



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΩΤΟΗΛΕΚΤΡΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΓΡΑΦΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ: ΣΟΦΙΑΝΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ
ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 2005050037

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ
ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: ΜΑΝΤΖΑΒΙΝΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ
ΞΕΚΟΥΚΟΥΛΩΤΑΚΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΙΑΜΑΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

Χανιά, Νοέμβριος 2011

Η παρούσα διπλωματική είναι
αφιερωμένη στην μητέρα μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Κατ' αρχάς θα ήθελα να δώσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια Κ. Βενιέρη Δανάη για την ανάθεση της εργασίας και τις πολύτιμες συμβουλές της.

Στην Δρ. Χατζησυμεών Θάλεια για την εξαιρετική συνεργασία μας και την υποστήριξη της όλο αυτό το διάστημα.

Στην συμφοιτήτρια μου Πολίτη Ελεονώρα για την ωφέλιμη συμβολή της στην ολοκλήρωση των πειραμάτων.

Στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής κ. Μαντζαβίνο Διονύσιο και κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο για τον χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και όσους στάθηκαν δίπλα μου όλα τα χρόνια της φοίτησης μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης προσφέροντας μου την αμέριστη συμπαράσταση τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ	8
1.1 Νερό	8
1.2 Ορισμός της Απολύμανσης	10
1.3 Απολύμανση Νερού	10
1.4 Απολύμανση Λυμάτων	11
2 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ	12
2.1 Ταξινόμηση Απολυμαντικών Μέσων	12
2.2 Μηχανισμοί Απολύμανσης	13
2.3 Παράμετροι που Επηρεάζουν την Αποτελεσματικότητα της Απολύμανσης	14
2.4 Μέθοδοι Απολύμανσης	15
2.4.1 Χλωρίωση	15
2.4.2 Έκθεση σε Υπεριώδη Ακτινοβολία (UV)	19
2.4.3 Οζόνωση	21
3 ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗ	24
3.1 Ετερογενής Φωτοκατάλυση	24
3.2 Το Φωτοηλεκτροχημικό Φαινόμενο	25
3.3 Η Φωτοκαταλυτική Οξείδωση	27
3.4 Ημιαγώγιμα Υλικά – Καταλύτες	29
3.5 Εφαρμογή Φωτοκατάλυσης για την Απολύμανση Υγρών Αποβλήτων	32
3.6 Φωτοηλεκτροκαταλυτική Οξείδωση	32
4 ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ	35
4.1 <i>Escherichia coli</i>	36
4.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	38
5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ <i>E. COLI</i> ΚΑΙ <i>ENTEROCOCCUS FAECALIS</i>	39
5.1 Συμβατική Καλλιεργητική Μέθοδος	39
5.2 Μοριακή μέθοδος	39
5.3 Μέθοδος PCR	40
5.3.1 Αρχή Λειτουργίας της Αντίδρασης της PCR	40
5.3.2 Στάδια Κύκλου PCR	41
5.3.3 Φάσεις της Αντίδρασης PCR	42
5.3.4 Εκκινητές και DNA Πολυμεράση	43
5.4 Η Αρχή Λειτουργίας της Real Time PCR	45
5.5 Χημείες Real-Time PCR	51
5.5.1 Ειδικά Συστήματα Ανίχνευσης	51
5.5.2 Μη Ειδικά Συστήματα Ανίχνευσης	52

5.5.3 Μέθοδος SYBR GREEN	52
5.6 Οι Διαφορές Μεταξύ PCR και Real Time PCR	53
6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	55
7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	56
7.1 Υλικά	56
7.1.1 Θρεπτικά υλικά	56
7.1.2 Χημικά Υλικά	56
7.1.3 Διαλύματα	56
7.1.4 Πρότυπο Στέλεχος <i>Escherichia coli</i> και <i>Enterococcus faecalis</i>	57
7.1.5 Καταλύτης TiO_2	57
7.1.6 Εκκινητές - Ιχνηθέτες	57
7.2 Μεθοδολογία	58
7.2.1 Φωτοκατάλυση	58
7.2.2 Φωτοηλεκτροκατάλυση	61
8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ	62
8.1 Επίδραση της Τάσης στην Απόδοση της Φωτοηλεκτροκατάλυσης	62
8.1.1 Επίδραση Σταθερής Τάσης 2 Volt	63
8.1.2 Επίδραση Σταθερής Τάσης 4 Volt	64
8.1.3 Επίδραση Σταθερής Τάσης 5 Volt	65
8.1.4 Επίδραση Σταθερής Τάσης 10 Volt	66
8.1.5 Επίδραση Της Τάσης	67
8.2 Επίδραση του Είδους του Μικροοργανισμού στην Απόδοση της Φωτοηλεκτροκατάλυσης	69
8.2.1 Επίδραση του Είδους Μικροοργανισμού	70
8.3 Απολυμαντική Ικανότητα Φωτοηλεκτροκατάλυσης σε Πραγματικό Λύμα Εξαρτώμενη από το Είδος του Μικροοργανισμού	73
8.3.1 Σταθερή Τάση 5 Volt για Συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL <i>E. coli</i> και <i>Enterococcus faecalis</i>	74
8.3.2 Σταθερή Τάση 5 Volt για Συγκέντρωση 10^5 CFU's/mL <i>E. coli</i> και <i>Enterococcus faecalis</i>	77
8.4 Επίδραση της Συγκέντρωσης του Καταλύτη στην Απόδοση της Φωτοκατάλυσης	78
9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	79
10 ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	81
10.1 Ελληνική	81
10.2 Ξένη	83
11 ΣΕΛΙΔΕΣ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ	85

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα διπλωματική διατριβή εκπονήθηκε στα εργαστήρια Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και Τεχνικής Χημικών Διεργασιών και Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Σκοπός της εν λόγω εργασίας ήταν ο έλεγχος του ρυθμού απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με εφαρμογή των μεθόδων της ετερογενούς φωτοκατάλυσης και της φωτοηλεκτροκατάλυσης με χρήση της ηλιακής ακτινοβολίας.

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας εφοδιασμένος με άνοδο από οξείδιο του τιτανίου σε υπόστρωμα τιτανίου¹ και κάθοδο ζirkονία. Ο έλεγχος της απολύμανσης πραγματοποιήθηκε με την μέτρηση του ποσοστού αδρανοποίησης των μικροοργανισμών *E.coli* και *Enterococcus faecalis* τόσο σε νερό όσο και σε διάλυμα υγρών αποβλήτων συναρτήσει διαφόρων παραμέτρων λειτουργίας, όπως η συγκέντρωση του καταλύτη TiO_2 , η ένταση του ρεύματος, η εφαρμοζόμενη τάση, το είδος και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών και ο χρόνος απολύμανσης.

Προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός απολύμανσης έγινε ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών τόσο με την κλασσική μικροβιολογική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όσο και με την μέθοδο μοριακής βιολογίας real-time PCR². Επίσης, μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις του γενετικού υλικού των παθογόνων μικροοργανισμών. Συμπερασματικά, πρέπει να αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης των βακτηρίων μετά από 15 min φωτοηλεκτροκατάλυσης σε πραγματικό λύμα χρησιμοποιώντας σταθερή τάση 5 Volt και παρουσία 10^7 CFU's/mL *E.coli* και *Enterococcus faecalis*. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι *Enterococcus faecalis* ήταν πιο ανθεκτικοί σε σύγκριση με τα *E.coli* στις μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε λόγω του ανθεκτικότερου κυτταρικού τους τοιχώματος.

¹ TiO_2/Ti .

² Polymerase Chain Reaction.

ABSTRACT

The implementation of the present diploma thesis took place in the laboratories of both Environmental Microbiology and Chemical Processes and Wastewater Treatment of the department of Environmental Engineering at the Technical University of Crete.

The objective of the present study was to investigate the rate of disinfection of water and wastewater by the means of photocatalytic and photoelectrocatalytic processes. Solar irradiation was used as the light source.

Experiments were conducted at a laboratory-scale reactor equipped with an anode of titanium oxide film onto a titanium substrate and with a zirconia cathode.

Disinfection rate was estimated by measuring the percentage of inactivation of *E.coli* and/or *Enterococcus faecalis* microorganisms in water and wastewater. Various operating parameters such as the concentration of TiO₂ catalyst, power intensity, the applied voltage, the type and the concentration of microorganisms in water and wastewater and treatment time were investigated.

Furthermore, in order to estimate the disinfection rate quantification of the microorganisms was carried out by means of both the common microbiological method of successive dilutions and the molecular biology technique of real-time PCR. Moreover, the mutations of the genomic DNA of the microorganisms were studied.

The conclusion that was extracted through the results of the present study is that the concentration of bacteria was decreased after 15 minutes of photoelectrocatalysis of real wastewater effluent at constant voltage of 5 Volt and in the presence of 10⁷ CFU's/mL *E.coli* and *Enterococcus faecalis*.

It was also observed that in *Enterococcus faecalis* were more resistant to disinfection than *E.coli* bacteria because of their stronger cell wall.

1 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ

1.1 Νερό

Το νερό είναι η περισσότερο διαδεδομένη χημική ένωση που είναι απαραίτητη σε όλες τις γνωστές μορφές ζωής που υπάρχουν στον πλανήτη μας. Οι άνθρωποι και τα ζώα έχουν στο σώμα τους 60 - 70% νερό κατά βάρος, ενώ φτάνει μέχρι και το 90% εκείνου των κυττάρων. Το νερό αποτελείται από υδρογόνο (H) και οξυγόνο (O). Ο χημικός τύπος του νερού είναι H_2O και η σχετική αναλογία βαρών του υδρογόνου και του οξυγόνου είναι 2,016 : 16,000. Το νερό είναι υγρό, διαυγές, άχρωμο σε λεπτά στρώματα, κυανίζον σε μεγάλους όγκους. Η καθαρή ουσία είναι άγευστη, ενώ το καλό πόσιμο νερό έχει ευχάριστη γεύση, που οφείλεται στα διαλυμένα άλατα και αέρια. Η πυκνότητα του νερού είναι διαφορετική σε διάφορες θερμοκρασίες, παίρνοντας την μέγιστη τιμή της στους 4 °C. Το νερό έχει ποικίλη χημική δράση. Σχηματίζει "ενώσεις διά προσθήκης" με πολλά άλατα, καθώς και με πολλά μόρια άλλων ουσιών. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται υδρίτες ή ένυδρες ενώσεις. Το πόσιμο νερό πρέπει να είναι διαυγές, άχρωμο, άοσμο, δροσερό³. Το πόσιμο νερό περιέχει διαλυμένο οξυγόνο, άζωτο, διοξείδιο του άνθρακα, ελάχιστα ίχνη οργανικών ουσιών, καθώς και ίχνη φυτικών μικροοργανισμών. Πρέπει να εξετάζεται φυσικώς (θερμοκρασία, διαύγεια, γεύση, οσμή), χημικώς (ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος ουσιών, σκληρομετρία), μικροσκοπικώς (έρευνα μικροοργανισμών), βακτηριολογικώς (καλλιέργεια των μικροβίων του νερού) και τοπογραφικώς (θέση πηγής, διαδρομής του νερού).

³ Θερμοκρασίας 7-11 βαθμών Κελσίου.



Εικόνα 1.1. Το νερό σε: α) στερεά (παγόβουνο), β) υγρή (θάλασσα) και γ) αέρια (υδρατμοί στην ατμόσφαιρα) μορφή

1.2 Ορισμός της Απολύμανσης

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 (Παλαιολόγου, 2008).

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 (Μήτρακας, 2001).

1.3 Απολύμανση Νερού

Η απολύμανση του πόσιμου νερού έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των κρουσμάτων από τις νόσους των υδάτων, όπως η χολέρα και ο τυφοειδής. Οπότε σχετίζεται άμεσα με την καθημερινή υγιεινή, την επιβίωση των ανθρώπων και σε επέκταση την προστασία του περιβάλλοντος.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες συνήθως δεν υπάρχει αρκετό καθαρό πόσιμο νερό. Στις χώρες αυτές το πρόβλημα της μη ορθής απολύμανσης του νερού προκαλεί ασθένειες και θανάτους σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες όπως είναι τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα⁴.

Στην απολύμανση το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών αφαιρείται με την βοήθεια διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας νερού όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η οζόνωση και η χλωρίωση. Ο μηχανισμός της απολύμανσης διαβρώνει το κυτταρικό τοίχωμα των κυττάρων των μικροοργανισμών ή δημιουργεί αλλαγές στην κυτταρική διαπερατότητα, το πρωτόπλασμα ή την ενζυμική δραστηριότητα⁵.

⁴ Άτομα που έχουν προσβληθεί από την ασθένεια του Aids, καρκινοπαθείς, δέκτες μεταμόσχευσης οργάνων κτ.λ.

⁵ Αυτό συμβαίνει λόγω των διαρθρωτικών αλλαγών στα ένζυμα.

Αυτές οι διαταραχές στην κυτταρική δραστηριότητα κάνουν τους μικροοργανισμούς να μην είναι πλέον σε θέση να πολλαπλασιαστούν και κατά συνέπεια να πεθάνουν. Σκοπός των τεχνικών επεξεργασίας είναι η όσο το δυνατόν καλύτερη απομάκρυνση, απενεργοποίηση και θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών, ώστε να αποφεύγεται η μετάδοση ασθενειών στον άνθρωπο και στα ζώα. Οι μικροοργανισμοί καταστρέφονται με αποτέλεσμα τον τερματισμό της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής τους (Δρούμπαλη, 2010).

1.4 Απολύμανση Λυμάτων

Ο στόχος της απολύμανσης των λυμάτων είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών σε τέτοιο βαθμό ώστε η διάθεση των λυμάτων στους υδάτινους αποδέκτες ή η επαναχρησιμοποίησή τους να μην δημιουργεί κινδύνους στη δημόσια υγεία. Η απολύμανση είναι το τελευταίο στάδιο στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων και το μοναδικό με αποκλειστικό σκοπό την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών.

Ο ρυθμός εξουδετέρωσης των παθογόνων μικροοργανισμών (ιοί, βακτήρια, παράσιτα) που περιέχονται στα λύματα εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως:

- το είδος του μικροοργανισμού,
- τις ιδιότητες, το είδος και τη δόση του απολυμαντικού μέσου,
- το χρόνο έκθεσης των μικροοργανισμών στο απολυμαντικό μέσο,
- τα υδραυλικά χαρακτηριστικά της δεξαμενής απολύμανσης,
- τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λυμάτων⁶.

Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάγκη περαιτέρω επεξεργασίας για την απολύμανση των λυμάτων και την πρόσθετη μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι σκόπιμο να εξετάζεται ανά περίπτωση ανάλογα με τα έργα διάθεσης των λυμάτων και τα χαρακτηριστικά του υδάτινου αποδέκτη.

Στην περίπτωση διάθεσης των λυμάτων στην ανοικτή θάλασσα η απολύμανση των λυμάτων είναι συχνά περιττή καθώς λόγω της αραιώσης και της φυσικής φθοράς των μικροοργανισμών οι συγκεντρώσεις τους είναι αρκετά χαμηλές ώστε να μη δημιουργούν κινδύνους μετάδοσης ασθενειών (Ανδρεαδάκης et al, 2005).

⁶ Οργανικό φορτίο, αμμωνιακό άζωτο, συγκέντρωση στερεών, θολότητα, pH και θερμοκρασία.

2 ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

2.1 Ταξινόμηση Απολυμαντικών Μέσων

Τα **απολυμαντικά μέσα** χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες:

- στις χημικές απολυμαντικές ουσίες,
- στις μη χημικές.

Τα **χημικά απολυμαντικά μέσα** μπορούν να διακριθούν:

- στα οξειδωτικά,
- στα μη οξειδωτικά.

Ως οξείδωση εννοείται η ένωση ενός στοιχείου με το οξυγόνο ή η αφαίρεση υδρογόνου από μία ένωση.

Ως οξειδωτικά απολυμαντικά μπορούν να χαρακτηριστούν το αέριο χλώριο (Cl_2), το διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2), το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl), το όζον (O_3), το βρώμιο (Br_2), το ιώδιο (I_2), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υπεροξικό οξύ ($\text{H}_4\text{X}_e\text{O}_6$).

Ως μη οξειδωτικά απολυμαντικά χαρακτηρίζονται το μεθυλενο -διθειοκυάνιο (MBT), το διβρωμονιτριλοπροπιοναμίδιο (BNPA), οι χλωριωμένες φαινόλες, οι ισοθειαζόλες και το Δι-τριβουτυλοξείδιο κασσίτερου (TBTO).

Στα μη χημικά μέσα απολύμανσης του νερού ανήκουν η υπεριώδης ακτινοβολία (UV), οι υπέρηχοι, η αποστειρωτική διήθηση και σε περιορισμένη έκταση η θερμότητα και η ραδιενεργός ακτινοβολία.

Το πιο συνηθισμένο μέσο απολύμανσης είναι το χλώριο, ενώ εναλλακτικά χρησιμοποιείται το όζον και η υπεριώδης ακτινοβολία (Μήτρακας, 2001).

Τα χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού είναι:

- ο υψηλός ρυθμός εξουδετέρωσης παθογόνων μικροοργανισμών,
- η χαμηλή δραστικότητα με ουσίες που περιέχονται στο νερό και η χαμηλή παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων,
- το χαμηλό κόστος λειτουργίας και οι μικρές απαιτήσεις συντήρησης,
- ο μηδενικός κίνδυνος κατά τη χρήση του,
- η εύκολη ανιχνευσιμότητα του στο νερό,
- και τέλος η χαμηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς.

Οι παραπάνω ιδιότητες δεν είναι συγκεντρωμένες σε ένα απολυμαντικό, όμως θα πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των εναλλακτικών μεθόδων επεξεργασίας (Νταρακάς, 2009).

2.2 Μηχανισμοί Απολύμανσης

Η μικροβιοκτόνος δράση των απολυμαντικών μέσων επιτυγχάνεται ως εξής (Δρόσου, 2007):

- Με την φθορά του κυτταρικού τοιχώματος που οδηγεί στην λύση και το θάνατο του κυττάρου⁷,
- με την μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας όπου επιτρέπει την διαφυγή ζωτικών θρεπτικών συστατικών, όπως το άζωτο και ο φώσφορος⁸,
- με την μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος όπου έχουμε την πήξη της κυτταρικής πρωτεΐνης⁹, μετουσίωση των πρωτεϊνών¹⁰,
- με την μεταβολή του DNA ή RNA των οργανισμών με τον σχηματισμό διπλών δεσμών, έχοντας ως αποτέλεσμα την πρόκληση της ρήξης ορισμένων κλώνων DNA¹¹,
- παρεμποδίζοντας την ενζυματική δράση προκαλώντας την μεταβολή της χημικής διευσθέτησης των ενζύμων και απενεργοποίησή τους¹².

⁷ Πενικιλίνη – αντιβιοτικό που θεωρείται ως ένα από τα ισχυρότερα σύγχρονα θεραπευτικά μέσα.

⁸ Φαινολικές ενώσεις, απορρυπαντικά.

⁹ Θερμότητα.

¹⁰ Ισχυρά οξέα ή αλκαλικά μέσα.

¹¹ Ακτινοβολία U.V.

¹² Οξειδωτικά μέσα, το χλώριο κλ.π.

2.3 Παράμετροι που Επηρεάζουν την Αποτελεσματικότητα της Απολύμανσης

Η αποτελεσματικότητα της διεργασίας της απολύμανσης είναι μια σύνθετη συνάρτηση πολλών μεταβλητών και δηλώνει την ικανότητα των απολυμαντικών να επιδρούν στο κυτταρικό υλικό και να παρεμποδίζουν τους μηχανισμούς λειτουργίας του κυττάρου. Η αποτελεσματικότητα αυτή ελέγχεται από τις παρακάτω παραμέτρους (Παλαιολόγου, 2008):

- **Το είδος του απολυμαντικού.** Κάθε απολυμαντικό αδρανοποιεί ένα συγκεκριμένο μικροοργανισμό με διαφορετικό τρόπο και ρυθμό,
- **την δόση του απολυμαντικού.** Υψηλότερες δόσεις αυξάνουν συνήθως το ρυθμό απολύμανσης,
- **τον τύπο του μικροοργανισμού και την φυσιολογική του κατάσταση.** Τα πρωτόζωα είναι πιο δύσκολα στην απολύμανση και ακολουθούν τα βακτήρια και οι ιοί,
- **τον χρόνο επαφής.** Αύξηση του χρόνου επαφής βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης,
- **το pH.** Η αποτελεσματικότητα μερικών απολυμαντικών¹³ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τιμή του δείκτη pH,
- **την θερμοκρασία.** Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία αναμένεται και αύξηση του ρυθμού απολύμανσης,
- **την θολότητα.** Έχει αποδειχθεί ότι εμποδίζει την απολύμανση, επειδή τα σωματίδια που την δημιουργούν μπορούν να περιβάλλουν και να προστατέψουν τους μικροοργανισμούς από την δράση του απολυμαντικού. Επίσης το υλικό από το οποίο αποτελούνται τα σωματίδια της θολότητας προκαλεί κατανάλωση απολυμαντικού με αντίστοιχη απαίτηση για αυξημένες δόσεις απολύμανσης,
- **το διαλυτό οργανικό υλικό.** Το διαλυτό οργανικό υλικό είναι δυνατόν να καταναλώσει απολυμαντικό και να οδηγήσει στη δημιουργία ενώσεων με μικρή ή καθόλου απολυμαντική ικανότητα. Επιπροσθέτως η παρουσία διαλυτού οργανικού υλικού οδηγεί στη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων απολύμανσης.

¹³ Π.χ. χλώριο.

2.4 Μέθοδοι Απολύμανσης

Όλες οι μέθοδοι απολύμανσης που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα, στοχεύουν στην καταστροφή των βακτηριδίων, ιών και των λοιπών μικροοργανισμών που πιθανό να είναι φορείς ασθενειών, ή μπορούν να εξελιχθούν σε τέτοιους.

Παρακάτω αναγράφονται οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης που χρησιμοποιούνται σήμερα:

- Χλωρίωση¹⁴,
- Έκθεση σε Υπεριώδη Ακτινοβολία (UV),
- Οζόνωση,
- Φωτοκατάλυση.

2.4.1 Χλωρίωση

Η χλωρίωση αποτέλεσε την πρώτη μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής στα μέσα της δεύτερης δεκαετίας του εικοστού αιώνα για την απολύμανση τόσο υγρών αποβλήτων, όσο και πόσιμου νερού. Τα πρώτα προβλήματα παρουσιάστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του 1940 στην Αμερική και σχετιζόταν με την δυσάρεστη γεύση και την οσμή του νερού. Για να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα αλλά και θέματα που σχετιζόνταν με την ασφαλή διαχείριση των εγκαταστάσεων απολύμανσης, την ελάττωση των επιπτώσεων των παραπροϊόντων της απολύμανσης, τη μείωση του λειτουργικού κόστους και τη βελτίωση της απολυμαντικής δράσης αναπτύχθηκαν νέες μέθοδοι χλωρίωσης.

Το χλώριο (Cl_2) είναι ουσία τοξική για τον άνθρωπο και τα ζώα, όμως σε χαμηλές συγκεντρώσεις, οι οποίες απαιτούνται για την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών, θεωρείται αβλαβές. Η χλωρίωση του νερού πρέπει να γίνεται σωστά και να παρακολουθείται σε συστηματική βάση, ώστε να φθάνουν στους καταναλωτές μικρά μόνο ποσά χλωρίου και όχι τα παραπροϊόντα της απολύμανσης.

Η συνήθης περιεκτικότητα του χλωρίου στο νερό δεν υπερβαίνει το 1 mg/L (ppm) ενώ και 50 mg/L έχουν αποδειχθεί ακίνδυνα για τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η προσδιδόμενη γεύση και οσμή από το χλώριο ακόμη και για περιεκτικότητες που είναι πολύ κατώτερες από το όριο που χαρακτηρίζεται ως επικίνδυνο, είναι τόσο δυσάρεστες που καθιστούν την πόση του αδύνατη.

¹⁴ Αέριο χλώριο (Cl_2), υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl), διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2).

Το χλώριο σαν ισχυρό οξειδωτικό μέσο αντιδρά με διάφορες ενώσεις (Fe^{2+} , NH_4^+ , Mn^{2+} , S^{2-} , CN^- κ.ά.) που υπάρχουν στο νερό και στα απόβλητα. Το ποσό του χλωρίου που αντιδρά με τις ουσίες αυτές πριν αρχίσει η καθαρά απολυμαντική του δράση λέγεται απαιτούμενο χλώριο. Πέρα από την οξειδωτική του δράση, το χλώριο έχει και μεγάλη καταστρεπτική δράση στους παθογόνους μικροοργανισμούς που μεταδίδονται με το νερό.

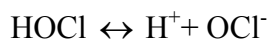
Η ποσότητα του χλωρίου που απαιτείται για απολύμανση εξαρτάται από την περιεκτικότητα των οργανικών ουσιών στο νερό. Έχει επίσης την ικανότητα να διασπά τις οργανικές ουσίες και να ενεργεί και σαν οξειδωτικός παράγοντας πέραν της δράσης του σαν μικροβιοκτόνο. Για να μην επιδρά δυσμενώς το ελεύθερο χλώριο στον φυσικό αποδέκτη πρέπει να ελέγχεται η περιεκτικότητά του. Πλήρης απολύμανση επιτυγχάνεται όταν μετά την ανάμιξη και οξείδωση, η περιεκτικότητα του ελεύθερου χλωρίου είναι περίπου 0,2 mg/L.

Σε περίπτωση περισσότερης χλωρίωσης προσδίδεται στο νερό οσμή και γεύση ενώ για περιεκτικότητα μικρότερη από το παραπάνω όριο (0,2 mg/L) δεν εξασφαλίζεται πλήρης απολύμανση. Το ποσοστό καταστροφής των βακτηρίων εξαρτάται από τον χρόνο επαφής τους με το χλώριο έχοντας ως ελάχιστο χρόνο χλωρίωσης τα 15 με 30 λεπτά. Η τιμή του υπολειμματικού χλωρίου σε νερά που χλωριώνονται μας δείχνει αν η χλωρίωση που γίνεται είναι επαρκής.

Όταν το αέριο χλώριο αναμιγνύεται με το νερό σχηματίζεται υποχλωριώδες οξύ (HOCl) ως εξής:



Το υποχλωριώδες οξύ είναι ένα ασθενές οξύ που διασπάται στη συνέχεια σε ιόντα υδρογόνου (H^+) και υποχλωριώδη ιόντα (OCl^-):



Η παρουσία του υποχλωριώδους οξέος στο νερό εξαρτάται κυρίως από το pH. Σε χαμηλές τιμές pH υπερισχύει το υποχλωριώδες οξύ (HOCl), ενώ σε υψηλές τιμές υπερισχύουν τα υποχλωριώδη ιόντα (OCl^-). Πρέπει να συμπληρώσουμε ότι η βακτηριοκτόνος δράση του υποχλωριώδους οξέος (HOCl) είναι ισχυρότερη από αυτήν του υποχλωριώδους ιόντος (OCl^-).

Το υδροχλωρικό οξύ (HCl) που παράγεται κατά την αντίδραση εξουδετερώνεται από τα όξινα ανθρακικά (HCO₃⁻) του νερού. Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του pH και όσο χαμηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο περισσότερη ποσότητα χλωρίου απαιτείται για την επιτυχή απολύμανση.

Στην περίπτωση που θα χρησιμοποιηθεί χλωριώδες νάτριο (NaOCl₂) και αέριο χλώριο (Cl₂) δημιουργείται διοξείδιο του χλωρίου (ClO₂) το οποίο είναι τελικά και το βακτηριοκτόνο μέσο:



Το διοξείδιο του χλωρίου (ClO₂) είναι ένα σταθερό αέριο που παραμένει σαν υπόλειμμα στο νερό για μικρό χρονικό διάστημα και είναι ιδιαίτερα δραστικό σε υψηλές τιμές του pH.

Εάν χρησιμοποιηθεί υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) προκύπτει υποχλωριώδες οξύ και για υψηλές τιμές του pH μετατρέπεται σε υποχλωριώδες ιόν του οποίου η βακτηριοκτόνος δράση δεν είναι αποτελεσματική:



Στην περίπτωση αυτή απαιτείται διόρθωση του pH ώστε η τιμή του να είναι μικρότερη από 7,5. Το φως, η θερμοκρασία και ίχνη βαρέων μετάλλων δημιουργούν απώλειες ενεργού χλωρίου λόγω μετατροπής του σε χλωρικό και χλωριώδες νάτριο.

Το τμήμα του συνολικά υπάρχοντος ενεργού χλωρίου, το οποίο βρίσκεται σε μορφή υποχλωριώδους οξέος (HOCl) και υποχλωριωδών ιόντων (OCl⁻) είναι γνωστό σαν υπολειμματικό χλώριο. Πρέπει να σημειώσουμε ότι σαν ενεργό χλώριο εννοείται το άθροισμα όλων των ενώσεων χλωρίου που υπάρχουν σε κάποια χρονική στιγμή στο νερό και έχουν απολυμαντική δράση.

Όσον αφορά στην απολύμανση των υγρών αποβλήτων με χλώριο, δημιουργούνται παραπροϊόντα (τριαλομεθάνια, THM κτ.λ.) τα οποία μελετούνται για τις παρενέργειες τους στην ανθρώπινη υγεία (Νταρακάς, 2009).

Η μέθοδος της χλωρίωσης εμφανίζει τα εξής πλεονεκτήματα (Δρούμπαλη, 2010):

- ευκολία στην χρήση του,
- χαμηλό κόστος,
- μεγάλο αντιμικροβιακό φάσμα,
- δρα υπολλειματικά¹⁵.

Τα μειονεκτήματα που εμφανίζει η μέθοδος αυτή είναι τα ακόλουθα (Παλαιολόγου, 2008):

- Το χλώριο είναι μια ουσία που εμφανίζει υψηλή τοξικότητα η οποία πιθανώς θέτει κινδύνους υγείας στους χειριστές των μονάδων επεξεργασίας και γενικότερα στον πληθυσμό, σε περίπτωση που απελευθερωθεί λόγω ατυχήματος,
- το χλώριο αντιδρά με τα οργανικά συστατικά στα απόβλητα και παράγονται δυσάρεστες οσμές,
- το χλώριο αντιδρά με τα οργανικά συστατικά στα απόβλητα και παράγονται παραπροϊόντα, τα οποία είναι γνωστά για την καρκινογενή ή και μεταλαξιογόνο δράση τους,
- το υπολλειμματικό χλώριο στις εκροές επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων είναι τοξικό για την υδρόβια ζωή,
- υπάρχει προβληματισμός για την απόρριψη οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο περιβάλλον, των οποίων οι μακροχρόνιες επιδράσεις δεν είναι ακόμη γνωστές.

¹⁵ Μια ποσότητα χλωρίου παραμένει στο νερό, με αποτέλεσμα να συνεχίζει την δράση του ως απολυμαντικό για μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την προσθήκη του.

2.4.2 Έκθεση σε Υπεριώδη Ακτινοβολία (UV)

Η μέθοδος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταστροφή μονοκύτταρων μικροοργανισμών, όπως είναι οι παθογόνοι ιοί. Η καταστροφή των μικροοργανισμών οφείλεται στην απορρόφηση της ακτινοβολίας από το γενετικό υλικό (DNA) των κυττάρων. Η μέγιστη καταστροφική ικανότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας επιτυγχάνεται σε μήκος κύματος 250 - 265 nm, όπου αναφέρεται η μέγιστη απορρόφησή της από τα νουκλεϊνικά οξέα. Η ευαισθησία των μικροοργανισμών που προσβάλλονται από την υπεριώδη ακτινοβολία ποικίλλει εξαρτώμενη από την αντίσταση στη διείσδυση της.

Η χημική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και το πάχος του καθορίζουν την αντίσταση των μικροοργανισμών στην υπεριώδη ακτινοβολία. Έκθεση των μορίων με προσβεβλημένο μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία DNA, σε ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού γαλάζιου φωτός (310 - 500 nm), μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την επανόρθωση της βλάβης και πρέπει να αποφεύγεται. Αυτό το φαινόμενο αφορά σε ορισμένους μόνο μικροοργανισμούς και γενικά δεν αφορά στους ιούς. Για παράδειγμα ο *Streptococcus* δεν φωτοεπισκευάζεται ενώ αντίθετα η *Shigella* φωτοεπισκευάζεται.

Μέτρο της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης με υπεριώδη ακτινοβολία αποτελεί η ποσότητα της ενέργειας που απορροφάται από το μικροοργανισμό. Η ποσότητα αυτή είναι το γινόμενο του ρυθμού με τον οποίο η ενέργεια παρέχεται¹⁶ επί τον χρόνο κατά τον οποίο ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε αυτή. Παρ' όλα αυτά, αύξηση της δόσης οδηγεί συχνά σε μειωμένη απολυμαντική δράση, γεγονός που οφείλεται στην προσρόφηση των βακτηρίων στα αιωρούμενα σωματίδια.

Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι ότι ορισμένες ανόργανες και οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στα απόβλητα απορροφούν στο μήκος κύματος της εκπεμπόμενης υπεριώδους ακτινοβολίας. Ο χρόνος και η ένταση της ακτινοβολίας είναι οι παράμετροι που προκαθορίζουν το αποτέλεσμα της ακτινοβολίας στην απολύμανση των νερών (Νταρακάς, 2009).

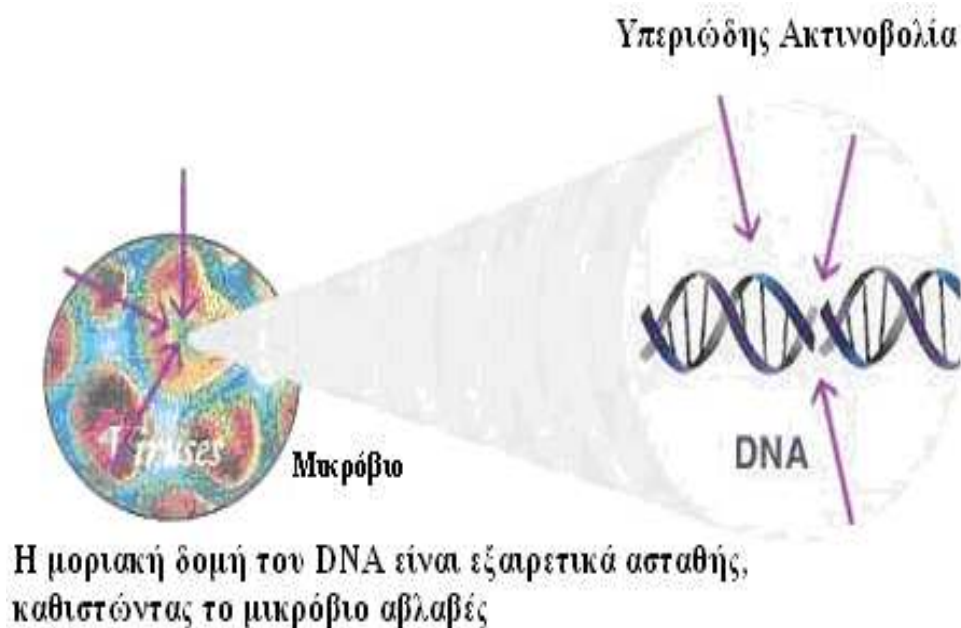
¹⁶ Ένταση

Σαν πλεονεκτήματα της μεθόδου απολύμανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας θα μπορούσαμε να αναφέρουμε τα παρακάτω (Δροσου, 2007):

- Αποδοτικό απολυμαντικό,
- μη υπολειμματική τοξικότητα,
- είναι περισσότερο αποδοτική από το χλώριο στην απενεργοποίηση των περισσότερων ιών, σπόρων, κυστών,
- δεν ευνοεί τον σχηματισμό DBP (Disinfection By-Products - Υπο-προϊόντα Απολύμανσης) στις δοσολογίες που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση,
- δεν αυξάνει το επίπεδο των TDS (Total Dissolved Solids - Ολικά Διαλυμένα Στερεα) στην επεξεργασμένη εκροή,
- αποδοτικό στην καταστροφή των ανθεκτικών οργανικών συστατικών όπως η NDMA (N- νιτροσοδιμεθυλαμίνη),
- βελτιωμένη ασφάλεια σε σχέση με την χρήση χημικών απολυμαντικών,
- απαιτεί μικρότερο χώρο σε σχέση με την απολύμανση με χλώριο,
- σε υψηλότερες δόσεις UV από αυτές που απαιτούνται, η ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τη συγκέντρωση ιχνοποσοτήτων οργανικών συστατικών (π.χ. NDMA, νιτροσοδιμεθυλαμίνη).

Μεινεκτήματα μεθόδου απολύμανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (Δροσου, 2007):

- Μη άμεση μέτρηση για τον έλεγχο της επιτυχίας της απολύμανσης,
- δεν παρέχει υπολειμματική συγκέντρωση,
- είναι λιγότερο αποδοτικό στην απενεργοποίηση κάποιων ιών, σπόρων και κυστών στις χαμηλές δοσολογίες που χρησιμοποιούνται για κολοβακτηρίδια,
- καταναλώνει ενέργεια,
- είναι κρίσιμος ο υδραυλικός σχεδιασμός του UV συστήματος,
- είναι σχετικά ακριβό,
- απαιτείται μεγάλος αριθμός UV λυχνιών όταν χρησιμοποιούνται συστήματα χαμηλής- πίεσης, χαμηλής- έντασης,
- οι λυχνίες χαμηλής-πίεσης, χαμηλής-έντασης απαιτούν καθαρισμό με οξύ για να απομακρυνθούν οι επικαθίσεις αλάτων,
- διαθεσιμότητα του χημικού συστήματος για βοηθητικές χρήσεις, όπως ο έλεγχος οσμών.



Εικόνα 2.4.2. Μηχανισμός δράσης της UV ακτινοβολίας

2.4.3 Οζόνωση

Η απολύμανση με όζον (O_3) έχει αναπτυχθεί αρκετά τα τελευταία χρόνια. Το όζον είναι ένα άχρωμο αέριο που έχει έντονη οσμή και σχηματίζεται κατά την έκθεση του οξυγόνου σε ηλεκτρικές εκκενώσεις υψηλής τάσης ή από την υπεριώδη ακτινοβολία. Στο επίπεδο της θάλασσας, είναι πολύ δύσκολο να βρεθεί όζον και σε περίπτωση που υπάρξει είναι εξαιρετικά ασταθές. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις ανίχνευσης όζοντος είναι γύρω στα 0.1 ppm έχοντας χρόνο ζωής γύρω στα 30 min και στην συνέχεια μετατρέπεται σε οξυγόνο.

Έτσι λοιπόν οι βιομηχανικοί χρήστες που παράγουν όζον το επιτυγχάνουν από τον αέρα ή από αποθηκευμένο οξυγόνο. Λόγω του μικρού χρόνου ζωής το όζον πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παραγωγή του.

Το όζον έχει πολύ ισχυρή και γρήγορη απολυμαντική δράση επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα καταστροφή των ιών. Η χρήση όζοντος για την απολύμανση του πόσιμου νερού είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική. Η ποσότητα όζοντος που απαιτείται για την απολύμανση βιολογικά κατεργασμένων λυμάτων είναι 15 – 20 g/m^3 λυμάτων και η διάρκεια της αντίδρασης είναι 15 με 30 min.

Για πλήρη καταστροφή των κυτταρικών δεσμών ακόμη και στην περίπτωση των ιών, απαιτούνται υπολειμματικές συγκεντρώσεις από 0,2 έως 0,5 mg/L με χρόνο επαφής τα 6 min. Το όζον παράγεται από ατμοσφαιρικό αέρα που έχει υποστεί κατάλληλη επεξεργασία ή από καθαρό οξυγόνο.

Το αέριο όζον παράγεται με ηλεκτρική εκκένωση ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια τάσης 10 έως 20 KV. Η αντίδραση παραγωγής όζοντος λαμβάνει χώρα σε κατάλληλο αντιδραστήρα που ονομάζεται οζονιστήρας.

Το όζον μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για την απόσμιση του νερού. Μικρές ποσότητες όζοντος της τάξης των 1-2 mg/L, προστιθέμενες στο νερό είναι ικανές να οξειδώσουν τις ενώσεις που περιέχουν θείο και άζωτο και προκαλούν τις έντονες οσμές στο νερό. Η χρήση όζοντος έχει ως πλεονέκτημα ότι εμποδίζει την επανεμφάνιση των οσμών.

Οι αερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται κατά την επεξεργασία με όζον αποκλείουν το σχηματισμό οσμών. Η δράση του όζοντος στην αφαίρεση οσμών στηρίζεται αφενός στην αντιμικροβιακή δράση μέσω οξείδωσης των πρωτεϊνικών δομών¹⁷ και αφετέρου στην οξείδωση των οσμηρών ενώσεων ή το σχηματισμό ασταθών ενώσεων με τους φορείς των οσμών¹⁸ (Νταρακάς, 2009).

¹⁷ Βακτηρίων ή ιών.

¹⁸ Ουρία, φαινόλες κλ.π.

Πλεονεκτήματα της απολύμανσης με όζον (Νταρακάς, 2009):

- Απουσία προβλημάτων ασφάλειας σε σχέση με τη μεταφορά και την αποθήκευση,
- εξαιρετες απολυμαντικές ιδιότητες. Καταστρέφει ταχύτατα μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στο χλώριο ή άλλα απολυμαντικά όπως αμοιβάδες, κόκκοι, μύκητες, μυξομύκητες, φύκια, σπόροι και κύστες,
- μικροί χρόνοι εφαρμογής¹⁹. Η απολύμανση λαμβάνει χώρα σχεδόν ακαριαία,
- μικρότερη ευαισθησία της μεθόδου στο pH και τη θερμοκρασία. Η απολυμαντική ικανότητα παρουσιάζεται αναλλοίωτη για pH 6 – 10 και θερμοκρασία 2 – 30 °C,
- βελτίωση της ποιότητας του υδάτινου αποδέκτη λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου στο αέριο εξόδο,
- δεν προκαλείται αύξηση των ολικών διαλυμένων στερεών στα επεξεργασμένα απόβλητα,
- επιτυγχάνεται μείωση του χρώματος και της θολότητας των αποβλήτων,
- το υπολειμματικό όζον μιας διεργασίας απολύμανσης είναι εξίσου τοξικό με το υπολειμματικό χλώριο αλλά αποσυντίθεται πολύ γρήγορα, οπότε δεν δημιουργεί προβλήματα στον υδάτινο αποδέκτη.

Μειονεκτήματα της απολύμανσης με όζον (Νταρακάς, 2009):

- Υψηλό πάγιο και λειτουργικό κόστος,
- ορισμένα βιομηχανικά απόβλητα περιέχουν ρυπαντές που καταναλώνουν οξειδωτικό ανταγωνιστικά, γεγονός που μπορεί να καταστήσει τον οζονισμό ασύμφορο,
- απαιτείται πιλοτική εγκατάσταση για να βρεθεί η βέλτιστη δόση όζοντος,
- σχηματίζονται ενώσεις επικίνδυνες για την υγεία όπως εποξειδία, βρωμικά και βρωμιωμένες οργανικές ενώσεις.

¹⁹ Ο οζονισμός απαιτεί περίπου 10 λεπτά ενώ η χλωρίωση 30 – 35 λεπτά.

3 ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗ

3.1 Ετερογενής Φωτοκατάλυση

Η ετερογενής φωτοκατάλυση αξιοποιεί τις καταλυτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αιωρήματα ημιαγώγιμων κόνεων (TiO_2 , ZnO , WO_3) με παρουσία τεχνητού ή φυσικού φωτισμού, οι οποίες μπορούν να επιφέρουν την πλήρη οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων ρύπων, καθώς και την απενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών, χωρίς την περαιτέρω επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Αναπτύχθηκε ραγδαία την τελευταία δεκαετία λόγω ορισμένων σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους στην αδρανοποίηση τοξικών ρύπων στα υγρά απόβλητα και στον αέρα. Η ανάμειξη του προς καθαρισμό αποβλήτου με έναν ημιαγώγιμο καταλύτη²⁰, ο οποίος είναι χημικά και βιολογικά αδρανής και ο φωτισμός του συστήματος με τεχνητό ή ηλιακό φως, επιφέρουν τελικά την πλήρη καταστροφή των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στο απόβλητο. Πρόκειται για μία μέθοδο απολύμανσης η οποία λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον και αυτό επειδή έχει τεράστιες ομοιότητες με τις διεργασίες αυτοκαθαρισμού της φύσης. Η παρουσία του καταλύτη απλώς επιταχύνει κατά πολλές τάξεις μεγέθους την αποικοδόμηση.

Σαν πλεονεκτήματα της μεθόδου μπορούμε να αναφέρουμε (Πούλιος, 2007):

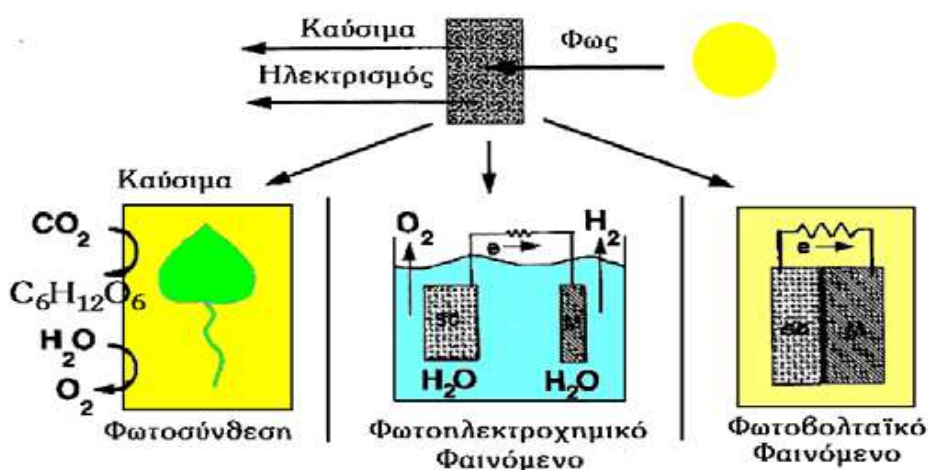
- Την πλήρη φωτοκαταλυτική οξείδωση(καύση, mineralization) των οργανικών μορίων,
- το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις ρύπων,
- την δυνατότητα χρησιμοποίησης ως φωτοευαίσθητων καταλυτών, ημιαγώγιμων υλικών που είναι χημικά και βιολογικά αδρανή (π.χ. TiO_2) και το χαμηλό τους κόστος,
- το ότι είναι δυνατή η ανάκτηση και συνεπώς η επαναχρησιμοποίηση τους, γεγονός που συνεπάγεται αφ' ενός τη μείωση του κόστους εφαρμογής της μεθόδου, αφ' ετέρου την αποφυγή της επιπλέον επιβάρυνσης του περιβάλλοντος με χημικούς ρύπους,

²⁰ Στην παρούσα εργασία ήταν το TiO_2 .

- την δυνατότητα εκμετάλλευσης του ηλιακού φωτός²¹ για την ενεργοποίηση του καταλύτη ένα πλεονέκτημα που αποκτά ιδιαίτερη βαρύτητα σε περιοχές μεγάλης ηλιοφάνειας, όπως είναι η χώρα μας,
- και τέλος την απολυμαντική ικανότητα της μεθόδου.

3.2 Το Φωτοηλεκτροχημικό Φαινόμενο

Η φωτοκαταλυτική οξείδωση των διαφόρων οργανικών ρύπων βασίζεται στο φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο, δηλαδή στο φαινόμενο που εμφανίζεται κατά το φωτισμό της ετεροεπαφής (διαφασικής περιοχής) μεταξύ ενός ημιαγωγού και ενός διαλύματος, ο οποίος περιέχει και το κατάλληλο οξειδοαναγωγικό σύστημα. Το φαινόμενο αυτό αποτελεί έναν από τους τρεις τρόπους μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική.



Εικόνα 3.2. Μετατροπή της ηλιακής ενέργειας σε ηλεκτρική και χημική ενέργεια

Γενικά ως φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο ορίζεται το φαινόμενο εκείνο όπου ο φωτισμός της διεπιφάνειας ηλεκτρόδιο - ηλεκτρολύτης επιφέρει αλλαγή στο δυναμικό του ηλεκτροδίου (ανοικτό κύκλωμα) ή στο ρεύμα που ρέει στη διαφασική περιοχή (κλειστό κύκλωμα). Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο εμφανίζεται κατά τον φωτισμό της ετεροεπαφής ενός φωτοευαίσθητου ημιαγωγίμου υλικού με ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Τα στερεά χωρίζονται βάσει των ηλεκτρονικών ιδιοτήτων τους σε μέταλλα, ημιαγωγούς και μονωτές.

²¹ Ανανεώσιμη πηγή ενέργειας.

Μακροσκοπικά η διαφορετικότητα που παρουσιάζουν εμφανίζεται στην αντίσταση που παρουσιάζουν στη ροή του ηλεκτρικού ρεύματος, καθώς και στην εξάρτηση του θερμικού συντελεστή της αντίστασης από τη θερμοκρασία. Για τα μέταλλα η ειδική αντίσταση (ρ), έχει τιμές της τάξεως των 10^{-6} Ohm x cm (σε θερμοκρασία δωματίου). Για τους ημιαγωγούς η ειδική αντίσταση βρίσκεται σε εύρος τιμών $10^{-2} - 10^9$ Ohm x cm. Στους μονωτές κυμαίνεται από $10^{14} - 10^{22}$ Ohm x cm.

Μικροσκοπικά οι ηλεκτρονικές ιδιότητες των στερεών περιγράφονται με τη βοήθεια του μοντέλου των ενεργειακών τροχιακών το οποίο περιγράφει τη συμπεριφορά ενός ηλεκτρονίου κατά την κίνηση του στο πεδίο που δημιουργεί ο πυρήνας και τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι ηλεκτρονικές ιδιότητες των μετάλλων διαφέρουν ριζικά από αυτές των ημιαγωγών. Επίσης, οι διαφορές μεταξύ των ημιαγωγών και των μονωτών είναι περισσότερο ποσοτικής και λιγότερο ποιοτικής φύσης. Το απαγορευμένο ενεργειακό χάσμα αποτελεί μία σημαντική παράμετρο, η οποία και καθορίζει την συμπεριφορά των υλικών, σχετικά με τις φυσικές και φυσικοχημικές ιδιότητες τους.

Ένα επιπλέον σημαντικό χαρακτηριστικό για κάθε ημιαγωγό είναι και η ενέργεια ή επίπεδο Fermi (EF), που αποτελεί το χαρακτηριστικό ενεργειακό "σύνορο" μεταξύ των ταινιών σθένους και αγωγιμότητας και δίνει την ενεργειακή κατάσταση των ηλεκτρονίων στον κρύσταλλο. Με ηλεκτροχημική ορολογία η ενέργεια Fermi αντιστοιχεί στο ηλεκτροχημικό δυναμικό των ηλεκτρονίων στον ημιαγωγό.

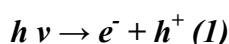
Ημιαγώγιμες ιδιότητες σε ένα στερεό μπορούν να επιτευχθούν και μέσω της παρουσίας προσμίξεων. Ανάλογα με το είδος των προσμείξεων, εάν ο ημιαγωγός έχει πλεονάζοντες φορείς αρνητικού φορτίου (e^-) ονομάζεται n-τύπου, ενώ αν έχει πλεονάζοντες φορείς θετικού φορτίου είναι p-τύπου. Αποτέλεσμα της διαφορετικής ηλεκτρονικής δομής των μετάλλων και των ημιαγωγών είναι και η διαφορετική ηλεκτροχημική και κατ' επέκταση φωτοηλεκτροχημική συμπεριφορά τους.

Η εμφάνιση του φωτοηλεκτροχημικού φαινομένου προϋποθέτει:

- Την ύπαρξη φωτοευαίσθητων ημιαγώγιμων υλικών ικανών να απορροφήσουν τμήμα της φωτεινής ακτινοβολίας και να την μετατρέψουν σε φορείς του ηλεκτρικού ρεύματος (e^-/h^+),
- την ταυτόχρονη ύπαρξη ενός ηλεκτρικού πεδίου, ικανού να διαχωρίσει τους φωτοδημιουργούμενους φορείς και να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα.

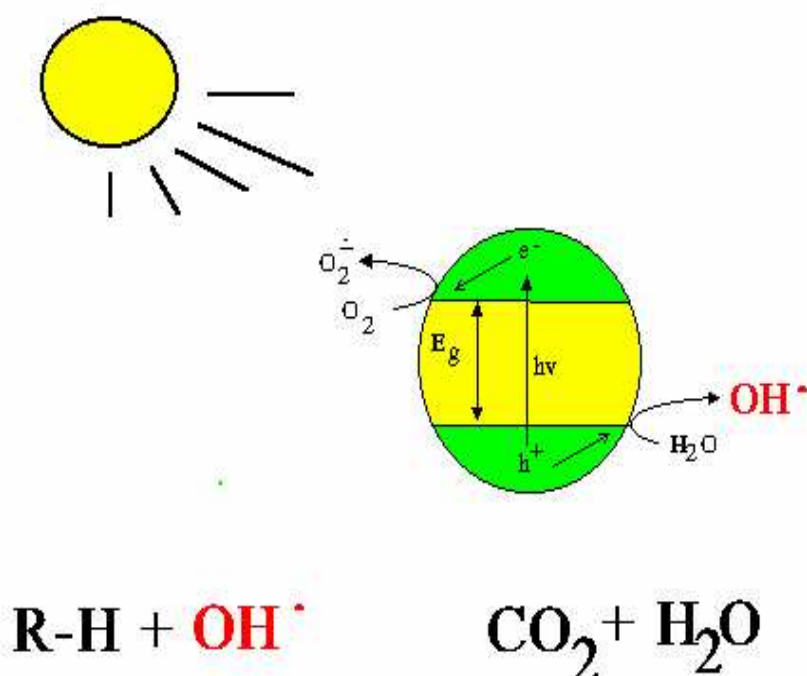
Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο εμφανίζεται κατά τον φωτισμό της ετεροεπαφής ενός φωτοευαίσθητου ημιαγώγιμου υλικού με ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα (Πούλιος, 2007).

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, και μεταπηδούν στην ταινία αγωγιμότητας δημιουργώντας παράλληλα θετικά φορτισμένες οπές στην ταινία σθένους:



3.3 Η 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.



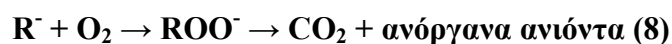
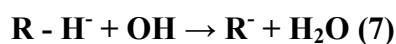
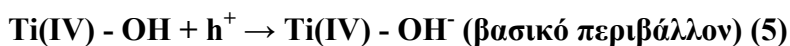
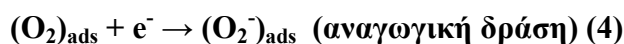
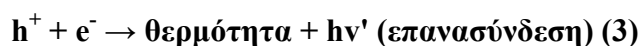
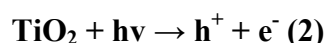
Εικόνα 3.3. Προσομοίωση κόκκου ημιαγώγιμης σκόνης με μικροφωτοηλεκτροχημικό στοιχείο. Υπό την επίδραση του φωτός δημιουργείται περίσσεια ηλεκτρονίων στη ζώνη αγωγιμότητας και οπών στη ζώνη σθένους.

Ο φωτισμός ενός τέτοιου συστήματος δημιουργεί στο εσωτερικό του κόκκου όπως και προηγουμένως 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 H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς τις αντίστοιχες ρίζες του υδροξυλίου ($OH^\cdot$).

Οι ρίζες αυτές αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο, το οποίο προσβάλλει τα οργανικά μόρια που βρίσκονται στο διάλυμα και μέσω υπεροξειδικών ριζών τα αποικοδομεί προς CO_2 και ανόργανα άλατα. Λόγω δε του υψηλού δυναμικού αναγωγής των ριζών αυτών (2.8 V ως προς το κανονικό ηλεκτρόδιο του υδρογόνου, KHY), είναι δυνατή η προσβολή πρακτικά όλων των οργανικών ρύπων που συναντώνται στην υγρή και στην αέρια φάση.

Αρχικά αποσπών άτομα H^+ δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες, οι οποίες αποικοδομούνται στη συνέχεια οξειδωτικά, προς ενώσεις μικρότερου μοριακού βάρους (αλδεΐδες, οξέα) που τελικά αποκαρβοξυλιώνονται προς CO_2 και διάφορα ανόργανα ιόντα (Cl^- , NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , κ.ά.) (Πούλιος, 2007).

Στην περίπτωση που ως ημιαγωγός χρησιμοποιείται το TiO_2 ισχύει :



3.4 Ημιαγώγιμα Υλικά – Καταλύτες

Ως φωτοκαταλύτες ορίζονται τα στερεά εκείνα που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Αυτοί είναι συνήθως ημιαγωγοί. Ο ρόλος του ημιαγωγού στη φωτοκαταλυτική διεργασία είναι αποφασιστικής σημασίας.

Τόσο οι φυσικές του ιδιότητες όσο και οι φυσικοχημικές, αποτελούν παραμέτρους, οι οποίες επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος. Ένα μειονέκτημα τους είναι ο επανασυνδυασμός των θετικών οπών με τα ηλεκτρόνια, οπότε οδηγούμαστε στην παραγωγή φωτονίων ή θερμότητας²² και όχι παραγωγή ριζών υδροξυλίου, μειώνοντας έτσι την φωτοκαταλυτική δραστηριότητα των ημιαγωγών. Τρόποι αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος είναι είτε η προσθήκη ενώσεων που προσλαμβάνουν ηλεκτρόνια (IEAs) είτε η προσθήκη οξειδωτικών, δημιουργώντας εναλλακτικές «πηγές» ριζών υδροξυλίου.

Μία κοινή λύση είναι η παροχή O_2 στο διάλυμα για την δέσμευση των ηλεκτρονίων και την παράταση της ζωής των θετικών οπών ($e^-_{cb} + O_2 \rightarrow O_2^-$) (Τσίμας, 2007).

Ένας αποτελεσματικός φωτοκαταλύτης θα πρέπει να είναι:

- Φωτοκαταλυτικά ενεργός,
- να έχει τη δυνατότητα να αξιοποιεί φως στο ορατό ή υπεριώδες φάσμα,
- να είναι βιολογικά και χημικά αδρανής,
- να είναι φωτοσταθερός,
- να είναι μη τοξικός,
- και τέλος να έχει σχετικά χαμηλό κόστος.

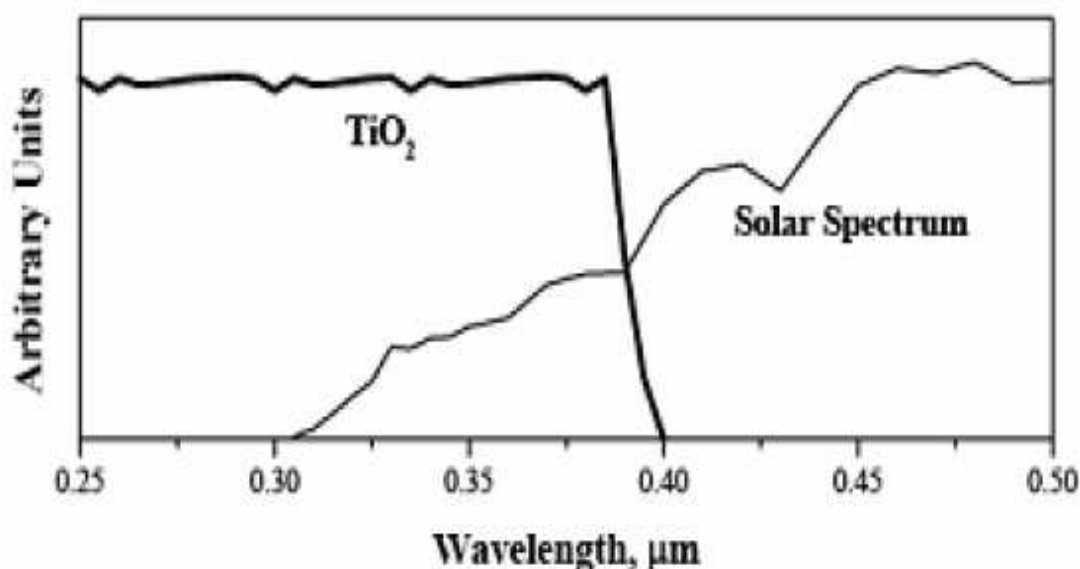
Σε αναζήτηση ενός ημιαγωγού που να είναι φωτοχημικά ενεργός ως ενεργοποιητής της φωτοκαταλυτικής αντίδρασης, το δυναμικό οξειδοαναγωγής της φωτοπαραγόμενης στοιβάδας σθένους πρέπει να είναι αρκούντως θετικό στην δημιουργία ριζών υδροξυλίου $OH\cdot$, οι οποίες μπορούν να μεταγενέστερα να οξειδώσουν τους οργανικούς ρυπαντές και το δυναμικό οξειδοαναγωγής από το φωτοπαραγόμενο ηλεκτρόνιο της διηγιρμένης στοιβάδας, πρέπει να είναι επαρκώς αρνητικό ώστε να είναι σε θέση να ελαττώσει το προσροφημένο O_2 σε υπεροξειδικά ανιόντα. Τα Si , TiO_2 , ZnO , WO_3 , CdS , ZnS , $SrTiO_3$, SnO_2 , WSe_2 , Fe_2O_3 , κλ.π. μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φωτοκαταλύτες.

²² Αντίδραση επανασύνδεσης

Η οξείδωση πολλών ρυπαντών, και ειδικότερα τα οργανικά είδη, απαιτεί υψηλά δυναμικά με το αποτέλεσμα η περιοχή της στοιβάδας σθένους στην διεπιφάνεια του ημιαγωγού – ηλεκτρολύτη να πρέπει να είναι αρκετά θετική, με χαρακτηριστικό παράδειγμα το TiO_2 και το CdS . Σε αυτές τις περιπτώσεις οι φωτο-δημιουργημένες οπές θα έχουν ενέργεια για να οξειδώσουν τα οργανικά συστατικά μέσω της δημιουργίας ριζών υδροξυλίου. Το δυναμικό της οξειδοαναγωγής πρέπει να βρίσκεται στο εσωτερικό του ενεργειακού κενού του φωτοκαταλύτη. Αυτό συμβαίνει μόνο στην περίπτωση του TiO_2 και SrTiO_3 . Γενικά οι ρυπαντές είναι οργανικοί και ο ημιαγωγός που χρησιμοποιείται είναι το διοξείδιο του τιτανίου TiO_2 . Το σύνολο των οργανικών ρυπαντών που μπορούν να φωτο-ανοργανοποιηθούν εξολοκλήρου από οξυγόνο, χρησιμοποιώντας το TiO_2 ως ενεργοποιητή, είναι πολύ ευρύ και περιλαμβάνει πολλούς αλειφατικούς, αρωματικούς ρυπαντές, απορρυπαντικά, βαφές, παρασιτοκτόνα και φυτοφάρμακα.

Το TiO_2 παρουσιάζει συγκριτικά με τους υπόλοιπους ημιαγωγούς, εκτός από τη μεγάλη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα και τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανακύκλωσής του.

Μόνο πρόβλημά του αποτελεί το γεγονός ότι, λόγω του μεγάλου ενεργειακού κενού μεταξύ ζώνης σθένους και αγωγιμότητας, δεν απορροφά στο ορατό φάσμα²³. Έτσι είναι δυνατή η εκμετάλλευση μικρού μόνο μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας, περίπου το 6% του ηλιακού φάσματος. (Parsons, 2004). Βλ. σχήμα 3.4



Σχήμα 3.4. Φάσμα απορρόφησης του TiO_2 και φάσμα εκπομπής του ήλιου

²³ Τυπικά απορροφά σε μήκη κύματος <388 nm.

Παρόλα αυτά, τα πλεονεκτήματα του έχουν καταστήσει το TiO_2 , ως το ημιαγώγιμο υλικό στο πεδίο των φωτοκαταλυτών στην εξυγίανση του νερού. Υπάρχουν τρεις τύποι κρυσταλλικών δομών φυσικού TiO_2 , και πιο συγκεκριμένα, οι τύποι ρουτίλιο, ανατάση και μπρουκίτης (rutile, anatase και brookite). Οι σημαντικότερες μορφές του TiO_2 είναι η ανατάση και το ρουτίλιο με Ebg 3.2 και 3.0 eV και γι' αυτό απορροφούν στο υπεριώδες φάσμα (Parsons, 2004).

Το TiO_2 σε μορφή ανατάσης παρουσιάζεται να είναι περισσότερο αποτελεσματικός ημιαγωγός για τις περιβαλλοντικές εφαρμογές. Αυτό συμβαίνει λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των $\text{OH}^\cdot$ και H_2O στην επιφάνειά του και επιπλέον λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτοδιεγερμένων e^- και h^+ .

Ο φωτοκαταλύτης Degussa P25 TiO_2 παράγεται από την υδρόλυση σε υψηλή θερμοκρασία (άνω των 1200°C) του TiCl_4 , παρουσία υδρογόνου και οξυγόνου. Το TiO_2 επεξεργάζεται επιπλέον με ατμό για την απομάκρυνση του HCl το οποίο παράγεται από την αντίδραση. Το προϊόν που προκύπτει είναι 99.5% καθαρό TiO_2 ²⁴, χωρίς πόρους με ειδική επιφάνεια $50\pm 15\text{ m}^2/\text{g}$ και μέση διάμετρο σωματιδίων της τάξης των 21nm (Mills, 1997).

Ο φωτοκαταλύτης οφείλει την δράση του στο γεγονός ότι όταν φωτόνια ενός συγκεκριμένου μήκους κύματος, προσπίπτουν πάνω στην επιφάνεια του, ηλεκτρόνια προωθούνται από την στοιβάδα σθένους στην στοιβάδα αγωγιμότητας. Αυτό δημιουργεί θετικά φορτισμένες οπές στην στοιβάδα σθένους. Στα υδατικά διαλύματα οι φωτοδημιουργούμενες οπές αντιδρούν με τα ιόντα OH^- ή με τα μόρια του H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς ρίζες υδροξυλίου $\text{OH}^\cdot$. Οι ρίζες αυτές αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο.

²⁴ Με αναλογία ανατάση : ρουτίλιο, 70:30

3.5 Εφαρμογή Φωτοκατάλυσης για την Απολύμανση Υγρών

Αποβλήτων

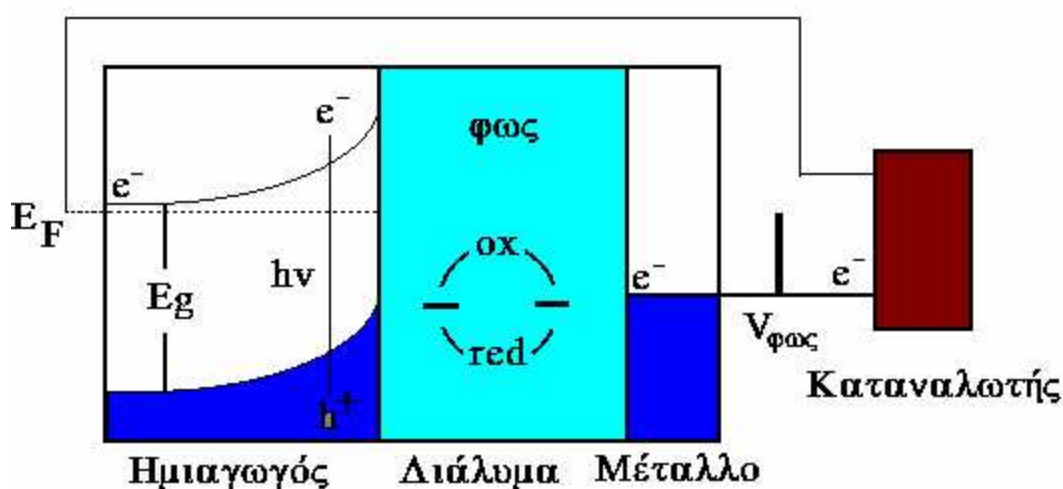
Είναι γνωστό ότι η οξειδωτική καταστροφή των βακτηριδίων προκαλείται από την εκθεσή τους σε στοιχεία όπως τα ανιόντα υπεροξειδίων (O_2^-), το υπεροξείδιο υδρογόνου (H_2O_2), και οι ρίζες υδροξυλίου ($OH^\cdot$), τα οποία μπορούν να βλάψουν τις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα και τις μεμβράνες των κυττάρων. Η αθροιστική ζημία που προκαλείται από τη δράση των παραπάνω στοιχείων (Reactive Oxygen Species [R.O.S.]) μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα στο θάνατο. Αρκετή δουλειά έχει γίνει εξετάζοντας τη βακτηριοκτόνο επίδραση του φωτοκαταλύτη TiO_2 μέσα από ένα ευρύ φάσμα οργανισμών συμπεριλαμβανομένων ιών, βακτηριδίων, μυκήτων, αλγών και καρκινικών κυττάρων. Παρόλα αυτά η κατανόηση του φωτοχημικού μηχανισμού της βακτηριοκτόνου δράσης του παραμένει κατά ένα μεγάλο μέρος ασαφής.

Πρέπει να τονιστεί ότι η ταυτότητα των κύριων φώτο-οξειδωτικών μέσων και των ρόλων τους στο μηχανισμό της βιοκτόνου δράσης τους στους μικροοργανισμούς είναι κάτω από συνεχή έρευνα. Εντούτοις, γενικά γίνεται αποδεκτό ότι τα στοιχεία (R.O.S.) όπως οι ρίζες υδροξυλίου διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο (Rincon & Pulgarin, 2005 ; Μάρακας, 2006).

3.6 Φωτοηλεκτροκαταλυτική Οξείδωση

Το μειονέκτημα που παρουσιάζει η ετερογενής φωτοκατάλυση ως μέθοδος αντιρρύπανσης, όταν ο ημιαγωγός χρησιμοποιείται υπό μορφή κόνεως, είναι η ανάγκη απομάκρυνσής του μετά το πέρας της επεξεργασίας. Για το λόγο αυτό εντατικές είναι οι προσπάθειες διεθνώς για ανάπτυξη αντιδραστήρων, όπου ο καταλύτης χρησιμοποιείται υπό μορφή λεπτού υμενίου επάνω σε αδρανή υποστρώματα, ώστε να αποκοπεί το στάδιο της απομάκρυνσης του. Η χρησιμοποίησή όμως του καταλύτη υπό μορφή λεπτού υμενίου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της απόδοσης του συστήματος, λόγω σημαντικής μείωσης της ενεργούς επιφάνειάς του (m^2/g), καθώς και λόγω της απενεργοποίησής του μετά από κάποιο χρονικό διάστημα. Το γεγονός αυτό η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί να το λύσει είτε με τη βελτίωση των φωτοκαταλυτικών ιδιοτήτων του TiO_2 , υλικού που κατ'εξοχήν χρησιμοποιείται, είτε με τη συνδυαστική δράση της φωτοκαταλυτικής οξείδωσης με κάποια άλλη μέθοδο.

Ένας τρόπος με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί η αντιστάθμιση του προβλήματος αυτού είναι η διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος, διαμέσου των λεπτών υμενίων του καταλύτη, τα οποία λειτουργούν ως άνοδοι ενός γαλβανικού στοιχείου. Η εφαρμογή ενός μικρού θετικού δυναμικού στον καταλύτη μέσω κατάλληλης φωτοηλεκτροχημικής διάταξης, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.6, έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική αύξηση της απόδοσης του συστήματος.



Εικόνα 3.6. Αρχή λειτουργίας ενός φωτοηλεκτροχημικού στοιχείου

Η φωτοηλεκτροκαταλυτική οξείδωση, δηλαδή η υποβοηθούμενη με ηλεκτρικό ρεύμα φωτοκαταλυτική οξείδωση, βασίζεται στο φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο, το οποίο στις δεκαετίες του 1970 και 1980 γνώρισε μεγάλη ανάπτυξη λόγω των δυνατοτήτων που παρείχε, για τη φωτοχημική διάσπαση του νερού, μέσω της συνεργιστικής δράσης του ηλιακού φωτός και διαφόρων φωτοευαίσθητων ημιαγώγιμων υλικών. Η εφαρμογή της ως μεθόδου καταστροφής οργανικών ρύπων είναι πολύ πρόσφατη, παρουσιάζει όμως σημαντικά πλεονεκτήματα. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, με τη φωτοηλεκτροκαταλυτική οξείδωση επιτυγχάνεται, συγκριτικά με την απλή φωτοκαταλυτική οξείδωση, τουλάχιστον τριπλασιασμός της ταχύτητας καταστροφής διαφόρων οργανικών μορίων, τόσο παρουσία τεχνητού όσο και φυσικού φωτός, ενώ ταυτόχρονα παραλείπεται το στάδιο της διήθησης.

Ο φωτοηλεκτροκαταλυτικός αντιδραστήρας, εντός του οποίου λαμβάνει χώρα η οξείδωση των οργανικών ρύπων, λειτουργεί κατά τρόπο ανάλογο με ένα γαλβανικό στοιχείο, όπου ως άνοδος χρησιμοποιείται το επικαλυμμένο με τον καταλύτη υπόστρωμα, ενώ ως κάθοδος κάποιο αδρανές μέταλλο (π.χ. ανοξείδωτος χάλυβας ή γραφίτης). Ο φωτισμός της ανόδου με τεχνητό ή ηλιακό φωτισμό δημιουργεί κατά τρόπο ανάλογο με την απλή φωτοκαταλυτική οξείδωση ελεύθερες ρίζες του υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), ο αριθμός των οποίων όμως είναι κατά πολύ μεγαλύτερος, λόγω της εφαρμοζόμενης εξωτερικά διαφοράς δυναμικού μεταξύ της φωτοανόδου και καθόδου (Πούλιος, 2007).

4 ΒΑΚΤΗΡΙΔΙΑ ΚΑΙ ΚΟΛΟΒΑΚΤΗΡΙΟΕΙΔΗ

Μέρος των μικροοργανισμών που συναντάμε στα υγρά απόβλητα και στους υδάτινους φορείς είναι παθογόνοι. Κυρίως είναι βακτήρια αλλά επίσης 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 και τα βακτηρίδια, που βρίσκονται σε μεγάλους αριθμούς στο γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου και των θερμόαιμων ζώων και κατ' επέκταση στα ανθρώπινα και ζωικά απόβλητα (Δρούμπαλη, 2010).

Τα βακτηρίδια είναι ετερότροφοι ή αυτότροφοι οργανισμοί, αερόβιοι, αναερόβιοι ή επαμφοτερίζοντες. 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, 2003).

Τα ολικά κολοβακτηριοειδή ανήκουν στην οικογένεια των Εντεροβακτηριακών. Τυπικά γένη συναντώμενα στα δίκτυα νερού είναι τα *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella*. Τα ολικά κολοβακτηρίδια είναι μία από τις ομάδες βακτηρίων που χρησιμοποιούνται σαν δείκτες μικροβιολογικής ρύπανσης.

4.1 *Escherichia coli*

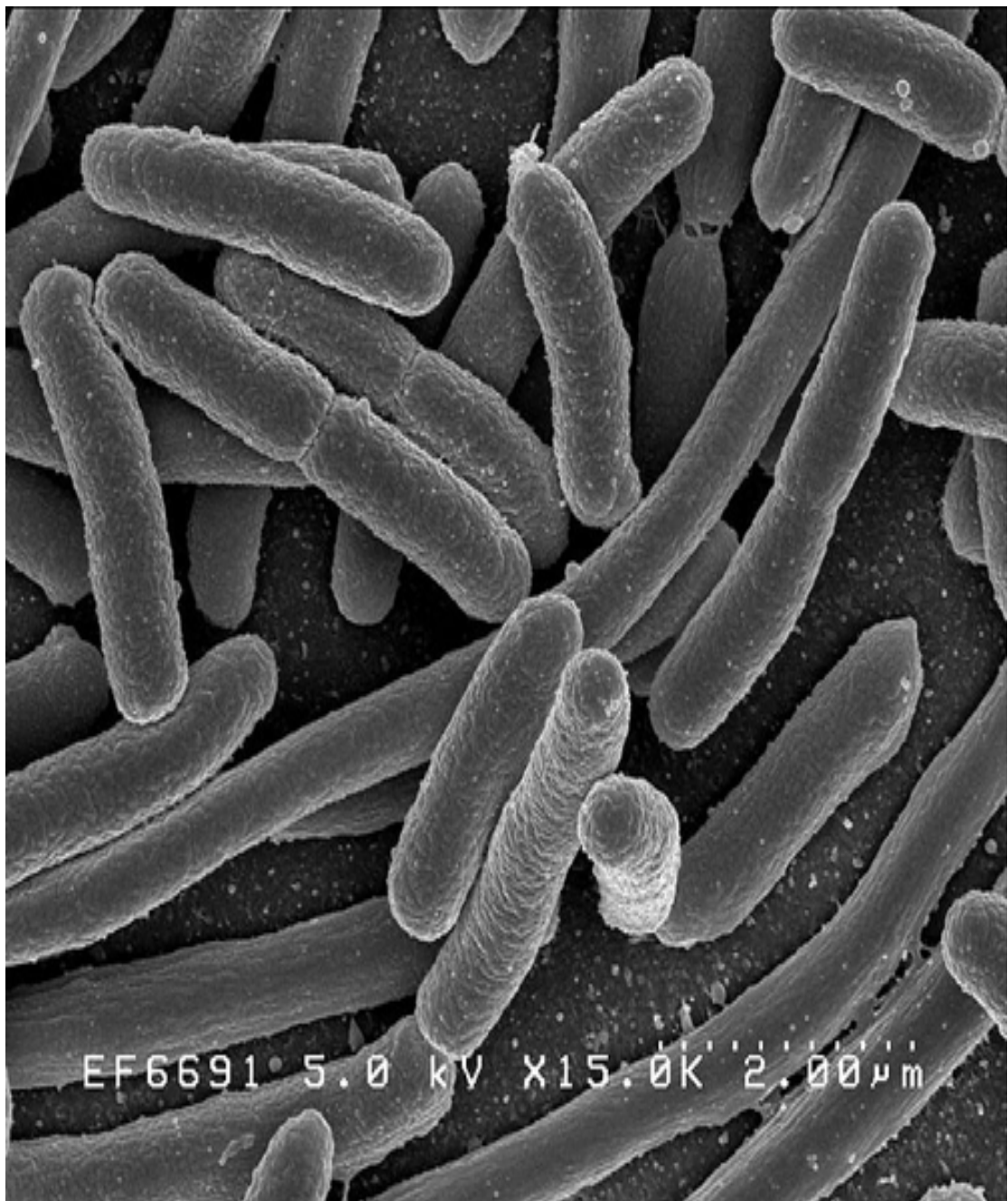
Το γένος *Escherichia* είναι μέλος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών²⁵ και ανήκει στα κολοβακτηριοειδή. Η *E.coli* είναι το τυπικό είδος του γένους και το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών, καθώς διαθέτει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της (Βενιέρη, 2005).

Θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς, όσο και του κατεργασμένου νερού. Πρόκειται για ευρέως διαδεδομένο μικροοργανισμό αφού είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο βακτήριο της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας. Αποτελεί μόνιμο ξενιστή του εντέρου των ανθρώπων και των θερμόαιμων ζώων, όπου μπορεί να υπάρχει σε μεγάλους αριθμούς²⁶ και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 95% των εντεροβακτηριακών που ανευρίσκονται στα κόπρανα. Η *E.coli* διαβιώνοντας στο εντερικό σύστημα συνήθως δεν αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, εκτός και αν πρόκειται για εξασθενημένα 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. Μια τυπική σύσταση ολικών κολοβακτηριδίων σε υγρά αστικά απόβλητα κυμαίνεται από 10^6 μέχρι 10^9 *E.coli* σε 100 ml αποβλήτου. 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 απομόνωση της από δείγματα νερού, αποδεικνύει πέρα από κάθε αμφιβολία την πρόσμειξη 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. Η μολυσματική δόση για τον άνθρωπο ποικίλλει από ένα μικροβιακό κύτταρο μέχρι πολλές χιλιάδες και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του δέκτη (φύλο, ηλικία, φυσική κατάσταση κλ.π.) (Metcalf & Eddy, 2002).

²⁵ Η οποία περιλαμβάνει κυρίως κινητά Gram-αρνητικά βακτήρια.

²⁶ Μέχρι και 10^9 /gr κοπράνων

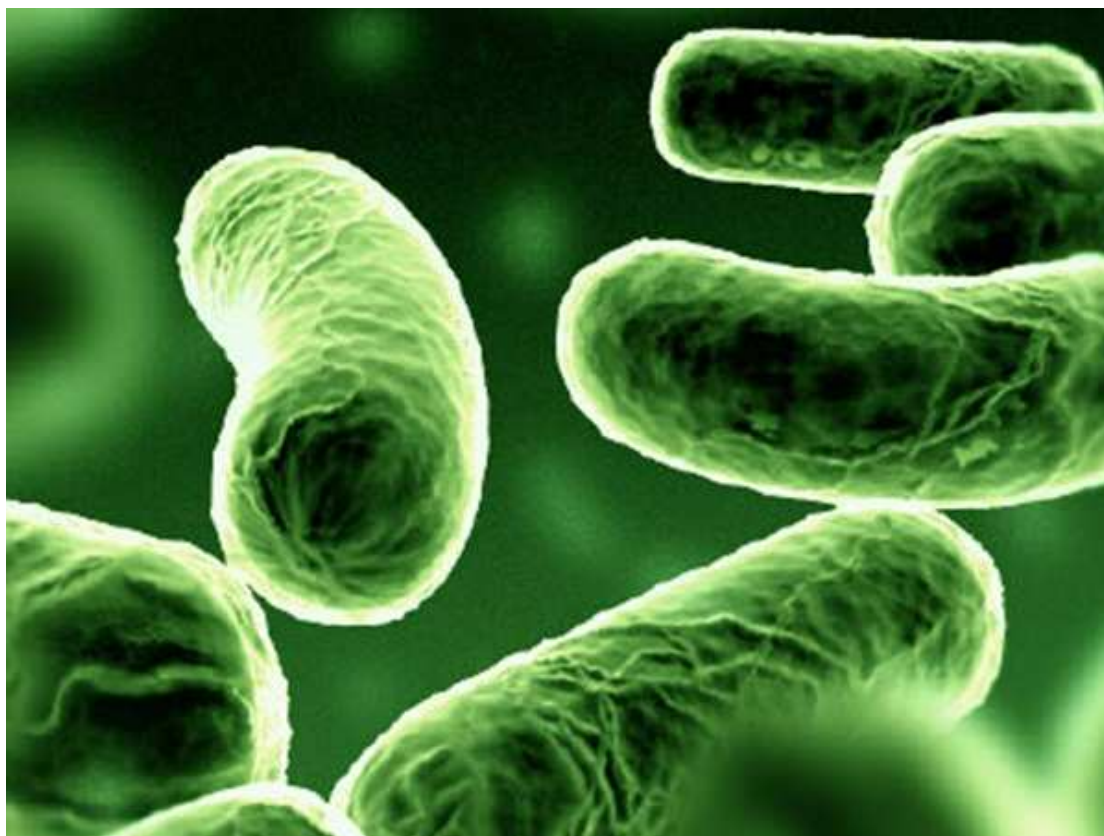


Σχήμα 4.1:Στελέχη E.coli

4.2 *Enterococcus faecalis*

Βακτηρίδια που ανήκουν στην οικογένεια των στρεπτόκοκκων²⁷. Αποτελούνται από διάφορα είδη που υπάρχουν στα κόπρανα ανθρώπων και θερμόαιμων ζώων. Στα κόπρανα ανθρώπων οι εντερόκοκκοι σπανίως υπερβαίνουν τους 10^6 / gr, ενώ στα κόπρανα των ζώων υπάρχουν σε μεγαλύτερο αριθμό από την *E.coli*. Δύσκολα πολλαπλασιάζονται στο νερό και παρουσιάζουν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στην χλωρίωση από την *E.coli*. Η παρουσία τους αποτελεί απόδειξη μόλυνσης του ύδατος με περιττωματικές ουσίες όπως επίσης και παλαιότερης μόλυνσης.

Ο κύριος λόγος αναζήτησης τους είναι η εκτίμηση της σημασίας της παρουσίας Ολικών Κολοβακτηριοειδών επί απουσίας *E.coli* καθώς και η παροχή συμπληρωματικών πληροφοριών για την εκτίμηση της έκτασης πιθανής κοπρανώδους μόλυνσης (Γεωργίου-Μπούφα, 2005).



Σχήμα 4.2: Στελέχη Enterococcus faecalis

²⁷ Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει κυρίως κινητά Gram-θετικά βακτήρια.

5 ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ E. COLI ΚΑΙ ENTEROCOCCUS FAECALIS

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 (CFU's), και εκφράζεται συνήθως ως αριθμός των CFU's ανά mL ή ανά γραμμάριο δείγματος. Η συγκέντρωση των CFU's 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 αραιώση γίνεται μέχρι το $1/10^6$ cfu/mL, ώστε να υπολογιστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο αριθμός των αποικιών (Δρούμπαλη, 2010).

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 (Viable But Not Culturable - VBNC). Αυτοί οι μικροοργανισμοί καλούνται να αποδείξουν τη μεταβολική δραστηριότητα και να διατηρούν τα χαρακτηριστικά των παθογόνων (Chatzisymeon et al., 2010).

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την κατάσταση VBNC μπορεί να περιλαμβάνουν την UV έκθεση, κάποιους αντιμικροβιακούς παράγοντες, τις αλλαγές της θερμοκρασίας, το pH και την έλλειψη ενέργειας. Η εισαγωγή σε μοριακές τεχνικές έχει συμβάλει στο να ξεπεραστούν τα σημαντικά μειονεκτήματα των συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας.

Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική της PCR επέτρεψε καινούργιες προσεγγίσεις στην έρευνα των παθογόνων μικροοργανισμών λόγω της υψηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει, της ιδιαιτερότητας και της ταχύτητας της.

5.3 Μέθοδος PCR

5.3.1 Αρχή Λειτουργίας της Αντίδρασης της PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro*²⁸ μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της μοριακής βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της μοριακής βιολογίας όσο και της ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφεύρεση του το 1984 και τιμήθηκε γι' αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993. Πιο συγκεκριμένα η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από τρία διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με την βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει την δυνατότητα να θερμάνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο (Βερβερίδης, 2003).

²⁸ In vitro: μέσα στο γυαλί – δοκιμαστικό σωλήνα. Επιστημονικός όρος της βιολογίας που αναφέρεται κυρίως στην τεχνική της πραγματοποίησης ενός δεδομένου πειράματος σε δοκιμαστικό σωλήνα ή γενικότερα για πειράματα που πραγματοποιούνται σε αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες έξω από τους ζωντανούς οργανισμούς.

5.3.2 Στάδια Κύκλου PCR

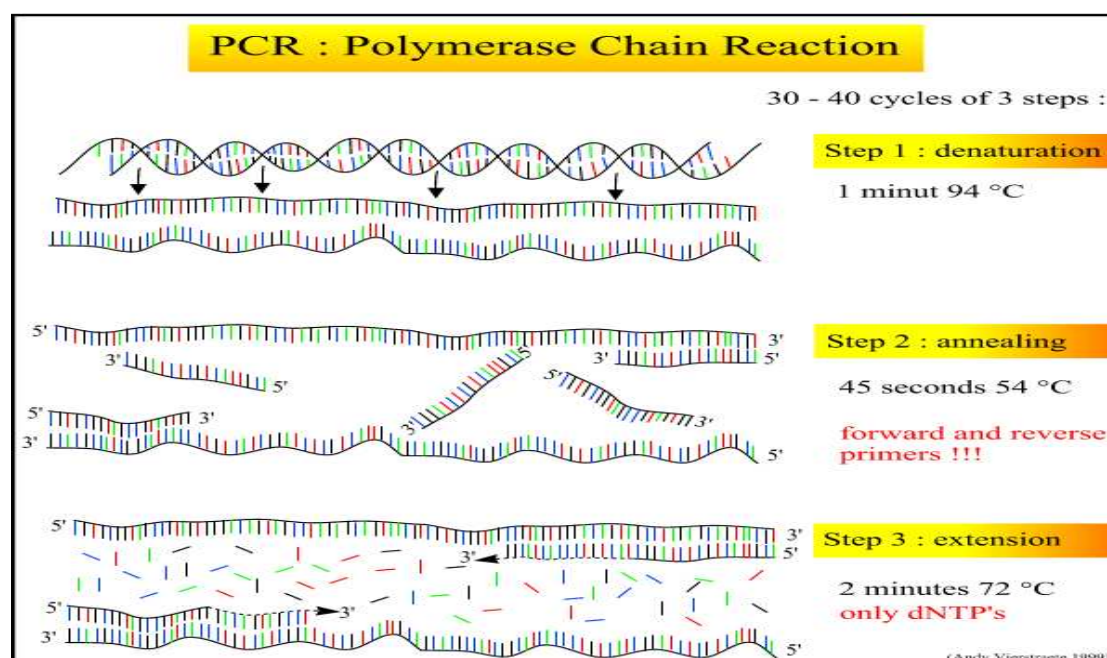
Τα στάδια που αποτελούν τον επαναλαμβανόμενο κύκλο της αντίδρασης PCR είναι τα εξής:

- 1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation),
- 2) υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου,
- 3) επιμήκυνση εκκινητών (extension).

Κατά την διάρκεια του **πρώτου σταδίου** το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικ.5.3.2).

Στο **δεύτερο στάδιο** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Εικ. 5.3.2).

Στο **τρίτο και τελευταίο στάδιο** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (Εικ. 5.3.2).

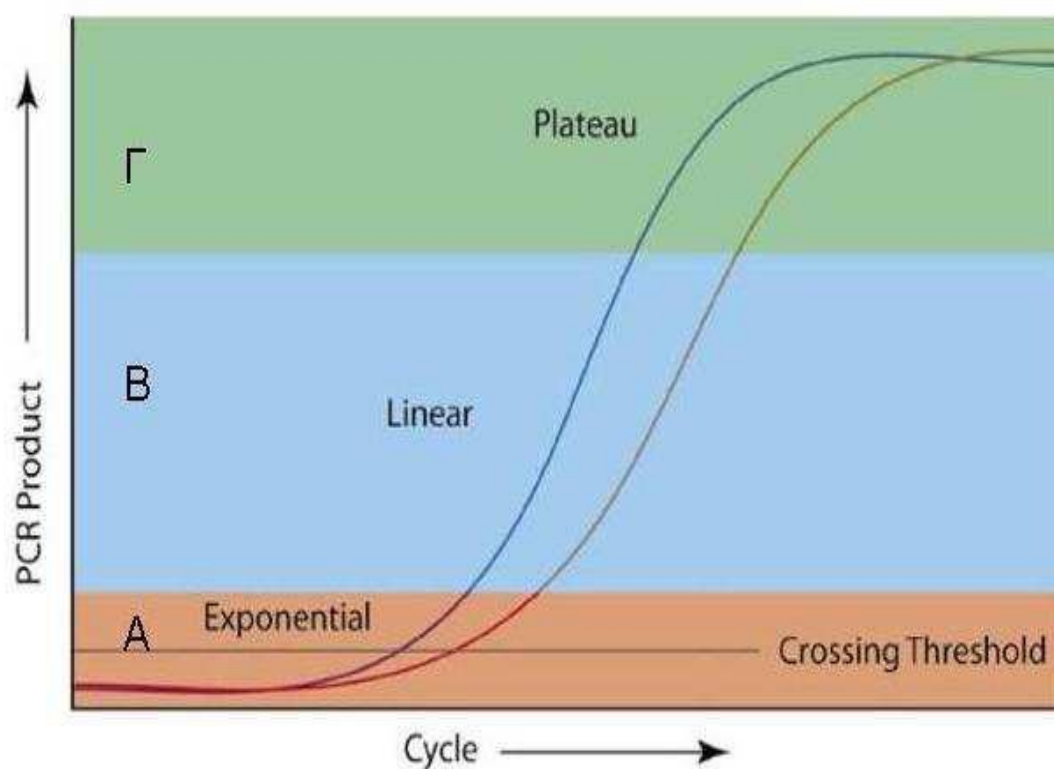


Εικόνα 5.3.2. Τα βασικά στάδια της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1): Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2): Ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3): Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension).

5.3.3 Φάσεις της Αντίδρασης PCR

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε **τρεις φάσεις**:

- **Εκθετική (exponential) φάση:** Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σ' αυτή την φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA (Εικ. 5.3.3Α),
- **Γραμμική (linear) φάση:** Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων (Εικ. 5.3.3Β),
- **Φάση Plateau:** Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Εικ. 5.3.3Γ) (Λαζανάκη 2010).



Εικόνα 5.3.3. Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες χωρίζεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ(Plateau).

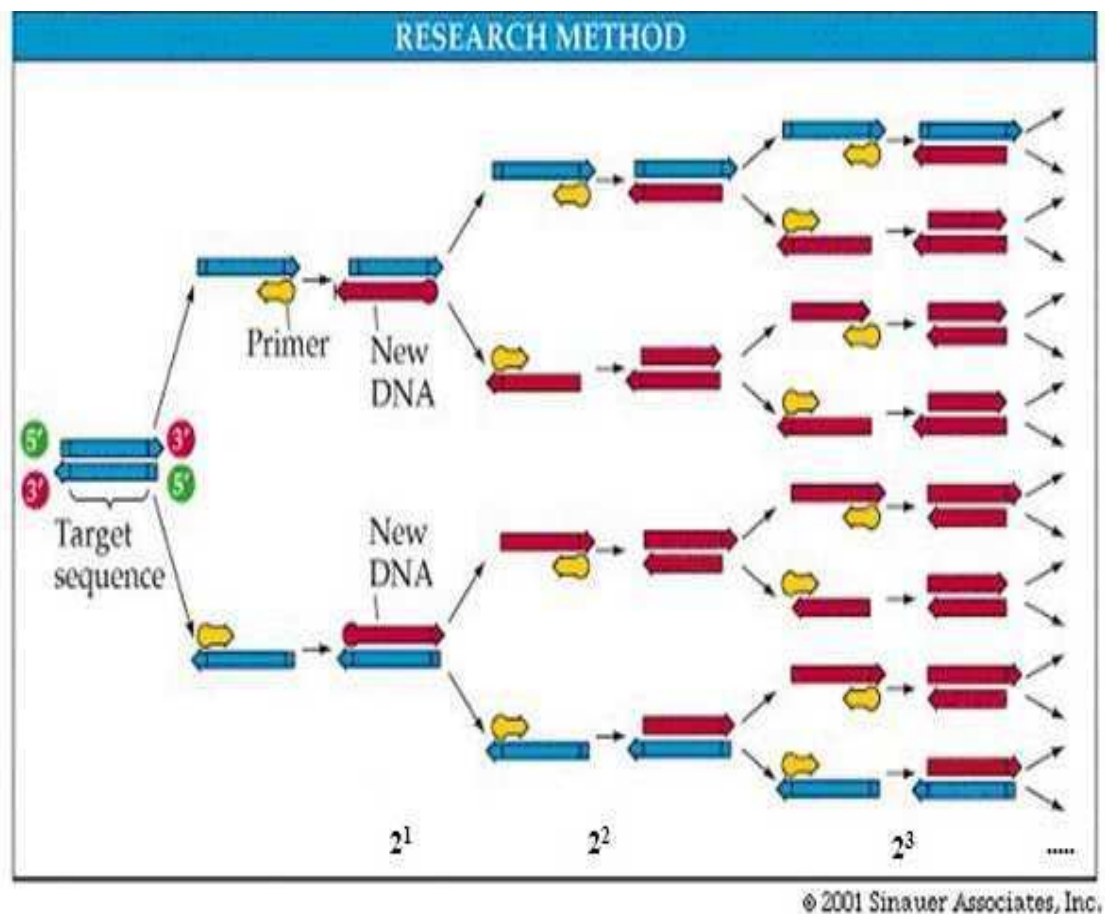
5.3.4 Εκκινητές και DNA Πολυμεράση²⁹

Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση. Οι **εκκινητές** (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια και έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA, αφορούν τις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράσης την σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος και έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m). Η **DNA πολυμεράση** (Taq polymerase) είναι ένζυμο που βοηθάει στην σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνει μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3' άκρο του εκκινητή. Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-80°C, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστηριότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα με την βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Ορισμένα από τα παράγωγα της Taq πολυμεράσης είναι το Klenow Fragment, το Stoffel fragment, η faststart polymerase, η pfu DNA polymerase, η Vent Polymerase και η Tth polymerase. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λάθος τοποθέτηση βάσεων κατά την σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3' προς 5' επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι' αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg et al, 2002).

²⁹ Taq Polymerase

Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης που αφορά την PCR εκτός από τους εκκινητές, τις πολυμεράσες και το τμήμα DNA, υπάρχουν επίσης και: τα dNTP's τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates) που είναι απαραίτητα νουκλεοτίδια (ATP, TTP, CTP και GTP) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{++}) που απαιτούνται για την ενζυματική δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης και ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.0 (Βαρζάκας και Αρβανιτο-γιάννης, 2006).

Η διαδικασία της PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε αρκετούς κύκλους, συνήθως όμως 30 με 40 κύκλοι είναι αρκετοί για να συντεθούν εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA και τα αντίγραφα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία για τον επόμενο κύκλο (Λαζανάκη 2010) (Εικ. 5.3.4).

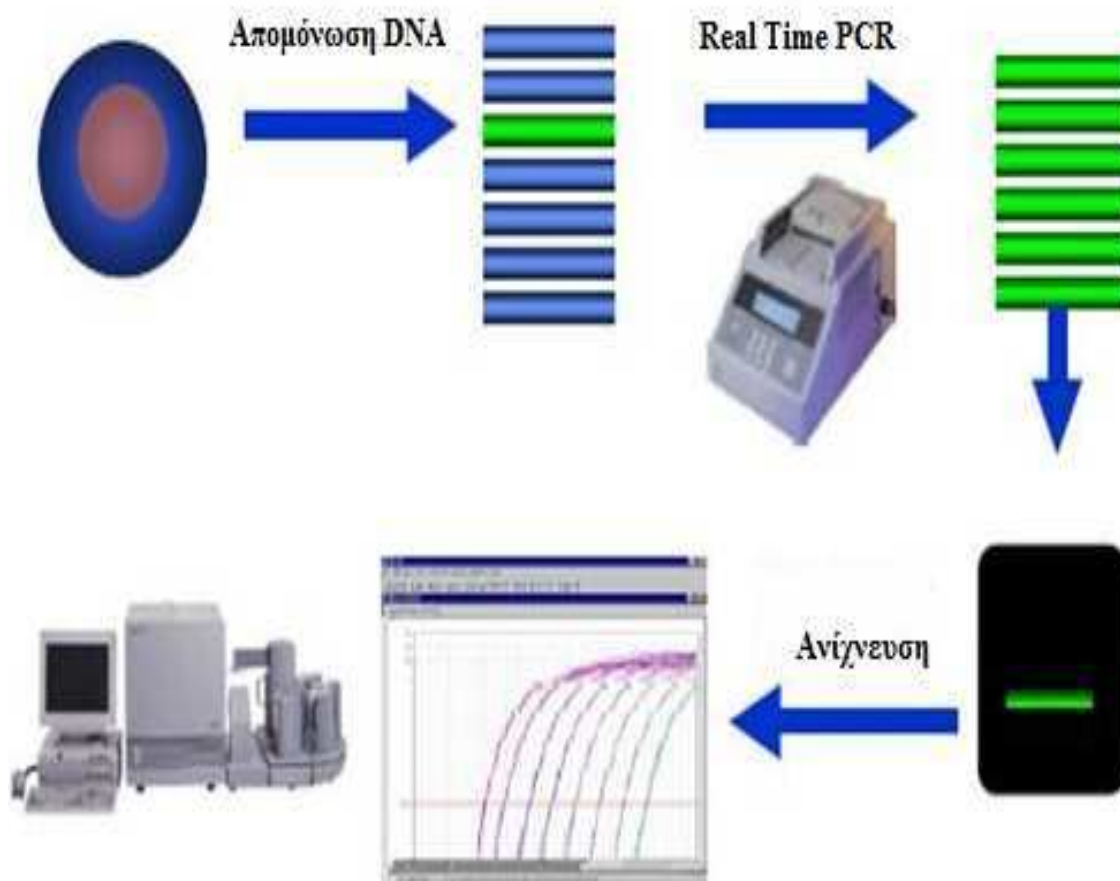


Εικόνα 5.3.4. Παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας της μεθόδου και εκθετικού πολλαπλασιασμού των προϊόντων.

Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των προϊόντων εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αгарόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη θα είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα της PCR γίνονται ορατά με την βαφή του Βρωμιούχου αιθιδίου (Ethidium bromide) το οποίο φθορίζει έντονα κάτω από υπεριώδεις ακτίνες UV όταν συγκεντρώνεται στις περιοχές DNA προϊόντων της PCR, εφόσον παρεμβάλλεται μεταξύ των ζευγών των βάσεων του διπλόκλωνου DNA (Hunt, 2006). Το βρωμιούχο αιθίδιο μπορεί να ενσωματωθεί στη πηκτή αгарόζης πριν την ηλεκτροφόρηση ή να εμβαπτιστεί η πηκτή σε διάλυμα του μετά την ηλεκτροφόρηση (Λαζανάκη 2010).

5.4 Η Αρχή Λειτουργίας της Real Time PCR

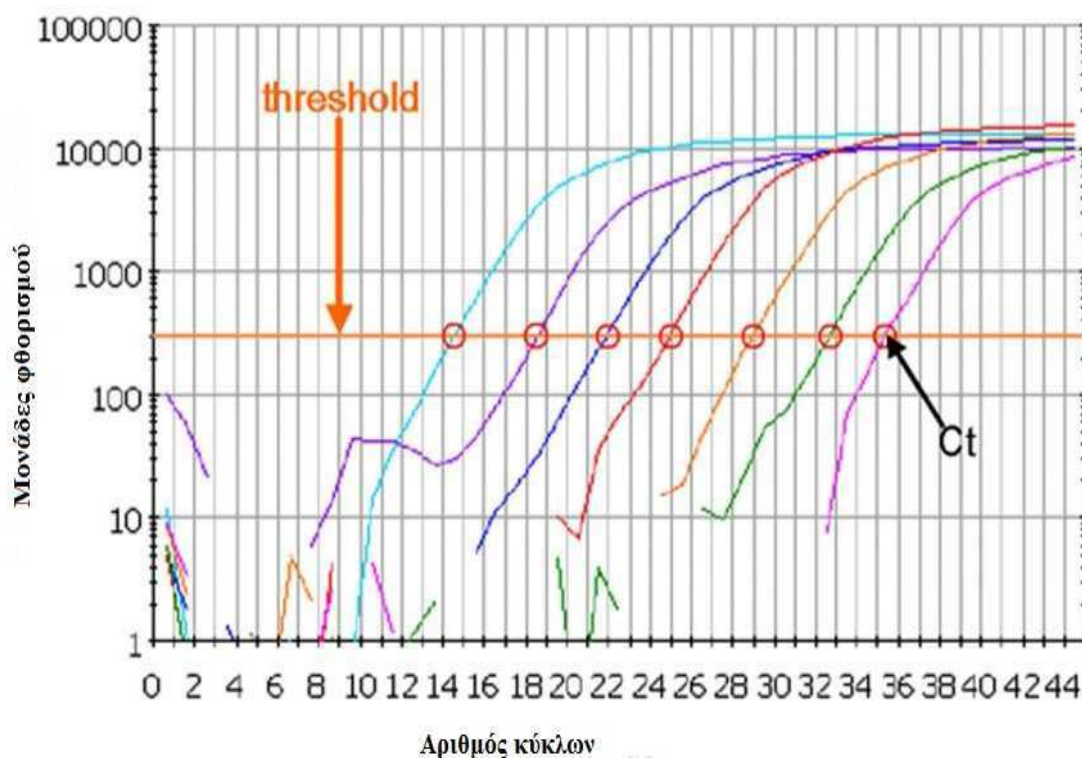
Η Real Time PCR αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Συχνά αναφέρεται και με άλλες ονομασίες όπως Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) ή Kinetic PCR, ενώ πολύ συχνά συγχέεται με την μέθοδο της Αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcription PCR) εξαιτίας της συντομογραφίας RT-PCR. Με την Real Time PCR συνήθως επιδιώκεται ανάλυση DNA, είναι δυνατόν όμως να πραγματοποιηθεί ανάλυση και τμημάτων cDNA ή RNA αν συνδιάστουν οι μέθοδοι της Real time PCR με την μέθοδο της Reverse transcription PCR. Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της PCR παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα σε μικρότερο χρόνο απ'ότι η PCR και δίνει την δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικ. 5.4α). Το διάλυμα της αντίδρασης της Real Time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR έκτος από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton et al, 2006). Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με την βοήθεια αυτοποιημένου μηχανήματος ειδικού για την Real time PCR που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και το οποίο παρέχει την δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του σήματος ανίχνευσης του DNA μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικ. 5.4α).



Εικόνα 5.4α. Η διαδικασία ξεκινάει από την απομόνωση του DNA, συνεχίζει στην αντίδραση της Real Time PCR και τελειώνει με την ανίχνευση των προϊόντων.

Στην Real time PCR η παρακολούθηση της σύνθεσης του DNA που παράγεται στην αντίδραση γίνεται με την σήμανση των αντιγράφων με φθορίζοντα μόρια (fluorescent reporter molecule), στα πρώτα στάδια της αντίδρασης (εκθετική φάση). Τα μόρια αυτά εκπέμπουν φθορισμό, ο οποίος μετράται σε κάθε κύκλο και βοηθάει στη ποσοτικοποίηση του προϊόντος. Η ένταση του φθορισμού αυξάνεται σταδιακά σε συνάρτηση με την αύξηση των αντιγράφων που παράγονται σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Stratagene, 2006).

Η γραμμή **Threshold** (Εικ. 5.4β) είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται **Threshold cycle (Ct)** ή **τιμή Ct**.

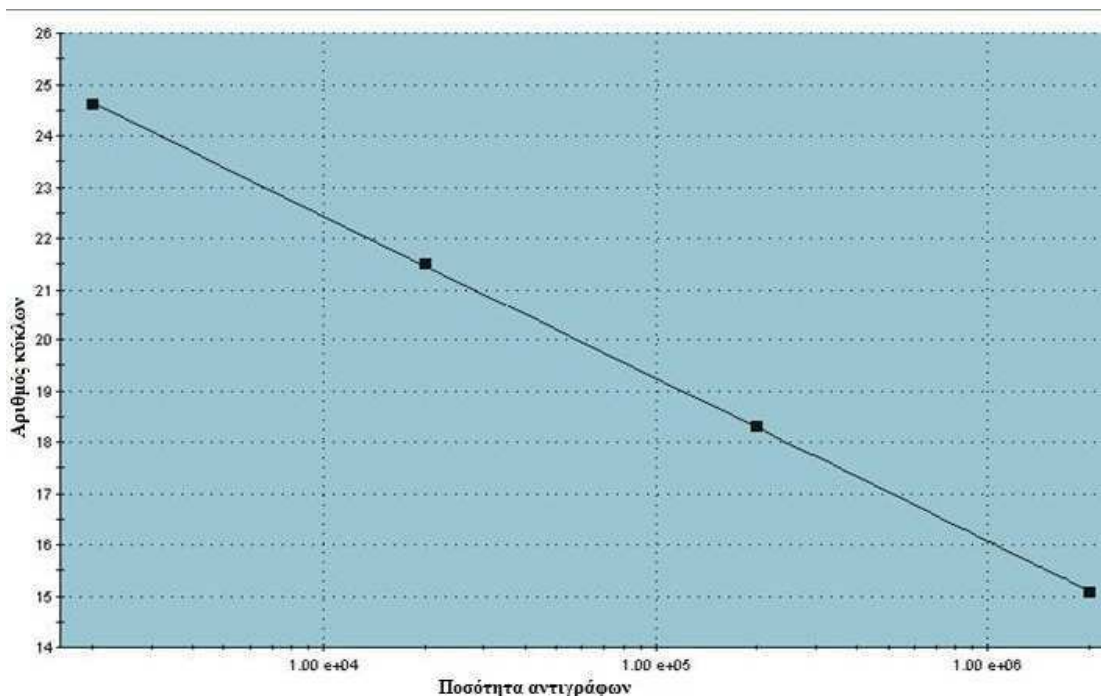


Εικόνα 5.4β. Με την οριοθέτηση του σημείου threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής Ct.

Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα θα εμφανιστεί η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη (Wong et al, 2005).

Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογισθεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν δυο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγθούν. Οι μέθοδοι αυτές είναι: Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification) (Livak et al, 2001).

Η **απόλυτη ποσοτικοποίηση** (Absolute quantification) παρέχει την μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην χρήση μίας **καμπύλης αναφοράς** (standard curve, Εικ. 5.4γ), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης.

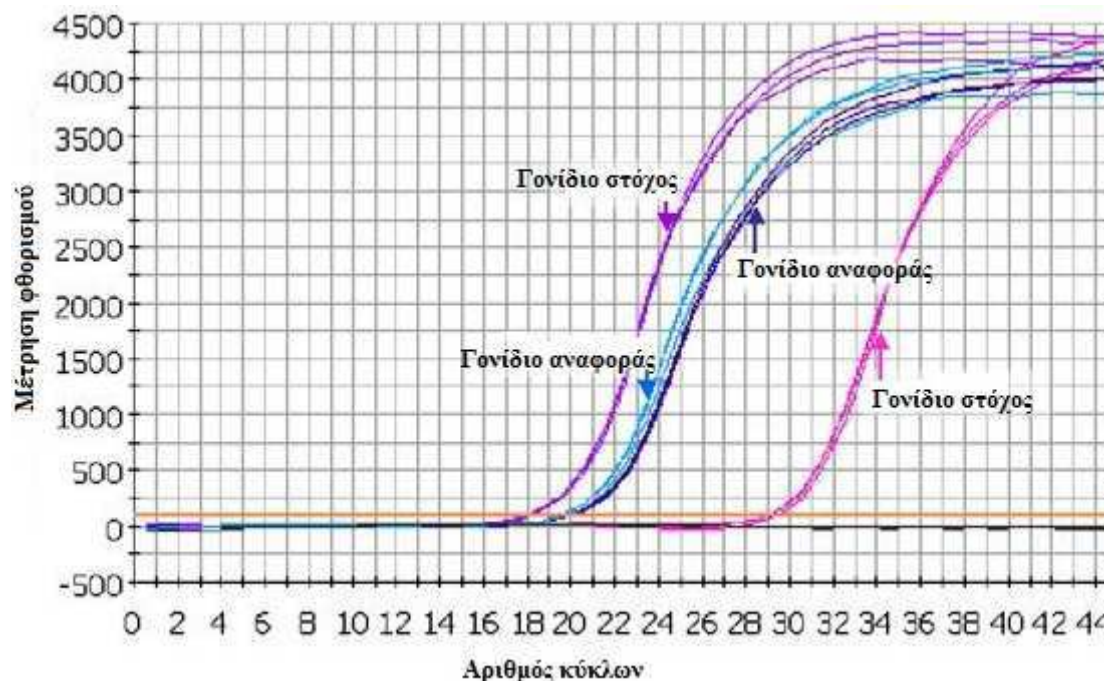


Εικόνα 5.4γ. Παράδειγμα καμπύλης αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από τέσσερα σημεία, δηλαδή από τέσσερις αραιώσεις του αρχικού μάρτυρα.

Για την δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεγθεί μια γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρα, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γενωμικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο (recombinant) πλασμιδιακό DNA (recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene, 2006). Αυτή τη συγκέντρωση-μάρτυρα θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα περάσουν από τις ίδιες συνθήκες της Real Time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα (Λαζανάκη, 2010).

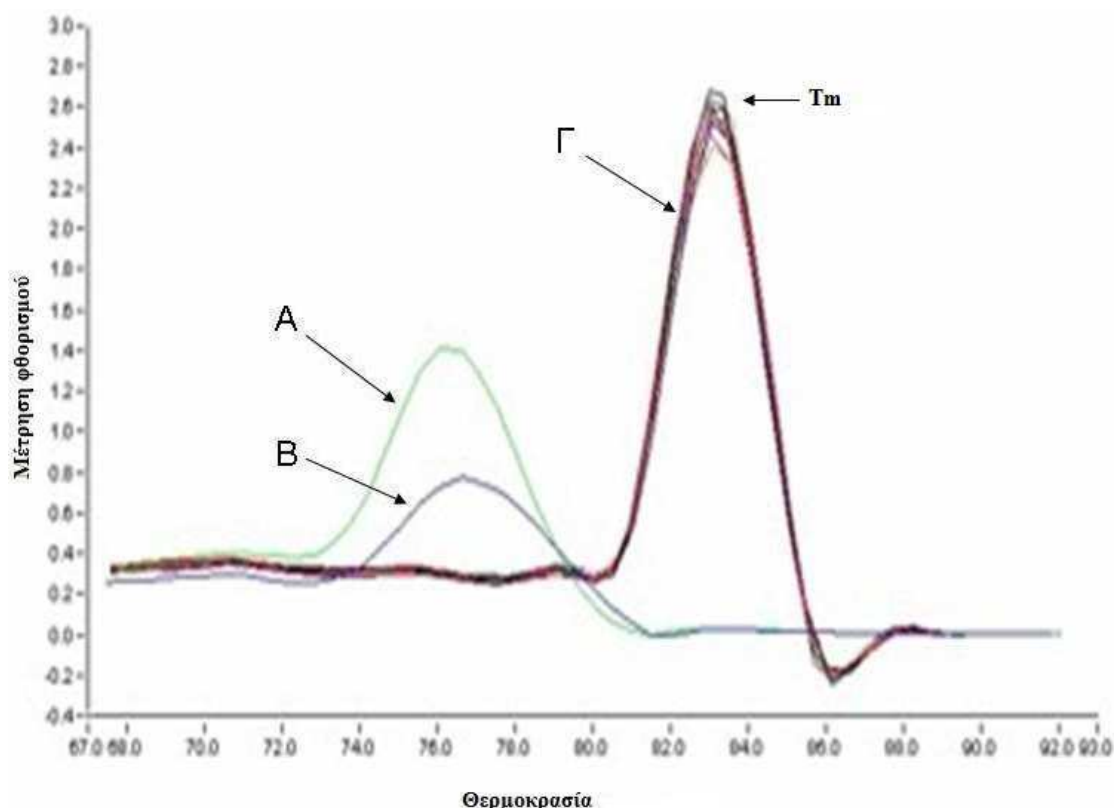
Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις Ct values της κάθε αραιώσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και θα πρέπει τα σημεία αυτά να καλύπτουν το εύρος των συγκεντρώσεων των υπό μελέτη δειγμάτων (Βλ. Εικόνα 5.4γ). Στην περίπτωση που δεν καλύπτει όλο το εύρος των συγκεντρώσεων τότε μπορεί η ποσοτικοποίηση των υπό μελέτη δειγμάτων να μην είναι αξιόπιστη. Στη συνέχεια μπορεί με την βοήθεια της συσκευής της Real time PCR να γίνει σύγκριση των τιμών Ct των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς και έτσι να ποσοτικοποιηθούν τα άγνωστα δείγματα (Stratagene, 2006).

Η **σχετική ποσοτικοποίηση** (Relative quantification) είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη ποσοτικοποίηση και με την μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση της καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Εικόνα 5.4δ). Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς (π.χ. το μαθηματικό μοντέλο του Pfaffl), (Pfaffl, 2002).



Εικόνα 5.4δ. Σύγκριση καμπύλης του υπό μελέτη γονιδίου (γονίδιο στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (reference gene).

Μια ακόμα δυνατότητα που παρέχει η τεχνολογία της Real Time PCR είναι η κατασκευή **καμπύλης αποδιάταξης** (Melting curve ή Dissociation curve) με την οποία μπορούν να αξιολογηθούν τα προϊόντα της αντίδρασης, να δούμε δηλαδή αν τα προϊόντα που παρήχθησαν είναι αυτά που θέλουμε ή όχι. Η καμπύλη αυτή βασίζεται στην **θερμοκρασία αποδιάταξης** (Melting temperature ή T_m) των προϊόντων της αντίδρασης (Houghton et al, 2006).



Εικόνα 5.4ε. Παράδειγμα καμπύλης αποδιάταξης στην οποία εμφανίζονται τρεις διαφορετικές κορυφές (A, B και Γ). Η υψηλότερη κορυφή (Γ) αντιστοιχεί στην θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Οι κορυφές A και B αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης από αυτή της κορυφής Γ.

Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA και εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος DNA. Τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών ή τμήματα που προέρχονται από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (mispriming) (Hunt, 2006).

Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης τότε θα εμφανιστεί μια κορυφή στην καμπύλη, ενώ στην περίπτωση που ανάμεσα στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης (T_m) (Εικόνα 5.4ε), επειδή για κάθε προϊόν η αποδιάταξη γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία. Η μεθοδολογία της εφαρμογής της αντίδρασης της Real Time PCR θα πρέπει να περιλαμβάνει πάντα και αρνητικούς μάρτυρες (κενά DNA) μαζί με άγνωστα δείγματα προς ανάλυση. Τα αρνητικά αυτά δείγματα αφορούν την εφαρμογή κανονικής αντίδρασης με χρήση όλων των υλικών της PCR πλην της προσθήκης του DNA (όπως στην περίπτωση της αντίδρασης των αγνώστων δειγμάτων). Συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA, για να εξεταστεί η περίπτωση επιμόλυνσης του διαλύματος της αντίδρασης PCR του αγνώστου δείγματος υπό εξέταση με DNA άλλου οργανισμού (Λαζανάκη, 2010).

5.5 Χημείες Real-Time PCR

Υπάρχουν δύο είδη χημειών για την ανίχνευση της ενισχυόμενης αλληλουχίας του DNA, με Real-Time PCR: τα ειδικά και τα μη ειδικά συστήματα. Στην πρώτη περίπτωση επιτυγχάνεται διαχωρισμός της ενισχυόμενης αλληλουχίας-ενδιαφέροντος από τυχόν μη ειδικά προϊόντα, που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών, ενώ στην δεύτερη ανιχνεύονται όλα τα δίκλινα μόρια DNA, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση (Bustin, 2000, Giulietti et al., 2001).

5.5.1 Ειδικά Συστήματα Ανίχνευσης

Στα ειδικά συστήματα ανίχνευσης γίνεται χρήση ανιχνευτή, ειδικού για την αλληλουχία-στόχο. Οι ανιχνευτές έχουν τη δυνατότητα σήμανσης με διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, των οποίων τα διαφορετικά φάσματα διέγερσης και εκπομπής επιτρέπουν τον σαφή διαχωρισμό τους. Ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι που ανήκουν στη συγκεκριμένη κατηγορία αποτελούν οι Taqman probes, Molecular beacon probes και Scorpions.

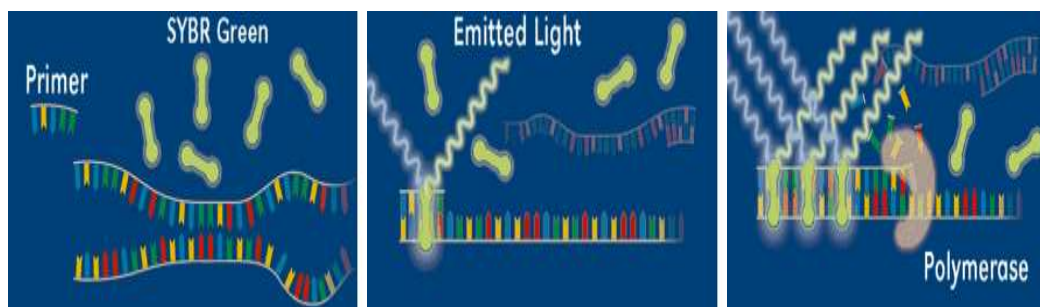
5.5.2 Μη Ειδικά Συστήματα Ανίχνευσης

Συνήθως στα μη ειδικά συστήματα ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική, η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (dsDNA). Μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που ανήκει σε αυτά τα συστήματα ανίχνευσης είναι η SYBR GREEN όπου περιγράφεται παρακάτω.

5.5.3 Μέθοδος SYBR GREEN

Στην παρούσα διπλωματική εφαρμόσαμε την μέθοδο SYBR Green. Στην μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η χρωστική SYBR Green I. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει στα 520 nm. Σημειώνεται ότι η SYBR green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα. Ωστόσο, η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

Η χρήση μη ειδικών συστημάτων ανίχνευσης παρουσιάζει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα. Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της SYBR green είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζευγάρι εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική μέθοδο από την χρήση ειδικού ανιχνευτή (probe). Επιπλέον, συνιστά μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής, με αποτέλεσμα την ενίσχυση του προκύπτοντος σήματος. Αντίθετα, σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι προσδένεται σε όλα τα δίκλωνα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση ενίσχυσης, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα που ενδέχεται να προκύπτουν. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Παρόλ' αυτά υπάρχει τρόπος να ξεπεραστούν αυτοί οι περιορισμοί. Ο σωστός σχεδιασμός ειδικών εκκινητών όπως επίσης και η βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, μπορούν να συμβάλλουν στην αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπύλων αποδιάταξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους φθορισμούς που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.



Εικόνα 5.5.2.1. Περιγραφή της λειτουργίας της χρωστικής SYBR green I. Όταν η χρωστική βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός. Η ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του σε συνδυασμό με τη διέγερσή της με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Η ένταση του φθορισμού αυτού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος.

5.6 Οι Διαφορές Μεταξύ PCR και Real Time PCR

Παρόλο που η Real Time PCR είναι παραλλαγή της PCR υπάρχουν ορισμένες βασικές διαφορές στον τρόπο που λειτουργούν οι δύο μέθοδοι. Η PCR είναι μια κυρίως ποιοτική μέθοδος που δεν μπορεί να εκφράσει τα αποτελέσματα της αντίδρασης με συγκεκριμένα νούμερα, ενώ με την Real Time PCR μπορεί να γίνει ακριβή ποσοτικοποίηση των προϊόντων της αντίδρασης. Τα προϊόντα της αντίδρασης της PCR μπορούν να ελεγχθούν μόνο μετά το τέλος της διαδικασίας και αφού πρώτα γίνει ηλεκτροφόρηση των αποτελεσμάτων σε πηκτη αгарόζης (Hunt, 2006).

Η Real Time PCR επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας των προϊόντων οποιαδήποτε στιγμή μέσω κάμερας που διαθέτει η συσκευή της Real Time PCR, επισπεύδοντας την διαδικασία. Η κάμερα αυτή καταγράφει τον φθορισμό που εκπέμπουν τα προϊόντα που σχηματίζονται και στην συνέχεια δίδει τα δεδομένα στον υπολογιστή με τον οποίο είναι συνδεδεμένη η συσκευή (Houghton et al, 2006).

Άλλη μια διαφορά είναι η φάση κατά την οποία γίνεται η ανίχνευση των προϊόντων της αντίδρασης. Στην PCR η ανίχνευση των προϊόντων γίνεται στην φάση του plateau (Εικόνα 5.3.3Γ), όταν δηλαδή η αντίδραση βρίσκεται στο τέλος της διαδικασίας και έχει αρχίσει να μειώνεται ο ρυθμός δημιουργίας αντιγράφων, λόγω ελάττωσης των αντιδραστηρίων και μειωμένης δραστηριότητας της Taq πολυμεράσης.

Αντίθετα στην Real Time PCR τα προϊόντα ανιχνεύονται κατά την διάρκεια της εκθετικής (exponential) φάσης (Εικ. 5.3.3Α), όπου τα αποτελέσματα είναι πιο ακριβή (Gachon et al., 2004).

Ακόμα στο διάλυμα της Real Time PCR προστίθεται συγκεκριμένη χρωστική ουσία όπως π.χ. (SYBR Green I ή probes) που αποτελεί και τον μηχανισμό ανίχνευσης για την παρακολούθηση της αντίδρασης μέσω κατάλληλου ανιχνευτή της ακτινοβολίας της χρωστικής, ενώ στην PCR η ανίχνευση προϊόντων γίνεται με την προσθήκη του Ethidium bromide στη πηκτή αγαρόζης, μετά δηλαδή την ολοκλήρωση της αντίδρασης (Hunt, 2006).

Μια τελευταία διαφορά είναι ότι με την Real Time PCR είναι δυνατό να μπορούμε να αξιολογήσουμε αν τα προϊόντα της αντίδρασης προέρχονται όντως από το τμήμα DNA που χρησιμοποιήθηκε ως στόχος, με την βοήθεια της Melting curve ενώ η PCR δεν έχει τέτοια δυνατότητα (Houghton et al, 2006).

6 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν:

- ♦ Η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης του νερού και των πραγματικών λυμάτων με την χρήση των μεθόδων της φωτοκατάλυσης και της φωτοηλεκτροκατάλυσης.
- ♦ Ο έλεγχος της απόδοσης της απολύμανσης μετρώντας το ποσοστό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών *E.coli* και *Enterococcus faecalis* σε συνάρτηση με διάφορες παραμέτρους λειτουργίας όπως η συγκέντρωση του καταλύτη TiO_2 , η ένταση του ρεύματος, η εφαρμοζόμενη τάση, το είδος και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών και του χρόνου απολύμανσης.
- ♦ Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών τόσο με την κλασσική μικροβιολογική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όσο και με την μέθοδο μοριακής βιολογίας real-time PCR Sybr Green.

7 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Υλικά

7.1.1 Θρεπτικά υλικά

- Nutrient Agar (*Oxoid*)
- Hicrome Agar (*Sigma*)
- Slanetz – Bartley Medium (*HiMedia*)

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 0.8% (*Merck*)

7.1.3 Διαλύματα

- Διάλυμα *CTAB-NaCl* (για την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος):
4.1g NaCl, 10g *CTAB* σε 100ml ddH₂O
- Ρυθμιστικό διάλυμα *Tris-EDTA* (*TE*)
50mM *Tris*, 50mM *EDTA*, pH 8.0. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.
- Διάλυμα 10% *SDS*
5g *SDS* σε 50ml ddH₂O

- Διάλυμα Tryptone Soya Broth (TSB)
30g TSB σε 1L ddH₂O. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.

7.1.4 Πρότυπο Στέλεχος *Escherichia coli* και *Enterococcus faecalis*

Στην πραγματοποίηση των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκαν οι μικροοργανισμοί *E.coli* ATCC 23716 (American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA) και *Enterococcus faecalis* ATCC 14506 (American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA).

7.1.5 Καταλύτης TiO₂

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, στα αρχικά χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις καταλύτη TiO₂ (Aeroxide P 25 [Degussa P 25]) που παρέχεται από την εταιρία Degussa AG. Στα επόμενα πειράματα χρησιμοποιήθηκε ακινητοποιημένο TiO₂ πάνω σε υπόστρωμα τιτανίου.

7.1.6 Εκκινητές - Ιγνηθέτες

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

Primer	Αλληλουχία
gadrt-1	5'–GCG TTG CGT AAA TAT GGT TGC CGA–3'
gadrt-2	5'–CGT CAC AGG CTT CAA TCA TGC GTT–3'
Efs130F	5'–AACCTACCCATCAGAGGG –3'
Efs490R	5'–GACGTTTCAGTTACTAACG –3'

Πίνακας 7.1.6: Εκκινητές για την real-time PCR

Για την *Escherichia coli* έχουμε: (Chen et al, 2006)

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'–GCG TTG CGT AAA TAT GGT TGC CGA–3' (*gadrt-1*)

Αντίστροφος εκκινητής : 5'–CGT CAC AGG CTT CAA TCA TGC GTT–3' (*gadrt-2*)

Για τον *Enterococcus faecalis* έχουμε: (Bartosch et al, 2004)

Εμπρόσθιος εκκινητής: 5'–AACCTACCCATCAGAGGG –3' (*Efs130F*)

Αντίστροφος εκκινητής: 5'–GACGTTTCAGTTACTAACG –3' (*Efs490R*)

7.2 Μεθοδολογία

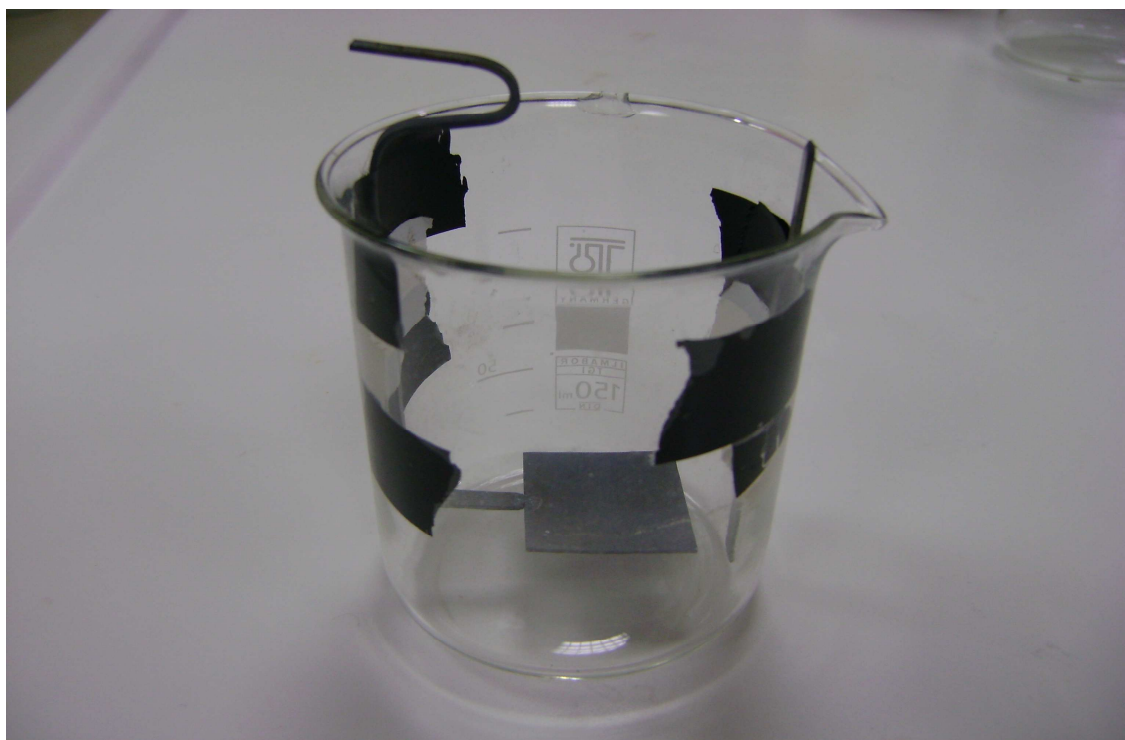
7.2.1 Φωτοκατάλυση

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων φωτοκατάλυσης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φωτός η λάμπα Newport 67005 Solar Simulator system ισχύος 150 watt. Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην εικόνα 7.2.1α με την λάμπα solar, τον αντιδραστήρα εφοδιασμένο με την άνοδο και την κάθοδο³⁰ και τον αναδευτήρα όπου γινόταν η τοποθέτηση του αντιδραστήρα όπου είχε στο εσωτερικό του ένα μαγνητάκι. Έτσι γινόταν η συνεχής ανάδευση του εκάστοτε μείγματος. Ο αντιδραστήρας φαίνεται στην εικόνα 7.2.1β και στην εικόνα 7.2.1γ φαίνεται μια προσομοίωση της πειραματικής διάταξης.



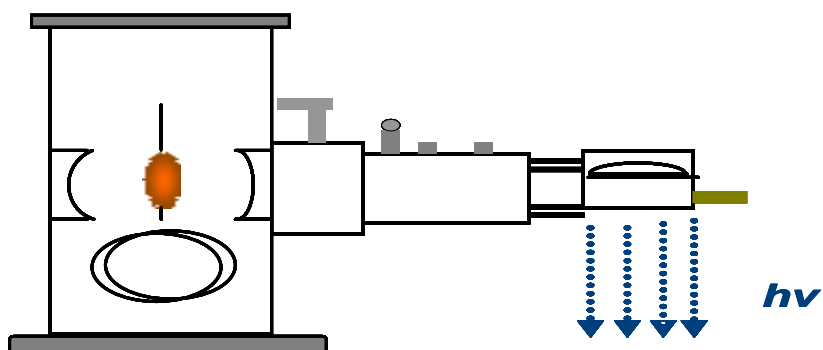
Εικόνα 7.2.1α: Πειραματική Διάταξη

³⁰ Που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν



Εικόνα 7.2.1β: Πειραματικός Αντιδραστήρας

Solar simulator



TiO₂/Ti-film

Zr

**60 mL solution
of BPA**

Magnetic stirring

+

-

Εικόνα 7.2.1γ: Προσομοίωση Πειραματικής Διάταξης

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ανακαλλιέργεια των εκάστοτε βακτηρίων που χρησιμοποιούνταν σε κάθε πείραμα. Για την ανακαλλιέργεια τόσο των *Escherichia coli* όσο και των *Enterococcus faecalis* χρησιμοποιήθηκε Nutrient Agar ως θρεπτικό υλικό, μη επιλεκτικό. Στην συνέχεια αφού τα βακτήρια επωαζόταν για 24 ώρες στους 37°C λαμβανόταν μια ποσότητα βακτηρίων, χρησιμοποιώντας κρίκους εμποτισμού και επιμολυνόταν κάθε φορά το αντίστοιχο υδατικό διάλυμα. Το υδατικό διάλυμα ήταν είτε αποστειρωμένο διάλυμα NaCl 0,8% είτε αποστειρωμένο δείγμα από τον βιολογικό καθαρισμό της ΕΕΛ³¹ Χανίων μετά την διαδικασία της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

Αφού λήφθηκε ποσότητα 60 mL νερού (ή δείγματος βιολογικού καθαρισμού) και τοποθετήθηκε στον αντιδραστήρα, στην συνέχεια εμποτίστηκε με μερικούς κρίκους από το εκάστοτε βακτήριο και μετρήθηκε η απορρόφηση του. Σύμφωνα με την κλίμακα Mcfarland έπρεπε να κυμαίνεται από 0,082-0,092 ώστε η συγκέντρωση των μικροοργανισμών στα 60 mL να είναι της τάξης των 10⁹ cfu's. Πριν τοποθετηθεί ο αντιδραστήρας πάνω στον αναδευτήρα έγινε η προσθήκη 0,2 γραμμάρια Na₂SO₄, έπειτα η λήψη μιας ποσότητας δείγματος πριν ξεκινήσει η διαδικασία της φωτοκατάλυσης και στην συνέχεια η τοποθέτηση του αντιδραστήρα πάνω στον αναδευτήρα και αφότου τέθηκε σε λειτουργία έγινε και ενεργοποίηση της λάμπας ώστε να ξεκινήσει το πείραμα. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 15, 30, 45, 60 και 90 min και γινόταν άμεση τοποθέτηση τους στο ψυγείο.

Μετά το πέρας της λήψης των δειγμάτων γινόταν η συλλογή τους από το ψυγείο και ανάδευση τους με μηχανικό αναδευτήρα τύπου vortex. Έπειτα γινόταν η επίστρωση τους σε τριβλία και πιο συγκεκριμένα 200 μL σε ένα τριβλίο για τα δείγματα 15,30 και 45 min και 200 μL σε 5 τριβλία για τα δείγματα 60 και 90 min.

Στην συνέχεια αφότου τελείωσε η διαδικασία της επίστρωσης τα δείγματα τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο για 24 h ώστε να γίνει έπειτα η καταμέτρηση των αποικιών των μικροοργανισμών.

Ο αριθμός των μικροοργανισμών έπρεπε να αναχθεί σε ποσότητα δείγματος 1 mL. Οπότε στην περίπτωση του ενός τριβλίου γινόταν πολλαπλασιασμός με το 5 του αριθμού των μικροοργανισμών ώστε να γίνει η αναγωγή τους στο 1 mL ενώ στους χρόνους των 60 και 90 min όπου έγινε επίστρωση σε 5 τριβλία έγινε πρόσθεση τους.

³¹ Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων

7.2.2 Φωτοηλεκτροκατάλυση

Στην διαδικασία της φωτοηλεκτροκατάλυσης ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία με την φωτοκατάλυση απλώς χρησιμοποιήθηκε και συσκευή παροχής ρεύματος στην άνοδο και την κάθοδο του αντιδραστήρα. Οι τιμές της τάσης που εφαρμόστηκαν ήταν 2, 4, 5 και 11 Volt. Η εφαρμογή του ρεύματος έγινε ώστε να αποτραπεί η ένωση των ηλεκτρονίων που έχουν φύγει από την στοιβάδα σθένους τους λόγω φωτοβόλησης, με τις οπές που έχουν μείνει ελεύθερες μετά την απομάκρυνση τους, ενισχύοντας την φωτοκαταλυτική οξειδωτική δράση του καταλύτη μας. Η συσκευή παροχής ρεύματος φαίνεται στην εικόνα 7.2.2.



Εικόνα 7.2.2: Στο κάτω μέρος διακρίνεται η συσκευή παροχής ρεύματος και στο επάνω η κεντρική μονάδα λειτουργίας της λάμπας ηλιακής ακτινοβολίας.

8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ

8.1 Επίδραση της Τάσης στην Απόδοση της Φωτοηλεκτροκατάλυσης

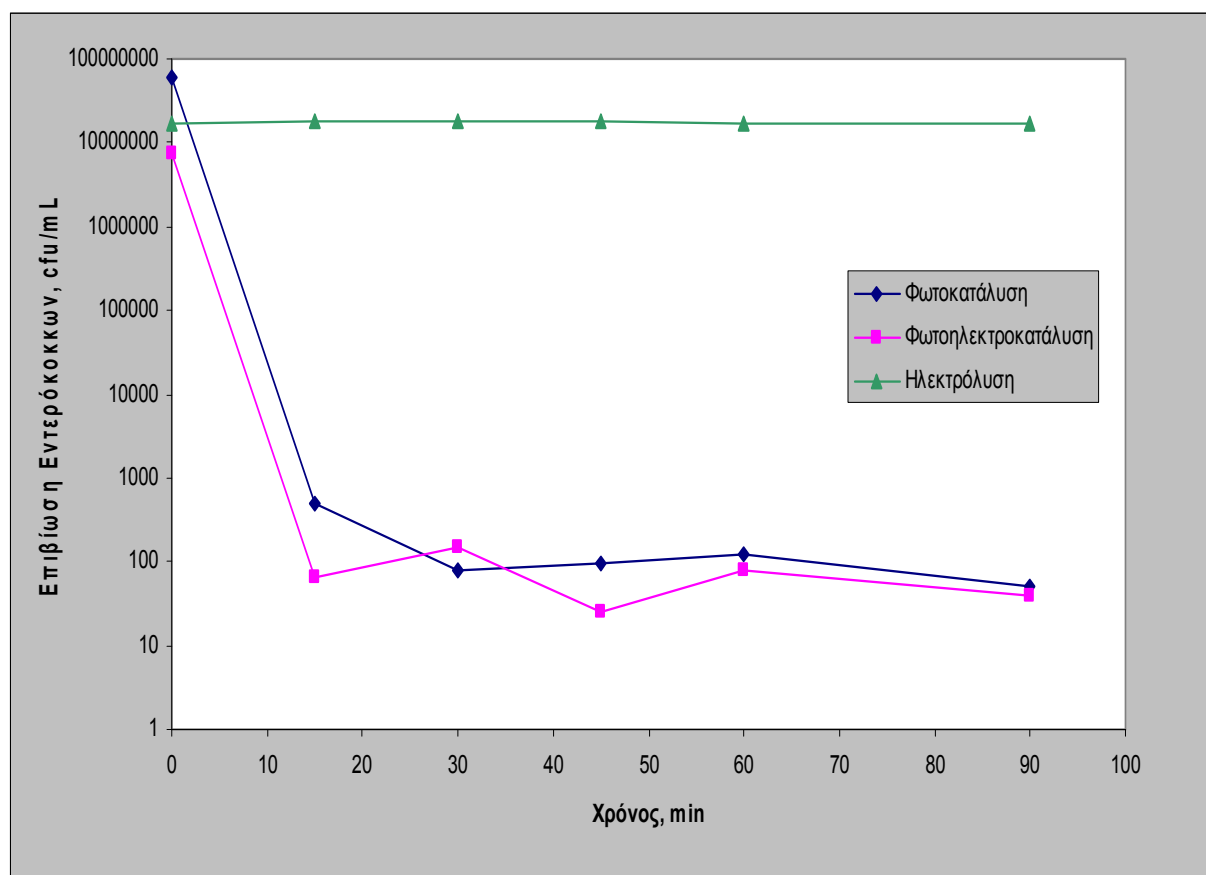
Καταρχάς πραγματοποιήθηκαν πειράματα όπου χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι της φωτοκατάλυσης, της ηλεκτρόλυσης και της φωτοηλεκτροκατάλυσης. Οι διαφορετικές συνθήκες αφορούσαν στην ηλεκτρόλυση και στην φωτοηλεκτροκατάλυση όπου εφαρμόσαμε διαφορετικές τιμές τάσης, ώστε να εκτιμήσουμε την επίδραση της στην απόδοση των απολυμαντικών μας μεθόδων.

Έγινε εμποτισμός των *Enterococcus faecalis* σε αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's σε αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό 60 mL. Κατόπιν έγινε η λήψη δείγματος πριν ξεκινήσει η διαδικασία της απολύμανσης και έπειτα στους χρόνους των 15, 30, 45, 60 και 90 min. Στην συνέχεια, έλαβε χώρα η επίστρωση 200 μ L στα τριβλία και τοποθετησή τους σε επωαστικό θάλαμο για 24 h. Την επόμενη μέρα έγινε η μέτρηση των αποικιών ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό της επιβίωσης των *Enterococcus faecalis* και να ελεγχθεί η ποιότητα της απολύμανσης.

Τέλος πρέπει να αναφερθεί ότι στα παρακάτω διαγράμματα εμφανίζεται η επιβίωση των εκάστοτε μικροοργανισμών που εξετάστηκαν σε λογαριθμική κλίμακα ανά μονάδα χρόνου.

8.1.1 Επίδραση Σταθερής Τάσης 2 Volt

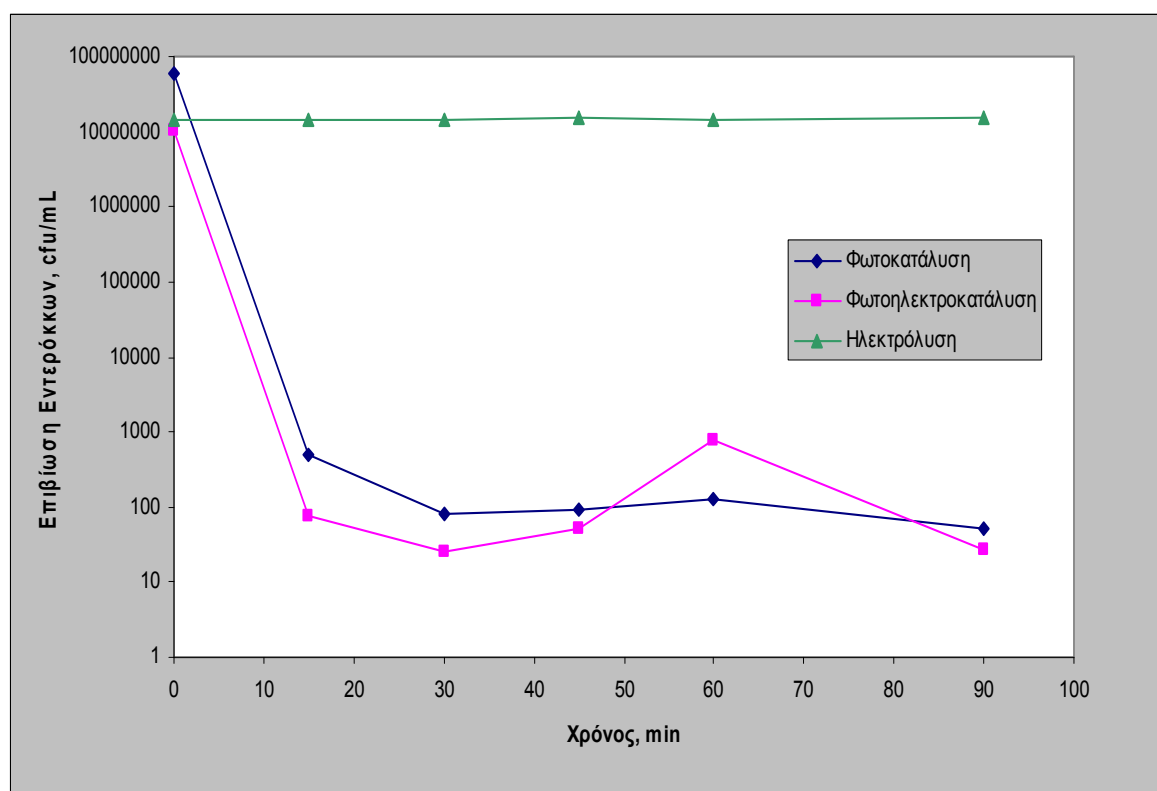
Αρχικά εφαρμόστηκε σταθερή τάση 2 V οπότε το διερχόμενο ρεύμα είχε ένταση 0,5 mA. Παρατηρήθηκε ότι η μέθοδος της ηλεκτρόλυσης όταν εφαρμόστηκε χωρίς την παρουσία φωτός δεν έφερε κανένα αποτέλεσμα στην διαδικασία της απολύμανσης, γεγονός αναμενόμενο λόγω της μικρής τιμής της τάσης που εφαρμόσαμε. Αντιθέτως η φωτοκατάλυση και η φωτοηλεκτροκατάλυση μετά τα 15 min επέφεραν ικανοποιητικά αποτελέσματα αφού επιβίωσε ένα μικρό ποσοστό μόνο των *Enterococcus faecalis*. Παρόλα αυτά όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 8.1.1 δεν επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση στο διάστημα των 90 min που κράτησε η πειραματική διαδικασία.



Διάγραμμα 8.1.1: Επιβίωση των *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας σταθερή τάση 2 Volt και για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε υδατικό διάλυμα 0,8% NaCl.

8.1.2 Επίδραση Σταθερής Τάσης 4 Volt

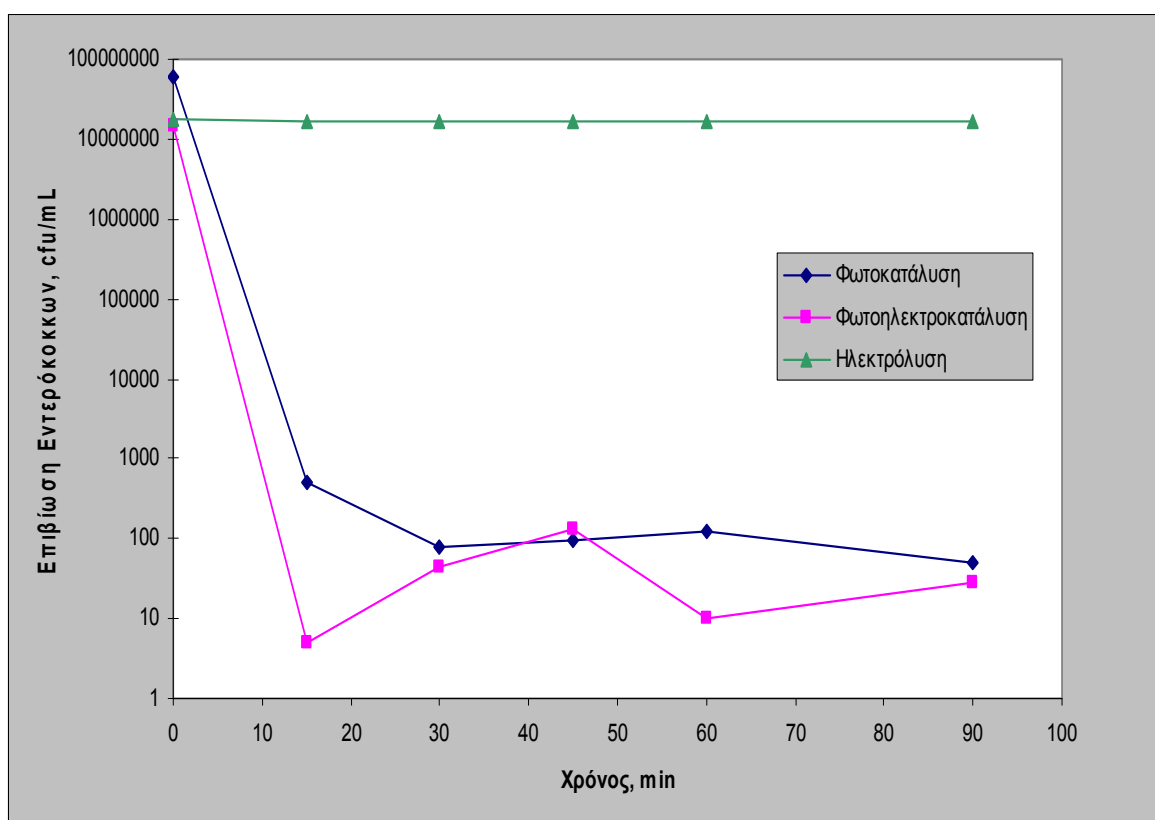
Στην συνέχεια εφαρμόστηκε σταθερή τάση στα 4 Volt και το διερχόμενο ρεύμα είχε ένταση 0,55 mA. Επίσης, η μέθοδος της ηλεκτρόλυσης όταν εφαρμόστηκε χωρίς την παρουσία φωτός δεν έφερε κανένα αποτέλεσμα. Αντιθέτως η φωτοκατάλυση και η φωτοηλεκτροκατάλυση μετά τα 15 min επέφεραν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην διαδικασία απολύμανσης. Στην φωτοηλεκτροκατάλυση παρατηρήθηκε μια αύξηση των *Enterococcus faecalis* μετά το πέρας της 1 ώρας, που πιθανόν να σχετιζόταν με πειραματικό σφάλμα, είτε κατά την διαδικασία της απολύμανσης, είτε κατά την διαδικασία επίστρωσης στο τριβλίο. Τέλος όπως και στην προηγούμενη περίπτωση που εφαρμόσαμε την τάση των 2 Volt δεν επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση στο διάστημα των 90 λεπτών που κράτησε η πειραματική διαδικασία όπως φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα 8.1.2.



Διάγραμμα 8.1.2: Επιβίωση των *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας σταθερή τάση 4 Volt και για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε υδατικό διάλυμα 0,8% NaCl.

8.1.3 Επίδραση Σταθερής Τάσης 5 Volt

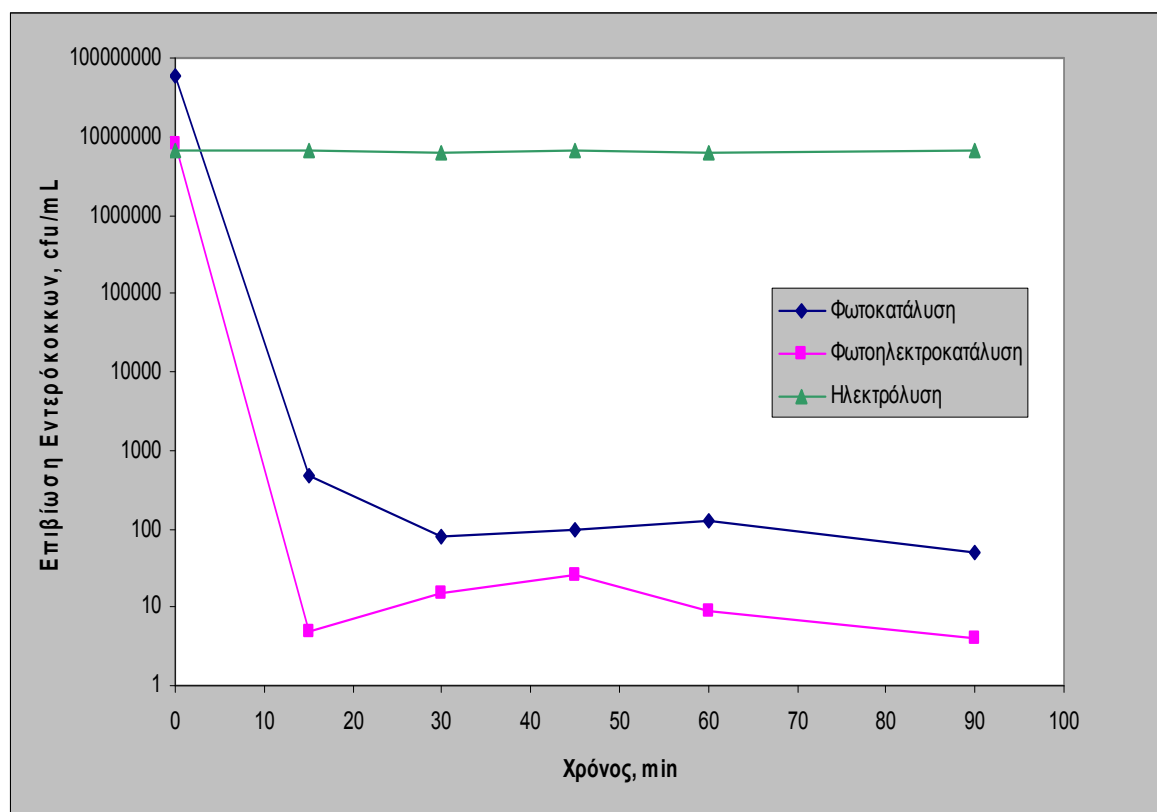
Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων εφαρμόσαμε σταθερή τάση στα 5 V και ένταση ρεύματος στα 0,65 mA. Η μέθοδος της ηλεκτρόλυσης όπως και προηγουμένως δεν επέφερε κανένα αποτέλεσμα στην διαδικασία της απολύμανσης. Η φωτοηλεκτροκατάλυση μετά τα 15 min είχε καλύτερη επίδραση στην απολύμανση σε σύγκριση με την φωτοκατάλυση. Στην φωτοηλεκτροκατάλυση παρατηρήθηκε επίσης ανεπιθύμητη αύξηση των *Enterococcus faecalis* μετά το πέρας της 1 ώρας πιθανόν λόγω πειραματικού σφάλματος. Όπως και στις δυο προηγούμενες περιπτώσεις που εφαρμόσαμε τάσεις της τάξεως των 2 V και 4 V δεν επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση στο διάστημα των 90 min που κράτησε η πειραματική διαδικασία. Τα παραπάνω συμπεράσματα φαίνονται στο διάγραμμα 8.1.3.



Διάγραμμα 8.1.3: Επιβίωση των *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας σταθερή τάση 5 Volt και για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε υδατικό διάλυμα 0,8% NaCl.

8.1.4 Επίδραση Σταθερής Τάσης 10 Volt

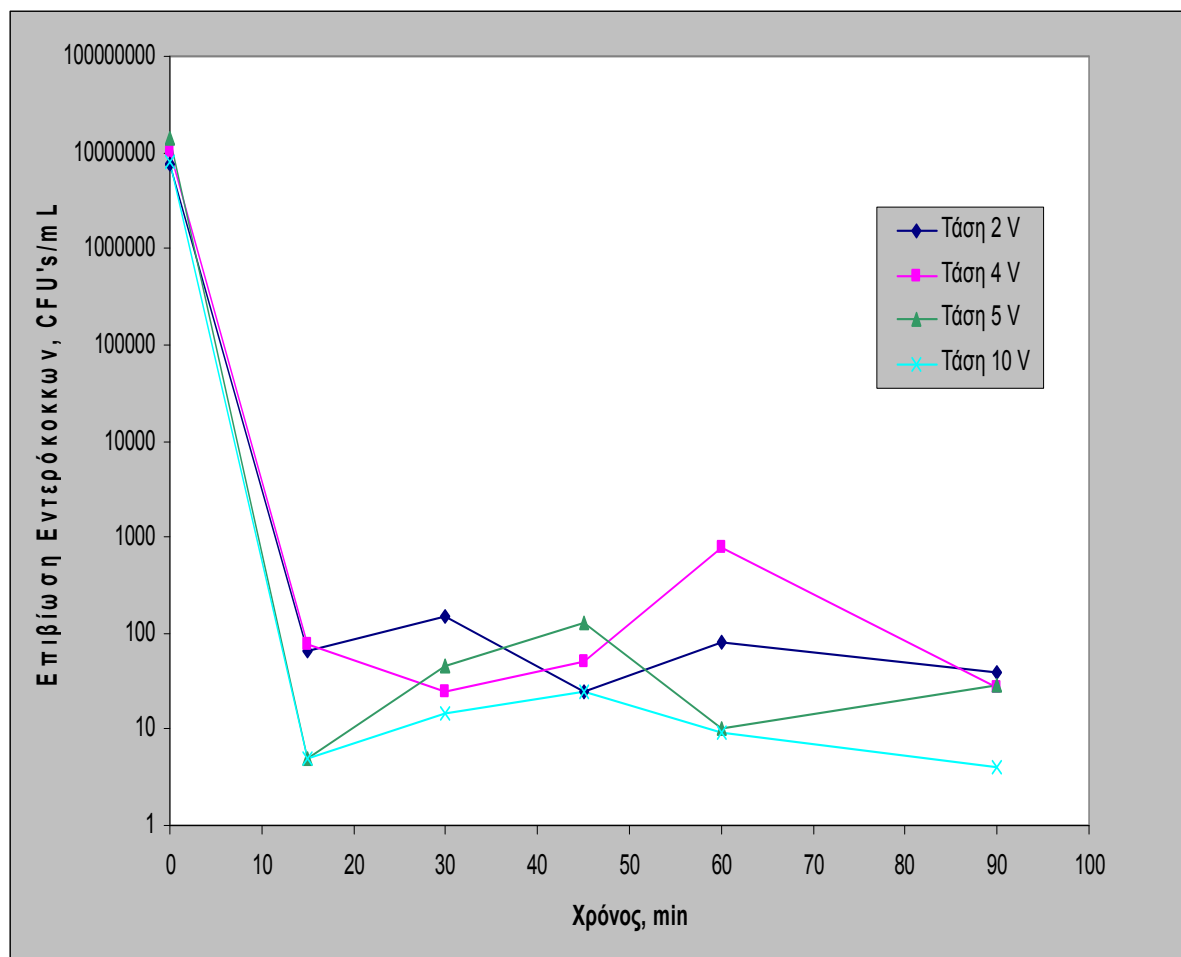
Στην τελευταία σειρά πειραμάτων με σταθερή τάση, εφαρμόσαμε 10 V με ένταση ρεύματος 1 mA. Η μέθοδος της ηλεκτρόλυσης, αν και με αρκετά υψηλότερη τάση σε σύγκριση με τα προηγούμενα πειράματα, επίσης δεν επέφερε κανένα αποτέλεσμα στην διαδικασία της απολύμανσης. Η φωτοηλεκτροκατάλυση μετά τα 15 min είχε καλύτερη επίδραση στην διαδικασία σε σύγκριση με την φωτοκατάλυση και επιτεύχθηκε σχεδόν πλήρης απολύμανση. Τέλος σε καμία από τις μεθόδους δεν επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση στο διάστημα των 90 min που κράτησε η πειραματική διαδικασία. Παρατηρήσαμε ότι και στις 4 διαφορετικές τάσεις που εφαρμόσαμε δεν καταφέρουμε να πετύχουμε ολική θανάτωση των *Enterococcus faecalis*, συμπεραίνοντας ότι θα χρειαζόταν περισσότερος χρόνος μεγαλύτερος των 90 min για την διεξαγωγή των πειραμάτων, ώστε να απολυμανθεί πλήρως το δείγμα μας. Τα συμπεράσματά μας φαίνονται στο διάγραμμα 8.1.4.



Διάγραμμα 8.1.4: Επιβίωση των *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας σταθερή τάση 10 Volt και για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε υδατικό διάλυμα 0,8% NaCl.

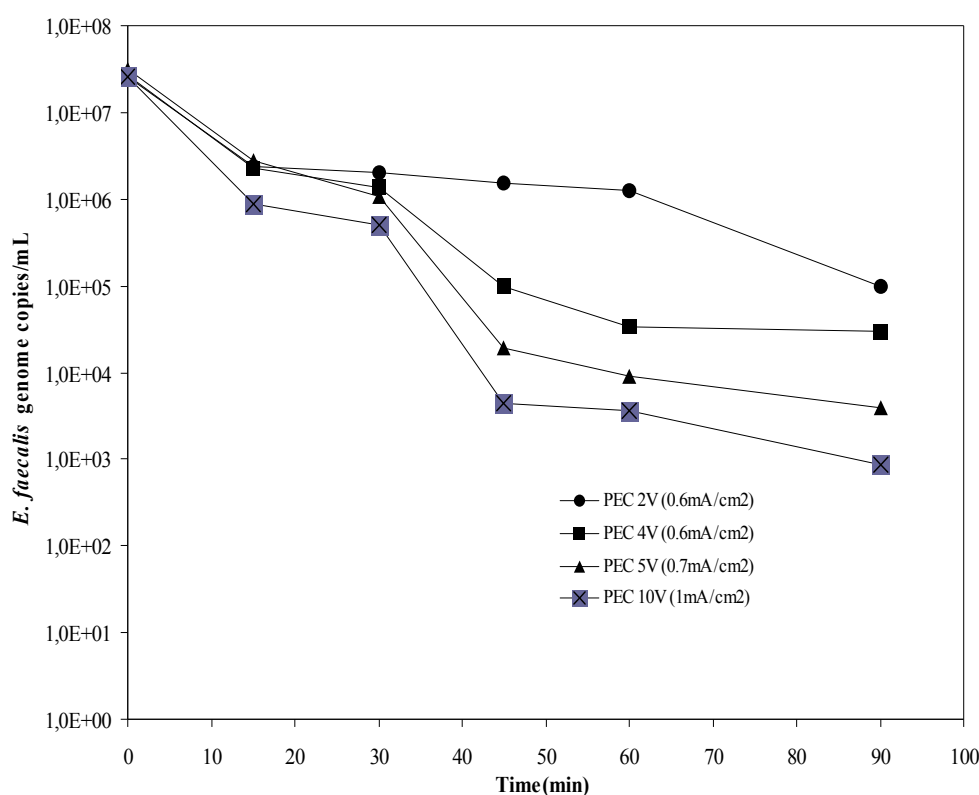
8.1.5 Επίδραση Της Τάσης

Στο παρακάτω διάγραμμα βλέπουμε συγκεντρωτικά την επίδραση των τάσεων 2, 4, 5 και 10 V στην επιβίωση των *Enterococcus faecalis*. Παρατηρούμε ότι η καλύτερη απολύμανση επιτυγχάνεται για τάση 10 V και η χειρότερη για τάση 2 V γεγονός που ήταν αναμενόμενο, όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 8.1.5: Επιβίωση των *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας για τάσεις 2, 4, 5 και 10 V και για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε υδατικό διάλυμα 0,8% NaCl.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR που αφορά στην επίδραση της διαφορετικής τάσης στους μικροοργανισμούς φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 8.1.5β: Αντίγραφα γονιδιώματος *E. Faecalis* σε τιμές τάσεις 2,4,5 και 10 Volt.

Παρατηρούμε συγκρίνοντας τα διαγράμματα των δυο μεθόδων ότι οι διαφορές που υπάρχουν είναι πολύ μικρές. Οι διαφορές αυτές μπορεί να οφείλονται ότι στην καλλιεργητική μέθοδο τα μικροβιακά κύτταρα υπόκεινται σε στρες μετά την εφαρμογή της μεθόδου της φωτοηλεκτροκατάλυσης με αποτέλεσμα να βρίσκονται σε μια κατάσταση όπου ναι μεν είναι βιώσιμα αλλά δεν μπορούν να καλλιεργηθούν περαιτέρω (Viable but non culturable – VBNC). Αυτοί οι μικροοργανισμοί μπορούν να ανιχνευθούν με την μοριακή μέθοδο της Real Time PCR (Venieri et al. 2011). Πάντως βλέπουμε ότι καθώς αυξάνεται η τιμή της εφαρμοζόμενης τάσης πετυχαίνουμε μεγαλύτερο βαθμό απολύμανσης γεγονός που φαίνεται και στο παραπάνω διάγραμμα της PCR. Αυτό οφείλεται κυρίως σε δύο λόγους. Καταρχάς καθώς αυξάνεται η τιμή της τάσης, αυξάνονται και οι ρίζες υδροξυλίου βελτιώνοντας έτσι την απόδοση της απολύμανσης. Επίσης με την αύξηση της τάσης η κυτταρική μεμβράνη των υφίσταται περισσότερες βλάβες και οι μικροοργανισμοί υπόκεινται σε οσμωτικό σοκ και έτσι παίρνουμε καλύτερα αποτελέσματα.

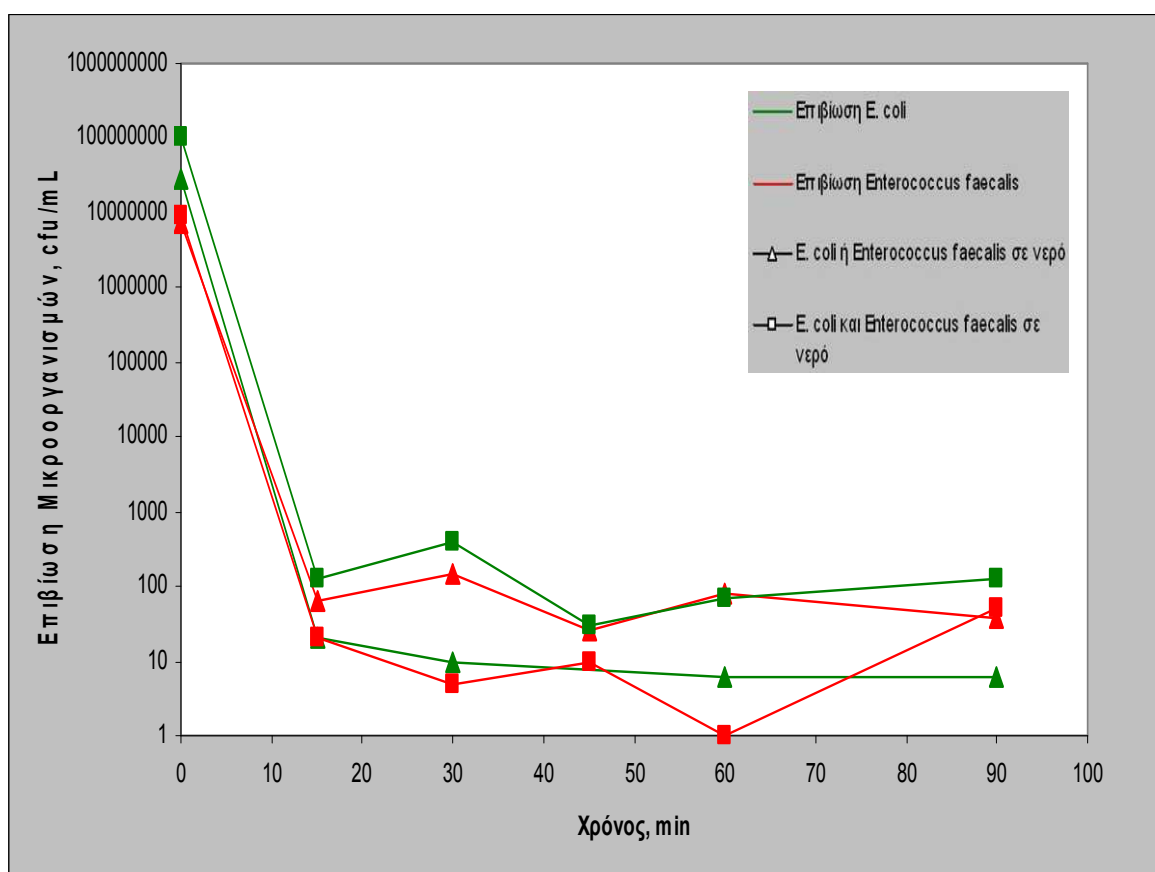
8.2 Επίδραση του Είδους του Μικροοργανισμού στην Απόδοση της Φωτοηλεκτροκατάλυσης

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της φωτοηλεκτροκατάλυσης χρησιμοποιώντας σταθερή τάση 2 Volt και επιμολύνοντας το δείγμα της αρχικά με *E.coli* ή με *Enterococcus faecalis* και στη συνέχεια συνδυαστικά και με τα δυο αυτά είδη μικροοργανισμών.

Έγινε επιμόλυνση με *E.coli* και των *Enterococcus faecalis* σε συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL σε αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό 60 mL. Κατόπιν έγινε και η συνδυαστική επιμόλυνση του. Έπειτα έγινε λήψη του δείγματος πριν ξεκινήσει η διαδικασία της απολύμανσης και στην συνέχεια της χρόνους των 15, 30, 45, 60 και 90 min. Ύστερα έλαβε χώρα η επίστρωση στα τριβλία και τοποθέτηση της σε επωαστικό θάλαμο για 24 h. Την επόμενη μέρα έγινε η μέτρηση των αποικιών ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό της επιβίωσης των *E.coli* και των *Enterococcus faecalis* βγάζοντας έτσι το συμπέρασμα της ποιότητας της απολύμανσης σε διαφορετικά είδη μικροοργανισμών.

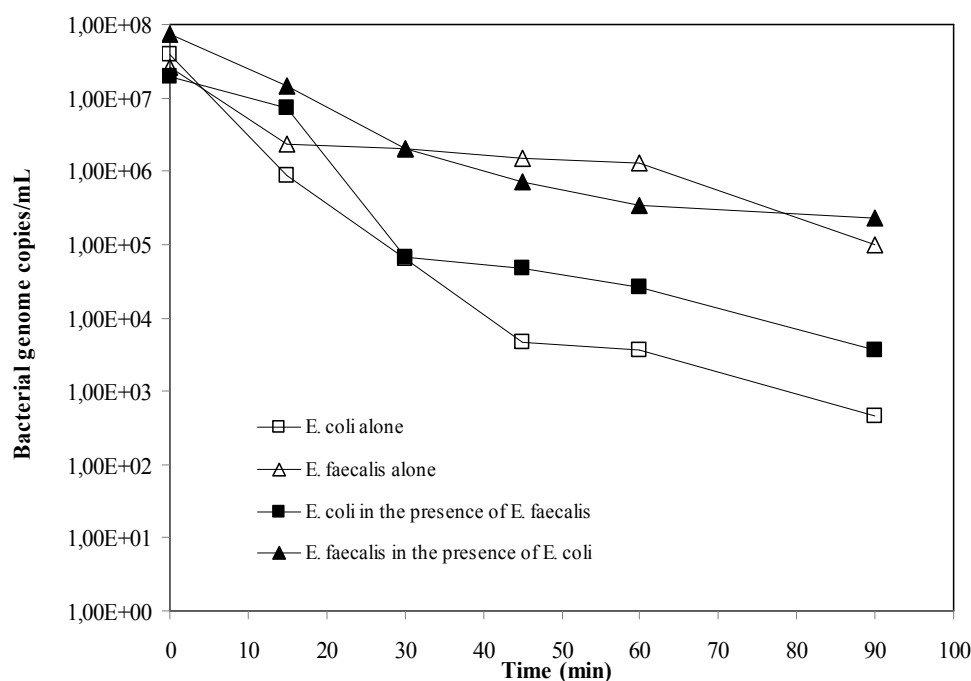
8.2.1 Επίδραση του Είδους Μικροοργανισμού

Εφαρμόστηκε η μέθοδος της φωτοηλεκτροκατάλυσης με σταθερή τάση 2 Volt και για ένταση ρεύματος 0,5 mA. Η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών ήταν 10^7 CFU's/mL. Παρατηρήθηκε ότι είχαμε καλύτερη απολύμανση στα *E.coli* σε σύγκριση με τα *E.coli* συνδυασμένα με *Enterococcus faecalis*. Η απολύμανση στα συνδυασμένα *Enterococcus faecalis* ήταν στα ίδια επίπεδα με την απολύμανση των *E.coli* σε σύγκριση με των *Enterococcus faecalis*. Όπως φαίνεται και στο παρακάτω διάγραμμα δεν επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση στο διάστημα των 90 min που κράτησε η πειραματική διαδικασία.



Διάγραμμα 8.2.1: Επιβίωση των *E.coli* και *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας τάση 2 V για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε υδατικό διάλυμα 0,8% NaCl.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR που αφορούν στην επίδραση του είδους του μικροοργανισμού φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 8.2.1α Αντίγραφα γονιδιώματος *E. Faecalis* και *E.coli* για συγκέντρωση μικροοργανισμών 10^7 CFU's/mL σε αποστειρωμένο νερό.

Παρατηρώντας το παραπάνω διάγραμμα βλέπουμε ότι τα αποτελέσματα που μας δίνει η αντίδραση της PCR παρουσιάζουν διαφοροποιήσεις σε σχέση με αυτά της καλλιεργητικής μεθόδου. Αυτό οφείλεται στο ότι η φωτοηλεκτροκάταλυση δημιουργεί συνθήκες στρες στους μικροοργανισμούς επιφέροντας τους σε μια κατάσταση όπου είναι βιώσιμοι αλλά μη καλλιεργήσιμοι (VBNC) καθιστώντας την καλλιεργητική μέθοδο μη επαρκή για την εκτίμηση της αδρανοποίησης των βακτηρίων. Επίσης παρατηρούμε ότι η αδρανοποίηση της *E.coli* είναι πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με του *Enterococcus faecalis* λόγω του ότι το κύτταρό του περιβάλλεται από ένα "παχύ" στρώμα πεπτιδογλυκάνης σε αντίθεση με τα Gram αρνητικά βακτήρια και τα *E. coli*, το οποίο του προσδίδει ανθεκτικότητα στις περιβαλλοντικές συνθήκες και στις απολυμαντικές μεθόδους. της ανθεκτικότερης κυτταρικής μεμβράνης του.

Πρέπει να σημειωθεί ότι παρουσία και των δύο η απολύμανση είναι πιο αργή επειδή οι πυκνότητες των βακτηρίων είναι πιο μεγάλες συγκρινόμενες με την περίπτωση που είναι μόνα τους τα βακτήρια στο δείγμα και ότι σε δείγματα που περιέχουν πολλούς πληθυσμούς βακτηρίων η απολύμανση γίνεται πιο αργή, δηλαδή είναι σαν να υπάρχει ένα είδος προστασίας έναντι των συνθηκών απολύμανσης.

Τέλος αυτό που είναι σημαντικό, από την άποψη της δημόσιας υγείας, είναι ότι σύμφωνα με την PCR, ακόμα και μετά από 60 λεπτά απολύμανσης, τα αντίγραφα του γονιδιώματος εξακολουθούν να υπάρχουν στο μείγμα της αντίδρασης, αυξάνοντας έτσι ορισμένες ανησυχίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της φωτοηλεκτροκατάλυσης ως μεθόδου απολύμανσης.

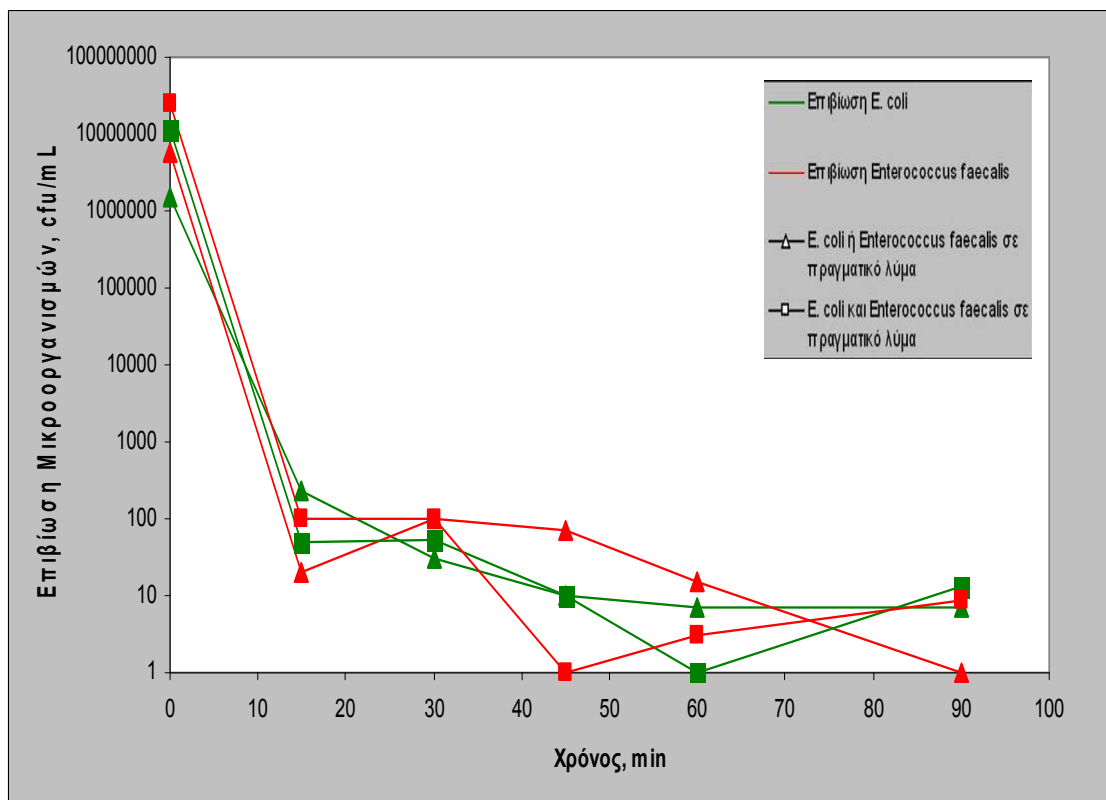
8.3 Απολυμαντική Ικανότητα Φωτοηλεκτροκατάλυσης σε Πραγματικό Λύμα Εξαρτώμενη από το Είδος του Μικροοργανισμού

Στην επόμενη σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε την μέθοδο της φωτοηλεκτροκατάλυσης χρησιμοποιώντας σταθερή τάση 5 Volt και επιμολύνοντας το δείγμα μας με *E.coli*, *Enterococcus faecalis* και συνδυαστικά τα δυο αυτά είδη μικροοργανισμών.

Έγινε καλλιέργεια των *E.coli* και των *Enterococcus faecalis* χωριστά και συνδυαστικά με συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL και 10^5 CFU's/mL σε πραγματικό λύμα, που λήφθηκε από την Ε.Ε.Λ. Χανίων μετά το στάδιο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Ο όγκος αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε ήταν 60 mL. Έπειτα έγινε λήψη του δείγματος πριν ξεκινήσει η διαδικασία της απολύμανσης και στην συνέχεια στους χρόνους των 15, 30, 45, 60 και 90 min. Ύστερα έλαβε χώρα η επίστρωση στα τριβλία και τοποθέτηση τους σε επωαστικό θάλαμο για 24 h. Την επόμενη μέρα έγινε η μέτρηση των αποικιών ώστε να υπολογιστεί το ποσοστό της επιβίωσης των *E.coli* και των *Enterococcus faecalis* ελέγχοντας έτσι την ποιότητα της απολύμανσης παρουσία διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών.

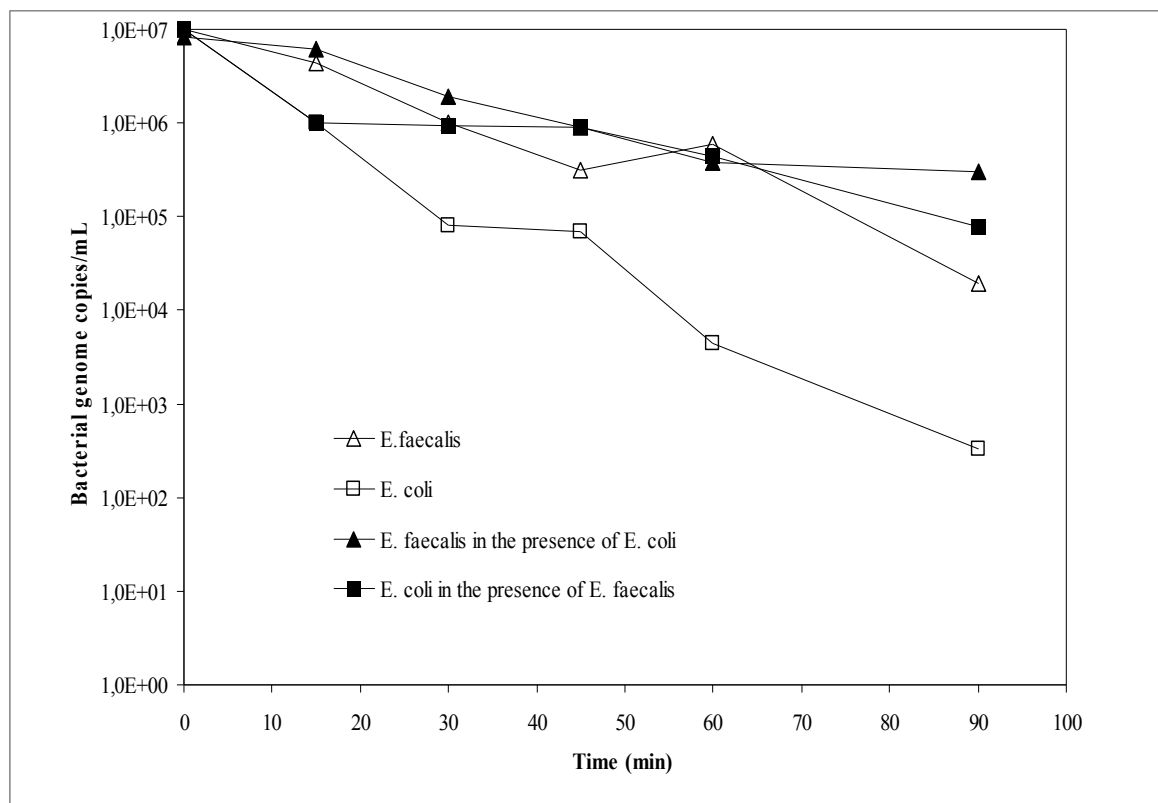
8.3.1 Σταθερή Τάση 5 Volt για Συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL *E. coli* και *Enterococcus faecalis*

Εφαρμόστηκε η μέθοδος της φωτοηλεκτροκατάλυσης με την χρήση σταθερής τάσης της τάξεως των 5 Volt και έντασης ρεύματος 0,7 mA. Η συγκέντρωση των μικροοργανισμών ήταν 10^7 CFU's/mL. Παρατηρήθηκε ότι η ποιότητα της απολύμανσης στα 15 και στα 30 min ήταν σχεδόν η ίδια και για τα 2 είδη μικροοργανισμών αλλά και για το συνδυαστικό όπου μετρηθήκαν τα *E.coli*. Στην συνέχεια στα 60 min μηδενίστηκαν τα *E.coli* που είχαμε στο συνδυαστικό με τους *Enterococcus faecalis* αν και πιθανόν να οφείλontan σε πειραματικό σφάλμα γιατί στα 90 min όπου ολοκληρώθηκε και η πειραματική διαδικασία υπήρχε μια μικρή ποσότητα *E.coli*. Επίσης οι *Enterococcus Faecalis* στο συνδυαστικό με τα *E.coli* μηδενίστηκαν μετά το πέρας των 45 λεπτών αλλά και πάλι λόγω πειραματικού σφάλματος είχαμε μια μικρή ποσότητα στο τέλος του πειράματος. Τέλος μόνο στην περίπτωση των *Enterococcus faecalis* επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση στο διάστημα των 90 min. Τα συμπεράσματα μας φαίνονται στο διάγραμμα 8.3.1.



Διάγραμμα 8.3.1: Επιβίωση των *E.coli* και *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας τάση 5 V για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε πραγματικό λύμα.

Τα αποτελέσματα της μεθόδου Real Time PCR που αφορούν στην επίδραση του είδους του μικροοργανισμού σε συνθήκες πραγματικού λύματος φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.



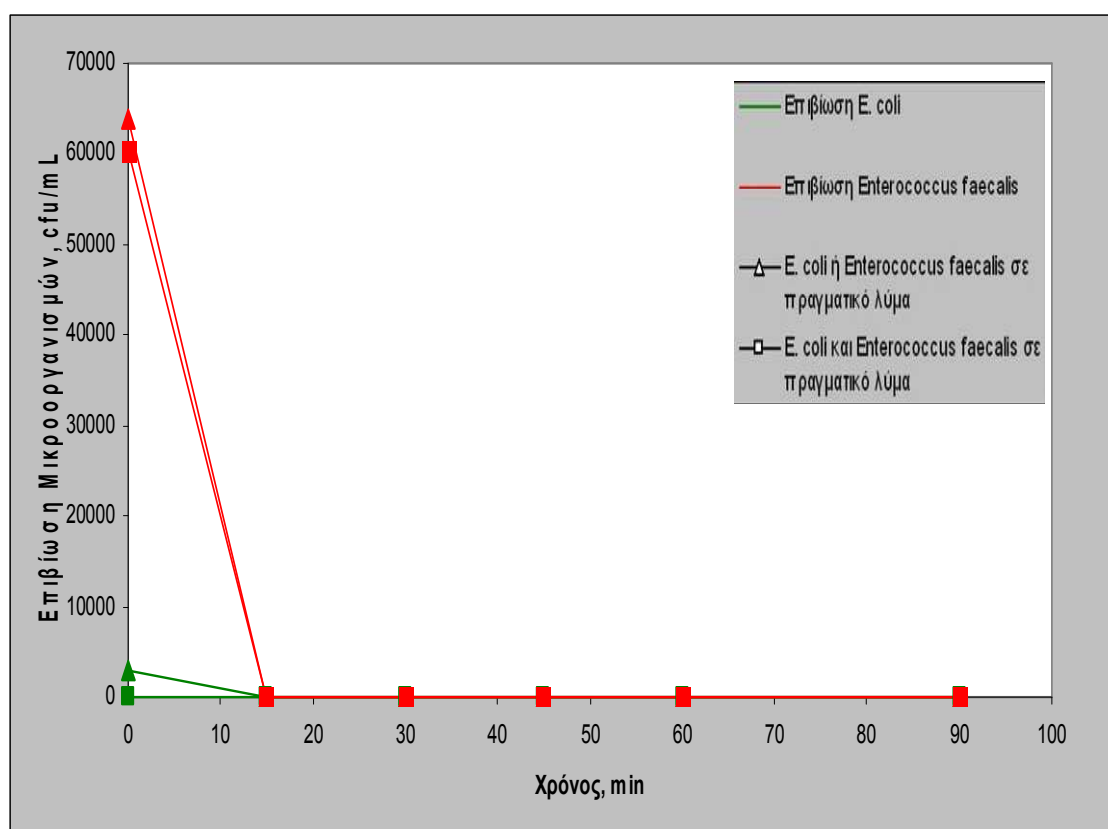
Διάγραμμα 8.3.1α Αντίγραφα γονιδιώματος *E. Faecalis* και *E.coli* για συγκέντρωση μικροοργανισμών 10^7 CFU's/mL σε πραγματικό λύμα.

Το συμπέρασμα που μπορούμε να βγάλουμε από τα παραπάνω διαγράμματα είναι ότι υπάρχει συμφωνία μεταξύ των διαγραμμάτων της καλλιεργητικής μεθόδου και της μοριακής Real Time PCR. Στην καλλιεργητική μέθοδο δεν είναι τόσο ξεκάθαρη η εικόνα πιθανότατα λόγω πειραματικών σφαλμάτων. Παρατηρούμε λοιπόν ότι η καλύτερη απολύμανση συμβαίνει όταν μελετάμε τα *E.coli* ή τους *Enterococcus faecalis* χωριστά σε σύγκριση με τα συνδιαστικά πειράματα. Επίσης βγάζουμε το συμπέρασμα ότι τα *E.coli* είναι λιγότερο ανθεκτικά σε σχέση με τους *Enterococcus faecalis* πράγμα αναμενόμενο λόγω του ότι τα μεν είναι βακτήρια Gram – με μια πιο απλή κυτταρική μεμβράνη σε σχέση με τους *Enterococcus faecalis* που είναι Gram + με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερος χρόνος για την αδρανοποίηση τους και την καταστροφή της μεμβράνης τους.

Στην περίπτωση που υπάρχουν συνθήκες που πλησιάζουν περισσότερο στο περιβάλλον του πραγματικού αποβλήτου δηλαδή τα *E.coli* και οι *Enterococcus faecalis* συνδυασμένα μεταξύ τους τα αποτελέσματα δεν είναι τόσο ικανοποιητικά. Αυτό οφείλεται στο γεγονός του ότι οι μικροβιακοί πληθυσμοί σχηματίζουν συσσωματώματα μεταξύ τους με αποτέλεσμα οι εξωτερικοί να καταστρέφονται στο διάστημα αυτό της απολύμανσης αλλά οι εσωτερικοί να επιβιώνουν, με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερος χρόνος για καλύτερα αποτελέσματα.

8.3.2 Σταθερή Τάση 5 Volt για Συγκέντρωση 10^5 CFU's/mL *E. coli* και *Enterococcus faecalis*

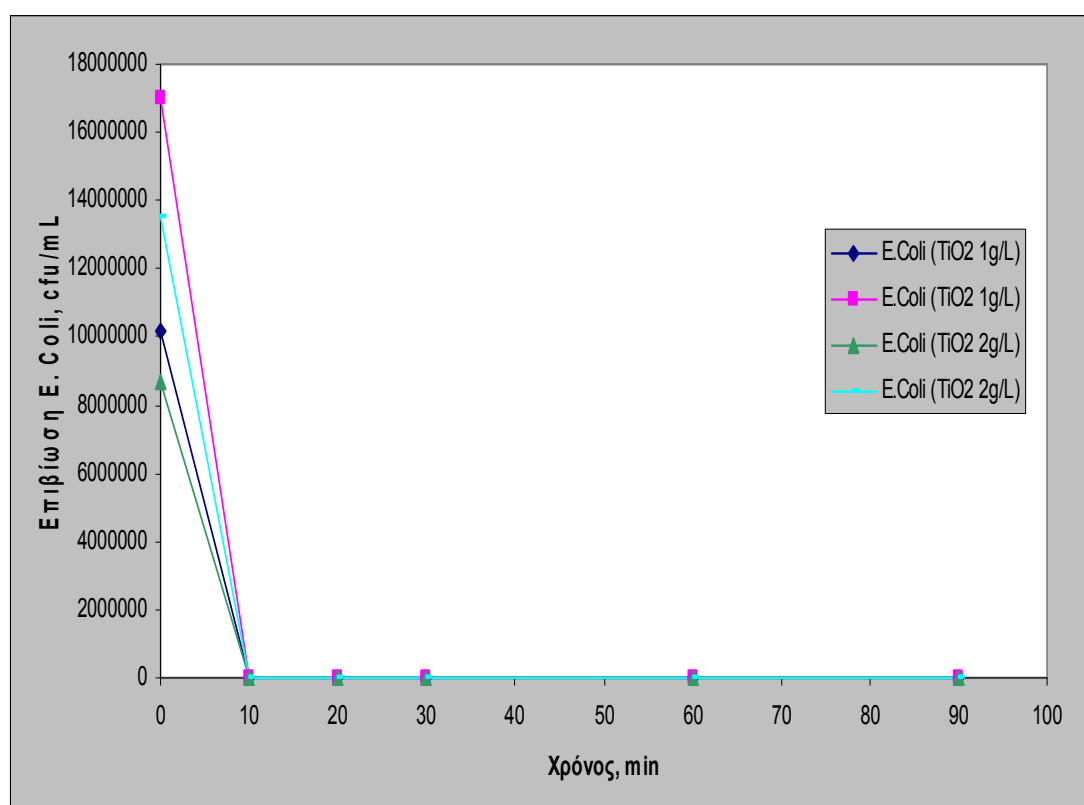
Στην συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος της φωτοηλεκτροκατάλυσης με την χρήση σταθερής τάσης της τάξεως των 5 Volt και για συγκέντρωση των μικροοργανισμών 10^5 CFU's/mL και ένταση ρεύματος 0,7 mA. Μελετήθηκε η συγκέντρωση 10^5 CFU's/mL των μικροοργανισμών καθώς έχει παρατηρηθεί ότι σε αυτές τις συγκεντρώσεις απαντώνται συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί στα λύματα που έχουν υποστεί δευτεροβάθμια επεξεργασία (Chatzisyneon et al, 2010). Παρατηρήθηκε ότι η ποιότητα της απολύμανσης μετά την διάρκεια των 15 λεπτών ήταν 100% και για τις 3 μετρήσεις που κάναμε και αυτό είχε να κάνει με την πολύ μικρή ποσότητα μικροοργανισμών που εμποτίσαμε στο δείγμα μας.



Διάγραμμα 8.3.2: Επιβίωση των *E.coli* και *Enterococcus faecalis* εφαρμόζοντας τάση 5 V για αρχική συγκέντρωση 10^5 CFU's/mL. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο σε πραγματικό λύμα.

8.4 Επίδραση της Συγκέντρωσης του Καταλύτη στην Απόδοση της Φωτοκατάλυσης

Στην τελευταία σειρά πειραμάτων εφαρμόστηκε η μέθοδος της φωτοκατάλυσης με την χρήση λάμπας ηλιακής ακτινοβολίας. Παρατηρήθηκε ότι η ποιότητα της απολύμανσης μετά την διάρκεια των 10 min ήταν 100% και για τις 4 μετρήσεις χρησιμοποιώντας διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις *E.coli* και διαφορετική ποσότητα καταλύτη TiO_2 . Πιο συγκεκριμένα στα δύο από τα 4 πειράματα χρησιμοποιήσαμε 1 g/L καταλύτη και στα τελευταία 2 g/L χωρίς να παρουσιαστεί κάποια διαφορά αφού σε όλες τις περιπτώσεις επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση. Οπότε η βέλτιστη λύση θεωρείται το 1 g/L αφού υπάρχει μια επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων που εξάχθηκαν για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις του καταλύτη. Τα παραπάνω συμπεράσματα φαίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα 8.4.



Διάγραμμα 8.4: Επιβίωση των *E.coli* χρησιμοποιώντας συγκεντρώσεις καταλύτη 1g/L και 2g/L.. Ποσοτικοποίηση μικροοργανισμών με καλλιεργητική μέθοδο νερό.

9 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η φωτοηλεκτροκαταλυτική απόδοση της απολύμανσης, μετρώντας το ποσοστό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών *E.coli* και *Enterococcus faecalis* σε συνάρτηση με διάφορες παραμέτρους λειτουργίας. Αυτές οι παράμετροι ήταν η συγκέντρωση του καταλύτη TiO_2 , η ένταση του ρεύματος, η εφαρμοζόμενη τάση, το είδος και η συγκέντρωση των μικροοργανισμών και ο χρόνος απολύμανσης.

Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκε τόσο με την κλασσική μικροβιολογική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όσο και με την μέθοδο μοριακής βιολογίας real-time PCR. Επιπλέον, μελετήθηκαν οι μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών που τους καθιστά πιο ανθεκτικούς στις διαδικασίες τις απολύμανσης που χρησιμοποιούμε. Πιο αναλυτικά θα μπορούσαμε να πούμε τα εξής:

1. Στην διαδικασία διεξαγωγής των πειραμάτων με χρήση φωτοηλεκτροκατάλυσης παρατηρήθηκε ότι για συγκεντρώσεις μικροοργανισμών της τάξης των 10^7 CFU's/mL χρειαζόταν περισσότερος χρόνος πέραν των 90 min για να επιτευχθούν καλύτερα αποτελέσματα απολύμανσης.
2. Η βέλτιστη ποσότητα καταλύτη που χρειάστηκε για τα πειράματα που χρησιμοποιήσαμε σε μορφή σκόνης το TiO_2 ήταν 1 g/L αφού επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση μετά από 10 min.
3. Παρατηρήθηκε ότι οι *Enterococcus faecalis* ήταν πιο ανθεκτικοί σε σύγκριση με τα *E.coli* στις μεθόδους που χρησιμοποιήσαμε λόγω του ανθεκτικότερου κυτταρικού τους τοιχώματος.
4. Πιθανόν τα πειραματικά σφάλματα να επηρέασαν τις πειραματικές μας μετρήσεις ώστε να εξηγήσουμε τις ανωμαλίες που προέκυψαν στην μέτρηση των αποικιών στα τριβλία.

5. Η ηλεκτροκατάλυση συνεισφέρει ελάχιστα στην απόδοση της διεργασίας της φωτοηλεκτροκατάλυσης.
6. Αυξάνοντας την εφαρμοζόμενη τάση στο διάλυμα, η απόδοση της διεργασίας αυξάνει λόγω της παραγωγής περισσότερων ριζών υδροξυλίου.
7. Σε όλα τα πειράματα που διεξάχθηκαν μετά την έλευση των 15 λεπτών παρατηρήθηκε μεγάλη μείωση της επιβίωσης των μικροοργανισμών.
8. Η παρουσία άλλων μικροοργανισμών επηρεάζει αρνητικά την απόδοση της φωτοηλεκτροκαταλυτικής επεξεργασίας λόγω της δημιουργίας συσσωματωμάτων μεταξύ τους.
9. Τα αποτελέσματα της καλλιεργητικής μεθόδου συμφωνούσαν σε μεγάλο βαθμό με εκείνα της μοριακής μεθόδου Real Time PCR. Οι μικρές διαφορές που υπάρχουν στις δύο μεθόδους οφείλονται στο στρες που δέχονται οι μικροοργανισμοί με την μέθοδο της φωτοηλεκτροκατάλυσης καθιστώντας τους ζωντανούς αλλά μη καλλιεργήσιμους πράγμα που δεν φαίνεται με την καλλιεργητική μέθοδο παρά μόνο με την μοριακή της PCR.
10. Στα πειράματα που χρησιμοποιήσαμε ξεχωριστά τα *E.coli* ή τους *Enterococcus faecalis* είχαμε καλύτερα αποτελέσματα απολύμανσης σε σύγκριση με τα συνδυαστικά τους.
11. Η διεργασία της φωτοηλεκτροκατάλυσης είναι ανώτερη της φωτοκατάλυσης και της ηλεκτρόλυσης.
12. Η αρχική συγκέντρωση των εκάστοτε μικροοργανισμών επηρεάζει άμεσα τον χρόνο απολύμανσης.

10 ΠΗΓΕΣ - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

10.1 Ελληνική

1. **Ανδρεαδάκης, Α. Μαμάης, Δ. Γαβαλάκη, Ε.** (2005). *‘‘Διαχείριση Υγρών Αποβλήτων με Αποκεντρωμένα Συστήματα Επεξεργασίας’’,* Καρδίτσα.
2. **Βαρζάκας, Χ. Θ., Αρβανιτογιάννης Ι.** (2000). *‘‘Γενετικά Τροποποιημένα Τρόφιμα’’,* Εκδόσεις Εμβryo, Αθήνα.
3. **Βερβερίδης, Φ.** (2003). *‘‘Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών’’,* Ηράκλειο Κρήτης.
4. **Βενιέρη, Δ.** (2005). *‘‘Προσδιορισμός της ανθρώπινης ή μη προέλευσης του κολοβακτηριδίου που απομονώνεται από το υδάτινο περιβάλλον με καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές’’,* Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.
5. **Δρούμπαλη, Α.** (2010). *‘‘Έλεγχος Απολύμανσης Νερού και Υγρών Αποβλήτων με Χρήση UV-A και UV-C Ακτινοβολίας’’,* Διπλωματική Εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης.
6. **Δρόσου, Α.** (2007). *‘‘Φωτοκαταλυτική Απολύμανση Νερού παρουσία Διοξειδίου του Τιτανίου και Υπεροξικού Οξέος’’,* Διπλωματική Εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης.
7. **Λαζανάκη, Β.** (2010). *‘‘Η χρήση της Real Time PCR για την Ανίχνευση Γενετικά Τροποποιημένων Στελεχών Βακτηρίου(Escherichia Coli)’’,* Διπλωματική Εργασία, Ηράκλειο Κρήτης.
8. **Μαντζαβίνος, Δ.** (2003). *‘‘Επεξεργασία Υγρών Αποβλήτων’’,* Σημειώσεις Πανεπιστημιακών Παραδόσεων, Πολυτεχνείο Κρήτης.
9. **Μάρακας, Χ.** (2006). *‘‘Απολύμανση επεξεργασμένων αστικών λυμάτων με χρήση εξελιγμένων διεργασιών οξειδωσης και χλωρίωσης με συνδυασμό και σύγκριση των μεθόδων’’,* Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης.
10. **Μήτρακας, Μ.** (2001). *‘‘Ποιοτικά χαρακτηριστικά και επεξεργασία νερού’’,* Εκδόσεις Τζιόλα.
11. **Νταρακάς, Ε.** (2009). *‘‘Βασικές Παράμετροι ελέγχου ποιότητας νερού και λυμάτων’’,* Θεσσαλονίκη.
12. **Ρήγα, Δ.** (2006). *‘‘Τεχνικές φωτοκαταλυτικής απολύμανσης νερού και δευτεροβάθμια επεξεργασμένων αποβλήτων’’,* Διπλωματική Εργασία, ΤΕΙ Κρήτης
13. **Πούλιος, Ι.** (2007). *‘‘Φωτοηλεκτροχημεία των Ημιαγωγών – Βασικές αρχές και εφαρμογές’’,* Θεσσαλονίκη.

14. **Παλαιολόγου, Α.** (2008). *‘Έφαρμογές των εξελεγμένων διεργασιών οξείδωσης στην απολύμανση του νερού’*, Διπλωματική Εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης.
15. **Συμεωνίδου, Ι., Ε.** (2010), *‘Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των ρυθμιστών του κυτταρικού κύκλου CdtI και Geminin σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς’*, Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών.
16. **Τσίμας, Μ.** (2007). *‘Ταυτόχρονη Επεξεργασία As (III) και Χουμικών Οξέων με χρήση Ετερογενούς φωτοκατάλυσης’*, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης.

10.2 Ξένη

1. **Bartosch, S., Fite, A., Macfarlane, GT, McMurdo, Met,** (2004) *“Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota”*, Enviromental Microbiology.
2. **Berg, J., Tymoczko, J. and Stryer L.,** (2002). *“Biochemistry, 5th edition”*. W.H. Freeman and Company, New York.
3. **Bustin, S., A.,** (2000). *“Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays”*, J Mol Endocrinol 25.
4. **Chatzisyμεon, E., Droumpali, A., Mantzavinos, D., Venieri, D.,** (2010). *“Disinfection of water and wastewater by UV-A and UV-C irradiation: application of real-time PCR method”*, Photochemical & Photobiological Sciences.
5. **Chen, Y., Higgins, M., Maas, N., Murthy, S.,** (2006) *“Dna extraction and Escherichia coli quantification of anaerobically digested biosolids using the competitive touchdown PCR method”*, Water Res.
6. **Gachon, C., Mingam, A. and Chaerrier, B.,** (2004). *“Real Time PCR: what relevance to plant studies ? ”*, Journal of Experimental Botany.
7. **Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., and Mathieu, C.** (2001). *“An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression”*, Methods 25.
8. **Houghton, S. and Cockerill, F.,** (2006). *“RealTime PCR: Overview and applications”*, Surgery.
9. **Hunt, M.,** (2006). *“Real Time PCR Tutorial”*, University of South Carolina.
10. **Livak, K., J., and Schmittgen, T., D.,** (2001). *“Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDC T Method”*, Elsevier, Methods, USA.
11. **Mills, A.** (1997). *“An overview of semiconductor photocatalysis, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry”*
12. **Metcalf & Eddy** (2002). *“Μηχανική Υγρών Αποβλήτων, Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση”* Εκδόσεις Τζιόλα.
13. **Parsons, S.** (editor), **Mills, A. and Lee, S.** (writers), (2004). *“Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment”*, IWA Publishing.

14. **Pfaffl, M.,W.,** (2002). *“Chapter 3: A-Z of quantitative PCR”*, Εκδόσεις S.A. Bustin, International University Line, La jolla, CA.
15. **Rincon, A.-G., Pulgarin C.,** (2005). *“Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO₂ photo-assisted treatment of mixed E. coli and Bacillus sp. and bacterial community present in wastewater”*, Science Direct, Catalysis Today.
16. **Stratagene,** (2006). *“Introduction to Quantitative PCR”*, Stratagene, La Jolla, CA.
17. **Venieri, D., Chatzisyneon, E., Gonzalo, M., Rosal, R., Mantzavinos, D.** (2011). *“Inactivation Of Enterococcus faecalis by TiO₂-mediated UV and solar irradiation in water and wastewater: culture techniques never say the whole truth”*, Photochem Photobiol.
18. **Wong, M., L. and Medrano, J., F.,** (2005). *“Real Time PCR for m-RNA quantitation”*, Biotechniques.

11 ΣΕΛΙΔΕΣ ΣΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

1. http://library.tee.gr/digital/m2093/m2093_andreadakis.pdf
2. http://library.tee.gr/digital/m2077/m2077_georgiou.pdf
3. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337310003401>
4. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=stryer&part=A3769>
5. <http://pathmicro.med.sc.edu/pcr/realtime-home.htm>
6. http://www.biotechniques.com/multimedia/archive/00011/BTN_A_05391R_V01_O_11901a.pdf