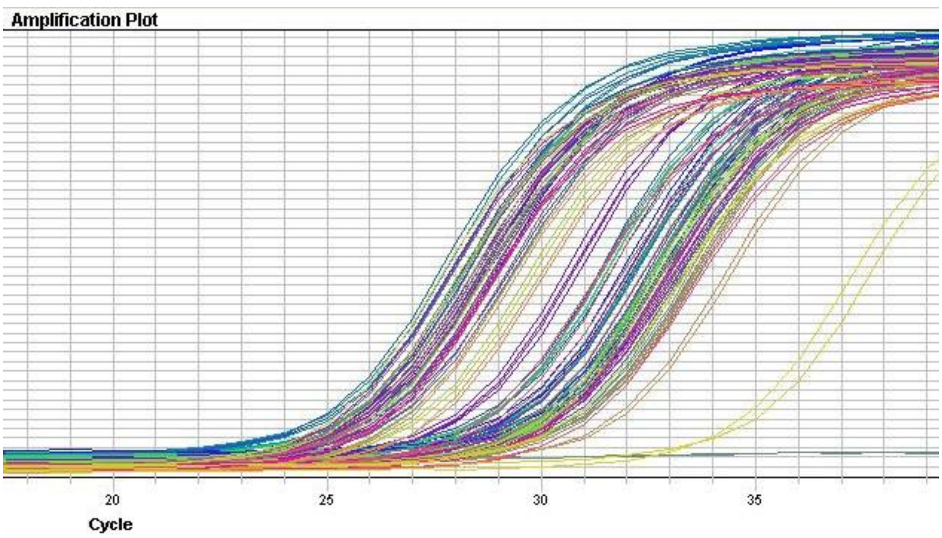
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ:ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΥΓΡΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ UV-A ΚΑΙ UV-C ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ

Εκπόνηση εργασίας: ΔΡΟΥΜΠΑΛΗ ΑΡΙΑΔΝΗ
Α.Μ: 2005050007



Χανιά 2010

Περιεχόμενα

I. ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα προπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και το Εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών και Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Βενιέρη Δανάη για την ανάθεση της παρούσας εργασίας αλλά και για την άριστη συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Χατζησυμεών Θάλεια, για την βοήθεια και την υποστήριξη της από την αρχή μέχρι την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Μαντζαβίνο Διονύσιο για την άριστη συνεργασία, καθώς και για την παραχώρηση του εργαστηρίου Τεχνικής Χημικών Διεργασιών & Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων κατά την περίοδο διεξαγωγής των πειραμάτων και τον κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο για τον χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν προσφέροντας μου την τόσο σημαντική ηθική συμπαράσταση κατά την διάρκεια της φοίτησης μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Το H_2O και η σημασία της άριστης ποιότητάς του

Το νερό αποτελεί βασικό στοιχείο ανάπτυξης και διατήρησης της ζωής στον πλανήτη. Η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού και των μεγάλων περιόδων ξηρασίας, τα τελευταία χρόνια, έχουν οδηγήσει στην επιβολή πιο αυστηρών μέτρων για την ορθολογική διαχείριση και διαφύλαξη της ποιότητας των υπαρχόντων αποθεμάτων νερού παγκοσμίως. Το χρησιμοποιούμενο για ανθρώπινη κατανάλωση νερό πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία των ανθρώπων, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ενώσεις σε συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Επομένως, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία αποτελούν τα πρότυπα ποιότητας και θεσπίζονται νομοθετικά. (Μήτρακας Μ.,1996)

Για το λόγο αυτό κρίνεται υψίστης σημασίας η αναγκαιότητα για απολύμανση τόσο του πόσιμου νερού όσο και του νερού που προέρχεται από τις εξόδους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων και προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση (κολύμβηση, αλιεία, άρδευση ή ακόμη και πόσιμο). Γενικότερα, ως απολύμανση ορίζεται η επεξεργασία εκείνη που έχει ως σκοπό την καταστροφή ή την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών που τυχόν περιέχει το νερό, ώστε να μην είναι ικανοί για την μετάδοση ασθενειών προστατεύοντας έτσι τη δημόσια υγεία.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, που συνήθως απαντώνται στα νερά, και είναι επικίνδυνοι για τη δημόσια υγεία, είναι συνήθως αλλόχθονοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι περνούν παροδικά μέσα στο υδάτινο οικοσύστημα, προερχόμενοι κυρίως από το γαστρεντερικό σωλήνα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων. Αυτοί είναι κυρίως βακτήρια αλλά και πρωτόζωα και ιοί. Κάθε παθογόνος μικροοργανισμός και όλοι οι άλλοι μικροοργανισμοί που αποβάλλονται με κόπρανα μεταφέρονται στον άνθρωπο αφού το νερό μπορεί να αναμιχθεί με μικροοργανισμούς που διατηρούνται στο έντερο του ανθρώπου και των ζώων.

Επειδή οι παθογόνοι μικροοργανισμοί βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις αλλά σε μεγάλη ποικιλία ειδών, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του κάθε είδους των μικροοργανισμών είναι πρακτικά αδύνατος. Έτσι, αντί για τον προσδιορισμό του κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών γίνεται ο προσδιορισμός ενδεικτικών μικροοργανισμών (δείκτες), η παρουσία των οποίων σημαίνει και την πιθανή μόλυνση των νερών από παθογόνους μικροοργανισμούς. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή , η *Escherichia coli*, οι *Enterococci.*

Στην παρούσα εργασία θα δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στη μελέτη της αδρανοποίησης και καταστροφής μικροοργανισμών όπως η *E.coli*, η οποία ανήκει στα κολοβακτηριοειδή, συνεπώς είναι μέλος της οικογένειας των εντεροβακτηρίων και θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του επεξεργασμένου νερού. Τα χαρακτηριστικά επιβίωσης και η ευαισθησία της στα απολυμαντικά είναι όμοια με εκείνα πολλών παθογόνων μικροβίων, ιδιαίτερα δε με την σαλμονέλα και την σιγκέλλα. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών, η *E.coli* είναι ο καλύτερος βιολογικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης του νερού. Η απομόνωσή της από δείγματα νερού, αποδεικνύει πέρα από κάθε αμφιβολία την πρόσμιξη του νερού με περιττωματικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι και οποιοσδήποτε άλλος μικροοργανισμός που τυχόν βρίσκεται στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να εισχωρήσει στο νερό και κατ' επέκταση και παθογόνοι μικροοργανισμοί, επισημαίνοντας τους δυνητικούς κινδύνους μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων.

2. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

2.1 Απολύμανση-ορισμός

Απολύμανση είναι η επεξεργασία εκείνη του νερού που έχει ως σκοπό την καταστροφή ή την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών που τυχόν περιέχει, ώστε να μην είναι ικανοί για την μετάδοση των αντίστοιχων ασθενειών και να προστατευτεί η δημόσια υγεία. Γενικότερα, ως απολύμανση ορίζεται η επεξεργασία εκείνη που έχει ως σκοπό τη διατήρηση των μικροοργανισμών ενός ανοικτού ή κλειστού δικτύου νερού σε επίπεδα που παρέχουν τη βεβαιότητα ότι το νερό είναι ασφαλές για αστική κατανάλωση. Στην περίπτωση των αποβλήτων η απολύμανση αποβλέπει στην προστασία των υδάτινων αποδεκτών. Είναι ουσιώδες να διευκρινισθεί η διαφορά μεταξύ της αποστείρωσης, η οποία σημαίνει πλήρη καταστροφή όλων των μικροοργανισμών και της απολύμανσης, η οποία χαρακτηρίζεται ως η εκλεκτική ελάττωση σε ανεκτά επίπεδα των μικροοργανισμών. (Palaiologou et al., 2007)

2.2 Μηχανισμοί Απολύμανσης

Οι πέντε βασικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την επεξήγηση της δράσης των απολυμαντικών είναι (1) φθορά του κυτταρικού τοιχώματος, (2) μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας, (3) μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος, (4) μεταβολή του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών και (5) παρεμπόδιση της ενζυματικής δράσης.

Η φθορά ή η καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος θα έχει σαν αποτέλεσμα τη λύση και το θάνατο του κυττάρου. Ορισμένες ενώσεις, όπως η πενικιλίνη παρεμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

Απολυμαντικά μέσα όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα απορρυπαντικά μεταβάλουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτές οι ενώσεις καταστρέφουν την εκλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης και επιτρέπουν τη διαφυγή ζωτικών συστατικών όπως το άζωτο και ο φώσφορος.

Η θερμότητα, η ακτινοβολία και τα ισχυρά οξέα ή τα αλκαλικά μέσα μετατρέπουν την κολλοειδή φύση του πρωτοπλάσματος. Η θερμότητα προκαλεί πήξη στην κυτταρική πρωτεΐνη και τα οξέα ή οι βάσεις μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες, προκαλώντας θανατηφόρες επιπτώσεις.

Η ακτινοβολία UV μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό διπλών δεσμών στους μικροοργανισμούς και να προκαλέσει ρήξη ορισμένων κλώνων DNA. Όταν απορροφώνται UV φωτόνια από το DNA βακτηρίων και πρωτόζωων και το DNA και RNA ιών, μπορεί να σχηματισθούν ομοιοπολικά διμερή (covalent dimers) από τις παρακείμενες θυμίνες του DNA ή τις ουρακίλες (uracils) του RNA. Ο σχηματισμός διπλών δεσμών διακόπτει τη διαδικασία αντιγραφής, ο οργανισμός δεν μπορεί πλέον να αναπαραχθεί και παραμένει έτσι ανενεργός.

Άλλος τύπος απολύμανσης είναι η παρεμπόδιση της ενζυματικής δράσης. Οξειδωτικά μέσα όπως το χλώριο, μπορούν να μεταβάλλουν τη χημική διευθέτηση των ενζύμων και να απενεργοποιήσουν τα ένζυμα. (Palaiologou et al., 2007).

2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την δράση των απολυμαντικών

Οι παράγοντες εκείνοι που επηρεάζουν την δράση των απολυμαντικών είναι οι ακόλουθοι :

Χρόνος επαφής

Ο χρόνος επαφής είναι μία σημαντική μεταβλητή: σύμφωνα με την H.Chick (1900), για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, η δράση του μεγαλώνει όσο αυξάνεται ο χρόνος επαφής. Αυτό εκφράζεται με τις ακόλουθες μαθηματικές σχέσεις:

$$\left(\frac{dN_t}{dt}\right) = -k\, N_t$$

Όπου

dN_t/dt : ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των οργανισμών με τον χρόνο
k: σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης (T^{-1})
N_t :ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t
t: χρόνος

Αν N_o είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών για t=0 τότε:

$$\frac{N_t}{N_o} = e^{-kt} \rightarrow ln\frac{N_t}{N_o} = -kt$$

όπου η τιμή της σταθεράς k, λαμβάνεται από το διάγραμμα $-\ln(N_t/N_o)$ ως προς τον χρόνο t.

Συγκέντρωση του απολυμαντικού

Σύμφωνα με τον Watson (1900), η σταθερά απενεργοποίησης σχετίζεται με την συγκέντρωση ως ακολούθως:

$$k = k' \cdot C \cdot n$$

όπου
k: η σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης,
k΄: σταθερά θανάτωσης,
C: συγκέντρωση του απολυμαντικού,
n: συντελεστής διάλυσης, και συνδυάζοντας με την σχέση (1) καταλήγουμε στην ακόλουθη μαθηματική σχέση:

$$\frac{N_t}{N_o} = e^{-k'C^n t} \rightarrow ln\frac{N_t}{N_o} = -k'C^n t$$

$$lnC = -\frac{1}{n}lnt + \frac{1}{n}ln\left[\frac{1}{k'}\left(-ln\frac{N_t}{N_o}\right)\right]$$

Από τον νόμο της Chick, υπάρχουν αποκλίσεις: (α) το φαινόμενο υστέρησης (ή ώμου) όπου τα συστατικά του υγρού αντιδρούν αρχικά με το απολυμαντικό, καθιστώντας το απολυμαντικό ανενεργό, (β) το φαινόμενο απόληξης όπου μεγάλα σωματίδια προστατεύουν τους οργανισμούς που πρόκειται να απολυμανθούν, (γ) ο συνδυασμός των φαινομένων υστέρησης και απόληξης.

Ένταση και φύση του φυσικού αντιδραστηρίου ή των μέσων

Η θερμότητα και το φως είναι φυσικά μέσα απολύμανσης, των οποίων η απόδοση εξαρτάται από την ισχύ τους. Αν για παράδειγμα η αποσύνθεση των οργανισμών περιγράφεται από από μία 1ης τάξεως αντίδρασης, τότε η επίδραση της ισχύος του φυσικού απολυμαντικού αντιπροσωπεύεται από την σταθερά k.

Η θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό θανάτωσης με χημικά απολυμαντικά μπορεί να γίνει κατανοητή από την παρακάτω εξίσωση, μία μορφή ***van't Hoff and Arrhenius*** :

$$\ln (t_1/t_2)=[E(T_2-T_1)/RT_1T_2]$$

όπου

t_1, t_2 : ο χρόνος για δεδομένο ποσοστό θανάτωσης σε θερμοκρασίες T_1 και T_2 αντίστοιχα

E: ενέργεια ενεργοποίησης, J/mole (cal/mole)

R: σταθερά των αερίων, 8.3144 J/mole K (1.99cal/mole K)

Η αύξηση της θερμοκρασίας, έχει ως αποτέλεσμα μία πιο γρήγορη θανάτωση των μικροοργανισμών.

Μικροβιακό φορτίο

Η απόδοση των διαφόρων απολυμαντικών επηρεάζεται από την φύση, τον τύπο και την κατάσταση στην οποία βρίσκονται οι μικροοργανισμοί και αποτελεί κριτήριο για την επιλογή του κατάλληλου απολυμαντικού, ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση.

Η φύση του υγρού

Στα πειράματα χρησιμοποιούνται δείγματα με απιονισμένο νερό. Στην πράξη θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα χαρακτηριστικά του υπό μελέτη νερού, η ύπαρξη των οποίων μπορεί να δράσει ανασταλτικά στην αποδοτικότητα του απολυμαντικού (π.χ. η παρουσία αιωρούμενης ύλης θα μπορούσε να μειώσει την αποδοτικότητα του απολυμαντικού, με την απορρόφηση του απολυμαντικού αλλά και με την προστασία των παγιδευμένων βακτηρίων). (Δρόσου,2007)

2.4 Χλωρίωση

Η συνήθης μέθοδος απολύμανσης του νερού και των αστικών λυμάτων είναι η χλωρίωση και χρησιμοποιήθηκε το 1914 στην Altoona, PA και στο Milwakee, για την απολύμανση υγρών αποβλήτων. Είναι όμως και η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απολύμανση πόσιμου νερού. Τα πρώτα προβλήματα ανέκυψαν στις αρχές της δεκαετίας του ’40 στις Η.Π.Α. (δυσάρεστη γεύση και οσμή). Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, αλλά και θεμάτων που σχετίζονται με την ασφαλή διαχείριση των εγκαταστάσεων απολύμανσης, την ελάττωση των επιπτώσεων των παραπροϊόντων της απολύμανσης, τη μείωση του λειτουργικού κόστους και φυσικά τη βελτίωση της απολυμαντικής δράσης αναπτύχθηκαν παράλληλα και με τις τεχνολογικές εξελίξεις νέες μέθοδοι χλωρίωσης ή και παραλλαγές της απολύμανσης με χλώριο (όπως διοξείδιο του χλωρίου και υποχλωριώδες νάτριο) (Parsons et al.,2004).

Αν και ο τρόπος με τον οποίο το χλώριο καταστρέφει τους μικροοργανισμούς δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος, για τα βακτηρίδια η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το χλώριο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη τους και αδρανοποιεί ορισμένα ένζυμα που είναι απαραίτητα για τη ζωή τους. Επειδή η αντίδραση χλωρίου ενζύμων είναι αντιστρέψιμη σε χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου είναι δυνατόν τα ένζυμα να επανασχηματισθούν και να συνεχίσουν την λειτουργία τους.

Η αδρανοποίηση των ενζύμων ή των DNA και RNA των μικροοργανισμών προϋποθέτει τη διείσδυση του χλωρίου μέσα στο κύτταρο. Επειδή οι περισσότεροι μικροοργανισμοί όμως έχουν μέσα στο νερό αρνητικό φορτίο, το OCl^- απωθείται και διεισδύει δύσκολα (λόγω του ομώνυμου φορτίου) ενώ το HOCl πλησιάζει και διεισδύει ευκολότερα στο κύτταρο και έτσι έχει μεγαλύτερη απολυμαντική δράση από το OCl^- (Μάρακας, 2006).

Οι βασικές μορφές με τις οποίες χρησιμοποιείται το χλώριο ως απολυμαντικό είναι:

- υγρό – αέριο χλώριο (Cl_2)
- υποχλωριώδη άλατα (νάτριο $NaOCl$ ή ασβέστιο $Ca(OCl)_2$)
- διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2)

Το υποχλωριώδες νάτριο διατίθεται υπό μορφή υδατικού διαλύματος ενώ το υποχλωριώδες ασβέστιο υπό μορφή κοκκώδους υλικού ή συμπιεσμένων ταμπλετών. Σημειώνεται ότι η μείωση της περιεκτικότητας σε διαθέσιμο χλώριο ενός διαλύματος υποχλωριώδους νατρίου με την πάροδο του χρόνου θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τον υπολογισμό των εφαρμοζόμενων δόσεων χλωρίωσης.

Το διοξείδιο του χλωρίου έχει καλή απολυμαντική δράση και δημιουργεί πολύ λίγα παραπροϊόντα, όπως τριαλομεθάνια. Είναι όμως ασταθές αέριο και δεν μπορεί να παραχθεί σε εμπορεύσιμη μορφή, αλλά πρέπει να παράγεται στο σημείο χρήσης κάτω από αυστηρές διαδικασίες ασφαλείας. Σε σύγκριση με το ελεύθερο χλώριο παρουσιάζει καλύτερη δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων και μικρότερη δράση έναντι ιών.

Σε κάθε περίπτωση, συγκρίνοντας παράγοντες όπως το μέγεθος και το κόστος της εγκατάστασης χλωρίωσης, τη διαθεσιμότητα των υλικών που απαιτούνται για την συνεχή λειτουργία της, τον επιδιωκόμενο βαθμό απολύμανσης, τις απαιτήσεις εξοπλισμού και προσωπικού για τη λειτουργία – συντήρηση, τη μεταφορά και αποθήκευση του υλικού και την ασφάλεια του συνόλου της εγκατάστασης, καταλήγουμε στην επιλογή της καταλληλότερης μορφής.

Το πλεονέκτημα της χλωρίωσης, έναντι άλλων απολυμαντικών ουσιών, είναι η εύκολη χρήση του, το χαμηλό κόστος, η ισχυρή δραστικότητα του σε πολλούς παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά και η υπολειμματική του δράση (παραμένει σαν προστατευτικός παράγοντας για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα στο νερό).

Παρόλο που η χρήση του χλωρίου για την απολύμανση του πόσιμου νερού και των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων είναι ιδιαίτερης σημασίας για την δημόσια υγεία, η συνεχής χρήση του έχει προκαλέσει σοβαρές ανησυχίες. Τα βασικότερα πλεονεκτήματα είναι ότι:

1. Ορισμένες χημικές ενώσεις που βρίσκονται στο νερό μπορεί να αντιδράσουν με το χλώριο σχηματίζοντας διάφορα παραπροϊόντα όπως τα τριαλογονομεθάνια, τα οποία έχουν αποδειχτεί επικίνδυνα για την υγεία ως καρκινογόνα.

2. Η χλωρίωση του νερού είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με προβλήματα οσμής και γεύσης του νερού, τα οποία οφείλονται όχι μόνο στο χλώριο καθ' αυτό αλλά και σε διάφορα παραπροϊόντα απολύμανσης, τα οποία προσδίδουν αυτή τη χαρακτηριστική, έντονη οσμή και γεύση στο νερό.

3. Η απολύμανση του νερού με χλώριο απαιτεί και ένα ακόλουθο βήμα αποχλωρίωσής του, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές τοξικές επιδράσεις των υπολειμμάτων χλωρίου καθώς και των παραπροϊόντων απολύμανσης στους υδρόβιους μικροοργανισμούς, ειδικά αν αυτό το νερό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση.

4. Η χλωρίωση του νερού δεν το καθιστά καθαρό καθώς αρκετοί μικροοργανισμοί είναι ανθεκτικοί στο χλώριο. Παράσιτα όπως η *Giardia* και το *Cryptosporidium* ευθύνονται για αρκετές γαστρεντερικές παθήσεις. Επιπλέον αρκετοί ιοί και παθογόνα βακτήρια είναι ανθεκτικά στο χλώριο, γεγονός που ενέχει αρκετούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου, οπότε και κρίνεται απαραίτητη η χρήση άλλων απολυμαντικών μεθόδων.

2.5 Προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι απολύμανσης

Στο πλαίσιο αναζήτησης εναλλακτικών μεθόδων απολύμανσης, φιλικών προς το περιβάλλον (καθαρές τεχνολογίες), μπορεί να ενταχθεί και το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την χρησιμοποίηση των προηγμένων οξειδωτικών μεθόδων απολύμανσης (ΠΟΜΑ). Με τον όρο αυτό εννοούνται κυρίως εκείνες οι τεχνολογίες οι οποίες στηρίζονται στην χρήση μεθόδων όπως ο οζονισμός (O_3, O_3/UV, O_3/H_2O_2), η ετερογενής φωτοκατάλυση (TiO_2/UV), το αντιδραστήριο Fenton (Fe_2^+/H_2O_2) και φωτο-Fenton (UV/Fe_2^+/H_2O_2), η ηλεκτροχημική οξείδωση, η οξείδωση σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες (καταλυτική ή μη), η χρήση υπερήχων, κ.α. (Parsons et al., 2004).

Η ραγδαία ανάπτυξή τους την τελευταία δεκαετία οφείλεται, αφενός στην ικανότητά τους να αδρανοποιούν τις πλέον βλαβερές/τοξικές και μη βιοαποδομήσιμες οργανικές ουσίες που συναντώνται στην υγρή και αέρια φάση, αφετέρου δε στους ολοένα και πιο αυστηρούς περιβαλλοντικούς νόμους που θέτει σε εφαρμογή η πολιτεία.

Οι διεργασίες προχωρημένης οξείδωσης αφορούν το σχηματισμό και την χρήση της ελεύθερης ρίζας του υδροξυλίου ($HO^{\cdot}$) ως ένα ισχυρό οξειδωτικό μέσο για την καταστροφή ενώσεων οι οποίες δεν μπορούν να οξειδωθούν με την χρήση συμβατικών οξειδωτικών μέσων (π.χ οξυγόνο, όζον, χλώριο). Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με τα διαλυτά συστατικά εκκινώντας μια σειρά αντιδράσεων οξείδωσης. Πρόκειται για ιδιαίτερα ισχυρά οξειδωτικά σώματα τα οποία, αντιδρούν με οργανικές ενώσεις αποσπώντας H^- και δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες.

Οι τελευταίες προκαλούν οξειδωτικές θερμικές αντιδράσεις, οι οποίες τελικά οδηγούν στην πλήρη μετατροπή των οργανικών ενώσεων σε CO_2, H_2O και ανόργανα άλατα. Οι ρίζες υδροξυλίου δεν είναι επιλεκτικές, μπορούν να δράσουν σε κανονική θερμοκρασία και πίεση και είναι ικανές να οξειδώσουν σχεδόν όλες τις υπάρχουσες ανηγμένες ενώσεις χωρίς κάποιο περιορισμό στην κλάση ή την ομάδα των ενώσεων σε αντίθεση με άλλα οξειδωτικά.

Στις ΠΟΜΑ οι ενώσεις των υγρών αποβλήτων αποικοδομούνται και δεν συγκεντρώνονται ή μεταφέρονται σε άλλη φάση. Δεν παράγονται δευτερογενή απόβλητα και επομένως δεν υπάρχει η ανάγκη για διάθεση ή αναγέννηση υλικών. (Δρόσου,2007).

Οι ΠΟΜΑ έχουν τα παρακάτω πλεονεκτήματα:

- Συντελούν στην επίλυση και όχι στη μεταφορά του προβλήματος.
- Αδρανοποιούν τις περισσότερες βλαβερές οργανικές και ανόργανες ουσίες.
- Σημαντικό πλεονέκτημα των $OH^{\cdot}$ είναι η μη επιλεκτική προσβολή των διάφορων οργανικών ενώσεων, στοιχείο που επιτρέπει την εφαρμογή τους σε όλων σχεδόν των ειδών τα απόβλητα, που περιέχουν οργανικούς ρύπους.
- Η προεπεξεργασία λυμάτων με κάποια από τις ΠΟΜΑ διευκολύνει την ακολουθούμενη βιολογική επεξεργασία, λόγω της δημιουργίας βιο-αποικοδομήσιμων προϊόντων, καθώς και λόγω της μείωσης της τοξικότητας των λυμάτων.
- Η προεπεξεργασία των λυμάτων, καθιστά μεθόδους όπως η αντίστροφη ώσμωση και ιοντοανταλλαγή κατά πολύ οικονομικότερες, λόγω της αποτροπής δημιουργίας συσσωματωμάτων οργανικής ύλης.
- Χρησιμοποιούν φιλικότερα προς το περιβάλλον αντιδραστήρια.
- Συντελούν στη δραστική μείωση της παραγόμενης λάσπης.
- Έχουν δυνατότητα χρήσης της ηλιακής ακτινοβολίας. (Δρόσου,2007)

Τα μειονεκτήματα που θα μπορούσαμε να αναφέρουμε σχετικά με τις διεργασίες προχωρημένης οξείδωσης είναι:

- Σχετικά ακριβά αντιδραστήρια
- Υψηλό κόστος λόγω της χρήσης πηγών φωτός για παραγωγή υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.6 Υπεριώδης Ακτινοβολία

Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία βρίσκεται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ του ορατού φωτός και των ακτίνων Χ και μπορεί καλύτερα να περιγραφεί ως αόρατη ακτινοβολία. Για να σκοτωθούν οι μικροοργανισμοί, οι ακτίνες UV πρέπει στην κυριολεξία να χτυπήσουν το κύτταρο. Η UV ενέργεια διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων, περνά μέσω του σώματος κυττάρων και διασπά το DNA τους, αποτρέποντας την αναπαραγωγή. Ο βαθμός αδρανοποίησης από την υπεριώδη ακτινοβολία συσχετίζεται άμεσα με την δόση της UV ακτινοβολίας που εφαρμόζεται στο υγρό. Η δόση μετριέται σε μικρο-Watt επί τα δευτερόλεπτα εφαρμογής ανά τετραγωνικό εκατοστό της επιφάνειας που εκπέμπεται στο υγρό ($\mu Ws/cm^2$) (Μάρακας,2006).

Εικόνα 2.1 Μηχανισμός δράσης της UV ακτινοβολίας(Δρόσου,2007)

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι μη-ιονίζουσα και έχει ένα εύρος μήκους κύματος από 100 – 400 nm. Αυτό το εύρος υποδιαιρείται σε τρεις ζώνες.

- Την UVA (μεγάλου κύματος) από 315 – 400 nm,
- την UVB (μεσαίου κύματος) από 280 – 315 nm και
- την UVC (μικρού κύματος) από 100 – 280 nm.

Η ακτινοβολία από το υπεριώδες UV φως, εντείνει την απολύμανση και την κάνει μια εύχρηστη λύση. Η πιο κοινή πηγή UVC ακτινοβολίας είναι ένας λαμπτήρας ατμών υδραργύρου κατασκευασμένος από χαλαζία ή από παρόμοιο υλικό, όπου δεν απορροφάει στο έντονο και καταστρεπτικό μη αόρατο φως των 254 nm. Η υπεριώδης ακτινοβολία εκπέμπεται από τη δημιουργία ενός τόξου εντός της λάμπας ατμού υδραργύρου εξαιτίας ηλεκτρικής εκκένωσης. Για να εξασφαλιστεί η απολύμανση, το νερό πρέπει να είναι κατά το δυνατόν απαλλαγμένο από αιωρούμενα στερεά και ουσίες που απορροφούν το φως (Μάρακας,2006).

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι μια φυσική διαδικασία απολύμανσης και υπό αυτήν τη μορφή, έχει διάφορα θεμελιώδη χαρακτηριστικά που την διακρίνουν από τις χημικές διαδικασίες απολύμανσης (όπως η χλωρίωση). Η υπεριώδης ακτινοβολία επιτυγχάνει την απολύμανση προκαλώντας φωτο-βιοχημικές αλλαγές μέσα στους μικροοργανισμούς. Για να πραγματοποιηθεί μια φωτοχημική αντίδραση, δύο τουλάχιστον όροι πρέπει να ικανοποιούνται: πρέπει να είναι διαθέσιμη ακτινοβολία ικανοποιητικής ενέργειας ώστε να μπορέσει να αλλάξει τους χημικούς δεσμούς, η ακτινοβολία πρέπει να απορροφηθεί από το μόριο στόχος (οργανισμός). Στην πλειοψηφία των UV εφαρμογών απολύμανσης, οι λαμπτήρες χαμηλής πιέσεως τόξων υδραργύρου, έχουν επιλεγεί ως πηγή UV ακτινοβολίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής ακτινοβολίας από αυτούς τους λαμπτήρες είναι μονοχρωματικό σε ένα μήκος κύματος (λ) 254 nm (Parsons et al., 2004).

Υπάρχουν και άλλα μήκη κύματος που είναι εμφανή στο φάσμα παραγωγής από έναν λαμπτήρα τόξων υδραργύρου χαμηλής πιέσεως. Το μήκος κύματος των 185 nm αντιπροσωπεύει την ακτινοβολία με πολύ υψηλότερη ενέργεια απ' ό,τι των 254 nm, αλλά αυτό το μήκος είναι ασήμαντο στις περισσότερες εφαρμογές λόγω της απορροφητικότητας του από το περίβλημα χαλαζία που περιβάλλει το λαμπτήρα και από τα υδάτινα συστατικά.

Κάποια μήκη κύματος είναι εμφανή στο ορατό φάσμα (λ ≥ 400 nm). Η ακτινοβολία αυτών των μηκών κύματος είναι ατελέσφορη όσον αφορά στην απολύμανση και είναι υπεύθυνη για το απαλό μπλε χρώμα που επιδεικνύεται από τους λαμπτήρες χαμηλής πιέσεως.

Η ενέργεια που συνδέεται με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μπορεί να υπολογιστεί ως:

$$E_\lambda = \frac{h \cdot C}{\lambda} \cdot A$$

Όπου:

E_λ = ακτινοβόλος ενέργεια που συνδέεται με το δεδομένο μήκος κύματος, kcal/einstein

C = ταχύτητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε ένα κενό = 3 · 1017 nm/s

h = σταθερά Planck = $1{,}583 \cdot 10^{-37}$ kcal · s

λ = μήκος κύματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, nm

A = αριθμός Avogadro = 6.023 · 1023 φωτόνια/einstein

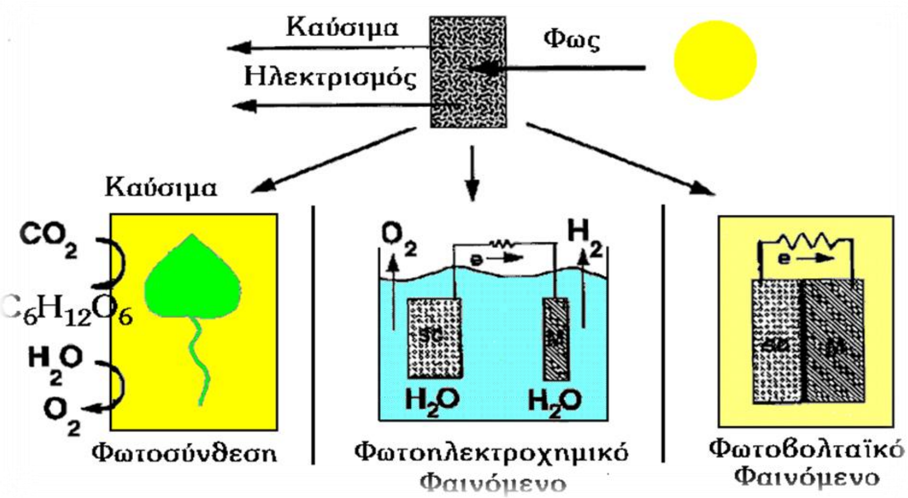
Όπως περιγράφεται παραπάνω, η φωτοχημική αλλαγή είναι δυνατή μόνο εάν η ακτινοβολούμενη ενέργεια είναι διαθέσιμη να απορροφηθεί. Εκτενής έρευνα έχει δείξει ότι τα νουκλεϊνικά οξέα (όπως το δεσοξυριβονουκλεϊνικό οξύ (DNA) και το ριβονουκλεϊνικό οξύ (RNA)) και οι πρωτεΐνες απορροφούν αποτελεσματικά την UV ακτινοβολία. Ειδικότερα, αυτά τα υλικά απορροφούν έντονα εντός των μηκών κύματος: $240 \leq \lambda \leq 260$ nm. Επειδή οι χαμηλής πιέσεως λαμπτήρες τόξων υδραργύρου εκπέμπουν την πλειοψηφία της ακτινοβολίας τους σε ένα μήκος κύματος μέσα σε αυτό το εύρος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για να προκαλέσουν μια φωτο - βιοχημική αλλαγή στους μικροοργανισμούς (μετάλλαξη για την περίπτωση του DNA).

2.7 Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση είναι συνδυασμός υπεριώδους ακτινοβολίας UV με χρήση κάποιου καταλύτη (π.χ. διοξείδιο του τιτανίου, TiO_2), με σκοπό την δημιουργία οξειδωτικών συνθηκών (φωτοκαταλυτική οξείδωση). Με την φωτοκατάλυση επιτυγχάνεται ακόμα και η πλήρης οξείδωση διαφόρων οργανικών ρύπων καθώς και η απενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Πρόκειται για μια μέθοδο αντιρρύπανσης η οποία λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον. (Malato et al.,2007).

2.8 Το φωτοηλεκτρικοχημικό φαινόμενο

Η μέθοδος της φωτοκαταλυτικής οξείδωσης των οργανικών ρύπων βασίζεται στο φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο, το οποίο αποτελεί έναν από τους 3 τρόπους μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 : Μετατροπή φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική

Γενικά, ως φωτοηλεκτρικό φαινόμενο ορίζεται το φαινόμενο εκείνο όπου ο φωτισμός της διεπιφάνειας ηλεκτρόδιο/ηλεκτρολύτης επιφέρει αλλαγή στο δυναμικό του ηλεκτροδίου (ανοιχτό κύκλωμα) ή στο ρεύμα που ρέει στη διφασική περιοχή (κλειστό κύκλωμα). Τα στερεά χωρίζονται βάσει των ηλεκτρικών ιδιοτήτων τους σε μέταλλα, ημιαγωγούς και μονωτές. Στην συνέχεια αναφέρονται ορισμένα στοιχεία βάσει των οποίων γίνεται ο διαχωρισμός των στερεών μεταξύ τους, λόγω του ότι η διαφορετικότητα τους αυτή αντικατοπτρίζεται και στις ηλεκτρικές, οπτικές και ηλεκτροχημικές/φωτοηλεκτρικές ιδιότητές τους (Palaiologou et al., 2007).

Μακροσκοπικά η διαφορετικότητα αυτή εμφανίζεται στην αντίσταση που παρουσιάζουν στη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος, καθώς και στην εξάρτηση του θερμικού συντελεστή της αντίστασης από την θερμοκρασία. Μικροσκοπικά οι ηλεκτρονικές ιδιότητες των στερεών περιγράφονται με τη βοήθεια του μοντέλου των ενεργειακών τροχιακών ή αλλιώς του μοντέλου των ενεργειακών ζωνών, το οποίο περιγράφει την συμπεριφορά ενός ηλεκτρονίου κατά την κίνηση του στο πεδίο που δημιουργεί ο πυρήνας και τα ηλεκτρόνια που το περιβάλλουν.

Πρέπει να σημειωθεί ότι ενώ οι ηλεκτρονικές ιδιότητες των μετάλλων διαφέρουν ριζικά από αυτές των ημιαγωγών, οι διαφορές των τελευταίων και των μονωτών είναι περισσότερο ποσοτικής και λιγότερο ποιοτικής φύσης. Το απαγορευμένο ενεργειακό χάσμα αποτελεί μια σημαντική παράμετρο, η οποία και καθορίζει την συμπεριφορά των υλικών, σχετικά με τις φυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητές τους. Αποτέλεσμα της διαφορετικής ηλεκτρονικής δομής των μετάλλων και των ημιαγωγών είναι και η διαφορετική και κατ' επέκταση φωτοηλεκτροχημική συμπεριφορά τους. Η εμφάνιση του φωτοηλεκτρικού φαινομένου αφετέρου προϋποθέτει την ύπαρξη φωτοευαίσθητων ημιαγώγιμων υλικών ικανών να απορροφήσουν τμήμα της φωτεινής ακτινοβολίας και να την μετατρέψουν σε φορέα του ηλεκτρικού ρεύματος (e^-/h^+) καθώς επίσης την ταυτόχρονη ύπαρξη ενός ηλεκτρικού πεδίου, ικανού να διαχωρίσει τους φωτοδημιουργούμενους φορείς και να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα (Omatoyo et al., 2010).

Κατά το φωτισμό του συστήματος ημιαγωγός/ηλεκτρολύτης με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, τα ηλεκτρόνια της ταινίας σθένους, διεγείρονται απορροφώντας φωτόνια ενέργειας ίσης ή μεγαλύτερης από αυτή που αντιστοιχεί στο ενεργειακό χάσμα του ημιαγωγού ($hv>E_g$) και μεταπηδούν στην ταινία αγωγιμότητας δημιουργώντας παράλληλα θετικά φορτισμένες οπές στην ταινία σθένους. Τα φωτοδημιουργούμενα ζεύγη οπών/ηλεκτρονίων διαχωρίζονται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου της διαφασικής περιοχής και στην περίπτωση ενός n – τύπου ημιαγωγού, τα μεν ηλεκτρόνια κινούνται προς το εσωτερικό του κρυστάλλου, ενώ οι οπές ρέουν προς την επιφάνεια όπου αντιδρούν με το υπάρχον οξειδοαναγωγικό σύστημα. Τα φωτοδημιουργούμενα αυτά σωματίδια δρουν ως ισχυρά αναγωγικά και οξειδωτικά και συνεισφέρουν, μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων με τις κατάλληλες ουσίες που είναι διαλυμένες στο νερό, στη μετατροπή του φωτός σε ηλεκτρική ή χημική ενέργεια (Malato et al., 2009).

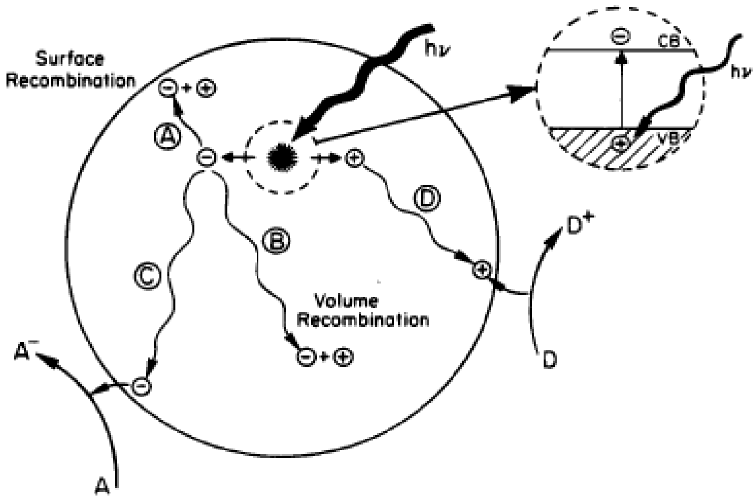
2.9 Η θεωρία της φωτοκατάλυσης

Η φωτοκατάλυση βασίζεται στο φαινόμενο της φωτοκαταλυτικής οξείδωσης. Ο συνδυασμός UV και καταλύτη (κόκκοι ημιαγώγιμης κόνεως), σε ένα υδάτινο μέσο, προκαλεί φωτοκαταλυτική οξείδωση. Ο κάθε κόκκος ημιαγώγιμης κόνεως (π.χ. TiO_2) που βρίσκεται σε επαφή με το κατάλληλο διάλυμα, λειτουργεί, υπό την επίδραση φωτός συγκεκριμένου μήκους κύματος, από μόνος του σαν μια μικροφωτοηλεκτροχημική κυψέλη, όπου συνυπάρχουν η άνοδος και η κάθοδος. Ο φωτισμός ενός τέτοιου συστήματος δημιουργεί στο εσωτερικό του κόκκου ζεύγη ηλεκτρονίων (e^-) και οπών (h^+) τα οποία διαχωρίζονται και οδεύουν προς την επιφάνεια του κόκκου. Σε υδατικά διαλύματα οι φωτοδημιουργούμενες οπές αντιδρούν με τα ιόντα OH^- ή με τα μόρια του νερού που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς τις αντίστοιχες ρίζες του υδροξυλίου (OH^-). Οι ρίζες αυτές αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο, το οποίο προσβάλει τα οργανικά μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα και μέσω υπεροξειδικών ριζών, τα αποδομεί προς CO_2 και ανόργανα άλατα (Malato et al., 2009).

Λόγω του υψηλού δυναμικού αναγωγής των ριζών αυτών (2.8V), είναι δυνατή η προσβολή πρακτικά όλων των οργανικών ρύπων που συναντώνται στην υγρή και αέρια φάση. Αρχικά αποσπούν άτομα υδρογόνου δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες, οι οποίες αποδομούνται στη συνέχεια, προς ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους όπου τελικά αποκαρβοξυλιώνονται προς CO_2 και διάφορα ανόργανα ιόντα (Μάρακας,2006).

Το πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου είναι το γεγονός ότι δεν περιλαμβάνει αντιστάσεις στη μεταφορά μάζας και ότι δύναται να λάβει χώρα σε περιβαλλοντικές συνθήκες (ως οξειδωτικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και το μοριακό οξυγόνο). Υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις, η φωτοκατάλυση οξειδώνει πλήρως τον οργανικό ρύπο (Palaiologou et al., 2007).

Οι σημαντικότερες διαδικασίες που συμβαίνουν σε ένα ημιαγώγιμο φωτοκαταλημμένο μόριο κάτω από την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας σε ένα υδατικό διάλυμα οξειδώσιμου ρυπαντή και διαλυμένου οξυγόνου προσομοιάζονται στο παρακάτω Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1: Κύριες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μέσα σε κόκκο ημιαγώγιμης σκόνης, κατά τη φωτοδιέγερσή του από ακτινοβολία hν≥Eg: (A) και (B) επανασύνδεση ζεύγους οπών/ηλεκτρονίων στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του κόκκου αντίστοιχα, (C) αναγωγή του δέκτη A και (D) οξείδωση του δότη D.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στην ετερογενή φωτοκαταλυτική διεργασία είναι οι εξής, στην περίπτωση που ως ημιαγωγός χρησιμοποιείται το TiO_2 (Omatoyo et al., 2010):

- Ακτινοβόληση καταλύτη TiO_2 και φώτο-δημιουργία οπών και ηλεκτρονίων:

$$TiO_2 + hv \rightarrow h^+ + e^-$$

- Αντίδραση των θετικά φορτισμένων οπών με OH^- σε αλκαλικό περιβάλλον ή με το H_2O οξειδώνοντάς τα σε $OH^{\bullet}$:

$$h_{vb}^+ + H_2O \rightarrow OH^{\bullet} + H^+$$

$$h_{vb}^+ + OH^- \rightarrow OH^{\bullet}$$

- Οξείδωση προσροφημένων οργανικών μορίων, από τις φωτοδημιουργημένες οπές, στην επιφάνεια του καταλύτη σε διάφορα οξειδωτικά προϊόντα:

$$\text{Οργανικό μόριο} + h_{vb}^+ \rightarrow \text{Προϊόντα Οξείδωσης}$$

- Αντίδραση των φωτοδημιουργημένων ηλεκτρονίων με ηλεκτρονιολήπτες όπως το προσροφημένο O_2 στην επιφάνεια του καταλύτη ή όπως το διαλυμένο O_2 και μετατροπή σε ανιονικές ρίζες του υπεροξειδίου $O_2^{\bullet -}$:

$$e_{cb}^- + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -}$$

$$R\text{-}H + OH. \rightarrow R. + H_2O$$

- Αντίδραση των φωτοδημιουργημένων ηλεκτρονίων με τα προσροφώμενα οργανικά συστατικά στην επιφάνεια του καταλύτη μέσω αναγωγικών αντιδράσεων:

$$(O_2)ads + e^- \rightarrow (O_2^-)ads \quad \text{(αναγωγική δράση)}$$

- Επανασύνδεση των φωτοδημιουργημένων ηλεκτρονίων και των φωτοδημιοργημνων οπών:

$$h^+ + e^- \rightarrow \text{θερμότητα} + hv' \text{ (επανασύνδεση)}$$

- Ετερογενής TiO_2 φωτοαποδόμηση των οργανικών μορίων από τις ρίζες TiO_2:

$$Ti(IV)\text{-}OH + h^+ \rightarrow Ti(IV)\text{-}OH. \text{ (βασικό περιβάλλον)}$$

$$Ti(IV)\text{-}H_2O + h^+ \rightarrow Ti(IV)\text{-}OH. + H^+ \text{ (όξινο περιβάλλον)}$$

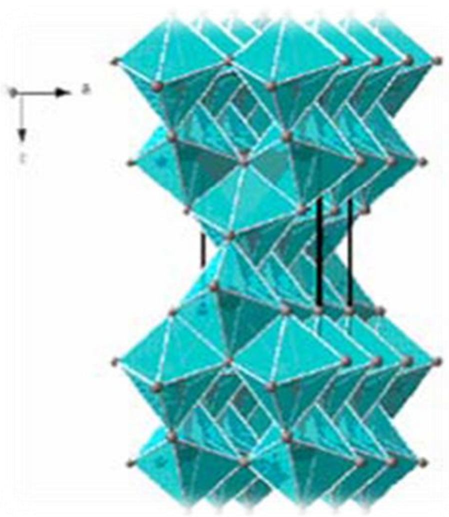
2.10 Ημιαγώγιμα υλικά – Καταλύτες

Ο ρόλος του ημιαγωγού στη φωτοκαταλυτική καταστροφή των ρύπων είναι αποφασιστικής σημασίας. Τόσο οι φυσικές όσο και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες αποτελούν παραμέτρους, οι οποίες επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος. Οι ημιαγώγιμες ουσίες που επί το πλείστον έχουν χρησιμοποιηθεί για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές, τόσο στο περιβαλλοντικό όσο και στον ενεργειακό τομέα, είναι οι ακόλουθες: TiO2, ZnO, $SrTiO_3$, O_3, Fe_2O_3, Z_nS, C_dS.

Ένας ημιαγώγιμος φωτοκαταλύτης, ο οποίος χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του νερού πρέπει να είναι χημικά και βιολογικά αδρανής, ενεργός φωτοκαταλυτικά, να παράγεται και να χρησιμοποιείται εύκολα και να ενεργοποιείται κάτω ακόμα και από την επίδραση του ηλιακού φωτός. Εκτός του διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2), το οποίο δεν απορροφά το ορατό φως, κανένας άλλος ημιαγωγός δεν πληροί όλες τις παραπάνω προϋποθέσεις (Parsons et al., 2004).

Το διοξείδιο του τιτανίου είναι ευρέως διαθέσιμο, σχετικά φθηνό, μη τοξικό και έχει μεγάλη χημική σταθερότητα. Ο καταλύτης TiO_2 έχει μεγάλη $E_{bg} \cong 3.2 – 3.0$ eV και σαν συνέπεια μπορεί να απορροφήσει μόνο το υπεριώδες φως, ειδικά αυτό με μήκος κύματος μικρότερο του 380 nm , το οποίο αντιπροσωπεύει ένα μικρό μόνο μέρος του ηλιακού φάσματος (περίπου 6%). Παρόλα αυτά, η ύπαρξη τόσων πολλών πλεονεκτημάτων του TiO_2 σαν ημιαγώγιμος φωτοκαταλύτης καθιστά όχι και τόσο σημαντικούς τους περιορισμούς όσον αφορά το φασματικό προφίλ του και γι’ αυτό αποτελεί το ιδανικότερο ημιαγώγιμο υλικό για τον καθαρισμό του νερού μέσω ημιαγώγιμης φωτοκατάλυσης (Parsons et al., 2004).

Συναντάται σε τρεις κρυσταλλικές μορφές, την ρουτίλη (rutile), την μπρουκίτη (brookite) και την ανατάση (anatase) η οποία είναι και η πιο ενεργή φωτοκαταλυτικά λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των OH^- και H_2O στην επιφάνειά του και επιπλέον λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτοδιεγερμένων e_{cb}^- και hv^+ παράγεται πιο εύκολα από τις άλλες δύο.



Εικόνα 2.3: Κρυσταλλική μορφή ανάτασης καταλύτη TiO_2

Κατά την φωτοελαχιστοποίηση ρύπων μέσω TiO_2, τα φωτοδημιουργούμενα ηλεκτρόνια μειώνουν το οξυγόνο στο νερό και οι φωτοδημιουργούμενες οπές ελαχιστοποιούν τον ρύπο. Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνει την αρχική οξείδωση των υδροξυλ-ομάδων που βρίσκονται πάνω στη επιφάνεια του καταλύτη σε ρίζες υδροξυλίου οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνουν τον ρύπο και κάθε επόμενο ενδιάμεσο. Το τελικό προϊόν είναι συνήθως το CO_2 και το νερό.

Παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στην διάβρωση και φωτοδιάβρωση, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανακύκλωσης του. Παρόλα αυτά η υποχρέωση του διαχωρισμού των πολύ μικρών μορίων του από το αιώρημα μετά την επεξεργασία περιορίζει την πρόοδο της διαδικασίας. Βέβαια ο καταλύτης αυτής της μορφής μπορεί να ακινητοποιηθεί σε ένα κατάλληλο αδρανές υλικό το οποίο εξαλείφει το στάδιο απομάκρυνσης του καταλύτη. Σαν συνέπεια όμως αυτού η επιφάνεια του καταλύτη μειώνεται (Parsons et al., 2004).

3. ΒΑΚΤΗΡΙΑ - ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ-ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Μέρος των μικροοργανισμών που απαντώνται στα υγρά απόβλητα και στους υδάτινους φορείς είναι παθογόνοι. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι κυρίως βακτήρια αλλά και πρωτόζωα και ιοί. Επειδή βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις αλλά σε μεγάλη ποικιλία ειδών, η ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών είναι πρακτικά αδύνατος. Έτσι, αντί για τον προσδιορισμό κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών γίνεται ο προσδιορισμός ενδεικτικών μικροοργανισμών.

Ως τέτοιοι ενδεικτικοί μικροοργανισμοί χρησιμοποιούνται τα κολοβακτηριοειδή, που βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και κατ' επέκταση στα ανθρώπινα και ζωικά απόβλητα.

Τα βακτήρια είναι ετερότροφοι ή αυτότροφοι (συνήθως χημειοσυνθετικοί) οργανισμοί, αερόβιοι, αναερόβιοι. Βρίσκονται στον αέρα, στο νερό, σε οργανικές ουσίες ή σε ζωντανούς οργανισμούς των φυτών και των ζώων. Ζουν κάτω από μεγάλη ποικιλία συνθηκών θερμοκρασίας, οξυγόνου, pH και αναπτύσσονται ταχύτατα όταν υπάρχει επαρκής τροφή και τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά. Τα ετερότροφα βακτηρίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων, γιατί καταναλώνουν ως τροφή τις οργανικές ουσίες των αποβλήτων (Μαντζαβίνος Δ., 2003).

Η ανίχνευση των ανθρώπινων εντερικών παθογόνων καθίσταται δύσκολη καθώς οι παθογόνοι αυτοί μικροοργανισμοί βρίσκονται στο περιβάλλον σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η μολυσματική τους δόση κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Για τον προσδιορισμό της προέλευσης των εντερικών παθογόνων σε κάποιο υδάτινο σύστημα καταφεύγουμε στον προσδιορισμό συγκεκριμένων δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης. Οι συνήθεις δείκτες που χρησιμοποιούνται σε μελέτες που αφορούν στο πόσιμο και θαλασσινό νερό είναι οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι, οι εντερόκοκκοι και η *Escherichia coli*.

Η *E.coli* ανήκει στα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και είναι μία από τις ομάδες βακτηρίων που χρησιμοποιούνται σαν δείκτες μικροβιολογικής ρύπανσης. Συνεπώς, η ύπαρξη τους είναι μια γενική ένδειξη μόλυνσης στα υγρά απόβλητα και του νερού.

Παράλληλα, ανευρίσκεται σε συγκεντρώσεις πολύ υψηλότερες από τα παθογόνα, των οποίων υποδηλώνει την παρουσία. Το γεγονός ότι διαβιώνει τόσο στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου όσο και των θερμόαιμων ζώων καθώς και η μελέτη συγκεκριμένων χαρακτηριστικών της έχουν συντελέσει στην ολοκλήρωση ερευνών διάκρισης προέλευσης κοπρανώδους υλικού και τον αποτελεσματικό τρόπο αντιμετώπισης του εκάστοτε προβλήματος.

Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δεικτών

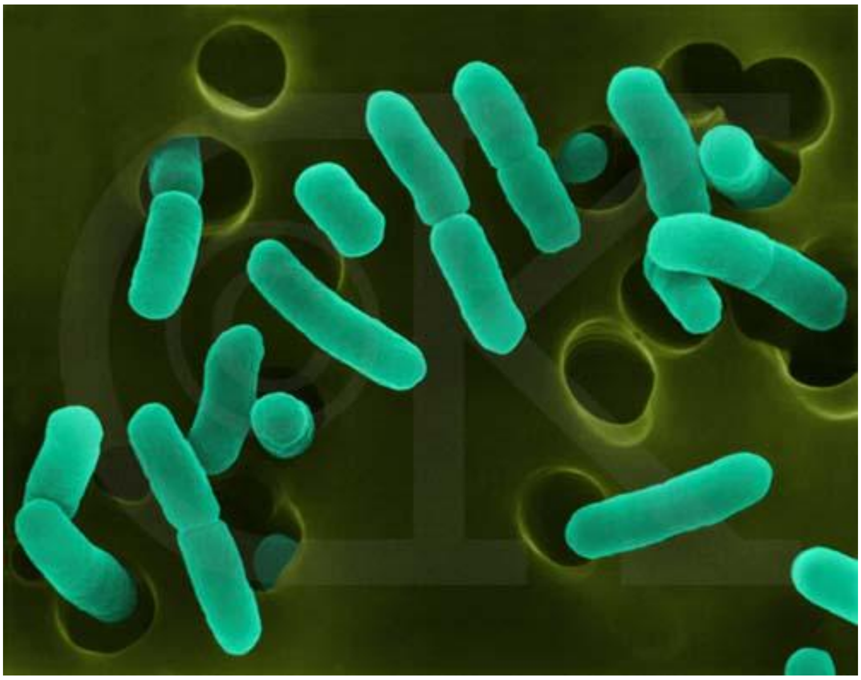
Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των βακτηρίων είναι οι ακόλουθες:

- Απευθείας καταμέτρηση σε μικροσκόπιο

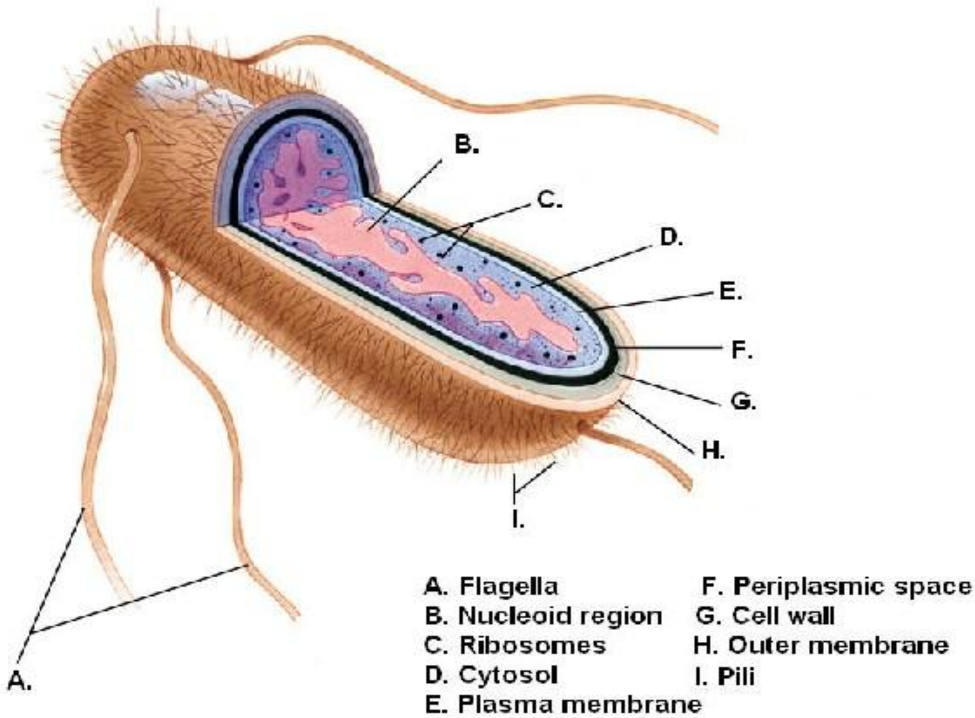
- Καλλιεργητική μέθοδος, ύστερα από:
  - Διήθηση υπό κενό σε μεμβράνες
  - Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων

- Μοριακή μέθοδος,
  -Παράδειγμα: η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real-time PCR).

4. *Escherichia coli*



Εικόνα 4.1:Στελέχη E.coli (http://www.ebiologie.fr/gallery-ocount-gv33.html)



Εικόνα 4.2:Δομή E.coli

(A)μαστίγια,(B)πυρήνας,(C)Ριβοσώματα, (D)Κυτταρόπλασμα, (E)πλασματική μεμβράνη, (F)Περιπλασματικός χώρος, (G)Κυτταρικό τοίχωμα,(H)εξωτερική μεμβράνη, (I)τριχίδια

Το γένος *Escherichia* περιλαμβάνει βακτήρια που ανήκουν στην οικογένεια *Enterobacteriaceae,* η οποία περιλαμβάνει κυρίως κινητά Gram-αρνητικά βακτήρια. Η *E.coli* είναι το τυπικό είδος του γένους και το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των *Enterobacteriaceae,* καθώς διαθέτει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της. Η κοινή ονομασία του είδους που επικράτησε στα ελληνικά είναι η λέξη *κολοβακτηρίδιο* (Βενιέρη,2005).

Πρόκειται για ευρέως διαδεδομένο μικροοργανισμό αφού είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο βακτήριο της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας. Ο ανθρώπινος εντερικός σωλήνας αποτελεί το φυσικό περιβάλλον του μικροοργανισμού όπου αναπτύσσεται ήδη από την εμβρυική ηλικία του ατόμου, αναπτύσσοντας μια σχέση αμοιβαίας αλληλεξάρτησης. Η *E.coli* διαβιώνοντας στο εντερικό σύστημα συνήθως δεν αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, εκτός και αν πρόκειται για εξασθενισμένα άτομα ή όταν ο πληθυσμός του βακτηρίου υπερβεί κάποια ανώτατα όρια. Όσον αφορά στα παθογόνα στελέχη του είδους, αυτά δύνανται να προκαλέσουν μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων, οι οποίες περιορίζονται στις βλεννογόνες επιφάνειες ή εξαπλώνονται σε ολόκληρο το σώμα.

Επιπλέον, ανευρίσκεται στο γαστρεντερικό σύστημα πολλών θερμόαιμων ζώων, όπως είναι τα βοοειδή, τα αιγοπρόβατα, οι χοίροι, οι σκύλοι κ.α. Η παρουσία της στο νερό ή στα τρόφιμα θεωρείται ότι δείχνει την άμεση ή έμμεση κοπρανώδη μόλυνση από λύματα και την πιθανή παρουσία άλλων παθογόνων.

Για τη διατήρηση της μικροβιολογικής ποιότητας και ασφάλειας των συστημάτων νερού και την ελάττωση της κοπρανώδους μόλυνσης, η οποία ενέχει υψηλούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, είναι επιτακτική ανάγκη να χρησιμοποιηθούν κατάλληλες τεχνολογίες απολύμανσης για την αδρανοποίηση ή ακόμα και θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών (Benabbou et al., 2007).

4.1 Αδρανοποίηση *E.coli* με φωτοκαταλυτική οξείδωση

Ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου έχει αποτελέσει θέμα έρευνας τα τελευταία χρόνια. Ένα κοινό χαρακτηριστικό σε όλο τον μηχανισμό φαίνεται να είναι η αρχική φθορά της κυτταρικής μεμβράνης που ακολουθείται από την καταστροφή των ενδοκυτταρικών συστατικών. Παρουσία των κατάλληλων οξειδοαναγωγικών ζευγών, αυτοί οι μεταφορείς ηλεκτρικών φορτίων είναι σε θέση να προκαλέσουν μειώσεις και οξειδώσεις. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι πλέον δεκτές ως αντιδρώντα στην φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων (Δρόσου,2007).

Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με τα περισσότερα βιολογικά μόρια στο ελεγχόμενο ρυθμό διάχυσης. Για το λόγο αυτό η αδρανοποίηση των *E.coli* από την ρίζα υδροξυλίου, η οποία παράγεται από τη φωτοκαταλυτική δράση, εξαρτάται και από τους περιορισμούς μαζικής μεταφοράς διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος ή της κυτταρικής μεμβράνης και από την σύντομη ημι-ζωή της ρίζας.

Η φωτοκαταλυτική καταστροφή της ενδοτοξίνης των *E.coli*, η οποία είναι ένα ζωτικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης, πάνω σε μία λεπτή ταινία TiO_2 μελετήθηκε από τον Sunada et al (2003). Η καταστροφή των κυττάρων *E.coli* βρέθηκε να συνοδεύεται από την μείωση της ενδοτοξίνης και αυτό υπονοεί ότι η φωτοκατάλυση με διοξείδιο του τιτανίου κατέστρεψε την εξωτερική μεμβράνη του βακτηριακού κυττάρου (Δρόσου, 2007).

Η επιφάνεια επίδρασης του TiO_2 με τα *E.coli* διαδραματίζεται σε pH 6 και ευνοείται όσο τα *E.coli* είναι αρνητικά φορτισμένα με pH μεταξύ 3 και 9.

Αλλαγές στην συγκέντρωση των συστατικών της κυτταρικής μεμβράνης με τον επιπλέον φωτισμό, έδειξαν ότι η εξωτερική μεμβράνη λειτουργεί ως εμπόδιο , ενώ το στρώμα πεπτιδογλυκάνη δεν έχει περιοριστική λειτουργία.

Αν και οι πρωτεΐνες και τα νουκλεϊνικά οξέα απορροφούν αποτελεσματικά την UV ακτινοβολία, θεωρείται ότι η πλειοψηφία της προσκληθείσας ζημίας εξαιτίας της UV ακτινοβολίας, οφείλεται στις βάσεις που συνθέτουν τα νουκλεϊνικά οξέα. Η υπεριώδης ακτινοβολία ουσιαστικά δρα ως «στειρωτικό» των μικροοργανισμών επιδιώκοντας να εμποδίσει τον πολλαπλασιασμό τους και συγκεκριμένα αλλοιώνοντας το DNA και RNA εμποδίζει τη μεταφορά γενετικού υλικού και άρα την αναπαραγωγή των μικροοργανισμών. Παρόλα αυτά αρκετοί μικροοργανισμοί παρουσιάζουν την ικανότητα να επιδιορθώνουν μόνοι τους τις βλάβες του γενετικού υλικού (φωτοεπιδιόρθωση), αναιρώντας έτσι, κατά κάποιον τρόπο, την απολυμαντική επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας (Berney et al., 2006).

Ο αρχικός μηχανισμός της υπεριώδους ακτινοβολίας στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών είναι η άμεση καταστροφή των κυψελοειδών νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA). Το υπεριώδες φως, μήκους κύματος γύρω στα 260 nm προκαλεί την περισσότερη ζημιά στο κύτταρο. Το μήκος κύματος συμπίπτει πολύ με αυτό της μέγιστης απορρόφησης των νουκλεϊνικών οξέων. Οι λαμπτήρες χαμηλής πιέσεως υδραργύρου, εκπέμπουν περίπου το 92% του φωτός τους σε ένα μήκος κύματος στα 254 nm. Κατά συνέπεια, αυτοί οι λαμπτήρες είναι σχεδόν ιδανικές μικρές γεννήτριες υπεριώδους ακτινοβολίας (McCullagh et al., 2007).

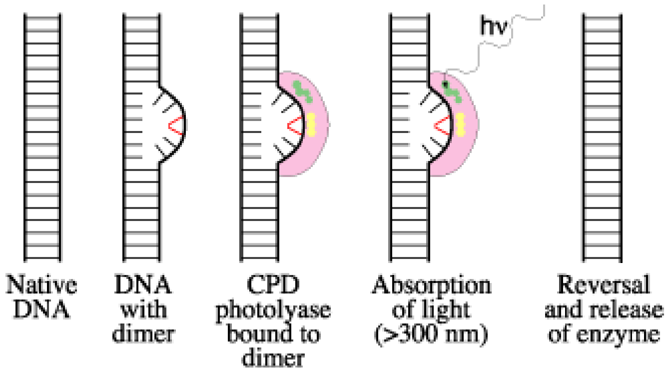
Συμπερασματικά, η φωτοκαταλυτική αντίδραση αρχίζει με μία μερική αποδόμηση της εξωτερικής μεμβράνης και ακολουθείται από την διατάραξη της κυτταροπλασματικής μεμβράνης κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο (Δρόσου,2007).

4.2 Φωτοενεργοποίηση – αναγέννηση

Ωστόσο, το φυσιολογικό αποτέλεσμα της αδρανοποίησης δεν είναι κατανοητό και περιπλέκεται από την ικανότητα πολλών μικροοργανισμών να αποκαταστήσουν τη βλάβη που υφίσταται το DNA τους από τη UV ακτινοβολία. Ενώ η πρόκληση ζημιών αποτελεί μια αμιγώς φωτοχημική αντίδραση που εμφανίζεται στα λίγα δευτερόλεπτα, ενώ το νερό εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία κατά την απολύμανση, η αλληλεπίδραση των αντιδράσεων που ενδεχομένως να οδηγήσει σε αδρανοποίηση περιλαμβάνει ορισμένες βιοχημικές αντιδράσεις που μπορεί να επηρεαστούν από τη θερμοκρασία. Τα τελευταία αυτά φαινόμενα μπορούν να πραγματοποιηθούν ακόμα και κατά τη διάρκεια της περιόδου ακτινοβολίας, αλλά είναι ως επί το πλείστον κατά τη διάρκεια του χρόνου μετά την ακτινοβόληση όπου παρατηρούνται διεργασίες επανενεργοποίησης αν υπάρχουν κατάλληλες συνθήκες. Η κύρια επίδραση που αδρανοποιεί την υπεριώδη ακτινοβολία είναι ο σχηματισμός φωτοπροϊόντων στο DNA (Rincon et al., 2004).

Η DNA φωτολυάση έιναι ένα ένζυμο που υπάρχει σε βακτήρια και άλλους οργανισμούς και επισκευάζει βλάβες στο DNA που προκαλούνται από την έκθεση στην υπεριώδη (UV) ακτινοβολία . Στο σκοτάδι, η φωτολυάση συνδέεται με τη διμερή θυμίνη που σχηματίζεται από την υπεριώδη ακτινοβολία, καθώς και για την επακόλουθη έκθεση στο μπλε φως που απορροφά την ενέργεια του φωτός και τη χρησιμοποιεί για να χωρίστει από την διμερή και να αποκατασταθεί η φυσιολογική δομή. Αυτή η διαδικασία καλείται φωτοενεργοποίηση. Η DNA φωτολυάση της *E. coli* κωδικοποιείται από το γονίδιο PHR.

Από τη στιγμή που η βλάβη στο DNA επισκευαστεί, ο μικροοργανισμός θα είναι σε θέση να πραγματοποιήσει την αναπαραγωγή του και την εκ νέου ρύπανση του απολυμασμένου νερού. Αυτό μειώνει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης UV και μπορεί να οδηγήσει στον πολλαπλασιασμό των παθογόνων μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, ο πραγματικός χρόνος απολύμανση (EDT), που εξασφαλίζει συνολική θανάτωση των βακτηρίων πρέπει να καθοριστεί κατά την αξιολόγηση της διαδικασίας απολύμανσης UV (Quek et al. ,2008).



Εικόνα 4.3: Επανασχηματισμός DNA μετά την απορρόφηση ηλιακής ακτινοβολίας

5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ *E.coli* ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

5.1 Συμβατική Καλλιεργητική Μέθοδος

Στην ποσοτική μικροβιολογία, η μέτρηση των βιώσιμων βακτηρίων που σχηματίζουν αποικίες σε ένα δείγμα, γίνεται με τον προσδιορισμό των αποικιών που αναπτύσσονται από το εκάστοτε βακτήριο, σε ειδικό θρεπτικό υλικό. Οι μονάδα μέτρησης των αποικιών ονομάζεται Colony Forming Units,(CFUs), και εκφράζεται συνήθως ως αριθμός των CFUs ανά ml ή ανά γραμμάριο δείγματος.

Η συγκέντρωση των CFUs στο νερό θεωρείται σημαντικής σημασίας και υπολογίζεται κάνοντας διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις (δηλαδή, 1/10 αραιώσεις, καθεμία με την προσθήκη ενός μέρους του αποβλήτου σε 9 μέρη του διαλύτη) και εμβολιάζοντας ένα ml σε κάθε ένα από τα τριβλία. Σημειώνεται ότι κάθε αραίωση γίνεται μέχρι το $1/10^6$ cfu/mL, ώστε να υπολογιστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο αριθμός των αποικιών.

5.2 Μοριακή μέθοδος

Έως τώρα ο έλεγχος της απολύμανσης των νερών πραγματοποιείται με τις συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους. Ωστόσο, αυτές οι μέθοδοι έχουν περιορισμούς τόσο από ποσοτική και ποιοτική άποψη. Είναι χρονοβόρες, επίπονες και επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο των βακτηρίων που μπορεί να διαιρεθούν. Ωστόσο, ένα σημαντικό μέρος του μικροβιακού πληθυσμού στο υδάτινο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των εντερικών βακτηρίων, έχει χαρακτηριστεί ως μη καλλιεργήσιμο. Ολιγοτροφικές και ακραίες συνθήκες μπορεί να ωθήσουν τα βακτήρια να εισέλθουν σε μια κατάσταση που χαρακτηρίζεται ως βιώσιμη, αλλά μη καλλιεργήσιμη (VBNC). Αυτοί οι μικροοργανισμοί καλούνται να αποδείξουν τη μεταβολική δραστηριότητα και να διατηρούν τα χαρακτηριστικά των παθογόνων (Chatzisymeon et al., 2010).

Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την κατάσταση VBNC (viable but not culturable bacteria) μπορεί να περιλαμβάνουν την UV έκθεση, κάποιους αντιμικροβιακούς παράγοντες, το pH και τις αλλαγές της θερμοκρασίας, καθώς και του άνθρακα και της έλλειψης ενέργειας.

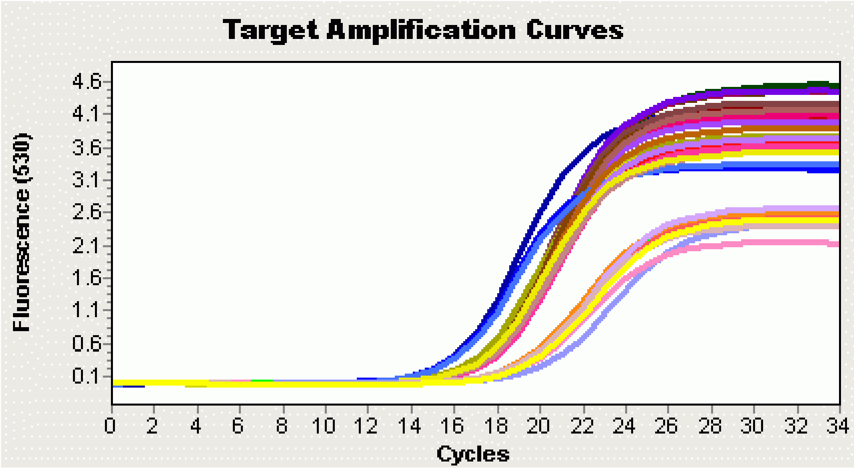
Η εισαγωγή σε μοριακές τεχνικές έχει συμβάλει στο να ξεπεραστούν τα σημαντικά μειονεκτήματα των μεθόδων καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, η PCR επέτρεψε για διάφορες νέες προσεγγίσεις σε έρευνα των παθογόνων λόγω της υψηλής ευαισθησίας, της ιδιαιτερότητας, και της ταχύτητας.

5.2.1 Μέθοδος PCR

Η PCR είναι μία in vitro μέθοδος και μπορεί να πραγματοποιηθεί χωρίς περιορισμούς στη μορφή του χρησιμοποιούμενου DNA. Μπορεί ακόμα να διαφοροποιηθεί εκτενώς για την πραγματοποίηση ποικίλων μεθόδων γενετικής επέμβασης. Με τη χρήση της συγκεκριμένα θραύσματα DNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε έναν δοκιμαστικό σωλήνα απουσία ζωντανών κυττάρων.

5.2.2 Αντίδραση

Με την PCR, μια συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος μπορεί να πολλαπλασιαστεί μέχρι και δισεκατομμύρια φορές, δεδομένου ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η αλληλουχία του γονιδίου είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των συνθετικών DNA ολιγονουκλεοτιδίων, το καθένα συμπληρωματικό με μία από τις αλυσίδες του δίκλωνου DNA. Τα ολιγονουκλεοτίδια που θα χρησιμοποιηθούν ως εκκινητήρες πρέπει να δεσμεύονται σε θέσεις αντίθετες από την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί, με άλλα λόγια καθορίζουν τα άκρα του θραύσματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί.



Εικόνα 5.1: καμπύλες και κύκλοι PCR

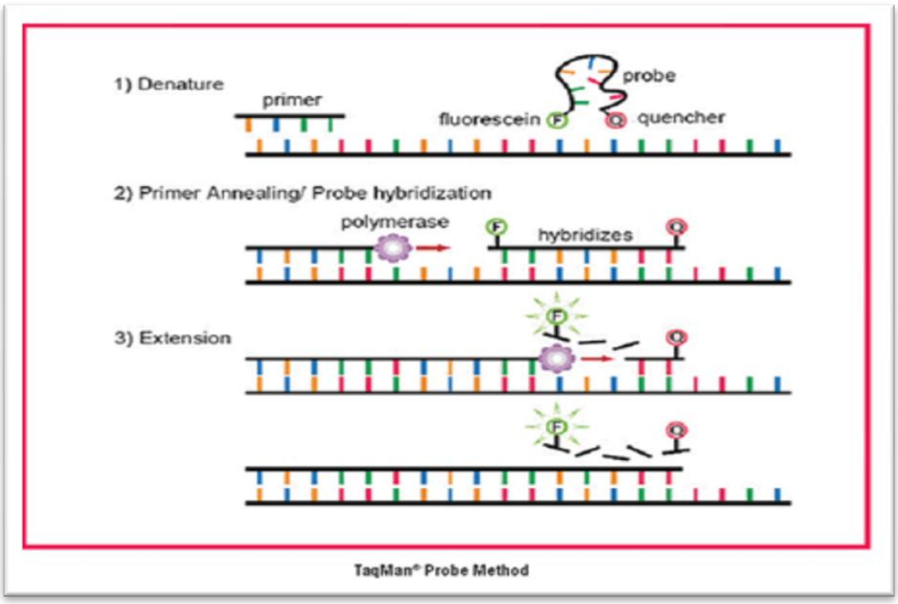
5.2.3 Στάδια

Ένας πλήρης κύκλος μιας PCR αντίδρασης περιλαμβάνει τρία στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA (denaturation)

2. Προσαρμογή των εκκινητήρων στο DNA εκμαγείο (annealing)

3. Επιμήκυνση των εκκινητήρων (extension).



Εικόνα 5.2: Στάδια αντίδρασης PCR

Ένας πλήρης τέτοιος κύκλος περιλαμβάνει επώαση των δειγμάτων σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες και γίνεται στις μέρες μας αυτόματα από ειδικά μηχανήματα τους θερμοκυκλωτές (thermal cyclers). Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95° C. Στη συνέχεια οι εκκινητήρες σε περίσσια προσαρμόζονται με υβριδισμό στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους 50 – 60° C. Ακολουθεί επώαση στους 72° C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από μία θερμοάντοχη πολυμεράση, παρουσία των τεσσάρων νουκλεοτιδίων.

Καθώς η διαδικασία επαναλαμβάνεται, οι νεοσύστατοι κλώνοι με τη σειρά τους χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για την in vitro σύνθεση του DNA. Μετά από μερικούς κύκλους το επικρατές προϊόν είναι ένα DNA θραύσμα που το μέγεθος του οποίου αντιστοιχεί στην μεταξύ των δύο αρχικών εκκινητήρων απόσταση. Στη πράξη 20 με 30 κύκλοι της αντίδρασης είναι αρκετοί για την αποτελεσματική ενίσχυση του DNA θραύσματος. Σε κάθε κύκλο που διαρκεί περίπου πέντε λεπτά η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Η όλη διαδικασία κλωνοποίησης ενός DNA θραύσματος σε ένα in vitro σύστημα (χωρίς κύτταρα) διαρκεί μερικές ώρες, σε σχέση με τις μερικές μέρες που απαιτούνται για τις in vivo διαδικασίες κλωνοποίησης.

5.2.4 Μέθοδος της Real-time PCR

Η αλυσυδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time PCR) είναι η PCR που μετρά την ποσότητα cDNA ή mRNA σε ένα δείγμα, είτε από έναν πληθυσμό των κυττάρων (ιστός ή κυτταροκαλλιέργεια), είτε από ένα μονό κύτταρο. Ο πραγματικός χρόνος χρησιμοποιείται συνήθως για να καθορίσει την έκφραση mRNA ενός γονιδίου, και τα επίπεδα έκφρασής του (αριθμός αντιγράφων mRNA).

Όσον αφορά στην Περιβαλλοντική Μικροβιολογία η Real time PCR χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον προσδιορισμό των πηγών μόλυνσης του περιβάλλοντος και την εκτίμηση επικινδυνότητας, καθώς παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα των παθογόνων παραγόντων που ανιχνεύει.

Επιπλέον, εφαρμόζοντας την ποσοτικοποίηση (quantitation, qPCR), η μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύσει το DNA παθογόνων βακτηρίων σε δείγματα νερού και λυμάτων σε εξαιρετικά χαμηλές ποσότητες και να αξιολογήσει τις πιθανότητες του κινδύνου για τη δημόσια υγεία. Η τεχνολογία της qPCR έχει αποδειχθεί ότι είναι ευαίσθητη, ειδική και ακριβής σε ποσοτικά αποτελέσματα (Chatzisymeon et al., 2010).

5.2.5 Εφαρμογές

Η PCR είναι εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη μέθοδος, έχει δυνατότητα ανίχνευσης και ενός μόνο DNA μορίου σε ένα μείγμα. Μικροποσότητες RNA μπορούν επίσης να αναλυθούν με τον ίδιο τρόπο, μετά τη μεταγραφή τους σε DNA από την ανάστροφη τρανσκριπτάση (RT-PCR – reverse transcription PCR). Η PCR τεχνολογία αντικαθιστά τον υβριδισμό κατά Southern για τη διάγνωση γενετικών ασθενειών και για την ανίχνευση λοιμωδών νόσων (ιώσεων, μικροβιακών λοιμώξεων κτλ.). Επιπλέον, στην ιατροδικαστική από ένα απλό ίχνος αίματος ή άλλων ιστών (ακόμα και από ένα κύτταρο) μπορεί να αναγνωριστεί η ταυτότητα ενός ατόμου.

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι ένας από τους σημαντικότερους κινδύνους για την υγεία που συνδέονται με το νερό και τα υγρά απόβλητα. Τρέχουσες μέθοδοι για την ανίχνευση παθογόνων ιών, βακτηρίων και πρωτόζωων τείνουν να είναι ανακριβείς και χρονοβόρες. Ως αποτέλεσμα, τα βακτήρια δείκτες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό του σχετικού κινδύνου κοπρανώδους μόλυνσης και για την πιθανή παρουσία παθογόνων παραγόντων νερού και υγρών αποβλήτων. Συνεπώς, ερευνώνται μέθοδοι για την άμεση ανίχνευση μικροβιακών παθογόνων στο νερό και στα υγρά απόβλητα.

Η μέθοδος αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι μία από τις κύριες εναλλακτικές μεθόδους ανίχνευση. Η PCR έχει αποδειχθεί ότι είναι μια γρήγορη, άκρως ευαίσθητη και ακριβής μέθοδος. Έχει ήδη χρησιμοποιηθεί πειραματικά για την ανίχνευση παθογόνων ιών, βακτήριων και πρωτόζωων σε νερό και υγρά απόβλητα. Η PCR, ωστόσο, έχει έναν αριθμό από περιορισμούς. Ένας τέτοιος περιορισμός είναι η παραγωγή των ψευδών θετικών αποτελεσμάτων, μέσω της ανίχνευσης των γυμνών νουκλεϊκών οξέων, των μη βιώσιμων μικροοργανισμών, ή μέσω μόλυνσης στο εργαστήριο. Άλλοι περιορισμοί περιλαμβάνουν αναστολή από περιβαλλοντικούς ρύπους.

Όσον αφορά στην Περιβαλλοντική Μικροβιολογία, η Real-time PCR χρησιμοποιείται εκτεταμένα για τον προσδιορισμό των πηγών μόλυνσης του περιβάλλοντος και την εκτίμηση επικινδυνότητας, καθώς παρέχει ποσοτικά αποτελέσματα των παθογόνων παραγόντων που ανιχνεύει.

Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο οποιουδήποτε περιβαλλοντικού δείγματος: νερό (πόσιμο δικτύου, επιφανειακό, θαλασσινό), έδαφος, λύματα (επεξεργασμένα και μη), λάσπη, compost και την εκτίμηση της βιοποικιλότητας.

Εφαρμόζεται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γονιδίων ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως για παράδειγμα δείγματα νερού. Με αυτόν τον τρόπο εκτιμάται το ποσοστό ανθεκτικότητας σε περιβαλλοντικούς μικροβιακούς πληθυσμούς, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με τη δημόσια υγεία αλλά και την αποτελεσματικότητα μεθόδων απολύμανσης.

Με τη Real-time PCR ελέγχεται η άρτια λειτουργία της μεθόδου απολύμανσης σε σταθμούς βιολογικού καθαρισμού με την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση διαφόρων κατηγοριών ιών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται γενικά ανθεκτικοί κατά τα στάδια επεξεργασίας των λυμάτων.

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται το δυναμικό της Real-time PCR για την άμεση ανίχνευση βακτηριακών παθογόνων, κυρίως του βακτηρίου *E.coli*, σε απολυμασμένο νερό με UV ακτινοβολία.

6. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

- Η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης του νερού και των πραγματικών λυμάτων με τη χρήση UV-A και UV-C ακτινοβολίας.
- Ο έλεγχος της απόδοσης της απολύμανσης μετρώντας το ποσοστό αδρανοποιήσης των μικροοργανισμών *E.coli* σε συνάρτηση με διάφορες παραμέτρους λειτουργίας. Αυτές οι παράμετροι είναι η συγκέντρωση του καταλύτη TiO_2, η πηγή ακτινοβολίας και ο χρόνος της απολύμανσης.
- Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών τόσο με την κλασσική μικροβιολογική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όσο και με την μέθοδο μοριακής βιολογίας real-time PCR.
- Η μελέτη της ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών μετά την απολύμανση σε πειράματα που διεξήχθησαν στο σκοτάδι και στο φυσικό φως.

7. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Υλικά

7.1.1 Καλλιεργητικά υλικά

Nutrient Agar *(Oxoid)*

Hicrome Agar *(Sigma)*

7.1.2 Χημικά Υλικά

Αιθανόλη *(Merck)*

Αιθυλενοδιαμινοτετροξικό οξύ συν.*EDTA (Sigma)*

Δωδεκυλοθειϊκό Νάτριο συν.*SDS* (Sigma)

Ισοπροπανόλη *(Merck)*

N-Cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide συν.*CTAB (Merck)*

Tris – (hydroxymethyl) – aminomethan συν.*Tris (Merck)*

Φαινόλη – Χλωροφόρμιο – Ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 *(Sigma)*

Χλωριούχο Νάτριο *(Merck)*

7.1.3 Διαλύματα

- *Διάλυμα CTAB-NaCl (για την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος):*
  4.1g NaCl, 10g *CTAB* σε 100ml ddH_2O

- *Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE)*
  50mM *Tris*, 50mM *EDTA*, pH 8.0. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121^oC για 15 λεπτά.

- *Διάλυμα 10% SDS*

  5g *SDS* σε 50ml ddH_2O

- *Διάλυμα Tryptone Soya Broth (TSB)*

  30g *TSB* σε 1L ddH_2O. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121^oC για 15 λεπτά.

- *Διάλυμα της qPCR*

  το οποίο περιέχει master mix 2XPCR, 1 μM από κάθε εκκινητή και 250 nM από τον ιχνηθέτη (TaqMan probe) .

7.1.4 Πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli*

Στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιείται ένας βακτηριακός δείκτης *Escherichia coli*. *E. coli* ATCC 23716 (American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA).

7.1.5 Καταλύτης TiO_2

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις καταλύτη TiO_2 (Aeroxide P 25 (Degussa P 25)) που παρέχεται από την εταιρία Degussa AG.

7.1.6 Εκκινητές-Ιχνηθέτες

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της Real-time PCR είχαν την παρακάτω αλληλουχία:

Εμπρόσθιος εκκινητής : 5΄-GTCCAAAGCGGCGATTTG-3΄

Αντίστροφος εκκινητής : 5΄-CCTGCCAGGCCAGAAGTT-3΄

Ο ιχνηθέτης που χρησιμοποιήθηκε έχει την αλληλουχία

TaqMan ιχνηθέτης: 5΄-F-AAACGGCAGAGAAGGTACTGGAA-- BBQ-3΄

Πίνακας 7.1: εκκινητές για την real-time PCR και ιχνηθέτης TaqMan®

Εκκινητές και ιχνηθέτης	**Αλληλουχία (5΄ → 3΄)**	**Γονίδιο**	**Λειτουργία**	**GeneBank accession no.**
Εμπρόσθιος εκκινητής	GTCCAAAGCGGCGATTTG	*uidA*	Glucuronidase	S69414
Αντίστροφος εκκινητής	CCTGCCAGGCCAGAAGTT			
Ιχνηθέτης TaqMan®	F-AAACGGCAGAGAAGGTACTGGAA--BBQ			

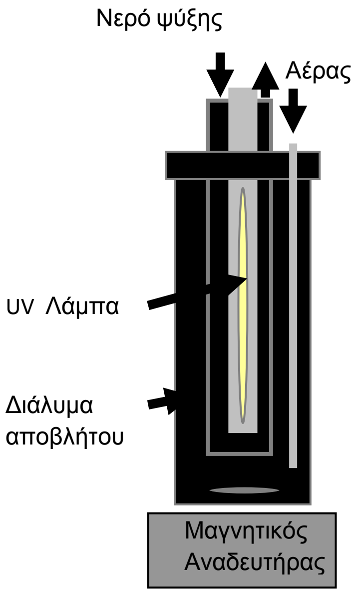
7.2 Μεθοδολογία

7.2.1 Φωτοκατάλυση

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων φωτοκατάλυσης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φωτός η λάμπα Radium Ralutec 9W /78, UVA 350-400 nm υπεριώδους ακτινοβολίας ισχύος 9 watt, η οποία τοποθετούνταν μέσα σε γυάλινη κυλινδρική υποδοχή ενός δοχείου. Το γυάλινο αυτό δοχείο αποτελείται από τρία μέρη στα οποίο δεν γίνεται μεταφορά μάζας μεταξύ τους.

Εικόνα 7.1: πειραματική διάταξη

Εικόνα 7.2: Λάμπα παραγωγής UVA ακτινοβολίας



Σχήμα 7.1. Απεικόνιση φωτοκαταλυτικού αντιδραστήρα εργαστηριακής κλίμακας.

Το πρώτο μέρος είναι αυτό στο οποίο τοποθετείται η λάμπα και είναι πρώτο στην σειρά μετρώντας από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του δοχείου. Το τρίτο μέρος αποτελείται από ένα διπλό γυάλινο τοίχωμα στο οποίο κυκλοφορεί το νερό το οποίο προέρχεται από την συσκευή ψύξης και διατηρεί την θερμοκρασία του διαλύματος σταθερή στους 25^{o} C. Ενδιάμεσα από αυτά τα μέρη τοποθετείται το νερό με τους μικροοργανισμούς. Το δοχείο καλύφθηκε εξωτερικά με αλουμινόχαρτο για να μην επηρεαστεί το διάλυμα από κάθε είδους ακτινοβολία, εκτός από αυτή που εξέπεμπε η

λάμπα, ενώ γινόταν και εισαγωγή αέρα για να γίνεται καλύτερη ανάδευση καθώς και για να υπάρχει στο διάλυμα αρκετό διαλυμένο οξυγόνο. Επιπλέον για την καλύτερη ανάδευση τοποθετούσαμε ένα μαγνητάκι. Μετά την εισαγωγή του διαλύματος με τους οργανισμούς γινόταν και η προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας του καταλύτη.
Η διάρκεια των πειραμάτων φωτοκατάλυσης παρουσία κατάλύτη TiO_2 ήταν 2 ώρες και την πρώτη μισή ώρα το πείραμα διεξαγόταν χωρίς την παρουσία λάμπας ώστε να πραγματοποιείται η προσρόφηση του καταλύτη. Τα δείγματα λαμβάνονταν κάθε 10 λεπτά μέχρι την πρώτη ώρα και το τελευταίο δείγμα λαμβανόταν μετά από μισή ώρα. Μετά από 3 μέρες από το τέλος της απολύμανσης εξετάστηκε η αναγέννηση των *E.coli*.

7.2.2 Απολύμανση με Υπεριώδη Ακτινοβολία UVC

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων απολύμανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας UVC χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ακτινοβολίας η λάμπα χαμηλής πίεσης ατμών υδραργύρου της PHILIPS, TUV PL-S, υπεριώδους ακτινοβολίας με ισχύ 11 Watt, η οποία τοποθετείται μέσα σε κυλινδρική υποδοχή κατασκευασμένη από χαλαζία (3,5 x15 cm), ώστε να μην απορροφάει τα μήκη κύματος της UVC ακτινοβολίας. Με την σειρά του ο χαλαζίας εφαρμοζόταν στο κέντρο κυλινδρικού γυάλινου δοχείου με ποσότητα 200 ml του προς επεξεργασία αποβλήτου. Στο γυάλινο δοχείο τοποθετείτε ένα μαγνητάκι ανάδευσης μαζί με το απόβλητο και το δοχείο παρέμενε βυθισμένο σε λουτρό ύδατος για την διατήρηση της θερμοκρασίας και αναδευόταν από ηλεκτρικό μαγνητικό αναδευτήρα που βρισκόταν στη βάση της όλης διάταξης.

Πραγματοποιήθηκε πείραμα απολύμανσης με UVC ακτινοβολία σε ποσότητα αποβλήτου 400 mL, με διάρκεια επεξεργασίας 1,5 ώρα, όπου και συγκρίθηκε η απολυμαντική ικανότητα της UVC με τα πειράματα της φωτοκατάλυσης τόσο με συνθετικό όσο και με πραγματικό απόβλητο. Πάρθηκαν δείγματα από το δοχείο έπειτα από 3, 6, 10, 20, 30, 60, 90 και 120 λεπτά επεξεργασίας, καθώς εξετάστηκε επίσης η αναγέννηση των *E.Coli* έπειτα από 3 μέρες από το τέλος της απολύμανσης με UVC.

7.2.3 Πειράματα αναγέννησης μικροοργανισμών στη φωτοκατάλυση

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο σκοτάδι και το φυσικό φως της ηλιακής ακτινοβολίας υπό συνεχή ανάδευση για 3 ημέρες. Μετά την απολύμανση, 100 mL του τελικού λυμάτος διατηρήθηκαν στο σκοτάδι και άλλα 100 mL ακτινοβολήθηκαν με φυσικό φως του ήλιου υπό συνεχή ανάδευση για 3 ημέρες. Μετά από αυτό το χρονικό διάστημα το τελικό δείγμα αναλύθηκε για την βιωσιμότητα των *E.coli*.

Τόσο για το δείγμα που βρισκόταν στο σκοτάδι όσο και για αυτό στο φυσικό φως, από τα 100 mL έγινε επίστρωση ποσότητας 1 mL σε 5 τριβλία με θρεπτικό υλικό Hicrome Agar (200 μL σε κάθε τριβλίο) και έγινε η επώασή τους σε κλίβανο των $37^{o}C$ για περίπου 20 ώρες. Μετά από κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε μέτρηση των αποικιών που παρουσιάστηκαν, κάτω από μικροσκόπιο.

7.2.4 Καλλιεργητική μέθοδος

Η ανίχνευση και η καταμέτρηση του βακτηρίου *E.coli* στο διάλυμα της αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων και την επίστρωση των δειγμάτων σε θρεπτικό υλικό (καλλιεργητική μέθοδος). Για τη σωστή καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, κυρίως των 10 λεπτών, λαμβάνεται δείγμα των 4 mL από το υπό επεξεργασία απόβλητο. Το δείγμα αυτό υφίσταται αραίωση σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται 1mL από το αρχικό δείγμα το οποίο αναδεύεται με 9 mL υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου (NaCl) συγκέντρωσης 0.8% (w/v %). Ακολούθησαν 6 διαδοχικές αραιώσεις για κάθε δείγμα και για καθεμία από τις αραιώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν 200 μL για την επίστρωσή τους σε θρεπτικό Hicrome Agar και την καταμέτρηση των αποικιών. Τα τριβλία επωάστηκαν στους $37^{o}C$ για 20-24 ώρες πριν την καταμέτρηση των αποικιών. Ο ελάχιστος ανιχνεύσιμος αριθμός των βακτηρίων σε αυτά τα πειράματα ήταν 1 CFU/mL (δεδομένου ότι 1000μL (5×200 μL) είχαν επιστρωθεί σε κάθε τριβλίο).

7.2.5 Real time PCR

- **Μεθοδολογία TaqMan**

Στη μέθοδο της Real-time PCR, πραγματοποιείται μέτρηση φθορισμού με τη χρησιμοποίηση των εκκινητών (qPCR primers) και των ιχνηθετών Taqman, οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί με τη χρήση του λογισμικού υπολογιστών Primer Express v 2,0 (Applied Biosystems). Οι ιχνηθέτες Taqman έχουν σχεδιαστεί ώστε να διαθέτουν υψηλότερη θερμοκρασία τήξης (Tm) από εκκινητές κατά 10^{o}C περίπου έτσι ώστε να εξασφαλισθεί η δέσμευση σε συγκεκριμένες περιοχές. Ο ιχνηθέτης (probe) επισημαίνεται με μια φθορίζουσα χρωστική ουσία, FAM, μετά τη θέση 5 και μια ουσία (quencher) μη φθορισμού στη θέση 3. Το συνολικό μέγεθος του προϊόντος PCR είναι μικρότερο από 100 βάσεις. Το πρότυπο γονιδιωματικό DNA, οι PCR εκκινητές, και οι ιχνηθέτες (probes) προστέθηκαν στο Taqman® Universal PCR Mastermix ώστε να δημιουργηθεί τελικός όγκος 25 μL.

Το αναμιγμένο διάλυμα της real-time qPCR περιέχει 2X PCR μίγμα master mix, 1μM από κάθε εκκινητή και 250nM του ιχνηθέτη Taqman. Οι αντιδράσεις της Real-time PCR πραγματοποιήθηκαν στον εργαστηριακό εξοπλισμό StepOne Plus System (Applied Biosystems) σε θερμοκρασία 50 ^{o}C για 2 λεπτά και 95 ^{o}C για 10 λεπτά, ακολουθούμενες από 45 κύκλους των 95 ^{o}C για 15 δευτερόλεπτα και 60 ^{o}C για 60 s (Chatzisymeon et al.,2010).

Όλα τα δείγματα αναλύθηκαν τρεις φορές για την εξασφάλιση της επαναληψιμότητας της μεθόδου. Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας ανίχνευσης, έγινε έλεγχος μιας σειράς 10-φορές αραιωμένου γονιδιακού DNA *E.coli* (από 100 ng έως 10 fg) για όριο κύκλων(C_T), χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της real-time qPCR (Chatzisymeon et al.,2010).

- **Απομόνωση DNA**

Παράλληλα, το γονιδιακό DNA απομονώθηκε σύμφωνα με το τυπικό πρωτόκολλο με βάση τη χημική εκχύλιση και την προσθήκη φαινόλης / χλωροφορμίου / ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) .

Συγκεκριμένα έγινε λήψη 1.5 ml, από κάθε υγρή καλλιέργεια και από τους σωλήνες με τις διαδοχικές αραιώσεις, και τοποθετήθηκαν σε *eppendorf* για να ακολουθήσει φυγοκέντρηση. Στη συνέχεια, τα κύτταρα υπέστησαν φυγοκέντρηση για 5 min σε μικροφυγόκεντρο. Έγινε αναρρόφηση με πιπέτα και ακολούθησε προσθήκη το 567 μL διαλύματος TE , έγινε προσθήκη 30 μL του 10% SDS και 3 μL του διαλύματος 20mg/ml πρωτεϊνάσης Κ και τέλος επωάστηκε για 1 ώρα στους 37^{o}C.

Στη συνέχεια, 80 μL του 10% CTAB που περιέχει 0,7% NaCl προστέθηκαν και το μείγμα επωάστηκε για 10 λεπτά σε 65^{o}C. Στο διάλυμα που εξάγεται προστέθηκαν 750 μL του χλωροφορμίου, έγινε φυγοκέντρηση, και λήψη της υδατικής φάσης. Το DNA που λήφθηκε από την υδατική φάση αναμίχθηκε με 500 μL ισοπροπανόλης. Το διάλυμα έμεινε για μια νύχτα στους -20^{o}C.

Στη συνέχεια το ίζημα πλύθηκε με 70% αιθανόλη. Έγινε φυγοκέντρηση και απόρριψη της αιθανόλης, ώστε το ίζημα να είναι καθαρό και να περιέχει μόνο το γενετικό υλικό. Η ποσότητα του συνόλου των δειγμάτων DNA προσδιορίσθηκε με τιμή απορρόφησης τους σε 260nm. Η καθαρότητα του νουκλεϊκού οξέος καθορίστηκε επίσης από το λόγο της απορρόφησης δειγμάτων στα 260 nm και 280 nm (Chatzisymeon et al.,2010).

- **Φωτομέτρηση DNA**

Μια από τις μεθόδους για τον προσδιορισμό της ποσότητας και καθαρότητας του DNA είναι η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται φωτομέτρηση του γενετικού υλικού στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική απορρόφηση στα 260 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκέντρωσης του γενετικού υλικού στο υπό εξέταση δείγμα. Οπτική απορρόφηση της τάξης της μιας μονάδας αντιστοιχεί σε 50 μg/ml δίκλωνου DNA, 40 μg/ml μονόκλωνου DNA και RNA και περίπου σε 20 μg/ml μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων. Η αναλογία των οπτικών απορροφήσεων στα δύο μήκη κύματος 260 nm και 280 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος. Η τιμή της αναλογίας για υψηλής καθαρότητας DNA είναι 1/8. Εάν υπάρχει επιμόλυνση πρωτεϊνών ή φαινόλης η τιμή αυτή είναι σημαντικά μικρότερη με αποτέλεσμα να καθίσταται αδύνατος ο ακριβής προσδιορισμός της ποσότητας του απομονωμένου γενετικού υλικού.

- **Πρότυπη Καμπύλη**

Η ποσοτικοποίηση του βακτηριακού DNA έγινε με τη βοήθεια της μεθόδου της Real-time PCR. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε μια πρότυπη καμπύλη γονιδιακού DNA από καθαρές καλλιέργειες του βακτηρίου *E.coli*.

Για να προσδιοριστεί η ευαισθησία ανίχνευσης της διαδικασίας, έγινε έλεγχος σε μια σειρά αραιωμένου γονιδιακού DNA (1/10 αραίωση), από καθαρή καλλιέργεια, και πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση του κύκλου αντίδρασης (C_T).

Η πρότυπη καμπύλη χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί η ποσότητα του DNA που ανιχνεύθηκε σε κάθε δείγμα. Η ευαισθησία ανίχνευσης της Real-time PCR είναι της τάξης των 100 fg γονιδιακού DNA *E.coli* καθαρής καλλιέργειας, το οποίο είναι περίπου 21 αντίγραφα του γονιδίου uidA της *E.coli*. Ο υπολογισμός αυτός βασίζεται στα 4.8 fg, που χαρακτηρίζει τη μέση ποσότητα γονιδιακού DNA σε ένα κύτταρο *E.coli* (4.7Mbp). Αυτό το όριο ανίχνευσης, έχει αναφερθεί σε άλλες μελέτες (Shannon et al., 2007), υπογραμμίζοντας την σπουδαιότητα των μοριακών μεθόδων, σχετικά με την ακριβή ανίχνευση, την απομόνωση και την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών (Chatzisymeon et al.,2010).

7.3 Σχεδιασμός πειραμάτων

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 5 πειράματα απλής προσρόφησης του καταλύτη χωρίς ακτινοβολία, με διαφορετική συγκέντρωση καταλύτη. Πραγματοποιήθηκαν 7 πειράματα φωτοκατάλυσης με UV-A ακτινοβολία και 5 πειράματα φωτόλυσης με UV-C ακτινοβολία σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου NaCl 0,8 % (w/v), το οποίο επιμολύνθηκε με βακτήρια *E.coli*.

Για την δημιουργία του διαλύματος αυτού προστέθηκαν σε 350 ml NaCl, 2 ή περισσότερες κρικιές από την καλλιέργεια *E.coli* σε Nutrient agar. Για να επιτευχθούν συγκεντρώσεις παραπλήσιες με αυτές των πραγματικών λυμάτων ήταν απαραίτητη η φωτομέτρηση, δηλαδή η μέτρηση της θολότητας σε φωτόμετρο σε μήκος κύματος 600 nm, σύμφωνα με τα πρότυπα “Mc Farland standards” για να χαρακτηριστεί το βακτηριακό εναιώρημα με συγκεκριμένη τιμή. Οι τιμές επιθυμητής απορρόφησης φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 7.2 : τιμές επιθυμητής απορρόφησης

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% Χλωριούχο βάριο (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% Θειικό οξύ (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Πυκνότητα κυττάρων (1X10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Διαπερατότητα*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Απορρόφηση*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

*σε μήκος κύματος των 600 nm

Με το πραγματικό λύμα πραγματοποιήθηκαν συνολικά 4 πειράματα, τα 2 εκ των οποίων ήταν με UV-A ακτινοβολία και προσρόφηση 200 mg/l καταλύτη και 400 mg/l αντίστοιχα, και 2 με UV-C ακτινοβολία χωρίς καταλύτη και με 25 mg/l καταλύτη.

Το πραγματικό λύμα συλλέχθηκε από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων του Δήμου Χανίων (Κρήτη, Ελλάδα), λίγο πριν την είσοδο του αποβλήτου στο στάδιο της χλωρίωσης.

Για όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της Real-time PCR ώστε να έχουμε πιο ακριβή αποτελέσματα για τη μελέτη της απολύμανσης.

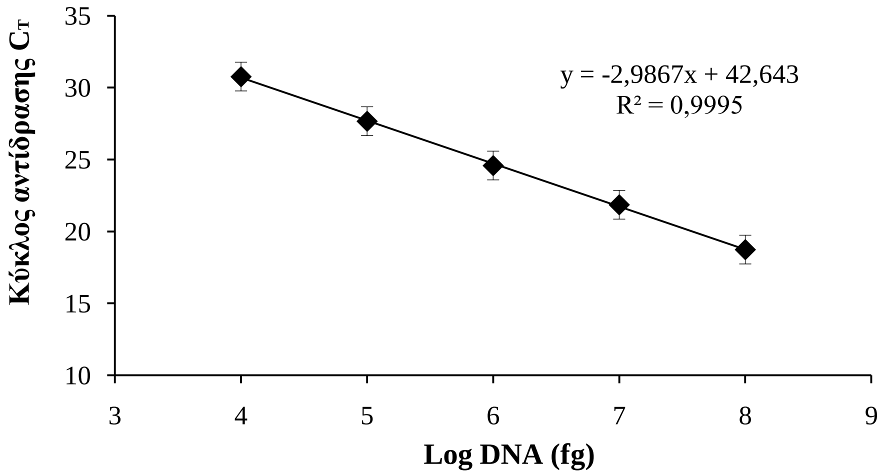
Ο πίνακας 7.3 δείχνει όλα τις συνθήκες των πειραμάτων.

Πίνακας 7.3 : πειραματικές συνθήκες

	Απόβλητο	Συγκέντρωση καταλύτη (TiO_2 mg/l)	Ακτινοβολία	Αρχική Συγκέντρωση *E.coli* (cfu/ml)
P1	NaCl 0.8%	100	-	$6{,}57*10^7$
P2	NaCl 0.8%	100	-	$5{,}9*10^7$
P3	NaCl 0.8%	100	-	$3{,}07*10^7$
P4	NaCl 0.8%	100	UV-A 9 Watt	$8{,}9*10^7$
P5	NaCl 0.8%	100	-	$4{,}7*10^7$
P6	NaCl 0.8%	200	UV-A 9 Watt	$4{,}45*10^7$
P7	NaCl 0.8%	400	UV-A 9 Watt	$1{,}15*10^7$
P8	NaCl 0.8%	-	UV-A 9 Watt	$9.1*10^7$
P9	NaCl 0.8%	200	UV-A 9 Watt	$2{,}8*10^7$
P10	NaCl 0.8%	200	-	$1{,}45*10^7$
P11	NaCl 0.8%	200	UV-A 9 Watt	$1{,}7*10^7$
P12	NaCl 0.8%	-	UV-C 11 Watt	$8{,}3*10^7$
P13	NaCl 0.8%	-	UV-C 11 Watt	$5{,}4*10^7$
P14	NaCl 0.8%	-	UV-C 11 Watt	$3{,}7*10^7$
P15	Πραγματικό	200	UV-A 9 Watt	$7{,}5 *10^3$
P16	Πραγματικό	400	UV-A 9 Watt	$6{,}25 *10^3$
P17	Πραγματικό	-	UV-C 11 Watt	$7 *10^3$
P18	Πραγματικό	25	UV-C 11 Watt	$1{,}25 *10^4$
P19	NaCl 0.8%	200	UV-A 9 Watt	$3{,}05*10^7$
P20	NaCl 0.8%	-	UV-C 11 Watt	$8{,}975*10^7$
P21	NaCl 0.8%	25	UV-C 11 Watt	$1{,}67*10^7$

8. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.1 Πρότυπη καμπύλη - Ποσοτικοποίηση των *E.coli* με τη μέθοδο της real-time PCR



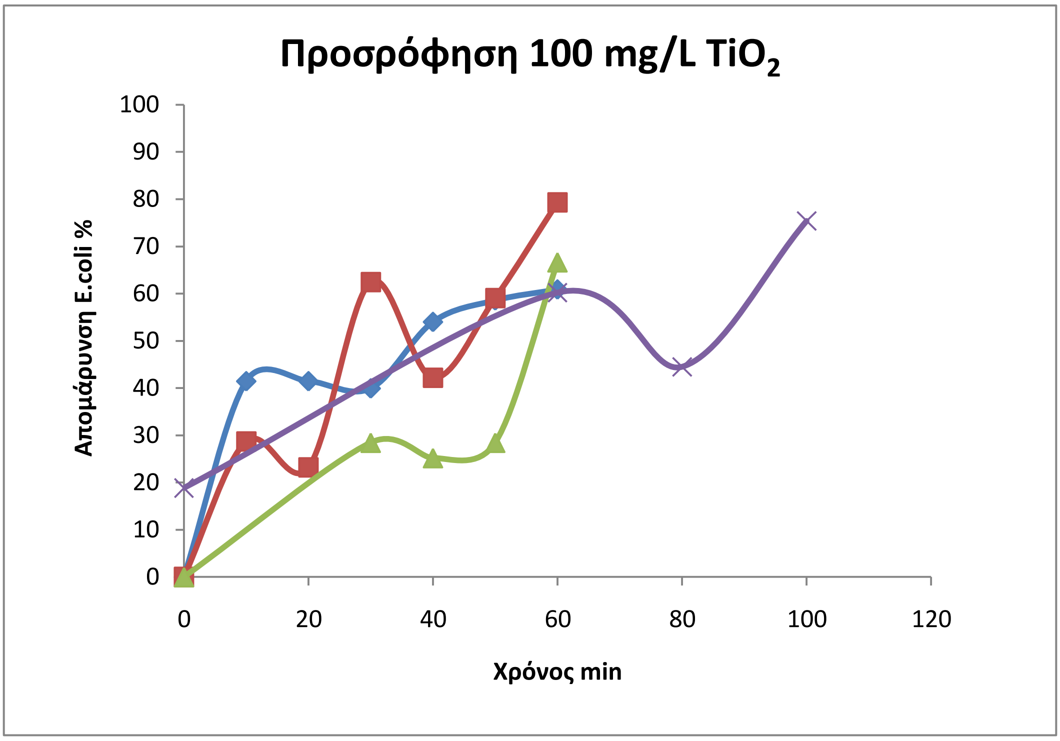
Διάγραμμα 8.1: Καμπύλη βαθμονόμησης ποσότητας DNA των E.coli

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση του γονιδιακού DNA του βακτηρίου *E.coli*. Για τον προσδιορισμό της ευαισθησίας ανίχνευσης της μεθόδου real-time PCR, έγινε μια σειρά δέκα αραιώσεων καθαρού DNA του στελέχους του βακτηρίου, ώστε να εκτιμηθεί το ποσό των κύκλων (C_T) που πραγματοποιήθηκαν για κάθε ποσότητα DNA.

8.2 Πειράματα Προσρόφησης

Αρχικά έγιναν 4 επαναληπτικά πειράματα προσρόφησης του υδατικού διαλύματος χλωριούχου νατρίου NaCl 0,8 % (w/v), το οποίο επιμολύνθηκε με βακτήρια *E.coli*, σε 100 mg/L καταλύτη TiO_2, για να εκτιμηθεί το ποσοστό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών μόνο από τον καταλύτη, απουσία ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 8.1.

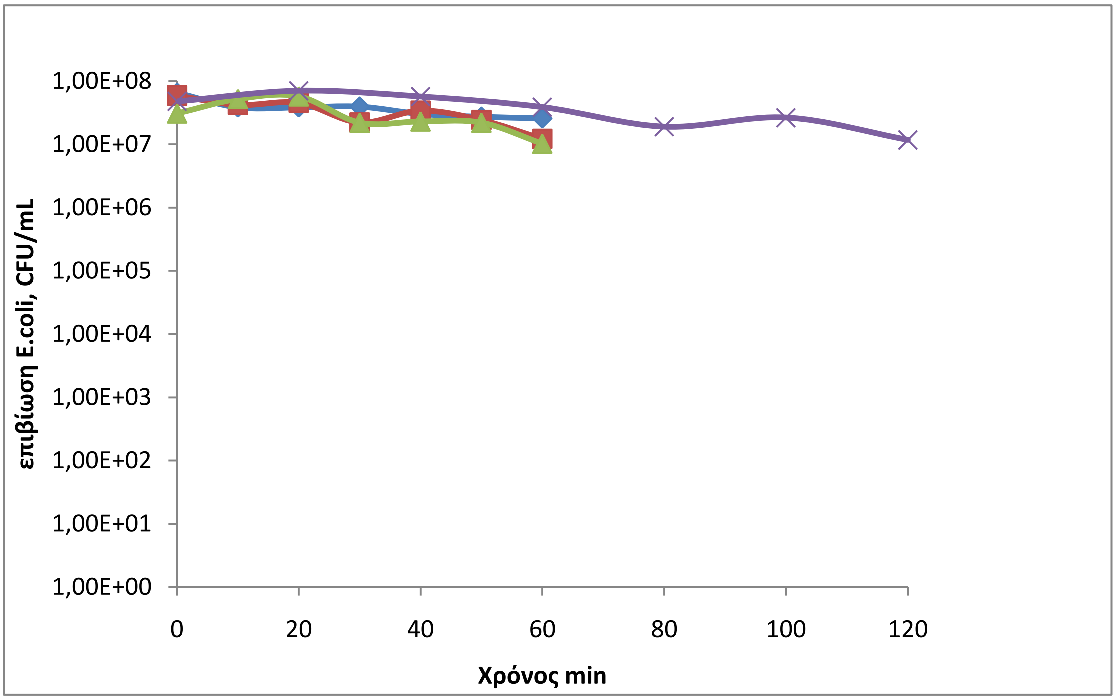
Στα παρακάτω διαγράμματα φαίνεται η ποσοστιαία απομάκρυνση σε σχέση με το χρόνο καθώς και οι αποικίες $\frac{CFU}{mL}$ σε λογαριθμική κλίμακα ανά μονάδα χρόνου.



Διάγραμμα 8.1: Ποσοστό αδρανοποίησης των E.coli κατά την προσρόφηση τους σε 100 mg/L TiO_2, απουσία φωτός, υδατικό διάλυμα, επαναληπτικά πειράματα.

Παρατηρούμε ότι δεν έχει απολυμανθεί το μολυσμένο νερό και το μέγιστο ποσοστό απομάκρυνσης είναι περίπου το 80 %. Διαπιστώνουμε επίσης ότι η προσροφητική ικανότητα του καταλύτη TiO_2 δεν επαρκεί για την απολύμανση του νερού. Συγκεκριμένα η *E.coli* προσροφάται στην επιφάνεια του καταλύτη και η αλληλεπίδραση αυτή έχει ως συνέπεια την απομάκρυνση του βακτηρίου κατά 80% από το υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου.

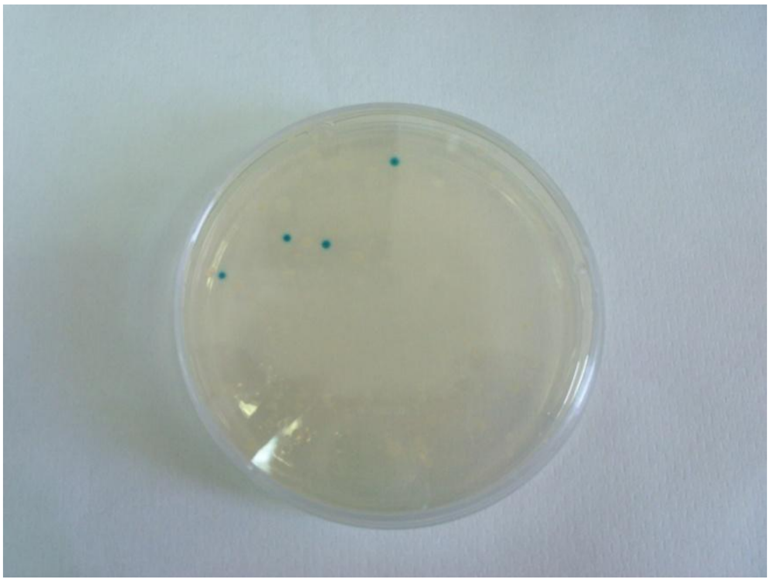
Ωστόσο, απουσία ακτινοβολίας, η απολύμανση του νερού δεν είναι η επιθυμητή καθώς το ικανοποιητικό ποσοστό είναι μεταξύ 99-100%. Παρόλα αυτά η τιμή των αποικιών ανά mL όπως φαίνεται από το παρακάτω διάγραμμα δεν έχει μειωθεί και είναι της τάξης του $10^7 \frac{CFU}{mL}$.



Διαγραμμα 8.2: Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια προσρόφησης τους σε 100 mg/L TiO_2, απουσία φωτό, υδατικό διάλυμα, επαναληπτικά πειράματα.

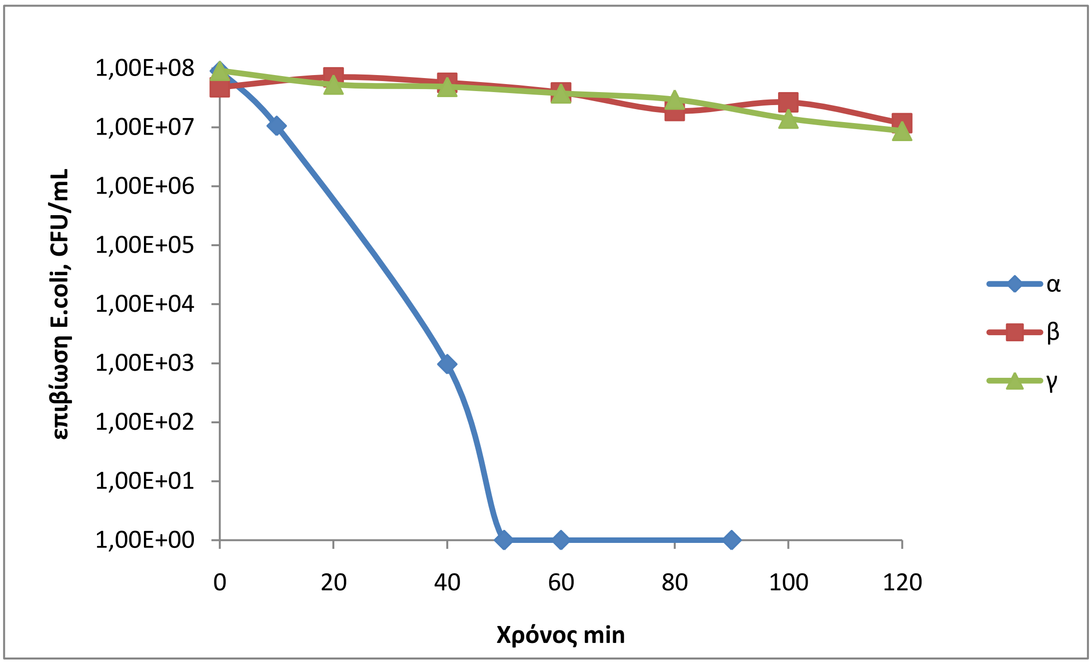
8.3 Σύγκριση UV-A, UV-A/TiO_2 και TiO_2/dark διεργασιών

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου έγινε σύγκριση της απολύμανσης του υδατικού διάλυματος χλωριούχου νατρίου NaCl 0,8 % (w/v), το οποίο επιμολύνθηκε με βακτήρια *E.coli*, σε 3 διαφορετικές συνθήκες.



Εικόνα 8.1: Απεικόνιση των αποικιών E.coli

Συνθήκες απολύμανσης: (α) με φωτοκατάλυση (συνδυασμό UV-A/TiO_2) με συγκέντρωση TiO_2=100 mg/L, (β) μόνο με συγκέντρωση καταλύτη TiO_2=100 mg/L και (γ) μόνο ακτινοβολία UV-A. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα.

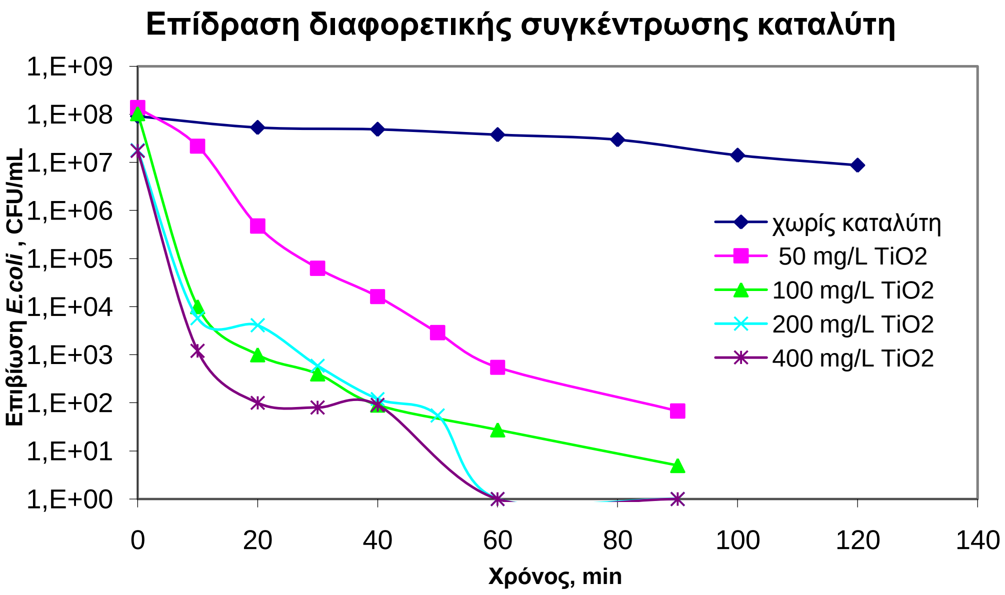


Διάγραμμα 8.4 : Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του αποβλήτου με (α) UV-A/TiO_2, (β) TiO_2 και απουσία ακτινοβολίας (γ) UV-A ακτινοβολία

Παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση του πληθυσμού της *E.coli* όταν προσροφήθηκε μόνο σε καταλυτική επιφάνεια, μειώθηκε μόνο κατά μια τάξη μεγέθους. Επιπρόσθετα, κατά τη φωτόλυση του συνθετικού λύματος, η συγκέντρωση της *E.coli* μειώθηκε κατά μια τάξη μεγέθους. Διαπιστώθηκε ότι η ακτινοβολία UV-A σε συνδυασμό με την προσρόφηση σε καταλύτη οδήγησε σε 100% αδρανοποίηση *E.coli* μετά από 50 λεπτά. Αυτό συνεπάγεται ότι η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την προσρόφηση του καταλύτη, είχε ως αποτέλεσμα την θανάτωση της *E.coli*.

8.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη. Συγκεκριμένα, έγινε σύγκριση των πειραμάτων φωτόλυσης και φωτοκατάλυσης για συγκέντρωση καταλύτη TiO_2=50 mg/L, TiO_2=100 mg/L, TiO_2=200 mg/L και TiO_2=400 mg/L. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



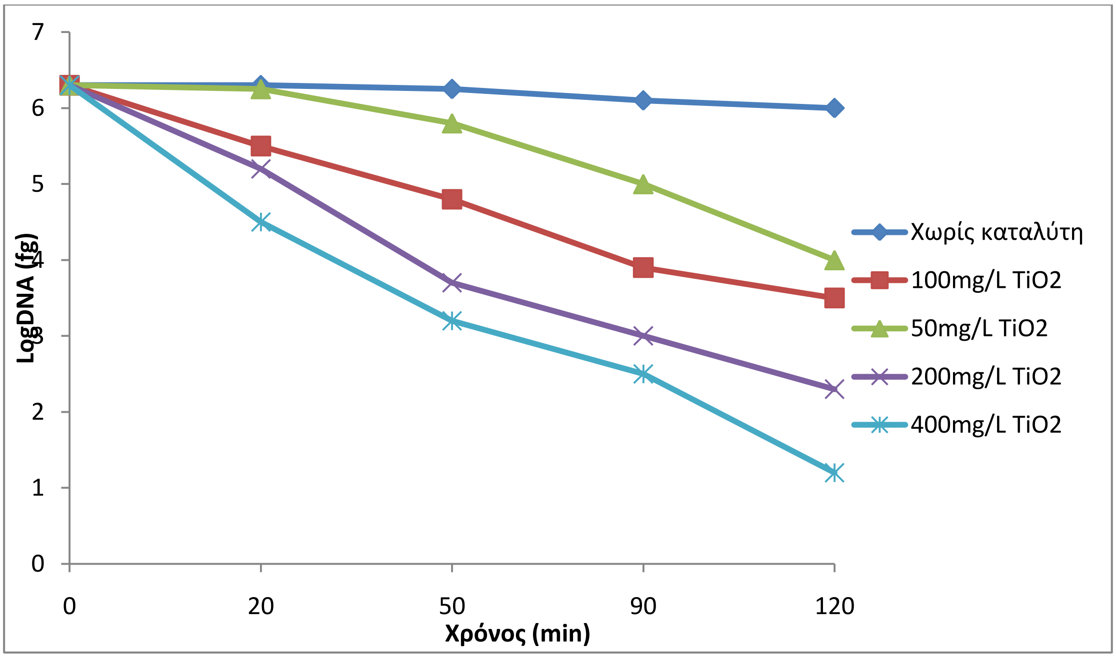
Διάγραμμα 8.5 : Επιβίωση της E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του επιμολυσμένου διαλύματος χλωριούχου νατρίου NaCl 0,8 % (w/v), με UV-A ακτινοβολία υπό διαφορετικές συγκεντρώσεις καταλύτη TiO_2.

Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν, παρατηρούμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη TiO_2, το ποσοστό αδρανοποίησης του βακτηρίου είναι μεγαλύτερο. Συγκεκριμένα, αυξάνοντας την ποσότητα του TiO_2, η *E.coli* απενεργοποιείται σε λιγότερο χρόνο με ποσοστό αδρανοποίησης 100%.

Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί ότι, σύμφωνα με τους ισχύοντες κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η συγκέντρωση της *E.coli* στο νερό πρέπει να είναι ίση με το μηδέν. Ως εκ τούτου, αυτό είναι εφικτό μόνο υπό την παρουσία 200 - 400 mg/L TiO_2 και ύστερα από 60 λεπτά της φωτοκατάλυσης, όπου έχει επιτευχθεί το 100% της αδρανοποίησης *E.coli*.

Λαμβάνοντας υπόψη ότι, η λιγότερη ποσότητα TiO_2 (200 mg/L) έχει την ίδια αποτελεσματικότητα και απόδοση σε σχέση με τη μεγαλύτερη (400 mg/L), όλα τα επόμενα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με συγκέντρωση καταλύτη 200 mg/L TiO_2.

Το παρακάτω διάγραμμα δείχνει τα αποτελέσματα για τα ίδια πειράματα με τη μέθοδο της Real-time PCR.



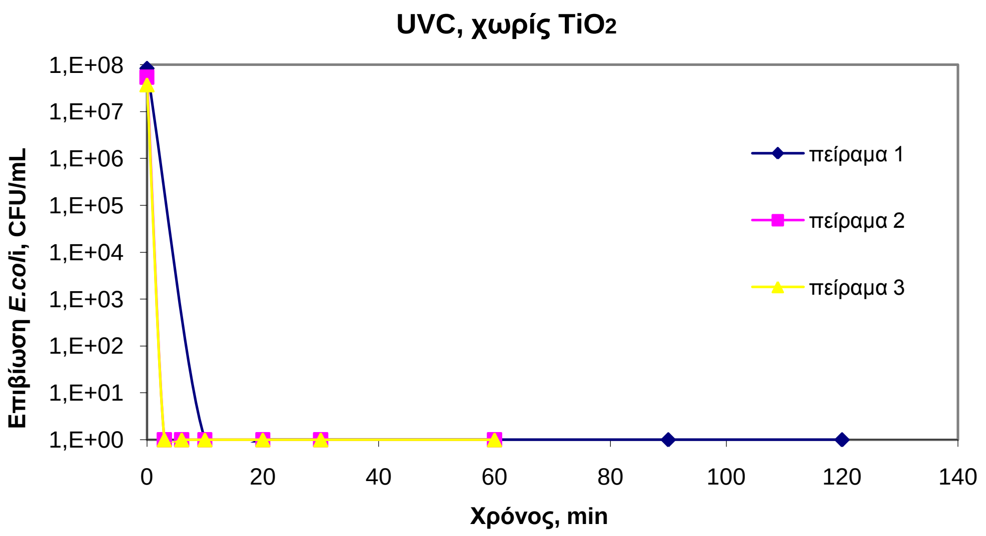
Διάγραμμα 8.6: Ανίχνευση του γονιδιακού DNA του βακτηρίου της Escherichia coli σε υδατικό διάλυμα NaCl 0,8% (w / v) για τις διάφορες φορτίσεις TiO_2 με ακτινοβολία UV-A ακτινοβολία με τη μέθοδο Real-time PCR.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τις δύο μεθόδους που εφαρμόζονται, υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση στη μέθοδο της Real-time PCR, η οποία έδειξε ότι ακόμα και μετά από 60 λεπτά ακτινοβολίας, φαίνεται η παρουσία του DNA του βακτηρίου στα δείγματα που μελετήθηκαν. Το σημαντικό ζήτημα πολλών μελετών που ασχολούνται με μοριακές τεχνικές είναι ο προσδιορισμός των αποτελεσμάτων να είναι ενδεικτικός των βιώσιμων κυττάρων.

Ωστόσο, στην παρούσα μελέτη ο μοναδικός παράγοντας είναι οι ακτινοβολίες UV-A και UV-C, οι οποίες θα μπορούσαν να βλάψουν τα βακτηριακά κύτταρα , και αναγνωρίζονται ως ικανές να βλάψουν τους μικροοργανισμούς. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι όλες οι παράμετροι ήταν σταθερές και ελεγχόμενες, τα θετικά αποτελέσματα που προκύπτουν από τη Real-time PCR ήταν αξιόπιστα, όσον αφορά τη βιωσιμότητα των βακτηρίων και στην ακεραιότητα του υπό εξέταση DNA.

8.5 Επίδραση της UV-C ακτινοβολίας σε διάλυμα χλωριούχου νατρίου NaCl 0,8 % (w/v)

Στο διάγραμμα 8.7 που ακολουθεί δίνονται τα αποτελέσματα από 3 πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε επιμολυσμένο υδατικό διάλυμα χλωριούχου νατρίου 0,8 % (w/v), για τον προσδιορισμό της επίδρασης της UV-C ακτινοβολίας.



Διάγραμμα 8.7 : Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του λύματος με UV-C ακτινοβολία, σε υδατικό διάλυμα NaCl 0.8% (w/v).

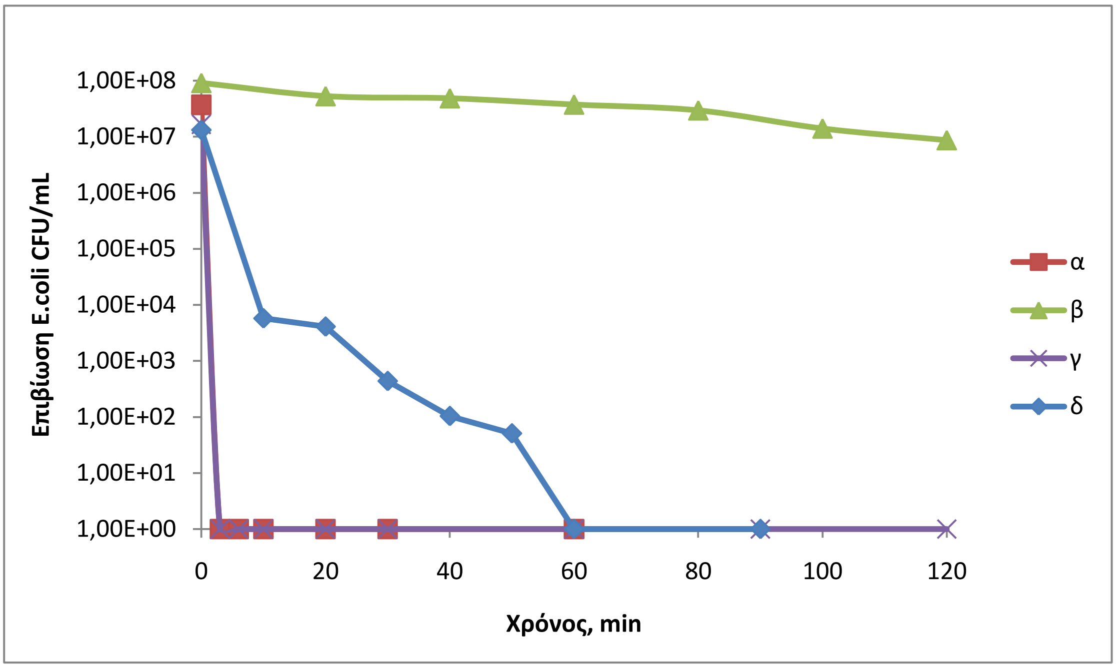
Αξίζει να σημειωθεί ότι και στα τρία επαναληπτικά πειράματα, είχαμε ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις βακτηρίου στο νερό της τάξης των 10^7 και παρατηρήθηκε ολική απολύμανση μέσα σε χρόνο λιγότερο από 3 λεπτά.

Πρέπει να επισημανθεί ότι μετά το πέρας των πειράματων αυτών, πραγματοποιήθηκαν πειράματα αναγέννησης των μικροοργανισμών τόσο στο σκοτάδι, όσο και στην ηλιακή ακτινοβολία, υπό συνεχή ανάδευση για 3 μέρες. Στα πειράματα αυτά παρατηρήθηκε φωτοενεργοποίηση του βακτηρίου *E.coli* μετά από 3 μέρες. Οπότε πρέπει να επισημανθεί ότι η UV-C ακτινοβολία απλώς αδρανοποιεί το βακτήριο και δεν μειώνει τη βιωσιμότητά του.

Στην ενότητα 8.9 φαίνεται πίνακας με τα αποτελέσματα της αναγέννησης του βακτηρίου της *E.coli*.

8.6 Επίδραση της πηγής ακτινοβολίας (UV-A και UV-C)

Η επίδραση των διαφόρων ακτινοβολιών UV μελετήθηκε υπό παρόμοιες εντάσεις, οι οποίες ήταν 9W και 11 W για UV-A και UV-C, αντίστοιχα.

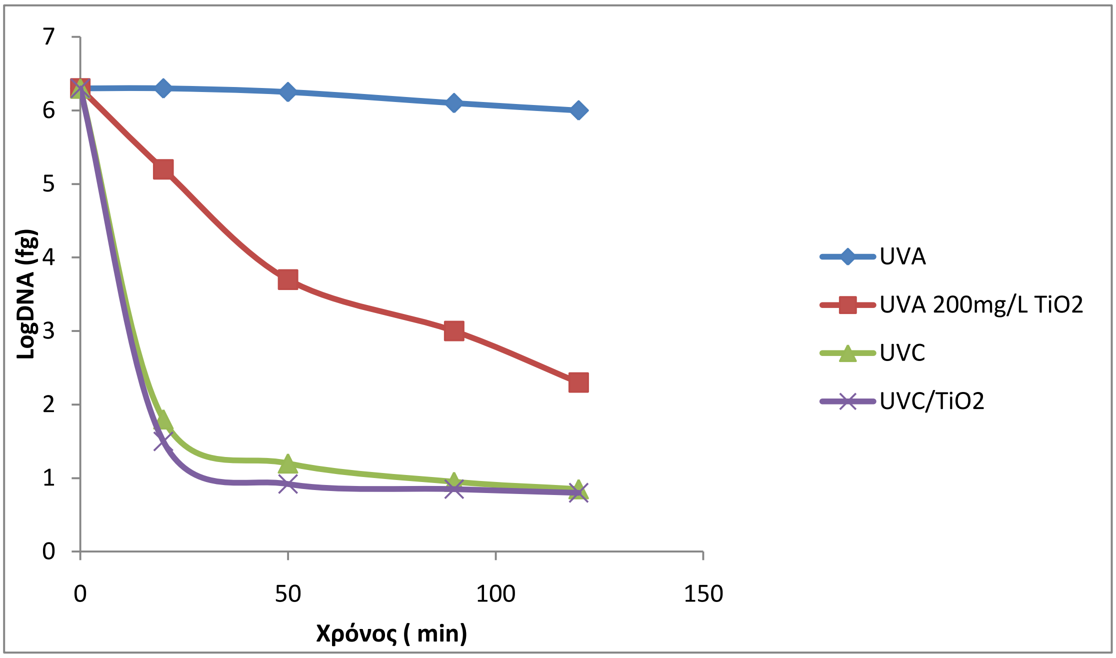


Διάγραμμα 8.8: Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του αποβλήτου με (α) UV-C ακτινοβολία, (β) UV-A ακτινοβολία, (γ) UV-C ακτινοβολία και 25 mg/L TiO_2 και (δ) UV-A ακτινοβολία και 200 mg/L TiO_2.

Από το παραπάνω διάγραμμα, παρατηρείται ότι η ακτινοβολία UV-A είναι λιγότερο αποτελεσματική από την ακτινοβολία UV-C, ακόμη και με την παρουσία καταλύτη συγκέντρωσης 200 mg/L. Πλήρης αδρανοποίηση επιτεύχθηκε μετά από 60 λεπτά με την απολύμανση UV-A/TiO_2.

Επιπλέον, η απενεργοποίηση της *E.coli* είναι κατά πολύ πιο αποτελεσματική υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας UV-C με την παρουσία ή την απουσία του TiO_2. Η συγκέντρωση των βακτηρίων μειώνεται σε μη ανιχνεύσιμο χρόνο μέχρι τα 3 λεπτά της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου real-time PCR φαίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



Διάγραμμα 8.9: Ανίχνευση του γονιδιακού DNA του Escherichia coli σε υδατικό διάλυμα NaCl 0,8% (w / v) με (α) UV-A ακτινοβολία, (β) UV-A ακτινοβολία και 200 mg/L TiO_2, (γ)UV-C ακτινοβολία και (δ) UV-C ακτινοβολία και 25 mg/L TiO_2, με τη μέθοδο Real-time PCR.

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, η μέθοδος της real-time PCR δίνει αποτελέσματα σε διαφορετικές περιόδους της βακτηριακής αδρανοποίησης. Παρ 'όλα αυτά, υπήρχε μια συμβατότητα, όσον αφορά την αποτελεσματικότητα της UV ακτινοβολίας, καθώς η UV-C ήταν πιο ισχυρή. Μέσα σε 3 λεπτά της επεξεργασίας υπήρχε 80% μείωση του βακτηριακού DNA, ενώ μετά από περίπου 90 λεπτά, η συνολική μείωση του DNA είναι 95%.

Η διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων οφείλεται στην κατάσταση των βακτηρίων που ορίζεται ως «βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη "(VBNC), ως συνέπεια της μεθόδου απολύμανσης. Η UV ακτινοβολία μπορεί να θεωρηθεί ως ένας από τους πιο ισχυρούς παράγοντες, που προκαλεί την κατάσταση VBNC των βακτηρίων (Chatzisymeon et al., 2010).

Επίσης, το νερό αποτελεί ολιγοτροφικό περιβάλλον, όπου οι μεγάλοι πληθυσμοί των βακτηρίων έχουν μη καλλιεργήσιμη μορφή, καθιστώντας δύσκολο για τον ερευνητή να τους ποσοτικοποιήσει σωστά. Η κατάσταση VBNC οδηγεί σε αισθητή απώλεια της βιωσιμότητας σε βακτήρια και λανθασμένα αρνητικά αποτελέσματα εφαρμογής των κλασσικών μεθόδων καλλιέργειας.

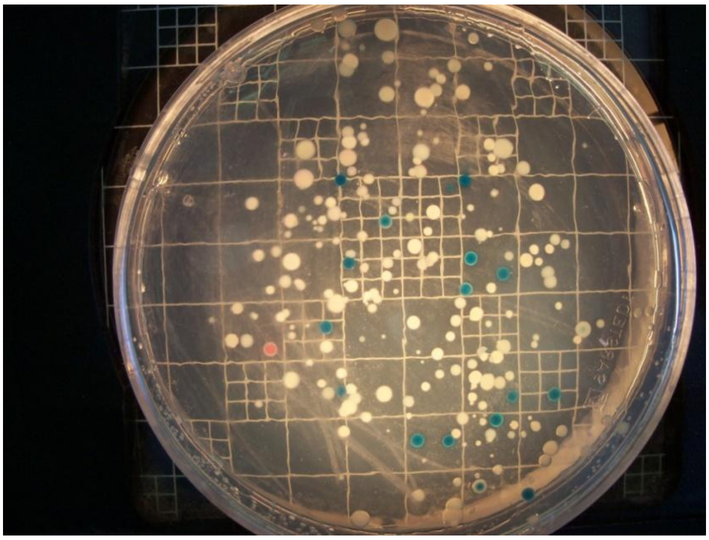
Παρόλα αυτά, οι μικροοργανισμοί οι οποίοι εισέρχονται στην κατάσταση αυτή διατηρούν τα παθογόνα χαρακτηριστικά τους και η απαρίθμηση για τον εντοπισμό τους είναι υποχρεωτική, έτσι ώστε η μικροβιακή αξιολόγηση του υδάτινου περιβάλλοντος να είναι ακριβής και αξιόπιστη (Muela et al.,2008).

Από τα αποτελέσματά μας παρατηρείται ότι οι μοριακές μέθοδοι, είναι ικανές να ανιχνεύουν μικροβιακούς πληθυσμούς που βρίσκονται στα ύδατα συμπεριλαμβανομένων και των μη καλλιεργήσιμων.

8.7 Απολυμαντική ικανότητα φωτοκατάλυσης σε πραγματικό λύμα

Τα πειράματα απολύμανσης πραγματοποιήθηκαν με πραγματικό λύμα το οποίο συλλέχθηκε από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων του Δήμου Χανίων (Κρήτη, Ελλάδα), λίγο πριν την είσοδο του αποβλήτου στο στάδιο της χλωρίωσης.

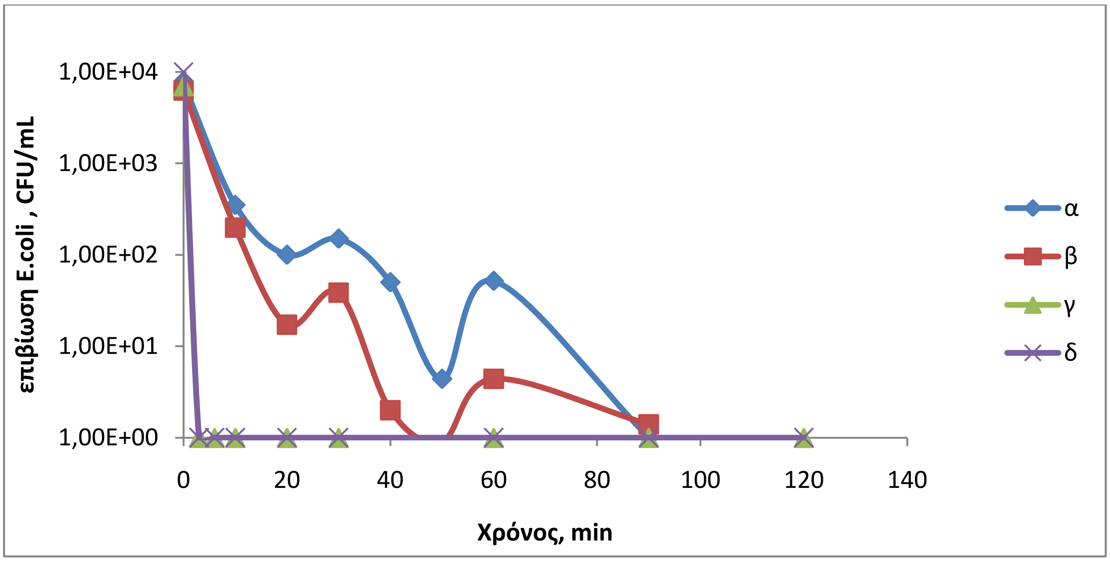
Το pH του αποβλήτου ήταν 7.8. Το COD ήταν 11 mg/L. Η θολότητα ήταν 1.4 NTU. Τα *E.coli* τα οποία ήταν το αντικείμενο της μελέτης μας, και είχαν συγκέντρωση 8.3 10^3 cfu/ml και Enterococcus με συγκέντρωση 11 cfu/ml.



Εικόνα 8.2: Αποικίες βακτηρίων από πραγματικό λύμα

Στο πραγματικό λύμα πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UV-A και συγκεντρώσεις καταλύτη 200 mg/L και 400 mg/L και 2 πειράματα με ακτινοβολία UV-C, εκ των οποίων το ένα με συγκέντρωση καταλύτη 25 mg/L, ώστε να γίνει έλεγχος φωτοενεργοποίησης 3 μέρες μετά από την απολύμανση του αποβλήτου.

Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται η επιβίωση της *E.coli* σε cfu/mL σε λογαριθμική κλίμακα ανά μονάδα χρόνου.

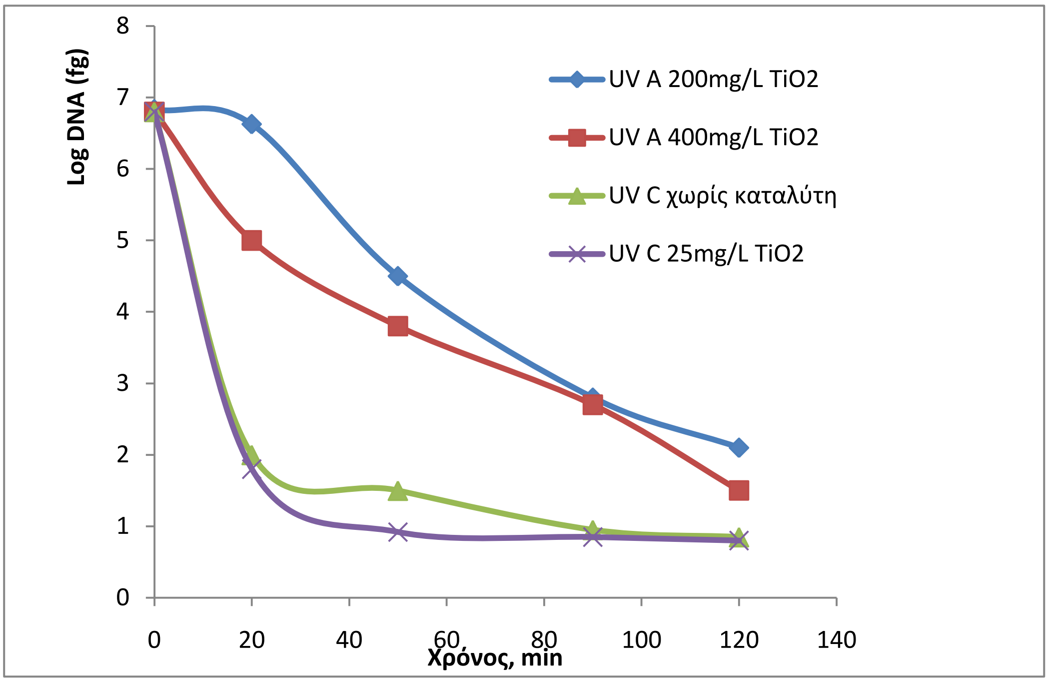


Διάγραμμα 8.10: Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του πραγματικού αποβλήτου με (α) UV-A ακτινοβολία και 200 mg/L TiO_2 , (β) UV-A ακτινοβολία και 400 mg/L TiO_2, (γ) UV-C ακτινοβολία και (δ) UV-C ακτινοβολία και 25 mg/L TiO_2

Συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης του πραγματικού λύματος παρατηρείται ότι η UV-C ακτινοβολία ήταν ικανή να αδρανοποιήσει πλήρως τον πληθυσμό *E. coli* σε μόλις 3 λεπτά. Ενώ, με UV-A ακτινοβολία σε συνδυασμό με προσρόφηση σε συγκέντρωση καταλύτη TiO_2 200 mg/L και 400 mg/L, η αδρανοποίηση της *E.coli* πραγματοποιήθηκε μετά από 90 λεπτά.

Παρακάτω έχουμε τα αποτελέσματα από την μέθοδο της Real-time PCR, κάτω από τις ίδιες συνθήκες για τη σύγκριση της μοριακής μεθόδου με την συμβατική.

Να σημειωθεί ότι για τη σύγκριση με το πραγματικό απόβλητο, δημιουργήθηκε διάλυμα NaCl 0.8 % στο οποίο έγινε επιμόλυνση με *E.coli* σε ίδιες συγκεντρώσεις με αυτές του λύματος μας.



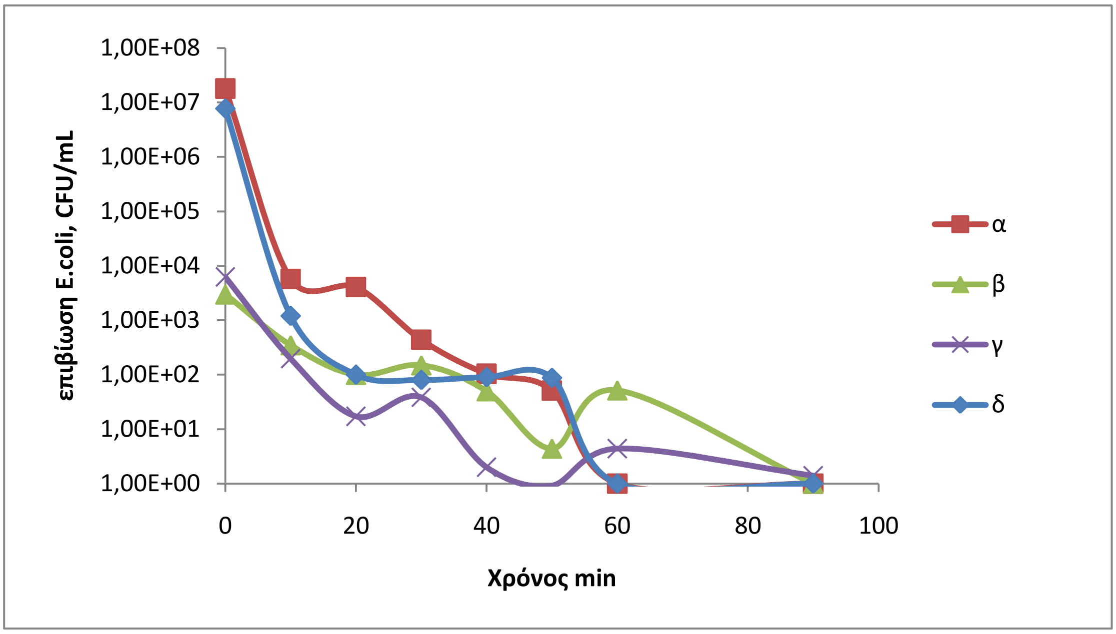
Διάγραμμα 8.11: Ανίχνευση του γονιδιακού DNA του Escherichia coli σε υδατικό διάλυμα NaCl 0,8% (w / v) με (α) UV-A ακτινοβολία και 200 mg/L TiO_2 , (β) UV-A ακτινοβολία και 400 mg/L TiO_2, (γ) UV-C ακτινοβολία και (δ) UV-C ακτινοβολία και 25 mg/L TiO_2, με τη μέθοδο Real-time PCR.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου της Real-time PCR έδειξαν ότι ύστερα από περίπου 100 λεπτά πραγματοποίησης της διαδικασίας, ανιχνεύθηκε DNA το οποίο μειώθηκε κατά 95%.

Στη χρήση UV-A ακτινοβολίας παρατηρείται ότι δεν υπάρχει 100% απολύμανση και υπάρχει μικρή ποσότητα βακτηριακού DNA. Στη χρήση της UV-C ακτινοβολίας η ποσότητα είναι μικρότερη άρα είναι πιο αποτελεσματική μέθοδος. Γενικά, για τα πραγματικά λύματα απαιτείται μια πιο αποτελεσματική και διαρκής επεξεργασία καθώς χαρακτηρίζονται από πολύπλοκη σύνθεση και αρκετό βακτηριακό φορτίο.

8.8 Επίδραση του είδους του λύματος

- Πραγματοποιήθηκαν πειράματα φωτοκατάλυσης με διαφορετικές συγκεντρώσεις καταλύτη τόσο σε πραγματικό όσο και σε επιμολυσμένο διάλυμα NaCl 0.8% (w/v).

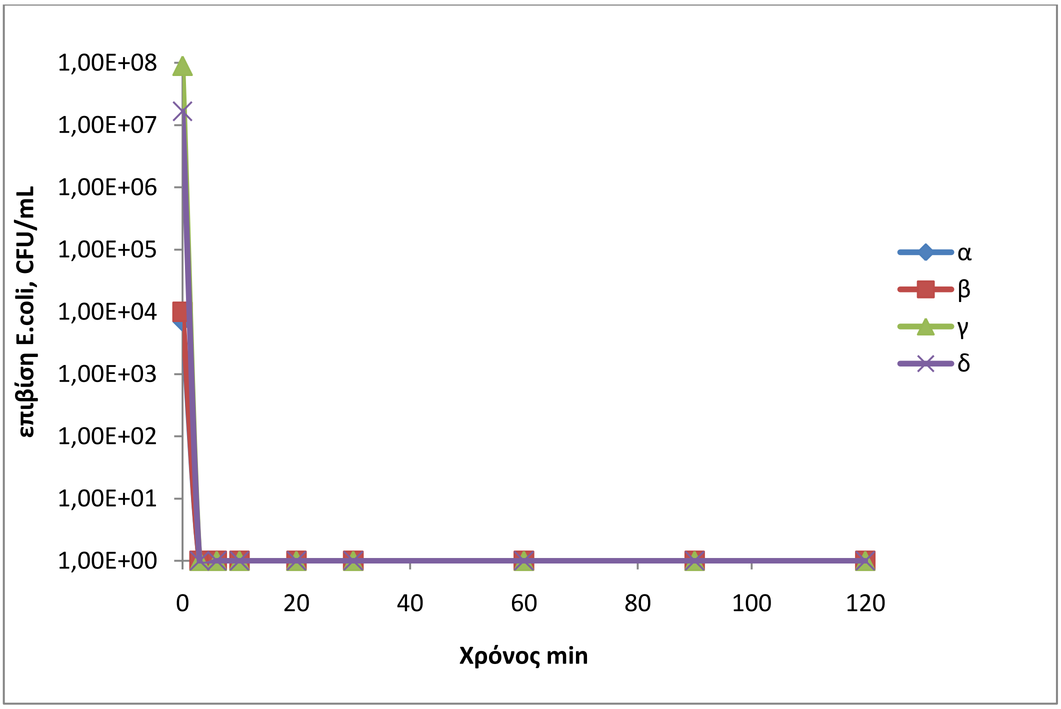


Διάγραμμα 8.12 : Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας με (α) UV-A ακτινοβολία και 200 mg/L TiO_2, σε επιμολυσμένο υδατικό διάλυμα NaCl 0.8% (w/v) (β) UV-A ακτινοβολία και 200 mg/L TiO_2,σε πραγματικό απόβλητο,(γ) UV-A ακτινοβολία και 400 mg/L TiO_2,σε πραγματικό απόβλητο και (δ) UV-A ακτινοβολία και 400 mg/L TiO_2, σε επιμολυσμένο υδατικό διάλυμα NaCl 0.8% (w/v).

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η επιθυμητή απολύμανση του επιμολυσμένου υδατικού διαλύματος NaCl 0.8% (w/v), πραγματοποιείται μετά από 60 λεπτά, ενώ του πραγματικού αποβλήτου πραγματοποιείται στα 90 λεπτά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα πραγματικά λύματα χαρακτηρίζονται από πολύπλοκη σύνθεση και αρκετό βακτηριακό φορτίο.

Επιπλέον για τον προσδιορισμό της αναγέννησης των βακτηρίων πραγματοποιήθηκαν πειράματα στα παραπάνω απόβλητα, όπου στο πραγματικό απόβλητο είχαμε αναγέννηση των μικροοργανισμών μετά την 3ήμερη ανάδευση τους σε σκοτάδι. Στο τεχνητό απόβλητο δεν παρατηρήθηκε αναγέννηση. Ωστόσο, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι αποικίες που βρέθηκαν μετά τις 3 μέρες είναι πιθανό να αποτελούνται απενεργοποιημένα βακτήρια *E.coli*. Τα αποτελέσματα της φωτοενεργοποίησης φαίνονται παρακάτω στην ενότητα 8.9.

- Πραγματοποιήθηκαν επίσης πειράματα για τη σύγκριση της απολυμαντικής ικανότητας της UV-C ακτινοβολίας με ή χωρίς καταλύτη, σε πραγματικό και συνθετικό λύμα.



Διάγραμμα 8.13: Επιβίωση των E.coli κατά τη διάρκεια επεξεργασίας με (α) UV-C ακτινοβολία, σε πραγματικό απόβλητο (β) UV-C ακτινοβολία και 25 mg/L TiO_2, σε πραγματικό απόβλητο,(γ) UV-C ακτινοβολία, σε συνθετικό απόβλητο και (δ) UV-C ακτινοβολία και 25 mg/L TiO_2, σε συνθετικό απόβλητο

Στο παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι το χρονικό διάστημα απολύμανσης είναι το ίδιο και στα 4 πειράματα και είναι λιγότερο από 3 λεπτά. Η ακτινοβολία UV-C έχει την δυνατότητα να απενεργοποιεί τη βακτηριακή δράση.

Παρόλα αυτά στα πειράματα της φωτοενεργοποίησης (ενότητα 8.9) και για τις 4 περιπτώσεις παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια, τόσο στο πραγματικό απόβλητο, όσο και στο τεχνητό με τη χρήση καταλύτη είχαν σκοτωθεί. Στο τεχνητό διάλυμα χωρίς την παρουσία καταλύτη, τα *E.coli* δεν είχαν σκοτωθεί αλλά μετά από 3 μέρες παρατηρήθηκε αναγέννηση του βακτηρίου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η χρήση έστω και μικρής ποσότητας καταλύτη είναι αρκετά σημαντική για την απολύμανση καθώς τα κύτταρα αδρανοποιούνται και δεν προκαλείται η αναγέννησή τους.

8.9 Πειράματα φωτοενεργοποίησης

Τα πειράματα απολύμανσης πραγματοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της απόδοσης της φωτοενεργοποίησης των μικροοργανισμών.

Τα βακτήρια έχουν εξελίξει τέσσερις κύριους μηχανισμούς για την επισκευή του κυττάρου τους, αλλά ακόμα και για την ανοχή στη βλάβη της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το κατεστραμμένο DNA, έχει την ιδιότητα να επισκευάζει τα νουκλεοτίδια, και κάποιες μεταλλαξιογόνες ουσίες να συμβάλουν στην επιδιόρθωση του DNA.

Όσον αφορά το επιμολυσμένο υδατικό διάλυμα NaCl 0.8% (w/v) διαπιστώθηκε ότι κατά την απολύμανση με UV-A ακτινοβολία παρουσία καταλύτη TiO_2 δεν υπάρχει επιδιόρθωση στα βακτήρια είτε στο σκοτάδι ή στο φως της ηλιακής ακτινοβολίας.

Ωστόσο, παρατηρείται ότι κατά την απολύμανση του νερού από την ακτινοβολία UV-C απουσία καταλύτη TiO_2, δεν επιτεύχθηκε ο επιθυμητός χρόνος απολύμανσης, ακόμη και αν δεν εντοπίστηκε *E.coli* μετά από μόλις 3 λεπτά της απολύμανσης, καθώς υπήρξε επιδιόρθωση μετά από 3 ημέρες, τόσο σε σκοτάδι όσο και υπό την ακτινοβόληση του ηλιακού φωτός.

Κατά τη διάρκεια φωτοκαταλυτικής απολύμανσης, ρίζες και άλλα οξειδωτικά είδη που παράγονται από τον καταλύτη TiO_2 έχουν προκαλέσει ζημιά που μπορεί να σε ορισμένες περιπτώσεις, να επιδεινωθεί στο σκοτάδι, δημιουργώντας μια "υπολειμματική επίδραση" της φωτοκαταλυτικής θεραπείας. Για το λόγο αυτό, σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε με UV-C ακτινοβολία και συγκέντρωση 25 mg/L TiO_2, ο μηχανισμός επιδιόρθωσης του DNA γίνεται λιγότερο ενεργός, ε αποτέλεσμα η αδρανοποίηση του βακτηρίου *E.coli* να καταστεί αμετάκλητη.

Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι το οξειδωτικό είδος αναπτύσσεται στην επιφάνεια του τιτανίου και προκαλεί σοβαρές βλάβες στα κύτταρα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά, είναι δυνατή η χρήση UV-C, παρουσία του TiO_2 για την απολύμανση του νερού.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζεται η επιβίωση του βακτηρίου της *E.coli* μετά το πέρας των πειραμάτων απολύμανσης, τόσο σε σκοτεινό μέρος όσο και υπό την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας για 3 μέρες.

Συνθήκες πειραμάτων					**Επιβίωση *E.coli* μετά από 90 λεπτά απολύμανσης (CFU/mL)**	**Επιβίωση *E.coli* μετά από 120 λεπτά απολύμανσης (CFU/mL)**	**Επιβίωση *E.coli* μετά από 3 μέρες ανάδευση στο σκοτάδι (CFU/mL)**	**Επιβίωση *E.coli* μετά από 3 μέρες φωτοενεργοποίηση σε ηλιακή ακτινοβολία (CFU/mL)**
Πείραμα	**Λάμπα**	**Συγκέντρωση TiO_2 (mg/L)**	**Λύμα**	**Αρχική συγκέντρωση *E.coli* (CFU/mL)**				
1	UV-A	200	0.8%(w/v) NaCl	10^7	0	-	0	0
2	UV-A	400	0.8%(w/v) NaCl	10^7	0	-	0	0
3	UV-C	-	0.8%(w/v) NaCl	10^7	-	0	>400	376
4	UV-C	25	0.8%(w/v) NaCl	10^7	-	0	0	0
5	UV-A	400	Πραγματικό λύμα	10^7	7	-	4	0
6	UV-C	-	Πραγματικό λύμα	10^3	-	0	0	0
7	UV-C	25	Πραγματικό λύμα	10^7	-	0	0	0

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η απόδοση της απολύμανσης, μετρώντας το ποσοστό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών *E.coli* σε συνάρτηση με διάφορες παραμέτρους λειτουργίας. Αυτές οι παράμετροι είναι η συγκέντρωση του καταλύτη TiO_2, η πηγή ακτινοβολίας και ο χρόνος της απολύμανσης. Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε τόσο με την κλασσική μικροβιολογική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όσο και με την καινοτόμα real-time PCR μέθοδο μοριακής βιολογίας. Επιπλέον, μελετήθηκε η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών μετά την απολύμανση σε πειράματα που διεξήχθησαν στο σκοτάδι και στο φυσικό φως.Συμπερασματικά:

1. Όσον αφορά στα πειράματα φωτοενεργοποίησης διαπιστώθηκε ότι από την συνδυασμένη απολύμανση με ακτινοβολία και καταλύτη UV-A/TiO_2 δεν υπάρχει αναγέννηση βακτηρίων είτε στο σκοτάδι είτε στο ηλιακό φως.
2. Η χρήση της μεθόδου Taqman Real-time PCR, αποδείχθηκε ότι είναι αποτελεσματική στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του βακτηριακού DNA σε δείγματα νερού και υγρών αποβλήτων κατά τη διάρκεια των πειραμάτων απολύμανσης.
3. Τόσο η κλασσική απολυμαντική μέθοδος όσο και η Real-time PCR έδειξαν ότι η ακτινοβολία UV-C είναι πιο αποτελεσματική, σχετικά με την απολύμανση του νερού και των δειγμάτων των λυμάτων. Ωστόσο, υπήρξε μια σημαντική διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων που επιτυγχάνονται από τις δύο τεχνικές, που αφορούν το χρόνο που απαιτείται για το σύνολο της βακτηριακής αδρανοποίησης.
4. Με τη μέθοδο της Real time PCR, τα στοιχεία έδειξαν ότι απαιτείται επιπλέον χρόνος για την 100% βακτηριακή μείωση, σε σύγκριση με τα ευρήματα από τις κλασσικές μεθόδους.
5. Η UV ακτινοβολία προκαλεί φυσιολογική ένταση στους πληθυσμούς των βακτηρίων, οδηγώντας τους προς την κατάσταση VBNC (βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη), η οποία εμποδίζει την ανίχνευσή τους με συμβατικές μεθόδους.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

<u>Ξένη βιβλιογραφία</u>

Benabbou A. K., Derriche Z., Felix C., Lejeune P., Guillard C., Photocatalytic inactivation of Escherischia coli. Effect of concentration of TiO_2 and microorganism, nature, and intensity of UV irradiation, Applied Catalysis B: Environmental, (2007) 76, 257-263.

Berney M., Weilenmann H., Egli T., Adaptation to UVA radiation of *E.coli* growing in continuous culture, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, (2006)

Chatzisymeon E. , Droumpali A., Mantzavinos D., Venieri D., Disinfection of water and wastewater by UV-A and UV-C irradiation: application of real-time PCR method, Photochemical & Photobiological Sciences, (2010)

Gedalanga P., Olson B., Development of a quantitative PCR method to differentiate between viable and nonviable bacteria in environmental water samples, Applied Microbiology Biotechnology, (2009)

Malato S., Fernandez-Ibanez P., Maldonado M. I., Blanco J., Gernjak W., Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends, Catal Today, (2009) 147, 1-59.

McCullagh, Robertson, Bahneman, The applications of TiO_2 photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms: a review, Res. Chem.Intermed.,Vol. 33, (2007)

Muela A. , Seco C. , Camafeita E, Arana I. , Orruno M. , Lopez J. A. & Barcina I., Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducting the viable but nonculturable state, FEMS, (2008)

Omatoyo K. Dalrymplea,, E.Stefanakos, Maya A. Trotz, D. Yogi Goswami, A review of the mechanisms and modeling of photocatalytic disinfection, Applied Catalysis B: Environmental 98 (2010)

Parsons S. , Mills A. and Lee S., Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment, IWA Publishing, (2004).

Palaiologou A., Marakas H., N. Xekoukoulotakis P., Moya A., Vergara Y., Kalogerakis N., Gikas P., Mantzavinos D., Disinfection of water and wastewater by TiO_2 photocatalysis, sonolysis and UV-C irradiation, Catal. Today, (2007)

Quek P.H., Hu J., Influence of photoreactivating light intensity and incubation temperature on photoreactivation of *Escherichia coli* following LP and MP UV disinfection, Journal of Applied Microbiology, (2008)

Rincon A. , Pulgarin C. , Field solar E. coli inactivation in the absence and presence of TiO_2: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection?, ,Solar Energy (2004)

Shannon K. E., Lee D.-Y., Trevors J. T., Beaudette L. A., Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment, Sci Total Environ, (2007)

Ελληνική βιβλιογραφία

Αγγελάκης Α. , Tchobanoglous G . (1995), ΥΓΡΑ ΑΠΟΒΛΗΤΑ, Φυσικά Συστήματα Επεξεργασίας και Ανάκτησης, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο

Βενιέρη Δανάη (2005), Προσδιορισμός της ανθρώπινης ή μη προέλευσης του κολοβακτηριδίου που απομονώνεται από το υδάτινο περιβάλλον με καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής, Πάτρα.

Δρόσου Αικατερίνη (2007), Φωτοκαταλυτική Απολύμανση Νερού παρουσία Διοξειδίου του Τιτανίου και Υπεροξικού Οξέος Διπλωματική Εργασία ,Πολυτεχνείο Κρήτης , Χανιά.

Μαντζαβίνος Διονύσιος (2003), Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων, Σημειώσεις Πανεπιστημιακών Παραδόσεων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

Μάρακας Χαρίδημος (2006), Απολύμανση Επεξεργασμένων Αστικών Λυμάτων με Χρηση Εξελιγμένων Διεργασιών Οξείδωσης και Χλωρίωσης με Συνδυασμό και Σύγκριση των Μεθόδων, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης

Μήτρακας Μ. (1996), Ποιοτικά Χαρακτηριστικά και Επεξεργασία Νερού, 1η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλας, Θεσσαλονίκη.

Παπαδάμ. Θ., Μαντζαβίνος, Δ.,(2005), Συνεπεξεργασία οργανικών και μετάλλων με φωτοκατάλυση. Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Tchobanoglous G. (2006), Μηχανική Υγρών Αποβλήτων, Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση , Metcalf & Eddy (Α’ & Β’ τόμος), 4η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλας, Θεσσαλονίκη