



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΔΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Απολύμανση νερού με τη χρήση φωτοκατάλυσης:
Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* και
επίδραση στο γενετικό υλικό της.**



Εκπόνηση: Αντωνία Φραγγεδάκη

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δανάη Βενιέρη

Νοέμβριος 2014

Στους γονείς και στον αδερφό μου

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Περιβαλλοντική και Υγειονομική Μηχανική» του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Οικολογίας και Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και στο Εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών και Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Βενιέρη Δανάη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και την άριστη και δημιουργική συνεργασία καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επιπλέον, ευχαριστώ πολύ την κ. Γουνάκη Ιωσηφίνα για την άριστη καθημερινή συνύπαρξη στον εργαστηριακό χώρο και την καθοδήγηση που πρόθυμα προσέφερε όποτε χρειαζόταν, όπως και τον κ. Μπίνα Βασίλειο για την παροχή των απαραίτητων για την εργασία καταλυτών αλλά και την παρατήρηση και φωτογράφιση των μικροοργανισμών σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

Ευχαριστίες οφείλω επίσης, στα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο και κ. Διαμαντόπουλο Ευάγγελο για την παρουσία τους και για το χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου, που είναι πάντα δίπλα μου.

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα Εικόνων.....	4
Περίληψη.....	7
Abstract	8
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1 Η σημασία του νερού	9
1.2 Απολύμανση: ορισμός και σπουδαιότητα	10
1.3 Τύποι απολυμαντικών μέσων	11
1.3.1 Χημικά απολυμαντικά μέσα.....	11
1.3.2 Μη χημικά απολυμαντικά μέσα.....	12
1.4 Τα χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού	12
1.5 Μηχανισμοί απολυμαντικής δράσης.....	13
1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την απολυμαντική δράση	14
1.6.1 Είδος του απολυμαντικού	14
1.6.2 Είδος και κατάσταση του μικροοργανισμού.....	14
1.6.3 Χρόνος επαφής.....	15
1.6.4 Συγκέντρωση του απολυμαντικού	15
1.6.5 pH	16
1.6.6 Θερμοκρασία.....	16
1.6.7 Θολερότητα	17
1.6.8 Διαλυτό οργανικό υλικό	17
1.6.9 Βιοφίλμ.....	17
1.7 Συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης	17
1.7.1 Χλωρίωση	18
1.7.2 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).....	21
1.7.3 Οζόνωση	23
1.8 Προηγμένες Διεργασίες Οξείδωσης.....	25
2 Φωτοκατάλυση	27
2.1 Ετερογενής φωτοκατάλυση	27
2.1.1 Μηχανισμός λειτουργίας της ετερογενούς φωτοκατάλυσης.....	27
2.1.2 Φωτοκαταλύτης TiO ₂	31
2.1.3 Παράγοντες που επιδρούν στην ετερογενή φωτοκατάλυση	32

2.1.4	Αξιολόγηση της ετερογενούς φωτοκατάλυσης	36
3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
4	Γενετική τυποποίηση της <i>K. pneumoniae</i>	42
4.1	Η RAPD-PCR	42
5	ΣΚΟΠΟΣ	44
6	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	45
6.1	Υλικά και συσκευές	45
6.1.1	Θρεπτικά υλικά.....	45
6.1.2	Χημικά και Βιοχημικά Υλικά	45
6.1.3	Διαλύματα	45
6.1.4	Στέλεχος <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
6.1.5	Φασματοφωτόμετρο.....	46
6.1.6	Καταλύτες.....	46
6.1.7	Αντιδραστήρας και πηγή φωτός	47
6.1.8	Φίλτρα ακτινοβολίας.....	47
6.1.9	Εκκινητές	48
6.1.10	Θερμικός κυκλοποιητής	48
6.1.11	Συσκευή ηλεκτροφόρησης.....	48
6.1.12	Σύστημα φωτογράφησης και σύστημα επεξεργασίας των προφίλ των ζωνών της RAPD 48	
6.2	Πειραματική Διαδικασία	48
6.2.1	Προετοιμασία πειραμάτων	48
6.2.2	Παρασκευή θρεπτικών υλικών	49
6.2.3	Παρασκευή εναιωρήματος	49
6.2.4	Φωτοκατάλυση	50
6.2.5	Καλλιεργητική μέθοδος.....	51
6.2.6	Παρατήρηση των βακτηρίων με τη χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης 51	
6.2.7	Απομόνωση γενετικού υλικού	51
6.2.8	RAPD-PCR	52
6.2.9	Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της RAPD-PCR	53
7	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
7.1	Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη	54
7.2	Έλεγχος τοξικότητας των μετάλλων	55

7.3	Επίδραση του είδους του καταλύτη	57
7.4	Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού	60
7.5	Επίδραση της προσροφητικής ικανότητας των καταλυτών	64
7.6	Επίδραση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας	65
7.7	Επίδραση της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας στην κυτταρική δομή	71
7.8	Έλεγχος φωτοενεργοποίησης	74
7.9	Επίδραση της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας στο γενετικό υλικό	75
8	Συμπεράσματα	85
9	Βιβλιογραφία.....	87

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1: Φωτοεπαγόμενος σχηματισμός ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής στην επιφάνεια κόκκου TiO_2 παρουσία ρύπου (P).....	29
Εικόνα 2: Κύτταρα της <i>K.pneumoniae</i> (www.mrsatoday.com).....	41
Εικόνα 3: Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη PC-146 (1% Co/TiO_2) στη φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> κατόπιν έκθεσης σε προσομοιωτή ηλιακής ακτινοβολίας. Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10^5 cfu/mL.	55
Εικόνα 4: Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> υπό την επίδραση cobalt chloride hexahydrate 98%, απουσία ακτινοβολίας. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση άλατος: 250mg/L.	56
Εικόνα 5: Αδρανοποίηση της <i>K.pneumoniae</i> υπό την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας με τον εμπορικό καταλύτη P25 και με καταλύτες TiO_2 ενισχυμένους με Mn (α), με Co (β) και με Mn και Co (γ). Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.	58
Εικόνα 6: Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> υπό την επίδραση φωτοκατάλυσης με καταλύτες TiO_2 ενισχυμένους με Mn. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10^5 cfu/mL (πάνω), 10^3 cfu/mL (μεσαίο), 10^2 cfu/mL (κάτω), Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	61
Εικόνα 7: Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> υπό την επίδραση φωτοκατάλυσης με καταλύτες TiO_2 ενισχυμένους με Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10^5 cfu/mL (πάνω), 10^3 cfu/mL (μεσαίο), 10^2 cfu/mL (κάτω), Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	62
Εικόνα 8: Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> υπό την επίδραση φωτοκατάλυσης με καταλύτες TiO_2 ενισχυμένους με Mn και Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10^5 cfu/mL (πάνω), 10^3 cfu/mL (μεσαίο), 10^2 cfu/mL (κάτω), Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	63
Εικόνα 9: Επίδραση της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης στην αποτελεσματικότητα της φωτοκαταλυτικής απολύμανσης έναντι της <i>K. pneumoniae</i> με τη χρήση καταλύτη PC-140 (0.3% Mn/TiO_2). Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.	64
Εικόνα 10: Επίδραση της προσροφητικής ικανότητας των καταλυτών στην αποτελεσματικότητα της απολύμανσης έναντι της <i>K. pneumoniae</i> . Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	65
Εικόνα 11: UV–VIS απορρόφηση του P25 και του Mn:TiO_2 (0.02–1 wt%) (a), του Co:TiO_2 (0.02–1 wt%) (b) και του Mn/Co:TiO_2 (εύρος συγκέντρωσης των δυο ενισχυτών: 0.04–1 wt%)(c) (Venieri et al., 2014).	66
Εικόνα 12: Επίδραση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας στη φωτοκαταλυτική απολύμανση εναιωρημάτων <i>K. pneumoniae</i> διαφόρων αρχικών συγκεντρώσεων με τη χρήση του PC-142: 1% Mn/TiO_2 . Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	68
Εικόνα 13: Επίδραση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας στη φωτοκαταλυτική απολύμανση εναιωρημάτων <i>K. pneumoniae</i> διαφόρων αρχικών συγκεντρώσεων με τη χρήση του PC-146: 1% Co/TiO_2 . Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	69
Εικόνα 14: Φωτογραφίες SEM κυττάρων <i>K. pneumoniae</i> πριν, κατά τη διάρκεια και στο πέρας της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας με τους καταλύτες 0.02% Mn/TiO_2 , 0.02% Co/TiO_2 και 1% Co/TiO_2	72

Εικόνα 15: Φωτογραφίες SEM κυττάρων <i>K. pneumoniae</i> κατά τη διάρκεια και στο πέρας της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας με τους καταλύτες 1% Co/TiO ₂ , 0.04% Mn-Co/TiO ₂ και 0.1% Mn-Co/TiO ₂ (τα πράσινα βέλη που δε συνοδεύονται από ένδειξη δείχνουν ινίδια προερχόμενα από τα κατεστραμμένα βακτηριακά κύτταρα).	73
Εικόνα16: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των <i>K. pneumoniae</i> που υπέστησαν επεξεργασία με Mn/TiO ₂ . Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία με συγκεκριμένους καταλύτες: 1, 2: 0.02% Mn/TiO ₂ μετά από 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα - 3, 4: 0.04% Mn/TiO ₂ μετά από 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα - 5, 6: 0.1% Mn/TiO ₂ μετά από 3 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 7, 8: 0.3% Mn/TiO ₂ μετά από 6 και 15 λεπτά, αντίστοιχα.....	76
Εικόνα17: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των <i>K. pneumoniae</i> που υπέστησαν επεξεργασία με Co/ TiO ₂ . Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία με συγκεκριμένους καταλύτες: 1, 2: 0.02% Co/TiO ₂ μετά από 6 και 15 λεπτά, αντίστοιχα - 3, 4: 0.04% Co/TiO ₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 5, 6: 0.1% Co/TiO ₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 7, 8: 0.3% Co/TiO ₂ μετά από 3 και 15 λεπτά, αντίστοιχα.	79
Εικόνα18: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των <i>K. pneumoniae</i> που υπέστησαν επεξεργασία με Mn-Co/ TiO ₂ . Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία: 1, 2: 0.04% Mn-Co/TiO ₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 3, 4: 0.1% Mn-Co/TiO ₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα.	80
Εικόνα19: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των <i>K. pneumoniae</i> που υπέστησαν επεξεργασία με 1% Mn/TiO ₂ απουσία ακτινοβολίας. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία: 1, 2, 3, 4: μετά από 0, 3, 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα.	81
Εικόνα20: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των <i>K. pneumoniae</i> που υπέστησαν επεξεργασία με 1% Mn/ TiO ₂ με τη χρήση φίλτρων. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία: 1, 2,: με ορατό μόνο φως για 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα - 3,4: με ένταση ηλιακής ακτινοβολίας 5.3×10^{-7} Einstein/(L·s) για 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 5, 6: με ένταση ηλιακής ακτινοβολίας 4.93×10^{-7} Einstein/(L·s) για 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα.....	84

Πίνακας 1: Ανόργανα οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα.....	11
Πίνακας 2: Οργανικά μη οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα	11
Πίνακας 3: Μη χημικές απολυμαντικές μέθοδοι.....	12
Πίνακας 4: Οδηγίες για τα παραπροϊόντα της απολύμανσης μέσα στο νερό.....	20
Πίνακας 5: Δυναμικό αναγωγής οξειδωτικών	26
Πίνακας 6. Καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία.....	47
Πίνακας 7: Επίδραση του Mn και του Co στο ενεργειακό χάσμα. Με δείκτη α επισημαίνονται τα sub-bandgaps. (Venieri et al., 2014)	67
Πίνακας 8: Ενεργοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> μετά το τέλος των φωτοκαταλυτικών πειραμάτων σε σκοτάδι ή υπό φυσικό φωτισμό.....	74
Πίνακας 9: Μέσος δείκτης ομολογίας ($S_{\chi\gamma}$) των δημιουργούμενων προφίλ RAPD στα ζωντανά βακτήρια μετά από επεξεργασία με τους ενισχυμένους καταλύτες.....	77

Περίληψη

Η *Klebsiella pneumoniae* αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο, ανθεκτικό σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και καταπονήσεις. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση του ρυθμού αδρανοποίησης του συγκεκριμένου παθογόνου στο νερό με τη χρήση ετερογενούς φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας υπό προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία και η διερεύνηση της επαγόμενης γενετικής ποικιλότητας με εφαρμογή της RAPD-PCR ως εργαλείο μοριακής τυποποίησης. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιήθηκαν νέοι καταλύτες TiO_2 ενισχυμένοι με Mn ή Co ή τόσο Mn όσο και Co και εξετάστηκε η επίδραση ποικίλων παραμέτρων. Ο εξεταζόμενος μικροοργανισμός φάνηκε ότι αδρανοποιείται εύκολα, καθώς η απολύμανση επήλθε σύντομα (σε πολλές περιπτώσεις μόλις μετά από 10 λεπτά) ενώ τα επίπεδα εκ νέου ανάπτυξης του βακτηρίου υπό σκοτάδι και υπό φυσικό φωτισμό που καταγράφηκαν ήταν πολύ χαμηλά. Η ενεργότητα των εν λόγω καταλυτών υπερίσχυε της αντίστοιχης του εμπορικού καταλύτη P25 (TiO_2), κάτι που υποδεικνύει την ικανότητά τους να απορροφούν στο ορατό φάσμα, απουσία υπεριώδους ακτινοβολίας ($>420 \text{ nm}$). Τη βέλτιστη φωτοκαταλυτική αποτελεσματικότητα επέδειξαν οι διμερώς ενισχυμένοι καταλύτες, υπογραμμίζοντας τη συνεργιστική δράση των μετάλλων-ενισχυτών. Η αδρανοποίηση του βακτηρίου προήλθε από την οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων του και την αύξηση της περατότητας των κυτταρικών μεμβρανών τους και όχι από ενδεχόμενη τοξική επίδραση των μετάλλων με τα οποία είχαν εμπλουτιστεί οι καταλύτες. Η ανάλυση RAPD έδειξε ότι αύξηση του χρόνου επεξεργασίας οδηγεί σε σημαντική μεταβολή των προφίλ της RAPD. Η γενετική ποικιλομορφία ανάμεσα στις απομονώσεις εντεινόταν με αύξηση της περιόδου φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας και παρατεταμένη ακτινοβολήση επηρέασε τη συνολική διαφοροποίηση των ζωνών σε κάθε περίπτωση. Τα RAPD αποτυπώματα ήταν ιδιαίτερα διαφοροποιημένα ανάμεσα στην ανέπαφη απομόνωση και σε εκείνες που είχαν υποστεί επεξεργασία με καταλύτες που περιείχαν Co. Τέλος, σημειώνεται ότι οι δημιουργούμενοι πολυμορφισμοί ενδεχομένως αυξάνουν την ήδη σημαντική λοιμογόνο δράση της *K. pneumoniae*.

Abstract

Klebsiella pneumoniae is considered an emerging pathogen persistent in extreme environmental and stressed conditions. The aim of the present study is the investigation of inactivation rates of this pathogen in water by means of heterogeneous photocatalytic treatment under simulated solar irradiation and the induced genetic variance applying RAPD-PCR as a molecular typing tool. For this purpose, novel Mn-, Co- and Mn/Co-doped TiO₂ catalysts were assessed. The effect of various operating conditions was examined. The reference strain of *K. pneumoniae* proved to be readily inactivated, since disinfection occurred rapidly (i.e. after only 10 min of treatment) and low levels of bacterial regrowth were recorded in the dark and under natural sunlight. The activity of these catalysts was superior to the respective of commercially available P25 titania, accredited to the fact that they can be activated in the visible part of the spectrum, in the absence of UV light (i.e. >420 nm). Binary doped titania exhibited the best photocatalytic activity verifying the synergistic effect induced by composite dopants. Inactivation of the bacteria is attributed to the oxidative degradation of their cells and increase of their cell permeability and not to the potential toxicity of the metal-doped semiconductors, which did not exhibit any bactericidal properties. RAPD analysis showed that increasing the treatment time led to a considerable alteration of RAPD profiles. Genetic variation among isolates increased in relation to the period of treatment and prolonged irradiation in each case affected the overall alteration in band patterns. RAPD patterns were highly diverse between treated and untreated isolates when disinfection was performed with the Co-doped titania. The broad spectrum of genetic variance and generated polymorphisms has the potential to increase the already significant virulence of the species.

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η σημασία του νερού

Το νερό, συνιστώντας περίπου το 75% κατά βάρος του ανθρώπινου οργανισμού, συμμετέχοντας στη φωτοσύνθεση, επιδρώντας στις κλιματικές συνθήκες, συμβάλλοντας στη θερμορύθμιση των οργανισμών, στη μεταφορά ουσιών στο εσωτερικό τους και στη διεκπεραίωση των μεταβολικών τους αντιδράσεων αλλά και χρησιμοποιούμενο στη βιομηχανία και στην αγροτική παραγωγή, αποτελεί πολύτιμο αγαθό για τον άνθρωπο και τα οικοσυστήματα.

Η ανάγκη για επαρκείς ποσότητες ποιοτικού νερού, που τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται εντονότερη λόγω της αύξησης του πληθυσμού, της ραγδαίας ανάπτυξης της βιομηχανίας και των μακροχρόνιων ξηρασιών σε πολλές περιοχές του πλανήτη, αποτελεί θέμα παγκόσμιου ενδιαφέροντος (Chong et al., 2010). Προς ικανοποίηση αυτής της ανάγκης, έχουν υιοθετηθεί ποικίλες λύσεις και στρατηγικές όπως η εξοικονόμηση νερού μέσω ορθολογικής χρήσης του, η προστασία των οικοσυστημάτων που συνδέονται με τον κύκλο του (Χολέβα, 2007) και διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας του προκειμένου να αποκτή την απαραίτητη ποιότητα.

Εκτιμάται ότι περίπου 4 δισεκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έχουν περιορισμένη ή καθόλου πρόσβαση σε καθαρό, απολυμασμένο νερό και εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν ετησίως από ασθένειες που οφείλονται σε αυτό (Malato et al., 2009). Αυτοί οι αριθμοί αναμένεται να αυξηθούν στο μέλλον, λόγω της εντεινόμενης επιβάρυνσης του υδρολογικού κύκλου με ρυπογόνους και μολυσματικούς παράγοντες (Wintgens et al., 2008; Richardson, 2008; Suarez et al, 2008).

Για την άμβλυνση του παραπάνω προβλήματος είναι διαθέσιμες σήμερα πλήθος τεχνολογιών επεξεργασίας του νερού. Ορισμένες από αυτές, όπως η προσρόφηση ή η πήξη απλώς συμπυκνώνουν τους εμπεριεχόμενους ρυπογόνους ή μολυσματικούς παράγοντες μεταφέροντάς τους σε άλλες φάσεις αλλά χωρίς να τους καταστρέφουν πλήρως (Padmanabhan et al., 2006). Άλλες συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας του νερού όπως η καθίζηση, η διήθηση, οι χημικές μέθοδοι και οι τεχνολογίες μεμβρανών έχουν υψηλό κόστος και κάποιες φορές παράγουν τοξικούς δευτερογενείς ρύπους στο οικοσύστημα (Gaya and Abdullah, 2008). Αυτές οι τοξικές προσμίξεις ανιχνεύονται ενίοτε σε υψηλές συγκεντρώσεις και απασχολούν παγκοσμίως σε μια εποχή που η ενημέρωση για περιβαλλοντικά θέματα έχει ενταθεί και πλήθος περιβαλλοντικών νομοθεσιών θεσπίζονται προκειμένου να προστατευτεί η δημόσια υγεία και τα οικοσυστήματα. Έτσι, παραμένει πάντα επίκαιρη η ανάγκη για εξεύρεση νέων μεθόδων επεξεργασίας του νερού ή για βελτιστοποίηση των ήδη υπάρχουσών.

1.2 Απολύμανση: ορισμός και σπουδαιότητα

Ιδιαίτερα σημαντική για τη δημόσια υγεία κρίνεται η ελάττωση - εκτός των άλλων - και του μικροβιακού φορτίου (μολυσματικοί παράγοντες) που περιέχεται στο νερό και το οποίο είναι δυνητικά επικίνδυνο. Πραγματοποιείται δηλαδή, καταστροφή ή αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών που τυχόν περιέχει, ώστε να μην είναι ικανοί για τη μετάδοση των αντίστοιχων ασθενειών.

Η επεξεργασία αυτή ονομάζεται απολύμανση και 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 ενώ στην περίπτωση των αποβλήτων η απολύμανση αποβλέπει στην προστασία των υδάτινων αποδεκτών (Palaiologou et al., 2007). Κρίνεται ουσιώδες σε αυτό το σημείο να διευκρινιστεί η διαφορά μεταξύ της αποστείρωσης και της απολύμανσης. Η αποστείρωση σημαίνει την πλήρη καταστροφή όλων των μικροοργανισμών ενώ η απολύμανση αποτελεί την εκλεκτική ελάττωση των παθογόνων μικροοργανισμών σε ανεκτά επίπεδα (Μήτρακας, 2001).

Στο παρελθόν, όταν δε λάμβανε χώρα μικροβιολογικός έλεγχος των υδάτων, εκατομμύρια άνθρωποι προσβάλλονταν από σοβαρές υδατογενείς λοιμώξεις δηλαδή ασθένειες που οφείλονται στην παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι, εισερχόμενοι στο νερό μέσω των λυμάτων, επιβιώνουν παρά το ολιγοτροφικό, αφιλόξενο υδάτινο περιβάλλον και μεταδίδουν νοσήματα με ποικίλους τρόπους, όπως με κατάποση, επαφή, εισπνοή υδατοσταγονιδίων. Ακόμη και σήμερα όμως, που είναι γνωστή η σημασία της μικροβιολογικής καθαρότητας του νερού για τη δημόσια υγεία, ο αριθμός των υδατογενών λοιμώξεων εξακολουθεί να είναι μεγάλος, ιδιαίτερα στις χώρες του τρίτου κόσμου όπου αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου των παιδιών (Χολέβα, 2007).

Ο κίνδυνος μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων καθιστά απαραίτητη την απολύμανση τόσο του πόσιμου νερού όσο και του νερού που προέρχεται από εξόδους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων και προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση (Δρούμπαλη, 2010) καθώς η τελευταία αποτελεί μια από τις ελκυστικές επιλογές προκειμένου να εξασφαλίζονται ποσότητες νερού που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για αγροτικές και βιομηχανικές δραστηριότητες (Bradley et al., 2002; Lapena et al., 1995), αλιεία και κολύμβηση (Δρούμπαλη, 2010). Επίσης, νερό προερχόμενο από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων που έχει υποστεί απολύμανση μπορεί να διατεθεί ασφαλέστερα σε κάποιον υδάτινο αποδέκτη προασπίζοντας τη δημόσια υγεία.

1.3 Τύποι απολυμαντικών μέσων

Τα μέσα που χρησιμοποιούνται ως απολυμαντικά μπορούν να διακριθούν σε δύο βασικές κατηγορίες, τα χημικά και τα μη χημικά.

1.3.1 Χημικά απολυμαντικά μέσα

Εναντίον διάφορων μικροβίων του νερού έχει βρεθεί ότι δρουν τόσο ανόργανες ενώσεις με οξειδωτικό δυναμικό (Πίνακας 1) όσο και οργανικές ενώσεις, μη οξειδωτικές (Πίνακας 2).

Πίνακας 1: Ανόργανα οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα

Ανόργανα οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα
ελεύθερο χλώριο (Cl_2) (Shin et al., 2008)
χλωριώδες νάτριο (NaOCl_2), υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) (Fukuzaki, 2006)
διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2) (Huang et al., 1997)
βρώμιο (Br_2) (Moore et al., 1992)
χλωριούχο βρώμιο (BrCl) (Taylor and Butler, 1982)
όζον (O_3) (Cho et al., 2003)
ιώδιο (I_2) (Backer et al., 2000)
ιόντα χαλκού και αργύρου (Omelchenko et al., 2005; Kim et al., 2004)
υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO_4) (Chen and Yeh, 2005)
υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (Droguet et al., 2001)

Πίνακας 2: Οργανικά μη οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα

Οργανικά μη οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα
μεθυλενοδιθειοκυάνιο (MBT) (Seymour Stanton Block, 2001)
ισοθειαζόλες (Grussenmeyer et al., 1992)
διβρωμονιτριλοπροπιοναμίδιο (DBNPA) (Μήτρακας, 2001)
διβρωμονιτριλοπροπανόλη (Stretton et al., 1973; Shepherd et al., 1988)
διτριβουτυλοξείδιο του κασσιτέρου (TBTO) (Μήτρακας, 2001)

Ακόμη, ως χημικό απολυμαντικό μπορεί να θεωρηθεί και το ισχυρά όξινο ή αλκαλικό νερό που έχει την ικανότητα να καταστρέφει παθογόνα μικρόβια αφού πολύ χαμηλό pH (<3) ή πολύ υψηλό (>11) είναι τοξικό για μεγάλο αριθμό βακτηριακών ειδών.

1.3.2 Μη χημικά απολυμαντικά μέσα

Στις μη χημικές μεθόδους απολύμανσης ανήκουν οι μέθοδοι του πίνακα 3:

Πίνακας 3: Μη χημικές απολυμαντικές μέθοδοι

Μη χημικά απολυμαντικά μέσα
θερμική επεξεργασία (Μήτρακας, 2001)
υπεριώδης ακτινοβολία (Bergmann et al., 2002)
υπέρηχοι (Mason, 2007; Hua and Thompson, 2000)
παλμικό ηλεκτρικό πεδίο (Narsetti et al., 2006)
διαχωρισμός μέσω μεμβρανών (Madaeni, 1999)
ραδιενεργός ακτινοβολία (Μήτρακας, 2001)

Επιπλέον όλων αυτών, υπάρχουν και μέθοδοι που χρησιμοποιούν σε συνδυασμό χημικά και μη χημικά μέσα όπως η ηλεκτροχημική απολύμανση (Kerwick et al., 2005) και η φωτοκατάλυση.

1.4 Τα χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού

Οι επιθυμητές ιδιότητες ενός απολυμαντικού (Ανδρεαδάκης, 2005; Μήτρακας, 2001; Droste, 1997) είναι :

- υψηλός ρυθμός εξουδετέρωσης παθογόνων μικροοργανισμών
- χαμηλή δραστικότητα με ουσίες που περιέχονται στο νερό και χαμηλή παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων
- χαμηλή τοξικότητα στον άνθρωπο και στα οικόσιτα ζώα
- χαμηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς
- μηδενικός κίνδυνος κατά τη χρήση του
- χαμηλό κόστος λειτουργίας και συντήρησης
- εύκολη και αξιόπιστη ανιχνευσιμότητα στο νερό
- εύκολη και ασφαλής αποθήκευση και μεταφορά

- υψηλή διαθεσιμότητα στην αγορά
- αποδοτικότητα στις θερμοκρασίες περιβάλλοντος
- υψηλή σταθερότητα δηλαδή να διατηρεί την απολυμαντική του ικανότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα
- μη διαβρωτικό για τις διάφορες επιφάνειες με τις οποίες έρχεται σε επαφή
- ομοιογένεια

Κάθε απολυμαντικό διαθέτει κάποια από τα παραπάνω χαρακτηριστικά χωρίς να τα συγκεντρώνει όλα. Είναι χρήσιμο όμως, να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των εναλλακτικών μεθόδων ώστε να επιλέγεται ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση η πιο κατάλληλη.

1.5 Μηχανισμοί απολυμαντικής δράσης

Τα διάφορα απολυμαντικά μέσα επιδρούν στην κυτταρική λειτουργία των παθογόνων μικροοργανισμών με διάφορους τρόπους. Οι πιο βασικοί μηχανισμοί απολυμαντικής δράσης που έχουν προταθεί είναι (Palaiologou, 2007) :

- η φθορά του κυτταρικού τοιχώματος που οδηγεί στη λύση και στο θάνατο του κυττάρου. Με το μηχανισμό αυτό δρουν διάφορες ουσίες, μεταξύ των οποίων και το πρώτο αντιβιοτικό, η πενικιλίνη, που παρεμποδίζει τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.
- η μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας της πλασματικής μεμβράνης από ορισμένες ουσίες που αναστέλλουν την εκλεκτικότητά της επιτρέποντας έτσι τη διαφυγή ζωτικών συστατικών όπως το άζωτο και ο φωσφόρος. Σε αυτή την κατηγορία απολυμαντικών μέσων ανήκουν οι φαινολικές ενώσεις και τα απορρυπαντικά.
- η μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος από θερμότητα (η οποία οδηγεί στην πήξη των κυτταρικών πρωτεϊνών), ακτινοβολία και ισχυρά οξέα ή αλκαλικά μέσα (τα οποία μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες).
- η μεταβολή του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών από υπερϊώδη ακτινοβολία που μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό διπλών δεσμών στις αλυσίδες του DNA έχοντας ως συνέπεια τη ρήξη κάποιων εξ' αυτών και τη διακοπή της διαδικασίας της αντιγραφής, καθιστώντας το μικροοργανισμό ανίκανο να αναπαραχθεί.

- η παρεμπόδιση της ενζυματικής δράσης από οξειδωτικά μέσα όπως το χλώριο που μπορούν να μεταβάλλουν τη χημική διεύθυνση των ενζύμων και να απενεργοποιήσουν απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς ένζυμα.

1.6 Παράγοντες που επηρεάζουν την απολυμαντική δράση

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης μετράται ευρέως με το λογαριθμικό δείκτη απομάκρυνσης των παθογόνων μικροοργανισμών LVR που δίνεται από τη σχέση $LRV = \log_{10} (C_{in} / C_{out})$,

όπου:

C_{in} η συγκέντρωση του παθογόνου στο αρχικό εναιώρημα και

C_{out} η συγκέντρωση του παθογόνου στο εναιώρημα μετά την επεξεργασία

Συνεπώς, για συγκεκριμένο παθογόνο τιμή LRV ίση με 2 αντιστοιχεί σε 99% απολύμανση ενώ $LRV=4$ αντιστοιχεί σε 99,99% απολύμανση (Bennett, 2008).

Η ικανότητα των απολυμαντικών μέσων να επιδρούν στο κυτταρικό υλικό και να παρεμποδίζουν τους μηχανισμούς λειτουργίας του κυττάρου, εξαρτάται κυρίως από το είδος του απολυμαντικού, το είδος και την κατάσταση του μικροοργανισμού, τη συγκέντρωση του απολυμαντικού, το χρόνο επαφής, το pH, τη θερμοκρασία, τη θολερότητα, το διαλυτό οργανικό υλικό (Φεσά, 2009) και την ύπαρξη βιολογικού υμενίου (βιοφίλμ).

1.6.1 Είδος του απολυμαντικού

Η απόδοση της απολύμανσης εξαρτάται από το είδος του απολυμαντικού που χρησιμοποιούμε εναντίον συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Το χλώριο και οι διάφορες ενώσεις του, για παράδειγμα, δεν επιτυγχάνουν τον υψηλό ρυθμό θανάτωσης κάποιων ιών που επιτυγχάνει το όζον.

1.6.2 Είδος και κατάσταση του μικροοργανισμού

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται από τη φύση και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Γενικά είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν, λόγω της κυτταρικής τους δομής, τα πρωτόζωα και ακολουθούν οι ιοί και τα βακτήρια. Αυξημένη αντίσταση στην απολύμανση παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν ανθεκτικές μορφές όπως κύστες και σπόρια

(Ρήγα, 2006). Επίσης, είναι σαφές ότι μικροοργανισμοί που για κάποιο λόγο έχουν καταστεί λιγότερο ακμαίοι, είναι πιο ευαίσθητοι στα διάφορα απολυμαντικά.

1.6.3 Χρόνος επαφής

Μια από τις βασικότερες παραμέτρους που επιδρούν στην απολύμανση θεωρείται ο χρόνος επαφής του απολυμαντικού με το λύμα. Η Βρετανίδα Harriette Chick που ασχολήθηκε κυρίως με τη μελέτη των πρωτεϊνών και με τα άλγη μολυσμένων υδάτων, παρατήρησε ότι δεδομένης της συγκέντρωσης του απολυμαντικού, η αύξηση του χρόνου επαφής του τελευταίου με το λύμα οδηγεί σε ανάλογη αύξηση της θανάτωσης των παθογόνων μικροοργανισμών. Ο λεγόμενος νόμος της Chick είναι (Metcalf and Eddy, 2007; Lambert and Johnston, 2000; Haas and Karra, 1984) :

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

όπου :

$\frac{dN}{dt}$ είναι ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών με τον χρόνο

k η σταθερά ταχύτητας αδρανοποίησης των μικροοργανισμών, $[T^{-1}]$

N_0 αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t

t ο χρόνος

Αν N_0 είναι ο αριθμός των μικροοργανισμών για $t=0$ τότε :

$$\frac{N}{N_0} = e^{-kt} \Rightarrow \ln \frac{N}{N_0} = -kt$$

Η τιμή της σταθεράς k λαμβάνεται από το διάγραμμα $-\ln \frac{N}{N_0}$ ως προς το χρόνο t .

1.6.4 Συγκέντρωση του απολυμαντικού

Ο Watson (1908) πρότεινε μια εμπειρική λογαριθμική σχέση που συσχετίζει τη σταθερά ρυθμού αδρανοποίησης k με την συγκέντρωση του απολυμαντικού C :

$$k = C^n t$$

όπου :

k η σταθερά ρυθμού αδρανοποίησης των μικροοργανισμών

C η συγκέντρωση του απολυμαντικού

t ο χρόνος

n ο συντελεστής αραίωσης του απολυμαντικού

$n > 1$ σημαίνει ότι η συγκέντρωση του απολυμαντικού είναι πιο σημαντική από τον χρόνο επαφής

$n = 1$ σημαίνει ότι η συγκέντρωση και ο χρόνος έχουν την ίδια βαρύτητα

$n < 1$ σημαίνει ότι ο χρόνος είναι πιο σημαντικός από την συγκέντρωση του απολυμαντικού

Συνήθως, χρησιμοποιείται η σταθερά k που αντιστοιχεί σε 99 % αδρανοποίηση των μικροοργανισμών.

Βάσει της παραπάνω εξίσωσης, μεγάλες συγκεντρώσεις απολυμαντικού απαιτούν μικρούς χρόνους επαφής ενώ μικρές συγκεντρώσεις μεγάλους χρόνους επαφής και κατ' επέκταση μεγάλες δεξαμενές απολύμανσης (Λέκκας, 2005).

1.6.5 pH

Η επίδραση του pH στην απολύμανση, μπορεί ανάλογα με το απολυμαντικό μέσο να είναι διαφορετική. Για παράδειγμα, αυξημένες τιμές pH ενισχύουν την απολυμαντική δράση ενώσεων του αμμωνίου ενώ μειώνουν εκείνη των υποχλωριωδών, των φαινολών και του ιωδίου.

1.6.6 Θερμοκρασία

Με κάποιες εξαιρέσεις χημικών μέσων στα οποία η αύξηση της θερμοκρασίας επιφέρει αλλοίωση, φαίνεται ότι σε γενικές γραμμές αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε γρηγορότερη θανάτωση των μικροοργανισμών. Η επίδραση αυτή μπορεί να προσδιορισθεί από μια μορφή της εξίσωσης *van't Hoff – Arrhenius*. Η σχέση που παρέχει τον απαιτούμενο χρόνο, ώστε να επιτευχθεί συγκεκριμένο ποσοστό θανάτωσης είναι (Metcalf and Eddy, 2007) :

$$\ln \frac{t_1}{t_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}$$

όπου :

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

E η ενέργεια ενεργοποίησης, J/mole (ή cal/mole)

R η σταθερά των αερίων, 8.3144 J/mole·K (ή 1.99 cal/mole·K)

1.6.7 Θολερότητα

Η θολερότητα αποτελεί μέτρο της συγκέντρωσης των αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό. Έχει αποδειχθεί ότι επιδρά αρνητικά στη διαδικασία απολύμανσης, καθώς τα αιωρούμενα σωματίδια μπορεί να περιβάλλουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς προστατεύοντάς τους από τη δράση του απολυμαντικού. Επιπρόσθετα, αυξάνεται η απαιτούμενη δόση απολυμαντικού καθώς το υλικό από το οποίο αποτελούνται τα σωματίδια αυτά χρήζει κάποιας ποσότητας απολυμαντικού (Πολίτη, 2012).

1.6.8 Διαλυτό οργανικό υλικό

Το διαλυτό οργανικό υλικό που περιέχεται στο υπό επεξεργασία υγρό είναι δυνατόν να καταναλώσει απολυμαντικό και να οδηγήσει στη δημιουργία ενώσεων με μικρή ή καθόλου απολυμαντική ικανότητα αλλά και στη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων (Πολίτη, 2012).

1.6.9 Βιοφίλμ

Η ύπαρξη συσσωματωμάτων μικροοργανισμών που έχουν προσκολληθεί στις διάφορες επιφάνειες (π.χ δίκτυο ύδρευσης, αντιδραστήρες) φαίνεται ότι δυσχεραίνει τη διαδικασία της απολύμανσης (Farcas et al., 2012). Οι ποικίλοι μικροοργανισμοί, που δημιουργούν το βιοφίλμ εκκρίνοντας πολυσακχαρίτες, προστατεύονται ως ένα βαθμό από τη δράση των απολυμαντικών μέσων καθώς τα τελευταία δυσκολεύονται να διεισδύσουν στο εσωτερικό του υμενίου. Ταυτόχρονα, η επιβίωση των προσκολλημένων μικροβίων διευκολύνεται και από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών ενώ παράλληλα υποβοηθάται ο πολλαπλασιασμός τους λόγω των ευνοϊκών συνθηκών (κατάλληλο pH, θερμοκρασία) που επικρατούν στο υμένιο σε σχέση με το ελαιώρημα, καθιστώντας τη διαδικασία της απολύμανσης ακόμη πιο δύσκολη. Συν τοις άλλοις, οι Farcas et al. (2012) υπογραμμίζουν ότι τα υλικά των σωληνώσεων μπορεί να διαβρωθούν από τη δράση των μικροοργανισμών και τα προϊόντα αυτής της διάβρωσης δύνανται να αντιδράσουν με το ελεύθερο χλώριο και να οδηγήσουν σε ελάττωση του υπολειμματικού απολυμαντικού.

1.7 Συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης

Σήμερα, μεταξύ των μεθόδων απολύμανσης οι πιο διαδεδομένες είναι η χλωρίωση, η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και η οζόνωση (Πολίτη, 2012).

1.7.1 Χλωρίωση

Η χλωρίωση είναι η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απολύμανση τόσο των υγρών αποβλήτων όσο και του πόσιμου νερού και αποτελεί την πιο συνηθισμένη σήμερα τεχνολογία απολύμανσης (Parsons et al., 2004). Γίνεται με προσθήκη στο νερό:

A) ελεύθερου χλωρίου (Cl_2)

B) υποχλωριώδους ασβεστίου ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$)

Γ) υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl)

τα οποία διαλυόμενα στο νερό σχηματίζουν υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και υδροχλωρικό οξύ (HCl)

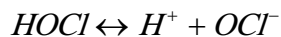
ή

Δ) διοξειδίου του χλωρίου (ClO_2) που δε διαλύεται στο νερό (WHO,S13).

A) Η αντίδραση που λαμβάνει χώρα όταν προστίθεται αέριο χλώριο στο νερό είναι η ακόλουθη:



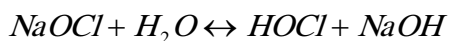
Επειδή το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές, διασπάται στη συνέχεια σε ιόντα υδρογόνου (H^+) και υποχλωριώδη ιόντα (OCl^-):



Σε χαμηλές τιμές pH στο νερό, υπερिशύει το HOCl ενώ σε υψηλές τα OCl^- . Ισχυρότερη απολυμαντική δράση εκ των δύο έχει το HOCl (Νταρακάς, 2009) καθώς το αρνητικό φορτίο που διαθέτουν οι περισσότεροι μικροοργανισμοί εντός του νερού απωθεί τα OCl^- ενώ το HOCl πλησιάζει, διεισδύει ευκολότερα στα μικροβιακά κύτταρα και τελικά αδρανοποιεί κάποια ένζυμα απαραίτητα για την επιβίωση του μικροβίου (Μάρακας, 2006).

Συνήθως, πλήρης απολύμανση θεωρείται ότι επιτυγχάνεται όταν η περιεκτικότητα του ελεύθερου διαθέσιμου χλωρίου (HOCl και OCl^-) είναι περίπου 0.2 ppm μετά την ανάμειξη και οξείδωση και η διάρκεια της χλωρίωσης τουλάχιστον 15-30 λεπτά. Μεγαλύτερες περιεκτικότητες συνδέονται με εμφάνιση οσμής και γεύσης στο νερό ενώ μικρότερες δεν εξασφαλίζουν πλήρη απολύμανση (Νταρακάς, 2009) καθώς μπορεί να είναι αντιστρέψιμη η αντίδραση χλωρίου-ενζύμων με αποτέλεσμα την επαναλειτουργία των ενζύμων των μικροοργανισμών (Μάρακας, 2006).

B) Όταν χρησιμοποιείται υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) πραγματοποιείται η εξής αντίδραση:



Σε περιπτώσεις υψηλού pH, το HOCl μετατρέπεται σε OCl^- που έχουν χαμηλότερη απολυμαντική δράση και γι' αυτό απαιτείται διόρθωσή του ώστε να γίνει μικρότερο του 7.5

Γ) Για μικρές εγκαταστάσεις είναι πιο οικονομική η χρήση υποχλωριώδους ασβεστίου $Ca(OCl)_2$ αντί του χλωρίου. Η ουσία αυτή αντιδρά με το νερό και απελευθερώνεται χλώριο.

Δ) Το διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2) δε διατίθεται σε εμπορεύσιμη μορφή και πρέπει να παράγεται στο σημείο χρήσης κάτω από αυστηρές συνθήκες ασφαλείας σύμφωνα με την αντίδραση:



Έχει καλή απολυμαντική δράση και δημιουργεί πολύ λίγα παραπροϊόντα, όπως τριαλογονομεθάνια. Το ClO_2 είναι αέριο που παραμένει σαν υπόλειμμα στο νερό για μικρό χρονικό διάστημα και σε σύγκριση με το ελεύθερο χλώριο παρουσιάζει καλύτερη δράση έναντι παθογόνων βακτηρίων, αλλά μικρότερη έναντι ιών.

Αξιολόγηση της χλωρίωσης

Η χλωρίωση ως απολυμαντική μέθοδος είναι αποτελεσματική εναντίον μεγάλου φάσματος μικροοργανισμών, έχει χαμηλό κόστος, εύκολη εφαρμογή ενώ παράλληλα έχει το πλεονέκτημα της υπολειμματικής δράσης δηλαδή παραμένει δραστικό το απολυμαντικό μέσα στο νερό για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα (Δρούμπαλη, 2010, www.who.int).

Όμως, η συγκεκριμένη τεχνική έχει εγείρει προβληματισμό λόγω μιας σειράς μειονεκτημάτων που εμφανίζει. Συνδέεται συχνά με την εμφάνιση δυσάρεστης οσμής και γεύσης στο νερό εξαιτίας του χλωρίου ή παραπροϊόντων του (Rook, 1974; Bellar et al., 1974). Τα τριαλογονομεθάνια βρέθηκε ότι προκαλούν καρκίνο σε εργαστηριακά ζώα (National Cancer Institute, 1976) κι έτσι ακολούθησαν ρυθμίσεις σχετικά με αυτά από τις ΗΠΑ και άλλες χώρες ενώ πλέον όρια έχουν θεσπιστεί για αριθμό άλλων παραπροϊόντων της απολύμανσης όπως τα αλογονωμένα οξικά οξέα (σχηματίζονται, όπως και τα τριαλογονομεθάνια, κυρίως από χλώριο και χλωραμίνες), ενώσεις που περιέχουν το χλωριώδες ανιόν (ClO_2^-) (σχηματίζεται κυρίως από το διοξείδιο του χλωρίου) και ενώσεις που περιέχουν το βρωμικό ανιόν (BrO_3^-) (σχηματίζεται κυρίως από την οζόνωση). Παρ' όλα αυτά, ο Διεθνής Οργανισμός για την Έρευνα πάνω στον Καρκίνο θεώρησε ανεπαρκή τα στοιχεία συσχέτισης της χλωρίωσης με την εμφάνιση καρκίνου (Van Leeuwen, 2000). Σήμερα, εκτός των προαναφερθέντων, θεωρούνται μεγάλης σημασίας για την υγεία και άλλα παραπροϊόντα όπως τα ιωδιούχα οξέα, βρωμιούχα νιτρομεθάνια, ιωδιούχα τριαλογονομεθάνια, αλογονωμένα αμίδια, αλογονωμένες φουρανόνες, αλογονωμένες

πυρόλες, αλογονωμένες κινόνες, αλογονωμένες κετόνες, αλογονωμένες αλδεΐδες, αλογονωμένα νιτρίλια και νιτροζαμίνες. Ακόμη, φαίνεται ότι τα παραπροϊόντα που περιέχουν άζωτο (“N-DBPs”), είναι πιο τοξικά για το γενετικό υλικό και τα κύτταρα εν συγκρίσει με εκείνα που δεν περιέχουν. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται τα όρια που έχουν τεθεί για όσες από τις ενώσεις αυτές έχουν θεσπιστεί ρυθμίσεις.

Πίνακας 4: Οδηγίες για τα παραπροϊόντα της απολύμανσης μέσα στο νερό

<i>U.S. EPA regulations</i>	<i>MCL (mg/L)</i>
Total THMs (chloroform, bromodichloromethane, chlorodibromomethane, bromoform)	0.080
5 Haloacetic acids (chloro-, bromo-, dichloro-, dibromo-, trichloroacetic acid)	0.060
Bromate	0.010
Chlorite	1.0
<i>World Health Organization (WHO) guidelines</i>	<i>Guideline value^a (mg/L)</i>
Chloroform	0.3
Bromodichloromethane	0.06
Chlorodibromomethane	0.1
Bromoform	0.1
Carbon tetrachloride	0.004
Chloroacetic acid	0.02
Dichloroacetic acid	0.05 ^b
Trichloroacetic acid	0.2
Bromate	0.01 ^b
Chlorite	0.7 ^b
Dichloroacetonitrile	0.02 ^b
Dibromoacetonitrile	0.07
Cyanogen chloride	0.07
2,4,6-trichlorophenol	0.2
N-Nitrosodimethylamine (NMDA)	0.1
<i>European Union Standards</i>	<i>Standard value^a (mg/L)</i>
Total THMs	0.1
Bromate	0.01 ^c
<i>Other regulations</i>	<i>MCL (ng/L)</i>
NMDA	9 ^d , 10 ^e

^aWorld Health Organization (WHO) guidelines on THMs state that the sum of the ratio of the concentration of each THM to its respective guideline value should not exceed unity. WHO guidelines can be found at http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/. European Union drinking water standards can be found at www.nucfilm.com/eu_water_directive.pdf

^bProvisional guideline value

^cWhere possible, without compromising disinfection, EU member states should strive for a lower value

^dOntario, Canada

^eCalifornia, U.S.

1.7.2 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

Η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκε η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία για απολύμανση πόσιμου νερού ήταν το 1910 στη Μασσαλία (Henry et al., 1910), μετά την ανάπτυξη της λάμπας ατμών υδραργύρου και του σωλήνα χαλαζία, με τη βοήθεια των οποίων εφαρμόζεται. Στην Ευρώπη, η UV εφαρμόζεται ευρέως ως τεχνική απολύμανσης από τη δεκαετία του 1980 για τον έλεγχο μόλυνσης υπόγειων υδάτων (Kruithof et al., 1992). Η εφαρμογή της ως μια από τις βασικές μεθόδους απολύμανσης σε ΗΠΑ και Ευρώπη ήρθε μετά από την ανακάλυψη της υψηλής αποτελεσματικότητάς της εναντίον του *Cryptosporidium* (Clancy et al., 1998) και της *Giardia*, πρωτόζωα των οποίων οι κύστες δεν καταστρέφονται αποτελεσματικά από τη χλωρίωση και την οζόνωση (όταν η τελευταία εφαρμόζεται σε χαμηλές τιμές CT ώστε να περιορίζεται ο σχηματισμός ενώσεων που περιέχουν το βρωμικό ανιόν BrO_3^-) (Hijnen et al., 2006).

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ηλεκτρομαγνητική ενέργεια που τοποθετείται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ των ακτίνων X και του ορατού φωτός (Κυριακόπουλος, 2009) και συγκεκριμένα στα 100 nm - 400 nm. Διαχωρίζεται σε 4 περιοχές, σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Φωτισμού:

- UV-A (315-400 nm)
- UV-B (280-315 nm)
- UV-C (200-280 nm)
- V-UV (100-200 nm) (Paul Chen et al., 2007).

Η απολυμαντική της δράση έγκειται στην απορρόφησή της από το γενετικό υλικό των μικροβιακών κυττάρων και στον επακόλουθο σχηματισμό διμερών πυριμιδίνης μεταξύ των αζωτούχων βάσεων ενός κλώνου DNA (Μήτρακας, 2001). Έτσι, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων γίνεται αδύνατος και τελικά ο μικροοργανισμός καθίσταται αβλαβής και θανατώνεται (Λέκκας, 2005). Όλοι οι μικροοργανισμοί επηρεάζονται από την υπεριώδη ακτινοβολία με κάποιους όμως να είναι πιο ανθεκτικοί λόγω της χημικής σύνθεσης και του πάχους του κυτταρικού τους τοιχώματος που ανθίστανται στην ακτινοβολία. Η μέγιστη αποτελεσματικότητα επιτυγχάνεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 250 – 265 nm που έχει τη μέγιστη απορρόφηση από τα νουκλεϊκά οξέα αλλά και από πρωτεΐνες. Η πιο κοινή πηγή αυτής της ακτινοβολίας είναι ένας λαμπτήρας ατμών υδραργύρου κατασκευασμένος από χαλαζία ή από παρόμοιο υλικό, που δεν απορροφά στο καταστρεπτικό μη

ορατό φως των 254 nm. Η UV ακτινοβολία εκπέμπεται από τη δημιουργία εντός της λάμπας ενός τόξου ατμών υδραργύρου εξαιτίας ηλεκτρικής εκκένωσης.

Για να εξασφαλιστεί η απολύμανση το νερό πρέπει να είναι κατά το δυνατόν απαλλαγμένο από αιωρούμενα στερεά και ουσίες που απορροφούν το φως (Μάρακας, 2006) αφού η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με UV ακτινοβολία επηρεάζεται από την ποσότητα - δόση της ενέργειας που απορροφά ο μικροοργανισμός. Η δόση αυτή είναι ανάλογη της έντασης της παρεχόμενης ακτινοβολίας (ενέργεια, mW), του χρόνου έκθεσης του μικροοργανισμού σε αυτήν (διάρκεια ακτινοβολίας, sec) και αντιστρόφως ανάλογη με την επιφάνεια του υγρού στο οποίο εφαρμόζεται (cm^2). Επομένως, η δόση μετριέται σε $\left[\frac{\text{mW} \cdot \text{s}}{\text{cm}^2} \right]$. Παρόλα αυτά, αύξηση της δόσης οδηγεί συχνά σε μειωμένη απολυμαντική δράση λόγω προσρόφησης των βακτηρίων στα αιωρούμενα σωματίδια (Νταρακάς, 2009).

Αξιολόγηση της UV ακτινοβολίας

Η UV φαίνεται ότι είναι αποτελεσματική έναντι όλων των κατηγοριών παθογόνων που μπορούν να μεταφερθούν μέσω του νερού (Hijnen et al., 2006). Μάλιστα, παρουσιάζει μεγαλύτερη απόδοση σε σύγκριση με τη χλωρίωση στην απενεργοποίηση των περισσότερων ιών (Gerba et al., 2002), σπορίων και κυστών πρωτοζώων (Okoh et al., 2007). Επίσης, δε δημιουργεί τοξικά παραπροϊόντα στις δοσολογίες που χρησιμοποιούνται ούτε αφήνει τοξική υπολειμματική συγκέντρωση ενώ ο απαιτούμενος εξοπλισμός καταλαμβάνει λιγότερο χώρο σε σχέση με τη χλωρίωση (Δρόσου, 2007). Ταυτόχρονα μπορεί να καταστρέψει ανθεκτικά οργανικά συστατικά όπως η Ν-νιτροσοδιμεθυλαμίνη (NDMA) (Tchobanoglous, 2006) που είθισται να παράγεται από τις βιομηχανικές διαδικασίες και να ανιχνεύεται σε πληθώρα επεξεργασμένων τροφίμων και τελικά στο νερό (Andrzejewski et al., 2005) ενώ θεωρείται πολύ τοξική για το ήπαρ (George et al., 2001; Peto et al., 1991).

Όμως, λόγω της απουσίας υπολειμματικής δράσης δεν μπορεί να ελεγχθεί η επιτυχία της απολύμανσης (Δρόσου, 2007; Tchobanoglous, 2006), είναι αρκετά κοστοβόρος (Hoyer, 2004) αφού απαιτεί μεγάλο αριθμό λαμπτήρων και κατανάλωση ενέργειας, μειώνεται η απόδοση των λυχνιών κατά τη διάρκεια της ζωής τους ενώ επίσης χρήζουν συχνών καθαρισμών με οξύ (Νταρακάς, 2009; Δρόσου, 2007). Ακόμη, ενώ η χαμηλής πίεσης μονοχρωματική ακτινοβολία που χρησιμοποιείται συνήθως είναι αποτελεσματική έναντι μεγάλου αριθμού ιών, η αδρανοποίηση των αδενοϊών που είναι πολυπληθείς στο νερό και πιο ανθεκτικοί, απαιτεί μέσης πίεσης πολυχρωματική ακτινοβολία (Linden et al., 2007) κάτι που δεν έχει εφαρμοστεί ευρέως έως τώρα. Τέλος, κάποιοι μικροοργανισμοί

εμφανίζουν το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης δηλαδή όταν μετά την επεξεργασία με UV εκτεθούν σε ακτινοβολία του ορατού γαλάζιου φωτός έχουν τη δυνατότητα επιδιόρθωσης των βλαβών που είχε υποστεί το DNA τους, καθιστώντας τελικά ανεπαρκή την απολύμανση (Hallmich and Gehr, 2010; Νταρακάς, 2009; Locas et al., 2008). Αυτό συναντάται σε ορισμένους μόνο μικροοργανισμούς, όπως η *Shigella* (Νταρακάς, 2009), η *E.coli* και άλλα ολικά κολοβακτηριοειδή (Okoh et al., 2007) και γενικά δεν αφορά τους ιούς.

1.7.3 Οζόνωση

Το όζον (O_3) είναι ένα άχρωμο, εξαιρετικά ασταθές αέριο που αντιδρά με ποικιλία οργανικών και ανόργανων διαλυμένων στο νερό ουσιών. Ακόμη, μπορεί να διασπαστεί ταχύτατα και να σχηματίσει οξειδωτικά μέσα μεταξύ των οποίων και η ρίζα υδροξυλίου ($-OH^\cdot$). Τόσο το μοριακό όζον όσο και η ρίζα υδροξυλίου είναι πολύ ισχυρά οξειδωτικά, αποτελεσματικά στην απολύμανση (Κυριακόπουλος, 2009).

Το όζον στο επίπεδο της θάλασσας είναι δύσκολο να βρεθεί. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις ανίχνευσής του είναι 0,1ppm και έπειτα από 30 περίπου λεπτά μετατρέπεται σε οξυγόνο. Έτσι, παράγεται βιομηχανικά μέσα σε κατάλληλο αντιδραστήρα (οζονιστήρας) από τη διέλευση επεξεργασμένου αέρα ή καθαρού οξυγόνου μέσα από δύο ηλεκτρόδια με υψηλή εναλλασσόμενη διαφορά δυναμικού (Νταρακάς, 2009; Κυριακόπουλος, 2009).

Η δόση που χρησιμοποιείται σε μια μονάδα επεξεργασίας νερού καθορίζεται από την ποιότητα του ακατέργαστου νερού και από το σκοπό για τον οποίο χρησιμοποιείται. Μονάδες όπου το όζον χρησιμοποιείται για την οξείδωση του σιδήρου και του μαγγανίου απαιτούν διαφορετική δόση όζοντος από εκείνη που απαιτείται για την απενεργοποίηση πρωτοζώων όπως του *Cryptosporidium* (Κυριακόπουλος, 2009). Για την απολύμανση βιολογικά κατεργασμένων λυμάτων απαιτείται όζον 15 – 20 gr/m^3 λυμάτων και η διάρκεια της αντίδρασης είναι 15-30 λεπτά ενώ για πλήρη καταστροφή των κυτταρικών δομών ακόμη και στην περίπτωση των ιών απαιτούνται υπολειμματικές συγκεντρώσεις 0.2 – 0.5 mg/L με χρόνο επαφής 6 λεπτά. Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απόσμιση του νερού που επιτυγχάνεται με 1 – 2 mg/L , δόση ικανή να οξειδώσει τις οργανικές ενώσεις που περιέχουν θείο και άζωτο και είναι οι κύριες αιτίες των οσμών. Παράλληλα με την αφαίρεση των οσμών, η χρήση όζοντος εμποδίζει την επανεμφάνισή τους καθώς οι αερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται κατά την επεξεργασία με όζον αποκλείουν το σχηματισμό οσμών. Η ικανότητα

απόσμισης τους όζοντος στηρίζεται αφενός στην αντιμικροβιακή δράση μέσω οξείδωσης των πρωτεϊνικών δομών βακτηρίων ή ιών και αφετέρου στην οξείδωση των οσμηρών ενώσεων ή στο σχηματισμό ασταθών ενώσεων με τους φορείς των οσμών (ουρία, φαινόλες κ.λπ.) (Νταρακάς, 2009).

Αξιολόγηση της οζόνωσης

Η χρήση όζοντος θεωρείται μια αποτελεσματική μέθοδος απολύμανσης για ποικίλους τύπους υδάτων όπως επιφανειακά και υπόγεια πόσιμα ύδατα, οικιακά και βιομηχανικά λύματα που προορίζονται για επαναχρησιμοποίηση ή απόθεση σε φυσικούς υδάτινους αποδέκτες αλλά και νερό πισίνας και πύργων ψύξης (Gottschalk et al., 2010) αφού καταστρέφει ταχύτατα μικροοργανισμούς ανθεκτικούς σε άλλα απολυμαντικά (π.χ. χλώριο) όπως πρωτόζωα, μύκητες, σπόρια και κύστες πρωτοζώων. Ακόμη, δεν έχει μεγάλη ευαισθησία ως προς τις συνθήκες pH και θερμοκρασίας καθώς διατηρείται αναλλοίωτη η απολυμαντική ικανότητά της για τιμές pH 6-10 και θερμοκρασία 2-30°C. Επιπροσθέτως, μειώνεται το χρώμα και η θολρότητα των αποβλήτων, βελτιώνεται η ποιότητα του υδάτινου αποδέκτη χάρη στην υψηλή συγκέντρωση διαλυμένου οξυγόνου στο αέριο εξόδο, δεν αυξάνεται η συγκέντρωση των ολικών διαλυμένων στερεών στα επεξεργασμένα λύματα ενώ το υπολειμματικό όζον - αν και τοξικό- δε δημιουργεί πρόβλημα στον υδάτινο αποδέκτη αφού αποσυντίθεται πολύ γρήγορα, σε αντίθεση με το υπολειμματικό χλώριο (Νταρακάς, 2009).

Παρ' όλα αυτά, προτιμάται η χρήση του ως ενδιάμεσο βήμα στη διαδικασία απολύμανσης (Gottschalk et al., 2010) κι όχι ως τελικό, καθώς το διαλυμένο όζον έχει μικρή διάρκεια ζωής που σημαίνει ότι πρέπει να χρησιμοποιείται επί τόπου, αμέσως μετά την παραγωγή του και να ακολουθείται από τη δράση κάποιου άλλου απολυμαντικού μέσου με υπολειμματική συγκέντρωση (π.χ. χλωρίου ή χλωραμινών). Άλλο σημαντικό μειονέκτημα είναι ο σχηματισμός επικίνδυνων για την υγεία ενώσεων – κυρίως βρωμίου όταν βρίσκονται βρωμιούχα άλατα σε υψηλά επίπεδα μέσα στο νερό (π.χ. παράγονται βρωμονιτρομεθάνια τα οποία ενοχοποιούνται για τοξικές επιδράσεις στο γενετικό υλικό αλλά και σε ολόκληρα τα κύτταρα) (Krasner et al., 2006; Plewa et al., 2004). Εκτός των παραπάνω, ανακύπτουν και πρακτικά ζητήματα όπως η ανάγκη για πιλοτική εγκατάσταση προκειμένου να βρεθεί η βέλτιστη δόση όζοντος, η απαίτηση μεγάλων ποσοτήτων όταν τα λύματα είναι βιομηχανικής προέλευσης και οι ρύποι τους καταναλώνουν μεγάλο μέρος του παρεχόμενου όζοντος και γενικότερα το υψηλό πάγιο και λειτουργικό κόστος (Νταρακάς, 2009).

1.8 Προηγμένες Διεργασίες Οξειδωσης

Οι παραπάνω τεχνικές απολύμανσης παρά την αποτελεσματικότητά τους σε πολλές περιπτώσεις και τα υπόλοιπα θετικά τους χαρακτηριστικά που τις καθιστούν τις πιο δημοφιλείς, εμφανίζουν, όπως προαναφέρθηκε, ιδιότητες που δημιουργούν προβληματισμό. Ιδιαίτερης σπουδαιότητας παράδειγμα μπορούν να θεωρηθούν, ορισμένα από τα δημιουργούμενα παραπροϊόντα της πλέον διαδεδομένης απολυμαντικής μεθόδου, της χλωρίωσης, που ενοχοποιούνται ως μεταλλαξιγόνα και σε κάποιες περιπτώσεις ως καρκινογόνα (Yang and Cheng, 2007; Lu et al., 2009; Coleman et al., 2005) έχοντας οδηγήσει στην ανάγκη εύρεσης και υιοθέτησης νέων τεχνολογιών απολύμανσης χωρίς επιβάρυνση για την ανθρώπινη υγεία.

Έτσι, έχει λάβει χώρα έρευνα και ανάπτυξη στο πεδίο των Προηγμένων Διεργασιών Οξειδωσης (Advanced Oxidation Processes - AOPs) – καινοτόμων τεχνολογιών επεξεργασίας του νερού που βασίζονται στην επί τόπου δημιουργία ενδιάμεσων υψηλής δραστηριότητας όπως H_2O_2 , OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, O_3 για την ανοργανοποίηση ανθεκτικών οργανικών ενώσεων και την αδρανοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών και παραπροϊόντων απολύμανσης (Pera-Titus et al., 2004; Esplugas et al., 2002). Σε αυτόν τον τύπο τεχνολογιών ανήκουν η φωτόλυση (UV-B,C), ο οζονισμός (O_3 , $\text{O}_3/\text{UV-B}$, $\text{O}_3/\text{H}_2\text{O}_2$), $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV-B}$, η ετερογενής φωτοκατάλυση ($\text{TiO}_2/\text{UV-A}$), το αντιδραστήριο Fenton και Photo-Fenton (ομοιογενής φωτοκατάλυση), η υγρή οξείδωση, η ηλεκτροχημική οξείδωση, η (καταλυτική ή μη) οξείδωση σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες κ.ά. (Πολίτη, 2012).

Η απολυμαντική δράση των εν λόγω διεργασιών έγκειται στην πρόκληση καταστροφών στα κυτταρικά συστατικά των μικροοργανισμών από τις δραστικές οξειδωτικές ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται και συνήθως είναι ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet), τα πιο ισχυρά οξειδωτικά μέσα μετά το φθόριο (Carp et al., 2004) (Πίνακας 5). Πιο συγκεκριμένα, οι ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με τα διαλυτά συστατικά εκκινώντας μια σειρά αντιδράσεων οξείδωσης. Αντιδρούν με οργανικές ενώσεις αποσπώντας ή δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες που προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις. Οι τελευταίες αντιδράσεις οδηγούν τελικά στην πλήρη μετατροπή των οργανικών ενώσεων σε CO_2 , H_2O και ανόργανα άλατα. Μάλιστα, λόγω του υψηλού δυναμικού αναγωγής των ριζών αυτών (2.8 V), είναι δυνατή η προσβολή πρακτικά όλων των οργανικών ρύπων των αποβλήτων (Carp et al., 2004). Αυτό έχει ως επακόλουθο οι Προηγμένες Διεργασίες Οξειδωσης να κερδίζουν το ενδιαφέρον της έρευνας σήμερα αφού συνδυάζουν την αποτελεσματική απολύμανση του νερού με την καταστροφή πολλών τοξικών μη βιοαποδομήσιμων υγρών και αέριων ουσιών χωρίς τη δημιουργία επικίνδυνων για την υγεία και το περιβάλλον παραπροϊόντων.

Πίνακας 5: Δυναμικό αναγωγή οξειδωτικών

<u>Οξειδωτικό</u>	<u>(V)</u>	<u>Οξειδωτικό</u>	<u>(V)</u>
F ₂	3.03	MnO ₄	1.68
OH[•]	2.80	ClO ₂	1.57
O	2.42	HClO	1.49
O ₃	2.07	Cl ₂	1.36
H ₂ O ₂	1.78	Br ₂	1.09

2 Φωτοκατάλυση

Μια από τις Προηγμένες Διεργασίες Οξείδωσης που έχει απασχολήσει πλήθος ερευνών τις τελευταίες δεκαετίες είναι η φωτοκατάλυση. Πρόκειται για την επιτάχυνση μιας φωτοαντίδρασης από την παρουσία καταλύτη (Mills and Hunte, 1997), ο οποίος, χωρίς να καταναλώνεται, μειώνει την ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης προσφέροντας έναν εναλλακτικό μηχανισμό πραγματοποίησής της.

Η φωτοκατάλυση διακρίνεται σε δυο τύπους, την ομογενή όπου ο καταλύτης βρίσκεται στην ίδια (υγρή) φάση με το εναιώρημα και την ετερογενή που περιλαμβάνει δυο διαφορετικές φάσεις.

2.1 Ετερογενής φωτοκατάλυση

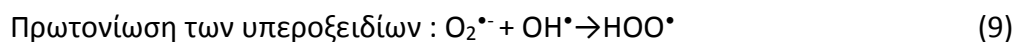
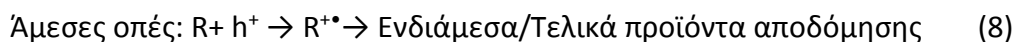
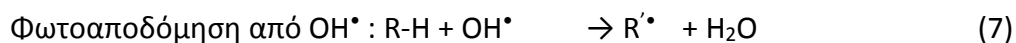
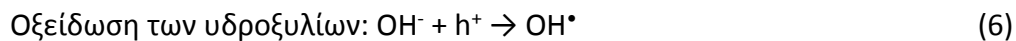
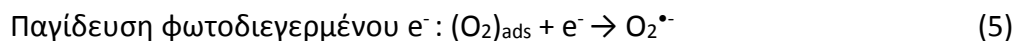
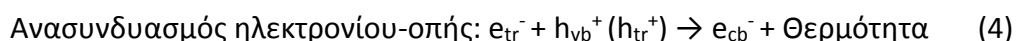
Η ετερογενής φωτοκατάλυση που χρησιμοποιεί ημιαγωγίμους καταλύτες (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , CdS , GaP and ZnS) έχει επιδείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα τόσο στη μετατροπή πλήθους σταθερών οργανικών σε εύκολα βιοδιασπώμενες ενώσεις και τελικά στη μετατροπή τους σε αβλαβές διοξείδιο του άνθρακα και νερό όσο και στην απολύμανση νερού.

2.1.1 Μηχανισμός λειτουργίας της ετερογενούς φωτοκατάλυσης

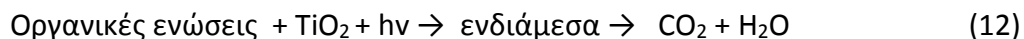
Οι βασικές αρχές της φωτοφυσικής και φωτοχημείας στις οποίες στηρίζεται η ετερογενής φωτοκατάλυση που χρησιμοποιεί ημιαγωγίμο καταλύτη έχουν αναφερθεί αρκετές φορές στη βιβλιογραφία (Gaya and Abdullah, 2008; Fujishima et al., 2000) και αφορούν στο φωτοηλεκτρικό φαινόμενο, έναν τρόπο μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική. Πρόκειται για ένα φαινόμενο όπου ο φωτισμός της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη επιφέρει αλλαγή στο δυναμικό του ηλεκτροδίου (ανοιχτό κύκλωμα) ή στο ρεύμα που ρέει στη διφασική περιοχή (κλειστό κύκλωμα).

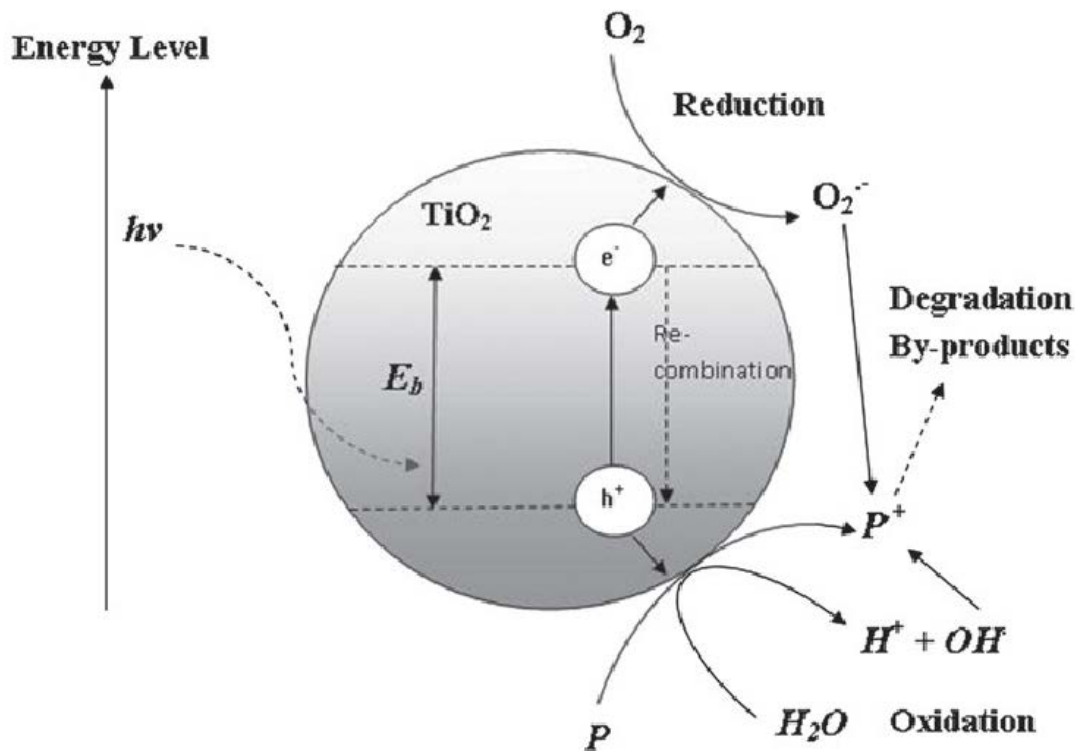
Σύμφωνα με το μοντέλο των μοριακών τροχιακών, η ηλεκτρονιακή δομή των περισσότερων ημιαγωγίμων υλικών περιλαμβάνει δυο σημαντικές ενεργειακές στάθμες. Η πρώτη που λέγεται ζώνη σθένους (valence band) είναι ανώτερη και πλήρης ηλεκτρονίων ενώ η δεύτερη, ονομάζεται ζώνη αγωγιμότητας, είναι χαμηλότερη και ελεύθερη ηλεκτρονίων. Μεταξύ τους παρεμβάλλεται η απαγορευμένη ζώνη. Το ενεργειακό κενό ανάμεσα τους αποκαλείται ενεργειακό χάσμα (E_{bg} , band gap energy)(Ευγενίδου, 2005).

Στην περίπτωση του TiO_2 , που χρησιμοποιείται ευρύτατα για την επαγωγή σειράς αναγωγικών και οξειδωτικών αντιδράσεων στην επιφάνειά του λόγω του μοναδικού ηλεκτρονίου του εξωτερικού του τροχιακού, το ενεργειακό χάσμα είναι 3.2 eV. Όταν πάνω στην επιφάνεια του καταλύτη φθάσει ενέργεια φωτονίου ($h\nu$) ίση ή μεγαλύτερη από την ενέργεια χάσματος, το μοναδικό ηλεκτρόνιο σθένους θα διεγερθεί από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας σε κάποια femtoseconds. Η Εικόνα 1 παρουσιάζει το μηχανισμό δημιουργίας του ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής όταν το σωματίδιο του TiO_2 ακτινοβοληθεί με επαρκή φωτεινή ενέργεια η οποία συνήθως αντιστοιχεί σε μήκη κύματος μικρότερα των 400nm. Η φωτονιακή διέγερση αφήνει πίσω μια κενή ζώνη σθένους δημιουργώντας έτσι το ζεύγος ηλεκτρονίου-οπής (e^-h^+). Η ακολουθία των αλυσιδωτών αντιδράσεων οξείδωσης-αναγωγής που συμβαίνουν στη φωτοδιεγερόμενη επιφάνεια είναι η εξής:



Οπότε συνολικά:





Εικόνα 1: Φωτοεπαγόμενος σχηματισμός ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής στην επιφάνεια κόκκου TiO₂ παρουσία ρύπου (P)

Το e_{tr}^- και το h_{tr}^+ στην εξίσωση 4 αναπαριστούν το ηλεκτρόνιο που παγιδεύεται στην επιφάνεια της ζώνης αγωγιμότητας και την οπή που παγιδεύεται στη ζώνη σθένους, αντίστοιχα. Αυτοί οι παγιδευμένοι φορείς φορτίου συνήθως περιβάλλονται από καταλύτη και δεν ανασυνδυάζονται αμέσως μετά τη διέγερση (Furube et al., 2001). Απουσία δεκτών ηλεκτρονίου (εξίσωση 4), το διεγερμένο ηλεκτρόνιο ανασυνδυάζεται με την οπή της ζώνης σθένους σε nanoseconds με ταυτόχρονη έκλυση θερμότητας. Έτσι, η παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων είναι κρίσιμης σημασίας για την καθυστέρηση του ανασυνδυασμού και άρα την επιτυχή φωτοκαταλυτική δράση. Η εξίσωση 5 απεικονίζει πώς η παρουσία οξυγόνου αποτρέπει τον ανασυνδυασμό του ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής καθώς επάγει το σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Αυτή η $O_2^{\cdot-}$ μπορεί έπειτα να λάβει πρωτόνιο σχηματίζοντας τη ρίζα υδροϋπεροξειδίου (HO_2^{\cdot}) και ακολούθως υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) (εξισώσεις 9 και 10, αντίστοιχα). Η HO_2^{\cdot} έχει επίσης αναφερθεί ότι μπορεί να αποτελέσει δέκτη ηλεκτρονίου κι έτσι η συνύπαρξη αυτών των ριζών μπορεί να επιμηκύνει ακόμη περισσότερο το χρόνο μέχρι τον ανασυνδυασμό. Όμως, πρέπει να τονιστεί ότι όλα αυτά τα γεγονότα της φωτοκατάλυσης λαμβάνουν χώρα χάρη στην παρουσία διαλυμένου οξυγόνου και μορίων νερού. Απουσία νερού, οι πολύ δραστικές ρίζες υδροξυλίου (OH^{\cdot}) δε θα μπορούσαν να σχηματιστούν και θα

εμπόδιζε την αποδόμηση οργανικών ενώσεων που βρίσκονται στην υδατική φάση. Κάποιες απλές οργανικές ενώσεις όπως το οξαλικό και το φορμικό οξύ μπορούν να ανοργανοποιηθούν με απευθείας ηλεκτροχημική οξείδωση όπου το e_{tr}^- λαμβάνεται από ιόντα μετάλλων χωρίς την παρουσία νερού (Byrne and Eggins, 1998). Παρόλο που η h_{tr}^+ θεωρείται ότι έχει την ικανότητα να οξειδώνει άμεσα οργανικές ενώσεις, δεν είναι απολύτως βέβαιο. Οι h_{tr}^+ είναι ισχυρά οξειδωτικά, ενώ τα e_{tr}^- είναι καλά αναγωγικά, ανάλογα με τον τύπο του καταλύτη και τις συνθήκες οξείδωσης. Πολλές μηχανιστικές μελέτες πάνω σε διάφορες οργανικές ενώσεις (π.χ. φαινόλη, χλωροφαινόλη, οξαλικό οξύ) έχουν εξετάσει εκτενώς τη φωτοαποδόμησή τους πάνω σε επιφάνειες TiO_2 . Οι αρωματικές ενώσεις μπορούν να υδροξυλιωθούν από τη δραστική OH^\bullet που οδηγεί σε επιτυχημένη οξείδωση/αναγωγή και τελικά σε άνοιγμα του δακτυλίου. Τα ενδιάμεσα που προκύπτουν, κυρίως αλδεΐδες και καρβοξυλικά οξέα, θα καρβοξυλιωθούν έπειτα παράγοντας αβλαβές διοξείδιο του άνθρακα και νερό. Από τη στιγμή που η φωτοκαταλυτική αντίδραση πραγματοποιείται πάνω στη διεγερμένη επιφάνεια TiO_2 , η κατανόηση των βημάτων της αντίδρασης που εμπλέκονται στη φωτοαποδόμηση των οργανικών ενώσεων είναι πολύ σημαντική για τη διατύπωση της κινητικής. Για την ετερογενή φωτοκατάλυση, οι υγρής φάσης οργανικές ενώσεις διασπώνται στα αντίστοιχα ενδιάμεσά τους και τελικά ανοργανοποιούνται, αν ο χρόνος επίδρασης της ακτινοβολίας είναι ικανός (εξίσωση 12).

Οι Vinodgopal και Kamat (1992) έχουν αναφέρει την εξάρτηση του ρυθμού φωτοαποδόμησης των οργανικών από την κάλυψη της επιφάνειας του φωτοκαταλύτη. Αυτό υπογραμμίζει τη σπουδαιότητα της προσρόφησης των μορίων ή της επιφανειακής επαφής με τον καταλύτη κατά τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία. Παρομοίως, η επιφάνεια αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών με τον καταλύτη κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας είναι πολύ σημαντική για την ενίσχυση του ρυθμού αδρανοποίησης των μικροοργανισμών. Όταν οι δημιουργούμενες ενεργές μορφές οξυγόνου έρχονται σε στενή επαφή με τους μικροοργανισμούς, το κυτταρικό τοίχωμα θα είναι η αρχική θέση επίθεσης (Maness et al., 1999). Η στιβάδα λιποπολυσακχαριτών του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος είναι ο πρώτος στόχος των φωτοεπαγόμενων ενεργών μορφών οξυγόνου και ακολουθούν η προσβολή της στιβάδας πεπτιδογλυκάνης, η υπεροξείδωση της λιπιδικής μεμβράνης και η τελική οξείδωση των πρωτεϊνών της μεμβράνης. Όλα αυτά οδηγούν σε ταχεία εκροή ιόντων καλίου από τα βακτηριακά κύτταρα επιφέροντας άμεση ελάττωση της ζωτικότητας του κυττάρου. Η μείωση της ζωτικότητας συνήθως συνδέεται με την υπεροξείδωση πολυακόρεστων φωσφολιπιδίων της πλασματικής μεμβράνης (δηλαδή απώλεια καίριων κυτταρικών λειτουργιών) που τελικά οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. Η δημιουργία οξειδωτικής καταπόνησης και οι επιδράσεις της στην κυτταρική μεμβράνη μπορεί να παρατηρηθεί με τη χρήση προηγμένης μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (advanced atomic force

microscopy) ή υπέρυθρης φασματοσκοπίας μετασχηματισμού κατά Fourier (attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy)(Chong et al., 2010).

2.1.2 Φωτοκαταλύτης TiO_2

Για να θεωρείται φωτοχημικά ενεργός ένας ημιαγωγός και να μπορεί να ενεργοποιήσει οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις, πρέπει το δυναμικό οξειδοαναγωγής της φωτοδημιουργούμενης οπής να είναι επαρκώς θετικό ώστε βάσει του μηχανισμού που προαναφέρθηκε να μπορούν να σχηματιστούν ρίζες υδροξυλίου που εν συνεχεία θα οξειδώσουν τις οργανικές ενώσεις. Επιπλέον, το δυναμικό οξειδοαναγωγής του φωτοδημιουργούμενου ηλεκτρονίου θα πρέπει να είναι επαρκώς αρνητικό ώστε να μπορεί να ανάγει το προσροφημένο οξυγόνο. Το ελάχιστο μήκος κύματος που απαιτείται για την προώθηση ενός ηλεκτρονίου από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας εξαρτάται από την ενέργεια κενής ζώνης (ενεργειακό χάσμα).

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στη φωτοκαταλυτική τεχνολογία μέχρι τώρα στρέφεται στο TiO_2 καθώς συγκεντρώνει τα περισσότερα θετικά χαρακτηριστικά μεταξύ των διάφορων φωτοκαταλυτών. Συναντάται σε τρεις κρυσταλλικές μορφές, οι οποίες είναι η ανατάση (η πιο σταθερή δομή στις χαμηλές θερμοκρασίες, ανήκει στο τετράγωνο κρυσταλλικό σύστημα), το ρουτίλιο (η πιο σταθερή δομή στις υψηλές θερμοκρασίες κι έτσι βρίσκεται ακόμη και σε πυριγενή πετρώματα, ανήκει στο τετράγωνο κρυσταλλικό σύστημα) και ο μπρουκίτης (συναντάται σε διάφορα ορυκτά και ανήκει στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα). Η ανατάση είναι η πιο δραστική φωτοκαταλυτικά, λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των ανιόντων OH^- και του H_2O στην επιφάνειά της, καθώς και λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτοπαραγόμενων e^- και h^+ (Χατζησυμεών, 2009; Πούλιος, 2007). Έτσι, μετά από πλήθος ερευνών τις τελευταίες δύο δεκαετίες που υποστηρίζουν το παραπάνω, χρησιμοποιείται κυρίως στη μορφή της ανατάσης ή στη συνδυασμένη μορφή ανατάσης – ρουτιλίου (Gaya and Abdulah, 2008; Malato et al., 2009; Parsons, 2004).

Το TiO_2 έχει εδραιωθεί ως ο πιο αποτελεσματικός καταλύτης καθώς είναι ο πιο φωτοενεργός υπό φωτεινή ενέργεια μήκους κύματος 300-390nm και μένει σταθερός μετά τους επαναλαμβανόμενους κύκλους κατάλυσης, ενώ το CdS ή το GaP διασπώνται παράγοντας τοξικά προϊόντα (Malato et al., 2009). Εκτός των παραπάνω, στην ευρεία χρησιμοποίησή του στη φωτοκαταλυτική επεξεργασία νερού έχουν συμβάλλει οι πολύπλευρες λειτουργικές ιδιότητές του, όπως η χημική και θερμική του σταθερότητα (Chong et al., 2010), το γεγονός ότι είναι βιολογικά αδρανής, η ανθεκτικότητά του στη φωτοδιάβρωση παρέχοντας τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, το χαμηλό του κόστος και η εύκολη παραγωγή και χρήση του (Χατζησυμεών, 2009; Πούλιος, 2007). Πρόσθετο πλεονέκτημα

αποτελεί ο χαμηλός ρυθμός επανασύνδεσης οπών (h^+) – ηλεκτρονίων (e^-), τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια του κόκκου. Η επανασύνδεση μειώνει τη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα των ημιαγωγών επειδή οδηγεί στην παραγωγή φωτονίων ή θερμότητας και όχι ριζών υδροξυλίου.

Αξιοσημείωτο μειονέκτημα του TiO_2 είναι το μεγάλο ενεργειακό του χάσμα (3.2 eV) που έχει ως αποτέλεσμα να ενεργοποιείται μόνο με υπεριώδη ακτινοβολία και συγκεκριμένα με φως μήκους κύματος μικρότερου των 388nm καθιστώντας δυνατή την αξιοποίηση μικρού μόνο μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας (5-6%). Γι' αυτόν το λόγο, την τελευταία δεκαετία έχουν γίνει προσπάθειες τροποποίησης αυτού του καταλύτη με την προσθήκη μετάλλων (χαλκός, κοβάλτιο, μαγγάνιο κ.ά) ή μη μετάλλων, κατά την οποία επιτυγχάνεται μείωση του ενεργειακού χάσματος και τελικά απορρόφηση σε μήκη κύματος κοντά στο ορατό φως (McEnoy et al., 2013; Lee et al., 2013; Feng et al., 2012; Deng et al., 2011; Binas et al., 2012; Karunakaran et al., 2010; Lu et al., 2003; Marugan et al., 2009).

Ακόμη, όπως συμβαίνει και με τους υπόλοιπους καταλύτες, απαιτείται διαχωρισμός του TiO_2 από το αιώρημα κατόπιν της επεξεργασίας, κάτι που είναι χρονοβόρο και κοστοβόρο. Λύση σε αυτό, μπορεί να αποτελεί η ακινητοποίησή του πάνω σε αδρανές υλικό που όμως οδηγεί σε μείωση της λειτουργικής επιφάνειας του καταλύτη (Aguedach et al., 2005).

2.1.3 Παράγοντες που επιδρούν στην ετερογενή φωτοκατάλυση

Ο ρυθμός οξείδωσης και η αποτελεσματικότητα της φωτοκατάλυσης εξαρτώνται ισχυρά από έναν αριθμό παραμέτρων που καθορίζουν τη φωτοανοργανοποίηση και τη φωτοαπολύμανση ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει η προσπάθεια βελτιστοποίησης του φωτοκαταλυτικού συστήματος μέσα από πρόσφατες προτεινόμενες μεθόδους.

- Συγκέντρωση καταλύτη

Η αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη μέχρι μια βέλτιστη τιμή, γενικά επιταχύνει και βελτιστοποιεί τη φωτοκαταλυτική διαδικασία καθώς αυξάνονται τα διαθέσιμα ενεργά κέντρα. Μάλιστα, θεωρείται ότι η συγκέντρωση του TiO_2 είναι ευθέως ανάλογη με το συνολικό ρυθμό της αντίδρασης (Gaya and Abdullah, 2008). Αυτή η γραμμική εξάρτηση υπάρχει μέχρι ενός σημείου έπειτα από το οποίο ο ρυθμός της αντίδρασης αρχίζει να μειώνεται και να γίνεται ανεξάρτητος από τη συγκέντρωση του TiO_2 . Όταν η συγκέντρωση του TiO_2 αυξηθεί πάνω από ένα επίπεδο κορεσμού, η αυξημένη θολερότητα που προκαλείται οδηγεί σε μείωση του συντελεστή απορρόφησης της ακτινοβολίας (Chen et al., 2007), κάτι στο οποίο συμβάλλει η γεωμετρία και οι συνθήκες λειτουργίας

του φωτοαντιδραστήρα (Bamba et al., 2008). Επίσης, σε περίπτωση υπερβολικής φόρτισης έχει παρατηρηθεί καθίζηση του φωτοκαταλύτη (Gogate et al., 2004).

- pH

Το pH είναι κύρια λειτουργική παράμετρος της φωτοκατάλυσης καθώς επιδρά στο φορτίο των κόκκων του καταλύτη, στο μέγεθος των συσσωματωμάτων του και στις θέσεις των ζωνών αγωγιμότητας και σθένους, επηρεάζοντας τελικά την προσρόφηση του υποστρώματος στον καταλύτη (Chong et al., 2010). Το ισοηλεκτρικό σημείο του ημιαγωγού (zero point charge - ZPC), έχει χρησιμοποιηθεί από πολλές έρευνες για τη μελέτη της επίδρασης του pH στη φωτοκαταλυτική επεξεργασία (Chong et al., 2009b,c; Ochuma et al., 2007; Chin et al., 2006; Toor et al., 2006; Dutta et al., 2004). Το ισοηλεκτρικό σημείο του TiO_2 εξαρτάται από τη μέθοδο παραγωγής του και κυμαίνεται από 4.5 έως 7.5 (Malato et al., 2009). Στην τιμή αυτή, λόγω της απουσίας ηλεκτροστατικής δύναμης, οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα σωματίδια του καταλύτη και στα συστατικά του νερού-λύματος είναι μηδαμινές. Σε $\text{pH} < \text{pH}_{\text{pzc}}(\text{TiO}_2)$ η επιφάνεια του καταλύτη φορτίζεται θετικά με αποτέλεσμα τη δημιουργία ελκτικής δύναμης προς τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια ενώ σε $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}(\text{TiO}_2)$ η επιφάνεια αποκτά αρνητικό φορτίο αποθώντας τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια. Σε μελέτη (Herrera Melián et al., 2000) παρατηρήθηκε ενίσχυση του ρυθμού αδρανοποίησης των βακτηρίων σε pH 5 ενώ μεταγενέστερη διερεύνηση (Rincón and Pulgarin, 2006) της φωτοκαταλυτικής αδρανοποίησης της *E.coli* δεν έδειξε διαφοροποίηση όταν το αρχικό pH ήταν 4-9. Σε αυτό το σημείο, χρειάζεται να αναφερθεί το ενδεχόμενο αλλοίωσης του αρχικού pH κατά τη διάρκεια της φωτοκατάλυσης από το σχηματισμό ενδιάμεσων προϊόντων που φέρουν διάφορες λειτουργικές ομάδες και επηρεάζουν ποικιλοτρόπως το pH του νερού (Stylidi et al., 2003).

- Θερμοκρασία

Η βέλτιστη θερμοκρασία της αντίδρασης θεωρείται ότι είναι μεταξύ 20°C και 80°C για τη φωτοανοργανοποίηση (Malato et al., 2009) καθώς υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την επανασύνδεση των φορέων φορτίου και δυσχεραίνει την προσρόφηση των οργανικών ενώσεων πάνω στην επιφάνεια του TiO_2 (Gaya and Abdullah, 2008) ενώ κάτω των 80°C ενισχύεται η προσρόφηση (αυθόρμητο εξώθερμο φαινόμενο). Περαιτέρω μείωση της θερμοκρασίας κοντά στους 0°C προκαλεί αύξηση της ενέργειας ενεργοποίησης. Όταν σκοπός της επεξεργασίας είναι η απολύμανση, γενικά όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο αυξάνεται ο ρυθμός αδρανοποίησης των μικροοργανισμών

(Rincón and Pulgarin, 2003). Αυτό συμφωνεί με την εξίσωση Van't Hoffe-Arrhenius (εξίσωση 13) όπου η σταθερά ρυθμού k είναι ανάλογη με την εκθετική ($-1/T$):

$$\ln\left(\frac{k_1}{k_2}\right) = -\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1}\right) \quad (\text{εξίσωση 13})$$

Όπου

k_1, k_2 οι σταθερές για τις θερμοκρασίες T_1 και T_2

E_a η ενέργεια ενεργοποίησης

R η παγκόσμια σταθερά των αερίων

Παρ' όλα αυτά, μέχρι τώρα δεν υπάρχουν εκτενείς μελέτες που να συγκρίνουν την επίδραση της ετερογενούς φωτοκατάλυσης σε κάθε τύπο μικροοργανισμού κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες (Herrmann, 2005). Έτσι, προκειμένου να αποφεύγεται το υψηλό κόστος θέρμανσης του νερού είθισται η φωτοκατάλυση να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου καθώς παραμένει αποτελεσματική και σε αυτές τις συνθήκες.

- Διαλυμένο οξυγόνο

Το διαλυμένο οξυγόνο παίζει σημαντικό ρόλο στη φωτοκαταλυτική αντίδραση αφού διασφαλίζει την παρουσία δεκτών ηλεκτρονίων που παγιδεύουν το διεγερμένο ηλεκτρόνιο της ζώνης αγωγιμότητας αποκλείοντας την επανασύνδεση (Chong et al., 2009b).

- Αρχική συγκέντρωση και είδος του υποστρώματος

Έχει αναφερθεί σε πολλές μελέτες η εξάρτηση του ρυθμού της ετερογενούς φωτοκατάλυσης από τη συγκέντρωση των συστατικών του νερού (Ochuma et al., 2007; Toor et al., 2006; Chong et al., 2009b,c). Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών προκαλούν κορεσμό της επιφάνειας του TiO_2 και μειώνουν την αποτελεσματικότητα των φωτονίων καθιστώντας συχνά απαραίτητη την αραίωση σε εκροές υψηλών συγκεντρώσεων (Konstantinou and Albanis, 2004). Όμως, η αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος μέχρι ένα βαθμό αυξάνει το ρυθμό της αντίδρασης καθώς αυξάνεται η πιθανότητα σχηματισμού OH^\bullet στον καταλύτη, επομένως και η πιθανότητα αντίδρασης των OH^\bullet με το ρύπο (Τσίμας, 2007).

Σημασία πέρα από τη συγκέντρωση έχει και το είδος του ρύπου. Δεν εμφανίζουν όλα τα οργανικά την ίδια επίδραση στην απαιτούμενη διάρκεια της ακτινοβόλησης κάτι που εξαρτάται κι από τη χημική φύση των ενώσεων (Bahnemann, 2004; Bhatkhnade et al., 2004). Αντίστοιχα, έχει δημιουργηθεί μια κατάταξη των μικροοργανισμών ως προς την ανθεκτικότητά τους απέναντι στην

απολύμανση γενικά. Μεταξύ όλων, οι πιο ανθεκτικές μορφές μικροοργανισμών είναι τα prions, ακολουθούμενα από τα κοκκίδια (*Cryptosporidium*), τα βακτηριακά ενδοσπόρια (π.χ. *Bacillus*), τα μυκοβακτηρίδια (*M. tuberculosis*), τους ιούς (π.χ. *poliovirus*), τους μύκητες (π.χ. *Aspergillus*), τα Gram-αρνητικά βακτήρια (π.χ. *Pseudomonas*) και τελικά τα Gram-θετικά βακτήρια (π.χ. *Enterococcus*) (Malato et al., 2009). Οι διαφορές τους εξηγούνται από τη διαπερατότητα του κυτταρικού τους τοιχώματος, το μέγεθος και την πολυπλοκότητα των εκάστοτε μικροοργανισμών. Τα περισσότερα βακτήρια φαίνεται ότι μπορούν να θανατωθούν εύκολα με φωτοκατάλυση με TiO_2 αλλά στόχος πρέπει να είναι η πλήρης αδρανοποίηση ώστε να διασφαλιστεί ότι δε θα υπάρχουν μετά την επεξεργασία στελέχη ζωντανά, ικανά να μολύνουν (WHO, 2006) καθώς κάποιοι μικροοργανισμοί όπως τα πρωτόζωα είναι ιδιαίτερα μολυσματικοί ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις δημιουργώντας κίνδυνο επιδημιών από το επεξεργασμένο νερό (Chong et al., 2010).

- Μήκος κύματος

Η επίδραση της εκπομπής φωτός διαφορετικών μηκών κύματος είναι σημαντική παράμετρος για το ρυθμό της φωτοκαταλυτικής αντίδρασης και εξαρτάται από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου καταλύτη που καθορίζει το ενεργειακό κενό ανάμεσα στις ζώνες σθένους και αγωγιμότητας (Τσίμας 2007; Gogate et al, 2004). Για τον εμπορικό P25 TiO_2 , που έχει κρυσταλλική αναλογία ανατάσης 70/80:20/30, κατάλληλο για τη φωτονιακή ενεργοποίηση είναι μήκος κύματος χαμηλότερο των 388nm (Herrmann, 1999; Bahnemann, 2004; Τσίμας, 2007). Η κρυσταλλική φάση του ρουτιλίου του TiO_2 έχει μικρότερη ενέργεια χάσματος ($E_B \sim 3.02 \text{ eV}$) σε σχέση με την ανατάση ($E_B \sim 3.20 \text{ eV}$) (Gaya and Abdullah, 2008). Αυτό καταδεικνύει ότι το TiO_2 στη μορφή του ρουτιλίου μπορεί να ενεργοποιηθεί με μήκος κύματος έως και 400 nm, ανάλογα με το όριο του ενεργειακού χάσματος για τον χρησιμοποιούμενο τύπο ρουτιλίου.

- Ένταση φωτός

Η οργανική αποδόμηση παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας σε πολλές μελέτες έχει γραμμική συσχέτιση με την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (Glatzmaier et al., 1990; Glatzmaier, 1991; Magrini and Webb, 1990), όμως μετέπειτα έρευνα έδειξε ότι πάνω από μια οριακή τιμή (20 mW/cm^2), η γραμμική εξάρτηση του ρυθμού της αντίδρασης από την ένταση μετατρέπεται σε εξάρτηση από την τετραγωνική ρίζα της ενώ σε υψηλές εντάσεις, η εξάρτηση μηδενίζεται (Malato et al., 2009). Αυτό εξηγείται από την κάλυψη της επιφάνειας του καταλύτη η οποία οδηγεί σε περιορισμό της μεταφοράς μάζας κατά την προσρόφηση και εκρόφηση, αποτρέποντας έτσι την είσοδο της

ακτινοβολίας, πρόβλημα που θα μπορούσε να περιοριστεί με αύξηση της τυρβώδους ροής. Επίσης, τα απομακρυνόμενα από την επιφάνεια του καταλύτη τελικά προϊόντα μπορούν να επηρεάσουν την εξάρτηση από την ένταση, καθώς ίσως παγιδεύουν τους δέκτες ηλεκτρονίων και ευνοούν την επανασύνδεση ηλεκτρονίων-οπών.

Επιπροσθέτως, έχει αναφερθεί ότι η απολυμαντική ικανότητα του φωτοκαταλύτη εξαρτάται έντονα από την ένταση της ακτινοβολίας όταν δε γίνονται διακοπές (Rincón and Pulgarin, 2004). Έλεγχος της επίδρασης των εντάσεων 400 και 1000 W/m² στη βακτηριακή θανάτωση και εκ νέου αύξηση των μικροβίων, έδειξε ότι υψηλή ένταση χωρίς διακοπές στην ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει μη αναστρέψιμη βλάβη στην *E. coli*. Όταν γινόταν διακοπόμενη ακτινοβολία παρατηρήθηκε επανεμφάνιση βακτηρίων τις επόμενες 24 ή 48 ώρες. Ορισμένες μελέτες προτείνουν ότι αυτό οφείλεται στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης σε συνθήκες σκότους όπου τα μερικώς κατεστραμμένα κύτταρα επανακάμπτουν παρουσία θρεπτικών (Sun et al., 2003; Shang et al., 2009). Άλλοι θεωρούν ότι τα κύτταρα που έχουν υποστεί βλάβη αλλά δεν είναι πλήρως απενεργοποιημένα μπορούν να αποκτήσουν ξανά τη ζωτικότητά τους μέσω επιδιορθώσεων σε συνθήκες φωτός και συγκεκριμένα κάτω από ακτινοβολία 300-500 nm (Rincón and Pulgarin, 2003; Sichel et al., 2007). Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει βεβαιότητα για τη βέλτιστη ένταση ακτινοβολίας. Τα αποτελέσματα της απολύμανσης με 400 W/m² για 2,5 ώρες ίσως διαφέρουν από εκείνα της επίδρασης 1000 W/m² για 1 ώρα. Έτσι, για την πρόβλεψη της ελάχιστης απαιτούμενης ακτινοβολίας, είναι σημαντική η διενέργεια προκαταρκτικών μελετών πάνω στην απόδοση του φωτοαντιδραστήρα και στις εκάστοτε μικροβιακές κοινότητες (που μπορεί να παρουσιάζουν ποικίλου βαθμού ανθεκτικότητα) (Chong et al., 2010).

- Παρουσία ιόντων

Πολύ συχνά - στα βιομηχανικά κυρίως - απόβλητα περιέχονται άλατα σε διάφορες συγκεντρώσεις, μεγάλο μέρος των οποίων βρίσκεται σε ιονισμένη μορφή. Η παρουσία ιόντων είναι δυνατόν να επηρεάσει τη διεργασία αποδόμησης μέσω διάφορων μηχανισμών: προσρόφηση των ρύπων πάνω στα ιόντα, αντίδραση των ιόντων με τις ρίζες υδροξυλίου και απορρόφηση της υπερϊώδους ακτινοβολίας από αυτά (Gogate et al., 2004).

2.1.4 Αξιολόγηση της ετερογενούς φωτοκατάλυσης

Στην αξιολόγηση της ετερογενούς φωτοκατάλυσης ως μια πολύ καλή εναλλακτική μέθοδο επεξεργασίας νερού έχουν οδηγήσει ένας αριθμός σημαντικών χαρακτηριστικών της όπως:

- ότι η συνήθης θερμοκρασία και πίεση του περιβάλλοντος είναι κατάλληλες για τη συγκεκριμένη επεξεργασία (Chong et al., 2010)
- ότι επιτυγχάνεται πλήρης ανοργανοποίηση των αντιδρώντων και των ενδιάμεσων ενώσεων χωρίς δευτερογενή ρύπανση. Έχει διαπιστωθεί σε πολλές μελέτες ότι οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) που δημιουργούνται ως αποτέλεσμα του φωτοεπαγόμενου διαχωρισμού φορτίου στις επιφάνειες του TiO_2 για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών και την ανοργανοποίηση οργανικών ενώσεων δεν παράγουν δευτερογενείς ρύπους (Chong et al., 2010) ενώ παράλληλα καταστρέφουν και τυχόν τοξικά οργανικά μόρια όπως αυτά που περιέχονται σε φυτοφάρμακα (Μανιός, 2003).
- ότι το λειτουργικό κόστος είναι χαμηλό τόσο λόγω των σχετικά φθηνών καταλυτών και της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησής τους μετά από ανάκτηση όσο και λόγω της δυνατότητας χρησιμοποίησης της ηλιακής ακτινοβολίας ως πηγή υπεριώδους ακτινοβολίας σε ορισμένες περιοχές (Chong et al., 2010; Μανιός, 2003).
- ότι το TiO_2 που χρησιμοποιείται συνήθως ως φωτοκαταλύτης δεν είναι τοξικό και ταυτόχρονα είναι χημικά σταθερό σε μεγάλο εύρος τιμών pH.
- ότι το O_2 που απαιτείται για τη φωτοκατάλυση υπάρχει άφθονο στην ατμόσφαιρα.
- είναι αποτελεσματική απολυμαντική μέθοδος και μάλιστα με πιο μόνιμα αποτελέσματα αφού η δράση των υδροξυλίων, που κυρίως παράγονται από τη φωτοκατάλυση, έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση και συνεπώς καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η μείωση του ρυθμού αναγέννησης των παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και η μείωση του αναγεννημένου πληθυσμού (Μανιός, 2003).
- ότι είναι εφαρμόσιμη και για χαμηλές συγκεντρώσεις ρύπου.
- ότι η διάταξη είναι απλή, με μεγάλη διάρκεια ζωής και μικρές απαιτήσεις ελέγχου (Ξεκουκουλωτάκης, 2008).

Ωστόσο, η ετερογενής φωτοκατάλυση αντιμετωπίζει το μειονέκτημα της ανάγκης απομάκρυνσης του καταλύτη είτε με διήθηση που κοστίζει σε χρόνο και σε χρήμα (Chong et al., 2010; Gogate and Pendent, 2004) είτε με ακινητοποίησή του σε στερεές επιφάνειες. Προσπάθειες για το τελευταίο έχουν γίνει με τη χρήση ινών πυριτίου, γυαλιού και άνθρακα, πλεγμένου υφάσματος ινών, κεραμικών υλικών ή γύρω από το περίβλημα της πηγής φωτός (Dalrymple et al., 2007), όμως η μέθοδος αυτή ελαττώνει τη διαθέσιμη λειτουργική επιφάνεια του καταλύτη.

Ακόμη, λόγω του μικρού ρυθμού των αντιδράσεων της φωτοκατάλυσης χρειάζεται παροχή μεγάλης ποσότητας καταλύτη ενώ επίσης, εξαιτίας της θολερότητας του εναιωρήματος, της διασποράς του φωτός και της απορρόφησής του από το υγρό καθίσταται αδύνατη η ομοιόμορφη ακτινοβολήση της επιφάνειας του ημιαγωγού (Gogate and Pendit, 2004).

Τέλος, από ορισμένους προτείνεται λόγω της απουσίας υπολειμματικής δράσης, η ετερογενής φωτοκατάλυση να χρησιμοποιείται όχι μόνη αλλά κυρίως σαν μέθοδος προκατεργασίας, πριν τη χλωρίωση (Parsons, 2004; Malato et al., 2009).

3 *Klebsiella pneumoniae*

Οι υδάτινοι φορείς και τα υγρά απόβλητα περιέχουν πλήθος διαφορετικών μικροοργανισμών - βακτηρίων, μυκήτων, πρωτοζώων και ιών - μέρος των οποίων είναι παθογόνοι. Ορισμένοι από αυτούς – κυρίως εκείνοι που βρίσκονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, είναι σχετικά ακίνδυνοι και πιο εύκολο να αναπτυχθούν, απομονωθούν και προσδιοριστούν ενώ παράλληλα συνήθως η παρουσία τους στο νερό σημαίνει και τη μόλυνση από άλλους μικροοργανισμούς - έχουν απασχολήσει περισσότερες έρευνες σε σχέση με άλλους. Η *E. coli*, που συγκεντρώνει τα παραπάνω χαρακτηριστικά σε πολύ σημαντικό βαθμό, αποτελεί τον πιο μελετημένο μικροοργανισμό ως προς διάφορες πτυχές άρα και ως προς την ανθεκτικότητά της απέναντι στην απολύμανση. Έτσι, κάποιοι άλλοι μικροοργανισμοί, σημαντικοί για τη δημόσια υγεία, φαίνεται να χρήζουν επιπλέον έρευνας ώστε να απαντηθούν περισσότερα ερωτήματα γύρω από αυτούς. Στους τελευταίους ανήκει και η *Klebsiella sp.*

Η *Klebsiella* είναι εντερικός, αρνητικός κατά gram βάκιλος, μη σπορογόνος, προαιρετικά αναερόβιος που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Πρόκειται για μη κινητό βακτήριο που έχει τη δυνατότητα να αναπτύσσει βλενώδεις αποικίες με τη βοήθεια του πολυσακχαριτικού ελύτρου που διαθέτει. Ως προς τις βιοχημικές ιδιότητές της, ζυμώνει τη γλυκόζη παράγοντας οξύ, ανάγει τα νιτρικά και παράγει καταλάση αλλά όχι οξειδάση (Donnenberg, 2010).

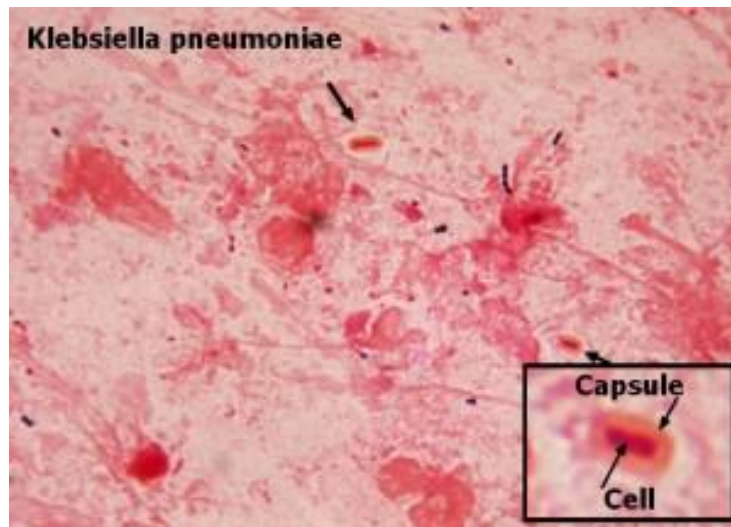
Η *Klebsiella* συναντάται παντού στη φύση, τόσο στο περιβάλλον όπου βρίσκεται στην επιφάνεια των υδάτων, στο έδαφος και στα φυτά όσο και στο βλεννογόνο των θηλαστικών (Bagley et al., 1978; Brovn et al., 1973; Edberg et al., 1986; Matsen et al., 1974; Seider et al., 1975). Στον άνθρωπο, ως σαπρόφυτο αποικίζει το ρινοφάρυγγα και το γαστρεντερικό σωλήνα ενώ σε ορισμένα άτομα όπως στους αλκοολικούς και στους διαβητικούς αναπτύσσει μεγάλο αριθμό αποικιών στο στοματοφάρυγγα (Mackowiak et al., 1978). Αποτελεί ένα από τα αίτια της βακτηριακής πνευμονίας της κοινότητας και έχει υψηλό ποσοστό θνητότητας αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα. Παρ' όλα αυτά, η πλειοψηφία των λοιμώξεων από *Klebsiella* παρατηρείται στα νοσοκομειακά περιβάλλοντα. Θεωρείται ευκαιριακό παθογόνο που προσβάλλει ανοσοκατεσταλμένα άτομα τα οποία νοσηλεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα και ιδιαίτερα αν πάσχουν από σοβαρά υποκείμενα νοσήματα όπως ο σακχαρώδης διαβήτης ή η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια. Στο νοσοκομειακό περιβάλλον ο βαθμός φορέας των ασθενών μεταβάλλεται δραματικά ανάλογα με τη διάρκεια της νοσηλείας, ενώ δεν πρέπει να αγνοηθεί το γεγονός ότι και το νοσηλευτικό προσωπικό είναι σημαντικός φορέας (Casewell and Phillips, 1978; Cooke et al., 1979). Άλλες δεξαμενές που ευθύνονται για τη διασπορά του είναι οι ιατρικές συσκευές ή όργανα και οι παράγοντες αίματος (Jumma et al., 1992; Montgomerie et al.,

1979) που έχουν μολυνθεί εξαιτίας ελλιπών μέτρων υγιεινής. Παρ'όλα αυτά, ο αποικισμός και η μετέπειτα λοίμωξη από τη νοσοκομειακή *Klebsiella* φαίνεται να σχετίζεται περισσότερο με τη χρήση αντιβιοτικών που ασκούν πίεση στα στελέχη του μικροβίου και σε μικρότερο βαθμό με άλλους παράγοντες που αφορούν την παροχή υπηρεσιών από το ιατρικό ή νοσηλευτικό προσωπικό (Γεωργούση, 2010; Pollack et al., 1972; Rose et al., 1968).

Το πιο σημαντικό κλινικά είδος του γένους, αυτό στο οποίο οφείλονται οι περισσότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις από *Klebsiella*, είναι η *K. pneumoniae*. Είναι υπεύθυνο για το 10% όλων των νοσοκομειακών λοιμώξεων και συχνή αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού, του αναπνευστικού και των μαλακών μορίων αλλά και σηψαιμίας, ιδιαίτερα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς (Podschun and Ullmann, 1998; Brisse et al., 2006). Στις προκαλούμενες λοιμώξεις περιλαμβάνονται επίσης λοιμώξεις τραυμάτων, κεντρικών φλεβικών γραμμών, χοληφόρων οδών αλλά και περιπτώσεις περιτονίτιδας και μηνιγγίτιδας (Γεωργούση, 2010).

Τα τελευταία χρόνια έχουν παρατηρηθεί νοσοκομειακές «επιδημίες» από ανθεκτικά σε πολλά αντιβιοτικά στελέχη (multi-drug resistant) *K. pneumoniae* σε Μονάδες Νεογνών, Εντατικής Θεραπείας, Αυξημένης Φροντίδας χειρουργημένων ασθενών καθώς και σε χειρουργικές και παθολογικές κλινικές. Στα πολυανθεκτικά στελέχη ανήκουν σχετικά νέοι τύποι στελεχών όπως εκείνα που παράγουν ευρέως φάσματος-β-λακταμάσες (ESBLs) και εκείνα που παράγουν καρβαπενεμάσες (imipenem-resistant), δηλαδή στελέχη που παράγουν ένζυμα τα οποία καταστρέφουν κάποια από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα αντιβιοτικά. Η συχνότητα των πρώτων (ESBLs) σε κλινικό επίπεδο έχει αυξηθεί με την πάροδο των ετών ενώ τις τελευταίες 2 δεκαετίες έχουν εισβάλλει στο νοσοκομειακό περιβάλλον και τα δεύτερα (imipenem-resistant) τα οποία προκαλούν ιδιαίτερα απειλητικές λοιμώξεις, με μικρά ποσοστά επιβίωσης των ασθενών λόγω ανεπάρκειας των θεραπευτικών επιλογών.

Η ανθεκτική κάψουλα από πολυσακχαρίτες που διαθέτει το μικρόβιο αυξάνει τη μολυσματικότητά του προστατεύοντάς το από τη φαγοκυττάρωση και από τους βακτηριοκτόνους παράγοντες του ορού (Burke et al., 2009; Podschun et al., 1992) και βοηθώντας στην προσκόλλησή του στα επιθηλιακά κύτταρα των ουροφόρων οδών (Struve et al, 2003) με τους πρωτεϊνικούς κροσσούς που διαθέτει. Αυτό σε συνδυασμό με την αντοχή της στο νοσοκομειακό περιβάλλον εξαιτίας της διασποράς γονιδίων ανθεκτικότητας από μικρόβιο σε μικρόβιο μέσω πλασμιδίων (Γεωργούση, 2010) τοποθετούν την *K. pneumoniae* στα πιο μολυσματικά και παθογόνα μικρόβια, ιδιαίτερα για ευαίσθητες ομάδες πληθυσμού και ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (Yousef et al., 2012; Bitton, 2011).



Εικόνα 2: Κύτταρα της *K.pneumoniae*(www.mrsatoday.com)

4 Γενετική τυποποίηση της *K. pneumoniae*

4.1 Η RAPD-PCR

Η ανάγκη για ανίχνευση και διαφοροποίηση των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά μικροβιακών στελεχών που συχνά προκαλούν σοβαρά προβλήματα νοσοκομειακών επιδημιών έχει οδηγήσει στη δοκιμή και εφαρμογή ποικιλίας μεθόδων ανίχνευσης του αποτυπώματος του DNA μεταξύ των οποίων και ο καθορισμός ριβοτύπου (ribotyping), η ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου (pulsed field gel electrophoresis, PFGE), αλλά και μέθοδοι που στηρίζονται στην PCR όπως το τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (random amplified polymorphic DNA-PCR, RAPD-PCR) και ο πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (amplified fragment length DNA-PCR, AFLP-PCR). Αυτές οι μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτός των περιπτώσεων άλλων μικροοργανισμών και στη διαφοροποίηση των κλινικών στελεχών της *K. pneumoniae* για επιδημιολογικές μελέτες και διαχείριση νοσοκομειακών λοιμώξεων (Arlet et al., 1994; Brisse and Verhoef, 2001; Jonas et al., 2004; Burke et al., 2009; Ashayeri-panah et al., 2012; Baroud et al., 2013; Sinha et al., 2008; Deschaght et al., 2011; Munoz et al., 2007). Μεταξύ αυτών, η PFGE θεωρείται η πιο καλή μέθοδος διάκρισης των στελεχών (Pettigrew et al., 2002) αλλά λόγω του ότι είναι χρονοβόρος και κοστοβόρος, σημαντικό ενδιαφέρον συγκεντρώνεται στην RAPD-PCR καθώς έχει οικονομικά και πρακτικά πλεονεκτήματα (Gori et al., 1996; Li et al., 2009).

Η RAPD-PCR αποτελεί ένα απλό και οικονομικό σχετικά εργαλείο για τη μελέτη της γονοτυπικής εγγύτητας ενός περιορισμένου αριθμού απομονώσεων, δίνοντας τη δυνατότητα ανίχνευσης και της επαγόμενης από κάποια απολυμαντική διαδικασία γενετικής ποικιλοτήτά τους (Deschaght et al., 2011).

Πρόκειται για έναν τύπο PCR όπου τα θραύσματα του DNA τα οποία πολλαπλασιάζονται είναι τυχαία και δημιουργούν πρότυπα διαφορετικά για το κάθε στέλεχος. Χρησιμοποιείται ένας μικρού μήκους (8-12 νουκλεοτιδίων) εκκινητής ο οποίος θα ξεκινήσει να πολλαπλασιάζει ή όχι ένα τμήμα DNA ανάλογα με τις θέσεις που είναι συμπληρωματικές προς την αλληλουχία του εκκινητή (Williams et al., 1990). Δεν παράγεται θραύσμα αν οι εκκινητές υβριδοποιήθηκαν πολύ μακριά ή τα 3' άκρα των εκκινητών δεν είναι απέναντι το ένα από το άλλο. Γι'αυτό αν μια μετάλλαξη συμβεί στο DNA-μήτρα στη θέση που πριν ήταν συμπληρωματική με τον εκκινητή, δε θα παραχθεί προϊόν, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικού προτύπου ζωνών στο gel (NCBI). Η επιλογή της σωστής αλληλουχίας του

εκκινητή είναι πολύ σημαντική καθώς διαφορετικές αλληλουχίες θα παράγουν διαφορετικά πρότυπα ζωνών και ίσως επιτρέπουν μια πιο εξειδικευμένη αναγνώριση των στελεχών.

Σε αντίθεση με την απλή PCR, στην RAPD-PCR δεν απαιτείται γνώση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού-στόχου καθώς οι εκκινητές θα συνδεθούν σε κάποιο σημείο της αλληλουχίας αλλά δεν είναι ξεκάθαρο το πού ακριβώς (Mbwana et al., 2006). Αυτό κάνει τη μέθοδο ιδανική για τη σύγκριση του DNA βιολογικών συστημάτων που δε βρίσκονται στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας επομένως δε γνωρίζουμε πολλά στοιχεία για την αλληλουχία του γενετικού τους υλικού ή για ένα σύστημα όπου συγκρίνονται σχετικά λίγες αλληλουχίες DNA, αλλά δεν είναι κατάλληλη για τη δημιουργία βάσης δεδομένων.

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος αυτή έχει δεχτεί κριτική που βασίζεται κυρίως στην απουσία επαναληψιμότητας, εξαιτίας των συνθηκών χαμηλής αυστηρότητας στις οποίες πραγματοποιείται, όπως και των πολυάριθμων παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν τα προφίλ της (Ellsworth et al., 1993; Khandka et al., 1997, Ashayeri-panah et al., 2012). Έχει φανεί ότι τα πρότυπα της RAPD επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του εκκινητή, των νουκλεοτιδίων, της πολυμεράσης και του $MgCl_2$, από το δείγμα του DNA και την καθαρότητά του, από το προφίλ των θερμικών κύκλων και από τον τύπο του θερμοκυκλοποιητή (Ellsworth et al., 1993; MacPherson et al., 1993; Saunders et al., 2001; Blixt et al., 2003; Atienzar and Jha, 2006; Peng et al., 2007). Θεωρείται όμως, ότι μετά από σχολαστική βελτιστοποίηση και αυστηρή εφαρμογή των αντίστοιχων πρωτοκόλλων, μπορεί να είναι μια αξιόπιστη, ευαίσθητη και αναπαράξιμη μέθοδος για την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών σε μελέτες γενετικής ποικιλομορφίας (Blixt et al., 2003; Atienzar and Jha, 2006; Peng et al., 2007) και αυτό μαζί με το οικονομικό της πλεονέκτημα την καθιστούν συχνά προτιμητέα.

5 ΣΚΟΠΟΣ

Η *K. pneumoniae* αποτελεί ευκαιριακό παθογόνο που, όπως προαναφέρθηκε, αποδεικνύεται συχνά επικίνδυνο – ιδιαίτερα για συγκεκριμένες ομάδες του ανθρώπινου πληθυσμού. Δεδομένης της ανθεκτικότητάς της στο περιβάλλον και του γεγονότος ότι μεταδίδεται μέσω της κατανάλωσης νερού, είναι επιτακτική ανάγκη να ερευνηθούν αποτελεσματικές και αξιόπιστες τεχνικές απολύμανσης του νερού, που θα την αδρανοποιούν, παρέχοντας κατάλληλα μέτρα ελέγχου της (Venieri et al., 2014). Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος απολύμανσης, η χλωρίωση, εγείρει προβληματισμούς για την ασφάλειά της ενώ φαίνεται ότι εναντίον κάποιων στελεχών που απομονώνονται από το περιβάλλον δεν έχει την απαιτούμενη αποτελεσματικότητα λόγω της παραγωγής από το βακτήριο εξωκυτταρικού πολυμερούς, την αλλαγή των μεμβρανικών λιπιδίων του και της αυξημένης συσσωμάτωσης των κυττάρων του.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να ανιχνευθεί η αποτελεσματικότητα ενισχυμένων με μέταλλα καταλυτών στην αδρανοποίηση υπό προσομειωμένη ηλιακή ακτινοβολία ανθεκτικού στελέχους του βακτηρίου *K. pneumoniae*. Γίνεται προσπάθεια τόσο να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα των εν λόγω καταλυτών με εκείνη του εμπορικού καταλύτη P25 που χρησιμοποιείται σήμερα όσο και να ελεγχθεί η επίδραση διάφορων παραμέτρων, όπως η συγκέντρωση του φωτοκαταλύτη, η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών, η περιεκτικότητα του καταλύτη σε μέταλλο ή μέταλλα και το επιδρόν ηλεκτρομαγνητικό φάσμα, στην αποτελεσματικότητα της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας με τους συγκεκριμένους καταλύτες. Ακόμη, επιχειρείται να ελεγχθεί η τοξικότητα των εμπεριεχόμενων στους καταλύτες μετάλλων, το ενδεχόμενο φωτοενεργοποίησης της *K. pneumoniae* μετά τη φωτοκατάλυση, οι κυτταρικές αλλοιώσεις αλλά και οι τυχόν αλλαγές στις οποίες υπόκειται το γενετικό υλικό της κατά την επεξεργασία.

6 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

6.1 Υλικά και συσκευές

6.1.1 Θρεπτικά υλικά

- MFC agar (HiMedia Laboratories)
- Nutrient agar (Lab M Limited)
- Nutrient agar broth (HiMedia Laboratories)

6.1.2 Χημικά και Βιοχημικά Υλικά

- Αιθανόλη (Merck)
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ συν. EDTA (Sigma)
- Δωδεκυλοθειϊκό οξύ συν. SDS (Sigma)
- Ισοπροπανόλη (Merck)
- N-Setyl-N,N,N-trimethylammonium bromide συν. CTAB (Merck)
- Πρωτεΐνάση-K
- Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan συν. Tris (Merck)
- Χλωριούχο Νάτριο (Merck)
- Ladder (BioLabs)

6.1.3 Διαλύματα

- Διάλυμα NaCl 0.8% w/v
- Διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70% v/v
- 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 μετά από αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά.
- Διάλυμα 10% SDS:

5g SDS σε 50mL ddH₂O

- Διάλυμα πρωτεΐνης-K, συγκέντρωσης 20mg/mL
- Διάλυμα Φαινόλη-Χλωροφόρμιο-Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) (Sigma)

6.1.4 Στέλεχος *Klebsiella pneumoniae*

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το βακτήριο *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5056 (Public Health England Culture Collections).

6.1.5 Φασματοφωτόμετρο

Η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων μέσα στο ελαιώδη με το υγρό θρεπτικό υλικό υπολογιζόταν μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του ελαιωρήματος στα 500nm σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240 spectrophotometer)

6.1.6 Καταλύτες

Στα φωτοκαταλυτικά πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθοι καταλύτες:

- Εμπορικός καταλύτης TiO₂ (P25) της εταιρίας Degussa AG
- Καταλύτες TiO₂ εμπλουτισμένοι με μαγγάνιο ή κοβάλτιο ή και τα δύο μέταλλα (Mn:TiO₂, Co:TiO₂ και Mn-Co:TiO₂), παρεχόμενοι από το Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας (Μπίνας και συνεργάτες, Ηράκλειο Κρήτης) (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία

Κωδικός	Σύσταση
PC-177	0.02 wt% Mn: TiO ₂
PC-139	0.04 wt% Mn: TiO ₂
PC-140	0.1 wt% Mn: TiO ₂
PC-141	0.3 wt% Mn: TiO ₂
PC-142	1 wt% Mn: TiO ₂
PC-161	0.02 wt% Co : TiO ₂
PC-143	0.04 wt% Co : TiO ₂
PC-144	0.1 wt% Co : TiO ₂
PC-145	0.3 wt% Co : TiO ₂
PC-146	1 wt% Co : TiO ₂
PC-147	0.04 wt% Co : TiO ₂ - 0.04 wt% Mn : TiO ₂
PC-150	0.1 wt% Co : TiO ₂ - 0.1 wt% Mn : TiO ₂

6.1.7 Αντιδραστήρας και πηγή φωτός

Τα πειράματα φωτοκατάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα τύπου batch με τη χρήση συστήματος προσωμοιωμένου ηλιακού φωτός (Newport 67005 Solar Simulator System) στο οποίο περιλαμβάνεται μια λάμπα ξένου, χωρίς όζον, ισχύος 150Watt και ένα φίλτρο AirMass 1.5 (Newport, model 81094). Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία περιέχει περίπου 5% UV-A και 0.1% UV-B ενώ το φίλτρο αποκόπτει την ακτινοβολία με μήκος κύματος μικρότερο των 280nm. Η ένταση της ακτινοβολίας στον αντιδραστήρα στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μετρήθηκε και βρέθηκε 5.8×10^{-7} Einstein/(Ls), που αντιστοιχεί σε ακτινοβολία 1.31×10^{-2} W/m².

6.1.8 Φίλτρα ακτινοβολίας

Επιπλέον πειράματα έγιναν με τη χρήση:

α) ενός φίλτρου (Newport, FSQ-GG420, 50.8 mm × 50.8 mm) που δεν επιτρέπει τη διέλευση ακτινοβολίας μήκους κύματος κάτω των 420 nm αποκόποντας όλο το υπεριώδες φάσμα

β) ενός φίλτρου (Newport, FSQ-ND02, 50.8 mm × 50.8 mm) με 80% διαπερατότητα στα 632.8 nm που μειώνει την ακτινοβολία στα 5.3×10^{-7} Einstein/(Ls) και

γ) ενός φίλτρου (Newport, FSQ-ND04, 50.8 mm × 50.8 mm) με 60% διαπερατότητα στα 632.8 nm που μειώνει την ακτινοβολία στα 4.93×10^{-7} Einstein/(Ls).

6.1.9 Εκκινητές

Για τη διεξαγωγή της PCR χρησιμοποιήθηκαν δεκαμερείς εκκινητές (Ashayeri-panah et al., 2012; Deschaght et al., 2011) με την ακόλουθη αλληλουχία:

RAPD4: 5'-AAGACGCCDT-3'

RAPD7: 5'-GTGGATGCGA-3'

6.1.10 Θερμικός κυκλοποιητής

Η αντίδραση της PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή AdvancedPrimus 25 (Peqlab).

6.1.11 Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Τα προϊόντα της PCR μαζί με τον ladder ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 1.5% υπό τάση 110V.

6.1.12 Σύστημα φωτογράφησης και σύστημα επεξεργασίας των προφίλ των ζωνών της RAPD

Για την οπτικοποίηση των ζωνών που δημιουργήθηκαν στην πηκτή ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκε τράπεζα φθορισμού (UniTecCambridge) ενώ για την επεξεργασία των προφίλ των ζωνών χρησιμοποιήθηκε το UVibandmap software (UVITEC Cambridge).

6.2 Πειραματική Διαδικασία

6.2.1 Προετοιμασία πειραμάτων

Πριν τα πειράματα φωτοκατάλυσης ήταν απαραίτητο να γίνεται η προετοιμασία του εναιωρήματος που θα χρησιμοποιούνταν όπως και των θρεπτικών υλικών α) στα οποία θα αναπτυσσόταν το αρχικό στέλεχος της *K. pneumoniae* και β) που θα εμπλουτίζονταν με τα δείγματα που θα λαμβάνονταν μετά τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία. Όσον αφορά στο εναιώρημα, επρόκειτο

για απιονισμένο νερό στο οποίο επροστίθετο κατάλληλη ποσότητα NaCl ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα NaCl 0.8% το οποίο, έπειτα από αποστείρωση, επιμολυνόταν με ποσότητα *K. pneumoniae*. Ο μικροοργανισμός προερχόταν από υγρή καλλιέργεια στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί στέλεχος φυλασσόμενο στους -80°C. Τα βήματα που ακολουθούνταν πριν από το πείραμα φωτοκατάλυσης περιγράφονται στις επόμενες υποπαραγράφους.

6.2.2 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

- Παρασκευή διαλύματος θρεπτικού υλικού για στερεή καλλιέργεια: Nutrient agar (μη εκλεκτικό) ή MF-Cagar (εκλεκτικό υλικό για *Klebsiella*) και θρεπτικού υλικού για υγρή καλλιέργεια: Nutrient broth, σύμφωνα με τις αναγραφόμενες στη συσκευασία οδηγίες της εταιρίας.
- Στην περίπτωση των Nutrient agar και Nutrient broth απαιτούνταν ακολούθως η αποστείρωσή τους σε αυτόκαυστο σε πίεση 1.1 atm και θερμοκρασία 121°C για 30min.
- Επίστρωση τρυβλίων με Nutrient agar ή MF-Cagar και στερεοποίησή τους.
- Κατάλληλη συσκευασία των τρυβλίων ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσής τους.
- Φύλαξη των τρυβλίων που περιείχαν το άγαρ και της γυάλινης φιάλης που περιείχε το Nutrient broth στους 4°C.

6.2.3 Παρασκευή εναιωρήματος

- Παρασκευή διαλύματος NaCl 0.8% με διαλύτη απιονισμένο νερό.
- Αποστείρωσή του σε αυτόκαυστο (1.1 atm , 121°C για 30min).
- Ανακαλλιέργεια στελέχους *K. pneumoniae* που φυλασσόταν στους -80°C, τόσο σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10mL Nutrient broth ώστε να χρησιμοποιηθεί στο πείραμα όσο και σε τρυβλίο με Nutrient agar ώστε να φυλάσσεται στους 4°C και να χρησιμοποιείται για επόμενες ανακαλλιέργειες.
- Επώαση του μικροοργανισμού (δοκιμαστικός σωλήνας και τρυβλίο) σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 20-24h.
- Φύλαξη του τρυβλίου που περιείχε αποικίες υπόλευκου χρώματος στους 4°C ώστε να χρησιμοποιείται για τη λήψη αποικίας για επόμενες ανακαλλιέργειες.
- Ανάδευση της υγρής καλλιέργειας.
- Φασματοφωτομέτρηση δείγματος από την παραπάνω καλλιέργεια στα 600nm.

- Κατάλληλες διαδοχικές αραιώσεις δείγματος από την καλλιέργεια σε αποστειρωμένο διάλυμα NaCl 0.8% έως ότου δημιουργηθεί εναιώρημα με την επιθυμητή συγκέντρωση βακτηρίων. Βάσει της κλίμακας McFarland, όταν η τιμή απορρόφησης του δείγματος (δηλαδή η ένδειξη του φασματοφωτόμετρου) που φωτομετράται στα 600nm είναι 0,132 , η συγκέντρωση των μικροοργανισμών σε αυτό είναι περίπου 1.5×10^8 cfu/mL. Όταν δημιουργούνται εναιώρημα με τη συγκεκριμένη συγκέντρωση, η διαδικασία των διαδοχικών αραιώσεων και φασματοφωτομετρήσεων σταματούσε και αυτό χρησιμοποιείτο στα επόμενα βήματα.
- Επιμόλυνση κατάλληλου όγκου αποστειρωμένου διαλύματος NaCl 0.8% με κατάλληλο όγκο από το παραπάνω βακτηριακό εναιώρημα (συγκέντρωσης 1.5×10^8 cfu/mL).
- Διαδοχικές αραιώσεις (σε διαλύτη αποστειρωμένο διάλυμα NaCl 0.8%) του προηγούμενου διαλύματος ώστε να παρασκευαστούν 200mL δείγματος συγκέντρωσης 10^5 cfu/mL, 10^3 cfu/mL ή 10^2 cfu/mL, ανάλογα με το πείραμα που είχε σχεδιασθεί κάθε φορά.
- Προετοιμασία 18 δοκιμαστικών σωλήνων με 9mL αποστειρωμένου διαλύματος NaCl 0.8% που αργότερα επιμολύνονταν με κατάλληλο όγκο δείγματος προερχόμενο από το επεξεργασμένο με φωτοκατάλυση (για διάφορα χρονικά διαστήματα) δείγμα ώστε να γίνουν καλλιέργειες και να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου ως προς τη θανάτωση του βακτηρίου.

Η ανακαλλιέργεια και οι αραιώσεις πραγματοποιούνταν κάτω από απαγωγό προκειμένου να αποφευχθεί η επιμόλυνση των διαλυμάτων με μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος χώρου. Επιπλέον, όλος ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιούνταν στις παραπάνω αλλά και σε όλες τις επόμενες διαδικασίες είχε προηγουμένως αποστειρωθεί είτε σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 185°C για 2h είτε σε αυτόκαυστο στους 121°C και σε 1,1atm για 30min.

6.2.4 Φωτοκατάλυση

- Τοποθέτηση των 200mL δείγματος στον αντιδραστήρα υπό ανάδευση.
- Προσθήκη του εκάστοτε καταλύτη (η προστιθέμενη μάζα του διέφερε ανάλογα με τη συγκέντρωση του καταλύτη που ήταν επιθυμητό να χρησιμοποιηθεί στο εκάστοτε πείραμα).
- Προσρόφηση του καταλύτη για 10min.
- Ενεργοποίηση της λάμπας.
- Λήψη δειγμάτων 1,5mL σε χρόνους 0, 3, 6, 10, 15, 30 min.

6.2.5 Καλλιεργητική μέθοδος

- Διαδοχικές αραιώσεις των παραπάνω δειγμάτων κι έλεγχος απενεργοποίησης του βακτηριακού στελέχους με την καλλιεργητική μέθοδο μέσω επίστρωσης σε θρεπτικό υλικό.
- Επώαση των τρυβλίων σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 37°C για 20-24h.
- Καταμέτρηση των αποικιών.
- Λήψη με κρίκο εμβολιασμού μιας αποικίας από ένα τρυβλίο κάθε χρονικής στιγμής και επιμόλυνση υγρού θρεπτικού υλικού στο οποίο προστίθεται γλυκερόλη σε αναλογία 2:1 προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή των κυττάρων από την μετέπειτα ψύξη.
- Φύλαξη στους -80°C για μεταγενέστερη επεξεργασία.

6.2.6 Παρατήρηση των βακτηρίων με τη χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης

Ποσότητα των αρχικών δειγμάτων που έδωσαν τελικά αποικίες απεστάλη στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας (Ηράκλειο) ώστε μετά από κατάλληλη επεξεργασία να παρατηρηθούν οι κυτταρικές αλλοιώσεις στα επεξεργασμένα στελέχη της *K. pneumoniae*.

6.2.7 Απομόνωση γενετικού υλικού

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού από την *K. pneumoniae* ακολουθήθηκε η εξής μέθοδος, βασισμένη σε τυπικό πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού από Gram-αρνητικά βακτήρια, μετά από δοκιμές του και τροποποιήσεις του όπου κρίθηκε αναγκαίο:

- Λήψη των δειγμάτων (σε κάθε πείραμα αντιστοιχούν 6 δείγματα που ελήφθησαν στα 0, 3, 6, 10, 20, 30 min) από τους -80°C.
- Φυγοκέντρηση για 10 min στα 25000 rcf στους 24°C.
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού με πιπέτα.
- Διάλυση του ιζήματος με πιπέτα με προσθήκη 567 μ L διαλύματος TE.
- Προσθήκη 30 μ L διαλύματος SDS συγκέντρωσης 10% w/v.
- Προσθήκη 3 μ L διαλύματος πρωτεΐνάσης-K συγκέντρωσης 20mg/mL.
- Ανάδευση.
- Επώαση σε block heater στους 37°C για 3 ώρες.
- Προσθήκη 80 μ L διαλύματος CTAB που περιείχε 0.7%NaCl.

- Επώαση σε block heater στους 65°C για 10 min.
- Προσθήκη 750μL διαλύματος Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1.
- Έντονη ανάδευση.
- Φυγοκέντρωση στα 10000 rcf για 10min στους 4°C.
- Λήψη της υδατικής φάσης.
- Προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης από τους -20°C και ανάδευση με πιπέτα.
- Παραμονή στους -20°C.
- Φυγοκέντρωση στα 10000 rcf για 20min στους 4°C.
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού.
- Καθαρισμός του γενετικού υλικού (ίζημα) με προσθήκη 500 μL αιθανόλης συγκέντρωσης 70%v/v και ανάδευση με πιπέτα.
- Φυγοκέντρωση στα 10000 rcf για 20min στους 4°C.
- Απόρριψη της αιθανόλης.
- Τοποθέτηση των erpendorf με το ίζημα σε block heater στους 37°C έως ότου εξατμιστεί η αιθανόλη.
- Επαναδιάλυση του DNA σε 50μLmilliQH₂O.
- Φύλαξη του απομονωμένου DNA στους -20 °C.

Η καθαρότητα και η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA υπολογίστηκαν φωτομετρικά, λαμβάνοντας δύο μετρήσεις, στα 260 nm και στα 280 nm. Η συγκέντρωση του DNA υπολογίζεται με βάση το ότι οπτική πυκνότητα στα 260nm (O.D.260)=1 αντιστοιχεί σε 50 μg δίκλωνου DNA ανά mL διαλύματος ενώ η καθαρότητα του διαλύματος DNA προσδιορίζεται από το λόγο O.D.260 / O.D. 280 και θεωρείται καθαρό όταν η τιμή είναι μεγαλύτερη του 1,6 και κοντά στο 1,8.

6.2.8 RAPD-PCR

Προκειμένου να γίνει ανίχνευση πολυμορφισμών που θα ήταν πιθανό να συνδέονται με την επιβίωση στελεχών του βακτηρίου παρά τη φωτοκαταλυτική τους επεξεργασία, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που βασίζεται σε τυχαίους πολυμορφισμούς του DNA (RAPD-PCR). Μετά από έλεγχο διαφορετικών 10-νουκλεοτιδικών εκκινητών με τυχαία αλληλουχία, επιλέχθησαν δυο (RAPD4: 5'-AAGACGCCDT-3' και RAPD7: 5'-GTGGATGCGA-3') για περαιτέρω μελέτη καθώς έδωσαν τα πιο ευδιάκριτα αποτυπώματα.

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με θερμικό κυκλοποιητή στον οποίο τοποθετήθηκαν όγκοι αντίδρασης 25 μ L που περιείχαν περίπου 90 ng του μικροβιακού DNA, $MgCl_2$ 4 mM, 1 X PCR buffer, 1 μ M του εκκινητή, 2.5 U AmpliTaq DNA πολυμεράσης και 0.4mM dNTPs. Το πρόγραμμα περιελάμβανε 4 min στους 94 °C για να γίνει αποδιάταξη και 50 κύκλους στους 94 °C για 1 min, στους 34°C για 2 min και στους 72°C για 2 min, ακολουθούμενους από τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 min.

6.2.9 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της RAPD-PCR

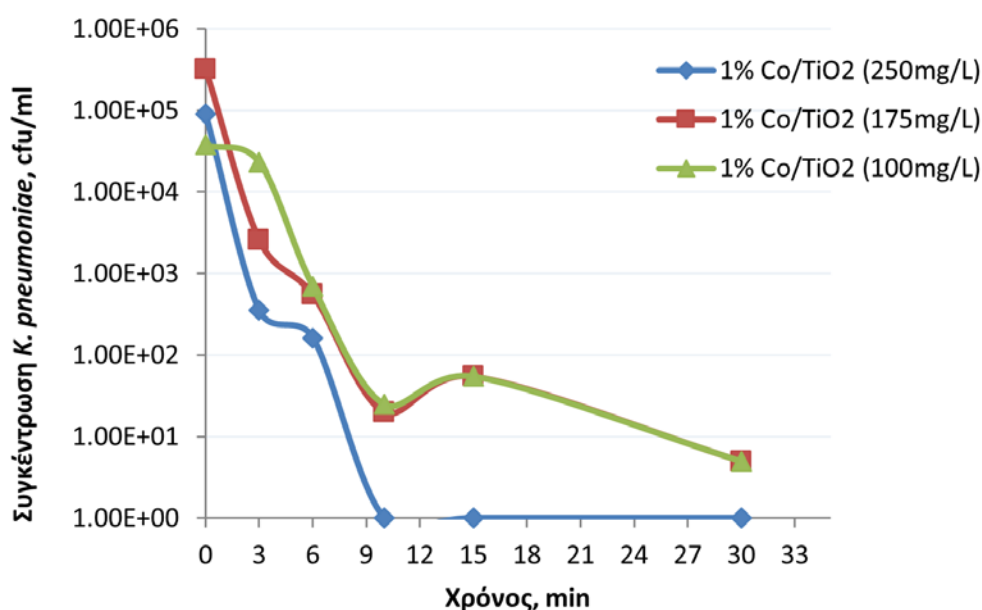
Τα προϊόντα της PCR διαχωρίζονταν ηλεκτροφορητικά σε πηκτή αгарόζης 1,5% w/v, που περιείχε 1 mg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Ως αναφορά σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε ένας ladder 1 Kb. Μετά από περίπου 3 ώρες ηλεκτροφόρησης η γέλη φωτογραφιζόταν κατόπιν έκθεσης σε UV ακτινοβολία.

Τα προφίλ της RAPD που προέκυπταν αναλύονταν με το λογισμικό UVibandmap (UVITEC Cambridge), που ανέλυε το δυαδικό κώδικα και δημιουργούσε δένδρογράμματα βασισμένα στο συντελεστή Jaccard και στη μέθοδο ομαδοποίησης UPGMA (unweighted-pair group method with arithmetic mean clustering method) (Souza Lopez et al., 2005). Ο δείκτης ομολογίας των προφίλ της RAPD ορίστηκε ως το ποσοστό των κοινών ζωνών: $S_{xy} = 2n_{xy} / (n_x + n_y)$, όπου για τις απομονώσεις x και y, είναι ο αριθμός των κοινών ζωνών στα RAPD προφίλ τους (n_{xy}) διαιρούμενος με τον αριθμό των ζωνών και των δύο απομονώσεων. Οι τιμές του δείκτη ομολογίας S_{xy} κυμαίνονται από 0 έως 1 με τη μέγιστη τιμή να αντιπροσωπεύει απόλυτη ομοιότητα των προφίλ (Pérez et al., 1998).

7 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη

Με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του καταλύτη στην αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας και να επιλεγεί η βέλτιστη, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με συγκέντρωση χρησιμοποιούμενου καταλύτη εύρους 100-250mg/L (Εικόνα 9). Μικρότερες συγκεντρώσεις δεν ελέγχθηκαν διότι η *K. pneumoniae* είναι βάκιλος με ισχυρή κάψουλα, ανθεκτική σε διάφορους παράγοντες καταστροφής κυττάρων (Burke et al., 2009). Επομένως, κρίθηκε σκόπιμο - καθότι ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός δεν έχει αποτελέσει αντικείμενο πολλών φωτακαταλυτικών μελετών - να χρησιμοποιηθούν παρόμοιες ή πιο υψηλές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται για άλλα βακτήρια. Ο πληθυσμός της *E.coli* για παράδειγμα, φαίνεται ότι μειώνεται με ρυθμό 4-log μέσα σε 5 λεπτά επεξεργασίας με συγκέντρωση καταλύτη 100 mg/L, πέρα από την οποία η απολύμανση φθάνει σε πλατώ (Venieri et al., 2014). Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη από ένα σημείο και μετά οδηγεί σε μειωμένη διείσδυση του φωτός μέσα στο εναιώρημα, περιορίζοντας την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας (Suri et al., 2012). Σε αυτό θεωρείται ότι οφείλεται η καταγραφή συγκεντρώσεων καταλύτη κοντά στα 100 mg/L ως βέλτιστη σε πλήθος εργασιών (Malato et al., 2009; Vijay et al, 2013; Rizzo et al., 2014). Τα πειραματικά αποτελέσματα όμως στην παρούσα μελέτη έδειξαν για την *K. pneumoniae* ότι όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του καταλύτη αυξάνεται και ο ρυθμός αδρανοποίησης με αποτέλεσμα να επιλεγεί όλα τα επόμενα πειράματα να πραγματοποιηθούν με καταλύτες συγκέντρωσης 250mg/L καθώς αυτή καταγράφηκε να θανατώνει σε σχεδόν 10 λεπτά, σε κάποια πειράματα, κύτταρα *K. pneumoniae* αρχικής πυκνότητας 10^5 cfu/mL (Εικόνα 3).

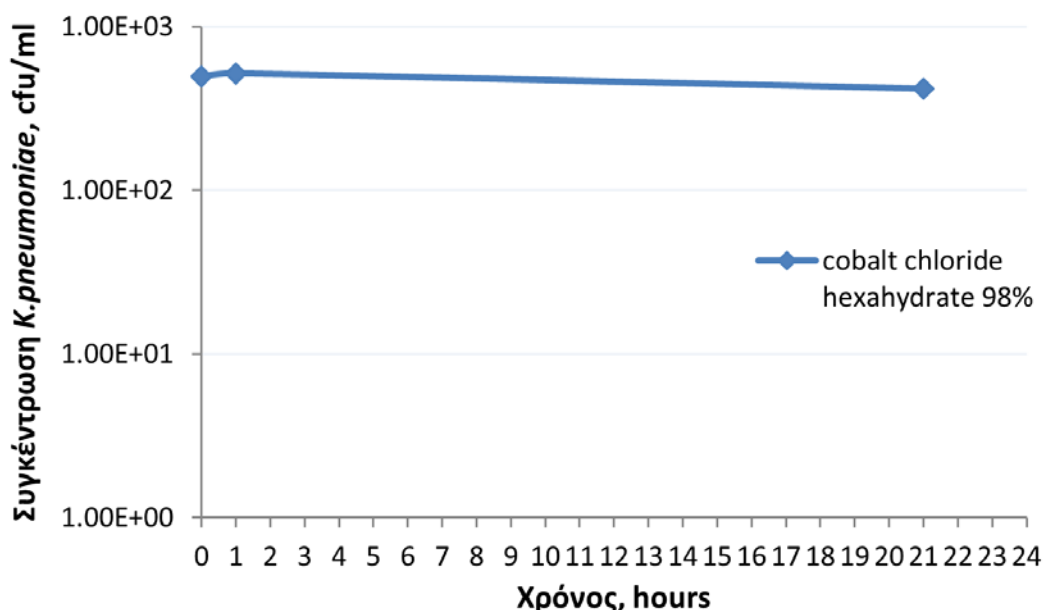


Εικόνα 3: Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη PC-146 (1% Co/TiO₂) στη φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* κατόπιν έκθεσης σε προσομοιωτή ηλιακής ακτινοβολίας. Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10⁵ cfu/mL.

7.2 Έλεγχος τοξικότητας των μετάλλων

Προκειμένου να εξεταστεί το ενδεχόμενο τοξικότητας του κοβαλτίου που περιέχεται σε ορισμένους από τους χρησιμοποιούμενους στην παρούσα εργασία καταλύτες, διεξήχθη πείραμα με cobalt chloride hexahydrate 98% αντί καταλύτη σε σκοτάδι. Από τα αποτελέσματά του, φάνηκε ότι τα ιόντα κοβαλτίου δεν έχουν τοξική δράση έναντι της *K. pneumoniae* (Εικόνα 4).

Επιπροσθέτως, έλαβε χώρα μια σειρά πειραμάτων απουσία ακτινοβολίας με τους καταλύτες που είχαν τη χαμηλότερη (0,02% wt) και την υψηλότερη (1% wt) συγκέντρωση μετάλλου. Η συγκέντρωση του καταλύτη στο υδατικό εναιώρημα ήταν 250mg/L και η αρχική βακτηριακή συγκέντρωση 10⁴cfu/mL. Κατά τη διάρκεια του πειράματος που διήρκεσε 1 ώρα η πυκνότητα του βακτηρίου έμεινε σχεδόν σταθερή επομένως συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι ενισχυμένοι καταλύτες δεν ήταν τοξικοί για την *K. pneumoniae*. Επομένως, συμπεραίνεται ότι τα μέταλλα βελτίωσαν τη φωτοκαταλυτική ικανότητα του TiO₂ και η αδρανοποίηση που επιτεύχθηκε στα πειράματα οφειλόταν στην από κοινού δράση καταλύτη και ακτινοβολίας.



Εικόνα 4: Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* υπό την επίδραση cobalt chloride hexahydrate 98%, απουσία ακτινοβολίας. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση άλατος: 250mg/L.

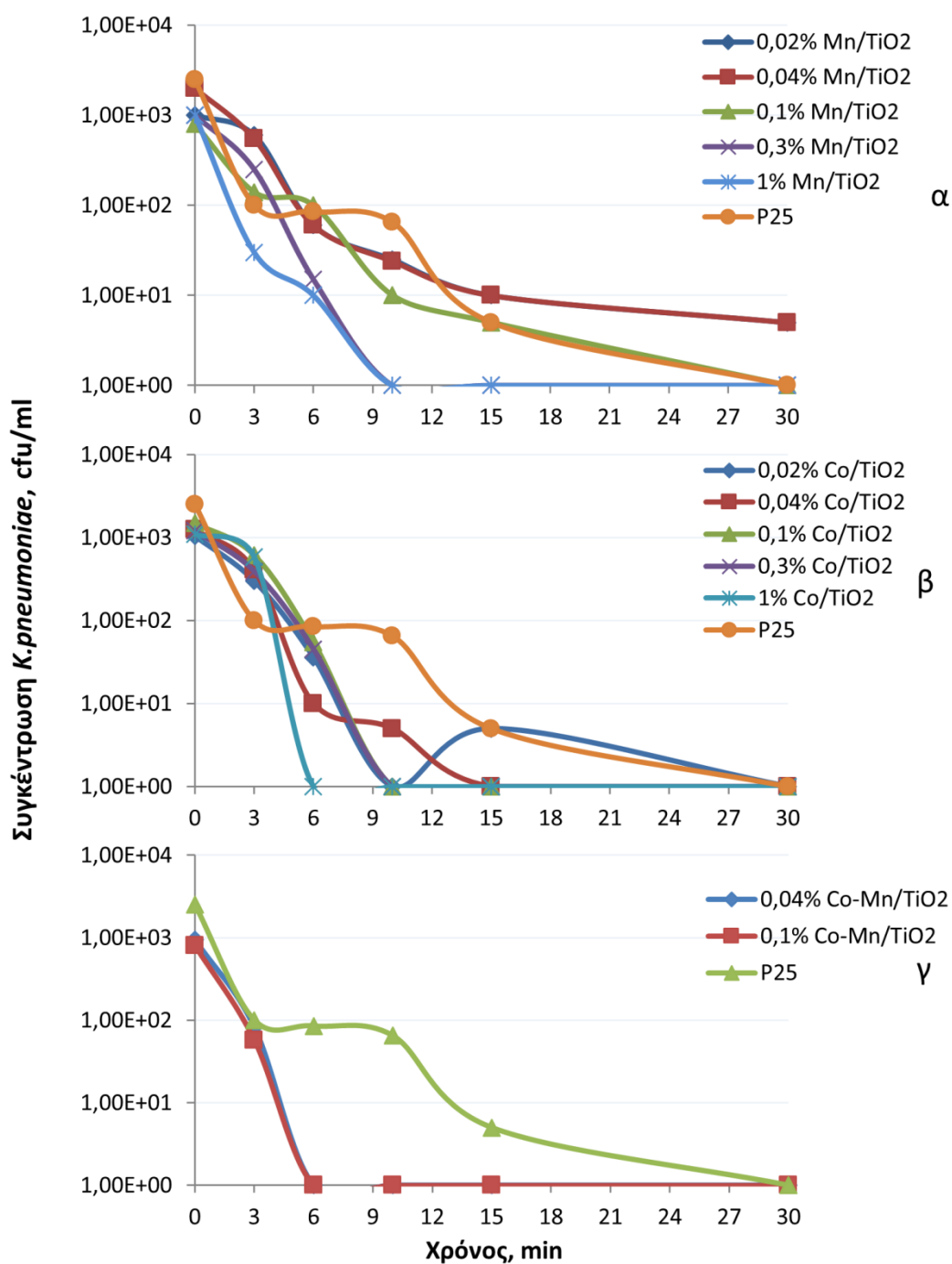
Αρκετές φορές έχει καταγραφεί η τοξικότητα του κοβαλτίου, και συγκεκριμένα του οξειδοαναγωγικά δραστικού ιόντος του κοβαλτίου, Co^{2+} , στα βακτήρια όταν τα τελευταία εκτίθενται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις από εκείνες που είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση των μεταβολικών τους αντιδράσεων (Rengifo-Herrera et al., 2008). Τα ιόντα κοβαλτίου φαίνεται ότι δρουν εναντίον του *Helicobacter pylori* αναστέλλοντας τη λειτουργία κάποιων ενζύμων του μικροβίου αλλά και ενεργοποιώντας ένζυμο που εμπλέκεται στη διαδικασία της αναπνοής με αποτέλεσμα βλάβη στη ρύθμιση της αναπνοής, επομένως και επιπτώσεις στην ανάπτυξη και τη βιωσιμότητα του *H. pylori*. Επίσης, η αντιμικροβιακή αποτελεσματικότητα των αλάτων Co φαίνεται ότι αυξάνεται με την αύξηση της διαλυτότητας των αλάτων, δηλαδή το χλωριούχο κοβάλτιο που είναι ευδιάλυτο έχει μικρότερη ανασταλτική συγκέντρωση από το λιγότερο διαλυτό θειούχο κοβάλτιο το οποίο εμφανίζει μεγαλύτερη ανασταλτική συγκέντρωση (Bruggraber et al., 2004). Άλλος πιθανός μηχανισμός δράσης - πέραν της επίδρασης σε ένζυμα - θεωρείται η επενέργεια στο γενετικό υλικό (Bruggraber et al., 2004) αν και παλαιότερες μελέτες με τη χρήση αλάτων κοβαλτίου δεν έδειξαν βλάβη στο βακτηριακό DNA (Beyersmann et al., 1992). Σε άλλη μελέτη έχει βρεθεί ότι διαλύματα ιόντων Co συγκέντρωσης 10ppm οδηγούν σε τετραπλασιασμό του χρόνου πολλαπλασιασμού του *H. pylori* ενώ σε σωματιδιακή μορφή συγκεντρώσεις 6ppm Co δεν έχουν τοξική δράση απέναντι στο βακτήριο (Anwar et al., 2007). Υπάρχουν επίσης καταγραφές τοξικότητας σε φωτοκαταλύτες: σε ορισμένες περιπτώσεις οι

ενισχυμένοι με μέταλλα καταλύτες επάγουν την καταστροφή των βακτηριακών κυττάρων λόγω της απελευθέρωσης στο διάλυμα της αντίδρασης τοξικών ιόντων των μετάλλων (Reddy et al., 2007).

7.3 Επίδραση του είδους του καταλύτη

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη χρήση διάφορων καταλυτών προκειμένου να συγκριθεί η αποτελεσματικότητά τους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν ο εμπορικός καταλύτης P25 που περιέχει TiO_2 και καταλύτες TiO_2 ενισχυμένοι με Mn ή Co ή Mn και Co διάφορων περιεκτικοτήτων.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 5, οι ενισχυμένοι με Mn ή/και Co καταλύτες επέδειξαν μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα συγκριτικά με τον εμπορικό καταλύτη ως προς την αδρανοποίηση του βακτηρίου. Παρ' όλο που ο P25 θεωρείται πολύ φωτοενεργός χάρη στην αργή επανασύνδεση ηλεκτρονίου-οπής και στη μεγάλη επιφάνειά του (Suri et al., 2012), τα μέταλλα φαίνεται ότι βελτίωσαν τη δραστικότητα των καταλυτών κατόπιν έκθεσης σε ηλιακή ακτινοβολία αφού η θανάτωση της *K. pneumoniae* επήλθε ακόμη και μετά από επεξεργασία μόνο 10 λεπτών, σε ορισμένες περιπτώσεις.



Εικόνα 5: Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* υπό την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας με τον εμπορικό καταλύτη P25 και με καταλύτες TiO₂ ενισχυμένους με Mn (α), με Co (β) και με Mn και Co (γ). Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10³ cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

Επιπλέον, συγκρίνοντας τους ενισχυμένους με Mn και ακολούθως τους ενισχυμένους με Co καταλύτες, παρατηρείται ότι αυξανόμενης της περιεκτικότητας του καταλύτη σε μέταλλο, βελτιώνεται

η απολυμαντική αποτελεσματικότητά του. Από τα διαγράμματα των πειραμάτων που έλαβαν χώρα, προκύπτει ότι ο PC-142 (1wt% Mn/TiO₂) και ο PC-146 (1 wt% Co/TiO₂) επιδεικνύουν καλύτερη φωτοκαταλυτική δράση σε σχέση με τους υπόλοιπους, καθώς τα βακτήρια αδρανοποιήθηκαν μόλις μετά από 10 λεπτά. Φαίνεται επομένως, ότι παρά την ανθεκτικότητα που επιδεικνύει η *K. pneumoniae* κατά τη διάρκεια διάφορων μεθόδων απολύμανσης, η φωτοκατάλυση με εμπλουτισμένους με μέταλλο καταλύτες είναι αρκετά αποδοτική καθώς μικρής διάρκειας επεξεργασία επιφέρει πλήρη αδρανοποίηση σε εναιωρήματα με αρχική συγκέντρωση βακτηρίων περίπου 10², 10³cfu/mL αλλά ακόμη και 10⁵cfu/mL, όπως φαίνεται στην Εικόνα 6, Εικόνα 7 και Εικόνα 8.

Η επιταχυνόμενη θανάτωση βακτηρίων κατά τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία με ενισχυμένους με μέταλλα ή μη μέταλλα (π.χ. χαλκό, άζωτο, βόριο, φθόριο, ζirkόνιο) καταλύτες TiO₂ έχει αναφερθεί σε πλήθος μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* (Fisher et al., 2013; Wang et al., 2013; Wong et al., 2006; Swetha et al., 2010; Burke et al., 2009).

Επιπρόσθετα πειράματα που έλαβαν χώρα με τη χρησιμοποίηση των διμερώς ενισχυμένων καταλυτών PC-147 (0.04% Mn-Co/TiO₂) και PC-150 (0.1% Mn-Co/TiO₂) έδειξαν ότι οι τελευταίοι επάγουν πιο ταχύ θάνατο στην *K. pneumoniae* (Εικόνα 8) σε σχέση με τους μονομερώς ενισχυμένους (Εικόνα 6, Εικόνα 7), στις ίδιες συγκεντρώσεις. Μάλιστα, καταγράφηκε μείωση του πληθυσμού της *K. pneumoniae* κατά 5 log εντός 15 λεπτών ενώ η αντίστοιχη μείωση στον πληθυσμό *E. coli* που μελετήθηκε σε άλλη εργασία (Venieri et al., 2014) συνέβη μετά από 30 λεπτά και μόνο στην περίπτωση του καταλύτη με τη μέγιστη περιεκτικότητα σε μέταλλα (PC-150: 0.1 wt% Mn-Co/TiO₂). Παρόμοιοι ρυθμοί αδρανοποίησης για την *E. coli* έχουν παρατηρηθεί και σε μελέτη όπου έγινε χρήση νανοσωματιδίων TiO₂ ενισχυμένων με N και Ag για φωτοκαταλυτική επεξεργασία με ορατή ακτινοβολία (Willett et al., 2000) ενώ σε άλλη περίπτωση, η ενίσχυση του P25 με N και S επέφερε αδρανοποίηση 4-Log στην *E. coli* μετά από 90 λεπτά έκθεσης στο ορατό φως (Galbavy et al., 2010). Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις συνηγορούν υπέρ της συνεργιστικής δράσης των μετάλλων-ενισχυτών που αντισταθμίζει τα πιθανά μειονεκτήματα των μεμονωμένων μετάλλων (Malato et al., 2009; Pelaez et al., 2012).

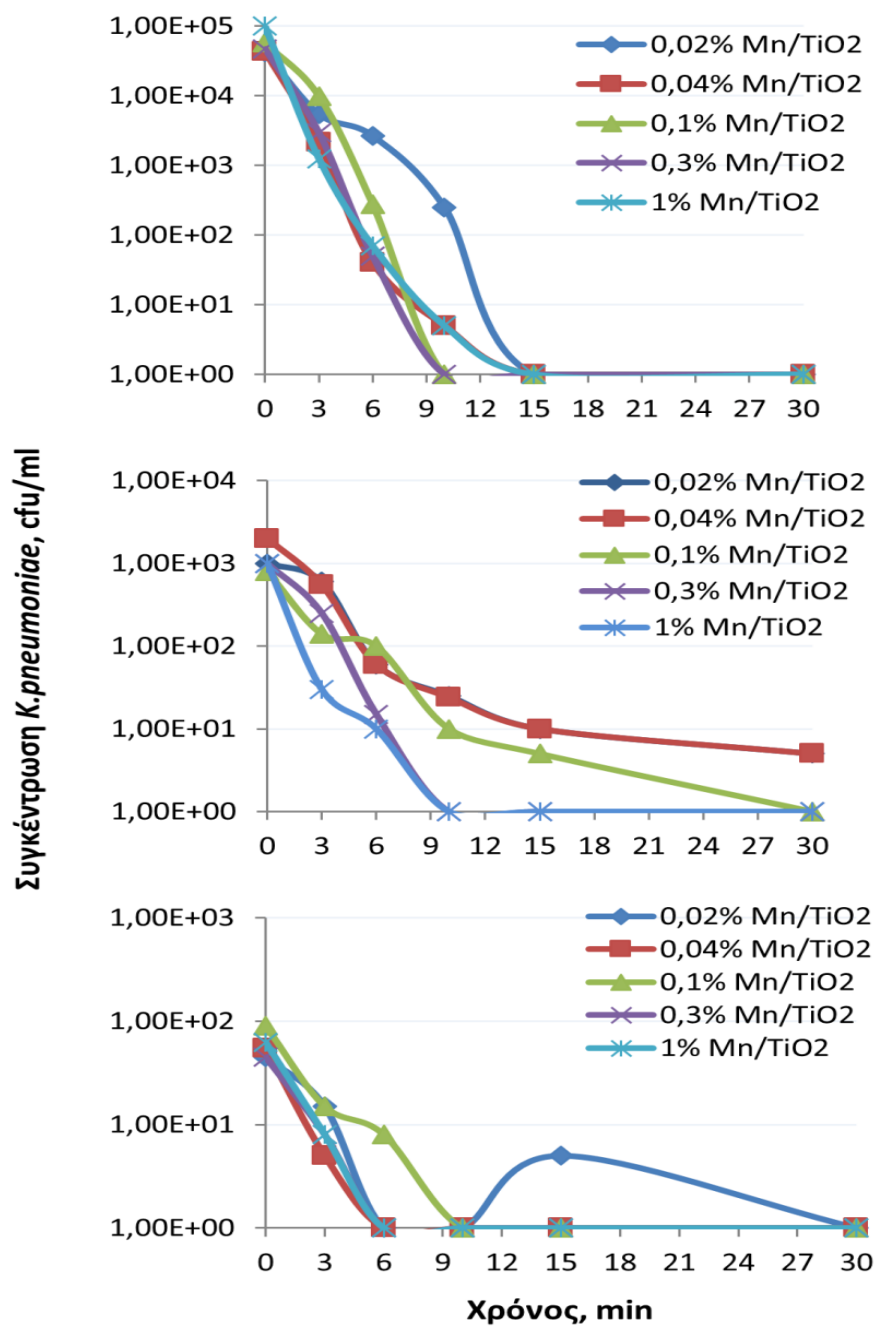
Η ενισχυμένη αποτελεσματικότητα των εμπλουτισμένων καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα αυτά τα πειράματα ίσως ερμηνεύεται από πιθανή δράση των ενισχυτών πάνω στην επιφάνεια του TiO₂ ως παγίδα ηλεκτρονίων, προωθώντας έτσι τη μεταφορά φορτίων στη διεπιφάνεια και καθυστερώντας την επανασύνδεση του ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής (Lu et al, 2003).

Από τα παραπάνω φαίνεται, πως στο σημερινό πλαίσιο περιβαλλοντικών και οικονομικών αναγκών, η ετερογενής φωτοκατάλυση μπορεί να αποτελεί μια αξιόπιστη και συμφέρουσα μέθοδο επεξεργασίας του νερού ιδιαίτερα αν καταφέρει η επιστημονική κοινότητα να απαντήσει στις προκλήσεις που ανακύπτουν. Μια από αυτές είναι και η ανάπτυξη φωτοκαταλυτών με μεγαλύτερο εύρος φωτοδραστικότητας ώστε να μπορούν να αξιοποιούν μεγαλύτερο φάσμα του ηλιακού φωτός καθιστώντας ακόμη πιο εύκολη και προσιτή οικονομικά τη χρήση της φωτοκατάλυσης για περιοχές με έντονη ηλιοφάνεια που θα μπορούσαν να στηρίζουν σε αξιοσημείωτο βαθμό, εκτός των άλλων, και την απολύμανση του νερού τους στην «πράσινη» ενέργεια.

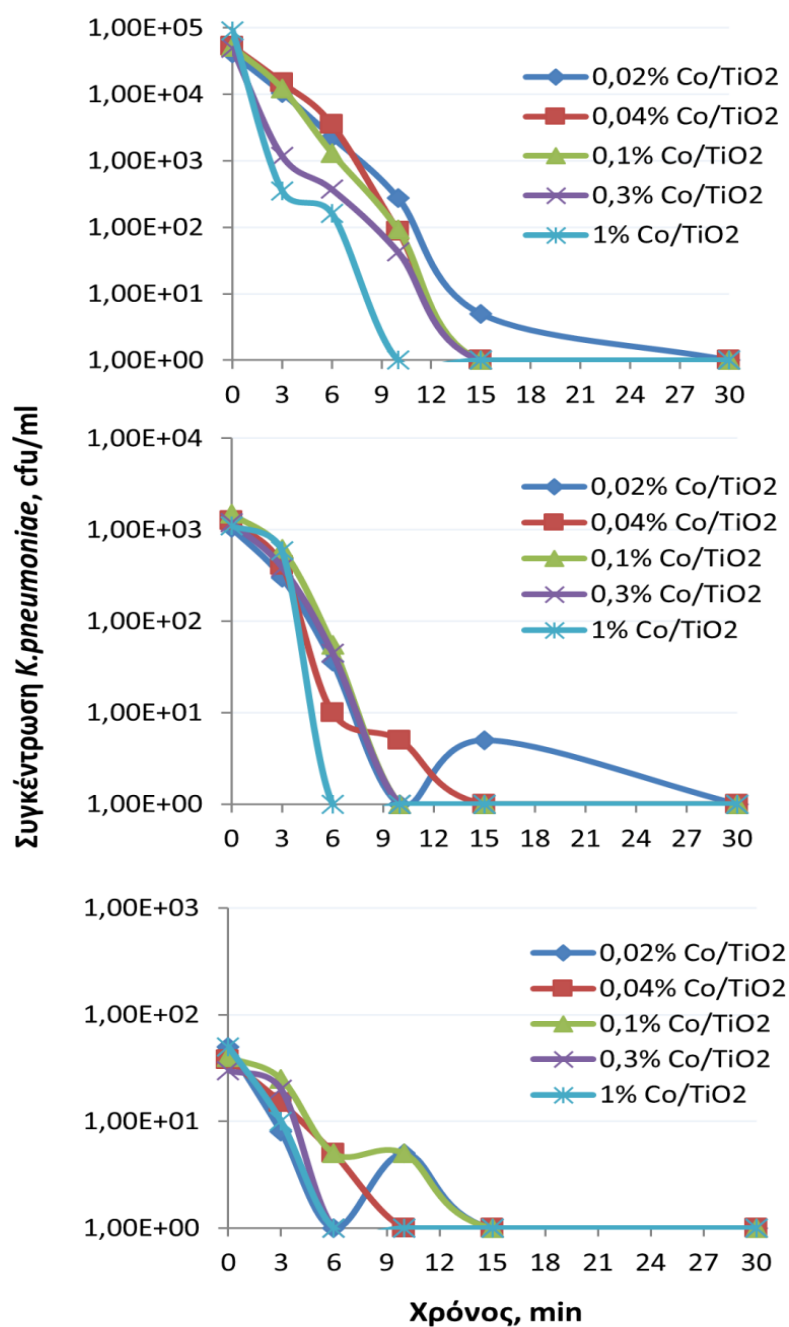
7.4 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης του μικροοργανισμού

Στη συγκεκριμένη εργασία, αύξηση της βακτηριακής πυκνότητας οδήγησε σε μείωση της αδρανοποίησης. Συγκρίνοντας τα διαγράμματα που προέκυψαν (Εικόνα 6, Εικόνα 7, Εικόνα 8), παρατηρείται ότι όταν η αρχική συγκέντρωση βακτηρίων ήταν 10^2 και 10^3 cfu/mL η *K. pneumoniae* αδρανοποιούνταν στα 10 και 15 λεπτά αντίστοιχα, ενώ όταν ήταν 10^5 cfu/mL σε κάποια πειράματα (όπου χρησιμοποιήθηκαν οι καταλύτες με τη μικρότερη περιεκτικότητα σε μέταλλα) δεν επήλθε πλήρης θανάτωση πριν τα 30, και ορισμένες φορές πριν τα 45 λεπτά. Η ύπαρξη των εναπομείναντων κυττάρων μετά από μακρά επεξεργασία - άνω των 30 λεπτών - ίσως εξηγείται από την επιβίωση κάποιου ανθεκτικού υποπληθυσμού που συσσωρεύτηκε σε συγκεκριμένη περιοχή του εναιωρήματος κι έτσι προστατεύτηκε ή από ανθεκτικότητα που οφείλεται στο γενετικό υλικό κάποιων στελεχών (Wu et al., 2010).

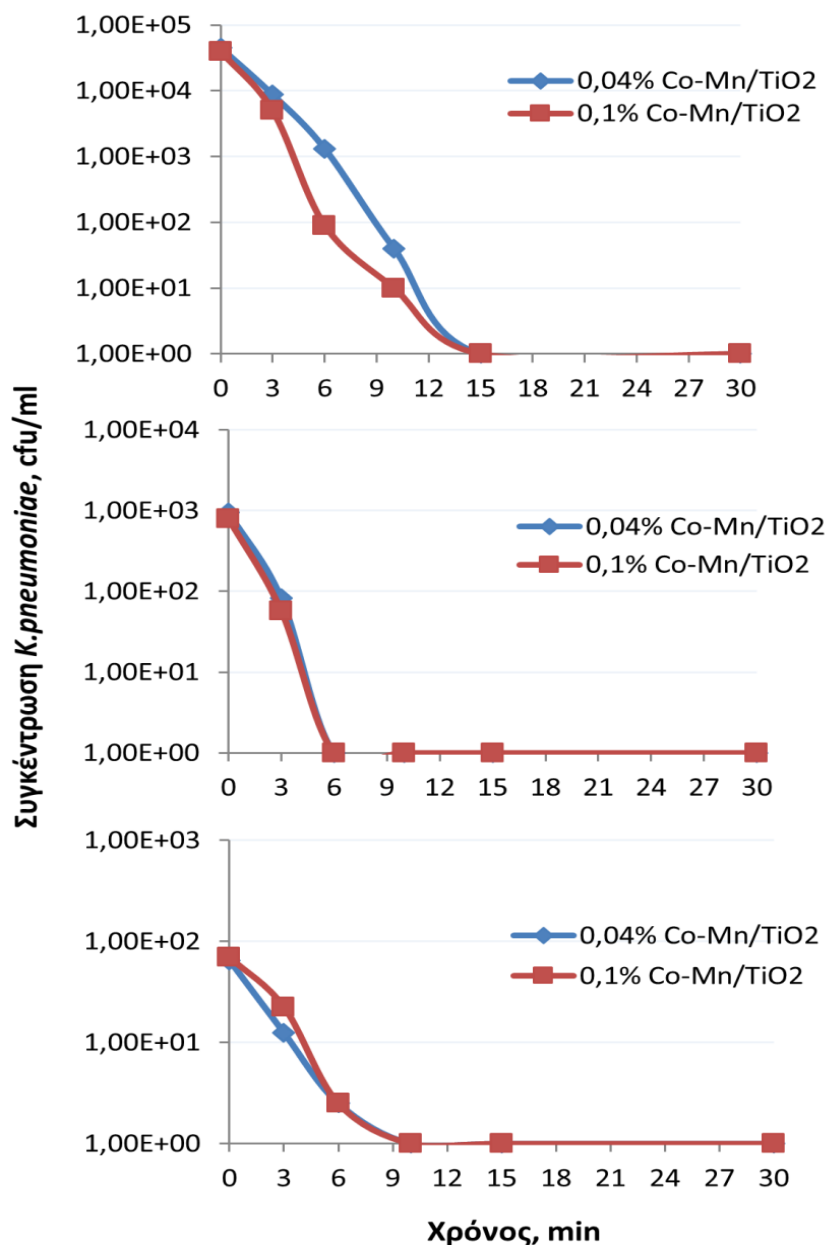
Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με εκείνα πολλών αντίστοιχων μελετών, σύμφωνα με τα οποία, η απολύμανση μέσω κοινών τεχνικών είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης. Παρόλα αυτά, ο απαιτούμενος χρόνος για πλήρη αδρανοποίηση εξαρτάται από το είδος του υπό μελέτη βακτηρίου.



Εικόνα 6: Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* υπό την επίδραση φωτοκατάλυσης με καταλύτες TiO₂ ενισχυμένους με Mn. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10⁵ cfu/mL (πάνω), 10³ cfu/mL (μεσαίο), 10² cfu/mL (κάτω), Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L

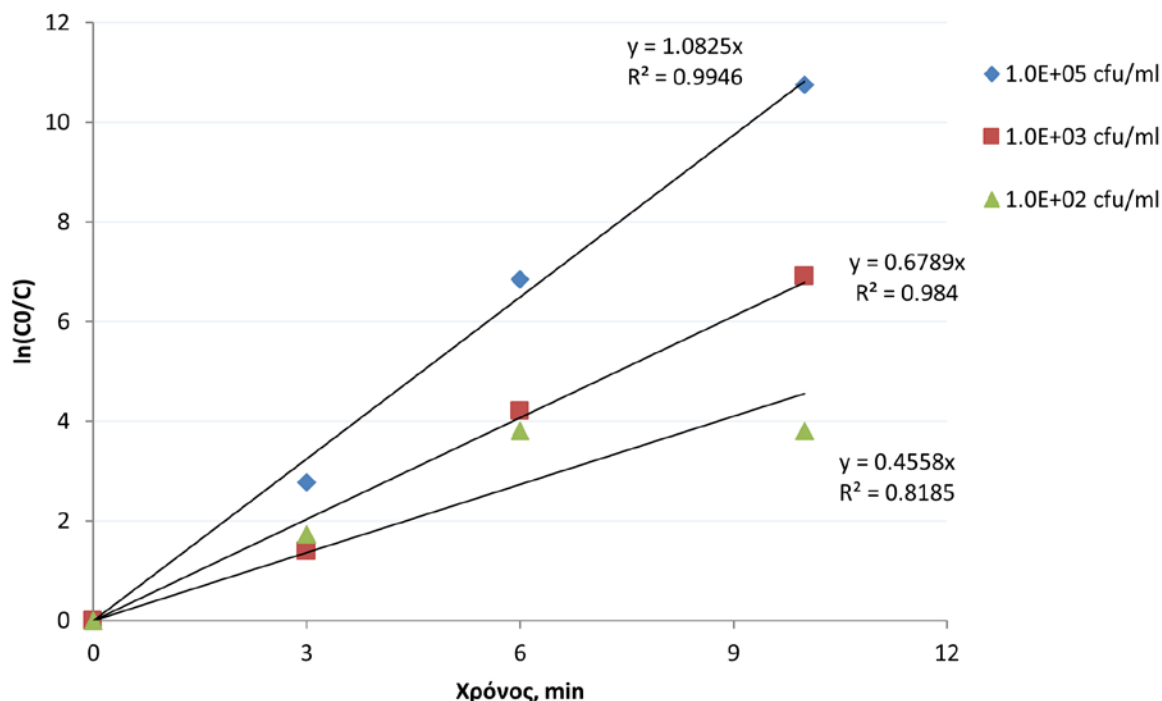


Εικόνα 7: Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* υπό την επίδραση φωτοκατάλυσης με καταλύτες TiO₂ ενισχυμένους με Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10⁵ cfu/mL (πάνω), 10³ cfu/mL (μεσαίο), 10² cfu/mL (κάτω), Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.



Εικόνα 8: Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* υπό την επίδραση φωτοκατάλυσης με καταλύτες TiO₂ ενισχυμένους με Mn και Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10⁵ cfu/mL (πάνω), 10³ cfu/mL (μεσαίο), 10² cfu/mL (κάτω), Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

Ο ρυθμός απολύμανσης μπορεί να ακολουθήσει ικανοποιητικά μια ψευδοπρώτης τάξης κινητική, όπως φαίνεται στην Εικόνα 9. Οι σταθερές του ρυθμού της κινητικής που υπολογίστηκαν ήταν: 0.46 ($r^2=0.82$), 0.67 ($r^2=0.98$) και 1.08 min^{-1} ($r^2=0.99$) για αρχική συγκέντρωση βακτηρίων 10^2 , 10^3 and 10^5 cfu/mL.

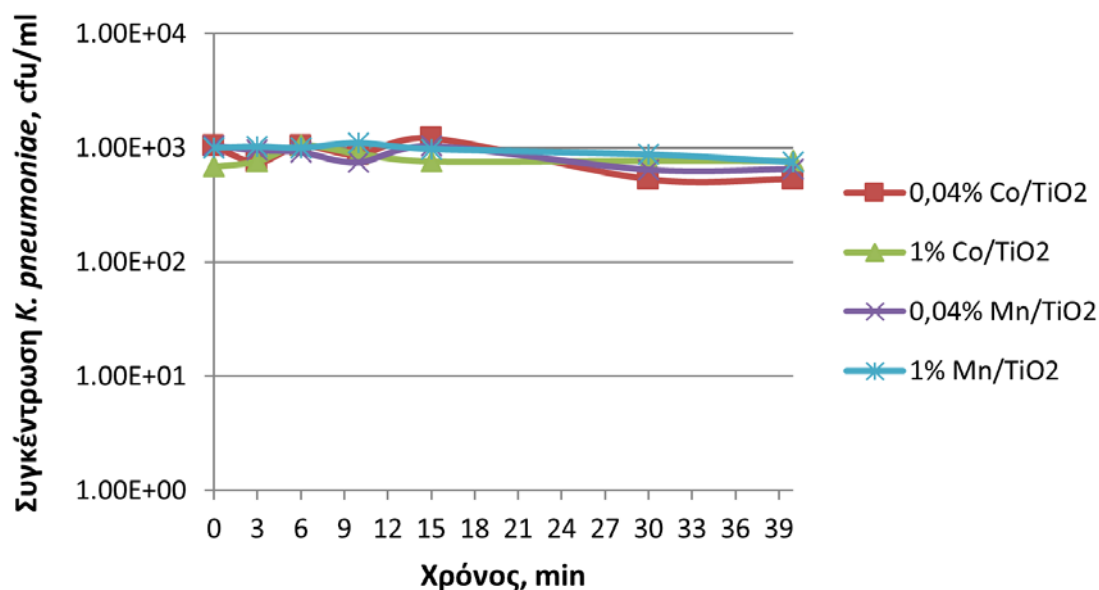


Εικόνα 9: Επίδραση της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης στην αποτελεσματικότητα της φωτοκαταλυτικής απολύμανσης έναντι της *K. pneumoniae* με τη χρήση καταλύτη PC-140 (0.3% Mn/TiO₂). Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

7.5 Επίδραση της προσροφητικής ικανότητας των καταλυτών

Επίσης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα χωρίς ακτινοβολία προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση της προσροφητικής ικανότητας των καταλυτών στους βακτηριακούς πληθυσμούς. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν 2 καταλύτες από την κάθε κατηγορία: ένας με χαμηλή-μέτρια περιεκτικότητα σε μέταλλο και εκείνος με τη μέγιστη (PC-139: 0.04% Mn/TiO₂ και PC-142: 1% Mn/TiO₂ από την πρώτη ομάδα, PC-143: 0.04% Co/TiO₂ και PC-146: 1% Co/TiO₂ από τη δεύτερη). Η συγκέντρωση της *K. pneumoniae* παρέμενε σταθερή σε όλη τη διάρκεια του κάθε πειράματος (Εικόνα 10) οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η προσροφητική ικανότητα των καταλυτών δεν επιφέρει απολύμανση κάτι που εξηγείται από το μεγαλύτερο μέγεθος του μικροβίου σε σχέση με εκείνο του κόκκου το οποίο δεν επιτρέπει την προσρόφηση του πρώτου πάνω στο δεύτερο (Blanco et al., 2006). Ταυτόχρονα, γίνεται αντιληπτό ότι η απολύμανση προκύπτει ως αποτέλεσμα της από κοινού δράσης καταλύτη και

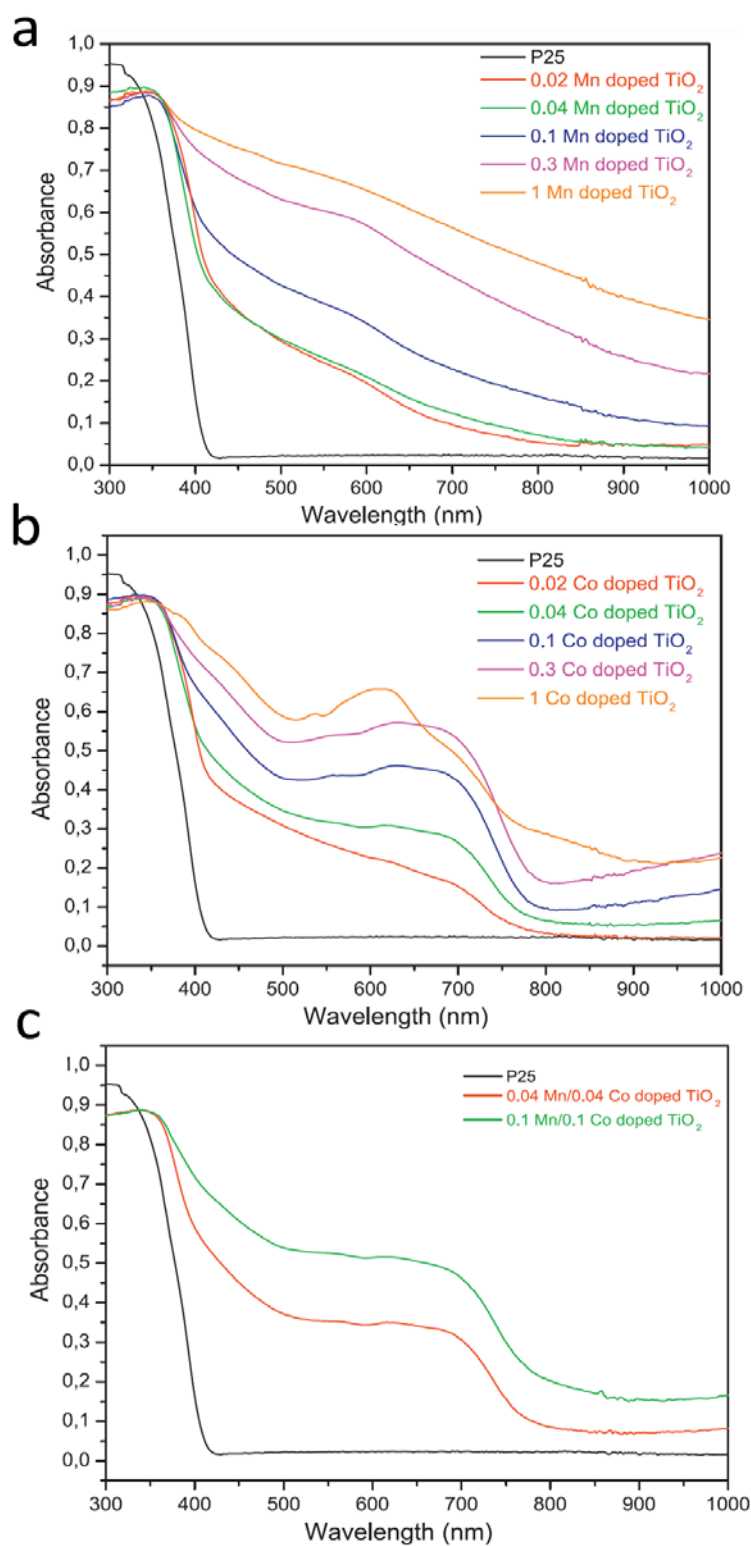
ακτινοβολίας αφού απουσία ακτινοβολίας δεν επήλθε κανενός βαθμού αδρανοποίηση.



Εικόνα 10: Επίδραση της προσροφητικής ικανότητας των καταλυτών στην αποτελεσματικότητα της απολύμανσης έναντι της *K. pneumoniae*. Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10³cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

7.6 Επίδραση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας

Η υπεροχή των ενισχυμένων με μέταλλα καταλυτών εν συγκρίσει με τον P25 ως προς τη θανάτωση βακτηρίων σε υδατικά δείγματα κάτω από προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία, είναι πιθανό να οφείλεται στη μεταβολή της περιοχής απορρόφησης του καταλύτη ο οποίος φαίνεται ότι διεύρυνε την απορρόφηση μέχρι τα 600nm, όπως επίσης και στη μείωση του ενεργειακού χάσματος (Εικόνα 11 και Πίνακας 7) (Venieri et al., 2014). Άρα, ίσως να χρησιμοποιήθηκε μεγαλύτερο μέρος του ηλιακού φάσματος και να υπερνικήθηκε ένα από τα μειονεκτήματα του P25, που είναι η χαμηλή ενεργότητά του πέρα από το φάσμα του υπεριώδους φωτός.



Εικόνα 11: UV-VIS απορρόφηση του P25 και του Mn:TiO₂(0.02–1 wt%) (a), του Co:TiO₂(0.02–1 wt%) (b) και του Mn/Co:TiO₂ (εύρος συγκέντρωσης των δυο ενισχυτών: 0.04–1 wt%)(c) (Venieri et al., 2014).

Πίνακας 7: Επίδραση του Mn και του Co στο ενεργειακό χάσμα. Με δείκτη α επισημαίνονται τα sub-bandgaps. (Venieri et al., 2014)

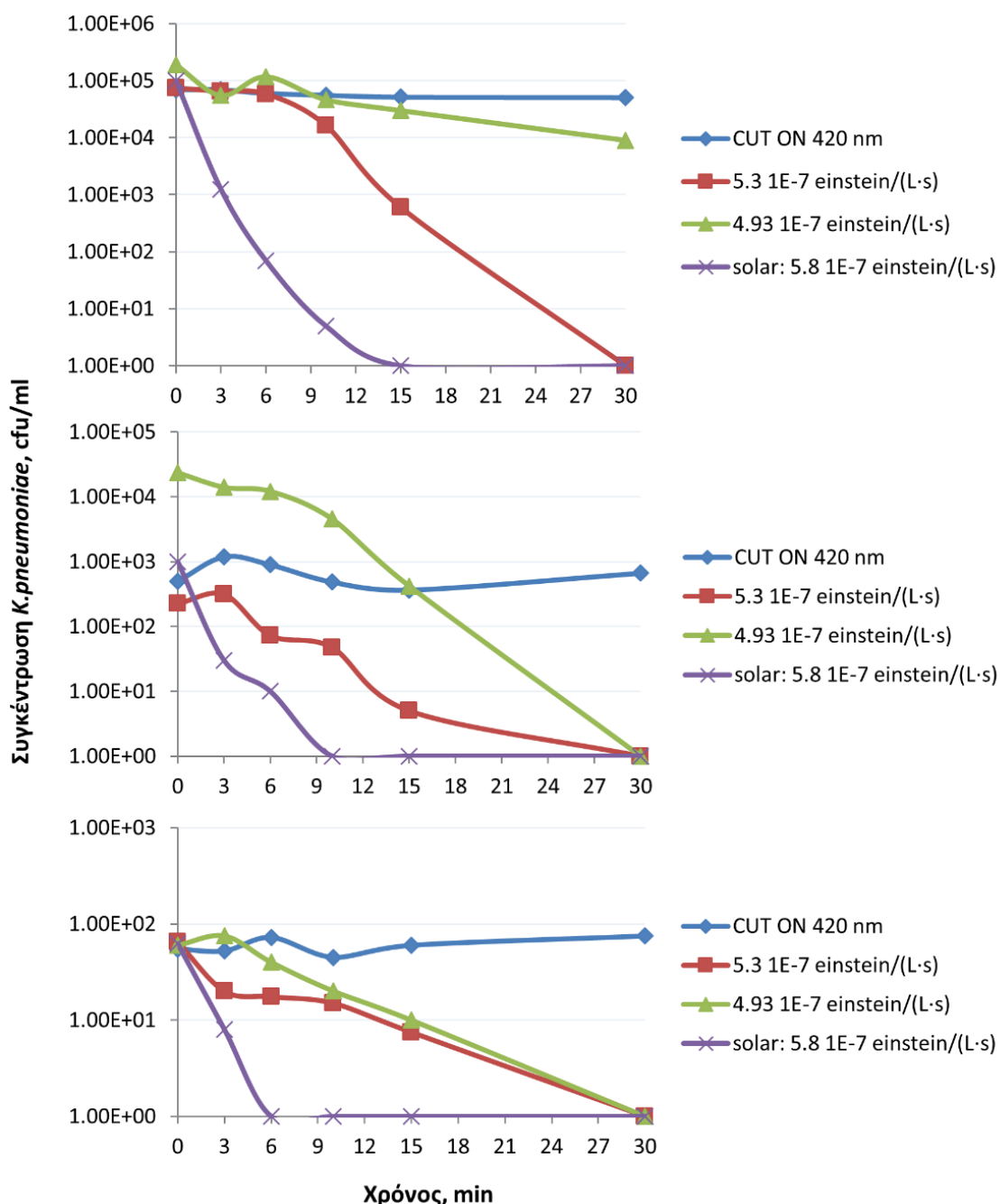
Dopant concentration (molar ratio)	Mn-doped TiO ₂ Indirect band gap (eV)	Co-doped TiO ₂ Indirect band gap (eV)	Mn/Co-doped TiO ₂ Indirect band gap (eV)
0.02	2.7	2.97	
0.04	2.85	2.85 [1.6 ^a]	3 [1.6 ^a]
0.1	2.75	2.83 [1.55 ^a]	2.7 [1.5 ^a]
0.3	2.6	2.7 [1.5 ^a]	
1	2.4	[1.41 ^a]	

Προκειμένου να ελεγχθεί αυτό πιο διεξοδικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη χρήση φίλτρου που απέκοπτε την υπεριώδη ακτινοβολία (δηλαδή το φάσμα κάτω των 420nm). Επίσης, για να εξεταστεί η επίδραση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας, έλαβαν χώρα πειράματα με φίλτρα που μείωναν την έντασή της στα 5.3×10^{-7} Einstein/(L·s) και στα 4.93×10^{-7} Einstein/(L·s) και συγκρίθηκαν με τη χρήση ολόκληρου του φάσματος της προσομοιωμένης ηλιακής ακτινοβολίας (5.8×10^{-7} Einstein/(L·s)). Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν ο πιο αποδοτικός από τους καταλύτες που είχαν ενισχυθεί με Mn (PC-142: 1% Mn/TiO₂) και ο πιο αποδοτικός από εκείνους που είχαν ενισχυθεί με Co (PC-146: 1% Co/TiO₂) ενώ χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις βακτηρίων (10^2 , 10^3 και 10^5 cfu/mL) ώστε να είναι πιο ασφαλή τα συμπεράσματα.

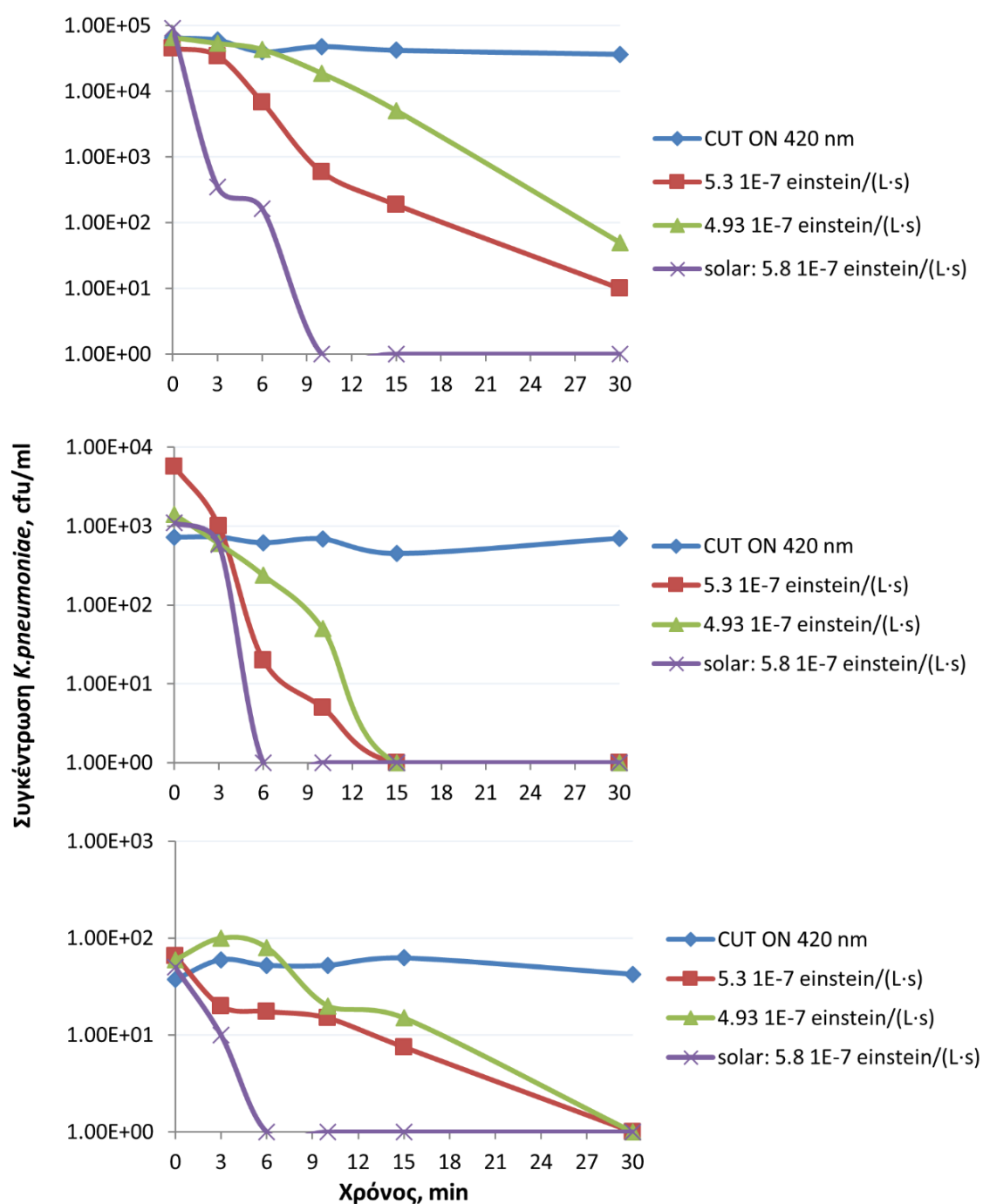
Στα διαγράμματα που ακολουθούν (Εικόνα 12, Εικόνα 13) παρατηρείται ότι προκλήθηκε μικρή ελάττωση του μικροβιακού πληθυσμού στα πειράματα από τα οποία απουσίαζε η υπεριώδης ακτινοβολία (χρήση φίλτρου cut on 420nm). Στο πείραμα με 1% Co/TiO₂ και αρχική βακτηριακή συγκέντρωση 10^5 cfu/mL η αδρανοποίηση έφτασε το 44% σε 30 λεπτά επεξεργασίας ενώ ο μέσος όρος στα 6 πειράματα ήταν περίπου 10%. Παρ'όλο που δεν επήλθε αδρανοποίηση σημαντικού βαθμού, φάνηκε ότι οι καταλύτες ενεργοποιήθηκαν στο ορατό φάσμα, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι τα μέταλλα επέκτειναν την περιοχή απορρόφησης του TiO₂.

Ακόμη, η αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* απαιτούσε περισσότερο χρόνο όσο μειωνόταν η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας. Μάλιστα, με ένταση 4.93×10^{-7} Einstein/(L·s) δεν επετεύχθη απολύμανση των εναιωρημάτων αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης 10^5 cfu/mL εντός της χρονικής διάρκειας του πειράματος ενώ στα υπόλοιπα πειράματα (με εξαίρεση ένα) όπου εξεταζόταν μικρότερη

βακτηριακή συγκέντρωση η απολύμανση έγινε στα 30 λεπτά, πολύ αργότερα δηλαδή από ό,τι συνέβαινε με την εφαρμογή όλου του φάσματος της ηλιακής ακτινοβολίας. Ελαφρώς πιο αποδοτική από την ένταση των 4.93×10^{-7} Einstein/(L·s) βρέθηκε η ένταση 5.3×10^{-7} Einstein/(L·s).



Εικόνα 12: Επίδραση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας στη φωτοκαταλυτική απολύμανση εναιωρημάτων *K. pneumoniae* διαφόρων αρχικών συγκεντρώσεων με τη χρήση του PC-142: 1% Mn/TiO₂. Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10^3 cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.



Εικόνα 13: Επίδραση του μήκους κύματος της ακτινοβολίας και της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας στη φωτοκαταλυτική απολύμανση εναιωρημάτων *K. pneumoniae* διαφόρων αρχικών συγκεντρώσεων με τη χρήση του PC-146: 1% Co/TiO₂. Αρχική συγκέντρωση βακτηρίου: 10³cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

Η επίδραση του μήκους κύματος στη φωτοκαταλυτική απολύμανση έχει μελετηθεί εκτενώς. Στις περισσότερες μελέτες, το UV-A φως παρέχει φωτόνια που είναι αποτελεσματικά στην ενεργοποίηση του καταλύτη (Bhatkhnade et al., 2004;

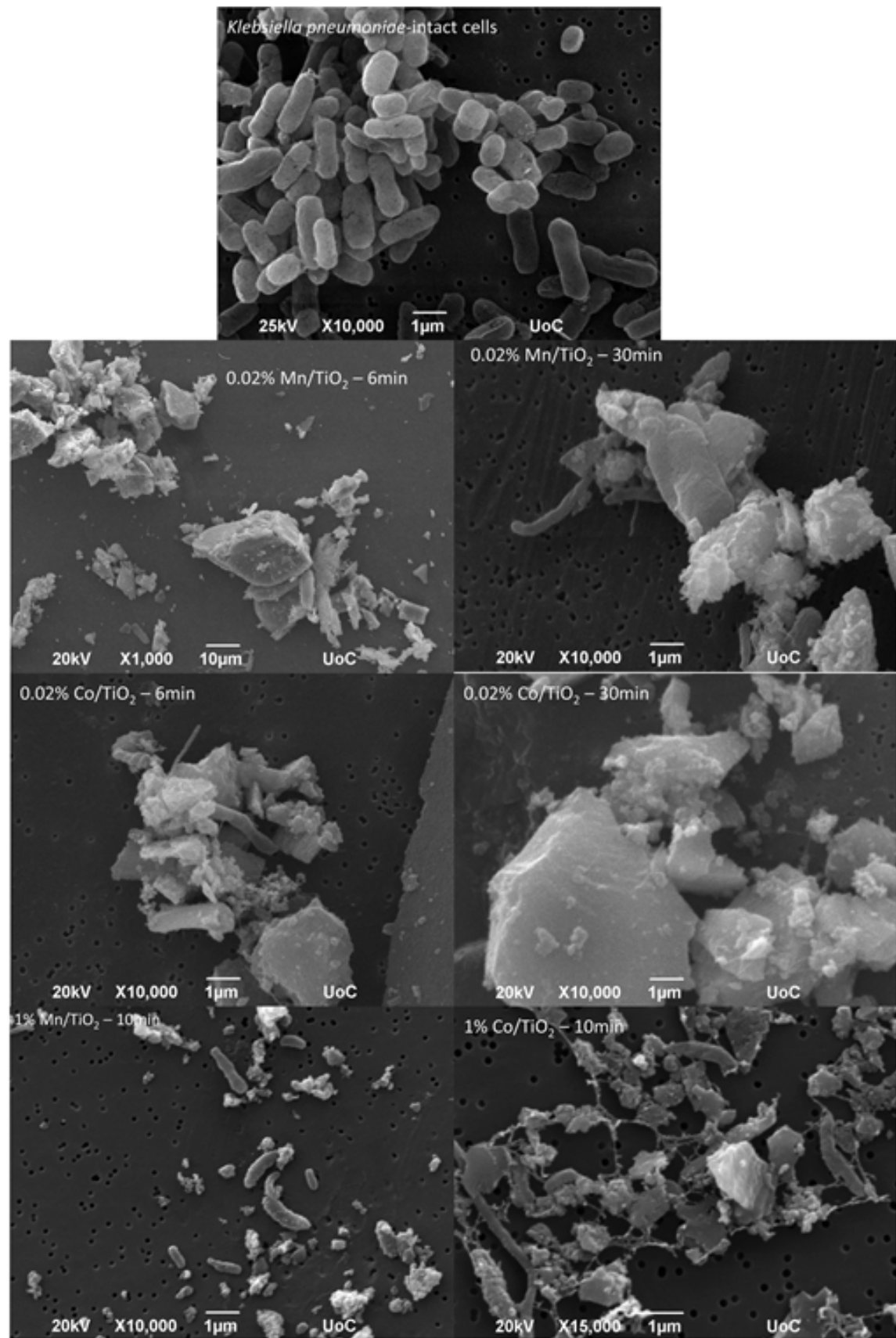
Chin et al., 2006; Ochuma et al., 2007). Στη φύση η UV-C (100-280 nm, 4.43-12.4 eV) συνήθως απορροφάται από την ατμόσφαιρα και δε φθάνει στην επιφάνεια της γης. Μόνο ο αντιδραστήρας προσομοιωμένης ακτινοβολίας μπορεί να εκπέμπει UV-C που ενεργοποιεί τον καταλύτη και προκαλεί μείωση των μικροοργανισμών. Ο μηχανισμός δράσης της περιλαμβάνει τη δημιουργία ζευγών ανάμεσα σε βάσεις μιας αλυσίδας νουκλεϊκού οξέος καθιστώντας τελικά το μικροοργανισμό ανίκανο να συνεχίσει το μεταβολισμό και την αύξησή του. Αν είναι εκτενής η δημιουργία διμερών, η καταστροφή είναι μη αναστρέψιμη και το κύτταρο απενεργοποιείται. Παρ' όλα αυτά, δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί ευαίσθητοι στη UV-C και ορισμένοι πολύ ανθεκτικοί μπορούν να επιβιώσουν. Σε αυτούς ανήκουν η *Legionella pneumophila* και οι ωκύστες του *Cryptosporidium parvum* (Malato et al., 2009).

Η φυσική UV ακτινοβολία που φθάνει στην επιφάνεια της γης αποτελείται από φάσματα UV-A (315-400 nm, 3.10-3.94 eV) και UV-B (280-315 nm, 3.94-4.43 eV). Ο μηχανισμός φωτόλυσης για αυτά τα φάσματα είναι διαφορετικός από αυτόν στην περίπτωση της UV-C. Οι UV-A και UV-B μπορούν να απορροφηθούν από τα κυτταρικά συστατικά που ονομάζονται ενδοκυτταρικά χρωμοφόρα. Η L-τρυπτοφάνη είναι το πιο γνωστό από αυτά και θεωρείται ότι περιέχει ακόρεστους δεσμούς που περιέχονται σε φλαβίνες, στεροειδή και κινόνες (Tyrrell and Keyse, 1990). Από αυτές τις UV ακτινοβολίες, η UV-A είναι τοξική μόνο παρουσία οξυγόνου. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου ή το οξειδωτικό στρες που παράγεται από την απορρόφηση φωτός από τα χρωμοφόρα μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα και τα συστατικά τους, οδηγώντας σε υπεροξειδωση των λιπιδίων, δημιουργία διμερών πυριμιδίνης και τελικά καταστροφές του DNA. Η επαφή των ενεργών μορφών οξυγόνου με το DNA έχει ως αποτέλεσμα θραύσεις στις μονές αλυσίδες και τροποποιήσεις στα νουκλεϊκά οξέα. Τέτοιες βλάβες στο DNA συνήθως είναι θνησιγόνες ή μη αναστρέψιμα μεταλλαξιγόνες. Με την παρουσία του καταλύτη TiO_2 , παρατηρείται υψηλός βαθμός κυτταρικών βλαβών καθώς το ποσό των ενεργών μορφών οξυγόνου που παράγονται αυξάνεται. Ορισμένοι μικροοργανισμοί που είναι ανθεκτικοί στη φωτόλυση με UV-A απανεργοποιήθηκαν επιτυχώς με φωτοκατάλυση με TiO_2 , δηλαδή: *E. cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* και *S. Typhimurium* (Ibáñez et al., 2003). Μεγαλύτερα μήκη κύματος (>400nm) έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί στην ηλιακή

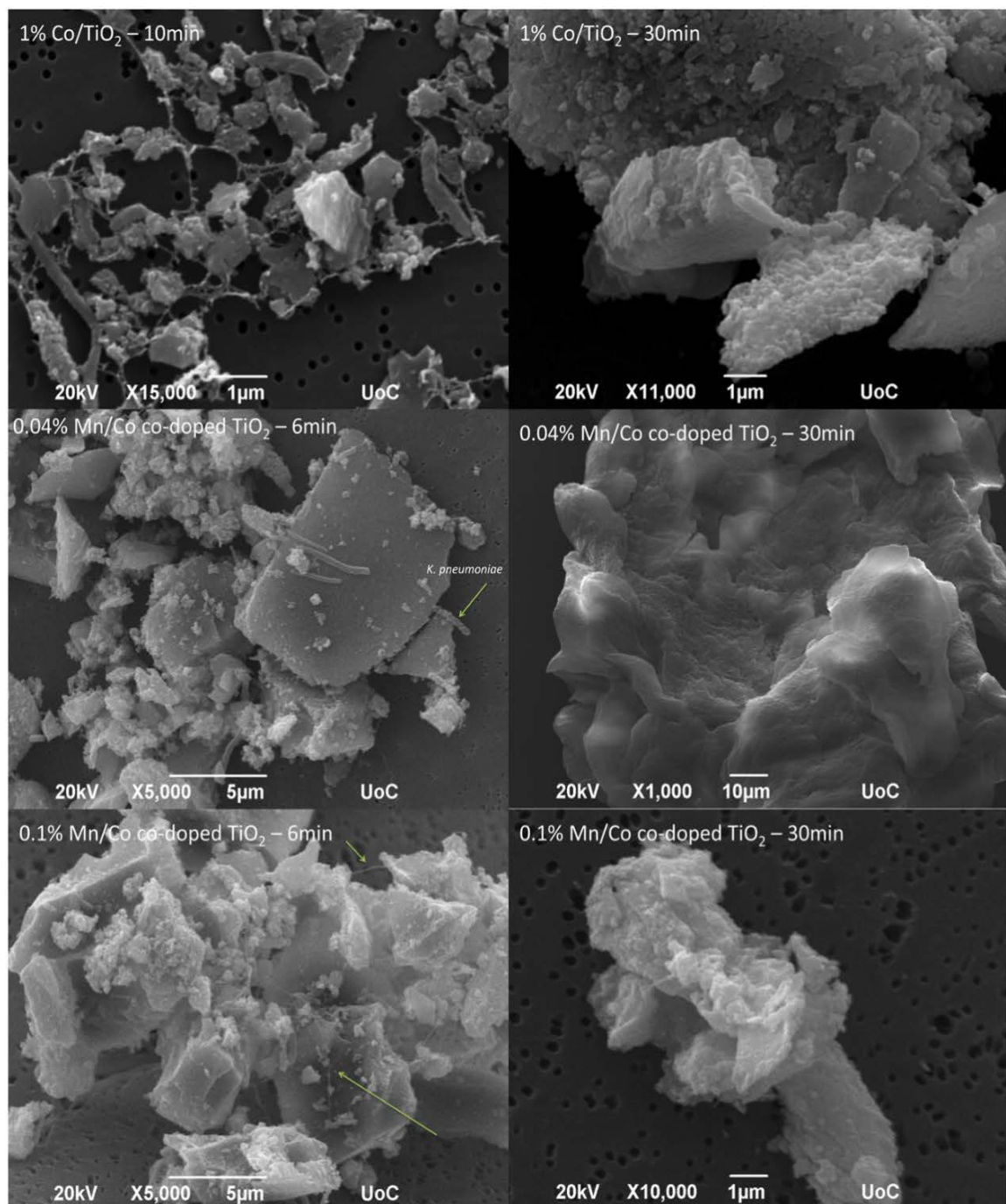
απολύμανση (SODIS) (Sichel et al., 2007; Lonnen et al., 2005; Berney et al., 2006; Kehoe et al., 2004; McGuigan et al., 2006).

7.7 Επίδραση της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας στην κυτταρική δομή

Προκειμένου να εξεταστεί η επίπτωση της φωτοκατάλυσης στην κυτταρική δομή των βακτηρίων, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης. Τα νανοσωματίδια του καταλύτη αλληλεπιδρούν με τα βακτηριακά κύτταρα προκαλώντας οξειδωτικό στρες. Η βλάβη επεκτείνεται προς την πλασματική μεμβράνη αυξάνοντας την κυτταρική διαπερατότητα και επιτρέποντας την εκροή των ενδοκυτταρικών συστατικών η οποία οδηγεί σε κυτταρικό θάνατο. (Karunakaran et al., 2010; Swetha et al., 2010). Σε πολλές περιπτώσεις η αλλαγή στη διαπερατότητα της μεμβράνης, επιβεβαιώνεται από την έξοδο ιόντων καλίου (Lu et al., 2003). Στην Εικόνα 14 και Εικόνα 15 παρουσιάζονται φωτογραφίες από κύτταρα της *K. pneumoniae* πριν την επεξεργασία καθώς και φωτογραφίες από κύτταρα μετά από κάποια λεπτά φωτοκατάλυσης. Στις τελευταίες φαίνονται υπολείμματα από τις κάψουλες πολυσακχαρίτη μαζί με το υλικό που απελευθερώθηκε από τα κύτταρα. Η προοδευτική μαζική δημιουργία ριζών υδροξυλίου κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας πιθανολογείται ότι υπερισχύει των μηχανισμών προστασίας που διαθέτουν τα βακτηριακά κύτταρα των οποίων η πυκνότητα μειώνεται αυξανόμενου του χρόνου φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας, όπως φάνηκε από προηγούμενα διαγράμματα. Όσο εξελίσσεται το πείραμα η αδρανοποίηση γίνεται πιο αργή κάτι που αποδίδεται στην προστασία των εναπομείναντων υγιών κυττάρων από τους μεταβολίτες που εκκρίνονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα (Vijay et al., 2013).



Εικόνα 14: Φωτογραφίες SEM κυττάρων *K. pneumoniae* πριν, κατά τη διάρκεια και στο πέρας της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας με τους καταλύτες 0.02% Mn/TiO₂, 0.02% Co/TiO₂ και 1% Co/TiO₂.



Εικόνα 15: Φωτογραφίες SEM κυττάρων *K. pneumoniae* κατά τη διάρκεια και στο πέρας της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας με τους καταλύτες 1% Co/TiO₂, 0.04% Mn-Co/TiO₂ και 0.1% Mn-Co/TiO₂ (τα πράσινα βέλη που δε συνοδεύονται από ένδειξη δείχνουν ινίδια προερχόμενα από τα κατεστραμμένα βακτηριακά κύτταρα).

7.8 Έλεγχος φωτοενεργοποίησης

Η βακτηριακή εκ νέου ανάπτυξη μετά την επεξεργασία θεωρείται θέμα μεγάλης σπουδαιότητας αφού θέτει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία καθώς δεν εξασφαλίζει τη διάρκεια της απολύμανσης. Γενικά, ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να είναι αποτέλεσμα της καταστροφής της μεμβράνης που τελικά οδηγεί σε απώλεια των κυτταρικών συστατικών. Όμως μια σημαντική βλάβη στο κυτταρικό τοίχωμα δεν οδηγεί απαραίτητα στο θάνατο καθώς τα βακτήρια διαθέτουν μηχανισμό για την αποκατάσταση της ζημιάς (Nadtochenko et al., 2006). Έτσι, για την εκτίμηση της πιθανής εκ νέου ανάπτυξης της *K. pneumoniae* πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε σκοτάδι και σε φυσικό φωτισμό για 48 ώρες μετά το τέλος της φωτοκατάλυσης. Στην πλειοψηφία των συγκεκριμένων πειραμάτων δεν υπήρξε ενεργοποίηση του βακτηρίου. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι 3 περιπτώσεις του Πίνακα 8. Συγκεκριμένα, φωτοενεργοποίηση παρατηρήθηκε μετά την επεξεργασία με 0.02% Mn/TiO₂, 0.1% Mn/TiO₂ και 0.1% Co/TiO₂, αλλά έφτασε το 0.2% του αρχικού πληθυσμού, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι η καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών από τα οξειδωτικά είδη που δημιουργήθηκαν στην επιφάνεια του καταλύτη ήταν επαρκώς εκτενής ώστε να επεκταθεί προς την πλασματική μεμβράνη, αυξάνοντας τη διαπερατότητα και προκαλώντας εν τέλει κυτταρικό θάνατο, επιτρέποντας σε πολύ μικρό ποσοστό τη φωτοενεργοποίηση.

Πίνακας 8: Ενεργοποίηση της *K. pneumoniae* μετά το τέλος των φωτοκαταλυτικών πειραμάτων σε σκοτάδι ή υπό φυσικό φωτισμό.

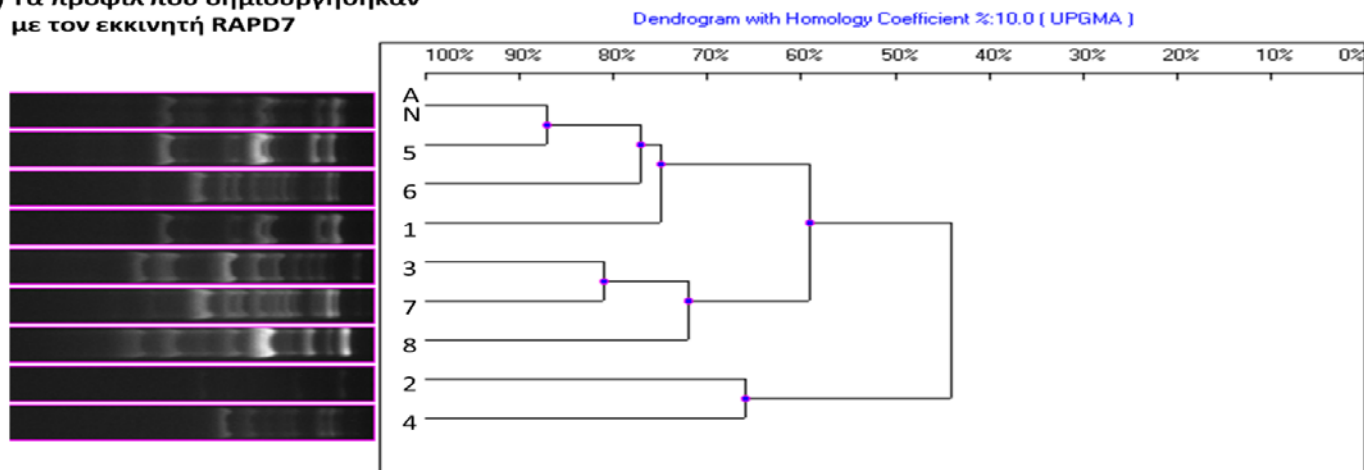
Χρησιμοποιούμενος καταλύτης	Αρχική βακτηριακή συγκέντρωση (cfu/mL)	Εκ νέου ανάπτυξη της <i>K. pneumoniae</i> (cfu/mL)			
		Παραμονή στο σκοτάδι (για 24ώρες μετά την επεξεργασία)	Παραμονή σε φυσικό φωτισμό (για 24ώρες μετά την επεξεργασία)	Παραμονή στο σκοτάδι (για 48ώρες μετά την επεξεργασία)	Παραμονή σε φυσικό φωτισμό (για 48 ώρες μετά την επεξεργασία)
0.02% Mn/TiO ₂	10 ³	0	0	0	1
0.1% Mn/TiO ₂	10 ³	0	1	0	2
0.1% Co/TiO ₂	10 ³	0	0	0	1

7.9 Επίδραση της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας στο γενετικό υλικό

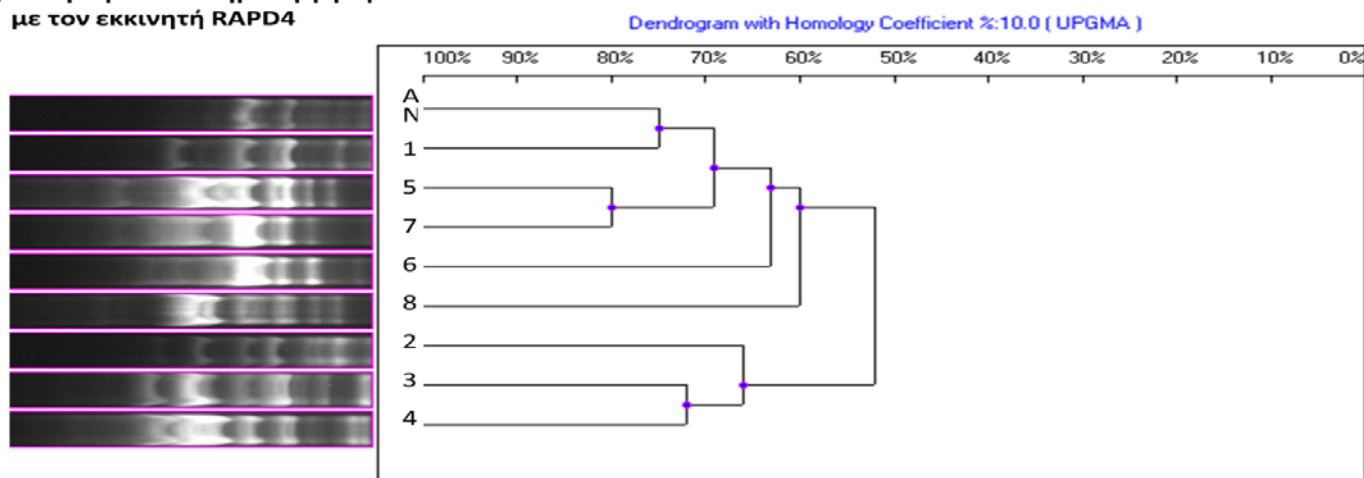
Προκειμένου να διαπιστωθεί η επαγωγή ή όχι πολυμορφισμών, ελήφθησαν κύτταρα που είχαν μείνει ζωντανά μετά από κάποια λεπτά φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας με ενισχυμένους καταλύτες, απομονώθηκε το γενετικό τους υλικό και πραγματοποιήθηκε RAPD-PCR με τη χρήση των εκκινητών RAPD7 και RAPD4. Από αυτή τη διαδικασία δημιουργήθηκε ποικιλία αποτυπωμάτων ζωνών και με τους δυο εκκινητές και αντίστοιχα δενδρογράμματα ομαδοποίησης των στελεχών.

Συγκρίνοντας τα προφίλ που δημιουργήθηκαν από τα δείγματα των κυττάρων που είχαν υποστεί φωτοκατάλυση με καταλύτες Mn με εκείνα των ανέπαφων κυττάρων (Εικόνα16), παρατηρούνται διαφορετικές ζώνες ενίσχυσης και με τους δυο εκκινητές οδηγώντας στην ομαδοποίησή τους σε διαφορετικές ομάδες ανάλογα με το βαθμό ομολογίας τους με τα ανέπαφα κύτταρα *K. pneumoniae*. Η ομολογία των αποτυπωμάτων κυμαινόταν στο 33-87% και 41-75% με τους εκκινητές RAPD7 και RAPD4, αντίστοιχα. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, φαίνεται ότι όσο περνούσε ο χρόνος ακτινοβολήσης δημιουργούνταν σημαντικές μεταβολές στα RAPD προφίλ των ζωντανών κυττάρων αφού σημαντική διάκριση ανάμεσα στις απομονώσεις καταγραφόταν μετά από μεγάλη περίοδο επεξεργασίας. Για παράδειγμα (Εικόνα16α), όταν τα βακτήρια υπόκειντο σε επεξεργασία με 0.1% Mn/TiO₂ για μόλις 3 λεπτά η ομολογία του γενετικού τους υλικού (με χρήση του εκκινητή RAPD7) με αυτό της ανέπαφης *K. pneumoniae* ήταν 87%. Όταν όμως βρίσκονταν για 30 λεπτά υπό φωτοκαταλυτική επεξεργασία με 0.02% Mn/TiO₂ η ομολογία ανάμεσα στο DNA των κυττάρων αυτών και στο DNA των ανέπαφων κυττάρων ήταν μόνο 33% ενώ στα 6 λεπτά η αντίστοιχη τιμή ήταν 75%. Σημαντική ήταν και η διαφοροποίηση όταν χρησιμοποιήθηκε ο καταλύτης 0.04% Mn/TiO₂, καθώς η ομολογία του γενετικού υλικού των ανέπαφων και εκείνων που βρίσκονταν κάτω από επεξεργασία για 30 λεπτά ήταν 55%. Από το παραπάνω όπως και από τη σύγκριση των υπόλοιπων προφίλ των απομονώσεων, φαίνεται ταυτόχρονα ότι η συγκέντρωση του μετάλλου στον καταλύτη δεν επιδρά ιδιαίτερα στο προφίλ των ζωνών.

α) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD7



β) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD4



Εικόνα16: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των *K. pneumoniae* που υπέστησαν επεξεργασία με Mn/TiO₂. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία με συγκεκριμένους καταλύτες: 1, 2: 0.02% Mn/TiO₂ μετά από 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα - 3, 4: 0.04% Mn/TiO₂ μετά από 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα - 5, 6: 0.1% Mn/TiO₂ μετά από 3 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 7, 8: 0.3% Mn/TiO₂ μετά από 6 και 15 λεπτά, αντίστοιχα.

Επίσης, παρ'όλο που τα προφίλ των ζωνών ήταν διαφορετικά για τον κάθε εκκινητή, προέκυψαν δένδρογράμματα με παρόμοιους δείκτες ομολογίας S_{xy} (Πίνακας 9). Ο μέσος δείκτης ομολογίας όταν χρησιμοποιούνταν καταλύτες Co/TiO₂ ήταν 0.45 και 0.42 με τον εκκινητή RAPD7 και με τον RAPD4 , αντίστοιχα ενώ στα πειράματα με Mn-Co/TiO₂ οι αντίστοιχες τιμές ήταν 0.36 και 0.34. Όμως, ο RAPD4 δημιούργησε πρότυπα με υψηλότερη τιμή S_{xy} στην περίπτωση καταλυτών Mn/TiO₂. Από τα παραπάνω δεν είναι ευφικτό να συναχθεί ένα σαφές, γενικό συμπέρασμα για τη σχετική διακριτική ικανότητα των 2 εκκινητών.

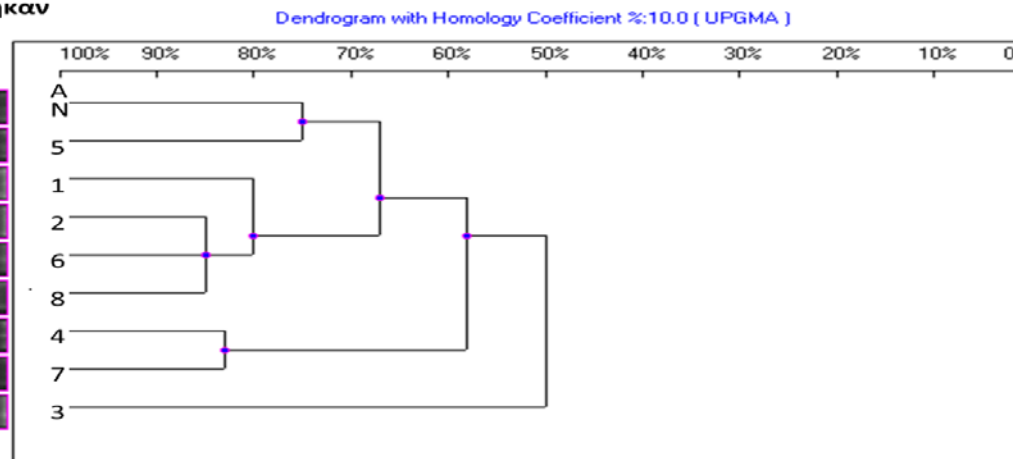
Πίνακας 9: Μέσος δείκτης ομολογίας (S_{xy}) των δημιουργούμενων προφίλ RAPD στα ζωντανά βακτήρια μετά από επεξεργασία με τους ενισχυμένους καταλύτες

Χρησιμοποιούμενοι καταλύτες	Μέσος δείκτης ομολογίας (S_{xy})	
	Εκκινητής RAPD7	Εκκινητής RAPD4
Mn/TiO ₂	0.41±0.17	0.53±0.14
Co/TiO ₂	0.45±0.14	0.42±0.10
Mn-Co/TiO ₂	0.36±0.10	0.34±0.10

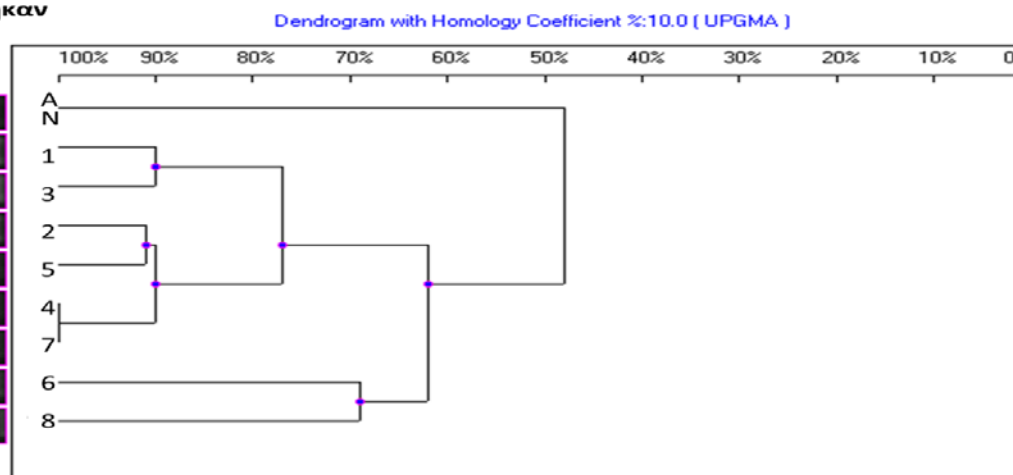
Στην περίπτωση των πειραμάτων που διεξήχθησαν με Co/TiO₂ (Εικόνα17), όταν χρησιμοποιήθηκε ο εκκινητής RAPD7, φάνηκε 66% ομολογία του ανέπαφου με στέλεχος που ήταν 6 λεπτά υπό φωτοκατάλυση ενώ με το πέρασμα του χρόνου το ποσοστό μειωνόταν αλλά όχι έντονα, ίσως λόγω του μικρού χρόνου επεξεργασίας (στα συγκεκριμένα πειράματα με Co/TiO₂ η αδρανοποίηση είχε επέλθει πολύ πριν τα 30 λεπτά, επομένως δεν υπήρχε απομόνωση επεξεργασμένη για 30 λεπτά). Επίσης, στελέχη με παρόμοιους χρόνους επεξεργασίας εμφάνισαν μεγάλη ομολογία όπως για παράδειγμα εκείνα που υπέστησαν φωτοκατάλυση διάρκειας 15, 10 και 15 λεπτών με 0,02% Co/TiO₂, 0,1% Co/TiO₂ και 0,3% Co/TiO₂, αντίστοιχα, τα οποία τοποθετήθηκαν στην ίδια ομάδα με συντελεστή ομολογίας 85%. Με τον RAPD4 το ανέπαφο στέλεχος αποτελούσε μόνο του μια ξεχωριστή ομάδα από όλα τα υπόλοιπα, με τα οποία είχε 48% ομολογία. Στα 15 λεπτά επεξεργασίας με 0,02% Co/TiO₂ ή 0,3% Co/TiO₂ η ομολογία ήταν περίπου 50%, ενώ σε παρόμοια επίπεδα κινούνταν η ομολογία και με τα υπόλοιπα στελέχη χωρίς να φαίνεται έντονη

επίδραση του χρόνου επεξεργασίας. Ίσως, αν ο χρόνος επεξεργασίας ήταν μεγαλύτερος κι έφτανε τα 30 λεπτά, όπως στα πειράματα με Mn, να προέκυπτε περαιτέρω μείωση της ομολογίας. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει η έντονη διαφοροποίηση των στελεχών που έχουν υποστεί έστω και μικρής διάρκειας επεξεργασία (ακόμη και 3 λεπτών) σε σχέση με το ανέπαφο. Αυτό ίσως υποδεικνύει καλή διακριτική ικανότητα του RAPD4, τουλάχιστον στην περίπτωση των ενισχυμένων με Co καταλυτών.

α) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD7



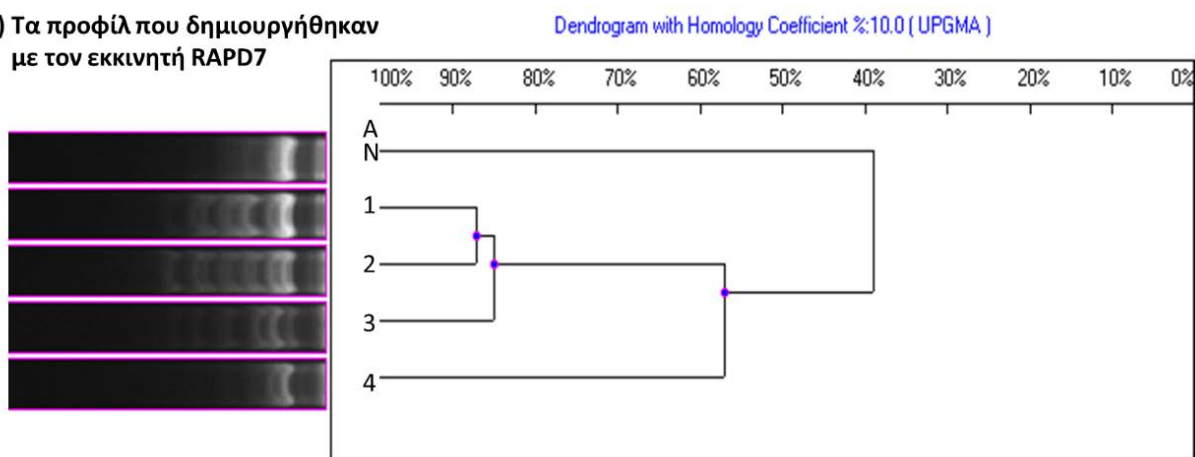
β) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD4



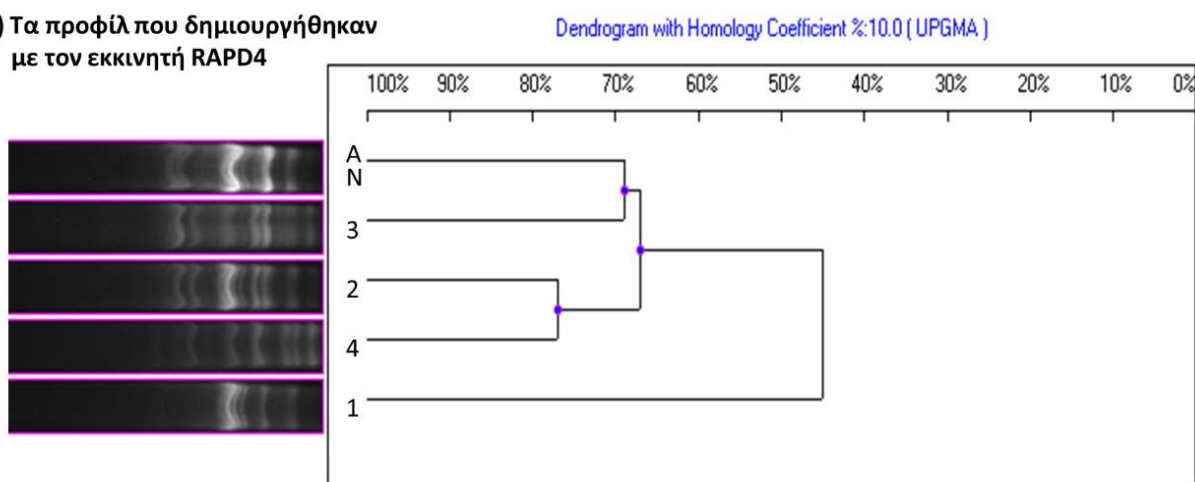
Εικόνα17: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των *K. pneumoniae* που υπέστησαν επεξεργασία με Co/ TiO₂. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία με συγκεκριμένους καταλύτες: 1, 2: 0.02% Co/TiO₂ μετά από 6 και 15 λεπτά, αντίστοιχα - 3, 4: 0.04% Co/TiO₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 5, 6: 0.1% Co/TiO₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 7, 8: 0.3% Co/TiO₂ μετά από 3 και 15 λεπτά, αντίστοιχα.

Τα πρότυπα που δημιουργήθηκαν στην περίπτωση των πειραμάτων με τους Mn-Co/TiO₂ (Εικόνα18) καταλύτες κατέδειξαν χαμηλότερη ομολογία του ανέπαφου με τα επεξεργασμένα στελέχη, εν συγκρίσει με τα πειράματα των μονομερώς ενισχυμένων καταλυτών. Ο εκκινητής RAPD7 δημιούργησε ζώνες που ομαδοποίησαν τα επεξεργασμένα στελέχη ξεχωρίζοντάς τα από το ανέπαφο με το οποίο ο συντελεστής ομολογίας ήταν 39%. Με τον RAPD4 προέκυψε μικρότερη διαφοροποίηση των επεξεργασμένων απομονώσεων από το ακέραιο μικρόβιο. Το τελευταίο είχε 66% ομολογία με στέλεχος που βρισκόταν υπό την επίδραση της φωτοκατάλυσης για 10 λεπτά. Εδώ χρειάζεται να ληφθεί υπ' όψη η μικρότερη, σε σχέση με άλλα πειράματα, διάρκεια της υφιστάμενης επεξεργασίας αφού επετεύχθη συντομότερα η αδρανοποίηση της *K. pneumoniae*.

α) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD7



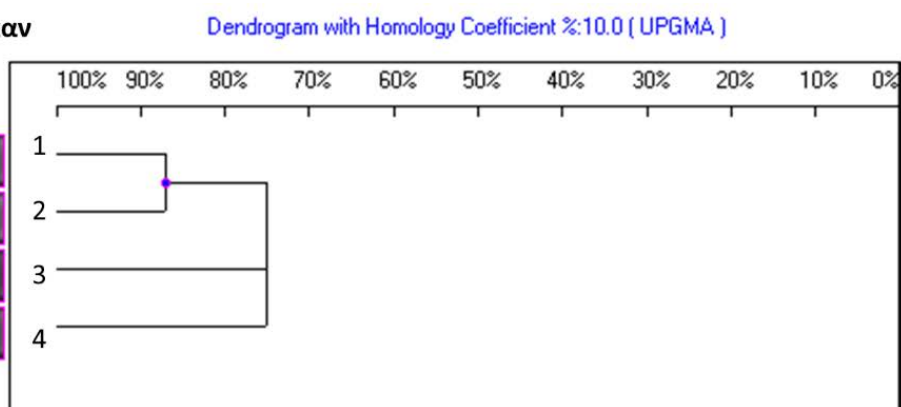
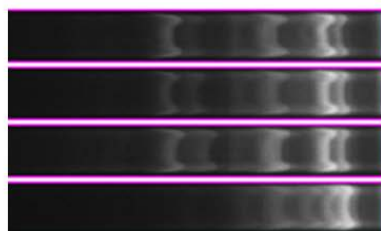
β) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD4



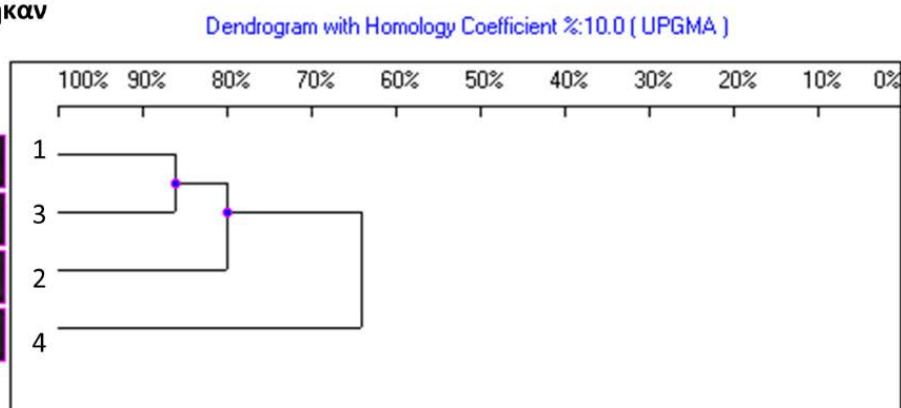
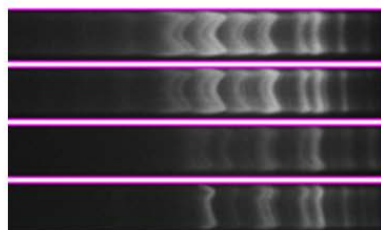
Εικόνα18: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των *K. pneumoniae* που υπέστησαν επεξεργασία με Mn-Co/TiO₂. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία: 1, 2: 0.04% Mn-Co/TiO₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 3, 4: 0.1% Mn-Co/TiO₂ μετά από 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα.

Παρατήρηση των RAPD προφίλ που δημιουργήθηκαν από τα πειράματα με Mn/TiO₂ από τα οποία απουσίαζε η ακτινοβολία, οδηγεί στη διαπίστωση ότι η διαφοροποίηση του γενετικού υλικού ήταν μικρή και αυξανόταν σταδιακά με την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας (Εικόνα 19). Αυτό είναι πιο εμφανές στην περίπτωση του RAPD7, όπου η ομολογία του γενετικού υλικού της *K. pneumoniae* που μόλις είχε τοποθετηθεί στο φωτοαντιδραστήρα (0 λεπτά φωτοκατάλυσης) με εκείνο του μικροβίου 3 λεπτών αργότερα ήταν 87%, ενώ έπεσε στο 75% στα 6 λεπτά φωτοκατάλυσης. Το γεγονός ότι στα 10 λεπτά διατηρούνταν ακόμη η ομολογία στο 75% ίσως υποδεικνύει τη μικρή επίδραση του καταλύτη όταν απουσιάζει ακτινοβολία ή αποτελεί απλώς ένδειξη της πολυμορφικότητας των στελεχών για την οποία διακρίνεται, από τη φύση της, η *K. pneumoniae*.

α) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD7



β) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD4



Εικόνα19: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των *K. pneumoniae* που υπέστησαν επεξεργασία με 1% Mn/TiO₂ απουσία ακτινοβολίας. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία: 1, 2, 3, 4: μετά από 0, 3, 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα.

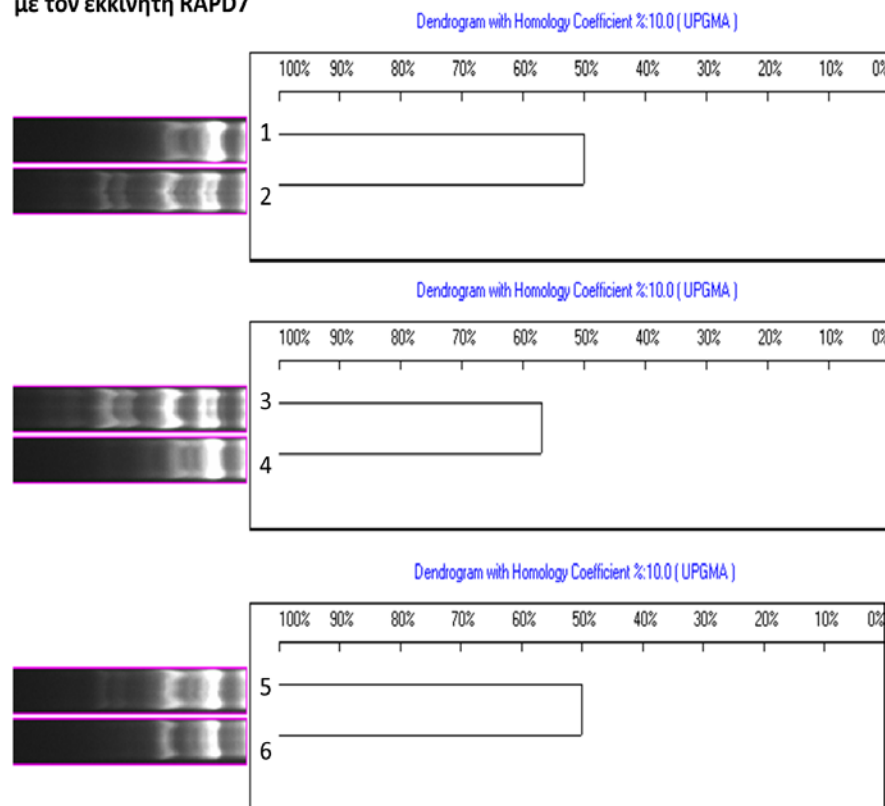
Όσον αφορά στα προφίλ που προέκυψαν για τα μικρόβια που υπέστησαν φωτοκατάλυση με τη χρήση φίλτρων που έκοβαν την υπεριώδη ακτινοβολία ή μείωναν την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας, ο RAPD4 έδωσε σημαντικής ομοιότητας ζώνες και στα 3 πειράματα (Εικόνα 20β). Η επεξεργασία 6 και 30 λεπτών με 1% Mn/TiO₂ παρουσία μόνο του ορατού φάσματος (απουσία υπεριώδους φωτός) οδήγησε σε ομολογία 87% των δυο απομονώσεων ενώ η φωτοκατάλυση με μειωμένη ένταση ηλιακής ακτινοβολίας έδωσε 81% ομολογία μεταξύ του στελέχους που ήταν κάτω από φως έντασης 5.3×10^{-7} Einstein/(L·s) για 6 λεπτά και εκείνου που ήταν για 10 λεπτά και 80% μεταξύ εκείνων που βρίσκονταν υπό 4.93×10^{-7} Einstein/(L·s) για 6 και 30 λεπτά. Πρόκειται για ποσοστά ομολογίας πολύ υψηλότερα από εκείνα που αναφέρονταν σε πειράματα με πλήρες ηλιακό φάσμα και ένταση 4.8×10^{-7} Einstein/(L·s), κάτι που θα μπορούσε να υποδεικνύει την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας στο γενετικό υλικό. Όμως, τα πρότυπα που δημιουργήθηκαν από τον RAPD7 δεν οδηγούν με σαφήνεια στο ίδιο συμπέρασμα αφού οι αντίστοιχες ομολογίες ήταν 50%, 57% και 50% (Εικόνα 20α).

Η τυποποίηση βακτηρίων χρησιμοποιείται εδώ και δεκαετίες για τη μελέτη τοπικών μικροβιακών εξάρσεων π.χ. νοσοκομειακών εξάρσεων, όπως επίσης για την παρακολούθηση νέων αναδυόμενων ανθεκτικών κλώνων πχ παθογόνων όπως του *Acinetobacter baumannii* (Diancourt et al., 2010; Van den Broek et al., 2006), της *K. pneumoniae* (Brisse et al., 2009; Mendonca et al., 2009.), του *Mycobacterium tuberculosis* (Burgos et al., 2004), της *Neisseria meningitidis* (Woods et al., 1996), της *Pseudomonas aeruginosa* (Inglis et al., 2010) και του *Staphylococcus aureus* (Makgotlho et al., 2009). Τις τελευταίες δεκαετίες οι τεχνικές γενετικής τυποποίησης (αποτύπωμα του DNA, DNA fingerprinting) έχουν αντικαταστήσει φαινοτυπικές όπως η τυποποίηση του σερότυπου, η τυποποίηση της ευαισθησίας των φάγων και η ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Από τις γενετικές μεθόδους συχνά χρησιμοποιείται η RAPD PCR ως γρήγορη και οικονομική μέθοδος για μικρής κλίμακας τυποποιήσεις. Παρ' όλο που η επαναληψιμότητά της μεταξύ των δοκιμών είναι περιορισμένη, προσφέρει τη δυνατότητα μελέτης μέσα σε μια δοκιμή της γενετικής ομοιότητας μικρού αριθμού απομονώσεων που ίσως ανήκουν σε μια συγκεκριμένη έξαρση (π.χ ενός νοσοκομείου) (Deschaght et al., 2011).

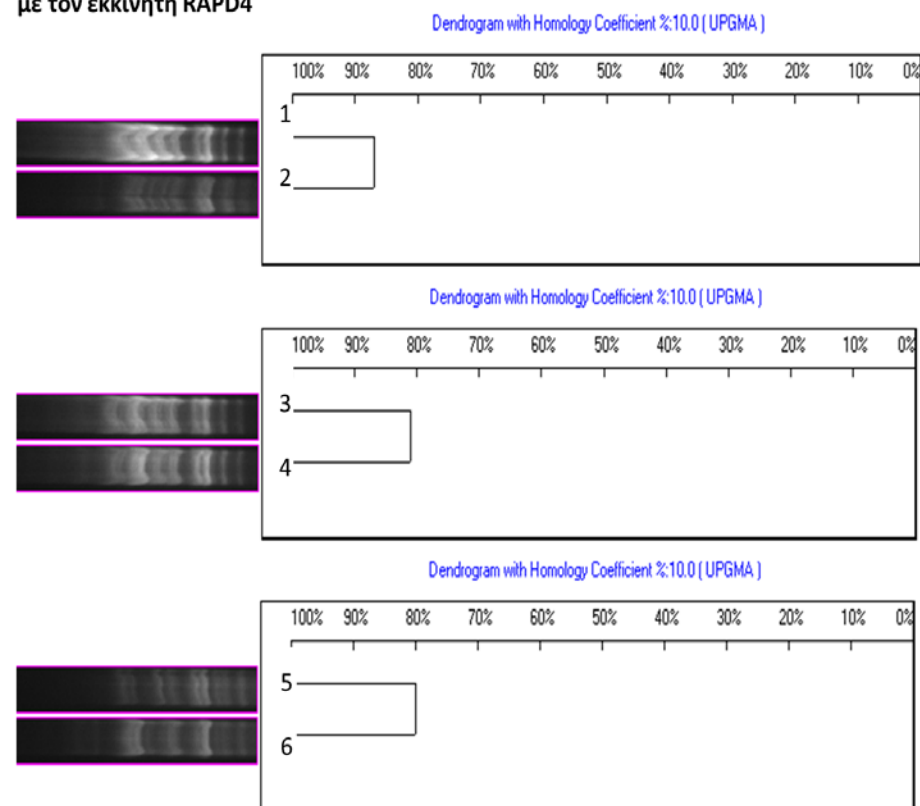
Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με το ότι η μέθοδος του RAPD αποτυπώματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την γρήγορη τυποποίηση στελεχών του συγκεκριμένου μικροοργανισμού, συμπεριλαμβανομένων και ανθεκτικών σε αντιβιοτικά και ιδιαίτερα επικίνδυνων στελεχών για τη δημόσια υγεία. Οι παθογόνοι πληθυσμοί της *K.*

pneumoniae είναι εξαιρετικά ετερογενείς (Souza Lopez et al., 2005). Οι πολυάριθμοι ορότυποί της θα μπορούσαν να εξηγήσουν τη γενετική ποικιλότητα που διαφαίνεται από την ανάλυση RAPD. Η ύπαρξη ευρείας ποικιλίας διαφορετικών *K. pneumoniae* σε στρεσογόνο περιβάλλον υπογραμμίζει την ικανότητα του είδους να επιβιώνει υπό ακραίες συνθήκες (Sinha et al., 2008). Οι πολυμορφισμοί στο γενετικό υλικό του μικροοργανισμού ίσως περιλαμβάνουν σημειακές μεταλλάξεις και γενετική αναδιάταξη, πράγμα που είναι πιθανό να αυξάνει την ήδη σημαντική λοιμογόνο δράση του είδους και μένει να εξεταστεί.

α) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD7



β) Τα προφίλ που δημιουργήθηκαν με τον εκκινητή RAPD4



Εικόνα20: RAPD αποτυπώματα που δημιουργήθηκαν με α) τον εκκινητή RAPD7 και β) τον εκκινητή RAPD4 και η αντίστοιχη ανάλυση ομαδοποίησης των *K. pneumoniae* που υπέστησαν επεξεργασία με 1% Mn/ TiO₂ με τη χρήση φίλτρων. Η ένδειξη AN αφορά στο ανέπαφο στέλεχος. Οι αριθμοί αντιστοιχούν σε στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία: 1, 2,: με ορατό μόνο φως για 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα - 3,4: με ένταση ηλιακής ακτινοβολίας 5.3×10^{-7} Einstein/(L·s) για 6 και 10 λεπτά, αντίστοιχα - 5, 6: με ένταση ηλιακής ακτινοβολίας 4.93×10^{-7} Einstein/(L·s) για 6 και 30 λεπτά, αντίστοιχα.

8 Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία επιχείρησε να ελέγξει την αδρανοποίηση της *K. pneumoniae*, το οποίο χαρακτηρίζεται ευκαιριακό παθογόνο με σημαντική ανθεκτικότητα σε διάφορους βακτηριοκτόνους παράγοντες, σε υδατική μήτρα υπό προσομειωμένη ηλιακή ακτινοβολία με τη χρήση καταλυτών TiO_2 εμπλουτισμένων με Mn ή/και Co σε μορφή κόνεως, όπως και την επίδραση της παραπάνω επεξεργασίας στο γενετικό υλικό του βακτηρίου. Ακολουθούν τα κύρια συμπεράσματα που συνήχθησαν από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων που έλαβαν χώρα:

- Όλοι οι χρησιμοποιούμενοι καταλύτες υπό ηλιακή ακτινοβολία αδρανοποιούσαν με ικανοποιητικό ρυθμό την *K. pneumoniae*, που παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε ποικιλία μεθόδων επεξεργασίας. Μάλιστα ο ρυθμός αδρανοποίησης με τους εν λόγω καταλύτες ήταν σημαντικά υψηλότερος (2-3 φορές) από εκείνον στην περίπτωση του εμπορικού καταλύτη ενώ η συγκέντρωση των μετάλλων-ενισχυτών μέσα στο ημιαγώγιμο TiO_2 φάνηκε ότι επηρεάζει τη φωτοκαταλυτική διαδικασία: αύξησή της επιτάχυνε την αδρανοποίηση.
- Η βελτίωση της απολυμαντικής ικανότητας που επήλθε με τον εμπλουτισμό του TiO_2 με μαγγάνιο ή/και κοβάλτιο δεν προήλθε από τοξική επίδραση των μετάλλων στο βακτήριο. Η ενίσχυση βελτίωσε τη φωτοκαταλυτική ικανότητα του TiO_2 , διευρύνοντας το φάσμα στο οποίο απορροφά ο καταλύτης και καθυστερώντας την επανασύνδεση ηλεκτρονίου-οπής.
- Τη βέλτιστη φωτοκαταλυτική ενεργότητα επέδειξαν οι διμερώς ενισχυμένοι (Mn-Co/TiO_2) καταλύτες οι οποίοι σε λιγότερο από 10 λεπτά φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας προκάλεσαν εξ' ολοκλήρου θανάτωση του μικροβίου, πράγμα που συνηγορεί υπέρ της συνεργιστικής δράσης των δυο μετάλλων.
- Η αύξηση της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης επηρεάζει τον απαιτούμενο για την απολύμανση χρόνο αφού φάνηκε ότι απαιτείται μεγαλύτερης διάρκειας φωτοκαταλυτική επεξεργασία για να επιτευχθεί

πλήρης αδρανοποίηση των μικροοργανισμών όταν εκείνοι είχαν υψηλότερη αρχική συγκέντρωση στο εναιώρημα.

- Η σχετικά γρήγορη φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση του συγκεκριμένου βακτηρίου συνοδεύτηκε από πολύ χαμηλά επίπεδα εκ νέου ανάπτυξης του- μετά το τέλος της επεξεργασίας - τόσο υπό συνθήκες σκότους όσο και υπό φυσικό φωτισμό, ελαχιστοποιώντας το φόβο για σημαντικά ποσοστά φωτοενεργοποίησης που συναντώνται ορισμένες φορές στα βακτήρια.
- Η ένταση και η πηγή ακτινοβολίας βρέθηκε να επηρεάζει πολύ την αποτελεσματικότητα της διεργασίας: όσο μειωνόταν η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας η αδρανοποίηση αργούσε ενώ όταν αποκοπτόταν το υπεριώδες φάσμα, η απολυμαντική ικανότητα μειωνόταν έντονα, χωρίς να είναι όμως ανύπαρκτη, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι ενισχυμένοι καταλύτες καταφέρνουν να απορροφήσουν στο ορατό φως αλλά λιγότερο.
- Η φωτοκαταλυτική επεξεργασία φάνηκε να επιδρά στο γενετικό υλικό της *K. pneumoniae* και μάλιστα η γενετική διαφοροποίηση των απομονώσεων αυξανόταν με αύξηση του χρόνου επεξεργασίας αφού τα πρότυπα των RAPD ζωνών που δημιουργούνταν - και με τους δυο εκκινητές – ήταν πολύ διαφορετικά ανάμεσα στον ανέπαφο-ακέραιο μικροοργανισμό και σε εκείνον που είχε υποστεί μακράς διάρκειας επεξεργασία.
- Τα δημιουργούμενα πρότυπα RAPD εμφάνιζαν πολύ έντονες διαφοροποιήσεις ανάμεσα στο ανέπαφο και στα στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία με Co, στην περίπτωση του εκκινητή RAPD4 .
- Οι δημιουργούμενοι πολυμορφισμοί ίσως ενισχύουν τη λοιμογόνο δράση της *K. pneumoniae*, υπόθεση που χρήζει διερεύνησης.

9 Βιβλιογραφία

- Aguedach, S. Brosillon, J. Morvan, and E. K. Lhadi, 2005. Photocatalytic degradation of azo-dyes reactive black 5 and reactive yellow 145 in water over a newly deposited titanium dioxide. *Applied Catalysis B*, 57 (1):55–62.
- Andrzejewski, P., Kasprzyk-Hordern, B., Nawrocki, J., 2005. The hazard of N-nitrosodimethylamine (NDMA) formation during water disinfection with strong oxidants. *Desalination*, 176 (1–3): 37–45.
- Anwar, H. A., Aldam, C. H., Visuvanathan, S., Hart, A. J., 2007. The effect of metal ions in solution on bacterial growth compared with wear particles from hip replacements. *The Bone and Joint Journal*, 89(12):1655-1659
- Ashayeri-panah, M., Eftekhari, F., Feizabadi, M.M., 2012. Development of an optimized random amplified polymorphic DNA protocol for fingerprinting of *Klebsiella pneumoniae*. *Letters in Applied Microbiology*, 54(4):272-279.
- Backer, H., Hollowell, J., 2000. Use of iodine for water disinfection: iodine toxicity and maximum recommended dose. *Environmental Health Perspective*, 108(8): 679–684.
- Bagley, S.T., Seider, R.J., Talbot, H.W.J., Morrow, J.E., 1978. Isolation of *Klebsiella* from within living wood. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(1):178-185.
- Bahnemann, D., 2004. Photocatalytic water treatment: solar energy applications. *Solar Energy*, 77: 445-459.
- Baroud, M., Dandache, I., Araj, G.F., Wakim, R., Kanj, S., Kanafani, Z., Khairallah, M., Sabra, A., Shehab, M., Dbaibo, G., Matar, G.M., 2013. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41(1):75-79.
- Bellar, T.A., Lichtenberg, J.J., Kroner, R.C., 1974. Occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters. *Journal of American Water Works Association*, 66(12):703–706.
- Bennett A., *Drinking water: Pathogen removal from water-technologies and techniques, Filtration and separation*. Elsevier Ltd. 45(10), 14-16, 2008.
- Bergmann, M.E.H., 2010. Drinking water disinfection by in-line electrolysis: product and inorganic by-product formation. In: *Electrochemistry for the Environment*, Chapter 7, C. Comninellis, G. Chen (Eds.), Springer, New York, USA.
- Beyersmann, D., Hartwig, A., 1992. The genetic toxicology of cobalt. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115: 137-145.

- Bhatkhnade, D.S., Kamble, S.P., Sawant, S.B., Pangarkar, V.G., 2004. Photocatalytic and photochemical degradation of nitrobenzene using artificial ultraviolet light. *Chemical Engineering Journal*, 102: 283-290.
- Binas, V.D., Sambani, K., Maggos, T., Katsanaki, A., Kiriakidis, G., 2012. Synthesis and photocatalytic activity of Mn-doped TiO₂ nanostructured powders under UV and Visible light. *Applied Catalysis B: Environmental*, 113-114:79-86.
- Bitton, G., 2011. *Wastewater microbiology*, 4th edition, Wiley-Blackwell.
- Blanco, J., Fernandez, P. and Malato, S., 2006. Solar photocatalytic detoxification and disinfection of water: Recent Overview. *Journal of Solar Energy Engineering* 129(1): 4-15.
- Bradley, B.R., Daigger, G.T., Rubin, R., Tchobanoglous, G., 2002. Evaluation of onsite wastewater treatment technologies using sustainable development criteria. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 4, 87-99.
- Brisse, S., Grimont, F. & Grimont, P. A. D., 2006. The genus *Klebsiella*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edition. Edited by M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer & E. Stackebrandt. New York: Springer.
- Brisse, S., Verhoef, J., 2001. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping, 51(3):915-24.
- Brown, C., Seider, R.J. , 1973. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. *Applied Microbiology*, 25(6):900-904.
- Bruggraber, S.F., French, G., Thompson, R.P., Powell, J.J., 2004. Selective and effective bactericidal activity of the cobalt (II) cation against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, 9(5):422-8.
- Burke, R.L., Whitehouse, C.A. , Taylor, J.K., Selby, E.B., 2009. Epidemiology of invasive *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscosity phenotype in a research colony of nonhuman primates. *Comparative Medicine*, 59(6):589-597.
- Casewell, M.W., Phillips, I., 1978. Epidemiological patterns of *Klebsiella* colonization and infection in an intensive care ward. *The Journal of Hygiene*, 80(2):295-300.
- Chen, C.C., Lu, C.S., Chung, Y.C., Jan, J.L., 2007. UV light induced photodegradation of malachite green on TiO₂ nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 141:520-528.
- Chen, J.J., Yeh, H.H., 2005. The mechanisms of potassium permanganate on algae removal. *Water Research*, 39 (18):4420–4428
- Cho, M., Cates, E.L., Kim, J.H., 2011. Inactivation and surface interactions of MS-2 bacteriophage in a TiO₂ photoelectrocatalytic reactor. *Water Research*, 45(5):2104-2110.

- Cho, M., Chung, H., Yoon, J., 2003. Disinfection of Water Containing Natural Organic Matter by Using Ozone-Initiated Radical Reactions. *Applied Environmental Microbiology*, 69(4): 2284–2291.
- Chong, M.N., Jin, B., Chow, C.W.K., Saint, C., 2010. Recent developments in photocatalytic water treatment technology: A review. *Water Research*, 44(10):2997-3027.
- Cooke, E.M., Pool, R., Brayson, J.C., Edmondson, A.S., Munro, M.E., Shinebaum, R., 1979. Further studies on the source of *Klebsiella aerogenes* in hospital patients. *The Journal of Hygiene*, 83(3): 391-395.
- Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*. 147(1):1-59.
- Deng, Q.R., Xia, X.H., Guo, M.L., Gao, Y., Shao, G., 2011. Mn-doped TiO₂ nanopowders with remarkable visible light photocatalytic activity. *Materials Letters*, 65(13):2051–2054.
- Deschaght, P., Van Simaey, L., Decat, E., Van Mechelen, E., Brisse, S., Vaneechoutte, M., 2011. Rapid genotyping of *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using melting curve analysis of RAPD-generated DNA fragments (McRAPD). *Research in Microbiology*, 162(4):386-392
- Donnenberg, M.S., 2010. Enterobacteriaceae. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7th Edition, Churchill Livingstone, ISBN: 978-0-443-06839-3.
- Drogué, P., Elmaleh, S., Rumeau, M., Bernard, C., Rambaud, A., 2001. Hydrogen peroxide production by water electrolysis: application to disinfection. *Journal of Applied Electrochemistry*, 31 (8):811–822.
- Droste, R.L., 1997. Theory and Practice of Water and Wastewater Treatment. Chapter 13, Wiley, NY.
- Dunlop, P. S. M., McMurtry, T.A., Hamilton, J. W. J., Byrne, J.A., 2008. Photocatalytic inactivation of *Clostridium perfringens* spores on TiO₂ electrodes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 196(1):113-119.
- Dutta, P.K., Ray, A.K., 2004. Experimental investigation of Taylor vortex photocatalytic reactor for water purification. *Chemical Engineering Science* 59:5249 – 5259.
- Edberg, S., Piscitelli, V., Cartter, M., 1986. Phenotypic characteristics of coliform and noncoliform bacteria from a public water supply compared with regional and national clinical species. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3):474-478.
- Farkas, A., Ciataras, D., Bocos, B., 2012. Biofilms Impact on Drinking Water Quality. Ecological Water Quality - Water Treatment and Reuse. Dr. Voudouris (Ed.), ISBN: 978-953-51-0508-4.

- Feng, H., Zhang, M.H., Yu, L.E., 2012. Hydrothermal synthesis and photocatalytic performance of metal-ions doped TiO₂. *Applied Catalysis A: General*, 413–414:238–244.
- Fisher, M.B., Keane, D.A., Fernández-Ibáñez, P., Colreavy, J., Hinder, S.J., McGuigan, K.G., Pillai, S.C., 2013. Nitrogen and Copper doped visible light active TiO₂ photocatalysts for water decontamination. *Applied Catalysis B: Environmental*, 130:8–13.
- Fukuzaki, S., 2006. Mechanisms of actions of sodium hydrochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science and Technology*, 11:147–157.
- Galbavy, E. S., Ram, K., Anastasio, C., 2010. 2-Nitrobenzaldehyde as a chemical actinometer for solution and ice photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 209:186–192.
- Gaya, U.I., Abdullah A.H., 2008. Heterogeneous Photocatalytic Degradation of Organic Contaminants over Titanium Dioxide: A Review of Fundamentals, Progress and Problems. *Journal of Photochemistry and Photobiology C, Photochemistry Reviews*, 9(1):1–12.
- George, J., Rao, K. R.; Stern, R., Chandrakasan, G., 2001. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen. *Toxicology*, 156 (2–3): 129–138.
- Glatzmaier, G.C., 1991. Innovative solar technologies for treatment of concentrated organic wastes. *Solar Energy Materials*, 24(1):672–673.
- Glatzmaier, G.C., Nix, R.G., Mehos, M.S., 1990. Solar destruction of hazardous chemicals. *Journal of Environmental Science and Health A*, 25:571–581.
- Goetz, A.M., Rihs, J.D., Chow, J.W., Singh, N., Muder, R.R., 1995. An outbreak of infusion-related *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in a liver transplantation unit. *Clinical Infectious Diseases*, 21(6):1501–1503.
- Gogate P.R., Pandit A.B., 2004. A review of imperative technologies for wastewater treatment I oxidation technologies at ambient conditions. *Journal of Advances in Environmental Research* 8 (3–4): 501–551.
- Gottschalk, C., Libra, J., Saupe, A., 2010. *Ozonation of Water and Waste Water: A Practical Guide to Understanding Ozone and its Applications*, 2nd Edition.
- Grussenmeyer, H., Wollenweber, H.W., 1992. Microbial slime control in paper machine circuit waters using an enzyme preparation – part I. *Wochenblatt für Papierfabrikation*, 22:915–917.
- Guillard, C., Bui, T.-H., Felix, C., Moule, V., Lina, B., Lejeune, P., 2008. Microbiological disinfection of water and air by photocatalysis. *Comptes Rendus Chimie*, 11(1):107–113.
- Haas C.N. and Karra S.A.B., 1984. Kinetics of Microbial Inactivation By Chlorine – I, Review of Results in Demand Free Systems, *Water research*, Vol. 18, No. 11, p.p. 1443–1449.

- Hallmich, C., Gehr R., 2010. Effect of pre- and post-UV disinfection conditions on photoreactivation of fecal coliforms in wastewater effluents. *Water Research*, 44(9):2885-93.
- Henry. V., Helbronner, A., Recklinghausen, M., 1910. Inactivation of bacteriophage MS2 in wastewater effluent with monochromatic and polychromatic ultraviolet light. *Water Research*, 24(11):1387-1393.
- Herrmann, J.G., 2005. Research to protect water infrastructure: EPA's water security research program. *Proc. SPIE* 5781, 48.
- Herrmann, J.M., 1999. Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants. *Catalysis Today* 53:115-129.
- Hijnen, W.A.M., Beerendonk, E.F., Medema, G.J., 2006. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *Water Research*, 40(1):3-22.
- Hoyer, O., 2004. Water disinfection with UV radiation—requirements and realization. In: *Proceedings of the European Conference UV Karlsruhe, UV radiation. Effects and Technologies*, September 22–24, 2003, Karlsruhe.
- Hua, I., Thompson, J.E., 2000. Inactivation of *Escherichia coli* by sonication at discrete ultrasonic frequencies. *Water Research*, 34 (15): 3888–3893.
- Huang, J., Wang, L., Ren, N., Ma, F., Juli, 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research*, 31(3):607–613.
- Hunt, M., 2006. Real Time PCR Tutorial, University of South Carolina.
- Jumaa, P., Chattopadhyay, B., 1992. Pseudobacteraemia with multiply-resistant *Klebsiella pneumoniae* resulting from contamination from the blood gas machine on a neonatal unit. *The Journal of Hospital Infection*, 22(3):251-255.
- Kadir, K., Nelson, K.L., 2014. Sunlight mediated inactivation mechanisms of *Enterococcus faecalis* and *Escherichia coli* in clear water versus waste stabilization pond water. *Water Research*, 50:307-317.
- Karunakaran, C., Abiramasundaria, G., Gomathisankara, P., Manikandana, G., Anandib, V., 2010. Cu-doped TiO₂ nanoparticles for photocatalytic disinfection of bacteria under visible light. *Journal of Colloid and Interface Science*, 352(1):68–74.
- Kerwick, M.I., Reddy, S.M., Chamberlain, A.H.L, Holt, D.M., 2005. Electrochemical disinfection, an environmentally acceptable method of drinking water disinfection? *Electrochimica Acta*, 50 (25–26): 5270-5277.
- Konstantinou I.K. and Albanis T.A., 2004. TiO₂- assisted photo catalytic degradation of azo dyes in aqueous solution: kinetic and mechanistic investigations.
- Krasner, S.W., Weinberg, H.S., Richardson, S.D., Pastor, S.J., Chinn, R., Scilimenti, M.J., Onstad, G., Thruston, A.D. Jr , 2006. The occurrence of a new generation of

- disinfection by-products. *Environmental Science and Technology*, 40(23):7175–7185.
- Kruithof, J.C., van der Leer, R.C., Hijnen, W.A.M., 1992. Practical experiences
- Lambert, R.J.W. and Johnston M.D., 2000. Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves, *Journal of Applied Microbiology*, 88:907-913.
- Lapena, L., Cerezo, M., Garcia-Augustin, P., 1995. Possible reuse of treated municipal wastewater for Citrus spp. plant irrigation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 55:697-703.
- Lee, H.U., Lee, S.C., Choi, S., Son, B., Lee, S.M., Kim, H.J., Lee, J., 2013. Efficient visible-light induced photocatalysis on nanoporous nitrogen-doped titanium dioxide catalysts. *Chemical Engineering Journal* 228: 756-764.
- Linden, K.G., Thurston, J., Schaefer, R., Malley, J.P., 2007. Enhanced UV inactivation of adenoviruses under polychromatic UV lamps. *Applied and Environmental Microbiology*, 73 (23):7571-7574.
- Lopes, A.C.S, Rodrigues J.F., Júnior, M.A.M., 2005. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. *Microbiological Research*, 160(1): 37-46.
- Lu, Z.X., Zhou, L., Zhang, Z.L., Shi, W.L., Xie, Z.X., Xie, H.Y., Pang, D.W., Shen, P., 2003. Cell damage induced by photocatalysis of TiO₂ thin films. *Langmuir*, 19(21):8765-8768
- Mackowiak, P.A., Martin, R.M., Jones, S.R., Smith, J.W., 1978. Pharyngeal colonization by gram-negative bacilli in aspiration-prone persons. *Archives of Internal Medicine*, 138(8):1224-1227.
- Madaeni, S.S., 1999. The application of membrane technology for water disinfection. *Water Research*, 33 (2): 301–308.
- Malato, S., Fernández-Ibáñez, P., Maldonado, M. I., Blanco, J., Gernjak, W., 2009. Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*, 147(1):1-60.
- Maness, P.C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(9):4094-4098.
- Martinez-Huitle, C.A., Brillas E., 2008. Electrochemical Alternatives for Drinking Water Disinfection. *Angewandte Chemie, International Edition*, 47(11):1998–2005.
- Marugán, J., Christensen, P., Egerton, T., Purnama, H., 2009. Synthesis, characterization and activity of photocatalytic sol-gel TiO₂ powders and electrodes. *Applied Catalysis B: Environmental*, 89: 273-283.

- Mason T.J., 2007. Developments in ultrasound-Non-medical. Progress in Biophysics & Molecular Biology, 93:166-175.
- Mason, T.J., 2007. Developments in ultrasound-Non-medical. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 93:166-175.
- Matsen, J.M., Spindler, J.A., Blosser, R.O. ,1974. Characterization of *Klebsiella* isolates from natyral receiving waters and comparison with human isolates. Applied Microbiology, 28(4):672-678.
- Mbwana, J., Bölin, I., Lyamuya, E., Mhalu, F., Lagergard, T., 2006. Molecular characterization of *Haemophilus ducreyi* from different geographical locations. Journal of Clinical Microbiology, 44(1):132-137.
- McEvoy, J. G., Cui, W., Zhang, Z., 2013. Degradative and disinfective properties of carbon-doped anatase-rutile TiO₂ mixtures under visible light irradiation. Catalysis Today, 207:191-199.
- Metcalfe and Eddy, Μηχανική υγρών αποβλήτων, επεξεργασία και επαναχρησιμοποίηση, Τόμος Β, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη 2007.
- Montgomerie, J.Z., 1979. Epidemiology of *Klebsiella* and hospital-associated infections. Reviews of Infectious Diseases, 1(5):736-753.
- Moore, R. M., Whitton, C. M., Shepherd, L. H., 1992. Water Treatment Process. US Patent No. 5141652.
- Munoz, M. A., Welcome, F. L. , Schukken, Y. H. , Zadoks, R. N., 2007. Molecular epidemiology of two *Klebsiella pneumoniae* mastitis outbreaks on a dairy farm in New York State. Journal of Clinical Microbiology, 45(12):3964-3971.
- Nadtochenko, V. A., Rincon, A. G., Stanca, S. E., Kiwi, J., 2005. Dynamics of *E. coli* membrane cell peroxidation during TiO₂ photocatalysis studied by ATR-FTIR spectroscopy and AFM microscopy. Journal of Photochemistry and Photobiology A, 169(2):131-137.
- Narsetti, R., R.D. Curry, R.D., McDonald, K.F., Clevenger, T.E., Nichols, L.M., 2006. Microbial inactivation in water using pulsed electric fields and magnetic pulse compressor technology, IEEE Transaction Plasma Science, 34 (4):1386-1393.
- National Cancer Institute, 1976. Report on the carcinogenesis bioassay of chloroform (CAS no. 67-66-3), MD: National Cancer Institute.
- Ochuma, I.J., Fishwick, R.P., Wood, J., Winterbottom, J.M., 2007. Optimisation of degradation conditions of 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene in water and reaction kinetics analysis using a cocurrent downflow contactor photocatalytic reactor. Applied Catalysis B: Environmental, 73:259-268.
- Omelchenko, A., Pivovarov, A.A., Swindall, W.J., 2005. Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards. Water Disinfection Using Silver and Copper Ions and Colloidal Gold. NATO Science Series, 48:159-166.

- Omelchenko, A., Pivovarov, A.A., Swindall, W.J., 2005. Modern Tools and Methods of Water Treatment for Improving Living Standards, Water Disinfection Using Silver and Copper Ions and Colloidal GOLD, NATO Science Series, 48:159-166.
- Padmanabhan, P.V.A., Sreekumar, K.P. Thiagarajan, T.K. Satpute, R.U. Bhanumurthy, K., Sengupta, P., Dey, G.K. and Warriar, K.G.K., 2006. Nano-crystalline titanium dioxide formed by reactive plasma synthesis. Vacuum, 80 (11-12):1252-1255.
- Palaiologou, A., Marakas, H., Xekoukoulotakis, N., Moya, A., Vergara, Y., Kalogerakis, N., Gikas, P., Mantzavinos, D., 2007. Disinfection of water and wastewater by TiO₂ photocatalysis, sonolysis and UV-C irradiation, Catalysis Today, 129(1-2):136-142.
- Parsons S., Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment, Iwa Publishing, 2004.
- Paul Chen J., Yang L., Wang L.K., Zhang B. (2007), Advanced Physicochemical Treatment Processes, Handbook of Environmental Engineering, Edited by : Wang L.K., Hung Y.-T. and Shamas N.K., Vol. 4, p.p. 317-365, The Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Pavlov, A. R., Pavlova, N. V., Kozyavkin, S. A., Slesarev, A. I., 2004. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. Trends in Biotechnology, 22 (5): 253–260
- Pelaez, M., Nolan, N.T., Pillai, S.C., Seery, M.K., Falaras, P., Kontos, A.G., Dunlop, P.S.M., Hamilton, J.W.J., Byrne, J.A., O'shea, K., Entezari, M.H., Dionysiou, D.D, 2012. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. Applied Catalysis B: Environmental, 125:331-349.
- Pérez, T., Alborno, J., Domínguez, A., 1998. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. Molecular Ecology, 7(10):1347-57.
- Peto, R., Gray, R., Brantom, P., Grasso, P., 1991. Dose and Time Relationships for Tumor Induction in the Liver and Esophagus of 4080 Inbred Rats by Chronic Ingestion of N-Nitrosodiethylamine or N-Nitrosodimethylamine. Cancer Research, 51 (23, Part 2): 6452–6469.
- Pettigrew, M.M., B. Foxman, B., Ecevit, Z., Marrs, C.F., Gilsdorf, J., 2002. Use of pulsed-field gel electrophoresis, enterobacterial repetitive intergenic consensus typing, and automated ribotyping to assess genomic variability among strains of nontypeable *Haemophilus influenza*. Journal of Clinical Microbiology, 40(2):660-662.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Jazwierska, P., Richardson, S.D., Chen, P.H., McKague, A.B., 2004. Halonitromethane drinking water disinfection byproducts: chemical characterization and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity. Environmental Science and Technology, 38(1):62–68

- Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4):589–603.
- Pollack, M., Charache, P., Niemann, R.E., Jett, M.P., Reinhardt, J.A., Hardy, P.H.Jr, 1972. Factors influencing colonization and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet*, 2(7779):668-671.
- Richardson, S.D., 2008. Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues. *Analytical Chemistry*, 80(12):4373-4402.
- Richardson, S.D. and Postigo, C., 2012. Drinking Water Disinfection By-products. In: *Emerging Organic Contaminants and Human Health*. Springer Link. Online ISBN:978-3-642-28132-7
- Rizzo, L., Sannino, D., Vaiano, V., Sacco, O., Scarpa, A., Pietrogiacomini, D., 2014. Effect of solar simulated N-doped TiO₂ photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an *E. coli* strain in biologically treated urban wastewater. *Applied Catalysis B: Environmental*, 144:369-378.
- Rook, J.J., 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *Water Treatment Examination*, 23:234–243.
- Rose, H.D., Scheier, J., 1968. The effect of hospitalization and antibiotic therapy on the gram-negative fecal flora. *American Journal of the Medical Sciences*, 225(4):228-236.
- Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R., Horn, G., Mullis, K., Erlich, H., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239 (4839): 487–491.
- Sambrook, J. and Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed). Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-879-69576-5.
- Seider, R.J., Knittel, M.D., Brown, C., 1975. Potential pathogens in the environment: cultural reactions and nucleic acid studies on *Klebsiella pneumoniae* from clinical and environmental sources. *Applied Microbiology*, 29(6):819-825.
- Seymour Stanton Block, 2005. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. Lippincott Williams & Wilkins, 5th edition.
- Shepherd, J.A., Waigh, R.D., Gilbert, P., 1998. Antibacterial action of 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol (bronopol). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(11): 1693–1698.
- Shin, G.A., Sobsey, M.D., 2008. Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Research*, 42(17):4562-8.
- Sinha, M., Kapley, A., Purohit, H.J., 2008. Study of biodiversity of *Klebsiella* sp.. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(2):203–207.

- Stretton, R. J., Manson, T. W., 1973. Some Aspects of the Mode of Action of the Antibacterial Compound Bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol). *Journal of Applied Bacteriology*, 36(1):61–76.
- Struve, C., Krogfelt, K.A., 2006. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: Lack of correlation between in vitro and in vivo studies. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1):149-154.
- Stylidi, M., Kondarides, D.I., Verykios, X.E., 2003. Pathways of solar light-induced photocatalytic degradation of azo dyes in aqueous TiO₂ suspensions," *Applied Catalysis B: Environmental*, 40(4):271–286.
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., 2008. How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2): 125-138.
- Suri, R. P. S., Thornton, H. M., Muruganandham, M., 2012. Disinfection of water using Pt- and Ag-doped TiO₂ photocatalysts. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 33 (14):1651-1659.
- Swetha, S., Santhosh, S.M., Balakrishna, R.G., 2010. Enhanced bactericidal activity of modified titania in sunlight against *Pseudomonas aeruginosa*, a water-borne pathogen. *Photochemistry and Photobiology*, 86(5):1127-1134.
- Taylor, G.R. , Butler, M.A., 1982. Comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride and iodine. *Journal of Hygiene*, 89 (2):321–328.
- Tchobanoglous G., Burton F.L., Stensel H.D., 2006. *Μηχανική Υγρών Αποβλήτων*,
- Tsai, T.M., Chang, H.H., Chang, K.C., Liu, Y.L., Tseng, C.C., 2010. A comparative study of the bactericidal effect of photocatalytic oxidation by TiO₂ on antibiotic-resistant and antibiotic-sensitive bacteria. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 85(12):1642-1653.
- Van Leeuwen, F. X. R., 2000. Safe drinking water: the toxicologist's approach. *Food and Chemical Toxicology*, 38:51-58.
- Venieri, D., Chatzisyμεon, E., Gonzalo, M.S., 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. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 10(11): 1744–1750.
- Venieri, D., Fraggadaki, A., Binas, V., Zachopoulos, A., Kiriakidis, G., Mantzavinos, D., 2014. Study of generated genetic polymorphisms during the photocatalytic elimination of *Klebsiella pneumoniae* in water. *Photochemical and Photobiological Sciences*.
- Venieri, D., Fraggadaki, A., Kostadima, M., Chatzisyμεon, E., Binas, V., Zachopoulos, A., Kiriakidis, G., Mantzavinos, D., 2014. Solar light and metal-doped TiO₂ to eliminate water-transmitted bacterial pathogens: Photocatalyst characterization and disinfection performance. *Applied Catalysis B: Environmental* 154–155:93–101.

- Venieri, D., Markogiannaki, E., Chatzisyneon, E., Diamadopoulos, E., Mantzavinos, D., 2013. Inactivation of *Bacillus anthracis* in water by photocatalytic, photolytic and sonochemical treatment, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 12(4):645-652.
- Vijay, M., Ramachandran, K., Ananthapadmanabhan, P.V., Nalini, B., Pillai, B.C., Bondioli, F., Manivannan, A., Narendhirakannan, R.T., 2013. Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria by reactive plasma processed nanocrystalline TiO₂ powder. *Current Applied Physics*, 13(3):510-516.
- Vimont, S., Mnif, B., Fevre, C., Brisse, S., 2008. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 57(10):1308-1310.
- Vinodgopal, K., Kamat, P.V., 1992. Photochemistry on surfaces: photodegradation of 1,3-diphenylisobenzofuran over metaloxide particles. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(12):5053-5059.
- Wang, B., Leung, M.K.H., Lu, X.Y., Chen, S.Y., 2013. Synthesis and photocatalytic activity of boron and fluorine codoped TiO₂ nanosheets with reactive facets. *Applied Energy*, 112:1190-1197.
- Willett, K.L., Hites, R.A., 2000. Chemical actinometry: Using o-nitrobenzaldehyde to measure light intensity in photochemical experiments. *Journal of Chemical Education*, 77(7): 900-902.
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22): 6531-6535.
- Wintgens, T., Salehi, F., Hochstrat, R., Melin, T., 2008. Emerging contaminants and treatment options in water recycling for indirect potable use. *Water Science and Technology*, 57(1):99-107.
- Wong, M.S., Chu, W.C., Sun, D.S., Huang, H.S., Chen, J.H., Tsai, P.J., Lin, N.T., Yu, M.S., Hsu, S.F., Wang, S.L., Chang, H.H., 2006. Visible-light-induced bactericidal activity of a nitrogen-doped titanium photocatalyst against human pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9):6111-6116.
- Wu, P., Xie, R., ImLay, K., Shang, J.K., 2010. Visible light induced bactericidal activity of titanium dioxide co-doped with nitrogen and silver. *Environmental Science and Technology*, 44(18):6992-6997.
- Yousef, A., Barakat, N.A.M., Amna, T., Al-Deyab, S.S., Hassan, M.S., Abdel-hay, A., Kim, H.Y., 2012. Inactivation of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* by CuO/TiO₂ nanofibers: A multifunctional nanomaterial via one-step electrospinning. *Ceramics International*, 38(6):4525-4532.
- Γεωργούση Κ., 2010. Φαινοτυπικά και γενετικά χαρακτηριστικά στελεχών *K. pneumoniae* MBL-θετικών, Διδακτορική Διατριβή.

- Δρόσου, Α., 2007. Φωτοκαταλυτική απολύμανση νερού παρουσία διοξειδίου του τιτανίου και υπεροξικού οξέος, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- Δρούμπαλη, Α., 2010. Έλεγχος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με χρήση UV-A και UV-C ακτινοβολίας, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- Ευγενίδου, Ε., 2010. Μελέτη της φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης επιλεγμένων οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων σε υδατικά διαλύματα», Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Κυριακόπουλος, Σ., 2009. Τριαλογονομεθάνια στο πόσιμο νερό της Αθήνας.
- Λαζανάκη, Β., 2010. Η χρήση της RealTimePCR (RT-PCR) για την ανίχνευση γενετικά τροποποιημένων στελεχών βακτηρίου (*Escherichia coli*), Διπλωματική εργασία, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.
- Λέκκας, Θ., 2005. Περιβαλλοντική Μηχανική, Διαχείριση υδατικών πόρων, Κόσμος ΠΕΜΕΡ ΕΠΕ, Αθήνα.
- Μάρακας Χ., Απολύμανση επεξεργασμένων αστικών λυμάτων με χρήση εξελιγμένων διεργασιών οξείδωσης και χλωρίωσης με συνδυασμό και σύγκριση των μεθόδων, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά 2006.
- Μήτρακας, Μ., 2001. Ποιοτικά χαρακτηριστικά και επεξεργασία νερού, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.
- Νταρακάς, Ε., 2009. Βασικές παράμετροι ελέγχου ποιότητας νερού και λυμάτων, Θεσσαλονίκη.
- Ξεκουκουλωτάκης, Ν., 2008. Προηγμένες Διεργασίες Οξείδωσης για την επεξεργασία νερού και υγρών αποβλήτων, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις.
- Πολίτη, Ε., Έλεγχος απολύμανσης νερού και λυμάτων με τη χρήση ηλεκτρόλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης, 2012.
- Πούλιος, Ι., 2007. Φωτοηλεκτροχημεία των Ημιαγωγών - Βασικές αρχές και Εφαρμογές, Θεσσαλονίκη, Πτυχιακή εργασία, ΤΕΙ Δυτικής Μακεδονίας.
- Τσίμας Μ., 2007. Ταυτόχρονη Επεξεργασία As(III) και Χουμικών Οξέων με χρήση Ετερογενούς φωτοκατάλυσης, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Χανιά.
- Φεσά, Μ., 2009. Τεχνικές απολύμανσης πόσιμου νερού, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.
- Χατζησυμεών, Ε., 2009. Επεξεργασία υγρών αποβλήτων κατεργασίας ελιάς με εφαρμογή χημικών και βιολογικών διεργασιών, Διδακτορική διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
- Χολέβα, Ε., 2007. Η γνώμη των κατοίκων του δήμου Νέσσωνας για το πόσιμο νερό, Διπλωματική εργασία, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα.

Ιστοσελίδες

www.who.int

<http://web.auth.gr/aop/research.html>

www.mrsatoday.com

www.eolabs.com

Εικόνες εξωφύλλου:

www.tumblr.com

klebsiella-pneumoniae.org