσαν, καθώς το σώμα μετακινείται προς τα εμπρός, συμβάλλοντας σε ομαλότερο βάδισμα (Ratner et al., 2004, “Biomaterials Science: A Multidisciplinary endeavor”; Migliaresi και Alexander, 2004).

1.1.4.4. Όργανα για Ιατρική Χρήση

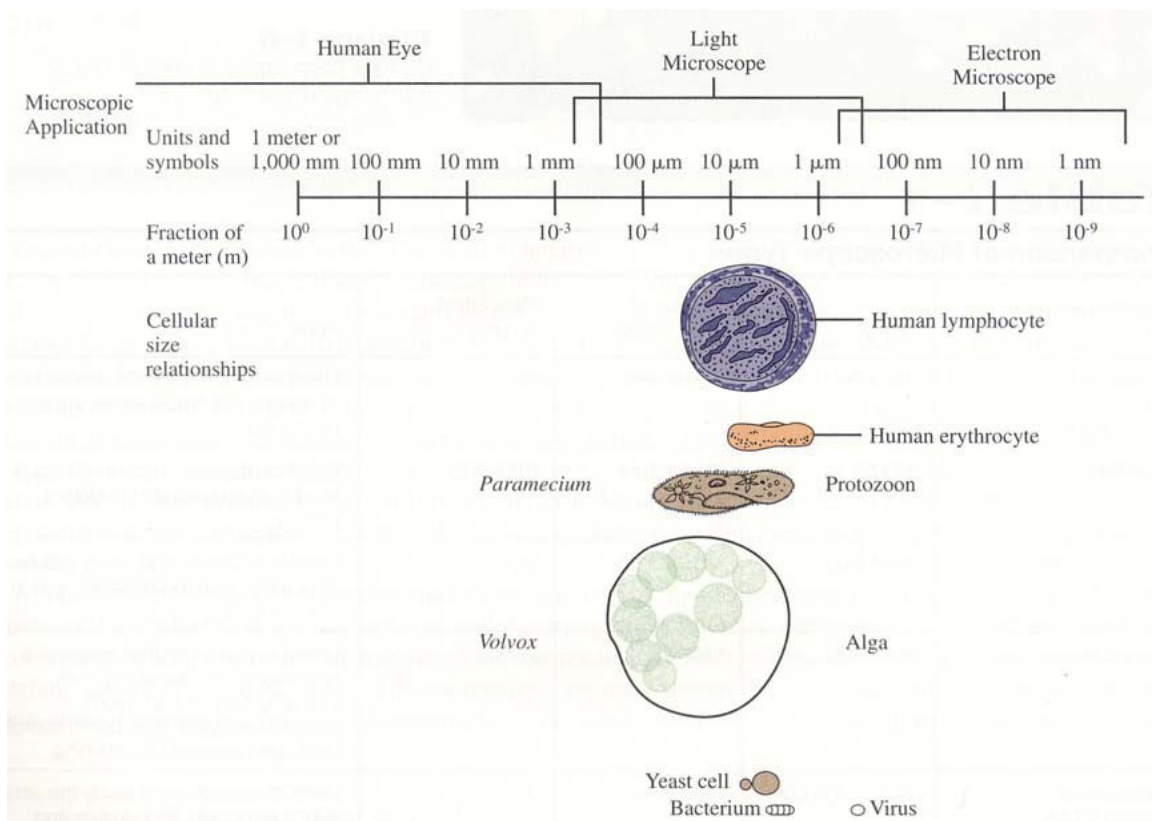
Υψηλής τεχνολογίας όργανα χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο για διαγνωστικούς σκοπούς. Τα όργανα αυτά, εξαιτίας του μεγάλου βάρους τους, βρίσκονται πάνω σε μεγάλα μετακινούμενα τραπέζια, τα υλικά από τα οποία κατασκευάζονται είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά, σκληρά αλλά και ελαφρά, ακτινοπερατά και μη μαγνητικά. Έτσι προτιμούνται τα πολυμερικά σύνθετα με ίνες άνθρακα Migliaresi και Alexander, 2004).

1.2. Γενικά Περί Μικροοργανισμών

Στο υποκεφάλαιο περιγράφονται τα γενικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων, οι τρόποι ταξινόμησής τους, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. epidermidis* και πώς αυτές σχετίζονται με την παρουσία βιοϋλικών, η παθογένεια των λοιμώξεων και τα στάδια προσκόλλησης των βακτηρίων στα βιοϋλικά.

Οι μικροοργανισμοί χωρίζονται από άποψη κυτταρικής οργάνωσης σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς. Οι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί είναι απλούστεροι και το γενετικό τους υλικό δεν περιβάλλεται από μεμβράνη. Αντίθετα οι ευκαρυωτικοί μικροοργανισμοί είναι περισσότερο σύνθετοι μορφολογικά, και το γενετικό τους υλικό περιβάλλεται από μεμβράνη. Τα φύκη, οι μύκητες, τα πρωτόζωα, τα ανώτερα φυτά και τα ζώα είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί.

Όλα τα βακτήρια είναι απλοί μονοκύτταροι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί με μέγεθος της τάξης του 1 μm . Για να γίνει κατανοητό το πόσο μικρό είναι το μέγεθός τους παρατίθεται το σχήμα 1.2.1.



Σχήμα 1.2.1. Ενδεικτικό διάγραμμα συγκριτικών μεγεθών διαφόρων κυττάρων.

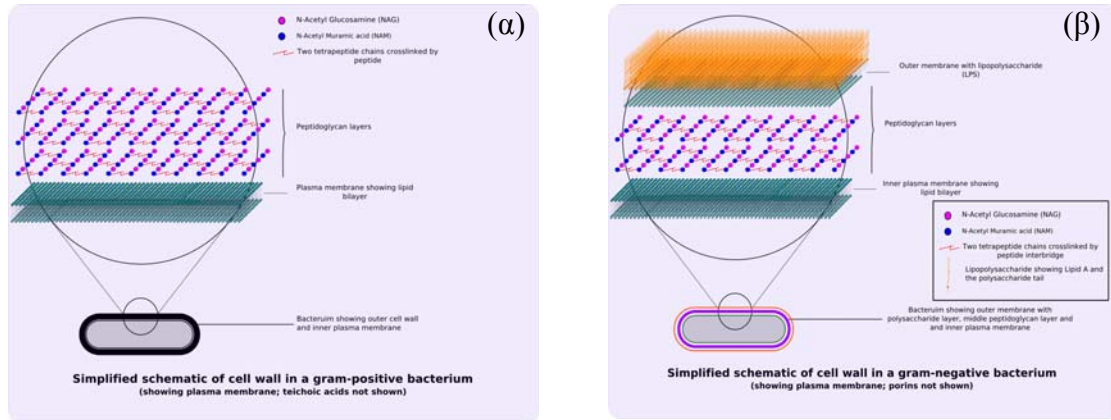
Το βακτηριακό κύτταρο περιβάλλεται από μια λεπτή μεμβράνη η οποία ονομάζεται κυτταροπλασματική και συγκρατεί τα οργανίδια και τα μικρά ή μεγάλα μόρια που είναι απαραίτητα για τη διατήρηση των διαφόρων λειτουργιών του κυττάρου (κυτταρόπλασμα). Ρυθμίζει επίσης τη δίοδο των διαφόρων διαλυτών μορίων μεταξύ του εσωτερικού του κυττάρου και του εξωτερικού περιβάλλοντος. Το γενετικό τους υλικό δεν περιβάλλεται από μεμβράνη, άρα δεν διαθέτουν πυρήνα. Εξωτερικά της κυτταροπλασματικής μεμβράνης βρίσκεται το κυτταρικό τοίχωμα το οποίο εξασφαλίζει τη δομική ακεραιότητα του κυττάρου. Παρότι η εσωτερική ωσμωτική πίεση των περισσότερων βακτηρίων κυμαίνεται μεταξύ 5-20 ατμοσφαιρών, εξαιτίας της μεγάλης συγκέντρωσης μορίων μέσα στο κύτταρο, το κύτταρο διατηρεί την ακεραιότητά του χάρη στην ισχύ του προκαρυωτικού κυτταρικού τοιχώματος.

Το σχήμα των βακτηρίων μπορεί να είναι ραβδόμορφο, σφαιρικό ή σπειροειδές.

Τα βακτήρια χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά, ανάλογα με το αν χρωματίζονται με την μέθοδο Gram. Η μέθοδος αυτή, που πήρε την ονομασία της από τον Gram που πρώτος την περιέγραψε, αναπτύχθηκε στην διάρκεια μιας προσπάθειας για την εκλεκτική χρώση των βακτηρίων που βρίσκονται σε μολυσματικούς ιστούς και είναι η εξής: όλα τα κύτταρα χρωματίζονται πρώτα με κρυσταλλικό ιώδες και ιώδιο και στη συνέχεια πλένονται με ακετόνη ή αλκοόλη. Βρέθηκε ότι το πλύσιμο αυτό αποχρωματίζει, εκτός των ιστών και πολλές κατηγορίες βακτηρίων που ονομάστηκαν αρνητικά κατά Gram (εμφανίζονται ως ροζ ή κόκκινα μετά τη χρώση και το πλύσιμο), σε αντίθεση με αυτά που δεν αποχρωματίζονται (εμφανίζονται ως μπλε-βιολετί), καθώς εγκλωβίζουν το σύμπλοκο κρυσταλλικού ιώδους-ιωδιούχου καλίου στο κυτταρικό τους τοίχωμα που έχει δομή πλούσια σε υδατάνθρακες οι οποίοι δεν αποδομούνται από την αλκοόλη που χρησιμοποιείται για τον αποχρωματισμό στην Gram χρώση, και που ονομάστηκαν θετικά κατά Gram.

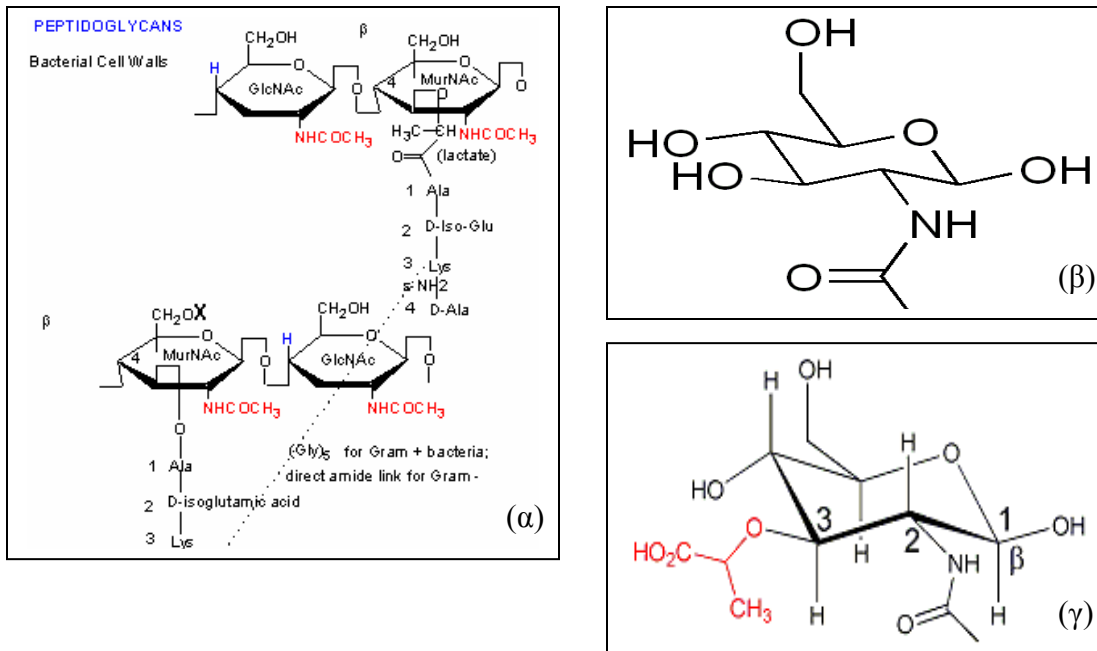
Έχει αποδειχθεί ότι η διαφορά μεταξύ θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων οφείλεται σε διαφορές των κυτταρικών τοιχωμάτων τους, καθώς ακόμα και τα κατά Gram-θετικά κύτταρα μπορούν να αποχρωματισθούν με ακετόνη ή αιθανόλη, αν τα κυτταρικά τους τοιχώματα αφαιρεθούν μετά τη χρώση και πριν το στάδιο του πλυσίματος.

Το κυτταρικό τοίχωμα των Gram-θετικών κυττάρων αποτελείται από μια στοιβάδα πεπτιδογλυκάνης (μουκοπεπίδιο) και τειχοϊκά οξέα ενώ απουσιάζει ο λιποπολυσακχαρίτης που αποτελεί δομικό χαρακτηριστικό των Gram-αρνητικών βακτηρίων (Σχήμα 1.2.2.)



Σχήμα 1.2.2. Σχηματικό Διάγραμμα κυτταρικού τοιχώματος Gram-θετικών (α) και Gram-αρνητικών βακτηρίων (β) (Costerton et al., 2004).

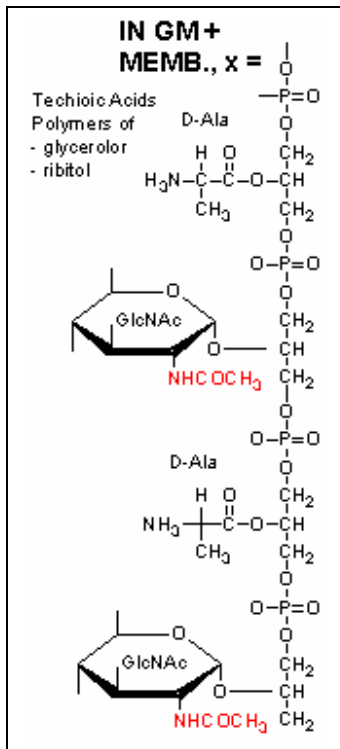
Η πεπτιδογλυκάνη αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του κυτταρικού τοιχώματος των Gram-θετικών βακτηρίων, αφού αποτελεί το 50% του βάρους του. Αποτελείται από τα αμινοσάκχαρα N-ακετυλογλυκοζαμίνη και N-ακετυλομουραμικό οξύ, που συνδέονται μεταξύ τους με 1,4 β-γλυκοσιδικό δεσμό. Με την καρβοξυλική ομάδα του N-ακετυλομουραμικού οξέος ενώνονται τετραπεπτιδικές αλυσίδες που αποτελούνται από τα αμινοξέα D-γλουταμινικό οξύ, D- και L-αλανίνη και L-λυσίνη. Οι πεπτιδικές αλυσίδες του N-ακετυλομουραμικού οξέος ενώνονται μεταξύ τους με πενταπεπτιδική γέφυρα γλυκίνης (Παπαπαναγιώτου, 2001). Η δομή της πεπτιδογλυκάνης απεικονίζεται στο σχήμα 1.2.3. (Waldvogel, 1990).



Σχήμα 1.2.3. (α) Δομή πεπτιδογλυκάνης. GlcNAc: N-ακετυλο γλυκοζαμίνη (β) και MurNAc: N-ακετυλο-μουραμικό οξύ (γ), και τα αμινοξέα: 1. Ala: L-αλα (αλανίνη), 2. D-isoglutamic acid (γλουταμινικό οξύ), 3. Lys: L-λυσ (λυσίνη), D-αλα (αλανίνη). Οι δύο τετραπεπτιδικές αλυσίδες ενώνονται μεταξύ τους με πενταπεπτιδική γέφυρα γλυκίνης.

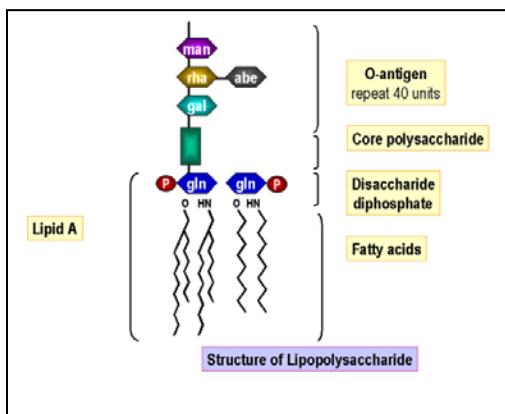
Στη πεπτιδογλυκάνη οφείλεται η στερεότητα του τοιχώματος και καταστρέφεται με την επίδραση της λυσοζύμης ή οξέων. Παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογόνο δράση του βακτηρίου, προκαλεί την παραγωγή ιντερλευκίνης 1 από τα φαγοκύτταρα και χημειοτακτισμό για τη συγκέντρωση των πολυμορφοκυττάρων στο σημείο της φλεγμονής (Karlan και Tenenbaum, 1980; Παναγιώτου, 2001).

Τα τειχοϊκά οξέα αποτελούνται από μια ομάδα φωσφορικών πολυμερών. Κάποια από αυτά βρίσκονται συνδεδεμένα με την πεπτιδογλυκάνη (τειχοϊκά οξέα του κυτταρικού τοιχώματος) αποτελούμενα από μια εναλλασόμενη ακολουθία φωσφορικής ριβιτόλης, ενώ άλλα είναι συνδεδεμένα με λιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης (τειχοϊκά οξέα της μεμβράνης) και αποτελούνται από φωσφορική γλυκερόλη σε επαναλαμβανόμενες μονάδες (Παναγιώτου, 2001). που συνδέονται με την πεπτιδογλυκάνη ή με την κυτταροπλασματική μεμβράνη δια μέσου λιπόφιλων ομάδων (λιποτεϊχοϊκά οξέα) (Σχήμα 1.2.4.).



Σχήμα 1.2.4. Τειχοϊκά Οξέα

Σε αντίθεση με το τοίχωμα των Gram-θετικών βακτηρίων, αυτό των Gram-αρνητικών φέρει εξωτερικά ένα λιποπολυσακχαρίτη, η δομή του οποίου φαίνεται στο σχήμα 1.2.5. Στον λιποπολυσακχαρίτη αυτό οφείλεται και η παθογένεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων.



Σχήμα 1.2.5. Δομή λιποπολυσακχαρίτη Gram-αρνητικών βακτηρίων.

Τα πιο χαρακτηριστικά γένη των Gram-θετικών βακτηρίων είναι: *Staphylococcus*, *Streptococcus* και *Enterococcus* ενώ τα πιο χαρακτηριστικά γένη των Gram-αρνητικών είναι: *Escherichia coli*, *Pseudomonas* και *Salmonella*.

Τα τελευταία χρόνια, η επίπτωση των Gram-θετικών βακτηρίων ως αιτίου σήψης έχει αυξηθεί σε σχέση με την επίπτωση των Gram-αρνητικών παθογόνων. Η σήψη αποτελεί φλεγμονώδη ανταπόκριση του ανοσιακού συστήματος σε βακτηριακή λοίμωξη και κινητοποιείται από βακτηριακές τοξίνες, όπως η ενδοτοξίνη (λιποπολυσακχαρίτης) των Gram-αρνητικών βακτηρίων και το σύμπλεγμα λιποτειχοϊκού οξέος-πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών βακτηρίων.

Οι αιτίες για την αυξανόμενη συχνότητα λοιμώξεων προερχόμενων από Gram-θετικά βακτήρια είναι οι εξής:

(α) Η αυξημένη χρήση ενδοαγγειακών καθετήρων για μεγάλο χρονικό διάστημα και γενικά χειρουργικών εμφυτευμάτων όπως προσθετικών αρθρώσεων, βαλβίδων κτλ

(β) Η εμπειρική αντιμικροβιακή αγωγή που χρησιμοποιείται κυρίως εναντίον των Gram-αρνητικών παθογόνων και η οποία έχει οδηγήσει σε ανθεκτικά Gram-θετικά βακτήρια.

Στην περίπτωση λοιμώξεων από Gram-θετικά βακτήρια οι μικροοργανισμοί συνήθως πέρχονται από το δέρμα, τραύματα, μαλακά μόρια και θέσεις εμφυτευμάτων, ενώ στην περίπτωση λοιμώξεων προερχόμενων από Gram-αρνητικά βακτήρια οι μικροοργανισμοί συνήθως προέρχονται από τον εντερικό σωλήνα ή το ουρογεννητικό σύστημα (Diekema et al., 2001, Paragioudaki et al., 2004).

1.2.1 Σταφυλόκοκκοι

Οι σταφυλόκοκκοι είναι Gram θετικοί κόκκοι, διαμέτρου 0.5 έως 1.5 μm περίπου και ανήκουν στην οικογένεια *Micrococcaceae*. Η οικογένεια *Micrococcaceae* περιλαμβάνει τα γένη *Staphylococcus*, *Rophia*, *Planococcus* και *Micrococcus*. Ο διαχωρισμός του γένους *Staphylococcus* από το γένος *Micrococcus*, που και αυτό αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του ανθρώπου και σπάνια αποτελεί αίτιο λοιμώξεων, βασίζεται στην αναερόβια διάσπαση της γλυκόζης και στον έλεγχο ευαισθησίας στη bacitracin. Οι σταφυλόκοκκοι διασπών τη γλυκόζη αεροβίως

και αναεροβίως, ενώ οι μικρόκοκκοι τη διασπών μόνο αεροβίως (Δημητρακόπουλος, 1987) και είναι ανθεκτικοί στη bacitracin ενώ οι μικρόκοκκοι είναι ευαίσθητοι (δίσκος 0.04U σε τρυβλίο με 5% αιματούχο άγαρ) (Forbes *et al.*, 2002).

Η ονομασία “*Staphylococcus*” εισήχθηκε για πρώτη φορά από τον Alexander Ogston, το 1883, για να περιγράψει σφαιρικά βακτήρια τα οποία σχηματίζουν αθροίσματα (σωρούς) που μοιάζουν με τσαμπιά από σταφύλια. Μετά από μια σειρά κλινικών και εργαστηριακών μελετών περιέγραψε την σταφυλοκοκκική λοίμωξη (Ogston 1883). Ο Rosenbach, το 1884, διαχωρίζει τους σταφυλόκοκκους σε παθογόνους (*S. aureus*) και μη παθογόνους (*S. epidermidis*) (Rupp *et al.*, 1994). Τα δυο είδη διαχωρίζονται μεταξύ τους από την ικανότητα των παθογόνων στελεχών να προκαλούν πήξη του πλάσματος. Η ορολογική ταξινόμηση προτάθηκε για πρώτη φορά το 1902, από τους Kolle και Otto, που ανέφεραν ότι με μεθόδους αιματοσυγκόλλησης ήταν δυνατό να διακριθούν τα παθογόνα από τα μη παθογόνα στελέχη (Kolle and Otto 1902). Μόλις το 1962 ο Pereira αναφέρει ότι υπάρχει μία ομάδα πηκτάση αρνητικών σταφυλοκόκκων, γνωστή σήμερα ως *S. saprophyticus*, η οποία προκαλεί λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος (Pereira *et al.*, 1962). Οι Wilson και Stuart (Wilson *et al.*, 1965) αναφέρουν λοιμώξεις χειρουργικών τραυμάτων από πηκτάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους. Το 1971 ο Holt αναφέρει αποικισμό κολποκοιλιακών αναστομών με πηκτάση αρνητικούς σταφυλοκόκκους. Ο αποικισμός αυτός συσχετίστηκε άμεσα με την εμφάνιση σηψαιμίας (Holt *et al.*, 1971).

Μετά το 1980 και παράλληλα με την έξαρση των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων που οφείλονται σε MRSA στελέχη, εμφανίζονται με αυξανόμενη συχνότητα και λοιμώξεις που οφείλονται σε πηκτάση-αρνητικούς σταφυλόκοκκους. Η χρήση ενδοφλέβιων καθετήρων και προσθετικών υλικών στην κλινική πράξη έχει ως αποτέλεσμα την απομόνωση στελεχών *S. epidermidis* όπως επίσης *S. hominis* και *S. haemolyticus* από τους καθετηριασμένους ασθενείς. Πολλά από τα στελέχη αυτά εμφανίζονται ανθεκτικά στη μεθικιλίνη και σε άλλα αντιβιοτικά (Archer, 1988).

1.2.2. Ταξινόμηση Σταφυλοκόκκων

Το γένος *Staphylococcus* διακρίνεται σε 38 είδη εκ των οποίων οι *S. epidermidis* και *S. aureus* αποτελούν τους κύριους παθογόνους μικροοργανισμούς.

Οι σταφυλόκοκκοι βρίσκονται στον αέρα και το έδαφος, απομονώνονται από τα θηλαστικά και αποικίζουν το δέρμα και τους βλεννογόννους του ανθρώπου σε συγκεντρώσεις πάνω από 10^4 - 10^6 CFU/mL (Colony Forming Units/mL) (Noble and Pitcher, 1978). Μερικά είδη βρίσκονται μόνο σε ζώα, ενώ άλλα αποικίζουν συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές του ανθρώπου. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. aureus* αφορούν κυρίως το δέρμα και τα μαλακά μόρια, την αναπνευστική οδό, τα οστά, τους συνδέσμους και το ενδοθήλιο των αγγείων (Δημητρακόπουλος, 1987). Μεταξύ των πηκτάση αρνητικών σταφυλοκόκκων ο *S. epidermidis* αποτελεί τον κυριότερο αερόβιο μικροοργανισμό που ανευρίσκεται ως φυσιολογική χλωρίδα του δέρματος και των βλεννογόνων (Kloos, 1997). Τις τελευταίες δεκαετίες όμως αποτελεί σημαντικό αίτιο πρόκλησης λοιμώξεων σε νοσηλευόμενους ασθενείς σε όλες τις ανεπτυγμένες χώρες και σχετίζεται τις περισσότερες φορές με τη χρήση προσθετικών υλικών (Huebner et al., 1999).

Οι σταφυλόκοκκοι αναπτύσσονται εύκολα στα κοινά θρεπτικά υλικά, όπως το αιματούχο άγαρ, το ΒΗΙΑ (άγαρ από εκχύλισμα εγκεφάλου-καρδιάς), το θρεπτικό άγαρ, και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (10-42°C) με ευνοϊκότερη θερμοκρασία τους 35-37°C. Η μεγάλη αντοχή σε υψηλές πυκνότητες NaCl (8-10%) χρησιμοποιείται για την απομόνωση τους από υλικά που περιέχουν και άλλα μικρόβια. Σε υγρά θρεπτικά υλικά προκαλούν ομοιομερή θολερότητα. Σε στερεά θρεπτικά υλικά αναπτύσσονται μέσα σε 24 ώρες με αποικίες στρογγυλές 1-3 mm διάμετρο, λείες και υπερυψωμένες και λάμπουσες, οι οποίες παράγουν διάφορες χρωστικές, από άσπρες έως πορτοκαλί και μπορούν να παρουσιάσουν μερικές φορές ζώνες αιμόλυσης στο αιματούχο άγαρ (Δημητρακόπουλος, 1987).

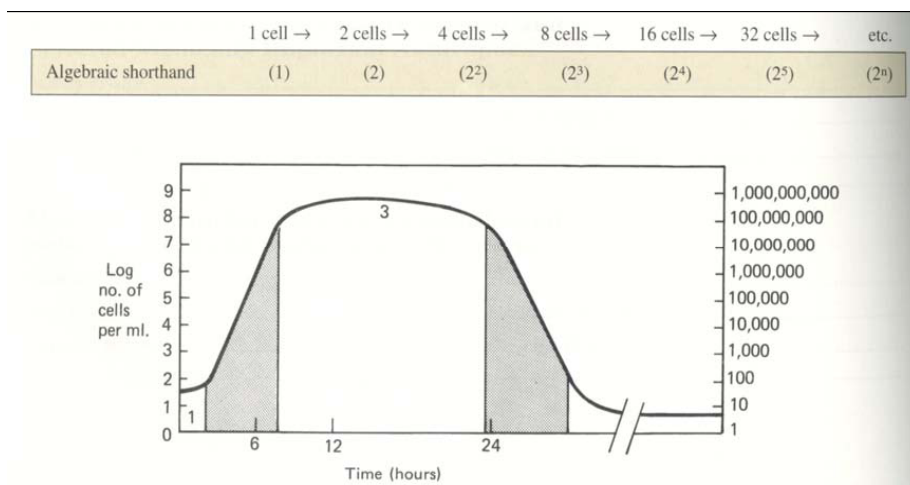
1.2.3. Ανάπτυξη των Μικροοργανισμών

Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών απαιτεί πρόσβαση σε πηγές ενέργειας και σε ενώσεις απαραίτητες για την σύνθεση των κυτταρικών τους δομών. Η ανάπτυξη των

οργανισμών απαιτεί διαθέσιμο άνθρακα, υδρογόνο, οξυγόνο, άζωτο, θείο, φωσφόρο και ποικιλία άλλων μεταλλικών στοιχείων. Τα κύτταρα λαμβάνουν τα απαραίτητα θρεπτικά μεταφέροντας τα μέσω των μεμβρανών τους και τα μετατρέπουν με ενζυμικές αντιδράσεις σε προϊόντα χρήσιμα για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών οδηγεί σε αύξηση του αριθμού τους όταν τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται με διαίρεση. Στην περίπτωση αυτή τα κύτταρα αυξάνουν σε μέγεθος και διαιρούνται σε δύο θυγατρικά κύτταρα περίπου ίσου μεγέθους. Η μελέτη της ανάπτυξης των κυττάρων λοιπόν δεν ακολουθεί την παρακολούθηση του μεγέθους τους (λόγω του μικρού τους μεγέθους), αλλά την παρακολούθηση της αύξησης του αριθμού τους (Παναγιώτου, 2001).

1.2.3.1. Καμπύλη Ανάπτυξης

Η παρακολούθηση της ανάπτυξης των μικροοργανισμών γίνεται μέσω της καμπύλης ανάπτυξης της μικροβιακής καλλιέργειας. Όταν οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται σε υγρά θρεπτικά μέσα, συνήθως σε κλειστά συστήματα ασυνεχούς λειτουργίας (batch cultures), δεν υπάρχει προσθήκη νέου θρεπτικού μέσου. Για τον λόγο αυτό η συγκέντρωση των θρεπτικών μειώνεται, ενώ η συγκέντρωση των προϊόντων μεταβολισμού αυξάνει. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών που πολλαπλασιάζονται με κυτταρική διαίρεση μπορεί να παρασταθεί ως ο λογάριθμος του αριθμού των κυττάρων σε σχέση με τον χρόνο. Η μορφή της καμπύλης που προκύπτει έχει τέσσερις διακριτές περιοχές.



Σχήμα 1.2.6. Γραφική παράσταση τυπικής μορφής καμπύλης ανάπτυξης μικροοργανισμών.

(1) Φάση προσαρμογής (Lag phase)

Όταν οι μικροοργανισμοί προστίθενται σε νέο θρεπτικό μέσο, συνήθως δεν παρατηρείται αύξηση του αριθμού τους για κάποιο χρονικό διάστημα. Το στάδιο αυτό ονομάζεται φάση προσαρμογής. Αν και τα κύτταρα στην φάση αυτή δεν διαιρούνται και δεν υπάρχει καθαρή αύξηση της κυτταρικής τους μάζας, τα κύτταρα συνθέτουν νέα συστατικά. Το στάδιο αυτό πριν την έναρξη της διαδικασίας διαίρεσης των κυττάρων είναι απαραίτητο για διάφορους λόγους, όπως για παράδειγμα η προσαρμογή στην διαφορετική σύσταση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας, η ανάγκη ανάπτυξης ενζύμων για τον μεταβολισμό των θρεπτικών κλπ. Η διάρκεια της φάσης προσαρμογής, εξαρτάται από την «κατάσταση» στην οποία βρίσκονται τα κύτταρα, την φύση και την θερμοκρασία του θρεπτικού μέσου, τον όγκο των βακτηριακών κυττάρων κλπ. Η φάση προσαρμογής είναι εκτενής όταν το βακτηριακό εναιώρημα (εμβόλιο) που χρησιμοποιείται είναι παλιό (γερασμένο), ή όταν το θρεπτικό μέσο αποτελείται από καθαρά χημικές ενώσεις. Αντίθετα, όταν το εμβόλιο προέρχεται από καλλιέργεια που βρίσκεται στην εκθετική φάση ανάπτυξης και η σύνθεση του μέσου καλλιέργειας είναι όμοια με αυτή του εμβολίου τότε η φάση προσαρμογής είναι μικρότερη σε διάρκεια.

(2) Φάση εκθετικής ανάπτυξης (Exponential phase)

Κατά την διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξης οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται με έναν μέγιστο σταθερό ρυθμό ανάπτυξης σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα. Επειδή κάθε κύτταρο διαιρείται σε διαφορετική χρονική στιγμή η μορφή της καμπύλης ανάπτυξης είναι ομαλή χωρίς να παρατηρείται απότομη βηματική αύξηση.

(3) Φάση στασιμότητας (Stationary phase)

Μετά το πέρας της εκθετικής φάσης η ανάπτυξη των κυττάρων σταματά και η καμπύλη ανάπτυξης γίνεται οριζόντια. Στην φάση στασιμότητας ο πληθυσμός των

ζωντανών κυττάρων παραμένει σταθερός με εξισορρόπηση των ρυθμών ανάπτυξης και θανάτου. Ο μικροβιακός πληθυσμός εισέρχεται στην φάση στασιμότητας για διάφορους λόγους. Ένας προφανής λόγος είναι η έλλειψη των θρεπτικών από το μέσο καλλιέργειας ή η μείωση ενός σημαντικού θρεπτικού παράγοντα. Στις περιπτώσεις αερόβιας καλλιέργειας το διαλυμένο οξυγόνο είναι ο περιοριστικός παράγοντας της ανάπτυξης διότι το οξυγόνο έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και δεν επαρκεί για να διατηρήσει την μικροβιακή καλλιέργεια σε ρυθμούς εκθετικής ανάπτυξης. Η ανάπτυξη των κυττάρων δύναται επίσης να σταματήσει λόγω της συσσώρευσης «τοξικών» μεταβολικών προϊόντων στο μέσο ανάπτυξης.

(4) Φάση θανάτου (Death phase)

Η μείωση των θρεπτικών παραγόντων και η αύξηση των «τοξικών» συστατικών στο μέσο ανάπτυξης οδηγούν την καλλιέργεια στη φάση θανάτου. Ο θάνατος των κυττάρων όπως και η ανάπτυξη είναι συνήθως λογαριθμική δηλαδή σταθερό ποσοστό κυττάρων νεκρώνεται κάθε ώρα. Αυτή η σχέση ισχύει ακόμη και όταν ο συνολικός αριθμός των κυττάρων παραμένει σταθερός εξαιτίας της μη λύσης των νεκρών κυττάρων.

1.2.4. *Staphylococcus epidermidis*: Συχνότητα και Επιδημιολογία

Ο *S. epidermidis* ανήκει στην κατηγορία των πηκτάση αρνητικών σταφυλοκόκκων, άρα είναι Gram θετικός, και βρίσκεται σε όλο το δέρμα του ανθρώπου και στο δέρμα όλων των θερμόαιμων ζώων ως μόνιμη μικροβιακή χλωρίδα. Αποικίζει τους βλεννογόνους του αναπνευστικού, τις ρινικές κοιλότητες, το αυτί και τους οφθαλμούς. Βρίσκεται στη φύση, στο νερό, τα τρόφιμα και στο έδαφος και είναι ο πιο συχνά απομονωμένος σταφυλόκοκκος σε ποσοστό 65-95% (Δημητρακόπουλος, 1987).

Παρότι ο *S. epidermidis*, όπως και οι περισσότεροι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλενωδών μεμβρανών, αποτελεί πλέον συχνό αιτιολογικό παράγοντα νοσοκομειακής βακτηριαμίας. Οι περισσότερες λοιμώξεις που οφείλονται στον *S. epidermidis* είναι ενδονοσοκομειακές και αυτό αποδεικνύεται από μελέτες προερχόμενες από

καρδιοχειρουργικές κλινικές οι οποίες δείχνουν ότι ενώ οι σταφυλόκοκκοι που απομονώνονται πριν από το χειρουργείο είναι ανθεκτικοί στα αντιβιοτικά σε ποσοστό μόνο 10%, οι σταφυλόκοκκοι που απομονώνονται 7-10 μέρες μετά είναι πολυανθεκτικοί σε ποσοστό 65-70%. Τα νοσοκομειακά λοιπόν στελέχη *S. epidermidis* εμφανίζονται πολυανθεκτικά, γεγονός που αποδεικνύει την εκλεκτική πίεση που ασκείται από την ευρεία και μερικές φορές αλόγιστη χορήγηση των αντιβιοτικών στα νοσοκομεία.

Η αύξηση των λοιμώξεων με πηκτάση αρνητικούς και κυρίως με *S. epidermidis* κατά τις τελευταίες δύο δεκαετίες οφείλεται κυρίως στα εξής:

(α) Στην εκτεταμένη χρήση βιοϊατρικών υλικών για την υποστήριξη σοβαρά νοσούντων ασθενών. Ο *S. epidermidis* αποτελεί σύνηθες αίτιο λοιμώξεων σε ασθενείς με ενδοφλεβικούς και περιτοναϊκούς καθετήρες και προσθετικές βαλβίδες (Huebner και Goldmann, 1999; Road et al., 1998).

(β) Στην εκτεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών ευρέος φάσματος για την πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς (Jones et al., 1996). Η εκτεταμένη χρήση οδηγεί στην επικράτηση πολυανθεκτικών στελεχών της φυσιολογικής χλωρίδας των ασθενών (Duguid et al., 1992).

(γ) Στον αυξανόμενο αριθμό ανοσοκατασταλμένων και σοβαρά νοσούντων ασθενών, οι οποίοι συνήθως απαιτούν τη χρήση ενδοφλέβιων καθετήρων (Scierholz and Beuth, 2001; Raad, 1998; Tacconelli et al., 1997). Τέτοιοι ασθενείς είναι οι ουδετεροπενικοί, άτομα με κακοήθεια (Wade et al., 1982; Pagano et al., 1997; Souvenir et al., 1998). ή πρόωρα νεογνά με ομφαλικό καθετήρα (Pessoa-Silva et al., 2001; Raimundo).

Το γεγονός ότι τα στελέχη που απομονώνονται από ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη, και επομένως σε όλα τα β-λακταμικά, καθιστά τη θεραπεία των λοιμώξεων ιδιαίτερα δύσκολη και την απομάκρυνση των βιοϋλικών πολλές φορές επιβεβλημένη. Αυτό συνεπάγεται ότι το κόστος των λοιμώξεων, μεταφραζόμενο σε νοσηρότητα, θνητότητα και νοσηλεία, είναι υψηλό. Η βακτηριαμία εμφανίζει θνητότητα 0-34%, παράταση νοσηλείας 7-19 μέρες και σημαντική αύξηση του κόστους ανά ασθενή, σύμφωνα με στοιχεία από το Εθνικό Νοσοκομειακό Σύστημα Επιτήρησης των ΗΠΑ (Vaudax et al., 1990; von Eiff et al., 2002; Vincent, 2003).

1.2.5. Λοιμώξεις που Προέρχονται από τον *Staphylococcus epidermidis*

1.2.5.1. Γενικά Χαρακτηριστικά των λοιμώξεων

1. Οι λοιμώξεις που οφείλονται σε πηκτάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους είναι κατά κύριο λόγο λοιμώξεις ενδονοσοκομειακές και σχετίζονται άμεσα με ενδονοσοκομειακά στελέχη που απομονώνονται από ασθενείς και ιατρο- νοσηλευτικό προσωπικό. Εξαιρέση αποτελούν: α) ενδοκαρδίτιδα φυσικών βαλβίδων, β) ορισμένες περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας προσθετικών βαλβίδων που εμφανίζονται μετά από ένα χρόνο από την εμφύτευση, γ) μερικά επεισόδια περιτονίτιδας σε ασθενείς με συνεχή περιτοναϊκή διάλυση, και δ) λοιμώξεις ουροποιητικού που οφείλονται στον *S. saprophyticus*.

2. Η αύξηση της συχνότητας των λοιμώξεων από πηκτάση-αρνητικούς σταφυλοκόκκους σχετίζεται άμεσα με την αύξηση της χρήσης βιοϊατρικών υλικών και ενδοφλέβιων καθετήρων.

3. Τα στελέχη που απομονώνονται ανήκουν σε ποσοστό μεγαλύτερο από 80% στο είδος *S. epidermidis*, ενώ οι εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις ανήκουν σε άλλα πηκτάση αρνητικά είδη σταφυλοκόκκων.

4. Τα νοσοκομειακά στελέχη είναι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 80% ανθεκτικά σε μεγάλο αριθμό αντιβιοτικών, όπως μεθικιλίνη και άλλα β-λακταμικά αντιβιοτικά, ερυθρομυκίνη, κλινδαμυκίνη, τετρακυκλίνες, χλωραμφενικόλη, τριμεθοπρίμη-σουλφαμεθοξαζόλη και αμινογλυκοσίδες. Γενικά, θεωρείται ότι ένας πολυανθεκτικός φαινότυπος αποτελεί ενδονοσοκομειακό στέλεχος ικανό να προκαλέσει λοίμωξη.

5. Η θεραπεία των λοιμώξεων είναι δύσκολη και συνήθως απαιτεί την απομάκρυνση των βιοϋλικών (Huebner και Goldmann, 1999).

1.2.5.2. Ειδικές Λοιμώξεις Προερχόμενες από τον *Staphylococcus epidermidis*

I. Βακτηραιμία

Την τελευταία δεκαετία έχει παρατηρηθεί μεγάλη αύξηση βακτηριαμιών στις ΗΠΑ και την Ευρώπη και συνοδεύονται από μεγάλη νοσηρότητα και θνητότητα που κυμαίνεται μεταξύ 11-43%.

Οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι είναι το πιο συχνό αίτιο νοσοκομειακής βακτηριαμίας η οποία σχετίζεται άμεσα με παρουσία κάποιου βιοϊατρικού υλικού σε ποσοστό 70%. Ο *S. epidermidis* αποτελεί τη συνηθέστερη αιτία βακτηριαμίας σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς που φέρουν καθετήρες ή άλλα εμφυτεύματα (Huebner and Goldmann, 1999; Road et al., 1998), που παίρνουν ανοσοκατασταλτικά (Pagano et al., 1997; Souvenir et al., 1998) και σε νεογνολογικές μονάδες (Pessoa-Silva et al., 2001). Οι βακτηριαμίες των νεογνών σχετίζονται με το χαμηλό βάρος γέννησης, την ύπαρξη καθετήρων και μηχανικού αερισμού. Οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι μπορεί να δώσουν θετικές αιμοκαλλιέργειες λόγω επιμόλυνσης από το δέρμα. Για αυτόν το λόγο θα πρέπει να λαμβάνονται αιμοκαλλιέργειες από διαφορετικά σημεία με μεγάλη προσοχή και αυστηρές συνθήκες αντισηψίας και ακόμη να γίνεται σωστή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

II. Μολύνσεις Ενδοαγγειακών Καθετήρων

Περίπου 50% από τα 40 εκατομμύρια άτομα που νοσηλεύονται κάθε χρόνο στις ΗΠΑ χρήζουν ενδοφλέβιων καθετήρων. Έχει υπολογιστεί ότι άνω των 60.000 περιπτώσεων νοσοκομειακής βακτηριαμίας οφείλονται στην χρήση καθετήρων. Οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι ευθύνονται για το 50% των λοιμώξεων (Huebner and Goldmann, 1999; Road et al., 1998).

Ο *S. epidermidis* είναι ένας από τους πιο συχνά ανευρισκόμενους μικροοργανισμούς στις ημιποσοτικές καλλιέργειες καθετήρων είτε πρόκειται για ενδοφλέβιους περιφερικούς είτε για καθετήρες παρεντερικής διατροφής είτε για ενδοφλέβιους κεντρικούς (Huebner and Goldmann, 1999; Road et al., 1998). Η αύξηση

των λοιμώξεων από ενδαγγειακούς καθετήρες έχει ως συνέπεια και την αύξηση των βακτηριαμιών από *S. epidermidis*.

Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί στο να διευκρινιστεί ο τρόπος με τον οποίο τα βακτήρια αποικίζουν τον καθετήρα και πώς προκαλείται η λοίμωξη και η βακτηριαμία. Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι οι μικροοργανισμοί εισάγονται δια μέσου του καναλιού που ανοίγει ο καθετήρας, δηλαδή δια μέσου της εξωτερικής επιφάνειας του (Maki et al., 1982, Winston et al., 1983). Άλλοι ερευνητές πιστεύουν ότι οι μικροοργανισμοί εισβάλλουν στον αυλό του καθετήρα δια μέσου μικρών εγχοπών. Μελέτες με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έχουν δείξει ότι σε ασθενείς με βακτηριαμία που σχετίζεται με καθετήρες αποικίζεται πιο συχνά ο αυλός παρά η εξωτερική επιφάνεια του (Tenney et al., 1986). Ένα τρίτο μηχανισμό αποτελεί η μόλυνση του καθετήρα από μια απομακρυσμένη εστία κατά τη διάρκεια της βακτηριαμίας. Αυτό πιθανόν να συμβαίνει σε ένα μικρό ποσοστό ασθενών που φέρουν λοίμωξη σε κάποιο άλλο σημείο του σώματός τους, οπότε πρόκειται για αυτομόλυνση μέσω αιματογενούς διασποράς. Δεν αποκλείεται όμως και η αυτομόλυνση από τη μικροβιακή χλωρίδα του ασθενούς κατά την τοποθέτηση του καθετήρα. Επίσης το νοσηλευτικό προσωπικό είναι συχνά φορέας ανθεκτικών μικροβιακών στελεχών τα οποία πιθανότατα αποικίζουν τον καθετήρα. Τέλος, δεν αποκλείεται η αποίκιση του καθετήρα από επιμολυσμένα απολυμαντικά αλλά και από κάποια ενδοφλέβια σκευάσματα τα οποία είναι περισσότερο επιρρεπή στη μόλυνση σε σχέση με κάποια άλλα. Υγρά παρεντερικής διατροφής και λιπιδικά γαλακτώματα είναι υπέρτονα και πλούσια σε θρεπτικά υλικά και επομένως ευνοούν την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων.

Έχει αποδειχθεί ότι οι πλαστικοί καθετήρες προκαλούν συχνότερα λοιμώξεις από ότι οι μεταλλικοί και συρμάτινοι και οι μεταλικές βελόνες (Hoffmann et al., 1992).

Η παραμονή των καθετήρων για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 72 ωρών αυξάνει τον κίνδυνο λοίμωξης. Η αποίκιση του καθετήρα με βακτήρια μπορεί να οδηγήσει σε βακτηριαμία, σηπτική θρόμβωση, ενδοκαρδίτιδα αλλά ακόμα και στο θάνατο. Η θεραπεία συνίσταται στην άμεση αφαίρεση του καθετήρα (Huebner και Goldmann, 1999).

III. Ενδοκαρδίτιδα

Η λοίμωξη των φυσικών καρδιακών βαλβίδων από πηκτάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους είναι σπάνιες, αφού αποτελούν το 5% όλων των περιπτώσεων (Miele et al., 2001). Αντίθετα, οι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι αποτελούν την πιο συχνή αιτία λοίμωξης των προσθετικών καρδιακών βαλβίδων. Ο *S. epidermidis* είναι υπεύθυνος για το 40% των περιπτώσεων ενδοκαρδίτιδας (Ing et al., 1997). Όλες οι περιπτώσεις ενδοκαρδίτιδας προσθετικής βαλβίδας από *S. epidermidis* που εμφανίζονται τον πρώτο χρόνο από τη χειρουργική επέμβαση, φαίνεται ότι οφείλονται στον εμβολιασμό του μικροοργανισμού κατά τη διάρκεια του χειρουργείου. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ασθενείς αυτοί, παρουσιάζουν λοίμωξη από στελέχη που είναι ανθεκτικά στη μεθικιλίνη, οπότε πιθανολογείται ότι πρόκειται για ενδονοσοκομειακά στελέχη (Waldvogel, 1980). Η θεραπεία είναι συνήθως χειρουργική. Σε ποσοστό 25% των ασθενών απαιτείται αντικατάσταση της βαλβίδας και η θνητότητα είναι υψηλή (>36%) (Miele et al., 2001).

IV. Περιτονίτιδα από Μόλυνση Καθετήρων Περιτοναϊκής Διάλυσης

Η περιτονίτιδα είναι η πιο σοβαρή επιπλοκή σε ασθενείς που υπόκεινται σε περιτοναϊκή διάλυση. Ο *S. epidermidis* αποτελεί ένα από τα συχνότερα αίτια (Gottenbos et al., 2002) χωρίς να είναι ακόμα γνωστός ο μηχανισμός δράσης του. Ορισμένοι ερευνητές υποστηρίζουν ότι οι βιομεμβράνες των σταφυλοκόκκων πάνω στα τοιχώματα των περιτοναϊκών καθετήρων σχετίζονται με την περιτονίτιδα στους ασθενείς αυτούς.

V. Λοιμώξεις Ουροποιητικού Συστήματος

Ο *S. epidermidis* απομονώνεται σχεδόν αποκλειστικά από τα ούρα ενδονοσοκομειακών ασθενών με επιπλοκές από το ουροποιητικό (Trautner et al., 2004). Το 50% έχει ουροκαθετήρες, και σχεδόν όλοι έχουν επιπλοκές, όπως πρόσφατη χειρουργική επέμβαση στο ουροποιητικό, μεταμόσχευση νεφρού ή ουρολιθίαση.

VI. Οστεομυελίτιδα

Για τις περισσότερες περιπτώσεις οστεομυελίτιδας υπεύθυνος είναι ο *S. aureus*. Ο *S. epidermidis* μπορεί να είναι το αίτιο των εξής λοιμώξεων των οστών: στερνική οστεομυελίτιδα λόγω μόλυνσης του τραύματος μέσης στερνοτομής, ύστερα από

καρδιοχειρουργική επέμβαση, μόλυνση του οστού που περιβάλλει μια προσθετική άρθρωση, αιματογενής οστεομυελίτιδα από μόλυνση των τεχνητών διόδων αιμοδιύλησης (Perdreau-Remington et al., 1996)

VII. Μολύνσεις των Προσθετικών Αρθρώσεων

Οι μολύνσεις των προσθετικών αρθρώσεων του γόνατος και του ισχίου είναι σπάνιες, αλλά καταστροφικές, γιατί απαιτούν την απομάκρυνση της προσθήκης. Ο *S. epidermidis* είναι υπεύθυνος για το 20-40% των λοιμώξεων αυτών και είναι ο δεύτερος σε συχνότητα, μετά τον *S. aureus* (Perdreau-Remington et al., 1996).

VIII. Άλλες λοιμώξεις

Ο *S. epidermidis* είναι η συχνότερη αιτία μολύνσεων των αγγειακών μοσχευμάτων, οι οποίες εμφανίζονται συνήθως 3 μήνες μετά την εγχείρηση. Αποτελεί επίσης τη συνηθέστερη αιτία ενδοφθαλμίτιδας, μετά από εγχειρήσεις ιδιαίτερα καταρράκτη ή εμφύτευσης φακού αλλά και διαφόρων τραυμάτων (Jansen et al., 1991; Garcia-Saenz et al., 2000; Willcox et al., 2001; Merriam et al., 2003).

1.2.6. Παθογένεια των λοιμώξεων που προκαλούνται από τον *S. epidermidis*

Από όλα τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι ο *S. epidermidis* απομονώνεται σε ποσοστό 50-80% από τα κλινικά δείγματα των πηκτάση-αρνητικών σταφυλοκόκκων. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. epidermidis* περιλαμβάνουν την ενδοκαρδίτιδα σε προσθετικές βαλβίδες, λοιμώξεις ενδοφλέβιων καθετήρων, περιτονίτιδα, βακτηριαμία, οστεομυελίτιδα, λοιμώξεις προσθετικών αρθρώσεων καθώς και λοιμώξεις του ουροποιητικού παρουσία καθετήρων, άρα σχετίζονται άμεσα με την παρουσία κάποιου βιοϋλικού. Σε αντίθεση με τον *S. aureus*, δεν έχει την ικανότητα παραγωγής τοξινών και ενζύμων (Δημητρακόπουλος, 1987) άρα η παθογένεια του αποδίδεται στην ικανότητά του να προσκολλάται στην επιφάνεια του βιοϋλικού, να παραμένει εκεί και να πολλαπλασιάζεται κάτω από ένα προστατευτικό κάλυμμα εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας που το ίδιο παράγει και ονομάζεται γλυκοκάλυκας ή “slime” (Fletcher and Decho, 2001-web 2; Rupp and Archer, 1994; Vuong and Otto, 2002).

1.2.7. Στάδια της Προσκόλλησης του *S. epidermidis* στην Επιφάνεια ενός Βιοϋλικού

Το πρώτο βήμα για την εμφάνιση της λοίμωξης είναι η προσκόλληση του μικροβίου επάνω στην επιφάνεια του βιοϋλικού. Είναι πιθανόν ότι μικρός αριθμός βακτηρίων, από τη φυσιολογική χλωρίδα του ασθενούς, δηλαδή τους βλεννογόνους και το δέρμα, αποικίζει το βιοϋλικό κατά τη διάρκεια της χειρουργικής εμφύτευσής του. Συχνά θεωρείται ότι τα βακτήρια προέρχονται από τα χέρια του χειρουργικού ή νοσηλευτικού προσωπικού, από το περιβάλλον του νοσοκομείου, από άλλους ασθενείς ή από λοιμώξεις που ο ασθενής έχει σε άλλα σημεία του σώματός του (Maki et al., 1997).

Αφού τα βακτήρια προσκολληθούν στο υλικό αρχίζουν και πολλαπλασιάζονται με σκοπό να δημιουργήσουν πολύκυττάρια δομές πάνω στο υλικό. Παράλληλα παράγουν μια εξωκυττάρια βλενώδη ουσία η οποία λέγεται slime. Το συσσωμάτωμα των βακτηριακών κυττάρων και της εξωκυττάριας ουσίας του ονομάζεται βιομεμβράνη ή βιομάζα (biofilm) (σχήμα 1.2.7.) (O'Toole et al., 2000). Μετά τη δημιουργία της βιομεμβράνης, κύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί ή θυγατρικά κύτταρα, ξεφεύγουν από τη βιομεμβράνη, σταματώντας να παράγουν slime, για να αποικίσουν νέες περιοχές.

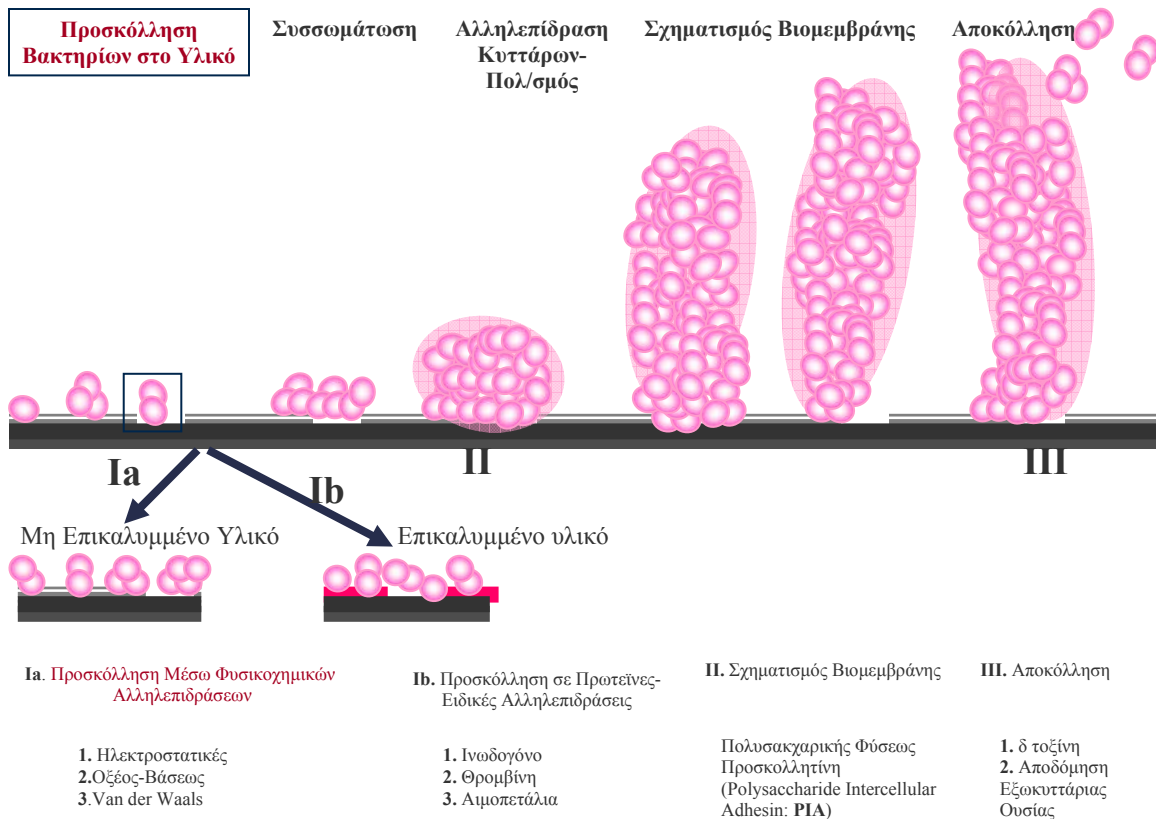
Το slime που παράγεται από τους πηκτάση αρνητικούς σταφυλοκόκκους είναι μια υδροπηκτική από πολυσαχαρίτες που συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω ιοντικών δεσμών. Οι πολυσακχαρίτες αποτελούνται από ουδέτερους μονοσακχαρίτες όπως γλυκόζη, μανόζη, γαλακτόζη, φρουκτόζη, φουκόζη και ραμνόζη, αλλά και από υδατάνθρακες, πολυόλες και ουρονικό οξύ (Karamanos et al., 1995).

Τα βακτηριακά στελέχη που δεν παράγουν slime θεωρούνται λιγότερο παθογόνα και μειωμένης προσκολλητικής ικανότητας. Τα βακτήρια που δεν προσκολλώνται γρήγορα σε κάποια επιφάνεια καταστρέφονται από το ανοσοποιητικό σύστημα. Επομένως η παραγωγή slime θεωρείται πολύ σημαντική για τη διατήρηση και ενίσχυση της βακτηριακής προσκόλλησης, για την προστασία ενάντια στα φαγοκύτταρα, το ανοσοποιητικό σύστημα και τα αντιβιοτικά (Costerton, 1999; Costerton et al., 1999).

Βακτήρια που παράγουν slime και έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια ενός βιοϋλικού είναι λιγότερο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά από ότι βακτήρια που βρίσκονται σε κάποια καλλιέργεια. Αυτή η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά ίσως σχετίζεται με το μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης που τα βακτήρια υιοθετούν μέσα στο biofilm ή στη μειωμένη μεταφορά θρεπτικών υλικών, μεταβολιτών και οξυγόνου από και προς τη μάζα του

biofilm (Donlan και Costerton, 2002; Mah και O'Toole, 2001; Stewart και Costerton, 2001; Monzon et al., 2002; Duguid et al., 1992).

Επιπρόσθετα, το biofilm προστατεύει τα βακτήρια από τις διατμητικές τάσεις της ροής (Donlan και Costerton, 2002).



Σχήμα 1.2.7. Σχηματική αναπαράσταση των φάσεων που περιλαμβάνει η δημιουργία βιομεμβράνης (biofilm) και των παραγόντων που την επηρεάζουν (Τροποποιημένο από Vuong and Otto, 2002).

1.2.7.1. Πρώτη Φάση Προσκόλλησης: Μη ειδική προσκόλληση: Φυσικοχημικές Αλληλεπιδράσεις Βακτηρίων - Υλικών

Από όσα προαναφέρθηκαν γίνεται κατανοητό ότι το πρώτο βήμα για την εμφάνιση της λοίμωξης είναι η προσκόλληση του βακτηρίου επάνω στην επιφάνεια του βιοϋλικού (Rijnaarts et al., 1995), αφού πρώτα προσελκυστεί από αυτή. Γενικά τα

βακτήρια προτιμούν να αναπτύσσονται στην επιφάνεια ενός υλικού από το να παραμένουν σε μορφή εναιωρήματος.

Στο πρώτο στάδιο της προσκόλλησης παρεμβαίνουν μη ειδικοί μηχανισμοί, όπως το επιφανειακό φορτίο, η πολικότητα, δυνάμεις Van der Waals, η κίνηση Brown, η βαρύτητα και η υδροφοβικότητα (Fleer et al., 1989). Οι περισσότεροι ερευνητές πιστεύουν ότι στη φάση προσέγγισης του βακτηρίου σ' οποιοδήποτε υλικό, βασικό ρόλο παίζει η υδροφοβικότητα του μικροβιακού κυττάρου και του βιοϋλικού. Η υδροφοβικότητα του *S. epidermidis* ποικίλει ανάμεσα στα διάφορα στελέχη και εξαρτάται από την περιεκτικότητα της κυτταρικής επιφάνειας σε πρωτεΐνες. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα μειώνουν τον υδρόφοβο χαρακτήρα της επιφάνειας (Vacheethasane et al., 1998). Επιπλέον, η εξωτερική επιφάνεια του *S. epidermidis* φέρει αρνητικό επιφανειακό φορτίο.

Αυτού του είδους οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και βιοϋλικών κατατάσσονται σε μεγάλο και μικρό εύρους (απόστασης). Οι μεγάλοι εύρους μη ειδικές αλληλεπιδράσεις, συνήθως ιοντικές και van der Waals, (απόσταση βακτηρίου-υλικού < 50 nm) είναι συνάρτηση της απόστασης και της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Οι μικρού εύρους αλληλεπιδράσεις γίνονται αποτελεσματικές μόνο όταν το κύτταρο φτάσει κοντά στην επιφάνεια (απόσταση βακτηρίου-υλικού < 5 nm) και συνήθως τέτοιες είναι η δημιουργία δεσμών υδρογόνου (Gottenbos et al., 2002; Mayer et al., 1999).

Επομένως, τα βακτήρια πρέπει να πλησιάσουν την επιφάνεια μέσω των αλληλεπιδράσεων μεγάλου εύρους προκειμένου οι μικρού εύρους αλληλεπιδράσεις να λάβουν χώρα και να ισχυροποιηθεί η προσκόλληση.

Η πρώτη φάση της βακτηριακής προσκόλλησης είναι αυτή που κάνει τη δεύτερη φάση της ειδικής προσκόλλησης εφικτή.

1.2.7.2. Δεύτερη Φάση Προσκόλλησης: Ειδική προσκόλληση: Παραγωγή Εξωκυττάριας Ουσίας (slime)

Ειδική προσκόλληση. Η ειδική προσκόλληση του *S. epidermidis* σε επιφάνειες καθετήρων έχει αναφερθεί ότι επιτυγχάνεται με πρωτεΐνες επιφανείας και με μία

πολυσακχαριδική προσκολλητίνη (PS/A: Polysaccharide-adhesin), (Tojo et al., 1988; O’Gara and Humphreys, 2001; Gotz, 2002; Mack, 1999). Η PS/A είναι μεγάλου μοριακού μεγέθους (>500.000 daltons) πολυμερές γαλακτόζης και αραβινόζης, σε αναλογία 1:1 (Müller et al., 1993). Η PS/A φαίνεται ότι αυξάνει τον αποικισμό επί των βιοϊατρικών υλικών στα πολύ αρχικά στάδια (προσκόλληση μετά από 15 λεπτά επαφής των υλικών με καλλιεργήματα μικροβίων σε ζωμό). Διάφορες μελέτες έχουν δείξει εκτός από τον *S. epidermidis* ότι ο *S. capitis* επίσης παράγει PS/A. Είναι γνωστό επίσης ότι ο *S. epidermidis* έχει την ικανότητα παραγωγής λιπασών, πρωτεασών και αιμολυσινών.

Παραγωγή slime. Μετά την προσκόλληση του βακτηρίου ακολουθεί το δεύτερο βήμα για την εμφάνιση της λοίμωξης το οποίο είναι η παραγωγή slime (EPS: extracellular polymeric substance), (Fleer et al., 1989; Jansen et al., 1989). Η παραγωγή και ο ρόλος του slime στην παθογένεια αποτελεί πολυσυζητημένο θέμα το οποίο δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Από μελέτες που έγιναν με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο καθώς και από τον ανοσολογικό έλεγχο των στελεχών *S. epidermidis* που σχετίζονταν με λοιμώξεις προσθετικών υλικών, αποδείχθηκε ότι αυτά τα βακτήρια παράγουν μια βλενώδη εξωκυττάρια ουσία (slime) που προάγει την προσκόλληση των βακτηρίων μεταξύ τους και σε πλαστικά υλικά και ότι ο πολυσακχαρίτης είναι εμφανής στα τελικά στάδια της προσκόλλησης, και όχι στην αρχική φάση (Peters et al., 1982).

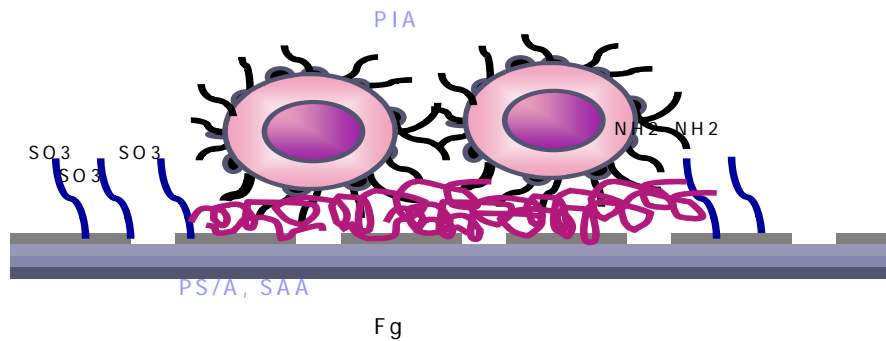
Η παραγωγή μιας προσκολλητίνης πολυσακχαρικής φύσεως (Polysaccharide Intercellular Adhesin: PIA, όπως επικρατεί να ονομάζεται σήμερα) η οποία συμβάλλει στην αλληλεπίδραση των βακτηριακών κυττάρων μεταξύ τους και άρα στη συσσωμάτωση και δημιουργία του biofilm, θεωρείται εξαιρετικής σημασίας. Η σύνθεση της PIA κωδικοποιείται στο οπερόνιο *ica* που περιλαμβάνει εν σειρά τα γονίδια *icaA* (N-ακετυλογλυκοζαμιν-τρανσφεράση), *icaD* (επαυξάνει τη δράση της N-ακετυλογλυκοζαμιν-τρανσφεράσης), *icaB* (το προϊόν ανιχνεύεται στο περιβάλλον και ίσως παίζει ρόλο ακετυλάσης) και το *icaC* (προάγει τη σύνθεση μεγάλων πολυμερών ενισχύοντας τη δράση των IcaAD) (Klug et al., 2003; Curarella et al., 2001; Crampton et al., 1999; Dobinsky et al., 2003; Conlon et al., 2002).

Το περιβαλλοντικό έναυσμα για την ενεργοποίηση των *ica* γονιδίων δεν είναι ακόμα απόλυτα γνωστό, θεωρείται ωστόσο ότι σημαντικό ρόλο παίζουν η ιστική υποξία, η παραγωγή και υποδοχή από τα μικροβιακά κύτταρα ‘χημικών μορίων επικοινωνίας’

(quorum sensing signals) και το θρεπτικό υπόστρωμα (von Eiff και Heilmann, 2002). Η διαδικασία ολοκληρώνεται όταν ο 'σταθερός' πληθυσμός αποκτήσει ικανότητα για παραγωγή και διάχυση στο περιβάλλον 'ελεύθερων' κυττάρων που μπορούν να προκαλέσουν τοπική λοίμωξη, μικροβιαμία, ουρολοίμωξη, απελευθέρωση σηπτικών εμβόλων ή αποικισμό νέων περιοχών με biofilm. Οι γενετικές περιοχές, που κυρίως σχετίζονται με τη σύνθεση του PIA είναι: το οπερόνιο *icaADBC*, η έκφραση του οποίου εξαρτάται από περιβαλλοντικούς (Sabine et al., 2003; Sarah et al., 2001) και γονιδιακούς παράγοντες (Mack et al., 2000).

Σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση του *S. epidermidis* στα προσθετικά υλικά και τον σχηματισμό βιομεμβρανών (biofilms) παίζουν και διάφορες πρωτεΐνες επιφανείας του βακτηρίου που έχουν χαρακτηριστεί ως προσκολλητίνες (Tojo et al., 1988). Μετά την έκθεση των βιοϊατρικών υλικών στα υγρά του σώματος, όπως αίμα, σίελος ή ούρα, προσροφώνται μακρομοριακά στοιχεία και σχηματίζουν μια «συμβατική μεμβράνη» (Reid et al., 1994; Reid et al., 1998). Η συμβατική μεμβράνη αποτελεί τη βάση για το σχηματισμό της ώριμης βιομεμβράνης. Τα περισσότερα μακρομόρια που προσροφώνται έχουν πρωτεϊνική σύσταση, όπως αλβουμίνη, ινωδογόνο, κολλαγόνο και φιβρονεκτίνη.

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Πατρών (Arvaniti et al., 1994), η χημική ανάλυση του ακατέργαστου εξοκυττάρου προϊόντος (crude slime) έδειξε ότι αποτελείται από μόρια πρωτεϊνών, πεπτιδογλυκανών, υδατανθράκων, νουκλεϊνικών και τειχοϊκών οξέων. Ο επικρατέστερος ουδέτερος μονοσακχαρίτης είναι η γλυκόζη, ενώ σε ένα στέλεχος ανιχνεύθηκε και γαλακτόζη. Η κλασμάτωση του slime έδειξε τη παρουσία πολυσακχαρίτη, διαφόρων πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Χημικός χαρακτηρισμός των πολυσακχαριτικών κλασμάτων έδειξε ότι περιέχουν ουδέτερους μονοσακχαρίτες και εξοζαμίνες, οι οποίες έχουν τη δομή της γλυκοζαμίνης. Το βασικό συστατικό του πολυσακχαρίτη (60-65% των μακρομορίων του slime που περιέχουν και υδατάνθρακες) είναι ένας θειωμένος, όξινος πολυσακχαρίτης 20 kDa, (Karamanos et al., 1995). Επίσης, περιέχει μία ομοιογενώς φορτισμένη όξινη πεπτιδογλυκάνη (80 kDa), ένα πολυσακχαρίτη 12.5 kDa, δύο μη ανιοντικούς υδατάνθρακες που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένοι με πρωτεΐνες (250 και 125 kDa), ένα μακρομόριο 60 kDa που διασπάται με το πρωτεολυτικό ένζυμο παπαΐνη και τειχοϊκά οξέα (Karamanos et al., 1995).



Σχήμα 1.2.8. Σχηματική αναπαράσταση της δεύτερης φάσης της προσκόλλησης

Συνοπτικά λοιπόν μπορεί να ειπωθεί ότι η προσκόλληση των βακτηρίων και η δημιουργία biofilm στην επιφάνεια ενός βιοϋλικού λαμβάνει χώρα στα εξής διαδοχικά στάδια

1. Έκθεση της επιφάνειας στο εναιώρημα βακτηρίων. Εξαιτίας της μεταφοράς μάζας αλλά και των συνθηκών ροής, κάποια από τα βακτήρια του εναιωρήματος θα έρθουν σε επαφή με την επιφάνεια.
2. Ακολουθεί το στάδιο της αρχικής προσκόλλησης όπου τα βακτήρια επιλέγουν περιοχές στις οποίες θα προσκολληθούν με τη βοήθεια υδρόφοβων, ηλεκτροστατικών και δυνάμεων Van der Waals, ανάλογα με την τραχύτητα της επιφάνειας αλλά επηρεαζόμενα και από την παρουσία ή όχι πρωτεϊνών. Στο δεύτερο στάδιο προσκόλλησης στη επιφάνεια του βιοϋλικού συμβάλλουν και πρωτεΐνες επιφανείας του βακτηρίου (SSP-1, SSP-2), η αυτολυσίνη AtlE του *S. epidermidis*, καθώς και πρωτεΐνες του πλάσματος (ινωδογόνο, θρομβίνη, θρομβοσπονδίνη, κολλαγόνο κ.α.). Αν η προσκόλληση γίνεται σε κύτταρα, τότε συνεισφέρουν αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών της βακτηριακής επιφανείας και του ξενιστή (εξωκυτταρίων ή συνδεδεμένων στην επιφάνεια των κυττάρων του).
3. Αφού προσκολληθούν κάποια βακτηριακά κύτταρα στην επιφάνεια (αδρανή ή έμβια), ακολουθεί η παραγωγή slime, από τα έμβια, που αποτελείται από τεϊχοϊκά οξέα, πεπτιδογλυκάνες και κυρίως από μόρια πολυσακχαριδικής φύσεως, όπως η διακυτταρική προσκολλητίνη (intracellular polysaccharide adhesin, PIA) που ενισχύει και

σταθεροποιεί την προσκόλληση των βακτηρίων τόσο μεταξύ τους όσο και με την επιφάνεια. Στη δημιουργία του biofilm συμβάλλουν επίσης το αντιγόνο SAA (slime-associated antigen) και η πρωτεΐνη AAP (accumulation-associated protein) που αποτελούνται επίσης από N-ακετυλο γλυκοζαμίνη. Όλα αυτά μαζί με παράγοντες συσσωμάτωσης, πρωτεΐνες και τειχοϊκά οξέα συμβάλλουν στο μεγάλο ιξώδες του slime (Σχήμα 1.2.8.).

Το slime προστατεύει τα βακτήρια από τους αντιμικροβιακούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται στην θεραπεία αυτών των λοιμώξεων. Προστατεύει τον μικροοργανισμό από την φαγοκυττάρωση (Kristinsson et al., 1988) και δημιουργεί ένα προστατευτικό μικροβιακό περιβάλλον μέσα στο οποίο επικρατούν άριστες συνθήκες αναπτύξεως του μικροβίου. Υπάρχουν εμφανείς αποδείξεις ότι το slime αντιδρά με τον ξενιστή και με άλλους μηχανισμούς, εκτός από τον ρόλο που διαδραματίζει στο σχηματισμό της βιομεμβράνης, ενώ προστατεύει τα βακτηριακά κύτταρα από τη διαμητική τάση της ροής. (Stewart και Costerton, 2001; Monzon et al., 2002; Duguid et al., 1992; Donlan και Costerton, 2002).

4. Στο τελικό στάδιο της προσκόλλησης έχουμε τη μεταφορά θυγατρικών κυττάρων από το δημιουργημένο biofilm σε άλλη περιοχή της επιφάνειας προκειμένου να επεκταθεί ο αποικισμός.

1.3. Παράγοντες που Επηρεάζουν την Προσκόλληση Βακτηρίων σε Βιοϋλικά

Η προσκόλληση των βακτηρίων σε βιοϋλικά είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους. Τέτοιες είναι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως οι συνθήκες ροής, η παρουσία πρωτεϊνών του ορού ή αντιβιοτικών, οι βακτηριακές ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του υλικού. Στο σημείο αυτό γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση πειραματικών μελετών που διερευνούν το πώς οι παραπάνω παράμετροι επηρεάζουν την βακτηριακή προσκόλληση και επιβεβαιώνουν ότι η διεξοδική και μεθοδική μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος, των χαρακτηριστικών της επιφάνειας των βιοϋλικών (φυσικοχημικές ιδιότητες, τοπογραφία-τραχύτητα) και της συμπεριφοράς των διάφορων βακτηρίων είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κατανόηση της διαδικασίας της βακτηριακής προσκόλλησης προκειμένου να ληφθούν τα κατάλληλα μέτρα ώστε αυτή να αποφευχθεί.

1.3.1. Περιβαλλοντικοί Παράγοντες

Ορισμένοι παράγοντες του περιβάλλοντος όπως η θερμοκρασία, η ιοντική ισχύς και το pH του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκονται τα βακτηριακά κύτταρα, ο χρόνος έκθεσης του βιοϋλικού στο βακτηριακό εναιώρημα, η βακτηριακή συγκέντρωση, η παρουσία αντιβιοτικών και οι συνθήκες ροής επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στα βιοϋλικά.

1.3.1.1. Συνθήκες Ροής

Οι συνθήκες ροής θεωρούνται ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν τόσο τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων (Isberg και Barnes, 2002; Duddridge et al., 1982; Dickinson και Cooper, 1995) όσο και τη δομή και τη δραστηριότητα της βιομεμβράνης (biofilm) (Stoodley et al., 1999; Klapper et al., 2002). Γενικά θεωρείται ότι μεγαλύτερος ρυθμός διάτμησης οδηγεί σε μεγαλύτερες δυνάμεις αποκόλλησης που με τη σειρά τους έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων (Dickinson και Cooper, 1995), και τη μεταβολής της δομής της βιομάζας (biofilm) καθιστώντας την πυκνότερη και λεπτότερη (Chand et al., 1991).

Κατά την επαφή ενός βακτηρίου με την επιφάνεια ενός υλικού, το βακτήριο είναι σε θέση να συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις που εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας τόσο του βακτηρίου όσο και του υλικού. Λαμβάνοντας υπόψη μας την απλούστερη περίπτωση της προσκόλλησης ενός βακτηρίου σε ένα υλικό μέσω δεσμών υποδοχέα/προσδέτη (receptor/ligand), ο αριθμός των δεσμών που μπορεί να σχηματισθεί είναι συνάρτηση της πυκνότητας του υποδοχέα και του προσδέτη (Hubble et al., 1996; Mascari et al., 2003). Εάν κάθε δεσμός απαιτεί μια συγκεκριμένη δύναμη για να σπάσει, ο αριθμός των δεσμών μεταξύ του βακτηρίου και της επιφάνειας καθορίζει την μέγιστη διατμητική τάση υπό την επίδραση της οποίας ένα προσκολλημένο βακτήριο είναι σε θέση να αντισταθεί στην αποκόλληση (Mohamed et al., 2000). Υπάρχει ένας βέλτιστος ρυθμός ροής που ευνοεί τη βακτηριακή προσκόλληση και που εκφράζει την ισορροπία μεταξύ του ρυθμού προσκόλλησης και της δύναμης που ενεργεί στο προσκολλημένο βακτήριο (Liu και Tay, 2002). Στην περίπτωση του υψηλότερου αριθμού υποδοχέων/κύτταρο, η προσκόλληση του *S. aureus* σε καλυπτρίδες γυαλιού επικαλυμμένες με κολλαγόνο αυξάνεται με αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 σε 300 s^{-1} και μειώνεται για ρυθμό διάτμησης μεγαλύτερο του 500 s^{-1} .

Κατά την προσκόλληση, ο αριθμός των δεσμών του βακτηρίου με το υλικό μπορεί να αυξηθεί ή να μειωθεί. Εάν ο αριθμός των δεσμών μειωθεί κάτω από μια κρίσιμη τιμή, το βακτήριο θα αποκολληθεί. Σε ρυθμούς ροής όπου η διατμητική τάση είναι μικρή, ο αριθμός των δεσμών που απαιτείται για να διατηρηθεί η προσκόλληση είναι μικρός και μια δεκαπλάσια αύξηση στη συγκέντρωση του υποδοχέα και του προσδέτη έχει αμελητέα επίδραση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων. Σε μεγαλύτερους ρυθμούς ροής, όπου η επίδραση της διάτμησης οδηγεί σε μεγαλύτερες δυνάμεις στα προσκολλημένα βακτήρια, η δυνατότητα σχηματισμού μεγαλύτερου αριθμού δεσμών είναι πολύ μεγαλύτερης σημασίας (Hubble et al., 2003).

Επιπλέον, υπάρχουν στοιχεία ότι τόσο τα προσκολλημένα βακτήρια όσο και αυτά του εναιωρήματος μπορούν να ανταποκριθούν στη διάτμηση αλλάζοντας το ρυθμό ανάπτυξής τους, τη μορφολογία τους, το μέγεθός τους και την πυκνότητα της βιομάζας, αλλά και το μεταβολισμό τους (Liu και Tay, 2001, 2002). Η υψηλότερη δραστηριότητα διυδρογονάσεων και ο χαμηλότερος ρυθμός ανάπτυξης επιτυγχάνονται όταν αυξάνεται ο ρυθμός διάτμησης. Ο μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, μαζί με την ενισχυμένη καταβολική

δραστηριότητα προτείνει ότι διαχωρισμός του καταβολισμού από τον αναβολισμό μπορεί να εμφανιστεί σε μεγάλους ρυθμούς διάτμησης. Επομένως, ένα βιολογικό φαινόμενο, εκτός από μια απλή φυσική επίδραση, μπορεί να είναι η αιτία της παρατηρούμενης σχέσης μεταξύ του ρυθμού διάτμησης και της προκύπτουσας δομής της βιομεμβράνης (biofilm).

Η ποσοτική αξιολόγηση των τιμών διατμητικής τάσης που ευνοούν την προσκόλληση και εκείνων που απαιτούνται για να αποκολληθούν τα προσκολλημένα βακτήρια δείχνει ότι υπάρχει μία τάξη μεγέθους διαφορά στα μεγέθη. Έχει αποδειχθεί ότι η διατμητική τάση που απαιτείται για την αποκόλληση του βακτηρίου αυξάνει με το χρόνο επώασης μέχρι μια μέγιστη τιμή, προτείνοντας ότι πρόσθετες αλληλεπιδράσεις λαμβάνουν χώρα σταδιακά μετά από την αρχική βακτηριακή προσκόλληση (Ming et al., 1998).

1.3.1.2. Ιοντική Ισχύς και pH Ρυθμιστικού Διαλύματος

Οι συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών, όπως KCl, NaCl και η τιμή του pH στο βακτηριακό διάλυμα επηρεάζουν την προσκόλληση (Sanderson et al., 1996; Bunt et al., 1995; McWhirter et al., 2002). Οι Bunt et al., το 1993, έδειξαν ότι το pH και η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος επηρεάζουν την υδροφοβικότητα της επιφάνειας των κυττάρων (Cell Surface Hydrophobicity: CSH). Το CSH βρέθηκε να είναι σημαντικά χαμηλότερο στο υψηλότερο pH (7.4) και σε χαμηλή ιοντική ισχύ (0.5 M), ενώ το CSH ήταν μεγαλύτερο σε pH 2.2 και ιοντική ισχύ 1 M. Η μεγαλύτερη προσκόλληση στις υδρόφοβες επιφάνειες βρέθηκε για pH μεταξύ 2.2 και 4, στην περιοχή δηλαδή του ισοηλεκτρικού σημείου όπου τα βακτήρια δεν είναι φορτισμένα, και για ιοντική ισχύ 1 M. Η επίδραση της αυξανόμενης ιοντικής ισχύος στην βακτηριακή προσκόλληση οφείλεται στην εξάλειψη των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (απωστικών) μεταξύ βακτηρίων και υλικού (Ong et al., το 1999). Επομένως, η ιοντική ισχύς και το pH επηρεάζουν τη βακτηριακή προσκόλληση μέσω της αλλαγής των χαρακτηριστικών της επιφάνειας τόσο των βακτηρίων όσο και των υλικών (φορτίο, υδροφοβικότητα) και επομένως επιφέρουν αλλαγές στις αλληλεπιδράσεις της αρχικής φάσης της βακτηριακής προσκόλλησης (φάση 1).

1.3.1.3. Αντιβιοτικά

Η παρουσία αντιβιοτικών μειώνει τη βακτηριακή προσκόλληση με τρόπο που εξαρτάται από με την ευαισθησία του βακτηρίου στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό αλλά και από την συγκέντρωση του (Schierholz et al., 2000). Οι Kohnen et al., το 2003 έδειξαν ότι η προσκόλληση του *S. epidermidis* σε καθετήρες μειώθηκε όταν αυτοί είχαν εμποτιστεί με τα αντιβιοτικά rifampin-sparfoxacin και αυτά απελευθερώνονταν αργά με το χρόνο από την επιφάνεια των καθετήρων.

Εντούτοις, οι Arciola et al., το 2002 έδειξαν ότι τα προσκολλημένα κύτταρα *S. epidermidis* είναι λιγότερο ευαίσθητα στα αντιβιοτικά σε σχέση με τα μη προσκολλημένα. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από την αλλαγή που επέρχεται στο μεταβολισμό (μικρότερος ρυθμός ανάπτυξης) και στο σύστημα αντοχής των βακτηρίων κάτω από δυσμενείς για αυτά συνθήκες, μετά από την προσκόλληση και την παραγωγή της εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας (slime). Μπορεί επίσης να εξηγηθεί από το ότι μεταλλαγμένα στελέχη κάποιου βακτηρίου τα οποία είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά προσκολλώνται πιο εύκολα στην επιφάνεια του υλικού και αντιλαμβάνονται τις συνθήκες ως ευνοϊκές για την ανάπτυξή τους.

1.3.2. Χαρακτηριστικές Επιφανειακές Ιδιότητες Υλικού

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στην επιφάνεια ενός βιοϋλικού συμπεριλαμβάνουν τη χημική σύσταση της επιφάνειας του υλικού (Cordero et al., 1996; Speranza et al., 2004; Gottenbos et al., 2000; Tegoulia και Cooper, 2002; Kiremitci-Gumustederelioglou and Pesmen, 1996; Henriques et al., 2004; Buczynski et al., 2003), το φορτίο (Gottenbos et al., 1999), και την υδροφοβικότητα της επιφάνειας (Balazs et., 2003) αλλά και την τραχύτητα και την τοπογραφία της (Scheuerman και λοιποί., 1998).

1.3.2.1. Χημική Σύσταση της Επιφάνειας

Η χημική σύσταση της επιφάνειας του υλικού επηρεάζει την προσκόλληση των βακτηρίων αλλά τον πολλαπλασιασμό τους. Τα υλικά με διαφορετικές τελικές χημικές ομάδες αλλάζουν τη βακτηριακή προσκόλληση με τρόπο που εξαρτάται από την υδροφοβικότητα και το φορτίο του υλικού.

Οι Tegoulia και Cooper, το 2002 μελέτησαν την προσκόλληση του *S. aureus* σε μονοστρωματικά αυτοοργανούμενα συστήματα σιλανίων (Self Assembled Monolayers: SAMs) με διαφορετικές χημικές ομάδες ως τελικές που αυτές ήταν μεθύλια (CH_3), υδροξύλια (CH_2OH), καρβοξύλια (COOH) και τρι οξείδιο του αιθυλενίου (EG_3). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσκόλληση ήταν χαμηλότερη στο EG_3 και αυξήθηκε με τη μετάβαση από τις ομάδες υδροξυλίου στις ομάδες καρβοξυλίου και κυρίως στις μεθυλο-ομάδες. Η προσκόλληση του *S. aureus* σε όλες τις επιφάνειες πλην του EG_3 εξηγείται καλά από τη θερμοδυναμική θεωρία (η γωνία επαφής του νερού με τις επιφάνειες ήταν: CH_3 : 100, CH_2OH : 12, COOH : 25, EG_3 : 34). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι στην επιφάνεια του EG_3 συγκρατούνται στοιβάδες νερού οι οποίες αποτρέπουν την απευθείας επαφή μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας.

1.3.2.2. Ηλεκτρικό Φορτίο Επιφάνειας Υλικού

Οι Kiremitci και Pesmen, το 1996 έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση ήταν μειωμένη στον αρνητικά-φορτισμένο πολυ (μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) παρουσία ακρυλικού οξέος (PMMA/AA), ενώ αυξήθηκε στον θετικά-φορτισμένο πολυ (μεθακρυλικό μεθυλεστέρα) παρουσία διμεθυλάμινο αιθυλικού μεθακρυλικού οξέος (PMMA/DMAEMA) με τρόπο που εξαρτώνταν από την περιεκτικότητα του συμπολυμερούς (AA ή DMAEMA) στο PMMA.

1.3.2.3. Υδροφοβικότητα Επιφάνειας Υλικού

Εάν η χημεία της επιφάνειας τροποποιηθεί με άργυρο (Woodyard et al., 1996; Gold, 2003), με άμορφο άνθρακα (Hauert, 2003) και με άλλα επιστρώματα με τη βοήθεια της τεχνολογίας πλάσματος (Whitehead et al., 2004; Davenas et al., 2002; Balazs et al., 2003; Francois et al., το 1996), η βακτηριακή προσκόλληση σε αυτές τις επιφάνειες είναι πιθανόν να εμποδίζεται. Οι Balazs et al., το 2003 έδειξαν ότι το τροποποιημένο με πλάσμα οξυγόνου PVC μείωσε την προσκόλληση της *Pseudomonas aeruginosa* λόγω της σημαντικής αλλαγής στην υδροφοβικότητα του, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PVC. Μετά την τροποποίηση σε πλάσμα οξυγόνου η γωνία διαβροχής του PVC με το νερό ήταν 20° σε αντίθεση με το αρχικό PVC η γωνία διαβροχής του οποίου ήταν 80° . Οι

James και Jayakrishnan, το 2003 έδειξαν ότι θειοκυανοποίηση της επιφάνειας PVC (PVC-SCN) μείωσε την προσκόλληση τόσο του *S. epidermidis* όσο και του *S. aureus*. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στην αλλαγή της υδροφοβικότητας του PVC μετά από τη θειοκυανοποίηση (γωνία διαβροχής με το νερό του PVC-SCN: 50°).

Σε αντίθεση όμως με τα παραπάνω αποτελέματα, οι Morra και Cassineli, 1996, έδειξαν ότι η τροποποίηση επιφανειών πολυστυρενίου με πλάσμα οξυγόνου αύξησε την προσκόλληση του *S. epidermidis*.

Άρα η επίδραση της υδροφοβικότητας της επιφάνειας του υλικού στην βακτηριακή προσκόλληση είναι κάτι που απαιτεί περισσότερη διερεύνηση.

Επικάλυψη της επιφάνειας με πεπτίδια (Park et al., 1998; Harris et al., 2004; Shi et al., 2000) και με μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Flemming et al., 2000; Vacheethasane and Marchant, 2000; James and Jayakrishnan, 2003; Paulsson et al., 1994; Baveja et al., 2004) έχει δείξει ότι μπορεί να μειώσει τη βακτηριακή προσκόλληση.

Συγκεκριμένα, οι Park et al., το 1998 έδειξαν ότι επικαλύψεις πολυουρεθάνης (PU) με πολυ (αιθύλενο γλυκόλη) [PEG1k: με μοριακό βάρος (M.W.) 1000], με υδροξυλιωμένο PEG1k (PEG1k-OH), και ειδικότερα με μακρομοριακές υδροξυλιωμένες αλυσίδες PEG (PEG-3.4k-OH με M. W. 3350) και με μακρομοριακές ηπαρινοποιημένες αλυσίδες PEG (PEG-3.4k-Heparin) μείωσαν τη βακτηριακή προσκόλληση εξαιτίας της αυξημένης υδροφιλικότητας των αλυσίδων αυτών σε σύγκριση με την μη επικαλυμμένη PU (γωνίες επαφής με το νερό: PU: 93, -PU-PEG1k-OH: 44). Οι επικαλύψεις PU με αλυσίδες PEG που φέρουν στην άκρη τους θειομάδες και ηπαρίνη προκάλεσαν τη μεγαλύτερη μείωση στην βακτηριακή προσκόλληση ίσως εξαιτίας του γεγονότος ότι αυτές οι τελικές ομάδες προσροφούν μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών. Επιπρόσθετα, οι Shi et al., το 2000 έδειξαν ότι επικάλυψη επιφανειών πολυ μεθυλ μεθακρυλικού οξέως (PMMA), πολυστυρενίου (PS) και σιλικόνης (Si) με μουκίνη (βλεννίνη) από βόειο ορό (Bovine serum mucin: BSM) προκάλεσε μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης λόγω της αυξημένης υδροφιλικότητας των επιφανειών αυτών σε σχέση με τις μη επικαλυμμένες επιφάνειες.

1.3.2.4. Τραχύτητα επιφάνειας

Έχει διαπιστωθεί ότι πολυμερείς επιφάνειες με αυξημένη τραχύτητα και μορφολογικές ατέλειες προωθούν τη βακτηριακή προσκόλληση και το σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm), περισσότερο από ότι οι λείες και με μικρή τραχύτητα επιφάνειες (Scheurman et al., 1998). Αυτό μπορεί να συμβαίνει εξαιτίας του ότι ένα αυξημένης τραχύτητας υλικό έχει μεγαλύτερη επιφάνεια και περισσότερες ευνοϊκές θέσεις διαθέσιμες για την προσκόλληση βακτηρίων, σε σχέση με ένα λείο υλικό, αλλά και γιατί οι θέσεις αυτές τους παρέχουν προστασία από τις συνθήκες ροής ή και την άμυνα του οργανισμού.

Συγκεκριμένα, οι Taylor et al., το 1998, έδειξαν ότι μικρή αύξηση στην τραχύτητα της επιφάνειας PMMA με σμυριδόχαρτο βαθμού P1200 (silicon carbide paper), δηλαδή αύξηση της μέσης επιφανειακής τραχύτητας (average surface roughness: Ra) από 0.04 μm σε 1.24 μm προκάλεσε σημαντική αύξηση στη βακτηριακή προσκόλληση, ενώ, περαιτέρω αύξηση της τραχύτητας με σμυριδόχαρτα P400 και P120 που προκάλεσαν Ra 1.86 μm και 3.66 μm αντίστοιχα, δεν είχε σημαντική επίδραση στη βακτηριακή προσκόλληση σε σχέση με την αρχική λεία επιφάνεια PMMA

Οι Boyd et al., το 2002, έδειξαν ότι μια αύξηση στην μέση επιφανειακή τραχύτητα (Ra) ανοξειδωτου ατσάλιου από 0.04 μm σε 0.30 μm οδήγησε σε μεγαλύτερη δύναμη προσκόλλησης των βακτηρίων σε σχέση με αυτή που προκλήθηκε από μεγαλύτερη αύξηση της επιφανειακής τραχύτητας, και συγκεκριμένα από 0.04 μm σε 0.96 μm . Αυτό σημαίνει ότι κάτω από την ίδια δύναμη αποκόλλησης που προκαλείται από ακίδα μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscope: AFM) (δείτε επίσης την περιγραφή τεχνικής AFM, παράρτημα 3, παράγραφος 3.2.) περισσότερα κύτταρα παραμένουν στο ανοξειδωτο ατσάλι όταν αυτό έχει Ra 0.30 μm από ότι όταν αυτό έχει Ra 0.04 μm και 0.96 μm .

Η αιτία αυτής της μη μονότονης εξάρτησης της βακτηριακής προσκόλλησης από την επιφανειακή τραχύτητα δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί και απαιτεί περαιτέρω μελέτες. Μελέτη της επίδρασης περισσότερων τιμών επιφανειακής τραχύτητας επιφάνειας, μέτρηση της διαθέσιμης κάθε φορά επιφάνειας για προσκόλληση βακτηρίων και μελέτη της τοπογραφίας της επιφάνειας μπορεί να δώσουν απαντήσεις στο ερώτημα αυτό.

Σε αυτή την κατεύθυνση, οι Kamuzewitz και Possart, το 2003, έδειξαν ότι η τραχύτητα συσχετίζεται και με την υδροφοβικότητα και την επιφανειακή ενέργεια ενός υλικού. Συγκεκριμένα, πρότειναν ότι η αύξηση της τραχύτητας οδηγεί σε αύξηση της επιφάνειας του υλικού και αυτό πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη μέτρηση γωνιών διαβροχής μεταξύ υγρών και τραχιών επιφανειών και κατά τον υπολογισμό της επιφανειακής ενέργειας και υδροφοβικότητας.

Επιπρόσθετα, οι Hoek and Agarwal, το 2006, έδειξαν ότι το μέγεθος της ενέργειας αλληλεπίδρασης σφαιρικών σωματιδίων και τραχιών επιφανειών μειώνεται με την αύξηση της επιφανειακής τραχύτητας, επειδή η απόσταση σωματιδίου- επιφάνειας υλικού είναι αποτελεσματικά μεγαλύτερη. Ως εκ τούτου, οι τραχιές επιφάνειες γίνονται ευνοϊκότερες για την εναπόθεση σωματιδίων, καθώς οι ελκυστικές van der Waals αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρότερες στις μεγάλες αποστάσεις από είτε τις οξέως-βάσεως είτε τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Η έννοια των αλληλεπιδράσεων ανάπτυσσεται στο δεύτερο κεφάλαιο).

Εκτός όμως από την επιφανειακή τραχύτητα, σημαντικό ρόλο παίζει και η τοπογραφία του υλικού.

1.3.2.5. Τοπογραφία Επιφάνειας Υλικού

Έχει διαπιστωθεί ότι πορώδη μοσχεύματα επιμολύνονται από βακτήρια πολύ πιο συχνά σε σχέση με υλικά που δεν φέρουν πόρους. Αυτό υποδηλώνει ότι τα βακτήρια αποικίζουν την πορώδη επιφάνεια κατά προτίμηση. Επιπλέον έχει βρεθεί ότι τα βακτήρια προσκολλώνται περισσότερο σε υλικά που φέρουν αυλακώσεις και πλέγματα, σε σχέση με υλικά τα οποία είναι επίπεδα ή και λεία. Αυτό πιθανώς οφείλεται στην αυξανόμενη επιφάνεια των μη επίπεδων υλικών σε σχέση με τα επίπεδα. (Scheurman et al., 1998; Medilanski et al., 2002; Bos et al., 2000). Επιπρόσθετα, τα βακτήρια προσκολλώνται κατά προτίμηση σε ατέλειες του υλικού με μέγεθος παρόμοιο με το μέγεθός τους δεδομένου ότι αυτό μεγιστοποιεί την επιφάνεια επαφής βακτηρίου-υλικού. Τα αυλάκια ή οι γρατσουνιές που είναι παρόμοια σε μέγεθος με το μέγεθος του βακτηρίου αυξάνουν την επιφάνεια επαφής και ως εκ τούτου την ικανότητα προσκόλλησης του βακτηρίου, ενώ αυλάκια που είναι πολύ μεγαλύτερα-ευρύτερα από το βακτηριακό μέγεθος έχουν παρόμοιες τιμές βακτηριακής προσκόλλησης με μια επίπεδη επιφάνεια. Τα αυλάκια ή οι

γρατσουνιές που έχουν μέγεθος πολύ μικρότερο από αυτό των βακτηρίων μειώνουν την επιφάνεια επαφής βακτηρίου-υλικού και ως εκ τούτου την προσκολλητική ικανότητα του βακτηρίου. (Edwards et al., 2001).

1.3.3. Χαρακτηριστικά Επιφάνειας Βακτηρίων

Σε ένα δεδομένο υλικό, τα διαφορετικά βακτηριακά είδη και στελέχη εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα προσκόλλησης, που εκτός από τα βιολογικά χαρακτηριστικά, εξαρτάται και από τα φυσικοχημικές ιδιότητες του κάθε είδους και στελέχους. Η υδροφοβικότητα αλλά και το επιφανειακό φορτίο των βακτηρίων είναι χαρακτηριστικά που έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζουν την προσκόλληση.

1.3.3.1. Υδροφοβικότητα Βακτηρίων

Γενικά, τα βακτήρια με υδρόφοβες επιφάνειες προτιμούν τα υδρόφοβα υλικά ενώ τα υδρόφιλα βακτήρια έχουν μειωμένη προσκολλητική ικανότητα. Οι Vacheethasane et al., το 1998 έδειξαν ότι το στέλεχος του *S. epidermidis* με τη μεγαλύτερη υδροφοβικότητα προσκολλάται περισσότερο στην υδρόφοβη επιφάνεια πολυ αιθυλενίου (PE) από ότι το στέλεχος με τη μικρότερη υδροφοβικότητα, για διατμητικές τάσεις μεταξύ 0-8 dyn/cm². Αντίθετα, η διαφορά στην ικανότητα προσκόλλησης μεταξύ υδρόφοβων και υδρόφιλων βακτηρίων μειώθηκε με την αύξηση της διατμητικής τάσης και η συσχέτιση μεταξύ της προσκόλλησης και της βακτηριακής υδροφοβικότητας χάθηκε για διατμητικές τάσεις μεγαλύτερες από 15 dyn/cm². Στην περίπτωση που οι επιφάνειες είχαν επικαλυφθεί με πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (Poor Platelet Plasma: PPP) θετική συσχέτιση μεταξύ της βακτηριακής υδροφοβικότητας και της προσκόλλησης βρέθηκε μόνο κάτω από συνθήκες στάσης (15 dyn/cm²) και όχι δυναμικές. Εντούτοις, έχει αποδειχθεί ότι η υδροφοβικότητα της επιφάνειας του υλικού διαδραματίζει έναν σημαντικότερο ρόλο στη βακτηριακή προσκόλληση σε σχέση με την υδροφοβικότητα της επιφάνειας του βακτηρίου ακόμα και για διατμητικές τάσεις που φτάνουν τις 65 dyn/cm².

1.3.3.2. Ηλεκτρικό Φορτίο Βακτηριακής Επιφάνειας

Τα περισσότερα μόρια αποκτούν κάποιο ηλεκτρικό φορτίο κατά τη διασπορά τους σε υδατικό διάλυμα λόγω του ιονισμού των ομάδων επιφάνειάς τους. Τα βακτήρια στην υδατική φάση είναι σχεδόν πάντα αρνητικά φορτισμένα. Το αρνητικό αυτό φορτίο της επιφάνειάς τους ποικίλλει ανάμεσα στα διάφορα βακτηριακά είδη και επηρεάζεται από το μέσο και το στάδιο της ανάπτυξης, τη δομή του κυτταρικού τους τοιχώματος, το pH και την ιοντική ισχύ του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται (An και Friedman, 1998).

Εντούτοις, η σχετική συμβολή του ηλεκτρικού φορτίου της βακτηριακής επιφάνειας στην διαδικασία της προσκόλλησης δεν έχει γίνει σαφώς κατανοητή.

1.3.3.3. Βιολογικοί Παράγοντες Επιφάνειας Βακτηρίου

Τα βακτηριακά στελέχη που δεν παράγουν slime θεωρούνται λιγότερο παθογόνα και μειωμένης προσκολλητικής ικανότητας. Επομένως, η παραγωγή slime θεωρείται ότι ενισχύει την προσκόλληση. Οι εξωκυττάρια ουσίες που συμβάλλουν στην προσκόλληση είναι: μία πολυσακχαριδική προσκολλητίνη (PS/A: Polysaccharide-adhesin), πρωτεΐνες επιφανείας του βακτηρίου (SSP-1, SSP-2), η αυτολυσίνη AtlE του *S. epidermidis*, καθώς και πρωτεΐνες του πλάσματος (ινωδογόνο, θρομβίνη, θρομβοσπονδίνη, κολλαγόνο κ.α.). Αν η προσκόλληση γίνεται σε κύτταρα, τότε συνεισφέρουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών της βακτηριακής επιφανείας και του ξενιστή (εξωκυττάρων ή συνδεδεμένων στην επιφάνεια των κυττάρων του ξενιστή) (Tojo et al., 1988; O’Gara and Humphreys, 2001; Gotz, 2002; Mack, 1999).

1.3.4. Πρωτεΐνες ορού ή ιστών

Οι πρωτεΐνες ορού ή ιστών, όπως η αλβουμίνη, η ινωδεκτίνη, το ινωδογόνο, η λαμίνη, το αποδιατεταγμένο κολλαγόνο και άλλες, προωθούν ή εμποδίζουν τη βακτηριακή προσκόλληση είτε γιατί δεσμεύονται στην επιφάνεια του υλικού ή στη βακτηριακή επιφάνεια είτε γιατί είναι παρούσες στο υγρό μέσο κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης. Οι περισσότερες από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και πρωτεϊνών είναι ειδικές και η σύνδεση τους έχει τη μορφή υποδοχέα-προσδέτη (receptor-

ligand) (Miorner et al., 1980). Ο τρόπος αλληλεπίδρασης βακτηρίων με διάφορες πρωτεΐνες είναι ο εξής:

1.3.4.1. Ινωδεκτίνη

Η προσροφημένη σε επιφάνειες υλικών ινωδεκτίνη (Fibronectin Fn), προωθεί σαφώς την προσκόλληση του *S. aureus* στις επιφάνειες αυτές (Vaudax et al., 1984; Herrmann et al., 1988). Η σύνδεση της Fn με τον *S. aureus* είναι ειδική, χρονικά εξαρτημένη και μη αναστρέψιμη. Επομένως, παρουσία Fn, η προσκόλληση του *S. aureus* στις επιφάνειες προσθετικών υλικών αυξάνεται σημαντικά.

Εντούτοις, υπάρχουν διαμάχες σχετικά με τη επίδραση της Fn στην προσκόλληση του *S. epidermidis* στις επιφάνειες των υλικών (Herrmann et al., 1988).

1.3.4.2. Αλβουμίνη

Η προσροφημένη, σε επιφάνειες κεραμικών, μετάλλων και πολυμερών, αλβουμίνη (αλβουμίνη από ανθρώπινο ορό: Human Serum Albumin: HAS) έχει εμφανίσει ανασταλτική δράση στη βακτηριακή προσκόλληση. Οι Dickinson et al., το 1997 έδειξαν ότι η αλβουμίνη εμποδίζει την προσκόλληση του *S. aureus* σε βασική πολυουρεθάνη (PEU-B), σε θετικά φορτισμένη πολυουρεθάνη που φέρει αμινομάδες (PEU-N) και σε αρνητικά φορτισμένη πολυουρεθάνη που φέρει θειομάδες (PEU-N). Επιπλέον, έδειξαν ότι η αλβουμίνη εμπόδισε τη βακτηριακή προσκόλληση με τρόπο ανάλογο του ρυθμού διάτμησης. Αύξηση του ρυθμού διάτμησης μείωσε την προσκόλληση του *S. aureus* σε αλβουμίνη προσροφημένη σε PEU-N επιφάνειες.

Η αλβουμίνη μπορεί να εμποδίσει την βακτηριακή προσκόλληση σε υλικά είτε γιατί προσροφάται στην επιφάνεια του υλικού και την κάνει πιο υδρόφιλη (Camesano, 2007) είτε γιατί δεσμεύεται στα βακτηριακά κύτταρα (Fletcher et al., 1982.)

1.3.4.3. Ινωδογόνο

Οι περισσότερες μελέτες έχουν δείξει ότι το προσροφημένο σε βιοϋλικά ινωδογόνο προωθεί την προσκόλληση των βακτηρίων και ειδικά των σταφυλοκόκκων (Dickinson et al., 1995; Dickinson et al., 1997; Tegoulia και Cooper, 2002). Επιπλέον η προσρόφηση του ινωδογόνου στην επιφάνεια είτε των βακτηρίων είτε των υλικών

ενισχύει τη βακτηριακή προσκόλληση με τρόπο που δεν εξαρτάται από το ρυθμό ροής ακόμα και όταν αυτός φτάνει τα 200 s^{-1} . Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την άποψη της παρουσίας υποδοχέων για το ινωδογόνο στην επιφάνεια των σταφυλοκόκκων. Πρόσφατα, παρουσιάστηκε ο μεσολαβητικός ρόλος του ινωδογόνου, της ινικής και ιντεγκρινών των αιμοπεταλίων στην προσκόλληση του *S. aureus* σε αιμοπετάλια που βρίσκονται συνδεδεμένα με την επιφάνεια ενός υλικού (Fallgren et al., 2002).

1.3.4.4. Θρομβίνη

Η θρομβίνη αυξάνει σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση δεδομένου ότι πολυμερίζει το ινωδογόνο του πλάσματος σε ινική. Η ινική περιβάλλει και συνδέει το σύνολο των αιμοπεταλίων κατά το σχηματισμό ενός θρόμβου προκειμένου να τον σταθεροποιήσουν. Τόσο η θρομβίνη όσο και ο σχηματιζόμενος θρόμβος στο σύνολό του προωθούν τη βακτηριακή προσκόλληση (Baumgartner et al., 1998).

1.3.4.5. Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP)

Η προσκόλληση των διάφορων πηκτάση αρνητικών σταφυλοκόκκων σε υλικά στην επιφάνεια των οποίων έχει προσροφηθεί PPP είναι πολύ χαμηλότερη από ότι επάνω σε «γυμνές» (bare) επιφάνειες (Vacheethasane et al., 1998; Dickinson et al., 1997). Αυτή η επίδραση του PPP και του ορού οφείλεται κυρίως στην προσροφημένη αλβουμίνη. Εντούτοις, το PPP όταν βρίσκεται προσροφημένο σε μια επιφάνεια παρουσία θρομβίνης ενισχύει την βακτηριακή προσκόλληση.

1.3.4.6. Αιμοπετάλια

Οι Baumgartner και Cooper, το 1997 έδειξαν ότι η προσκόλληση του *S. aureus* αυξάνεται από προσκολλημένα αιμοπετάλια και κυρίως από την ταυτόχρονη παρουσία αιμοπεταλίων και θρομβίνης. Τα προσκολλημένα και ενεργοποιημένα αιμοπετάλια υποβάλλονται σε εκτενείς αλλαγές συμπεριλαμβανομένης της ενεργοποίησης των δεκτών επιφάνειας και της απελευθέρωσης πρωτεϊνών που αποθηκεύονται στα κοκκία τους όπως σεροτονίνη και τον παράγοντα von Willebrand (vWf). Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια δεσμεύουν διάφορες διαλυτές πρωτεΐνες του πλάσματος όπως το

ινωδογόνο, τη θρομβοσπονδίνη και την ινωδεκτίνη επομένως, προωθούν τη βακτηριακή προσκόλληση.

1.4. Τεχνικές που Χρησιμοποιούνται για την Αξιολόγηση της Βακτηριακής Προσκόλλησης

Σε αυτό το υποκεφάλαιο περιγράφονται συνοπτικά διάφορες τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης και το σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm) και περιγράφονται στην ανασκόπηση των An και Friedman, 1997.

1.4.1. Μικροσκοπία για τον Υπολογισμό και τη Μορφολογική Παρατήρηση των Προσκολλημένων Βακτηρίων

- ***Οπτική Μικροσκοπία***

Η χρήση της οπτικής μικροσκοπίας περιορίζεται σε δείγματα τα οποία είναι διαφανή και έχουν μικρό πάχος. Σε αυτές τις περιπτώσεις, τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να παρατηρηθούν στη φυσική τους κατάσταση, δηλαδή ενώ είναι ελεύθερα σε υγρό μέσο ή ενώ έχουν προσκολληθεί στο προς εξέταση υλικό. Ο τρόπος αυτός παρατήρησης βελτιώνεται σημαντικά με τη χρησιμοποίηση ορισμένων μη τοξικών χρωστικών ουσιών, οι οποίες έχουν την ικανότητα να χρωματίζουν συγκεκριμένα κύτταρα ή ενδοκυτταρικά στοιχεία διαπερνώντας τις πλασματικές μεμβράνες χωρίς να θίγουν τη δομή και τη λειτουργικότητα τους. Πρόκειται για την εφαρμογή της χρώσεως που επιτρέπει να αναγνωρίζονται και να ξεχωρίζουν οπτικά ορισμένα μέρη του κυττάρου, τα οποία κανονικά διακρίνονται με δυσκολία. Πιο συγκεκριμένα, η διαφορετική χημική σύσταση των διαφορετικών κυτταρικών στοιχείων προκαλεί τη διαφορετική συμπεριφορά τους απέναντι στην ίδια χρωστική. Αυτό συμβαίνει διότι η χρωστική αποταμιεύεται διαφορεικά είτε επειδή συνδέεται χημικά με ορισμένα ενδοκυτταρικά συστατικά, είτε επειδή διαλύεται σε μια συγκεκριμένη κυτταρική φάση με τη μορφή μορίων ή ιόντων. Έτσι εκδηλώνεται η διαφορετική χρώση των επί μέρους συστατικών.

Η πλειονότητα των χρωστικών είναι οργανικές αρωματικές ενώσεις, όπως η εωσίνη, το κυανούν της ανιλίνης και άλλες. Επιπρόσθετα, η Gram χρώση που

αναφέρθηκε στο υποκεφάλαιο 1.2., για το διαχωρισμό των βακτηρίων σε Gram-θετικά ή αρνητικά ανιχνεύεται με οπτικό μικροσκόπιο.

Το κύριο μειονέκτημα του οπτικού μικροσκοπίου είναι η διακριτική του ικανότητα, η οποία στην περίπτωση του λευκού σύνθετου φωτός δεν ξεπερνά τα 2500 Å.

- ***Μικροσκόπιο Φθορισμού (Epifluorescence Microscopy)***

Στην περίπτωση του μικροσκοπίου φθορισμού τα προς εξέταση δείγματα μπορεί να είναι διαφανή ή μη, ενώ δεν παίζει ρόλο το πάχος τους. Σε αντίθεση με το οπτικό μικροσκόπιο, στο μικροσκόπιο φθορισμού γίνεται προσθήκη φίλτρων διέγερσης ανάμεσα στην φωτεινή πηγή και το συγκεντρωτικό φακό, καθώς και προσθήκη φίλτρων εκπομπής ανάμεσα στον αντικειμενικό φακό και τη διάταξη καταγραφής. Τα φίλτρα διέγερσης είναι φίλτρα ευρείας ζώνης επιλεγμένα κατάλληλα ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση φωτός σε μήκη κύματος πολύ κοντά στο μέγιστο απορρόφησης του χρωμοφόρου φθορισμού, ενώ εμποδίζουν τη διέλευση μεγαλύτερων μηκών κύματος. Αντίθετα, τα φίλτρα εκπομπής επιλέγονται έτσι ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση του φωτός από το φάσμα εκπομπής και να εμποδίζουν τη διέλευση του φωτός διέγερσης.

Τα βακτηριακά κύτταρα, προσκολλημένα ή μη, προκειμένου να παρατηρηθούν σημαίνονται με κάποιο χρωμοφόρο φθορισμού όπως η ισοθιοκυανική φλουορεσίνη (FITC) και το πορτοκαλί της ακριδίνης. Συχνά γίνεται χρήση αντισωμάτων, λεκτινών ή αλληλουχίας νουκλεοτιδίων, συμπληρωματικών κάποιας συγκεκριμένης αλληλουχίας νουκλεοτιδίων των βακτηρίων (Fluorescence In Situ Hybridisation, Krimer et al., 1999; Moter et al., 2000), και αυτά φέρουν κάποιο χρωμοφόρο φθορισμού (όπως FITC). Η διαδικασία της χρώσης για τη μελέτη μας περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.5.3. (Κάποιες λεπτομέρειες για το μικροσκόπιο φθορισμού δίνονται στο Παράρτημα 3).

Το μειονέκτημα του απλού μικροσκοπίου φθορισμού είναι η ταυτόχρονη διέγερση του φθορισμού των «αντικειμένων» που βρίσκονται εκτός του εξεταζόμενου εστιακού επιπέδου. Ειδικά για υλικά μεγάλης τραχύτητας αλλά και για συσσωματώματα βακτηρίων που βρίσκονται σε διαφορετικά επίπεδα, αυτό οδηγεί σε λήψη ασαφούς

εικόνας. Για το σκοπό αυτό τα τελευταία χρόνια γίνεται χρήση του μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης.

- ***Μικροσκόπιο Συνεστιακής Σάρωσης (Scanning Confocal Laser Microscopy: SCLM)***

Η βασική αρχή της μικροσκοπίας συνεστιακής σάρωσης, και το πλεονέκτημά της ταυτόχρονα, είναι η διέγερση φθορισμού κάθε φορά από ένα σημείο του δείγματος, με τη χρήση laser. Με την ακτινοβολήση ενός σημείου κάθε φορά, η ένταση της ακτινοβολήσης μειώνεται απότομα, πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης, καθώς η δέσμη του φωτός συγκλίνει ή αποκλίνει. Έτσι μειώνεται η διέγερση του φθορισμού των «αντικειμένων» που βρίσκονται εκτός του εξεταζόμενου εστιακού επιπέδου. Εάν το σημείο αυτό είναι αρκετά μικρό, στα όρια τα οποία θέτονται από την περίθλαση, τότε η διακριτική ικανότητα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του συμβατικού μικροσκοπίου.

Τα βακτηριακά κύτταρα, προσκολλημένα ή μη σημαίνονται με κάποιο χρωμοφόρο φθορισμού, όπως και στην περίπτωση του μικροσκοπίου φθορισμού. Η διαδικασία της χρώσης για τη μελέτη μας περιγράφεται στο κεφάλαιο 3, παράγραφο 3.5.4. (Κάποιες λεπτομέρειες για το μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης δίνονται στο Παράρτημα).

- ***Μικροσκόπιο Ηλεκτρονικής Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy: SEM)***

Κατά την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης μια πολύ λεπτή εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας σαρώνει την υπό εξέταση επιφάνεια, παρέχοντας πληροφορίες για τη μορφολογία (Η αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου ηλεκτρονικής σάρωσης δίνεται στο Παράρτημα 3).

Τα προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα παρατηρούνται με το μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης αφού πρώτα μονιμοποιηθούν και αφυδατωθούν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.2.

- ***Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy: AFM)***

Το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης χρησιμοποιεί μια λεπτή ακίδα διαστάσεων λίγων νανομέτρων, που σαρώνει την υπό εξέταση επιφάνεια (Παράρτημα 3). Επομένως, η μελέτη των προσκολλημένων σε ένα υλικό βακτηρίων δεν περιορίζεται από το μήκος κύματος του φωτός ή των ηλεκτρονίων. Η μελέτη με το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης είναι σε θέση να αποκαλύψει την τοπογραφία του υλικού αλλά και τη μορφολογία των προσκολλημένων βακτηρίων, με ατομική ανάλυση, χωρίς ιδιαίτερη επεξεργασία του δείγματος, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.2.

1.4.2. Μέθοδοι Μέτρησης Ζώντων Βακτηρίων

- ***Μέθοδος Μέτρησης του Αριθμού των Ζώντων Προσκολλημένων στην Επιφάνεια Βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs)***

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή τα βακτήρια που έχουν προσκολληθεί στην επιφάνεια του προς εξέταση υλικού αποκολλώνται με χρήση υπερήχων και το εναιώρημα των βακτηρίων μετά από διαδοχικές αραιώσεις επιστρώνεται σε τρυβλίο με θρεπτικό υλικό. Τα βακτήρια που αναπτύσσονται μετρούνται μετά από 24 ώρες επώαση στους 37 °C, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.1.

- ***Ραδιοσήμανση***

Κατά τη μέθοδο της ραδιοσύμανσης, γίνεται σήμανση των βακτηρίων με ραδιενεργά στοιχεία, όπως [¹⁴C]. Η μέθοδος αυτή επιτρέπει μέτρηση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων ακόμα και στο εσωτερικό καθετήρων, πόρων και στην επιφάνεια σωματιδίων, απαιτεί όμως εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό.

- ***CTC Χρώση***

Με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) επιτρέπεται η παρατήρηση και η καταμέτρηση ζώντων βακτηρίων που έχουν προσκολληθεί σε ένα υλικό. Η οξειδωμένη CTC είναι άχρωμη, ενώ η ανηγμένη από μεταφορά ηλεκτρονίων των ζώντων βακτηρίων φθορίζει.

1.4.3. Άλλες Άμεσες και Έμμεσες Μέθοδοι

- **Φασματοφωτομετρία**

Με την τεχνική αυτή προσδιορίζεται η οπτική πυκνότητα εναιωρήματος βακτηρίων και με ποιοτική συσχέτιση της οπτικής πυκνότητας και της μεθόδου μέτρησης του αριθμού των ζώντων βακτηρίων (CFUs) μπορεί να κατασκευαστεί καμπύλη αναφοράς σύμφωνα με την οποία από την οπτική πυκνότητα προκύπτει ο αριθμός των βακτηρίων του εναιωρήματος (Mc Farland standard, παράγραφος 3.3.3.)

- **Μετρητής Σωματιδίων**

Με την τεχνική αυτή (Coulter counter) προσδιορίζεται ο αριθμός των βακτηρίων σε εναιώρημα.

- **Βιοχημικοί Δείκτες (ATP)**

Με προσδιορισμό βιοχημικών δεικτών, όπως του ATP, μπορεί να προσδιοριστεί ο αριθμός των ζώντων βακτηρίων σε διάλυμα.

1.4.4. Μέθοδος Εκτίμησης Βλεννώδους Εξωκυττάριας Ουσίας (Slime) ή Βιομεμβράνης (Biofilm)

- **Μετρήσεις Πάχους, Πυκνότητας**

Με τη βοήθεια των μικροσκοπίων και κυρίως του μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης, υπολογίζεται το πάχος και η πυκνότητα της σχηματιζόμενης βιομεμβράνης στην επιφάνεια ενός υλικού.

- **Μορφολογικές Παρατηρήσεις**

Με χρήση των μικροσκοπίων που περιγράφησαν στην παράγραφο 1.4.1. παρατηρείται η μορφολογία της σχηματιζόμενης βιομεμβράνης στην επιφάνεια ενός υλικού.

- ***Μέτρηση του Περιεχομένου της Βιομεμβράνης***

Με τη χρήση ειδικών αντισωμάτων και λεκτινών μπορεί να ποσοτικοποιηθεί η περιεκτικότητα της βιομεμβράνης σε κάποιους πολυσακχαρίτες ή πρωτεΐνες (Παράγραφος 3.5.4.).

Κεφάλαιο 2

Θεωρητικές Προσεγγίσεις και Τεχνικές Μέτρησης Δυνάμεων Αλληλεπίδρασης Βακτηρίων-Υλικών

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι θεωρητικές προσεγγίσεις που έχουν προταθεί για την εξήγηση της βακτηριακής προσκόλλησης και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται με στόχο των υπολογισμών των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών.

2.1. Θεωρητικές Προσεγγίσεις των Αλληλεπιδράσεων Βακτηρίων-Υλικών

Στο υποκεφάλαιο αυτό περιγράφονται οι θεωρητικές προσεγγίσεις που έχουν προταθεί για την εξήγηση πειραματικών αποτελεσμάτων που σχετίζονται με προσκόλληση βακτηρίων σε υλικά, αλλά και για την πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών.

Με δεδομένο ότι τα βακτήρια έχουν διαστάσεις κολλοειδών (περίπου 1 μm διάμετρο) αλλά και ότι, αρχικά τουλάχιστον, αλληλεπιδρούν με το υλικό μέσω φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων, τα μοντέλα που έχουν προταθεί είναι βασισμένα κατά κύριο λόγο στις θεωρίες κολλοειδών συστημάτων και συγκεκριμένα την θερμοδυναμική, την DLVO και την εκτεταμένη DLVO.

Εξαιτίας όμως του το ότι οι επιφάνειες των βακτηρίων αποτελούνται από μακρομόρια τα οποία επίσης συμβάλλουν στην προσκόλληση έχουν προταθεί και μοντέλα που περιγράφουν την προσκόλληση μέσω μακρομοριακών δεσμών.

2.1.1. Θεωρίες Κολλοειδών Σωματιδίων

Όπως ήδη περιγράφηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, η προσκόλληση των βακτηρίων στις επιφάνειες των υλικών είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους και που αποτελείται από δύο φάσεις. Η πρώτη φάση κυριαρχείται από φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων και των υλικών. Τέτοιες είναι οι αλληλεπιδράσεις van der Waals, οι ηλεκτροστατικές και οι οξέος-βάσεως. Η δεύτερη φάση είναι χρόνο-εξαρτώμενη και κατά τη διάρκειά της τα βακτήρια προσκολλώνται πιο ισχυρά τόσο στην επιφάνεια του υλικού όσο και το ένα στο άλλο μέσω πολυμερών δομών του τοιχώματός τους και της εξωκυττάριας βλεννώδους

ουσίας που παράγουν (slime). Αλληλεπιδρούν επίσης με πρωτεΐνες ορού μέσω κυρίως αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη (receptor-ligand) (Costerton et al., 1995).

Συνεπώς, κατά της διάρκεια της αρχικής φάσης προσκόλλησης, τα βακτήρια πλησιάζοντας το υλικό προσελκύονται ή απωθούνται ανάλογα τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας τόσο των βακτηρίων όσο και του υλικού, αλλά και του διαλύματος μέσα στο οποίο βρίσκονται (Busscher et al., 1984; Gannon et al., 1991; Hermansson, 1999;).

Για την κατανόηση των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων της προσκόλλησης, τα βακτήρια μοντελοποιούνται ως μη ζώντα κολλοειδή σωματίδια. Κάνοντας αυτή την παραδοχή, τρεις θεωρητικές προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών: η θερμοδυναμική, η DLVO και η εκτεταμένη DLVO.

2.1.1.1. Θερμοδυναμική Θεωρία

Σύμφωνα με τη θερμοδυναμική θεωρία (Absolom et al., 1983), η προσκόλληση των βακτηρίων σε ένα υλικό θεωρείται ως δημιουργία μιας νέας διεπιφάνειας: βακτηρίου (B)-υλικού (S), μετά από διάσπαση των δύο προϋπαρχουσών διεπιφανειών: βακτηρίων (B)-υγρού (L) και υλικού (S)-υγρού (L). Η τάση των βακτηρίων να προσκόλληθούν εκφράζεται από την μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά τη διαδικασία της προσκόλλησης σύμφωνα με την εξίσωση:

$$\Delta G_{d0}^{adh} = \gamma_{BS} - \gamma_{BL} - \gamma_{SL} \quad (2.1)$$

όπου ΔG_{d0}^{adh} (J/m^2) είναι η ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης, ανά μονάδα επιφάνειας, ενός βακτηρίου στην επιφάνεια ενός υλικού μέσα σε υγρό, όταν η απόσταση μεταξύ του βακτηρίου και του υλικού τείνει στο μηδέν $d \rightarrow 0$ (van Oss and Good, 1984). Ο όρος γ_{BS} (J/m^2) είναι η διεπιφανειακή ενέργεια βακτηρίου-υλικού, γ_{BL} (J/m^2) είναι η διεπιφανειακή ενέργεια βακτηρίου-υγρού και γ_{SL} (J/m^2) είναι η διεπιφανειακή ενέργεια υλικού-υγρού.

Η προσκόλληση ευνοείται για $\Delta G^{adh} < 0$ και αυτό σημαίνει ότι η αυθόρμητη προσκόλληση συνοδεύεται από μείωση στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, όπως προβλέπεται από το δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής. Ο τρόπος με τον οποίο

υπολογίζονται οι διεπιφανειακές ενέργειες εξαρτάται από τη θερμοδυναμική προσέγγιση που χρησιμοποιείται.

2.1.1.1.1. Προσέγγιση Dispersion-Polar (Διασποράς-Πολικής)

Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση της θερμοδυναμικής θεωρίας, η ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης ενός βακτηρίου (B) στην επιφάνεια ενός υλικού (S) μέσα σε υγρό (L), εκφράζεται ως το άθροισμα της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας λόγω αλληλεπιδράσεων διασποράς (d) και λόγω πολικών αλληλεπιδράσεων (p) σύμφωνα με την εξίσωση

$$\Delta G_{d0}^{adh} = \Delta G_{d0}^d + \Delta G_{d0}^p \quad (2.2)$$

Όπου ΔG_{d0}^{adh} , είναι η συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης, και ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^p οι συνιστώσες της από τις αλληλεπιδράσεις διασποράς και τις πολικές, αντίστοιχα.

Όσον αφορά στις *αλληλεπιδράσεις διασποράς*, ο Fowkes (Fowkes, 1962; Fowkes, 1964; Fowkes et al, 1980) τις απέδωσε στις αλληλεπιδράσεις London ή αλλιώς στις αλληλεπιδράσεις «κυμαινόμενων» (fluctuating) διπόλων-διπόλων εξ επαγωγής, οι οποίες υπάρχουν σε όλες τις μορφές ύλης και *δίνουν πάντα μια ελκτική δύναμη* μεταξύ των παρακείμενων ατόμων ή μορίων, ανεξάρτητα από το πόσο παρόμοια η φύση τους μπορεί να είναι. Επιπλέον, απέδωσε τις πολικές αλληλεπιδράσεις στους δεσμούς υδρογόνου, αλλά και στις αλληλεπιδράσεις Keesom ή δίπολων-διπόλων εξ επαγωγής, και στις Debye ή αλλιώς αλληλεπιδράσεις διπόλων-διπόλων. Εντούτοις, εξέτασε τη διεπιφάνεια μεταξύ δύο φάσεων που αλληλεπιδρούν εξ ολοκλήρου μέσω δυνάμεων διασποράς, και έτσι υπολόγισε την διεπιφανειακή ενέργεια υλικού-υγρού χρησιμοποιώντας την εξίσωση:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} \quad (2.3)$$

όπου, γ_S, γ_L είναι η συνολική ελεύθερη ενέργεια του υλικού και του υγρού αντίστοιχα, και γ_S^d, γ_L^d οι συνιστώσες της λόγω διασποράς για το υλικό και το υγρό αντίστοιχα.

Οι Owens και Wendt, το 1969, πρότειναν τη διάσπαση της συνολικής ελεύθερης ενέργειας ενός υλικού ή ενός υγρού σε δύο συνιστώσες: τη *συνιστώσα λόγω διασποράς* και τη *συνιστώσα λόγω δεσμών υδρογόνου* ή αλλιώς την *πολική συνιστώσα*. Η ενέργεια αλληλεπίδρασης των πολικών δυνάμεων στη διεπιφάνεια υλικού (S)-υγρού (L)

ποσοτικοποιήθηκε και συμπεριλήφθηκε ως γεωμετρικός μέσος των πολικών συστατικών του υλικού και του υγρού. Έτσι, υπολόγισαν την διεπιφανειακή ενέργεια υλικού-υγρού μέσω της επέκτασης της εξίσωσης που ο Fowkes είχε προτείνει [Εξίσωση (2.3)] χρησιμοποιώντας την εξίσωση

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (2.4)$$

Αυτή εναλλακτικά μπορεί να γραφεί ως

$$\gamma_{SL} = \left(\sqrt{\gamma_S^d} - \sqrt{\gamma_L^d}\right)^2 + \left(\sqrt{\gamma_S^p} - \sqrt{\gamma_L^p}\right)^2 \quad (2.5)$$

Οι διεπιφανειακές ενέργειες βακτηρίου-υλικού (BS) και βακτηρίου-υγρού (BL) μπορούν να υπολογισθούν από εξισώσεις ανάλογες με την προηγούμενη και αυτές είναι

$$\gamma_{BS} = \left(\sqrt{\gamma_B^d} - \sqrt{\gamma_S^d}\right)^2 + \left(\sqrt{\gamma_B^p} - \sqrt{\gamma_S^p}\right)^2 \quad (2.6)$$

$$\gamma_{BL} = \left(\sqrt{\gamma_B^d} - \sqrt{\gamma_L^d}\right)^2 + \left(\sqrt{\gamma_B^p} - \sqrt{\gamma_L^p}\right)^2 \quad (2.7)$$

Σύμφωνα με εξίσωση (2.1) και με την αντικατάσταση των διεπιφανειακών ενεργειών BS, BL και SL από τις εξισώσεις (2.5), (2.6) και (2.7), η συνολική ελεύθερη ενέργεια της βακτηριακής προσκόλλησης εκφράζεται ως

$$\begin{aligned} \Delta G_{d0}^{adh} &= \Delta G_{d0}^d + \Delta G_{d0}^p = \\ &= \left[\left(\sqrt{\gamma_B^d} - \sqrt{\gamma_S^d}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_B^d} - \sqrt{\gamma_L^d}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_S^d} - \sqrt{\gamma_L^d}\right)^2 \right] + \left[\left(\sqrt{\gamma_B^p} - \sqrt{\gamma_S^p}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_B^p} - \sqrt{\gamma_L^p}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_S^p} - \sqrt{\gamma_L^p}\right)^2 \right] \quad (2.8) \end{aligned}$$

Επομένως, η προσέγγιση dispersion-polar υπονοεί ότι οι πολικές διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις προέρχονται από μία και μόνη πολική ιδιότητα ή συστατικό που σχετίζεται με κάθε είδος ή αλληλεπιδρώντες φάσεις, όπως ακριβώς υπάρχει μια και μόνη ιδιότητα ή συστατικό διασποράς. Επιπλέον, ο κανόνας του γεωμετρικού μέσου, που έχει αποδειχθεί (θεωρητικά και πειραματικά) σωστός για τις αλληλεπιδράσεις διασποράς, υιοθετείται επίσης για τις πολικές αλληλεπιδράσεις.

Εκτός από την προσέγγιση του γεωμετρικού μέσου, οι Wu and Brzozowski, το 1971, πρότειναν την χρήση του αρμονικού μέσου προκειμένου να συνδυάσουν την πολική συνιστώσα και τη συνιστώσα διασποράς της ελεύθερης ενέργειας του υλικού και του υγρού, προκειμένου να υπολογίσουν τη διεπιφανειακή ενέργεια υλικού-υγρού. Ο

Dahal, το 1987 παρατήρησε, σε μια συγκριτική μελέτη, ότι οι δύο προσεγγίσεις δεν διαφέρουν σημαντικά, εντούτοις η προσέγγιση του γεωμετρικού μέσου είναι ευρύτερα χρησιμοποιημένη.

2.1.1.1.2. Προσέγγιση Lifshitz-van der Waals/Acid-Base

Ο van Oss (van Oss et al, 1986; van Oss et al, 1989; van Oss, 2003) πρότεινε την προσέγγιση Lifshitz-van der Waals/Acid-Base της θερμοδυναμικής θεωρίας. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση, η ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης ενός βακτηρίου (B) στην επιφάνεια ενός υλικού (S) μέσα σε υγρό (L), εκφράζεται ως το άθροισμα της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας λόγω αλληλεπιδράσεων Lifshitz-van der Waals (LW) και λόγω αλληλεπιδράσεων οξέος-βάσεως (Acid-Base: AB) σύμφωνα με την εξίσωση

$$\Delta G_{d0}^{adh} = \Delta G_{d0}^{LW} + \Delta G_{d0}^{AB} \quad (2.9)$$

όπου, ΔG_{d0}^{adh} είναι η συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης, ανά μονάδα επιφάνειας, ενός βακτηρίου στην επιφάνεια ενός υλικού μέσα σε υγρό, όταν η απόσταση μεταξύ του βακτηρίου και του υλικού τείνει στο μηδέν $d \rightarrow 0$ (van Oss and Good, 1984), και ΔG_{d0}^{LW} , ΔG_{d0}^{AB} οι συνιστώσες της από τις αλληλεπιδράσεις LW και AB αντίστοιχα.

Όσον αφορά τις LW ή αλλιώς τις *ηλεκτροδυναμικές αλληλεπιδράσεις*, υπάρχουν τρεις τύποι: οι αλληλεπιδράσεις London ή αλλιώς οι αλληλεπιδράσεις «κυμαινόμενων» (fluctuating) διπόλων-διπόλων εξ επαγωγής, οι αλληλεπιδράσεις Keesom ή δίπολων-διπόλων εξ επαγωγής, και οι Debye ή αλλιώς αλληλεπιδράσεις διπόλων-διπόλων. Δεδομένου ότι οι Keesom και οι Debye θεωρούνται αμελητέες στα συμπυκνωμένα μέσα όπως τα υγρά και τα στερεά, οι αλληλεπιδράσεις London είναι οι κυρίαρχες. Εν τούτοις, ο Chaudhury, το 1984, απέδειξε ότι, σύμφωνα με τη θεωρία Lifshitz, και οι τρεις van der Waals (vdW) αλληλεπιδράσεις είναι μη πολικές και ότι όλες εξασθενούν στο ίδιο ποσοστό ως συνάρτηση της απόστασης, για αποστάσεις μικρότερες από <10 nm. Επομένως, ο Chaudhury, το 1984 σε αντίθεση με τον Fowkes (Fowkes, 1962; Fowkes, 1964; Fowkes et al, 1980), απέδειξε ότι, τόσο μακροσκοπικά όσο και μικροσκοπικά, οι αλληλεπιδράσεις LW μπορούν και πρέπει να αντιμετωπίζονται μαζί, ως μη πολικές. Μια

σημαντική διαφορά μεταξύ των μη πολικών και των πολικών συστατικών/συνιστωσών έγινε έτσι σαφής: οι μη πολικές αλληλεπιδράσεις (LW) εκφράζουν μία και μόνη ιδιότητα που εκφράζεται μέσω μίας και μόνης σταθεράς της van der Waals σταθεράς και επομένως η συνιστώσα LW της διεπιφανειακής ενέργειας υλικού-υγρού ακολουθεί τον κανόνα του γεωμετρικού μέσου:

$$\gamma_{SL}^{LW} = \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}} \right)^2 \quad (2.10)$$

ενώ η *πολική συνιστώσα* (AB) της ελεύθερης ενέργειας ενός υλικού ή ενός υγρού περιλαμβάνει δύο μη προσθετικές παραμέτρους. Αυτές είναι η παράμετρος ηλεκτρόνιο-δέκτης/δότης υδρογόνου (πρωτονίου) που συμβολίζεται ως γ^+ (οξύ κατά Lewis) και η παράμετρος ηλεκτρόνιο-δότης/δέκτης-υδρογόνου (πρωτονίου) που συμβολίζεται ως γ^- (βάση κατά Lewis). Επομένως, οι αλληλεπιδράσεις AB κατά Lewis περιλαμβάνουν τις αλληλεπιδράσεις ηλεκτρόνιο-δεκτών/ηλεκτρόνιο-δοτών και ως υποκατηγορία αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου, τις υδροφοβικές και τις αλληλεπιδράσεις ενυδάτωσης. Επιπλέον, οι παράμετροι γ^+ , γ^- είναι μη προσθετικοί και μπορεί να συνδυαστούν μόνο ως εξής:

$$\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} \quad (2.11)$$

Η συνιστώσα AB της διεπιφανειακής ενέργειας SL εκφράζεται ως

$$\Delta G_{SL}^{AB} = -2\left(\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}\right) \quad (2.12)$$

Η εξίσωση 2.1 ισχύει και για τις αλληλεπιδράσεις AB έτσι

$$\Delta G_{SL}^{AB} = \gamma_{SL}^{AB} - \gamma_L^{AB} - \gamma_S^{AB} \Rightarrow \gamma_{SL}^{AB} = \Delta G_{SL}^{AB} + \gamma_L^{AB} + \gamma_S^{AB} \quad (2.13)$$

Επομένως, η συνιστώσα AB της διεπιφανειακής ενέργειας υλικού-υγρού εκφράζεται ως

$$\gamma_{SL}^{AB} = 2\left(\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-} + \sqrt{\gamma_L^+ \gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} - \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+}\right) = 2\left(\sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}\right) \quad (2.14)$$

και η συνολική διεπιφανειακή ενέργεια υλικού-υγρού εκφράζεται ως

$$\gamma_{SL} = \gamma_{SL}^{LW} + \gamma_{SL}^{AB} = \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}\right)^2 + 2\left(\sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}\right) \quad (2.15)$$

Οι διεπιφανειακές ενέργειες βακτηρίου-υλικού (BS) και βακτηρίου-υγρού (BL) μπορούν να υπολογισθούν από εξισώσεις ανάλογες με τις προηγούμενες και αυτές είναι

$$\gamma_{BS} = \gamma_{BS}^{LW} + \gamma_{BS}^{AB} = \left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}}\right)^2 + 2\left(\sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_S^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_S^-}\right) \quad (2.16)$$

$$\gamma_{BL} = \gamma_{BL}^{LW} + \gamma_{BL}^{AB} = \left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}\right)^2 + 2\left(\sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_L^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_L^-}\right) \quad (2.17)$$

Σύμφωνα με την εξίσωση (2.1) και με αντικατάσταση των διεπιφανειακών ενεργειών BS, BL και SL, από τις εξισώσεις (2.15), (2.16) και (2.17), η συνολική ελεύθερη ενέργεια της βακτηριακής προσκόλλησης υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\begin{aligned} \Delta G_{d0}^{adh} &= \Delta G_{d0}^{LW} + \Delta G_{d0}^{AB} = \\ &= \left[\left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}\right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_S^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}}\right)^2 \right] \\ &+ 2 \left[\left(\sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_S^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_S^-}\right) - \left(\sqrt{\gamma_B^+} - \sqrt{\gamma_L^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_B^-} - \sqrt{\gamma_L^-}\right) - \left(\sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+}\right)\left(\sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-}\right) \right] \Rightarrow \\ \Delta G_{d0}^{adh} &= 2 \left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} \gamma_L^{LW} + \sqrt{\gamma_S^{LW}} \gamma_L^{LW} - \sqrt{\gamma_B^{LW}} \gamma_S^{LW} - \gamma_L^{LW} \right) \\ &+ 2 \left[\sqrt{\gamma_L^+} \left(\sqrt{\gamma_B^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-} \right) + \sqrt{\gamma_L^-} \left(\sqrt{\gamma_B^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+} \right) - \sqrt{\gamma_B^+ \gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_B^- \gamma_S^+} \right] \Rightarrow \\ \Delta G_{d0}^{adh} &= 2 \left(\sqrt{\gamma_B^{LW}} - \sqrt{\gamma_L^{LW}} \right) \left(\sqrt{\gamma_L^{LW}} - \sqrt{\gamma_S^{LW}} \right) \\ &+ 2 \left[\sqrt{\gamma_L^+} \left(\sqrt{\gamma_B^-} + \sqrt{\gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_L^-} \right) + \sqrt{\gamma_L^-} \left(\sqrt{\gamma_B^+} + \sqrt{\gamma_S^+} - \sqrt{\gamma_L^+} \right) - \sqrt{\gamma_B^+ \gamma_S^-} - \sqrt{\gamma_B^- \gamma_S^+} \right] \end{aligned} \quad (2.18)$$

2.1.1.2. Θεωρία DLVO

Σύμφωνα με τη θεωρία DLVO (Derjaguin and Landau, 1941; Israelachvili, 1991) η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης, ή η ενέργεια προσκόλλησης, μεταξύ ενός βακτηρίου (B) και υλικού (S) μέσα σε υγρό (L) εκφράζεται ως το άθροισμα των *Lifshitz-van der Waals* (LW) και των *ηλεκτροστατικών ενεργειών αλληλεπίδρασης* (EL) σύμφωνα με

$$U_{BLS}^{DLVO} = U_{BLS}^{LW} + U_{BLS}^{EL} \quad (2.19)$$

όπου U_{BLS}^{DLVO} (J) είναι η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης βακτηρίου-υλικού, U_{BLS}^{LW} η ενέργεια των LW αλληλεπιδράσεων και U_{BLS}^{EL} η ενέργεια των EL αλληλεπιδράσεων.

Οι αλληλεπιδράσεις LW έχουν περιγραφεί εκτενώς στην παράγραφο 2.1.1.1.2. «προσέγγισης Lifshitz-van der Waals/Acid-Base». Η ενέργεια αλληλεπίδρασης LW μεταξύ ενός βακτηρίου και υλικού σε υγρό (αλληλεπιδράσεις σφαίρας-επίπεδης επιφάνειας υλικού) ως συνάρτηση της απόστασης δίνεται από την εξίσωση

$$U_{BLS}^{LW} = \frac{AR}{6d} \quad (2.20)$$

όπου το R είναι η βακτηριακή ακτίνα, d είναι η απόσταση μεταξύ των επιφανειών του βακτηρίου και του υλικού, και A (J) είναι η σταθερά Hamaker, η οποία υπολογίζεται από την εξίσωση

$$A = -12\pi d_0^2 \Delta G_{d0}^{LW} \quad (2.21)$$

Όπου το d_0 ορίζεται συνήθως ως 0.158 nm, και μπορεί να θεωρηθεί ως η απόσταση μεταξύ των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στοιβάδων των βακτηρίων-υλικού (όριο van der Waals - πίο κοντινή προσέγγιση μεταξύ των βακτηρίων και του υλικού) (van Oss and Good, 1984). ΔG_{d0}^{LW} είναι η LW συνιστώσα της συνολικής ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης και αξιολογείται όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1.1.2. «προσέγγισης Lifshitz-van der Waals/Acid-Base».

Οι *αλληλεπιδράσεις LW* είναι οι μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεγάλου εύρους και όπως φαίνεται από την εξίσωση (2.20) είναι ανάλογες της βακτηριακής ακτίνας και εξασθενούν ως συνάρτηση της απόστασης, μέχρι περίπου τα 10 nm. Πέρα από τα 10 nm η εξασθένιση γίνεται ανάλογη του τετραγώνου της απόστασης (Chaudhury, 1984).

Οι *EL αλληλεπιδράσεις* προκύπτουν από την αλληλεπικάλυψη μεταξύ των ηλεκτρικών διπλών στοιβάδων του βακτηρίου και του υλικού μέσα σε υγρό. Η ενέργεια αλληλεπίδρασης EL μεταξύ ενός βακτηρίου και ενός υλικού σε υγρό (αλληλεπιδράσεις σφαίρας-επίπεδης επιφάνειας υλικού) δίνονται από την εξίσωση

$$U_{BLS}^{EL} = \pi \varepsilon R \left[2\psi_B \psi_S \ln \left(\frac{1 + e^{-kd}}{1 - e^{-kd}} \right) + (\psi_B^2 + \psi_S^2) \ln(1 - e^{-2kd}) \right] \quad (2.22)$$

όπου $\varepsilon = 80 \times 8.854 \times 10^{-12} \text{ (C}^2 \text{ J}^{-1} \text{ m}^{-1}\text{)}$ είναι η διηλεκτρική σταθερά του νερού, ψ_B , ψ_S (V) είναι το δυναμικό ζήτα της επιφάνειας των βακτηρίων και του υλικού αντίστοιχα, $k \text{ (m}^{-1}\text{)}$ είναι το αντίστροφο μήκος Debye που υπολογίζεται ως $k = 0.328 \times 10^{10} (I)^{1/2} \text{ (m}^{-1}\text{)}$, όπου I είναι η ιοντική ισχύς του διαλύματος και d είναι η απόσταση μεταξύ του βακτηρίου και της επιφάνειας του υλικού.

Οι αλληλεπιδράσεις EL εξασθενούν με την απόσταση (d) κατά τρόπο εκθετικό, που επηρεάζεται από το d και το πάχος του διπλού στρώματος ($1/k$).

Αντικαθιστώντας τις εξισώσεις (2.20), (2.22) στη (2.19) η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης βακτηρίου-υλικού σύμφωνα με την DLVO δίνεται από την εξίσωση

$$U_{BLS}^{DLVO} = U_{BLS}^{LW} + U_{BLS}^{EL} = \frac{2\pi d_0^2 \Delta G_{d0}^{LW} R}{d} + \pi \varepsilon R \left[2\psi_B \psi_S \ln \left(\frac{1 + e^{-kd}}{1 - e^{-kd}} \right) + (\psi_B^2 + \psi_S^2) \ln(1 - e^{-2kd}) \right] \quad (2.23)$$

Σε πολλές περιπτώσεις είναι χρήσιμο να είναι γνωστή όχι μόνο η ενέργεια αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός βακτηριδίου και της επιφάνειας ενός υλικού αλλά και η δύναμη αλληλεπίδρασης ως συνάρτηση της απόστασης (d). Η συνολική δύναμη αλληλεπίδρασης υπολογίζεται με παραγωγή της ενέργειας αλληλεπίδρασης ως προς την απόσταση (d). Επομένως, με παραγωγή της εξίσωσης (2.23) ως προς την απόσταση (d), η συνολική δύναμη αλληλεπίδρασης δίνεται από την εξίσωση:

$$F(d) = F_{(d)}^{LW} + F_{(d)}^{EL} \Rightarrow F(d) = \frac{2\pi d_0^2 \Delta G_{d0}^{LW} R}{d^2} + 2\pi \varepsilon R k \exp(-kd) \times \frac{2\psi_B \psi_S + (\psi_B^2 + \psi_S^2) \exp(-kd)}{1 - \exp(-2kd)} \quad (2.24)$$

2.1.1.3. Εκτεταμένη Θεωρία DLVO

Σύμφωνα με την εκτεταμένη θεωρία DLVO (van Oss, 1995; van Oss, 2003), η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης, ή η ενέργεια της προσκόλλησης, μεταξύ ενός βακτηρίου (B) και υλικού (S) μέσα σε υγρό (L) εκφράζεται ως το άθροισμα των *Lifshitz-van der Waals* (LW), των *ηλεκτροστατικών* (EL) και των *οξέος-βάσεως* (Acid-Base: AB) ενεργειών αλληλεπίδρασης σύμφωνα με την εξίσωση

$$U_{BLS}^{DLVO} = U_{BLS}^{LW} + U_{BLS}^{EL} + U_{BLS}^{AB} \quad (2.25)$$

Οι ενέργειες αλληλεπίδρασης LW (U_{BLS}^{LW}) και EL (U_{BLS}^{EL}) και ο τρόπος που μπορούν να υπολογιστούν περιγράφησαν στην παράγραφο 2.1.1.2. «Θεωρία DLVO».

Η έννοια των AB αλληλεπιδράσεων και πώς υπολογίζεται η συνιστώσα AB ($\Delta G_{d_0}^{AB}$) της ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης ενός βακτηρίου στην επιφάνεια ενός υλικού μέσα σε υγρό, όταν η απόσταση μεταξύ του βακτηρίου και του υλικού τείνει στο μηδέν $d \rightarrow 0$ (van Oss and Good, 1984) περιγράφονται στην παράγραφο 2.1.1.1.2 «προσέγγισης Lifshitz-van der Waals/Acid-Base».

Η *ενέργεια αλληλεπίδρασης AB* μεταξύ ενός βακτηρίου και ενός υλικού σε υγρό (αλληλεπιδράσεις σφαιράς-επίπεδης επιφάνειας υλικού), ως συνάρτηση της απόστασης (d), δίνεται από την εξίσωση

$$U_{BLS}^{AB} = 2\pi R \lambda \Delta G_{d_0}^{AB} \exp\left(\frac{d_0 - d}{\lambda_1}\right) \quad (2.26)$$

όπου λ_1 είναι το χαρακτηριστικό μήκος εξασθένισης των AB αλληλεπιδράσεων στο νερό ($\lambda_1 \approx 1$ nm). Επομένως, η ενέργεια αλληλεπίδρασης AB εξασθενεί εκθετικά με την απόσταση (d) ως συνάρτηση του χαρακτηριστικού μήκους του νερού λ και είναι ανάλογη της βακτηριακής ακτίνα R . (d_0 είναι η απόσταση βακτηρίου-υλικού κατά την επαφή)

Οι *δυνάμεις AB*, που είναι υπεύθυνες για όλες τις μη-ομοιοπολικές, μη-ηλεκτροστατικές, πολικές αλληλεπιδράσεις που εμφανίζονται στο νερό, υπολογίζονται με παραγωγή της ενέργειας αλληλεπίδρασης AB [εξίσωση (2.26)] ως προς την απόσταση και δίνονται από την εξίσωση

$$F_{(d)}^{AB} = -2\pi R \Delta G_{d_0}^{AB} \exp\left(\frac{d_0 - d}{\lambda_1}\right) \quad (2.27)$$

Στα υδατικά μέσα, οι δυνάμεις AB μπορούν να είναι ελκτικές (υδροφοβική έλξη) ή απωστικές (υδρόφιλες δυνάμεις ή δυνάμεις ενυδάτωσης) ανάλογα με το βαθμό υδροφοβικότητας ή υδροφιλικότητας των συστατικών που εμπλέκονται.

Η *συνολική δύναμη αλληλεπίδρασης* μεταξύ ενός βακτηρίου και ενός υλικού ως συνάρτηση της απόστασης, σύμφωνα με την εκτεταμένη θεωρία DLVO, δίνεται επομένως από την εξίσωση

$$\begin{aligned}
F(d) &= F_{(d)}^{LW} + F_{(d)}^{EL} + F_{(d)}^{AB} \Rightarrow \\
F(d) &= \frac{2\pi d_0^2 \Delta G_{d_0}^{LW} R}{d^2} + \pi \varepsilon R k \left[2\psi_B \psi_S \frac{2}{e^{kd} - e^{-kd}} + (\psi_B^2 + \psi_S^2) \left(1 - \frac{e^{kd} + e^{-kd}}{e^{kd} - e^{-kd}} \right) \right] \\
&\quad - 2\pi R \Delta G_{d_0}^{AB} \exp\left(\frac{d_0 - d}{\lambda_1}\right)
\end{aligned} \quad (2.28)$$

Εάν επιθυμούμε να εξετάσουμε την εξασθένιση όλων των μη-ομοιοπολικών δυνάμεων αλληλεπίδρασης στο νερό, με χρήση της εξίσωσης (2.28), μπορούμε να παρατηρήσουμε ότι κάτω από φυσιολογική ιοντική ισχύ ($I = 0.15M$), οι δυνάμεις EL εξασθενούν πιο απότομα ως συνάρτηση της απόστασης σε σχέση με τις δυνάμεις AB (των οποίων ο ρυθμός εξασθένησης με την απόσταση είναι κατά ένα μεγάλο μέρος ανεξάρτητος από την ιοντική ισχύ). Από την άλλη πλευρά, οι δυνάμεις EL εξασθενούν πιο βαθμιαία με την απόσταση σε σχέση με τις δυνάμεις AB για $I \ll 0.15M$. Είναι επομένως δύσκολο να περιγραφούν γενικοί κανόνες ως προς το ποια από τις δύο αλληλεπίδρασεις οι δυνάμεις είναι περισσότερο ευρέος ή περιορισμένου φάσματος. Όλα εξαρτώνται από τις *in vivo* ή *in vitro* καταστάσεις του υγρού μέσου. Επιπλέον, ενώ οι δυνάμεις AB και EL εξασθενούν εκθετικά ως συνάρτηση της απόστασης (d), οι δυνάμεις ή οι αλληλεπίδρασης LW εξασθενούν αναλογικά με την απόσταση (d), και επομένως αρκετά βαθμιαία.

Εντούτοις, και η DLVO και η εκτεταμένη DLVO θεωρία προβλέπουν ότι υπάρχει ένα «πρωτεύον ελάχιστο» κατά την επαφή βακτηρίου-υλικού (d_0) που αντιστοιχεί στην ισορροπία μεταξύ ελκτικών και απωστικών δυνάμεων μικρού εύρους, ένα «δευτερεύον ελάχιστο» όπου οι μεγάλης απόστασης απωστικές δυνάμεις εξισορροπούν τις μεγάλης απόστασης ελκτικές δυνάμεις και ένα «μέγιστο» που παρεμβάλλεται ανάμεσα στα δύο ελάχιστα και που παρουσιάζει ένα ενεργειακό εμπόδιο αλληλεπίδρασης το οποίο τα βακτηρίδια πρέπει να διασχίσουν προκειμένου να προσκολληθούν (Israelachvili, 1991; Norde and Lyklema, 1989). (Σχήμα 2.1.1.)



Σχήμα 2.1.1. Σχηματική αναπαράσταση δευτερεύοντος και πρωτεύοντος ελαχίστου όπως αυτά προβλέπονται από τις θεωρίες DLVO και εκτεταμένη DLVO.

2.1.1.4. Μετρήσεις

Είναι προφανές από όλα τα προηγούμενα ότι προκειμένου να υπολογισθεί η ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{adh}) ενός βακτηρίου (B) σε μια επιφάνεια υποστρωμάτων (S) σε υγρό (L), σύμφωνα με τη προσέγγιση “Dispersion-Polar”, είναι απαραίτητο να μετρηθούν οι **γωνίες επαφής** θ (deg) δύο υγρών, ενός πολικού και ενός μη πολικού (για παράδειγμα: μεθυλενο-ιωδίδιο: CH_2I_2 ως μη πολικό και νερό ως πολικό), με την επιφάνεια του υλικού και των βακτηριακών κυττάρων αντίστοιχα (Busscher et al, 1984). Κατόπιν, με χρήση της εξίσωσης Young ($\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL}$) για κάθε υγρό και αντικατάσταση των γ_S και γ_{SL} με το άθροισμα της πολικής και μη συνιστώσας τους, η εξίσωση 2.5. γράφεται ως εξής:

$$1 + \cos \theta = 2\sqrt{\gamma_S^d} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^d}}{\gamma_L} \right) + 2\sqrt{\gamma_S^p} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^p}}{\gamma_L} \right) \quad (2.29)$$

Επομένως, οι δύο άγνωστες παράμετροι: γ_S^d , γ_S^p , όπου το S είναι η επιφάνεια του υλικού ή η βακτηριακή επιφάνεια, μπορούν να υπολογισθούν, καθώς για το νερό και

άλλα υγρά τα γ_L , γ_L^d και γ_L^p είναι γνωστά (Busscher et al, 1984; Owens and Wendt, 1969).

Στην περίπτωση της “Lifshitz-van der Waals acid-base” προσέγγισης της θερμοδυναμικής θεωρίας, είναι απαραίτητο να υπολογισθεί η συνολική ελεύθερη ενέργεια της επιφάνειας του υλικού και των βακτηρίων (γ_S, γ_B) καθώς και των συνιστωσών τους LW ($\gamma_S^{LW}, \gamma_B^{LW}$) και AB ($\gamma_S^+, \gamma_S^-, \gamma_B^+, \gamma_B^-$). Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να μετρηθούν οι γωνίες επαφής θ τριών υγρών, δύο πολικών και ενός μη πολικού (για παράδειγμα: μεθυλενο-ιωδίδιο: CH_2I_2 ως μη πολικό και νερό, γλυκερόλη ως πολικά), με την επιφάνεια του υλικού και των βακτηριακών κυττάρων αντίστοιχα (Busscher et al, 1984). Κατόπιν, με χρήση της εξίσωσης Young ($\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL}$) για κάθε υγρό και αντικατάσταση των γ_S και γ_{SL} με το άθροισμα των συνιστωσών τους LW και AB (όπου $\gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-}$) η εξίσωση 2.15 γίνεται

$$(1 + \cos \theta)\gamma_L = 2\left(\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}}\right) + \sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + \sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (2.30)$$

Επομένως, οι τρεις άγνωστες παράμετροι: γ_S^{LW} , γ_S^+ , γ_S^- , όπου το S είναι η επιφάνεια του υλικού ή η βακτηριακή επιφάνεια, δεδομένου ότι για τα υγρά αυτές οι παράμετροι είναι γνωστές, μπορούν να υπολογισθούν (van Oss et al., 1986; van Oss, 1995).

Στο παράρτημα 4 περιγράφεται πώς με **χρήση γωνιομέτρου** μετρούνται οι γωνίες επαφής με τα διάφορα υγρά.

Αυτές οι παράμετροι χρησιμοποιούνται επίσης στην DLVO θεωρία και την εκτεταμένη DLVO για την αξιολόγηση των ενεργειών αλληλεπίδρασης LW, AB ή των δυνάμεων αλληλεπίδρασης αντίστοιχα.

Εντούτοις, για την αξιολόγηση των ηλεκτροστατικών ενεργειών ή των δυνάμεων αλληλεπίδρασης, είναι απαραίτητη η μέτρηση του **δυναμικού ζ (ζήτα)** της επιφάνειας του υλικού και των βακτηριακών κυττάρων (ψ_B, ψ_S) αντίστοιχα.

Για να γίνει κατανοητό τι είναι το δυναμικό ζ πρέπει να ειπωθεί ότι τα κολλοειδή σωματίδια συνήθως αποτελούνται από έναν κρυσταλλικό πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από ένα μονομοριακό φορτισμένο οργανικό στρώμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, γύρω

από τα σωματίδια να συγκεντρώνεται ένα φορτισμένο στρώμα ιόντων το οποίο αποτελείται από δύο μέρη. Το εσωτερικό μέρος που ονομάζεται στρώμα Stern (Stern layer), αποτελείται από ιόντα τα οποία είναι ισχυρά συνδεδεμένα με τα σωματίδια, ενώ το εξωτερικό μέρος δημιουργείται από διάχυση ασθενέστερα συνδεδεμένων ιόντων του διαλύματος. Το δυναμικό στην διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ των δύο στρωμάτων ονομάζεται δυναμικό ζ. Η τιμή του δυναμικού ζ συνδέεται ποσοτικά με το φορτίο στην επιφάνεια των σωματιδίων και υπολογίζεται μέσω ηλεκτροφόρησης. Η μέθοδος της **ηλεκτροφόρησης** στηρίζεται στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις οι οποίες ασκούνται από το πεδίο στα σωματίδια λόγω του φορτίου τους και χρησιμοποιεί σταθερά πεδία. Η κινητικότητα των σωματιδίων μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο μετρείται και άρα το δυναμικό ζ υπολογίζεται με **χρήση της τεχνικής ζ sizer** που περιγράφεται στο παράρτημα 4.

Επομένως, το δυναμικό ζ των βακτηριακών κυττάρων, καθώς και αυτά έχουν διαστάσεις κολλοειδών σωματιδίων, υπολογίζεται με μέτρηση της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας σε διάλυμα, συγκεκριμένης ιοντικής ισχύος και pH, με τη βοήθεια της τεχνικής ζ sizer. Το δυναμικό ζ της επιφάνειας υλικών υπολογίζεται με χρήση διατάξεων ροής υγρών, συγκεκριμένης ιοντικής ισχύος και pH, πάνω στην επιφάνεια του υλικού, σε ηλεκτρικό πεδίο. Η τεχνική αυτή ονομάζεται streaming potential (Walkson et al, 2002).

2.1.1.5. Αλληλεπιδράσεις Εκτεταμένης DLVO μεταξύ Σφαιρών και Αυξημένης Τραχύτητας Επιφανειών

Μία από τις κυριότερες αδυναμίες όλων των κολλοειδών θεωριών είναι η υπόθεση της ομαλής επιφάνειας των υλικών. Αυτή η υπόθεση τις καθιστά λίγο έως πολύ μη εφαρμόσιμες για τις τραχιές επιφάνειες. Για αυτόν το λόγο, οι Kamuzewitz και Possart, το 2003, πρότειναν τη διόρθωση των μετρήσεων γωνιών επαφής για τις τραχιές επιφάνειες. Επιπλέον, οι Hoek and Agarwal, 2006, εκτέλεσαν τις προσομοιώσεις προκειμένου να μελετήσουν τις διεπιφανειακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των σφαιρικών σωματιδίων και τραχιών επιφανειών, μέσω της θεωρίας της εκτεταμένης DLVO. Από τη μελέτη τους προέκυψε ότι το μέγεθος της ενέργειας αλληλεπίδρασης, όπως αυτή υπολογίζεται από την θεωρία της εκτεταμένης DLVO είναι – κατά μέσο όρο- μειωμένο από την τραχύτητα της επιφάνειας, επειδή η απόσταση σωματιδίου- επιφάνειας υλικού

είναι αποτελεσματικά μεγαλύτερη. Ως εκ τούτου, οι τραχιές επιφάνειες γίνονται ευνοϊκότερες για την εναπόθεση σωματιδίων, καθώς οι ελκυστικές van der Waals αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρότερες στις μεγάλες αποστάσεις από είτε τις οξέως-βάσεως είτε τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Επομένως, ένα πιο γενικό μοντέλο που θα περιέγραφε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ τραχιών σωματιδίων και τραχιών επιφανειών θα μπορούσε να ενισχύσει την ακρίβεια και την αξιοπιστία των υπολογισμών που σχετίζονται με τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης, καθώς όχι μόνο οι επιφάνειες των υλικών αλλά και των βακτηρίων έχουν κάποια τραχύτητα.

2.1.2. Προσέγγιση Βακτηριακής Προσκόλλησης μέσω Μακρομοριακών Δεσμών

Ένα ακόμα μειονέκτημα όλων των κολλοειδών θεωριών είναι η υπόθεση των μοριακά λείων βακτηριακών επιφανειών, που καθιστούν τις μη εφαρμόσιμες για τις διεπιφάνειες που περιέχουν μακρομόρια σημαντικού μεγέθους, τα οποία έχουν επιπτώσεις στην απόσταση μεταξύ βακτηρίων-επιφάνειας υλικού και το ακριβές είδος της αλληλεπίδρασης.

Η δημιουργία «γεφυρώματος» μεταξύ πολυμερικών δομών των βακτηριακών κυττάρων, όπως είναι οι προσκολλητίνες, και της επιφάνειας του υλικού, υπονοεί σταθερότερη βακτηριακή προσκόλληση.

Ο *S. epidermidis*, για παράδειγμα, θεωρείται ότι επιτυγχάνει την ειδική προσκόλληση του σε επιφάνειες καθετήρων μέσω μίας πολυσακχαριδικής προσκολλητίνης (PS/A: Polysaccharide-adhesin), πρωτεϊνών επιφανείας (SSP-1, SSP-2), της αυτολυσίνης AtlE και τειχοϊκών οξέων, ενώ τα κύτταρα αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μέσω της PIA (Tojo et al., 1988; O’Gara and Humphreys, 2001; Gotz, 2002; Mack, 1999).

Όλες αυτές οι προσκολλητίνες και πρωτεΐνες λοιπόν συμβάλλουν τόσο στην προσκόλληση όσο και στην απόσταση και το είδος των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικού (Mack, 1999; O’Toole et al., 2000; O’Gara και Humphreys, 2001; Gotz, 2002).

Σε αυτή την κατεύθυνση ο Dickinson, το 1997, μελέτησε την ενέργεια της διεπιφάνειας μεταξύ σωματιδίου (βακτηρίου) - υλικού παρουσία μακρομοριακών

δεσμών. Πρότεινε ότι η ενέργεια αλληλεπίδρασης, ως συνάρτηση της απόστασης, για την πρόβλεψη της βακτηριακής προσκόλλησης στην οποία μεσολαβούν μακρομοριακοί δεσμοί, μπορεί να θεωρηθεί ως το άθροισμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης λόγω φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων (κολλοειδούς τύπου) (U_d) και της ενέργειας των n δεσμών.

Επομένως, η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης (U), όταν N μακρομόρια είναι διαθέσιμα για σχηματισμό δεσμών στη διεπιφάνεια βακτηρίου-υλικού, θεωρείται ότι εξαρτάται από την απόσταση (d) βακτηρίου-υλικού και από τον αριθμό των δεσμών (n) σύμφωνα με τη σχέση

$$U(n, d) = U(d) + n \in(d) \quad (2.31)$$

όπου $\in(d)$ είναι η ενέργεια οποιουδήποτε ενιαίου δεσμού που εξαρτάται από την απόσταση (d) λόγω του τεντώματος ή/και της συμπίεσης του δεσμού μακριά από κάποια ελάχιστη ενεργειακή κατάσταση. Γενικά, το $\in(d)$ εξαρτάται από τις ιδιότητες του συγκεκριμένου μακρομοριακού δεσμού και πρέπει να προσδιορίζεται από τη θεωρία ή το πείραμα.

Ο Dickinson υιοθέτησε την υπόθεση των Bell, 1978 και Dembo et al., 1988, που λέει ότι οι δεσμοί συμπεριφέρονται ως ιδανικά ελατήρια με ενέργεια που αυξάνεται παραβολικά καθώς ο δεσμός συμπιέζεται ή τεντώνεται μακριά από το ελάχιστο ενεργειακό μήκος (Z_0). Με βάση αυτήν την υπόθεση, το $\in(d)$ έχει τη μορφή

$$\in(d) = \in_0 + \frac{\sigma}{2}(d - Z_0)^2 \quad (2.32)$$

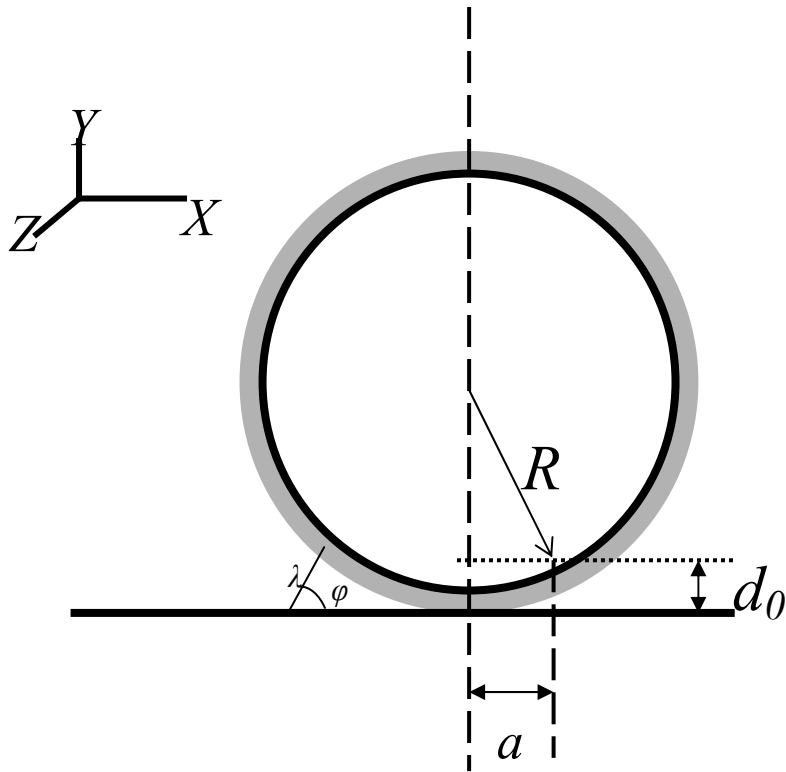
όπου Z_0 είναι το κανονικό-ελάχιστο ενεργειακό μήκος των δεσμών, $\in_0 = \in(Z_0)$ και σ (J/m^2) είναι η ακαμψία των δεσμών. Εάν η ενέργεια των δεσμών είναι υψηλή η συγγένεια είναι χαμηλή και η βακτηριακή προσκόλληση δεν είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκή, ενώ οι δεσμοί με τη χαμηλότερη ενέργεια χρησιμεύουν προκειμένου να μειωθεί το ενεργειακό εμπόδιο κατά την προσκόλληση. Όπως και στην περίπτωση των θεωριών DLVO και εκτεταμένης DLVO, υπάρχουν δύο ελάχιστα: ένα «πρωτεύον ελάχιστο» με $n > 0$, οπότε τότε πρόκειται για προσκολλημένο βακτήριο με πολλαπλούς δεσμούς, και ένα «δευτερεύον ελάχιστο» στην υψηλότερη απόσταση χωρισμού με $n = 0$, το οποίο είναι ουσιαστικά ίδιο με το ελάχιστο της DLVO ή της εκτεταμένης DLVO θεωρίας.

Επομένως, ο Dickinson, το 1997, πρότεινε ότι οι ιδιότητες των μακρομοριακών δεσμών στη διεπιφάνεια βακτηρίου-υλικού έχουν σημαντικές επιπτώσεις στην προσκόλληση των σωματιδίων/βακτηρίων στην επιφάνεια του υλικού.

Με αυτή του τη θεωρία επέκτεινε τις προηγούμενες προσπάθειες μοντελοποίησης των Cozens-Roberts et al., 1990 για προσκόλληση κυττάρων μέσω δεσμών υποδοχέα-προσδέτη, καθώς το δικό του μοντέλο προβλέπει την εξάρτηση της κινητικής της δημιουργίας μακρομοριακών δεσμών από την απόσταση βακτηρίου-υλικού, αλλά και από το ρόλο των κολλοειδών (φυσικοχημικών) δυνάμεων. Κατά συνέπεια, η μετάβαση στην κατάσταση προσκόλλησης καθορίζεται από το ύψος του ενεργειακού εμποδίου μεταξύ προσκολλημένης και ελεύθερης κατάστασης, και αυτό το ύψος καθορίζεται από τον αριθμό, τη συγγένεια, και την ακαμψία των δεσμών, καθώς επίσης και το είδος των κολλοειδών δυνάμεων.

2.1.2.1 Δύναμη Προσκόλλησης

Ξέροντας την ακτίνα της επιφάνειας επαφής ($a = \sqrt{2d_0R}$) μεταξύ του μορίου (βακτηρίου) και της επιφάνειας του υλικού (σχήμα 2.1.2), η δύναμη προσκόλλησης και η ροπή, όταν μόνο οι μακρομοριακοί δεσμοί λαμβάνονται υπόψη, υπολογίζονται ακολουθώντας την υπόθεση των Hammer και Lauffenburger, 1987, Kuo και Lauffenburger, 1993, Kuo et al., 1997: ότι η πυκνότητα των δεσμών (δηλ. η συγκέντρωση ανά μονάδα περιοχής) είναι ομοιόμορφη στην επιφάνεια επαφής και ότι οι δεσμοί μπορούν να μοντελοποιηθούν ως ελατήρια του Hooke που παραμορφώνονται εξίσου. Η κρισιμότερη υπόθεση είναι ότι οι δεσμοί παραμορφώνονται εξίσου. Αυτό είναι σαφώς μια υπερεκτίμηση αλλά έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη (Kuo και Lauffenburger, 1997, Kuo et al., 1993).



Σχήμα 2.1.2 Σχηματικό διάγραμμα (εκτός κλίμακας) ενός βακτηρίου σε επαφή με την επίπεδη επιφάνεια του υλικού. Τα R και a είναι οι ακτίνες του βακτηρίου και της επιφάνειας επαφής αντίστοιχα, d_0 είναι η απόσταση βακτηρίου-υποστρώματος κατά την επαφή. φ η γωνία μεταξύ των δεσμών και του υποστρώματος, λ το μήκος των μακρομοριακών δεσμών. (Τροποποιημένο από Kuo και Lauffenburger, 1993; Chang και Hammer, 1996).

Υποθέτοντας ότι οι μακρομοριακοί δεσμοί είναι παράλληλοι δεδομένου ότι η ακτίνα της επιφάνειας επαφής είναι μικρή έναντι της ακτίνας των βακτηρίων, η δύναμη προσκόλλησης (F_B) που οφείλεται στους μακρομοριακούς δεσμούς μπορεί να γραφτεί ως

$$F_B = -(\pi a^2 n \sigma \lambda)(\cos \varphi X + \sin \varphi Y) \quad (2.33)$$

Όπου λ είναι η επιμήκυνση του ελατηρίου και το φ καθορίζει την κατεύθυνση των δεσμών.

Σύμφωνα με Dickinson, 1997, λοιπόν η συνολική δύναμη προσκόλλησης (F_t) είναι το άθροισμα της δύναμης λόγω κολλοειδών (φυσικοχημικών) αλληλεπιδράσεων (F_d), που δίνεται από τις εξισώσεις (2.24) ή (2.28), ανάλογα με την κολλοειδή θεωρία που χρησιμοποιείται, και της δύναμης λόγω των μακρομοριακών δεσμών (F_B) που δίνεται από την εξίσωση (2.33).

$$F_t = F_d + F_B \quad (X, Y \text{ διευθύνσεις}) \quad (2.34)$$

Επιπλέον, η ροπή στην μπροστινή άκρη της επιφάνειας επαφής λόγω των μακρομοριακών δεσμών (F_{TB}) είναι

$$F_{TB} = [F_B \cdot a] \quad (2.35)$$

Οι φυσικοχημικές δυνάμεις θεωρούνται ως συμμετρικές και επομένως αυτές δεν ασκούν ροπή στο μόριο.

2.2. Τεχνικές που Χρησιμοποιούνται για τον Υπολογισμό των Αλληλεπιδράσεων Βακτηρίων-Υλικών

Δύο κατηγορίες τεχνικών που χρησιμοποιούνται στον υπολογισμό της βακτηριακής δύναμης προσκόλλησης και των αλληλεπιδράσεων έχουν προταθεί: εκείνες που χρησιμοποιούν ροή για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης ή ενάντια σε προσκολλημένα βακτήρια και εκείνες που μελετούν μεμονωμένα βακτήρια (μικροσκόπιο ατομικής δύναμης). Στο σημείο αυτό γίνεται μία σύντομη ανασκόπηση.

2.2.1. Στατικές Δοκιμές

Είναι απλά, ανέξοδα, άμεσα συστήματα για να μελετήσουν τη βακτηριακή προσκόλληση σε διαφορετικές επιφάνειες. Η αρχή είναι η ακόλουθη: αρχικά προετοιμάζεται η επιφάνεια και επωάζεται με ένα εναιώρημα βακτηρίων για μια καθορισμένη χρονική περίοδο. Κατόπιν, τα μη-προσκολλημένα βακτήρια αφαιρούνται με ξέπλυμα και μετρούνται τα υπόλοιπα (προσκολλημένα) βακτήρια στην επιφάνεια. Τα προσκολλημένα βακτήρια και η βιομεμβράνη (biofilm) μπορούν να εξεταστούν με διάφορες μεθόδους, οι οποίες περιγράφησαν στο κεφάλαιο 1, υποκεφάλαιο 1.4. (An και Friedman, 1997).

Το κύριο μειονέκτημα της στατικών πειραμάτων είναι ότι είναι ένα ποιοτικό, ή ημιποσοτικό στην καλύτερη περίπτωση, τεστ, και ότι δίνει το γενικό αριθμό βακτηρίων που έχουν προσκολληθεί.

Για το λόγο αυτό, αλλά και επειδή η βακτηριακή προσκόλληση σε βιοϋλικά που βρίσκονται στο ανθρώπινο σώμα, λαμβάνει χώρα κάτω από δυναμικές συνθήκες, και συνήθως συνθήκες ροής, έχουν προταθεί διάφορες διατάξεις που επιτρέπουν τη μελέτη της επίδρασης του ρυθμού διάτμησης στη βακτηριακή προσκόλληση. Στις διατάξεις αυτές, τα προσκολλημένα βακτήρια και το biofilm μπορούν να εξεταστούν ή σε πραγματικό χρόνο με χρήση μικροσκοπίου ή μετά το πέρας του πειράματος και με τις μεθόδους που περιγράφησαν για τα στατικά πειράματα (υποκεφάλαιο 1.4.).

Οι βασικές έννοιες της ροής περιγράφονται στο Παράρτημα 1. Πρέπει εδώ να ειπωθεί ότι οι υποθέσεις που χρησιμοποιούνται είναι ότι το εναιώρημα των βακτηρίων είναι νευτώνικό και μη συμπιεστό ρευστό.

Οι διατάξεις που έχουν προταθεί για το σχηματισμό ροής είναι οι ακόλουθες:

2.2.2. Αίθουσες (Κανάλι) Ροής Παράλληλων-Πλακών (Parallel-Plate Flow Chambers)

Η διαμόρφωση ροής παράλληλων-πλακών είναι πολύ κοινή, δεδομένου ότι είναι απλή να κατασκευαστεί και η γενική ροή μέσα στην αίθουσα (χωρίο) μπορεί να αναλυθεί από μαθηματική άποψη σχετικά εύκολα. Στην συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη παραλλαγή που μια αντλία παρέχει μια σταθερή ροή, το ρευστό εισρέει από τη μια πλευρά και εκρέει από τη αντίθετη πλευρά ενός ορθογώνιου χωρίου (Bruinsma et al., 2001 Bakker et al., 2003). Η ανώτερη πλάκα είναι συνήθως Plexiglas ή γυαλί ενώ το κατω μέρος είναι το προς εξέταση υλικό (διαφανές ή μη) στο οποίο τα βακτήρια έχουν εναποτεθεί για έναν προκαθορισμένο χρόνο. Η ροή του ρευστού δημιουργεί μια **διατμητική τάση** στο προς εξέταση υλικό (κάτω πλάκα), η οποία υπολογίζεται από την σχέση:

$$\tau_w = \Delta P h/2L \quad (2.36)$$

όπου:

ΔP είναι η πτώση πίεσης (εξόδου - εισόδου), $\Delta P=(12L/h^3W)\mu Q$,

h είναι το ύψος,

L είναι το μήκος

και

W είναι το πλάτος της χωρίου,

μ είναι το ιξώδες του ρευστού και

Q είναι η ογκομετρική παροχή, δηλαδή ο συνολικός όγκος του ρευστού που ρέει ανά μονάδα χρόνου.

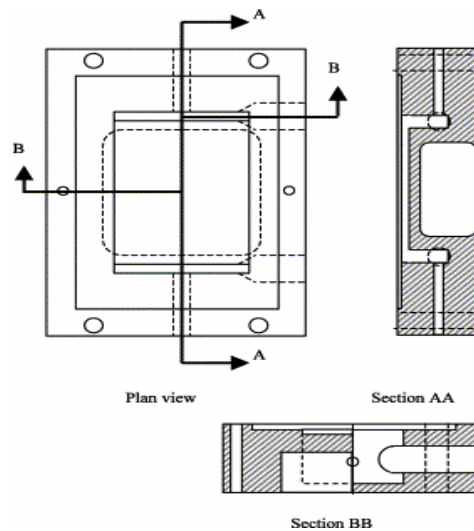
Η υπόθεση είναι ότι η διατμητική τάση είναι περίπου ίση με την τάση που ασκείται στα βακτήρια, δεδομένου ότι το ύψος βακτηρίων είναι πολλές τάξεις μεγέθους μικρότερο από το ύψος του χωρίου.

Επιπρόσθετα, ο *ρυθμός διάτμησης* στην επιφάνεια δίνεται από τη σχέση

$$S = \frac{6Q}{Wh^2} \quad (2.37)$$

Όπου Q είναι η ογκομετρική παροχή, h είναι το ύψος, W είναι το πλάτος της αίθουσας

Μια χαρακτηριστική σχηματική αναπαράσταση μιας τέτοιας αίθουσας παρουσιάζεται στο σχήμα 2.2.1.



Σχήμα 2.2.1. Διάγραμμα ενός χωρίου ροής παράλληλων-πλακών (Missirlis και Spiliotis, 2002)

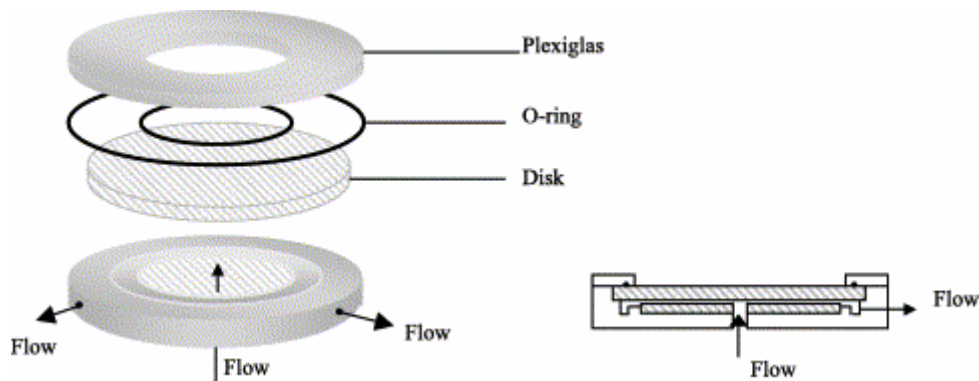
2.2.3. Αίθουσα Ακτινικής Ροής (Radial Flow Chamber, RFC)

Μια άλλη διαμόρφωση των αιθουσών είναι αυτή της αίθουσας (χωρίου) ακτινικής ροής (RFC), (σχήμα 2.2.2.) (Dickinson και Cooper, 1995). Εν συντομία, το RFC αποτελείται από δύο επίπεδους δίσκους που χωρίζονται από ένα λεπτό χάσμα h. Για

ένα δεδομένο ογκομετρικό ρυθμό ροής (παροχή) (Q), ο *ρυθμός διάτμησης* στην επιφάνεια (S) είναι αντιστρόφως ανάλογος προς την ακτινική απόσταση (r) από την είσοδο της ροής και υπολογίζεται από το πλάτος του χάσματος (h) χρησιμοποιώντας τη σχέση:

$$S = 3Q/\pi r h^2 \quad (2.38)$$

Το S και το r χρησιμοποιούνται εναλλακτικά από εδώ και στο εξής, λαμβάνοντας υπόψη την εξίσωση (2.38) και ότι τα h και Q είναι γνωστά. Ένα τέτοιο σχέδιο ροής παρέχει ένα δυναμικό ρυθμό διάτμησης που σταδιακά ελαττώνεται στις εξωτερικές άκρες των δίσκων.



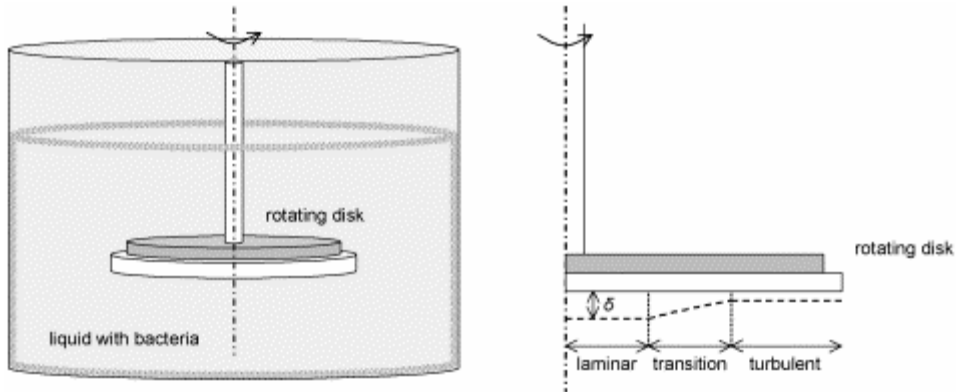
Σχήμα 2.2.2.. Διάγραμμα ενός χωρίου ακτινικής ροής (Dickinson et al., 1997)

2.2.4. Περιστρεφόμενος Δίσκος

Έχει χρησιμοποιηθεί επίσης ο περιστρεφόμενος δίσκος (σχήμα 2.2.3.), όπου στο συνοριακό υδροδυναμικό, η ακτινική και αξονική ταχύτητα είναι μεγαλύτερη από το μηδέν (DeJong et al., 2002). Έξω από το συνοριακό υδροδυναμικό στρώμα, υπάρχει μόνο αξονική ροή. Κατά μήκος της επιφάνειας, τρεις περιοχές μπορούν να διακριθούν:

μια περιοχή γραμμικής ροής, μια περιοχή μεταβατικής ροής και μια περιοχή τυρβώδους ροής.

Για τον περιστρεφόμενο δίσκο που χρησιμοποιείται στην γραμμική ροή, η διατμητική τάση ποικίλλει μεταξύ 3.5 και 13.1 N/m² και στην τυρβώδη ροή η διατμητική τάση είναι μεταξύ 694 και 1124 N/m².



Σχήμα 2.2.3. Περιστρεφόμενος δίσκος (DeJong et al., 2002)

2.2.5. Υδροδυναμικές Δυνάμεις

Στο σημείο αυτό περιγράφονται οι δυνάμεις που ασκούνται λόγω ροής (υδροδυναμικές δυνάμεις) στα προσκολλημένα ή πολύ κοντά στην επιφάνεια του υλικού βακτήρια.

Το σχήμα 2.2.4. παρουσιάζει μια ροή με διάτμηση που εφαρμόζεται σε ένα προσκολλημένο σφαιρικό σωματίδιο/βακτήριο. Εξαιτίας της ροής, δημιουργείται μια υδροδυναμική δύναμη κατά την κατεύθυνση της ροής (hydrodynamic drag force: F_D) που ενεργεί στο βακτήριο και τείνει να το κινήσει στην κατεύθυνση της ροής (κατεύθυνση X).

Σύμφωνα με Goldman et al., 1967, η *υδροδυναμική δύναμη κατά την κατεύθυνση της ροής* ή αλλιώς η *οπισθέλκουσα* δίνεται από την εξίσωση

$$F_D = 1.7 \times 6\pi\mu R V_y \quad (2.39)$$

όπου μ είναι το δυναμικό ιξώδες, R είναι η ακτίνα του σωματιδίου - βακτηρίου και V_y είναι η ταχύτητα του ρευστού, που στο κέντρο του βακτηρίου ($V_y = V_R$) δίνεται από την εξίσωση

$$V_R = RS \quad (2.40)$$

όπου το S είναι ο ρυθμός διάτμησης που υπολογίζεται από τις εξισώσεις (2.37) ή (2.38), ανάλογα με τη διάταξη της αίθουσας ροής (chamber).

Επομένως, η υδροδυναμική οπισθέλκουσα δύναμη δίνεται από την εξίσωση

$$F_D = 32.06\mu R^2 S \quad (2.41)$$

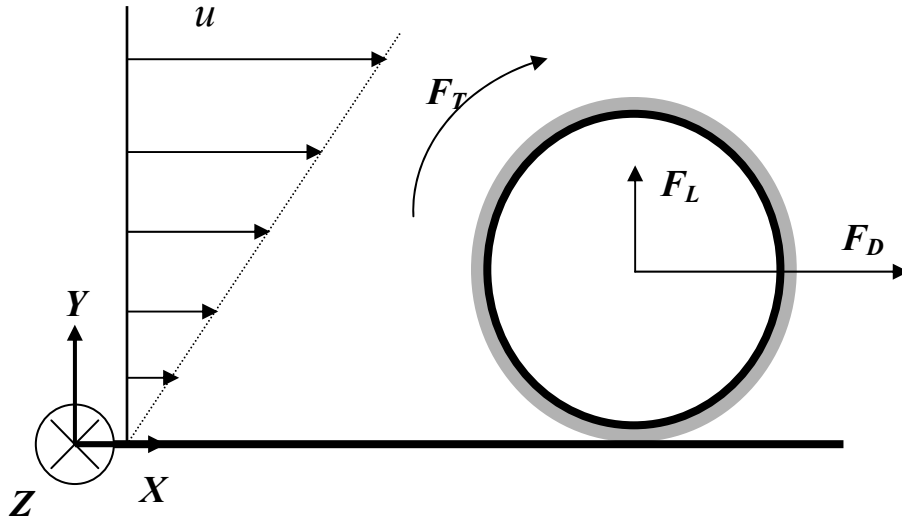
Η **υδροδυναμική ροπή** (hydrodynamic torque: F_T) που ενεργεί επάνω στο κέντρο του βακτηρίου (κατεύθυνση Z) σύμφωνα με τον Goldman et al., 1967, δίνεται από την εξίσωση

$$F_T = 11.86R^3 \mu S = 0.369RF_D \quad (2.42)$$

Η **υδροδυναμική δύναμη άντωσης** (hydrodynamic lifting force: F_L) ενεργεί κανονικά και σε κατεύθυνση απομάκρυνσης από την επιφάνεια του υποστρώματος-υλικού (κατεύθυνση Y , κάθετα στο υλικό) και μπορεί να υπολογιστεί από την εξίσωση

$$F_L = 81.2R^3 \mu \nu^{-1/2} S^{3/2} \quad (2.43)$$

όπου ν είναι το κινηματικό ιξώδες.



Σχήμα 2.2.4. Καθορισμός των υδροδυναμικών δυνάμεων που ασκούνται σε ένα βακτήριο προσκολλημένο στην επίπεδη επιφάνεια: F_D : οπισθέλκουσα (Drag force), F_T : ροπή (Torque) and F_L : άντωση (Lift force) (Τροποποιημένο από Chang και Hammer, 1996).

2.2.6. Ισορροπία των Δυνάμεων και των Ροπών

Γράφοντας τις εξισώσεις της μηχανικής ισορροπίας ενός σωματιδίου (βακτηρίου) που είναι προσκολλημένο σε μια επιφάνεια και που εκτίθεται σε διάτμηση καταλήγουμε:

1. Ισορροπία δυνάμεων στον άξονα X

$$(F_t + F_D)_X = 0 \quad (2.44)$$

όπου τα F_t, F_D (συνολική δύναμη προσκόλλησης και οπισθέλκουσα λόγω ροής αντίστοιχα) υπολογίζονται από τις εξισώσεις (2.34) και (2.39) αντίστοιχα.

2. Ισορροπία ροπών στο μπροστινό τμήμα της επιφάνειας επαφής στον άξονα Z

$$(F_{TB} + F_T) + RF_D = 0 \quad (2.45)$$

όπου τα F_{TB}, F_T, F_D (ροπή λόγω των μακρομοριακών δεσμών, υδροδυναμική ροπή και οπισθέλκουσα αντίστοιχα) υπολογίζονται από τις εξισώσεις (2.35), (2.42) και (2.39) αντίστοιχα.

3. Ισορροπία δυνάμεων στον άξονα Y

$$(F_t + F_L)_Y = 0 \quad (2.46)$$

όπου τα F_t, F_L (συνολική δύναμη προσκόλλησης και άντωση λόγω ροής αντίστοιχα) υπολογίζονται από τις εξισώσεις (2.34) και (2.43) αντίστοιχα.

Επομένως, με τη χρήση διάτμησης γνωστής ογκομετρικής παροχής (Q) και έτσι γνωστού ρυθμού διάτμησης (S) ή τάσης ($\tau = \mu S$), και με την επίλυση των εξισώσεων (2.44), (2.45) και (2.46) μπορεί να υπολογισθεί η δύναμη προσκόλλησης, η μέγιστη επιμήκυνση των δεσμών λ_{max} επάνω από την οποία οι δεσμοί σπάζουν και συμβαίνει η αποκόλληση βακτηρίου, ή την ακαμψία του δεσμού (σ), ή τον αριθμό δεσμών (n), ή τη συγγένεια, ανάλογα με το σύστημα των γνωστών και άγνωστων παραμέτρων.

Επιπλέον, μπορεί να αξιολογηθεί η δυνατότητα εφαρμογής και η προβλεψιμότητα της θεωρητικής προσέγγισης που χρησιμοποιείται για να εξηγήσει τα πειραματικά αποτελέσματα.

Σύμφωνα με Chang και Hammer, 1996, το μέγεθος της δύναμης στην οποία ένα κύτταρο υποχωρεί αναφέρεται ως δύναμη της προσκόλλησης, εντούτοις ο χαρακτήρας ή η κατεύθυνση της δύναμης, που εξαρτάται από την πειραματική διάταξη της προσκόλλησης, μπορεί να έχει επιπτώσεις στο αποτέλεσμα, ακόμα κι αν δυνάμεις ακριβώς του ίδιου μεγέθους εφαρμόζονται στις διαφορετικές διατάξεις.

Σύμφωνα με τις προσομοιώσεις τους, 20 φορές μεγαλύτερη δύναμη απαιτείται για να αποκολληθεί ένα σωματίδιο εάν εφαρμόζεται άντωση (Lift) και όχι οπισθέλκουσα (Drag) δύναμη. Στις υψηλές πυκνότητες δεσμών οι διατμητικές δυνάμεις μπορούν να είναι τουλάχιστον 56 φορές πιο αποτελεσματικές από την άντωση στην αποκόλληση κυττάρων από επιφάνειες υλικών. Οι υδροδυναμικές δυνάμεις (οπισθέλκουσα: drag,

άντωση: lift και ροπή: torque) μπορούν να είναι πίο διασπαστικές από την οπισθέλκουσα του ίδιου μεγέθους, λόγω της συνδυαζόμενης ροπής.

Επομένως, η οπισθέλκουσα είναι η πιο αποτελεσματική επειδή οι δυνάμεις που ασκούνται εφαπτομενικά εστιάζονται στους δεσμούς στην πίσω άκρη της επιφάνειας επαφής και επειδή η αναλογία του μήκους δεσμών ως προς την ακτίνα των βακτηρίων είναι μικρή, οδηγώντας έτσι σε μεγάλες αξονικές εκτάσεις δεσμών και άρα σε αποκόλληση.

Εντούτοις, με τη χρήση διάτμησης σε βακτήρια προσκολλημένα σε επιφάνειες, ή κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης, το σημαντικότερο μειονέκτημα είναι ότι η μετρούμενη δύναμη προσκόλλησης είναι συνολική, αφορά δηλαδή πληθυσμό βακτηρίων και άρα πιθανολογική. Από την άποψη αυτή λοιπόν έχει αρκετούς περιορισμούς. Για το λόγο αυτό έχει αρχίσει να γίνεται χρήση τεχνικών που μελετούν μεμονωμένα βακτήρια, όπως το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης και περιγράφεται συνοπτικά.

2.2.7. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM)

Το ατομικό μικροσκόπιο δύναμης (AFM) έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο στη βιολογία και τη μικροβιολογία (Dufrene, 2001; 2002). Εκτός από το γεγονός ότι το AFM έχει αποδειχθεί χρήσιμο στην απεικόνιση της μορφολογίας των μεμονωμένων βακτηριακών κυττάρων και του βακτηριακού biofilm που είναι προσκολλημένα σε στερεές επιφάνειες-υλικά, τόσο σε ξηρό όσο και σε ενυδατωμένο περιβάλλον (Robichon et al., 1999), χρησιμοποιείται ολοένα και περισσότερο για μετρήσεις δυνάμεων αλληλεπίδρασης βακτηρίων-υλικών (Boyd et al., 2002; Beech et al., 2002; Lower et al., 2000; Afrin et al., 2004; Gaboriand και Dufrene, 2006) όπως τις van der Waals και τις ηλεκτροστατικές, αλλά και για την εξέταση των τοπικών μηχανικών ιδιοτήτων της επιφάνειας στρωμάτων βακτηρίων ή του μεμονωμένου βακτηρίου (Gaboriand και Dufrene, 2006).

Για τη μελέτη των δυνάμεων που συμμετέχουν στη βακτηριακή προσκόλληση, διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις που χρησιμοποιούν το AFM έχουν προταθεί. Οι Fang et al., 2000, μέτρησαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ακίδας του AFM (νιτρίδιο του πυριτίου) και στρωμάτων βακτηρίων (*sulfate-reducing bacteria*) που είχαν

προσκολληθεί σε μίκα, στον αέρα. Οι Razatos et al., 1998, μέτρησαν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ της ακίδας του AFM (νιτρίδιο του πυριτίου) στην οποία είχαν προσκολληθεί κύτταρα *E. coli* (μέσω πολυαιθύλενο ιμίνης: polyethyleneimine και γλουταραλδεΐδης) και στερεών υποστρωμάτων (γυαλί), σε υγρό. Οι Abu-Lail και Camesano, 2006 μέτρησαν τη δύναμη αλληλεπίδρασης μεταξύ *E. coli* και της ακίδας του AFM και την επιμέρησαν σε:

μη συγκεκριμένη: κολλοειδούς τύπου μεγάλου εύρους και συγκεκριμένη: περιορισμένου εύρους όπως δεσμοί υδρογόνου.

Εντούτοις, οι Vadillo-Rodriguez et al., 2004 έδειξαν ότι ο τρόπος που τα βακτήρια είναι ακινητοποιημένα σε ένα υπόστρωμα ή την ακίδα του (μηχανική παγίδευση, φυσική προσρόφηση σε θετικά φορτισμένα υποστρώματα, σταθεροποίηση με γλουταραλδεΐδη, χημική τροποποίηση) επηρεάζει τις μετρούμενες δυνάμεις αλληλεπίδρασης, δεδομένου ότι η φυσική προσρόφηση και η σταθεροποίηση (χημική τροποποίηση) μπορούν να προωθήσουν τις δομικές αναδιοργανώσεις και τις φυσικοχημικές αλλαγές στις δομές του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου.

Κεφάλαιο 3

Υλικά και Μέθοδοι

3 Υλικά και Μέθοδοι

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται τα υλικά, τα βακτήρια και οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για τον χαρακτηρισμό της επιφάνειας υλικών και βακτηρίων, όσο και για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης.

3.1. Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για τη μελέτη της προσκόλλησης των βακτηρίων στην επιφάνειά τους χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

3.1.1. Πολυ βίνυλο χλωρίδιο (Polyvinyl Chloride: PVC) και Επιφανειακά Τροποποιημένο PVC με Τεχνικές Πλάσματος

3.1.2. Πολυτερεφθαλικός αιθυλενεστέρας (Polyethylene Terephthalate: PET) και Επιφανειακά Τροποποιημένο PET με Τεχνικές Πλάσματος

3.1.3. Αυτο-οργανούμενα Μονοστρωματικά Συστήματα (Self Assembled Monolayers: SAMs)

Η περιγραφή της προετοιμασίας των δειγμάτων περιγράφεται στα κεφάλαια 4, 5 και 6 αντίστοιχα.

3.2. Χαρακτηρισμός Υλικών

3.2.1. Μελέτη της Αέριας Φάσης του Πλάσματος και της Αλληλεπίδρασής της με την Επιφάνεια του Πολυμερούς

3.2.1.1. Ηλεκτρικές Μετρήσεις

Μετρήσεις ρεύματος και τάσης διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της τροποποίησης των πολυμερών επιφανειών προκειμένου να εξασφαλιστεί σταθερή κατανάλωση ισχύος για όλα τα δείγματα (Παράρτημα 2).

3.2.1.2. Οπτικές Μετρήσεις

Οπτικές μετρήσεις διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της τροποποίησης των πολυμερών επιφανειών PET, μέσω Χωρικά Διακεκριμένης Φασματοσκοπίας εκπομπής, προκειμένου να καταγραφεί η παραγωγή ατόμων και μετασταθών τα οποία συμβάλλουν στην επιφανειακή τροποποίηση του PET (Παράρτημα 2).

3.2.1.2. Ανακλαστική Συμβολομετρία Laser

Η Ανακλαστική Συμβολομετρία Laser χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση του ρυθμού εγχάραξης ή εναπόθεσης, κατά τη διάρκεια της τροποποίησης των πολυμερών επιφανειών με τεχνική Πλάσματος (Παράρτημα 2).

3.2.2. Μελέτη της Τοπογραφίας και της Τραχύτητας των Υλικών-Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης

Η τοπογραφία των πολυμερών επιφανειών PVC και PET, των τροποποιημένων με τεχνική πλάσματος επιφανειών PVC και PET, αλλά και των αυτο-οργανούμενων μονοστρωματικών συστημάτων (SAMs) έγινε με τη χρήση μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM). Η συσκευή του AFM, που διαθέτει το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, είναι τύπου Multimode και είναι κατασκευασμένη από την Digital Instruments. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής περιγράφεται στο Παράρτημα 3.

Η τοπογραφία των υλικών μελετήθηκε με την ακίδα να βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού (contact mode). Μετά τη λήψη εικόνων σε διάφορες περιοχές του προς εξέταση υλικού και με διαφορετικά μεγέθη σάρωσης (scan size), οι εικόνες αναλύθηκαν μέσω του λογισμικού Nanoscope III, έκδοση 5.12r2 προκειμένου να υπολογισθεί η μέση επιφανειακή τραχύτητα (average surface roughness: Ra).

3.2.3. Μελέτη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφάνειας Υλικών

3.2.3.1. Μετρήσεις Γωνιών Διαβροχής-Υπολογισμός Επιφανειακής Ενέργειας

Για τη μέτρηση γωνιών επαφής μεταξύ δύο ή περισσότερων υγρών (νερού, μεθυλενο-ιωδιδίου, γλυκερόλης) και των προς μελέτη υλικών έγινε χρήση γωνιομέτρου. Η συσκευή του γωνιομέτρου, που διαθέτει το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, είναι τύπου CAM 101 και είναι κατασκευασμένη από την KSV Instruments. Η αρχή λειτουργίας του οργάνου περιγράφεται στο Παράρτημα (4).

Ο τρόπος υπολογισμού της επιφανειακής ενέργειας των υλικών και των πολικών και μη συνιστωσών της, με τη χρήση των γωνιών διαβροχής, περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.4.

3.2.3.2. Φασματοσκοπία Φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS)

Με τη χρήση φασματοσκοπίας ακτίνων X και συγκεκριμένα με το σύστημα LHS-10 της εταιρείας SPECS, που βρίσκεται στο ΕΙΧΗΜΥΘ, μελετήθηκε η χημική σύσταση της επιφάνειας των υλικών. Αρχικά, καταγράφηκαν φάσματα ευρείας σάρωσης (wide scans) και στη συνέχεια έγιναν λεπτομερείς μετρήσεις. Από τις εντάσεις των κορυφών XPS και με τη χρήση των συντελεστών ευαισθησίας των στοιχείων στον φωτοιονισμό υπολογίστηκε η επιφανειακή σύσταση. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής περιγράφεται στο Παράρτημα 4.

3.2.3.3. Μικροηλεκτροφόρηση για τον Υπολογισμό του Δυναμικού ζ

Στην περίπτωση των SAMs, κόκκοι τροποποιημένου και μη γυαλιού με τη μορφή εναιωρήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Saline: PBS), διαφορετικής κάθε φορά ιοντικής ισχύος, ηλεκτροφορήθηκαν στην συσκευή Zeta Sizer 5000 που είναι κατασκευασμένη από τη Malvern Instruments και βρίσκεται στο ΕΙΧΗΜΥΘ. Μέσω της ηλεκτροφόρησης μετρήθηκε η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων και υπολογίστηκε έτσι το δυναμικό ζ της επιφάνειας. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής περιγράφεται στο Παράρτημα (4).

3.3. Βακτήρια

3.3.1. Στελέχη Βακτηρίων

Κατά τη διάρκεια της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τρία στελέχη *S. epidermidis* τα οποία ήταν τα εξής:

I. Το κλινικό slime-θετικό στέλεχος *S. epidermidis* GRE 500 το οποίο απομονώθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου της Πάτρας από έναν νοσηλευόμενο ασθενή ο οποίος εμφάνισε λοίμωξη σχετιζόμενη με την παρουσία ενδοφλέβιου καθετήρα.

II. Το πρότυπο στέλεχος ATCC 35984 το οποίο φέρει το οπερονίου *ica*, είναι slime-θετικό και έχει αποδεδειγμένη ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm).

III. Το πρότυπο στέλεχος ATCC 12228 το οποίο δεν φέρει το οπερονίου *ica* και είναι slime-αρνητικό, δηλαδή δεν έχει ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm).

Τα στελέχη αυτά φυλάσσονται στους $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε ένα διάλυμα που περιέχει 70% Tryptic Soy Broth (TSB:BBL) και 30% γλυκερόλης (50% σε νερό).

3.3.2. Ταυτοποίηση Κλινικού Βακτηριακού Στελέχους

Το κλινικό στέλεχος GRE 500 ταυτοποιήθηκε στο Τμήμα Μικροβιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών και συγκεκριμένα από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κα Έρις Σπηλιοπούλου.

Για την ταυτοποίηση του στελέχους χρησιμοποιήθηκε η παρατήρηση της μορφολογίας των αποικιών, η Gram χρώση, οι δοκιμασίες καταλάσης και πηκτάσης, και ο προσδιορισμός των βιοχημικών ιδιοτήτων με τα συστήματα ταυτοποίησης API-Staph (BioMérieux, SA Lyon, France). Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) (Παράρτημα 5) και τη χρήση ειδικών εκκινητών ελεγχθηκε η παρουσία του οπερονίου *ica* (γονίδια *icaADBC*) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή

του πολυσακχαρίτη που συμβάλει στην συσσωμάτωση των βακτηρίων (Polysaccharide Intercellular Adhesin: PIA). Η παραγωγή εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας (slime) και ο σχηματισμός βιομεμβράνης ερευνήθηκε με τη μέθοδο που περιγράφηκε από τους Christensen et al., 1985. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε με τους παρακάτω δύο τρόπους:

α) Ποιοτική μέθοδος ανάπτυξης βιομεμβράνης σε δοκιμαστικά σωληνάρια κατά Christensen, κατόπιν καλλιέργειας του στελέχους σε θρεπτικό υλικό TSB και σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες.

β) Ποσοτικός προσδιορισμός του slime. Η μέθοδος βασίζεται στην κλασσική ποιοτική μέθοδο των Christensen et al. 1985 με τροποποιήσεις. Αναλυτικά, εναιώρημα βακτηρίων σε TSB πυκνότητας 10^7 CFU/ml επωάζεται σε κελία πλάκας μικροτιτλοποίησης των 96 θέσεων στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ για 24 h. Ακολουθεί πλύσιμο της πλάκας με απιονισμένο νερό προκειμένου να απομακρυνθούν κύτταρα που δεν έχουν προσκολληθεί. Μετά από μονιμοποίηση της βιομεμβράνης στους $60\text{ }^\circ\text{C}$ για 1 h, τα δείγματα χρωματίζονται με τη χρωστική Hucker crystal violet για 1 min. Η περίσσεια της χρωστικής απομακρύνεται με έκπλυση της μικροπλάκας σε απιονισμένο νερό (Baltassari et al. 1993). Η διαδικασία ολοκληρώνεται με τη διαλυτοποίηση της χρωστικής με την προσθήκη 100 μL απιονισμένου νερού και 10 μL διαλύματος HCl 0.1 N. Ακολουθεί φωτομέτρηση στα 570 nm. Θετικές τιμές για τον σχηματισμό βιομεμβράνης θεωρούνται εκείνες που είναι μεγαλύτερες από 0,24, ενώ αρνητικές όταν η απορρόφηση είναι μικρότερη του 0,12.

Από την ταυτοποίηση προέκυψε ότι πρόκειται για ένα Gram-θετικό, πηκτάση αρνητικό σταφυλόκοκο και συγκεκριμένα για ένα στέλεχος *S. epidermidis* το οποίο φέρει το οπερονίου *ica* και μάλιστα το εκφράζει, δηλαδή παράγει slime.

3.3.3. Προετοιμασία Βακτηρίων για την Πειραματική Διαδικασία

Πριν από κάθε πείραμα, 10 μl από το κατεψυγμένο διάλυμα βακτηρίων επωάστηκαν για 24 ώρες στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ σε Tryptic Soy Agar (TSA: BBL). Ακολούθως, δύο με τρεις αποικίες από το TSA μεταφέρθηκαν σε 5 ml Tryptic Soy Broth (TSB: BBL) όπου και επωάστηκαν για 18 ώρες στους $37\text{ }^\circ\text{C}$ υπό ανάδευση (120 rpm). Στη συνέχεια τα βακτήρια φυγοκεντρήθηκαν σε 2683 g, στους $4\text{ }^\circ\text{C}$ για 10 min, πλύθηκαν δύο φορές με 5 ml ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS, pH 7,4) και 0,1 ml από το εναιώρημα αυτό επαναδιαλύθηκαν σε 30 ml PBS προκειμένου να προκύψει εναιώρημα βακτηρίων

συγκέντρωσης 3×10^8 βακτήρια/ml (σύμφωνα με το McFarland standard: Biomerieux). Πριν από κάθε πείραμα, η συγκέντρωση των βακτηρίων ελέγχθηκε με φωτομέτρηση στα 550 nm ώστε κάθε φορά το εναιώρημα βακτηρίων να έχει την ίδια συγκέντρωση. Στη συνέχεια το εναιώρημα αναδεύτηκε ισχυρά με vortex και ακολούθως πέρασε δύο φορές από 25 gauge βελόνα προκειμένου να διασπαστούν τα συσσωματώματα.

3.3.4. Μελέτη Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφάνειας Βακτηρίων

3.3.4.1. Μετρήσεις Γωνιών Διαβροχής-Υπολογισμός Επιφανειακής Ενέργειας

Για τη μέτρηση γωνιών επαφής μεταξύ δύο ή περισσότερων υγρών (νερού, μεθυλενο-ιωδιδίου, γλυκερόλης) και των προς μελέτη βακτηρίων έγινε χρήση γωνιομέτρου όπως περιγράφηκε και στην παράγραφο 3.2.3.1. Για τη μέτρηση των γωνιών διαβροχής, τα βακτήρια με τη μορφή εναιωρήματος σε PBS διηθήθηκαν και συγκρατήθηκαν σε φίλτρο με διάμετρο πόρων 0.2 μm ώστε να σχηματίσουν πολύστρωτες στοιβάδες. Το φίλτρο με τα βακτήρια αφέθηκε να στεγνώσει μέχρι ένα κρίσιμο σημείο (Busscher et al., 1984) προκειμένου στην επιφάνεια των πολύστρωτων στοιβάδων βακτηρίων να αποθεθούν οι σταγόνες των διαφόρων υγρών και να μετρηθούν οι γωνίες διαβροχής. Για τον προσδιορισμό του κρίσιμου σημείου αφυδάτωσης των βακτηριακών κυττάρων έγιναν μετρήσεις σε διάφορα χρονικά διαστήματα μεταξύ μισής και τεσσάρων ωρών. Διαπιστώθηκε ότι οι γωνίες διαβροχής σταθεροποιούνται μετά από τρεις περίπου ώρες και για διάστημα μισής ώρας, οπότε οι μετρήσεις γίνονταν σε αυτό το χρονικό διάστημα. Η αρχή λειτουργίας του οργάνου περιγράφεται στο Παράρτημα (4).

Ο τρόπος υπολογισμού της επιφανειακής ενέργειας των βακτηρίων και των πολικών και μη συνιστωσών του είναι ο ίδιος με αυτόν που χρησιμοποιείται για τα υλικά και περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.4.

3.3.4.2. Μικροηλεκτροφόρηση για τον Υπολογισμό του Δυναμικού ζ

Όπως και στην περίπτωση των SAMs, τα βακτήρια με τη μορφή εναιωρήματος σε PBS διαφορετικής κάθε φορά ιοντικής ισχύος ηλεκτροφορήθηκαν στην συσκευή Zeta Sizer 5000 που είναι κατασκευασμένη από τη Malvern Instruments και βρίσκεται στο ΕΙΧΗΜΥΘ. Μέσω της ηλεκτροφόρησης μετρήθηκε η ηλεκτροφορητική κινητικότητα

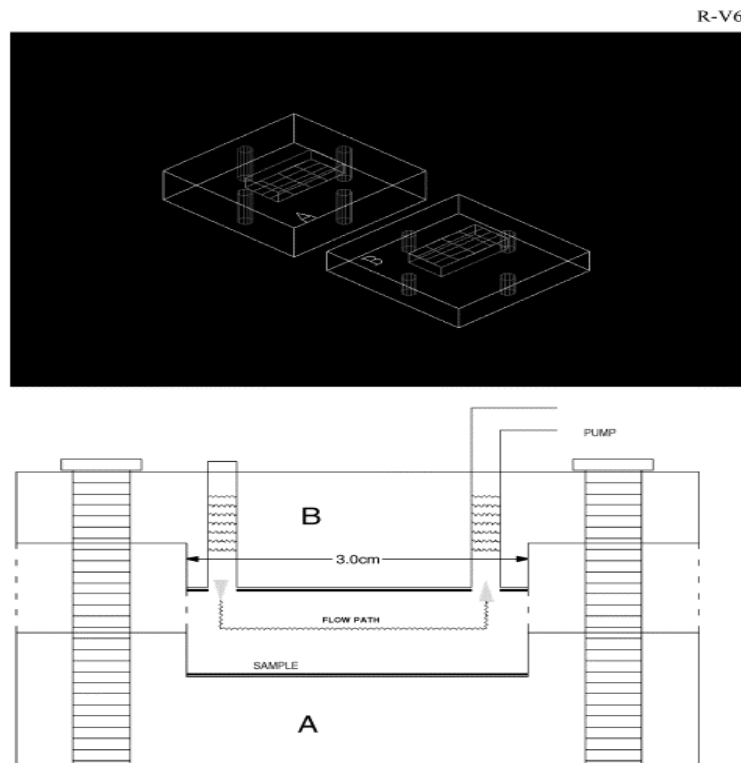
των σωματιδίων και υπολογίσθηκε έτσι το δυναμικό ζ της επιφάνειας. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής περιγράφεται στο Παράρτημα (4).

3.4. Διατάξεις Ροής

Οι διατάξεις ροής που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης του ρυθμού διάτμησης στη βακτηριακή προσκόλληση ήταν δύο, η **Αίθουσα Ροής Παράλληλων-Πλακών (Parallel-Plate Flow Chamber)** και η **Αίθουσα Ακτινικής Ροής (Radial Flow Chamber, RFC)**

3.4.1. Αίθουσα (Κανάλι) Ροής Παράλληλων Πλακών (Parallel Plate Flow Chamber)

Η αίθουσα ροής παράλληλων πλακών που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο σχήμα 3.1.



Σχήμα 3.1. Αίθουσα Ροής Παράλληλων Πλακών (Parallel Plate Flow Chamber)

Το chamber που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατασκευασμένο από plexiglass και το δείγμα τοποθετούνταν στην κάτω πλάκα (σχήμα 3.1. Α)

Σε αυτή τη διάταξη η ο **ρυθμός διάτμησης** στην επιφάνεια δίνεται από τη σχέση

$$S = \frac{6Q}{Wh^2} \quad (3.1)$$

Όπου Q είναι η ογκομετρική παροχή, δηλαδή ο συνολικός όγκος του ρευστού που ρέει στη μονάδα του χρόνου (m^3/s), και ήταν η παράμετρος που μεταβάλλονταν στα διάφορα πειράματα, με τη βοήθεια της αντλίας (pump: της εταιρίας Kd Scientific), με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του ρυθμού διάτμησης στην προσκόλληση των βακτηρίων,

h είναι το ύψος του chamber, δηλαδή η απόσταση της άνω πλάκας από το προς εξέταση υλικό (sample) ($0.35 \times 10^{-3} m$, για τη συγκεκριμένη διάταξη και πάχος υλικών $1 \times 10^{-3} m$),

W είναι το πλάτος της αίθουσας, ($0.015 m$, για τη συγκεκριμένη διάταξη).

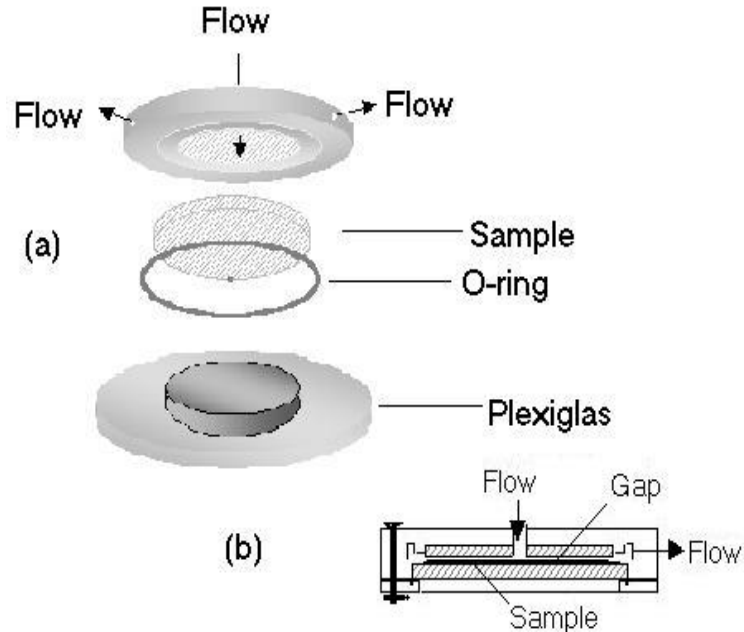
Οι διαστάσεις των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $30 \times 15 \times 1 mm$.

Το εύρος των ρυθμών διάτμησης που μελετήθηκε ήταν από $50-2000 s^{-1}$, καθώς τόσο είναι το εύρος των ρυθμών διάτμησης για αγγεία του ανθρώπινου σώματος στα οποία επικρατεί σταθερή γραμμική ροή (Goldsmith και Turrilo, 1986).

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε κάθε φορά η προσκόλληση των βακτηρίων στο κέντρο του chamber, μακριά δηλαδή από τις εισόδους, καθώς μόνο στο κέντρο η ροή είναι πλήρως ανεπτυγμένη και άρα σταθερή και γραμμική. Το εναιώρημα των βακτηρίων θεωρήθηκε ως νευτώνειο, μη συμπιεστό ρευστό (Παράρτημα 1).

3.4.2. Αίθουσα Ακτινικής Ροής (Radial Flow Chamber)

Η αίθουσα ακτινικής ροής που χρησιμοποιήθηκε απεικονίζεται στο σχήμα 3.2.



Σχήμα 3.2. Αίθουσα Ακτινικής Ροής (Radial Flow Chamber) (όπου «flow» είναι τα σημεία εισόδου και εξόδου της ροής, «gap» το κενό μεταξύ του άνω δίσκου και του δείγματος «sample», ή αλλιώς ύψος του chamber, o-ring είναι ένα κυκλικό λάστιχο σιλικόνης που χρησιμοποιείται για να ενισχύσει τη στεγανότητα του chamber)

Το chamber που χρησιμοποιήθηκε ήταν κατασκευασμένο από plexiglass και το δείγμα τοποθετούνταν μεταξύ των δύο πλακών (σχήμα 3.2.)

Σε αυτή τη διάταξη η ο **ρυθμός διάτμησης** στην επιφάνεια δίνεται από τη σχέση

$$S = \frac{3Q}{\pi h^2} \quad (3.1)$$

Όπου Q είναι η ογκομετρική παροχή, δηλαδή ο συνολικός όγκος του ρευστού που ρέει στη μονάδα του χρόνου (m^3/s), και ήταν η παράμετρος που μεταβάλλονταν στα διάφορα πειράματα, με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του ρυθμού διάτμησης στην προσκόλληση των βακτηρίων

h είναι το ύψος του chamber, δηλαδή η απόσταση της άνω πλάκας από το προς εξέταση υλικό ($0,2 \times 10^{-3} m$, για τη συγκεκριμένη διάταξη και πάχος δειγμάτων/υλικών $100 \times 10^{-6} m$),

r είναι η ακτινική απόσταση από την είσοδο της ροής (η ακτίνα της συγκεκριμένη διάταξης ήταν 44×10^{-3} m, όση και η ακτίνα των δειγμάτων/υλικών).

Το εύρος των ρυθμών διάτμησης που μελετήθηκε ήταν από $50-2000 \text{ s}^{-1}$, καθώς τόσο είναι το εύρος των ρυθμών διάτμησης για αγγεία του ανθρώπινου σώματος στα οποία επικρατεί σταθερή γραμμική ροή (Goldsmith και Turrito, 1986).

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε κάθε φορά η προσκόλληση των βακτηρίων μακριά από τις εισόδους, καθώς μόνο στα σημεία αυτά η ροή είναι πλήρως ανεπτυγμένη και άρα σταθερή και γραμμική. Το εναιώρημα των βακτηρίων θεωρήθηκε ως νευτώνειο, μη συμπιεστό ρευστό (Παράρτημα 1).

3.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης

3.5.1. Μέθοδος Μέτρησης του Αριθμού των Ζώντων Προσκολλημένων στην Επιφάνεια Βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs)

Μετά την προσκόλληση των βακτηρίων στο προς εξέταση υλικό, τμήμα του υλικού (1 cm^2) βυθίζεται σε 5 ml PBS. Τα προσκολλημένα βακτήρια αποκολλούνται από το υλικό με τη χρήση λουτρού υπερήχων (sonication bath) για 10 λεπτά σε πάγο, προκειμένου να αποφευχθεί λύση των κυττάρων. Αφού τα βακτήρια αποκολληθούν και άρα περάσουν στην υδατική φάση, το εναιώρημα μετά από διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις επιστρώνεται σε τρυβλία με Trypticase Soy agar (TSA) και ο αριθμός των αποικιών μετράται μετά από επώαση στους 37°C για 24 ώρες.

3.5.2. Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy: SEM)

Μετά την προσκόλληση των βακτηρίων, τα δείγματα μονιμοποιούνται με γλουταραλδεύδη και αφυδατώνονται. Αναλυτικά, μετά από επώαση του κάθε υλικού με το εναιώρημα βακτηρίων, το δείγμα πλένεται με 10 ml PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα ή χαλαρά προσκολλημένα βακτήρια. Ακολούθως, υποβάλλεται σε μονιμοποίηση με διάλυμα γλουταραλδεύδης 2,5% σε PBS για 20 min. Αφυδατώνεται διαδοχικά με διαλύματα αιθανόλης πυκνότητας 10, 30, 50, 70, 90 και 100% σε νερό, για 20 min με το κάθε ένα. Αφού επιχρυσωθεί για 10 min προκειμένου να

γίνει αγωγίμο, μελετάται με SEM. Η αρχή λειτουργίας του SEM περιγράφεται στο Παράρτημα 3.

3.5.3. Μικροσκόπιο Φθορισμού (Image Analyzed Epifluorescence Microscopy) (Fluorescence In Situ Hybridization, FISH).

Μετά την προσκόλληση των βακτηρίων, τα δείγματα μετά από μονιμοποίηση και υβριδισμό με φθορίζοντα DNA-ανιχνευτή (Ινστιτούτο Τεχνολογίας και Έρευνας, Κρήτης), που είναι συμπληρωματικός σε αλληλουχία νουκλεοτιδίων του 16S rDNA γονιδίου, μελετώνται με μικροσκόπιο φθορισμού (Παράρτημα 3).

Ειδικότερα, μετά από επώαση κάθε υλικού με το εναιώρημα βακτηρίων, το δείγμα πλένεται με 10 ml PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα ή χαλαρά προσκολλημένα βακτήρια, και μονιμοποιείται στους 4 °C για 16 ώρες. Ακολουθεί λύση των βακτηρίων που βρίσκονται στο υλικό με τη χρήση ενός ενζυμικού διαλύματος (750 µg λυσοσταφίνη/ml, 5 mg λυσοζύμη/ml, 50 mM φωσφορικό νάτριο, 0,05% σαπονίνη) για 1 ώρα στους 37 °C. Μετά τη λύση, με χρήση UV ακτινοβολίας σταθεροποιείται το DNA των βακτηρίων πάνω στο υλικό. Για τον υβριδισμό, χρησιμοποιείται το διάλυμα υβριδισμού [0,9 M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,001% SDS, 43% φορμαμίδιο, 50 ng του DNA ανιχνευτή που είναι σημασμένος με φθορίζουσα ουσία: Cy3 (απορρόφηση στα 595 nm, εκπομπή στα 615 nm) ή φλουορεσίνη (απορρόφηση στα 494 nm, εκπομπή στα 518 nm)]. Ο ανιχνευτής είναι ο EUB338-κατάλληλος για όλα τα προκαρυωτικά κύτταρα- και έχει την ακόλουθη αλληλουχία νουκλεοτιδίων: 5'-ACGGGCGGTGT[G/A]C-3' η οποία δεσμεύεται ειδικά στη συμπληρωματική της αλληλουχία στο βακτήριο. Ο χρόνος υβριδισμού είναι 3 ώρες στους 43 °C και στη συνέχεια απομακρύνεται ο ανιχνευτής που δεν έχει δεσμευτεί πλένοντας το δείγμα δύο φορές στους 43 °C για 15 min με ένα διάλυμα (0,9 M NaCl, 50 mM sodium phosphate [pH 7,5], 0,1% SDS) και ακολούθως με δισαπεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Το δείγμα μελετάται με μικροσκόπιο φθορισμού. Η χρήση της τεχνικής αυτής επιτρέπει την παρατήρηση, ταυτοποίηση και καταμέτρηση των προσκολλημένων σε μια επιφάνεια βακτηρίων, χωρίς να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα (Moter και Gobel, 2000; Krimer et al., 1999; Amann, 1990).

3.5.4. Μικροσκόπιο Συνεστιακής Σάρωσης (Scanning Confocal Laser Microscopy: SCLM)

Το μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης που διαθέτει το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, είναι κατασκευασμένη από την Nikon. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής αυτής περιγράφεται στο Παράρτημα 3.

Για τη μελέτη των δειγμάτων με μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης έγιναν τα ακόλουθα.

Τα δείγματα, στα οποία έχουν προσκολληθεί τα βακτήρια, υποβάλλονται σε μονιμοποίηση και υβριδισμό με φθορίζοντα DNA, RNA-ανιχνευτή, αλλά και σε σήμανση του πολυσακχαρίτη που συμβάλλει στην συσσωμάτωση των βακτηρίων με χρήση φθορίζουσας λεκτίνης (Molecular Probes), και ακολούθως μελετώνται με το μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης (Παράρτημα 3).

Ειδικότερα, μετά από επώαση κάθε υλικού με το εναιώρημα βακτηρίων, το δείγμα πλένεται με 10 ml PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα ή χαλαρά προσκολλημένα βακτήρια, και μονιμοποιείται με χρήση διαλύματος φορμαλδεΐδης (3 %), για μισή ώρα, στους 37 °C. Η φορμαλδεΐδη παρασκευάζεται λίγο πριν τη χρήση της από παραφορμαλδεΐδη με διάλυση της τελευταίας σε PBS, στους 60 °C παρουσία σταγόνων NaOH 5 M.

Ακολούθως γίνεται η χρώση. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται η χρωστική Syto 9 (απορρόφηση στα 485 nm και εκπομπή στα 500 nm) (Molecular Probes), η οποία είναι ένας φθορίζοντας DNA, RNA-ανιχνευτής που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και βάφει τα νουκλεϊνικά οξέα ζώντων και νεκρών βακτηρίων. Το δείγμα επωάζεται με τη χρωστική σε συγκέντρωση 2 μl/ml απιονισμένου και αποστειρωμένου νερού, για μισή ώρα, στους 37 °C. Στη συνέχεια απομακρύνεται ο ανιχνευτής που δεν έχει δεσμευτεί πλένοντας το δείγμα δύο φορές με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό. Με τη μέθοδο αυτή σχηματίζεται σαφής εικόνα για την κατανομή των προσκολλημένων βακτηρίων.

Παράλληλα χρησιμοποιείται μια λεκτίνη (Wheat Germ Agglutinin, Molecular Probes) σεσημασμένη με φθοριόχρωμα (Texas Red: Απορρόφηση στα 595 nm και εκπομπή στα 615 nm) η οποία δεσμεύεται ειδικά στη N-ακέτυλο γλυκοζαμίνη που αποτελεί κύριο συστατικό της Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA), η οποία βοηθά

στη συσσωμάτωση των βακτηρίων και στη δημιουργία biofilm. Η λεκτίνη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 10 µg/ml PBS (10 mM, pH 7,5). Το δείγμα επωάζεται για μισή ώρα με το διάλυμα λεκτίνης και ακολούθως απομακρύνεται ο ανιχνευτής που δεν έχει δεσμευτεί πλέοντας το δείγμα δύο φορές με PBS (Strathmann et al., 2002).

Με χρήση της συγκεκριμένης λεκτίνης, μελετήθηκε ο μηχανισμός του δεύτερου σταδίου της προσκόλλησης (Ειδικές αλληλεπιδράσεις) καθώς και σε ποιο βαθμό το στάδιο αυτό συντελεί στην βακτηριακή συσσωμάτωση.

Για τη μελέτη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα Laser Αργού (διέγερση φθορίζουσας ουσίας στα 488 nm) και Ηλίου-Νέου (διέγερση φθορίζουσας ουσίας στα 543 nm).

3.5.5. Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscope: AFM)

Μετά από επώαση του κάθε υλικού με το εναιώρημα βακτηρίων, το δείγμα πλένεται με 10 ml PBS προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη προσκολλημένα ή χαλαρά προσκολλημένα βακτήρια. Ακολούθως, υποβάλλεται σε μονιμοποίηση με διάλυμα γλουταραλδεϋδης 2,5% σε PBS για 20 min και παρατηρείται με μικροσκόπιο ατομικής σάρωσης καθώς αυτό έχει μεγάλη διακριτική ικανότητα (Παράρτημα 3). Με χρήση γλουταραλδεϋδης ήταν δυνατή η μελέτη του δείγματος ακόμα με την ακίδα να βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια του υλικού-βακτηρίων (contact mode).

3.6. Μελέτη της Έκφρασης των Γονιδίων *ica* Προσκολλημένων Βακτηρίων και Βακτηρίων του Εναιωρήματος που Έχουν Έρθει σε Επαφή με το προς Μελέτη Υλικό

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ica* έγινε στο Τμήμα Μικροβιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κα Ιρις Σπηλιοπούλου και την Υποψήφια Διδάκτορα Κα Αντιγόνη Φωκά.

Η μέθοδος βασίζεται στο ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA του γονιδίου.

Συγκεκριμένα, μετά το πείραμα προσκόλλησης των βακτηρίων στα SAMs υλικά, τα προσκολλημένα βακτήρια αποκολλώνται από το υλικό με χρήση διαλύματος τρυψίνης 0,25 % σε PBS για 5 λεπτά (Screenivasan και Chrony, 2005). Ακολούθως μεταφέρονται

σε βόειο ορό (Fetal Bovine Serum: FBS) προκειμένου να εξουδετερωθεί η τρυψίνη και να μην επηρεάσει τη δομική ακεραιότητα των βακτηριακών κυττάρων.

Τόσο τα βακτήρια του εναιωρήματος όσο και τα προσκολλημένα που έχουν μεταφερθεί σε υδατική φάση φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά και ακολουθεί έκπλυση του ιζήματος με 1.5 mL διαλύματος DEPC 0.1%. Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Τριζόλης (Trizol) (Pfaffl, 2004).

Το RNA απομονώθηκε από καλλιέργημα της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, καθώς τότε μεταγράφονται τα γονίδια *ica*. Δηλαδή τροποποιήθηκε το πείραμα της προσκόλλησης που χρησιμοποιούσε βακτήρια της στατικής φάσης ανάπτυξης, καθώς για τη μελέτη των γονιδίων τα βακτήρια πρέπει να είναι στην λογαριθμική φάση ανάπτυξης, δηλαδή 2 ώρες μετά την καλλιέργειά τους σε Bovine Heart Infusion (BIH) αντί για TSB.

Μετά την απομόνωσή του το RNA μεταγράφεται αντιστρόφως σε DNA (complementary DNA, cDNA), ώστε να ανιχνευθεί η παρουσία και η ποσότητά του (Bustin et al., 2004). Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των προϊόντων με απόλυτο υπολογισμό και αποτελεί χρήσιμο έκφρασης γονιδίων. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης (Pfaffl, 2004).

Για τη σήμανση και παρακολούθηση των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε το SYBR Green I (SG), που είναι μη ειδικός τρόπος σήμανσης. Για τη Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Rotor Gene και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα της συσκευής Rotor-Gene Analysis Software 6.0.

Αναλυτικά η διαδικασία της απομόνωσης του RNA, της αντίστροφης μεταγραφής και της Real Time PCR περιγράφονται στο Παράρτημα 5.

3.7. Στατιστική Επεξεργασία Αποτελεσμάτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με χρήση του λογισμικού SPSS. Ως στατιστικά σημαντική διαφορά θεωρήθηκε αυτή για την οποία $p < 0,05$. Επιπρόσθετα, η στατιστική σημαντικότητα των συσχετίσεων μελετήθηκε με το ίδιο

λογισμικό και οι ως στατιστικά σημαντικές θεωρήθηκαν οι συσχετίσεις για τις οποίες $p < 0,01$.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 4

***Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων
Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυβινυλοχλωριδίου με
Τεχνικές Πλάσματος και του Ρυθμού Διάτμησης στην
Προσκόλληση των Βακτηρίων***

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων σε υμένα Πολυβινυλοχλωριδίου (Poly Vinyl Chloride: PVC) και επιφανειακά τροποποιημένου PVC σε εκκενώσεις ραδιοσυχνότητας (Radiofrequency: RF): CF_4/H_2 και $\text{C}_2\text{H}_2/\text{He}$, σε εκκενώσεις ατομικής δέσμης (Atom Beam: AB) C_2H_2 και σε εκκενώσεις συνδυασμού ατομικής δέσμης-επιμετάλλωσης προσανατολισμένης με μαγνήτες (Atom Beam-Magnetron Sputtering): Ag και Ag/ C_2H_2 . Η τροποποίηση των υμενίων παραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα πλάσματος που βρίσκεται στο Τμήμα Ηλεκτρολόγων και Μηχανολόγων Μηχανικών του Πανεπιστημίου του Δουβλίνου, από τον Dr D.P. Dowling.

Η βακτηριακή προσκόλληση πραγματοποιήθηκε υπό δυναμικές συνθήκες. Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών και του ρυθμού διάτμησης στη βακτηριακή προσκόλληση.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση ήταν μειωμένη σε όλα τα τροποποιημένα με πλάσμα υλικά εκτός από την περίπτωση του CF_4/H_2 . Η μέγιστη μείωση παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του τροποποιημένου με άργυρο (Ag) PVC. Σε όλα τα υλικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 σε 2000 s^{-1} .

Εισαγωγή

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 και συγκεκριμένα στις παράγραφους 1.2.6. και 1.2.7., το κρίσιμο στάδιο για την εμφάνιση λοιμώξεων σχετιζόμενων με την παρουσία βιοϋλικών, είναι η βακτηριακή προσκόλληση στην επιφάνεια του υλικού. Η προσκόλληση είναι το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικού (Heilmann et al., 1996). Τόσο οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις (μη ειδικές) όσο και οι ειδικές αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη (receptor-ligand), στην περίπτωση επικαλυμμένων υλικών με πρωτεΐνες πλάσματος, καθώς επίσης και οι συνθήκες ροής συμβάλλουν στη δυνατότητα του βακτηριακού κυττάρου να συνδεθεί με την επιφάνεια του υλικών. Εντούτοις, η σχετική συμβολή τους στη διαδικασία της βακτηριακής προσκόλλησης δεν είναι πλήρως γνωστή (Gray et al., 1984; Duguid et al., 1992; Hermansson et al., 1999).

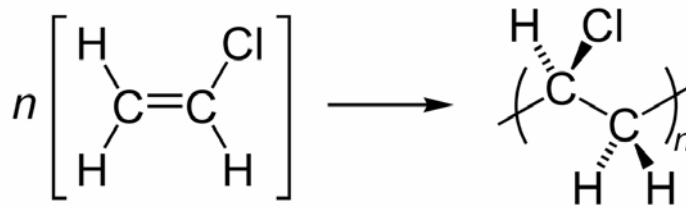
Ελλείψει των ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη (receptor-ligand), δηλαδή απουσία πρωτεϊνών, τα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν άμεσα στην

επιφάνεια του υλικού μέσω των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων. Σε αυτήν την περίπτωση, η αρχική φάση προσκόλλησης κυβερνάται κατά ένα μεγάλο μέρος από αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικές, πολικές (p ή οξέος-βάσεως: AB) και αλληλεπιδράσεις διασποράς (d ή Lifshitz-van der Waals: LW) μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας του υλικού (Israelachvili, 1992; Heilmann et al., 1996).

Μόλις οι μικροοργανισμοί φθάνουν στην επιφάνεια του υλικού, υπό στατικές συνθήκες, θα προσελκυστούν ή αποκρουσθούν από αυτήν, ανάλογα με το είδος και το ποσό αυτών των αλληλεπιδράσεων. Δεδομένου ότι η διαδικασία της βακτηριακής προσκόλλησης στις ενδοφλέβιες ιατρικές συσκευές συνδέεται με ροή (Duguid et al., 1992), οι φυσικές δυνάμεις όπως η διάτμηση που παράγεται από την αιμοδυναμική της περιοχής στην οποία βρίσκεται το εμφύτευμα, επηρεάζουν την διαδικασία της προσκόλλησης, άρα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Σε αυτή την κατεύθυνση, μελετήθηκε η επίδραση της μεταβολής των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας υμενίου PVC με τροποποίησή της με τεχνικές πλάσματος στην προσκόλληση των βακτηρίων. Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση του ρυθμού διάτμησης στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων.

Το PVC επιλέχθηκε επειδή είναι ένα φθινό πολυμερές το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως ως βιοϋλικό για την κατασκευή εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών, η μακροχρόνια όμως χρήση του παρεμποδίζεται από την εμφάνιση λοιμώξεων που σχετίζονται με αυτό, όπως άλλωστε συμβαίνει με τα περισσότερα τεχνητά υλικά. Εκείνο που το χαρακτηρίζει είναι η μειωμένη διαβρεξιμότητα και άρα η μικρή επιφανειακή ενέργεια εξαιτίας της έλλειψης πολικών ομάδων όπως $-COOH$ και $-OH$. Η χημική δομή του PVC φαίνεται στο σχήμα 4.1. Η διαβρεξιμότητα ενός δείγματος χαρακτηρίζεται από τη γωνία διαβροχής, δηλαδή από τη γωνία που σχηματίζει μία σταγόνα νερού συγκεκριμένου όγκου με την επιφάνεια του υλικού. Μεγάλες γωνίες σχηματίζονται σε υλικά μειωμένης διαβρεξιμότητας-μικρής επιφανειακής ενέργειας (Παράρτημα 4: Γωνιόμετρο).



Σχήμα 4.1. Χημική δομή του PVC

Η **εναπόθεση λεπτών υμενίων φθορίου ή αλλιώς η φθορίωση επιφανειών** έχει αποδειχθεί ότι βελτιώνει την αιμοσυμβατότητα πολυμερών καθώς δεν εμφανίζει αυξημένη προσκόλληση αιμοπεταλίων, ενώ παράλληλα δεν είναι τοξική (Pizzoferrato et al., 1995)

Η **εναπόθεση λεπτών υμενίων υδρογονομένου άμορφου άνθρακα a-C:H και λεπτών υμενίων άμορφου άνθρακα a-C** έχει αρχίσει να μελετάται συστηματικά και να χρησιμοποιείται προκειμένου να βελτιώσει τις χημικές και μηχανικές ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών, εξαιτίας της χημικής του αδράνειας, της μεγάλης του σκληρότητας και της μειωμένης διαβρεξιμότητάς του (Dowling et al., 1997; Dowling et al., 1998; Wang et al., 2004).

Η **εναπόθεση λεπτών υμενίων αργύρου (Ag)** έχει συσχετισθεί με μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης αλλά και με αντιβακτηριακές ιδιότητες καθώς τα ιόντα αργύρου προσδένονται ισχυρά στις ηλεκτρονιο-δοτικές ομάδες της επιφάνειας των βακτηρίων και υποκαθιστούν μεταλλικά ιόντα τα οποία είναι απαραίτητα για την επιβίωση των βακτηρίων, όπως ασβέστιο και ψευδάργυρο. Αυτό συνεπάγεται μείωση στη μεταφορά υδρογόνου και θρεπτικών συστατικών δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης και άρα βακτηριακό θάνατο (Dowling et al., 2003; Chaw et al., 2005).

4.1. Υλικά και Μέθοδοι

4.1.1. Υλικά

Ως υποστρώματα για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

i) Υμένια Πολοβινυλοχλωριδίου (Poly Vinyl Chloride: PVC) πάχους 100 μm, ημικρυσταλλικά, αποστειρωμένα με αιθυλενοξειδίο και κατασκευασμένα από την εταιρεία Ergo, Athens. Τα υμένια αυτά χρησιμοποιούνται για την κατασκευή σάκκων αίματος και άρα ήταν «ιατρικού βαθμού»

ii) Λεπτά Υμένια Φθορίου και Υδρογονομένου Άμορφου Άνθρακα που Εναποτέθηκαν στο PVC σε Εκκενώσεις (RF) CF_4/H_2 και C_2H_2/He αντίστοιχα.

Ο αντιδραστήρας πλάσματος που χρησιμοποιήθηκε για τις εναποθέσεις φθορίου και υδρογονομένου άμορφου άνθρακα (a-C:H) ήταν αντίστοιχος με αυτόν του Εργαστηρίου Τεχνολογίας Πλάσματος του Τμήματος των Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, ο οποίος περιγράφεται στο Παράρτημα 2. Και για τις δύο εναποθέσεις χρησιμοποιήθηκαν εκκενώσεις αίγλης ραδιοσυχνότητας (RF). Η συχνότητα διέγερσης ήταν 13.56 MHz. Πριν τις εναποθέσεις, τα υμένια PVC τροποποιήθηκαν σε πλάσμα Οξυγόνου σε πίεση 25 Pa, για ένα λεπτό, προκειμένου να ενισχυθεί η επιφανειακή ενέργειά τους και να έχουν καλύτερη συνάφεια με την ακολουθούμενη εναπόθεση. Η πίεση λειτουργίας της εκκένωσης για τις εναποθέσεις ρυθμίστηκε στα 15 Pa. Στην περίπτωση των εναποθέσεων λεπτών υμενίων φθορίου, χρησιμοποιήθηκε αέριο μίγμα CF_4/H_2 σε αναλογία 1/30, ενώ στην περίπτωση των εναποθέσεων a-C:H χρησιμοποιήθηκε μίγμα C_2H_2/He σε αναλογία 1/30.

iii) Λεπτά Υμένια Άμορφου Άνθρακα που Εναποτέθηκαν στο PVC σε Εκκενώσεις (AB) C_2H_2

Η εναπόθεση των υμενίων άμορφου άνθρακα (a-C) έγινε σε πλάσμα ατομικής δέσμης (Atom Beam: AB). Πριν τις εναποθέσεις, τα υμένια PVC τροποποιήθηκαν σε πλάσμα Αργού (AB) σε πίεση 0.1 Pa, για ένα λεπτό, προκειμένου να ενισχυθεί η επιφανειακή ενέργειά τους και να έχουν καλύτερη συνάφεια με την εναπόθεση του a-C.

Στην συνέχεια ακολούθησε η εναπόθεση του a-C. Η πίεση λειτουργίας της εκκένωσης ρυθμίστηκε στα 0.1 Pa και η τάση στα 1000 Volt. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε για την εναπόθεση ήταν καθαρό C₂H₂. Με σύγκριση των συνθηκών ι) και ιι) παρατηρείται ότι η εναπόθεση άνθρακα σε AB απαιτεί πολύ χαμηλότερη πίεση καθώς επιταχύνει τα άτομα προς την επιφάνεια του υλικού.

iv) Λεπτά Υμένια Αργύρου και Αργύρου-Άμορφου Άνθρακα που Εναποτέθηκαν στο PVC σε Εκκενώσεις (AB-Magnetron Sputtering)

Η εναπόθεση των υμενίων αργύρου (Ag) και αργύρου-άμορφου άνθρακα (a-C) έγινε σε επιμεταλλωτή προσανατολισμένου με μαγνήτες (Magnetron Sputtering: MS) με παράλληλη χρήση πλάσματος ατομικής δέσμης (Atom Beam: AB). Πριν τις εναποθέσεις, τα υμένια PVC τροποποιήθηκαν σε πλάσμα Αργού (AB) σε πίεση 0.1 Pa, για ένα λεπτό, προκειμένου να ενισχυθεί η επιφανειακή ενέργειά τους και να έχουν καλύτερη συνάφεια με την εναπόθεση των Ag, a-C. Στην συνέχεια ακολούθησε η εναπόθεση του Ag με τη χρήση του επιμεταλλωτή. Στην περίπτωση των υμενίων αργύρου-άμορφου άνθρακα έγινε παράλληλη χρήση MS-AB προκειμένου να εναποτεθεί το a-C μέσω του AB. Η πίεση λειτουργίας της εκκένωσης ρυθμίστηκε στα 0.1 Pa και η τάση στα 1000 Volt. Το αέριο που χρησιμοποιήθηκε για την εναπόθεση Ag-C₂H₂ ήταν καθαρό C₂H₂. Ο συνδυασμός AB-MS επιτρέπει την εναπόθεση Ag ακόμα και σε ευαίσθητα πολυμερή καθώς έτσι το μέταλλο εναποτίθεται σε χαμηλές θερμοκρασίες υποστρώματος.

4.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών χρησιμοποιήθηκαν κάποιες από τις τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.2.

Χρησιμοποιήθηκε οπτικό προφιλόμετρο προκειμένου να μετρηθεί το πάχος των εναποθέσεων. Επίσης, μελετήθηκε η τοπογραφία και η τραχύτητα των υλικών μέσω μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με νερό αλλά και η τεχνική της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS), όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.2. αλλά και στο Παράρτημα 3. Στη συγκεκριμένη μελέτη, η ανάλυση XPS έγινε στο Εργαστήριο

Επιστήμης των Επιφανειών, του Τμήματος των Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών από τον Καθηγητή Κο Σ. Λαδά.

4.1.3. Βακτήρια

Χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχη *S. epidermidis*: το πρότυπο ATCC 35984 το οποίο φέρει το οπερονίου *ica*, είναι slime-θετικό και έχει αποδεδειγμένη ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm) και το κλινικό GRE 500, slime-θετικό επίσης (Παράγραφος 3.3.2.). Η προετοιμασία των βακτηρίων για την πειραματική διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.3.

4.1.4. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης

Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης έγιναν δυναμικά πειράματα για τα οποία χρησιμοποιήθηκε το Radial Flow Chamber, το οποίο περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.4.2. Η βακτηριακή προσκόλληση μελετήθηκε κάτω από ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} , 200 s^{-1} , 500 s^{-1} και 2000 s^{-1} . Το εναιώρημα βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 3×10^8 βακτήρια/ml. Τα πειράματα είχαν διάρκεια 150 λεπτά. Τα προσκολλημένα σε κάθε υλικό βακτήρια μελετήθηκαν με χρήση της μεθόδου μέτρησης του αριθμού των ζώντων προσκολλημένων στην επιφάνεια βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs), όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.1. αλλά και με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Τα δείγματα για το SEM προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.2. Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκε επίσης το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης και το μικροσκόπιο φθορισμού. Η προετοιμασία των δειγμάτων για την παρατήρηση με τα συγκεκριμένα μικροσκόπια περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και στις παραγράφους 3.5.3. και 3.5.5.

4.2. Αποτελέσματα

4.2.1. Υλικά

4.2.1.1. Πάχος Υμενίου που Εναποτέθηκε

Στον πίνακα 4.1. περιγράφονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν: το σύμβολο που χρησιμοποιείται για το κάθε ένα από το σημείο αυτό και μετά, το είδος της εναπόθεσης και το πάχος των εναποθέσεων.

Από τις μετρήσεις του πάχους της εναπόθεσης προκύπτει ότι κατά την επεξεργασία του PVC με πλάσμα CF_4/H_2 σε εκκενώσεις RF ουσιαστικά δεν προέκυψε επικάλυψη αλλά χημική τροποποίηση της επιφάνειας, δηλαδή δεσμεύτηκε φθόριο. Στην περίπτωση της επεξεργασίας του PVC με πλάσμα C_2H_2/He σε εκκενώσεις RF, το πάχος του λεπτού υμενίου υδρογονομένου άμορφου άνθρακα (a-C:H) που εναποτέθηκε ήταν 0.3 μm . Το πάχος του λεπτού υμενίου άμορφου άνθρακα (a-C) που εναποτέθηκε με πλάσμα C_2H_2 σε εκκενώσεις AB ήταν 1 μm . Στην περίπτωση της εναπόθεσης αργύρου (Ag) σε εκκενώσεις MS, το πάχος της επικάλυψης ήταν 0.04 μm . Κατά τη συνδιασμένη εναπόθεση Ag/a-C σε εκκενώσεις AB-MS, το υμένιο που εναποτέθηκε είχε πάχος 1 μm .

Όνομα Υλικού	Είδος Εναπόθεσης	Πάχος Εναπόθεσης
PVC	Μη επεξεργασμένο	---
CF_4	CF_4/H_2 σε εκκενώσεις RF	Μη μετρήσιμο
a-C:H	C_2H_2/He σε εκκενώσεις RF	0.3 μm
a-C	C_2H_2 σε εκκενώσεις AB	1 μm
Ag	Ag σε εκκενώσεις MS	0.04 μm
Ag/ a-C	Ag/ C_2H_2 σε εκκενώσεις MS/AB	1 μm

Πίνακας 4.1. Συμβολισμός υλικών, συνθήκες εναπόθεσης και πάχος υμενίου που εναποτέθηκε.

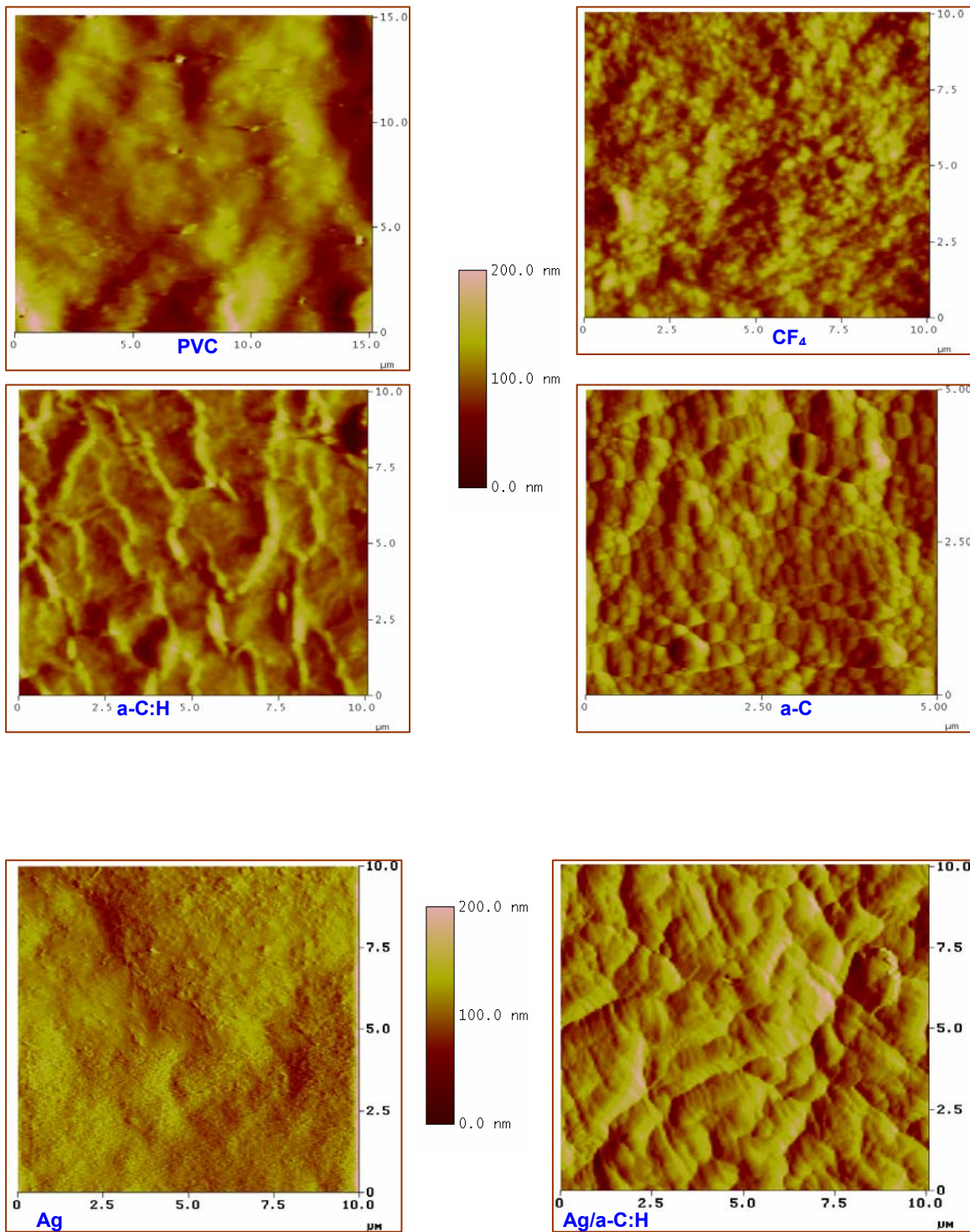
4.2.1.2. Τοπογραφία-Τραχύτητα- Γωνίες Διαβροχής

Εξαιτίας της παρατηρούμενης εναπόθεσης κατά την επεξεργασία με πλάσμα, ήταν αναμενόμενη η αλλαγή της τοπογραφίας αλλά και της τραχύτητας των τροποποιημένων δειγμάτων σε σχέση με το μη τροποποιημένο PVC. Με χρήση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM) λήφθηκαν εικόνες σε διάφορες περιοχές των τροποποιημένων υλικών και αφού ελέγχθηκε η ομοιογένειά τους, επιλέχθηκε να παρουσιαστούν οι εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 4.1.) ως αντιπροσωπευτικές των υλικών.

Από τις εικόνες αυτές (Εικόνα 4.1.) φαίνεται ότι το μη τροποποιημένο PVC είναι ιδιαίτερα τραχύ με βαθιές τάφρους. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε φίλτρο κατά τη λήψη των εικόνων για μείωση του θορύβου που προκαλούσε η ανωμαλία της επιφάνειας. Έτσι το ύψος (*Z range*) των ανωμαλιών εμφανίζεται μικρότερο σε σχέση με το πραγματικό. Όσον αφορά το τροποποιημένο με CF_4 PVC, εμφανίστηκε λιγότερο τραχύ σε σχέση με το PVC, παρότι από τις μετρήσεις με προφιλόμετρο δεν φάνηκε να είχε εναποτεθεί υμένιο. Το λεπτό υμένιο a-C:H φάνηκε να ακολουθεί την τοπογραφία του PVC, αντίθετα τόσο το υμένιο a-C όσο και το υμένιο Ag/ a-C εμφανίστηκαν ως ιδιαίτερα τραχιά. Η εναπόθεση Ag φαίνεται να οδήγησε σε πιο λεία επιφάνεια σε σχέση με το μη τροποποιημένο PVC.

Μετά από επεξεργασία των εικόνων AFM των επιφανειών των υλικών και με χρήση του λογισμικού Nanoscope III, έκδοση 5.12r2 υπολογίστηκε η μέση επιφανειακή τραχύτητα (average surface roughness: *Ra*) των υλικών και φαίνεται στον πίνακα 4.2. Από τις τιμές *Ra* προκύπτει ότι η τροποποίηση με CF_4 και Ag μείωσε το *Ra* ενώ η εναπόθεση a-C το αύξησε σημαντικά, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PVC. Το υμένιο a-C:H δεν μετέβαλλε σημαντικά την τραχύτητα του PVC.

Στον πίνακα 4.2. παρουσιάζονται επίσης οι γωνίες διαβροχής μεταξύ νερού και της επιφάνειας των υλικών. Από τα αποτελέσματα παρατηρείται ότι τα υμένια a-C:H, a-C και Ag/a-C μείωσαν τη γωνία διαβροχής με το νερό. Το Ag δεν μετέβαλλε σημαντικά τη γωνία διαβροχής σε σχέση με το PVC, ενώ το CF_4 προκάλεσε σημαντική αύξηση. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα υμένια a-C:H, a-C και Ag/a-C είναι πιο υδρόφιλα σε σχέση με το PVC, αφού σχηματίζουν μικρότερες γωνίες διαβροχής με το νερό, το οποίο είναι πολικό, ενώ το CF_4 είναι πιο υδρόφοβο.



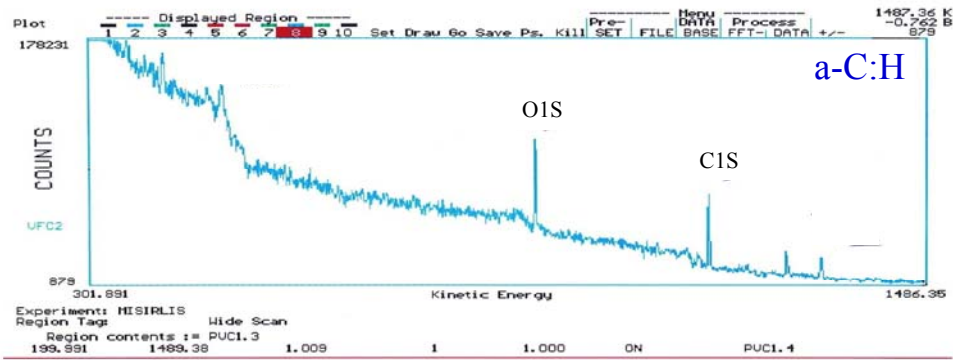
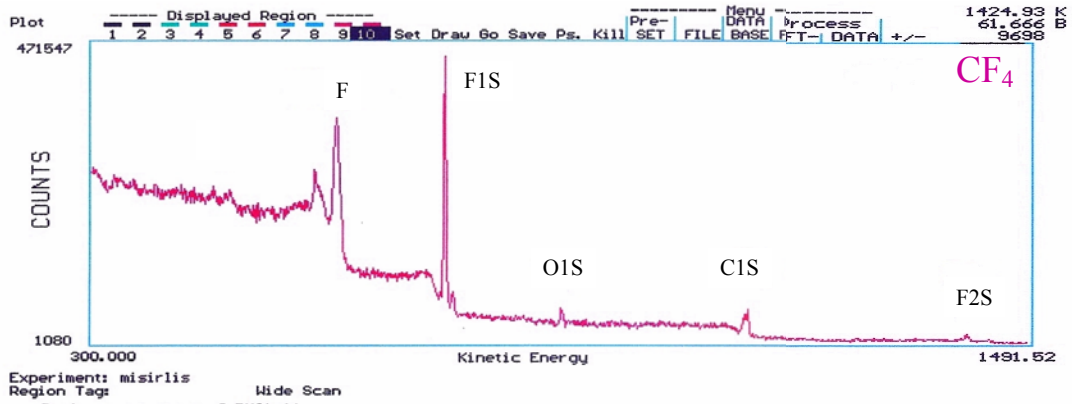
Εικόνα 4.1. Εικόνες AFM των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν και περιγράφονται στον Πίνακα 4.1.

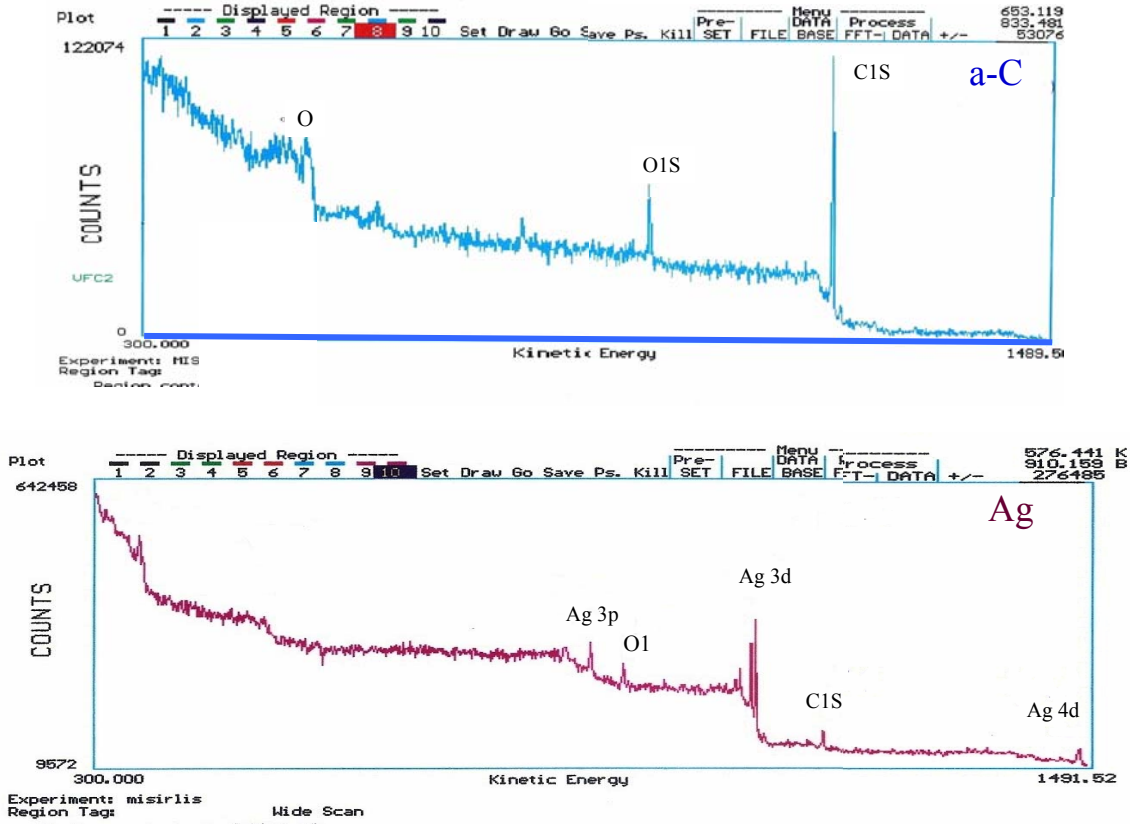
Υλικό	θ νερό (deg)	Ra (nm)
PVC	105.5±1.1	29,2±11,7
CF ₄	141.05±0.2	19,5±1,8
a-C:H	88.8±0.8	25,1±1,6
a-C	85.6±4.8	46,8±2,9
Ag	109.6±0.8	15,6±2,4
Ag/ a-C	93.1 ± 19	33,5±1,7

Πίνακας 4.2. Μέση τιμή και απόκλιση γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού και επιφάνειας των υλικών, και μέση επιφανειακή τραχύτητα: (Ra nm).

4.2.1.3. Χημική Σύσταση Επιφάνειας-XPS

Η μελέτη της χημικής σύστασης, με XPS, της επιφάνειας του τροποποιημένου PVC με CF₄, a-C:H, a-C, και Ag είχε τα εξής αποτελέσματα:





Διάγραμμα 4.1. Φάσματα XPS ευρείας σάρωσης για τα υλικά CF_4 , a-C:H, a-C, και Ag

Από τη μελέτη του διαγράμματος 4.1. επιβεβαιώνεται ότι κατά την επεξεργασία του PVC με CF_4 εισήχθησαν ομάδες με φθόριο, παρότι το πάχος του υμενίου δεν μπορούσε να μετρηθεί. Επομένως, επιβεβαιώθηκε με αυτό τον τρόπο και με τις γωνίες διαβροχής η χημική τροποποίηση της επιφάνειας κατά την επεξεργασία με CF_4 . Στην περίπτωση του a-C:H παρατηρείται ότι τα στοιχεία που κυριαρχούν είναι το Οξυγόνο και ο Άνθρακας, όπως και στην περίπτωση του a-C. Η διαφορά μεταξύ τους είναι ο λόγος O/C, ο οποίος προέκυψε από την ολοκλήρωση των κορυφών Οξυγόνου. Στην περίπτωση του a-C:H ο λόγος O/C ήταν 1.10, ενώ στην περίπτωση του a-C ήταν 0.52. Η διαφορά αυτή οφείλεται στο ότι πριν την εναπόθεση του a-C:H, το δείγμα είχε τροποποιηθεί με πλάσμα Οξυγόνου. Με την XPS ανάλυση επιβεβαιώθηκε επίσης ότι κατά την επεξεργασία του PVC με Ag το στοιχείο που κυριαρχεί είναι το Ag.

4.2.2. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων – Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων των Υλικών

Στον πίνακα 4.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων στα διάφορα υλικά για ρυθμούς διάτμησης 50 s^{-1} , 200 s^{-1} , 500 s^{-1} και 2000 s^{-1} . Η προσκόλληση των δύο στελεχών δεν διέφερε σημαντικά, οπότε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αντιπροσωπεύουν και τα δύο. Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται προέκυψαν από τρία πειράματα για κάθε δείγμα.

Ο συνδυασμός μικροσκοπίων και τεχνικής CFUs επέτρεψε την ποσοτικοποίηση της βακτηριακής προσκόλλησης. Σε περιπτώσεις έντονης συσσωμάτωσης, όπως σε αυτή του PVC, αξιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των CFUs. Ομοίως για την περίπτωση του Ag, γιατί από τη σύγκριση CFUs – SEM διαπιστώθηκε ότι το Ag είχε προκαλέσει ακόμα και βακτηριακό θάνατο. Στην περίπτωση του a-C, αξιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από τη μικροσκοπία φθορισμού γιατί η ανίχνευση των προσκολλημένων βακτηρίων με SEM και AFM ήταν δύσκολη.

Υλικό	N^*E6 50 s^{-1}	N^*E6 200 s^{-1}	N^*E6 500 s^{-1}	N^*E6 2000 s^{-1}
PVC	8.62 ± 0.37	5.32 ± 0.35	3.85 ± 0.36	2.93 ± 0.34
CF ₄	9.17 ± 0.24	5.68 ± 0.23	4.00 ± 0.23	3.12 ± 0.21
a-C:H	4.53 ± 0.22	2.22 ± 0.21	2.14 ± 0.23	1.00 ± 0.22
a-C	3.90 ± 0.34	2.54 ± 0.37	3.51 ± 0.41	2.69 ± 0.34
Ag	3.12 ± 0.19	1.92 ± 0.22	1.50 ± 0.21	0.75 ± 0.22
Ag/ a-C	3.24 ± 0.34	2.45 ± 0.36	2.20 ± 0.33	1.12 ± 0.35

Πίνακας 4.3. Αριθμός Προσκολλημένων Βακτηρίων/cm² (*N*) στα προς εξέταση υλικά για ρυθμούς διάτμησης 50 s^{-1} , 200 s^{-1} , 500 s^{-1} και 2000 s^{-1}

Για τους ρυθμούς διάτμησης 50 s^{-1} και 200 s^{-1} η διαφορά στην προσκόλληση μεταξύ των υλικών ήταν στατιστικά σημαντική για όλα τα ζεύγη, εκτός από τα PVC - CF_4 , a-C:H - a-C και Ag - Ag/ a-C.

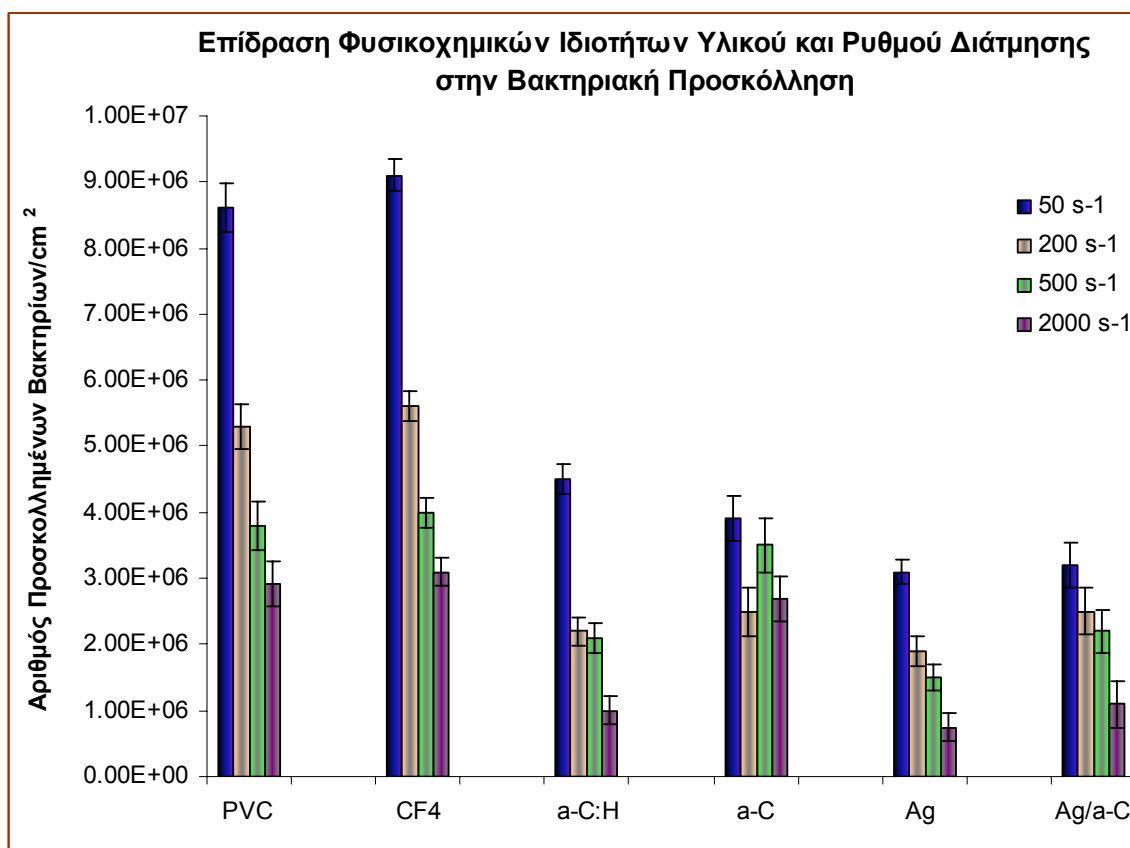
Για τους ρυθμούς διάτμησης 500 s^{-1} και 2000 s^{-1} η διαφορά στην προσκόλληση μεταξύ των υλικών ήταν στατιστικά σημαντική για όλα τα ζεύγη, εκτός από τα PVC- CF_4 - a-C και a-C:H – Ag - Ag/ a-C.

Μεταξύ των ρυθμών διάτμησης 50 s^{-1} - 200 s^{-1} , 50 s^{-1} - 500 s^{-1} , 50 s^{-1} - 2000 s^{-1} , 200 s^{-1} και 2000 s^{-1} , η διαφορά στην προσκόλληση για όλα τα υλικά, εκτός το a-C, ήταν στατιστικά σημαντική.

Μεταξύ των ρυθμών διάτμησης 200 s^{-1} - 500 s^{-1} , η διαφορά στην προσκόλληση ήταν στατιστικά σημαντική για τα υλικά PVC και CF_4 .

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει ότι όλα τα τροποποιημένα υλικά, με εξαίρεση το CF_4 , μείωσαν σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση. Η μεγαλύτερη μείωση εμφανίστηκε στα επεξεργασμένα με Ag και Ag/ a-C, αν και το δεύτερο, για τους περισσότερους ρυθμούς διάτμησης, μείωσε λιγότερο τη βακτηριακή προσκόλληση, σε σχέση με το πρώτο, εξαιτίας πιθανότατα της αυξημένης τραχύτητάς του. Η μείωση της προσκόλλησης σε αυτά τα υλικά δεν φαίνεται να σχετίζεται με τις γωνίες διαβροχής, και άρα την επιφανειακή ενέργεια των δειγμάτων, καθώς οι τιμές των γωνιών διαβροχής τους ήταν παρόμοιες με αυτές του PVC. Η μείωση πρέπει να σχετίζεται με την ικανότητα των ιόντων αργύρου να προσδένονται ισχυρά στις ηλεκτρονιο-δοτικές ομάδες της επιφάνειας των βακτηρίων αποτρέποντας έτσι τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις τους με την επιφάνεια. Στα λεπτά υμένα a-C:H και a-C παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων σε σχέση με το PVC, που φαίνεται να οφείλεται στην μειωμένη γωνία διαβροχής τους, και άρα στην αυξημένη επιφανειακή τους ενέργεια, σε σχέση με το PVC. Το a-C όμως προκάλλεσε αυξημένη προσκόλληση σε σχέση με το a-C:H, για όλους τους ρυθμούς διάτμησης, εκτός από το 50 s^{-1} . Η σχετικά αυξημένη προσκόλληση στο a-C, ακόμα και για μεγάλους ρυθμούς διάτμησης, φαίνεται να σχετίζεται με την τοπογραφία και την τραχύτητά του, η οποία ήταν αυξημένη σε σχέση με όλα τα άλλα υλικά, αλλά και με τη μικρότερη τιμή του λόγου O/C, σε σχέση με το a-

C:H. Επιπρόσθετα, η αύξηση αυτή της τραχύτητας φαίνεται να αύξησε την διαθέσιμη επιφάνεια για προσκόλληση αλλά και να παρείχε προστασία στα προσκολλημένα βακτήρια, οπότε αυτά δεν αποκολλήθηκαν ακόμα και όταν ο ρυθμός διάτμησης ήταν 2000 s^{-1} . Το CF_4 αύξησε σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση σε σχέση με το PVC για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} , εξαιτίας της υδροφοβικότητάς του και άρα της μειωμένης επιφανειακής του ενέργειας. Με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης όμως, παρατηρήθηκε ότι η βακτηριακή προσκόλληση στο CF_4 ήταν παρόμοια με αυτή στο μη επεξεργασμένο PVC. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στο διάγραμμα 4.2.

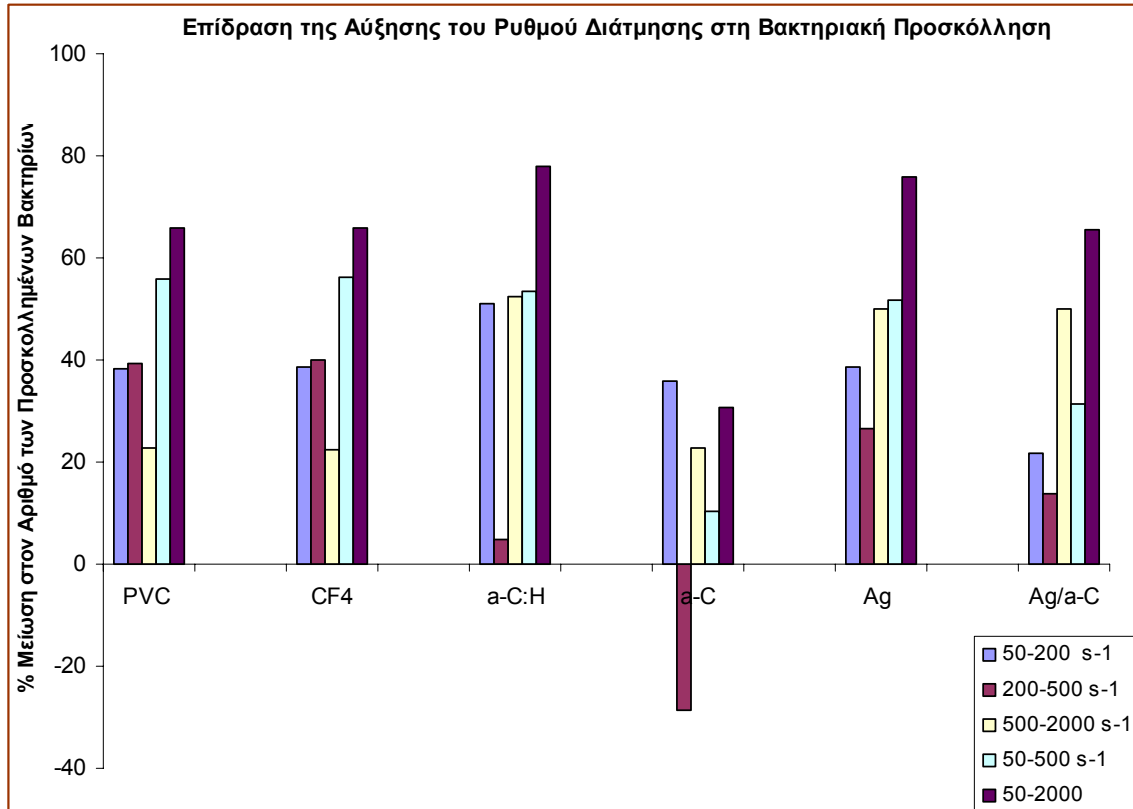


Διάγραμμα 4.2. Επίδραση Φυσικοχημικών ιδιοτήτων επιφάνειας υλικού και ρυθμού διάτμησης στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων.

4.2.3. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων – Ρυθμού Διάτμησης

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2., αλλά και στο διάγραμμα 4.2., προκύπτει ότι η σταδιακή αύξηση του ρυθμού διάτμησης, προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων για όλα τα υλικά, με εξαίρεση το a-C, το οποίο εμφάνισε μια ιδιόμορφη συμπεριφορά. Σε όλα τα υλικά, η μέγιστη μείωση στην προσκόλληση προκλήθηκε από την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 s^{-1} σε 2000 s^{-1} . Στα υλικά a-C:H, Ag και Ag/ a-C, η αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 200 s^{-1} σε 500 s^{-1} δεν επηρέασε σημαντικά την προσκόλληση, ενώ στα υλικά PVC και CF_4 τη μείωσε κατά περίπου 40 %. Το a-C εμφάνισε αυξημένη προσκόλληση για ρυθμό διάτμησης 500 s^{-1} , σε σχέση με το ρυθμό διάτμησης 200 s^{-1} , και η προσκόλληση ήταν παρόμοια με του ρυθμού διάτμησης 50 s^{-1} . Με αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 500 s^{-1} σε 2000 s^{-1} η βακτηριακή προσκόλληση μειώθηκε σημαντικά σε όλα τα υλικά.

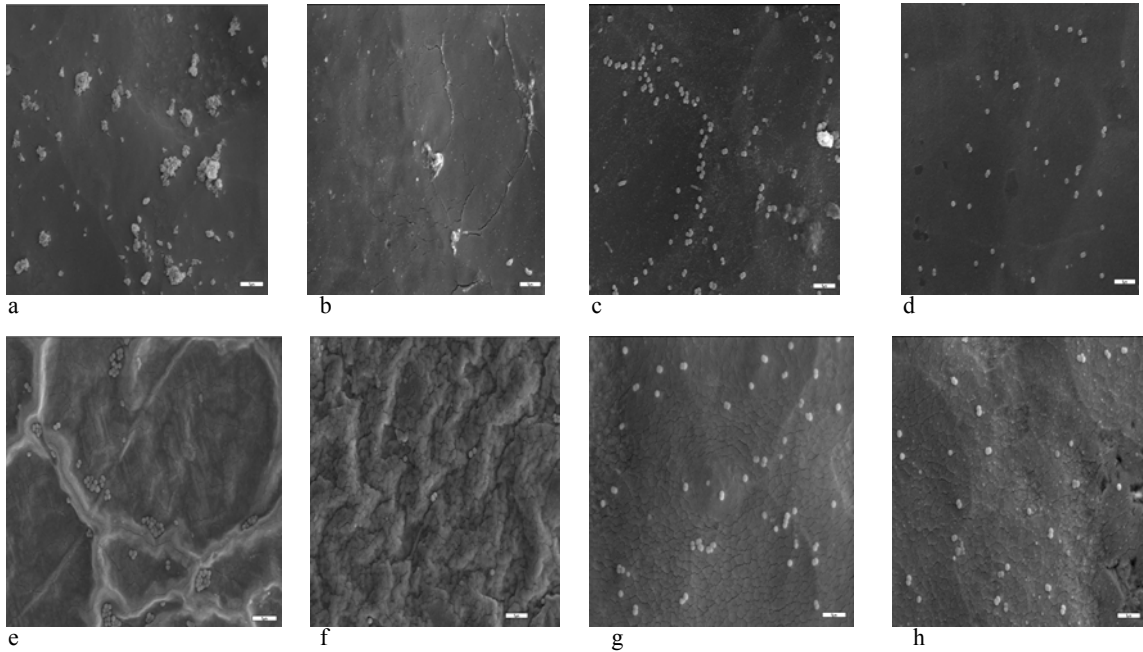
Η μέγιστη μείωση στη βακτηριακή προσκόλληση σε όλα τα υλικά εμφανίστηκε για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , σε σχέση με τους άλλους ρυθμούς διάτμησης. Είναι αξιοσημείωτο ότι για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , τα υλικά PVC, CF_4 και a-C εμφάνισαν παρόμοιο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων και μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως, για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , τα υλικά a-C:H, Ag και Ag/ a-C δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά στην προσκόλληση. Από αυτό προκύπτει ότι για μεγάλους ρυθμούς διάτμησης, υλικά με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, εμφανίζουν μη σημαντικές διαφορές και άρα ότι οι διατμητικές δυνάμεις που ασκούνται στα βακτηριακά κύτταρα λόγω ροής είναι αυτές που κυριαρχούν και καθορίζουν το αποτέλεσμα. Σε μικρότερους ρυθμούς διάτμησης, η φυσικοχημεία της επιφάνειας και η τραχύτητά της είναι οι παράγοντες που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και υλικών και άρα τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων. Τα αποτελέσματα αυτά συνοψίζονται στα διαγράμματα 4.2. και 4.3.



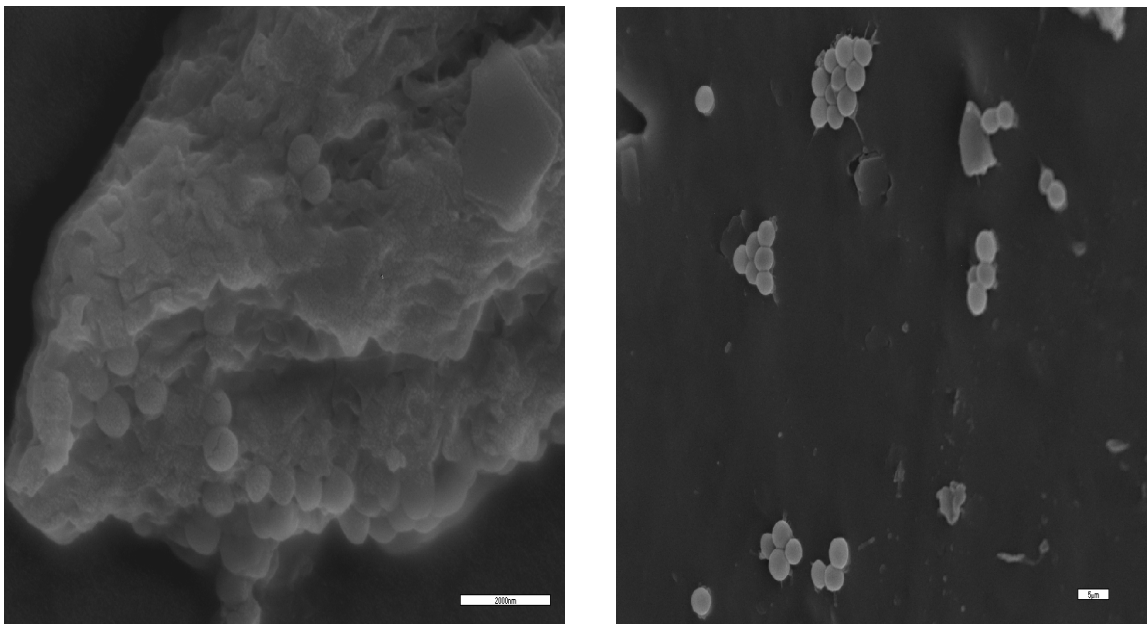
Διάγραμμα 4.3. Επίδραση της αύξησης του ρυθμού διάτμησης στην % μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων

Η εικόνα 4.2. παρουσιάζει τη μορφολογία των προσκολλημένων βακτηρίων, για ρυθμούς διάτμησης 50 s^{-1} και 2000 s^{-1} , όπως αυτή παρατηρήθηκε με SEM. Είναι αξιοσημείωτο ότι για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} , τα προσκολλημένα βακτήρια ήταν με τη μορφή συσσωματωμάτων σε όλα τα υλικά, εκτός από το Ag. Στην περίπτωση του Ag, τα προσκολλημένα βακτήρια εμφανίστηκαν μεμονωμένα. Με δεδομένο ότι η διαδικασία σχηματισμού βιομεμβράνης (biofilm) περιλαμβάνει δύο στάδια, το στάδιο της προσκόλλησης και αυτο της συσσωμάτωσης, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι το PVC προάγει όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και το σχηματισμό biofilm περισσότερο ή τουλάχιστον σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση κυρίως με το Ag. Η εικόνα 4.3. παρουσιάζει την προσκόλληση των βακτηρίων στο PVC για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} και 2000 s^{-1} σε μεγαλύτερη μεγέθυνση, καθώς τότε φαίνεται ξεκάθαρα ο σχηματισμός biofilm στα 50 s^{-1} αλλά και η παραγωγή εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας (slime) στα

2000 s^{-1} . Στην περίπτωση του υλικού Ag, τα ιόντα αργύρου προσδένονται ισχυρά στις ηλεκτρονιο-δοτικές ομάδες της επιφάνειας των βακτηρίων αποτρέποντας τόσο τις μεταξύ τους ελκτικές αλληλεπιδράσεις όσο και με την επιφάνεια του υλικού (Chaw et al., 2005).



Εικόνα 4.2. Εικόνες SEM των προσκολλημένων βακτηρίων στα υλικά: PVC, CF_4 , a-C:H και Ag για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} (a, c, e, g) και 2000 s^{-1} (b, d, f, h) αντίστοιχα. Οι εικόνες λήφθηκαν σε μεγέθυνση $\times 2000$, οπότε η γραμμή στη δεξιά κάτω άκρη των εικόνων αντιστοιχεί σε $5\mu\text{m}$.



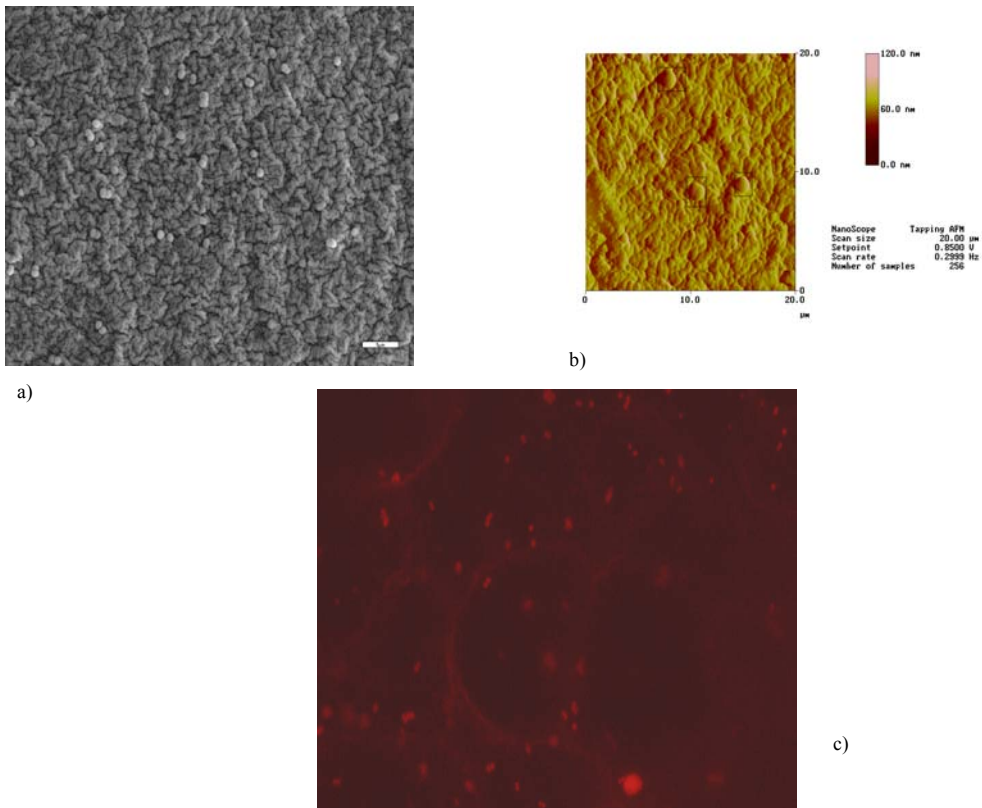
Εικόνα 4.3. Εικόνες SEM των προσκολλημένων βακτηρίων στο PVC για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} (αριστερή εικόνα x 5000) και 2000 s^{-1} (ξιά εικόνα x 4000)

Για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων ήταν πολύ μικρότερος για όλα τα υλικά, σε σχέση με το ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} , και ειδικά στην περίπτωση του PVC, το μέγεθος των συσσωματωμάτων ήταν πολύ μικρότερο.

Με δεδομένο ότι η διατμητική δύναμη, λόγω ροής, που ασκείται στα βακτήρια που προσεγγίζουν την επιφάνεια, αλλά και στα προσκολλημένα, είναι ανάλογη της ακτίνας του βακτηρίου (Κεφάλαιο 2, ροή) στην περίπτωση των συσσωματωμάτων, η ακτίνα είναι πολύ μεγαλύτερη αυτής του μεμονωμένου βακτηρίου και άρα η δύναμη διάτμησης που τους ασκείται είναι επίσης μεγαλύτερη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο μεγάλος ρυθμός διάτμησης να προκαλεί αποκόλληση των συσσωματωμάτων πιο εύκολα από ότι σε σχέση με τα μεμονωμένα κύτταρα. Το φαινόμενο αυτό οδήγησε σε μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης αλλά και του μεγέθους των συσσωματωμάτων στην περίπτωση του PVC.

Συγκρίνοντας τη μείωση που προέκυψε στη βακτηριακή προσκόλληση με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 200 s^{-1} σε 500 s^{-1} για τα υλικά PVC και Ag προκύπτει ότι η μείωση ήταν μεγαλύτερη για το PVC.

Η εικόνα 4.4. παρουσιάζει εικόνες SEM, AFM και μικροσκοπίου φθορισμού της βακτηριακής προσκόλλησης στο υλικό a-C για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} . Οι εικόνες από SEM και AFM παρέχουν πληροφορίες για τη θέση των προσκολλημένων βακτηρίων σε σχέση με την τοπογραφία του υλικού, ενώ η εικόνα μικροσκοπίου φθορισμού έκανε πιο εύκολη την ανίχνευση των βακτηριακών κυττάρων, ειδικά στην περίπτωση του a-C, καθώς η τοπογραφία του είχε παρόμοια μορφολογία-αντίθεση με τα συσσωματωμένα βακτήρια. Ακόμα και στην περίπτωση του μικροσκοπίου φθορισμού η εστίαση ήταν δύσκολη εξαιτίας της αυξημένης τραχύτητάς του.



Εικόνα 4.4. Εικόνες SEM (a), AFM (b) και μικροσκοπίου φθορισμού της βακτηριακής προσκόλλησης στο υλικό a-C (c) για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} .

Κεφάλαιο 5

***Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων
Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυτερεφθαλικού
Αιθυλενεστέρα με Τεχνική Πλάσματος, του Φαινομένου Γήρανσης
και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση των Βακτηρίων***

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων σε υμένια Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα (Polyethylene Terephthalate: PET) και επιφανειακά τροποποιημένου PET σε εκκενώσεις He/O₂ και CH₄/H₂. Στην περίπτωση των τροποποιημένων υμενίων PET σε εκκενώσεις He/O₂ μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου γήρανσης τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας όσο και στην προσκόλληση των βακτηρίων, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες.

Η τροποποίηση των υμενίων παραγματοποιήθηκε στον αντιδραστήρα πλάσματος που βρίσκεται στο Εργαστήριο Τεχνολογίας Πλάσματος του Τμήματος των Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών, από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κο Ματαρά και τον Επιστημονικό συνεργάτη-Διδάκτορα Κο Αμανατίδη.

Το κεφάλαιο αυτό χωρίζεται σε δύο υποκεφάλαια. Το πρώτο υποκεφάλαιο (5.1.) περιλαμβάνει τα αποτελέσματα της βακτηριακής προσκόλλησης, κάτω από στατικές συνθήκες, σε υμένια Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα (PET) και επιφανειακά τροποποιημένου PET σε εκκενώσεις He/O₂ και CH₄/H₂. Στο υποκεφάλαιο αυτό εξετάζεται η επίδραση των συνθηκών της εκκένωσης στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας των υμενίων και στο πώς αυτές επηρεάζουν τη βακτηριακή προσκόλληση.

Στο δεύτερο υποκεφάλαιο (5.2.) μελετάται το φαινόμενο της γήρανσης στο οποίο υπόκεινται τα επιφανειακά τροποποιημένα υμένια PET σε εκκενώσεις He/O₂ και το πώς αυτό επηρεάζει την προσκόλληση των βακτηρίων. Συγκεκριμένα, μελετάται η επίδραση του χρόνου γήρανσης τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού όσο και στην προσκόλληση των βακτηρίων, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες.

Και στα δύο υποκεφάλαια γίνεται μία προσπάθεια εξήγησης των πειραματικών αποτελεσμάτων μέσω της Θερμοδυναμικής Θεωρίας που περιγράφηκε στο δεύτερο κεφάλαιο και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.1.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση μειώνεται με την αύξηση της επιφανειακής ενέργειας και του πολικού χαρακτήρα των υλικών, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά από το μη πολικό τους χαρακτήρα, ο οποίος άλλωστε δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διαδικασία των τροποποιήσεων αλλά και του χρόνου γήρανσης. Και οι δύο προσεγγίσεις της Θερμοδυναμικής Θεωρίας «dispersion-polar» και

«Lifshitz van der Waals- Acid Base» εξήγησαν ικανοποιητικά την παρατηρούμενη προσκόλληση με την «dispersion-polar» να υπερέχει. Η δεύτερη προσέγγιση ανέδειξε τη σημασία του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα υλικών και βακτηρίων στην προσκόλληση. Αύξηση του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα προκάλεσε μείωση της προσκόλλησης. Ο ρυθμός διάτμησης αποδείχτηκε ως ένας επίσης παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά την ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται και μάλιστα μειώνει την προβλεψιμότητα της Θερμοδυναμικής Θεωρίας.

Εισαγωγή

Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 1 και συγκεκριμένα στις παράγραφους 1.2.6. και 1.2.7., το κρίσιμο στάδιο για την εμφάνιση λοιμώξεων σχετιζόμενων με την παρουσία βιοϋλικών, είναι η βακτηριακή προσκόλληση στην επιφάνεια του υλικού. Η προσκόλληση είναι το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικού (Heilmann et al., 1996). Τόσο οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις (μη ειδικές) όσο και οι ειδικές αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη (receptor-ligand), στην περίπτωση επικαλυμμένων υλικών με πρωτεΐνες πλάσματος, καθώς επίσης και οι συνθήκες ροής συμβάλλουν στη δυνατότητα του βακτηριακού κυττάρου να συνδεθεί με την επιφάνεια του υλικού. Εντούτοις, η σχετική συμβολή τους στη διαδικασία της βακτηριακής προσκόλλησης δεν είναι πλήρως γνωστή (Gray et al., 1984; Duguid et al., 1992; Hermansson et al., 1999).

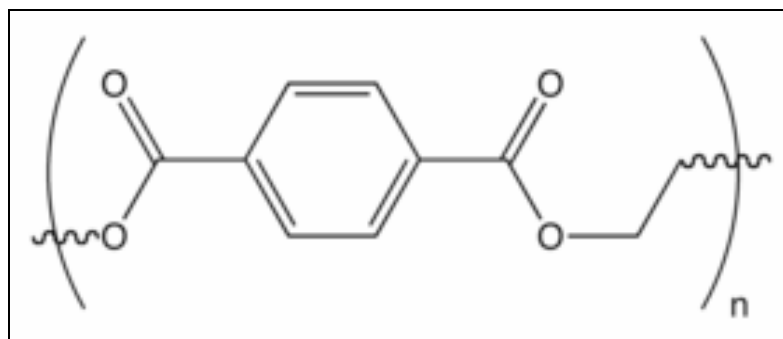
Ελλείψει των ειδικών αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-προσδέτη (receptor-ligand), δηλαδή απουσία πρωτεϊνών, τα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν άμεσα στην επιφάνεια του υλικού μέσω των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων. Σε αυτήν την περίπτωση, η αρχική φάση προσκόλλησης κυβερνάται κατά ένα μεγάλο μέρος από αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικές, πολικές (p ή οξέος-βάσεως: AB) και αλληλεπιδράσεις διασποράς (d ή Lifshitz-van der Waals: LW) μεταξύ των βακτηρίων και της επιφάνειας του υλικού (Israelachvili, 1992; Heilmann et al., 1996).

Μόλις οι μικροοργανισμοί φθάνουν στην επιφάνεια του υλικού, υπό στατικές συνθήκες, θα προσελκυσθούν ή αποκρουσθούν από αυτήν, ανάλογα με το ποσό αυτών των αλληλεπιδράσεων. Δεδομένου ότι η διαδικασία της βακτηριακής προσκόλλησης στις ενδοφλέβιες ιατρικές συσκευές συνδέεται με ροή (Goldsmith and Turitto, 1986; Duguid et al., 1992), οι φυσικές δυνάμεις όπως η διάτμηση που παράγεται από την αιμοδυναμική

της περιοχής στην οποία βρίσκεται το εμφύτευμα, επηρεάζουν την διαδικασία της προσκόλλησης, άρα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη.

Σε αυτή την κατεύθυνση, μελετήθηκε η επίδραση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας υμενίου PET και επιφανειακά τροποποιημένου PET σε εκκενώσεις He/O₂ και CH₄/H₂ στην προσκόλληση των βακτηρίων και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο υποκεφάλαιο 5.1. Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου γήρανσης τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες υμενίων PET που είχαν τροποποιηθεί σε εκκενώσεις He/O₂ όσο και στην προσκόλληση των βακτηρίων, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο υποκεφάλαιο 5.2.

Το **PET** επιλέχθηκε επειδή είναι ένα πολυμερές το οποίο χρησιμοποιείται ως βιοϋλικό για την κατασκευή εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών όπως ράμματα για τεχνητές καρδιακές βαλβίδες και τεχνητά αιμοφόρα αγγεία. Παρότι όμως χρησιμοποιείται ευρέως ως βιοϋλικό, λόγω των καλών μηχανικών ιδιοτήτων και της σχετικά καλής βιοσυμβατότητάς του (Kannan et al., 2005), η μακροχρόνια χρήση του παρεμποδίζεται από την εμφάνιση λοιμώξεων που σχετίζονται με αυτό, όπως άλλωστε συμβαίνει με τα περισσότερα τεχνητά υλικά. Εκείνο που το χαρακτηρίζει είναι η μειωμένη διαβρεξιμότητα και άρα η μικρή επιφανειακή ενέργεια εξαιτίας της έλλειψης πολικών ομάδων όπως -COOH και -OH. Η διαβρεξιμότητα ενός δείγματος χαρακτηρίζεται από τη γωνία διαβροχής, δηλαδή από τη γωνία που σχηματίζει μία σταγόνα νερού συγκεκριμένου όγκου με την επιφάνεια του υλικού. Μικρές γωνίες σχηματίζονται σε υλικά μειωμένης διαβρεξιμότητας (Παράρτημα 4: Γωνιόμετρο). Η χημική δομή του **PET** φαίνεται στο σχήμα 5.1.



Σχήμα 5.1. Χημική δομή του PET

Το **Ήλιο** αποτελεί ένα αέριο ιδιαίτερης προτίμησης όσων ασχολούνται με την τροποποίηση επιφανειών με την τεχνική του πλάσματος γιατί είναι αρκετά απλό στη χρήση, οικονομικό, ασφαλές και ακίνδυνο για το χρήστη. Χρησιμοποιείται στην επεξεργασία πολυμερικών επιφανειών στις εκκενώσεις αίγλης ραδιοσυχνότητας που αποτελεί μια μέθοδο ιδιαίτερα διαδεδομένη στη βιβλιογραφία (Schonhorn και Hansen, 1967). Η επεξεργασία αυτή μπορεί να βελτιώσει τις επιφανειακές ιδιότητες του υλικού όπως τη συνάφεια με άλλα υλικά, την αντοχή, τη διαβρεξιμότητα αλλά και τη βιοσυμβατότητα (Placinta et al., 1997; France και Short, 1998; Gupta et al., 2000). Χρησιμοποιείται επίσης συχνά ως αέριο προεπεξεργασίας ενός υμενίου πολυμερούς που στη συνέχεια υπόκειται σε διαδικασία επεξεργασίας με άλλο ενεργό αέριο.

Εφόσον το Ήλιο είναι αδρανές αέριο αναμένεται η επίδρασή του στο υλικό που έρχεται σε επαφή κατά την εκκένωση αίγλης να είναι καθαρά φυσικού χαρακτήρα (physical sputtering) και όχι χημικού (chemical modification). Η μεταφερόμενη ενέργεια από το πλάσμα στο υλικό είναι ικανή να προκαλέσει διάσπαση δεσμών και απελευθέρωση μικρών μορίων στην αέρια φάση, προϊόντων της αποικοδόμησης του υλικού. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται εγχάραξη. Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι κατά την τροποποίηση με πλάσμα ηλίου δημιουργείται μιας σταθερή διεπιφάνεια που κυριαρχείται από σταυροδεσμούς, μεταξύ του κύριου όγκου (bulk) του πολυμερούς και της επιφάνειάς του (Weidner et al., 1998; France και Short, 1998). Η διαμόρφωση αυτή περιορίζεται σε μικρό βάθος από την επιφάνεια, αφήνοντας τον κύριο όγκο ανεπηρέαστο. Παράλληλα όμως, το ενεργό οξυγόνο (ιόντα, ρίζες) που απελευθερώνεται από το πολυμερές ως προϊόν αποικοδόμησης κατά τη διάρκεια της διαδικασίας πλάσματος μπορεί να προκαλέσει οξείδωση της επιφάνειας (Clark και Dilks, 1978; Gheorghiu et al., 1997). Τόσο η δημιουργία σταυροδεσμών όσο και η οξείδωση μπορούν να αποδοθούν στην ενέργεια μεγάλου ποσού που είναι σε θέση να μεταφέρει στην πολυμερή επιφάνεια. Το μετασταθές Ήλιο τριπλής κατάστασης He_m^* είναι αυτό που αλληλεπιδρά με την επιφάνεια και μπορεί να δημιουργηθεί μετά από σύγκρουση με ηλεκτρόνια. Επιστρέφοντας στη θεμελιώδη στάθμη απελευθερώνεται ενέργεια περίπου ίση με 20 eV.

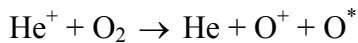
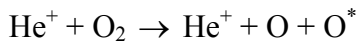
Το **Οξυγόνο** είναι ένα από τα αποκαλούμενα δραστικά αέρια και η αλληλεπίδρασή του με την επιφάνεια ενός πολυμερούς σε εκκενώσεις αίγλης έχει ως συνέπεια την τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της. Η επεξεργασία πολυμερών με πλάσμα οξυγόνου εμφανίζει ως κύριο χαρακτηριστικό την εισαγωγή νέων χαρακτηριστικών ομάδων στην επιφάνεια του υμενίου που περιέχουν Οξυγόνο και τέτοιες είναι ομάδες αιθέρα, υδροξυλίου, καρβονυλίου ή καρβοξυλικές. Στη συνέχεια ακολουθεί αποικοδόμηση του υλικού. Μάλιστα, έχει αποδειχτεί, ότι ο σχηματισμός των χαρακτηριστικών ομάδων συμβαίνει κατά τα πρώτα δευτερόλεπτα της έκθεσης του πολυμερούς στο πλάσμα και σε αυτό το στάδιο η αποικοδόμηση του μπορεί να θεωρηθεί αμελητέα. Για μεγαλύτερους όμως χρόνους επεξεργασίας εμφανίζεται κατακερματισμός της ανθρακικής αλυσίδας και μεταβολές στον προσανατολισμό άρα εγχάραξη (Briggs et al., 1980).

Αν και μεγάλο πλήθος αντιδράσεων λαμβάνουν χώρα στην αέρια φάση σε πλάσμα Οξυγόνου, είναι γενικά παραδεκτό ότι το ατομικό Οξυγόνο είναι το πιο ενεργό συστατικό. Τον κύριο μηχανισμό σχηματισμού του αποτελεί η διάσπαση των μορίων O_2 μετά από επίδραση ηλεκτρονίου. Συνεπώς η παραγωγή ατόμων Οξυγόνου εξαρτάται από την πυκνότητα και την ενέργεια των ηλεκτρονίων της εκκένωσης. Η ιδιαιτερότητα της συμπεριφοράς του Ο οφείλεται στο γεγονός ότι μέρος του που βρίσκεται στην αέρια φάση καταναλώνεται στην επιφάνεια του πολυμερικού υλικού, ενώ κατά την αποικοδόμηση του πολυμερούς ατομικό Οξυγόνο διαχέεται προς την περιοχή του πλάσματος, εμφανίζοντας τελικά ένα κυκλικό φαινόμενο. Σε συνθήκες δε χαμηλής πίεσης σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν και τα ιόντα O_2^+ . Τα αρνητικά ιόντα δε λαμβάνονται υπόψη (Παπακωνσταντίνου, Διδακτορική Διατριβή).

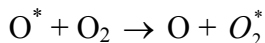
Η τροποποίηση πολυμερούς τόσο σε εκκένωση Ηλίου όσο και σε εκκένωση οξυγόνου έχουν ως συνέπεια, εκτός από την απομάκρυνση οργανικού υλικού, αύξηση στην διαβρεξιμότητα, στον πολικό χαρακτήρα του υλικού και στην επιφανειακή του ενέργεια. (Παπακωνσταντίνου, Διδακτορική Διατριβή)

Οι ιδιότητες του μίγματος **Ηλίου–Οξυγόνου** είναι συνδυασμός των όσων αναφέρθηκαν παραπάνω. Η αλληλεπίδραση της εκκένωσης αίγλης Οξυγόνου στο υπό επεξεργασία πολυμερές έχει καθαρά χημικό χαρακτήρα ενώ αυτή του αέριου Ηλίου είναι εγχάραξη φυσικού τύπου. Στο μίγμα Ηλίου–Οξυγόνου συμβαίνουν ελαστικές

συγκρούσεις μεταξύ των μετασταθών διεγερμένων ατόμων Ηλίου He^m και των προσαρτημένων ατόμων Οξυγόνου που οδηγεί στον ιονισμό του Οξυγόνου. Το φαινόμενο αυτό εκφράζεται από τις παρακάτω αντιδράσεις:



Αυξάνοντας το ποσοστό του Οξυγόνου στο μίγμα παρατηρείται μείωση του πληθυσμού του διεγερμένου ατομικού οξυγόνου:



Η ταυτόχρονη επεξεργασία πολυμερών με πλάσμα He και O_2 παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον γιατί οδηγεί σε οξείδωση της επιφάνειάς τους και σε ταυτόχρονη δημιουργία σταυροδεσμών. Η επεξεργασία αυτή είναι αρκετά σύντομη ενώ σημαντικές μεταβολές στη χημική σύσταση της επιφάνεια συντελούνται στα πρώτα δύο λεπτά λειτουργίας της εκκένωσης και οδηγούν σε αύξηση του πολικού χαρακτήρα και της επιφανειακής ενέργειας του πολυμερούς. Όταν αυτοί οι δύο μηχανισμοί συντελούνται συγχρόνως επιτυγχάνουν μια ενεργή επιφάνεια η οποία εμφανίζει σταθερότητα στο χρόνο (Clark και Dilks, 1979; Placinta et al., 1997; Inagaki et al., 2004; Papakonstantinou et al., 2007). Η ανταγωνιστική δράση των δύο παραπάνω μηχανισμών εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση του μίγματος, δηλαδή από το ποσοστό του κάθε αερίου που μετέχει στην εκκένωση.

Γήρανση του πολυμερούς ονομάζεται το φαινόμενο κατά το οποίο οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού μεταβάλλονται σε συνάρτηση με το χρόνο αποθήκευσης. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην κινητικότητα των οργανικών αλυσίδων που επιτρέπει στις επιφάνειες των πολυμερών να αποκρίνονται στις μεταβολές της επιφανειακής ενέργειας και συνεπώς να προσαρμόζουν τη χημική τους δομή στο περιβάλλον που βρίσκονται. Μέσω των περιστροφικών και μεταφορικών τους κινήσεων,

η χημική σύσταση της επιφάνειας μπορεί να μεταβληθεί με σκοπό την ελαχιστοποίηση της διεπιφανειακής ενέργειας (Παπακωνσταντίνου, Διδακτορική Διατριβή)

Κατά την τροποποίηση του PET σε εκκενώσεις He/O₂, δημιουργούνται στην επιφάνεια πολικές ομάδες που είναι υπεύθυνες για τον υδρόφιλο χαρακτήρα του υλικού. Καθώς τα υλικά βρίσκονται στον αέρα, δηλαδή σε ένα μη πολικό μέσο, το φαινόμενο της γήρανσης οφείλεται κυρίως στην ανακατάταξη του υλικού και ειδικότερα στην τάση των πολικών ομάδων να κατευθύνονται στον κύριο όγκο του υλικού (bulk) και έτσι να απομακρύνονται από την επιφάνεια. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή της επιφανειακής ενέργειας του υλικού με το χρόνο και συγκεκριμένα τη μείωσή της. Το φαινόμενο της γήρανσης εξαρτάται από τις συνθήκες της τροποποίησης του πολυμερούς και συγκεκριμένα από τη χημική σύσταση του αέριου μίγματος και όλες τις άλλες συνθήκες που χαρακτηρίζουν την εκκένωση. Έτσι ένα υλικό που έχει τροποποιηθεί ταυτόχρονα με πλάσμα He και O₂ είναι πιο σταθερό από αυτό που έχει τροποποιηθεί σε πλάσμα He ή O₂ και αυτό γιατί το πρώτο οδηγεί στο σχηματισμό ενός πιο συνεκτικού στρώματος μεταξύ της ανώτατης επιφάνειας και της μάζας του υλικού (Clark και Dilks, 1979; Placinta et al., 1997; Inagaki et al., 2004; Papakonstantinou et al., 2007).

Η **εναπόθεση άμορφων λεπτών υμενίων άνθρακα a-C:H** ή με τη μορφή αδάμαντα (Diamond Like Carbon: DLC) σε εκκενώσεις CH₄/H₂, όπως περιγράφηκε και στο προηγούμενο κεφάλαιο, έχει αρχίσει να μελετάται συστηματικά και να χρησιμοποιείται προκειμένου να βελτιώσει τις χημικές και μηχανικές ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών (Dowling et al., 1997; Dowling et al., 1998; Wang et al., 2004).

5.1. Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενοστερά σε Εκκενώσεις He/O₂ και CH₄/H₂ στην Προσκόλληση των Βακτηρίων

5.1.1. Υλικά και Μέθοδοι

5.1.1.1. Υλικά

Στο παρόν υποκεφάλαιο, ως υποστρώματα για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

ι) Υμένα Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενοστερά (Polyethylene Terephthalate: PET) πάχους 100 μm, ημικρυσταλλικά, διαξονικού προσανατολισμού και κατασκευασμένα από την εταιρεία GoodFellow. Τα υμένα αυτά εμφανίζουν θερμική σταθερότητα, καλή μηχανική αντοχή και είναι χημικά αδρανή.

ιι) Επιφανειακά Τροποποιημένα Υμένα PET σε Εκκενώσεις He/O₂.

Ο αντιδραστήρας περιγράφεται στο Παράρτημα 2.

Συνοπτικά, ο κύριος θάλαμος του αντιδραστήρα είναι κατασκευασμένος από ανοξείδωτο ατσάλι, κυλινδρικής συμμετρίας και διαμέτρου 160 mm. Στο εσωτερικό του θαλάμου βρίσκονται δύο παράλληλα ηλεκτρόδια, σε σχήμα δίσκων, μεταξύ των οποίων πραγματοποιείται η εκκένωση αίγλης ραδιοσυχνότητας (RF). Ως «πολωμένο» (RF) ηλεκτρόδιο χαρακτηρίζεται το ηλεκτρόδιο που τροφοδοτείται με dc τάση και ως «γειωμένο» (Ac ή Dc) το ηλεκτρόδιο στο οποίο στηρίζεται το πολυμερές (ο όρος γειωμένο ηλεκτρόδιο είναι σχετικός, καθώς όπως θα δούμε παρακάτω σε πολλά πειράματα πολώνεται με dc ή ac τάση). Τα ηλεκτρόδια είναι ίδιων διαστάσεων. Η διάμετρος τους είναι 55 mm, είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι και η μεταξύ τους απόσταση είναι 25 mm.

Πριν την είσοδο του PET στον αντιδραστήρα πλάσματος, αυτό καθαρίζεται για 1 λεπτό σε λουτρό υπερήχων με μεθανόλη. Στην συνέχεια ακολούθησε η τροποποίησή του στις διάφορες εκκενώσεις. Η πίεση λειτουργίας της εκκένωσης ρυθμίστηκε στα 33.34 ή 67.70 Pa και διατηρήθηκε σε αυτή την τιμή καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η συνολική παροχή των αερίων ήταν 20 sccm, η παροχή τάσης στο

γειωμένο ηλεκτρόδιο (Dc bias) $V_b = -30$ Volt και η συχνότητα διέγερσης 13.56 MHz. Η συγκεκριμένη πίεση και το δυναμικό πόλωσης του γειωμένου ηλεκτροδίου επιλέχθηκαν προκειμένου να μειώσουν το φαινόμενο γήρανσης (Παπακωνσταντίνου, Διδακτορική Διατριβή). Η καταναλισκόμενη ισχύς στον αντιδραστήρα διατηρήθηκε σταθερή, μέσω των ηλεκτρικών μετρήσεων, στα 1,2 Watt και ο χρόνος τροποποίησης των δειγμάτων ήταν 15 λεπτά. Η παράμετρος που μεταβάλλονταν ήταν οι επιμέρους αναλογίες των δύο αερίων στο μίγμα. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση της αναλογίας He/O₂ τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού όσο και στη βακτηριακή προσκόλληση.

iii) Επιφανειακά Τροποποιημένα Υμένια PET σε Εκκενώσεις CH₄/H₂

Η εναπόθεση των υμενίων άμορφου υδρογονομένου άνθρακα (a-C:H) έγινε στον αντιδραστήρα που περιγράφηκε αμέσως παραπάνω. Πριν την εναπόθεση έγινε μια προεπεξεργασία στα δείγματα PET σε εκκένωση He για 10 λεπτά με σκοπό να καθαριστεί η επιφάνεια από τυχόν προσμίξεις, να αυξηθεί η επιφανειακή ενέργεια και να έχουμε καλύτερη συνάφεια με την εναπόθεση του a-C:H. Στην συνέχεια ακολούθησε η εναπόθεση του a-C:H στις διάφορες εκκενώσεις. Η πίεση λειτουργίας της εκκένωσης ρυθμίστηκε στα 67.70 Pa και διατηρήθηκε σε αυτή την τιμή καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η αναλογία CH₄/H₂ ήταν 1/1. Η συνολική παροχή των αερίων ήταν 20 sccm, η συχνότητα διέγερσης 13.56 MHz και το δυναμικό του πολωμένου ηλεκτροδίου 300 Volt. Η καταναλισκόμενη ισχύς στον αντιδραστήρα υπολογίστηκε μέσω των ηλεκτρικών μετρήσεων, και ο χρόνος εναπόθεσης του a-C:H ήταν τέτοιος ώστε το πάχος των εναποθέσεων a-C:H να είναι 200 nm. Η παράμετρος που μεταβάλλονταν ήταν δυναμικό πόλωσης του γειωμένου ηλεκτροδίου (Ac bias) το οποίο κυμαινόταν από 100 έως 400 Volt προκειμένου να μελετηθεί ένα εύρος εναπόθεσης a-C:H από πολυμερές έως μορφής αδάμαντα (Diamond Like Carbon: DLC). Έτσι μελετήθηκε η επίδραση του δυναμικού πόλωσης του γειωμένου ηλεκτροδίου τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας του υλικού όσο και στη βακτηριακή προσκόλληση.

5.1.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών χρησιμοποιήθηκαν κάποιες από τις τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.2.

Συνοπτικά, μελετήθηκε η αέρια φάση του Πλάσματος και η αλληλεπίδρασής της με την επιφάνεια του πολυμερούς μέσω ηλεκτρικών και οπτικών μετρήσεων. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ανακλαστικής συμβολομετρίας Laser προκειμένου να μετρηθεί ο ρυθμός εγχάραξης του PET ή εναπόθεσης του a-C:H.

Επίσης, μελετήθηκε η τοπογραφία και η τραχύτητα των υλικών μέσω μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με δύο υγρά (νερό ως πολικό και μεθυλενο-ιωδίδιο ως μη) και τον υπολογισμό της επιφανειακής τους ενέργειας.

5.1.1.3. Βακτήρια

Χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος ATCC 35984 το οποίο φέρει το οπερονίου *ica*, είναι slime-θετικό και έχει αποδεδειγμένη ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm). Η προετοιμασία των βακτηρίων για την πειραματική διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.3.

5.1.1.4. Χαρακτηρισμός Βακτηρίων

Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των βακτηρίων, και συγκεκριμένα της επιφανειακής τους ενέργειας, χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με δύο υγρά (νερό ως πολικό και μεθυλενο-ιωδίδιο ως μη), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.4.1.

5.1.1.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης

Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης έγιναν στατικά πειράματα στα οποία το προς εξέταση υλικό εμβαπτίστηκε σε εναιώρημα βακτηρίων συγκέντρωσης 3×10^8 βακτήρια/ml για 150 λεπτά. Τα προσκολλημένα σε κάθε υλικό βακτήρια μελετήθηκαν με χρήση της μεθόδου μέτρησης του αριθμού των ζώντων

προσκολλημένων στην επιφάνεια βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs), όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.1. αλλά και με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Τα δείγματα για το SEM προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.2.

5.1.2. Αποτελέσματα

5.1.2.1. Υλικά

Στον πίνακα 5.1.1. περιγράφονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και οι συνθήκες της εκκένωσης κάτω από τις οποίες αυτές ετοιμάστηκαν.

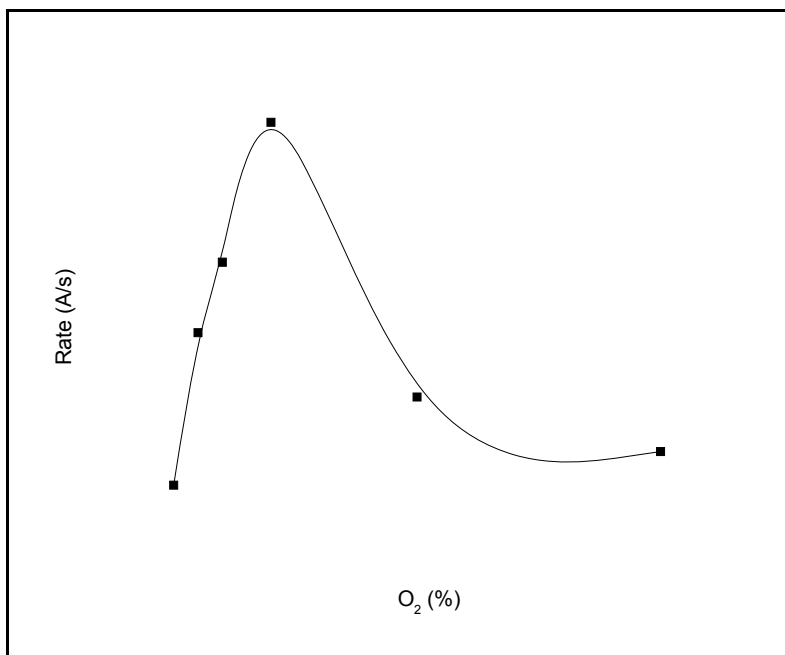
<u>Όνομα</u> <u>Υλικού</u>	<i>Παροχή</i> <i>CH₄</i> <i>(sccm)</i>	<i>Παροχή</i> <i>H₂</i> <i>(sccm)</i>	<i>Παροχή</i> <i>He</i> <i>(sccm)</i>	<i>Παροχή</i> <i>O₂</i> <i>(sccm)</i>	<i>Πίεση</i> <i>(Pa)</i>	<i>RF</i> <i>voltage</i> <i>V_{RF}</i> <i>(Volt)</i>	<i>Ac bias</i> <i>V_{ac}</i> <i>(Volt)</i>	<i>Dc bias</i> <i>V_d</i> <i>(Volt)</i>	<i>Ισχύς</i> <i>(Watt)</i>
<i>PET1</i>	10	10	-	-	67.70	300	100	-	4.5
<i>PET2</i>	10	10	-	-	67.70	300	200	-	5.1
<i>PET3</i>	10	10	-	-	67.70	300	300	-	5.9
<i>PET4</i>	10	10	-	-	67.70	300	400	-	6.1
<i>PET5</i>	-	-	20	0	33.34	305	-	-30	1.2
<i>PET6</i>	-	-	18	2	33.34	306	-	-30	1.2
<i>PET7</i>	-	-	16	4	33.34	278	-	-30	1.2
<i>PET8</i>	-	-	10	10	33.34	242	-	-30	1.2
<i>PET9</i>	-	-	0	20	33.34	200	-	-30	1.2
<i>PET10</i>	-	-	20	0	67.70	300	-	-30	2.0

Πίνακας 5.1.1. Παροχή αερίων (sccm), Συνολική Πίεση αερίων (Pa), Δυναμικό «πολωμένου (V_{RF}) ηλεκτροδίου (Volt), Δυναμικό «γειωμένου» (V_d ή V_{ac} bias) ηλεκτροδίου (Volt) and Συνολική κατανάλωση ισχύος (Watt) για την εναπόθεση των λεπτών υμενίων a-C:H (PET1-PET4) και για την τροποποίηση των υμενίων PET σε εκκενώσεις He/O₂ (PET5-PET10).

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 5.1.1., η διαδικασία της εναπόθεσης λεπτών υμενίων a-C:H στο PET απαιτεί πολύ μεγαλύτερη κατανάλωση ενέργειας για να πραγματοποιηθεί, σε σχέση με την τροποποίηση του PET σε εκκενώσεις He/O₂. Έτσι η απαιτούμενη κατανάλωση ισχύος είναι περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερη για τις εναποθέσεις σε σχέση με τις τροποποιήσεις. Επίσης, είναι φανερό ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό του Οξυγόνου στο συνολικό μίγμα αερίων που εισέρχεται στον αντιδραστήρα (PET5-PET9) τόσο λιγότερη παρεχόμενη τάση απαιτείται για να διατηρηθεί σταθερή η καταναλισκόμενη ισχύς. Αυτό το φαινόμενο είναι λογικό καθώς το Οξυγόνο είναι πολύ πιο δραστικό στοιχείο, σε σχέση με το Ήλιο, με αρκετά υψηλότερες ενεργές διατομές και η ύπαρξη του στον αντιδραστήρα τροφοδοτεί περισσότερες κρούσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών που υπάρχουν στο θάλαμο (μόρια, άτομα, ρίζες, ιόντα, ηλεκτρόνια). Όσον αφορά τις εναποθέσεις a-C:H, η αύξηση στο δυναμικό του «γειωμένου» (ac bias) μέχρι 300 Volt οδηγεί σε αύξηση της καταναλισκόμενης ισχύος, ενώ περαιτέρω αύξηση στο δυναμικό δεν επηρεάζει σημαντικά την κατανάλωση ισχύος.

5.1.2.1.1. Ρυθμός Εγχάραξης και Εναπόθεσης

Με χρήση της ανακλαστικής συμβολομετρίας Laser υπολογίστηκε ο ρυθμός εγχάραξης του PET για την περίπτωση των εκκενώσεων He/O₂ και ο ρυθμός εναπόθεσης για τις εναποθέσεις υμενίων a-C:H. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 5.1.1., ο μεγαλύτερος ρυθμός εγχάραξης επιτεύχθηκε όταν το O₂ καταλάμβανε το 20% του αέριου μίγματος στην εκκένωση.



Διάγραμμα 5.1.1. Ρυθμός εγχάραξης (etch rate, Å/sec) συναρτήσει του ποσοστού O₂

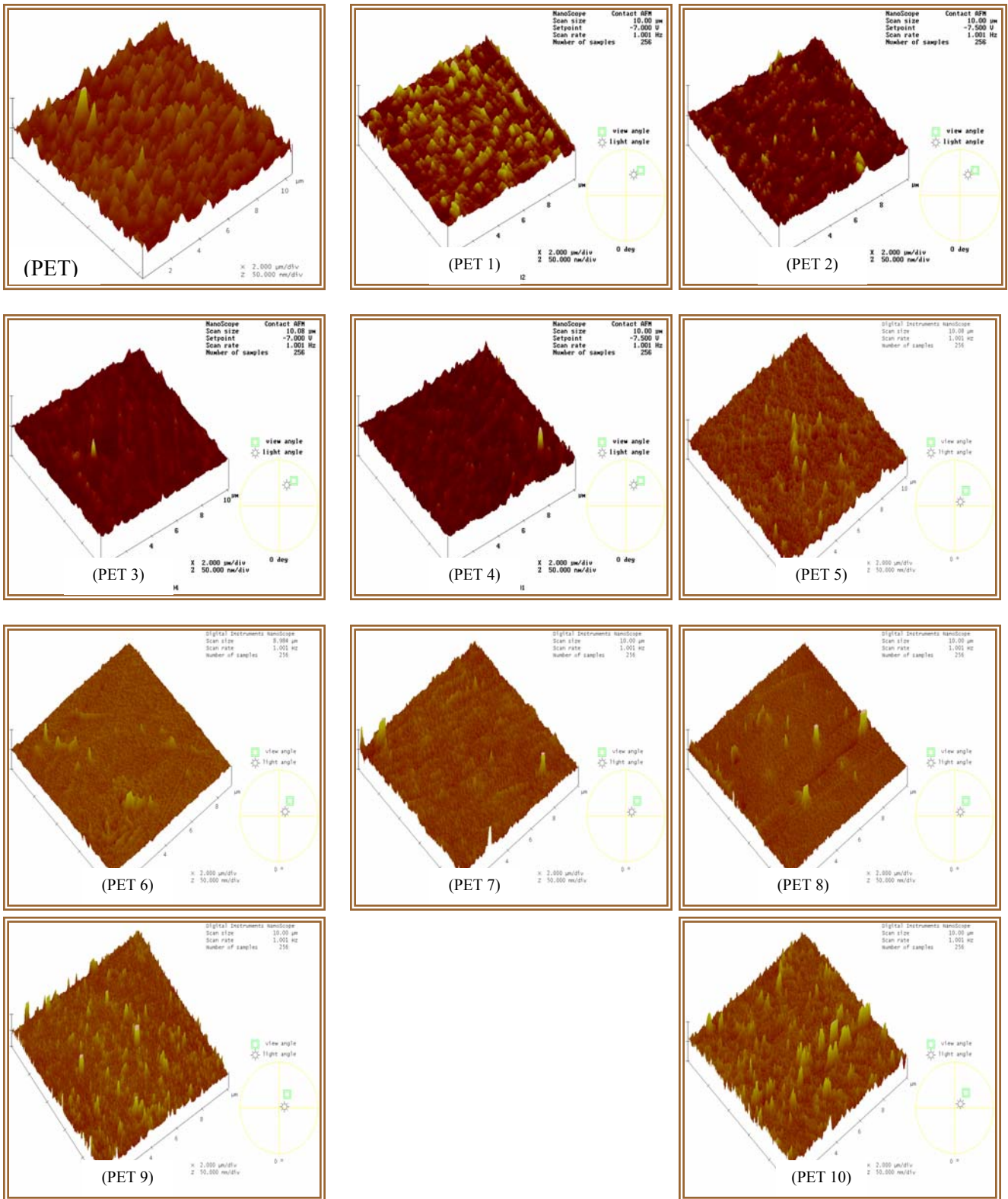
Στην περίπτωση των εναποθέσεων υμενίων a-C:H, ο ρυθμός εναπόθεσης δεν ξεπέρασε τα 0.1 Å/sec και ο χρόνος εναπόθεσης μεταβάλλονταν κάθε φορά προκειμένου το πάχος των λεπτών υμενίων να είναι 200 nm. Έτσι, ο χρόνος εναπόθεσης ήταν μεταξύ 75 λεπτά για το δείγμα PET 1 και 40 λεπτά για το δείγμα PET 4 (Πίνακας 5.1.1.)

5.1.2.1.2. Τοπογραφία-Τραχύτητα- Γωνίες Διαβροχής-Επιφανειακή Ενέργεια

Εξαιτίας της παρατηρούμενης εναπόθεσης και εγχάραξης, ήταν αναμενόμενη η αλλαγή της τοπογραφίας αλλά και της τραχύτητας των δειγμάτων PET 1- PET 10, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET. Με χρήση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM) λήφθηκαν εικόνες σε διάφορες περιοχές των τροποποιημένων υλικών και αφού ελέγχθηκε η ομοιογένειά τους, επιλέχθηκε να παρουσιαστούν οι εικόνες που ακολουθούν (Εικόνα 5.1.1.) ως αντιπροσωπευτικές των δειγμάτων PET-PET 10.

Από τις εικόνες αυτές (Εικόνα 5.1.1.) φαίνεται ότι το μη τροποποιημένο PET δεν είναι ιδιαίτερα τραχύ και ότι έχει δομές κωνικού σχήματος. Τα PET 1- PET 4, δηλαδή τα λεπτά υμένια a-C:H, εμφανίζονται πιο λεία σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET ενώ τα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ εμφανίζονται πιο τραχιά. Μετά από επεξεργασία

των εικόνων και με χρήση του λογισμικού Nanoscope III, έκδοση 5.12r2 υπολογίσθηκε η μέση επιφανειακή τραχύτητα (average surface roughness: Ra) των υλικών και φαίνεται στον Πίνακα 5.1.2. Από τις τιμές Ra προκύπτει ότι στην περίπτωση των υμενίων a-C:H, η αύξηση του δυναμικού του «γειωμένου» (V_{RF}) ηλεκτροδίου μείωσε τη μέση επιφανειακή τραχύτητα. Στην περίπτωση των εκκενώσεων He/O₂, η τραχύτητα αυξήθηκε με την αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου, αλλά και με την αύξηση της πίεσης από 33.334 σε 67.70 Pa για την περίπτωση του πλάσματος καθαρού Ηλίου. Παρόλα αυτά όμως είναι αξιοσημείωτο ότι η μέση επιφανειακή τραχύτητα παρέμεινε σε όλες τις περιπτώσεις σχετικά μικρή, αφού δεν υπερέβει τα 7 nm και αυτό υποδεικνύει τη σταθερότητα του PET κατά την επεξεργασία με πλάσμα. Αυτό οφείλεται στο ότι ο δακτύλιος φαινυλίου είναι αρκετά σταθερός και προστατεύει επίσης τον εστέρα από τον βομβαρδισμό των ιόντων και των άλλων χημικά δραστικών ειδών.



Εικόνα 5.1.1. Εικόνες AFM των υλικών που περιγράφονται στον Πίνακα 5.1.1.

<u>Όνομα δείγματος</u>	Ra (nm)	θ νερού (deg)	θ CH ₂ I ₂ (deg)	γ_s^d (mJ/m ²)	γ_s^p (mJ/m ²)	γ_s^p/γ_s^d	γ_s^{TOT} (mJ/m ²)
PET	3.1 ± 0.9	72.4	29.6	41.8	3.8	0.09	45.6
PET1	2.7 ± 0.2	84.8	39.7	37.4	2.4	0.06	39.8
PET2	2.5 ± 0.3	87.9	44.7	35.3	1.9	0.05	37.2
PET3	2.4 ± 0.3	86.5	38.5	38.6	1.8	0.05	40.4
PET4	2.1 ± 0.2	92.2	45.1	36.2	0.9	0.03	37.1
PET5	3.7 ± 0.3	37.8	11.0	37.4	26.0	0.70	63.4
PET6	3.1 ± 0.5	45.7	31.9	32.2	24.2	0.75	56.4
PET7	3.0 ± 0.3	41.8	11.2	38.1	23.4	0.61	61.5
PET8	4.6 ± 0.6	34.4	16.6	35.7	28.8	0.81	64.5
PET9	5.2 ± 1.2	33.9	21.0	34.3	29.9	0.87	64.2
PET10	4.8 ± 0.4	29.4	15.0	35.3	31.6	0.90	66.9
<i>S. epidermidis</i>	-----	23.1	64.5	26.0	32.2	1.24	58.2

Πίνακας 5.1.2. Μέση επιφανειακή τραχύτητα: Ra (nm), μέση τιμή γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού ή μεθυλενο-ιωδιδίου (CH₂I₂) με τα υλικά, ολική επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_s^{TOT}), η συνιστώσα της λόγω διασποράς (γ_s^d) καθώς και η πολική συνιστώσα (γ_s^p) και ο λόγος των δύο τελευταίων: (γ_s^p/γ_s^d). Η απόκλιση των γωνιών διαβροχής ήταν ± 3 deg.

Στον πίνακα 5.1.2. παρουσιάζονται επίσης οι μέσες τιμές των γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού και μεθυλενο-ιωδιδίου (CH₂I₂) με την επιφάνεια των υλικών-βακτηρίων, όπως αυτές μετρήθηκαν με τη χρήση γωνιομέτρου, τη μέρα της βακτηριακής προσκόλλησης. Με δεδομένο ότι η επιφανειακή τραχύτητα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την τροποποίηση, και άρα η πραγματική επιφάνεια του υλικού δεν διαφέρει από τη γεωμετρική (Kamusewitz και Possart, 2003), θεωρείται ότι η μεταβολή στις γωνίες διαβροχής οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στη μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι τα PET 1 - PET 4, δηλαδή τα λεπτά υμένα α-C:H, εμφάνισαν μεγαλύτερη γωνία διαβροχής τόσο με

το νερό όσο και με το CH₂I₂, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET, άρα ήταν πιο υδρόφοβα, ενώ τα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ εμφάνισαν μικρότερη γωνία διαβροχής τόσο με το νερό όσο και με το CH₂I₂, άρα ήταν πιο υδρόφιλα. Στην περίπτωση των υμενίων a-C:H, η αύξηση του δυναμικού του «γειωμένου» (V_{RF}) ηλεκτροδίου αύξησε τη γωνία διαβροχής με το νερό, αλλά και με το CH₂I₂, συγκρίνοντας το PET 1 με το PET 4. Στην περίπτωση των εκκενώσεων He/O₂, η γωνία διαβροχής με το νερό μειώθηκε με την αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου, αλλά και με την αύξηση της πίεσης από 33.334 σε 67.70 Pa για την περίπτωση του πλάσματος καθαρού Ηλίου. Όσον αφορά τις γωνίες με το CH₂I₂, τα πράγματα είναι πιο περίπλοκα. Παρατηρείται μείωση των γωνιών διαβροχής με το CH₂I₂, με την αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου από 10 σε 20 %, ενώ περαιτέρω αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου αύξησε τις γωνίες. Είναι αξιοσημείωτο πάντως ότι τόσο οι εναποθέσεις υμενίων a-C:H όσο και οι τροποποιήσεις σε εκκενώσεις He/O₂ μετέβαλλαν περισσότερο τη γωνία διαβροχής με το νερό σε σύγκριση με το CH₂I₂, καθώς οι μεν εναποθέσεις μετέβαλλαν τη γωνία διαβροχής με το νερό μέχρι και 20 deg, και οι τροποποιήσεις μέχρι και 50 deg, ενώ η μέγιστη παρατηρούμενη μεταβολή στις γωνίες διαβροχής ήταν περίπου 20 deg. Αυτό σημαίνει ότι, ιδιαίτερα στις εκκενώσεις He/O₂, μεταβλήθηκε και συγκεκριμένα αυξήθηκε ο πολικός χαρακτήρας του υλικού, ενώ ο μη πολικός του χαρακτήρας δεν επηρεάστηκε σημαντικά.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω παρατήρηση και με όρους επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{TOT}) και πολικής (γ_S^p) και μη (γ_S^d) συνιστώσας της, υπολογίσθηκαν οι παράμετροι αυτοί με χρήση της εξίσωσης Young ($\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL}$) και συγκεκριμένα της μορφής

$$1 + \cos \theta = 2\sqrt{\gamma_S^d} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^d}}{\gamma_L} \right) + 2\sqrt{\gamma_S^p} \left(\frac{\sqrt{\gamma_L^p}}{\gamma_L} \right)$$

όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.4. Κάνοντας λοιπόν χρήση των γωνιών διαβροχής του νερού και του CH₂I₂, και εφόσον τα γ_L , γ_L^d and γ_L^p είναι γνωστά και για τα δύο υγρά (Παράρτημα 4), η γραμμική επίλυση του συστήματος οδηγεί σε υπολογισμό της πολικής (γ_S^p) και μη (γ_S^d) συνιστώσας της

επιφανειακής ενέργειας, αλλά και της ολικής επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{TOT}) ως άθροισμα των γ_S^p και γ_S^d .

Οι τιμές γ_S^{TOT} , γ_S^p , γ_S^d των υλικών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.2. Από τις τιμές αυτές παρατηρείται ότι τα υλικά PET 1 - PET 4, δηλαδή τα λεπτά υμένια a-C:H, εμφάνισαν μείωση τόσο στην ολική επιφανειακή τους ενέργεια (γ_S^{TOT}) όσο και στις συνιστώσες της: πολική (γ_S^p) και μη (γ_S^d), σε σχέση με το μη επεξεργασμένο PET. Επίσης, εμφανίστηκαν ως πολύ υδρόφοβα καθώς η πολική συνιστώσα της επιφανειακής ενέργειας (γ_S^p) ήταν πολύ μικρότερη της μη πολικής (γ_S^d), όπως επίσης μικρός ήταν και ο λόγος γ_S^p/γ_S^d . Αντίθετα, τα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ (PET 5 - PET 10) εμφάνισαν αύξηση τόσο στην ολική επιφανειακή τους ενέργεια (γ_S^{TOT}) όσο και στην πολική (γ_S^p) συνιστώσα της, ενώ η μη πολική συνιστώσα (γ_S^d) έμεινε ουσιαστικά ανεπηρέαστη, σε σχέση τόσο με το μη επεξεργασμένο PET όσο και με τα λεπτά υμένια a-C:H. Επίσης, εμφανίστηκαν ως υδρόφιλα, καθώς τόσο η πολική συνιστώσα της επιφανειακής ενέργειας (γ_S^p) όσο και ο λόγος γ_S^p/γ_S^d , ήταν πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET και τα υμένια a-C:H.

Στην περίπτωση των υμενίων a-C:H, η αύξηση του δυναμικού του «γειωμένου» (V_{RF}) ηλεκτροδίου μείωσε τα γ_S^{TOT} , γ_S^p , γ_S^d αλλά και το λόγο γ_S^p/γ_S^d . Στην περίπτωση των εκκενώσεων He/O₂, γ_S^{TOT} , γ_S^p , γ_S^p/γ_S^d αυξήθηκαν με την αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου, αλλά και με την αύξηση της πίεσης από 33.334 σε 67.70 Pa για την περίπτωση του πλάσματος καθαρού Ηλίου. Είναι αξιοσημείωτο πάντως ότι οι τροποποιήσεις σε εκκενώσεις He/O₂ μετέβαλλαν περισσότερο τον πολικό χαρακτήρα του υλικού γ_S^p , ενώ ο μη πολικός γ_S^d έμεινε ουσιαστικά ανεπηρέαστος, συγκρίνοντάς τους τόσο με το μη επεξεργασμένο PET όσο και με τα λεπτά υμένια a-C:H. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι η εναπόθεση των λεπτών υμενίων a-C:H δεν τροποποίησε τόσο σημαντικά τις ιδιότητες του PET, όσο η τροποποίηση σε εκκενώσεις He/O₂.

Στον πίνακα 5.1.2. παρουσιάζονται επίσης οι μέσες τιμές των γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού και μεθυλενο-ιωδιδίου (CH₂I₂) με την επιφάνεια των βακτηρίων, όπως αυτές μετρήθηκαν με τη χρήση γωνιομέτρου. Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η

επιφάνεια των βακτηρίων είχε μικρή γωνία διαβροχής με το νερό αλλά αρκετά μεγάλη με το CH₂I₂. Με χρήση της εξίσωσης Young και των γωνιών διαβροχής, όπως ακριβώς περιγράφηκε παραπάνω για τα υλικά, υπολογίσθηκαν οι παράμετροι γ_s^{TOT} , γ_s^p , γ_s^d και γ_s^p/γ_s^d , και εμφανίζονται στον Πίνακα 5.1.2. Από τις τιμές τους προκύπτει ότι το συγκεκριμένο στέλεχος *S. epidermidis* είναι αρκετά υδρόφιλο αφού εμφανίζει υψηλή επιφανειακή ενέργεια (γ_s^{TOT}) και πολικό χαρακτήρα γ_s^p .

5.1.2.2. Προσκόλληση Βακτηρίων

Στον πίνακα 5.1.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων στα υλικά του Πίνακα 5.1.1.

<u>Όνομα</u> <u>δείγματος</u>	Αριθμός Προσκολλημένων Βακτηρίων/cm ² x 10 ⁶ (N)
PET	9.58±0.99
PET1	7.25±0.36*
PET2	7.68±0.63*
PET3	8.01±0.54*
PET4	8.16±0.37*
PET5	2.34±0.18 ^{*a}
PET6	2.48±0.26 ^{*a}
PET7	2.45±0.13 ^{*a}
PET8	3.20±0.18 ^{*a}
PET9	2.76±0.28 ^{*a}
PET10	1.44±0.21 ^{*a}

Πίνακας 5.1.3. Αριθμός Προσκολλημένων Βακτηρίων/cm² στα προς εξέταση υλικά

* $p < 0.05$, όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² σε όλα τα τροποποιημένα υλικά με τεχνική πλάσματος συγκρίνεται με τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² στο μη επεξεργασμένο PET.

$^a p < 0.05$, όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² σε όλα τα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ συγκρίνεται με τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² στα λεπτά υμένια a-C:H.

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1.3. προκύπτει ότι τόσο η εναπόθεση λεπτών υμενίων a-C:H, αλλά πολύ περισσότερο η τροποποίηση του PET σε εκκενώσεις He/O₂, μείωσαν σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο PET.

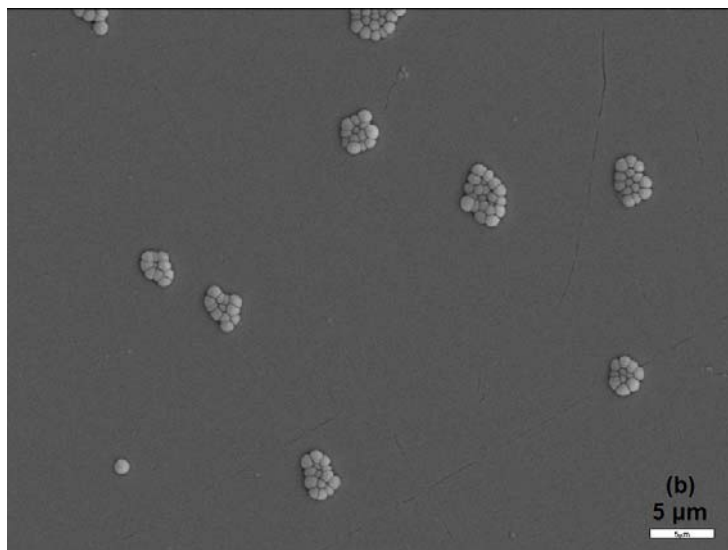
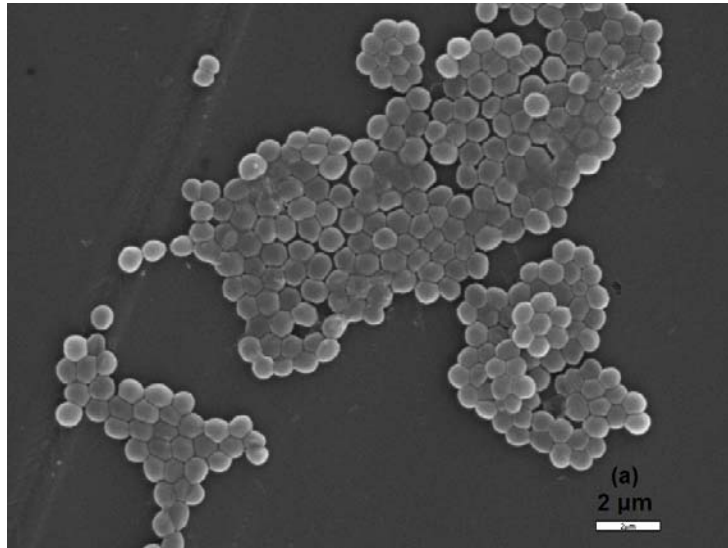
Επίσης, στην περίπτωση των υμενίων a-C:H, η αύξηση του δυναμικού του «γειωμένου» (V_{RF}) ηλεκτροδίου από 100 σε 400 Volt προκάλεσε αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων, ενώ οι ενδιάμεσες τιμές δεν επηρέασαν την προσκόλληση σημαντικά. Στην περίπτωση των εκκενώσεων He/O₂, η προσκόλληση των βακτηρίων αυξήθηκε με την αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου από 10 σε 50 %, ενώ περαιτέρω αύξηση στο ποσοστό του Οξυγόνου δεν επηρέασε σημαντικά την προσκόλληση σε σχέση με το 10 % Οξυγόνου σε ήλιο.

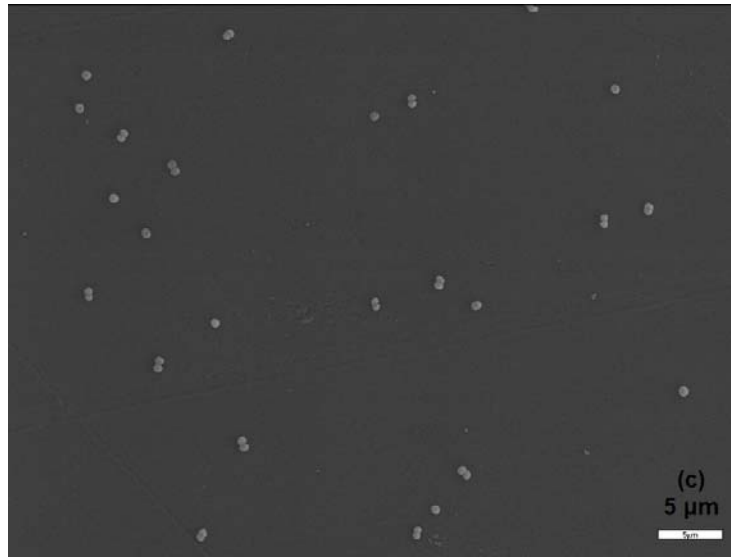
Από την παρατήρηση των εικόνων που λήφθηκαν με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM), προκειμένου να μελετηθεί η βακτηριακή προσκόλληση στα προς εξέταση υλικά, (Εικόνα 5.1.2.) προέκυψε ότι τόσο τα λεπτά υμένια a-C:H, αλλά πολύ περισσότερο το μη επεξεργασμένο PET, συγκράτησαν, όχι μόνο το μεγαλύτερο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων, αλλά και σε μορφή συσσωματωμάτων. Ειδικά στην περίπτωση του PET είναι εμφανής μια βλενώδης ουσία η οποία περιβάλλει τα προσκολλημένα βακτήρια. Αντίθετα, τα βακτήρια που ήταν προσκολλημένα στα υλικά που τροποποιήθηκαν σε εκκενώσεις He/O₂ εμφανίστηκαν μεμονωμένα.

Με δεδομένο ότι η διαδικασία σχηματισμού βιομεμβράνης (biofilm) περιλαμβάνει δύο στάδια, το στάδιο της προσκόλλησης και αυτο της συσσωμάτωσης, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι τα υδρόφοβα υλικά, το PET και τα υμένια a-C:H, προάγουν όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και το σχηματισμό biofilm περισσότερο ή τουλάχιστον σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με τα υδρόφιλα υλικά που προέκυψαν από την τροποποίηση σε πλάσμα He/O₂.

Στην εικόνα 5.1.2. παρατίθενται κάποιες χαρακτηριστικές εικόνες SEM που δείχνουν προσκολλημένα βακτήρια στην επιφάνεια PET, PET 4 (δηλαδή PET στο οποίο έχει εναποτεθεί a-C:H σε V_{RF} 400 Volt) και PET 7 (δηλαδή PET τροποποιημένο σε πλάσμα

20 % Οξυγόνου σε Ήλιο). Δεν κρίνεται σκόπιμο να παρατεθούν εικόνες των υπολοίπων υλικών καθώς η μορφολογία των προσκολλημένων βακτηρίων μοιάζει με τις αντίστοιχες που παρουσιάζονται και μεταβάλλεται μόνο ο αριθμός.





Εικόνα 5.1.2. Εικόνες SEM των προσκολλημένων βακτηρίων στα υλικά: (α) PET x5000, (b) PET 4 x2000 (δηλαδή PET στο οποίο έχει εναποτεθεί a-C:H σε V_{RF} 400 Volt) και (c) PET 7 x2000 (δηλαδή PET τροποποιημένο σε πλάσμα 20 % Οξυγόνου σε Ήλιο).

5.1.2.3. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων-Επιφανειακής Ενέργειας Υλικών

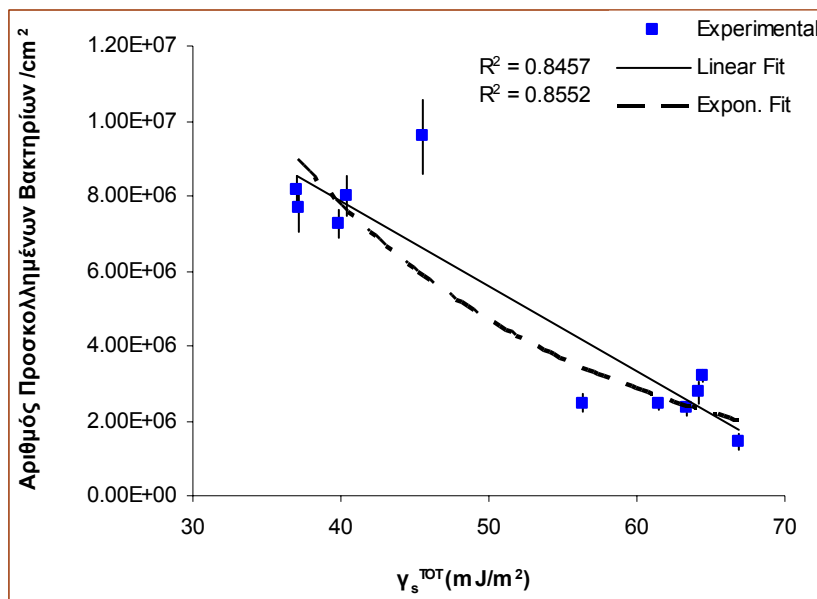
Λόγω της υψηλής ιοντικής ισχύς του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος μπορεί να θεωρηθεί ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών ήταν αμελητέες (van Oss, 2003). Επομένως, οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης των λεπτών υμενίων a-C:H και της τροποποίησης του PET σε εκκενώσεις He/O₂ και σχετίζονται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των επιφανειών πρέπει να είναι οι σημαντικές παράμετροι που επηρέασαν τη βακτηριακή προσκόλληση και συσσωμάτωση.

Επειδή όπως αναλύθηκε παραπάνω οι φυσικοχημικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας με πλάσμα σχετίστηκαν με την αλλαγή της διαβρεξιμότητας των υλικών και επομένως με την αλλαγή στην επιφανειακή τους ενέργεια, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η βακτηριακή προσκόλληση σχετίζεται άμεσα με την επιφανειακή ενέργεια των υλικών.

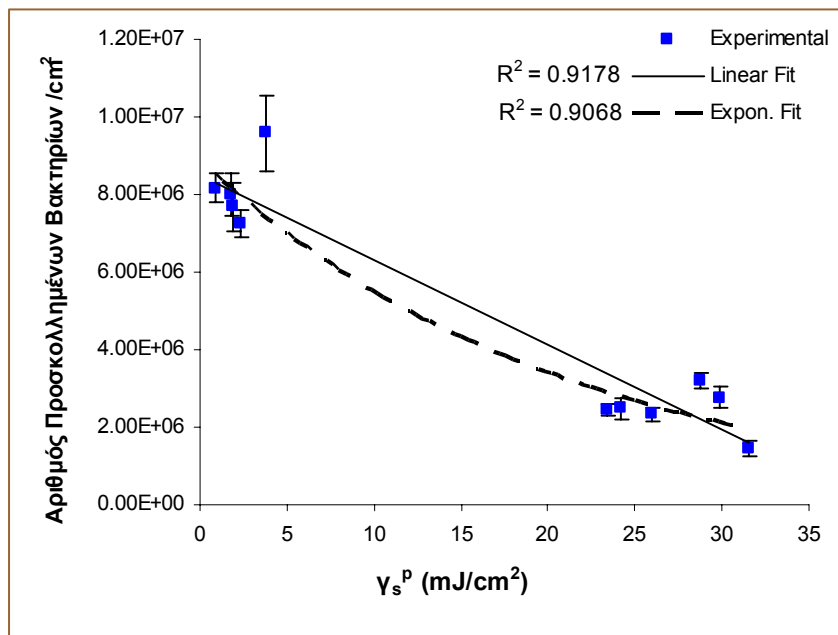
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση, μελετήθηκε η συσχέτιση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με την ολική επιφανειακή ενέργεια (γ_s^{TOT})

των υλικών και την πολική (γ_S^p) και μη (γ_S^d) συνιστώσα της. Από τα διαγράμματα 5.1.2-5.1.4. προκύπτει ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση των γ_S^{TOT} και γ_S^p , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του γ_S^d . Επομένως η βακτηριακή προσκόλληση μπορεί να μειωθεί με αύξηση της επιφανειακής ενέργειας του υλικού και κυρίως με αύξηση του πολικού του χαρακτήρα, ενώ δεν επηρεάζεται από τον μη πολικό χαρακτήρα του υλικού, ο οποίος άλλωστε δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την επεξεργασία των υλικών με τις συγκεκριμένες συνθήκες πλάσματος.

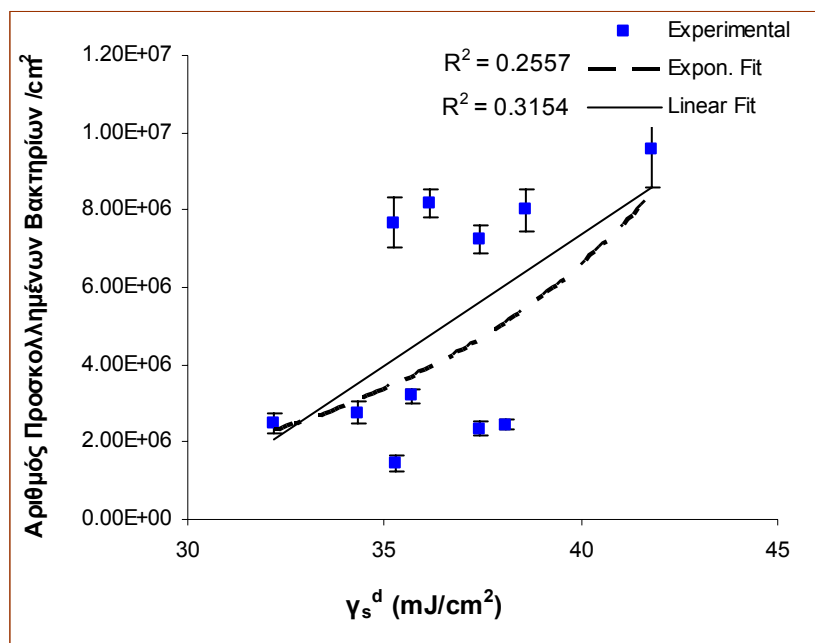
Συγκεκριμένα, από τα διαγράμματα 5.1.2-5.1.4. προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² (N) συσχετίζεται σημαντικά και αρνητικά με το γ_S^{TOT} (με εξισώσεις της μορφής: γραμμική συσχέτιση, $N = -240644 \gamma_S^{TOT} + 2E7$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.85$, και μη γραμμική συσχέτιση της μορφής $N = 7E7 \exp(-0.0528 \gamma_S^{TOT})$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.86$) και το γ_S^p (με εξισώσεις της μορφής: γραμμική συσχέτιση, $N = -226434 \gamma_S^p + 9E6$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.92$, και μη γραμμική συσχέτιση $N = 9E6 \exp(-0.0488 \gamma_S^p)$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.91$), ενώ δεν συσχετίζεται σημαντικά με το γ_S^d (γραμμική συσχέτιση $p = 0.037$, $R^2 = 0.32$ και μη γραμμική συσχέτιση $p = 0.062$, $R^2 = 0.26$).



Διάγραμμα 5.1.2. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – ολικής επιφανειακής ενέργειας των υλικών (γ_S^{TOT})



Διάγραμμα 5.1.3. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – πολικής συνιστώσας της επιφανειακής ενέργειας των υλικών (γ_s^p)



Διάγραμμα 5.1.4. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – μη πολικής συνιστώσας της επιφανειακής ενέργειας των υλικών (γ_s^d)

5.1.2.4. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων-Θερμοδυναμικής Θεωρίας: Προσέγγιση Dispersion-Polar

Η έντονη επίδραση της ολικής επιφανειακής ενέργειας των υλικών στη βακτηριακή προσκόλληση επιχειρήθηκε να εξηγηθεί από τη θερμοδυναμική θεωρία και συγκεκριμένα από την προσέγγιση Dispersion-Polar, όπως αυτή περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.1.1.

Αφού υπολογίστηκε η ολική επιφανειακή ενέργεια υλικών και βακτηρίων και οι συνιστώσες της, πολικές και μη, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.1.2.1., υπολογίσθηκαν στην συνέχεια οι διεπιφανειακές ενέργειες υλικού-υγρού (SL), βακτηρίου-υλικού (BS) και βακτηρίου-υγρού (BL), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1.1.1. Ακολούθως, υπολογίστηκε η συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{adh}) και οι συνιστώσες της από τις αλληλεπιδράσεις διασποράς (ΔG_{d0}^d) και τις πολικές (ΔG_{d0}^p), αντίστοιχα, με χρήση της εξίσωσης (8) της παραγράφου 2.1.1.1.1.

Οι τιμές των ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^p και ΔG_{d0}^{adh} παρουσιάζονται στον πίνακα 5.1.4.

<u>Όνομα</u> <u>δείγματος</u>	ΔG_{d0}^d (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^p (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^{adh} (mJ/m ²)
PET	-1.6	-15.2	-16.8
PET1	-1.3	-16.4	-17.7
PET2	-1.1	-16.9	-18.0
PET3	-1.3	-17.1	-18.4
PET4	-1.2	-18.2	-19.4
PET5	-1.2	-6.0	-7.2
PET6	-0.9	-6.5	-7.4
PET7	-1.3	-6.8	-8.1
PET8	-1.1	-5.2	-6.3
PET9	-1.0	-4.9	-5.9
PET10	-1.1	-4.5	-5.6

Πίνακας 5.1.4. συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{adh}), πολική (ΔG_{d0}^p) και μη (ΔG_{d0}^d) συνιστώσα της.

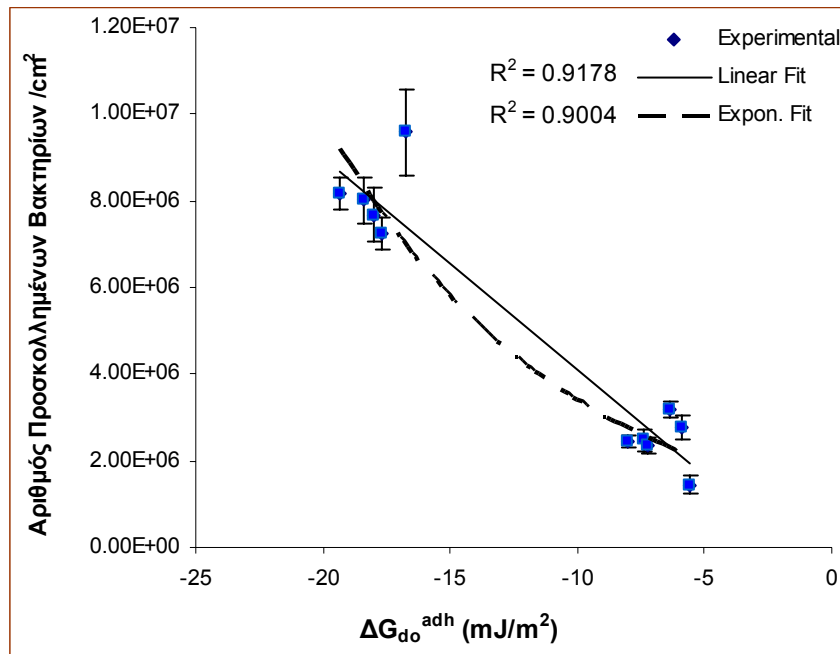
Σύμφωνα με την θερμοδυναμική θεωρία, η προσκόλληση ευνοείται για $\Delta G^{adh} < 0$ και αυτό σημαίνει ότι η αυθόρμητη προσκόλληση συνοδεύεται από μείωση στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, όπως προβλέπεται από το δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.4., η προσκόλληση ευνοείται περισσότερο στα λεπτά υμένια a-C:H, και το μη επεξεργασμένο PET, και λιγότερο στο τροποποιημένο σε εκκενώσεις He/O₂ PET.

Από τα διαγράμματα 5.1.5-5.1.7. προκύπτει ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση της ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{adh}) και της πολικής της συνιστώσας ΔG_{d0}^p , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του ΔG_{d0}^d , καθώς οι αλληλεπιδράσεις διασποράς μεταξύ υλικών και βακτηρίων δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα υλικά.

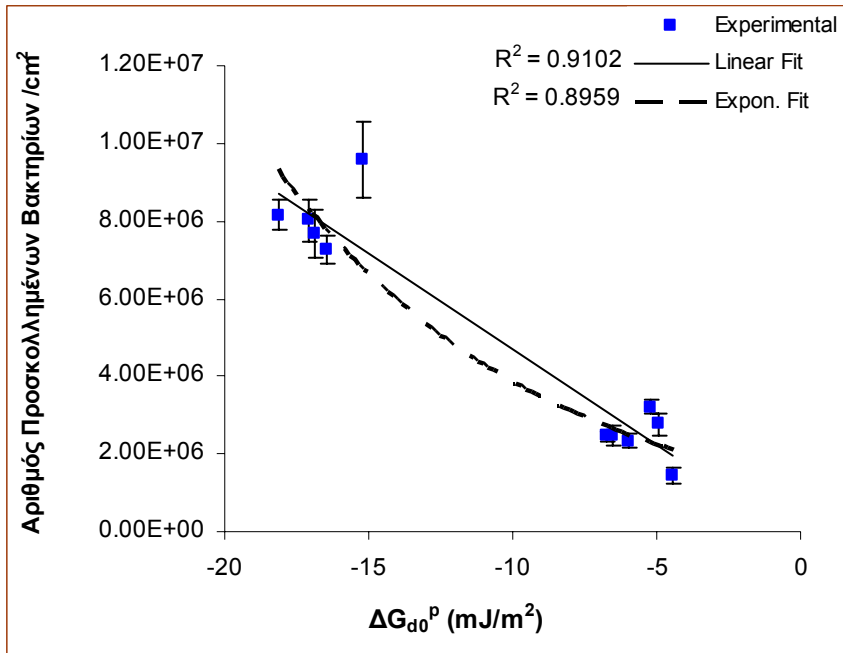
Συγκεκριμένα, από τα διαγράμματα 5.1.5-5.1.7. προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηριδίων/cm² (N) συσχετίζεται σημαντικά και αρνητικά με το ΔG_{d0}^{adh} (με εξισώσεις της μορφής: γραμμική συσχέτιση, $N = -482436 \Delta G_{d0}^{adh} - 839209$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.92$ και μη γραμμική συσχέτιση της μορφής $N = 1E6 \exp(-0.1033 \Delta G_{d0}^{adh})$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.90$) και το ΔG_{d0}^p (με εξισώσεις της μορφής: γραμμική συσχέτιση, $N = -495459 \Delta G_{d0}^p - 264820$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.91$, και μη γραμμική συσχέτιση $N = 1E6 \exp(-0.1081 \Delta G_{d0}^p)$, $p < 0.001$, $R^2 = 0.90$), ενώ δεν συσχετίζεται σημαντικά με το ΔG_{d0}^d (γραμμική συσχέτιση $p = 0.039$, $R^2 = 0.31$ και μη γραμμική συσχέτιση $p = 0.073$, $R^2 = 0.25$).

Από τη σύγκριση των διαγραμμάτων 5.1.2-5.1.4. με τα διαγράμματα 5.1.5-5.1.7., προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων συσχετίζεται καλύτερα με τα ΔG_{d0}^{adh} και ΔG_{d0}^p από ότι με τα γ_S^{TOT} και γ_S^p , και αυτό γιατί στον υπολογισμό των πρώτων λήφθησαν υπόψη, όχι μόνο οι ιδιότητες των υλικών αλλά και των βακτηρίων.

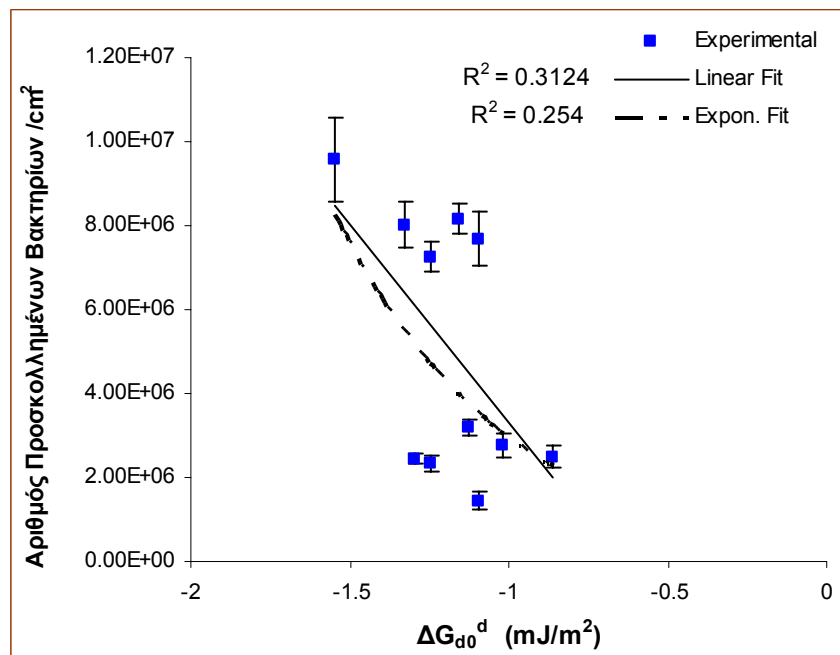
Επομένως, δεδομένου ότι το γ_S^d δεν ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των διάφορων υλικών και το γ_B^p είναι μικρότερο του γ_L^p , η βακτηριακή προσκόλληση δεν ευνοείται καθώς το γ_S^p αυξάνεται. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την παρουσία ενυδατωμένων στρωμάτων στα τροποποιημένα με He/O₂ PET και γύρω από τα βακτήρια, λόγω της υδρόφιλης-πολικής φύσης και των δύο. Η επικάλυψη των ενυδατωμένων αυτών στρωμάτων κατά τη διάρκεια της βακτηριακής προσκόλλησης απωθεί τα βακτήρια από την επιφάνεια μέσω δυνάμεων που είναι γνωστές ως «υδροφιλικές απωθήσεις» ή «δυνάμεις ενυδάτωσης» (van Oss, 1993).



Διάγραμμα 5.1.5. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{adh})



Διάγραμμα 5.1.6. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/ cm^2 – πολική συνιστώσα της συνολικής ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^p)



Διάγραμμα 5.1.7. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/ cm^2 – μη πολική συνιστώσα της συνολικής ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^d)

Παρατηρείται λοιπόν ότι αυτή η προσέγγιση της θερμοδυναμικής θεωρίας, παρότι δεν μπόρεσε να προβλέψει τη μείωση που παρατηρήθηκε στη βακτηριακή προσκόλληση στα λεπτά υμένα α-C:H, σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο PET, προέβλεψε ικανοποιητικά τη μείωση που παρατηρήθηκε στη βακτηριακή προσκόλληση στα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ PET. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη μικρή μεταβολή στη επιφανειακή ενέργεια των υμενίων α-C:H, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο PET, αλλά και στη μειωμένη τραχύτητα που αυτά εμφάνισαν. Επίσης, κάποιες παρεκλίσεις από τη θερμοδυναμική θεωρία που εμφανίζονται σε κάποια από τα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ PET, μπορεί και πάλι να οφείλονται στην ταυτόχρονη μεταβολή της τραχύτητας. Έτσι ενώ τα δείγματα PET 8 και 9 είχαν αυξημένο πολικό χαρακτήρα, σε σχέση με τα δείγματα PET 6 και 7, εμφάνισαν αύξηση της βακτηριακής προσκόλλησης, πιθανότατα λόγω της αυξημένης τραχύτητάς τους. Αντίθετα, το δείγμα PET 10, παρότι είχε επίσης σχετικά μεγάλη τραχύτητα, εμφάνισε μειωμένη βακτηριακή προσκόλληση σε σχέση με τα άλλα (PET 5- PET 9) εξαιτίας της μεγάλης επιφανειακής του ενέργειας και του πολικού του χαρακτήρα.

Παρόλα αυτά, σε μια προσπάθεια να συσχετισθεί η τραχύτητα με την προσκόλληση δεν βρέθηκε κάποια απλή σχέση μεταξύ τους (γραμμική συσχέτιση: $p = 0.11$, $R^2 = 0.22$), οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι οι βασικές παράμετροι που επηρέασαν την προσκόλληση ήταν η επιφανειακή ενέργεια των υλικών, ο πολικός τους χαρακτήρας, και ο πολικός χαρακτήρας των βακτηρίων.

5.2 Μελέτη της Επίδρασης του Φαινομένου της Γήρανσης Επιφανειακά Τροποποιημένων Υμενίων Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα σε Εκκενώσεις He/O₂ και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση των Βακτηρίων

5.2.1. Υλικά και Μέθοδοι

5.2.1.1. Υλικά

Στο παρόν υποκεφάλαιο, ως υποστρώματα για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

ι) Υμένια Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα (PET)

ιι) Γηρανσμένα Υμένια PET που ήταν Επιφανειακά Τροποποιημένα σε Εκκενώσεις He/O₂

Οι συνθήκες πλάσματος που επιλέχθηκαν για την τροποποίηση των υμενίων PET ήταν οι εξής: Η πίεση λειτουργίας της εκκένωσης ρυθμίστηκε στα 33.34 Pa και διατηρήθηκε σε αυτή την τιμή καθόλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Η συνολική παροχή των αερίων ήταν 20 sccm και η συχνότητα διέγερσης 13.56 MHz. Η καταναλισκόμενη ισχύς στον αντιδραστήρα διατηρήθηκε σταθερή, μέσω των ηλεκτρικών μετρήσεων, στα 1,2 Watt και ο χρόνος τροποποίησης των δειγμάτων ήταν 15 λεπτά. Η παράμετρος που μεταβάλλονταν ήταν οι επιμέρους αναλογίες των δύο αερίων στο μίγμα. Έτσι μελετήθηκε η επίδραση της εκκένωσης καθαρού Ηλίου και 20 % Οξυγόνου σε Ήλιο στο φαινόμενο της γήρανσης. Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδραση του φαινομένου της γήρανσης στη μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας του υλικού και πως αυτή συσχετίζεται με τη βακτηριακή προσκόλληση. Στην περίπτωση της εκκένωσης 20 % Οξυγόνου σε Ήλιο, έγινε χρήση τάσης στο γειωμένο ηλεκτρόδιο (Dc bias) $V_b = -30$ Volt γιατί η συγκεκριμένη πίεση και το δυναμικό πόλωσης του γειωμένου ηλεκτροδίου παρατηρήθηκε να μειώνει το φαινόμενο γήρανσης (Papakonstantinou et al., 2003). Στην περίπτωση της εκκένωσης καθαρού Ηλίου, δεν πολώθηκε το γειωμένο ηλεκτρόδιο προκειμένου το φαινόμενο της γήρανσης να είναι έντονο. Από εδώ και στο εξής ως He συμβολίζεται η τροποποίηση με καθαρό Ήλιο και ως He/O₂ η τροποποίηση

με 20 % Οξυγόνου σε Ήλιο. Τα υλικά αυτά μελετήθηκαν σε χρόνο γήρανσης μίας, οκτώ, δεκαεπτά, τριάντα και πενήντα οκτώ ημερών (Πίνακας 5.2.1.)

5.2.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών χρησιμοποιήθηκαν κάποιες από τις τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.2.

Συνοπτικά, μελετήθηκε η αέρια φάση του Πλάσματος και η αλληλεπίδρασή της με την επιφάνεια του πολυμερούς μέσω ηλεκτρικών και οπτικών μετρήσεων, και ανακλαστικής συμβολομετρίας Laser όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.1.1.2.

Επίσης, μελετήθηκε η τοπογραφία και η τραχύτητα των υλικών μέσω μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με τρία υγρά (νερό και γλυκερόλη ως πολικά και μεθυλενο-ιωδίδιο ως μη) και τον υπολογισμό της επιφανειακής τους ενέργειας, αλλά και η τεχνική της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS), όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.2. αλλά και στο Παράρτημα 3.

5.2.1.3. Βακτήρια

Χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο στέλεχος *S. epidermids* ATCC 35984 το οποίο φέρει το οπερονίο *ica*, είναι slime-θετικό και έχει αποδεδειγμένη ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm). Η προετοιμασία των βακτηρίων για την πειραματική διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.3.

5.2.1.4. Χαρακτηρισμός Βακτηρίων

Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των βακτηρίων, και συγκεκριμένα της επιφανειακής τους ενέργειας, χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με τρία υγρά (νερό και γλυκερόλη ως πολικό και μεθυλενο-ιωδίδιο ως μη), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.4.1.

5.2.1.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης

Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης έγιναν τόσο στατικά πειράματα στα οποία το προς εξέταση υλικό εμβαπτίσθηκε σε εναιώρημα βακτηρίων συγκέντρωσης 3×10^8 βακτήρια/ml, όσο και δυναμικά για τα οποία χρησιμοποιήθηκε το Radial Flow Chamber, το οποίο περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.4.2. Τα πειράματα είχαν διάρκεια 150 λεπτά. Τα προσκολλημένα σε κάθε υλικό βακτήρια μελετήθηκαν με χρήση της μεθόδου μέτρησης του αριθμού των ζώντων προσκολλημένων στην επιφάνεια βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs), όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.1. αλλά και με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM). Τα δείγματα για το SEM προετοιμάσθηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.2. Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκε επίσης το μικροσκόπιο ατομικής δύναμης και το μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης. Η προετοιμασία των δειγμάτων για την παρατήρηση με τα συγκεκριμένα μικροσκόπια περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και στις παραγράφους 3.5.4. και 3.5.5.

5.2.2. Αποτελέσματα

5.2.2.1. Υλικά

Στον πίνακα 5.2.1. περιγράφονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και ο χρόνος γήρανσής τους.

5.2.2.1.1. Ρυθμός Εγχάραξης- Τοπογραφία-Τραχύτητα

Ο ρυθμός εγχάραξης για το He ήταν $0.36 \text{ \AA}/\text{sec}$ και για το He/O₂ $2.62 \text{ \AA}/\text{sec}$.

Από τις εικόνες AFM που λήφθηκαν, και που ουσιαστικά είναι ίδιες αυτές που παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.1.1. για τα υλικά PET, PET 7: He/O₂ και PET 10: He, και με χρήση του λογισμικού Nanoscope III, έκδοση 5.12r2 υπολογίσθηκε η μέση επιφανειακή τραχύτητα (average surface roughness: Ra) των υλικών. Βρέθηκε ότι το PET είχε $Ra = 3.1 \pm 0.9$, το PET 7: He/O₂ είχε $Ra = 3.0 \pm 0.3$ και το PET 10: He είχε $Ra = 4.8 \pm 0.4$. Παρατηρείται λοιπόν ότι μεγαλύτερος ρυθμός εγχάραξης δεν συνεπάγεται

απαραίτητα μεγαλύτερη τραχύτητα, γεγονός που πιθανόν εξηγείται από την ανισοτροπία της εγχάραξης και τη σχέση οριζόντιας και κάθετης εγχάραξης. Το πιο πιθανό σενάριο είναι ο ρυθμός οριζόντιας εγχάραξης να φτάνει σε σημείο κορεσμού όταν η επιφανειακή κάλυψη με προϊόντα αποικοδόμησης γίνεται ίση με τη μονάδα, ενώ ο ρυθμός κάθετης εγχάραξης συνεχίζει να αυξάνεται και καθορίζεται από το ρεύμα ιόντων σε αναλογία με το ρυθμό εκρόφησης των προϊόντων από την επιφάνεια. Έτσι στην περίπτωση του He η ανισοτροπία είναι πιο έντονη.

5.2.2.1.2. Γωνίες Διαβροχής-Επιφανειακή Ενέργεια

Στον Πίνακα 5.2.1. παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού και μεθυλενο-ιωδιδίου (CH_2I_2) με την επιφάνεια των υλικών-βακτηρίων, όπως αυτές μετρήθηκαν με τη χρήση γωνιομέτρου. Με δεδομένο ότι η επιφανειακή τραχύτητα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την τροποποίηση, και άρα η πραγματική επιφάνεια του υλικού δεν διέφερε ουσιαστικά από τη γεωμετρική (Kamusewitz και Possart, 2003), θεωρείται ότι η μεταβολή στις γωνίες διαβροχής οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στη μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών.

Η επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_s^{d-p}), αλλά και η πολική (γ_s^p) και μη (γ_s^d) συνιστώσα της υπολογίσθηκαν όπως περιγράφεται στην παράγραφο 5.1.2.1., αλλά και στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.4.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.1., παρατηρείται ότι στην περίπτωση των εκκενώσεων He και He/O₂, η γωνία διαβροχής τόσο με το νερό όσο και με το CH₂I₂ μειώθηκε σημαντικά και για τις δύο τροποποιήσεις, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET, χωρίς όμως μεταξύ τους να εμφανίζουν σημαντική διαφορά. Με την αύξηση του χρόνου γήρανσης παρατηρήθηκε αύξηση στη γωνία διαβροχής με το νερό και για τις δύο τροποποιήσεις. Στην περίπτωση όμως του He, η αύξηση αυτή ήταν πιο απότομη. Παρόλα αυτά όμως, ακόμα και 58 μέρες μετά την τροποποίηση οι γωνίες διαβροχής με το νερό, και για τις δύο τροποποιήσεις, παρέμειναν μικρότερες σε σχέση με τη γωνία του μη τροποποιημένου PET.

<u>Υλικά</u>	θ νερού (deg)	θ CH ₂ I ₂ (deg)	γ_S^d (mJ/m ²)	γ_S^p (mJ/m ²)	γ_S^{d-p} (mJ/m ²)
<i>S. epidermidis</i>	23.1	64.5	26.0	32.2	58.2
PET	72.4	29.6	41.8	3.8	45.6
1 ώρα He	29.4	15.0	35.4	31.6	67.0
1 ώρα He/O ₂	28.9	15.8	35.1	32.0	67.1
8 ημέρες He	38.9	25.8	33.5	27.6	61.1
8 ημέρες He/O ₂	35.1	10.0	37.1	27.6	64.8
17 ημέρες He	45.5	26.5	34.4	23.1	57.5
17 ημέρες He/O ₂	50.1	21.6	27.2	34.3	51.5
30 ημέρες He	59.1	29.1	36.2	14.1	50.3
30 ημέρες He/O ₂	44.1	12.0	38.4	21.9	60.3
58 ημέρες He	50.8	28.7	34.5	19.8	54.3
58 ημέρες He/O ₂	47.6	12.5	39.0	19.6	58.6

Πίνακας 5.2.1. Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν και χρόνος γήρανσης, μέση τιμή γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού ή μεθυλενο-ιωδιδίου (CH₂I₂) με τα υλικά, ολική επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_S^{d-p}), η συνιστώσα της λόγω διασποράς (γ_S^d) καθώς και η πολική συνιστώσα (γ_S^p). Η απόκλιση των γωνιών διαβροχής ήταν ± 3 deg.

Από τις τιμές γ_S^{d-p} , γ_S^p , γ_S^d των βακτηρίων-υλικών που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.1. παρατηρείται ότι το συγκεκριμένο στέλεχος *S. epidermidis* είναι αρκετά υδρόφιλο αφού εμφανίζει υψηλή επιφανειακή ενέργεια (γ_S^{d-p}) και πολικό χαρακτήρα (γ_S^p). Αντίθετα το PET εμφανίζεται ως υδρόφοβο αφού έχει μεγάλη γωνία διαβροχής με το νερό και πολύ μικρότερο γ_S^p σε σχέση με το γ_S^d . Όσον αφορά τις τροποποιήσεις με He και He/O₂, προκύπτει ότι και οι δύο αύξησαν τα γ_S^{d-p} , γ_S^p τη μέρα της τροποποίησης ενώ το γ_S^d έμεινε ουσιαστικά ανεπηρέαστο, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET. Αφού η αύξηση στο γ_S^{d-p} προέκυψε από αύξηση στο γ_S^p , οι τροποποιήσεις οδήγησαν σε

αύξηση του πολικού χαρακτήρα του υλικού. Παρόλα αυτά οι τροποποιήσεις δεν ήταν σταθερές με το χρόνο. Αύξηση του χρόνου γήρανσης μείωσε τα γ_S^{d-p} , γ_S^p , και όπως στην περίπτωση των γωνιών διαβροχής, η μεταβολή ήταν πιο έντονη για τα τροποποιημένα με He υλικά.

Στον Πίνακα 5.2.2. παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ γλυκερόλης και της επιφάνειας των υλικών.

Υλικά	θ glycerol	γ_S^{LW} (mJ/m ²)	γ_S^+ (mJ/m ²)	γ_S^- (mJ/m ²)	γ_S^{AB} (mJ/m ²)	γ_S^{LW-AB} (mJ/m ²)
<i>S. epidermidis</i>	24.2	26	5.7	45.3	32.2	58.2
<i>PET</i>	66.7	44.9	1.1	0.5	0.7	45.6
<i>1 ώρα He</i>	30.0	32.1	3.5	40.9	23.8	55.9
<i>1 ώρα He/O₂</i>	24.0	32.6	4.3	37.9	25.6	58.2
<i>8 ημέρες He</i>	41.0	30.0	2.5	38.0	19.7	49.7
<i>8 ημέρες He/O₂</i>	35.8	33.4	2.5	38.1	19.7	53.1
<i>17 ημέρες He</i>	44.3	31.2	2.2	31.5	16.7	47.9
<i>17 ημέρες He/O₂</i>	43.6	29.5	3.2	25.2	18.1	47.6
<i>30 ημέρες He</i>	55.0	33.1	1.1	20.8	9.4	42.5
<i>30 ημέρες He/O₂</i>	32.4	36.7	3.4	24.5	18.2	54.9
<i>58 ημέρες He</i>	48.0	31.6	1.9	27.0	14.3	45.9
<i>58 ημέρες He/O₂</i>	45.6	35.2	1.5	28.9	13.0	48.2

Πίνακας 5.2.2. Μέση τιμή γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ γλυκερόλης και της επιφάνειας των υλικών, ολική επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_S^{LW-AB}), η συνιστώσα της λόγω διασποράς (γ_S^{LW}) καθώς και η πολική συνιστώσα (γ_S^{AB}). (γ_S^+) (γ_S^-). Η απόκλιση των γωνιών διαβροχής ήταν ± 3 deg.

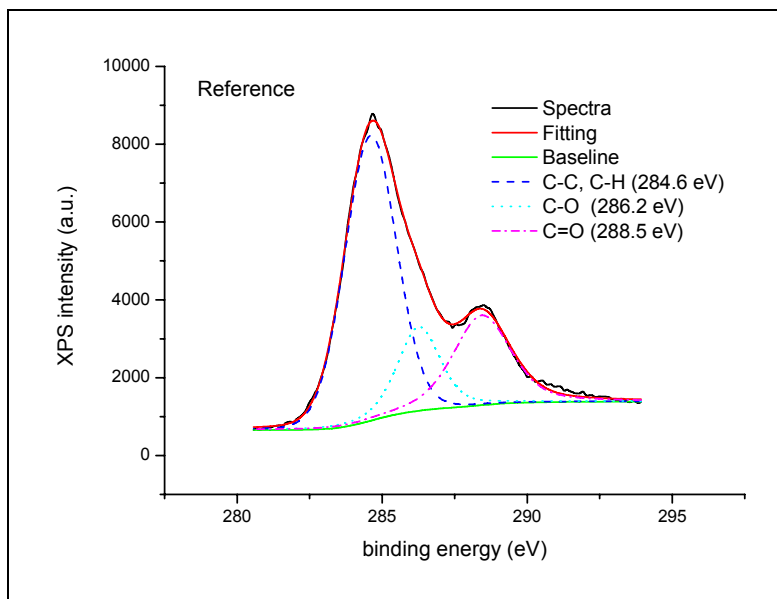
Από τις τιμές αυτές φαίνεται ότι οι τροποποιήσεις μείωσαν τη γωνία διαβροχής με τη γλυκερόλη, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET, ο χρόνος γήρανσης όμως προκάλεσε αύξηση των γωνιών αυτών.

Με βάση την προσέγγιση Lifshitz-van der Waals/Acid-Base της θερμοδυναμικής θεωρίας (Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.1.1.1.2.), με χρήση των γωνιών διαβροχής με τα τρία υγρά και χρήση της εξίσωσης Young, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1.4., υπολογίστηκε η επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_S^{LW-AB}), η συνιστώσα της λόγω αλληλεπιδράσεων οξέος-βάσεως (Acid-Base: AB) (γ_S^{AB}) και η συνιστώσα της λόγω αλληλεπιδράσεων Lifshitz-van der Waals (LW) (γ_S^{LW}) παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.2. Στον πίνακα αυτό παρουσιάζονται επίσης ο ηλεκτρονιο-δοτικός χαρακτήρας των υλικών (γ_S^-) αλλά και η τάση τους να δέχονται ηλεκτρόνια (γ_S^+). Από τις τιμές αυτές παρατηρείται ότι τα βακτήρια έχουν έντονο ηλεκτρονιο-δοτικό χαρακτήρα καθώς το γ_S^- είναι πολύ μεγαλύτερο του γ_S^+ . Το PET εμφάνισε μεγαλύτερο γ_S^+ σε σχέση με το γ_S^- , όμως γενικά είναι μη πολικό καθώς το γ_S^{AB} ήταν μικρό. Στην περίπτωση των τροποποιήσεων, και οι δύο αύξησαν σημαντικά τόσο το γ_S^{AB} όσο και το γ_S^- των υλικών, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET, όμως άφησαν τα γ_S^{LW} και γ_S^+ ουσιαστικά ανεπηρέαστα. Όπως και στην περίπτωση της dispersion-polar προσέγγισης, ο χρόνος γήρανσης μείωσε τόσο το γ_S^{AB} όσο και το γ_S^- των υλικών, ενώ και πάλι τα γ_S^{LW} και γ_S^+ έμειναν ουσιαστικά ανεπηρέαστα.

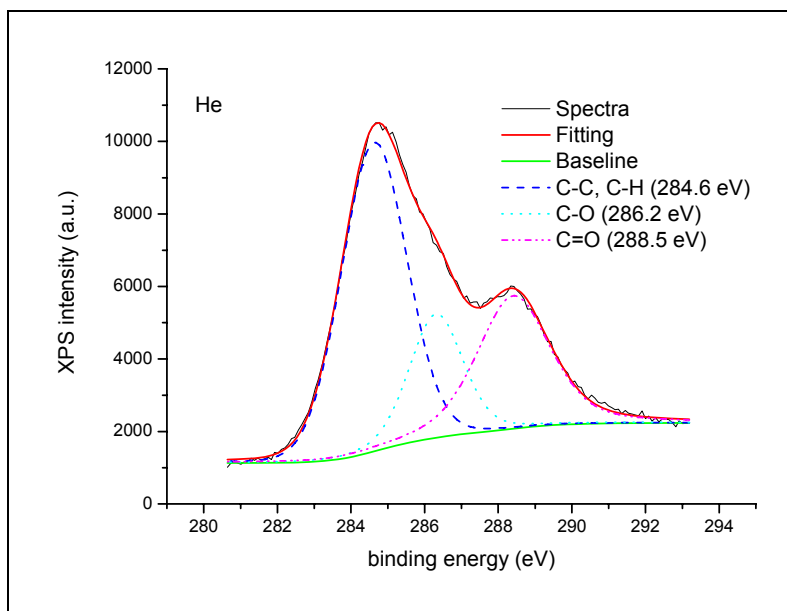
Το ότι τα τροποποιημένα με He/O₂ υλικά εμφανίζονται πιο σταθερά στο χρόνο, σε σχέση με τα τροποποιημένα με He, πρέπει να οφείλεται στο ότι ομάδες που έφεραν οξυγόνο ενσωματώθηκαν στην επιφάνεια του υλικού ταυτόχρονα με τη δημιουργία σταυροδεσμών που το Ήλιο προκάλεσε.

5.2.2.1.3. Χημική Σύσταση Επιφάνειας-XPS

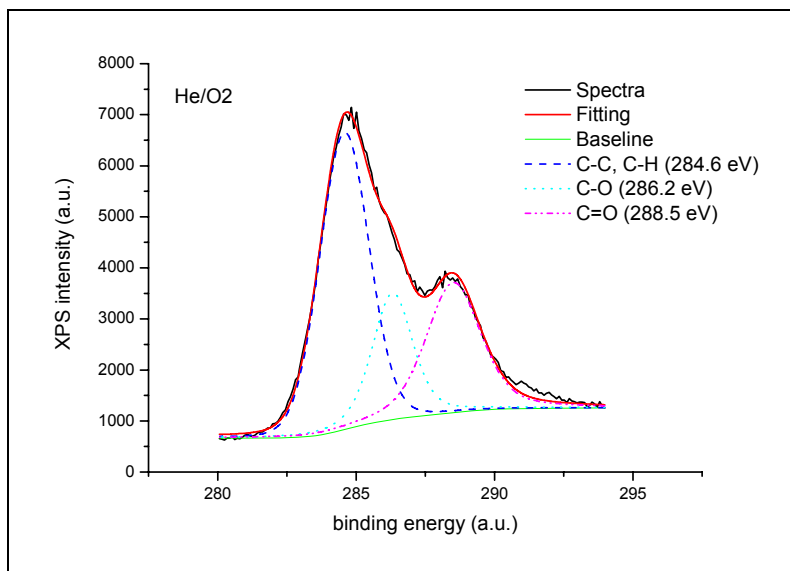
Η μελέτη της χημικής σύστασης της επιφάνειας του PET, του τροποποιημένου PET με He και He/O₂ τη μέρα της τροποποίησης και 45 μέρες μετά είχε τα εξής αποτελέσματα:



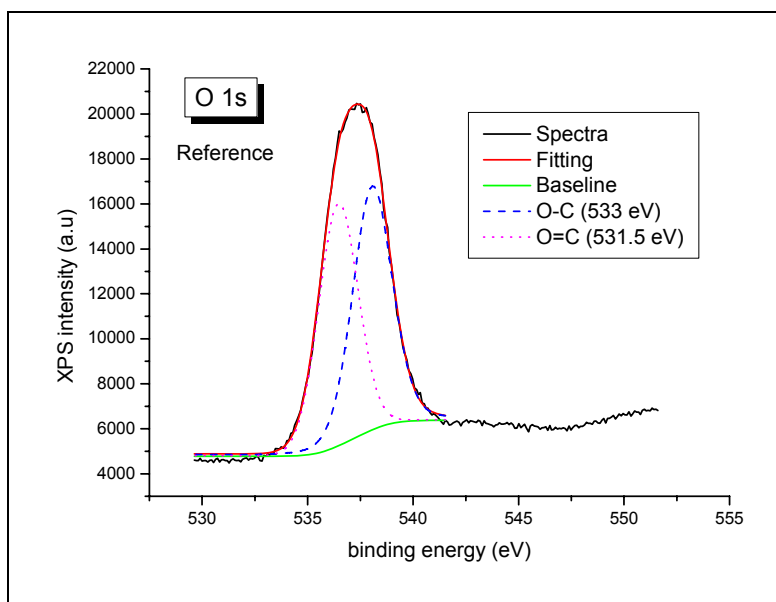
Διάγραμμα 5.2.1. Ανεπεξέργαστο PET, κορυφή C1s



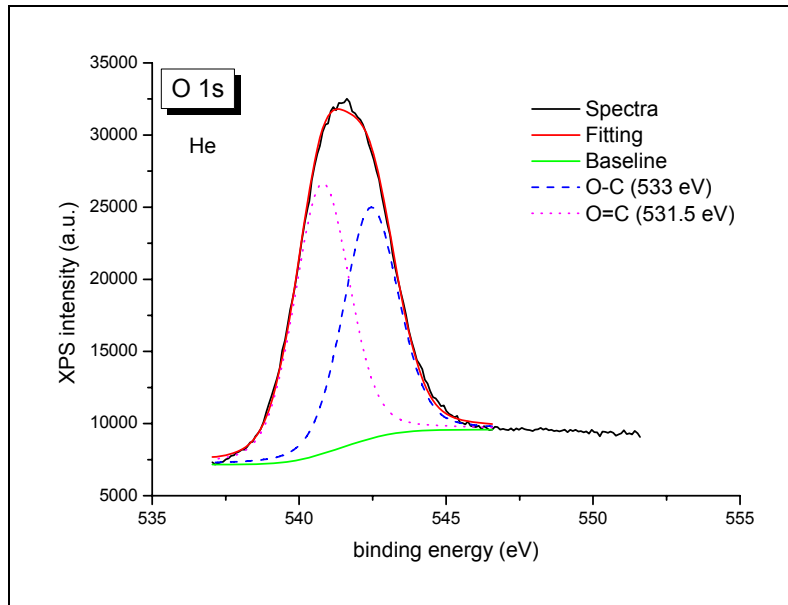
Διάγραμμα 5.2.2. Τροποποιημένο PET με He, τη μέρα της τροποποίησης, κορυφή C1s



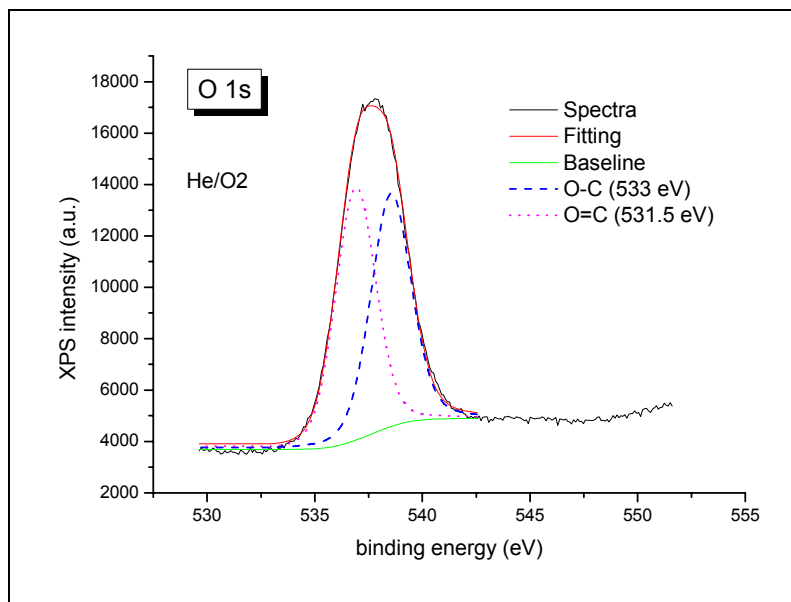
Διάγραμμα 5.2.3. Τροποποιημένο PET με He/O₂, τη μέρα της τροποποίησης, κορυφή C1s



Διάγραμμα 5.2.4. Ανεπεξέργαστο PET, κορυφή O1s

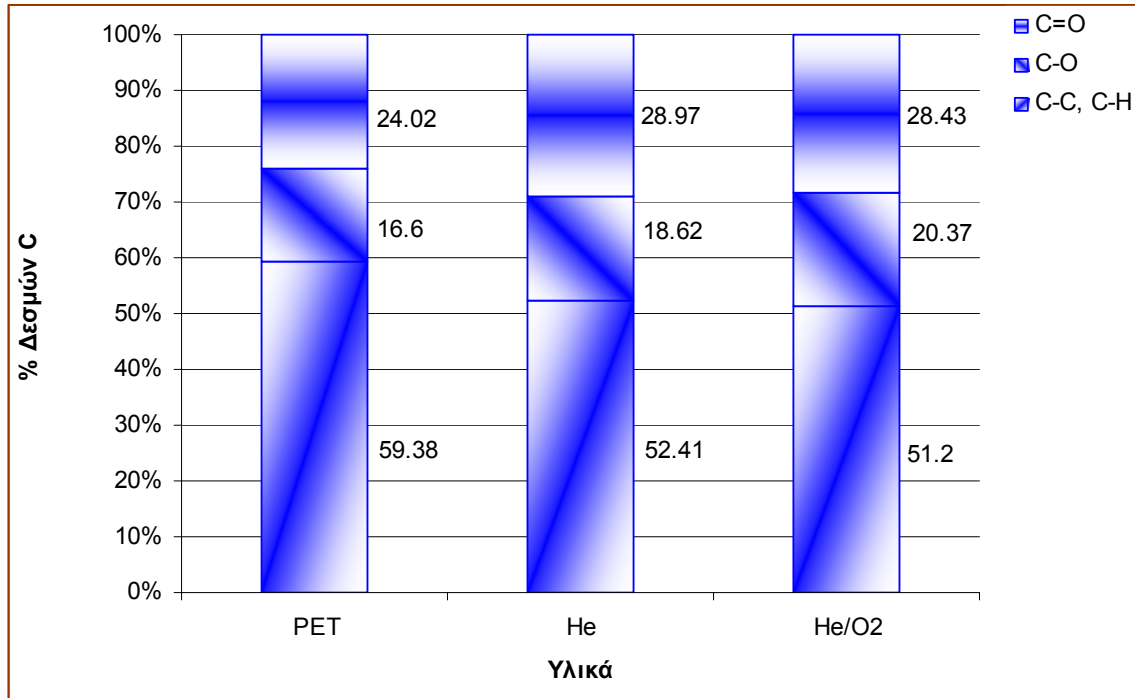


Διάγραμμα 5.2.5. Τροποποιημένο PET με He, τη μέρα της τροποποίησης, κορυφή O1s



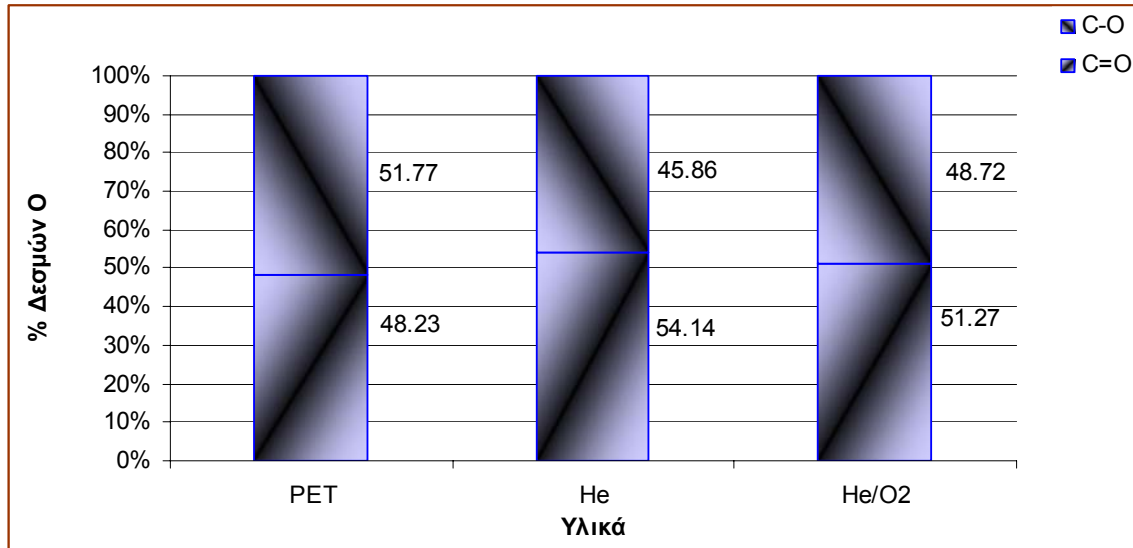
Διάγραμμα 5.2.6. Τροποποιημένο PET με He/O₂, τη μέρα της τροποποίησης, κορυφή O1s

Από την ολοκλήρωση των κορυφών των διαγραμμάτων 5.2.1.–5.2.3. υπολογίζεται το σχετικό ποσοστό των δεσμών του Άνθρακα στην τροποποιημένη και μη επιφάνεια του PET.



Διάγραμμα 5.2.7. Ποσοστό (%) δεσμών Άνθρακα στην τροποποιημένη και μη επιφάνεια του PET, τη μέρα της τροποποίησης

Από την ολοκλήρωση των κορυφών των διαγραμμάτων 5.2.4.–5.2.6. υπολογίζεται το σχετικό ποσοστό των δεσμών του Οξυγόνου στην τροποποιημένη και μη επιφάνεια του PET.



Διάγραμμα 5.2.8. Ποσοστό (%) δεσμών Οξυγόνου στην τροποποιημένη και μη επιφάνεια του PET, τη μέρα της τροποποίησης

Από το διάγραμμα 5.2.7. παρατηρείται ότι η επεξεργασία του PET με πλάσμα εισάγει Οξυγόνο στην επιφάνεια του τροποποιημένου PET, καθώς το ποσοστό των δεσμών του C – C και C – H μειώνεται από 59,38 % σε 51,2 %, και αντίστοιχα αυξάνεται το ποσοστό των δεσμών Οξυγόνου.

Το διάγραμμα 5.2.8. δείχνει τις μεταβολές των δεσμών του Οξυγόνου στο τροποποιημένο PET. Έτσι παρατηρείται ότι ευνοείται ο C = O σε σχέση με το δεσμό C – O.

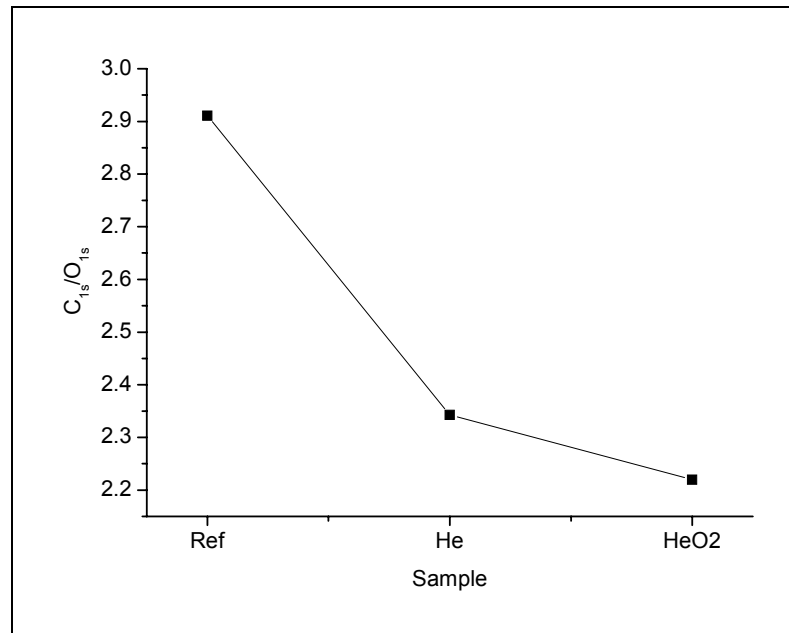
Η μεταβολή του λόγου του Άνθρακα ως προς το Οξυγόνο στην επιφάνεια όταν αυτή τροποποιηθεί με πλάσμα φαίνεται στο Διάγραμμα 5.2.9.

Από το διάγραμμα αυτό προκύπτει ότι η τροποποίηση αυξάνει την τιμή του λόγου O_{1s}/C_{1s} μέχρι και περίπου 20 %.

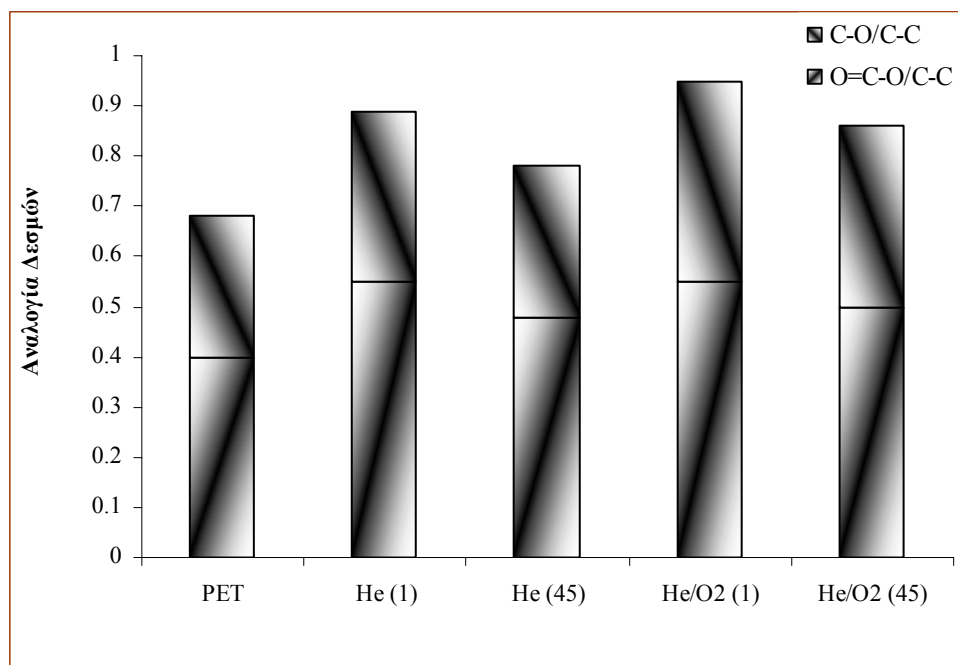
Από όλα τα παραπάνω αποτελέσματα που προέκυψαν με χρήση της τεχνικής XPS επιβεβαιώνεται αλλά και εξηγείται η παρατηρούμενη μείωση των γωνιών διαβροχής με το νερό και η αύξηση τόσο του πολικού χαρακτήρα (γ_S^P , γ_S^{AB}) αλλά και της επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{d-p} , γ_S^{LW-AB}), όπως αυτές υπολογίστηκαν με βάση τις δύο

προσεγγίσεις τις θερμοδυναμικής θεωρίας, για την ημέρα τροποποίησης των υλικών με πλάσμα.

Με σύγκριση των τροποποιημένων με He και He/O₂ τη μέρα της τροποποίησης και 45 μέρες μετά, μέσω της τεχνικής XPS, προκύπτει ότι ο χρόνος γήρανσης μειώνει την τιμή των λόγων C-O/C-C και C=O/C-C (Διάγραμμα 5.2.10). Ετσι εξηγείται η μείωση του πολικού χαρακτήρα (γ_S^p , γ_S^{AB}) αλλά και της επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{d-p} , γ_S^{LW-AB}) με το χρόνο γήρανσης.



Διάγραμμα 5.2.9. Μεταβολή του λόγου του Άνθρακα ως προς το Οξυγόνο κατά την τροποποίηση του PET, τη μέρα της τροποποίησης



Διάγραμμα 5.2.10. Μεταβολή των λόγων C-O/C-C και C=O/C-C με το χρόνο γήρανσης

5.2.2.2. Προσκόλληση Βακτηρίων

Στον Πίνακα 5.2.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων στα υλικά κάτω από στατικές συνθήκες και συνθήκες ροής.

Από τη μελέτη των αποτελεσμάτων που παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2.3. προκύπτει ότι και οι δύο τροποποιήσεις μείωσαν σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων τόσο την ημέρα της τροποποίησης, όσο και τις επόμενες ημέρες, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων αυξήθηκε σημαντικά ως συνάρτηση του χρόνου γήρανσης.

Υπό συνθήκες ροής, και συγκεκριμένα για ρυθμό διάτμησης 200 s^{-1} , ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτόν κάτω από στατικές συνθήκες. Επίσης, η μεγαλύτερη μείωση στη βακτηριακή προσκόλληση παρατηρήθηκε στο μη τροποποιημένο PET, δηλαδή το λιγότερο πολικό υλικό. Παρατηρήθηκε όμως ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων ακόμα και 58

ημέρες μετά την τροποποίηση, αν και αυξημένος σε σχέση με την πρώτη ημέρα της τροποποίησης, ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET.

Υλικό	<i>N*E6</i> Στατικές συνθήκες	<i>N*E6</i> 50 s ⁻¹	<i>N*E6</i> 200 s ⁻¹
<i>PET</i>	9.58±0.99 ^a	9.31±0.72 ^a	7.97±0.56 ^{a,b,c}
<i>1 ώρα He</i>	1.44±0.82	1.60±1.00	0.88±0.28
<i>1 ώρα He/O₂</i>	1.25±0.53	1.32±0.35	0.82±0.28
<i>8 ημέρες He</i>	2.25±0.49	2.08±0.60	1.00±0.43 ^b
<i>8 ημέρες He/O₂</i>	2.32±0.43 ^d	2.20±0.29 ^d	0.95±0.35 ^b
<i>17 ημέρες He</i>	3.15±0.39 ^{c,d,e}	2.30±0.20 ^d	2.45±0.23 ^{b,c,e}
<i>17 ημέρες He/O₂</i>	2.35±0.42 ^d	2.10±0.40	1.20±0.47 ^b
<i>30 ημέρες He</i>	4.51±0.38 ^{c,d,e}	3.99±0.80 ^{c,d}	3.50±0.27 ^{b,c,e}
<i>30 ημέρες He/O₂</i>	3.26±0.29 ^{c,d}	3.20±0.54 ^{c,d}	2.20±0.58 ^{b,c}
<i>58 ημέρες He</i>	4.55±0.35 ^{c,d,e}	4.75±0.22 ^{c,d,e}	4.23±0.25 ^{c,e}
<i>58 ημέρες He/O₂</i>	3.50±0.29 ^{c,d}	3.00±0.33 ^{c,d}	2.10±0.27 ^{b,c}

Πίνακας 5.2.3. Αριθμός Προσκολλημένων Βακτηρίων/cm² (*N*) στα προς εξέταση υλικά κάτω από στατικές συνθήκες και συνθήκες ροής (50 s⁻¹ και 200 s⁻¹)

^a $p < 0.05$ όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² σε όλα τα τροποποιημένα υλικά με τεχνική πλάσματος, σε κάθε συνθήκη, συγκρίνεται με τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² στο μη επεξεργασμένο PET.

^b $p < 0.05$ όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² σε ρυθμό διάτμησης 200 s⁻¹ συγκρίνεται με τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² υπό στατικές συνθήκες.

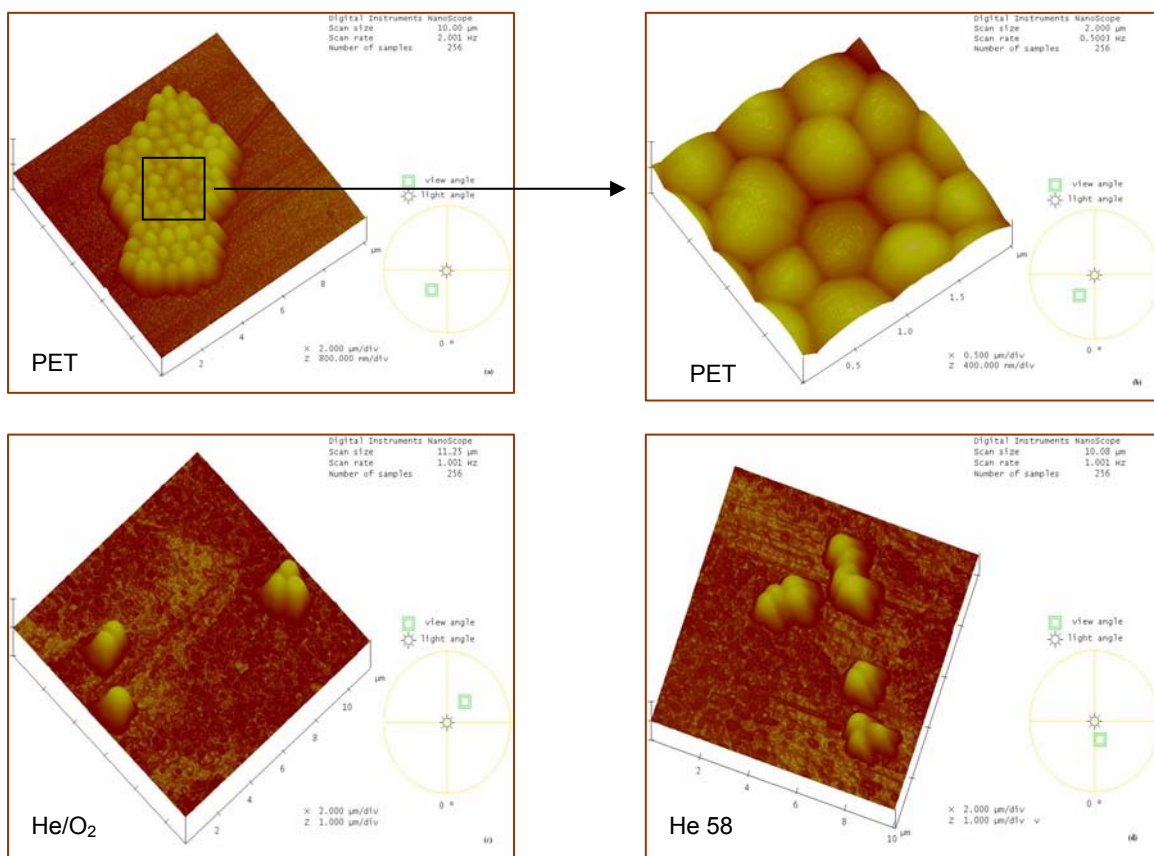
^c $p < 0.05$ όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² στα γηρανσμένα υλικά, για κάθε συνθήκη, συγκρίνεται με αυτόν στο υλικό He τη μέρα της τροποποίησης.

^d $p < 0.05$ όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² στα γηρανσμένα υλικά, για κάθε συνθήκη, συγκρίνεται με αυτόν στο υλικό He/O₂, τη μέρα της τροποποίησης

^e $p < 0.05$ όταν ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων/cm² στο τροποποιημένο με He, για κάθε συνθήκη, συγκρίνεται με αυτόν στο τροποποιημένο με He/O₂.

Επιπρόσθετα, από την παρατήρηση των εικόνων που λήφθηκαν με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) και μικροσκοπίου ατομικής δύναμης

(AFM) (Εικόνα 5.2.1.), προκειμένου να μελετηθεί η βακτηριακή προσκόλληση στα προς εξέταση υλικά, προέκυψε ότι το μη επεξεργασμένο PET, συγκράτησε, όχι μόνο το μεγαλύτερο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων, αλλά και σε μορφή συσσωματωμάτων. Αντίθετα, τα βακτήρια που ήταν προσκολλημένα στα υλικά που τροποποιήθηκαν σε εκκενώσεις He και He/O₂ εμφανίστηκαν μεμονωμένα. Το φαινόμενο της γήρανσης προκάλεσε ωστόσο την προσκόλληση τόσο μεμονωμένων βακτηρίων όσο και μικρών συσσωματωμάτων. Η αύξηση στο ρυθμό διάτμησης μείωσε το μέγεθος της συσσωμάτωσης στο PET.

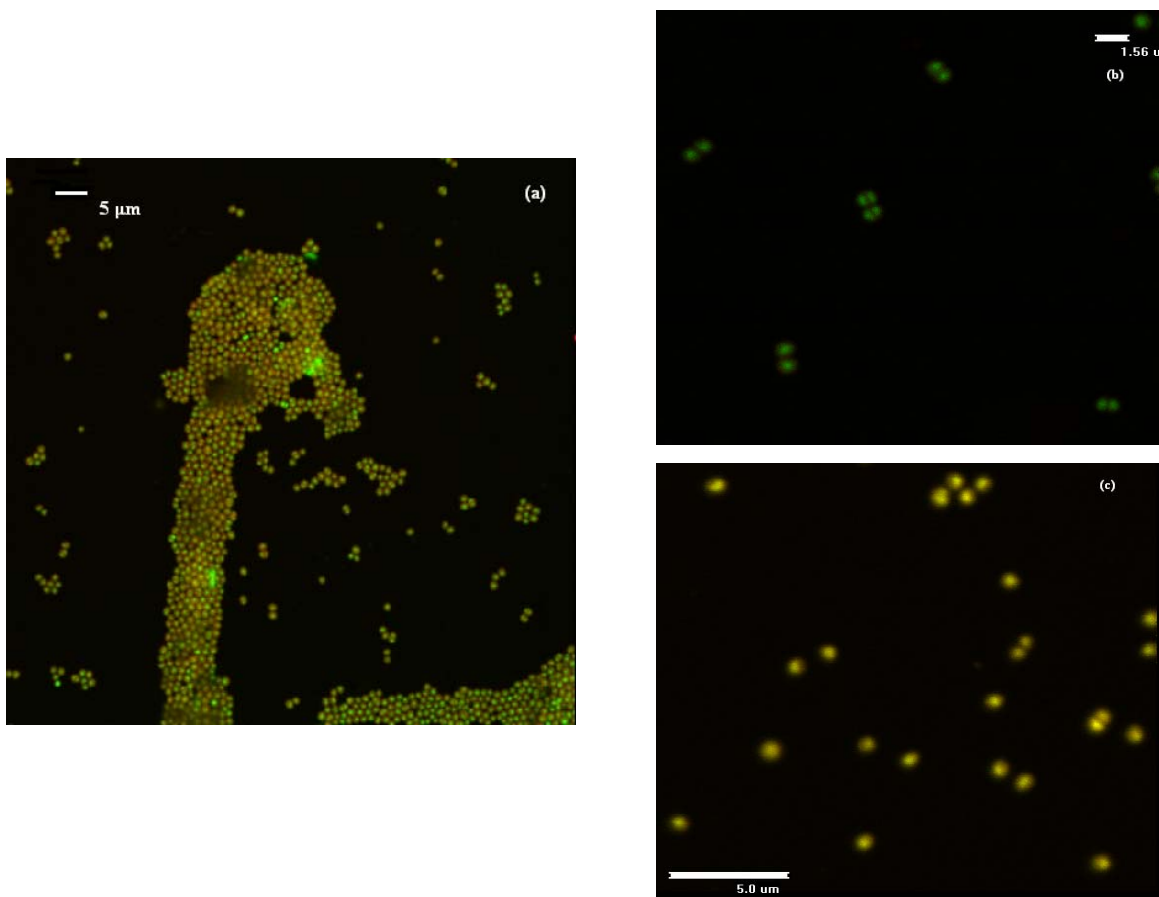


Εικόνα 5.2.1. Εικόνες AFM προσκολλημένων βακτηρίων στο μη τροποποιημένο PET, στο τροποποιημένο με He/O₂ PET τη μέρα της τροποποίησης και στο τροποποιημένο με He PET 58 ημέρες μετά

Με δεδομένο ότι η διαδικασία σχηματισμού βιομεμβράνης (biofilm) περιλαμβάνει δύο στάδια, το στάδιο της προσκόλλησης και αυτο της συσσωμάτωσης, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι το PET προάγει όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και το σχηματισμό biofilm περισσότερο ή τουλάχιστον σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με τα υδρόφιλα υλικά που προέκυψαν από την τροποποίηση σε πλάσμα He και He/O₂.

Προκειμένου να διερευνηθεί περισσότερο το φαινόμενο της συσσωμάτωσης, έγινε χρήση μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης αφού προηγουμένως τα προσκολλημένα βακτήρια είχαν συμανθεί με τη χρωστική Syto 9 (πράσινο χρώμα στις εικόνες), η οποία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και βάφει τα νουκλεϊνικά οξέα ζώντων και νεκρών βακτηρίων και με μια λεκτίνη (Wheat Germ Agglutinin), σεσημασμένη με φθοριόχρωμα (κόκκινο χρώμα στις εικόνες), η οποία δεσμεύεται ειδικά στη N-ακέτυλο γλυκοζαμίνη που αποτελεί κύριο συστατικό του πολυσακχαρίτη που τα βακτήρια παράγουν προκειμένου να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους (Polysaccharide Intercellular Adhesin: PIA). Η διαδικασία της χρώσης περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3, παράγραφο 3.5.4.

Από τις εικόνες που λήφθηκαν με το μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης (Εικόνα 5.2.2.) παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια που ήταν προσκολλημένα στο μη τροποποιημένο PET είχαν παράγει πολύ μεγαλύτερη ποσότητα PIA, σε σχέση με αυτά που είχαν προσκολληθεί στο τροποποιημένο με He/O₂ PET μία μέρα μετά την τροποποίηση αλλά και στο γηρανσμένο κατά 58 ημέρες τροποποιημένο με He PET. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το γηρανσμένο υλικό προήγαγε την παραγωγή PIA στα προσκολλημένα βακτήρια περισσότερο σε σχέση με το μη γηρανσμένο.



Εικόνα 5.2.2. Εικόνες μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης προσκολλημένων βακτηρίων στο μη τροποποιημένο PET (a), στο τροποποιημένο με He/O₂ PET τη μέρα της τροποποίησης (b) και στο τροποποιημένο με He PET 58 ημέρες μετά (c)

Από την παραπάνω εικόνα λοιπόν προκύπτει το συμπέρασμα ότι το φαινόμενο της συσσωμάτωσης είναι συνδυασμός φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικού και πιθανότατα αλλαγή του φαινοτύπου του βακτηρίου προκειμένου να προσαρμοσθεί στις συνθήκες του περιβάλλοντός του.

5.2.2.3. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων-Επιφανειακής Ενέργειας Υλικών-Ρυθμού Διάτμησης

Λόγω της υψηλής ιοντικής ισχύς του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος μπορεί να θεωρηθεί ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών ήταν αμελητέες (van Oss, 2003).

Επομένως, οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της τροποποίησης του PET σε εκκενώσεις He/O₂ αλλά και του χρόνου γήρανσης και σχετίζονται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας των υλικών πρέπει να είναι οι σημαντικές παράμετροι που επηρέασαν τη βακτηριακή προσκόλληση και συσσωμάτωση.

Επειδή, όπως αναλύθηκε παραπάνω οι φυσικοχημικές αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία της επεξεργασίας με πλάσμα αλλά και του χρόνου γήρανσης σχετίστηκαν με την αλλαγή στη διαβρεξιμότητα των υλικών, την αλλαγή στην επιφανειακή τους ενέργεια και τον πολικό τους χαρακτήρα αλλά και με την αλλαγή στη χημική τους σύσταση, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι η βακτηριακή προσκόλληση σχετίζεται άμεσα με την επιφανειακή ενέργεια των υλικών και την παρουσία ή μη πολικών ομάδων.

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η παραπάνω υπόθεση, μελετήθηκε η συσχέτιση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με την ολική επιφανειακή ενέργεια (γ_S^{d-p} , γ_S^{LW-AB}) των υλικών, την πολική (γ_S^p , γ_S^{AB}) και μη (γ_S^d , γ_S^{LW}) συνιστώσα της, όπως αυτές υπολογίστηκαν με βάση τις δύο προσεγγίσεις της θερμοδυναμικής θεωρίας.

Στον πίνακα 5.2.4. παρουσιάζονται οι συσχετίσεις του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων, υπό στατικές συνθήκες και υπό ρυθμό διάτμησης 200 s⁻¹, με τα γ_S^{d-p} , γ_S^p , γ_S^d . Από τους συντελεστές συσχέτισης, προκύπτει ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση των γ_S^{d-p} και γ_S^p , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του γ_S^d . Επομένως η βακτηριακή προσκόλληση μπορεί να μειωθεί με αύξηση της επιφανειακής ενέργειας του υλικού και κυρίως με αύξηση του πολικού του χαρακτήρα, ενώ δεν επηρεάζεται από τον μη πολικό χαρακτήρα του υλικού, ο οποίος άλλωστε δεν μεταβλήθει σημαντικά κατά την επεξεργασία των υλικών με τις συγκεκριμένες συνθήκες πλάσματος και το χρόνο γήρανσης. Όταν ο ρυθμός διάτμησης ήταν 200 s⁻¹ οι παραπάνω συντελεστές συσχέτισης μειώθηκαν, υποδηλώνοντας ότι ο ρυθμός διάτμησης είναι ένας επίσης παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση και αφού δεν λαμβάνεται υπόψη από την θερμοδυναμική θεωρία μειώνει τόσο την προβλεψιμότητά της όσο και την ικανότητά της να εξηγήσει τα αποτελέσματα. Όπως και στην περίπτωση των στατικών πειραμάτων, ο

αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του γ_S^d .

Στον πίνακα 5.2.5. παρουσιάζονται οι συσχετίσεις του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων, υπό στατικές συνθήκες και υπό ρυθμό διάτμησης 200 s^{-1} , με τα γ_S^{LW-AB} , γ_S^{AB} , γ_S^{LW} . Από τους συντελεστές συσχέτισης, προκύπτει ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση του γ_S^{AB} , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή των γ_S^{LW-AB} και γ_S^{LW} . Όταν ο ρυθμός διάτμησης ήταν 200 s^{-1} οι παραπάνω συντελεστές συσχέτισης μειώθηκαν, υποδηλώνοντας ότι ο ρυθμός διάτμησης είναι ένας επίσης παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση.

Στον πίνακα 5.2.6. παρουσιάζονται οι συσχετίσεις του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων, υπό στατικές συνθήκες και υπό ρυθμό διάτμησης 200 s^{-1} , με τα γ_S^- και γ_S^+ . Από τους συντελεστές συσχέτισης, προκύπτει ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση του γ_S^- , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή των γ_S^+ . Όταν ο ρυθμός διάτμησης ήταν 200 s^{-1} οι παραπάνω συντελεστές συσχέτισης μειώθηκαν, υποδηλώνοντας ότι ο ρυθμός διάτμησης είναι ένας επίσης παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση.

Με δεδομένο ότι τα βακτήρια εμφάνισαν έντονο ηλεκτρονιο-δοτικό χαρακτήρα, η προσκόλλησή τους μειώνεται με την αύξηση του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα του υλικού (γ_S^-), μιας και η τάση των υλικών να δέχονται ηλεκτρόνια (γ_S^+) δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά τη διαδικασία της τροποποίησης αλλά και εξαιτίας του φαινομένου γήρανσης.

Επίσης από τη μελέτη με XPS προέκυψε ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται με την αύξηση πολικών ομάδων και συγκεκριμένα με την αύξηση των ομάδων C=O και C-Oστην επιφάνεια του υλικού.

Πειραματικές συνθήκες	γ_S^{d-p}		γ_S^p		γ_S^d	
	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική*	Μη γραμμική*
N, στατικές	$N = -265738 \gamma_S + 2E7$ $p < 0.001, R^2 = 0.66$	$N = 2E8 \exp(-0.07 \gamma_S)$ $p < 0.001, R^2 = 0.74$	$N = -256690 \gamma_S^p + 9E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.94$	$N = 1E7 \exp(-0.06 \gamma_S^p)$ $p < 0.001, R^2 = 0.94$	$p = 0.026, R^2 = 0.44$	$p = 0.081, R^2 = 0.32$
N, 200 s^{-1}	$N = -242337 \gamma_S + 2E7$ $p < 0.001, R^2 = 0.62$	$N = 3E8 \exp(-0.09 \gamma_S)$ $p < 0.001, R^2 = 0.68$	$N = -232158 \gamma_S^p + 8E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.89$	$N = 1E7 \exp(-0.08 \gamma_S^p)$ $p < 0.001, R^2 = 0.87$	$p = 0.037, R^2 = 0.40$	$p = 0.082, R^2 = 0.28$

Πίνακας 5.2.4. Γραμμική και μη συσχέτιση και συντελεστές συσχέτισης (R^2) μεταξύ αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² (N) – επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{d-p}) πολικής (γ_S^p) και μη (γ_S^d) συνιστώσας της επιφανειακής ενέργειας των υλικών, όπως αυτές υπολογίσθηκαν με βάση την προσέγγιση «dispersion-polar» Οι τιμές p υποδηλώνουν το εάν οι συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές

*Στις περιπτώσεις όπου οι συσχετίσεις είναι μη στατιστικά σημαντικές, δεν παρουσιάζονται

Πειραματικές συνθήκες	γ_S^{LW-AB}		γ_S^{AB}		γ_S^{LW}	
	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική*	Μη γραμμική*
N, στατικές	$N = -284521 \gamma_S + 2E7$ $p = 0.049, R^2 = 0.38$	$N = 2E8 \exp(-0.09 \gamma_S)$ $p < 0.01, R^2 = 0.57$	$N = -322237 \gamma_S^{AB} + 9E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.89$	$N = 1E7 \exp(-0.08 \gamma_S^{AB})$ $p < 0.001, R^2 = 0.94$	$p = 0.037, R^2 = 0.61$	$p = 0.081, R^2 = 0.57$
N, 200 s ⁻¹	$p = 0.056, R^2 = 0.35^*$	$p = 0.014, R^2 = 0.51^*$	$N = -288462 \gamma_S^{AB} + 7E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.82$	$N = 1E7 \exp(-0.10 \gamma_S^{AB})$ $p < 0.001, R^2 = 0.83$	$p = 0.035, R^2 = 0.59$	$p = 0.063, R^2 = 0.41$

Πίνακας 5.2.5. Γραμμική και μη συσχέτιση και συντελεστές συσχέτισης (R^2) μεταξύ αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² (N) – επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{LW-AB}) πολικής (γ_S^{AB}) και μη (γ_S^{LW}) συνιστώσας της επιφανειακής ενέργειας των υλικών, όπως αυτές υπολογίσθηκαν με βάση την προσέγγιση «Lifshitz van der Waals-Acid Base». Οι τιμές p υποδηλώνουν το εάν οι συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές

*Στις περιπτώσεις όπου οι συσχετίσεις είναι μη στατιστικά σημαντικές, δεν παρουσιάζονται

Πειραματικές συνθήκες	γ_S^-		γ_S^+	
	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική*	Μη γραμμική*
N, στατικές	$N = -188126 \gamma_S^- + 9E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.88$	$N = 1E7 \exp(-0.04 \gamma_S^-)$ $p < 0.001, R^2 = 0.80$	$p = 0.028, R^2 = 0.54$	$p = 0.017, R^2 = 0.62$
N, 200 s^{-1}	$N = -170792 \gamma_S^- + 7E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.83$	$N = 1E7 \exp(-0.06 \gamma_S^-)$ $p < 0.001, R^2 = 0.76$	$p = 0.039, R^2 = 0.48$	$p = 0.022, R^2 = 0.59$

Πίνακας 5.2.6. Γραμμική και μη συσχέτιση και συντελεστές συσχέτισης (R^2) μεταξύ αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² (N) – ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα του υλικού (γ_S^-) πολικής και της τάσης του να δέχεται ηλεκτρόνια (γ_S^+), όπως αυτές υπολογίσθηκαν με βάση την προσέγγιση «Lifshitz van der Waals-Acid Base». Οι τιμές p υποδηλώνουν το εάν οι συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές

*Στις περιπτώσεις όπου οι συσχετίσεις είναι μη στατιστικά σημαντικές, δεν παρουσιάζονται

5.2.2.4. Συσχέτιση Προσκόλλησης Βακτηρίων - Θερμοδυναμικής Θεωρίας Προσεγγίσεις Dispersion-Polar και Lifshitz-van der Waals/Acid-Base - Ρυθμού Διάτμησης

Η έντονη επίδραση της ολικής επιφανειακής ενέργειας των υλικών στη βακτηριακή προσκόλληση επιχειρήθηκε να εξηγηθεί από τη θερμοδυναμική θεωρία και συγκεκριμένα από τις προσεγγίσεις Dispersion-Polar και Lifshitz van der Waals-Acid Base, όπως αυτές περιγράφηκαν στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στις παραγράφους 2.1.1.1.1. και 2.1.1.1.2.

Αφού υπολογίστηκε η ολική επιφανειακή ενέργεια υλικών και βακτηρίων και οι συνιστώσες της, πολικές και μη, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 5.2.2.1., υπολογίσθηκαν στην συνέχεια οι διεπιφανειακές ενέργειες υλικού-υγρού (SL), βακτηρίου-υλικού (BS) και βακτηρίου-υγρού (BL), όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.1.1.1.1. και 2.1.1.1.2. Ακολούθως, υπολογίστηκε η συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{adh}^{d-p} , ΔG_{d0}^{LW-AB}) και οι συνιστώσες της από τις αλληλεπιδράσεις διασποράς (ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^{LW}) και τις πολικές (ΔG_{d0}^p , ΔG_{d0}^{AB}), αντίστοιχα, με χρήση των εξισώσεων (2.8) της παραγράφου 2.1.1.1.1. και (2.18) της παραγράφου 2.1.1.1.2.

Οι τιμές των ΔG_{adh}^{d-p} , ΔG_{d0}^{LW-AB} , ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^{LW} , ΔG_{d0}^p , ΔG_{d0}^{AB} παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2.7.

Σύμφωνα με την θερμοδυναμική θεωρία, η προσκόλληση ευνοείται για $\Delta G_{adh} < 0$ και αυτό σημαίνει ότι η αυθόρμητη προσκόλληση συνοδεύεται από μείωση στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, όπως προβλέπεται από το δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2.7., η προσκόλληση ευνοείται περισσότερο στο μη τροποποιημένο PET και τα γηρανσμένα για περισσότερο χρόνο υλικά, σε σχέση με τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν σύντομα μετά την προσκόλληση.

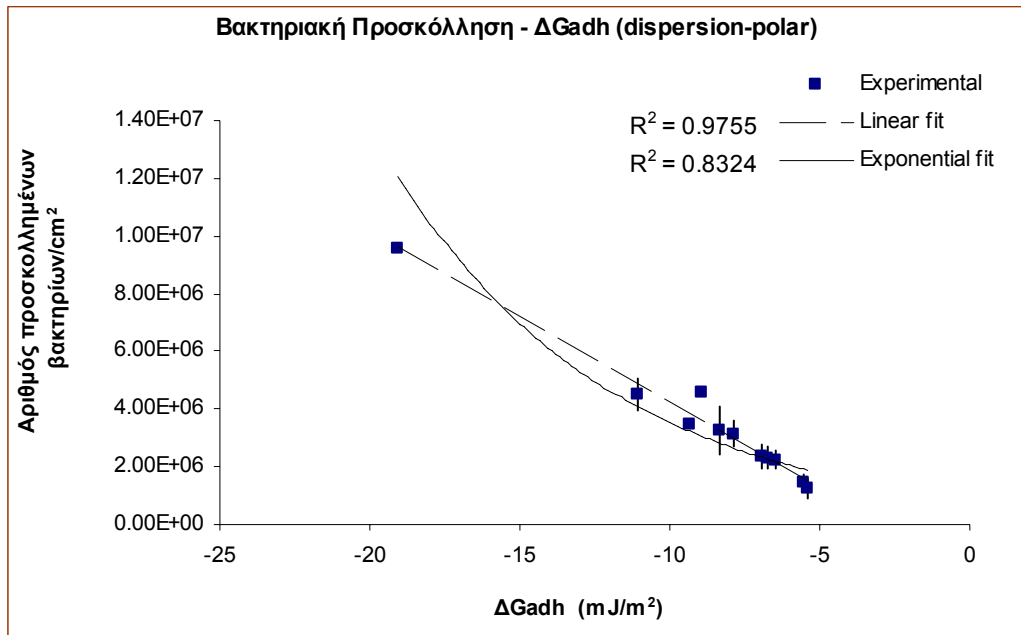
<u>Δείγματα</u>	ΔG_{d0}^d	ΔG_{d0}^p	ΔG_{adh}^{d-p}	ΔG_{d0}^{LW}	ΔG_{d0}^{AB}	ΔG_{d0}^{LW-AB}
	(mJ/m ²)	(mJ/m ²)	(mJ/m ²)	(mJ/m ²)	(mJ/m ²)	(mJ/m ²)
PET	-1.7	-17.4	-19.1	-1.7	-8.8	-10.5
1 ώρα He	-1.1	-4.5	-5.6	-0.9	18.2	17.3
1 ώρα He/O ₂	-1.1	-4.4	-5.4	-0.9	16.2	15.3
8 ημέρες He	-1.0	-5.5	-6.5	-0.7	17.9	17.2
8 ημέρες He/O ₂	-1.2	-5.5	-6.8	-1.0	17.9	16.9
17 ημέρες He	-1.0	-6.9	-7.9	-0.8	15.4	14.6
17 ημέρες He/O ₂	-0.5	-6.5	-7.0	-0.7	11.2	10.5
30 ημέρες He	-1.2	-9.9	-11.1	-0.9	11.5	10.4
30 ημέρες He/O ₂	-1.3	-7.2	-8.5	-1.2	10.7	9.5
58 ημέρες He	-1.0	-7.9	-8.9	-0.8	13.6	12.8
58 ημέρες He/O ₂	-1.4	-8.0	-9.3	-1.1	15.1	14.0

Πίνακας 5.2.7. Συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{adh}^{d-p} , ΔG_{d0}^{LW-AB}), πολική (ΔG_{d0}^p , ΔG_{d0}^{AB}) και μη (ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^{LW}) συνίστώσα της., όπως υπολογίζονται από τις προσεγγίσεις «Dispersion-Polar» και «Lifshitz van der waals-Acid Base»

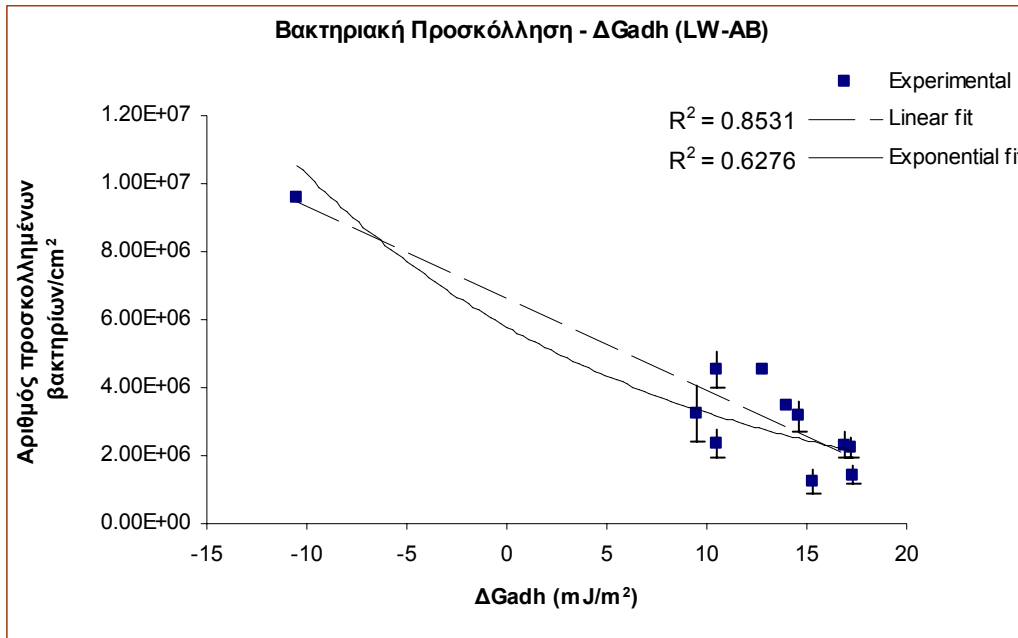
Είναι επίσης αξιοσημείωτο ότι ενώ σύμφωνα με την προσέγγιση Dispersion-Polar, οι προσκολλήσεις σε όλα τα υλικά είναι θερμοδυναμικά ευνοϊκές και ποικίλει ο βαθμός μείωσης της ελεύθερης ενέργειας του συστήματος, σύμφωνα με την προσέγγιση Lifshitz van der Waals-Acid Base οι προσκολλήσεις σε όλα τα υλικά εκτός από το μη τροποποιημένο PET είναι θερμοδυναμικά μη ευνοϊκές. Αυτό προκύπτει εξαιτίας του ότι η προσέγγιση Dispersion-Polar υιοθετεί τον κανόνα του γεωμετρικού μέσου τόσο για τις πολικές όσο και τις μη πολικές αλληλεπιδράσεις, ενώ στην περίπτωση της προσέγγισης Lifshitz van der Waals-Acid Base έχουμε δύο μη προσθετικούς όρους: τον ηλεκτρονιοδοτικό χαρακτήρα του υλικού (γ_S^-) και την τάση του να δέχεται ηλεκτρόνια (γ_S^+).

Από τα διαγράμματα: αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων - ΔG_{adh}^{d-p} , ΔG_{d0}^{LW-AB} , ΔG_{d0}^p , ΔG_{d0}^{AB} , ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^{LW} προέκυψαν οι συσχετίσεις που παρουσιάζονται στους πίνακες 5.2.8. και 5.2.9.

Ενδεικτικά παρατίθενται τα διαγράμματα 5.2.11 και 5.2.12 που δείχνουν την συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων - ΔG_{adh}^{d-p} και αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων - ΔG_{d0}^{LW-AB} , από στατικές συνθήκες.



Διάγραμμα 5.2.11. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – συνολικής ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{adh}^{d-p})



Διάγραμμα 5.2.12. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – συνολικής ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης ΔG_{d0}^{LW-AB}

Από τους πίνακες 5.2.8. και 5.2.9. προκύπτει ότι η βακτηριακή προσκόλληση σχετίζεται σημαντικά και αρνητικά με τα ΔG_{adh}^{d-p} , ΔG_{d0}^{LW-AB} , ΔG_{d0}^p και ΔG_{d0}^{AB} , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με τα ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^{LW} . Ο ρυθμός διάτμησης 200 s⁻¹ μείωσε τους συντελεστές συσχέτισης, υποδηλώνοντας τη σημαντικότητα του παράγοντα ροή στο φαινόμενο της βακτηριακής προσκόλλησης.

Σε μια προσπάθεια σύγκρισης των δύο προσέγγιση «Dispersion-Polar» και «Lifshitz van der Waals-Acid Base», φαίνεται η πρώτη να εξηγεί καλύτερα την προκύπτουσα βακτηριακή προσκόλληση.

Πειραματικές συνθήκες	ΔG_{adh}^{d-p}		ΔG_{d0}^p		ΔG_{d0}^d	
	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική*	Μη γραμμική*
N, στατικές	$N = -593610 \Delta G_{adh}^{d-p} - 2E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.98$	$N = 909872 \exp(-0.14 \Delta G_{adh}^{d-p})$ $p < 0.001, R^2 = 0.83$	$N = -625410 \Delta G_{d0}^p - 1E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.98$	$N = 995372 \exp(-0.14 \Delta G_{d0}^p)$ $p < 0.001, R^2 = 0.84$	$p = 0.034, R^2 = 0.41$	$p = 0.083, R^2 = 0.30$
N, 200 s ⁻¹	$N = -536268 \Delta G_{adh}^{d-p} - 2E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.92$	$N = 426592 \exp(-0.17 \Delta G_{adh}^{d-p})$ $p < 0.001, R^2 = 0.77$	$N = -565310 \Delta G_{d0}^p - 2E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.92$	$N = 478056 \exp(-0.18 \Delta G_{d0}^p)$ $p < 0.001, R^2 = 0.78$	$p = 0.045, R^2 = 0.37$	$p = 0.092, R^2 = 0.28$

Πίνακας 5.2.8. Γραμμική και μη συσχέτιση και συντελεστές συσχέτισης (R^2) μεταξύ αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² (N) – ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{adh}^{d-p}), πολικής (ΔG_{d0}^p) και μη (ΔG_{d0}^d) συνιστώσας της, όπως αυτές υπολογίσθηκαν με βάση την προσέγγιση «Dispersion-Polar». Οι τιμές p υποδηλώνουν το εάν οι συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές.

*Στις περιπτώσεις όπου οι συσχετίσεις είναι μη στατιστικά σημαντικές, δεν παρουσιάζονται

Experimental Conditions	ΔG_{d0}^{LW-AB}		ΔG_{d0}^{AB}		ΔG_{d0}^{LW}	
	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική	Μη γραμμική	Γραμμική *	Μη γραμμική *
N, στατικές	$N = -270620 \Delta G_{d0}^{LW-AB} + 7E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.85$	$N = 6E6 \exp(-0.06 \Delta G_{d0}^{LW-AB})$ $p < 0.001, R^2 = 0.63$	$N = -279066 \Delta G_{d0}^{AB} + 7E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.85$	$N = 6E6 \exp(-0.06 \Delta G_{d0}^{AB})$ $p < 0.001, R^2 = 0.62$	$p = 0.013, R^2 = 0.54$	$p = 0.025, R^2 = 0.36$
N, 200 s ⁻¹	$N = -245026 \Delta G_{d0}^{LW-AB} + 5E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.81$	$N = 4E6 \exp(-0.07 \Delta G_{d0}^{LW-AB})$ $p < 0.001, R^2 = 0.59$	$N = -252899 \Delta G_{d0}^{AB} + 6E6$ $p < 0.001, R^2 = 0.80$	$N = 5E6 \exp(-0.08 \Delta G_{d0}^{AB})$ $p < 0.001, R^2 = 0.59$	$p = 0.017, R^2 = 0.49$	$p = 0.036, R^2 = 0.32$

Πίνακας 5.2.9. Γραμμική και μη συσχέτιση και συντελεστές συσχέτισης (R^2) μεταξύ αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² (N) – ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{LW-AB}), πολικής (ΔG_{d0}^{AB}) και μη (ΔG_{d0}^{LW}) συνιστώσας της, όπως αυτές υπολογίσθηκαν με βάση την προσέγγιση «Lifshitz van der Waals-Acid Base». Οι τιμές p υποδηλώνουν το εάν οι συσχετίσεις είναι στατιστικά σημαντικές.

*Στις περιπτώσεις όπου οι συσχετίσεις είναι μη στατιστικά σημαντικές, δεν παρουσιάζονται.

Κεφάλαιο 6

*Μελέτη της Επίδρασης των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων Γυαλιού, Επιφανειακά Τροποποιημένου Γυαλιού, με Αυτο-Οργανούμενα Μονοστρωματικά Συστήματα, και του Ρυθμού Διάτμησης στην Προσκόλληση των Βακτηρίων και στην Έκφραση των Γονιδίων *ica**

Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των βακτηρίων σε γυαλί (OH) και επιφανειακά τροποποιημένο γυαλί με αυτό-οργανούμενα μονοστρωματικά συστήματα (Self-Assembled Monolayers: SAMs) με τελικές ομάδες αμίνης (NH₂) και μεθυλίου (CH₃).

Η βακτηριακή προσκόλληση πραγματοποιήθηκε υπό δυναμικές συνθήκες. Σκοπός ήταν η μελέτη της σχετικής συνεισφοράς των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών και του ρυθμού διάτμησης στη βακτηριακή προσκόλληση

Διερευνήθηκε παράλληλα η έκφραση των γονιδίων *ica* που κωδικοποιούν την παραγωγή μιας πολυσακχαριδικής φύσεως προσκολλητίνης (polysaccharide intercellular adhesin, PIA), η οποία συμβάλλει στη συσσωμάτωση των βακτηρίων και στο σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm).

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Μικροβιολογίας, της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Πατρών από την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Κα Ίρις Σπηλιοπούλου και την Υποψήφια Διδάκτορα Κα Αντιγόνη Φωκά.

Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας του υλικού και των ρυθμών διάτμησης με την έκφραση των γονιδίων, και πώς συσχετίζεται η βακτηριακή προσκόλληση με την έκφραση των γονιδίων αυτών. Η μέθοδος βασίζεται στο ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA του γονιδίου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσκόλληση των βακτηρίων, τόσο του πρότυπου slime-θετικού στελέχους όσο και του πρότυπου slime-αρνητικού, ήταν αυξημένη στο υπόστρωμα CH₃, σε σχέση με το υπόστρωμα NH₂ και κυρίως με το γυαλί. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος του διαλύματος αύξησε την βακτηριακή προσκόλληση, κυρίως στο γυαλί, εξαιτίας της μείωσης των απωστικών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η θερμοδυναμική θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά τα αποτελέσματα για υψηλής ιοντικής ισχύος διαλύματα, ενώ η DLVO για χαμηλής. Η εκτεταμένη DLVO θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά την επίδραση της φυσικοχημείας τόσο του διαλύματος όσο και της επιφάνειας του υλικού στη βακτηριακή προσκόλληση. Η αύξηση του ρυθμού διάτμησης, μείωσε την προσκόλληση των βακτηρίων με τρόπο που εξαρτώνταν από τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών, ενώ παράλληλα μείωσε την προβλεψιμότητα των παραπάνω θεωριών. Επομένως, η βακτηριακή προσκόλληση θεωρήθηκε ως

αποτέλεσμα του συνδιασμού φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμού μακρομοριακών δεσμών.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ica* έδειξαν ότι η έκφρασή τους ήταν συνάρτηση τόσο της φυσικοχημείας του υλικού όσο και του ρυθμού διάτμησης. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης των γονιδίων *ica* των βακτηρίων που είχαν έρθει σε επαφή με το υπόστρωμα CH₃ αλλά και με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης.

Εισαγωγή

Στην περίπτωση των πολυμερών υλικών, η χημική τροποποίηση της επιφάνειας οδήγησε, ειδικά στην περίπτωση του PVC που είχε μεγάλη τραχύτητα, σε ετερογενή επιφάνεια και ακόμη μεγαλύτερη τραχύτητα. Επιπρόσθετα, η παρουσία πλαστικοποιητών και άλλων ενώσεων που προστίθονται στο υλικό κατά την διαδικασία κατασκευής του οδηγούν σε πολύπλοκη χημική σύσταση. Ακόμα και στην περίπτωση του PET, που είχε μικρή επιφανειακή τραχύτητα, η τροποποίηση του σε εκκενώσεις He/O₂ προκάλεσε σε κάποιες περιπτώσεις αύξηση της τραχύτητας, ενώ από μελέτη με XPS προέκυψε η πολυπλοκότητα της χημικής σύστασης της επιφάνειας του υλικού, καθώς περιέχει βενζοϊκούς δακτυλίους, ομάδες κετόνης ή αλδεΐδης, καρβοξυλίου και υδροξυλίου.

Επομένως, μια αυστηρή μελέτη της επίδρασης της χημείας και της τοπογραφίας της επιφάνειας του υλικού στη βακτηριακή προσκόλληση απαιτεί ένα πρότυπο σύστημα που επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο του είδους των λειτουργικών-τελικών ομάδων της επιφάνειας του υλικού.

Σε αυτή την κατεύθυνση αποφασίστηκε η παρασκευή και χρήση υποστρωμάτων γυαλιού και επιφανειακά τροποποιημένου γυαλιού με αυτό-οργανούμενα μονοστρωματικά συστήματα (Self-Assembled Monolayers: SAMs) με τελικές ομάδες αμίνης (NH₂) και μεθυλίου (CH₃). Περιγραφή των SAMs ως μεθόδου μεταβολής των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας ενός υλικού γίνεται στο κεφάλαιο 1, και συγκεκριμένα στην παράγραφο 1.1.3.3.2.

6.1. Υλικά και Μέθοδοι

6.1.1. Υλικά

Ως υποστρώματα για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

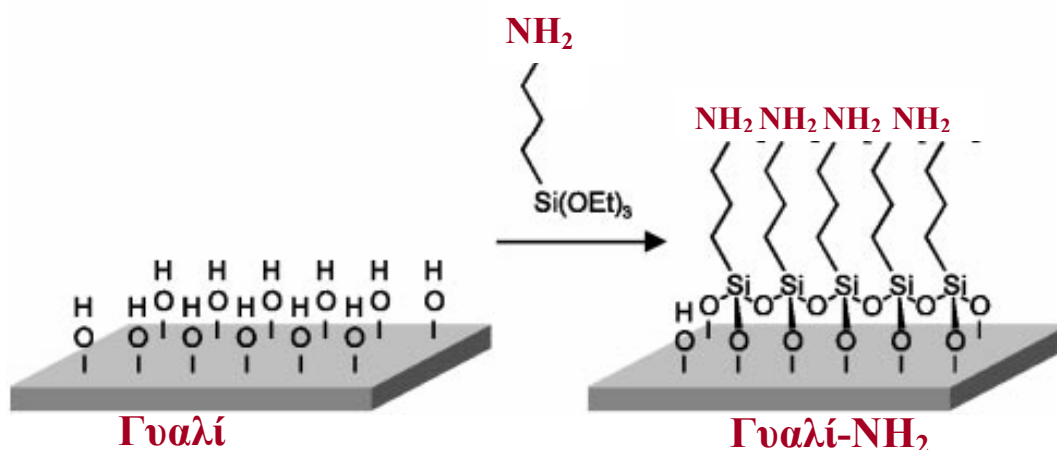
ι) Γυαλί το οποίο έφερε ως τελικές ομάδες Υδροξύλια (OH)

Για το σκοπό αυτό τα υποστρώματα γυαλιού, πάχους 1 mm, υδrolύθηκαν σε διάλυμα NaOH 5M για 1 ώρα προκειμένου στην επιφάνειά τους να προκύψουν ομάδες $-ONa$. Ακολούθως οξειδώθηκαν σε διάλυμα H_2O_2/H_2SO_4 αναλογίας 1/3 για 1 ώρα προκειμένου στην επιφάνειά τους να σχηματιστούν ομάδες OH, μετά από πλύσιμο 1 ώρας με απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό.

Οι χρόνοι υδρόλυσης και οξειδωσης των υποστρωμάτων επιλέχθηκαν ώστε να μην αυξάνεται σημαντικά η τραχύτητα του υλικού. Μικρότεροι χρόνοι οδήγησαν σε αύξηση της τραχύτητας εξαιτίας της ανισοτροπίας της διαδικασίας.

ii) Γυαλί το οποίο έφερε ως τελικές ομάδες Αμίνης (NH_2) (άμινο-ομάδες)

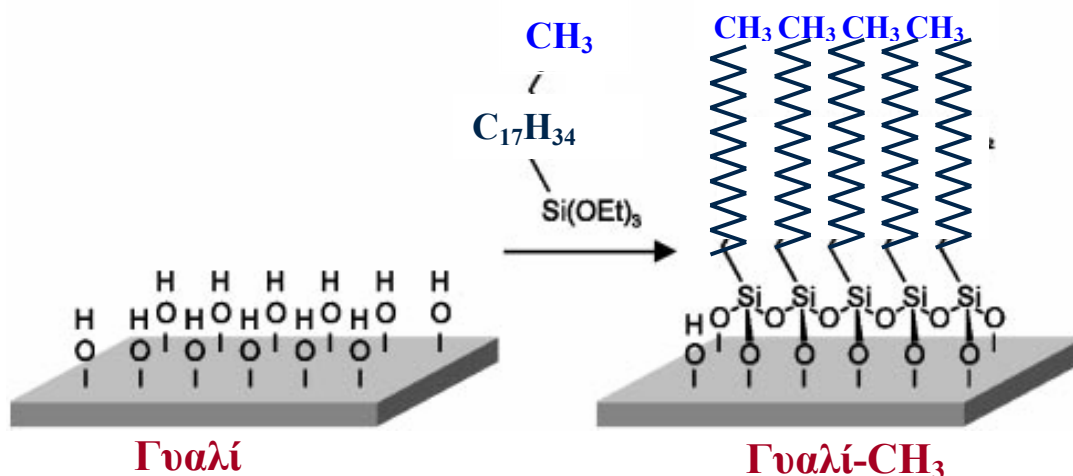
Για το σκοπό αυτό τα υποστρώματα γυαλιού, μετά από υδρόλυση, οξειδωση και ξήρανση για 2 ώρες στους $120^\circ C$, τροποποιήθηκαν με σιλάνιο το οποίο έφερε ως τελική ομάδα άμινο-ομάδα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το σιλάνιο “Amino Propyl Tri Ethoxy Silane” (APTES). Η ομάδα σιλανίου $Si(EtO)_3$ του APTES αλληλεπιδρά ισχυρά με τα υδροξύλια της επιφάνειας του γυαλιού και οδηγεί στο σχηματισμό χημικού δεσμού, ενώ η τελική του ομάδα (NH_2) παραμένει ελεύθερη να αλληλεπιδράσει με το βακτηριακό εναιώρημα όπως φαίνεται στο σχήμα 6.1.



Σχήμα 6.1. Τροποποίηση γυαλιού με σιλάνιο που φέρει τελικές ομάδες αμινο-ομάδες (NH_2)

υ) Γυαλί το οποίο έφερε ως τελικές ομάδες Μεθυλίον (CH_3) (μέθυλο-ομάδες)

Για το σκοπό αυτό τα υποστρώματα γυαλιού, μετά από υδρόλυση, οξείδωση και ξήρανση για 2 ώρες στους $120\text{ }^\circ\text{C}$, τροποποιήθηκαν με σιλάνιο το οποίο έφερε ως τελική ομάδα μέθυλο-ομάδα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε το σιλάνιο “Octadecyl Tri Ethoxy Silane” (ODS). Η ομάδα σιλανίου $Si(EtO)_3$ του ODS αλληλεπιδρά ισχυρά με τα υδροξύλια της επιφάνειας του γυαλιού και οδηγεί στο σχηματισμό χημικού δεσμού, ενώ η τελική του ομάδα (CH_3) παραμένει ελεύθερη να αλληλεπιδράσει με το βακτηριακό εναιώρημα όπως φαίνεται στο σχήμα 6.2.



Σχήμα 6.2. Τροποποίηση γυαλιού με σιλάνιο που φέρει τελικές ομάδες μέθυλο-ομάδες (CH_3)

Για την παρασκευή των υποστρωμάτων NH_2 , CH_3 αρχικά χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της **εμβάπτισης** στο αντίστοιχο διάλυμα σιλανίου, δηλαδή σε 1% (v/v) APTES σε αιθανόλη, για μία ώρα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, και σε 5% (v/v) ODS σε εξάνιο, για μία ώρα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος αντίστοιχα, και ακολούθησε πλύσιμο των υποστρωμάτων με τον αντίστοιχο διαλύτη και σταθεροποίηση στους $80\text{ }^\circ\text{C}$ (Faucheux et al., 2004). Διαπιστώθηκε όμως ότι με αυτό τον τρόπο, ακόμα και μειώνοντας τη συγκέντρωση του σιλανίου στο διάλυμα ή και το χρόνο τροποποίησης, δεν ήταν εφικτό να παρασκευαστούν μονοστρώματα σιλανίου, καθώς τα μόρια των σιλανίων συσσωματώνονταν αυξάνοντας σημαντικά την τραχύτητα (Εικόνα 6.1.).

Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της χημικής εναπόθεσης των μονοστρωμάτων σιλανίου σε φάση ατμών, σε υψηλή θερμοκρασία, δηλαδή η **μέθοδος της εξάχνωσης**.

Για το σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν δοχεία από Teflon μέσα στα οποία έγινε η χημική τροποποίηση των γυαλιών σε υψηλή θερμοκρασία.

Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των μέθυλο-ομάδων, τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο 200 μl ODS, και αυτά μαζί με τα υποστρώματα γυαλιού τοποθετήθηκαν στο δοχείο Teflon. Η τροποποίηση έγινε στους 150 °C, για 3 ώρες. Ακολούθησε πλύσιμο με εξάνιο και σταθεροποίηση για μισή ώρα στους 80 °C.

Στην περίπτωση των άμινο-ομάδων, τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δοχείο 100 μl APTES μαζί με 700 μl τολουένιο, και αυτά μαζί με τα υποστρώματα γυαλιού τοποθετήθηκαν στο δοχείο Teflon. Η τροποποίηση έγινε στους 90 °C, για 1 ώρα. Ακολούθησε πλύσιμο με αιθανόλη, τολουένιο, 1mM NaOH 1 mM HCl σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά με τον κάθε διαλύτη, προκειμένου να απομακρυνθούν τα μη ισχυρά προσκολλημένα σιλάνια, και σταθεροποίηση για μισή ώρα στους 80 °C.

Η μέθοδος της εξάχνωσης απέτρεψε τη δημιουργία συσσωματωμάτων πάνω στην επιφάνεια καθώς τα συσσωματώματα σιλανίων δεν εξαχνώνονται εύκολα (Sugimura et al., 2002).

6.1.2. Χαρακτηρισμός Υλικών

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών χρησιμοποιήθηκαν κάποιες από τις τεχνικές που περιγράφονται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.2.

Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η τοπογραφία και η τραχύτητα των υλικών μέσω μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM). Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με τρία υγρά (νερό και γλυκερόλη ως πολικά και μεθυλενο-ιωδίδιο ως μη) και τον υπολογισμό της επιφανειακής τους ενέργειας, αλλά και η τεχνική της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS), όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 3.2.3.2. αλλά και στο Παράρτημα 4. Η ανάλυση XPS έγινε στο ΕΙΧΗΜΥΘ. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε το δυναμικό ζ κόκκων γυαλιού πριν και μετά την τροποποίηση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος pH 7.4 και ιοντικής

ισχύος 10, 100 και 180 mM, από μετρήσεις κινητικότητας με το z-sizer (Παράρτημα 4).

6.1.3. Βακτήρια

Χρησιμοποιήθηκαν δύο στελέχους *S. epidermidis*: το πρότυπο ATCC 35984 το οποίο φέρει το οπερονίο *ica*, είναι slime-θετικό και έχει αποδεδειγμένη ικανότητα παραγωγής βιομεμβράνης (biofilm) και πρότυπο ATCC 12228, το οποίο δεν φέρει το οπερόνιο *ica* και είναι slime-αρνητικό. Η προετοιμασία των βακτηρίων για την πειραματική διαδικασία έγινε όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.3.

6.1.4. Χαρακτηρισμός Βακτηρίων

Για τη μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των βακτηρίων, και συγκεκριμένα της επιφανειακής τους ενέργειας, χρησιμοποιήθηκε γωνιόμετρο για μετρήσεις γωνιών διαβροχής με τρία υγρά (νερό και γλυκερόλη ως πολικό και μεθυλενο-ιωδίδιο ως μη), όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.3.4.1. Επιπρόσθετα, υπολογίστηκε το δυναμικό ζ των βακτηρίων σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος pH 7.4 και ιοντικής ισχύος 10, 100 και 180 mM, από μετρήσεις κινητικότητας με το z-sizer (Παράρτημα 4).

6.1.5. Μελέτη της Βακτηριακής Προσκόλλησης

Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης έγιναν δυναμικά πειράματα για τα οποία χρησιμοποιήθηκε το Parallel Plate Flow Chamber, το οποίο περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.4.1. Η βακτηριακή προσκόλληση μελετήθηκε κάτω από ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} και 2000 s^{-1} . Το εναιώρημα βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκέντρωσης 3×10^8 βακτήρια/ml. Τα πειράματα είχαν διάρκεια 150 λεπτά. Τα προσκολλημένα σε κάθε υλικό βακτήρια μελετήθηκαν με χρήση της μεθόδου μέτρησης του αριθμού των ζώντων προσκολλημένων στην επιφάνεια βακτηρίων (Colony Forming Units Counting Method: CFUs), όπως αυτή περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.1. αλλά και με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM).

Τα δείγματα για το SEM προετοιμάστηκαν όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.5.2. Για τη μελέτη της βακτηριακής προσκόλλησης χρησιμοποιήθηκε επίσης το μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης. Η προετοιμασία των δειγμάτων για την παρατήρηση με το συγκεκριμένο μικροσκόπιο περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και στην παράγραφο 3.5.4. και 3.5.

6.1.6. Μελέτη της Έκφρασης των Γονιδίων

Για τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ica* προσκολλημένων βακτηρίων και βακτηρίων του εναιωρήματος που έχουν έρθει σε επαφή με γυαλί που φέρει ομάδες OH ή CH₃ για ρυθμό διάτμησης 50 και 2000 s⁻¹, η διαδικασία περιγράφεται στο κεφάλαιο 3 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 3.6. αλλά και αναλυτικά στο Παράρτημα 5. Συνοπτικά, διάλυμα βακτηρίων της εκθετικής φάσης χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα της βακτηριακής προσκόλλησης. Τα προσκολλημένα στα υλικά βακτήρια αποκολλήθηκαν με χρήση τρυψίνης. Τόσο τα «προσκολλημένα» όσο και τα βακτήρια του εναιωρήματος υποβλήθησαν σε απομόνωση RNA. Ακολούθως, το RNA μεταγράφηκε αντιστρόφως σε DNA. Με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) επιτρέπει η ποσοτικοποίηση των προϊόντων (έκφραση γονιδίων) με απόλυτο υπολογισμό.

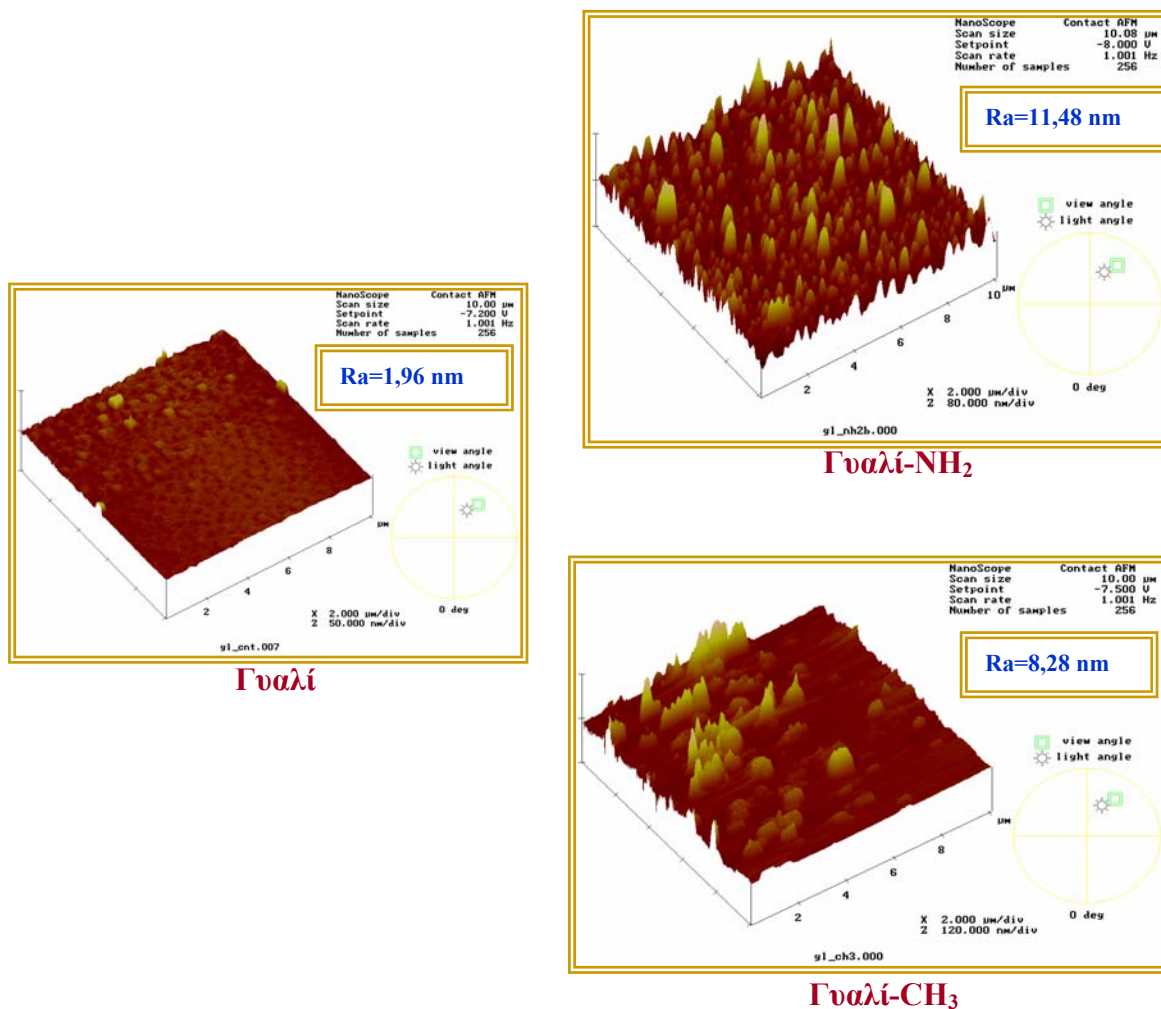
6.2. Αποτελέσματα

6.2.1. Υλικά

6.2.1.1. Τοπογραφία-Τραχύτητα

Με χρήση του μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (AFM) λήφθηκαν εικόνες σε διάφορες περιοχές των τροποποιημένων και μη γυαλιών και αφού ελέγχθηκε η ομοιογένειά τους, επιλέχθηκε να παρουσιαστούν οι εικόνες που ακολουθούν. Επιπρόσθετα, με χρήση του λογισμικού Nanoscope III, έκδοση 5.12r2 υπολογίστηκε η μέση επιφανειακή τραχύτητα (average surface roughness: Ra) των υλικών και παρατίθεται στις εικόνες

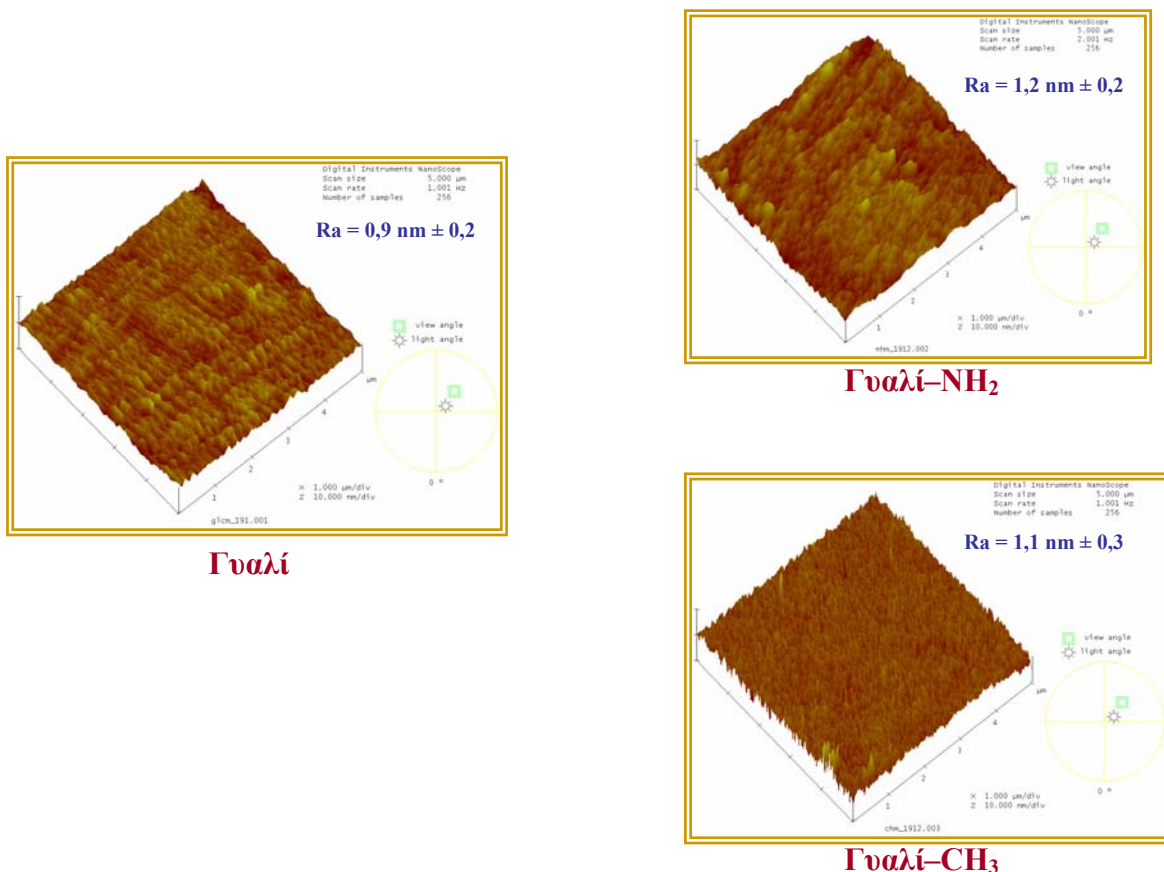
Στην εικόνα 6.1. παρουσιάζεται η τοπογραφία του γυαλιού μετά από υδρόλυση και οξείδωση αλλά και των τροποποιημένων γυαλιών με (NH₂) και (CH₃) με τη μέθοδο της εμβάπτισης, ως αντιπροσωπευτικές του κάθε είδους.



Εικόνα 6.1. Εικόνες AFM γυαλιού και τροποποιημένου με σιλάνια γυαλιού με τη μέθοδο της εμβάπτισης.

Από την εικόνα 6.1. προκύπτει ότι με τη μέθοδο της εμβάπτισης δεν ήταν εφικτή η δημιουργία μονοστρωμάτων σιλανίων στο γυαλί καθώς ταυτόχρονα προσροφούνταν και συσσωματώματα σιλανίων. Αυτό είχε ως συνέπεια να αλλάξει σημαντικά και η τραχύτητα των υλικών, παράγοντας που όπως αποδείχθηκε στο κεφάλαιο 4 επίσης επηρεάζει τη βακτηριακή προσκόλληση.

Στην εικόνα 6.2. παρουσιάζεται η τοπογραφία του γυαλιού μετά από υδρόλυση και οξείδωση αλλά και των τροποποιημένων γυαλιών με (NH₂) και (CH₃) με τη μέθοδο της εξάχνωσης, ως αντιπροσωπευτικές του κάθε είδους.



Εικόνα 6.2. Εικόνες AFM γυαλιού και τροποποιημένου με σιλάνια γυαλιού με τη μέθοδο της εμβάπτισης.

Από την εικόνα 6.2. προκύπτει ότι με τη μέθοδο της εξάχνωσης των σιλανίων σε υψηλή θερμοκρασία ήταν εφικτή η δημιουργία μονοστρωμάτων σιλανίων στο γυαλί καθώς ουσιαστικά δεν μεταβλήθηκε σημαντικά η τοπογραφία και η τραχύτητα του γυαλιού κατά την τροποποίηση .

6.2.1.2. Γωνίες Διαβροχής-Επιφανειακή Ενέργεια-Δυναμικό ζ

Στον Πίνακα 6.1. παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού, μεθυλενο-ιωδιδίου (CH_2I_2) και γλυκερόλης με την επιφάνεια των υλικών-βακτηρίων, όπως αυτές μετρήθηκαν με τη χρήση γωνιομέτρου, και η τυπική απόκλιση. Με δεδομένο ότι η επιφανειακή τραχύτητα δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την τροποποίηση, και άρα η πραγματική επιφάνεια του υλικού δεν διέφερε ουσιαστικά από τη γεωμετρική (Kamusewitz και Possart, 2003), θεωρείται ότι η

μεταβολή στις γωνίες διαβροχής οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στη μεταβολή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας των υλικών.

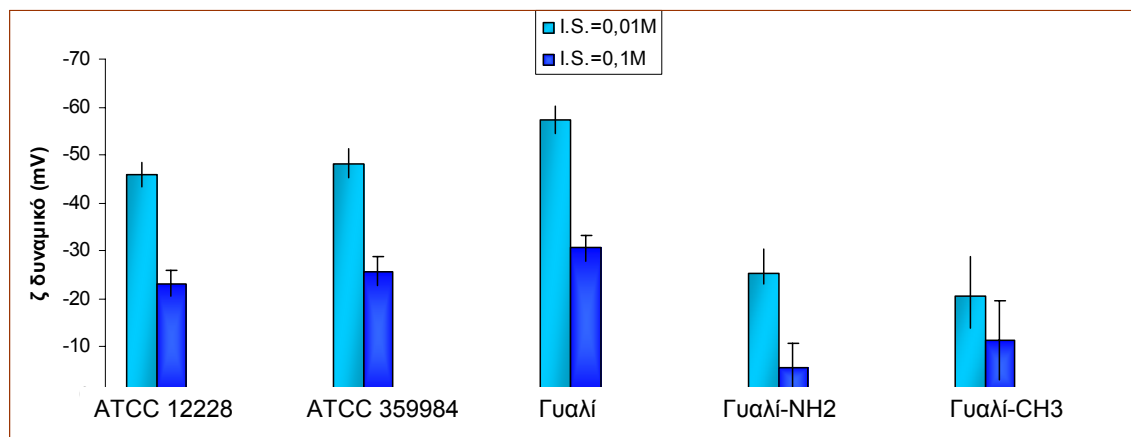
Στον πίνακα 6.1. παρουσιάζονται και οι μέσες τιμές και η τυπική απόκλιση του δυναμικού ζ βακτηρίων και υλικών, όπως αυτές μετρήθηκαν με το ζ-sizer.

<u>Υλικά</u>	θ νερού (deg)	θ CH ₂ I ₂ (deg)	Θ γλυκερόλης	ζ (mV) 0.01 M	ζ (mV) 0.1 M
ATCC 35984	23.1±3	64.5±4	24.2±3	-48.3±3	-25.8±3.1
ATCC 12228	112.0±2	78.2±4	93.8±2	-45.8±2.5	-23.2±2.8
Γυαλί	10.0±2	34.5±2	19.0±2	-57.5±3.1	-30.6±2.7
Γυαλί-NH ₂	49.1±3	36.8±3	47.1±2	-25.4±2.4	-5.1±4.5
Γυαλί-CH ₃	93.0±3	55.2±2	71.6±2	-20.7±6.9	-11.3±8.2

Πίνακας 6.1. Μέση τιμή γωνιών διαβροχής (θ , deg) μεταξύ νερού, μεθυλενο-ιωδιδίου (CH₂I₂), γλυκερόλης και υλικών-βακτηρίων και μέση απόκλιση. Μέση τιμή δυναμικού ζ (mV) βακτηρίων και υλικών και τυπική απόκλιση, για PBS ιοντικής ισχύος 0.01 M και 0.1 M.

Από τις τιμές των γωνιών διαβροχής φαίνεται ότι το slime-θετικό βακτήριο έχει πολύ μικρότερη γωνία διαβροχής, τόσο με το νερό όσο και με τα άλλα υγρά, σε σχέση με το slime-αρνητικό στέλεχος, ενώ τα δυναμικά ζ τους δεν διαφέρουν σημαντικά. Οι άμινο-ομάδες και κυρίως οι μέθυλο-ομάδες αύξησαν σημαντικά τη γωνία διαβροχής με όλα τα υγρά σε σχέση με το γυαλί. Επιπρόσθετα, το γυαλί εμφάνισε το περισσότερο αρνητικό υπόστρωμα σε σχέση με τα άλλα δύο υποστρώματα. Τα βακτήρια εμφανίστηκαν ως πολύ αρνητικά φορτισμένα, χωρίς το δυναμικό να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των δύο στελεχών. Η αύξηση της ιοντικής ισχύος μείωσε σημαντικά το δυναμικό ζ τόσο των υποστρωμάτων όσο και των βακτηρίων, καθώς το νέφος των ιόντων του διαλύματος της μεγαλύτερης ιοντικής ισχύος εξουδετέρωσε σε μεγάλο βαθμό τα αρνητικά φορτία των υλικών και των βακτηρίων. Το δυναμικό ζ δεν μπόρεσε να μετρηθεί σε διαλύματα ιοντικής ισχύος 1.8 M, καθώς τα αποτελέσματα ήταν μη επαναλήψιμα εξαιτίας της συσσωμάτωσης βακτηρίων και κόκκων γυαλιού στη μεγάλη ιοντική ισχύ.

Στο διάγραμμα 6.1. παρουσιάζονται οι τιμές του δυναμικού ζ βακτηρίων και υλικών για τα διαλύματα των δύο ιοντικών ισχύων προκειμένου να γίνει αισθητή η διαφορά τους.



Διάγραμμα 6.1. Μέση τιμή δυναμικού ζ (mV) βακτηρίων και υλικών και τυπική απόκλιση, για PBS ιοντικής ισχύος 0.01 M και 0.1 M.

Ακολουθώντας, με βάση την προσέγγιση Lifshitz-van der Waals/Acid-Base της θερμοδυναμικής θεωρίας (Κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.1.1.1.2.), με χρήση των γωνιών διαβροχής με τα τρία υγρά και χρήση της εξίσωσης Young, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1.4., υπολογίστηκε η επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_S^{LW-AB}), η συνιστώσα της λόγω αλληλεπιδράσεων οξέος-βάσεως (Acid-Base: AB) (γ_S^{AB}) και η συνιστώσα της λόγω αλληλεπιδράσεων Lifshitz-van der Waals (LW) (γ_S^{LW}) και παρουσιάζονται στον πίνακα 6.2. Επειδή οι τιμές των γωνιών διαβροχής ήταν σημαντικά διαφορετικές μεταξύ των διαφόρων βακτηρίων και υλικών, χρησιμοποιήθηκαν οι μέσες τιμές στους παραπάνω υπολογισμούς.

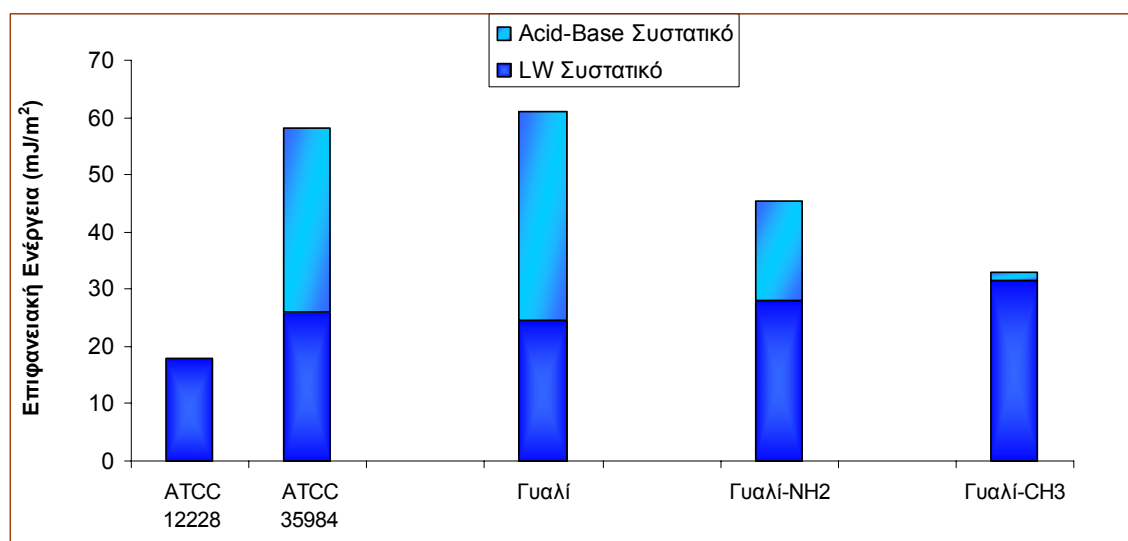
Επιπρόσθετα, στον πίνακα 6.2. παρουσιάζονται ο ηλεκτρονιο-δοτικός χαρακτήρας των υλικών (γ_S^-) αλλά και η τάση τους να δέχονται ηλεκτρόνια (γ_S^+). Από τις τιμές αυτές παρατηρείται ότι το slime-θετικό στέλεχος, το γυαλί και λιγότερο οι άμινο-ομάδες έχουν μεγάλη επιφανειακή ενέργεια και έντονο ηλεκτρονιο-δοτικό χαρακτήρα καθώς το γ_S^- είναι πολύ μεγαλύτερο του γ_S^+ . Στην περίπτωση όμως του slime-αρνητικού στελέχους και των μέθυλο-ομάδων προκύπτει ότι έχουν πολύ μικρό πολικό χαρακτήρα (γ_S^{AB}), άρα και ηλεκτρονιο-δοτικό ή δεκτικό χαρακτήρα, αλλά και

σημαντικά μικρότερη επιφανειακή ενέργεια, σε σχέση κυρίως με το slime-θετικό στέλεχος και το γυαλί.

Υλικό	γ_S^{LW} (mJ/m ²)	γ_S^+ (mJ/m ²)	γ_S^- (mJ/m ²)	γ_S^{AB} (mJ/m ²)	γ_S^{LW-AB} (mJ/m ²)
ATCC 35984	26	5.7	45.3	32.2	58.2
ATCC 12228	17.9	0.01	0.5	0.08	17.9
Γυαλί	24.7	6.4	51.8	36.3	60.9
Γυαλί-NH ₂	28.0	2.6	29.4	17.5	45.5
Γυαλί-CH ₃	31.7	1.2	0.03	1.19	32.9

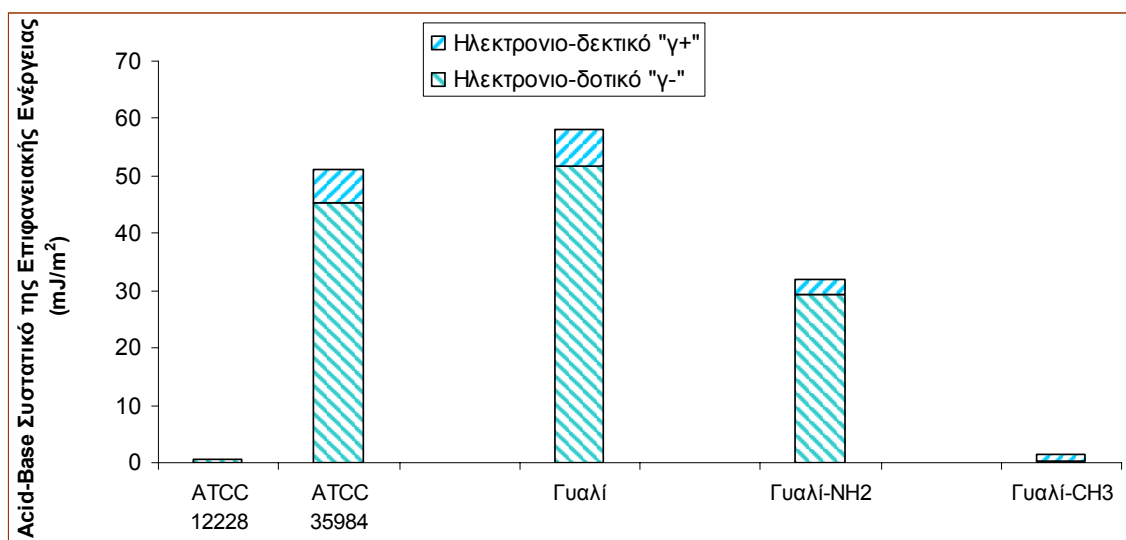
Πίνακας 6.2. Ολική επιφανειακή ενέργεια των υλικών (γ_S^{LW-AB}), η συνιστώσα της λόγω διασποράς (γ_S^{LW}) καθώς και η πολική συνιστώσα (γ_S^{AB}). Ηλεκτρονιο-δεκτικός (γ_S^+) και ηλεκτρονιο-δοτικός (γ_S^-) χαρακτήρας βακτηρίων και υλικών.

Στο διάγραμμα 6.2. παρουσιάζεται επίσης ο πολύ μικρός πολικός χαρακτήρας (γ_S^{AB}) του slime-αρνητικού στελέχους και των μέθυλο-ομάδων σε σχέση κυρίως με το slime-θετικό στέλεχος και το γυαλί. Ενώ οι άμινο-ομάδες εμφανίζουν μικρότερο πολικό χαρακτήρα σε σχέση με το γυαλί. Ο μη πολικός χαρακτήρας δεν διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διαφόρων υλικών και των βακτηρίων



Διάγραμμα 6.2. Ολική επιφανειακή ενέργεια των υλικών, η συνιστώσα της λόγω διασποράς (γ_S^{LW}) καθώς και η πολική συνιστώσα (γ_S^{AB}).

Στο διάγραμμα 6.3. παρουσιάζεται ο πολύ μικρός ηλεκτρονιο-δεκτικός χαρακτήρας (γ_S^+) όλων ουσιαστικά των υλικών και των βακτηρίων. Ενώ ο ηλεκτρονιο-δοτικός χαρακτήρας (γ_S^-) είναι σημαντικά μεγαλύτερος για το slime-θετικό στέλεχος και το γυαλί. Οι αμινομάδες εμφανίζουν μικρότερο ηλεκτρονιο-δοτικός χαρακτήρας (γ_S^-) σε σχέση με το γυαλί, ενώ οι μεθυλομάδες δεν έχουν ουσιαστικά καθόλου ηλεκτρονιο-δοτικό ή δεκτικό χαρακτήρα και άρα είναι μη πολικές.



Διάγραμμα 6.3. Ηλεκτρονιο-δεκτικός (γ_S^+) και ηλεκτρονιο-δοτικός (γ_S^-) χαρακτήρας βακτηρίων και υλικών.

6.2.1.3. Χημική Σύσταση Επιφάνειας-XPS

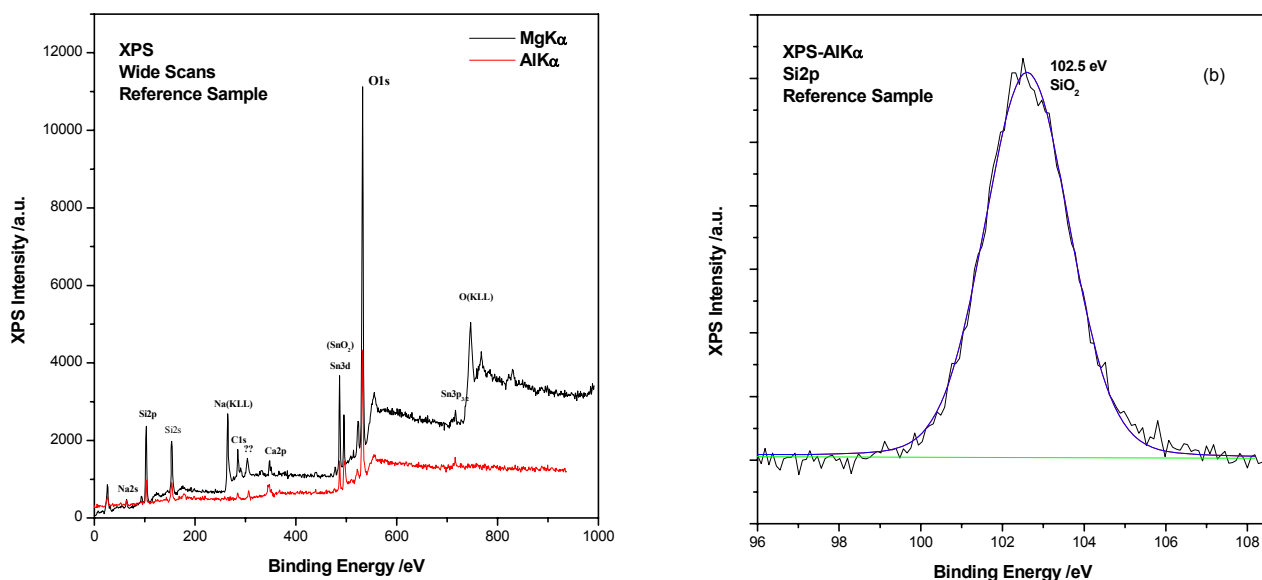
Η μελέτη της χημικής σύστασης της επιφάνειας του γυαλιού και του τροποποιημένου με αμινο-ομάδες και μέθυλο-ομάδες γυαλιού, με την τεχνική της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων (XPS), επιβεβαίωσε τη χημική τροποποίηση του γυαλιού μέσω της μεθόδου της εξάχνωσης των σιλανίων.

Όπως φαίνεται από το φάσμα ευρείας σάρωσης του γυαλιού, αλλά και την κορυφή O1s, αυτό ουσιαστικά αποτελείται από οξυγόνο, εξαιτίας των υδροξυλίων που προέκυψαν στη επιφάνειά του κατά την υδρόλυση και την οξείδωση (Διάγραμμα 6.4.).

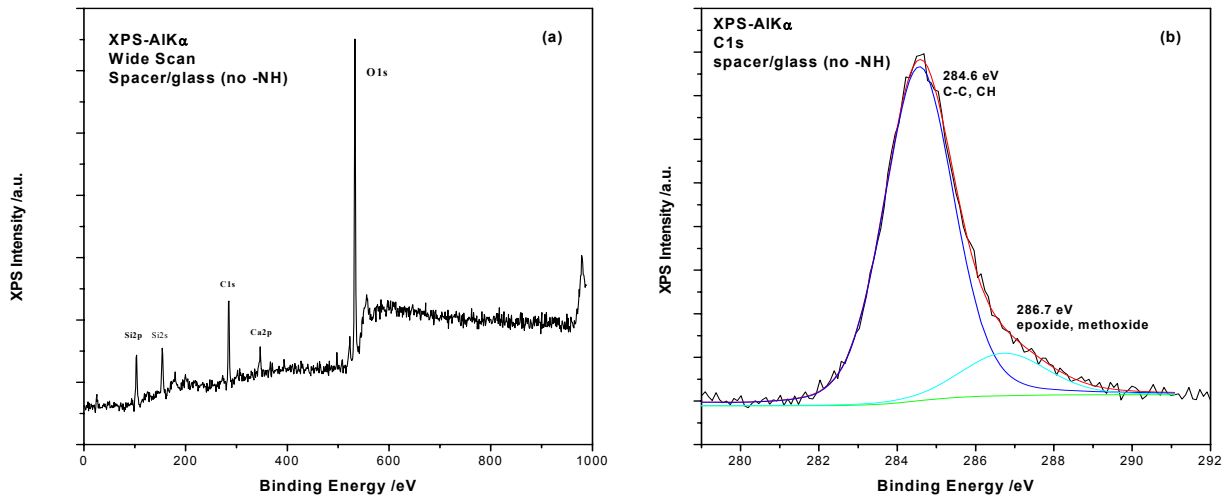
Στο διάγραμμα 6.5. παρουσιάζεται το διάγραμμα ευρείας σάρωσης των μέθυλο-ομάδων και η κορυφή C1s. Από το διάγραμμα αυτό προκύπτει ότι το γυαλί τροποποιήθηκε κατά τη σιλανοποίηση με ODS και είναι εμφανές από την κορυφή C1s ότι ο άνθρακας είναι όντως με τη μορφή C-C C-H.

Στο διάγραμμα 6.6. παρουσιάζεται το διάγραμμα ευρείας σάρωσης των μέθυλο-ομάδων και η κορυφή N1s. Από το διάγραμμα αυτό προκύπτει ότι το γυαλί τροποποιήθηκε κατά τη σιλανοποίηση με APTES και είναι εμφανές από την κορυφή N1s ότι υπάρχουν άμινο-ομάδες στην επιφάνεια του γυαλιού. Μάλιστα, το γεγονός ότι η άμινο-ομάδες εμφανίζονται στα 399.6 eV εξηγεί το ότι από τις μετρήσεις του δυναμικού το υπόστρωμα εμφανίστηκε ελαφρώς αρνητικά φορτισμένο, αφού για να ήταν θετικά φορτισμένο η κορυφή θα έπρεπε να ήταν στα 401.4 eV.

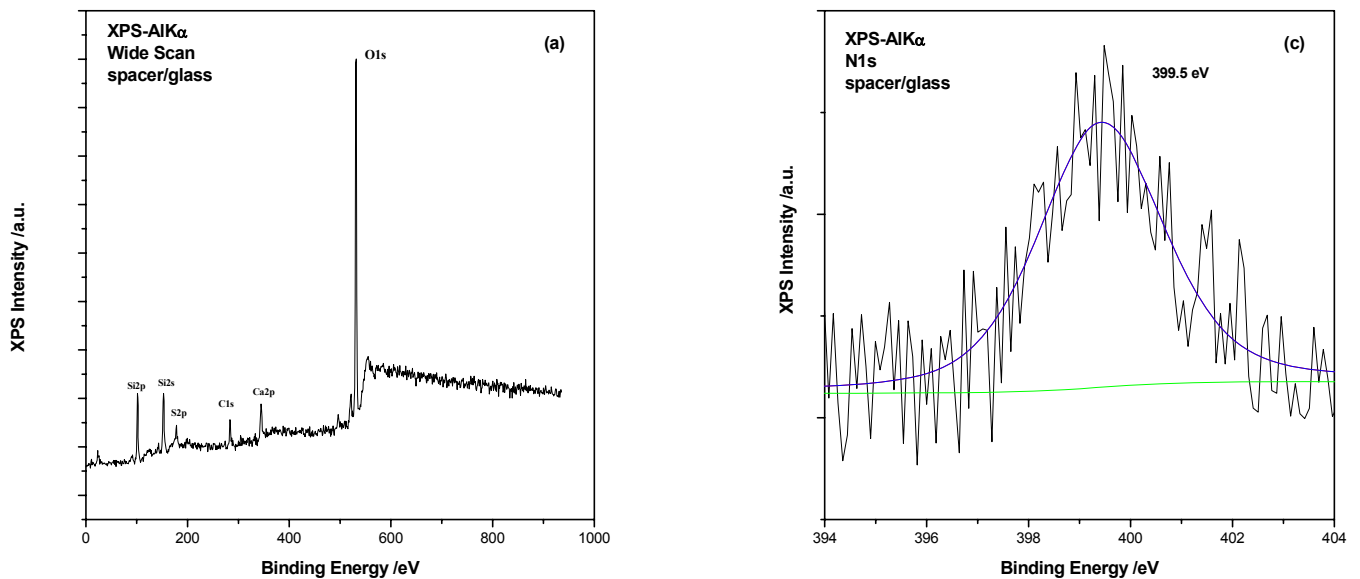
Από τις εντάσεις των κορυφών XPS και χρησιμοποιώντας τους συντελεστές ευαισθησίας των στοιχείων στον φωτοϊονισμό υπολογίστηκε η επιφανειακή σύσταση των υλικών και παρουσιάζεται στον πίνακα 6.3.



Διάγραμμα 6.4. Φάσμα ευρείας σάρωσης του γυαλιού και κορυφή O1s



Διάγραμμα 6.5. Φάσμα ευρείας σάρωσης των μέθυλο-ομάδων και κορυφή C1s



Διάγραμμα 6.6. Φάσμα ευρείας σάρωσης των άμινο-ομάδων και κορυφή N1s

Υλικό	C (%)	N (%)	O(%)	Si(%)
Γαλί	8.9	0	64.4	26.7
Γαλί-NH ₂	14.7	1	58.1	26.0
Γαλί-CH ₃	34.8	0	44.5	20.7

Πίνακας 6.3. % Χημική σύσταση των υλικών.

Επιπρόσθετα, από τη μείωση των σημάτων Si2p, και καθώς διαπιστώθηκε από το AFM ότι η τοπογραφία των υλικών είναι ομογενής, άρα η εναπόθεση και η κάλυψη του υποστρώματος γυαλιού με σιλάνια πλήρης, υπολογίστηκε το πάχος του μονοστρώματος των σιλανίων. Στην περίπτωση των μέθυλο-ομάδων το πάχος βρέθηκε ίσο με 2.5 nm, ενώ στην περίπτωση των άμινο-ομάδων το πάχος βρέθηκε ίσο με 1.3 nm. Παρότι η τεχνική XPS δεν είναι η καταλληλότερη για μέτρηση πάχους, οι τιμές αυτές συμφωνούν με τα θεωρητικά μήκη των συγκεκριμένων σιλανίων (Reiniger et al., 2002), οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι η τροποποίηση ήταν επιτυχής και μάλιστα οι αλυσίδες των σιλανίων σε κοντινή μεταξύ τους απόσταση, χωρίς να αφήνουν περιθώριο κλίσης/σηματισμού γωνίας με την επιφάνεια του γυαλιού.

6.2.2. Αποτελέσματα Βακτηριακής Προσκόλλησης

6.2.2.1. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης-Θερμοδυναμικής Θεωρίας

Εξαιτίας του ότι το δυναμικό ζ δεν μπόρεσε να μετρηθεί σε διαλύματα ιοντικής ισχύος 1.8 M, καθώς τα αποτελέσματα ήταν μη επαναλήψιμα εξαιτίας πιθανότατα της συσσωμάτωσης βακτηρίων και κόκκων γυαλιού στη μεγάλη ιοντική ισχύ, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν την βακτηριακή προσκόλληση για διαλύματα ιοντικής ισχύος 0.01 και 0.1 M, ενώ στις προηγούμενες μελέτες η προσκόλληση έλαβε χώρα σε διάλυμα ιοντικής ισχύος 2 M.

Στον πίνακα 6.4. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης των δύο βακτηριακών στελεχών στα υλικά, για *ρυθμό διάτμησης* 50 s^{-1} και για διαλύματα ιοντικής ισχύος 0.01 και 0.1 M.

Υλικό	<i>N*E6</i>	<i>N*E6</i>	<i>N*E6</i>	<i>N*E6</i>
	<i>ATCC 35984</i>	<i>ATCC 35984</i>	<i>ATCC 12228</i>	<i>ATCC 12228</i>
	<i>0.01 M</i>	<i>0.1 M</i>	<i>0.01 M</i>	<i>0.1 M</i>
<i>Γυαλί</i>	0.50±0.1	1.77±0.54	0.77±0.23	2.97±0.24
<i>Γυαλί-NH₂</i>	2.10±0.23	3.78±0.27	3.09±0.43	6.78±0.23
<i>Γυαλί-CH₃</i>	4.09±1.18	6.64±1.00	8.37±1.32	11.02±1.22

Πίνακας 6.4. Αριθμός Προσκολλημένων Βακτηρίων/cm² (*N*) στα προς εξέταση υλικά κάτω από ρυθμό διάτμησης 50 s⁻¹.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4., προκύπτει ότι και τα δύο στελέχη εμφάνισαν τη μεγαλύτερη προσκόλληση στο υπόστρωμα με τις μέθυλο-ομάδες, ακολούθησε το υπόστρωμα των άμινο-ομάδων, ενώ η μικρότερη προσκόλληση, και για τα δύο στελέχη, εμφανίστηκε στο γυαλί.

Από τη σύγκριση των δύο στελεχών προκύπτει ότι το slime-αρνητικό εμφάνισε μεγαλύτερη προσκολλητική ικανότητα σε σχέση με το slime-θετικό. Με δεδομένο ότι τα δύο στελέχη δεν είχαν σημαντικά διαφορετικά δυναμικά ζ, η διαφορά στην προσκόλληση πρέπει να οφείλεται στο ότι το slime-θετικό είχε έντονο πολικό χαρακτήρα, ενώ το slime-αρνητικό εμφάνισε μη πολικό χαρακτήρα.

Συγκρίνοντας τους αριθμούς των προσκολλημένων βακτηρίων για τις δύο ιοντικές ισχύς προκύπτει ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος αύξησε σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων, και για τα δύο στελέχη, και ότι η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στον αριθμό των βακτηρίων που προσκολλήθηκαν στο γυαλί. Αυτό οφείλεται στο ότι τόσο το γυαλί όσο και τα βακτηριακά στελέχη είχαν μεγάλο δυναμικό ζ. Επομένως, η αύξηση της ιοντικής ισχύος, που είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού ζ τόσο των υποστρωμάτων όσο και των βακτηρίων, μείωσε τις ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ βακτηρίων και υλικών, και άρα επέτρεψε την προσκόλληση.

Συγκρίνοντας τους αριθμούς των προσκολλημένων βακτηρίων για τα τρία υλικά, προκύπτει ότι η μεγαλύτερη προσκόλληση, και για τα δύο στελέχη εμφανίζεται στις μέθυλο-ομάδες, δηλαδή στο λιγότερο πολικό υλικό, με τη μικρότερη επιφανειακή ενέργεια. Δηλαδή, η αύξηση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με τη μείωση της επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{LW-AB}), του πολικού χαρακτήρα (γ_S^{AB}) και του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα (γ_S^-) των υλικών, ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με τον μη πολικό χαρακτήρα (γ_S^{LW}) και τον ηλεκτρονιο-δεκτικό χαρακτήρα (γ_S^+).

Η έντονη επίδραση της επιφανειακής ενέργειας των υλικών στη βακτηριακή προσκόλληση επιχειρήθηκε να εξηγηθεί από τη θερμοδυναμική θεωρία και συγκεκριμένα από την προσέγγιση Lifshitz van der Waals-Acid Base, όπως αυτή περιγράφηκε στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.1.2.

Αφού υπολογίστηκε η ολική επιφανειακή ενέργεια υλικών και βακτηρίων και οι συνιστώσες της, πολικές και μη, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 6.2.1.2., υπολογίστηκαν στην συνέχεια οι διεπιφανειακές ενέργειες υλικού-υγρού (SL), βακτηρίου-υλικού (BS) και βακτηρίου-υγρού (BL), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.1.1.1.2. Ακολούθως, υπολογίστηκε η συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{LW-AB}) και οι συνιστώσες της από τις αλληλεπιδράσεις διασποράς (ΔG_{d0}^{LW}) και τις πολικές (ΔG_{d0}^{AB}), αντίστοιχα, με χρήση της εξίσωσης (2.18) της παραγράφου 2.1.1.1.2.

Οι τιμές των ΔG_{d0}^{LW-AB} , ΔG_{d0}^{LW} , ΔG_{d0}^{AB} παρουσιάζονται στον πίνακα 6.5.

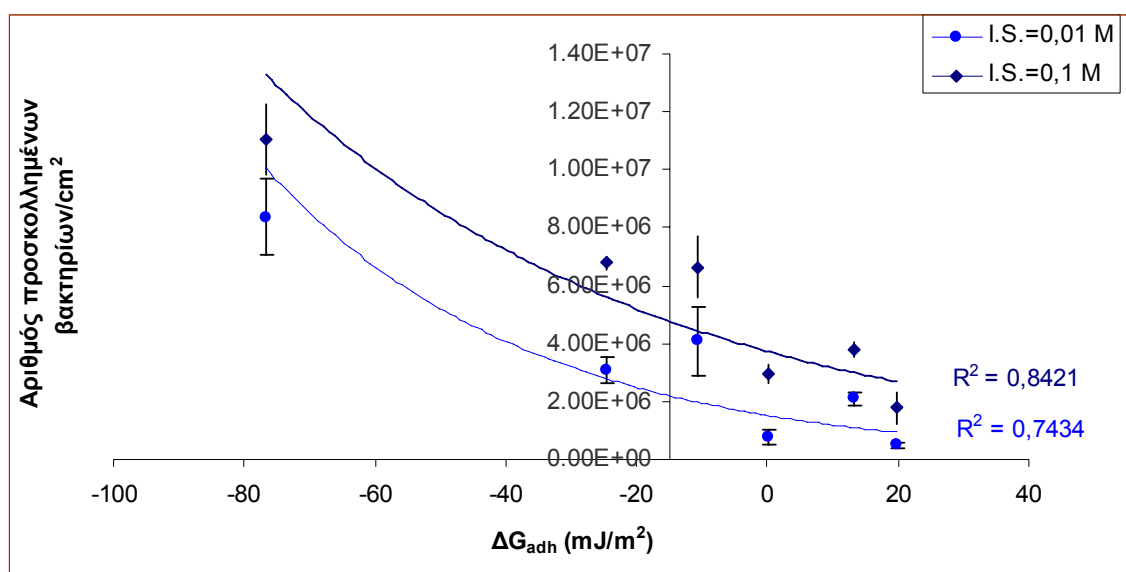
Υλικό	ΔG_{d0}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^{LW-AB} (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^{LW} (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^{AB} (mJ/m ²)	ΔG_{d0}^{LW-AB} (mJ/m ²)
<i>ATCC</i>	<i>ATCC</i>	<i>ATCC</i>	<i>ATCC</i>	<i>ATCC</i>	<i>ATCC</i>	<i>ATCC</i>
	35984	35984	35984	12228	12228	12228
Γαλί	-0.3	20.1	19.8	0.26	0	0.84
Γαλί-NH₂	-0.5	13.9	13.4	0.55	-25.2	-77.6
Γαλί-CH₃	-0.9	-9.7	-10.5	0.84	-24.7	-76.8

Πίνακας 6.5. Συνολική ελεύθερη ενέργεια της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{LW-AB}), πολική (ΔG_{d0}^{AB}) και μη (ΔG_{d0}^{LW}) συνιστώσα της, όπως υπολογίζονται από την προσέγγιση «Lifshitz van der waals-Acid Base»

Σύμφωνα με την θερμοδυναμική θεωρία, η προσκόλληση ευνοείται για $\Delta G^{adh} < 0$ και αυτό σημαίνει ότι η αυθόρμητη προσκόλληση συνοδεύεται από μείωση στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, όπως προβλέπεται από το δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής. Επομένως, σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.5., η προσκόλληση ευνοείται περισσότερο στις μέθυλο-ομάδες και κυρίως για το slime-αρνητικό στέλεχος.

Από το διάγραμμα 6.7., του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με το ΔG_{d0}^{LW-AB} , για τα δύο βακτηριακά στελέχη και τις δύο ιοντικές ισχείς, προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων συσχετίζεται καλύτερα με το ΔG_{d0}^{LW-AB} για

τη μεγαλύτερη ιοντική ισχύ. Αυτό σημαίνει ότι η θερμοδυναμική θεωρία εξηγεί καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα για μεγάλης ιοντικής ισχύος διαλύματα, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι εξασθενημένες εξαιτίας του νέφους των ιόντων του διαλύματος γύρω από τα βακτήρια και στην επιφάνεια του υλικού. Σε διαλύματα μικρής ιοντικής ισχύος οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές και μειώνουν την προβλεψιμότητα της θερμοδυναμικής καθώς δεν τις λαμβάνει υπόψη.



Διάγραμμα 6.7. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – συνολικής ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης ΔG_{d0}^{LW-AB} (Θερμοδυναμική Θεωρία)

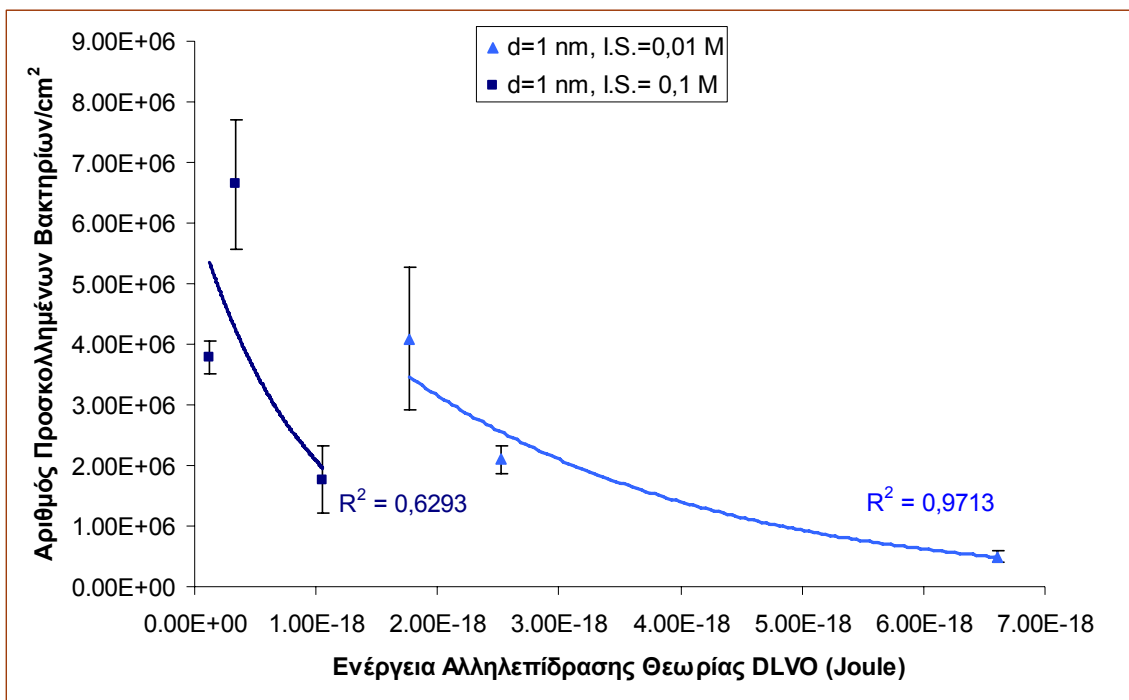
6.2.2.2. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης-Θεωρίας DLVO

Επειδή όπως αποδείχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η θερμοδυναμική θεωρία δεν μπόρεσε να περιγράψει εξίσου καλά τα αποτελέσματα της προσκόλλησης για τις δύο ιοντικές ισχύεις, επιχειρήθηκε η εξήγηση των αποτελεσμάτων μέσω της θεωρίας DLVO, η οποία περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.2. Συνοπτικά, αναφέρεται ότι σύμφωνα με τη θεωρία DLVO (Derjaguin and Landau, 1941; Israelachvili, 1991) η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης, ή η ενέργεια προσκόλλησης (U_{BLS}^{DLVO}) (J), μεταξύ ενός βακτηρίου

(B) και υλικού (S) μέσα σε υγρό (L) εκφράζεται ως το άθροισμα των Lifshitz-van der Waals (LW) και των ηλεκτροστατικών ενεργειών αλληλεπίδρασης (EL).

Με χρήση της εξίσωσης (2.23), των δυναμικών ζ που δόθηκαν στην παράγραφο 6.2.1.2., αλλά και των ΔG_{d0}^{LW} κάθε συνδυασμού, που υπολογίσθηκαν στην παράγραφο 6.2.1., υπολογίσθηκε η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης (U_{BLS}^{DLVO}) για απόσταση βακτηρίων-υλικού 1 nm, δηλαδή πολύ κοντά στην επιφάνεια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για το slime-θετικό στέλεχος ATCC 35984, καθώς για το slime ATCC 12228 ήταν παρόμοια και η διαφορά που παρουσιάστηκε αποδόθηκε στην θερμοδυναμική θεωρία, δηλαδή στην μειωμένη επιφανειακή τους ενέργεια.

Από το διάγραμμα 6.8., του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με το U_{BLS}^{DLVO} (J), για το slime-θετικό στέλεχος και τις δύο ιοντικές ισχείς προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων συσχετίζεται καλύτερα με το U_{BLS}^{DLVO} για τη μικρότερη ιοντική ισχύ. Αυτό σημαίνει ότι η θεωρία DLVO εξηγεί καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα για μικρής ιοντικής ισχύος διαλύματα, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι σημαντικές για την προσκόλληση των βακτηρίων στην επιφάνεια του υλικού. Σε μεγάλης ιοντικής ισχύος διαλύματα, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι εξασθενημένες εξαιτίας του νέφους των ιόντων του διαλύματος γύρω από τα βακτήρια και στην επιφάνεια του υλικού, οι δυνάμεις διασποράς αλλά και οι αλληλεπιδράσεις οξέος-βάσεως φαίνεται να εξηγούν καλύτερα τα αποτελέσματα, όπως άλλωστε αποδείχτηκε και στην παράγραφο 6.2.1.



Διάγραμμα 6.8. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – Ενέργειας αλληλεπίδρασης θεωρίας DLVO (U_{BLS}^{DLVO})

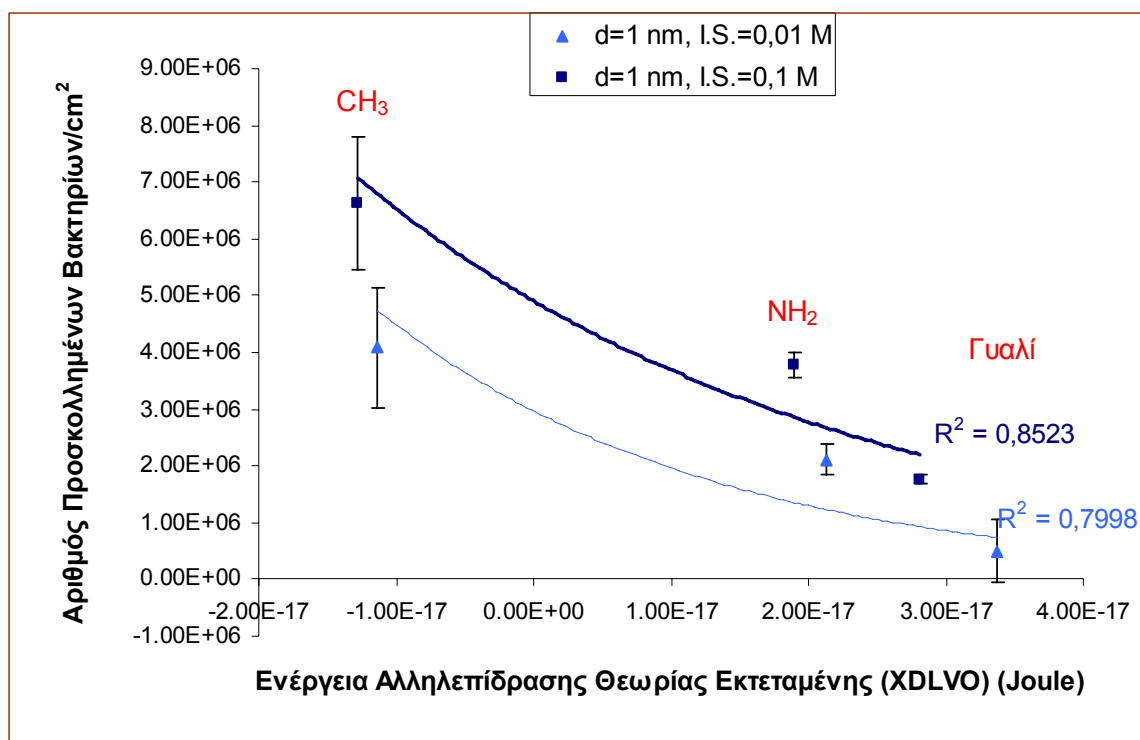
6.2.2.3. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης-Θεωρίας Εκτεταμένης DLVO

Επειδή όπως αποδείχθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η θερμοδυναμική θεωρία δεν μπόρεσε να περιγράψει καλά τα αποτελέσματα της προσκόλλησης για το μικρής ιοντικής ισχύος διάλυμα, ενώ η θεωρία DLVO δεν μπόρεσε να περιγράψει καλά τα αποτελέσματα της προσκόλλησης για το μεγάλης ιοντικής ισχύος διάλυμα, επιχειρήθηκε η εξήγηση των αποτελεσμάτων μέσω της θεωρίας της εκτεταμένης DLVO, η οποία περιγράφεται στο κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.3.

Σύμφωνα με την θεωρία της εκτεταμένης DLVO (van Oss, 1995; van Oss, 2003), η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης (U_{BLS}^{XDLVO}) (J), ή η ενέργεια προσκόλλησης, μεταξύ ενός βακτηρίου (B) και υλικού (S) μέσα σε υγρό (L) εκφράζεται ως το άθροισμα των Lifshitz-van der Waals (LW), των ηλεκτροστατικών (EL) και των οξέος-βάσεως (Acid-Base: AB) ενεργειών αλληλεπίδρασης.

Από το άθροισμα των εξισώσεων (2.23) και (2.26), με χρήση των δυναμικών ζ που δόθηκαν στην παράγραφο 6.2.1.2., αλλά και των ΔG_{a0}^{AB} , ΔG_{a0}^{LW} κάθε συνδυασμού,

που υπολογίσθηκαν στην παράγραφο 6.2.1., υπολογίσθηκε η συνολική ενέργεια αλληλεπίδρασης (U_{BLS}^{XDLVO}) για απόσταση βακτηρίων-υλικού 1 nm, δηλαδή πολύ κοντά στην επιφάνεια. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται για το slime-θετικό στέλεχος ATCC 35984 στο διάγραμμα 6.9.



Διάγραμμα 6.9. Συσχέτιση αριθμού προσκολλημένων βακτηρίων/cm² – Ενέργεια αλληλεπίδρασης θεωρίας εκτεταμένης DLVO (U_{BLS}^{XDLVO})

Από το διάγραμμα 6.9., του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με το U_{BLS}^{XDLVO} (J), για το slime-θετικό στέλεχος και τις δύο ιοντικές ισχείς προκύπτει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων στα τρία υλικά συσχετίζεται αρκετά καλά και για τις δύο ιοντικές ισχείς. Αυτό σημαίνει ότι η θεωρία της εκτεταμένης DLVO εξηγεί καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα, και άρα την επίδραση της χημικής σύστασης τόσο της επιφάνειας όσο και του διαλύματος, σε σχέση με τη θερμοδυναμική αλλά και την θεωρία DLVO και αυτό γιατί είναι ουσιαστικά ένας συνδυασμός των δύο αυτών, και λαμβάνει υπόψην της τις ηλεκτροστατικές, τις

Lifshitz-van der Waals (LW) και τις οξέος-βάσεως (Acid-Base: AB) αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών.

Τα αποτελέσματα όμως αυτά αφορούν το ρυθμό διάτμησης 50 s⁻¹.

Στην επόμενη παράγραφο γίνεται μια προσπάθεια συσχέτισης της βακτηριακής προσκόλλησης, του ρυθμού διάτμησης και της Θεωρίας της Εκτεταμένης DLVO.

6.2.2.4. Συσχέτιση Βακτηριακής Προσκόλλησης - Ρυθμού Διάτμησης - Θεωρίας Εκτεταμένης DLVO

Στον πίνακα 6.6. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της προσκόλλησης του slime-θετικού στελέχους στα υλικά, για **ρυθμό διάτμησης 2000 s⁻¹** και για διαλύματα ιοντικής ισχύος 0.01 και 0.1 M και παρατίθενται οι αντίστοιχοι αριθμοί προσκόλλησης για **ρυθμό διάτμησης 50 s⁻¹**, για τις απαραίτητες συγκρίσεις.

Υλικό	<i>N*E6</i>	<i>N*E6</i>	<i>N*E6</i>	<i>N*E6</i>
	<i>ATCC 35984</i>	<i>ATCC 35984</i>	<i>ATCC 35984</i>	<i>ATCC 35984</i>
	<i>0.01 M</i>	<i>0.1 M</i>	<i>0.01 M</i>	<i>0.1 M</i>
	<i>2000 s⁻¹</i>	<i>2000 s⁻¹</i>	<i>50 s⁻¹</i>	<i>50 s⁻¹</i>
<i>Γυαλί</i>	0.22±0.07	1.02±0.47	0.50±0.10	1.77±0.54
<i>Γυαλί-NH₂</i>	1.47±0.15	2.84±0.28	2.10±0.23	3.78±0.27
<i>Γυαλί-CH₃</i>	2.41±0.96	4.25±0.74	4.09±1.18	6.64±1.00

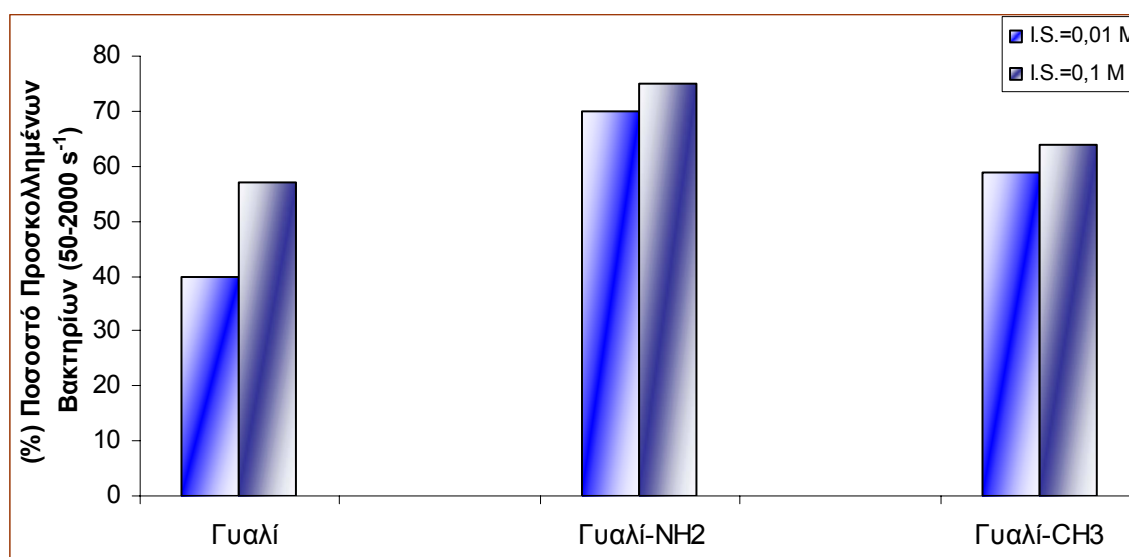
Πίνακας 6.6. Αριθμός Προσκολλημένων Βακτηρίων/cm² (*N*) στα προς εξέταση υλικά κάτω από ρυθμό διάτμησης 2000 s⁻¹.

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.6., προκύπτει ότι ακόμα και για ρυθμό διάτμησης 2000 s⁻¹ η μεγαλύτερη προσκόλληση εμφανίστηκε στο υπόστρωμα με τις μέθυλο-ομάδες, ακολούθησε το υπόστρωμα των άμινο-ομάδων, ενώ η μικρότερη προσκόλληση, και για τα δύο στελέχη, εμφανίστηκε στο γυαλί. Και πάλι η αύξηση της ιοντικής ισχύος αύξησε τη βακτηριακή προσκόλληση σε όλα τα υποστρώματα και κυρίως στο γυαλί, εξαιτίας της εξουδετέρωσης των απωστικών ηλεκτροστατικών δυνάμεων, μεταξύ βακτηρίων-υποστρωμάτων, από τα ιόντα του διαλύματος με μεγαλύτερη ιοντική ισχύ.

Δηλαδή και πάλι οι τρεις θεωρίες, Θερμοδυναμική, DLVO, εκτεταμένη DLVO που περιγράφησαν στις παραγράφους 6.2.2.1-6.2.2.3, ποιοτικά τουλάχιστον, εξηγούν τα πειραματικά αποτελέσματα.

Συγκρίνοντας όμως τους δύο ρυθμούς διάτμησης, και υπολογίζοντας το ποσοστό των βακτηρίων που προσκολλήθηκαν κάτω από ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , σε σχέση με το ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} προκύπτει το διάγραμμα 6.10.

Από το διάγραμμα αυτό προκύπτει ότι η αύξηση του ρυθμού διάτμησης και μείωσε σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων σε όλα τα υποστρώματα, η μεγαλύτερη όμως μείωση παρατηρήθηκε, όχι μόνο στο γυαλί, όπως ήταν αναμενόμενο από τη DLVO και την εκτεταμένη DLVO θεωρία, εξαιτίας των ηλεκτροστατικών απώσεων, αλλά και στις μέθυλο-ομάδες, παρότι οι θεωρίες είχαν προβλέψει μείωση της ενέργειας του συστήματος κατά την προσκόλληση και άρα ισχυρές δυνάμεις αλληλεπίδρασης.



Διάγραμμα 6.10. % Ποσοστό προσκολλημένων βακτηρίων στα υποστρώματα, μετά από σύγκριση των ρυθμών διάτμησης 50 και 2000 s^{-1} .

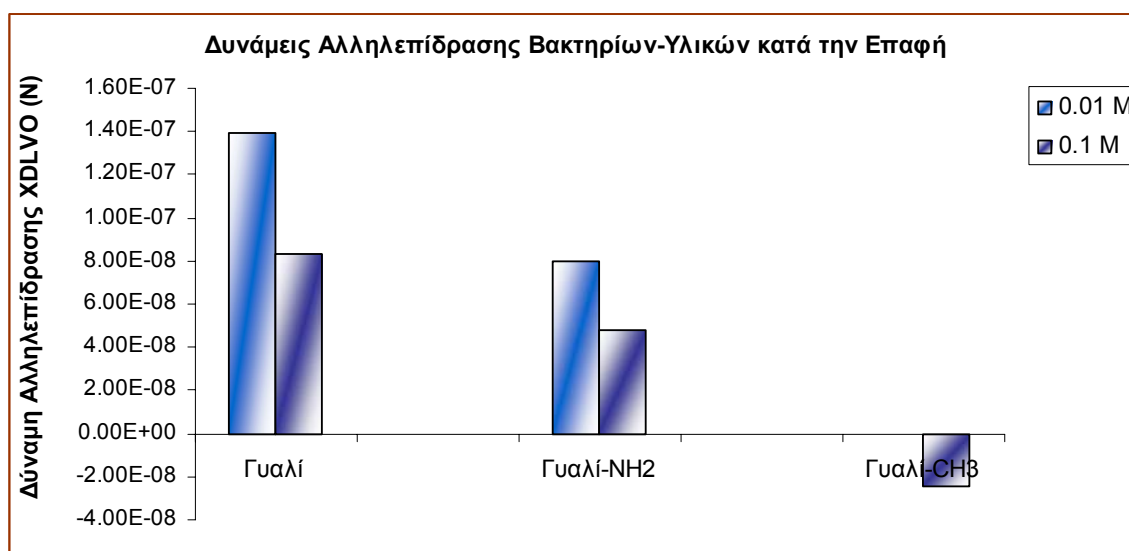
Σε μία προσπάθεια να εξηγηθεί το φαινόμενο της σημαντικότερης μείωσης της προσκόλλησης στις μέθυλο-ομάδες και όχι στις αμινο-ομάδες, όπως προέβλεπαν οι κολλοειδούς τύπου θεωρίες, αρχικά υπολογίσθηκε η δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίων-υλικών κατά την επαφή, δηλαδή για απόσταση $d = d_0 = 0.158 \text{ nm}$, που μπορεί να θεωρηθεί ως η απόσταση μεταξύ των ηλεκτρονίων των εξωτερικών

στοιβάδων των βακτηρίων-υλικού (όριο van der Waals - πιο κοντινή προσέγγιση μεταξύ των βακτηρίων και του υλικού) (van Oss and Good, 1984).

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η εκτεταμένη DLVO θεωρία (XDLVO), παράγραφος 2.1.1.3. και συγκεκριμένα η εξίσωση (2.28), προκειμένου να υπολογισθεί η συνολική δύναμη κατά την επαφή, οπότε προέκυψε το διάγραμμα 6.11.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι στα βακτήρια, μόνο κατά την επαφή με τις μέθυλο-ομάδες για μεγάλης ιοντικής ισχύος διάλυμα, ασκούνται ελκτικές δυνάμεις, οι οποίες οφείλονται στις αλληλεπιδράσεις οξέων –βάσεων (AB) (εξίσωση 2.27.)

Στον πίνακα 6.7. παρατίθενται οι δυνάμεις λόγω αλληλεπιδράσεων ηλεκτροστατικών (EL), διασποράς (LW) και οξέος-βάσεως (AB) για τους διάφορους συνδιασμούς βακτηρίων-υλικών-ιοντικών ισχύων. Προκύπτει λοιπόν ότι κατά την επαφή, οι δυνάμεις LW είναι σε όλες τις περιπτώσεις θετικές αλλά πολύ μικρότερες των άλλων δύο. Σε όλα τα υποστρώματα, εκτός των μέθυλο-ομάδων, οι ισχυρές ηλεκτροστατικές και οξέος-βάσεως απώσεις κυριαρχούν κατά την επαφή. Μόνο στην περίπτωση των μέθυλο-ομάδων οι AB αλληλεπιδράσεις, που είναι ίδιας τάξης μεγέθους με τις ηλεκτροστατικές οδηγούν τελικά σε έλξη.



Διάγραμμα 6.11. Δυνάμεις αλληλεπίδρασης βακτηρίων-υλικών, σύμφωνα με την XDLVO, κατά την επαφή

Υλικό-Ιοντική Ισχύς	F_{EL} (N)	F_{LW} (N)	F_{AB} (N)	F_{TOTAL} (N)
Γαλί (0.01 M)	7.71×10^{-8}	-8×10^{-10}	6.3×10^{-8}	1.39×10^{-7}

<i>Γβαλί (0.1 M)</i>	2.07×10^{-8}	-8×10^{-10}	6.3×10^{-8}	8.29×10^{-8}
<i>Γβαλί-NH₂ (0.01 M)</i>	3.74×10^{-8}	-1.7×10^{-9}	4.37×10^{-8}	7.94×10^{-8}
<i>Γβαλί-NH₂ (0.1 M)</i>	6.3×10^{-9}	-1.7×10^{-9}	4.37×10^{-9}	4.84×10^{-8}
<i>Γβαλί-CH₃ (0.01 M)</i>	3.27×10^{-8}	-2.6×10^{-9}	-3.1×10^{-8}	-4.1×10^{-10}
<i>Γβαλί-CH₃ (0.1 M)</i>	8.87×10^{-9}	-2.6×10^{-9}	-3.1×10^{-9}	-2.4×10^{-8}

Πίνακας 6.7. Δυνάμεις αλληλεπίδρασης βακτηρίων-υλικών, σύμφωνα με την XDLVO, κατά την επαφή

Παρότι τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7. εξηγούν ποιοτικά τα πειραματικά αποτελέσματα της προσκόλλησης, δηλαδή την αύξηση της προσκόλλησης με την αύξηση της ιοντικής ισχύος, καθώς τότε μειώνονται οι ηλεκτροστατικές απώσεις, αλλά και την αυξημένη προσκόλληση στις μέθυλο-ομάδες, δεν εξηγούν την σημαντική μείωση που παρουσιάζεται κατά την αύξηση του ρυθμού διάτμησης στις μέθυλο-ομάδες, σε σχέση με τις άμινο-ομάδες.

Υπολογίστηκαν λοιπόν οι δυνάμεις λόγω ροής, προκειμένου να δούμε αν με κάποιο τρόπο συσχετίζονται οι κολλοειδούς τύπου δυνάμεις με τις δυνάμεις ροής.

Με χρήση των εξισώσεων 2.41, 2.42 και 2.43 υπολογίστηκαν οι δυνάμεις λόγω ροής δηλαδή η *οπισθέλκουσα* (drag: F_D) και η *άντωση* (hydrodynamic lifting force: F_L) για ρυθμούς διάτμησης 50 και 2000 s^{-1} .

$$\text{Για ρυθμό διάτμησης } 50 \text{ s}^{-1} \quad F_D = 6 \times 10^{-13} \text{ N}, \quad F_L = 3 \times 10^{-16} \text{ N}$$

$$\text{Για ρυθμό διάτμησης } 2000 \text{ s}^{-1} \quad F_D = 2.5 \times 10^{-11} \text{ N}, \quad F_L = 8 \times 10^{-14} \text{ N}.$$

Παρατηρείται λοιπόν ότι η μεγαλύτερη δύναμη που ασκείται λόγω ροής σε ένα προσκολλημένο βακτήριο ή σε ένα βακτήριο πολύ κοντά στην επιφάνεια είναι η *οπισθέλκουσα*, ενώ η άντωση είναι πολύ μικρότερη.

Συγκρίνοντας την οπισθέλκουσα, και για τους δύο ρυθμούς διάτμησης, με τις τιμές των δυνάμεων που παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7. προκύπτει ότι στην περίπτωση των μέθυλο-ομάδων παρότι η οπισθέλκουσα είναι πολύ μικρότερη της δύναμης προσκόλλησης (10^{-8} N), αύξηση της από 6×10^{-13} N σε 2.5×10^{-11} N προκαλεί μείωση του προσκολλημένου αριθμού βακτηρίων μέχρι και 50%, ενώ στην περίπτωση των άμινο-ομάδων ίδια αύξηση της οπισθέλκουσας προκαλεί μείωση 30% περίπου.

Η διαπίστωση αυτή μας οδήγησε στο να μελετήσουμε την δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίων-υλικών, με βάση την θεωρία της εκτεταμένης DLVO όχι μόνο στο σημείο επαφής-γιατί δεν είναι βέβαιο ότι θα καταφέρουν τα βακτήρια να φτάσουν στη φάση της προσκόλλησης- αλλά σαν συνάρτηση της απόστασης βακτηρίου-υλικού.

Τα διαγράμματα που παρουσιάζονται αφορούν το διάλυμα της μεγάλης ιοντικής ισχύος, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις είναι μειωμένες.

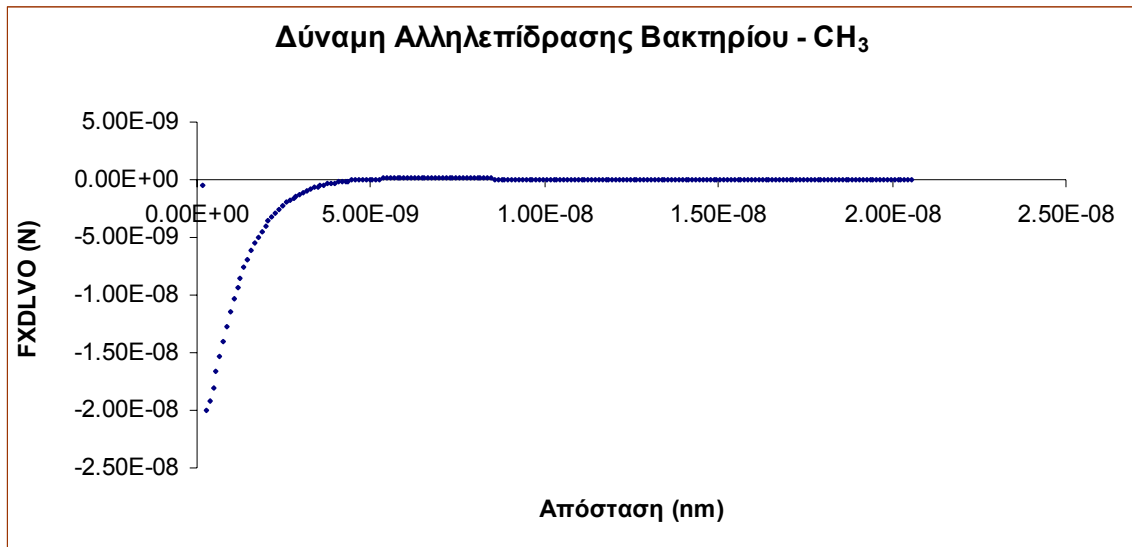
Στο διάγραμμα 6.12 παρουσιάζεται η δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίου-CH₃ ως συνάρτηση της απόστασης και παρατηρείται ότι για απόσταση μικρότερη των 5 nm το βακτήριο δέχεται μια ισχυρή ελκτική δύναμη που οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις οξέος-βάσεως (πολικές). Σε απόσταση όμως 5 και 9 nm εμφανίζεται ένα ενεργειακό φράγμα (Διάγραμμα 6.13) το οποίο είναι της τάξης των 10⁻¹⁰ N. Το ενεργειακό αυτό φράγμα για διατμητική δύναμη 6 x 10⁻¹³ N δεν απέτρεψε το βακτήριο από το να προσκολληθεί, όπως προέκυψε από τα πειραματικά αποτελέσματα, το απέτρεψε όμως σε μεγάλο βαθμό (μείωση στην προσκόλληση περίπου 50%) για διατμητική δύναμη 2.5 x 10⁻¹¹ N.

Στην περίπτωση των άμινο-ομάδων δεν εμφανίζεται αυτό το ενεργειακό ελάχιστο σε μικρή απόσταση βακτηρίου-επιφάνειας (διάγραμμα 6.14), καθώς από τον υπολογισμό της δύναμης μέσω της εκτεταμένης DLVO θεωρίας προέκυψε απωστική δύναμη. Μελετώντας όμως τις αλληλεπιδράσεις και για μεγαλύτερες των 20 nm αποστάσεις (διάγραμμα 6.15), προέκυψε ότι υπάρχει ένα ενεργειακό ελάχιστο (δευτερεύον, αφού είναι σε μακρινή απόσταση, κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.1.1.3.) και η δύναμη αλληλεπίδρασης (ελκτική) βακτηρίου-NH₂ σε αυτή την απόσταση (μεταξύ 25 και 40 nm είναι της τάξης των 5 x 10⁻¹⁴ N.

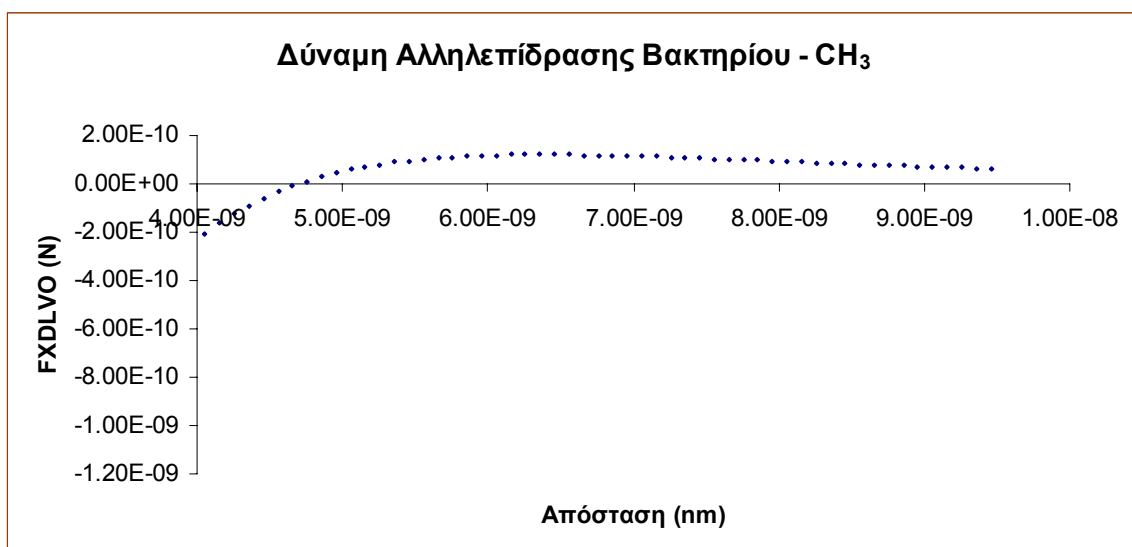
Η ελκτική αυτή δύναμη οφείλεται στην εξισορρόπηση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων από τις αλληλεπιδράσεις van der Waals (LW), οι οποίες είναι πιο ισχυρές σε μακρινές αποστάσεις τόσο από τις ηλεκτροστατικές όσο και από τις οξέος-βάσεως (AB). Οι AB, παρότι είναι πολύ ισχυρές σε μικρές αποστάσεις (<5 nm), εξασθενούν σημαντικά με την απόσταση.

Προκύπτει λοιπόν ότι ακόμα και όταν η οπισθέλκουσα λόγω διάτμησης είναι 2.5 x 10⁻¹¹ N, τα βακτήρια στην περίπτωση των άμινο-ομάδων καταφέρνουν σε μεγάλο βαθμό να προσκολληθούν εξαιτίας κάποιων άλλων αλληλεπιδράσεων, που δεν περιγράφονται ούτε από την εκτεταμένη DLVO θεωρία, και που σύμφωνα με τη

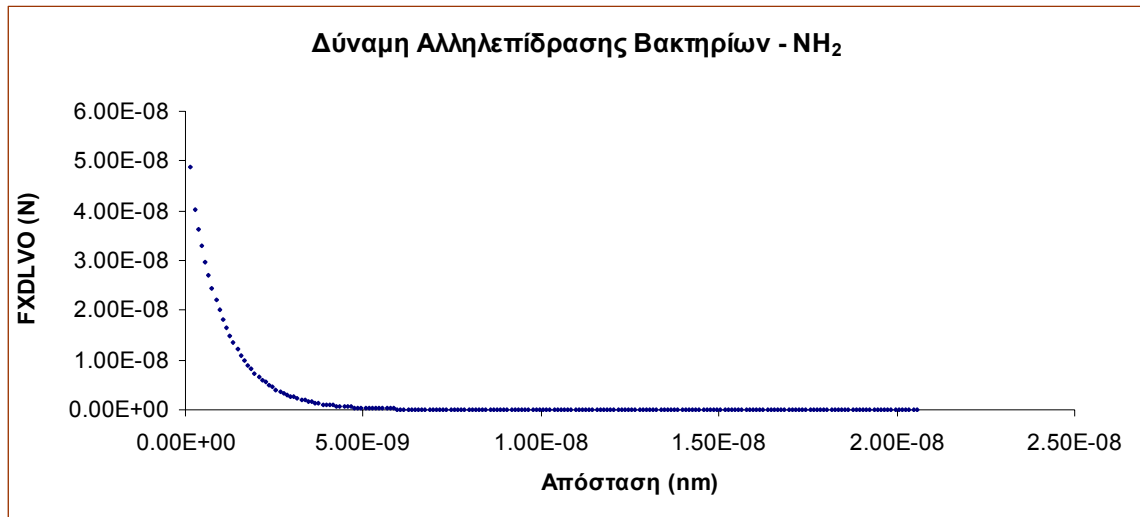
θεωρία του Dickinson, 1997, οφείλονται στους μακρομοριακούς δεσμούς που το βακτήριο είναι σε θέση να συνάψει. Με δεδομένο ότι οι αμινο-ομάδες είναι ενεργές, σε αντίθεση με τις μέθυλο-ομάδες, αποδεικνύεται με αυτόν τον τρόπο ότι συνάπτουν μακρομοριακούς δεσμούς με τα βακτήρια και για αυτό το λόγο παρατηρείται η απόκλιση στην προσκόλληση των βακτηρίων μεταξύ CH_3 και NH_2 , για μεγάλες τιμές οπισθέλκουσας.



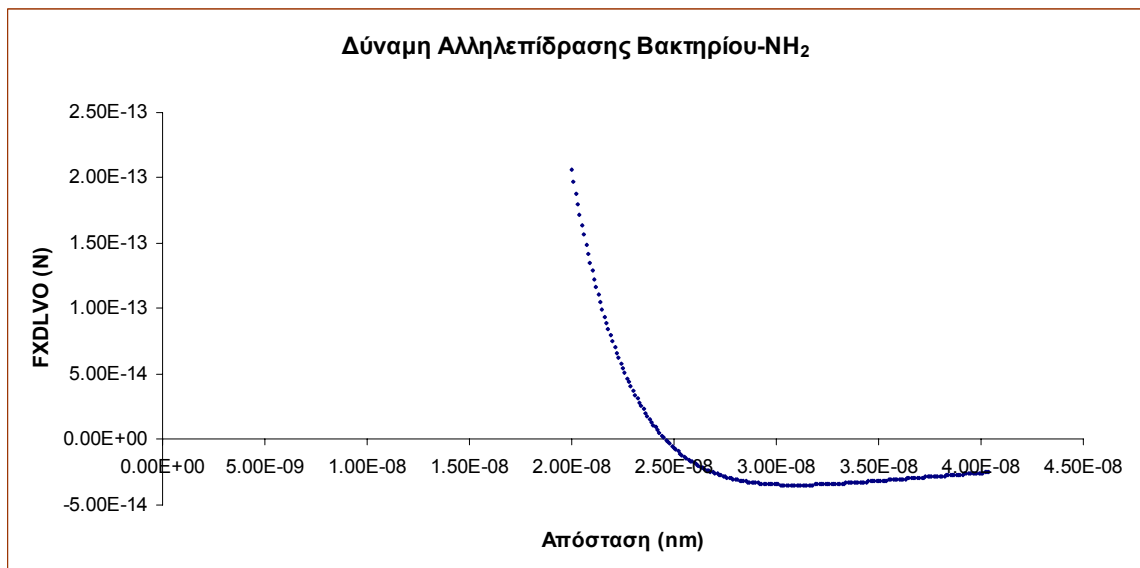
Διάγραμμα 6.12. Δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίου – CH_3 , ως συνάρτηση της απόστασης, όπως υπολογίζεται από την θεωρία της εκτεταμένης DLVO.



Διάγραμμα 6.13. Δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίου – CH₃, ως συνάρτηση της απόστασης, όπως υπολογίζεται από την θεωρία της εκτεταμένης DLVO – Ενεργειακό Φράγμα.



Διάγραμμα 6.14. Δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίου – NH₂, ως συνάρτηση της απόστασης, όπως υπολογίζεται από την θεωρία της εκτεταμένης DLVO.



Διάγραμμα 6.15. Δύναμη αλληλεπίδρασης βακτηρίου – NH₂, ως συνάρτηση της απόστασης, όπως υπολογίζεται από την θεωρία της εκτεταμένης DLVO, ενεργειακό ελάχιστο (δευτερεύον).

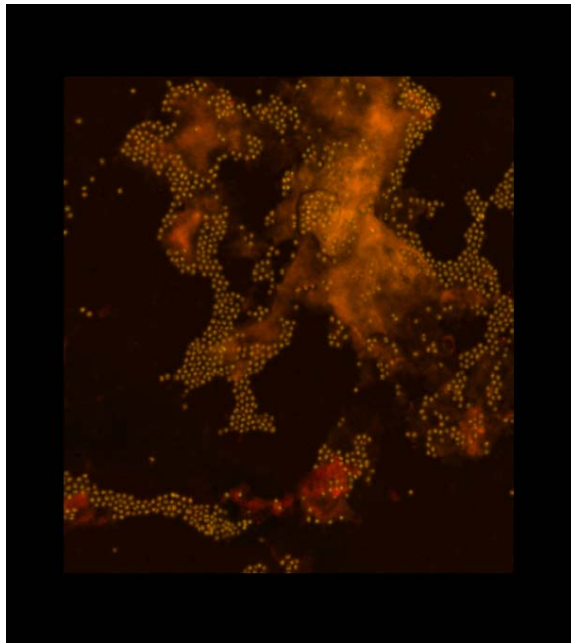
Στην περίπτωση του γυαλιού, οι ισχυρές ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις δεν επέτρεψαν στα βακτήρια να συνάψουν μακρομοριακούς δεσμούς.

Επομένως ο συνδιασμός των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων, όπως αυτές περιγράφονται από την θεωρία της εκτεταμένης DLVO και η δυνατότητα ή μη των βακτηρίων να σχηματίζουν μακρομοριακούς δεσμούς με την επιφάνεια φαίνεται να μπορεί να εξηγήσει την προσκόλληση τόσο σε μικρές όσο και σε μεγαλύτερες τιμές οπισθέλκουσας δύναμης λόγω ροής.

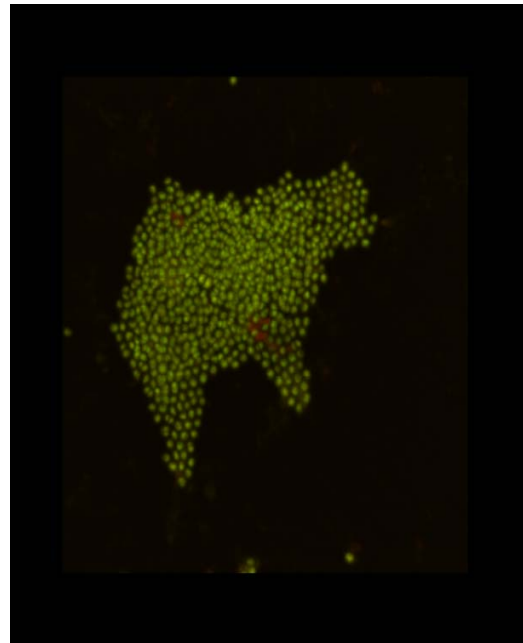
Περαιτέρω διερεύνηση είναι απαραίτητη για τη μελέτη του είδους και των χαρακτηριστικών των μακρομοριακών αυτών δεσμών.

6.2.3. Αποτελέσματα Έκφρασης Γονιδίων *ica*

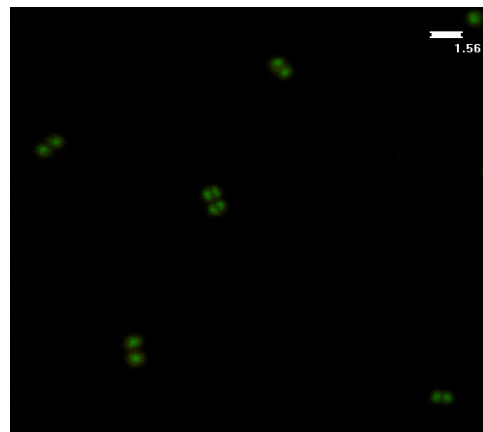
Από μελέτη των προσκολλημένων βακτηρίων στο γυαλί και τις μέθυλο-ομάδες, για ρυθμό διάτμησης 50 s⁻¹ και ιοντική ισχύ 0.1 M με μικροσκόπιο συνεστιακής σάρωσης, μετά από χρώση του DNA/RNA τους και της προσκολλητίνης που ευθύνεται για τη συσσωμάτωση (PIA), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 3.5.4, προέκυψε ότι τα προσκολλημένα βακτήρια του slime-θετικού στελέχους στις μέθυλο-ομάδες παρήγαγαν την PIA σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες σε σχέση με αυτά που είχαν προσκολληθεί στο γυαλί. Από τη μελέτη του slime-αρνητικού στελέχους προέκυψε ότι και αυτό συσσωματώνεται και προσκολλάται, αλλά δεν παράγει PIA. Εικόνα 6.3.



ATCC 35984: slime θετικό στο Γυαλί-CH₃



ATCC 12228: slime αρνητικό στο Γυαλί-CH₃



ATCC 35984: slime θετικό στο Γυαλί

Εικόνα 6.3. Εικόνες συνεστιακού μικροσκοπίου (πράσινο χρώμα: DNA/RNA βακτηρίων, κόκκινο χρώμα: προσκολλητίνη πολυσακχαρικής φύσεως: PIA)

Από τις εικόνες αυτές οδηγηθήκαμε στη σκέψη ότι τα βακτήρια του slime-θετικού στελέχους που έχουν προσκολληθεί στις μέθυλο-ομάδες πρέπει να είχαν ενεργοποιήσει τα γονίδια που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της PIA, δηλαδή τα γονίδια *ica*.

Στον πίνακα 6.8. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης του slime-θετικού στελέχους μετά από επαφή των βακτηρίων και προσκόλληση στο γυαλί και τις μέθυλο-ομάδες, για χρόνο 4 ωρών και ρυθμούς διάτμησης 50 και 2000 s⁻¹.

Με **E** συμβολίζονται τα βακτήρια του εναιωρήματος και με **Π** τα προσκολλημένα βακτήρια.

Υλικό/Ρυθμός Διάτμησης	<i>ica A</i> (copies/μl)	<i>ica D</i> (copies/μl)
Γυαλί-CH ₃ E 50 s ⁻¹	342.25	104.86
Γυαλί E 50 s ⁻¹	214.87	80.94
Γυαλί-CH ₃ Π 50 s ⁻¹	187.03	113.81
Γυαλί Π 50 s ⁻¹	64.13	52.41
Γυαλί-CH ₃ E 2000 s ⁻¹	11058.55	1864.95
Γυαλί E 2000 s ⁻¹	3406.52	583.03
Γυαλί-CH ₃ Π 2000 s ⁻¹	267.88	8.18
Γυαλί Π 2000 s ⁻¹	41.08	56.55

Πίνακας 6.8. Έκφραση γονιδίων *ica A* και *ica D* βακτηρίων εναιωρήματος και προσκολλημένων σε γυαλί και μέθυλο-ομάδες, για ρυθμούς διάτμησης 50 και 2000 s⁻¹.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει βακτήρια που έχουν έρθει σε επαφή με μέθυλο-ομάδες αυξάνουν την έκφραση των γονιδίων *ica A* και *ica D*. Το ίδιο αποτέλεσμα έχει και η αύξηση του ρυθμού διάτμησης.

Παρατηρείται λοιπόν ότι βακτήρια έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την γονιδιακή τους έκφραση προκειμένου να προσαρμοσθούν στο περιβάλλον τους.

Κεφάλαιο 7

Συζήτηση

Παρότι τα περισσότερα εμφυτεύματα και οι ιατρικές συσκευές βελτιώνουν την ποιότητα ζωής των ασθενών ή ακόμα σώζουν ζωές, η αυξανόμενη εμφάνιση λοιμώξεων που σχετίζεται άμεσα με τη χρήση και την παρουσία τους στο ανθρώπινο σώμα είναι μία από τις σημαντικότερες αιτίες που παρεμποδίζουν τη μακροχρόνια χρήση τους, αυξάνουν τη νοσηρότητα, το κόστος νοσηλείας αλλά και τη θνησιμότητα (Schierholz και Beuth, 2001; von Eiff et al., 2002; Vincent, 2003).

Η ομάδα των πηκτάση αρνητικών σταφυλοκόκκων και ιδιαίτερα ο *S. epidermidis* είναι το κύριο παθογόνο αίτιο στο 40-75% των λοιμώξεων σχετιζομένων με βιοϋλικά, ακολουθούμενος από τον *S. aureus*. Οι εμφυτευμένες ιατρικές συσκευές, με τη σειρά τους, ευθύνονται για το 45% των νοσοκομειακών λοιμώξεων και λόγω της ανθεκτικότητας των λοιμώξεων αυτών στα αντιβιοτικά και τους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, είναι αναγκαία στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η απομάκρυνση του εμφυτεύματος, με αρνητικές επιπτώσεις για τον ασθενή και αύξηση του κόστους της θεραπείας (Schierholz και Beuth, 2001; von Eiff et al., 2002; Vincent, 2003).

Παρότι ο *S. epidermidis*, όπως και οι περισσότεροι πηκτάση αρνητικοί σταφυλόκοκκοι, αποτελεί μέρος της φυσιολογικής χλωρίδας του δέρματος και των βλεννωδών μεμβρανών, αποτελεί πλέον συχνό αιτιολογικό παράγοντα νοσοκομειακών λοιμώξεων. Οι λοιμώξεις που προκαλούνται από τον *S. epidermidis* περιλαμβάνουν την ενδοκαρδίτιδα σε προσθετικές βαλβίδες (Miele et al., 2001), λοιμώξεις ενδοφλέβιων καθετήρων (Christensen et al, 1994; Tacconelli et al., 1997; Raad, 1998; Scierholz και Beuth, 2001), λοιμώξεις προσθετικών αρθρώσεων (Perdreau-Remington et al., 1996), λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος παρουσία καθετήρων (Trautner et al., 2004), καθώς και ενδοφθαλμίτιδα μετά από επέμβαση καταράκτη και εμφύτευση ενδοφθάλμιου τεχνητού φακού (Jansen et al., 1991; Garcia-Saenz et al., 2000; Willcox et al., 2001). Επομένως, σχετίζονται άμεσα με την παρουσία εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών.

Ο *S. epidermidis*, δεν έχει την ικανότητα παραγωγής τοξινών και ενζύμων, άρα η παθογένεια του αποδίδεται στην ικανότητά του να προσκολλάται στην επιφάνεια του βιοϋλικού, να παραμένει εκεί και να πολλαπλασιάζεται κάτω από ένα προστατευτικό κάλλυμα εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας, που ο ίδιος παράγει και ονομάζεται γλυκοκάλυκας ή “slime” (Rupp και Archer, 1994; Fletcher και Decho, 2001; Vuong και Otto, 2002).

Με δεδομένο ότι η εκτεταμένη χορήγηση ευρέος φάσματος αντιβιοτικών, για την πρόληψη και θεραπεία λοιμώξεων σε ενδονοσοκομειακούς ασθενείς, έχει οδηγήσει στην επικράτηση πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών της φυσιολογικής χλωρίδας, η κατασκευή αντιβακτηριακών βιοϋλικών κρίνεται επιβεβλημένη (Duguid et al., 1992; Mah και O'Toole, 2001; Stewart και Costerton, 2001; Donlan και Costerton, 2002; Monzon et al., 2002).

Για το σκοπό αυτό απαραίτητη είναι η μελέτη και η κατανόηση του μηχανισμού προσκόλλησης των βακτηρίων στην επιφάνεια του βιοϋλικού. Συγκεκριμένα, είναι απαραίτητη η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ βακτηρίων και βιοϋλικών, και των παραγόντων που τις επηρεάζουν, προκειμένου να κατανοηθεί η αιτία της προσκόλλησης αλλά και να βρεθούν τρόποι προκειμένου να αποφευχθεί.

Δεδομένου ότι η προσκόλληση των βακτηρίων σε βιοϋλικά είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία που επηρεάζεται από πολλές παραμέτρους, όπως τις ιδιότητες των βακτηρίων, τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του βιοϋλικού, αλλά και τις συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται, δηλαδή τις συνθήκες ροής και την παρουσία πρωτεϊνών, η σχετική συνεισφορά αυτών των παραμέτρων και οι θεμελιώδεις μηχανισμοί που κυβερνούν τη βακτηριακή προσκόλληση είναι ακόμα ανεπαρκώς κατανοητοί (Vaudax *et al.*, 1990; Heilmann *et al.*, 1996; Morra and Cassinelli, 1997; An and Friedman, 1998).

Σε αυτή την κατεύθυνση, αποφασίσαμε να διερευνήσουμε το φαινόμενο της βακτηριακής προσκόλλησης. Συγκεκριμένα, *διερευνήσαμε την επίδραση των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών, του ρυθμού διάτμησης και της σχετικής συνεισφοράς τους στην ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στην επιφάνεια του βιοϋλικού αλλά και να ενεργοποιούν τα γονίδια *ica* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας (slime) και συγκεκριμένα μιας πολυσακχαριδικής φύσεως προσκολλητίνης (polysaccharide intercellular adhesin, PIA). Ελέγξαμε επίσης εάν οι θεωρίες κολλοειδών συστημάτων, και συγκεκριμένα η θερμοδυναμική, η DLVO και η εκτεταμένη DLVO μπορούν να εξηγήσουν τα πειραματικά αποτελέσματα.*

*Αρχικά μελετήθηκε η προσκόλληση δύο slime-θετικών στελεχών *S. epidermidis*, του πρότυπου ATCC 35984 και του κλινικού GRE 500, σε διάφορους ρυθμούς διάτμησης, σε υμένια Πολυβινυλοχλωριδίου (Poly Vinyl Chloride: PVC) και επιφανειακά τροποποιημένου PVC σε εκκενώσεις ραδιοσυχνότητας*

(Radiofrequency: RF): CF_4/H_2 και $\text{C}_2\text{H}_2/\text{He}$, σε εκκενώσεις ατομικής δέσμης (Atom Beam: AB) C_2H_2 και σε εκκενώσεις συνδυασμού ατομικής δέσμης-επιμετάλλωσης προσανατολισμένης με μαγνήτες (Atom Beam-Magnetron Sputtering): Ag και Ag/ C_2H_2 .

Ο συνδυασμός μικροσκοπιών (ηλεκτρονικής σάρωσης: SEM, ατομικής δύναμης: AFM και φθορισμού) αλλά και της μεθόδου μέτρησης των ζώντων προσκολλημένων βακτηρίων (CFUs) επέτρεψε την ποσοτικοποίηση της βακτηριακής προσκόλλησης. Σε περιπτώσεις έντονης συσσωμάτωσης, όπως σε αυτή του PVC, αξιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα των CFUs. Ομοίως για την περίπτωση του Ag, γιατί από τη σύγκριση CFUs – SEM διαπιστώθηκε ότι το Ag είχε προκαλέσει ακόμα και βακτηριακό θάνατο. Στην περίπτωση των λεπτών υμενίων άμορφου άνθρακα a-C (C_2H_2), αξιοποιήθηκαν τα αποτελέσματα από τη μικροσκοπία φθορισμού γιατί η ανίχνευση των προσκολλημένων βακτηρίων με SEM και AFM ήταν δύσκολη.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η προσκόλληση των δύο στελεχών δεν διέφερε σημαντικά, και ότι ήταν μειωμένη σε όλα τα τροποποιημένα με πλάσμα υλικά, με εξαίρεση το CF_4/H_2 , σε σχέση με το μη επεξεργασμένο PVC. Η μέγιστη μείωση παρατηρήθηκε στην επιφάνεια του τροποποιημένου με άργυρο (Ag) PVC. Σε όλα τα υλικά παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 σε 2000 s^{-1} .

Συγκρίνοντας τα υλικά μεταξύ τους προέκυψε ότι:

Το CF_4 αύξησε σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση σε σχέση με το PVC, για ρυθμό διάτμησης 50 s^{-1} , εξαιτίας της υδροφοβικότητάς του και άρα της μειωμένης επιφανειακής του ενέργειας. Με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης όμως, παρατηρήθηκε ότι η βακτηριακή προσκόλληση στο CF_4 ήταν παρόμοια με αυτή στο μη επεξεργασμένο PVC. Με δεδομένο ότι τα στελέχη μας ήταν σχετικά υδρόφιλα, είχαν δηλαδή μικρή γωνία διαβροχής με το νερό και άρα αυξημένο πολικό χαρακτήρα, η προσκόλλησή τους, σύμφωνα με τη θερμοδυναμική θεωρία (Absolom et al., 1983), ευνοείται στα πιο υδρόφοβα υλικά, δηλαδή στα λιγότερο πολικά. Η σχετικά μικρή αύξηση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων στο CF_4 σε σχέση με το PVC φαίνεται να οφείλεται στη μικρότερη τραχύτητα του πρώτου σε σχέση με το δεύτερο. Οι Pizzoferrato et al., 1995, επίσης έδειξαν ότι η επιφανειακή τροποποίηση πολυουρεθάνης με εναπόθεση λεπτού φθοριωμένου υμενίου αύξησε την προσκόλληση του *S. aureus*, σε στατικά πειράματα.

Στα λεπτά υμένια άμορφου υδρογονωμένου άνθρακα a-C:H (C₂H₂/He) και άμορφου άνθρακα a-C (C₂H₂) παρατηρήθηκε μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων, σε σχέση με το PVC, που φαίνεται να οφείλεται στην μειωμένη γωνία διαβροχής τους, και άρα στην αυξημένη επιφανειακή τους ενέργεια, σε σχέση με το PVC. Αυτό είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Wang et al., 2004, που έδειξαν ότι η εναπόθεση λεπτών υμενίων άμορφου υδρογονωμένου άνθρακα μείωσε τη βακτηριακή προσκόλληση, κάτω από στατικές συνθήκες. Η σύγκριση των δύο αυτών εναποθέσεων έδειξε ότι το a-C προκάλλεσε αυξημένη προσκόλληση σε σχέση με το a-C:H, για όλους τους ρυθμούς διάτμησης, εκτός από το 50 s⁻¹. Η σχετικά αυξημένη προσκόλληση στο a-C, ακόμα και για μεγάλους ρυθμούς διάτμησης, φαίνεται να σχετίζεται με την τοπογραφία και την τραχύτητά του, η οποία ήταν αυξημένη σε σχέση με όλα τα άλλα υλικά, αλλά και με τη μικρότερη τιμή του λόγου O/C, σε σχέση με το a-C:H. Η αυξημένη τραχύτητα του a-C φαίνεται να αύξησε την διαθέσιμη επιφάνεια για προσκόλληση αλλά και να παρείχε προστασία στα προσκολλημένα βακτήρια, οπότε αυτά δεν αποκολλήθηκαν ακόμα και όταν ο ρυθμός διάτμησης ήταν 2000 s⁻¹. Αυτό είναι σε συμφωνία με τη μελέτη των Boyd et al., 2002 που έδειξε ότι αύξηση στην μέση επιφανειακή τραχύτητα (Ra) ανοξείδωτου ατσάλιου, από 0,04 μm σε 0.30 μm οδήγησε σε μεγαλύτερη δύναμη προσκόλλησης των βακτηρίων αλλά και με τη μελέτη των Taylor et al., 1998, η οποία έδειξε ότι μικρή αύξηση στην τραχύτητα της επιφάνειας PMMA από 0.04 μm σε 1.24 μm προκάλεσε σημαντική αύξηση στη βακτηριακή προσκόλληση, κάτω από στατικές συνθήκες.

Η μεγαλύτερη μείωση στη βακτηριακή προσκόλληση εμφανίστηκε στα επεξεργασμένα με Ag και Ag/ a-C, αν και το δεύτερο, για τους περισσότερους ρυθμούς διάτμησης, μείωσε λιγότερο τη βακτηριακή προσκόλληση, σε σχέση με το πρώτο, εξαιτίας πιθανότατα της αυξημένης τραχύτητάς του. Η μείωση της προσκόλλησης σε αυτά τα υλικά δεν φαίνεται να σχετίζεται με τις γωνίες διαβροχής, και άρα την επιφανειακή ενέργεια των δειγμάτων, καθώς οι τιμές των γωνιών διαβροχής τους ήταν παρόμοιες με αυτές του PVC. Η μείωση πρέπει να σχετίζεται με την ικανότητα των ιόντων αργύρου να προσδένονται ισχυρά στις ηλεκτρονιο-δοτικές ομάδες της επιφάνειας των βακτηρίων αποτρέποντας έτσι τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις τόσο μεταξύ τους όσο και με την επιφάνεια. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Dowling et al., 2003; Chaw et al., 2005

που έδειξαν μειωμένη βακτηριακή προσκόλληση σε υποστρώματα που περιέχουν στην επιφάνειά τους άργυρο.

Όσον αφορά την επίδραση του ρυθμού διάτμησης στην προσκόλληση των βακτηρίων στα παραπάνω υλικά, από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η σταδιακή αύξηση του ρυθμού διάτμησης, προκάλεσε σημαντική μείωση στον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων για όλα τα υλικά, με εξαίρεση το a-C, το οποίο εμφάνισε μια ιδιόμορφη συμπεριφορά.

Σε όλα τα υλικά, η μέγιστη μείωση στην προσκόλληση προκλήθηκε από την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 s^{-1} σε 2000 s^{-1} . Στα υλικά a-C:H, Ag και Ag/a-C, η αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 200 s^{-1} σε 500 s^{-1} δεν επηρέασε σημαντικά την προσκόλληση, ενώ στα υλικά PVC και CF_4 τη μείωσε κατά περίπου 40 %. Το a-C εμφάνισε αυξημένη προσκόλληση για ρυθμό διάτμησης 500 s^{-1} , σε σχέση με το ρυθμό διάτμησης 200 s^{-1} , και η προσκόλληση ήταν παρόμοια με του ρυθμού διάτμησης 50 s^{-1} .

Με αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 500 s^{-1} σε 2000 s^{-1} η βακτηριακή προσκόλληση μειώθηκε σημαντικά σε όλα τα υλικά. Η μέγιστη μείωση στη βακτηριακή προσκόλληση σε όλα τα υλικά εμφανίστηκε για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , σε σχέση με τους άλλους ρυθμούς διάτμησης. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Duddridge et al., 1982; Dickinson και Cooper, 1995; Isberg and Barnes, 2002, που έδειξαν ότι αύξηση του ρυθμού διάτμησης μείωσε τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων σε διάφορα υποστρώματα. Αντίθετα, οι Mohamed et al., 2000, έδειξαν ότι υπάρχει ένας βέλτιστος ρυθμός ροής που ευνοεί τη βακτηριακή προσκόλληση και που εκφράζει την ισορροπία μεταξύ του ρυθμού προσκόλλησης και της δύναμης που ενεργεί στο προσκολλημένο βακτήριο. Συγκεκριμένα, έδειξαν ότι στην περίπτωση μεγάλου αριθμού υποδοχέων/κύτταρο, η προσκόλληση του *S. aureus* σε καλυπτρίδες γυαλιού επικαλυμμένες με κολλαγόνο αυξήθηκε με αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 50 σε 300 s^{-1} ενώ μειώθηκε για ρυθμό διάτμησης μεγαλύτερο του 500 s^{-1} . Στη μελέτη μας δεν παρουσιάστηκε αυτός ο βέλτιστος ρυθμός διάτμησης, τουλάχιστον για το εύρος που μελετήσαμε, ίσως επειδή οι αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών δεν ήταν ειδικές, καθώς δεν είχε προηγηθεί προσρόφηση πρωτεϊνών στην επιφάνεια των υλικών.

Όσον αφορά το a-C, η ιδιόμορφη συμπεριφορά του στο ρυθμό διάτμησης πρέπει να οφείλεται στην αυξημένη τραχύτητά του. Σε συμφωνία με τη μελέτη των

Boyd et al., 2002, η αυξημένη τραχύτητα του a-C φαίνεται να αύξησε την διαθέσιμη επιφάνεια για προσκόλληση και άρα τη δύναμη προσκόλλησης των βακτηρίων.

Επιπρόσθετα, συγκρίνοντας τη μείωση που προέκυψε στη βακτηριακή προσκόλληση με την αύξηση του ρυθμού διάτμησης από 200 s^{-1} σε 500 s^{-1} για τα υλικά PVC και Ag προκύπτει ότι η μείωση ήταν μεγαλύτερη για το PVC.

Από την παρατήρηση της μορφολογίας των προσκολλημένων βακτηρίων με τα μικροσκόπια, προέκυψε ότι το PVC προήγαγε όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και το σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm) περισσότερο ή τουλάχιστον σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση κυρίως με το Ag.

Με δεδομένο ότι η οπισθέλκουσα, λόγω ροής, που ασκείται στα βακτήρια που προσεγγίζουν την επιφάνεια, αλλά και στα προσκολλημένα, είναι ανάλογη του τετραγώνου της ακτίνας του βακτηρίου (εξίσωση 2.41) στην περίπτωση των συσσωματωμάτων, η ακτίνα είναι πολύ μεγαλύτερη αυτής του μεμονωμένου βακτηρίου και άρα η οπισθέλκουσα που τους ασκείται είναι επίσης μεγαλύτερη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα ο μεγάλος ρυθμός διάτμησης να προκαλεί αποκόλληση των συσσωματωμάτων πιο εύκολα από ότι σε σχέση με τα μεμονωμένα κύτταρα. Το φαινόμενο αυτό οδήγησε σε μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης αλλά και του μεγέθους των συσσωματωμάτων ειδικά στην περίπτωση του PVC.

Είναι αξιοσημείωτο επίσης ότι για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , τα υλικά PVC, CF_4 και a-C εμφάνισαν παρόμοιο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων και μη στατιστικά σημαντική διαφορά. Ομοίως, για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} , τα υλικά a-C:H, Ag και Ag/ a-C δεν εμφάνισαν σημαντική διαφορά στην προσκόλληση. Από αυτό προκύπτει ότι *για μεγάλους ρυθμούς διάτμησης, υλικά με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες, εμφανίζουν μη σημαντικές διαφορές* και άρα ότι οι διατμητικές δυνάμεις που ασκούνται στα βακτηριακά κύτταρα λόγω ροής είναι αυτές που κυριαρχούν και καθορίζουν το αποτέλεσμα. *Σε μικρότερους ρυθμούς διάτμησης, η φυσικοχημεία της επιφάνειας και η τραχύτητά της είναι οι παράγοντες που καθορίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και υλικών και άρα τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων.*

Επειδή σε αυτή τη μελέτη είχαμε ταυτόχρονη μεταβολή πολλών παραμέτρων, δηλαδή της χημικής σύστασης αλλά και της τραχύτητας της επιφάνειας, παρότι έγινε σαφές ότι όλες αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν την προσκόλληση και αποκαλύφθηκε ο τρόπος επίδρασής τους, δεν μπορούσε να

ποσοτικοποιηθεί η σχετική συνεισφορά της κάθε παραμέτρου. Το κυριότερο πρόβλημα ήταν η αυξημένη τραχύτητα του ίδιου του PVC.

Για το λόγο αυτό, αποφασίσαμε να μελετήσουμε *την επίδραση της επιφανειακής τροποποίησης υμενίων Πολυτερεφθαλικού Αιθυλενεστέρα* (Polyethylene Terephthalate: PET), καθώς πρόκειται για ένα πολυμερές το οποίο χρησιμοποιείται ως βιοϋλικό και εμφανίζει σχετικά μικρή μέση επιφανειακή τραχύτητα.

Συγκεκριμένα, *μελετήθηκε η προσκόλληση του πρότυπου slime-θετικού στελέχους S. epidermidis: ATCC 35984 σε υμένια PET και επιφανειακά τροποποιημένου PET* σε εκκενώσεις He/O₂ και CH₄/H₂.

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι τόσο *η εναπόθεση λεπτών υμενίων a-C:H, αλλά πολύ περισσότερο η τροποποίηση του PET σε εκκενώσεις He/O₂, μείωσαν σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο PET.*

Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Wang et al., 2004, που έδειξαν ότι η εναπόθεση λεπτών υμενίων άμορφου υδρογονωμένου άνθρακα μείωσε τη βακτηριακή προσκόλληση, κάτω από στατικές συνθήκες, αλλά και με τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης (εναπόθεση λεπτών υμενίων άμορφου υδρογονωμένου άνθρακα σε PVC). Επίσης, όσον αφορά την τροποποίηση του PET με He/O₂, τα αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Wang et al., 1995, που παρατήρησαν μείωση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων σε τροποποιημένο σε πλάσμα αργού Πολυαιθυλένιο (PE). Ομοίως, οι Balazs et al., το 2003 έδειξαν ότι το τροποποιημένο με πλάσμα οξυγόνου PVC μείωσε την προσκόλληση της *Pseudomonas aeruginosa* λόγω της σημαντικής αλλαγής στην υδροφοβικότητα του σε σχέση με το μη τροποποιημένο PVC. Μετά την τροποποίηση σε πλάσμα οξυγόνου η γωνία διαβροχής του PVC με το νερό ήταν 20° σε αντίθεση με το αρχικό PVC η γωνία διαβροχής του οποίου ήταν 80°. Οι James and Jayakrishnan, το 2003 έδειξαν ότι θεικυανοποίηση της επιφάνειας PVC (PVC-SCN) μείωσε την προσκόλληση τόσο του *S. epidermidis* όσο και του *S. aureus*. Η μείωση αυτή αποδόθηκε στην αλλαγή της υδροφοβικότητας του PVC μετά από τη θεικυανοποίηση (γωνία διαβροχής με το νερό του PVC-SCN: 50°).

Αντίθετα, οι Morra και Cassinelli, 1996, παρατήρησαν αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων (*S. epidermidis*) σε Πολυστυρένιο (PS) τροποποιημένο με Οξυγόνο, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PS. Ομοίως, οι

Carnazza et al., 2005, παρατήρησαν αύξηση της προσκόλλησης της *Pseudomonas aeruginosa* σε τροποποιημένο PET και poly(hydroxymethylsiloxane) με πλάσμα οξυγόνου.

Από τα αποτελέσματα της μελέτης μας προέκυψε επίσης ότι, στην περίπτωση των υμενίων a-C:H, η αύξηση του δυναμικού του «γειωμένου» (V_{RF}) ηλεκτροδίου από 100 σε 400 Volt προκάλεσε αύξηση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων, ενώ οι ενδιάμεσες τιμές δεν επηρέασαν την προσκόλληση σημαντικά. Στην περίπτωση των εκκενώσεων He/O₂, η προσκόλληση των βακτηρίων αυξήθηκε με την αύξηση του ποσοστού του Οξυγόνου από 10 σε 50 %, ενώ περαιτέρω αύξηση στο ποσοστό του Οξυγόνου δεν επηρέασε σημαντικά την προσκόλληση σε σχέση με το 10 % Οξυγόνου σε Ήλιο.

Από την παρατήρηση των εικόνων που λήφθηκαν με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) προέκυψε ότι τόσο τα λεπτά υμένια a-C:H, αλλά πολύ περισσότερο το μη επεξεργασμένο PET, συγκράτησαν, όχι μόνο το μεγαλύτερο αριθμό προσκολλημένων βακτηρίων, αλλά και σε μορφή συσσωματωμάτων. Ειδικά στην περίπτωση του PET ήταν εμφανής μια βλενώδης ουσία η οποία περιβάλλει τα προσκολλημένα βακτήρια. Αντίθετα, τα βακτήρια που ήταν προσκολλημένα στα υλικά που τροποποιήθηκαν σε εκκενώσεις He/O₂ εμφανίστηκαν μεμονωμένα.

Με δεδομένο ότι η διαδικασία σχηματισμού βιομεμβράνης (biofilm) περιλαμβάνει δύο στάδια, το στάδιο της προσκόλλησης και αυτο της συσσωμάτωσης, μπορεί κανείς να υποθέσει ότι τα υδρόφοβα υλικά, το PET και τα υμένια a-C:H, προάγουν όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και το σχηματισμό biofilm περισσότερο ή τουλάχιστον σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση με τα υδρόφιλα υλικά που προέκυψαν από την τροποποίηση σε πλάσμα He/O₂. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι το PVC προήγαγε όχι μόνο την προσκόλληση αλλά και το σχηματισμό βιομεμβράνης (biofilm) περισσότερο ή τουλάχιστον σε μικρότερο χρονικό διάστημα, σε σχέση κυρίως με το Ag.

Λόγω της υψηλής ιοντικής ισχύος του διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία του βακτηριακού εναιωρήματος και την μελέτη της προσκόλλησης (2 M), μπορεί να θεωρηθεί ότι οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών ήταν αμελητέες (van Oss, 2003). **Επομένως, οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της εναπόθεσης των λεπτών υμενίων a-C:H και της τροποποίησης του PET σε εκκενώσεις He/O₂ και σχετίζονται με την**

επιφανειακή ενέργεια των υλικών πρέπει να είναι οι σημαντικές παράμετροι που επηρέασαν τη βακτηριακή προσκόλληση και συσσωμάτωση.

Από τη μελέτη της συσχέτισης του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με την ολική επιφανειακή ενέργεια (γ_S^{TOT}) των υλικών και την πολική (γ_S^p) και μη (γ_S^d) συνιστώσα της, προέκυψε ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση των γ_S^{TOT} και γ_S^p , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του γ_S^d , το οποίο άλλωστε δεν μεταβλήθηκε σημαντικά κατά την επεξεργασία των υλικών με τις συγκεκριμένες συνθήκες πλάσματος.

Η έντονη επίδραση της ολικής επιφανειακής ενέργειας των υλικών στη βακτηριακή προσκόλληση επιχειρήθηκε να εξηγηθεί από τη θερμοδυναμική θεωρία και συγκεκριμένα από την προσέγγιση Dispersion-Polar (Owens και Wendt, 1969).

Από τις συσχετίσεις μεταξύ του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων και της ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης (ΔG_{d0}^{adh}), της πολικής της συνιστώσας (ΔG_{d0}^p) και της μη πολικής (ΔG_{d0}^d) παρατηρήθηκε ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση του ΔG_{d0}^{adh} και του ΔG_{d0}^p , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του ΔG_{d0}^d , καθώς οι αλληλεπιδράσεις διασποράς μεταξύ υλικών και βακτηρίων δεν διέφεραν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα υλικά.

Από τη σύγκριση των συσχετίσεων του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με τα ΔG_{d0}^{adh} , ΔG_{d0}^p , γ_S^{TOT} και γ_S^p , παρατηρήθηκε ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων συσχετίζεται καλύτερα με τα ΔG_{d0}^{adh} και ΔG_{d0}^p από ότι με τα γ_S^{TOT} και γ_S^p , και αυτό γιατί στον υπολογισμό των πρώτων λήφθησαν υπόψη, όχι μόνο οι ιδιότητες των υλικών αλλά και των βακτηρίων.

Επομένως, δεδομένου ότι το γ_S^d δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των διάφορων υλικών και το γ_B^p είναι μικρότερο του γ_L^p , η βακτηριακή προσκόλληση δεν ευνοείται από την αύξηση του γ_S^p . **Δηλαδή η προσκόλληση βακτηρίων με έντονο πολικό χαρακτήρα, σε ακόμα μεγαλύτερου βαθμού πολικό μέσο (γ_L^p), δεν ευνοείται σε πολικές επιφάνειες.** Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από την παρουσία ενυδατωμένων στρωμάτων στα τροποποιημένα με He/O₂ PET και γύρω από τα βακτήρια, λόγω της υδρόφιλης-πολικής φύσης και των δύο. Η επικάλυψη των ενυδατωμένων αυτών

στρωμάτων κατά τη διάρκεια της βακτηριακής προσκόλλησης απωθεί τα βακτήρια από την επιφάνεια μέσω δυνάμεων που είναι γνωστές ως «υδροφιλικές απωθήσεις» ή «δυνάμεις ενυδάτωσης» (van Oss, 1993).

Επομένως, *η Dispersion-Polar προσέγγιση της θερμοδυναμικής θεωρίας*, παρότι δεν μπόρεσε να προβλέψει τη μείωση που παρατηρήθηκε στη βακτηριακή προσκόλληση στα λεπτά υμένια a-C:H, σε σύγκριση με το μη επεξεργασμένο PET, *προέβλεψε ικανοποιητικά τη μείωση που παρατηρήθηκε στη βακτηριακή προσκόλληση* στα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ PET. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται στη μικρή μεταβολή στην επιφανειακή ενέργεια των υμενίων a-C:H, σε σχέση με το μη επεξεργασμένο PET, αλλά και στη μειωμένη τραχύτητα που αυτά εμφάνισαν. Επίσης, *παρεκλίσεις από τη θερμοδυναμική θεωρία που εμφανίζονται σε κάποια από τα τροποποιημένα σε εκκενώσεις He/O₂ PET, μπορεί και πάλι να οφείλονται στην ταυτόχρονη μεταβολή της τραχύτητας.*

Παρόλα αυτά, *σε μια προσπάθεια να συσχετισθεί η τραχύτητα με την προσκόλληση δεν βρέθηκε κάποια απλή σχέση μεταξύ τους*, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι *οι βασικές παράμετροι που επηρέασαν την προσκόλληση ήταν η επιφανειακή ενέργεια των υλικών, ο πολικός τους χαρακτήρας, και ο πολικός χαρακτήρας των βακτηρίων.*

Ακολούθως, μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου γήρανσης τόσο στις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας τροποποιημένων σε εκκενώσεις He και He/O₂ υμενίων PET όσο και στην προσκόλληση των βακτηρίων (του πρότυπου slime-θετικού στελέχους S. epidermidis: ATCC 35984), κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και οι δύο τροποποιήσεις (He και He/O₂) μείωσαν σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων τόσο την ημέρα της τροποποίησης, όσο και τις επόμενες ημέρες, σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET, κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες. Παρόλα αυτά, ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων αυξήθηκε σημαντικά ως συνάρτηση του χρόνου γήρανσης.

Υπό συνθήκες ροής, και συγκεκριμένα για ρυθμό διάτμησης 200 s⁻¹, ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων μειώθηκε σημαντικά σε σχέση με αυτόν κάτω από στατικές συνθήκες. Επίσης, η μεγαλύτερη μείωση στη βακτηριακή προσκόλληση παρατηρήθηκε στο μη τροποποιημένο PET, δηλαδή το λιγότερο πολικό υλικό, όπως και στην περίπτωση του PVC. Παρατηρήθηκε επίσης ότι ο αριθμός των

προσκολλημένων βακτηρίων ακόμα και 58 ημέρες μετά την τροποποίηση, αν και αυξημένος σε σχέση με την πρώτη ημέρα της τροποποίησης, ήταν σημαντικά μικρότερος σε σχέση με το μη τροποποιημένο PET.

Όπως και στη προηγούμενη μελέτη, έτσι και σε αυτή οι αλλαγές που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της τροποποίησης του PET σε εκκενώσεις He/O₂ αλλά και του χρόνου γήρανσης και σχετίζονται με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας των υλικών πρέπει να είναι οι σημαντικές παράμετροι που επηρέασαν τη βακτηριακή προσκόλληση και συσσωμάτωση.

Από μελέτη της συσχέτισης του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με την ολική επιφανειακή ενέργεια (γ_S^{d-p} , γ_S^{LW-AB}) των υλικών, την πολική (γ_S^p , γ_S^{AB}) και μη (γ_S^d , γ_S^{LW}) συνιστώσα της, όπως αυτές υπολογίστηκαν με βάση τις δύο προσεγγίσεις τις θερμοδυναμικής θεωρίας (Dispersion-Polar, Lifshitz-van der Waals/Acid-Base), προέκυψε ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση των γ_S^{d-p} και γ_S^p , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του γ_S^d . Επιπρόσθετα, προέκυψε ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση του γ_S^{AB} , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή των γ_S^{LW-AB} και γ_S^{LW} . Προέκυψε επίσης ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με την αύξηση του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα του υλικού (γ_S^-), ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με την μεταβολή του ηλεκτρονιο-δεκτικού χαρακτήρα (γ_S^+), ο οποίος άλλωστε δεν μεταβλήθηκε σημαντικά.

Από τη μελέτη με XPS παρατηρήθηκε ότι η μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται με την αύξηση πολικών ομάδων και συγκεκριμένα με την αύξηση των ομάδων C=O και C-O στην επιφάνεια του υλικού. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η βακτηριακή προσκόλληση σχετίζεται σημαντικά και αρνητικά με τα ΔG_{adh}^{d-p} , ΔG_{d0}^{LW-AB} , ΔG_{d0}^p και ΔG_{d0}^{AB} , ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με τα ΔG_{d0}^d , ΔG_{d0}^{LW} . Επομένως η θερμοδυναμική θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, δηλαδή η αυθόρμητη προσκόλληση συνοδεύεται από μείωση στην ελεύθερη ενέργεια του συστήματος, όπως προβλέπεται από το δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής. Σε μια προσπάθεια σύγκρισης των δύο προσεγγίσεων «Dispersion-

Polar» και «Lifshitz van der Waals-Acid Base», φαίνεται η πρώτη να εξηγεί καλύτερα την προκύπτουσα βακτηριακή προσκόλληση.

Το φαινόμενο της συσσωμάτωσης που παρατηρήθηκε στο PET διερευνήθηκε με χρήση μικροσκοπίου συνεστιακής σάρωσης αφού προηγουμένως τα προσκολλημένα βακτήρια είχαν σημανθεί με τη χρωστική Syto 9 (πράσινο χρώμα στις εικόνες), η οποία διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και βάφει τα νουκλεϊνικά οξέα ζώντων και νεκρών βακτηρίων και με μια λεκτίνη (Wheat Germ Agglutinin), σεσημασμένη με φθοριόχρωμα (κόκκινο χρώμα στις εικόνες), η οποία δεσμεύεται ειδικά στη N-ακέτυλο γλυκοζαμίνη που αποτελεί κύριο συστατικό του πολυσακχαρίτη που τα βακτήρια παράγουν προκειμένου να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους (Polysaccharide Intercellular Adhesin: PIA). Από τις εικόνες που λήφθηκαν παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια που ήταν προσκολλημένα στο μη τροποποιημένο PET είχαν παράγει πολύ μεγαλύτερη ποσότητα PIA, σε σχέση με αυτά που είχαν προσκολληθεί στο τροποποιημένο με He/O₂ PET μία μέρα μετά την τροποποίηση αλλά και στο γηρανσμένο κατά 58 ημέρες τροποποιημένο με He PET. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το γηρανσμένο υλικό προήγαγε την παραγωγή PIA στα προσκολλημένα βακτήρια περισσότερο σε σχέση με το μη γηρανσμένο.

Επομένως το φαινόμενο της συσσωμάτωσης θεωρήθηκε συνδυασμός φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικού και πιθανότατα αλλαγή του φαινοτύπου του βακτηρίου προκειμένου να προσαρμοσθεί στις συνθήκες του περιβάλλοντός του. Στη βιβλιογραφία, το φαινόμενο της συσσωμάτωσης σε μη πολικά υλικά έχει παρατηρηθεί από τους Kodjikian et al., 2003.

Όταν ο ρυθμός διάτμησης ήταν 200 s⁻¹ οι παραπάνω συντελεστές συσχέτισης μειώθηκαν, υποδηλώνοντας ότι ο ρυθμός διάτμησης είναι ένας επίσης παράγοντας που επηρεάζει σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση. Επομένως σε μεγαλύτερους ρυθμούς διάτμησης, μεταβολές στην επιφανειακή ενέργεια των υλικών δεν επηρεάζουν τόσο σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση, όπως προβλέπει η θερμοδυναμική θεωρία. Τα αποτελέσματα αυτά ήταν σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Wang et al., 1995.

Στην περίπτωση των πολυμερών υλικών, η χημική τροποποίηση της επιφάνειας οδήγησε, ειδικά στην περίπτωση του PVC που είχε μεγάλη τραχύτητα, σε ετερογενή επιφάνεια και ακόμη μεγαλύτερη τραχύτητα. Ακόμα και στην περίπτωση του PET, που είχε μικρή επιφανειακή τραχύτητα, η τροποποίηση του σε εκκενώσεις

He/O₂ προκάλεσε σε κάποιες περιπτώσεις αύξηση της τραχύτητας, ενώ από μελέτη με XPS προέκυψε η πολυπλοκότητα της χημικής σύστασης της επιφάνειας του υλικού, καθώς περιέχει βενζοϊκούς δακτυλίους, ομάδες κετόνης ή αλδεΐδης, καρβοξυλίου και υδροξυλίου.

Για τους λόγους αυτούς *αποφασίστηκε η παρασκευή και χρήση υποστρωμάτων γυαλιού και επιφανειακά τροποποιημένου γυαλιού με αυτό-οργανούμενα μονοστρωματικά συστήματα (Self-Assembled Monolayers: SAMs) με τελικές ομάδες αμίνης (NH₂) και μεθυλίου (CH₃), προκειμένου να διερευνηθεί πιο συστηματικά η σχετική συνεισφορά της χημικής σύστασης της επιφάνειας και του διαλύματος, αλλά και του ρυθμού διάτμησης στην προσκόλληση.*

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν την βακτηριακή προσκόλληση για διαλύματα ιοντικής ισχύος 0.01 και 0.1 M, ενώ στις προηγούμενες μελέτες η προσκόλληση έλαβε χώρα σε διάλυμα ιοντικής ισχύος 2 M.

Για μικρό ρυθμό διάτμησης (50 s⁻¹), από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι και τα δύο στελέχη εμφάνισαν τη μεγαλύτερη προσκόλληση στο υπόστρωμα με τις μέθυλο-ομάδες, ακολούθησε το υπόστρωμα των άμινο-ομάδων, ενώ η μικρότερη προσκόλληση, και για τα δύο στελέχη, εμφανίστηκε στο γυαλί.

Από τη σύγκριση των δύο στελεχών προέκυψε ότι το slime-αρνητικό εμφάνισε μεγαλύτερη προσκολλητική ικανότητα σε σχέση με το slime-θετικό. Με δεδομένο ότι τα δύο στελέχη δεν είχαν σημαντικά διαφορετικά δυναμικά ζ, η διαφορά στην προσκόλληση αποδόθηκε στο ότι το slime-θετικό είχε έντονα πολικό χαρακτήρα, ενώ το slime-αρνητικό εμφάνισε μη πολικό χαρακτήρα.

Συγκρίνοντας τους αριθμούς των προσκολλημένων βακτηρίων για τις δύο ιοντικές ισχείς παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της ιοντικής ισχύος αύξησε σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων, και για τα δύο στελέχη, και ότι η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε στον αριθμό των βακτηρίων που προσκολλήθηκαν στο γυαλί. Αυτό αποδόθηκε στο ότι τόσο το γυαλί όσο και τα βακτηριακά στελέχη είχαν μεγάλο δυναμικό ζ. Επομένως, η αύξηση της ιοντικής ισχύος, που είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού ζ τόσο των υποστρωμάτων όσο και των βακτηρίων, μείωσε τις ηλεκτροστατικές απώσεις μεταξύ βακτηρίων και υλικών, και άρα επέτρεψε την προσκόλληση.

Συγκρίνοντας τους αριθμούς των προσκολλημένων βακτηρίων για τα τρία υλικά, προέκυψε ότι η μεγαλύτερη προσκόλληση, και για τα δύο στελέχη εμφανίστηκε στις μέθυλο-ομάδες, δηλαδή στο λιγότερο πολικό υλικό, με τη

μικρότερη επιφανειακή ενέργεια. Δηλαδή, η αύξηση της βακτηριακής προσκόλλησης σχετίζεται σημαντικά με τη μείωση της επιφανειακής ενέργειας (γ_S^{LW-AB}), του πολικού χαρακτήρα (γ_S^{AB}) και του ηλεκτρονιο-δοτικού χαρακτήρα (γ_S^-) των υλικών, ενώ δεν σχετίζεται σημαντικά με τον μη πολικό χαρακτήρα (γ_S^{LW}) και τον ηλεκτρονιο-δεκτικό χαρακτήρα (γ_S^+).

Από τη συσχέτιση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με το ΔG_{d0}^{LW-AB} , για τα δύο βακτηριακά στελέχη και τις δύο ιοντικές ισχύς εδείχθει ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων συσχετίζεται καλύτερα με το ΔG_{d0}^{LW-AB} για τη μεγαλύτερη ιοντική ισχύ. Αυτό σημαίνει ότι ***η θερμοδυναμική θεωρία εξηγεί καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα για μεγάλης ιοντικής ισχύος διαλύματα, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι εξασθενημένες εξαιτίας του νέφους των ιόντων του διαλύματος γύρω από τα βακτήρια και στην επιφάνεια του υλικού.*** Σε διαλύματα μικρής ιοντικής ισχύος οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι σημαντικές και μειώνουν την προβλεψιμότητα της θερμοδυναμικής καθώς δεν τις λαμβάνει υπόψη.

Από τη συσχέτιση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με την ενέργεια προσκόλλησης όπως αυτή υπολογίζεται από την θεωρία DLVO, U_{BLS}^{DLVO} (J), για το slime-θετικό στέλεχος και τις δύο ιοντικές ισχύεις προέκυψε ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων συσχετίζεται καλύτερα με το U_{BLS}^{DLVO} για τη μικρότερη ιοντική ισχύ. Αυτό σημαίνει ότι ***η θεωρία DLVO εξηγεί καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα για μικρής ιοντικής ισχύος διαλύματα, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι σημαντικές για την προσκόλληση των βακτηρίων στην επιφάνεια του υλικού.*** Σε μεγάλης ιοντικής ισχύος διαλύματα, όταν δηλαδή οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι εξασθενημένες εξαιτίας του νέφους των ιόντων του διαλύματος γύρω από τα βακτήρια και στην επιφάνεια του υλικού, οι δυνάμεις διασποράς αλλά και οι αλληλεπιδράσεις οξέος-βάσεως φαίνεται να εξηγούν καλύτερα τα αποτελέσματα.

Από τη συσχέτιση του αριθμού των προσκολλημένων βακτηρίων με την ενέργεια προσκόλλησης, όπως αυτή υπολογίζεται από την εκτεταμένη DLVO θεωρία U_{BLS}^{XDLVO} (J), για το slime-θετικό στέλεχος και τις δύο ιοντικές ισχύς προέκυψε ότι ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων στα τρία υλικά συσχετίζεται αρκετά καλά

και για τις δύο ιοντικές ισχύς. Αυτό σημαίνει ότι *η θεωρία της εκτεταμένης DLVO εξηγεί καλύτερα τα πειραματικά αποτελέσματα, και άρα την επίδραση της χημικής σύστασης τόσο της επιφάνειας όσο και του διαλύματος, σε σχέση με τη θερμοδυναμική αλλά και την θεωρία DLVO και αυτό γιατί είναι ουσιαστικά ένας συνδυασμός των δύο αυτών, και λαμβάνει υπόψη τις ηλεκτροστατικές, τις Lifshitz-van der Waals (LW) και τις οξέος-βάσεως (Acid-Base: AB) αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών.*

Για ρυθμό διάτμησης 2000 s^{-1} και μεν μειώθηκε σημαντικά ο αριθμός των προσκολλημένων βακτηρίων σε όλα τα υποστρώματα, η μεγαλύτερη όμως μείωση παρατηρήθηκε, όχι μόνο στο γυαλί, όπως ήταν αναμενόμενο από τη DLVO και την εκτεταμένη DLVO θεωρία, εξαιτίας των ηλεκτροστατικών απώσεων, αλλά και στις μέθυλο-ομάδες, παρότι οι θεωρίες είχαν προβλέψει μείωση της ενέργειας του συστήματος κατά την προσκόλληση και άρα ισχυρές δυνάμεις αλληλεπίδρασης.

Παρατηρήθηκε λοιπόν ότι ακόμα και όταν η οπισθέλκουσα, λόγω ροής, ήταν $2.5 \times 10^{-11} \text{ N}$, τα βακτήρια στην περίπτωση των αμινο-ομάδων κατάφεραν σε μεγάλο βαθμό να προσκολληθούν εξαιτίας κάποιων άλλων αλληλεπιδράσεων, που δεν περιγράφονται ούτε από την εκτεταμένη DLVO θεωρία, και που σύμφωνα με τη θεωρία του Dickinson, 1997, οφείλονται στους μακρομοριακούς δεσμούς που το βακτήριο είναι σε θέση να συνάψει. *Με δεδομένο ότι οι αμινο-ομάδες είναι ενεργές, σε αντίθεση με τις μέθυλο-ομάδες, αποδείχθηκε με αυτό τον τρόπο ότι συνάπτουν μακρομοριακούς δεσμούς με τα βακτήρια και για το λόγο αυτό παρατηρήθηκε η απόκλιση στην προσκόλληση των βακτηρίων μεταξύ CH_3 και NH_2 , από την εκτεταμένη DLVO θεωρία, για μεγάλες τιμές οπισθέλκουσας.*

Επομένως ο συνδιασμός εκτεταμένης DLVO θεωρίας και η δυνατότητα ή μη των βακτηρίων να σχηματίζουν μακρομοριακούς δεσμούς με την επιφάνεια φαίνεται να μπορεί να εξηγήσει την προσκόλληση τόσο σε μικρές όσο και σε μεγαλύτερες τιμές οπισθέλκουσας. Παρότι οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις της εκτεταμένης DLVO δεν εξηγούν από μόνες τους τα αποτελέσματα, είναι εκείνες που καθορίζουν το εάν ένα βακτήριο θα βρεθεί αρκετά κοντά στην επιφάνεια του υλικού ώστε να συνάψει μακρομοριακούς δεσμούς. Έτσι, παρότι και στην περίπτωση του γυαλιού θα μπορούσαν τα βακτήρια να συνάψουν μακρομοριακούς δεσμούς ή δεσμούς υδρογόνου, οι ισχυρές ηλεκτροστατικές απώσεις τα απέτρεψαν από κάτι τέτοιο.

Στη βιβλιογραφία και άλλοι έχουν παρατηρήσει αποκλίσεις από τη θερμοδυναμική και τις άλλες θεωρίες. Συγκεκριμένα οι Ong et al., 1999, χρησιμοποιώντας τροποποιημένες ακίδες AFM με βακτήρια, παρατήρησαν ότι αν και η θεωρία DLVO συμφωνεί με τα πειραματικά αποτελέσματα για μεγάλες αποστάσεις βακτηρίων-υλικών και για ένα συγκεκριμένο βακτηριακό στέλεχος, δεν συμφωνεί με τα πειραματικά αποτελέσματα για ένα άλλο στέλεχος και για μικρές αποστάσεις βακτηρίων-υλικών. Τα αποτελέσματά τους ήταν ποιοτικά συμβατά με την θεωρία της εκτεταμένης DLVO όταν συμπεριλήφθηκαν οι στερητικές αλληλεπιδράσεις. Επιπλέον, οι Sharp και Dickinson 2005, χρησιμοποιώντας οπτικές λαβίδες (optical tweezers) για να μετρήσουν άμεσα τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός βακτηρίου και μιας επίπεδης επιφάνειας, παρατήρησαν ότι η θεωρία DLVO περιγράφει ακριβώς τις αλληλεπιδράσεις βακτηρίου-επιφάνειας όταν η ιοντική ισχύς του διαλύματος ήταν χαμηλή όμως δεν περιγράφει το μήκος αποσύνθεσης των αλληλεπιδράσεων στις μέτριες και υψηλές συγκεντρώσεις ηλεκτρολυτών. Πρότειναν ότι η μακρομοριακή σύνδεση μπορεί να είναι αρμόδια για αυτές τις αποκλίσεις. Ομοίως, οι Boonaert et al., 2001 παρατήρησαν διαφορές στην προσκόλληση βακτηρίων μεταξύ γυαλιού και πολυστυρενίου και απέδωσαν τις παρατηρηθείσες διαφορές στη δημιουργία μακρομοριακών δεσμών.

Οι Abu Lail και Camesano 2006, παρατήρησαν ότι όταν χρησιμοποιήθηκε η κλασική θεωρία DLVO για να εξηγήσει τις δυνάμεις αλληλεπίδρασης μεταξύ *e.coli* και νιτριδίου του πυριτίου, το ποσό των ηλεκτροστατικών και van der Waals δυνάμεων υπερεκτιμήθηκε, ενώ οι δυνάμεις που μετρήθηκαν ήταν συγκρίσιμες με τις δυνάμεις που υπολογίστηκαν από τη θεωρία DLVO, εφ' όσον χρησιμοποιήθηκε το πρότυπο van der Waal για «τραχιές» σφαιρικές επιφάνειες. Επομένως, ένα γενικό πρότυπο που θα περιγράφει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των τραχιών μορίων και των τραχιών επιφανειών θα μπορούσε σημαντικά να αυξήσει την ακρίβεια και την αξιοπιστία των ήδη υπάρχοντων προτύπων (DLVO, εκτεταμένη DLVO) θεωριών.

Όσον αφορά τις συνθήκες ροής, ο ρυθμός διάτμησης και οι σχετικές υδροδυναμικές δυνάμεις επηρεάζουν σημαντικά τον αριθμό των προσκολλημένων βακτηρίων όπως παρατηρήθηκε από τους Isberg και Barnes 2002, Duddridge et al., 1982, Dickinson και Cooper, 1995, καθώς επίσης και τη δομή και τη σύσταση του biofilm (Stoodley et al., 1999; Klapper et al., 2002). Γενικά θεωρείται ότι υψηλότεροι ρυθμοί διάτμησης οδηγούν σε μεγαλύτερες δυνάμεις αποκόλλησης που οδηγούν στη μείωση του αριθμού συνημμένων βακτηριδίων.

Οι Bayoudh et al., 2005 παρατήρησαν ότι η δύναμη προσκόλλησης των βακτηρίων ήταν σε συμφωνία με τους υπολογισμούς της ελεύθερης ενέργειας της προσκόλλησης, αντίθετα δηλαδή από τα όσα εμείς παρατηρήσαμε.

Οι Finlay et al., 2002, σε συμφωνία με τα αποτελέσματά μας, παρατήρησαν ότι αν και ο μεγαλύτερος αριθμός ζωοσπορίων enteromorpha προσκολλήθηκε στη λιγότερο πολική επιφάνεια SAMs, σε συμφωνία με τη θερμοδυναμική θεωρία, σε μεγάλες διατμητικές τάσεις (56 Pa) αποκολλήθηκαν ευκολότερα από τα λιγότερο πολικά SAMs απ'ό, τι από τα πίο πολικά, ενώ σε ενδιάμεσες διατμητικές τάσεις (1.9 Pa και 9.2 Pa) αποκολλήθηκαν ευκολότερα από τα πιο πολικά.

Επιπλέον, οι Gomez-Suarez et al., 2001, περνώντας μια φυσαλίδα αέρα πάνω από προσκολλημένα βακτήρια προκειμένου να προκαλέσουν αποκόλληση από το υπόστρωμα, παρατήρησαν ότι η αποκόλληση ήταν η μεγαλύτερη κατά το πέρασμα της φυσαλίδας σε μικρή ταχύτητα ενώ δεν είχε σημασία η πολικότητα του υποστρώματος. Κατά το πέρασμα της φυσαλίδας με μεγάλη ταχύτητα τα βακτήρια αποκολλήθηκαν ευκολότερα από το υδρόφιλο γυαλί απ'ό, τι από το υδρόφοβο.

Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων ica απέδειξαν ότι τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν την έκφραση των γονιδίων τους προκειμένου να ανταποκριθούν και να προσαρμοστούν στις συνθήκες του περιβάλλοντος τους, φυσικοχημικές και μηχανικές.

Παράρτημα 1

Ροή

1.1. Η Έννοια του Ρευστού

Σε αυτό το παράρτημα θα δοθούν κάποια γενικά στοιχεία γύρω από την ροή των ρευστών. Αυτό, σε συνδυασμό με κάποιους ορισμούς θα βοηθήσει στο να γίνει αντιληπτό στον αναγνώστη το αντικείμενο της ροής ρευστών χωρίς να υπεισεέλθουμε σε λεπτομέρειες.

Η Μηχανική των Ρευστών, που ονομάζεται και Δυναμική των Ρευστών, έχει ως αντικείμενο την διατύπωση των νόμων της κινηματικής και της δυναμικής των ρευστών, δηλαδή των υγρών, των αερίων και των πολυφασικών ρευστών όπως ο ατμός. Ο κλάδος αυτός των θετικών επιστημών ασχολείται με την συμπεριφορά των ρευστών όταν αυτά βρίσκονται σε στάση και σε κίνηση και έχει εκτεταμένο θεωρητικό και πειραματικό ενδιαφέρον. Γι' αυτό η συμβολή του στην εξέλιξη της μαθηματικής επιστήμης και των άλλων συγγενών θεωρητικών κλάδων είναι εξαιρετικά σημαντική με ιδιαίτερες εφαρμογές στη μεταφορά μάζας και θερμότητας.

Αρχικά, είναι λογικό να δοθεί ο ορισμός του ρευστού. **Ρευστό** είναι μια ουσία που υφίσταται συνεχή παραμόρφωση υπό την επιρροή μιας διατμητικής τάσεως (Παγιατάκης, 1996; Παπαϊωάννου 1993), οσοδήποτε μικρή και αν είναι η τάση αυτή. Επομένως, τα ρευστά περιλαμβάνουν τις υγρές και τις αέριες φάσεις των φυσικών καταστάσεων. Επιπλέον, όταν ένα ρευστό βρίσκεται σε κατάσταση ισορροπίας δεν ασκείται πάνω σε αυτό καμία διατμητική τάση. Άρα, στα ηρεμούντα ρευστά ασκούνται μόνο κάθετες τάσεις. Ο διαχωρισμός μεταξύ της ρευστής και της στερεής κατάστασης της ύλης είναι καθαρός εάν κάποιος συγκρίνει την συμπεριφορά ενός ρευστού και ενός στερεού. Ένα στερεό μπορεί να παραμορφώνεται κάτω από την επιρροή μιας διατμητικής τάσης αλλά αυτή η παραμόρφωση δεν είναι συνεχής σε αντίθεση με το ρευστό που υφίσταται διαρκή παραμόρφωση κάθε χρονική στιγμή.

Στο σχήμα 1.1. έχουμε την τομή ενός στερεού κύβου ακμής h πριν και μετά τη δράση εξωτερικής εφαπτομενικής δύναμης F_x . Προφανώς, με την εφαρμογή της δύναμης ο κύβος υφίσταται εφαπτομενική παραμόρφωση. Στην περίπτωση ιδεώδους ελαστικού στερεού, στερεού δηλαδή το οποίο επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση (α) μόλις παύσει να ασκείται η δύναμη F_x , η εφαπτομενική τάση τ_{yx} , με άλλα λόγια η εσωτερική δύναμη την οποία δέχεται κάθε μόριο του στερεού από τα υπερκείμενά του εξαιτίας της δύναμης F_x , είναι

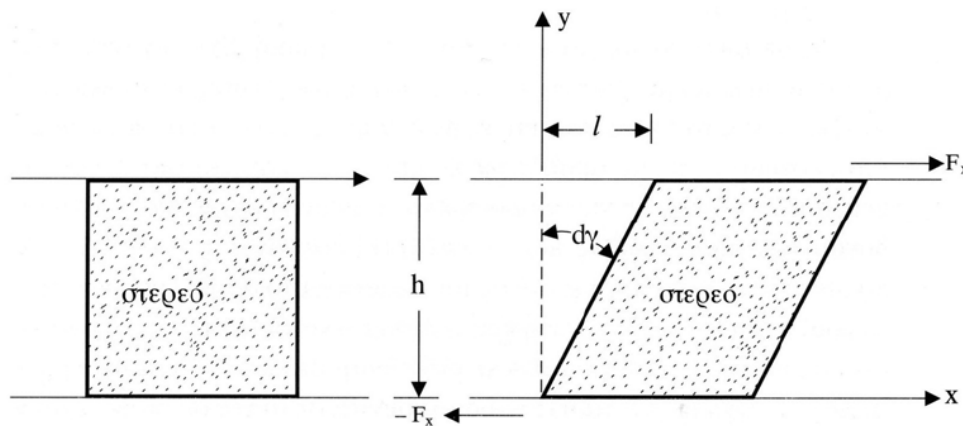
$$\tau_{yx} \propto \frac{1}{h} = \varepsilon \phi d\gamma \approx d\gamma$$

ή

$$\tau_{yx} = E \phi d\gamma \quad (\text{Νόμος το Hook}) \quad (1.1)$$

όπου $d\gamma$ είναι η μικρή γωνιακή παραμόρφωση και E η εφαπτομενική σταθερά ελαστικότητας.

Αντίθετα με τα στερεά, τα ρευστά όταν δέχονται την επίδραση εφαπτομενικής τάσης οποιουδήποτε μεγέθους, υφίστανται συνεχή παραμόρφωση.



Σχήμα 1.1: Συμπεριφοράς ιδεώδους ελαστικού στερεού σε κυβική μορφή, ακμής h , πριν (α) και μετά (β) τη δράση εξωτερικής εφαπτομενικής δύναμης F_x .

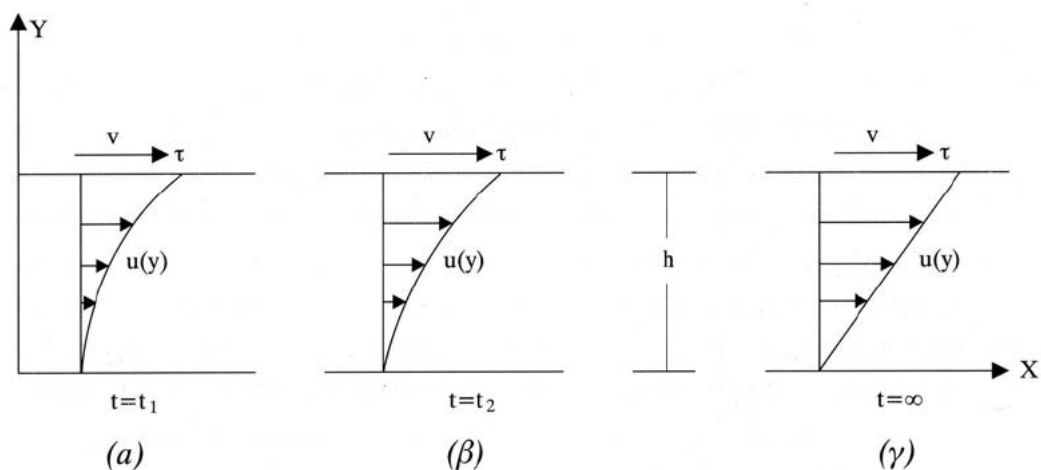
Στο σχήμα 1.2. θεωρούμε ένα ρευστό σε ηρεμία ανάμεσα σε δύο παράλληλες πλάκες. Σε χρόνο $t = 0$ η επάνω πλάκα τίθεται σε κίνηση με ταχύτητα v . Για να κινηθεί η πλάκα απαιτείται εφαπτομενική δύναμη F_x . Μόλις αυτή αρχίσει να κινείται, τίθενται σταδιακά σε κίνηση και τα γειτονικά στρώματα του υγρού, έως ότου η κατανομή της ταχύτητας του υγρού $u(y)$, αφού διέλθει διαδοχικά από τα στάδια (α) και (β), λάβει τη μορφή (γ). Στο στάδιο αυτό η εφαπτομενική τάση την οποία ασκεί το υγρό στην πλάκα δίδεται από τη σχέση:

$$\tau_{yx} = -\mu \frac{du}{dy} \quad (1.2)$$

όπου μ είναι ο συντελεστής ιξώδους του ρευστού και du/dy ο δείκτης γωνιακής παραμόρφωσης του (ανάλογο προς το $d\gamma$ των στερεών).

Το μείον στο δεξιό σκέλος της εξίσωσης υποδηλώνει ότι η φορά της τάσης τ_{yx} είναι αντίθετη προς την φορά της ταχύτητας u . Στο σχήμα 1.2. φαίνεται ότι η

μεταβολή της ταχύτητας u κατά τη διάσταση y , δηλαδή η παράγωγος du/dy , είναι μεγαλύτερη στα αρχικά στάδια και συνεπώς η εφαπτομενική τάση τ_{yx} ελαττώνεται από το (α) στο (γ) στάδιο.



Σχημα 1.2 Συμπεριφορά ρευστού, το οποίο περιορίζεται ανάμεσα σε δύο παράλληλες πλάκες και τίθεται σε κίνηση με τη μετατόπιση της υπερκείμενης. Μόλις η επάνω πλάκα αρχίσει να κινείται με την εφαρμογή της εφαπτομενικής δύναμης “F”, τίθονται σταδιακά σε κίνηση και τα γειτονικά στρώματα του υγρού, έως ότου η κατανομή της ταχύτητας του υγρού $u(y)$, αφού διέλθει διαδοχικά από τα στάδια (α) και (β), λάβει τη μορφή (γ). Τα γειτονικά προς την πλάκα μόρια του υγρού κινούνται με ταχύτητα ίση προς την ταχύτητα μετατόπισης της πλάκας

Το αξιοσημείωτο εδώ είναι ότι μόλις παύσει η εφαρμογή της δύναμης, το ρευστό δεν επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση, αλλά απλώς παύει να παραμορφώνεται. Τέλος, στις περιπτώσεις όπου το ρευστό είναι στατικό και συνεπώς η παραμόρφωσή του μηδενική, δεν υπάρχουν εφαπτομενικές τάσεις επί αυτού, απλά ασκούνται μόνο πιέσεις και δυνάμεις όγκου, οι οποίες βρίσκονται σε ισορροπία.

Για ροή εντός κυλινδρικού αγωγού η σχέση (1.2) παίρνει τη μορφή

$$\tau_{yx} = -\mu \frac{dv}{dr} \quad (1.3)$$

όπου r είναι η απόσταση από τον άξονα του αγωγού και v η ταχύτητα της ροής.

Από τη σχέση (1.3) προκύπτει ότι για παραβολική κατανομή ταχύτητας $v(r)$, η διατμητική τάση τ_{yx} λαμβάνει μέγιστη τιμή στα τοιχώματα του αγωγού και ελάχιστη στον άξονα.

1.2. Ιδιότητες των Ρευστών – Υπόθεση του Συνεχούς Μέσου.

Στην μελέτη ασυμπίεστης ροής μιας φάσης (αργότερα θα γίνει κατανοητή η έννοια της ασυμπίεστότητας), εάν το ρευστό είναι Νευτώνειο χρειαζόμαστε μόνο δύο ιδιότητες (Παγιατάκης, 1996; Παπαϊωάννου 1993), την **ομοιόμορφη πυκνότητα** και το **δυναμικό ιξώδες**. Πολλά ρευστά είναι Νευτώνεια όπως όλα τα αέρια και πολλά υγρά, τα οποία αποτελούνται από ομοιόμορφα μόρια όπως για παράδειγμα το νερό, οι κοινοί υγροί υδρογονάνθρακες, γλυκόλη, αιθανόλη κτλ. Μη Νευτώνεια ρευστά χρειάζονται πρόσθετες παραμέτρους για να χαρακτηρισθούν επαρκώς.

Όπως είναι γνωστό, τα ρευστά αποτελούνται από μόρια τα οποία κινούνται συνεχώς σε ακανόνιστες τροχιές προς όλες τις διευθύνσεις. Λόγω της θερμικής αυτής κίνησης, οι θέσεις και οι αποστάσεις μεταξύ των μορίων μεταβάλλονται συνεχώς, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το πλήθος των μορίων που περιέχονται κάθε χρονική στιγμή σε έναν ορισμένο όγκο ρευστού. Το γεγονός αυτό καθιστά προβληματικό τον καθορισμό των ιδιοτήτων του ρευστού (πυκνότητα και ιξώδες) σε ένα σημείο του χώρου. Στην μακροσκοπική ανάλυση των προβλημάτων ροής, για να αποφύγουμε την απροσδιοριστία των ιδιοτήτων, υποθέτουμε ότι το ρευστό είναι ένα συνεχές μέσο. Η υπόθεση του συνεχούς μέσου οδηγεί στην παραδοχή ότι οι ιδιότητές του, σε μια δεδομένη χρονική στιγμή, μεταβάλλονται από σημείο σε σημείο κατά τρόπο συνεχή. Στην πράξη, η πυκνότητα και το ιξώδες αποτελούν συνεχείς συναρτήσεις, γεγονός που καθίσταται εφικτό κάτω από ειδικές συνθήκες.

Το μοντέλο του συνεχούς μέσου αποτελεί τη βάση της θεωρητικής διερεύνησης των προβλημάτων ροής ρευστών. Για να είναι η χρήση αυτού του μοντέλου επιτρεπτή θα πρέπει οι διαστάσεις του εξεταζόμενου συστήματος να είναι μεγαλύτερες, συγκρινόμενες με τη μέση ελεύθερη διαδρομή των μορίων του ρευστού. Επειδή σε συνήθεις συνθήκες το μέγεθος αυτό είναι πολύ μικρό, η ανωτέρω προϋπόθεση ικανοποιείται.

Παρόμοια είναι και η συμπεριφορά για το μοριακό ιξώδες. Το ιξώδες είναι η ιδιότητα εκείνη των ρευστών που τους δίνει την δυνατότητα να αντιστέκονται σε

κάθε προσπάθεια αλλαγής της μορφής τους. Η παραμόρφωση ή η διάτμηση των ρευστών προκαλείται από την επίδραση των διατμητικών τάσεων.

Το ιξώδες (μ) δεν εκφράζει την πυκνότητα, αλλά την παχύτητα ή πηκτότητα ενός ρευστού. Η μονάδα του ιξώδους είναι το $\text{gr.cm}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$. Ο συνδυασμός αυτός καλείται poise. Στην πράξη συνήθως χρησιμοποιούμε το centipoise (cp), το οποίο ισούται με 0,01 poise. Για να κατανοήσουμε ποσοτικά το μέτρο αυτό, ας δούμε μερικά παραδείγματα: στη θερμοκρασία των 20 °C, ο αέρας έχει ιξώδες 0,018 cp, ο φυσιολογικός ορός 1,016 cp, η αιθυλική αλκοόλη 1,190 cp, ο υδράργυρος 1,547 cp, ενώ η γλυκερόλη 1,609 cp. Στα αέρια το ιξώδες αυξάνει με τη θερμοκρασία, ενώ στα υγρά ελαττώνεται. Έτσι, ενώ το ιξώδες του νερού 20 °C είναι περίπου 0,01 poise (= 1 cp), στους 30 °C κατέρχεται στα 0,692 cp.

Στην περίπτωση κατά την οποία το ιξώδες ενός υγρού είναι ανεξάρτητο από το ρυθμό παραμόρφωσης, το υγρό καλείται Νευτόνιο.

1.3. Τύποι Ροής

Με τον όρο ροή εννοούμε την κίνηση ενός ρευστού μέσα σε μια ορισμένη περιοχή του χώρου η οποία ονομάζεται πεδίο ροής. Οι βασικοί τύποι ροής που προκύπτουν από συγκεκριμένα κριτήρια όπως τη γεωμετρία της ροής, τη φύση του ρευστού, την εξάρτηση της ταχύτητας από το χρόνο κ.α., συνοψίζονται παρακάτω.

1.3.1. Συμπιεστά και Ασυμπιεστά Ρευστά

Τα ρευστά χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: τα ασυμπιεστά και τα συμπιεστά. ***Ασυμπιεστά είναι εκείνα των οποίων μια σταθερή μάζα αναφοράς καταλαμβάνει πάντα τον ίδιο όγκο.*** Θα μπορούσαμε συνεπώς με ικανοποιητική ακρίβεια να ισχυριστούμε ότι ασυμπιεστά είναι τα ρευστά των οποίων η πυκνότητα θεωρείται σταθερή (υγρά), ενώ συμπιεστά είναι εκείνα των οποίων η πυκνότητα μεταβάλλεται (αέρια). Προφανώς, το αίμα θεωρείται ασυμπιεστο ρευστό, το οποίο έχει σταθερή πυκνότητα $\rho=1,05 \text{ gr / cm}^3$.

1.3.2. Γραμμική (στρωτή) και Τυρβώδης (στροβιλώδης) Ροή

Η ***γραμμική ροή*** (Παγιατάκης, 1996; Παπαϊωάννου 1993) ***χαρακτηρίζεται από την στρωτή, δηλ. την ομαλή και κατά στρώματα κίνηση κάθε στοιβάδας του ρευστού σε***

σχέση με τις γειτονικές στοιβάδες. Σε κάθε τέτοιο στρώμα, η κατανομή της ταχύτητας του ρευστού είναι ομοιόμορφη σε όλη την έκταση μιας εγκάρσιας, ως προς τη διεύθυνση της ροής, διατομής του στρώματος. Επομένως, κατά τη στρωτή ροή, η μόνη κίνηση που παρατηρείται είναι κατά τη διεύθυνση της ροής, αφού δεν υπάρχει συνιστώσα της ταχύτητας κατά την κάθετη προς αυτή διεύθυνση, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει μακροσκοπική ανάμιξη των γειτονικών στρωμάτων του ρευστού λόγω ανταλλαγής μάζας σε μορφή σωματιδίων. Η επικοινωνία των στρωμάτων αυτών γίνεται σε μοριακό επίπεδο, καταλήγοντας σε μοριακή ανάμιξη λόγω της θερμικής κίνησης των μορίων.

Η τυρβώδης ροή (Παγιατάκης, 1996; Παπαϊωάννου 1993) χαρακτηρίζεται από την τρισδιάστατη στοχαστική μεταβολή της ταχύτητας του ρευστού, όπου τα σωματίδια κινούνται σε ακανόνιστες τροχιές προς όλες τις διευθύνσεις κατά εντελώς τυχαίο τρόπο. Σε αυτή την περίπτωση εμφανίζονται φαινόμενα μακροσκοπικής ανάμιξης των στρωμάτων ρευστού με αποτέλεσμα τη δημιουργία μικρών βραχυβίων δινών, έντονου στροβιλισμού και ταχείας ανάμιξης.

Ο τύπος της ροής που παρεμβάλλεται μεταξύ της στρωτής και της τυρβώδους ροής ονομάζεται μεταβατική ροή (Παγιατάκης, 1996; Παπαϊωάννου 1993).

Ο Reynolds χρησιμοποιώντας σωλήνες διαφόρων διαμέτρων και νερό διαφόρων θερμοκρασιών, κατάφερε να πιστοποιήσει πλήρως τα δύο είδη ιξώδους ροής και να παρουσιάσει τη βασική παράμετρο, η οποία φέρει και το όνομά του (αριθμός του Reynolds), ως κριτήριο που χαρακτηρίζει το είδος της ροής. Ο αριθμός Reynolds είναι μια αδιάστατη ομάδα γεωμετρικών και φυσικών μεταβλητών η οποία παριστάνεται με το σύμβολο Re .

$$Re = \frac{F_{\text{αδράνειας}}}{F_{\text{ιξώδους}}} = \rho v d / \mu,$$

όπου ρ η πυκνότητα του ρευστού, v η χαρακτηριστική ταχύτητα ροής και μ ο συντελεστής ιξώδους.

Η κρίσιμη τιμή $Re=2100$, δηλαδή το άνω όριο τιμής του Re , για το οποίο διατηρείται η ροή στρωτή (laminar flow), αντιστοιχεί σε ροή εντός κυλινδρικών σωλήνων. Αντίστοιχα, όταν $2100 < Re < 4000$ έχουμε μεταβατική ροή και όταν $Re > 4000$ έχουμε τυρβώδη ροή (turbulent flow).

1.3.3. Ανιζώδης και Ιζώδης Ροή – Συνθήκη μη Ολίσθησης.

Ανιζώδης ή άτριβη ροή (Παγιατάκης, 1996; Παπαϊωάννου 1993) όπως ονομάζεται, είναι η ροή ενός ρευστού με μηδενικό ιζώδες. Τα ρευστά που έχουν αυτή την ιδιότητα ονομάζονται ιδανικά ρευστά. Επειδή στη φύση δεν υπάρχει κανένα ρευστό το οποίο να έχει ιζώδες μηδέν, η έννοια της ανιζώδους ροής είναι θεωρητική. Από την άλλη μεριά, ιζώδης ροή είναι η ροή ενός πραγματικού ρευστού. Τα πραγματικά ρευστά έχουν όλα ιζώδες, ανεξάρτητα αν αυτό είναι μικρό ή μεγάλο. Η θεώρηση του ιζώδους στην ανάλυση των προβλημάτων ροής αυξάνει σημαντικά τη δυσκολία διατύπωσης και επίλυσης των εξισώσεων που διέπουν τη ροή του ρευστού. Σε αντίθεση με την άτριβη ροή, η ιζώδης ροή επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία στερεών τοιχωμάτων, με αποτέλεσμα το ρευστό να μην ολισθαίνει πάνω στην στερεή επιφάνεια, αλλά να είναι στερεά “προσκολλημένο” πάνω σε αυτήν. Η παρατήρηση αυτή, η οποία είναι γενική, αποτελεί βασική οριακή συνθήκη για την ανάλυση προβλημάτων ιζώδους ροής πάνω και γύρω από στερεά σώματα, η οποία είναι γνωστή ως συνθήκη μη ολίσθησης. Η συνθήκη αυτή αναφέρει ότι η σχετική ταχύτητα των πραγματικών ρευστών ως προς το στερεό τοίχωμα είναι μηδέν. Η συνθήκη μη ολίσθησης ισχύει όταν ισχύει και η υπόθεση του συνεχούς μέσου. Αξίζει να αναφέρουμε το γεγονός ότι καθώς απομακρυνόμαστε από την επιφάνεια του στερεού σώματος, η ταχύτητα του ρευστού αυξάνει συνεχώς έως ότου αποκτήσει μια συγκεκριμένη οριακή τιμή, οπότε και παραμένει σταθερή. Η περιοχή του ρευστού στην οποία συμβαίνει η μεταβολή της ταχύτητας ονομάζεται οριακό στρώμα [84,100] και είναι έντονη σε μεγάλους αριθμούς Reynolds.

1.3.4. Μονοδιάστατη, Διδιάστατη και Τρισδιάστατη Ροή.

Ο αριθμός των διαστάσεων μιας ροής ισούται με τον ελάχιστο απαιτούμενο αριθμό χωρικών συντεταγμένων για την περιγραφή του πεδίου ταχύτητας.

Στη γενική περίπτωση, η ροή ενός ρευστού είναι τρισδιάστατη. Σε πολλές περιπτώσεις όμως, σημαντικές μεταβολές στις συνθήκες ροής συμβαίνουν στη μία ή στις δύο μόνο διαστάσεις. Σε αυτές τις περιπτώσεις, οι μεταβολές στις άλλες διαστάσεις μπορούν να θεωρηθούν αμελετέες και να αγνοηθούν, κάνοντας την ανάλυσή μας πιο εύκολη.

- **Μονοδιάστατη ροή:** Οι συνθήκες ροής (ταχύτητα, πίεση, κ.λπ.) μεταβάλλονται μόνο κατά τη μία διάσταση.

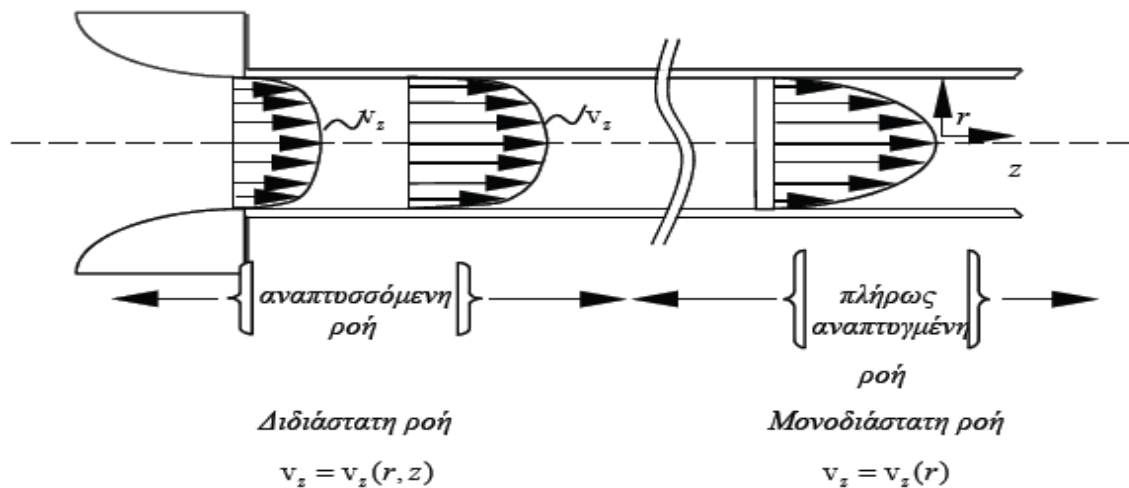
Παράδειγμα: Ροή νερού σε κανάλι.

- **Διδιάστατη ροή:** Οι συνθήκες ροής μεταβάλλονται κατά τη διεύθυνση της ροής και κατά μία διάσταση κάθετη σε αυτή.

Παράδειγμα: Ροή γύρω από κύλινδρο.

- **Τρισδιάστατη ροή:** Οι συνθήκες ροής μεταβάλλονται και στις τρεις διαστάσεις.

Παράδειγμα: Ροή σε αρτηρίες με διακλαδώσεις.



Σχήμα 1.3. Αναπτυσσόμενη και πλήρως ανεπτυγμένη ροή μέσα σε κυλινδρικό σωλήνα.

Μέσα σε έναν σωλήνα, για παράδειγμα, έχουμε διδιάστατη ροή στην αρχή που αργότερα, σε αρκετά μεγάλη απόσταση από τον σωλήνα, μετατρέπεται σε μονοδιάστατη όπως φαίνεται και στο σχήμα 1.3. Βέβαια, πάντα η μορφή της ροής καθορίζεται από τη γεωμετρία και τη φύση του προβλήματος ροής που επιλύεται, γεγονός που υποδεικνύει κάθε φορά τον αριθμό των διαστάσεων στον εκάστοτε τύπο ροής για τα πεδία. Έτσι, ανάλογα με τις χωρικές συντεταγμένες που επιλέγονται (πολικές, κυλινδρικές, σφαιρικές, σφαιροειδείς, ελλειψοειδείς) και ανάλογα με τον τύπο της ροής που επιβάλλεται, υπάρχουν μονοδιάστατες, διδιάστατες ή αξονοσυμμετρικές και τρισδιάστατες ροές, ενδεχόμενα χρονικά εξαρτώμενες.

1.3.5. Σταθερή και Μεταβατική Ροή.

Χαρακτηριστικό της σταθερής ροής είναι η μη ύπαρξη χρονικά μεταβαλλόμενων πεδίων και μεγεθών σε αντίθεση με την ασταθή ροή που τα πεδία ροής εξελίσσονται με το χρόνο. Παράδειγμα: Ροή αίματος σε μεγάλες αρτηρίες.

1.4. Θεμελιώδεις Νόμοι της Ρευστομηχανικής.

Η ανάπτυξη της Μηχανικής των ρευστών βασίζεται πάνω σε ορισμένες βασικές αρχές ή φυσικούς νόμους. Οι φυσικοί νόμοι έχουν διατυπωθεί σαν συμπέρασμα μακροχρόνιων παρατηρήσεων των φυσικών και χημικών φαινομένων στη φύση. Οι φυσικοί νόμοι έχουν αξιωματική διατύπωση, δηλαδή, αποτελούν αδιαμφισβήτητες αρχές οι οποίες προέρχονται από την ίδια τη φύση. Η επιβεβαίωση των αρχών αυτών γίνεται έμμεσα, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της μαθηματικής ανάλυσης με τα πειραματικά δεδομένα. Επισημαίνονται οι βασικοί φυσικοί νόμοι:

- i) Αρχή ή νόμος διατήρησης της μάζας,
- ii) Δεύτερος νόμος του Νεύτωνα,
- iii) Πρώτος και Δεύτερος νόμος της θερμοδυναμικής.

1.5. Ρυθμός Μεταβολής της Ροής

1.5.1. Ρυθμός μεταβολής της μάζας

Η μάζα του ρευστού που ρέει στη μονάδα του χρόνου υπολογίζεται ως εξής:

$$\dot{m} = \text{ρυθμός μεταβολής της μάζας} = \frac{\text{συνολική μάζα του ρευστού που ρέει}}{\text{χρόνος που χρειάζεται}}$$

1.5.2. Παροχή

Ο όγκος του ρευστού που ρέει στη μονάδα του χρόνου είναι συνηθέστερα γνωστός ως *παροχή*, και υπολογίζεται ως εξής:

$$Q = \text{παροχή} = \frac{\text{συνολικός όγκος του ρευστού που ρέει}}{\text{χρόνος που χρειάζεται}}$$

Η παροχή συνδέεται με το ρυθμό μεταβολής της μάζας με την ακόλουθη σχέση

$$\dot{m} = \rho Q,$$

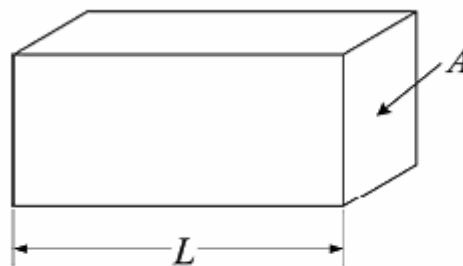
όπου ρ είναι η πυκνότητα του ρευστού.

Ως γνωστόν, οι μονάδες μέτρησης της παροχής Q στο σύστημα SI είναι m^3 / s . Όταν το αποτέλεσμα σε αυτές τις μονάδες είναι πολύ μικρό (ή πολύ μεγάλο), μπορούμε να

χρησιμοποιήσουμε υποπολλαπλάσια (ή πολλαπλάσια) αυτών. Μια πολύ χρήσιμη υποδιαίρεση είναι το λίτρο ανά δευτερόλεπτο, για το οποίο ισχύει: $l/s = 10^{-3} m^3 / s$.

1.5.3. Μέση Ταχύτητα

Ας υποθέσουμε ότι έχουμε ένα στοιχειώδες τμήμα ρευστού, μήκους L και διατομής εμβαδού A , όπως φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα



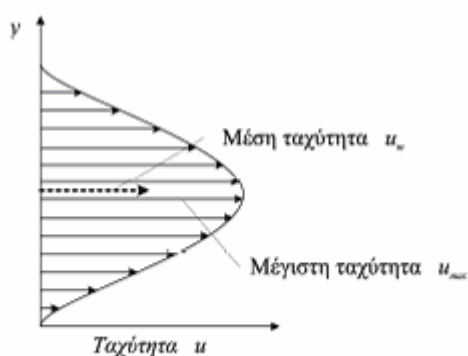
Στοιχειώδες τμήμα ρευστού

Τότε, η παροχή υπολογίζεται ως

$$Q = \frac{\text{όγκος}}{\text{χρόνος}} = \frac{A L}{t}$$

Εάν η μέση ταχύτητα είναι $u_m = L/t$, τότε η προηγούμενη σχέση γίνεται

$$Q = A u_m \Leftrightarrow u_m = \frac{Q}{A}$$



Μέση ταχύτητα ρευστού

Παράρτημα 2
Αντιδραστήρας Πλάσματος

2.1. Αντιδραστήρας Πλάσματος

Ο αντιδραστήρας πλάσματος που χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη βρίσκεται στο Εργαστήριο Πλάσματος του Τμήματος των Χημικών Μηχανικών του Πανεπιστημίου Πατρών. Η τροποποίηση των δειγμάτων έγινε από τον Αναπληρωτή Καθηγητή Κο Δ. Ματαρά και τον Επιστημονικό Συνεργάτη Διδάκτορα Κο Ε. Αμανατίδη.

Συνοπτικά, ο κύριος θάλαμος του αντιδραστήρα είναι κατασκευασμένος από ανοξείδωτο ατσάλι, κυλινδρικής συμμετρίας και διαμέτρου 160 mm. Στο εσωτερικό του θαλάμου βρίσκονται δύο παράλληλα ηλεκτρόδια, σε σχήμα δίσκων, μεταξύ των οποίων πραγματοποιείται η εκκένωση αίγλης ραδιοσυχνότητας (RF). Ως «πολωμένο» (RF) ηλεκτρόδιο χαρακτηρίζεται το ηλεκτρόδιο που τροφοδοτείται με dc τάση και ως «γειωμένο» (Ac ή Dc) το ηλεκτρόδιο στο οποίο στηρίζεται το πολυμερές (ο όρος γειωμένο ηλεκτρόδιο είναι σχετικός, καθώς σε πολλά πειράματα πολώνεται με dc ή ac τάση) (Papakonstantinou et al., 2003). Τα ηλεκτρόδια είναι ίδιων διαστάσεων. Η διάμετρος τους είναι 55 mm, είναι κατασκευασμένα από ανοξείδωτο ατσάλι και η μεταξύ τους απόσταση είναι 25 mm (Papakonstantinou et al., 2001).

Η εισαγωγή των αερίων στο θάλαμο του αντιδραστήρα πραγματοποιείται μέσω μιας οπής που βρίσκεται στη φλάντζα του πολωμένου ηλεκτροδίου. Το σύστημα παροχής των αερίων αποτελείται από δύο ανεξάρτητα ροόμετρα μάζας με ηλεκτρομαγνητικές βαλβίδες για τη ρύθμιση της ροής της εταιρείας MKS. Η έξοδος των αερίων και η άντληση του αντιδραστήρα πραγματοποιείται με τη βοήθεια δύο αντλιών.

Η ηλεκτρική τροφοδοσία παρέχεται από μια γεννήτρια εναλλασσόμενης τάσης, συχνότητας 13.56 MHz (Radiofrequency: RF), της εταιρείας ENI. Η μέτρηση της πίεσης γίνεται με έναν αισθητήρα (Spiliopoulos et al., 1996).

2.2. Ηλεκτρικές Μετρήσεις

Στο εργαστήριο Τεχνολογίας Πλάσματος είναι εφικτή η καταγραφή σε πραγματικό χρόνο των κυματομορφών τάσης και ρεύματος με απώτερο σκοπό τον υπολογισμό της καταναλισκόμενης ισχύος στην εκκένωση. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση δύο ακροδεκτών τάσης και ρεύματος τα χαρακτηριστικά των οποίων είναι τα ακόλουθα: ο ακροδέκτης τάσης της εταιρείας Hameg και ο ακροδέκτης ρεύματος της εταιρείας FCC. Οι κυματομορφές τάσης και ρεύματος καταγράφονται σε έναν

ψηφιακό παλμογράφο της εταιρείας LeCroy, με δυνατότητα καταγραφής σημάτων συχνότητας που στη συνέχεια μεταφέρονται μέσω μιας θύρας GPIB σε έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή (Parakonstantinou et al., 2003). Οι μετρήσεις τάσεως και ρεύματος δίνουν τη δυνατότητα να διατηρείται σταθερή η καταναλισκόμενη ισχύς στον αντιδραστήρα, και επομένως τα πειράματα να είναι επαναλήψιμα, ενώ μεταβάλλεται μόνο κάποια από τις άλλες παραμέτρους (σύσταση αέριου μίγματος, πίεση, δυναμικό).

2.3. Ανακλαστική Συμβολομετρία Laser

Εκτός από τις οπτικές μετρήσεις που διεξήχθησαν κατά τη διάρκεια της τροποποίησης των πολυμερών επιφανειών PET, μέσω Χωρικά Διακεκριμένης Φασματοσκοπίας εκπομπής, προκειμένου να καταγραφεί η παραγωγή ατόμων και μετασταθών τα οποία συμβάλλουν στην επιφανειακή τροποποίηση του PET (Amanatides και Mataras, 2005), μετρήθηκε και ο ρυθμός εγχάραξης ή εναπόθεσης του πολυμερούς.

Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η συμβολομετρία με ακτινοβολία laser (Laser Reflectance Interferometry, LRI) (Amanatides et al., 2000).

Η ανακλαστική συμβολομετρία με τη χρήση laser στηρίζεται στο φαινόμενο της συμβολής του φωτός που εμφανίζεται εξαιτίας της σκεδαζόμενης δέσμης laser πάνω σε φιλμ πολυμερούς. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το πάχος του εξεταζόμενου φιλμ δεν παραμένει σταθερό, παρατηρείται ενισχυτική συμβολή σε ορισμένα σημεία του και αποσβεστική σε άλλα. Τότε εμφανίζονται γραμμές με μέγιστα και ελάχιστα εντάσεως που ονομάζονται κροσσοί συμβολής. Οι κροσσοί αυτοί είναι σταθερού πάχους, αφού καθένας αντιστοιχεί σε τόπο σημείων για τα οποία το πάχος d του φιλμ είναι σταθερό. Γνωρίζοντας από πριν το πάχος του δείγματος που αντιστοιχεί ανάμεσα στην εμφάνιση δύο μεγίστων και διαιρώντας με τον αντίστοιχο χρόνο που απαιτείται για την εμφάνισή τους υπολογίζεται ο ρυθμός εγχάραξης.

Παράρτημα 3

Μικροσκόπια

3.1. Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (Scanning Electron Microscopy: S.E.M.)

Κατά την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης μια πολύ λεπτή εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας σαρώνει την υπό εξέταση επιφάνεια, παρέχοντας πληροφορίες για τη μορφολογία καθώς και τη σύσταση της επιφάνειας του αντικειμένου (όταν υπάρχει κατάλληλη διάταξη ανίχνευσης των εκπεμπόμενων ακτίνων-X).

Τα ηλεκτρόνια παράγονται με θερμιονική εκπομπή από θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου (W) και επιταχύνονται σε σωλήνα κενού (10^{-5} Torr) με δυναμικό επιτάχυνσης 10-40 kV, δημιουργώντας ρεύμα της τάξης 10^{-12} - 10^{-10} A, σε μια δέσμη διαμέτρου 20-30 Å. Η δέσμη των ηλεκτρονίων διαμορφώνεται με δύο μαγνητικούς συγκεντρωτικούς φακούς (magnetic condenser system) και στη συνέχεια με ένα μαγνητικό αντικειμενικό φακό (magnetic objective lens) προβάλλεται πάνω στο αντικείμενο. Το αντικείμενο τοποθετείται σε ένα “κεντραρισμένο” γωνιομετρικό υποδοχέα με δυνατότητα κίνησης x-y, περιστροφής και κλίσης.

Κατά την αλληλεπίδραση ηλεκτρονίων-αντικειμένου παράγονται: α) οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια (backscattered electrons) β) δευτερογενή ηλεκτρόνια (secondary electrons) γ) ηλεκτρόνια Auger (Auger electrons) και δ) ακτίνες-X (X-rays).

- Τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια, με ενέργεια περίπου όση και τα πρωτογενή, προέρχονται από την ελαστική ή σχεδόν ελαστική σκέδαση των ηλεκτρονίων της προσπίπτουσας δέσμης και είναι περισσότερα όσο μεγαλύτερος είναι ο ατομικός αριθμός των στοιχείων σύστασης του αντικειμένου. Η εικόνα που λαμβάνεται από τα οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια απεικονίζει τις περιοχές με διαφορετικό μέσο ατομικό αριθμό στοιχείων σύστασης.

- Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, με πολύ χαμηλή ενέργεια λόγω τυχαίων απωλειών πριν εξέλθουν από το αντικείμενο (μέγιστη ενέργεια 50 eV), προέρχονται συνήθως από την στοιβάδα K λόγω ιονισμού του αντικειμένου από τα ηλεκτρόνια της προσπίπτουσας δέσμης. Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια είναι πολύ περισσότερα από τα οπισθοσκεδαζόμενα και δίνουν την εικόνα της τοπογραφίας και της μορφολογίας της επιφάνειας.

- Τα ηλεκτρόνια Auger εκπέμπονται μετά τη δημιουργία των δευτερογενών ηλεκτρονίων, με σκοπό να διατηρήσουν μέσα στο άτομο το ενεργειακό ισοζύγιο, το οποίο διαταράσσεται από τις μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων των εξωτερικών

στιβάδων προς τις εσωτερικές. Τα ηλεκτρόνια Auger προέρχονται από την εξωτερική στιβάδα, έχουν χαρακτηριστική ενέργεια και ταυτοποιούν το στοιχείο προέλευσης τους.

- Οι ακτίνες- X , εκπέμπονται κατά τις μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στιβάδων προς τις εσωτερικές, με σκοπό να διατηρήσουν μέσα στο άτομο το ενεργειακό ισοζύγιο, το οποίο διαταράσσεται από τις μεταπτώσεις των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στιβάδων προς τις εσωτερικές. Έχουν χαρακτηριστική ενέργεια, ανάλογα τη μετάπτωση από την οποία προέρχονται και έτσι ταυτοποιούν το στοιχείο προέλευσης τους.

Το βάθος αλληλεπίδρασης ηλεκτρονίων-αντικειμένου ($<10 \mu\text{m}$) εξαρτάται από:

- τον ατομικό αριθμό του υλικού, (μεγαλύτερος ατομικός αριθμός συνεπάγεται μικρότερο βάθος αλληλεπίδρασης, λόγω της μεγαλύτερης απορρόφησης των ηλεκτρονίων από την επιφάνεια)
- το δυναμικό επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων
- τη γωνία πρόσπτωσης της δέσμης των ηλεκτρονίων (το βάθος διείσδυσης αυξάνει καθώς η διεύθυνση πρόσπτωσης πλησιάζει την κάθετη προς την επιφάνεια του δείγματος).

Τα τυπικά χαρακτηριστικά ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης είναι:

- διακριτική ικανότητα της τάξης 100 \AA
- δυνατότητα παρατήρησης δειγμάτων μεγάλου μεγέθους (έως μερικά cm), με μεγάλο βάθος πεδίου παρατήρησης, δημιουργώντας εικόνα τριδιάστατης (3D) απεικόνισης.

Η συσκευή SEM που διαθέτει το Πανεπιστήμιο Πατρών είναι τύπου JEOL-JSM 6300 της εταιρείας JEOL.

3.2. Μικροσκοπία Ατομικής Δύναμης (Atomic Force Microscopy: A.F.M.)

Η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM) είναι μια κατηγορία μικροσκοπίας ακίδας (S.P.M.: Scanning Probe Microscopy) κατά την οποία μια λεπτή ακίδα σαρώνει την υπό μελέτη επιφάνεια και καταγράφοντας τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ δείγματος και ακίδας μας δίνει πληροφορίες για τη μορφολογία του δείγματος σε κλίμακα νανομέτρου.

Συνεπώς δεν περιορίζεται από το μήκος κύματος του φωτός ή των ηλεκτρονίων και είναι σε θέση να αποκαλύψει την τοπογραφία μιας επιφάνειας με ατομική ανάλυση χωρίς ιδιαίτερη επεξεργασία του δείγματος.

Η συσκευή του AFM, που διαθέτει το εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής Τεχνολογίας του Πανεπιστημίου Πατρών, είναι τύπου Multimode, κατασκευασμένη από την Digital Instruments και αποτελείται από δύο μέρη: i) την κεφαλή και ii) τη βάση σάρωσης. Η κεφαλή είναι το ακίνητο τμήμα της διάταξης και φέρει την ακίδα σάρωσης, η οποία έχει ακτίνα καμπυλότητας στο άκρο της 10-40 nm και είναι ενσωματωμένη στο άκρο μια μικροσκοπικής προβόλου. Στην κεφαλή του AFM είναι επίσης, ενσωματωμένη μια πηγή δέσμης laser και μια φωτοδίοδος η οποία ανιχνεύει την ανακλώμενη από την πάνω πλευρά της προβόλου δέσμη. Η βάση σάρωσης (scanner) αποτελείται από συνδυασμό πιεζοκρυστάλλων, οι οποίοι με κατάλληλη ηλεκτρική διέγερση μετακινούν το δείγμα στις δύο διευθύνσεις του επιπέδου έτσι ώστε να είναι δυνατή η σάρωση της επιθυμητής επιφάνειας από την ακίδα. Στη διέγερση των ίδιων πιεζοκρυστάλλων οφείλεται και η κατακόρυφη μετακίνηση του δείγματος σε σχέση με την ακίδα, έτσι ώστε να ελέγχεται η μεταξύ τους απόσταση και να αποφεύγεται η πρόσκρουση της ακίδας στην επιφάνεια.

Η λειτουργία του AFM βασίζεται στον έλεγχο των δυνάμεων αλληλεπίδρασης της ακίδας με την επιφάνεια και διακρίνεται σε δύο μεθόδους, ανάλογα με το αν η ακίδα βρίσκεται σε επαφή με την επιφάνεια (contact mode) ή ταλαντώνεται σε μικρή απόσταση από αυτή (tapping mode). Στην πρώτη περίπτωση και ενώ το δείγμα σαρώνεται, η ακίδα κάμπτεται λόγω των υψομετρικών διαφορών στην τοπογραφία του δείγματος και η κάμψη αυτή καταγράφεται από το σύστημα ως μετατόπιση του σημείου πρόσπτωσης της ανακλώμενης δέσμης laser πάνω στη φωτοδίοδο. Ορίζοντας μία σταθερή τιμή για τη δύναμη που κάμπτει την ακίδα, δημιουργείται ουσιαστικά ένας βρόγχος ανάδρασης, που διατηρεί σταθερή την κάμψη της ακίδας και συνεπώς τη σχετική απόσταση ακίδας-επιφανείας, μετατοπίζοντας κατακόρυφα το δείγμα ανάλογα με το ανάγλυφο ακριβώς κάτω από την ακίδα. Η υψομετρική αυτή προσαρμογή καταγράφεται από το σύστημα και παρουσιάζεται σε μορφή δυσδιάστατης εικόνας τοπογραφίας. Οι ακίδες, που χρησιμοποιούνται με τη μέθοδο αυτή κατασκευάζονται από Si_3N_4 και έχουν σταθερά ελατηρίου $< 1 \text{ N/m}$.

Διατηρώντας σταθερή την απόκλιση του βραχίονα διατηρείται σταθερή και η δύναμη μεταξύ ακίδας και δείγματος. Αυτή η δύναμη υπολογίζεται από το νόμο του Hooke:

$$F = -kx$$

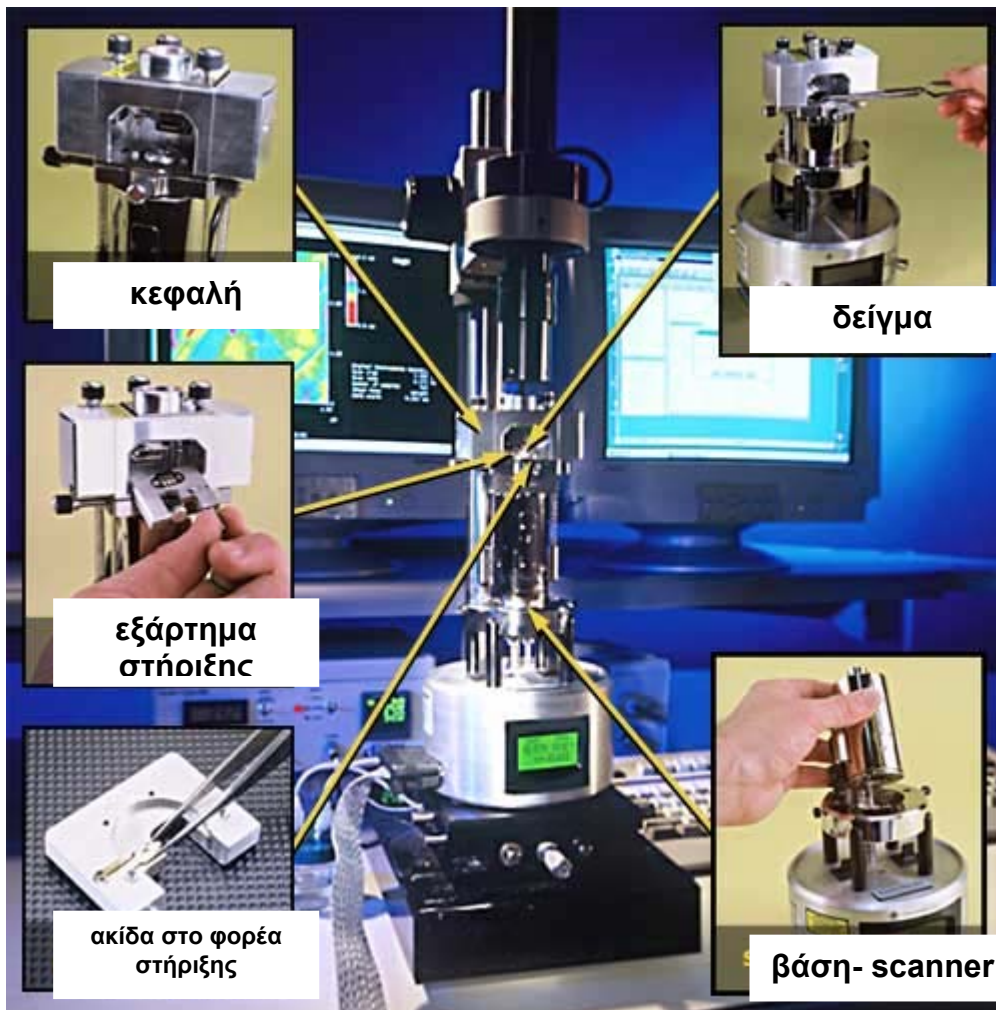
όπου F είναι δύναμη μεταξύ ακίδας και δείγματος, k είναι η σταθερά ελατηρίου και x είναι η απόκλιση βραχίονα-ελατηρίου. Η σταθερά k του ελατηρίου κυμαίνεται από

0.01 έως 1.0 N/m, καταγράφοντας έτσι δυνάμεις της τάξης nN έως μN σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Με τη μέθοδο της παλλόμενης ακίδας η επιφάνεια σαρώνεται με μια ακίδα προσαρμοσμένη στο άκρο ενός βραχίονα-ελατηρίου, ο οποίος ταλαντώνεται κοντά στη συχνότητα συντονισμού του με πλάτος ταλάντωσης, από 20 nm έως 100 nm. Κατά τη σάρωση η ακίδα “αγγίζει” την επιφάνεια του δείγματος στο κατώτερο σημείο της ταλάντωσης προκαλώντας έτσι αλλαγή στο πλάτος της. Ένα κύκλωμα ανάδρασης διατηρεί σταθερό το πλάτος της ταλάντωσης, διατηρώντας σταθερό το RMS του σήματος της ταλάντωσης το οποίο μεταφέρεται μέσω μιας ανακλώμενης δέσμης λέιζερ από κάθε σημείο (x,y) του δείγματος σε διδιάστατη συστοιχία φωτοδιόδων. Η κατακόρυφη κίνηση του δείγματος μέσω πιεζοηλεκτρικού κρυστάλλου (scanner) για τη διατήρηση του αρχικού πλάτους της ταλάντωσης για κάθε σημείο (x,y) του δείγματος αποθηκεύεται σε υπολογιστή, διαμορφώνοντας έτσι το είδωλο της τοπογραφίας της επιφάνειας του δείγματος. Διατηρώντας σταθερό το αρχικό πλάτος της ταλάντωσης, διατηρείται σταθερή η αλληλεπίδραση μεταξύ ακίδας και δείγματος κατά τη διάρκεια της σάρωσης.

Η μέθοδος αυτή (tapping mode) σε σχέση με τη σάρωση σε επαφή με την επιφάνεια (contact mode) παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι η ακίδα δεν έρχεται σε άμεση επαφή με το δείγμα και συνεπώς ο κίνδυνος παραμόρφωσης ή και αποκόλλησης προσροφημένων σωματιδίων από την επιφάνεια του λόγω της επίδρασης των πλευρικών δυνάμεων από την ακίδα μειώνονται στο ελάχιστο.

Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Multimode Scanning Probe Microscope της Digital Instruments με τη χρήση του λογισμικού Nanoscope IIIa, Version 5.23r3).

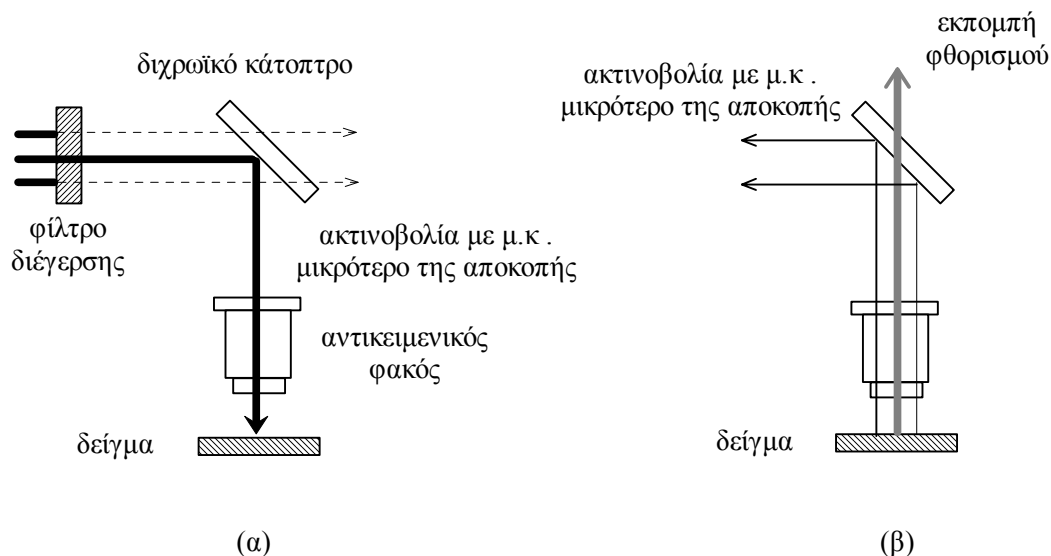


Σχήμα 1: Μικροσκόπιο Ατομικής Δύναμης (AFM), τύπου Multimode, κατασκευασμένο από τη Digital Instruments. Στις ένθετες φωτογραφίες φαίνονται τα κύρια τμήματα του (κεφαλή και βάση) καθώς και κάποια εξαρτήματα (φορέας ακίδας).

3.3. Μικροσκόπιο Φθορισμού

Στα μικροσκόπια φθορισμού όπου η διέγερση γίνεται με προσπίπτον φωτισμό ένα σχηματικό διάγραμμα φαίνεται στο σχήμα 2. Η εστίαση του φωτός στο δείγμα αλλά και η συλλογή του εκπεμπόμενου φθορισμού γίνεται μέσω του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου. Το βασικότερο πλεονέκτημα αυτής της διάταξης είναι ότι ο αντικειμενικός φακός λειτουργεί τόσο ως συγκεντρωτικός αλλά και ως αντικειμενικός. Η εστίαση του αντικειμενικού στο δείγμα έχει ως αποτέλεσμα τη σωστή ευθυγράμμιση του μικροσκοπίου η οποία είναι ίδια τόσο για τη διέγερση όσο

και για την παρατήρηση του φθορίζοντος φωτός. Το πεδίο του δείγματος το οποίο ακτινοβολείται είναι ίδιο με το παρατηρούμενο πεδίο.



Σχήμα 2: Διάγραμμα ενός μικροσκοπίου φθορισμού με προσπίπτον φωτισμό. α) Διέγερση του δείγματος χρησιμοποιώντας τον αντικειμενικό φακό σε συγκεντρωτικό. Ο χρωματικός διαχωριστής δέσμης ή διχρωϊκό κάτοπτρο έχει το χαρακτηριστικό ότι το φως κάτω από ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος κατώφλι, ανακλάται προς τον αντικειμενικό φακό και διεγείρει το δείγμα (έντονη μαύρη γραμμή). β) Η εκπομπή του φθορισμού από το δείγμα. Το εκπεμπόμενο φως (έντονη διακεκομμένη γραμμή) το οποίο εισέρχεται στον αντικειμενικό φακό με μήκος κύματος μεγαλύτερο από το επιλεγμένο κατώφλι δεν ανακλάται αλλά περνά προς τον ανιχνευτή. Τα μήκη κύματος κάτω από το επιλεγμένο κατώφλι σκεδάζονται και απομακρύνονται από τον ανιχνευτή.

Η οδήγηση του φωτός διέγερσης στο δείγμα γίνεται με τη βοήθεια ενός ειδικού κατόπτρου, του χρωματικού διαχωριστή δέσμης (chromatic beam splitter) ή διχρωϊκού κατόπτρου (dichroic mirror), το οποίο τοποθετείται ακριβώς πάνω από τον αντικειμενικό φακό. Οι καθρέπτες αυτοί έχουν μια επικάλυψη από ειδικό μείγμα, το οποίο έχει υψηλή ανάκλαση στις 45° στο φως με μήκος κύματος μικρότερο από ένα συγκεκριμένο ενώ επιτρέπει τη διάδοση των μεγαλύτερων μηκών κύματος. Συνεπώς το διχρωϊκό κάτοπτρο προκαλεί την ανάκλαση του διεγείροντος φωτός προς το δείγμα, αφού είναι μικρότερου μήκους κύματος, και επιτρέπει τη διέλευση του εκπεμπόμενου φθορισμού προς τους προσοφθάλμιους φακούς.

Στη διάταξη του προσπίπτοντος φωτισμού ένα μικρό ποσό από το φως της διέγερσης μπορεί ανακλαστεί από το δείγμα ή τα διάφορα οπτικά μέρη στην κατεύθυνση των προσοφθάλμιων φακών. Το ανεπιθύμητο αυτό διεγείρον φως απομακρύνεται αποτελεσματικά από τον οπτικό δρόμο της παρατήρησης με τη βοήθεια του διχρωϊκού κατόπτρου, το οποίο το παρεμποδίζει να φθάσει τους προσοφθάλμιους φακούς. Καταρχήν λοιπόν το διχρωϊκό κάτοπτρο δρα τόσο ως φίλτρο διέγερσης όσο και ως φίλτρο αποκοπής (barrier). Στην πράξη όμως ένα επιπλέον φίλτρο αποκοπής χρησιμοποιείται ώστε να εξαλείψει έστω και μικρή ποσότητα ανεπιθύμητου διεγείροντος φωτός από το να φτάσει στους προσοφθάλμιους φακούς. Διχρωϊκά κάτοπτρα υπάρχουν για διαχωρισμό όλων των περιοχών του φάσματος από το UV (300nm) ως την περιοχή του υπερύθρου (700nm).

Το διχρωϊκό κάτοπτρο σε συνδυασμό με φίλτρα συμβολής για τη διέγερση και την εκπομπή παρέχει πολύ καλή αντίθεση ακόμη και σε δείγματα με πολύ ασθενή φθορισμό αφού αξιοποιείται όλο το άνοιγμα του αντικειμενικού φακού.

Ένα επίσης σημαντικό πλεονέκτημα του προσπίπτοντος φωτισμού είναι η δυνατότητα συνδυασμού του με συμβατικές διαδικασίες οπτικής μικροσκοπίας όπως η αντίθεση φάσης (phase contrast), η χρήση πολωμένου φωτός και η αντίθεση διαφορικής συμβολής (differential interference contrast). Μάλιστα πολλές φορές είναι χρήσιμο να συνδυάζεται η πληροφορία από τη μικροσκοπία φθορισμού ενός δείγματος με την πληροφορία για τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του που μας δίνουν οι προαναφερθείσες μέθοδοι οπτικής μικροσκοπίας.

Η ευαισθησία αλλά και η συμβατότητα τους με τις άλλες μεθόδους διέλευσης έχουν καθιερώσει την τεχνική του προσπίπτοντος φωτισμού ως την επικρατέστερη διάταξη μικροσκοπίας φθορισμού.

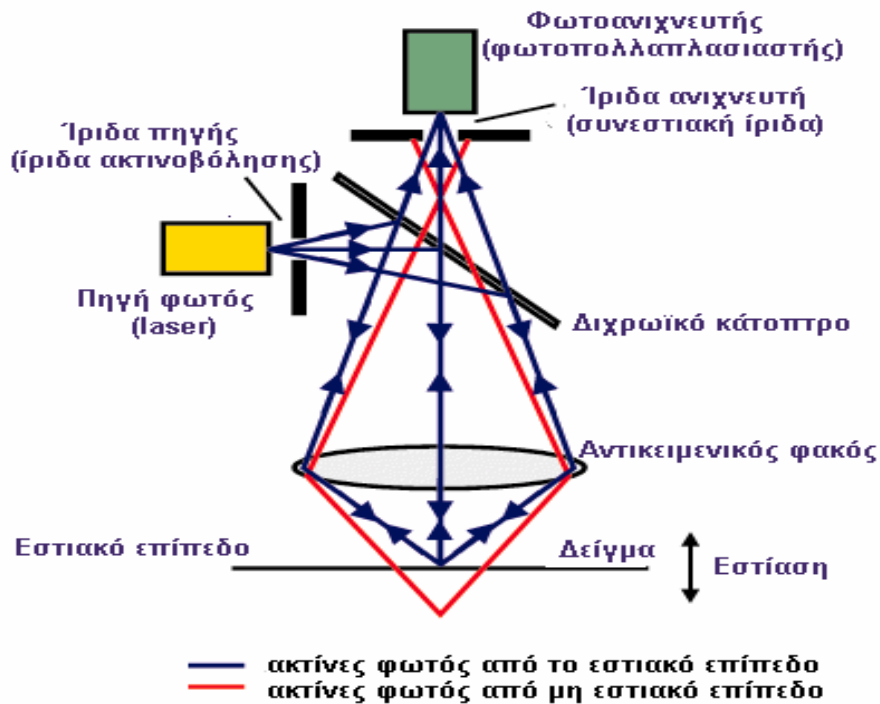
3.4. Συνεστιακό μικροσκόπιο φθορισμού (Scanning Confocal Laser Microscope: SCLM)

Εξέλιξη της μικροσκοπίας φθορισμού αποτελεί η συνεστιακή μικροσκοπίας σάρωσης με laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM). Υπάρχουν πολλές πιθανές διατάξεις συνεστιακού μικροσκοπίου, ωστόσο η πιο αποτελεσματική είναι

αυτή που χρησιμοποιεί προσπίπτοντα φωτισμό, καθώς χρησιμοποιεί τον ίδιο φακό στα συγκεντρωτικό και αντικειμενικό και δε χρειάζεται καμία επιπλέον ευθυγράμμιση των δύο αυτών φακών.

Η βασική αρχή της μικροσκοπίας σάρωσης (σχήμα 3) είναι η διέγερση φθορισμού κάθε φορά από ένα σημείο του δείγματος, με τη χρήση laser. Με την ακτινοβολήση ενός σημείου κάθε φορά, η ένταση της ακτινοβολήσης μειώνεται απότομα, πάνω και κάτω από το επίπεδο εστίασης, καθώς η δέσμη του φωτός συγκλίνει ή αποκλίνει. Έτσι μειώνεται η διέγερση του φθορισμού των «αντικειμένων» που βρίσκονται εκτός του εξεταζόμενου εστιακού επιπέδου. Εάν το σημείο αυτό είναι αρκετά μικρό, στα όρια τα οποία θέτονται από την περίθλαση, τότε η διακριτική ικανότητα του συνεστιακού μικροσκοπίου είναι σημαντικά μεγαλύτερη από αυτή του συμβατικού μικροσκοπίου.

Ο εκπεμπόμενος φθορισμός περνά πίσω μέσω του διχρωακού κατόπτρου και στη συνέχεια μέσω μιας ίριδας η οποία βρίσκεται σε συζευγμένο εστιακό επίπεδο με το δείγμα. Οποιοδήποτε φως το οποίο προέρχεται από σημείο που δεν ανήκει στο εστιακό επίπεδο εμποδίζεται από την ίριδα προσφέροντας έτσι επιπλέον εξασθένηση της συνεισφοράς του μη εστιασμένου φωτός (οπτικός θόρυβος). Τελικά το φως το οποίο περνά από την ίριδα ανιχνεύεται από έναν φωτοανιχνευτή.



Σχήμα 3. Βασική αρχή συνεστιακής μικροσκοπίας σάρωσης με laser.

Συνοπτικά ένα απεικονιστικό σύστημα συνεστιακής μικροσκοπίας φθορισμού επιτυγχάνει την απόρριψη του μη εστιασμένου φωτός με δύο τεχνικές:

- ↳ Με την ακτινοβολήση ενός σημείου του δείγματος κάθε φορά με μια εστιασμένη δέσμη και
- ↳ Με τη χρήση ίριδας η οποία εμποδίζει το φως που προέρχεται από μη εστιασμένα επίπεδα να φτάσει στο φωτοανιχνευτή.

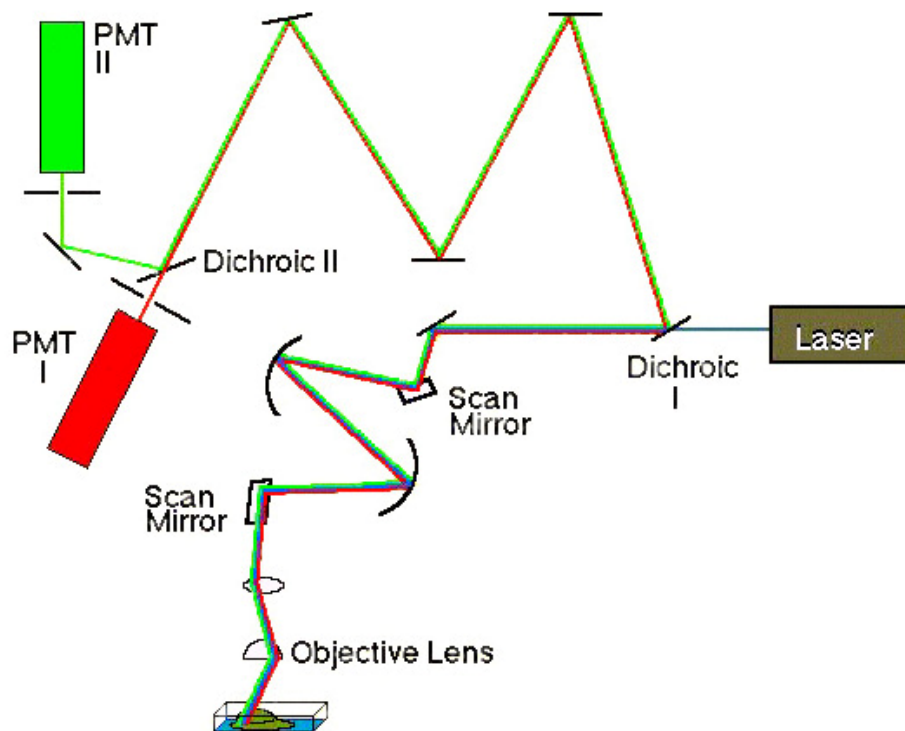
Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με laser έρχεται να λύσει ένα από τα βασικότερα προβλήματα της συμβατικής μικροσκοπίας φθορισμού, όπου το δείγμα ακτινοβολείται ολόκληρο από τη δέσμη διέγερσης και έτσι όλο το δείγμα φθορίζει συγχρόνως. Φυσικά η μεγαλύτερη ένταση του διεγείροντος φωτός είναι στο εστιακό επίπεδο του φακού αλλά και τα υπόλοιπα μέρη του δείγματος δέχονται ένα μέρος από το φως αυτό και φθορίζουν. Αυτό συνεισφέρει σε ένα ασαφές υπόβαθρο στην τελική εικόνα (οπτικός θόρυβος). Προσθέτοντας την ίριδα το πρόβλημα αυτό λύνεται.

Επειδή το εστιακό σημείο του αντικειμενικού φακού του μικροσκοπίου δημιουργεί την εικόνα εκεί όπου είναι η ίριδα τα δύο αυτά σημεία ονομάζονται συζευγμένα.

Το βασικό χαρακτηριστικό εδώ είναι ότι η ίριδα ανίχνευσης απορρίπτει το φως πάνω και κάτω από το εστιακό επίπεδο. Επομένως εάν η ίριδα μεγαλώσει, το βάθος πεδίου θα αυξηθεί. Στη συνεστιακή μικροσκοπία ωστόσο, το ζητούμενο είναι να μειωθεί το μέγεθος της ίριδας, ώστε να ελαχιστοποιηθεί το βάθος πεδίου, ενώ παράλληλα να συλλέγονται όλα τα εκπεμπόμενα φωτόνια.

Σε ένα σύστημα συνεστιακής σάρωσης σημείου η εικόνα του αντικειμένου δεν παράγεται κατευθείαν. Η απεικόνιση μιας περιοχής στο δείγμα και όχι ενός μόνο σημείου πραγματοποιείται με τη σάρωση του δείγματος και τη συλλογή του φωτός από όλα τα σημεία του οπτικού πεδίου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί είτε μετακινώντας το δείγμα και διατηρώντας σταθερή την ακτίνα του laser (stage scanning), είτε μετακινώντας τη δέσμη του laser κατά μήκος του δείγματος (beam scanning) με τη βοήθεια γαλβανομετρικών κατόπτρων.

Υπάρχει ακόμη η δυνατότητα για ανίχνευση δύο διαφορετικών μηκών κύματος φθορισμού με τη χρήση κατάλληλου διχρωϊκού κατόπτρου το οποίο να τα διαχωρίζει και να τα οδηγεί σε δύο διαφορετικούς φωτοπολλαπλασιαστές (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Ανίχνευση δύο διαφορετικών σημάτων φθορισμού ταυτόχρονα από το ίδιο δείγμα με τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού σάρωσης με laser.

Υπάρχει δυνατότητα ανίχνευσης ακόμα και τριών σημάτων φθορισμού με το συνεστιακό μικροσκόπιο που διαθέτει το Εργαστήριο Εμβιομηχανικής και Βιοϊατρικής τεχνολογίας του Τμήματος Μηχανολόγων Μηχανικών και Αεροναυπηγών, του Πανεπιστημίου Πατρών, που είναι κατασκευασμένο από την εταιρεία Nikon.

Το εστιακό επίπεδο επιλέγεται μέσω ενός κινητήρα υψηλής ακρίβειας, ελεγχόμενο από υπολογιστή, μετακινώντας την αντικειμενοφόρο πλάκα. Κατά αυτόν τον τρόπο, μπορούμε να πάρουμε μια ακολουθία από διδιάστατες εικόνες σε διαφορετικό βάθος στο δείγμα, οι οποίες μας δίνουν μια τρισδιάστατη απεικόνιση του αντικειμένου. Σημαντικό στοιχείο εδώ είναι ο μικροκινητήρας ο οποίος επιτρέπει την ακριβή γνώση του βάθους μέσα στο δείγμα στο οποίο βρίσκεται το απεικονιζόμενο επίπεδο. Ο μικροκινητήρας ελέγχει τα διαστήματα ανάμεσα στα διαδοχικά επίπεδα και ο υπολογιστής είναι υπεύθυνος για την καταγραφή τους.

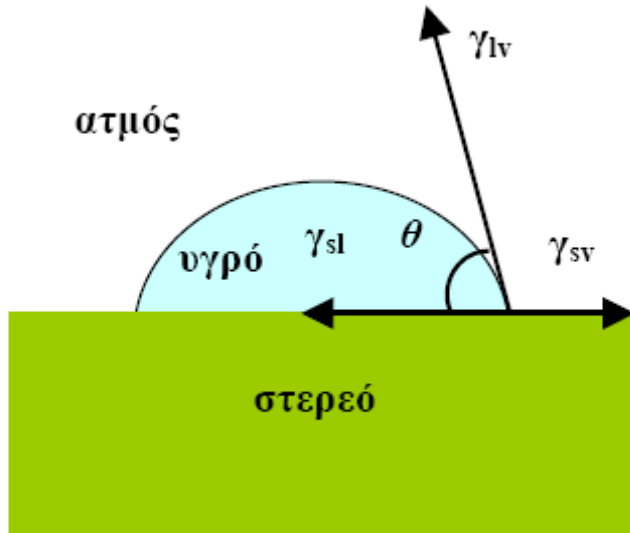
Παράρτημα 4

Γωνιόμετρο, XPS, Z-sizer, Προφιλόμετρο

4.1. Γωνιόμετρο - Μέτρηση Γωνίας Επαφής

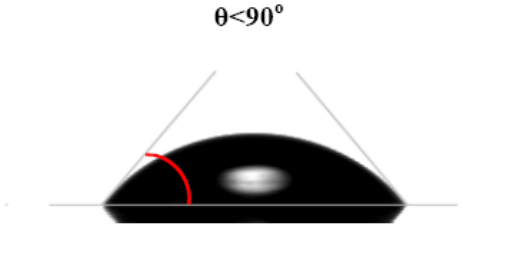
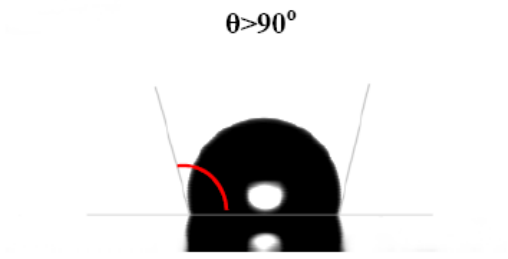
Η γωνία επαφής θ μεταξύ ενός υγρού και της επιφάνειας ενός υλικού αποτελεί ένδειξη της υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας της επιφάνειας, αλλά και μέθοδος υπολογισμού της επιφανειακής της ενέργειας και του πολικού και μη χαρακτήρα της. Το φαινόμενο στηρίζεται στην επιφανειακή τάση που αναπτύσσεται σε ένα υγρό όταν έρθει σε επαφή με τη στερεή επιφάνεια. Η μέτρηση της γωνίας επαφής είναι καθαρά επιφανειακό φαινόμενο. Με την μέτρηση της γωνίας επαφής σταγόνας υγρού πάνω σε μια επιφάνεια στερεού, μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για την μεταξύ τους χημική συγγένεια. Η επιφανειακή τάση είναι μια μέτρηση της συνεκτικής ενέργειας σε μια διεπιφάνεια. Όταν η επιφανειακή ενέργεια ενός υποστρώματος είναι μεγαλύτερη από την επιφανειακή τάση ενός υγρού, τότε το υγρό απλώνεται στην επιφάνεια και η γωνία που σχηματίζεται είναι μικρή.

Η επιφανειακή τάση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο το υγρό τείνει να αποκτήσει το μικρότερο δυνατό επιφανειακό εμβαδόν. Οφείλεται στις μοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται, είτε ενδομοριακά όπου το υγρό προτιμά την αλληλεπίδραση μεταξύ των μορίων του συνεπώς συστέλλεται (μεγάλη γωνία επαφής), είτε διαμοριακά με τα επιφανειακά μόρια του στερεού οπότε διαστέλλεται (μικρή γωνία επαφής). Η σταγόνα, λοιπόν μπορεί να χαρακτηριστεί από την γωνία που σχηματίζεται στο σημείο όπου το υγρό έρχεται σε επαφή με το στερεό και το περιβάλλον (συνήθως αέρας). Οι συνιστώσες της επιφανειακής ελεύθερης ενέργειας του υγρού και του στερεού μπορούν να υποδειχθούν ως διανύσματα όπως φαίνεται στο σχήμα 4.1., όπου: θ η γωνία επαφής, γ_{lv} η επιφανειακή ελεύθερη ενέργεια υγρού-ατμού, γ_{sv} η επιφανειακή ελεύθερη ενέργεια στερεού-ατμού, γ_{sl} η επιφανειακή ελεύθερη ενέργεια στερεού-υγρού.



Σχήμα 4.1. Σχηματικό διάγραμμα που δείχνει τις δυνάμεις που ασκούνται στο τριπλό σημείο συνύπαρξης στερεού υγρού και αερίου καθώς και την μετρούμενη γωνία επαφής.

Έστω λοιπόν μία επιφάνεια υλικού πάνω στην οποία τοποθετείται μια σταγόνα υγρού. Σε χαμηλές τιμές της γωνίας θ δείχνει ότι το υγρό εξαπλώνεται, ή διαβρέχει καλά την επιφάνεια, ενώ μεγάλες τιμές σημαίνουν μικρή διαβροχή. Έτσι, όταν $\theta < 90^\circ$ λέμε ότι η επιφάνεια παρουσιάζει μεγάλη ικανότητα διαβροχής, ενώ όταν $\theta > 90^\circ$ η ικανότητα αυτή είναι μικρή. Όταν το υγρό είναι νερό οι επιφάνειες χαρακτηρίζονται ως υδρόφιλες και υδρόφοβες αντίστοιχα. Όταν $\theta=0$ τότε το υγρό διαβρέχει πλήρως την επιφάνεια. Οι υδρόφοβες περιοχές θα εμποδίζουν την κίνηση της γραμμής επαφής καθώς το υγρό προωθείται και έτσι θα μεγαλώνει η γωνία επαφής. Όταν το νερό υποχωρεί οι υδρόφιλες περιοχές συγκρατούν την κίνηση και έτσι θα μειώνεται η γωνία επαφής (σχήμα 4.2.).

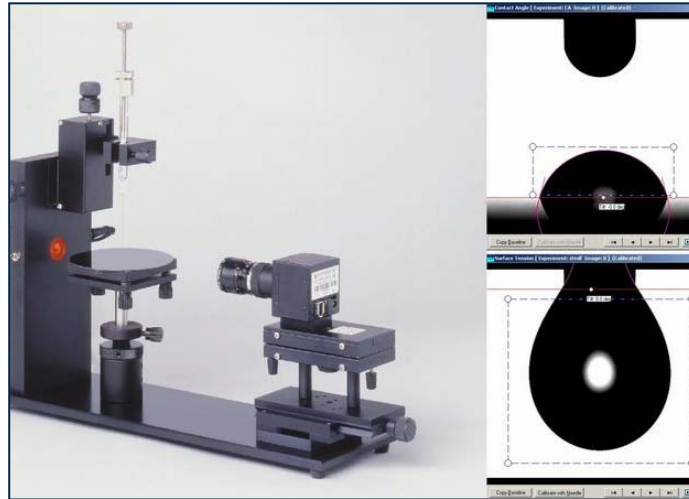
 <p style="text-align: center;">$\theta < 90^\circ$</p>	 <p style="text-align: center;">$\theta > 90^\circ$</p>
<p>Καλή επιφανειακή διαβροχή Μεγάλη επιφανειακή ενέργεια Υδρόφιλη επιφάνεια</p>	<p>Μικρή επιφανειακή διαβροχή Μικρή επιφανειακή ενέργεια Υδρόφοβη επιφάνεια</p>

Σχήμα 4.2. Γωνίες διαβροχής μεταξύ νερού και υδρόφιλου ή υδρόφοβου υλικού αντίστοιχα.

Το δείγμα τοποθετείται σε κατάλληλη βάση και μια σταγόνα υγρού εναποτίθεται, μέσω ειδικής σύριγγας, στην επιφάνεια του δείγματος. Το όργανο μέτρησης που χρησιμοποιήθηκε είναι τύπου “*KSV Contact Angle Measurements (CAM) 100*” και η διάταξη του φαίνεται στο σχήμα 4.3. Το υγρό τοποθετείται μέσα σε μια μικρομετρική σύριγγα που συγκρατείται πάνω από το δείγμα. Η επιφάνεια του δείγματος και η άκρη της σύριγγας είναι τοποθετημένες έτσι ώστε να βρίσκονται στο οπτικό πεδίο μιας κάμερας η οποία συνδέεται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, στην οθόνη του οποίου απεικονίζεται μεγενθυμένη εικόνα της σταγόνας και του σημείου επαφής της με την επιφάνεια (σχήμα 4.2.). Το σύστημα περιέχει εκτός από την CCD κάμερα για την καταγραφή των δεδομένων, και κατάλληλο λογισμικό για την ανάλυση της εικόνας. Το πρόγραμμα αυτό καθορίζει το σχήμα και την περίμετρο της σταγόνας και εξάγει τις γωνίες επαφής (δεξιά και αριστερή γωνία).

Από τις εικόνες διαβροχής με διάφορα υγρά υπολογίζεται η επιφανειακή ενέργεια και ο πολικός και μη χαρακτήρας της, όπως περιγράφηκε στο Κεφάλαιο 2 και συγκεκριμένα στην παράγραφο 2.1.1.4.

Για τα υγρά που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη, η επιφανειακή τάση τους, ο πολικός και μη χαρακτήρας τους και ο ηλεκτρονιο-δοτικός και δεκτικός παρατίθενται στον πίνακα 4.1.



Σχήμα 4.3. Γωνιόμετρο τύπου “KSV Contact Angle Measurements (CAM) 100”

<u>Υγρό</u>	γ_L^d (mJ/m ²)	γ_L^p (mJ/m ²)	γ_L^{d-p} (mJ/m ²)	γ_L^+ (mJ/m ²)	γ_L^- (mJ/m ²)
Νερό	21.8	51.0	72.8	25.5	25.5
Μεθυλενο-ιωδίδιο	50.8	0	50.8	0	50.8
Γλυκερόλη	34.0	30.0	64.0	3.9	57.4

Πίνακα 4.1. Επιφανειακή τάση των υγρών (γ_L^{d-p}), η πολική (γ_L^p) και μη (γ_L^d) συνιστώσα της, και ο ηλεκτρονιο-δοτικός (γ_L^+) και δεκτικός (γ_L^-) χαρακτήρας τους

4.2. Φασματοσκοπία Φωτοηλεκτρονίων από Ακτίνες X (XPS)

Η τεχνική της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X είναι μία από τις βασικές μη καταστρεπτικές τεχνικές επιφανειακής ανάλυσης στερεών σε περιβάλλον υπερυψηλού κενού [κάτω από 10⁻⁸ mbar].

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων, που εξαγονται κυρίως από εσωτερικές ηλεκτρονιακές στάθμες των ατόμων του στερεού, όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες-X συγκεκριμένης ενέργειας (XPS). Στηρίζεται δηλαδή στην δυνατότητας εξαγωγής δεσμικών ηλεκτρονίων από τα άτομα κοντά στην επιφάνεια του υλικού του δείγματος, τα οποία στην συνέχεια θα δώσουν πληροφορίες σχετικά με το άτομο στο οποίο ανήκουν. Η ανίχνευση και η καταγραφή των κορυφών

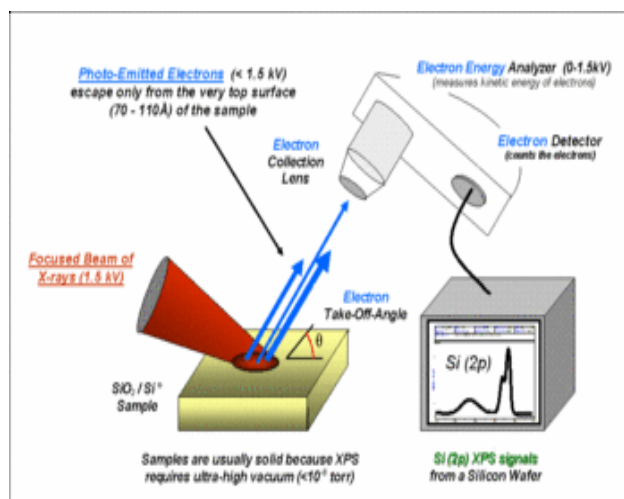
του εκπεμπόμενου φάσματος αποτελεί μία πλήρη εικόνα που χαρακτηρίζει τα άτομα των συστατικών του δείγματος που μελετάται.

Συγκεκριμένα, η ακριβής κινητική ενέργεια των κορυφών στο φάσμα των εξερχόμενων ηλεκτρονίων είναι χαρακτηριστική του είδους των ατόμων **[ποιοτική ανάλυση]** αλλά και του χημικού περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται τα άτομα αυτά **[χημικές μετατοπίσεις]**. Ο αριθμός των ηλεκτρονίων σε κάθε χαρακτηριστική ενέργεια είναι ανάλογος της συγκέντρωσης των συγκεκριμένων ατόμων στην περιοχή ανάλυσης **[ποσοτική ανάλυση]**.

Το σύστημα XPS που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα μελέτη βρίσκεται στο ΕΙΧΗΜΥΘ και είναι SPECS LHS-10 UHV και αποτελείται από τρεις θαλάμους: Θάλαμο ταχείας εισαγωγής δειγμάτων ($1\text{bar}-10^{-3}\text{ mbar}$), θάλαμο προετοιμασίας δειγμάτων ($10^{-3}-10^{-9}\text{ mbar}$) εξοπλισμένο με κανόνι ιοντοβολής με ιόντα Αργού για καθαρισμό των δειγμάτων σε υπερυψηλό κενό και θάλαμο ανάλυσης δειγμάτων (10^{-10} mbar) εφοδιασμένο με:

- Ημισφαιρικό αναλύτη της εταιρείας SPECS (LHS/EA10)
- Πηγή ακτίνων-X διπλής ανόδου Mg/Al [MgK α (1253.6eV) and AlK α (1486.3eV)]
- Κανόνι ηλεκτρονίων SPECS EQ 22/35. Ενέργειες ηλεκτρονίων: 0.02-5 KeV
- Χειριστήριο δειγμάτων στο οποίο μπορούν να τοποθετηθούν μέχρι και 3 δείγματα

Συνοπτικά, το διαστάσεων 10 mm x 10 mm δείγμα στερεώνεται σε ένα θερμικά μονωμένο υποδοχέα ο οποίος με μία ειδική διάταξη μπορεί να εισέρχεται από τον εξωτερικό χώρο της ατμόσφαιρας στον θάλαμο υπέρ-υψηλού κενού της διάταξης, προκειμένου να αναλυθεί. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου παρουσιάζεται στο σχήμα 4.4.



Σχήμα 4.4. Σχηματική αναπαράσταση αρχής λειτουργίας Φασματοσκοπίας Φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS)

4.3. Μικροηλεκτροφορηση (Zetasizer)

Η μέθοδος της μικροηλεκτροφόρησης στηρίζεται στις ηλεκτροστατικές δυνάμεις οι οποίες ασκούνται από το πεδίο στα σωματίδια λόγω του φορτίου τους και χρησιμοποιεί σταθερά πεδία.

Τα κολλοειδή σωματίδια ή βακτήρια λόγω του φορτισμένου οργανικού περιβλήματος που συνήθως διαθέτουν, με την εφαρμογή σταθερού ηλεκτρικού πεδίου δέχονται δυνάμεις Lorentz, οι οποίες τα οδηγούν στο θετικά ή αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο όταν αυτά παρουσιάζουν αρνητικό ή θετικό φορτίο. Η δύναμη Lorentz (F) είναι ανάλογη του φορτίου των σωματιδίων (q) και της έντασης του ηλεκτρικού πεδίου (E) σύμφωνα με τη σχέση:

$$F = q E$$

Επιπρόσθετα, κατά την κίνηση του σωματιδίου ασκούνται σε αυτό δυνάμεις τριβής (Ft) οι οποίες είναι ανάλογες της ταχύτητας (u) του σωματιδίου και του συντελεστή τριβής (f) σύμφωνα με τη σχέση

$$Ft = f u$$

Σε κατάσταση ισορροπίας, οι δύο δυνάμεις (η δύναμη Lorentz και η δύναμη τριβής) είναι ίσες και η ευκινησία (μ) των σωματιδίων δίνεται από τη σχέση

$$\mu = \frac{u}{E} = \frac{q}{f}$$

Κατά τη διαδικασία της μικροηλεκτροφόρησης, μετρείται η κινητικότητα ή αλλιώς ευκινησία (μ) των σωματιδίων/βακτηρίων και από αυτή υπολογίζεται το δυναμικό ζ από τη σχέση Smoluchowski:

$$\mu = \epsilon\epsilon_0\zeta/n$$

Επομένως, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στο ότι τα κολλοειδή σωματίδια συνήθως αποτελούνται από έναν κρυσταλλικό πυρήνα ο οποίος περιβάλλεται από ένα μονομοριακό φορτισμένο οργανικό στρώμα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, γύρω από τα σωματίδια να συγκεντρώνεται ένα φορτισμένο στρώμα ιόντων το οποίο αποτελείται από δύο μέρη. Το εσωτερικό μέρος ονομάζεται στρώμα Stern (Stern layer) και αποτελείται από ιόντα τα οποία είναι ισχυρά συνδεδεμένα με τα σωματίδια, ενώ το εξωτερικό μέρος δημιουργείται από διάχυση ασθενέστερα συνδεδεμένων ιόντων του διαλύματος. Το δυναμικό στην διαχωριστική επιφάνεια μεταξύ των δύο στρωμάτων ονομάζεται δυναμικό ζ και υπολογίζεται από την κινητικότητα μέσω της παραπάνω σχέσης.

Η συσκευή μικροηλεκτροφόρησης (ζ sizer 5000) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον υπολογισμό του δυναμικού ζ , βρίσκεται στο ΕΙΧΗΜΥΘ, παρουσιάζεται στην εικόνα 4.5. και είναι κατασκευασμένη από την εταιρεία Malvern Instruments Ltd. Είναι εξοπλισμένη με ένα laser Ηλίου-Νέου, μία κυψελίδα από Quartz (4mm ID), και σύστημα ελέγχου και μέτρησης της θερμοκρασίας. Το δείγμα (βακτήρια σε εναιώρημα ή σωματίδια SAMs) 1 ml, εισέρχεται στην κυψελίδα, σε θερμοκρασία 25 °C και μέσω του φωτοπολλαπλασιαστή, του ψηφιακού συσχετιστή και ηλεκτρονικού υπολογιστή συλλέγονται τα αποτελέσματα που αφορούν το δυναμικό ζ .

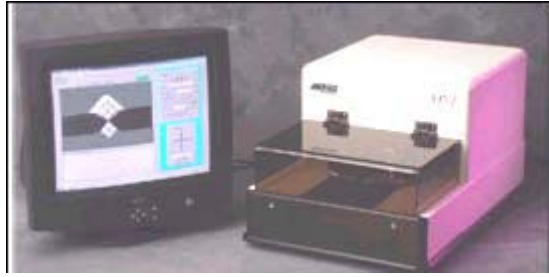


Εικόνα 4.5. Συσκευή μικροηλεκτροφόρησης (ζ sizer) EIXHMYΘ

4.4. Προφιλόμετρο Ακίδας

Το προφιλόμετρο ακίδας XP-2 TM της εταιρείας Ambios Technology παρέχει τη δυνατότητα μετρήσεων υψηλής ανάλυσης της επιφανειακής τοπογραφίας ποικίλου εύρους δειγμάτων. Χρησιμοποιήθηκε από τον Dr DP Dowling για τη μέτρηση του πάχους των υμενίων που είχε εναποθέσει στο PVC και τα αποτελέσματα παρουσιάστηκαν στο κεφάλαιο 4.

Η ακίδα του οργάνου σαρώνει το υμένιο σε ευθεία κάθετη ως προς τη χαραγή. Πριν τη μέτρηση του πάχους είναι απαραίτητη η επιλογή του κατάλληλου «βήματος» (step). Το προφιλόμετρο κινεί την ακίδα κατά μήκος της επιφάνειας του δείγματος που περιλαμβάνει το «βήμα». Καθώς η ακίδα συναντά το «βήμα» προκαλείται αλλαγή στο σήμα επαγωγικού χαρακτήρα, που είναι ενδεικτική του ύψους του βήματος. Το προφιλόμετρο ακίδας αποτελείται από δύο τμήματα: το χώρο του δείγματος όπου υπάρχει η ακίδα μέτρησης, τα αισθητήρια όργανα και η κάμερα και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μια εικόνα του οργάνου φαίνεται στην εικόνα 4.7.



Εικόνα 4.7. Προφιλόμετρο ακίδας

Ο χώρος του δείγματος, περιλαμβάνει: α) Ακίδα πολύ μικρής τελικής διατομής, έτσι ώστε η επαφή με την επιφάνεια του πολυμερικού υμενίου να είναι όσο το δυνατόν ανεπαίσθητη και να μη χαράζει το υμένιο. β) Επιφάνεια τοποθέτησης του δείγματος, η οποία μετακινείται μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή παρέχοντας τη δυνατότητα μέτρησης του πάχους σε οποιοδήποτε σημείο του πολυμερικού υμενίου. Οι ρυθμίσεις που γίνονται στο χώρο του δείγματος αφορούν κυρίως την κλίση της επιφάνειας τοποθέτησης του δείγματος. Οι ρυθμίσεις που γίνονται μέσω του ηλεκτρονικού υπολογιστή αφορούν: το είδος του «βήματος», το μήκος του προφίλ, την ταχύτητα σάρωσης της επιφάνειας από την ακίδα, την πίεση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του υμενίου. Με τον υπολογιστή δίνεται η εντολή σάρωσης του δείγματος και τελικά μετράται το πάχος από την υψομετρική διαφορά ανάμεσα στο σημείο αναφοράς και στο σημείο που γίνεται η μέτρηση.

Παράρτημα 5
*Μελέτη Έκφρασης Γονιδίων *ica**

5. Μελέτη της Έκφρασης των Γονιδίων *ica* με Αντίστροφη Μεταγραφή και Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (RT PCR)

Κατά τη μελέτη της επίδρασης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων αυτο-οργανούμενων μονοστρωματικών συστημάτων και των ρυθμών διάτμησης στην βακτηριακή προσκόλληση, διερευνήθηκε παράλληλα η έκφραση του γονιδίου *ica* που κωδικοποιεί την PIA, στην περίπτωση των SAMs. Σκοπός της μελέτης ήταν να διερευνηθεί αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της επιφάνειας του υλικού και των ρυθμών διάτμησης με την έκφραση των γονιδίων, και πώς συσχετίζεται η βακτηριακή προσκόλληση με την έκφραση των γονιδίων αυτών. Η μέθοδος βασίζεται στο ποσοτικό προσδιορισμό του mRNA του γονιδίου.

Η διερεύνηση της έκφρασης των γονιδίων είναι κρίσιμη για την κατανόηση της παθογένειας των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων. Η μελέτη της έκφραση ενός γονιδίου βασίζεται στην απομόνωση του mRNA και στην επακόλουθη μεταγραφή του σε DNA (copy DNA, cDNA), ώστε να ανιχνευθεί η παρουσία και η ποσότητά του. Η ανάπτυξη της τεχνολογίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR) επιτρέπει την ποσοτικοποίηση των προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό και αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στη διερεύνηση της έκφρασης γονιδίων. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, ενώ η σχετική ποσοτικοποίηση προσδιορίζει το ρυθμό έκφρασης σε σχέση με την παραγωγή mRNA του βακτηριακού κυττάρου (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή; Pfaffl, 2004). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η απόλυτη ποσοτικοποίηση.

5.1. Αποκόλληση Προσκολλημένων Βακτηρίων και Απομόνωση RNA

Τόσο τα βακτήρια του εναιωρήματος όσο και τα προσκολλημένα, μετά την αποκόλληση τους από τα προς εξέταση υλικά με χρήση τρυψίνης, για 5 λεπτά, και ακόλουθη εξουδετέρωσή της με βόειο ορό (Screenivasan και Chrony, 2005), υποβλήθηκαν στη διαδικασία απομόνωσης του RNA.

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τα βακτηριακά κύτταρα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της Τριζόλης (Trizol). Το RNA απομονώθηκε από καλλιέργημα της εκθετικής φάσης ανάπτυξης, καθώς τότε μεταγράφονται τα γονίδια *ica*.

Αρχικά τα βακτηριακά κύτταρα φυγοκεντρήθηκαν και ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με 1.5 mL διαλύματος DEPC 0.1%. Το ίζημα επαναδιαλύθηκε σε 100 μ L TE (pH 8), που περιείχαν 2mg λυσοζύμης (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) και επώασθη στους 37 °C για 10 λεπτά. Μετά την προσθήκη 1 mL Τριζόλης (Invitrogen, Carlsbad, USA) και την επακόλουθη επώαση στους 30 °C για 30 λεπτά, προστέθηκαν 200 μ L χλωροφορμίου και τα δείγματα αφέθηκαν στους -20 °C για 30 λεπτά. Στο στάδιο αυτό απαιτείται άριστη ομογενοποίηση του μίγματος, γι' αυτό πραγματοποιήθηκε παρατεταμένη ανακίνηση (vortex) μετά την προσθήκη χλωροφορμίου, αλλά και κατά τη διάρκεια της επώασης. Ακολούθησε φυγοκέντρωση σε 12.000 x g για 15 λεπτά στους 2-8 °C. Η υδατική φάση μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο τύπου erpendorf και το RNA κατακρημνήστηκε με προσθήκη 500 μ L ισοπροπανόλης, παραμονή για 30 λεπτά στους -20 °C και φυγοκέντρωση σε 12.000 x g για 10 λεπτά στους 2-8 °C. Μετά από έκπλυση του ιζήματος RNA με 75% αιθανόλη και φυγοκέντρωση σε 7.500 x g για 5 λεπτά στους 2-8 °C, το ίζημα παρέμεινε, για περίπου 30 λεπτά να στεγνώσει από τα κατάλοιπα αιθανόλης. Το RNA επαναδιαλύθηκε σε 50 μ L διαλύματος DEPC. Ακολούθησε κατεργασία με 3 IU RNase-free DNase (Promega, Madison, WI USA) στους 37 °C για 40 λεπτά, με σκοπό να καταστραφούν εναπομείναντα ίχνη DNA (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή).

Η απομόνωση του RNA επιβεβαιώθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Το παραγόμενο RNA ποσοτικοποιήθηκε μετρώντας την απορρόφησή του στα 260 nm. Η καθαρότητα του προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm και 280 nm και υπολογίζοντας το λόγο $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$. Κατάλληλα δείγματα ήταν όσα είχαν λόγο $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} > 1.6$. Η απουσία πρόσμιξης με DNA ανιχνεύθηκε με PCR χρησιμοποιώντας τους ειδικούς για το γονίδιο-στόχο εκκινητές και τις ίδιες συνθήκες αντίδρασης. Αν υπήρχε DNA, το δείγμα υπαβαλλόταν σε περαιτέρω πέψη με RNase-free DNase (Promega) και ξαναδοκιμαζόταν για την παρουσία DNA, μέχρις ότου να μην ανιχνεύεται πλέον (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή).

5.2. Σύνθεση cDNA – Αντίστροφη Μεταγραφή (Reverse Transcription)

Η διαδικασία σύνθεσης cDNA από RNA ονομάζεται αντίστροφη μεταγραφή και καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase). Το ένζυμο που απομονώνεται από ορισμένους RNA ιούς, χρησιμοποιεί το RNA ως

υπόστρωμα για να συνθέσει μια αλυσίδα DNA (complementary DNA, cDNA). Παράγονται έτσι υβριδικά μόρια cDNA-RNA. Στη συνέχεια καταστρέφεται η αλυσίδα RNA και το γονίδιο-στόχος εντοπίζεται στη cDNA αλυσίδα και ενισχύεται με τη χρήση ειδικών εκκινητών και με τη δράση της DNA πολυμεράσης.

Για την αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA χρησιμοποιήθηκε το σύστημα SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA). Το σύστημα χρησιμοποιεί την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript™ II Reverse Transcriptase (RT). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ολιγονουκλεοτίδια εξαμερών (random hexamer primers), που είναι μη ειδικά μόρια, με ικανότητα να ενισχύουν το RNA σε όλο το μήκος του, γ'αυτό και προκύπτει cDNA με την υψηλότερη απόδοση (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή; Bustin *et al.*, 2004).

Το αρχικό μίγμα αντίδρασης περιείχε 0.5 μg ολικού RNA, μίγμα τριφωσφονουκλεοτιδίων (dNTPs) 0.1 mM, 50 ng εκκινητών (random hexamer primers) και διάλυμα DEPC μέχρι τελικού όγκου 10 μL. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε θετικός μάρτυρας που εμπεριέχετο στα αντιδραστήρια του συστήματος και αρνητικός μάρτυρας, που δεν περιείχε καθόλου δείγμα.

Το μίγμα RNA/εκκινητών υπέστη θερμική αποδιάταξη για 5 λεπτά στους 65 °C και αμέσως σε πάγο (0 °C) για άλλα 5 λεπτά. Στη συνέχεια, σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 9 μL από το μίγμα που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 1x, MgCl₂ 5mM, DTT 0.01 M και 40 IU RnaseOUT™; Recombinant Ribonuclease Inhibitor. Το νέο μίγμα αντίδρασης παρέμεινε για 2 λεπτά στους 25 °C και έπειτα προστέθηκαν 50 IU από την αντίστροφη μεταγραφάση SuperScript™ II Reverse Transcriptase, το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση, και τα φιαλίδια παρέμειναν για άλλα 10 λεπτά στους 25 °C. Ακολούθησε επώαση για μία ώρα στους 42 °C και για 15 λεπτά στους 70 °C. Στη συνέχεια, διατηρώντας τις αντιδράσεις σε πάγο, προστέθηκαν 2 IU RNase H και επώασθηκαν στους 37 °C για 20 λεπτά. Η RNase H είναι το ένζυμο που πέπτει την αλυσίδα RNA από το δίκλωνο υβριδικό μόριο, ώστε να μείνει το μονόκλωνο cDNA. Σε αυτό το στάδιο τα δείγματα μπορούν να διατηρηθούν στους -20 °C ή να ακολουθήσει PCR (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή).

5.3. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης Πραγματικού Χρόνου (Real Time PCR)

Για τη Real Time PCR των γονιδίων *icaA* και *icaD* χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη μορίων εκκινητών: 5'-tct ctt gca gga gca atc aa-3' και 5'-tea ggc act aac atc cag ca-3' για το γονίδιο *icaA*. Και τα 5'-atg gtc aag ccc aga ca gag-3' 5'cgt gtt ttt aac att taa tgc aa-3' για το γονίδιο *icaD*. Επιλέχθηκε η αραίωση 1:4 για το DNA και η συγκέντρωση 0.4 μM για τον κάθε εκκινητή.

Για τη σήμανση και παρακολούθηση των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε το SYBR Green I (SG), που είναι μη ειδικός τρόπος σήμανσης. Επίσης, επιτρέπεται η ανάλυση με τήξη των προϊόντων μετά το τέλος της αντίδρασης, δηλαδή ανάλυση με χρήση της καμπύλης τήξης (melt curve analysis). Κατά τη διάρκεια της καμπύλη τήξης, μετράται ο φθορισμός που εκπέμπεται καθώς τα προϊόντα της αντίδρασης θερμαίνονται, από θερμοκρασία χαμηλότερη του σημείου τήξης τους (T_m) μέχρι θερμοκρασία μεγαλύτερη του T_m τους και αποδιατάσσονται. Οι κορυφές που εμφανίζονται στην καμπύλη τήξης αντιστοιχούν στα προϊόντα που έχουν ενισχυθεί με την αντίδραση και είναι ανάλογες των ζωνών στην απλή ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Συνεπώς, αυτή η ανάλυση στο τέλος του πειράματος είναι σημαντική, γιατί επιτρέπει τον ποιοτικό έλεγχο των προϊόντων.

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει ακριβή αριθμό αντιγράφων του γονιδίου-στόχος, χρησιμοποιώντας καμπύλη ποσοτικοποίησης γνωστών συγκεντρώσεων.

Για την παρούσα μελέτη, οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μL, χρησιμοποιώντας 5 μL cDNA (σε αραίωση 1:4), 2 x SYBR[®] Green I master mix (Invitrogen) και 0.4 μM από κάθε εκκινητή (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή).

Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα της συσκευής Rotor-Gene Analysis Software 6.0. Με συμβατική PCR με τους ίδιους εκκινητές επιβεβαιώθηκε το σωστό μέγεθος των προϊόντων και η απουσία μη ειδικών προϊόντων. Η απόδοση όλων των αντιδράσεων Real Time PCR υπολογίστηκε με βάση την κλίση της πρότυπης καμπύλης (slope) σύμφωνα με την εξίσωση $E=10^{-1/slope}$.

5.4. Ποσοτικοποίηση με Real-Time PCR (Quantitative Real-Time PCR, QRT-PCR)

Με την τεχνική της Real Time PCR υπάρχει η δυνατότητα όχι μόνο της παρακολούθησης της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο, αλλά και του προσδιορισμού της ποσότητας των παραγόμενων προϊόντων με απόλυτο ή σχετικό υπολογισμό. Η απόλυτη ποσοτικοποίηση προσδιορίζει τον αριθμό αντιγράφων του αρχικού δείγματος με χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης.

5.4.1. Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Real-Time Absolute QRT-PCR)

Με την απόλυτη ποσοτικοποίηση υπολογίζεται η συγκέντρωση του αρχικού δείγματος κάνοντας χρήση καμπύλης ποσοτικοποίησης, που είναι σειρά δειγμάτων αναφοράς (standards) με γνωστή συγκέντρωση. Τα δείγματα αναφοράς θα πρέπει να έχουν παραχθεί και ενισχυθεί με τον ίδιο τρόπο και τις ίδιες συνθήκες με τα προς ποσοτικοποίηση δείγματα. Αυτό σημαίνει πως εκτός από τις ίδιες συγκεντρώσεις αντιδρώντων μορίων και θερμοκρασιών, θα πρέπει να έχουν χρησιμοποιηθεί τα ίδια μόρια εκκινητών και φυσικά οι αντιδράσεις να έχουν την ίδια τιμή απόδοσης (efficiency, E) (RotorGene 3000 manual).

Τα δείγματα αναφοράς για την κατασκευή της καμπύλης ποσοτικοποίησης μπορεί να είναι ανασυνδυασμένο πλασμιδιακό DNA (recDNA), γενομικό DNA, προϊόν αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Pfaffl, 2004). Αφού προσδιοριστεί η συγκέντρωσή τους, συνήθως με μέτρηση της απορρόφησης στα 260 nm, θα πρέπει να ομαλοποιηθούν. Η ομαλοποίηση (normalization) γίνεται με βάση τον αριθμό κυττάρων ή το συνολικό ποσό RNA που χρησιμοποιείται και γίνεται για να διορθώσει τις διαφορές στην ποσότητα του δείγματος που εισάγεται στην αντίδραση (RotorGene 3000 manual).

Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση του καθαρισμένου προϊόντος στα 260 nm και υπολογίστηκε η συγκέντρωσή του σε αντίγραφα/μL (copies/μL), χρησιμοποιώντας τη σταθερά Avogadro ($N=6.023 \times 10^{23}$) και το μοριακό βάρος του γονιδίου, το οποίο προκύπτει από το γινόμενο του αριθμού βάσεων του επί του μέσου βάρους ενός ζεύγους νουκλεϊκών οξέων (660 Da), σύμφωνα με την εξίσωση:

$$N \times \text{συγκέντρωση (g/}\mu\text{L)} / \text{MW (g/mol)},$$

$$\text{όπου } N=6.023 \times 10^{23} \text{ αντίγραφα / mol}$$

$$\text{MW}=\text{αριθμός βάσεων} \times 660$$

(Χίνη, Διδακτορική Διατριβή).

Η συγκέντρωση του δείγματος σε ng/μL υπολογίστηκε στα 70 ng/μL, από το γινόμενο $OD_{260} \times 50 \times$ αραιώση. Η συγκέντρωση του αρχικού δείγματος σε αντίγραφα/μL (copies/μL) υπολογίστηκε ως εξής:

$$\begin{aligned} N \times \text{συγκέντρωση (g/μL)} / \text{MW (g/mol)} &= \\ &= 6.023 \times 10^{23} \text{ αντίγραφα / mol} \times (70 \times 10^9 \text{ g/μL}) / (180 \text{ bp} \times 660 \text{ g/bp}) = \\ &= 35 \times 10^9 \text{ copies/μL} \end{aligned}$$

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις έως τη συγκέντρωση των 10^5 copies/μL (2×10^{-5} ng/μL) και από αυτήν έγιναν διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις έως τη συγκέντρωση των 10 copies/μL (2×10^{-9} ng/μL). Από την κάθε συγκέντρωση μεταφέρθηκαν 5 μL στην αντίδραση της PCR, που σημαίνει ότι κάθε αντίδραση περιείχε από 50 έως 500000 αντίγραφα. Από τις διαδοχικές υποδεκαπλάσιες αραιώσεις του γονιδίου (εύρος: $10-10^5$ *tst* copies/ μL) προέκυψε η καμπύλη ποσοτικοποίησης. Η ομαλοποίηση της αντίδρασης έγινε με βάση το συνολικό ποσό RNA και συγκεκριμένα σε όλες τις αντιδράσεις, χρησιμοποιήθηκε 0.5 μg RNA, όπως αναφέρθηκε και στο *Σύνθεση cDNA – Αντίστροφη μεταγραφή* (Χίνη, Διδακτορική Διατριβή).

Βιβλιογραφία

- Absolom DR, Lamberti FV, Policova Z, Zingg W, van Oss CJ, Neumann AW (1983), Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 90-97.
- Abu-Lail NI, Camesano TA (2006), Specific and nonspecific interaction forces between Escherichia coli and silicon nitride, determined by Poisson statistical analysis. *Langmuir* 22, 7296-7301.
- Afrin R, Yamada T, Ikai A (2004), Analysis of force curves obtained on the live cell membrane using chemically modified AFM probes. *Ultramicroscopy* 10, 187-195.
- d'Agostino R, Favia P and Fracassi F (1997), "Plasma Processing of Polymers", Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, p.487.
- Alfonso JL, Goldmann WH (2003), Feeling the forces: atomic force microscopy in cell biology. *Life Sci* 72: 2553-2560.
- Amanatides E, Mataras D (2005), Electrical and optical properties of CH₄/H₂ RF plasmas for diamond-like thin film deposition *Diamond Relat Mater* 14, 292-295.
- Amanatides E, Stamou S, Boghosian S and Mataras D (2000), Proceedings of the 16th European Photovoltaic Solar Energy Conference, Glasgow, UK Vol. I pp.581.
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA (1990), Fluorescent-Oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in Microbiology, *J Bacteriol* 172: 762-770
- An YH, Friedman RJ (1997), Laboratory Methods for studies of bacterial adhesion. *J Microb Methods* 30(2): 141-152.
- An YH, Friedman RJ (1998), Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 43: 338-348.
- Archer GL (1998) Molecular epidemiology of multiresistant *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 21 (suppl): 133-138.
- Arciola CR, Campoccia D, Montanaro L (2002), Effects of antibiotic resistance of Staphylococcus epidermidis following adhesion to polymethylmethacrylate and to silicone surfaces. *Biomaterials* 23(6): 1495-1502
- Arefi FV, Andre P, Montazer-Rahmati, Amourouz J (1992), Plasma polymerization and surface treatment of polymers *Pure Appl. Chem.* 64: 715-723.

- [Arvaniti A](#), [Karamanos NK](#), [Dimitracopoulos G](#), [Anastassiou ED](#) et al. (1994), Isolation and characterization of a novel 20-kDa sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. [Arch Biochem Biophys](#). 1994 Feb 1; 308(2):432-8.
- Bakker DP, Huijs FM, DeVries J, Klijnstra JW, Busscher JH, van der Mei HC (2003), Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Col Surf B: Biointerf* 32 (3): 179-190.
- Bakker DP, van der Plaats A, Verkerke GJ, Busscher HJ, van der Mei HC (2003), Comparison of velocity profiles for different flow chamber designs used in studies of microbial adhesion to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6280-6287.
- Balazs DJ, Triandafillu K, Chevolut Y, Aronsson B-O, Harms H, Descouts P, Mathieu HJ (2003), Surface modification of PVC endotracheal tubes by oxygen glow discharge to reduce bacterial adhesion. *Surf Interf Anal* 35: 301-309.
- Baumgartner JN, Cooper SL (1998), Influence of thrombus components in mediating staphylococcus aureus adhesion to polyurethane surfaces. *J Biomed Mater Res* 40: 660-670.
- Baveja JK, Willcox MDP, Hume EBH, Kumar N, Odell R, Poole-Werner LA (2004), Furanones as potential anti-bacterial coatings on biomaterials. *Biomaterials* 25: 5003-5012.
- Bayoudh S, Ponsonnet L, Ben Ouada H, Bakhrouf A, Othmane A (2005), Bacterial detachment from hydrophilic and hydrophobic surfaces using a microjet impingement. *Coll. Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 266: 160-167.
- Beech IB, Smith JR, Steele AA, Penegar I, Campbell SA (2002), The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Coll Surf B: Biointerf* 23(2-3): 231-247.
- Bell GI (1978), Models for the specific adhesion of cells to cells. *Science* 200: 618-627.
- Bolshakova AV, Kiselyova OI, Filonov AS, Frolova OY, Lyubchenko YL, Yaminsky IV (2001), Comparative studies of bacteria with an atomic force microscopy operating in different modes. *Ultramicrosc* 86: 121-128.

- Boonaert, CJP, Dufrene YF, Derclaye SR, Rouxhet PG (2001), Adhesion of Lactococcus Lactis to model substrata: direct study of the interface. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 22: 171-182.
- Bos R, van der Mei HC, Gold J, Busscher HJ (2000), Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobisity. *FEMS Microbiol Let* 189: 311-315.
- Bowen R, Hilal N, Lovitt RW, Wright CJ (1998), Direct measurements of a force of adhesion of a single biological cell using an atomic force microscope. *Col Surf A: Physicochem Eng Asp* 136: 231-234.
- Boyd RD, Verran J, Jones MV, Bhakoo M (2002), Use of Atomic Force Microscope to determine the effect of substratum surface topography on bacterial adhesion. *Langmuir* 18: 2343-2346.
- Briggs D, Rance DG, Kendall CR and Blythe AR (1980), *Polymers*, 21: 895.
- Bruinsma GM, van der Mei HC, Busscher HJ (2001), Bacterial adhesion to surface hydrophilic and hydrophobic contact lenses. *Biomaterials* 22 (24): 3217-3224
- Brunski BJ, "Metals", in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, 2004, p. 137-151.
- Buczynski BW, Kory MM, Steiner RP, Kittinger TA, Ramsier RD (2003), Bacterial adhesion to zirconium surfaces. *Col Surf B: Biointerf* 30: 167-175.
- Bunt CR, Jones DS, Tucker IG, (1993), The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *Intern J Pharm* 99: 93-98.
- Bunt CR, Jones DS, Tucker IG, (1995), The effects of pH, ionic strength and polyvalent ions on the cell surface hydrophobisity of Escherichia coli evaluated by the BATH and HIC methods. *Intern J Pharm* 113: 257-261.
- Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AWJ, De Jong HP, Arends J (1984), Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 980-983.
- Bustin SA, Nolan T. "Analysis of mRNA expression by Real-Time PCR", Chapter 7. *Real-Time PCR, an essential guide*. Horizon Bioscience ed. 125-184, 2004.

- Carmen M, et al. (2000), In vitro adhesion of S. Epidermidis to intraocular lenses”, *J. Cataract Refract Surg.*; 26: 1673-1679
- Carnazza S, Satriano C, Guglielmino S, Marletta G (2005), *J. Colloid Interf. Sci.* 289(2) 386.
- F. Chan, *Introduction to Plasma Physics*, (Plenum Press, New York, 1974).
- Chang CC, Merritt K (1992), Microbial adherence on poly(methyl methacrylate) (PMMA) surfaces. *J Biomed Mater Res* 26: 197-207.
- Chang KC, Hammer DA (1996) Influence of direction and type of applied force on the detachment of macromolecularly-bound particles from surfaces. *Langmuir* 12: 2271-2282.
- Chang HT, Rittmann BE, Amar D, Heim R, Ehrlinger O, Lesty Y, (1991), Biofilm detachment mechanisms in a liquid fluidised bed. *Biotechnol Bioeng* 38: 499-506.
- Characklis WG (1973), Attached microbial growths-I. Attachment and growth. *Water Res* 7, 1113-1127.
- Chaudhury MK (1984), Short-range and long-range forces in colloidal and macroscopic systems, Ph.D. thesis, State University of New York, SUNY, Buffalo.
- Chaw KC, Manimaran M, Tay FEH (2005), *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (12): 4853.
- Christensen GD, Baldassarri L, Simpson WA, Colonization of medical devices by coagulase-negative staphylococci, in *Infections associated with idwelling medical devices*. edited by Bisno AL, Waldvogel FA, American Society for microbiology, Washington, DC 2005, chapter 5, 2nd edition
- Clark DT and Dilks A (1979), *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.* 17: 957.
- Colas A, Curtis J, “Silicone Biomaterials: History and Chemistry” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, 2004, p. 80-85.
- Cooke FW (2004), “Bulk Properties of Materials” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 23-31.

- Cooper SL, Visser SA, Hergenrother RW, Lamba NK (2004), “Polymers” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 67-79.
- Cordero J, Munuera L, Folgueira MD (1996), The influence of the chemical composition and surface of the implant on infection. *Injury* 27 (3): S-C34-37.
- Cramton ES, Ulrich M, Gotz F, and Doring G(2001), *Infection and Immunity*, 4079-4085
- Costerton JW (1999), Introduction to biofilm. *Intern J Antimicrob Agents* 11: 217-221.
- Costerton B, Cook E, Shirthliff M, Stoodley P, Pasmore M (2004), “Biofilms, Biomaterials and Device-Related Infections” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 67-79.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Cadwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995), *Microbial Biofilms. Annu. Rev. Microbiol.* 49: 711-745.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999), Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284: 1318-1322.
- Coury AJ (2004), “Chemical and Biochemical Degradation of Polymers” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 411-429.
- Cozens-Roberts C, Lauffenburger DA, Quinn JA (1990), Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. I. Probabilistic model and analysis. *Biophys. J.* 58: 841-856.
- Cozens-Roberts C, Quinn JA, Lauffenburger DA (1990), Receptor mediated adhesion phenomena: Model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys. J.* 58: 107-125.
- Cozens-Roberts C, Quinn JA, Lauffenburger DA (1990), Receptor-mediated cell attachment and detachment kinetics. II. Experimental model studies with the radial-flow detachment assay. *Biophys. J.* 58: 857-872.
- Cramton SE, Gerke G, Schnell NF, Nichols WW, Gotz F (1999), The intercellular (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity*, 67:5427-5433.

- Cucarella C, Solano C, Valle J, Amorena B, Lasa I, Penades JR. (2001), Bap, A Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 9:2888-2896.
- Dahal, EN (1987), Calculation of solid surface tensions. *Langmuir* 3: 1009-1015.
- Davenas J, Thevenard P, Philippe F, Arnaud MN (2002), Surface implantation treatments to prevent infection complications in short term devices. *Biomol Eng* 19: 263-268.
- DeJong P TeGiffel MC, Kiezebrink EA (2002), Prediction of the adherence, growth and release of microorganisms in production chains. *Intern J Food Microbiol* 74: 13-25.
- Della Volpe C, Maniglio D, Brugnara M, Siboni S, Morra M (2004), The solid surface free energy calculation. I. In defense of the multicomponent approach, *J. Colloid Interf. Sci.* 271: 434.
- Dembo M, Torney DC, Saxman K, Hammer D (1988), The reaction-limited kinetics of membrane to surface adhesion and detachment. *Proc. R. Soc. London. B: Biol. Sci.* 234: 55-83.
- Derjaguin BW, Landau L (1941), Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physiochim. URSS* 14: 633-662.
- Dickinson RB (1997), A dynamic model for the attachment of a Brownian particle mediated by discrete macromolecular bonds. *J. Colloid Interface Sci.* 190: 142-151.
- Dickinson RB, Cooper SL (1995), Analysis of shear-dependent bacterial adhesion kinetics to biomaterial surfaces. *Bioeng Food Nat Prod* 41 (9): 2160-2174.
- Dickinson RB, Nagel JA, McDevitt D, Foster TJ, Proctor RA, Cooper SL (1995), Quantitative comparison of clumping factor- and coagulase mediated Staphylococcus aureus adhesion to surface-bound fibrinogen under flow. *Infect Immun* 63(8): 3143-3150.
- Dickinson RB, Nagel JA, Proctor RA, Cooper SL (1997), Quantitative comparison of shear-dependent Staphylococcus aureus adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res* 36: 152-162.

- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ (2001), Survey of infections due to staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe and the Pacific region for the Sentry antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 32 (2): 114-132.
- Dietrich Mack et al, *Infection and immunity*, 2000, 3799-2807
- Dobinsky S, Kiel K, Rohde H, et al. Glucose-related dissociation between *icaADBC* transcription and biofilm expression by *Staphylococcus epidermidis*: evidence for an additional factor required for polysaccharide intercellular adhesin synthesis. *Journal of Bacteriology*, 2003; 185:2879-2886.
- Donlan RM, Costerton JW (2002), Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microb Reviews* 167-193.
- Donnelly K, Dowling DP, O'Brien TP, O'Leary, Kelly TC (1996), Comparison of diamond-like carbon films deposited from 40 KHz and 13,56 MHz r.f. plasmas. *Diam Rel Mater* 5: 445-447.
- Dowling DP, Betts AJ, Pope C, McConnell ML, Eloy R, Arnaud MN (2003), Anti-bacterial silver coatings exhibiting enhanced activity through the addition of platinum. *Surf Coat Techn* 163-164: 637-640.
- Dowling DP, Donnelly, McConnell ML, Eloy R, Arnaud MN (2001), Deposition of anti-bacterial silver coatings on polymeric substrates. *Thin Solid Films* 398-399: 602-606.
- Dowling DP, Donnelly K, Monclus M, McGuinness M (1998), The use of refractive index as a measure of diamond-like carbon film quality. *Diam Rel Mat* 7: 432-434.
- Duddridge JE, Kent CA, Laws JF (1982), Effect of surface shear stress on the attachment of *Pseudomonas fluorescens* to stainless steel under defined flow conditions. *Biotechnol Bioeng* XXIV: 153-164.
- Dufrene YF (2001), Application of Atomic Force Microscopy to microbial surfaces: from reconstituted cell surface layers to living cells. *Micron* 32: 153-165,
- Dufrene YF (2002), Atomic Force Microscopy: a powerful tool in Microbiology. *J Bacteriol* 184(19): 5205-5213,

- Dufrene YF (2003), Recent progress in the application of atomic force microscopy imaging and force spectroscopy to microbiology. *Cur Opin In Microbiol* 6: 317-323.
- Duguid IG, Evans E, Brown MR, Gilbert P (1992), Effect of biofilm culture upon the susceptibility of *Staphylococcus epidermidis* to tobramycin. *J Antimicrob Chemother* 30: 803-810.
- Edwards KJ, Rutenberg AD (2001), Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chem Geol* 180: 19-32.
- von Eiff C, Peters G, Heilmann C (2002), Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect Dis* 2: 677-685.
- von Engel, *Electric plasmas: Their nature and uses* (Taylor and Francis, London and New York, 1983).
- Fallgren C, Ljungh A, Shenkman B, Varon D, Savion N (2002), Venous shear stress enhances platelet mediated staphylococcal adhesion to artificial and damaged biological surfaces. *Biomaterials* 23: 4581-4589.
- Fang HHP, Chan KY, Xu LC (2000), Quantification of bacterial adhesion forces using atomic force microscopy. *J. Microbiol. Meth.* 40 (1): 89-97.
- Faucheux N, Schweiss R, Lutzow K, Werner C, Groth T (2004) Self-assembled monolayers with different terminating groups as model surfaces for cell adhesion studies. *Biomaterials* 25, 2721-2730
- Finlay JA, Callow ME, Ista LK, Lopez GP, Callow JA (2002), The influence of surface wettability on the adhesion strength of settled spores of the green alga *Enteromorpha* and the diatom *Amphora*. *Integr. Comp. Biol.* 42, 1116-1122.
- Flemming RG, Capelli CC, Cooper SL, Proctor RA (2000), Bacterial colonization of functionalized polyurethanes. *Biomaterials* 21: 273-281.
- Fletcher M Decho A (2001) Biofilms. *Encyclopedia of life sciences* (2001), Nature Publishing Group/ www.els.net.
- Forbes BA, Sahn DF, Weissfeld AS (eds). *Diagnostic Microbiology*. Mosby Inc., St. Louis, Missouri, USA, 2002.

- Fowkes FM (1962), Determination of interfacial tensions, contact angles and dispersion forces in surfaces by assuming additivity of intermolecular interactions in surfaces. *J. Phys. Chem.* 66, 382.
- Fowkes FM (1963), Additivity of intermolecular forces at interfaces. I Determination of the contribution to surface and interfacial tensions of dispersion forces in various liquids. *J. Phys. Chem.* 67: 2538.
- Fowkes FM (1964), Attractive forces at interfaces. *Ind. Engg. Chem.* 56, 40-52.
- Fowkes FM, McCarthy DC, Mostafa MA (1980), Contact angles and the equilibrium spreading pressures of liquids on hydrophobic solids. *J. Coll. Inter.Sci.* 78: 200-206.
- France RM, Short RD (1998), Plasma Treatment of Polymers: The Effects of Energy Transfer from an Argon Plasma on the Surface Chemistry of Polystyrene and Polypropylene: A High-Energy Resolution XPS Study. *Langmuir* 14, 4827-4835.
- Francois P, Vaudaux P, Nurdin N, Mathieu HJ, Descouts P, Lew DP (1996), Physical and biological effects of a surface coating procedure on polyurethane catheters. *Biomaterials* 17: 667-678.
- Gaboriand F, Dufrene YF (2006), Atomic force microscopy of microbial cells: Applications to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 54: 10-19.
- Gannon JT, Manilal VB, Alexander M (1991), Relationships between cell surface properties and transport of bacteria through soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 190-193.
- Garcia-Saenz MC, Arias-Puente A, Fresnadillo-Martinez MJ, Matilla-Rodriguez A (2000), In vitro adhesion of Staphylococcus epidermidis to intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 26 (11): 1673-1679.
- Geesey GG (2001), Bacterial behaviour at surfaces. *Cur Opin In Microbiol* 4: 296-300
- Gheorghiu M, Arefi FJ, Amouroux G Placinta, Popa G and Tatoulian M (1997), *Plasma Sources Sci. Technol*, 6: 8.
- Goldman AJ, Cox RG, Brenner H (1967), Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall. I. Motion through a quiescent fluid. *Chem. Eng. Sci.* 22, 637-651.

- Goldman AJ, Cox RG, Brenner H (1967), Slow viscous motion of a sphere parallel to a plane wall. II. Couette flow. *Chem. Eng. Sci.* 22, 653-660.
- Goldsmith HL, Turitto VT (1986), Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: Basic principles and applications. *Thromb Haemostas* 55: 415-435.
- Gomez-Suarez C, Busscher HJ, van der Mei HC (2001), Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2531-2537.
- Gottenbos B, Busscher HJ, Van Der Mei HC, Nieuwenhuis P (2002), Pathogenesis and prevention of biomaterial centered infections. *J Mat Sci: Mat In Med* 13: 717-722
- Gottenbos B, van der Mei HC, Busscher HJ (2000), Initial adhesion and surface growth of Staphylococcus epidermidis and Pseudomonas aeruginosa on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res* 50: 208-214
- Gotz F (2002), Staphylococcus and biofilms. *Mol Microb* 43(6): 1367-1378.
- Gray ED, Peters G, Versteegen M, Regelmann WE (1984), Effect of extracellular slime substance from Staphylococcus epidermidis adhesion on human cellular immune response. *Lancet* 18: 365-367.
- Groning P, Collaud M, Dietler G and Schlapbach L (1994), *J. Appl. Phys.* 76: 887.
- Gupta B, Hilborn J, Hollenstein Ch, Plummer CJG, Houriet R, Xanthopoulos N (2000), Surface modification of polyester films by RF plasma. *J Appl Polym Sci* 78, 1083-1091.
- Hammer DA, Lauffenburger DA (1987), A dynamic model for receptor-mediated cell adhesion to surfaces. *Biophys. J.* 52:475-487.
- Hanson SR (2004), "Blood Coagulation and Blood-Materials Interactions" in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner BD, Academic Press, p. 332-337.
- Hanson SR, Ratner BD (2004), "Evaluation of Blood-Materials Interactions" in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner BD, Academic Press, p. 367-378.

- Harris LG, Tosatti S, Wieland M, Textor M, Richards RG (2004), Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly (L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* 25: 4135-4148.
- Hauert R (2003), A review of modified DLC coatings for biological applications. *Diam Rel Mater* 12 (3-7): 583-589.
- Hauch KD (2004), “Microscopy for Biomaterials Science” in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner BD, Academic Press, p. 396-410.
- Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F (1996), Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. *Molec Microbiol* 20 (5): 1083-1091.
- Hench LL, Best S (2004), “Ceramics, Glasses and Glass-Ceramics” in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner BD, Academic Press, p. 153-169.
- Herrmann M, Vaudaux PE, Pittit D (1988), Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococci isolates to foreign material. *J Infect Dis* 158: 693–701.
- Hermansson M (1999), The DLVO theory in microbial adhesion. *Coll Surf B: Biointerf* 14: 105-119.
- Higashi N, Takahashi M, Niwa M (1999), Immobilization of DNA through intercalation at self-assembled monolayers on gold. *Langmuir* 15, 111-115.
- Hoek EMV, Agarwal GK (2006), Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. *J. Coll. Inter. Sci.* 298: 50-58.
- Hogt AH et al. (1983), Adhesion of coagulase-negative Staphylococci to Biomaterials, *J. General Microbiology*; 129: 2959-2968.
- Holt RJ “The colonization of ventriculoatrial shunts by coagulase negative staphylococci”, in Finland M, Marget W, Bartmann K, Bacterial infections: Change sin their causative agents, trends and possible basis, Springer-Verlag, 1971
- Hubble J (2003), Monte Carlo simulation of biospecific interactions between cells and surfaces. *Chem Eng Sci* 58: 4465-4474.

- Hubble J, Ming F, Eisenthal R, Whish W (1996), Progressive detachment of cells from surfaces: a consequence of heterogeneous ligand populations or a multi-site binding equilibrium? *J Theor Biol* 182: 169-171.
- Huebner J, Goldmann DA (1999), Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens. *Ann Rev Med* 50: 223-226.
- Inagaki N, Narushima K, Tuchida N and Miyazaki K (2004), Surface characterization of plasma-modified poly(ethylene terephthalate) film surfaces *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.* 42 (20): 3727.
- Isberg RR, Barnes P (2002), Dancing with the host: flow-dependent bacterial adhesion. *Cell* 110, 1-4.
- Israelachvili JN (1991), Intermolecular and Surface Forces. Academic Press: New York.
- Israelachvili JN (1992), Intermolecular and Surface Forces, Academic Press, London.
- James NR, Jayakrishnan A (2003), Surface thiocyanation of plasticized poly(vinyl chloride) and its effect on bacterial adhesion. *Biomaterials* 24: 2205-2212.
- Jansen B, Hartmann C, Schumacher-Perdreau F, Peters G (1991), Late onset endophthalmitis associated with intraocular lens: a case of molecularly proved *S. epidermidis* aetiology. *Br J Ophthalmol* 75: 440-441.
- Jucker BA, Zehnder AJB, Harms H (1998), Quantification of polymer interactions in bacterial adhesion. *Environ Sci Technol* 32: 2909-2915.
- Kamusewitz H, Possart W (2003), Wetting and scanning force microscopy on rough polymer surfaces: Wenzel's roughness factor and the thermodynamic contact angle. *Appl. Phys. A* 76, 899-902.
- Kannan RY, Salacinski HJ, Butler G Hamilton and Seifalian AM (2005), *J Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 74B: 570.
- Kaplan MH, Tenenbaum MJ (1982), *Staphylococcus aureus*: cellular biology and clinical application. *J Am Med* 72, 248-258.
- Karamanos NK, Panagiotopoulou HS, Syrokou A, Frangides C, Hjerpe A, Dimitrakopoulos G, Anastassiou ED (1995), Identity of macromolecules present in the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. *Biochimie* 77: 217-224.

- Kiremitci-Gumustederelioglu M, Pesmen A (1996), Microbial adhesion to ionogenic PHEMA, PU and PP implants. *Biomaterials* 17: 443-449.
- Klapper I, Rupp CJ, Cargo R, Purvedorj B, Stoodley P (2002), Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotech Bioeng* 80(3): 289-296.
- [Kloos WE](#), [Ballard DN](#), [Webster JA](#), [Hubner RJ](#), [Tomasz A](#), [Couto I](#), [Sloan GL](#), [Dehart HP](#), [Fiedler F](#), [Schubert K](#), [de Lencastre H](#), [Sanches IS](#), [Heath HE](#), [Leblanc PA](#), [Ljungh A](#). (1997), Ribotype delineation and description of *Staphylococcus sciuri* subspecies and their potential as reservoirs of methicillin resistance and staphylolytic enzyme genes. *Int J Syst Bacteriol.* 1997 Apr;47(2):313-23. Erratum in: *Int J Syst Bacteriol* Oct;47(4):1279.
- Kloos WE and Schleifer KH (1975), Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25: 62-79.
- Klug D, Wallet F, Kacet S, Courcol RJ. (2003), Involvement of adherence and adhesion *Staphylococcus epidermidis* genes in pacemaker lead-associated infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 41:3348-3350.
- Kodjikian L, Burillon C, Roques C, Pellon G, Freney J, Renaud FNR (2003), Biofilm formation on intraocular lenses by a clinical strain encoding the *ica* locus: a scanning electron microscopy study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 44 (10) : 4382-4387.
- Kohnen W, Kolbensschlag C, Teske-Keiser S, Jansen B (2003), Development of a long-lasting ventricular catheter impregnated with a combination of antibiotics. *Biomaterials* 24(26): 4865-4869.
- Kohn J, Abramson S, Langer K (2004), "Bioresorbable and Bioerodible Materials" in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 67-79.
- Krimer V, Merkert H, Von Eiff C, Frosch M, Eulert J, Lohr JF, Hacker J, Ziebuhr W (1999), Detection of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in clinical samples by 16S rRNA-directed in situ hybridisation. *J Clin Microbiol* 37(8): 2667-2673.

- [Kristinsson KG](#), [Hastings JG](#), [Spencer RC](#) (1988), The role of extracellular slime in opsonophagocytosis of *Staphylococcus epidermidis*. *J Med Microbiol*. Nov;27(3):207-13.
- Kuo SC, Hammer DA, Lauffenburger DA (1997), Simulation of detachment of specifically bound particles from surfaces by shear flow. *Biophys. J.* 73: 517-531.
- Kuo SC, Lauffenburger DA (1993), Relationship between receptor/ligand binding affinity and adhesion strength. *Biophys. J.* 65, 2191-2200.
- Kuusela P, Vartio T, Vuento M, Myhre EB (1985), Attachment of staphylococci and streptococci on fibronectin, fibronectin fragments, and fibrinogen bound to a solid phase. *Infect Immunol* 50: 77-85.
- Lahiri J, Isaacs L, Grzybowski B, Carbeck JD, Whitesides JM (1999), Biospecific Binding of Carbonic Anhydrase to Mixed SAMs Presenting Benzenesulfonamide Ligands: A Model System for Studying Lateral Steric Effects. *Langmuir* 15, 7186-7198.
- Lejeune P (2003), Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it. *Trend in Microbiol* 11(4): 179-184.
- Li B, Logan BE (2004), Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Coll. Surf. B: Biointerf.* 36, 81-90.
- Liu Y, Tay JH (2001), Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *J Appl Microbiol* 90: 337-342.
- Liu Y, Tay JH (2002), The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res* 36: 1653-1665.
- Lower SK, Tadanier CJ, Hochella MF (2000), Measuring interfacial and adhesion forces between bacteria and mineral surfaces with biological force microscopy *Geochim Cosmochim Acta* 64 (18): 3133-3139.
- Lysaght MJ, O'Laughlin J (2000), The demographic scope and economic magnitude of contemporary organ replacement therapies. *ASAIO* J46, 515-21.
- Ma H, Dickinson RB (2004), Kinetic analysis of the attachment of a biological particle to a surface by macromolecular binding. *J. Theoretical Biology* 226: 237-250.
- Mack D (1999), Molecular mechanisms of staphylococcus epidermidis biofilm formation. *J Hosp Inf* 43: S113-S125.

- Mah TFC, O'Toole GA (2001), Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiol* 9 (1,1) 34-39.
- Maki DG (1982) « Infections associated with intravascular lines » in Remington JS and Swartz NM (ed) Current clinical topics in infectious diseases. Vol 3 McGraw-Jill Book Co, New York, 309-363
- Maki DG, Stolz SM, Wheeler S, Mermel LA (1997), Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter: a randomised, controlled trial. *Ann Intern Med* 127: 257-266.
- Maki H., Yamaguchi T. and Murakami K.: 'Cloning and characterization of a gene affecting the methicillin resistance level and the autolysis rate in *Staphylococcus aureus*'. *J. Bacteriol.* 176: 4993, 1994.
- Marrucci G, Astarita G, *Principles of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, McGraw-Hill, Inc., London (1974).
- Mascari L, Ross JM (2001), Hydrodynamic shear and collagen receptor density determine the adhesion capacity of *S. aureus* to collagen. *Annals Biomed. Eng.* 29, 956-962.
- Mascari L, Ymele-Leki P, Eggleton CD, Speziale P, Ross JM (2003), Fluid shear contributions to bacteria cell detachment initiated by a monoclonal antibody *Biotechnol Bioeng* 83: 65-74.
- Mataras D, Cavadias S, Rapakoulias DE (1989), Spatial profiles of reactive intermediates in rf silane discharges. *J. Appl. Phys.* 66: 119.
- Mayer C, Moritz R, Kirschner C, Borchard W, Maibaum R, Wingender J, Flemming H-C (1999), The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *Intern J Biol Macromol* 26 (1): 3-16.
- McWhirter MJ, McQuillan AJ, Bremer PJ (2002), Influence of ionic strength and pH on the first 60 min of *Pseudomonas aeruginosa* attachment to ZeSe and to TiO₂ monitored by ATR-IR spectroscopy. *Col Surf B: Biointerf* 84 (1-2): 17-25.
- Medilanski E, Kaufmann K, Wick L, Wanner O, Harms H (2002), Influence of surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofoul* 18 (3): 193-203.
- Merriam CV, Fernandez HT, Citror DM, Tyrrell KL, Warren YA, Goldstein EJC, (2003), Bacteriology of human bite wound infections *Anaerobe* 9 (2): 83-86.

- Miele PS, Kogulan PK, Levy CS (2001), Seven cases of surgical native valve endocarditis caused by coagulase-negative staphylococci: an underappreciated disease. *Am Heart J* 142: 571-576.
- Migliaresi C, Alexander H (2004), “Composites” in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner BD, Academic Press, p. 181-196.
- Ming F, Whish W, Hubble J, Eisenthal R (1998), Estimation of parameters for cell-surface interactions: maximum binding force and detachment constant. *Enzyme Microbiol Technol* 22: 94-99.
- Miorner H, Myhre E, Bjorck L, Kronvall G (1980), Effect of specific binding of human albumin, fibrinogen, and immunoglobulin G on surface characteristics of bacterial strains as revealed by partition experiments in polymer phase system. *Infect Immunol* 29:879–885.
- Missirlis YF, Spiliotis AD (2002), Assessment of techniques used in calculating cell-materials interactions. *Biomolec Engin* 19: 287-294.
- Mohamed N, Rainier TR, Ross JM (2000), Novel experimental study of receptor-mediated bacterial adhesion under the influence of fluid shear. *Biotechnol Bioeng* 68: 628-636.
- Monzón M, Concepción Oteiza C, Leiva J, Lamata M, Amorena B (2002), Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 44(4): 319-324.
- Morra M, Cassinelli C (1996), *Staphylococcus epidermidis* adhesion to films deposited from hydroxyethylmethacrylate plasma. *J Biomed Mater Res* 31: 149-155.
- Morra M, Cassinelli C (1997), Bacterial adhesion to polymer surfaces: A critical review of surface thermodynamic approaches. *J Biomater Sci Polymer Edn* 9 (1): 55-74.
- Moter A, Gobel UB (2000), Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J Microbiol Meth* 41 (2): 85-112.
- Müller E, Huebner J, Gutierrez N, Takeda S, Goldmann DA, Pier GB (1993) Isolation and characterization of transposon mutants of *Staphylococcus epidermidis* deficient in capsular polysaccharide adhesion and slime. *Infect Immun* 61, 551-558

- Nelles G, Weisser M, Back R, Wohlfart P, Wenz G, Mittler-Neher S (1996), Controlled orientation of cyclodextrin derivatives immobilized on gold surfaces. *J Am Chem Soc* 118, 5039-5046.
- Neumann AW, Hum OS, Francis DW, Zingg W, van Oss CJ (1980), *J. Biomed. Mater. Res.* 14: 499.
- Nirmala R, James R, Jayakrishnan A (2003), Surface thiocyanation of plasticized poly(vinyl chloride) and its effect on bacterial adhesion. *Biomaterials* 24 (13): 2205-2212.
- Noble WC and Pitcher DG (1978) Microbial ecology of the human skin. *Adv Microbiol Ecol* 2, 245-253
- Norde W, Lyklema J (1989), Protein adsorption and bacterial adhesion to solid surfaces: A colloid-chemical approach. *Colloids Surf.* 38, 1-13.
- Nuzzo RG, Allara DL (1983), Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces. *J Am Chem Soc* 105, 4481-4883.
- Nyquist RM, Eberhardt AS, Silks LA, Li Z, Yang X, Swanson BI (2000), Characterization of Self-Assembled Monolayers for Biosensor Applications. *Langmuir* 16, 1793-1800.
- O’Gara JP, Humphreys H (2001), Staphylococcus epidermidis biofilms: importance and implications. *J Med Microbiol* 50: 582-587.
- Ogston A (1883) ‘Micrococcus poisoning’. *J. Anat. Physiol.* 17, 24-58.
- Ogston A. Report upon microorganisms in surgical diseases. *Br Med J* 1881, 1: 369-375.
- Rosenbach FJ. Mikro-organismen bei den Wund-Infektions-Krankheiten des menschen. Wiebaden, JF Bergmann’s Verlag, 1884.
- Ong YL, Razatos A, Georgiou G, Sharma MM (1999), Adhesion forces between E. coli bacteria and biomaterial surfaces. *Langmuir* 15: 2719-2725.
- van Oss CJ (1993), Acid-base interfacial interactions in aqueous media. *Colloid. Surf. A Physicochem Eng Aspects*, 78, 1-49.
- van Oss CJ (1995), Hydrophobic, hydrophilic and other interactions in epitope-paratope binding. *Molecular Immunology* 32 (3): 199-211.

- van Oss CJ (1995), Hydrophobicity of biosurfaces-origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 5: 91-110.
- van Oss CJ (2003), Long-range and short-range mechanisms of hydrophobic attraction and hydrophilic repulsion in specific and aspecific interactions. *J. Mol. Recognit.* 16, 177-190.
- van Oss CJ, Chaudhury MK, Good RJ (1989), The mechanism of phase separation of polymers in aqueous media-Apolar and polar systems. *Sep. Sci. Tech.* 23: 15-30.
- van Oss CJ, Good RJ (1984), The “equilibrium distance” between two bodies immersed in a liquid. *Colloids Surf.* 8: 373-381.
- van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK (1986), The role of van der Waals forces and hydrogen bonds in hydrophobic interactions between biopolymers and low energy surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 111, 378-390.
- O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000), Biofilm formation as microbial development. *Ann Rev Microbiol* 54 49-79.
- Owens DK, Wendt RC (1969), Estimation of surface energy of polymers. *J. Appl. Pol. Sci.* 13, 1741-1747.
- Pagano L, Tacconelli E, Tumbarello M, (1997), Bacteraemia in patients with hematological malignancies. Analysis of risk factors, etiological agents and prognostic indicators. *Haematologica* 82: 415-419
- Papakonstantinou DD, Amanatides E, Mataras D (2003), Proceedings of the 16th International Symposium on Plasma Chemistry (ISPC), Taormina, Italy.
- Papakonstantinou D, Amanatides E, Mataras D, Ioannidis V and Nikolopoulos P (2007), Improved Surface Energy Analysis for Plasma Treated PET Films. *Plasma Process Polym* 4, S1057-1062.
- Papakonstantinou D, Mataras D and Arefi-Khonsari F (2001), *J. Phys. IV*, 11: 357.
- Paragioudaki M, Stamouli V, Kolonitsiou F, Anastassiou ED, Dimitrakopoulos G, Spiliopoulou I (2004), Intravenous catheter infections associated with bacteraemia: a 2-year study in a University Hospital”, *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 10: 431-435.

- Park KD, Kim YS, Han DK, Kim YH, Lee EHB, Suh H, Choi KS (1998), Bacterial adhesion on PEG modified polyurethane surfaces. *Biomaterials* 19: 851-859.
- Paulsson M, Gouda I, Larm O, Ljungh A (1994), Adherence of coagulase-negative staphylococci to heparin and other glucosaminoglycans immobilized on polymer surfaces. *J Biomed Mater Res* 28: 311-317.
- Peppas NA, “Hydrogels” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, 2004, p. 100-106.
- Perdreau-Remington F, Stefanik D, Peters G (1996) A four-year prospective study on microbial ecology of explanted prosthetic hips in 52 patients with aseptic prosthetic joint loosening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 160-165.
- Pereira AT (1962), ‘Coagulase-negative strains of *Staphylococcus* possessing antigen 51 as agents of urinary infection’. *J. Clin. Pathol.* 15: 252-259.
- Pessoa-Silva CL, Miyasaki CH, De Almeida MF, Kopelman BI, Raggio RL, Wey SB (2001), Neonatal late-onset bloodstream infection: attributable mortality, excess of length of stay and risk factors. *Eur J Epidemiol* 17: 715-720.
- Peters G, Locci R, Pulverer G (1982), Adherence and growth of coagulase-negative staphylococci on surfaces of intravenous catheters. *J Infect Dis* 146: 479-482.
- Pfaffl MW. Chapter 3: Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA (ed) *A-Z of quantitative PCR*. International University Line (IUL), La Jolla, CA, USA, 2004: 89-113.
- Placinta G, Arefi-Khonsari F, Gheorgiu M, Amorous J, Popa G (1997), Surface properties and the stability of poly(ethylene terephthalate) films treated in plasmas of helium-oxygen mixtures. *J Appl Polym Sci* 66, 1367-1375
- Prince JL, Dickinson RB (2003), Kinetics and forces of adhesion for a pair of capsular/unecapsulated *Staphylococcus* mutant strains. *Langmuir* 19: 154-159.
- Raad I (1998), Intravascular-catheter-related infections. *The Lancet* 351 (9106): 893-898.
- Raimundo O, Heussler H, Bruhn JB, Suntrarachun S, Kelly N, Deighton MA, Garland SM (2002), Molecular epidemiology of coagulase negative staphylococcal bacteraemia in a newborn intensive care unit. *Journal of Hospital Infection* 51, 33-42.

- Ratner BD (2004), “A History of Biomaterials” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 10-20.
- Ratner BD (2004), “Degradation of Materials in the Biological Environment” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 411.
- Ratner BD (2004), “Surface Properties and Surface Characterization of Materials” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 40-66.
- Ratner BD (2004), Hoffman AS, “Non-fouling Surfaces” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 197-200.
- Ratner BD, Hoffman AS (2004), “Physicochemical Surface Modifications of Materials used in Medicine” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 201-217.
- Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lenons JE (2004), “Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 430-438.
- Razatos A, Ong YL, Sharma MM, Georgiou G (1998), Evaluating the interaction of bacteria with biomaterials using atomic force microscopy. *J Biomater Sci Polym Edn* 9: 1361-1373.
- Reiniger M, Basnar B, Friedbacher G, Schleberger M (2002) Atomic Force Microscopy of thin organic films on silicon in ultrahigh vacuum and under ambient conditions. *Surf Interf Analysis* 33, 85-88
- Rijnaarts HHM, Norbe W, Bouwer EJ, Lyklema J, Zehnder AJB (1995), Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Col Surf B: Bioint* 4: 5-22,
- Robertson J (2002), Diamond-like amorphous carbon. *Mater. Sci. Eng. R* 37: 129-281.
- Robichon D, Girard JC, Cenatiempo Y, Cavallier JF (1999), Atomic force microscopy imaging of dried or living bacteria. *C R Acad Sci Paris, Life Sci* 322: 687-693.
- Rupp ME, Archer GD (1994), Coagulase-negative staphylococci: pathogenesis associated with medical progress. *Clin Infect Dis* 19: 231-245.

- Sabine Dobinsky, Kathrin Kiel, Holger Rohde, Katrin Bartscht, Johannes K.-M. Knobloch, Matthias A. Horstkotte, and Dietrich Mack (2003), *Journal of Bacteriology*, Vol.185, 2879-2886.
- Samuel U, Guggenbichler JP (2004), Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver Impregnated catheter. *Intern J Antimicrob Agents* 23 (1): 75-78.
- Sagiv J (1980), Organized monolayers by adsorption. 1. Formation and structure of oleophobic mixed monolayers on solid surfaces. *J Am Chem Soc* 102, 92-98
- Sanderson NM, Guo B, Jacob AE, Handley PS, Cunniffe JG, Jones MN (1996), The interaction of cationic liposomes with the skin-associated bacterium *Staphylococcus epidermidis*: effects of ionic strength and temperature. *Biochim Bioph Acta (BBA) – Biomembr* 1283 (2, 4): 207-214.
- Scheuerman TR, Camper AK, Hamilton MA (1998), Effects of substratum topography on bacterial adhesion. *J Col Interf Sci* 208: 23-33.
- Schonhorn H, Hansen RH (1967), Treatment of surface polymers for adhesive bonding. *J Appl Polym Sci* 11, 1461-1474.
- Schreiber F (2000), Structure and growth of self-assembling monolayers. *Prog Surf Sci* 65, 151-256.
- Scierholz JM, Beuth J (2001), Implant infections: a haven of opportunistic bacteria. *J Hosp Infect* 49: 87-93.
- Schierholz JM, Beuth J, Pulverer G (2000), Evidence for a self-fulfilling hypothesis: chlorhexidine dressing for reduction of microbial colonization of the skin with central venous catheters. *J Hosp Infect* 44(3): 241-242.
- Sharma PK, Gibcus M J, van der Mei HC, Busscher HJ (2005), Influence of fluid shear and microbubbles on bacterial detachment from a surface. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3668-3673.
- Sharp JM, Dickinson RB (2005), Direct evaluation of DLVO theory for predicting long-range forces between a yeast cell and a surface. *Langmuir* 21, 8198-8203.
- Shi L, Ardehali R, Caldwell KD, Valint P (2000), Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. *Col Surf B: Biointerf* 17: 229-239.

- Silver S (2003), Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 27: 341-353.
- Souvenir D, Anderson DEJ, Palpant S, Mroch H, Askin S, Anderson J, Claridge J, Eiland J, Malone C, Garrison MW, Watson P, Cambell DM (1998), Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antiseptis, pseudobacteraemia and therapy of patients. *J Clin Microbiol* 36: 1923-1926.
- Speranza G, Gottardi G, Pederzoli C, Lunelli L, Canteri R, Pasquardini I, Carli E, Lui A, Mniglio D, Brugnara M, Anderle M (2004), Role of chemical interactions in bacterial adhesion to polymer surfaces. *Biomaterials* 25: 2029-2037.
- Spiliopoulos N, Mataras D and Rapakoulias DE (1996), *J. Vc. Sci. Technol. A* 14: 2757.
- Sreenivasan PK, Chorny RC (2005), The effects of disinfectant foam on microbial biofilms. *Biofouling*, 21(2), 141 – 149
- Stewart PS, Costerton JW (2001), Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* 358 (9276): 135-138.
- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle JD, Lappin-Scott HM (1999), Structural deformation of bacterial biofilm caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol Bioeng* 65: 83-92.
- Strathmann M, Wingender J, Flemming HC (2002), Application of fluorescently labeled lectins for the visualization and biochemical characterization of polysaccharides in biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol Methods* 50, 237-248.
- Sugimura H, Hozumi A, Kameyama T, Takai O (2002) Organosilane self-assembled monolayers formed at the vapour/solid interface. *Surf Interf Analysis* 34, 550-554
- Tacconelli E, Tumbarello M, Pittiruti M, Leone F, Lucia MB, Cauda R, Ortona L (1997,) Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 203-209.
- Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJP (1998), The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *J Mater Sci: Mater Med* 9: 17-22.

- Tegoulia VA, Cooper SL (2002), Staphylococcus aureus adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Col Surf B: Biointerf* 24: 217-228.
- Tenney JH, Moody MR, Newman KA, Schimpf SC, Wade JC, Costerton JW, Reed WP (1986) Adherent microorganisms on luminal surfaces of long term intravenous catheters *Arch Intern Med* 146, 1949-1954.
- Tojo M, Yamashita N, Goldmann DA, Pier GB (1988) Isolation and characterization of a capsular polysaccharide adhesin of *Staphylococcus epidermidis* which mediates attachment to polystyrene. *Infect immune* 59, 4187-4192.
- Trautner BW, Darouicher O (2004), Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *Am J Inf Contr* 32 (3): 177-183.
- Vacheethasanee K, Marchant RE (2000), Surfactant polymers designed to suppress bacterial (*Staphylococcus epidermidis*) adhesion on biomaterials. *J Biomed Mater Res* 50: 302-312
- Vacheethasanee K, Temenoff JS, Higashi JM, Gary A, Anderson JM, Bayston R, Marchant RE (1998), Bacterial surface properties of clinically isolated staphylococcus epidermidis strains determine adhesion on polyethylene. *J Mater Res* 42: 425-432.
- Vadillo-Rodriguez V, Busscher HJ, Norde W, De Vries J, Dijkstra RJB, Stokroos I, van der Mei HC (2004), Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5441-5446.
- Van Loosdrecht MCM, Lyklema J, Norde W, Schraa G, Zehnder AJB (1987), The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microbiol* 53: 1893–1897.
- Vaudaux PE, Waldvogel FA, Morgenthaler JJ, Nydegger UE (1984), Adsorption of fibronectin onto polymethylmethacrylate and promotion of *Staphylococcus aureus* adherence. *Infect Immunol* 45: 768–774.
- Vaudaux P, Yasuda H, Velazco MI, Huggler E, Ratti I (1990), Role of host and bacterial factors in modulating staphylococcal adhesion to implanted polymer surfaces. *J Biomater Appl* 5: 134-153.

- Vincent JL (2003), Nosocomial infections in adult intensive-care units. *Lancet* 361: 2068-2077.
- Visser J, Jeurnink TJM (1997), Fouling of heat exchangers in the dairy industry. *Experimental Thermal Fluid Sci.* 14: 407-424.
- Vogler EA, “Role of Water in Biomaterials” in Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine, Ratner BD, Academic Press, 2004, p. 59-66.
- Vuong C, Otto M (2002), Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes Infect* 4 (4): 481-489.
- Wade JC, Schimpff SC, Newman KA (1982), Staphylococcus epidermidis: An increasing cause of infection in patients with granulocytopenia. *Ann Intern Med* 97, 503-8.
- Wagner P, Nock S, Spudich JA, Volkmuth WD, Chu S, Cicero RL, Wade CP, Linford MR, Chidsey CED (1997), Bioreactive Self-Assembled Monolayers on Hydrogen-Passivated Si(111) as a New Class of Atomically Flat Substrates for Biological Scanning Probe Microscopy. *J Struct Biol* 119, 189-201.
- Waldvogel FA, “Staphylococcus aureus, including toxic shock syndrome” in Mandell, Douglas, Bennett (ed) Principles and Practice of Infectious Diseases, Third Edition 1990, p. 1489-1510.
- Walkson SL, Bhattacharjee S, Hoek EM, Elimelich M (2002), A novel asymmetric clamping cell for measuring streaming potential of flat surfaces. *Langmuir* 18: 2193-2198.
- Wang IW, Anderson JM, Jacobs MR, Marchant RE (1995), Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to biomedical polymers: contributions of surface thermodynamics and hemodynamic shear conditions. *J. Biomed. Mater. Res.* 29 485-493.
- Wang IW, Danilich M, Anderson J, Marchant RE (1995), Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to biomedical polymers: Contributions of surface thermodynamics and hemodynamic shear conditions. *J. Biomed. Mater. Res.* 29: 485-493.
- Wang J, Huang N, Pan CJ, Kwok SCH, Yang P, Leng YX, Chen JY, Sun H, Wan GJ, Liu ZY, Chu PK (2004), Bacterial repellence from polyethylene terephthalate surface modified by acetylene plasma immersion ion implantation-deposition. *Surf. Coat. Techn.* 186, 299-304.

- Weidner S, Kuhn G, Decker R, Roessner D, Friedrich J (1998), Influence of plasma treatment on the molar mass of poly(ethylene terephthalate) investigated by different chromatographic and spectroscopic methods. *J Polym Sci* 36, 1639-1648.
- Weinberg S, King MW, “Medical Fibers and Biotextiles”, in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, 2004, p. 86-99.
- Weisser M, Nelles G, Wohlfart P, Wenz G, Mittler-Neher S (1996), Immobilization kinetics of cyclodextrins at gold surfaces. *J Phys Chem* 100, 17893-17900.
- Whitehead KA, Colligon JS, Verran J (2004), The production of surfaces of defined topography and chemistry for microbial retention studies, using ion beam sputtering technology. *Intern Biodeter Biodegrad*
- Willcox MDP, Harmis N, Cowell B., Williams T, Holden BA (2001), Bacterial interactions with contact lenses; effects of lens material, lens wear and microbial physiology. *Biomaterials* 22: 3235-3247.
- Williams DF, Williams RF (2004), “Degradative Effects of the Biological Environment on Metals and Ceramics” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, p. 430-438.
- Willing GA, Ibrahim TH, Etzler FM, Neuman RD (2000), New approach to the study of particle-surface adhesion using atomic force microscopy. *J Col Interf Sci* 226: 185-188.
- Woodyard LL, Bowersock TL, Turek JJ, McCabe GP, DeFord J (1996), A comparison of the effects of several silver-treated intravenous catheters on the survival of staphylococci in suspension and their adhesion to the catheter surface. *J Contr Rel* 40: 23-30.
- Wu S, Brzozowski KJ (1971), Surface free energy and polarity of organic pigments. *J. Coll. Interf. Sci.* 37: 686-690.
- Wymer SA, Lakhtakia A, Engel RS (1995), Extinction Cross Section of an Arbitrary Body in a Viscous Incompressible Fluid. *Physical Review E* 52, 1857–1865.
- Yannas IV, “Natural Materials” in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Ratner BD, Academic Press, 2004, p. 127-136.

- Zlatanova J, Lindsay SM, Leuda SH (2000), Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscopy. *Progr Bioph Molec Biol* 74: 37-61.
- Δημητρακόπουλος Γ.Ο. Εισαγωγή στην κλινική μικροβιολογία και τα λοιμώδη νοσήματα. Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 1987.
- Δημητρακόπουλος Γ.Ο.: « Εισαγωγή στην Κλινική Μικροβιολογία και τα Λοιμώδη Νοσήματα», Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 1987.
- Δημητρακόπουλος Γ.Ο.: «Ιατρική Βακτηριολογία», Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, 1987.
- Παγιατάκης ΑΧ, *Εισαγωγή στην Ρευστομηχανική*, Πανεπιστήμιο Πατρών, Εκτυπωτικό Κέντρο, Πάτρα (1996)
- Παπαϊωάννου, Α.Θ., *Μηχανική των Ρευστών Ι*, Φωτοστοιχειοθεσία – Εκτύπωση: Σ. Αθανασόπουλος, Σ. Παπαδάμης & ΣΙΑ Ε.Ε., Αθήνα (1993).
- Παπακωνσταντίνου Δ., Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών
- Παπαπαναγιώτου Ι, Κυριαζοπούλου-Δαλαΐνα Β “Σταφυλόκοκκος” in: Ιατρική Μικροβιολογία & Ιολογία. 1η έκδοση University Studio Press, Θεσσαλονίκη 2001.
- Χίνη Βασιλική, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, 2007

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που προκύπτουν από την χρήση εμφυτευμάτων και ιατρικών συσκευών και που εμποδίζουν την μακροχρόνια χρήση τους είναι η εμφάνιση νοσοκομειακών σηψαιμικών επεισοδίων σχετιζόμενων με λοιμώξεις που προκαλούνται από πηκτάση αρνητικούς σταφυλόκοκκους, και κυρίως από τον *S. epidermidis*. Με δεδομένο ότι η εκτεταμένη χορήγηση αντιβιοτικών έχει οδηγήσει στην επικράτηση πολυανθεκτικών βακτηριακών στελεχών της φυσιολογικής χλωρίδας, η κατασκευή αντιβακτηριακών ή και βακτηριοστατικών βιοϋλικών κρίνεται επιβεβλημένη. Για το σκοπό αυτό απαραίτητη είναι η μελέτη και η κατανόηση του μηχανισμού προσκόλλησης των βακτηρίων στην επιφάνεια του βιοϋλικού.

Στην κατεύθυνση αυτή διερευνήθηκε η επίδραση των φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων βακτηρίων-υλικών, του ρυθμού διάτμησης και της σχετικής συνεισφοράς τους στην ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται στην επιφάνεια του βιοϋλικού αλλά και να ενεργοποιούν τα γονίδια *ica* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της εξωκυττάριας βλεννώδους ουσίας (slime) και συγκεκριμένα μιας πολυσακχαρικής φύσεως προσκολλητίνης (polysaccharide intercellular adhesin, PIA). Για τη μελέτη αυτή τροποιώθηκαν επιφανειακά με τεχνικές πλάσματος υπάρχοντα βιοϋλικά, παρασκευάστηκαν αυτό-οργανούμενα μονοστρωματικά συστήματα σε γυαλί και χαρακτηρίστηκαν φυσικοχημικά. Ελέγχθηκε επίσης εάν οι θεωρίες κολλοειδών συστημάτων, και συγκεκριμένα η θερμοδυναμική, η DLVO και η εκτεταμένη DLVO μπορούν να εξηγήσουν τα πειραματικά αποτελέσματα.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση μειώνεται με την αύξηση της επιφανειακής ενέργειας και του πολικού χαρακτήρα των υλικών, ενώ δεν επηρεάζεται σημαντικά από το μη πολικό τους χαρακτήρα. Η θερμοδυναμική θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά τα αποτελέσματα για υψηλής ιοντικής ισχύος διαλύματα, ενώ η DLVO για χαμηλής. Η εκτεταμένη DLVO θεωρία εξήγησε ικανοποιητικά την επίδραση της φυσικοχημείας τόσο του διαλύματος όσο και της επιφάνειας στη βακτηριακή προσκόλληση. Η αύξηση του ρυθμού διάτμησης μείωσε την προσκόλληση των βακτηρίων με τρόπο που εξαρτώνταν από τις φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις βακτηρίων-υλικών, ενώ παράλληλα μείωσε την προβλεψιμότητα των παραπάνω θεωριών. Επομένως, η βακτηριακή προσκόλληση θεωρήθηκε ως αποτέλεσμα του συνδιασμού φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμού μακρομοριακών δεσμών. Τα αποτελέσματα από τη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων *ica* έδειξαν ότι η έκφρασή τους αυξάνεται με την μείωση της επιφανειακής ενέργειας του υλικού και την αύξηση του ρυθμού διάτμησης.

ABSTRACT

One of the major problems arising from the use of implants and medical devices and impeding their long-term use is the emergence of nosocomial septic incidents related to infections caused by Coagulase negative staphylococci, most notably by *S. epidermidis*. The extensive use of antibiotics has resulted in multi-resistant bacterial strains of normal flora, making the need for developing antibacterial biomaterials of great importance. For this purpose it is necessary to study and understand the mechanism of bacterial adhesion to the surface of biomaterials.

In this direction, we investigated the influence of the physicochemical interactions between bacteria and materials, the shear rate and their relative contribution on the ability of bacteria to adhere to the biomaterial surface and to activate the *ica* genes, which are responsible for the production of extracellular polymeric (slime), and in particular for the production of polysaccharide intercellular adhesin (PIA), that mediates cell-cell interactions. For this study, the surface of existing biomaterials was modified by plasma methods, self-assembled monolayers were prepared on glass, and the materials were physicochemically characterized. The applicability of the colloidal theories, such as the thermodynamic, the DLVO and the extended DLVO, for the prediction of bacterial adhesion was examined as well.

The results showed that the increase in material surface energy and its polar component reduced bacterial adhesion, whereas adhesion was not significantly influenced by the non-polar character of the material surface. The thermodynamic theory explained satisfactorily the results for high ionic strength solutions, while DLVO for solutions with low ionic strength. The extended DLVO theory explained well the effects of both the solution and material surface properties to bacterial adhesion. The increase in shear rate reduced the number of adherent bacteria in a manner that depended on the bacteria-material physicochemical interactions, but not in the way that the above theories predicted. Therefore, bacterial adhesion considered as the result of a combination of the physicochemical and hydrodynamic interactions, and the formation of macromolecular bonds. The investigation of *ica* genes expression showed that the expression enhanced by the decrease in the material surface energy the increase in shear rate.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. **Katsikogianni M., Missirlis Y. F.**, European Cells Mater. (2004) 8, 37-57.
2. Adhesion of slime producing *Staphylococcus epidermidis* strains to PVC and diamond-like carbon/silver/fluorinated coatings. **Katsikogianni M., Spiliopoulou I., Dowling D. P., Missirlis Y. F.**, J. Mater. Sci. Mater. Med. (2006) 17(8), 679-689.
3. Plasma surface treatment of polyethylene terephthalate films for bacterial repellence. **Amanatides E., Mataras D., Katsikogianni M., Missirlis Y. F.**, Surf. Coat. Techn. (2006) 200, 6331-6335.
4. Plasma treated and a-C:H coated PET performance in inhibiting bacterial adhesion. **Katsikogianni M. G., Syndrevelis C. S., Amanatides E., Mataras D. S., Missirlis Y. F.**, Plasma Processes and Polymers, (2007) 4 (S1), S1046-S1051.
5. Theoretical and experimental approaches of bacteria-biomaterial interactions. **Missirlis Y. F., Katsikogianni M.**, Mater. Sci. Eng. Techn. (Mat.-wiss. u. Werkstofftech.) (2007) 38(12), 983-994.
6. *Staphylococcus epidermidis* Adhesion to He, He/O₂ Plasma Treated PET Films and Aged Materials: Contributions of Surface Free Energy and Shear Rate. **Katsikogianni M., Amanatides E., Mataras D. S., Missirlis Y. F.**, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces (2008) 65, 257-268.