

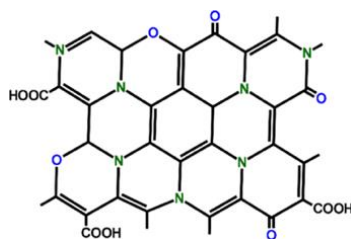
ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΠΟΡΩΔΟΥΣ ΚΥΒΟΕΙΔΟΥΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΦΥΚΗ**Δ. Καραγεώργου¹, Ε. Θώμου², Μ. Πατήλα¹, Κ-Μ. Λύρα², Ν. Χαλμπές², Α. Ενωτιάδης², Α. Πολύδερα¹, Κ. Σπύρου², Π. Καταπόδης¹, Δ. Γουρνής², Χ. Σταμάτης^{1*}**¹Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα²Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, 45110 Ιωάννινα, Ελλάδα
(*hstamati@uoi.gr)**ΠΕΡΙΛΗΨΗ**

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η μελέτη της επίδρασης μίας πρόσφατα σχηματισμένης δομής άνθρακα με εξαιρετικές ιδιότητες, των νανοσωματιδίων πορώδους κυβοειδούς άνθρακα (PCC), σε κύτταρα ενός Gram- αρνητικού βακτηρίου (*Escherichia coli*), ενός Gram-θετικού βακτηρίου (*Corynebacterium glutamicum*), καθώς και των μικροφυκών *Chlamydomonas reinhardtii* και *Chlorella vulgaris* αντίστοιχα. Πιο συγκεκριμένα, η επίδραση των PCCs που είχαν υποστεί οξειδωση (PCC-ox) ή προσθήκη μετάλλου (PCC-Cu και PCC-Ag) τόσο σε βακτήρια όσο και σε μικροφύκη εξετάστηκαν υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων και διαφορετικούς χρόνους αλληλεπίδρασης με τα κύτταρα. Επιπροσθέτως, η επίδρασή τους έναντι της ανάπτυξης των κυττάρων των μικροφυκών προσδιορίστηκε μέσω της μέτρησης του επιπέδου των συνολικών χλωροφυλλών κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Διαπιστώθηκε ότι η παρουσία των νανοϋλικών προκαλεί αναστολή του πολλαπλασιασμού τόσο των βακτηριακών κυττάρων *E. coli* και *C. glutamicum* όσο και των μικροφυκών *C. reinhardtii* και *C. vulgaris*. Η αναστολή αυτή σχετίζεται τόσο με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικών των νανοσωματιδίων, όσο και με τη συγκέντρωσή τους. Επιπλέον, διαπιστώθηκε πώς η ανασταλτική αυτή δράση είναι άμεσα σχετιζόμενη με το χρόνο αλληλεπίδρασης των νανοσωματιδίων με τα βακτηριακά κύτταρα ή και τα κύτταρα των μικροφυκών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα μεταλλικά νανοσωματίδια (NPs), όπως αργύρου, χαλκού, χρυσού, τιτανίου και οξειδωμένου αργύρου ^[1,2] έχουν μελετηθεί και έχουν εμφανίσει αντιβακτηριακές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών, ο Ag παρουσιάζει εξαιρετικές αντιβακτηριακές ιδιότητες, ενώ ο Cu και ο οξειδωμένος Cu έχουν χρησιμοποιηθεί σαν εναλλακτικά συστατικά με αποτελεσματικές αντισηπτικές ιδιότητες ^[3]. Οι ενισχυμένες αντιβακτηριακές ιδιότητες προέρχονται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των μεταλλικών NPs, καθώς έχουν υψηλή ειδική επιφάνεια και αυξημένη κινητικότητα σε σχέση με τα υλικά σε μορφή σκόνης ^[4,5]. Παρόλα αυτά, κάποιοι περιορισμοί παρεμποδίζουν τις ιδιαίτερες ιδιότητες των μεταλλικών NPs όταν χρησιμοποιούνται ως ανεξάρτητες μονάδες. Οι πιο σημαντικοί περιορισμοί είναι η τοξικότητα και τα φαινόμενα συσσωμάτωσης ^[6], που περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό την αντιμικροβιακή ικανότητά τους.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να επιτευχθούν σε επίπεδο νανοκλίμακας τα αποτελέσματα και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των NPs που περιέχουν Ag και Cu, μέσω της ακινητοποίησής τους σε μία νέα μορφή πορώδους άνθρακα με εξαιρετικές ιδιότητες που αναφέρεται ως πορώδης κυβοειδής άνθρακας (PCC) ^[7]. Αυτή η νέα νανοδομή αποτελεί ένα υλικό υψηλής απόδοσης ενσωματώνει μια σειρά από ιδιότητες όπως το ελαφρύ βάρος, ασυνήθιστη υδρόφιλη συμπεριφορά, μεγάλη σταθερότητα, ετερογένεια επιφάνειας και υψηλό ιεραρχημένο πορώδες (800-900 m²/g) (σχήμα 1) ^[7]. Ο συγκεκριμένος γεωμετρικός χαρακτήρας, το ιεραρχημένο πορώδες και η επιφάνειά του, καθιστά τα PCC ιδανικές μήτρες όπου μπορούν να φιλοξενηθούν μεταλλικά NPs με ομοιογενή τρόπο. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγονται τα φαινόμενα συσσωμάτωσης, που υποβαθμίζουν τις ιδιότητες των NPs.



Σχήμα 1: Απεικόνιση της δομής του Κυβοειδούς Άνθρακα.

Επιπλέον έγινε η προσπάθεια εισαγωγής ομάδων οξυγόνου (καρβονυλο-, καρβοξυλο-, επόξυ- ομάδες) με τη χρήση μιας τροποποιημένης μεθόδου Staudenmaier, ώστε να διερευνηθεί η επίδραση αυτού του τύπου τροποποίησης στην αντιμικροβιακή δράση. Το νέο υλικό που είναι πλούσιο σε ομάδες οξυγόνου ονομάστηκε PCC-ox. Με αυτό τον τρόπο παρουσιάζεται μία εύκολη, αποτελεσματική και χαμηλού κόστους εναλλακτική μέθοδος, όπου αποφεύγεται το στάδιο της ακινητοποίησης μετάλλου. Στην παρούσα δουλειά, έχει γίνει και η σύνθεση δύο διαφορετικών νανοδομών μέσω της ενθυλάκωσης Cu και Ag στη δομή του PCC, που ονομάζονται PCC-Cu και PCC-Ag.

Για την ανάπτυξη εφαρμογών, είναι απαραίτητη η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ νανουλικών και βιολογικών συστημάτων. Η τοξικότητα ορισμένων NPs έχει ήδη επισημανθεί [8]. Επιπλέον καθώς πολλά νανοϋλικά απελευθερώνονται στο περιβάλλον είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω των προϊόντων στα οποία είναι ενσωματωμένα, υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης των οικοσυστημάτων [9-11].

Σε αυτή την εργασία, έγινε η μελέτη της επίδρασης των PCC, PCC-ox, PCC-Cu, PCC-Ag σε ένα παθογόνο gram⁻ βακτήριο, το *E. coli*, σε ένα gram⁺ βακτήριο που χρησιμοποιείται ευρέως στη μεταβολική μηχανική, το *C. glutamicum*, καθώς και στο μικροφύκος *C. reinhardtii*, που αποτελεί ένα εξαιρετικό οικοτοξικολογικό μοντέλο [12-13]. Η βακτηριοκτόνος ικανότητα των υλικών αυτών μελετήθηκε μέσω του βαθμού θανάτου του βακτηριακού πληθυσμού, ενώ η επίδραση στα μικροφύκη μέσω της παραγωγής των χλωροφυλλών. Επιπροσθέτως, η εξέταση της επίδρασης τους στα κύτταρα των μικροφυκών θα υποδείξει το επίπεδο της περιβαλλοντικής τοξικής τους δράσης και τη δυνατότητα χρήσης τους ως αντιμικροβιακά εργαλεία.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Σύνθεση των PCC, PCC-ox, PCC-Cu, PCC-Ag

Η σύνθεση του PCC επετεύχθη μέσω του γρήγορου συντονισμού 4,4'-διπυριδίνης και ιόντων χαλκού παρουσία του συμπολυμερούς F127 σε διάλυμα νερού/αιθανόλης, και συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση. Ακολούθησε πυρόλυση (500°C για 2h) υπό ατμόσφαιρα αργού και εν συνεχεία εμβάπτιση σε νιτρικό οξύ (4M) για 24h έτσι ώστε να απομακρυνθεί ο χαλκός. Τέλος, το υλικό λήφθηκε με φυγοκέντρηση και εκπλύθηκε έως ότου pH~5. Για τη σύνθεση του μεταλλο-υποκατεστημένου κυβοειδή άνθρακα (PCC-Ag και PCC-Cu) τα PCC διαλύθηκαν σε υδατικό διάλυμα άλατος μετάλλου (10% w-w), λήφθηκαν με φυγοκέντρηση, ακολούθησε η επαναδιασπορά τους σε ένα νέο διάλυμα, παραλήφθηκαν με φυγοκέντρηση και αφυδατώθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Στην περίπτωση του PCC-Cu το υλικό υποβλήθηκε και σε θέρμανση στους 200°C για μία ώρα παρουσία αέρα προκειμένου να ληφθούν NPs οξειδωμένου χαλκού. Τέλος, η σύνθεση του οξειδωμένου PCC πραγματοποιήθηκε όπως αναφέρθηκε και παραπάνω με μια ελαφρώς τροποποιημένης εκδοχής της μεθόδου Staudenmaier που περιλαμβάνει οξείδωση του PCC με χρήση ισχυρών οξειδωτικών μέσων (H₂SO₄, HNO₃ και KClO₃).

Προσδιορισμός αντιβακτηριακής δράσης

Η αντιβακτηριακή ικανότητα των PCCs ελέγχθηκε έναντι των *E. coli* και *C. glutamicum* ATCC 21253. Τα βακτήρια αναπτύσσονται σε LB, υπό ανάδευση, στους 37 °C. Περίπου 10⁷ cfu/mL κυττάρων

που βρίσκονται στην εκθετική φάση, προστίθενται σε 0,9% NaCl και αφήνονται να αλληλεπιδράσουν για 2,6,12 ώρες με διαφορετικές συγκεντρώσεις των PCCs. Τελικά 25μl από τα παραπάνω, προστίθενται σε Nunclon Delta 96-Well MicroWell Plates from Thermo Scientific, που περιέχει LB broth medium (τελικός όγκος 250μl) και η ανάπτυξη προσδιορίζεται από το OD₆₀₀. Η θανατηφόρα επίδραση υπολογίζεται από το ποσοστό αναστολής της ανάπτυξης των κυττάρων που έχουν αλληλεπιδράσει με τα PCCs σε σχέση με τα κύτταρα που δεν αλληλεπιδράσαν.

Προσδιορισμός χλωροφυλλών

Οι συνολικές χλωροφύλλες (α και β) προσδιορίστηκαν μετά από 2, 4, 6 και 8 ημέρες αλληλεπίδρασης των κυττάρων των μικροφυκών με τα PCCs (5μg/ml). Ο προσδιορισμός τους έγινε με βάση το πρωτόκολλο του Porra et al ^[14].

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Με χρήση Ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM/EDX) και Μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (AFM) επιβεβαιώθηκε η κυβική δομή των PCC, τα οποία διαθέτουν μία πολύ τραχιά επιφάνεια αλλά και πολλούς μακρο-πόρους κατανομημένους στην επιφάνεια και το μέσο πάχος τους υπολογίστηκε στα 8.04 nm σύμφωνα με μετρήσεις ποροσιμετρίας. Στην περίπτωση της προσθήκης μετάλλων (PCC-Ag και PCC-Cu) η μορφολογία διατηρείται σχεδόν ανεπηρέαστη ενώ στην περίπτωση των οξειδωμένων PCC το κυβικό σχήμα εμφανίζεται ελαφρώς διαταραγμένο, ειδικά στις ακμές των κύβων, και το πάχος μειώνεται στο μισό (3.85 nm).

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η δομή καθώς και οι λειτουργικές ομάδες των PCC και PCC-ox, χρησιμοποιήθηκε η Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων- X (XPS). Σύμφωνα με τις πληροφορίες που εξάγονται από την ανάλυση των κορυφών C1s των υλικών, στο PCC υπάρχουν δεσμοί C-C (51.6%), C-O και C-N (27.9%), C=O (12.3%), καρβοξυλομάδες (4.6%) καθώς και μία συνιστώσα (3.6%) η οποία είναι χαρακτηριστική των κυβικών δομών. Στην περίπτωση του PCC-ox έχουμε μείωση στο ποσοστό των δεσμών C-C (34%) και C=O (5.2%), με παράλληλη αύξηση των ποσοστών των C-O/C-N (42%) και των καρβοξυλομάδων (6.7%). Επιπλέον, στο οξειδωμένο υλικό εισάγεται η συνιστώσα που οφείλεται στις εποξυ ομάδες με 12.1%.

Η θερμική συμπεριφορά των υλικών καθώς και το ποσοστό των μετάλλων στα PCC-Ag και PCC-Cu μελετήθηκε με διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) και με θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TG). Ένα σημαντικό στοιχείο που εξήχθη από αυτές τις μετρήσεις είναι ότι τα PCC είναι σταθερά και λειτουργικά σε θερμοκρασίες υψηλότερες σε σχέση με άλλα υλικά άνθρακα (400–500 °C), προσόν σημαντικό που τα καθιστά ιδανικά για ευρύ φάσμα εφαρμογών. Ακόμη, λόγω του ότι επιβεβαιώνεται ότι στο PCC δεν υπάρχουν ίχνη χαλκού που να προέρχονται από τη διαδικασία σύνθεσης, μπορεί να υπολογιστεί με ασφάλεια το ποσοστό παραμενοντων μετάλλων και νανοσωματιδίων οξειδίων μετάλλων στα PCC-Ag και PCC-Cu αντίστοιχα σε 4.2 και 4.5%.

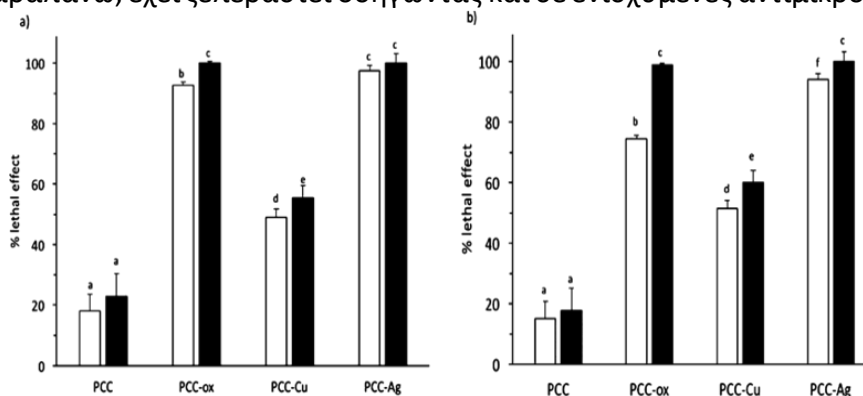
Επιπροσθέτως, μέσω μετρήσεων με XPS, αφού πρώτα επιβεβαιώθηκε η απουσία χαλκού που οφείλεται στη διαδικασία της σύνθεσης και λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση οξείδωσης των Cu NPs στα PCC-Cu (CuO), προσδιορίστηκε ότι η περιεκτικότητα σε χαλκό είναι 3.5% κατά βάρος. Αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη την ιοντική μορφή των νανοσωματιδίων Ag στα PCC-Ag, προσδιορίστηκε ότι η περιεκτικότητα σε άργυρο είναι 4.2% κατά βάρος.

Αντιβακτηριακή δράση των Κυβοειδών NPs

Τα PCCs σε συγκεντρώσεις 25 και 50 μg/ml οδήγησε σε αναστολή της ανάπτυξης κατά 18 και 23% των κυττάρων *E. coli* και 15 και 18% αντίστοιχα των κυττάρων *C. glutamicum*. Τα PCC-ox παρουσίασαν πιο δραστικό αποτέλεσμα με αναστολή που έφτασε σε 93 και 100% για το *E. coli* και 75 και 100% για το *C. glutamicum* στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις (Εικόνα1). Το PCC-Cu (25 και 50μg/ml) εμφάνισε ανασταλτική δράση της τάξης του 49 και 56% για το *E. coli* και 51 και 60% αντίστοιχα για το *C. glutamicum*. Οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του PCC-Cu οφείλονται στην

παρουσία του μετάλλου. Η πιο δραματική αναστολή του βακτηριακού πληθυσμού παρατηρείται στην περίπτωση του PCC-Ag, με 98 και 100% αναστολή στο *E. coli* και 94 και 100% για το *C. glutamicum* στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Αφού υπολογίστηκε το ποσοστό του Ag που αλληλεπίδρασε με τα κύτταρα (2,1μg/ml στα 50μg/ml και 1μg/ml στα 25μg/ml), διαπιστώθηκε ότι η αντιβακτηριακή δράση του PCC-Ag είναι ενισχυμένη σε σχέση με άλλα υλικά. Το ίδιο ισχύει και στην περίπτωση του PCC-Cu. Συμπεραίνεται λοιπόν πως το φαινόμενο συσσωμάτωσης που αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους περιορισμούς όπως αναφέρθηκε παραπάνω, έχει ξεπεραστεί οδηγώντας και σε ενισχυμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες.



Εικόνα 1: % Αναστολής του βακτηριακού πληθυσμού των *E.coli* (a) και *C.glutamicum* (b) έπειτα από 12h αλληλεπίδρασης με τα PCC, PCC-ox, PCC-Cu, PCC-Ag σε συγκεντρώσεις των 25μg/ml(λευκές στήλες) και 50μg/ml(μαύρες στήλες).

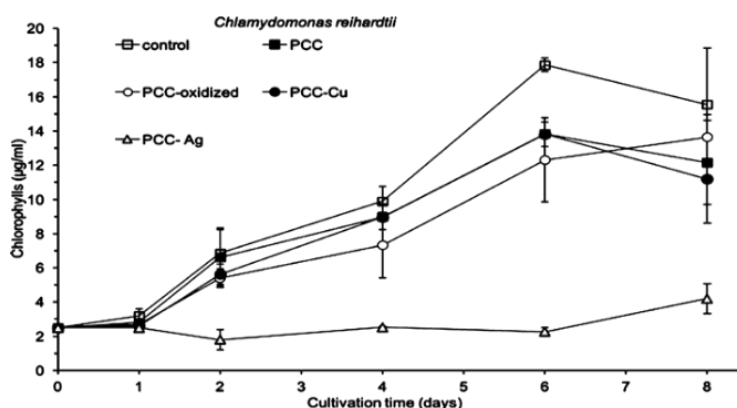
Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή αντιμικροβιακή δράση των τροποποιημένων PCCs εξετάστηκε η επίδραση του χρόνου αλληλεπίδρασης στους βακτηριακούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι υπάρχει μία αναλογική σχέση μεταξύ του χρόνου αλληλεπίδρασης και της θανατηφόρας επίδρασης στα βακτήρια, καθώς όσο αυξάνεται ο χρόνος, αυξάνεται και το ποσοστό των κυτταρικών θανάτων. Έτσι η 100% αναστολή της αύξησης του *E.coli* παρουσία PCC-Ag (50μg/ml) εμφανίζεται μετά από 2h αλληλεπίδρασης, ενώ για το PCC-ox απαιτούνται 12h.

Τέλος καθώς το PCC-Ag παρουσίασε την ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση, ελέγχθηκε η επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του υλικού (2,5-50μg/ml). Και για τα δύο βακτηριακά στελέχη, η μείωση του πληθυσμού είναι άμεσα σχετιζόμενη με τη δόση του υλικού, με το LC₅₀ για το *E.coli* να είναι 7,4±0,8 και για το *C. glutamicum* να είναι 14,0±1,0.

Επίδραση των PCCs στην ανάπτυξη των μικροφυκών

Δεδομένου ότι κάποια νανοϋλικά μπορεί να καταλήξουν στα υδάτινα οικοσυστήματα, πραγματοποιήθηκε μία πρωταρχική μελέτη των επιδράσεων που μπορεί να προκαλέσουν. Έτσι πραγματοποιήθηκε η έκθεση κυττάρων *C. reinhardtii* με αρχική συγκέντρωση χλωροφύλλης 2,5μg/ml σε 5μg/ml PCCs. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης, το ποσοστό των χλωροφυλλών στην αναλογία κύτταρα/βιομάζα παρουσιάστηκε σταθερή. Όλα τα PCCs προκάλεσαν ένα ανασταλτικό αποτέλεσμα στην παραγωγή χλωροφυλλών με τρόπο σχετιζόμενο από τη σύσταση του υλικού. Πιο συγκεκριμένα οι ρυθμοί ανάπτυξης μειώθηκαν από 0,31±0,1 σε 0,27±0,1, 0,25±0,1, 0,28±0,1 d⁻¹ για τα PCC, PCC-ox και PCC-Cu. Αντίστοιχα οι ρυθμοί παραγωγής χλωροφυλλών μειώθηκαν από 2,46±0,36 σε 1,75±0,19, 1,6±0,221, 1,8±0,17 mg L⁻¹ d⁻¹. Επιπλέον την 6^η ημέρα καλλιέργειας, η συνολική παραγωγή χλωροφυλλών έχει παρουσιάσει αναστολή σε σύγκριση με την καλλιέργεια χωρίς την παρουσία υλικού (εικόνα2). Τα PCC, PCC-Cu, PCC-ox ανέστειλαν την παραγωγή χλωροφυλλών περίπου 30%, κάτι που πιθανόν οφείλεται στην καταστροφή του κυττάρου ή στην αλληλεπίδραση με το φωτοσυνθετικό μηχανισμό. Μία ενισχυμένη καταστολή της παραγωγής χλωροφυλλών παρουσιάστηκε στην περίπτωση του PCC-Ag, όπου μέσω οπτικού μικροσκοπίου διαπιστώθηκε η σχεδόν ολοκληρωτική καταστροφή των κυττάρων και των χλωροπλαστών. Η ανασταλτική επίδραση των μετάλλων στα μικροφύκη οφείλεται στην παραγωγή ROS, σε

καταστροφή των κυττάρων, στο φαινόμενο σκίασης και στην αλληλεπίδραση των μεταλλικών NPs με το μέσο καλλιέργειας.



Εικόνα 2: Επίδραση των PCC, PCC-ox, PCC-Cu, PCC-Ag (5µg/ml) στην παραγωγή χλωροφυλλών του *C. reinhardtii* κατά τη διάρκεια καλλιέργειας για χρονικό διάστημα 8 ημερών.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα PCCs εμφανίζουν μια πληθώρα από αντιβακτηριακές επιδράσεις που σχετίζονται με πολλούς παράγοντες: σύσταση του υλικού, δόση, βακτηριακό στέλεχος, χρόνος αλληλεπίδρασης. Τα PCCs με τροποποιήσεις (οξειδωση ή προσθήκη μετάλλου) φάνηκαν ικανά να προκαλέσουν αναστολή στην ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των *E. coli* και *C. glutamicum* κυττάρων, παρουσιάζοντας ένα σημαντικό βακτηριοκτόνο αποτέλεσμα σε σχέση με τα PCC. Πιο συγκεκριμένα, τα PCC-ox είναι ένα φθινό και αποτελεσματικό υλικό, ενώ το PCC-Ag έχει την ικανότητα να καταστρέφει τα βακτηριακά κύτταρα μετά από μόλις 2 ώρες αλληλεπίδρασης. Το περιβαλλοντικό αποτύπωμα των PCCs σε συγκέντρωση 5mg/l προσδιορίστηκε με τη χρήση του μικροφύκου *C. reinhardtii*. Οι ειδικοί ρυθμοί αύξησης των κυττάρων που εκτέθηκαν στα PCCs παρουσίασαν σχέση εξάρτησης με τη σύσταση του υλικού, με τα PCC-ox να εμφανίζουν αλλοιώσεις το κυτταρικό τους τοίχωμα και το PCC-Ag καταστροφή του φωτοσυνθετικού μηχανισμού. Περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη για τον προσδιορισμό του περιβαλλοντικού κινδύνου σε περίπτωση απόρριψης των PCCs.

Τα αποτελέσματα της μελέτης υποδεικνύουν πως τα PCC-ox και PCC-Ag αποτελούν καινοτόμα νανοϋλικά που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές όπου απαιτούνται αντιβακτηριακές ιδιότητες.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το έργο συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο) μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ). Η ερευνητική εργασία υποστηρίζεται από το Ελληνικό Ίδρυμα Έρευνας και Καινοτομίας (ΕΛΙΔΕΚ) και από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ), στο πλαίσιο της Δράσης «Υποτροφίες ΕΛΙΔΕΚ Υποψηφίων Διδακτόρων» (αρ. 1137 και αρ. 1829).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] S.M. Dizaj, F. Lotfipour, M. Barzegar-Jalali, M.H. Zarrintan, K. Adibkia. Mater. Sci. Eng., C 44 (2014) 278–284.
- [2] I.A. Mamonova, I.V. Babushkina, I.A. Norkin, E.V. Gladkova, M.D. Matasov, D.M. Puchin'yan. Nanotechnol. Russ 10 (2015) 128–134.
- [3] M. Amiri, Z. Etemadifar, A. Daneshkazemi, M. Nateghi. J. Dent. Biomater 4 (2017) 347–352.
- [4] A. Nel, T. Xia, L. Madler, N. Li, Science 311 (2006) 622–627.

- [5] E. Navarro, F. Piccapietra, B. Wagner, F. Marconi, R. Kaegi, N. Odzak, L. Sigg, R. Behra. *Environ. Sci. Technol* 42 (2008) 8959–8964.
- [6] W. Shao, S. Wang, J. Wu, M. Huang, H.Liu, H. Min. *RSC Adv* 6 (2016) 65879–65884.
- [7] G-P Hao, G. Mondin, Z. Zheng, T. Biemelt, S. Klosz, S, R. Schubel, A. Eychmüller, S. Kaskel. *Angew. Chem., Int. Ed.* 54 (2014) 1941–1945.
- [8] M. Patila, I.V. Pavlidis, A. Kouloumpis, K. Dimos, K. Spyrou, P. Katapodis, D. Gournis, H. Stamatis. *Int. J. Biol. Macromol* 84 (2016) 227–235.
- [9] C.H. da Costa, F. Perreault, A. Oukarroum, S.P. Melegari, R. Popovic, W.G. Matias. *Sci. Total Environ* 565 (2016) 951–960.
- [10] J.R. Lead, G.E. Batley, P.J.J. Alvarez, M.N. Croteau, R.D. Handy, M.J. McLaughlin, J.D. Judy, K. Schirmer. *Environ. Toxicol. Chem* 37 (2018) 2029–2063.
- [11] B. Nowack, J.F. Ranville, S. Diamond, J.A. Gallego-Urrea, C. Metcalfe, J. Rose, N. Horne, A.A. Koelmans, S.J. Klaine. *Environ. Toxicol. Chem* 31 (2012) 50–59.
- [12] F. Perreault, A. Oukarroum, L. Pirastru, L. Sirois, W.G. Matias, R. Popovic. *J. Bot.* 2010, 763142.
- [13] S.P. Melegari, F. Perreault, R.H.R. Costa, R. Popovic, W.G. Matias. *Aquat. Toxicol.* 142-143 (2013) 431–440.
- [14] R.J. Porra, W.A. Thompson, P.E. Kriedemann. *Biochim. Biophys. Acta* 975 (1989) 384–394.