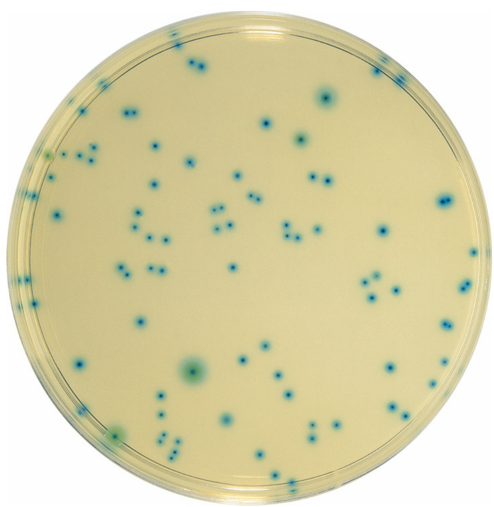
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ :

ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΣΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΗΛΕΚΤΡΟΚΑΤΑΛΥΣΗ



Εκπόνηση & συγγραφή εργασίας : Πολίτη Ελεονόρα

Αριθμός μητρώου : 2005050036

~ Χανιά, 2012 ~

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η διπλωματική αυτή εργασία ξεκίνησε τον Οκτώβριο του 2010 με την ανάθεση του θέματος και ολοκληρώθηκε τον Ιανουάριο του 2012. Στην ολοκλήρωσή της, πέραν της προσωπικής προσπάθειας, συνέβαλαν άνθρωποι τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Βενιέρη Δανάη για την ανάθεση του θέματος, την πολύτιμη καθοδήγηση που μου προσέφερε, καθώς και για την άριστη και δημιουργική συνεργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην Δρ. Χατζησυμεών Θάλεια για τη βοήθεια και την υποστήριξή της από την αρχή έως την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, αλλά και για τις πολύτιμες υποδείξεις της που ήταν καθοριστικής σημασίας για το πειραματικό μέρος της εργασίας.

Οφείλω, επιπλέον, να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Μαντζαβίνο Διονύσιο και τον κ. Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο για την παρουσία τους και για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην αξιολόγηση της εργασίας αυτής.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συμφοιτητή μου, Σοφιανό Σπύρο, για την άριστη συνεργασία μας κατά την περίοδο διεξαγωγής των πειραμάτων στο εργαστήριο και την σημαντική συμβολή του στην ολοκλήρωσή τους.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένειά μου και όλους τους φίλους μου οι οποίοι μου συμπαραστάθηκαν καθ’όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης και είναι πάντα δίπλα μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 6

ABSTRACT 7

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ 8

1.1 Το νερό και η σημασία της ποιότητάς του 8

1.2 Η ανάγκη για απολύμανση 9

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ 10

2.1 Η έννοια της απολύμανσης 10
2.1.1 Απολύμανση νερού 10
2.1.2 Απολύμανση λυμάτων 12

2.2 Μηχανισμοί δράσης της απολύμανσης 13

2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την απολυμαντική δράση 14
2.3.1 Χρόνος επαφής 14
2.3.2 Συγκέντρωση απολυμαντικού 15
2.3.3 Θολερότητα 16
2.3.4 Θερμοκρασία 16
2.3.5 Είδος του μικροοργανισμού 17
2.3.6 Διαλυτό οργανικό υλικό 17

2.4 Τύποι απολυμαντικών μέσων 17

2.5 Συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης 19
2.5.1 Χλωρίωση 19
2.5.2 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) 23
2.5.3 Οζόνωση 26

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : 29

ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΣΗ & ΦΩΤΟΗΛΕΚΤΡΟΚΑΤΑΛΥΣΗ 29

3.1 Προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι αντιρύπανσης 29

3.2 Ηλεκτρόλυση 30
3.2.1 Βασικές αρχές 30
3.2.2 Μηχανισμός ηλεκτροχημικής οξείδωσης 32

3.3 Φωτοκατάλυση 37
3.3.1 Ετερογενής φωτοκατάλυση 37
3.3.2 Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο 38
3.3.3 Μηχανισμός φωτοκαταλυτικής οξείδωσης 39
3.3.4 Ημιαγώγιμα υλικά – Καταλύτες 41

3.4 Φωτοηλεκτροκατάλυση 42

3.5 Εφαρμογή ηλεκτρόλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης για την απολύμανση νερού 43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : 44

ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΩΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ-ΔΕΙΚΤΕΣ 44

4.1 *Escherichia coli* 45

4.2 *Enterococcus faecalis*.. 47

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΟ- 49

ΠΟΙΗΣΗΣ *Escherichia coli* & *Enterococcus faecalis* 49

5.1 Συμβατική καλλιεργητική μέθοδος 49

5.2 Μοριακή μέθοδος 50

5.3 Μέθοδος PCR (μοριακή μέθοδος) 51
5.3.1 Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης PCR 51
5.3.2 Στάδια κύκλου της PCR 52
5.3.3 Φάσεις αντίδρασης PCR 53
5.3.4 Εκκινητές, DNA πολυμεράση & σύνθεση DNA 54

5.4 Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR.................................. 56

5.5 Μέθοδοι ανίχνευσης.. 62
5.5.1 Μέθοδος SYBR GREEN 63

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ 65

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 66

7.1 Υλικά 66
7.1.1 Θρεπτικά υλικά 66
7.1.2 Χημικά - βιοχημικά υλικά 66
7.1.3 Διαλύματα 66
7.1.4 Πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* & *Enterococcus faecalis* 67
7.1.5 Ηλεκτρόδια 67
7.1.6 Πηγή φωτός & καταλύτης 67
7.1.7 Εκκινητές & χρωστική 68

7.2 Μεθοδολογία.. 68
7.2.1 Ηλεκτρόλυση 70
Α) Με ηλεκτρόδιο BDD/Si... 70
Β) Με ηλεκτρόδιο TiO_2/Ti 72
7.2.2 Φωτοηλεκτροκατάλυση 73
7.2.3 Καλλιεργητική μέθοδος 75
7.2.4 Απομόνωση γενετικού υλικού βακτηρίων 77
Α) Για την *Escherichia coli* 77
Β) Για τον *Enterococcus faecalis*... 78

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ.......................... 80

8.1 Πειράματα ηλεκτρόλυσης με άνοδο BDD/Si 80

8.2 Επίδραση του είδους του μικροοργανισμού στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για νερό).. 82

8.3 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των εντερόκοκκων στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για νερό) 87

8.4 Επίδραση του είδους του μικροοργανισμού στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για πραγματικό λύμα) 89

8.5 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των *Escherichia coli* στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για πραγματικό λύμα) 93

8.6 Σύγκριση μεθόδων απολύμανσης για την αδρανοποίηση *Escherichia coli* σε νερό 96

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 98

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 100

Ελληνική βιβλιογραφία 100

Ξένη βιβλιογραφία 102

Σελίδες στο διαδίκτυο 105

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πειράματα της διπλωματικής αυτής εργασίας πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας καθώς και στο εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών και Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων του τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος, στο Πολυτεχνείο Κρήτης.

Σκοπός ήταν να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με εφαρμογή ηλεκτρόλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες για την ποιότητα της απολύμανσης ήταν τα βακτήρια *Escherichia coli* και *Enterococcus faecalis*.

Τα πειράματα ηλεκτρόλυσης πραγματοποιήθηκαν αρχικά χρησιμοποιώντας άνοδο BDD (Boron Doped Diamond), αλλά στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας με άνοδο από TiO_2 σε υπόστρωμα τιτανίου (TiO_2/Ti) και κάθοδο ζιρκονία. Ο ίδιος αντιδραστήρας χρησιμοποιήθηκε και κατά τη φωτοηλεκτροκατάλυση, υπό την επίδραση προσομοιωμένης ηλιακής ακτινοβολίας. Για τον έλεγχο της απολύμανσης, μελετήθηκε η αδρανοποίηση των βακτηρίων συναρτήσει διαφόρων παραμέτρων λειτουργίας όπως το είδος και η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων (10^3-10^7 CFU/mL), ο χρόνος απολύμανσης και το εξεταζόμενο δείγμα (νερό ή πραγματικό λύμα). Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων έγινε με τη συμβατική καλλιεργητική μέθοδο, καθώς και με τη μοριακή μέθοδο Real time PCR.

Κατά τη φωτοηλεκτροκατάλυση παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των βακτηρίων οδήγησε σε χαμηλότερο βαθμό αδρανοποίησής τους, απαιτώντας περισσότερο χρόνο επεξεργασίας για καλύτερη απολύμανση. Επιπλέον, ο *E.faecalis* εμφανίστηκε πιο ανθεκτικός από την *E.coli*, επειδή η πολύπλοκη κυτταρική δομή του παρέχει σε αυτόν μεγαλύτερη προστασία. Επίσης, σημαντικό ρόλο έπαιξε και το βακτηριακό περιεχόμενο του δείγματος, καθώς όταν σε αυτό συνυπήρχαν 2 είδη βακτηρίων ο βαθμός αδρανοποίησής τους ήταν χαμηλότερος. Η απόδοση της ηλεκτρόλυσης με TiO_2 δεν ήταν ικανοποιητική στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, καθώς η αδρανοποίηση ήταν σχεδόν αμελητέα.

ABSTRACT

During the implementation of the present thesis, experiments were carried out in the laboratory of Environmental Microbiology as well as the laboratory of Chemical Processes and Wastewater Treatment of the department of Environmental Engineering, at the Technical University of Crete.

The purpose of the present study was to evaluate the disinfection efficiency of water and secondary treated wastewater by means of electrocatalytic and photoelectrocatalytic oxidation. Bacterial strains of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* were used as indicators of the disinfection quality.

Electrocatalytic oxidation was initially carried out using a BDD (Boron Doped Diamond) anode but later on experiments were conducted using a laboratory-scale reactor equipped with a TiO_2/Ti-film anode and a zirconium cathode. The same reactor was used during photoelectrocatalytic oxidation (PEC) in the presence of simulated solar radiation. Operating parameters such as initial bacterial concentration (10^3-10^7 CFU/mL), treatment time, aqueous matrix (pure water or treated effluent) and its bacterial content were assessed concerning their impact on disinfection. Bacterial inactivation was quantified by the conventional culture method and Real time PCR, which is a molecular method.

The obtained results showed that PEC efficiency decreased when the initial bacterial concentration was increased, since high values of initial concentration require longer treatment periods for a better microbial inactivation. Furthermore, *E.faecalis* seems to be more resistant than *E.coli* as it possesses a more complex cellular structure than *E.coli*. The disinfection efficiency is also affected by the sample composition and its bacterial content. In complex samples that contained both *E.coli* and *E.faecalis*, lower inactivation rates were recorded. When electrocatalytic oxidation using a TiO_2 anode was applied, negligible inactivation was recorded, showing that electrochemical oxidation is not a suitable disinfection method at the experimental conditions under consideration.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το νερό και η σημασία της ποιότητάς του

Το νερό, απαραίτητο συστατικό της ζωής, αποτελεί πολύτιμο αγαθό. Αρκεί να σκεφτεί κανείς ότι τα 2/3 περίπου του ανθρώπινου σώματος αποτελούνται από νερό (www.watersave.gr). Οι φυσικές και χημικές του ιδιότητες συνιστούν τη βάση των βιολογικών κύκλων, ενώ οι θερμικές του ιδιότητες ελέγχουν τις κλιματολογικές συνθήκες στον πλανήτη μας και στηρίζουν το μέγιστο μέρος των δραστηριοτήτων ανθρώπου και βιομηχανίας (Χολέβα, 2007).

Μεταξύ των κρίσιμων θεμάτων που αφορούν την παγκόσμια κοινωνία είναι η ανάγκη διατήρησης των υδάτινων πόρων σε αρκετές ποσότητες και υψηλή ποιότητα. Ο αυξανόμενος πληθυσμός και η συνεχώς επεκτεινόμενη βιομηχανική και αγροτική βάση, καθώς και οι συνακόλουθα αυξανόμενες ενεργειακές ανάγκες με τα απόβλητα υποπροϊόντα τους, απαιτούν μεγάλες ποσότητες νερού. Οι ανάγκες σε γλυκό νερό αυξάνονται συνέχεια και πάνω από 80 χώρες σήμερα αντιμετωπίζουν στενότητα σε αυτό το θέμα. Η εξοικονόμηση του νερού, η ορθολογική χρήση του, η προστασία της ποιότητάς του, η προστασία των οικοσυστημάτων που συνδέονται με τον κύκλο του, είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για τη διατήρηση αυτού του πολύτιμου περιβαλλοντικού πόρου. Πέραν, όμως, από την ανάγκη να υπάρχει το νερό σε επαρκή ποσότητα, υπάρχει απαίτηση και για κατάλληλη ποιότητα. Νερό ακατάλληλης ποιότητας ουσιαστικά δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη μία εξειδικευμένη γνώση για την ευαισθητοποίηση ως προς το αγαθό του νερού (Χολέβα, 2007).

Το χρησιμοποιούμενο για ανθρώπινη κατανάλωση νερό πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία των ανθρώπων, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ενώσεις σε συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Επομένως, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία αποτελούν τα πρότυπα ποιότητας του νερού και θεσπίζονται νομοθετικά (Μήτρακας, 2001).

Η ανθρωπότητα πλήρωσε πολύ ακριβά την επί σειρά ετών έλλειψη του μικροβιολογικού ελέγχου του υδάτινου περιβάλλοντος, καθώς εκατομμύρια άνθρωποι έπεσαν θύματα σοβαρών υδατογενών λοιμώξεων. Ακόμα και σήμερα που είναι γνωστή η σημασία της μικροβιολογικής καθαρότητας του νερού για τη δημόσια υγεία, ο αριθμός των υδατογενών λοιμώξεων εξακολουθεί να είναι μεγάλος. Είναι γνωστό ότι στις χώρες του τρίτου κόσμου αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου των παιδιών. Οι λοιμώξεις αυτές 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 (Χολέβα, 2007).

Έτσι, η ποιότητα του νερού παίζει κυρίαρχο ρόλο στην υποβάθμιση των υδάτινων αλλά και των χερσαίων οικοσυστημάτων και πρέπει να εξετάζεται προκειμένου να ελέγχεται η επίδρασή του στα οικοσυστήματα και η δυνατότητα χρήσης του από τον άνθρωπο, που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος τους.

1.2 Η ανάγκη για απολύμανση

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, δηλαδή για άρδευση, αλιεία, κολύμβηση (Δρούμπαλη, 2010). Με την απολύμανση επιτυγχάνεται ελάττωση του μικροβιακού φορτίου που περιέχεται στο νερό και το οποίο είναι δυνητικά επικίνδυνο. Επίσης, νερό προερχόμενο από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων που έχει υποστεί απολύμανση μπορεί να διατεθεί ασφαλέστερα σε κάποιον υδάτινο αποδέκτη κι έτσι να προασπιστεί η δημόσια υγεία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

2.1 Η έννοια της απολύμανσης

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

Είναι ουσιώδες να διευκρινιστεί η διαφορά μεταξύ της αποστείρωσης, η οποία σημαίνει πλήρη καταστροφή όλων των μικροοργανισμών, και της απολύμανσης, η οποία χαρακτηρίζεται ως η εκλεκτική ελάττωση σε ανεκτά επίπεδα των παθογόνων μικροοργανισμών (Μήτρακας, 2001).

2.1.1 Απολύμανση νερού

Η απολύμανση του πόσιμου νερού μπορεί να θεωρηθεί το σημαντικότερο μέτρο του τελευταίου αιώνα για την προστασία της δημόσιας υγείας. Η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών που περιέχονται στο πόσιμο νερό έχει συμβάλει στη δραστική μείωση των κρουσμάτων από τις νόσους των υδάτων, όπως η χολέρα και ο τυφοειδής, στις αναπτυγμένες κυρίως χώρες, ενώ η έλλειψη του μέτρου αυτού σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες αποτελεί την αιτία πολλών θανάτων.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες συνήθως δεν υπάρχει αρκετό καθαρό πόσιμο νερό. Στις χώρες αυτές το πρόβλημα της μη ορθής απολύμανσης του νερού προκαλεί ασθένειες και θανάτους σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες όπως είναι τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα (φορείς του Aids, καρκινοπαθείς, δέκτες μεταμόσχευσης οργάνων κλπ.) (www.watermicro.gr).

Στην απολύμανση σκοπός είναι η όσο το δυνατόν καλύτερη απομάκρυνση, αδρανοποίηση και θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών κι αυτό επιτυγχάνεται με την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας νερού όπως είναι η χλωρίωση, η υπεριώδης ακτινοβολία και η οζόνωση. Ο μηχανισμός της απολύμανσης προκαλεί διαταραχές στην κυτταρική δραστηριότητα των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα αυτοί να μην είναι πλέον σε θέση να πολλαπλασιαστούν. Αυτός ο τερματισμός της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής τους είναι που οδηγεί στην καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών.

Wespionage/Flickr

Εικόνα 2.1 Πόσιμο νερό στις αναπτυσσόμενες χώρες (Φεσά, 2009)

2.1.2 Απολύμανση λυμάτων

Ο στόχος της απολύμανσης των λυμάτων είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών σε ικανοποιητικά επίπεδα, ώστε η διάθεση των λυμάτων στους υδάτινους αποδέκτες ή η επαναχρησιμοποίησή τους να μην εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία.

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

- το είδος του μικροοργανισμού
- το είδος, τις ιδιότητες και τη δόση του απολυμαντικού μέσου
- τον χρόνο έκθεσης των μικροοργανισμών στο απολυμαντικό μέσο
- τα υδραυλικά χαρακτηριστικά της δεξαμενής απολύμανσης
- τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των λυμάτων (οργανικό φορτίο, αμμωνιακό άζωτο, συγκέντρωση στερεών, θολότητα, απορροφητικότητα σε 254 nm, pH, θερμοκρασία)

Στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων η απολύμανση είναι το τελικό στάδιο κι έχει ως αποκλειστικό στόχο την εξουδετέρωση των παθογόνων και δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών. Πρέπει να σημειωθεί ότι η ανάγκη περαιτέρω επεξεργασίας για την απολύμανση των λυμάτων και την πρόσθετη μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών είναι σκόπιμο να εξετάζεται ανά περίπτωση, ανάλογα με τα έργα διάθεσης των λυμάτων και τα χαρακτηριστικά του υδάτινου αποδέκτη. Στην περίπτωση διάθεσης των λυμάτων στην ανοικτή θάλασσα η απολύμανσή τους είναι συχνά περιττή, καθώς λόγω της αραίωσης και της φυσικής φθοράς των μικροοργανισμών οι συγκεντρώσεις τους είναι αρκετά χαμηλές, ώστε να μη δημιουργούν κινδύνους μετάδοσης ασθενειών. Ιδιαίτερα κρίσιμη είναι η απολύμανση των λυμάτων στην περίπτωση επαναχρησιμοποίησής τους (Ανδρεαδάκης et al., 2005).

Πίνακας 2.1 Παθογόνοι μ/ο και ασθένειες που μπορούν να μεταδοθούν μέσω του νερού (Schoenen, 2002)

Βακτήρια	**Ιοί**	**Πρωτόζωα**
Cholera	Poliomyelitis	Amoebiasis
Typhoid fever	Hepatitis A και E	Giardiasis
Paratyphoid fever	Enterovirus	Cryptosporidiasis
Salmonellosis	Rotavirus	Toxoplasmosis
Shigellosis	Adenovirus	
Yersiniosis	Norwalk like virus	
Campylobacter Enteritis	Coxsackievirus	
E.coli (EHEC)		
Leptospirosis		

2.2 Μηχανισμοί δράσης της απολύμανσης

Ο τρόπος με τον οποίο τα διάφορα απολυμαντικά μέσα επιδρούν στην κυτταρική λειτουργία των παθογόνων μικροοργανισμών δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, όμως έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την επεξήγηση της μικροβιοκτόνου δράσης. Οι πιο βασικοί είναι (Palaiologou et al., 2007) :

- Φθορά του κυτταρικού τοιχώματος

Έχει σαν αποτέλεσμα τη λύση και το θάνατο του κυττάρου. Ορισμένες ενώσεις, όπως η πενικιλίνη, που είναι από τα σημαντικότερα αντιβιοτικά, παρεμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

- Μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας

Απολυμαντικά μέσα όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα απορρυπαντικά μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που πλέον παύει να είναι εκλεκτική, επιτρέποντας έτσι τη διαφυγή ζωτικών συστατικών όπως το άζωτο και ο φώσφορος.

- Μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος

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

- Μεταβολή του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών

Η ακτινοβολία UV μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό διπλών δεσμών στους μικροοργανισμούς και να προκληθεί ρήξη ορισμένων κλώνων DNA. Ο σχηματισμός τέτοιων δεσμών διακόπτει τη διαδικασία της αντιγραφής, ο οργανισμός δεν μπορεί πλέον να αναπαραχθεί κι έτσι παραμένει ανενεργός.

- Παρεμπόδιση της ενζυματικής δράσης

Οξειδωτικά μέσα όπως το χλώριο μπορούν να μεταβάλλουν τη χημική διευθέτηση των ενζύμων και να απενεργοποιήσουν ένζυμα που είναι απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς.

2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την απολυμαντική δράση

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, η οποία δηλώνει την ικανότητα των απολυμαντικών να επιδρούν στο κυτταρικό υλικό και να παρεμποδίζουν τους μηχανισμούς λειτουργίας του κυττάρου, εξαρτάται από τους εξής βασικούς παράγοντες (Φεσά, 2009) :

- το είδος του απολυμαντικού
- το είδος και την κατάσταση του μικροοργανισμού
- την συγκέντρωση του απολυμαντικού
- τον χρόνο επαφής
- το pH
- τη θερμοκρασία
- τη θολερότητα
- το διαλυτό οργανικό υλικό

2.3.1 Χρόνος επαφής

Ο χρόνος επαφής αποτελεί ίσως μία από τις σημαντικότερες μεταβλητές στη διεργασία της απολύμανσης. Η Harriet Chick, εργαζόμενη στην Αγγλία στις αρχές του 1900, παρατήρησε ότι για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής τόσο μεγαλύτερη είναι η θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτή η παρατήρηση αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1908 και σε διαφορετική μορφή ο νόμος της Chick είναι (Metcalf and Eddy, 2007; Haas and Karra, 1984; Lambert and Johnston, 2000) :

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

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 ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t

t ο χρόνος

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

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

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

2.3.2 Συγκέντρωση 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 μ/ο

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.

Από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει ότι για μεγάλες συγκεντρώσεις απολυμαντικού απαιτούνται μικροί χρόνοι επαφής, ενώ για μικρές συγκεντρώσεις μεγάλοι χρόνοι επαφής και συνεπώς μεγάλες δεξαμενές απολύμανσης (Λέκκας, 2005).

2.3.3 Θολερότητα

Η θολερότητα χρησιμοποιείται ευρέως ως μέτρο της συγκέντρωσης των αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό. Έχει αποδειχθεί ότι επιδρά αρνητικά στη διαδικασία απολύμανσης, επειδή τα σωματίδια που τη δημιουργούν μπορεί να περιβάλλουν και να προστατεύουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς από τη δράση του απολυμαντικού. Επιπλέον, το υλικό από το οποίο αποτελούνται τα σωματίδια αυτά απαιτεί αυξημένες δόσεις απολύμανσης, προκαλώντας έτσι μεγαλύτερη κατανάλωση απολυμαντικού.

2.3.4 Θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό θανάτωσης των μικροοργανισμών με χημικά απολυμαντικά μπορεί να προσδιορισθεί από μια μορφή της εξίσωσης *van't Hoff – Arrhenius*. Η σχέση για τον απαιτούμενο χρόνο *t*, ώστε να επιτευχθεί συγκεκριμένο ποσοστό θανάτωσης είναι (Metcalf and Eddy, 2007) :

$$\ln\frac{t_1}{t_2} = \frac{E\left(T_2 - T_1\right)}{RT_1T_2}$$

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)

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

2.3.5 Είδος του μικροοργανισμού

Η απόδοση της απολύμανσης επηρεάζεται από τη φύση, τον τύπο και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Τα πρωτόζωα είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν και ακολουθούν τα βακτήρια και οι ιοί. Μερικοί μικροοργανισμοί εμφανίζονται με ανθεκτικές μορφές (π.χ. κύστες, σπόρια), οπότε και αδρανοποιούνται δυσκολότερα. Η επιλογή του κατάλληλου απολυμαντικού γίνεται ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση.

2.3.6 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. Επιπλέον, η παρουσία αυτού του υλικού οδηγεί στη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων απολύμανσης.

2.4 Τύποι απολυμαντικών μέσων

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για απολύμανση διακρίνονται σε χημικές και μη χημικές.

- **Χημικά μέσα**

  Τα χημικά μέσα μπορούν να διαχωριστούν σε 2 μεγάλες κατηγορίες, τα οξειδωτικά και τα μη οξειδωτικά απολυμαντικά.

  Τα <u>οξειδωτικά</u> απολυμαντικά περιλαμβάνουν μία σειρά από ενώσεις με οξειδωτικό δυναμικό, όπως :

- Αέριο χλώριο (Cl_2)
- Υποχλωριώδες νάτριο ($NaOCl$) ή χλωριώδες νάτριο ($NaOCl_2$)

- Διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2)
- Βρώμιο (Br_2)
- Ιώδιο (I_2)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- Όζον (O_3)

Στα μη οξειδωτικά απολυμαντικά ανήκουν οργανικές κυρίως ενώσεις, όπως :

- μεθυλενοδιθειοκυάνιο (MBT)
- διβρωμονιτριλοπροπιοναμίδιο (BNPA)
- ισοθειαζόλες κ.α.

- **Μη χημικά μέσα**

  Στα μη χημικά μέσα απολύμανσης του νερού ανήκουν :

  - η υπεριώδης ακτινοβολία
  - η αποστειρωτική διήθηση
  - η θερμότητα
  - η ραδιενεργός ακτινοβολία

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

Τα **επιθυμητά χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού** είναι :

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

Οι παραπάνω ιδιότητες δεν είναι όλες συγκεντρωμένες σε ένα απολυμαντικό, θα πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των εναλλακτικών μεθόδων (Ανδρεαδάκης et al., 2005).

2.5 Συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης

Κοινός στόχος όλων των μεθόδων απολύμανσης που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα είναι η καταστροφή των βακτηρίων, ιών και άλλων μικροοργανισμών που πιθανόν να είναι φορείς ασθενειών ή μπορούν να εξελιχθούν σε παθογόνους. Σήμερα οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης είναι οι εξής :

- **Χλωρίωση** (αέριο χλώριο, υποχλωριώδες νάτριο, διοξείδιο του χλωρίου)
- **Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία** (UV)
- **Οζόνωση** (με παραγωγή όζοντος από ατμοσφαιρικό αέρα ή οξυγόνο)

2.5.1 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. Τα πρώτα προβλήματα που παρουσιάστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του ’40 στις Η.Π.Α. και συνδέονταν με τη δυσάρεστη γεύση και οσμή του νερού έγιναν αφορμή για την προσπάθεια βελτίωσης της μεθόδου. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, αλλά και θεμάτων που σχετίζονται με την ασφαλή διαχείριση των εγκαταστάσεων απολύμανσης, την ελάττωση των επιπτώσεων των παραπροϊόντων απολύμανσης, τη μείωση του λειτουργικού κόστους και φυσικά τη βελτίωση της απολυμαντικής δράσης, αναπτύχθηκαν παράλληλα και με τις τεχνολογικές εξελίξεις νέες μέθοδοι χλωρίωσης ή και παραλλαγές της απολύμανσης με χλώριο (διοξείδιο του χλωρίου, υποχλωριώδες νάτριο) (Parsons et al., 2004).

Το χλώριο (Cl_2) είναι ουσία τοξική για τον άνθρωπο και τα ζώα, όμως σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι οποίες απαιτούνται για την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών είναι αβλαβές. Πέραν της μικροβιοκτόνου του ικανότητας, το χλώριο ενεργεί και σαν οξειδωτικός παράγοντας και διασπά τις οργανικές ουσίες.

Η χλωρίωση επιτυγχάνεται με προσθήκη στο νερό είτε ελεύθερου χλωρίου είτε χημικών ενώσεων του χλωρίου. Συγκεκριμένα, οι βασικές μορφές με τις οποίες χρησιμοποιείται το χλώριο ως απολυμαντικό είναι :

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

Η ποσότητα του χλωρίου που απαιτείται για απολύμανση εξαρτάται από την περιεκτικότητα των οργανικών ουσιών στο νερό. Σε συνήθεις περιπτώσεις, πλήρης απολύμανση επιτυγχάνεται όταν, μετά την ανάμειξη και οξείδωση, η περιεκτικότητα του **ελεύθερου διαθέσιμου χλωρίου**, στο οποίο γίνεται αναφορά παρακάτω, είναι περίπου 0.2 ppm. Περισσότερη χλωρίωση προσδίδει στο νερό οσμή και γεύση, ενώ για περιεκτικότητα μικρότερη του ορίου των 0.2 ppm δεν εξασφαλίζεται πλήρης απολύμανση. Για να μην επιδρά δυσμενώς το ελεύθερο χλώριο στον φυσικό αποδέκτη πρέπει να ελέγχεται η περιεκτικότητά του και αυτή η μέτρηση δείχνει παράλληλα αν η χλωρίωση που γίνεται είναι επαρκής. Επιπλέον, το ποσοστό καταστροφής των βακτηρίων εξαρτάται από τον χρόνο επαφής τους με το χλώριο και σαν ελάχιστος χρόνος χλωρίωσης στην καλύτερη των περιπτώσεων θεωρούνται τα 15-30 λεπτά (Νταρακάς, 2009).

Αν και ο τρόπος με τον οποίο το χλώριο καταστρέφει τους παθογόνους μικροοργανισμούς δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος, για τα βακτήρια η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το χλώριο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη τους και αδρανοποιεί ορισμένα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Επειδή η αντίδραση χλωρίου-ενζύμων είναι αντιστρέψιμη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου είναι δυνατόν τα ένζυμα να επανασχηματιστούν και να συνεχίσουν τη λειτουργία τους (Μάρακας, 2006).

Όταν το <u>αέριο χλώριο</u> αναμιγνύεται με το νερό σχηματίζεται υποχλωριώδες οξύ (HOCl) :

$$Cl_2 + H_2O \leftrightarrow HOCl + H^+ + Cl^-$$

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

$$HOCl \leftrightarrow H^+ + OCl^-$$

Ανάλογα με την τιμή του pH στο νερό υπερισχύει το HOCl (χαμηλό pH) ή τα υποχλωριώδη ιόντα OCl^- (υψηλό pH). Αξίζει να σημειωθεί ότι η απολυμαντική δράση του HOCl είναι ισχυρότερη από αυτήν των OCl^- (Νταρακάς, 2009). Αυτό οφείλεται στο ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί έχουν μέσα στο νερό αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα τα OCl^-, λόγω του ομώνυμου φορτίου, να απωθούνται και να διεισδύουν δύσκολα στο κύτταρο, ενώ το HOCl πλησιάζει, διεισδύει ευκολότερα στο κύτταρο και αδρανοποιεί τα ένζυμα (Μάρακας, 2006).

Το τμήμα του συνολικά υπάρχοντος ενεργού χλωρίου, το οποίο βρίσκεται σε μορφή υποχλωριώδους οξέως HOCl και υποχλωριωδών ιόντων OCl^- είναι γνωστό ως **ελεύθερο διαθέσιμο χλώριο ή υπολειμματικό χλώριο**. Σημειώνεται ότι ενεργό χλώριο θεωρείται το άθροισμα όλων των ενώσεων χλωρίου που υπάρχουν σε κάποια χρονική στιγμή στο νερό και έχουν απολυμαντική δράση.

Όταν χρησιμοποιείται υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) προκύπτει HOCl που για υψηλές τιμές του pH μετατρέπεται σε υποχλωριώδη ιόντα OCl^-, των οποίων η απολυμαντική δράση δεν είναι αποτελεσματική :

$$NaOCl + H_2O \leftrightarrow HOCl + NaOH$$

Σε περίπτωση υψηλού pH απαιτείται διόρθωσή του για να γίνει μικρότερο του 7.5

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

Το <u>διοξείδιο του χλωρίου</u> ClO_2 δεν διατίθεται σε εμπορεύσιμη μορφή και πρέπει να παράγεται στο σημείο χρήσης κάτω από αυστηρές συνθήκες ασφαλείας :

$$2NaOCl_2 + Cl_2 \leftrightarrow 2ClO_2 + 2NaCl$$

Έχει καλή απολυμαντική δράση και δημιουργεί πολύ λίγα παραπροϊόντα, όπως τριαλομεθάνια. 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.

<u>Πλεονεκτήματα χλωρίωσης</u> (Δρούμπαλη, 2010) :

- ευκολία χρήσης της
- χαμηλό κόστος
- ισχυρή δραστικότητα σε ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών
- υπολειμματική δράση (το χλώριο παραμένει σαν προστατευτικός παράγοντας για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα στο νερό)

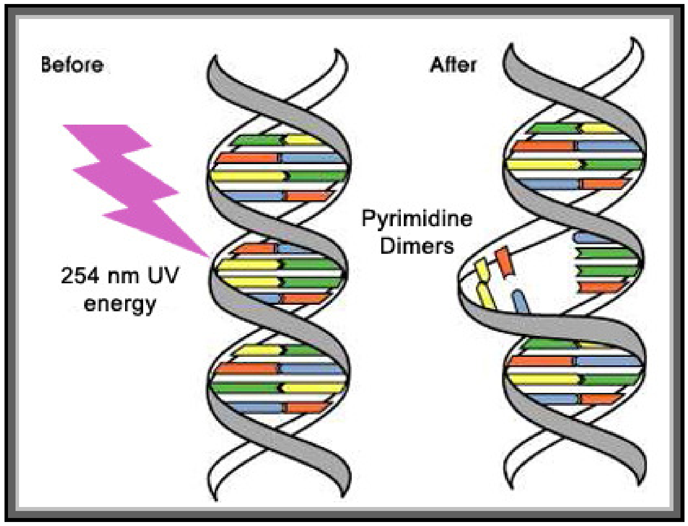
Παρόλο που η χρήση του χλωρίου για την απολύμανση του πόσιμου νερού και των επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων είναι ιδιαίτερης σημασίας για τη δημόσια υγεία, η συνεχής χρήση του έχει προκαλέσει προβληματισμό και ανησυχία. Τα βασικότερα **<u>μειονεκτήματα της χλωρίωσης</u>** είναι τα ακόλουθα (Δρούμπαλη, 2010) :

- Αντίδραση του χλωρίου με ορισμένες χημικές ενώσεις που περιέχονται στο νερό και δημιουργία επικίνδυνων παραπροϊόντων όπως τα τριαλομεθάνια, που θεωρούνται ύποπτα για καρκινογένεση
- Η χλωρίωση προσδίδει χαρακτηριστική έντονη οσμή και γεύση στο νερό, η οποία οφείλεται όχι μόνο στο χλώριο αλλά και σε διάφορα παραπροϊόντα απολύμανσης
- Απαιτείται ένα ακόλουθο βήμα αποχλωρίωσης του χλωριωμένου νερού, με στόχο να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές τοξικές επιδράσεις των υπολειμμάτων χλωρίου καθώς και των παραπροϊόντων απολύμανσης στους υδρόβιους οργανισμούς, ειδικά στην περίπτωση που το νερό αυτό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση

- Η χλωρίωση δεν καθιστά το νερό απολύτως καθαρό, καθώς αρκετοί μικροοργανισμοί, όπως ιοί και παθογόνα βακτήρια, είναι ανθεκτικοί στο χλώριο, γεγονός που εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία καθιστώντας απαραίτητη τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων απολύμανσης. Για παράδειγμα, παράσιτα όπως η *Giardia* και το *Cryptosporidium* ευθύνονται για αρκετές γαστρεντερικές παθήσεις.

2.5.2 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

Η υπεριώδης (UV) ακτινοβολία βρίσκεται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ του ορατού φωτός και των ακτίνων X και μπορεί καλύτερα να περιγραφεί ως αόρατη ακτινοβολία. Αυτή η μέθοδος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταστροφή μονοκύτταρων μικροοργανισμών, όπως είναι οι παθογόνοι ιοί. Η UV ακτινοβολία δε σκοτώνει άμεσα τους μικροοργανισμούς, αλλά αδρανοποιεί το πυρηνικό DNA τους με αποτέλεσμα να παύει να λειτουργεί ο αναπαραγωγικός μηχανισμός. Η καταστροφή των μικροοργανισμών επιτυγχάνεται με την απορρόφηση της ακτινοβολίας από το γενετικό υλικό των κυττάρων τους. Η μέγιστη καταστροφική ικανότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας επιτυγχάνεται σε μήκος κύματος 250 – 265 nm, όπου αναφέρεται η μέγιστη απορρόφησή της από τα νουκλεϊκά οξέα. Όταν το γενετικό υλικό των κυττάρων απορροφά την ενέργεια από την υπεριώδη ακτινοβολία σχηματίζονται διμερή πυριμιδίνης μεταξύ γενετικών βάσεων πυριμιδίνης στην ίδια αλυσίδα DNA, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα (Μήτρακας, 2001). Χάρη σε αυτό το δεσμό διμερών στην αλυσίδα του DNA, οι μικροοργανισμοί προσβάλλονται με τέτοιο τρόπο ώστε ο διαχωρισμός των κυττάρων και επομένως ο πολλαπλασιασμός τους να είναι αδύνατος : ο μικροοργανισμός γίνεται αβλαβής και θανατώνεται (Λέκκας, 2005).



Εικόνα 2.2 Μηχανισμός δράσης της UV ακτινοβολίας (Μήτρακας, 2001)

Αν και όλοι οι μικροοργανισμοί προσβάλλονται από την υπεριώδη ακτινοβολία, η ευαισθησία τους ποικίλλει, καθώς εξαρτάται από την αντίσταση στη διείσδυση της UV ακτινοβολίας. Η χημική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και το πάχος του καθορίζουν την αντίσταση των μικροοργανισμών στην UV ακτινοβολία. Έκθεση των μορίων με προσβεβλημένο λόγω έκθεσης σε υπεριώδη ακτινοβολία DNA σε ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού γαλάζιου φωτός (310 – 510 nm), μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την επανόρθωση της βλάβης και πρέπει να αποφεύγεται. Αυτό το φαινόμενο αφορά ορισμένους μόνο μικροοργανισμούς και γενικά δεν αφορά τους ιούς. Για παράδειγμα, ο *Streptococcus* δεν φωτοεπισκευάζεται, ενώ αντίθετα η *Shigella* φωτοεπισκευάζεται (Νταρακάς, 2009).

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με υπεριώδη ακτινοβολία επηρεάζεται από την ποσότητα – δόση της UV ενέργειας που απορροφάται από το μικροοργανισμό. Η δόση της ακτινοβολίας εξαρτάται από την ένταση της παρεχόμενης ακτινοβολίας (ενέργεια, mW), τον χρόνο κατά τον οποίο ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε αυτήν (διάρκεια ακτινοβολίας, sec) και είναι αντιστρόφως ανάλογη με την επιφάνεια του υγρού στο οποίο εφαρμόζεται (cm^2). Επομένως, η δόση μετριέται σε $\left[\frac{mW \cdot s}{cm^2}\right]$. Παρόλα αυτά, αύξηση της δόσης οδηγεί συχνά σε μειωμένη απολυμαντική δράση λόγω προσρόφησης των βακτηρίων στα αιωρούμενα σωματίδια. Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι ότι ορισμένες ανόργανες και οργανικές ενώσεις απορροφούν στο μήκος κύματος της εκπεμπόμενης UV ακτινοβολίας (Νταρακάς, 2009).

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι μη-ιονίζουσα και περιλαμβάνει ένα εύρος μήκους κύματος από 100 – 400 nm. Με βάση τη Διεθνή Επιτροπή Φωτισμού, CIE, αυτά τα μήκη κύματος ταξινομούνται σε 4 ζώνες : UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm), UV-C (200-280 nm) και V-UV (100-200 nm) (Paul Chen et al., 2007).

Το πιο σημαντικό μήκος κύματος της UV ακτινοβολίας για την απολύμανση του πόσιμου νερού είναι η UV-C, καθώς διαθέτει ισχυρή απολυμαντική δράση. Μικροοργανισμοί όπως οι ιοί, τα βακτήρια και οι μύκητες απενεργοποιούνται χάρη στη φωτοχημική δράση που παρέχει η υπεριώδης ακτινοβολία UV-C. Η πιο κοινή πηγή αυτής της ακτινοβολίας είναι ένας λαμπτήρας ατμών υδραργύρου κατασκευασμένος από χαλαζία ή από παρόμοιο υλικό, που δεν απορροφάει στο έντονο και καταστρεπτικό μη ορατό φως των 254 nm. Η UV ακτινοβολία εκπέμπεται από τη δημιουργία ενός τόξου εντός της λάμπας 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).

Η χρήση UV ακτινοβολίας είναι μια φυσική διαδικασία απολύμανσης και συνεπώς έχει χαρακτηριστικά που τη διαφοροποιούν από τις χημικές μεθόδους απολύμανσης, όπως η χλωρίωση. Η υπεριώδης ακτινοβολία επιτυγχάνει την απολύμανση προκαλώντας φωτο-βιοχημικές αλλαγές μέσα στους μικροοργανισμούς. Για να πραγματοποιηθεί μια φωτοχημική αντίδραση, 2 τουλάχιστον προϋποθέσεις πρέπει να πληρούνται :

- πρέπει να είναι διαθέσιμη ακτινοβολία ικανοποιητικής ενέργειας, ώστε να μπορέσει να αλλάξει τους χημικούς δεσμούς
- η ακτινοβολία πρέπει να απορροφηθεί από το μόριο – στόχο (μικροοργανισμό).

Έχει διαπιστωθεί ερευνητικά ότι τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) και οι πρωτεΐνες απορροφούν έντονα και αποτελεσματικά την υπεριώδη ακτινοβολία εντός των μηκών κύματος 250 – 265 nm. Επειδή οι χαμηλής πιέσεως λαμπτήρες τόξων υδραργύρου εκπέμπουν το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας τους σε ένα μήκος κύματος μέσα σε αυτό το εύρος, μπορούν να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για να προκαλέσουν μια φωτο-βιοχημική αλλαγή στους μικροοργανισμούς (μετάλλαξη για την περίπτωση του DNA) (Parsons et al., 2004).

Πλεονεκτήματα απολύμανσης με UV ακτινοβολία (Δρόσου, 2007) :

- Αποδοτική απολύμανση σε σχέση με το χλώριο στην απενεργοποίηση των περισσότερων ιών, σπορίων, κύστεων
- Δεν υπάρχει υπολειμματική τοξική συγκέντρωση
- Δεν ευνοεί τον σχηματισμό παραπροϊόντων απολύμανσης στις δοσολογίες που χρησιμοποιούνται
- Βελτιωμένη ασφάλεια σε σχέση με τη χρήση χημικών απολυμαντικών
- Ο εξοπλισμός καταλαμβάνει μικρό χώρο σε σχέση με την απολύμανση με Cl_2

Μειονεκτήματα απολύμανσης με UV (Δρόσου, 2007; Νταρακάς, 2009) :

- Μη άμεση μέτρηση για τον έλεγχο της επιτυχίας της απολύμανσης
- Δεν παρέχεται υπολειμματική συγκέντρωση, εμποδίζοντας τον έλεγχο
- Σχετικά ακριβή τεχνολογία (κατανάλωση ενέργειας, απαίτηση μεγάλου αριθμού λαμπτήρων)
- Πτώση της απόδοσης των συσκευών ακτινοβολίας και της διάρκειας ζωής των λαμπτήρων
- Απαιτείται καθαρισμός των λαμπτήρων και επιφανειών ανάκλασης λόγω των επικαθίσεων αλάτων
- Πιθανότητα φωτοεπισκευής των κυττάρων που έχουν πληγεί από τη UV ακτινοβολία

2.5.3 Οζόνωση

Η απολύμανση με όζον (O_3) είναι μία ιδιαίτερα αποτελεσματική τεχνολογία απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων. Η διεθνής εμπειρία έχει καταδείξει ότι η χρήση του όζοντος αποτελεί ιδανική λύση για προχωρημένη επεξεργασία υγρών αποβλήτων με στόχο την ανακύκλωση και επαναχρησιμοποίηση.

Το όζον είναι ένα άχρωμο αέριο με έντονη οσμή το οποίο σχηματίζεται κατά την έκθεση του οξυγόνου σε ηλεκτρικές εκκενώσεις υψηλής τάσης ή από την υπεριώδη ακτινοβολία. Στο επίπεδο της θάλασσας είναι πολύ δύσκολο να βρεθεί και σε περίπτωση που υπάρχει είναι εξαιρετικά ασταθές. Οι συνήθεις συγκεντρώσεις ανίχνευσης όζοντος είναι 0.1 ppm έχοντας χρόνο ζωής γύρω στα 30 λεπτά και στη συνέχεια μετατρέπεται σε οξυγόνο.
Έτσι λοιπόν το όζον παράγεται βιομηχανικά από ατμοσφαιρικό αέρα που έχει υποστεί κατάλληλη επεξεργασία ή από καθαρό οξυγόνο. Το αέριο όζον παράγεται με ηλεκτρική εκκένωση ανάμεσα σε 2 ηλεκτρόδια τάσης 10 – 20 KV. Η αντίδραση παραγωγής όζοντος λαμβάνει χώρα σε κατάλληλο αντιδραστήρα που ονομάζεται οζονιστήρας. Λόγω του μικρού χρόνου ζωής, το όζον πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παραγωγή του.

Το όζον έχει πολύ ισχυρή και γρήγορη απολυμαντική δράση επιτυγχάνοντας ταυτόχρονα καταστροφή των ιών. Η ποσότητα όζοντος που απαιτείται για την απολύμανση βιολογικά κατεργασμένων λυμάτων είναι 15 – 20 gr/m^3 λυμάτων και η διάρκεια της αντίδρασης είναι 15-30 λεπτά. Για πλήρη καταστροφή των κυτταρικών δεσμών ακόμη και στην περίπτωση των ιών απαιτούνται υπολειμματικές συγκεντρώσεις από 0.2 – 0.5 mg/L με χρόνο επαφής 6 λεπτά.

Το όζον μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και για την απόσμηση του νερού. Μικρές ποσότητες όζοντος της τάξης των 1 – 2 mg/L , προστιθέμενες στο νερό, είναι ικανές να οξειδώσουν 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. Οι αερόβιες συνθήκες που δημιουργούνται κατά την επεξεργασία με όζον αποκλείουν το σχηματισμό οσμών. Η ικανότητα απόσμησης 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 κλπ.) (Νταρακάς, 2009).

<u>Πλεονεκτήματα απολύμανσης με όζον</u> (Νταρακάς, 2009) :

- Απουσία προβλημάτων ασφάλειας σε σχέση με τη μεταφορά και την αποθήκευση
- Εξαίρετες απολυμαντικές ιδιότητες. Καταστρέφει ταχύτατα μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στο χλώριο ή άλλα απολυμαντικά, όπως αμοιβάδες, κόκκους, μύκητες, μυξομύκητες, φύκια, σπόρια και κύστες
- Μικροί χρόνοι εφαρμογής (ο οζονισμός απαιτεί περίπου 10 min, ενώ η χλωρίωση 30-35 min). Η απολύμανση πραγματοποιείται σχεδόν ακαριαία
- Μικρότερη ευαισθησία της μεθόδου στο pH και τη θερμοκρασία. Η απολυμαντική δράση μένει αναλλοίωτη για 2-30 ℃ και pH 6-10
- Βελτίωση της ποιότητας του υδάτινου αποδέκτη λόγω της μεγάλης συγκέντρωσης διαλυμένου οξυγόνου στο αέριο εξόδου
- Δεν προκαλείται αύξηση των ολικών διαλυμένων στερεών (TDS) στα επεξεργασμένα απόβλητα
- Επιτυγχάνεται μείωση του χρώματος και της θολότητας των αποβλήτων
- Το υπολειμματικό O_3 μιας διεργασίας απολύμανσης είναι εξίσου τοξικό με το υπολειμματικό Cl_2, αλλά αποσυντίθεται πολύ γρήγορα, οπότε δεν δημιουργεί προβλήματα στον υδάτινο αποδέκτη

<u>Μειονεκτήματα απολύμανσης με όζον</u> (Νταρακάς, 2009) :

- Υψηλό πάγιο και λειτουργικό κόστος
- Ορισμένα βιομηχανικά απόβλητα περιέχουν ρύπους που καταναλώνουν οξειδωτικό ανταγωνιστικά, γεγονός που μπορεί να καταστήσει τον οζονισμό ασύμφορο
- Απαιτείται πιλοτική εγκατάσταση για να βρεθεί η βέλτιστη δόση όζοντος
- Σχηματίζονται ενώσεις επικίνδυνες για την υγεία όπως εποξείδια, βρωμικά και βρωμιωμένες οργανικές ενώσεις

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 :

ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΣΗ & ΦΩΤΟΗΛΕΚΤΡΟΚΑΤΑΛΥΣΗ

3.1 Προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι αντιρύπανσης

Στο πλαίσιο αναζήτησης εναλλακτικών μεθόδων στις ήδη υπάρχουσες και φιλικών προς το περιβάλλον (καθαρές τεχνολογίες), μπορεί να ενταχθεί και το αυξανόμενο ενδιαφέρον τελευταία για την χρησιμοποίηση των προηγμένων οξειδωτικών μεθόδων αντιρύπανσης (ΠΟΜΑ). Με τον όρο αυτό εννοούνται κυρίως εκείνες οι τεχνολογίες οι οποίες στηρίζονται στην χρήση μεθόδων όπως ο οζονισμός (O_3, O_3/UV, O_3/H_2O_2), η ετερογενής φωτοκατάλυση (TiO_2/UV), το αντιδραστήριο Fenton (Fe^{2+}/H_2O_2) και φωτο-Fenton (UV/Fe^{2+}/H_2O_2), η ηλεκτροχημική οξείδωση, η οξείδωση σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες (καταλυτική ή μη), η χρήση υπερήχων, κ.α.

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

Η αποτελεσματικότητά τους στηρίζεται κυρίως, αλλά όχι αποκλειστικά, στην δημιουργία ελευθέρων ριζών υδροξυλίου $OH^{\bullet}$, οι οποίες και αποτελούν το ισχυρότερο οξειδωτικό μέσο, μετά το φθόριο, και επιπλέον δεν ρυπαίνουν το περιβάλλον. Οι ρίζες υδροξυλίου αντιδρούν με τα διαλυτά συστατικά εκκινώντας μια σειρά αντιδράσεων οξείδωσης. Πρόκειται για ιδιαίτερα ισχυρά οξειδωτικά σώματα, τα οποία αντιδρούν με οργανικές ενώσεις αποσπώντας ή και δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες. Οι τελευταίες προκαλούν οξειδωτικές αντιδράσεις, οι οποίες τελικά οδηγούν στην πλήρη μετατροπή των οργανικών ενώσεων σε CO_2, H_2O και ανόργανα άλατα. Λόγω δε 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).

3.2 Ηλεκτρόλυση

3.2.1 Βασικές αρχές

Με τον όρο ηλεκτρόλυση εννοείται η διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος μεταξύ των ηλεκτροδίων ενός κατάλληλου ηλεκτρολυτικού κελιού, όπου βρίσκεται το διάλυμα αποβλήτου και μέσα στο οποίο είναι εμβαπτισμένα τα 2 ηλεκτρόδια. Το σύστημα τροφοδοτείται με συνεχές ρεύμα από έναν ανορθωτή, τα άκρα του οποίου συνδέονται με τα ηλεκτρόδια του συστήματος (το θετικό άκρο του λειτουργεί ως άνοδος και το αρνητικό ως κάθοδος), οπότε πραγματοποιούνται οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και στα 2 ηλεκτρόδια (Χατζησυμεών, 2009).

Τα πρότυπα για το πόσιμο νερό και οι περιβαλλοντικοί κανονισμοί σχετικά με τη διάθεση των αποβλήτων γίνονται ολοένα και πιο αυστηροί. Έτσι, οι τεχνολογίες ηλεκτροχημικής επεξεργασίας έχουν συγκεντρώσει τις 2 τελευταίες δεκαετίες το παγκόσμιο ενδιαφέρον. Τα **πλεονεκτήματα** των τεχνολογιών αυτών είναι (Jüttner et al., 2000) :

- Καταλληλότητα για πλήθος εφαρμογών (οξείδωση, διαχωρισμός φάσεων, συγκέντρωση ή διάλυση, απολύμανση) και σε ποικιλία μέσων (αέρια, υγρά, στερεά) ανεξαρτήτως του όγκου επεξεργασίας
- Καλή ενεργειακή απόδοση, καθώς οι ηλεκτροχημικές διεργασίες γενικά έχουν μικρότερες θερμοκρασιακές απαιτήσεις. Τα ηλεκτρόδια και τα ηλεκτρολυτικά κελιά μπορούν να σχεδιαστούν ώστε να ελαχιστοποιήσουν τις απώλειες ισχύος που προκαλούνται από τη μη ομογενή κατανομή του ρεύματος, πτώσεις της τάσης και παράπλευρες αντιδράσεις
- Δυνατότητα αυτοματοποίησης της διεργασίας μέσω του εύκολου ελέγχου των μεταβλητών (δυναμικό ηλεκτροδίου και ένταση ρεύματος, παροχή, κλπ.)
- Το κόστος είναι σχετικά χαμηλό δεδομένου ότι η κατασκευή των ηλεκτρολυτικών κελιών είναι αρκετά απλή και με σωστό σχεδιασμό μπορεί να είναι οικονομική
- Δεν απαιτείται η προσθήκη μεγάλων ποσοτήτων χημικών στο απόβλητο

Μέχρι σήμερα η εφαρμογή της ηλεκτρόλυσης έχει δείξει ικανοποιητικά αποτελέσματα στην επεξεργασία διαφόρων οργανικών ρύπων (όπως φαινόλες, χλωροφαινόλες) και μετατροπή τους σε αέρια μορφή όπως CO_2, στη μείωση του δείκτη COD σε απόβλητα με μεγάλο οργανικό φορτίο (βιομηχανικά απόβλητα με COD 1500-8000 mg/L είχαν μείωση 85-100 %), καθώς και στην αντιμετώπιση νιτρικών ιόντων σε υψηλές συγκεντρώσεις (μείωση αυτών κατά 10-30 %). Επιπλέον, η μέθοδος της ηλεκτρόλυσης έχει μελετηθεί ως προς την απόδοσή της στη διαδικασία απολύμανσης νερού κι έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία εναντίων βακτηρίων όπως *E.coli* και *Marine bacteria H40* (Panizza & Carisola, 2005).

Ειδικότερα, οι ηλεκτροχημικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων, καθώς η χρήση ηλεκτροδίων τύπου DSA (dimensionally stable anodes) έχει επιφέρει μείωση στο λειτουργικό και πάγιο κόστος των βιομηχανικών μονάδων που εφαρμόζουν ηλεκτρόλυση. Τα ηλεκτρόδια αυτού του τύπου παρασκευάζονται από την απόθεση ενός ηλεκτροχημικά ενεργού οξειδίου πάνω σε υπόστρωμα κατάλληλου μετάλλου. Η επικάλυψη οξειδίου του μετάλλου μπορεί να είναι IrO_2, $RuO_2 – SnO_2$, Ta_2O_5, SnO_2, PtO_x κ.α., τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλή καταλυτική δραστικότητα και ηλεκτροχημική σταθερότητα. Επιπρόσθετα, το υπόστρωμα μετάλλου χαρακτηρίζεται από υψηλή ικανότητα διασποράς και συγκράτησης του καταλύτη πάνω στην επιφάνειά του καθώς και υψηλή αντιδιαβρωτική ικανότητα (Χατζησυμεών, 2009).

Η ηλεκτροχημική επεξεργασία παρουσιάζει, όμως, κάποια **μειονεκτήματα** που περιορίζουν την ευρεία εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα, όπως η περιορισμένη διάρκεια ζωής των ηλεκτροδίων και άλλα μειονεκτήματα που οφείλονται στην ετερογενή φύση των ηλεκτροχημικών διεργασιών : η απόδοση μπορεί να υπόκειται σε περιορισμούς μεταφοράς μάζας και να εξαρτάται ισχυρά από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Ένα άλλο σημαντικό σημείο είναι η μακροπρόθεσμη χημική σταθερότητα των συστατικών του ηλεκτροδίου παρουσία δραστικών μέσων (Δεληγιώργης, 2007).

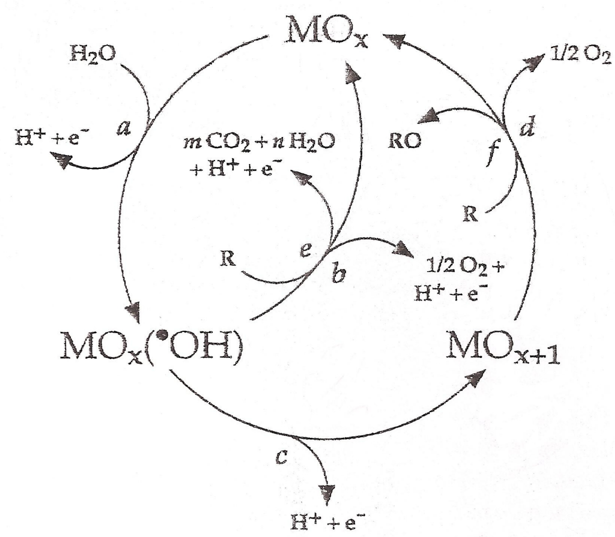
Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια η ηλεκτροχημική οξείδωση με χρήση ηλεκτροδίων διαμαντιού εμπλουτισμένου με βόριο (Boron Doped Diamond, BDD) φαίνεται να είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων. Το ηλεκτρόδιο αυτό θεωρείται ιδανική άνοδος για την οξείδωση οργανικών ρύπων, καθώς χαρακτηρίζεται από υψηλή δραστικότητα ως προς την οξείδωση των ενώσεων αυτών και υψηλή απόδοση της χρησιμοποιούμενης ηλεκτρικής ενέργειας (Χατζησυμεών, 2009).

3.2.2 Μηχανισμός ηλεκτροχημικής οξείδωσης

Η ηλεκτροχημική οξείδωση οργανικής ύλης πραγματοποιείται ουσιαστικά με 2 τρόπους (Χατζησυμεών, 2009) :

- Άμεση οξείδωση, η οποία λαμβάνει χώρα πάνω στο ηλεκτρόδιο ανόδου
- Έμμεση οξείδωση, η οποία λαμβάνει χώρα στον κύριο όγκο του διαλύματος με τη βοήθεια κατάλληλων οξειδωτικών μέσων που προϋπάρχουν στο διάλυμα ή σχηματίζονται κατά τη διάρκεια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων

Η **άμεση** ηλεκτροχημική οξείδωση των ρύπων πραγματοποιείται πάνω στην επιφάνεια της ανόδου και ένας γενικευμένος μηχανισμός των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα πάνω στην άνοδο (MO_x, οξείδιο μετάλλου) κατά την οξείδωση, με ταυτόχρονη έκλυση οξυγόνου, φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα.



Σχήμα 3.1 Αντιδράσεις κατά την άμεση ηλεκτροχημική οξείδωση οργανικών ενώσεων με ταυτόχρονη έκλυση O_2, σε όξινο περιβάλλον (Χατζησυμεών, 2009)

Αρχικά, πραγματοποιείται η διάσπαση του μορίου του H_2O πάνω στην επιφάνεια του οξειδίου του μετάλλου (MO_x) και παράγονται προσροφημένες ρίζες υδροξυλίου $HO^{\bullet}$:

$$H_2O + MO_x \rightarrow MO_x\left(HO^{\bullet}\right) + H^+ + e^- \qquad \text{(a)}$$

Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η αντίδραση έκλυσης O_2, η οποία πραγματοποιείται σε δυναμικό ≥ 1.23 V/SHE (SHE-standard hydrogen electrode: πρότυπο ηλεκτρόδιο υδρογόνου) και με 2 τρόπους, ανάλογα με το υλικό της ανόδου :

- Με φυσική προσρόφηση των ριζών υδροξυλίου πάνω στην άνοδο, οι οποίες οξειδώνονται ηλεκτροχημικά προς οξυγόνο :

  $$MO_x\left(HO^{\bullet}\right) \rightarrow MO_x + \frac{1}{2}O_2 + H^+ + e^- \qquad \text{(b)}$$

  Σε αυτή την περίπτωση, το ηλεκτρόδιο ανόδου δε λαμβάνει μέρος στην αντίδραση, απλώς παρέχει την απαραίτητη αδρανή επιφάνεια ώστε να γίνει η φυσική προσρόφηση των $MO_x\left(OH^{\bullet}\right)$ που προήλθαν από τη διάσπαση του H_2O. Τα ηλεκτρόδια τέτοιου τύπου ονομάζονται **μη ενεργά** και στην κατηγορία αυτή ανήκουν ηλεκτρόδια κατασκευασμένα από PbO_2, SnO_2, BDD κ.α.

- Με χημική προσρόφηση των ριζών υδροξυλίου πάνω στην άνοδο. Οι ρίζες υδροξυλίου χημειοροφούνται πάνω στα ενεργά σημεία της ανόδου και μέσω της οξείδωσής τους παράγεται ένα υψηλότερο οξείδιο του μετάλλου (MO_{x+1}) :

  $$MO_x\left(HO^\bullet\right) \rightarrow MO_{x+1} + H^+ + e^- \qquad \text{(c)}$$

  Ακολούθως, η έκλυση O_2 γίνεται μέσω της διάσπασης του υψηλότερου οξειδίου της επιφάνειας της ανόδου προς τη χαμηλότερη κατάσταση οξείδωσης και O_2 :

  $$MO_{x+1} \rightarrow MO_x + \frac{1}{2}O_2 \qquad \text{(d)}$$

  Σε αυτή την περίπτωση η έκλυση O_2 επηρεάζεται από το υλικό κατασκευής της ανόδου, εξαιτίας της άμεσης συμμετοχής της ανόδου στην αντίδραση. Τα ηλεκτρόδια τέτοιου τύπου ονομάζονται **ενεργά** και στην κατηγορία αυτή ανήκουν ηλεκτρόδια οξειδίων όπως IrO_2, RuO_2 κ.α.

Τέλος, όταν το ηλεκτρόδιο ανόδου είναι μη ενεργό, οι φυσιοροφημένες ρίζες υδροξυλίου είτε εκλύουν O_2 (αντίδραση b) είτε, παρουσία οργανικών ενώσεων R, τις οξειδώνουν προς CO_2 :

$$MO_x\left(HO^\bullet\right) + R \rightarrow MO_x + mCO_2 + nH_2O + H^+ + e^- \qquad \text{(e)}$$

όπου R : το κλάσμα της οργανικής ένωσης που χρειάζεται ένα ακόμη άτομο οξυγόνου για να λάβει την πλήρως οξειδωμένη μορφή του
m και n : εξαρτώνται από τη φύση της οργανικής ένωσης R

Στην περίπτωση που το ηλεκτρόδιο ανόδου είναι ενεργό, τα υψηλότερα οξείδια μετάλλου, MO_{x+1}, είτε διασπώνται προς O_2 (αντίδραση d) είτε, παρουσία οργανικών ενώσεων, τις οξειδώνουν επιλεκτικά :

$$MO_{x+1} + R \rightarrow MO_x + RO \qquad \text{(f)}$$

Πρακτικά, όλα τα ηλεκτρόδια οξειδίων των μετάλλων παρουσιάζουν μία ανάμεικτη συμπεριφορά, καθώς και οι 2 τρόποι έκλυσης O_2 λαμβάνουν χώρα. Δεν υπάρχει ένα τέλειο μη ενεργό ηλεκτρόδιο ανόδου, κυρίως λόγω κατασκευαστικών ελαττωμάτων στο πλέγμα του.

Η **έμμεση** ηλεκτροχημική οξείδωση λαμβάνει χώρα στον κύριο όγκο του διαλύματος, όπου μεταφέρονται διάφορα οξειδωτικά σώματα που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της διεργασίας, όπως το οξυγόνο, το χλώριο και οι υποχλωρίτες, συμβάλλοντας στην περαιτέρω μείωση του οργανικού φορτίου.

Επομένως, παρουσία NaCl, το οποίο είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό σώμα ή ηλεκτρολύτης κατά την ηλεκτρόλυση αποβλήτων με χρήση ανόδου τύπου DSA, σχηματίζονται χλωρο-υδροξυ ρίζες πάνω στην επιφάνεια της ανόδου, Μ, και στη συνέχεια οξειδώνουν τις οργανικές ενώσεις, σύμφωνα με τις ακόλουθες αντιδράσεις :

$$H_2O + M + Cl^- \rightarrow M\left(ClOH^\bullet\right) + H^+ + 2e^- \qquad (1)$$

$$R + M\left(ClOH^\bullet\right) \rightarrow M + R + H^+ + Cl^- \qquad (2)$$

Αντιδράσεις ανάμεσα στο H_2O και αυτές τις ρίζες κοντά στην άνοδο μπορούν να οδηγήσουν στον σχηματισμό ελεύθερου χλωρίου :

$$H_2O + M\left(ClOH^\bullet\right) + Cl^- \rightarrow M + O_2 + Cl_2 + 3H^+ + 4e^- \qquad (3)$$

Επιπρόσθετα, υποχλωρίτες μπορούν να σχηματιστούν ως εξής :

$$H_2O + Cl^- \rightarrow HOCl + H^+ + 2e^- \qquad (4)$$

Γενικά, σε όξινα διαλύματα το χλώριο είναι ο κύριος οξειδωτικός παράγοντας για την οξείδωση της οργανικής ύλης. Σε αλκαλικά διαλύματα λαμβάνει χώρα ένας κύκλος χλωριόντων-χλωρίου από τον οποίο προκύπτουν OCl^-, ClO_3^- και ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες έχουν ισχυρή οξειδωτική δράση. Οξειδωτικά δρουν επίσης το O_2 και μικρές ποσότητες από O_3.

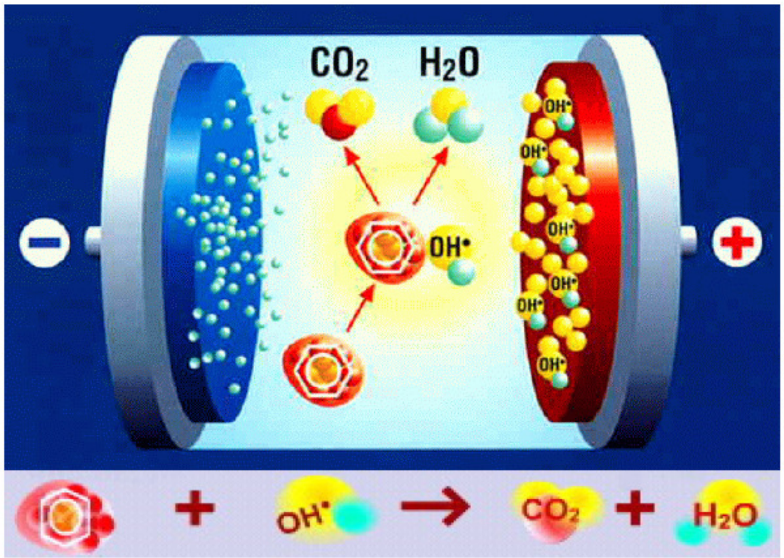
Όλα αυτά τα οξειδωτικά είναι αρκετά σταθερά και μεταφέρονται στο κυρίως διάλυμα, όπου οξειδώνουν το οργανικό φορτίο.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η αποτελεσματική αποικοδόμηση των συστατικών του αποβλήτου βασίζεται στην άμεση ηλεκτροχημική οξείδωση, επειδή τα δευτερογενή οξειδωτικά μέσα που διαχέονται στο διάλυμα δεν είναι ικανά να μετατρέψουν όλα τα οργανικά σε CO_2 και H_2O.

Το **υλικό κατασκευής της ανόδου** αποτελεί έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροχημική οξείδωση οργανικών ενώσεων. Η επιλογή του πρέπει να γίνεται προσεκτικά, καθώς το υλικό αυτό μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την απόδοση της ηλεκτρόλυσης. Η αντίδραση των οργανικών ενώσεων με ηλεκτροπαραγόμενες ρίζες υδροξυλίου (αντίδραση e) είναι ανταγωνιστική με την παράπλευρη αντίδραση έκλυσης O_2 (αντίδραση b). Αναλυτικότερα, η αλληλεπίδραση των ριζών υδροξυλίου με το υλικό κατασκευής της ανόδου (M) συνδέεται άμεσα με τη δραστικότητά τους. Γενικά, ισχύει ότι όσο λιγότερο αλληλεπιδρούν οι ρίζες υδροξυλίου με την άνοδο (μη ενεργή άνοδος), τόσο χαμηλότερη είναι η ηλεκτροχημική δραστικότητα ως προς την έκλυση O_2 και τόσο υψηλότερη είναι η ηλεκτροχημική δραστικότητα ως προς την οξείδωση των οργανικών ενώσεων.

Η υψηλή οξειδωτική ικανότητα μίας ανόδου χαρακτηρίζεται από την ασθενή αλληλεπίδραση του ηλεκτροδίου με τις ρίζες υδροξυλίου, που έχει ως αποτέλεσμα τη χαμηλή ηλεκτροχημική δραστικότητα ως προς την αντίδραση έκλυσης O_2 και την υψηλή δραστικότητα ως προς την οξείδωση των οργανικών ενώσεων. Το ηλεκτρόδιο BDD ανήκει στις ανόδους υψηλής οξειδωτικής ικανότητας. Επίσης, ικανοποιητική οξειδωτική δράση παρουσιάζουν τα ηλεκτρόδια από PbO_2, SnO_2, TiO_2, τα οποία παρουσιάζουν όμως μικρή ηλεκτροχημική σταθερότητα. Επομένως, τα ηλεκτρόδια BDD αποτελούν τις καλύτερες ανόδους, με υψηλή αποδοτικότητα ρεύματος για την οξείδωση των οργανικών και την απολύμανση νερού.

Μία τυπική άνοδος χαμηλής οξειδωτικής ικανότητας είναι αυτή του IrO_2, εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασής του με τις ρίζες υδροξυλίου.



Εικόνα 3.1 Απεικόνιση της μείωσης των οργανικών ρύπων στο νερό και στα υγρά απόβλητα μέσω ηλεκτροχημικής οξείδωσης (Δεληγιώργης, 2007)

3.3 Φωτοκατάλυση

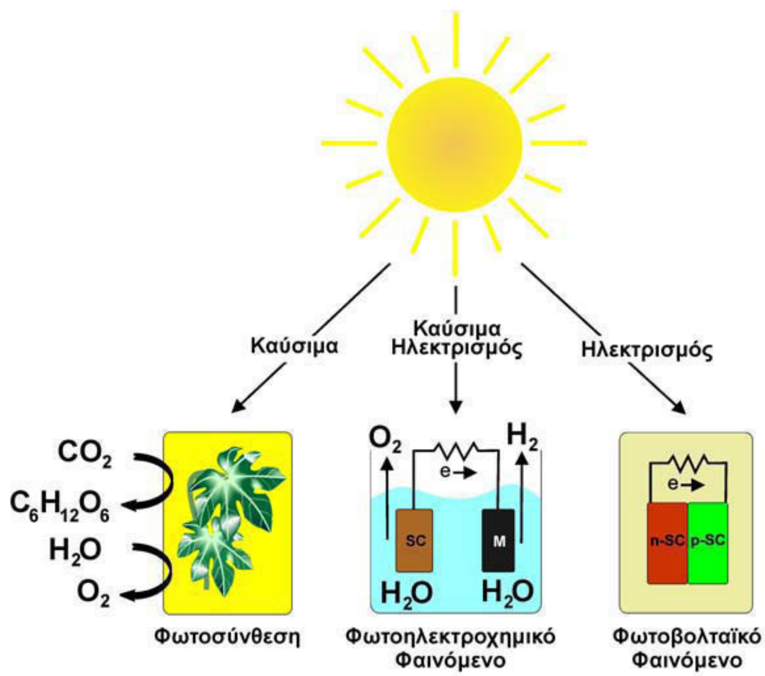
3.3.1 Ετερογενής φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση είναι συνδυασμός τεχνητού ή φυσικού φωτισμού και χρήσης κάποιου καταλύτη (όπως TiO_2, ZnO, WO_3, CdS), με σκοπό τη δημιουργία οξειδωτικών συνθηκών (φωτοκαταλυτική οξείδωση). Με τη μέθοδο αυτή μπορεί να επιτευχθεί ακόμα και πλήρης οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων ρύπων, καθώς και η απενεργοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών. Πρόκειται για μια διεργασία που αναπτύχθηκε ραγδαία την τελευταία δεκαετία, επειδή λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον. Η παρουσία του καταλύτη απλώς επιταχύνει κατά πολλές τάξεις μεγέθους την αποικοδόμηση (Πούλιος, 2007). Στην παρούσα εργασία ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε TiO_2.

Η διεργασία της ετερογενούς φωτοκατάλυσης βασίζεται στη δημιουργία ριζών υδροξυλίου, κατά τον φωτισμό ενός συστήματος ημιαγωγού/ηλεκτρολύτη με τεχνητό ή ηλιακό φως. Οι ρίζες $HO^{\bullet}$ αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο της διεργασίας, το οποίο προσβάλλει τα οργανικά μόρια του αποβλήτου και μέσω υπεροξειδικών ριζών τα αποδομεί προς CO_2 και ανόργανα άλατα (Χατζησυμεών, 2009).

3.3.2 Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο

Η φωτοκαταλυτική οξείδωση των διαφόρων οργανικών ενώσεων βασίζεται στο φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο, το οποίο αποτελεί έναν από τους τρεις τρόπους άμεσης μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική (Εικόνα 3.2).



Εικόνα 3.2 Μετατροπή φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική (Πούλιος, 2007)

Γενικά, φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο είναι το φαινόμενο εκείνο όπου ο φωτισμός της διεπιφάνειας ηλεκτρόδιο/ηλεκτρολύτης επιφέρει αλλαγή στο δυναμικό του ηλεκτροδίου (ανοικτό κύκλωμα) ή στο ρεύμα που ρέει στη διαφασική περιοχή (κλειστό κύκλωμα). Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται κατά το φωτισμό της διεπιφάνειας μεταξύ ενός φωτοευαίσθητου *ημιαγώγιμου* υλικού (ηλεκτρόδιο) και ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Τα στερεά διακρίνονται βάσει των ηλεκτρονικών ιδιοτήτων τους σε μέταλλα, ημιαγωγούς και μονωτές. Μακροσκοπικά, η διαφορετικότητα αυτή εμφανίζεται στην αντίσταση που παρουσιάζουν στη διέλευση ηλεκτρικού ρεύματος. Μικροσκοπικά, οι ηλεκτρονικές ιδιότητες των στερεών περιγράφονται με τη βοήθεια του μοντέλου των ενεργειακών τροχιακών, το οποίο περιγράφει τη συμπεριφορά ενός ηλεκτρονίου που βρίσκεται στην εξωτερική στιβάδα σθένους, κατά την κίνησή του στο πεδίο που δημιουργεί ο πυρήνας και τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν (Πούλιος, 2007).

Η εμφάνιση του φωτοηλεκτροχημικού φαινομένου προϋποθέτει :

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

3.3.3 Μηχανισμός φωτοκαταλυτικής οξείδωσης

Σύμφωνα με το μοντέλο των ενεργειακών τροχιακών, μεταξύ των κατειλημμένων δεσμικών τροχιακών στη ζώνη σθένους (ΖΣ) και των μη κατειλημμένων αντιδεσμικών τροχιακών στη ζώνη αγωγιμότητας (ΖΑ) ενός στερεού, παρεμβάλλεται μια περιοχή απαγορευμένων ενεργειακών καταστάσεων, η οποία ονομάζεται απαγορευμένη ζώνη ή αλλιώς απαγορευμένο ενεργειακό χάσμα (E_g).

Κατά τον φωτισμό ενός φωτοευαίσθητου ημιαγώγιμου υλικού, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα, με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, τα ηλεκτρόνια (e^-) της ΖΣ διεγείρονται, απορροφώντας φωτόνια ενέργειας ίσης ή μεγαλύτερης από αυτή που αντιστοιχεί στο ενεργειακό χάσμα του ημιαγωγού ($hv \geq E_g$) και μεταπηδούν στη ΖΑ, δημιουργώντας παράλληλα θετικά φορτισμένες οπές (h^+) στη ΖΣ. Στην περίπτωση που ως ημιαγωγός χρησιμοποιείται το διοξείδιο του τιτανίου, TiO_2, ισχύει :

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

Τα φωτοπαραγόμενα ζεύγη οπών/ηλεκτρονίων διαχωρίζονται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου της διαφασικής περιοχής και στην περίπτωση ενός n-τύπου ημιαγωγού, όπως το TiO_2, τα μεν ηλεκτρόνια κινούνται προς το εσωτερικό του κρυστάλλου, ενώ οι οπές ρέουν προς την επιφάνεια. Σε υδατικά διαλύματα οι φωτοπαραγόμενες οπές αντιδρούν με τα ανιόντα υδροξυλίου OH^- ή με τα μόρια του H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς τις αντίστοιχες ρίζες υδροξυλίου $OH^{\bullet}$, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις (Χατζησυμεών, 2009) :

$h^{+} + H_2O \rightarrow OH^{\bullet} + H^{+}$

$h^{+} + OH^{-} \rightarrow OH^{\bullet}$

Οργανικές ενώσεις + $h^{+} \rightarrow$ Προϊόντα οξείδωσης

$e^{-} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet -}$

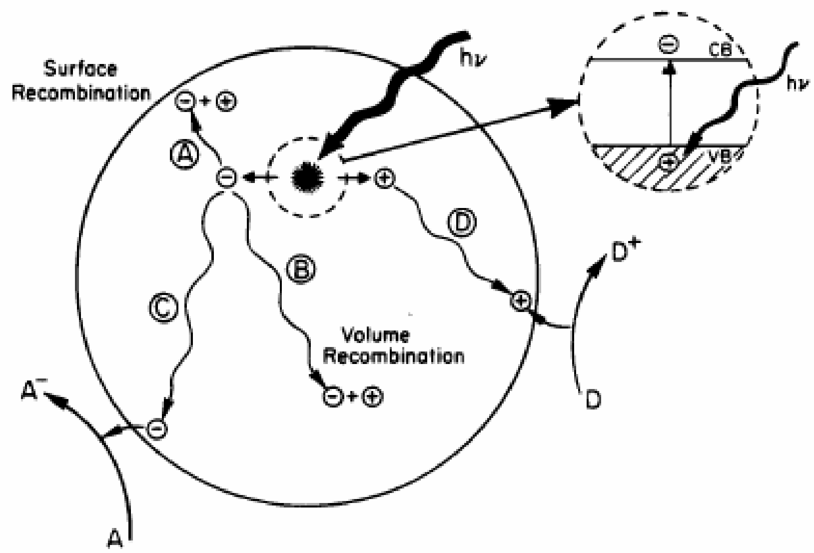
$O_2^{\bullet -} + H^{+} \rightarrow HO_2^{\bullet}$

Οργανικές ενώσεις + $e^{-} \rightarrow$ Προϊόντα αναγωγής

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

Οι ρίζες υδροξυλίου και υπερυδροξυλίου μπορούν να ανοργανοποιήσουν τις περισσότερες οργανικές ενώσεις που περιέχονται στο διάλυμα :

Ρίζες ($HO^{\bullet}, HO_2^{\bullet}$) + Οργανικές ενώσεις $\rightarrow$ Προϊόντα ανοργανοποίησης



Σχήμα 3.2 Κύριες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μέσα σε κόκκο ημιαγώγιμης σκόνης, κατά τη φωτοδιέγερσή του από ακτινοβολία hν ≥ E_g : (A) και (B) επανασύνδεση ζεύγους οπών/ηλεκτρονίων στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του κόκκου αντίστοιχα, (C) αναγωγή του δέκτη ηλεκτρονίων A και (D) οξείδωση του δότη ηλεκτρονίων D (Χατζησυμεών, 2009)

3.3.4 Ημιαγώγιμα υλικά – Καταλύτες

Οι φωτοκαταλύτες είναι στερεά υλικά που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Συνήθως, είναι ημιαγωγοί. Ο ρόλος του ημιαγωγού στη φωτοκαταλυτική οξείδωση οργανικών ρύπων είναι καθοριστικής σημασίας. Τόσο οι φυσικές όσο και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες είναι παράγοντες που επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος.

Ο καταλύτης TiO_2 είναι σχεδόν ο ιδανικός καταλύτης για τις φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις οξείδωσης καθώς είναι χημικά και βιολογικά αδρανής, φωτοκαταλυτικά ενεργός υπό κατάλληλη ακτινοβολία, παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση, το κόστος του είναι σχετικά χαμηλό και η παραγωγή/χρήση του είναι εύκολη. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ο χαμηλός ρυθμός επανασύνδεσης των h^+/e^-, τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια του κόκκου. Η επανασύνδεση οπών και ηλεκτρονίων μειώνει τη φωτοκαταλυτική δραστικότητα των ημιαγωγών, επειδή οδηγεί στην παραγωγή φωτονίων ή θερμότητας και όχι ριζών υδροξυλίου. Το μεγάλο μειονέκτημα του TiO_2 είναι το μεγάλο ενεργειακό του χάσμα E_g = 3.2 eV και σαν συνέπεια ενεργοποιείται μόνο με υπεριώδη ακτινοβολία, συγκεκριμένα με φως μήκους κύματος μικρότερου των 385 nm, επομένως είναι δυνατή η αξιοποίηση μικρού μόνο μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας (περίπου 6%). Το TiO_2 συναντάται σε τρεις κρυσταλλικές μορφές, οι οποίες είναι η ανατάση, το ρουτίλιο και ο μπρουκίτης. 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^+.

Αξίζει να σημειωθεί ότι σημαντικό ρόλο στην απόδοση της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας αποβλήτων παίζει η προσρόφηση των οργανικών ενώσεων πάνω στην επιφάνεια του καταλύτη, επειδή οι κύριες φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις πραγματοποιούνται πάνω στην επιφάνεια του καταλύτη μεταξύ προσροφημένων σωμάτων (οργανικές, οξειδωτικές και αναγωγικές ενώσεις).

Ως φωτοκαταλύτες έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί ενώσεις όπως ZnO, WO_3, $SrTiO_3$, ZnS κ.α., χωρίς όμως να συγκεντρώνουν τα πολλαπλά πλεονεκτήματα του TiO_2 (Χατζησυμεών, 2009; Πούλιος, 2007).

3.4 Φωτοηλεκτροκατάλυση

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

Ένας τρόπος με τον οποίο μπορεί να επιτευχθεί η αντιστάθμιση του προβλήματος αυτού είναι η διοχέτευση ηλεκτρικού ρεύματος διαμέσου των λεπτών υμενίων του καταλύτη, τα οποία λειτουργούν ως άνοδοι ενός γαλβανικού στοιχείου. Η εφαρμογή ενός μικρού θετικού δυναμικού στον καταλύτη μέσω κατάλληλης φωτοηλεκτροχημικής διάταξης, έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική αύξηση της απόδοσης του συστήματος. Αυτός ο συνδυασμός ετερογενούς φωτοκατάλυσης και ηλεκτρόλυσης αποτελεί την *μέθοδο της φωτοηλεκτροκατάλυσης*.

Η φωτοηλεκτροκαταλυτική οξείδωση, δηλαδή η υποβοηθούμενη με ηλεκτρικό ρεύμα φωτοκαταλυτική οξείδωση, ως μέθοδος καταστροφής οργανικών ενώσεων είναι πολύ πρόσφατη, παρουσιάζει όμως σημαντικά πλεονεκτήματα. Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία, με τη φωτοηλεκτροκαταλυτική οξείδωση επιτυγχάνεται, συγκριτικά με την απλή φωτοκαταλυτική οξείδωση, τουλάχιστον τριπλασιασμός της ταχύτητας καταστροφής διαφόρων οργανικών μορίων, τόσο παρουσία τεχνητού όσο και φυσικού φωτός, ενώ ταυτόχρονα παραλείπεται το στάδιο της διήθησης.

Ο φωτοηλεκτροκαταλυτικός αντιδραστήρας, εντός του οποίου λαμβάνει χώρα η οξείδωση των οργανικών ρύπων, λειτουργεί κατά τρόπο ανάλογο με ένα φωτοηλεκτροχημικό στοιχείο, όπου ως άνοδος χρησιμοποιείται το επικαλυμμένο με τον καταλύτη υπόστρωμα, ενώ ως κάθοδος κάποιο αδρανές μέταλλο (π.χ.

ανοξείδωτος χάλυβας ή γραφίτης). Ο φωτισμός της ανόδου με τεχνητό ή ηλιακό φωτισμό δημιουργεί κατά τρόπο ανάλογο με την απλή φωτοκαταλυτική οξείδωση ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου $OH^{\bullet}$, ο αριθμός των οποίων όμως είναι κατά πολύ μεγαλύτερος, λόγω της εφαρμοζόμενης εξωτερικά διαφοράς δυναμικού μεταξύ της φωτοανόδου και καθόδου (Πούλιος, 2007).

3.5 Εφαρμογή ηλεκτρόλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης για την απολύμανση νερού

Οι παράγοντες απολύμανσης που σχηματίζονται ηλεκτρολυτικά ή φωτοκαταλυτικά έχουν οξειδωτική δράση. Όσον αφορά την ηλεκτρόλυση, οι κυριότεροι παράγοντες ηλεκτροχημικής απολύμανσης ταξινομούνται με βάση το οξειδωτικό στοιχείο ως εξής (http://users.auth.gr):

- Παράγοντες με βάση το οξυγόνο : O_3, H_2O_2 και ρίζες υδροξυλίου $OH^{\bullet}$
- Παράγοντες με βάση το χλώριο : αέριο Cl_2, υποχλωρίτες OCl^-, υποχλωριώδες οξύ HOCl και διοξείδιο του χλωρίου ClO_2
- Άλλοι παράγοντες : MnO_4^-, FeO_4^{2-}, ιόντα μετάλλων μετάπτωσης, αλογόνα και παράγωγά τους, καθώς και η ηλεκτροχημικά τροποποιημένη οξύτητα ή αλκαλικότητα του μέσου

Η οξειδωτική καταστροφή των βακτηρίων προκαλείται από την έκθεσή τους σε τέτοιους παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να προκαλέσουν βλάβη στις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, τις μεμβράνες ή την ενζυματική λειτουργία των κυττάρων. Η αθροιστική βλάβη που προκαλείται κυρίως από τη δράση των παραγόντων με βάση το οξυγόνο (Reactive Oxygen Species, ROS) μπορεί να οδηγήσει τα κύτταρα στο θάνατο. Όσον αφορά τη φωτοκατάλυση, η κατανόηση του φωτοχημικού μηχανισμού της βακτηριοκτόνου δράσης παραμένει κατά ένα μεγάλο μέρος ασαφής και γίνεται συνεχής έρευνα για να προσδιοριστεί η ταυτότητα των κύριων φωτο-οξειδωτικών μέσων και του ρόλου τους στο μηχανισμό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών. Εντούτοις, γίνεται γενικά αποδεκτό ότι οξειδωτικά στοιχεία όπως οι ρίζες υδροξυλίου διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο (Rincon & Pulgarin, 2005; Μάρακας, 2006).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 :

ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΩΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ-ΔΕΙΚΤΕΣ

Μέρος των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα και στους υδάτινους φορείς είναι παθογόνοι. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι κυρίως βακτήρια αλλά και πρωτόζωα καθώς και ιοί. Επειδή βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις αλλά σε μεγάλη ποικιλία ειδών, είναι πρακτικά αδύνατο να προσδιοριστεί η ταυτότητα και η ποσότητα κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών. Έτσι, αντί για τον προσδιορισμό κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών γίνεται ο προσδιορισμός ενδεικτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι ονομάζονται δείκτες και η παρουσία των οποίων σημαίνει την πιθανή μόλυνση του νερού από παθογόνους μικροοργανισμούς (Δρούμπαλη, 2010).

Οι σπουδαιότεροι μικροοργανισμοί-δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή (total coliforms), τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (faecal coliforms) και οι εντερόκοκκοι (enterococci). Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι βακτήρια και επιλέγονται ως δείκτες γιατί είναι γενικά παρόντες σε νερό που περιέχει παθογόνα, είναι σχετικά ακίνδυνοι κι επίσης αναπτύσσονται, απομονώνονται και προσδιορίζονται εύκολα (Νταρακάς, 2009).

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που σημαίνει ότι ως κύτταρα δεν διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα. Είναι ετερότροφοι ή αυτότροφοι (συνήθως χημειοσυνθετικοί) μικροοργανισμοί, αερόβιοι, αναερόβιοι ή επαμφοτερίζοντες. Βρίσκονται στον αέρα, στο νερό, σε οργανικές ουσίες ή σε ζωντανούς οργανισμούς των φυτών και των ζώων. Ζουν κάτω από μεγάλη ποικιλία συνθηκών θερμοκρασίας, οξυγόνου, pH και αναπτύσσονται ταχύτατα όταν υπάρχει επαρκής τροφή και τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά. Τα ετερότροφα βακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, διότι καταναλώνουν ως τροφή τις οργανικές ουσίες που περιέχονται στα απόβλητα, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του ρυπαντικού φορτίου των αποβλήτων (Μαντζαβίνος, 2003).

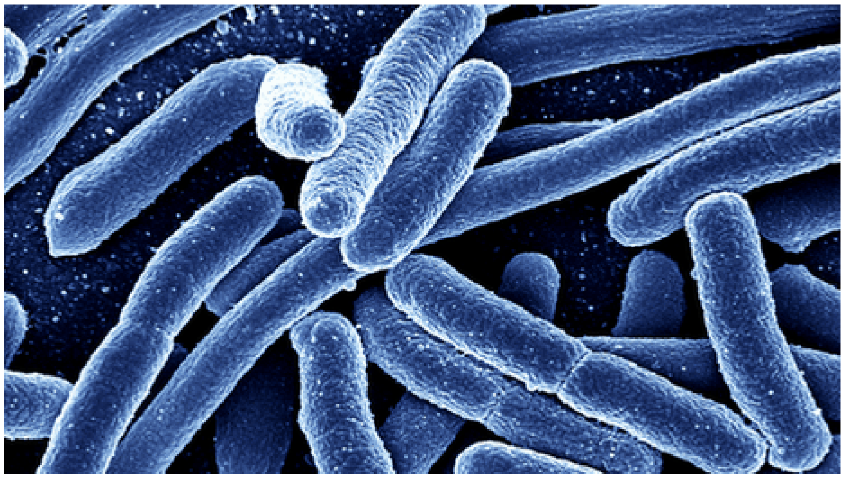
Η ανίχνευση των ανθρώπινων εντερικών παθογόνων καθίσταται δύσκολη καθώς, όπως προαναφέρθηκε, οι παθογόνοι αυτοί μικροοργανισμοί βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η μολυσματική τους δόση κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Επομένως, καταφεύγουμε εναλλακτικά στον προσδιορισμό δεικτών που υποδηλώνουν την κοπρανώδη μόλυνση του νερού. Στην παρούσα εργασία οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες ήταν η *E.coli* και ο *E.faecalis*.

4.1 *Escherichia coli*

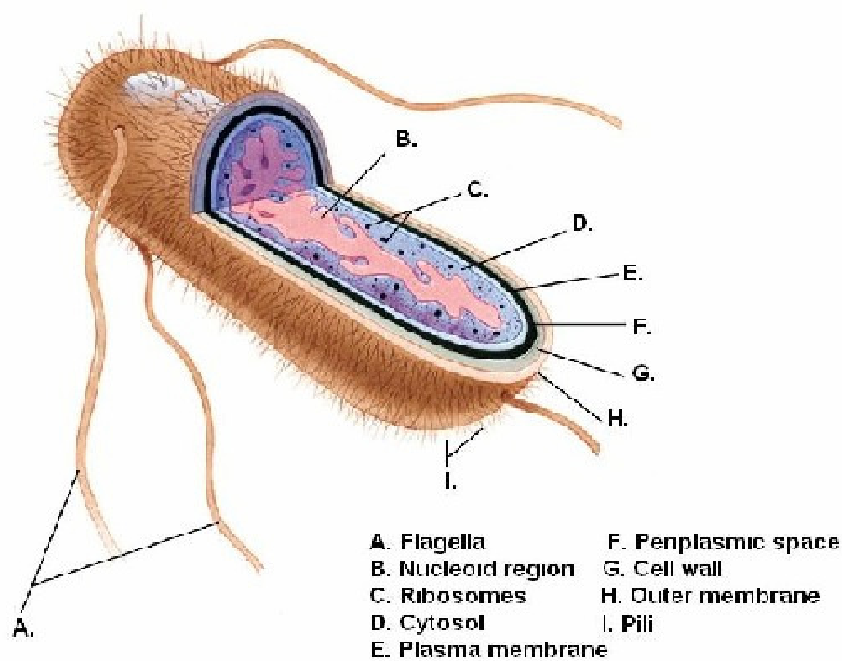
Η *E.coli* ανήκει στα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή. Το γένος *Escherichia* ανήκει στην οικογένεια των εντεροβακτηριακών, η οποία περιλαμβάνει κυρίως κινητά **Gram-αρνητικά** βακτήρια. Η *E.coli* είναι το τυπικό είδος του γένους και το πιο αντιπροσωπευτικό είδος της οικογένειας των εντεροβακτηριακών, καθώς διαθέτει όλους τους γενικούς χαρακτήρες της (Βενιέρη, 2005).

Θεωρείται ο βασικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης, τόσο του πρωτογενούς όσο και του επεξεργασμένου νερού. Πρόκειται για ευρέως διαδεδομένο μικροοργανισμό, καθώς είναι το κυρίαρχο δυνητικά αναερόβιο βακτήριο της ανθρώπινης εντερικής χλωρίδας. Διαβιώνει μόνιμα τόσο στον εντερικό σωλήνα του ανθρώπου όσο και των θερμόαιμων ζώων (βοοειδή, αιγοπρόβατα, σκύλοι κ.α.), όπου μπορεί να υπάρχει σε μεγάλους αριθμούς και μπορεί να αντιπροσωπεύει το 95% των εντεροβακτηριακών που απαντώνται στα κόπρανα. Η *E.coli* διαβιώνοντας στο εντερικό σύστημα συνήθως δεν αποτελεί κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, εκτός εάν πρόκειται για εξασθενημένα άτομα ή όταν ο πληθυσμός του βακτηρίου υπερβεί κάποια ανώτατα όρια. Όσον αφορά τα παθογόνα στελέχη του είδους, αυτά δύνανται να προκαλέσουν μεγάλη ποικιλία εντερικών και εξωεντερικών λοιμώξεων, οι οποίες περιορίζονται στις βλεννογόνες επιφάνειες ή εξαπλώνονται σε ολόκληρο το σώμα. Τα χαρακτηριστικά επιβίωσης και η ευαισθησία της στα απολυμαντικά είναι όμοια με εκείνα πολλών παθογόνων μικροβίων, ιδιαίτερα δε με την *Salmonella* και την *Shigella*. Λόγω των ιδιοτήτων αυτών, η *E.coli* είναι ο καλύτερος βιολογικός δείκτης κοπρανώδους μόλυνσης του νερού.

Η απομόνωσή της από δείγματα νερού αποδεικνύει πέρα από κάθε αμφιβολία την πρόσμιξη του νερού με περιττωματικές ουσίες, υποδηλώνοντας ότι και οποιοσδήποτε άλλος μικροοργανισμός που τυχόν βρίσκεται στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων μπορεί να εισχωρήσει στο νερό και κατ'επέκταση και παθογόνοι μικροοργανισμοί, επισημαίνοντας τους δυνητικούς κινδύνους μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων. Η μολυσματική δόση για τον άνθρωπο ποικίλλει από 1 μικροβιακό κύτταρο μέχρι πολλές χιλιάδες και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του δέκτη (φύλο, ηλικία, φυσική κατάσταση κλπ.) (Δρούμπαλη, 2010).



Εικόνα 4.1 Στελέχη *E.coli* (http://www.bbc.co.uk/news/health-13639241)



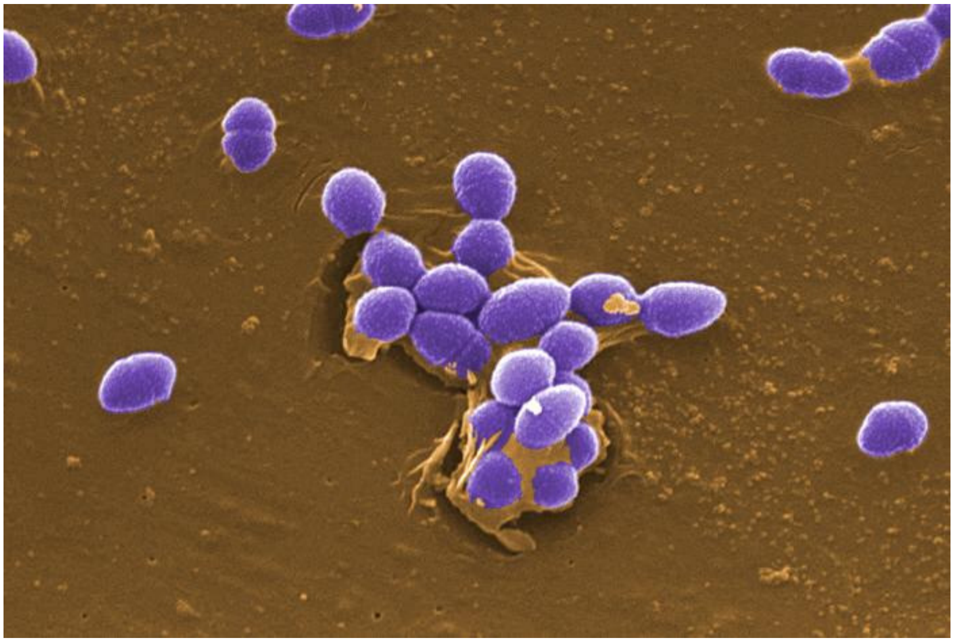
Εικόνα 4.2 Δομή *E.coli* (http://www.steadyhealth.com)

(A) μαστίγια, (B) περιοχή πυρήνα, (C) ριβοσώματα, (D) κυτταρόπλασμα, (E) πλασματική μεμβράνη, (F) περιπλασματικός χώρος, (G) κυτταρικό τοίχωμα, (H) εξωτερική μεμβράνη, (I) τριχίδια

4.2 *Enterococcus faecalis*

Οι εντερόκοκκοι (enterococci) είναι **Gram-θετικά** σφαιρικά βακτήρια τα οποία μπορούν να επιβιώσουν κάτω από αντίξοες συνθήκες στη φύση. Απαντώνται στο έδαφος, το νερό, σε φυτά καθώς και στα κόπρανα του ανθρώπου και άλλων θηλαστικών. Ορισμένα στελέχη αποτελούν την αιτία σοβαρών λοιμώξεων για τους ανθρώπους και τα ζώα. Είναι βακτήρια που συνδέονται τόσο με κοινές όσο και με νοσοκομειακές λοιμώξεις. Μερικά από αυτά είναι γνωστό ότι παρουσιάζουν κινητικότητα.

Ενώ υπάρχουν πάνω από 15 είδη του γένους *Enterococcus*, το 80-90% των κλινικών στελεχών είναι *E.faecalis*. Συγκεκριμένα, αυτό το Gram-θετικό, σφαιρικό βακτήριο είναι μη κινητό και μπορεί να παρατηρηθεί μεμονωμένο, σε ζεύγη ή σχηματίζει μικρές αλυσίδες. Συναντάται συχνότερα στο παχύ έντερο του ανθρώπου, όπου αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, καθώς και στο γεννητικό σύστημα των θυληκών ατόμων. Παρόλα αυτά, οι επιστήμονες έχουν εντοπίσει μια περιοχή παθογένειας στο γονιδίωμα του *E.faecalis* ικανή να μετατρέψει το βακτήριο από ακίνδυνο κάτοικο του εντέρου σε απειλητικό εισβολέα, καθιστώντας το κύρια αιτία νοσοκομειακών λοιμώξεων. Το βακτήριο αυτό συνδέεται με μολύνσεις σε τραύματα ή εγκαύματα κι επίσης είναι υπεύθυνο για λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, για ενδοκαρδίτιδα και μηνιγγίτιδα. Παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε πολλά αντιβιοτικά και μια αξιοσημείωτη ικανότητα για ανάπτυξη αντοχής και σε άλλα. Οι εντερόκοκκοι σπανίως πολλαπλασιάζονται στο νερό και είναι περισσότερο ανθεκτικοί στο περιβαλλοντικό stress και στη χλωρίωση σε σχέση με την *E.coli*. Η παρουσία τους αποτελεί απόδειξη μόλυνσης του νερού με περιττωματικές ουσίες καθώς και παλαιότερης μόλυνσης. Ο κύριος λόγος αναζήτησής τους σε περιβαλλοντικά δείγματα είναι να εκτιμηθεί η σημασία της παρουσίας ολικών κολοβακτηριοειδών επί απουσίας *E.coli*, καθώς και η παροχή συμπληρωματικών πληροφοριών για την εκτίμηση της έκτασης πιθανής κοπρανώδους μόλυνσης (http://microbewiki.kenyon.edu; http://www.ebi.ac.uk; Γεωργίου-Μπούφα, 2005).



Εικόνα 4.3 Βακτήρια *E.faecalis* (http://www.microbeworld.org)

Εικόνα 4.4 Αποικίες *E.faecalis* σε θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley medium (http://www.laboratorytalk.com)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΟ-ΠΟΙΗΣΗΣ *Escherichia coli* & *Enterococcus faecalis*

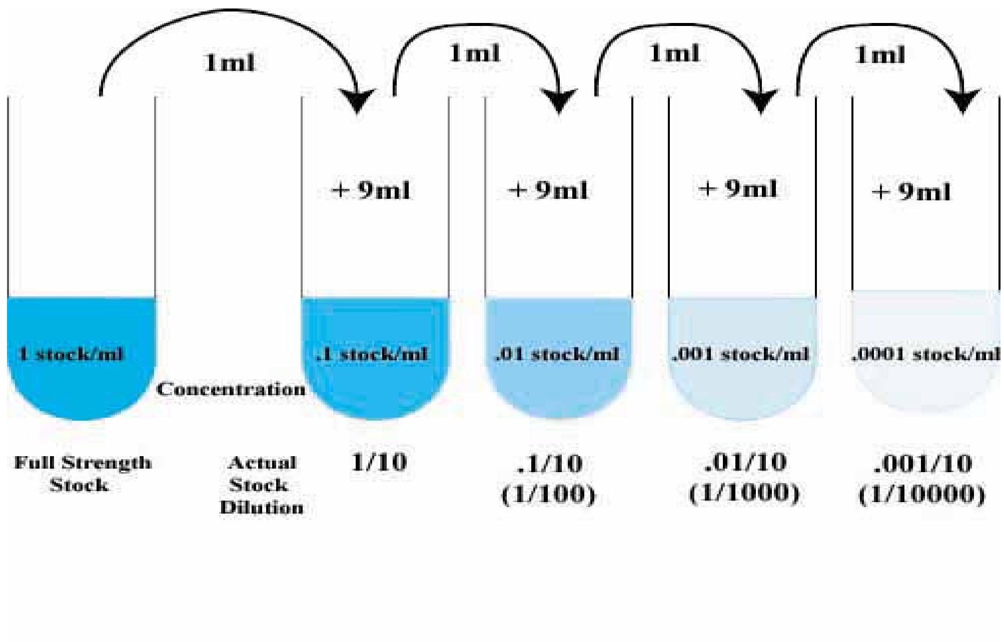
5.1 Συμβατική καλλιεργητική μέθοδος

Στην επιστήμη της Μικροβιολογίας, κατά την καλλιέργεια μικροοργανισμών στο εργαστήριο, οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν αποικίες επάνω σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Οι αποικίες, χάρη στον τρόπο δημιουργίας τους και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους (χροιά, σχήμα κ.α.), αποτελούν σήμερα σπουδαία μέθοδο αναγνώρισης των μικροοργανισμών. Οι διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους οι εκάστοτε δημιουργούμενες αποικίες προέρχονται κυρίως από χημικές επεξεργασίες, όπως την έκκριση διαφορετικών ενζύμων, χρωστικών κλπ. από τους μικροοργανισμούς, καθώς και διαφορές στον πολλαπλασιασμό τους (http://el.wikipedia.org).

Στην ποσοτική Μικροβιολογία, η μέτρηση των βιώσιμων βακτηρίων που σχηματίζουν αποικίες σε ένα δείγμα γίνεται με τον προσδιορισμό των αποικιών που αναπτύσσονται από το εκάστοτε βακτήριο επάνω σε ειδικό θρεπτικό υλικό (υπόστρωμα). Το θρεπτικό υλικό είναι τοποθετημένο σε τριβλίο (τριβλίο Petri), που είναι ένα πλαστικό συνήθως, κυλινδρικό πιάτο. Σαν βάση του θρεπτικού υλικού χρησιμοποιείται υγρό άγαρ το οποίο στη συνέχεια στερεοποιείται. Τα τριβλία τοποθετούνται σε ειδικούς φούρνους επώασης και πάνω τους σχηματίζονται αποικίες μικροοργανισμών με μορφή κηλίδων πάνω στο λείο θρεπτικό υλικό. Η μονάδα μέτρησης των αποικιών ονομάζεται Colony Forming Units, **CFU**, και εκφράζεται συνήθως ως αριθμός των CFU ανά mL ή ανά γραμμάριο δείγματος.

Η συγκέντρωση των CFU στο υπό μελέτη δείγμα νερού έχει ιδιαίτερη σημασία. Είναι προφανές ότι αν επάνω στο τριβλίο συνυπάρχουν πολλές αποικίες, τότε αυτές συμπιεζόμενες μπορεί να συνενωθούν, εμποδίζοντας την καταμέτρηση. Για το λόγο αυτό γίνονται διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις στο αρχικό δείγμα (δηλαδή 1/10 αραιώσεις, καθεμία με την προσθήκη ενός μέρους του αποβλήτου σε 9 μέρη του διαλύτη) και εμβολιάζοντας συνήθως με 1 mL κάθε ένα από τα τριβλία.

Σημειώνεται ότι κάθε αραίωση γίνεται μέχρι το $1/10^6$ CFU/mL, ώστε να προσδιοριστεί με μεγαλύτερη ακρίβεια ο αριθμός των αποικιών του αρχικού δείγματος (Δρούμπαλη, 2010).



Εικόνα 5.1 Μέθοδος διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων (http://biology.kenyon.edu)

5.2 Μοριακή μέθοδος

Έως τώρα ο έλεγχος της απολύμανσης του νερού πραγματοποιείται με τις συμβατικές μικροβιολογικές μεθόδους. Αυτές οι μέθοδοι, όμως, εμφανίζουν περιορισμούς τόσο από ποσοτική όσο και από ποιοτική άποψη. Είναι χρονοβόρες, επίπονες κι επιτρέπουν την ανίχνευση μόνο των βακτηρίων που μπορούν να διαιρεθούν. Ωστόσο, ένα σημαντικό μέρος του μικροβιακού πληθυσμού στο υδάτινο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των εντερικών βακτηρίων, έχει χαρακτηριστεί ως μη καλλιεργήσιμο. Ολιγοτροφικές και ακραίες συνθήκες μπορεί να ωθήσουν τα βακτήρια να εισέλθουν σε μια κατάσταση η οποία τα καθιστά βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα (**VBNC – Viable But Not Culturable**). Αυτοί οι μικροοργανισμοί καλούνται να αποδείξουν τη μεταβολική δραστηριότητα και να διατηρούν τα χαρακτηριστικά των παθογόνων. Οι παράγοντες που είναι υπεύθυνοι για την κατάσταση VBNC μπορεί να περιλαμβάνουν την έκθεση σε UV ακτινοβολία, κάποιους αντιμικροβιακούς παράγοντες, το pH και τις αλλαγές της θερμοκρασίας, καθώς και την έλλειψη άνθρακα ή ενέργειας. Αξίζει ακόμα να σημειωθεί ότι η κατάσταση VBNC μπορεί ενδεχομένως να οφείλεται και σε κάποια μετάλλαξη των βακτηρίων κατά την εφαρμογή της μεθόδου απολύμανσης.

Η εισαγωγή σε μοριακές τεχνικές έχει συμβάλει στο να ξεπεραστούν τα σημαντικά μειονεκτήματα των συμβατικών μεθόδων καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, η μέθοδος της PCR επέτρεψε νέες προσεγγίσεις στην έρευνα των παθογόνων μικροοργανισμών λόγω της υψηλής ευαισθησίας που παρουσιάζει, της ιδιαιτερότητας και της ταχύτητάς της (Δρούμπαλη, 2010).

5.3 Μέθοδος PCR (μοριακή μέθοδος)

5.3.1 Η αρχή λειτουργίας της αντίδρασης PCR

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μια *in vitro*[1] μέθοδος που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA σε πολλά αντίγραφα σε σύντομο χρόνο. Η PCR αποτελεί μια νέα τεχνική της Μοριακής Βιολογίας που εφαρμόζεται εκτενώς τόσο στο χώρο της Μοριακής Βιολογίας όσο και της Ιατρικής. Εφευρέτης της μεθόδου αυτής είναι ο Kerry Mullis, ο οποίος ανακοίνωσε την εφεύρεσή του το 1984 και τιμήθηκε γι’αυτήν με βραβείο Νόμπελ το 1993. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος της PCR στηρίζεται στην συνεχή επανάληψη ενός κύκλου που αποτελείται από 3 διαδοχικά στάδια. Σε κάθε στάδιο γίνεται επώαση του δείγματος σε διαφορετική κάθε φορά θερμοκρασία, με τη βοήθεια ενός ειδικού μηχανήματος, του θερμικού κυκλοποιητή (thermal cycler). Ο κυκλοποιητής έχει τη δυνατότητα να θερμαίνει και να ψύχει τα δείγματα σε σύντομο χρόνο (Βερβερίδης, 2003).

[1]*in vitro* : μέσα στο γυαλί-δοκιμαστικό σωλήνα. Επιστημονικός όρος που αναφέρεται κυρίως στην τεχνική πραγματοποίησης ενός πειράματος σε δοκιμαστικό σωλήνα ή γενικότερα σε πειράματα που πραγματοποιούνται έξω από τους ζωντανούς οργανισμούς υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες.

5.3.2 Στάδια κύκλου της PCR

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

1) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA (denaturation)

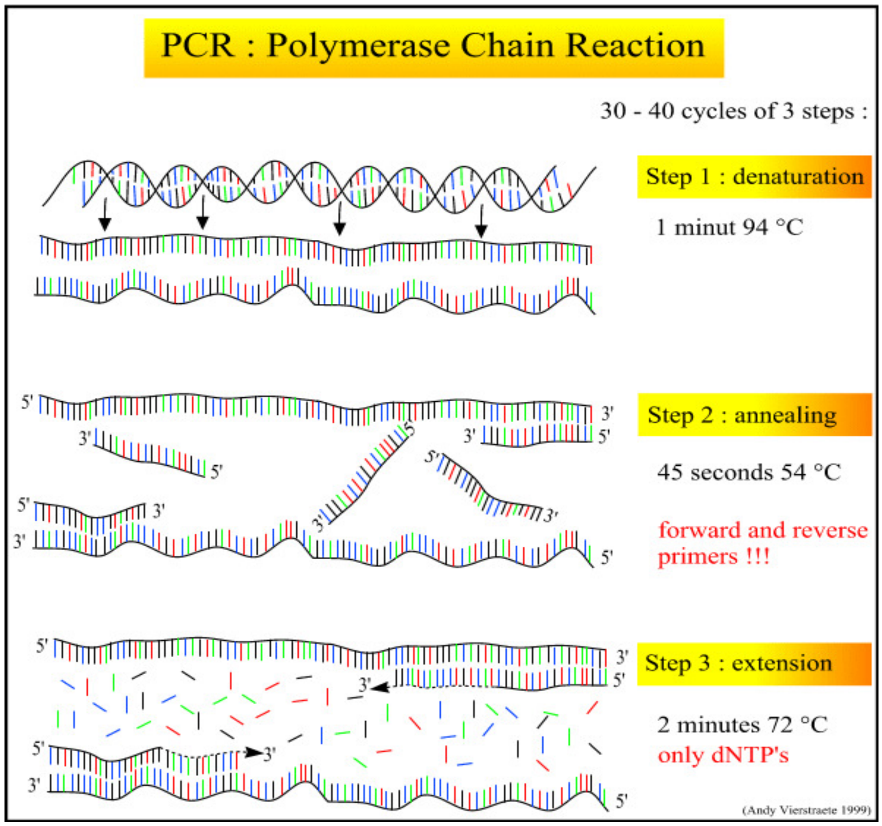
2) Υβριδοποίηση εκκινητών (primer annealing) στις αλληλουχίες του DNA-στόχου

3) Επιμήκυνση εκκινητών (extension)

Κατά τη διάρκεια του **πρώτου σταδίου** το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94 ℃ προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικόνα 5.2)

Στο **δεύτερο στάδιο** η θερμοκρασία μειώνεται στους 50-60 ℃ κι έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Εικόνα 5.2)

Στο **τρίτο και τελευταίο στάδιο** η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72 ℃ και με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP’s) στο 3’ άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5’ προς 3’ (επιμήκυνση/extension, Εικόνα 5.2)

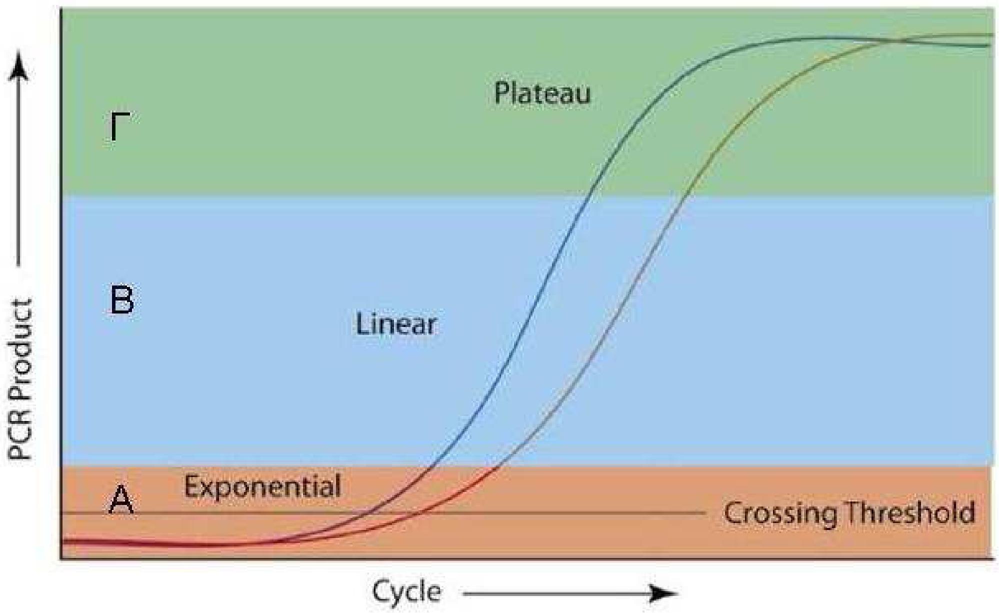


Εικόνα 5.2 Τα βασικά στάδια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Στάδιο 1 (Step 1) : Αποδιάταξη της διπλής αλυσίδας του τμήματος DNA (denaturation), Στάδιο 2 (Step 2) : ένωση των εκκινητών σε κάθε αλυσίδα (annealing), Στάδιο 3 (Step 3) : Σύνθεση των νέων μορίων DNA (extension) (Vierstraete, 1999)

5.3.3 Φάσεις αντίδρασης PCR

Η διαδικασία της PCR χωρίζεται σε τρεις φάσεις (Λαζανάκη, 2010) :

- **Εκθετική (exponential) φάση** : Είναι η φάση κατά την οποία έχει αρχίσει ο πολλαπλασιασμός της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Σε αυτή τη φάση η αντίδραση είναι πολύ αποτελεσματική και σε κάθε κύκλο διπλασιάζεται η προεπιλεγμένη αλληλουχία DNA (Εικόνα 5.3 Α)
- **Γραμμική (linear) φάση** : Η φάση στην οποία παρατηρείται μειωμένη παραγωγή αντιγράφων της αλληλουχίας DNA εξαιτίας της μείωσης της ενεργότητας των αντιδραστηρίων (Εικόνα 5.3 Β)
- **Φάση Plateau** : Στη φάση αυτή έχει σταματήσει η αντίδραση PCR καθώς και η παραγωγή νέων αντιγράφων εξαιτίας της εξάντλησης των αντιδραστηρίων (Εικόνα 5.3 Γ)



Εικόνα 5.3 Η καμπύλη παρουσιάζει τις τρεις φάσεις στις οποίες διακρίνεται η διαδικασία της PCR. Α) Εκθετική φάση (Exponential phase), Β) Γραμμική φάση (Linear phase) και Γ) Φάση Πλατώ (Plateau) (Van Guilder et al., 2008)

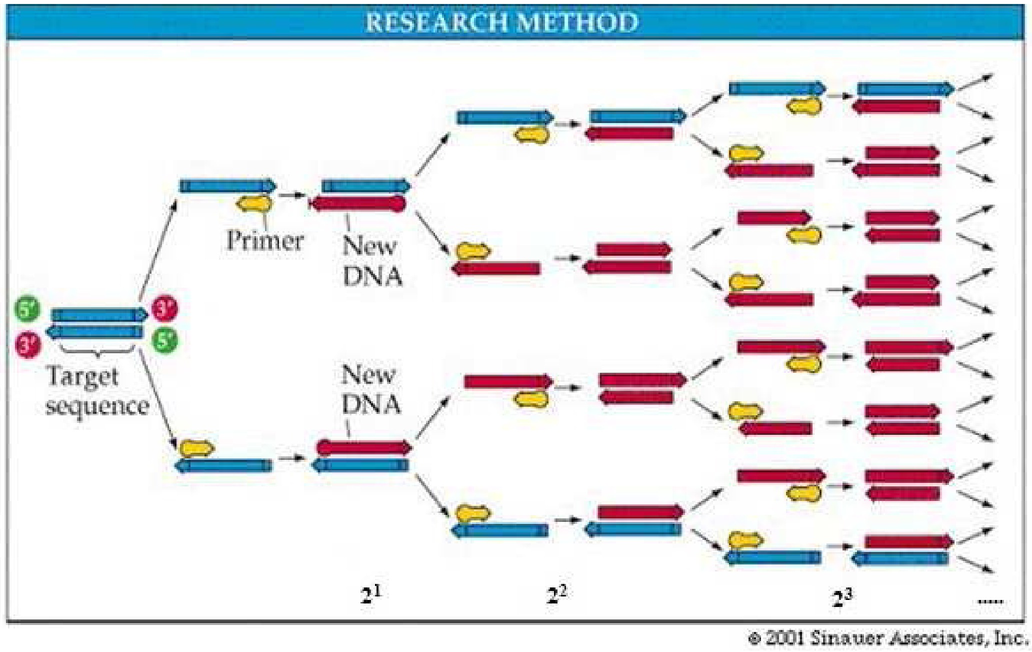
5.3.4 Εκκινητές, DNA πολυμεράση & σύνθεση DNA

Μεγάλη σημασία στην επιτυχία της PCR έχουν οι εκκινητές και η DNA πολυμεράση. Οι **εκκινητές** (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια κι έχουν συνήθως μήκος 15-20 νουκλεοτιδίων ο καθένας. Πρέπει να είναι συμπληρωματικοί στις αλυσίδες του DNA, αφορούν τις περιοχές από όπου αρχίζει το ένζυμο DNA πολυμεράση τη σύνθεση της διπλής αλυσίδας του επιθυμητού DNA προϊόντος κι έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature, T_m).

Η **DNA πολυμεράση** (Taq polymerase) είναι ένζυμο το οποίο μέσω της προσθήκης νουκλεοτιδίων βοηθάει στη σύνθεση της πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας που θα είναι συμπληρωματική της προεπιλεγμένης αλληλουχίας DNA. Τα νουκλεοτίδια σχηματίζουν ζευγάρια βάσεων με τα νουκλεοτίδια από την αρχική αλληλουχία DNA και η DNA πολυμεράση δημιουργεί τους δεσμούς που τα ενώνουν μεταξύ τους. Η προσθήκη των νουκλεοτιδίων γίνεται από το 3’ άκρο του εκκινητή. Η DNA πολυμεράση απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και παρουσιάζει μεγάλη αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες 72-80 ℃, διατηρώντας επαρκή ενζυματική δραστικότητα στις συνθήκες της αντίδρασης. Σήμερα, με τη βοήθεια μεθοδολογιών της Μοριακής Βιολογίας και Βιοτεχνολογίας έχουν αναπτυχθεί διάφορα παράγωγα της Taq πολυμεράσης με βελτιωμένα χαρακτηριστικά και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Αυτές οι πολυμεράσες δεν επιτρέπουν την λανθασμένη τοποθέτηση βάσεων κατά τη σύνθεση του DNA, εξαιτίας της 3’ προς 5’ επιδιορθωτικής ικανότητας (proofreading activity) που έχουν. Η Taq πολυμεράση δεν παρουσιάζει τέτοια ικανότητα και γι’αυτό υπάρχει πιθανότητα να έχουμε παραγωγή προϊόντων με τυχαίες τοποθετήσεις νουκλεοτιδίων στις νέες αλυσίδες DNA (με μικρή συχνότητα) (Berg et al., 2002). Ονομαστικά αναφέρονται ορισμένα από τα παράγωγα της Taq πολυμεράσης : Klenow fragment, Stoffel fragment, Faststart polymerase, Pfu DNA polymerase, Vent polymerase και Tth polymerase.

Μέσα στο διάλυμα της αντίδρασης που αφορά την PCR, πέρα από τους εκκινητές, τις πολυμεράσες και το τμήμα DNA, υπάρχουν επίσης και τα dNTP’s, τριφωσφορικά δεσοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxynucleotide triphosphates), που είναι απαραίτητα νουκλεοτίδια (ATP, TTP, CTP και GTP) για τη σύνθεση των συμπληρωματικών κλώνων, τα ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}) που απαιτούνται για την ενζυματική δραστικότητα της DNA πολυμεράσης κι ένα ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για τη διατήρηση του pH στις τιμές 7.5-8.

Η διαδικασία της PCR μπορεί να ολοκληρωθεί σε αρκετούς κύκλους, συνήθως όμως 30 με 40 κύκλοι είναι αρκετοί για να συντεθούν εκατομμύρια αντίγραφα του αρχικού τμήματος DNA. Σε κάθε κύκλο πραγματοποιείται διπλασιασμός του αριθμού των αντιγράφων του αρχικού τμήματος DNA και τα αντίγραφα που προκύπτουν χρησιμοποιούνται ως εκμαγεία (πρότυπα) για τον επόμενο κύκλο (Εικόνα 5.4) (Λαζανάκη, 2010).



Εικόνα 5.4 Παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας της μεθόδου και εκθετικού πολλαπλασιασμού των προϊόντων (Λαζανάκη, 2010)

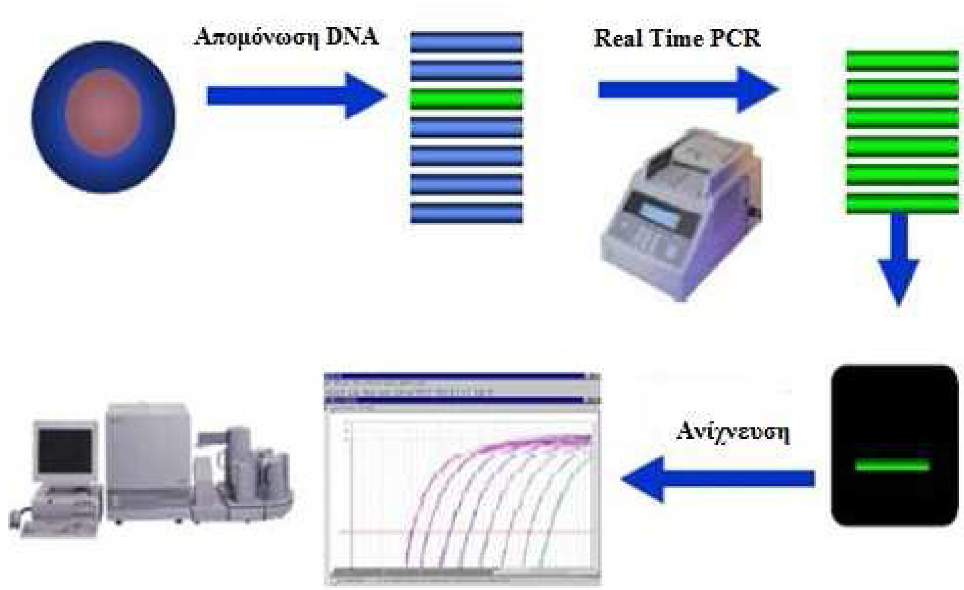
Για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της PCR, δηλαδή των αντιγράφων DNA, εφαρμόζεται η διαδικασία ηλεκτροφόρησης σε πηκτή αγαρόζης μαζί με μοριακούς δείκτες των οποίων τα μεγέθη είναι γνωστά (molecular markers). Έτσι, μπορούμε να διαπιστώσουμε αν το προϊόν της PCR έχει το αναμενόμενο μέγεθος. Τα προϊόντα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

5.4 Η αρχή λειτουργίας της Real Time PCR

Η **Real Time PCR** αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής PCR και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο (real time). Συχνά αναφέρεται και με άλλες ονομασίες όπως Quantitative real-time PCR (QRT-PCR) ή Kinetic PCR, ενώ αρκετά συχνά το όνομά της συγχέεται με τη μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcription PCR) λόγω της συντομογραφίας RT-PCR.

Με τη Real Time PCR συνήθως επιδιώκεται ανάλυση DNA, είναι όμως δυνατόν να πραγματοποιηθεί ανάλυση και τμημάτων cDNA (complementary DNA : μόριο DNA που έχει συντεθεί από ώριμο mRNA, έτοιμο προς μετάφραση) ή RNA αν συνδιαστούν οι μέθοδοι της Real time PCR με τη μέθοδο της Reverse transcription PCR. Παρόλο που η μέθοδος της Real time PCR στηρίζεται στις βασικές αρχές της συμβατικής PCR, παρουσιάζει μεγαλύτερη ακρίβεια, αποδοτικότητα σε μικρότερο χρόνο σε σχέση με την PCR και παρέχει τη δυνατότητα παρακολούθησης της πορείας σύνθεσης του DNA σε κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικόνα 5.5). Το διάλυμα της αντίδρασης της Real time PCR αποτελείται από τα ίδια αντιδραστήρια με αυτά της συμβατικής PCR εκτός από τους μηχανισμούς ανίχνευσης DNA, που αφορούν την προσθήκη συγκεκριμένων χρωστικών (Houghton & Cockerill, 2006).

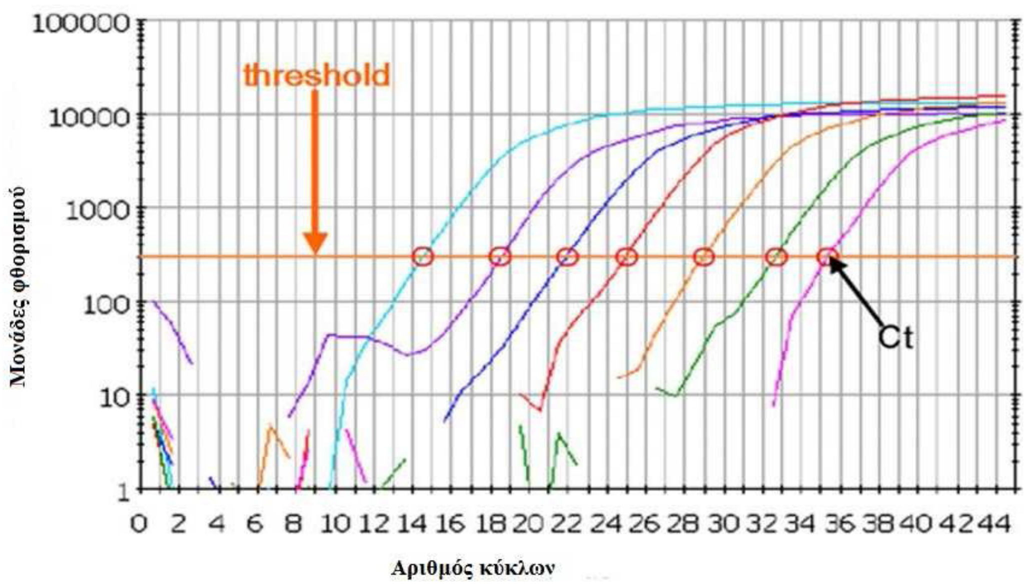
Τα δείγματα προς ανάλυση παρακολουθούνται με τη βοήθεια αυτοματοποιημένου μηχανήματος, ειδικού για τη Real time PCR, που είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και το οποίο παρέχει τη δυνατότητα ανάλυσης και ποσοτικοποίησης του σήματος ανίχνευσης DNA μετά από κάθε κύκλο της αντίδρασης (Εικόνα 5.5)



Εικόνα 5.5 Η διαδικασία της μεθόδου Real time PCR. Ξεκινάει με την απομόνωση του DNA, συνεχίζει με την αντίδραση της Real time PCR και τελειώνει με την ανίχνευση των προϊόντων (Λαζανάκη, 2010)

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

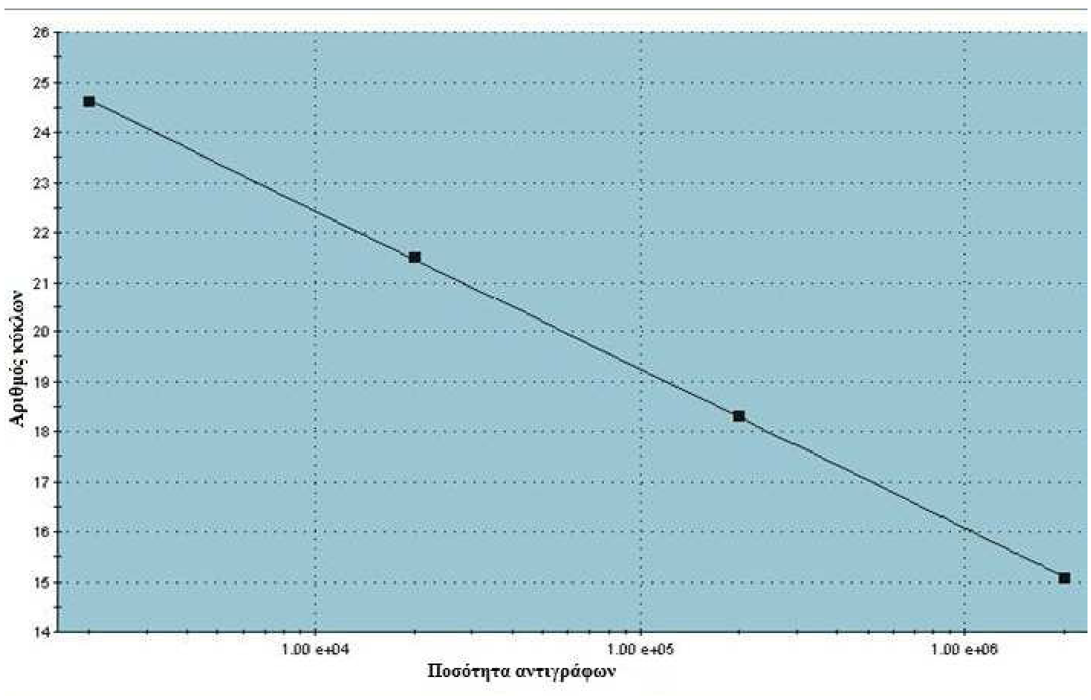
Η **γραμμή Threshold** (Εικόνα 5.6) είναι το σημείο στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real time PCR από το φόντο, ενώ ο κύκλος κατά τη διάρκεια του οποίου το δείγμα φτάσει την γραμμή Threshold ονομάζεται **Threshold cycle (C_t)** ή **τιμή C_t**.



Εικόνα 5.6 Με την οριοθέτηση του σημείου Threshold γίνεται πιο εύκολος ο προσδιορισμός της τιμής C_t (Hunt, 2006)

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

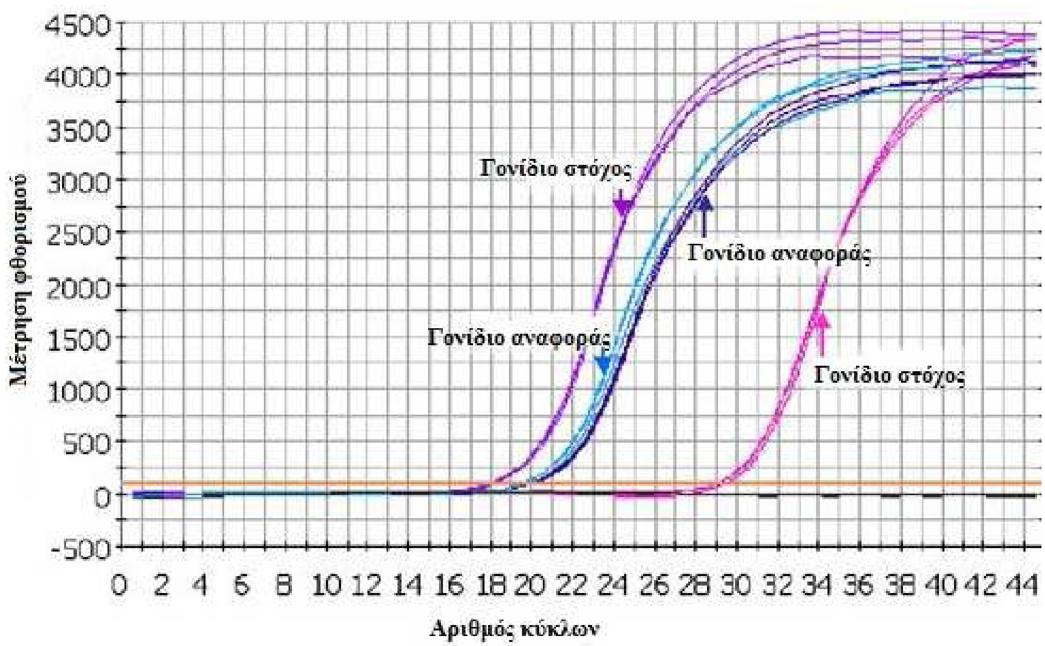
Ανάλογα με τον σκοπό του πειράματος, αν δηλαδή απαιτείται να υπολογιστεί η σχετική ποσότητα DNA ή ο ακριβής αριθμός αντιγράφων, υπάρχουν 2 διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να επιλεγούν : η απόλυτη ποσοτικοποίηση και η σχετική ποσοτικοποίηση (Livak & Schmittgen, 2001). Η **απόλυτη ποσοτικοποίηση** (absolute quantification) παρέχει τη μεγαλύτερη ακρίβεια στην ποσοτικοποίηση δειγμάτων της Real time PCR και χρησιμοποιείται όταν είναι απαραίτητο για το πείραμα να μετρηθεί η ακριβής ποσότητα της αλληλουχίας στο δείγμα. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση μιας **καμπύλης αναφοράς-πρότυπης καμπύλης** (standard curve, Εικόνα 5.7), με την οποία συγκρίνεται το φθορίζον σήμα που εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς θα πρέπει να επιλεχθεί μία γνωστή συγκέντρωση-μάρτυρας, που μπορεί να προέρχεται από DNA, γονιδιωματικό DNA, RNA, cDNA, ανασυνδιασμένο πλασμιδιακό DNA (recombinant, recDNA) ή συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (Stratagene, 2006). Αυτή η συγκέντρωση-μάρτυρας θα υποβληθεί σε μια σειρά διαδοχικών αραιώσεων και στη συνέχεια τα αραιωμένα δείγματα θα υποστούν την ίδια αντίδραση της Real time PCR μαζί με τα πειραματικά δείγματα.



Εικόνα 5.7 Παράδειγμα καμπύλης αναφοράς (standard curve) που σχηματίζεται από 4 σημεία, δηλαδή από 4 αραιώσεις της αρχικής συγκέντρωσης-μάρτυρα (Stratagene, 2006)

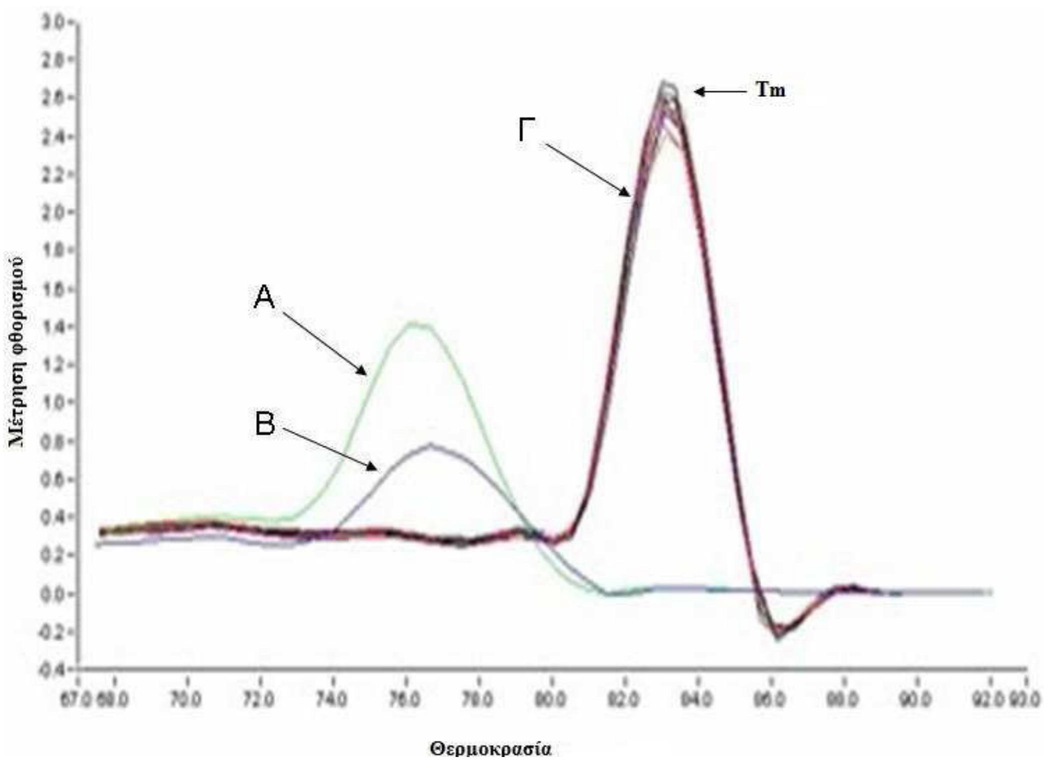
Μετά το τέλος της αντίδρασης η καμπύλη αναφοράς εμφανίζεται σε γράφημα ως μια ευθεία γραμμή που εκφράζει τον αριθμό των αντιγράφων του αρχικού μάρτυρα και τις τιμές C_t της κάθε αραίωσης. Η καμπύλη αναφοράς πρέπει να βασίζεται σε τουλάχιστον 4 σημεία (γνωστής συγκέντρωσης) και θα πρέπει τα σημεία αυτά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

Η **σχετική ποσοτικοποίηση** (relative quantification) είναι πιο εύκολη στη χρήση της σε σχέση με την απόλυτη και με τη μέθοδο αυτή δεν είναι απαραίτητη η χρήση καμπύλης αναφοράς. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη σύγκριση της έντασης φθορισμού του υπό μελέτη γονιδίου μετά από αλυσιδωτή ενίσχυση με εκείνη ενός γονιδίου αναφοράς (reference ή control gene) του ίδιου οργανισμού στην ίδια αντίδραση (Εικόνα 5.8). Έχουν αναπτυχθεί διάφορα μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται για να υπολογίσουμε την έκφραση του υπό μελέτη γονιδίου σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, όπως για παράδειγμα το μαθηματικό μοντέλο του Plaffl (Plaffl, 2002).



Εικόνα 5.8 Σύγκριση καμπύλης του υπό μελέτη γονιδίου (γονίδιο-στόχος) με το γονίδιο αναφοράς (reference gene) (Hunt, 2006)

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



Εικόνα 5.9 Παράδειγμα καμπύλης αποδιάταξης στην οποία εμφανίζονται τρεις διαφορετικές κορυφές. Η υψηλότερη κορυφή (Γ) αντιστοιχεί στη θερμοκρασία αποδιάταξης του επιθυμητού προϊόντος. Οι κορυφές Α και Β αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης από αυτήν της κορυφής Γ (Λαζανάκη, 2010)

Η θερμοκρασία αποδιάταξης είναι εκείνη στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA κι εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος αυτού. Τα προϊόντα της αντίδρασης θα πρέπει να έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, εκτός και αν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των εκκινητών ή τμήματα που προέρχονται από τοποθέτηση των εκκινητών σε παρόμοιες συμπληρωματικές αλληλουχίες (mispriming) (Hunt, 2006). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια θερμοκρασία αποδιάταξης, τότε θα εμφανιστεί μία κορυφή στην καμπύλη, ενώ στην περίπτωση που ανάμεσα στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα διαφορετικού μεγέθους, τότε θα παρατηρηθούν στην καμπύλη και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές θερμοκρασίες αποδιάταξης T_m (Εικόνα 5.9), επειδή για κάθε προϊόν η αποδιάταξη γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία.

Η μεθοδολογία εφαρμογής της αντίδρασης της Real time PCR θα πρέπει πέρα από τα άγνωστα δείγματα προς ανάλυση να περιλαμβάνει πάντα και αρνητικούς μάρτυρες (κενά DNA). Τα αρνητικά αυτά δείγματα αφορούν την εφαρμογή κανονικής αντίδρασης με χρήση όλων των υλικών της PCR, όπως στην περίπτωση της αντίδρασης των αγνώστων δειγμάτων, πλην όμως της προσθήκης του DNA. Στους αρνητικούς μάρτυρες συνήθως χρησιμοποιείται νερό αντί του αντίστοιχου όγκου DNA και στόχος είναι να εξεταστεί η περίπτωση επιμόλυνσης του υπό μελέτη αγνώστου δείγματος με DNA άλλου οργανισμού (Λαζανάκη, 2010).

5.5 Μέθοδοι ανίχνευσης

Η quantitative PCR (qPCR) ή αλλιώς ποσοτική PCR χρησιμοποιείται για την ποσοτικοποίηση της αλληλουχίας DNA (ή RNA) μέσα στο δείγμα. Η ποσότητα προϊόντος που ανιχνεύεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης σχετίζεται άμεσα με την αρχική ποσότητα της αλληλουχίας-στόχου μέσα στο δείγμα. Στην qPCR υπάρχουν 2 μέθοδοι ανίχνευσης που μπορούν να εφαρμοστούν για τη σήμανση των προϊόντων της Real time PCR (Λαζανάκη, 2010). Η μία μέθοδος βασίζεται στη χρήση **χρωστικών** ουσιών οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ ζευγών βάσεων σε δίκλωνο DNA (DNA binding dyes). Η άλλη μέθοδος βασίζεται στη χρήση ολιγονουκλεοτιδίων-**ιχνηθετών** (probes).

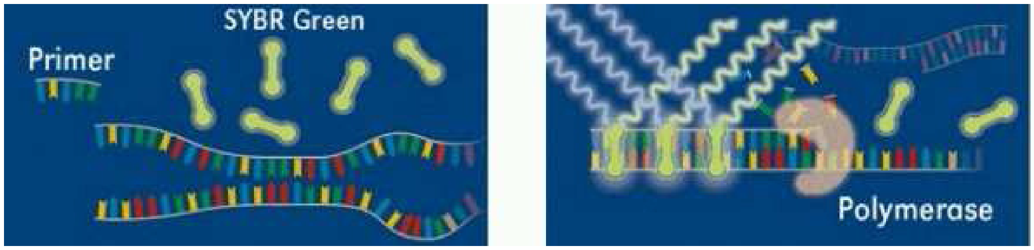
Η μέθοδος των χρωστικών δεν παρουσιάζει εξειδίκευση, καθώς ανιχνεύει όλα τα δίκλωνα μόρια DNA, πέραν της αλληλουχίας-στόχου, τα οποία ενισχύονται κατά την αντίδραση PCR. Κατά την εφαρμογή αυτής της μεθόδου ανίχνευσης χρησιμοποιείται μια φθορίζουσα χρωστική η οποία ενσωματώνεται σε δίκλωνο μόριο DNA (double stranded DNA–dsDNA). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η μέθοδος SYBR GREEN που χρησιμοποιείται ευρέως και περιγράφεται παρακάτω.

Η μέθοδος των ιχνηθετών είναι ειδική, καθώς διακρίνει την ενισχυόμενη αλληλουχία-στόχο από τυχόν μη ειδικά προϊόντα που ενισχύονται παράλληλα, καθώς και από πιθανά διμερή των εκκινητών (primer-dimers). Στηρίζεται στη χρήση ιχνηθέτη ειδικού για την αλληλουχία ενδιαφέροντος. Οι ιχνηθέτες παρέχουν τη δυνατότητα σήμανσης με διάφορες χρωστικές, των οποίων τα διαφορετικά φάσματα διέγερσης/εκπομπής επιτρέπουν τον σαφή διαχωρισμό τους. Μέθοδοι που ανήκουν σ’αυτή την κατηγορία είναι οι TaqMan probes, Molecular Beacons, Scorpion probes και FRET probes (Bustin, 2000; Giulietti et al., 2001).

5.5.1 Μέθοδος SYBR GREEN

Στην παρούσα εργασία εφαρμόσαμε τη μέθοδο SYBR GREEN Real time PCR. Στη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται η χρωστική **SYBR Green I**. Η ουσία αυτή διεγείρεται με ακτινοβολία μήκους κύματος 497 nm και εκπέμπει έντονο φως πράσινου χρώματος στα 520 nm όταν προσδένεται σε δίκλωνο μόριο DNA. Η SYBR Green I δεν φθορίζει όταν βρίσκεται ελεύθερη σε διάλυμα, όμως όταν ενσωματώνεται στο δίκλωνο DNA κατά τη σύνθεσή του, παράγει φθορισμό η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος στο διάλυμα.

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της χρωστικής αυτής είναι η δυνατότητα χρήσης της με οποιοδήποτε ζεύγος εκκινητών, για την ενίσχυση οποιασδήποτε αλληλουχίας-στόχου, γεγονός που την καθιστά πολύ πιο οικονομική κι εύχρηστη μέθοδο από τη χρήση ειδικού ιχνηθέτη (probe). Επιπλέον, αποτελεί μια ιδιαίτερα ευαίσθητη μέθοδο, καθώς σε κάθε μόριο DNA που συντίθεται δεσμεύονται πολλά μόρια χρωστικής με αποτέλεσμα την ενίσχυση του παραγόμενου φθορισμού. Ωστόσο, το μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι λόγω πρόσδεσης της SYBR Green I σε όλα τα παραγόμενα δίκλωνα μόρια DNA, μπορεί να γίνει λανθασμένη υπερεκτίμηση της αλληλουχίας-στόχου, καθώς μπορεί να συμπεριληφθούν και μη ειδικά προϊόντα ή και διμερή εκκινητών που ενδέχεται να προκύπτουν. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τον σωστό σχεδιασμό των εκκινητών καθώς και με τη βελτιστοποίηση των συνθηκών της αντίδρασης, με σκοπό την αποτροπή δημιουργίας διμερών των εκκινητών. Επιπλέον, η μελέτη των καμπυλών αποδιάταξης (melting curves) μετά το τέλος της αντίδρασης δίνει τη δυνατότητα διαχωρισμού του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας από τους φθορισμούς που οφείλονται σε διμερή εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα (Ιωαννίδη, 2010).



Εικόνα 5.10 Τρόπος λειτουργίας της χρωστικής SYBR Green I. Όταν βρίσκεται ελεύθερη στο διάλυμα δεν παράγεται φθορισμός, ενώ με την ενσωμάτωσή της στο DNA κατά τη σύνθεσή του και τη διέγερσή της με κατάλληλη ακτινοβολία παράγεται φθορισμός (Λαζανάκη, 2010)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 : ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι :

- Η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με χρήση *ηλεκτρόλυσης* και *φωτοηλεκτροκατάλυσης*.

- Ο έλεγχος της απόδοσης της απολυμαντικής μεθόδου υπό την επίδραση διαφόρων παραμέτρων. Αυτός ο έλεγχος πραγματοποιείται μετρώντας την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών *E.coli* και *E.faecalis* σε συνάρτηση με τον χρόνο απολύμανσης. Οι παράμετροι ως προς τις οποίες εξετάζεται η απόδοση είναι το είδος του μικροοργανισμού που περιέχεται στο δείγμα, η εφαρμοζόμενη τάση και η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών.

- Η μελέτη της αποτελεσματικότητας της φωτοηλεκτροκατάλυσης σε σχέση με την απλή ηλεκτρόλυση και τη φωτοκατάλυση.

- Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών τόσο με την κλασσική καλλιεργητική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων όσο και με τη μοριακή μέθοδο SYBR GREEN Real time PCR.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 Υλικά

7.1.1 Θρεπτικά υλικά

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

7.1.2 Χημικά - βιοχημικά υλικά

- Αιθανόλη *(Merck)*
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ, συντομογραφία *EDTA (Sigma)*
- Δωδεκυλο-θειικό Νάτριο, *SDS (Sigma)*
- Ισοπροπανόλη *(Merck)*
- Λυσοζύμη, *lysozyme*
- N-Cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide, *CTAB (Merck)*
- Πρωτεϊνάση-Κ
- Tris (hydroxymethyl) aminomethane, *Tris (Merck)*
- Χλωριούχο νάτριο, *NaCl (Merck)*

7.1.3 Διαλύματα

- Διάλυμα αιθανόλης συγκέντρωσης 70 %
- Ρυθμιστικό διάλυμα lysozyme lysis buffer :
  100 mM NaCl, 500 mM Tris [pH 8.0], lysozyme 10 mg/mL
- Διάλυμα *CTAB - NaCl* (για την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος) :
  4.1 gr NaCl, 10 gr *CTAB* σε 100 mL ddH_2O
- Διάλυμα ενζύμου πρωτεϊνάσης-Κ συγκέντρωσης 20 mg/mL

- Διάλυμα NaCl 0.8 % $^{w}/_{v}$
- Διάλυμα *SDS* 10 % :
  5 gr *SDS* σε 50 mL ddH_2O
- Ρυθμιστικό διάλυμα SDS lysis buffer :
  100 mM NaCl, 500 mM Tris [pH 8.0], 10 % $^{w}/_{v}$ SDS
- Ρυθμιστικό διάλυμα *Tris-EDTA (TE)* :
  50 mM *Tris*, 50 mM *EDTA*, pH 8.0. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121℃ για 15 λεπτά
- Διάλυμα Φαινόλη-Χλωροφόρμιο-Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) (Sigma)

7.1.4 Πρότυπο στέλεχος *Escherichia coli* & *Enterococcus faecalis*

Στην πραγματοποίηση των πειραμάτων της παρούσας εργασίας χρησιμοποιήθηκαν ως δείκτες τα βακτηριακά στελέχη *E.coli* ATCC 23716 και *E.faecalis* ATCC 14506 (American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA).

7.1.5 Ηλεκτρόδια

Χρησιμοποιήθηκε στα 2 πρώτα μόνο πειράματα (και στα επαναληπτικά τους) ηλεκτρολυτικό κελί DiaCell® της εταιρίας Adamant® με ηλεκτρόδιο BDD/Si (Boron Doped Diamond on Silicon – Διαμάντι με πρόσμιξη βορίου σε υπόστρωμα πυριτίου). Σε όλα τα υπόλοιπα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας εφοδιασμένος με άνοδο από διοξείδιο του τιτανίου σε υπόστρωμα τιτανίου, TiO_2/Ti, και κάθοδο ζιρκονία.

7.1.6 Πηγή φωτός & καταλύτης

Στα πειράματα της φωτοηλεκτροκατάλυσης ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκε η λάμπα Newport 67005 Solar Simulator System ισχύος 150 Watt. Ως καταλύτης αξιοποιήθηκε ακινητοποιημένο TiO_2 πάνω σε υπόστρωμα τιτανίου.

7.1.7 Εκκινητές & χρωστική

Οι εκκινητές (primers) που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση της Real time PCR επιλέχθηκαν με βάση ξενόγλωσση βιβλιογραφία και παρακάτω δίνονται οι αλληλουχίες τους.

Για την *E.coli* (Chen et al., 2006)

Πίνακας 7.1 Εκκινητές PCR για την *E.coli*

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

Για τον *E.faecalis* (Bartosch et al., 2004)

Πίνακας 7.2 Εκκινητές PCR για τον *E.faecalis*

Primer	Αλληλουχία
Efs130F	5΄–AACCTACCCATCAGAGGG –3΄
Efs490R	5΄–GACGTTCAGTTACTAACG –3΄

Η ουσία που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου ήταν η χρωστική SYBR Green I, η οποία με την ενσωμάτωσή της στο παραγόμενο δίκλωνο DNA παράγει πράσινο φθορισμό.

7.2 Μεθοδολογία

Προετοιμασία πειράματος

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα συνθετικό αλλά και πραγματικό απόβλητο. Στη φάση προετοιμασίας του πειράματος, ήταν απαραίτητο να γίνει ανακαλλιέργεια των εκάστοτε μικροοργανισμών (*E.coli* ή/και *E.faecalis*) σε θρεπτικό υλικό Nutrient Agar. Το Nutrient Agar αποτελεί μη επιλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο αναπτύσσονται λευκού χρώματος αποικίες. Η ανακαλλιέργεια περιλαμβάνει την επίστρωση των βακτηρίων (από προηγούμενη καλλιέργεια) σε τριβλία με χρήση πλαστικών κρίκων και την επώασή τους σε ειδικό φούρνο στους 37℃, για 24 hr (20-24 hr) αν πρόκειται για *E.coli* και 48 hr αν πρόκειται για εντερόκοκκους. Στη συνέχεια, από τις δημιουργούμενες αποικίες λαμβανόταν με κρίκο μια ποσότητα βακτηρίων με την οποία εμποτίζαμε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό για να το επιμολύνουμε, παρασκευάζοντας έτσι συνθετικό απόβλητο. Όσον αφορά το πραγματικό απόβλητο, αυτό συλλέχθηκε από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της Εγκατάστασης Επεξεργασίας Λυμάτων του δήμου Χανίων (ΕΕΛ Χανίων, Δυτική Κρήτη), λίγο πριν την είσοδό του στο στάδιο της χλωρίωσης. Για να χρησιμοποιηθεί ως πειραματικό δείγμα, προηγήθηκε η αποστείρωσή του σε αυτόκαυστο, έτσι ώστε να ρυθμιστεί η περιεκτικότητά του σε βακτήρια και στη συνέχεια επιμολύνθηκε με *E.coli* ή/και *E.faecalis* στο επιθυμητό επίπεδο.

Για να βεβαιωθούμε ότι η περιεκτικότητα του δείγματος σε μικροοργανισμούς κυμαινόταν μεταξύ συγκεκριμένων τιμών και να επιτευχθούν συγκεντρώσεις παραπλήσιες με αυτές των πραγματικών λυμάτων, γινόταν φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600 nm, έτσι ώστε να χαρακτηριστεί το βακτηριακό εναιώρημα με συγκεκριμένη τιμή. Σύμφωνα με την κλίμακα McFarland, όταν η απορρόφηση του δείγματος που μετράται στα 600 nm, δηλαδή η ένδειξη του φασματοφωτομέτρου, είναι 0.132, τότε η συγκέντρωση των μικροοργανισμών που περιέχει είναι περίπου 1.5×10^{8} CFU/mL. Η επιθυμητή τιμή απορρόφησης (≈ 0.09) επιτεύχθηκε είτε με αραίωση του δείγματος είτε επιμολύνοντάς το με επιπλέον ποσότητα βακτηρίων.

Πριν την έναρξη οποιουδήποτε πειράματος γινόταν η παρασκευή των απαραίτητων θρεπτικών υλικών, σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στη συσκευασία τους. Τα Nutrient Agar (για ανακαλλιέργεια), Hicrome Agar (για *E.coli*) και Slanetz (για *E.faecalis*) τοποθετήθηκαν σε τριβλία όπου και στερεοποιήθηκαν. Το Nutrient Broth (για υγρή ανακαλλιέργεια) ήταν απαραίτητο για να κατασκευαστεί η πρότυπη καμπύλη-καμπύλη βαθμονόμησης της μεθόδου PCR. Επίσης, παρασκευάστηκε υδατικό διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0.8% ($^{w}/_{v}$) το οποίο μετά την αποστείρωσή του χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης στις διαδοχικές αραιώσεις (καλλιεργητική μέθοδος). Πριν το πείραμα είχε μεγάλη σημασία η αποστείρωση σε αυτόκαυστο (121℃ για περίπου 20 min σε υψηλή πίεση) του εργαστηριακού εξοπλισμού όπως κωνικές φιάλες, δοκιμαστικοί σωλήνες, eppendorf, tips κ.α. Αυτό γίνεται για να αποφευχθεί κατά το δυνατόν περισσότερο τυχόν επιμόλυνση των πειραματικών συνθηκών. Γυάλινα αντικείμενα (κωνικές, ογκομετρικοί κύλινδροι, σωλήνες κ.α.) για τα οποία απαιτείται υψηλή καθαρότητα τοποθετήθηκαν με αλουμινόχαρτο στο πώμα τους σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης πριν τη χρήση τους, δηλαδή στους 185℃ για 1.5 hr.

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν διατηρώντας σταθερή τη θερμοκρασία στους 25 ± 1℃.

7.2.1 Ηλεκτρόλυση

Α) Με ηλεκτρόδιο BDD/Si

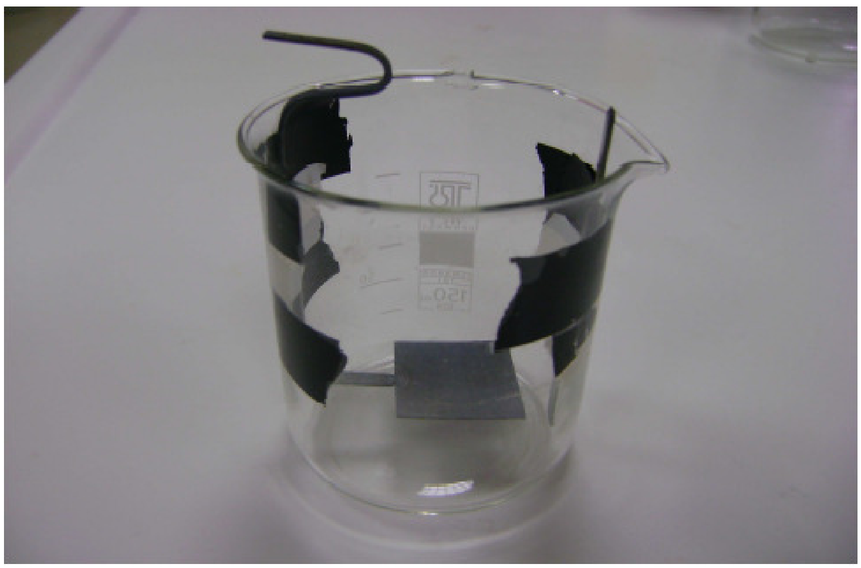
Στα 2 πρώτα πειράματα ηλεκτρόλυσης χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρολυτικό κελί (DiaCell®) με υλικό ανόδου διαμάντι εμπλουτισμένο με βόριο σε υπόστρωμα πυριτίου, BDD/Si. Τα κύρια στοιχεία της πειραματικής διάταξης είναι η δεξαμενή με ενσωματωμένο σύστημα ψύξης, η αντλία τροφοδοσίας και το φίλτρο. Το προς επεξεργασία υγρό διοχετεύεται μέσω της δεξαμενής (δοχείο όγκου $\approx$20 L) και με τη βοήθεια της αντλίας ανακυκλοφορεί και διέρχεται από το φίλτρο, το οποίο κατακρατά τα στερεά ή γενικά μεγάλα μόρια (όχι όμως και τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς) αποτρέποντας την εισαγωγή τους στα ηλεκτροχημικά διαμερίσματα του κελιού. Στη συνέχεια, με την εισαγωγή του υγρού στο κελί λαμβάνει χώρα ηλεκτροχημική οξείδωση στην άνοδο για την απολύμανσή του. Το σύστημα ψύξης της δεξαμενής συμβάλλει στη διατήρηση της θερμοκρασίας του δείγματος κάτω από τους 35℃. Η πολικότητα του μηχανήματος μπορεί να ρυθμιστεί να μεταβάλλεται αυτόματα, ώστε να αποτρέπονται οι επικαθήσεις αλάτων στα εξαρτήματά του.

Εικόνα 7.1 Πειραματική διάταξη

Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα ήταν 2 L συνθετικού αποβλήτου (αποστειρωμένο νερό επιμολυσμένο με *E.coli*). Κατά την έναρξη του πειράματος προστέθηκαν στο δείγμα 20 gr θειικού νατρίου, Na_2SO_4 1% $^{w}/_{v}$, για την αύξηση της αγωγιμότητας (ηλεκτρολύτης). Η διάρκεια των πειραμάτων ήταν 1.5 ώρα το πρώτο και 1 ώρα το δεύτερο και έλαβαν χώρα *υπό σταθερή ένταση ρεύματος 1 A*, καταγράφοντας σε τακτά χρονικά διαστήματα τις αντίστοιχες ενδείξεις της τάσης (8-9 V). Η λήψη των δειγμάτων έγινε στα 0, 10, 20, 30, 60 και 90 min (πρώτο πείραμα) και στα 0, 3, 6, 10, 20, 30, 60 min (δεύτερο πείραμα), λαμβάνοντας περίπου 3 mL δείγματος κάθε φορά και τοποθετώντας τα άμεσα σε ψυγείο. Μετά τη λήψη όλων των δειγμάτων του πειράματος και την εξαγωγή τους από το ψυγείο, ακολούθησε ανάδευσή τους με μηχανικό αναδευτήρα vortex. Έγιναν 6 διαδοχικές αραιώσεις μόνο στο δείγμα των 0 min και τα αραιωμένα δείγματα 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5} και 10^{-6} αλλά και αυτά των 10, 20, 30, 60, 90 min (ή 3, 6, 10, 20, 30, 60 min στο 2^{o} πείραμα) χρησιμοποιήθηκαν στην καλλιεργητική μέθοδο.

B) Με ηλεκτρόδιο TiO_2/Ti

Τα πειράματα της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν κατά βάση σε έναν εργαστηριακής κλίμακας αντιδραστήρα εφοδιασμένο με άνοδο από οξείδιο τιτανίου σε υπόστρωμα τιτανίου, TiO_2/Ti και κάθοδο από ζιρκονία. Η άνοδος έχει τετραγωνική μορφή και επιφάνεια 5.8 cm^2. Στην άνοδο και κάθοδο εφαρμόζονται με τη βοήθεια οδοντωτών clips τα καλώδια που συνδέονται με συσκευή παροχής ρεύματος.

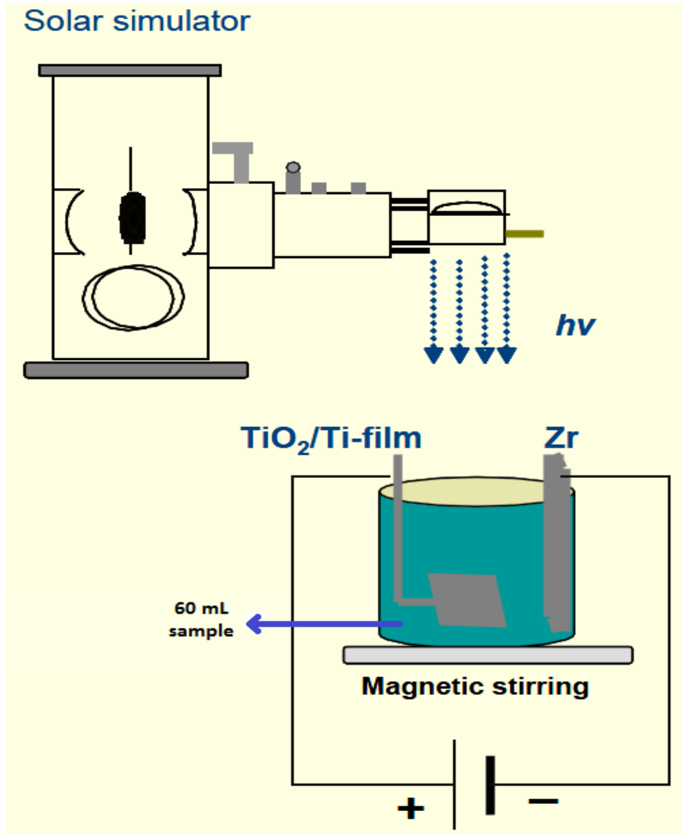


Εικόνα 7.2 Πειραματικός αντιδραστήρας

Ο όγκος του δείγματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν 60 mL και πριν την έναρξη του πειράματος έγινε προσθήκη 0.2 gr θειικού νατρίου, Na_2SO_4, το οποίο ως ηλεκτρολύτης βοηθάει στην αύξηση της αγωγιμότητας. Το υπό μελέτη δείγμα ήταν συνθετικό απόβλητο και συγκεκριμένα αποστειρωμένο νερό επιμολυσμένο με *E.coli*. Στον αντιδραστήρα με το δείγμα έγινε επίσης εισαγωγή ενός μικρού μαγνήτη και στη συνέχεια ο αντιδραστήρας τοποθετήθηκε επάνω σε συσκευή ανάδευσης, ώστε με την ενεργοποίησή της να επιτυγχάνεται η συνεχής ανάδευση του δείγματος μέσω της περιστροφής του μαγνήτη. Μετά την εφαρμογή των καλωδίων στα ηλεκτρόδια, έγινε ρύθμιση της επιθυμητής τάσης στη συσκευή παροχής ρεύματος (ποτενσιοστατική λειτουργία) και το πείραμα ξεκίνησε θέτοντας σε λειτουργία την παροχή ρεύματος καθώς και τη συσκευή ανάδευσης. Το πείραμα ηλεκτρόλυσης πραγματοποιήθηκε *υπό σταθερή τάση 2 Volt* και η διάρκειά του ήταν 2 ώρες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα, περίπου κάθε 5', καταγράφονταν και οι αντίστοιχες τιμές της έντασης του ρεύματος οι οποίες ήταν της τάξης των μA, δηλαδή πολύ χαμηλές. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα 0, 15, 30, 60, 90 και 120 min και κάθε δείγμα τοποθετήθηκε άμεσα σε ψυγείο για παραμονή μερικών λεπτών. Στη συνέχεια, όλα τα δείγματα αναδεύτηκαν μηχανικά με vortex και στο δείγμα των 0 min έγιναν 6 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Έπειτα, τα αραιωμένα δείγματα 10^{-4}, 10^{-5} και 10^{-6} αλλά και αυτά των 15, 30, 60, 90 και 120 min χρησιμοποιήθηκαν στην καλλιεργητική μέθοδο. Στη μέθοδο της Real time PCR αξιοποιήθηκαν τα άμεσα ληφθέντα δείγματα των 0, 15, 30, 60, 90 και 120 min.

7.2.2 Φωτοηλεκτροκατάλυση

Τα πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο αντιδραστήρα με την ηλεκτρόλυση, με άνοδο TiO_2/Ti. Ακολουθήθηκε σχεδόν η ίδια μεθοδολογία με την ηλεκτρόλυση, με τη διαφορά ότι πέρα από την παροχή ρεύματος στην άνοδο και κάθοδο, χρησιμοποιήθηκε ταυτόχρονα ως πηγή φωτός η λάμπα Newport 67005 Solar Simulator System ισχύος 150 Watt. Ως καταλύτης έδρασε το ακινητοποιημένο TiO_2 πάνω στο υπόστρωμα Ti. Η ποσότητα δείγματος σε κάθε πείραμα ήταν 60 mL είτε συνθετικού αποβλήτου (αποστειρωμένο νερό επιμολυσμένο με βακτήρια) είτε πραγματικού αποβλήτου (επίσης επιμολυσμένου), προσθέτοντας επίσης 0.2 gr Na_2SO_4 για αύξηση της αγωγιμότητας.



Εικόνα 7.3 Προσομοίωση πειραματικής διάταξης

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν *υπό σταθερές τιμές τάσης 2 και 5 Volt*, παρακολουθώντας και καταγράφοντας ανά τακτά διαστήματα τις αντίστοιχες τιμές της έντασης του ρεύματος, οι οποίες με το άναμμα της λάμπας ήταν της τάξης των mA. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 1.5 ώρα και η λήψη του δείγματος των 0 min γινόταν αμέσως μετά το άναμμα της λάμπας και την ενεργοποίηση της παροχής ρεύματος. Επίσης, έγινε δειγματοληψία στα 15, 30, 45, 60 και 90 min. Όλα τα δείγματα παρέμειναν για μερικά λεπτά σε ψυγείο και στη συνέχεια αναδεύτηκαν με vortex. Στο δείγμα των 0 min έγιναν 6 διαδοχικές αραιώσεις και ορισμένα από τα αραιωμένα δείγματα που προέκυψαν (10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3} ή 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}, ανάλογα με το πείραμα) αλλά και αυτά των 15, 30, 45, 60 και 90 min αξιοποιήθηκαν για την καλλιεργητική μέθοδο και τη Real time PCR. Η χρήση φωτός διαφοροποίησε σημαντικά τις πειραματικές συνθήκες, καθώς με το άναμμα της λάμπας η ένταση του ρεύματος αυξήθηκε κατά τρεις τάξεις μεγέθους, από μA σε mA. Η διοχέτευση ρεύματος φαίνεται να παίζει συμπληρωματικό ρόλο, υποβοηθώντας τη διεργασία της φωτοκατάλυσης και ενισχύοντας την οξειδωτική δράση του καταλύτη, αφού υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου αποτρέπεται η επανασύνδεση των φωτοπαραγόμενων ηλεκτρονίων με τις θετικά φορτισμένες οπές που είναι υπεύθυνες για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου. Αυτές οι ρίζες είναι επιθυμητές γιατί χάρη στην οξειδωτική δράση τους ενισχύουν την απολύμανση.

Εικόνα 7.4 Η συσκευή παροχής ρεύματος (κάτω μέρος) και η κεντρική μονάδα λειτουργίας της λάμπας solar (πάνω μέρος)

7.2.3 Καλλιεργητική μέθοδος

Σε κάθε πείραμα, μετά τη λήψη των δειγμάτων και την τοποθέτησή τους σε ψυγείο για μερικά λεπτά, ακολούθησε η καλλιεργητική διαδικασία με σκοπό την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των βακτηρίων *E.coli* και *E.faecalis*. Αρχικά, τοποθετήθηκαν σε 6 δοκιμαστικούς σωλήνες 9 mL υδατικού διαλύματος NaCl 0.8% $^{w}/_{v}$ σε κάθε έναν, για να ακολουθήσουν οι διαδοχικές αραιώσεις του δείγματος των 0 min. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε οριζόντια σειρά σε μια θήκη. Στην αρχή της σειράς τοποθετήθηκε ο σωλήνας με το αρχικό δείγμα των 0 min και με ειδική πιπέτα έγινε λήψη 1 mL από αυτό και εισαγωγή του στον αμέσως επόμενο σωλήνα, για να προκύψει αραίωση 1:10 (10^{-1}). Με τη σταδιακή επανάληψη της διαδικασίας, δηλαδή λαμβάνοντας κάθε φορά 1 mL από το προηγούμενο δείγμα (ήδη αραιωμένο) και εισάγοντάς το στον αμέσως επόμενο σωλήνα, προέκυψαν σταδιακά όλες οι αραιώσεις. Να σημειωθεί ότι πριν τη λήψη 1 mL από κάθε σωλήνα, ο σωλήνας έπρεπε να αναδευτεί με vortex, με σκοπό την ομοιόμορφη εξάπλωση των βακτηρίων. Έπειτα, ορισμένα από τα αραιωμένα δείγματα (ως επί το πλείστον τα 10^{-4}, 10^{-5} και 10^{-6}) αλλά και αυτά της δειγματοληψίας (15, 30, 45, 60, 90 min), μετά από καλή μηχανική τους ανάδευση με vortex, χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει επίστρωσή τους σε τριβλία με κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκαν 200 μL δείγματος, τα οποία λήφθηκαν με ειδική πιπέτα και η επίστρωση έγινε με χρήση πλαστικών κρίκων. Για ορισμένα δείγματα η επίστρωση έγινε σε έως και 5 τριβλία (5×200 μL), για να μειώσουμε το όριο ανίχνευσης της καλλιεργητικής μεθόδου και να έχουμε πιο αξιόπιστα αποτελέσματα. Στη συνέχεια, τα τριβλία τοποθετήθηκαν για 24 hr (*E.coli*) ή 48 hr (*E.faecalis*) σε φούρνο στους 37℃, ώστε να γίνει η επώαση των βακτηρίων. Το τελικό βήμα ήταν η καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών. Επειδή οι αποικίες εκφράζονται ως **CFU/mL**, ο αριθμός τους έπρεπε να αναχθεί σε ποσότητα δείγματος 1 mL με χρήση αριθμητικών υπολογισμών. Σε ένα τριβλίο μπορούν να μετρηθούν μέχρι 300 αποικίες. Αν είναι περισσότερες, η καταμέτρησή τους είναι δύσκολη και για το συγκεκριμένο τριβλίο οι αποικίες χαρακτηρίζονται ως μη αριθμήσιμες (NN, Non-Numerable). Με τις μετρήσιμες αποικίες γίνονται αριθμητικοί υπολογισμοί.

- Για τα τριβλία που περιέχουν αραιωμένο δείγμα 10^{-v}, όπου v = 1, 2, 3, 4, 5, 6 :

Μετρώντας x αποικίες στο δείγμα $10^{-\nu} \Rightarrow$ περίπου $x \cdot 10^{\nu}$ αποικίες στο αρχικό δείγμα. Αυτός είναι ο αριθμός CFU/200 μL του κάθε τριβλίου. Μετατροπή σε CFU/mL : $\frac{x \cdot 10^{\nu} CFU}{200\mu L} \cdot \frac{1000\mu L}{1mL} = x \cdot 10^{\nu} \cdot 5\frac{CFU}{mL}$

Έτσι, υπολογίζουμε τις αποικίες (CFU/mL) σε κάθε τριβλίο και παίρνοντας τον μέσο όρο των επιμέρους τιμών, προκύπτει ο πιθανός αριθμός αποικιών του αρχικού δείγματος (των 0 min).

- Για τα υπόλοιπα τριβλία :

Για δείγμα που έχει επιστρωθεί σε 1 μόνο τριβλίο στο οποίο μετρώνται x αποικίες

$$\Rightarrow \frac{xCFU}{200\mu L} \cdot \frac{1000\mu L}{mL} = x \cdot 5\frac{CFU}{mL}$$

και το σφάλμα της μεθόδου σε αυτήν την περίπτωση είναι $\pm 5\frac{CFU}{mL}$.

Για δείγμα που έχει επιστρωθεί σε 5 τριβλία (5×200 μL = 1000 μL = 1 mL), τότε αθροίζοντας τις αποικίες των τριβλίων προκύπτει άμεσα η τιμή τους σε CFU/mL, με σφάλμα $\pm 1 \frac{CFU}{mL}$.

7.2.4 Απομόνωση γενετικού υλικού βακτηρίων

Α) Για την *Escherichia coli*

Σύμφωνα με τυπικό πρωτόκολλο για την απομόνωση DNA από Gram-αρνητικά βακτήρια (όπως η *E.coli*), εφαρμόστηκε η εξής μέθοδος :

- Ανάδευση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τη δειγματοληψία (0, 15, 30 min κλπ.) με χρήση μηχανικού αναδευτήρα vortex
- Λήψη 1.5 mL από κάθε δείγμα και τοποθέτηση σε eppendorf
- Φυγοκέντρηση για 10 min στα 25000 RCF (επιτάχυνση) και θερμοκρασία 18℃ για καθίζηση των κυττάρων
- Αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού με πιπέτα
- Διάλυση του ιζήματος με πιπέτα προσθέτοντας 567 μL διαλύματος *TE*
- Προσθήκη 30 μL διαλύματος *SDS* συγκέντρωσης 10%
- Προσθήκη 3 μL διαλύματος ενζύμου πρωτεϊνάση-Κ συγκέντρωσης 20 mg/mL και ανάδευση με vortex
- Επώαση στους 37℃ για 1 ώρα. Η επώαση έγινε σε Block heater
- Προσθήκη 80 μL διαλύματος *CTAB* που περιέχει 0.7% NaCl
- Επώαση στους 65℃ για 10 λεπτά. Η επώαση έγινε σε υδατόλουτρο
- Προσθήκη 750 μL διαλύματος Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1
- Έντονη ανάδευση με χρήση vortex
- Φυγοκέντρηση στα 20000 RCF για 10 min στους 4℃
- Λήψη της επάνω υδατικής φάσης, κίτρινου χρώματος, και μεταφορά της σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 500 μL ισοπροπανόλης και ανάδευση με πιπέτα
- Παραμονή στους -20℃ κατά τη διάρκεια της νύχτας

- Φυγοκέντρηση στα 20000 RCF και στους 4℃ για 20 min
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και λήψη του ιζήματος (DNA)
- Καθαρισμός του γενετικού υλικού προσθέτοντας 500 μL αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και αναδεύοντας με πιπέτα
- Φυγοκέντρηση στα 20000 RCF και στους 4℃ για 10 min
- Απόρριψη της αιθανόλης και λήψη του ιζήματος
- Τοποθέτηση των eppendorf με ανοιχτά τα καπάκια στους 37℃ (Block heater) για 40 min για να εξατμιστεί η αιθανόλη
- Επαναδιάλυση του γενετικού υλικού σε 50 μL milliQ H_2O (διπλά απεσταγμένο νερό, ddH_2O)
- Φύλαξη του απομονωμένου γενετικού υλικού στους -20℃

B) Για τον *Enterococcus faecalis*

Σύμφωνα με τυπικό πρωτόκολλο για την απομόνωση DNA από Gram-θετικά βακτήρια (όπως ο *E.faecalis*), εφαρμόστηκε η εξής μέθοδος :

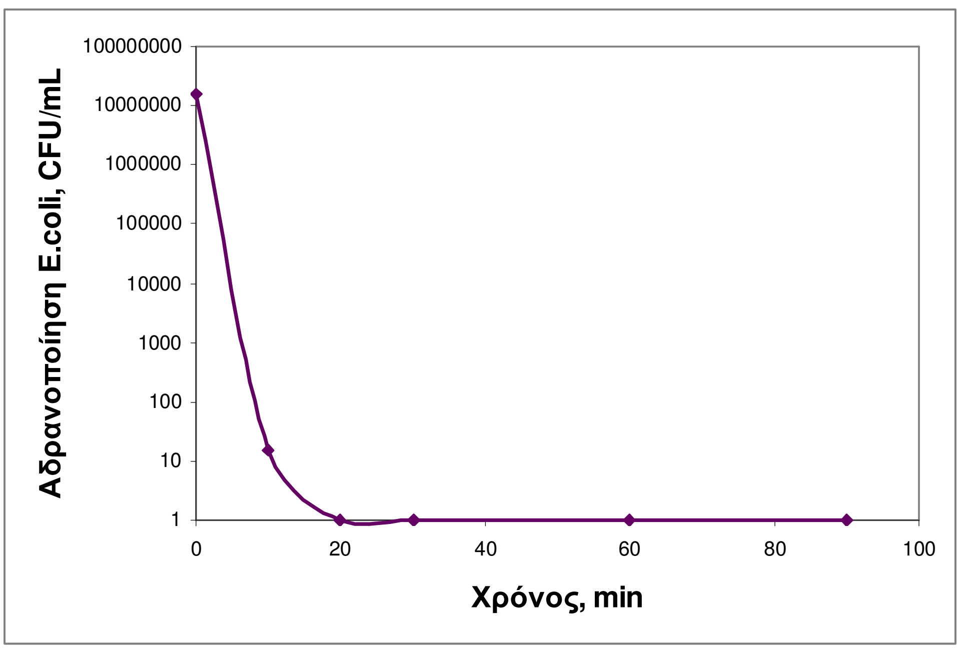
- Ανάδευση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν από τη δειγματοληψία (0, 15, 30 min κλπ.) με χρήση μηχανικού αναδευτήρα vortex
- Λήψη 1.5 mL από κάθε δείγμα και τοποθέτηση σε eppendorf
- Φυγοκέντρηση στα 14000 RCF για 5 min
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και λήψη του ιζήματος
- Προσθήκη 300 μL διαλύματος *lysozyme lysis buffer*
- Τοποθέτηση των eppendorf σε Block heater στους 37℃ για 1 ώρα
- Προσθήκη 200 μL διαλύματος *SDS lysis buffer*
- Μηχανική ανάδευση με vortex
- Τοποθέτηση των eppendorf σε Block heater στους 65℃ για 10 min
- Φυγοκέντρηση στα 14000 RCF για 5 min
- Λήψη της επάνω υδατικής φάσης και τοποθέτηση σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 500 μL διαλύματος Φαινόλη/Χλωροφόρμιο/Ισοαμυλική αλκοόλη 25:24:1 για αφαίρεση της πρωτεΐνης
- Ανάδευση με vortex για 5 sec
- Φύλαξη στους 4℃ για 5 min

- Φυγοκέντρηση στα 14000 RCF για 5 min στους 4℃
- Λήψη της επάνω υδατικής φάσης και τοποθέτησή της σε νέο eppendorf
- Προσθήκη 500 μL ισοπροπανόλης και ανάδευση με πιπέτα
- Φύλαξη στους -20℃ για 15 min
- Φυγοκέντρηση στα 14000 RCF για 10 min στους 4℃
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού και λήψη του ιζήματος
- Προσθήκη 500 μL αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και ανάδευση με πιπέτα
- Φυγοκέντρηση στα 14000 RCF για 10 min στους 4℃
- Απόρριψη του υπερκείμενου υγρού
- Τοποθέτηση των eppendorf με ανοιχτά τα καπάκια σε Block heater στους 37℃ για 30 min
- Διάλυση του γενετικού υλικού σε 50 μL milliQ H_2O (ddH_2O)
- Φύλαξη του απομονωμένου γενετικού υλικού στους -20℃

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 : ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

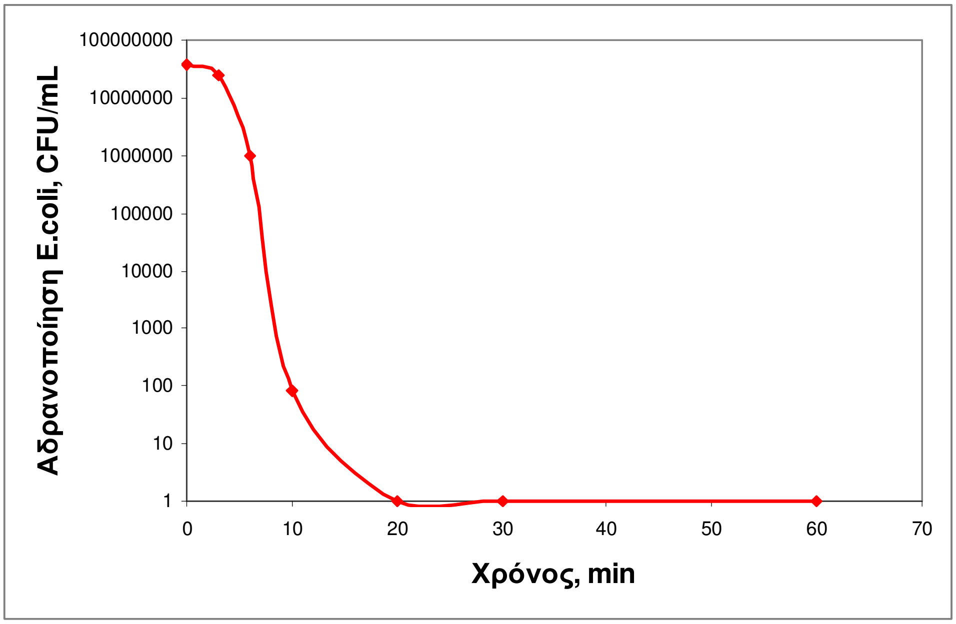
8.1 Πειράματα ηλεκτρόλυσης με άνοδο BDD/Si

Τα 2 πρώτα πειράματα της εργασίας πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα με ηλεκτρόδιο διαμαντιού εμπλουτισμένου με βόριο, BDD. Η ένταση ρεύματος διατηρήθηκε σταθερή στο 1 A και ως δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 2 L αποστειρωμένου απιονισμένου νερού επιμολυσμένου με *E.coli*, δηλαδή συνθετικό απόβλητο. Η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων ήταν και στις 2 περιπτώσεις της τάξης των 10^7 CFU/mL, αλλά στο 2^{ο} πείραμα η επιμόλυνση έγινε με σχεδόν διπλάσια ποσότητα *E.coli* σε σχέση με το 1^{ο} (8 μικροί κρίκοι την 1^{η} φορά και 16 τη 2^{η}). Με την καλλιεργητική μέθοδο, μετρώντας τις σχηματιζόμενες αποικίες, μελετήθηκε η αδρανοποίηση των *E.coli* και ελέγχθηκε η απόδοση της απολύμανσης. Στα παρακάτω διαγράμματα απεικονίζεται σε λογαριθμική κλίμακα η αδρανοποίηση των βακτηρίων αυτών, σε CFU/mL, συναρτήσει του χρόνου.



Εικόνα 8.1 Αδρανοποίηση *E.coli* κατά την ηλεκτρόλυση με άνοδο BDD, υπό σταθερή ένταση ρεύματος **1 A** και για αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^7 CFU/mL**. Το δείγμα ήταν αποστειρωμένο νερό επιμολυσμένο με βακτήρια και η ποσοτικοποίηση έγινε με την **καλλιεργητική μέθοδο**.

Παρατηρούμε ότι η ηλεκτρόλυση με χρήση ανόδου BDD λειτουργεί πολύ αποτελεσματικά, καθώς σε 20 min επιτυγχάνεται πλήρης απολύμανση, πράγμα που φαίνεται από το μηδενισμό της συγκέντρωσης των *E.coli* στον χρόνο αυτό (Εικόνα 8.1).

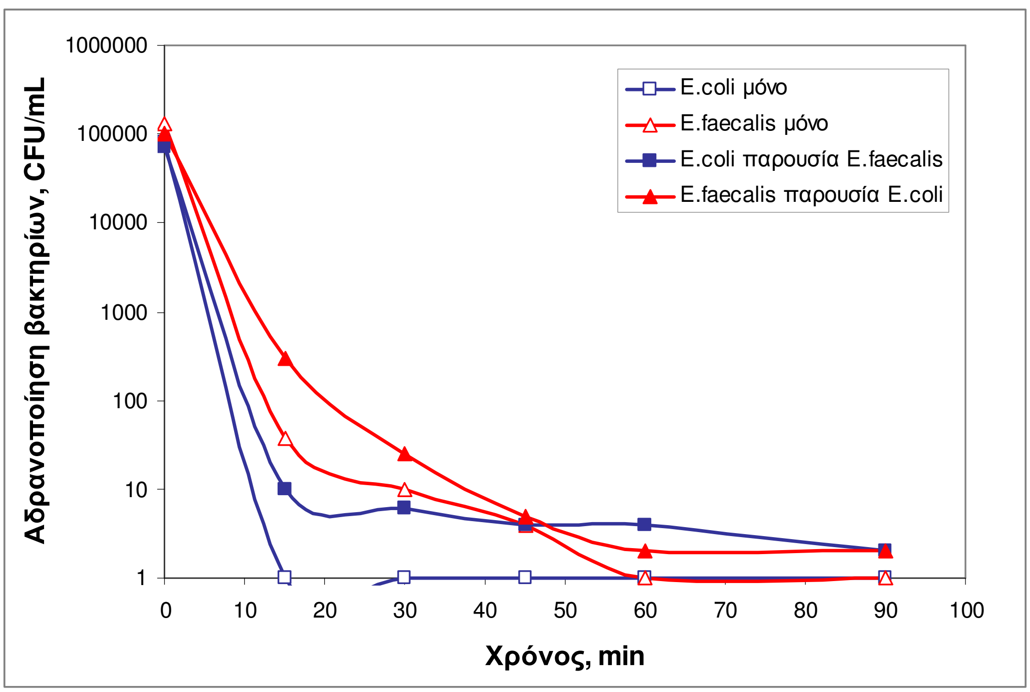


Εικόνα 8.2 Αδρανοποίηση *E.coli* κατά την ηλεκτρόλυση με άνοδο BDD, υπό σταθερή ένταση ρεύματος **1 A** και για αρχική συγκέντρωση βακτηρίων της τάξης **10^7 CFU/mL**. Το δείγμα ήταν αποστειρωμένο νερό επιμολυσμένο με βακτήρια και η ποσοτικοποίηση έγινε με την **καλλιεργητική μέθοδο**.

Η απόδοση της ηλεκτρόλυσης είναι και σε αυτήν την περίπτωση πολύ ικανοποιητική και παρόλο που η αρχική συγκέντρωση των *E.coli* είναι μεγαλύτερη σε σχέση με προηγουμένως, επιτυγχάνεται ξανά πλήρης απολύμανση σε 20 min (Εικόνα 8.2). Το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, καθώς το ηλεκτρόδιο BDD παρουσιάζει μεγάλη οξειδωτική ικανότητα και υψηλή αποδοτικότητα ρεύματος για την απολύμανση νερού.

8.2 Επίδραση του είδους του μικροοργανισμού στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για νερό)

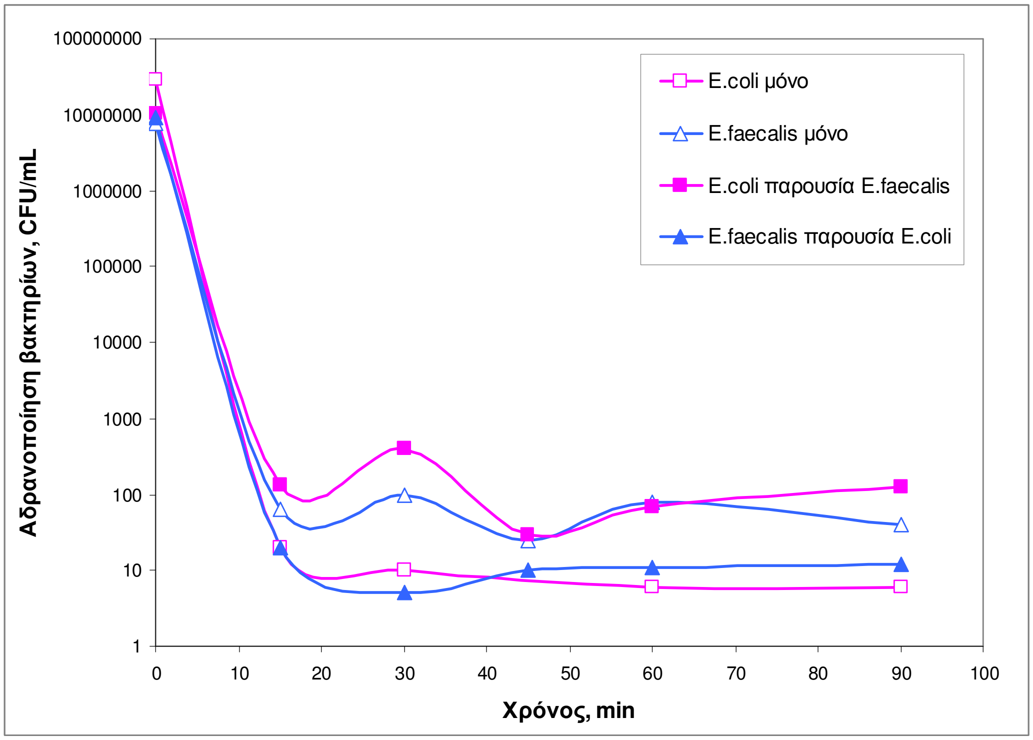
Τα πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας άνοδο από TiO_2 σε υπόστρωμα Ti και κάθοδο από Zr, υπό την επίδραση λάμπας η οποία προσομοιώνει την ηλιακή ακτινοβολία. Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν πειράματα στα οποία το χρησιμοποιούμενο δείγμα ήταν 60 mL αποστειρωμένο απιονισμένο νερό επιμολυσμένο με βακτήρια. Η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων ήταν 10^5 ή 10^7 CFU/mL και εφαρμόστηκε σταθερή τάση 2 V. Ανάλογα με το πείραμα, η επιμόλυνση του νερού έγινε είτε μόνο με *E.coli*, είτε μόνο με εντερόκοκκους ή ακόμα και με συνδυασμό των 2 ειδών βακτηρίων. Αυτή η διαφοροποίηση στη μικροβιολογική σύσταση του δείγματος νερού μελετήθηκε για να διερευνηθεί η επίδρασή της στην απόδοση της απολύμανσης. Τα διαγράμματα απεικονίζουν σε λογαριθμική κλίμακα την αδρανοποίηση των βακτηρίων σε σχέση με τον χρόνο. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την καλλιεργητική μέθοδο (CFU/mL) και με τη μέθοδο SYBR GREEN Real-time PCR (genome copies/mL).



Εικόνα 8.3 Αδρανοποίηση *E.coli* και *E.faecalis* με φωτοηλεκτροκατάλυση υπό σταθερή τάση **2 V** και αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^5 CFU/mL**. Ποσοτικοποίηση με την **καλλιεργητική μέθοδο** για δείγμα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με βακτήρια.

Παρατηρούμε ότι όταν στο δείγμα συνυπάρχουν οι 2 πληθυσμοί βακτηρίων, ο βαθμός αδρανοποίησης τόσο των *E.coli* όσο και των *E.faecalis* είναι μικρότερος σε σχέση την επεξεργασία κάθε είδους χωριστά (Εικόνα 8.3). Αυτό ίσως οφείλεται στην ανάπτυξη ανταγωνιστικών σχέσεων μεταξύ των 2 ειδών βακτηρίων και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους ή/και στον ανταγωνισμό για ενεργούς οξειδωτικούς παράγοντες (AOS, Active Oxygen Species) μεταξύ των βακτηρίων και των οργανικών παραπροϊόντων που απελευθερώνονται στο διάλυμα από τα ήδη αδρανοποιημένα βακτήρια (Baram et al., 2009). Επιπρόσθετα, παρουσία και των 2 μικροοργανισμών η απολύμανση γίνεται πιο αργά πιθανόν επειδή είναι μεγαλύτερη η πυκνότητα των βακτηρίων στο δείγμα σε σχέση με την περίπτωση που είναι μόνο του το κάθε είδος.

Επίσης, ο *E.faecalis* φαίνεται να είναι περισσότερο ανθεκτικός στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες σε σχέση με την *E.coli*, το οποίο δηλώνεται από το χαμηλότερο ρυθμό αδρανοποίησής του. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι εντερόκοκκοι (Gram-θετικά βακτήρια) διαθέτουν ένα παχύ κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης καθώς και μια εξωτερική μεμβράνη, τα οποία προσδίδουν σε αυτούς υψηλή πολυπλοκότητα και ικανότητα να διατηρούν τη βιωσιμότητά τους κατά τη φωτοηλεκτροκαταλυτική επεξεργασία (Cho et al., 2011).



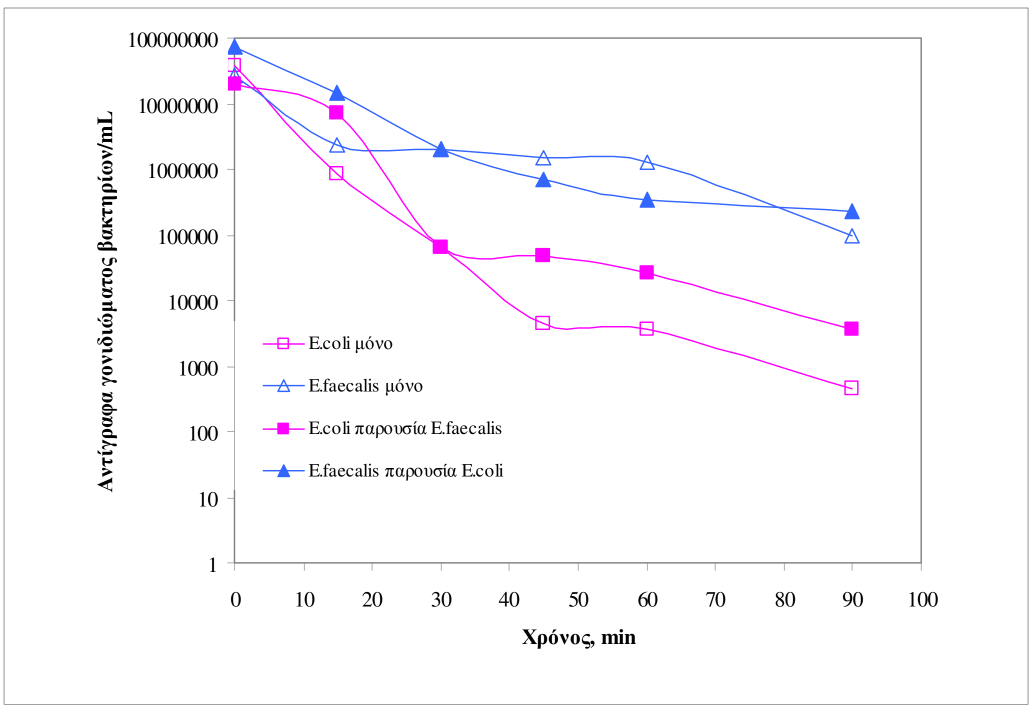
Εικόνα 8.4 Αδρανοποίηση *E.coli* και *E.faecalis* με φωτοηλεκτροκατάλυση υπό σταθερή τάση **2 V** και αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^7 CFU/mL**. Ποσοτικοποίηση με την **καλλιεργητική μέθοδο** για δείγμα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με βακτήρια.

Στο παραπάνω διάγραμμα, παρατηρούμε ξανά ότι επιτυγχάνεται καλύτερη αδρανοποίηση των *E.coli* όταν βρίσκονται μόνα τους στο δείγμα. Η συνύπαρξή τους με εντερόκοκκους επιδρά αρνητικά στην απολύμανση επειδή, όπως προαναφέρθηκε, αναπτύσσονται πιθανόν ανταγωνιστικές σχέσεις μεταξύ των 2 ειδών βακτηρίων οι οποίες είναι μάλλον ευνοϊκές για τα *E.coli*, παρέχοντάς τους ένα είδος προστασίας έναντι των συνθηκών απολύμανσης. Μία επιπλέον εξήγηση είναι ότι όταν τα 2 είδη βακτηρίων συνυπάρχουν στο δείγμα, αυξάνεται σημαντικά η πυκνότητα μικροοργανισμών του δείγματος, καθιστώντας δυσκολότερη την αδρανοποίησή τους. Στο διάγραμμα, η αδρανοποίηση των εντερόκοκκων παρουσία *E.coli* φαίνεται να είναι ταχύτερη σε σχέση με όταν βρίσκονται μόνοι τους, ίσως επειδή ο ανταγωνισμός λειτουργεί δυσμενώς για τους εντερόκοκκους στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Εξετάζοντας τα προφίλ αδρανοποίησης των 2 μικροοργανισμών χωριστά (*E.coli* μόνο και *E.faecalis* μόνο, Εικόνα 8.4), η *E.coli* φαίνεται να είναι λιγότερο ανθεκτική σε σχέση με τον *E.faecalis*, λόγω του ότι η απλούστερη κυτταρική δομή της την καθιστά πιο ευάλωτη.

Επίσης, παρατηρούμε ότι δεν επιτυγχάνεται πλήρης αδρανοποίηση στα 90 min διάρκειας κάθε πειράματος. Η συγκέντρωση μειώνεται μέχρι ένα ορισμένο όριο πέρα από το οποίο δεν παρατηρείται περαιτέρω αδρανοποίηση, πιθανόν εξαιτίας της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης των βακτηρίων που δεν είναι εφικτό να μηδενιστεί. Αξίζει να σημειωθεί ότι η αρχική συγκέντρωση ακολουθεί γενικά πτωτική τάση και οι όποιες αυξομειώσεις οφείλονται πιθανόν σε σφάλμα της καλλιεργητικής μεθόδου.

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μέθοδο Real time PCR φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

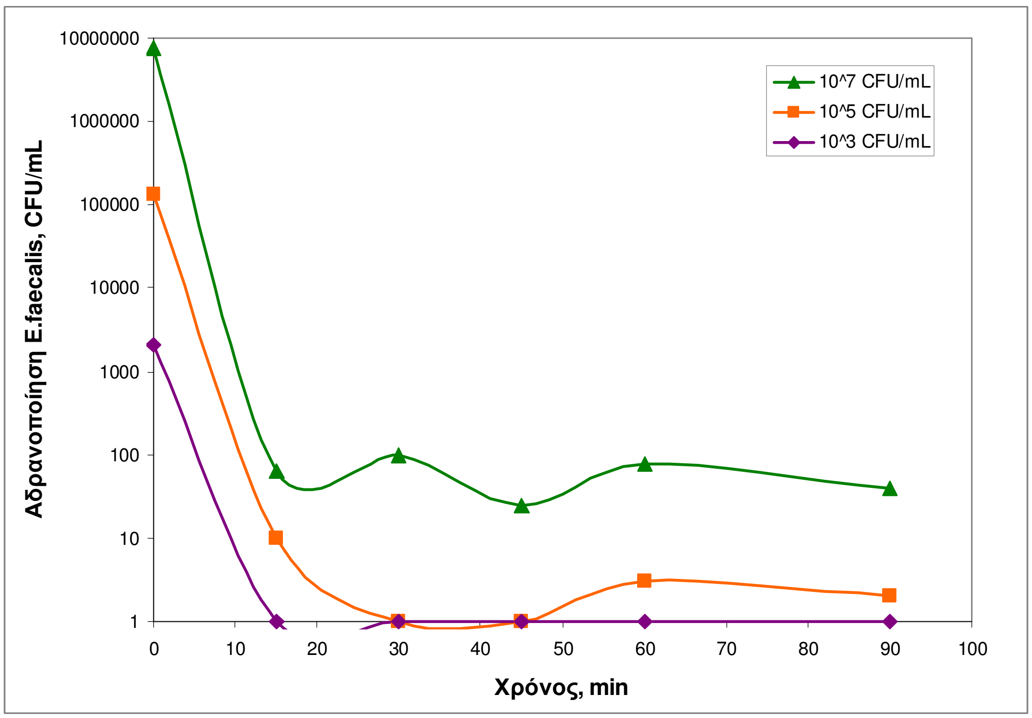


Εικόνα 8.5 Αντίγραφα γονιδιώματος *E.coli* και *E.faecalis* για δείγμα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με βακτήρια. Ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο **Real time PCR** για πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης υπό σταθερή τάση **2 V** και αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^7 CFU/mL**.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα των 2 μεθόδων (Εικόνες 8.4 και 8.5) παρατηρούμε ότι η μέθοδος Real time PCR δίνει διαφορετικά αποτελέσματα σε σχέση με τη συμβατική καλλιεργητική μέθοδο. Συγκεκριμένα, η μέθοδος Real time PCR υποδηλώνει ότι απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος επεξεργασίας για να επιτευχθεί μια ικανοποιητική μείωση των βακτηρίων. Με τη μέθοδο αυτή καταγράφηκε σημαντικός αριθμός γονιδιωματικών αντιγράφων/mL ακόμα και μετά από 90 min φωτοηλεκτροκαταλυτικής επεξεργασίας, σε αντίθεση με την καλλιεργητική μέθοδο που για την ίδια διάρκεια πειράματος έδειξε ικανοποιητική αδρανοποίηση. Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στην κατάσταση VBNC (βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα) στην οποία εισέρχονται τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της φωτοηλεκτροκατάλυσης ή ακόμα και σε στελέχη που έχουν υποστεί φθορά ή βρίσκονται σε λανθάνουσα κατάσταση και δεν μπορούν να επανέλθουν/ανιχνευτούν μέσω της καλλιεργητικής μεθόδου. Παρόλα αυτά, δημιουργεί προβληματισμό το κατά πόσον η μέθοδος PCR μπορεί να συσχετίσει τα παραγόμενα αντίγραφα βακτηριακού DNA με βιώσιμα *E.coli* και *E.faecalis*. Ωστόσο, επειδή ο χρόνος ημιζωής του DNA που απελευθερώνεται στο περιβάλλον θεωρείται πολύ σύντομος λόγω της παρουσίας πολυάριθμων νουκλεασών, θα μπορούσαμε να καταλήξουμε στο ότι το DNA που ανιχνεύεται ανήκει σε μη-καλλιεργήσιμα και όχι κατεστραμμένα κύτταρα (Lleo et al., 2005). Ο *E.faecalis* εμφανίζεται και πάλι περισσότερο ανθεκτικός από την *E.coli*. Επίσης, επιτυγχάνεται καλύτερη αδρανοποίηση στην περίπτωση που κάθε είδος βακτηρίου βρίσκεται μόνο του στο δείγμα. Κατά τη μελέτη, ενώ η φωτοηλεκτροκατάλυση παρουσιάζεται ικανή να αδρανοποιεί μέχρι ένα σημείο τους χρησιμοποιούμενους μικροοργανισμούς-δείκτες, τα εναπομείναντα αντίγραφα γονιδιώματος στο δείγμα δημιουργούν ανησυχία σχετικά με την καταλληλότητα της μεθόδου για την απολύμανση σύνθετων δειγμάτων, που περιέχουν διάφορους βακτηριακούς πληθυσμούς.

8.3 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των εντερόκοκκων στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για νερό)

Για να μελετηθεί η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των μικροοργανισμών στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων στα οποία η αρχική συγκέντρωση των *E.faecalis* ήταν, ανάλογα με το πείραμα, 10^3, 10^5 ή 10^7 CFU/mL. Εφαρμόστηκε σταθερή τάση 2 V και ως δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 60 mL αποστειρωμένου νερού το οποίο επιμολύναμε με εντερόκοκκους. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την καλλιεργητική μέθοδο και τη Real time PCR παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα, σε λογαριθμική κλίμακα σε σχέση σε σχέση με τον χρόνο.

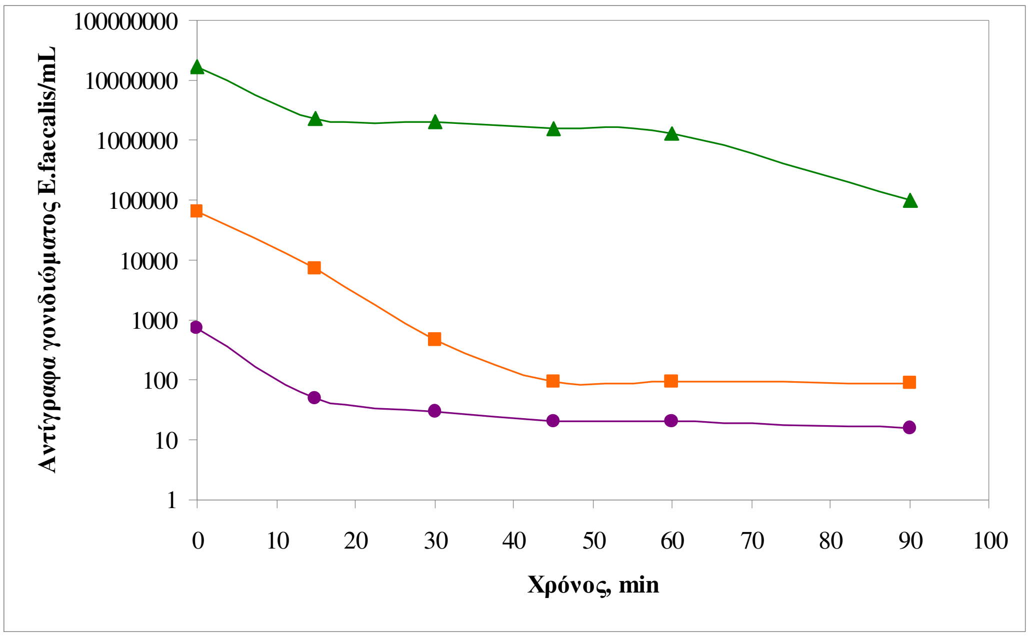


Εικόνα 8.6 Αδρανοποίηση *E.faecalis* με φωτοηλεκτροκατάλυση υπό σταθερή τάση **2 V** για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις του βακτηρίου. Ποσοτικοποίηση με την **καλλιεργητική μέθοδο** για δείγμα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με *E.faecalis*.

Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση των *E.faecalis*, ο βαθμός αδρανοποίησής τους μειώνεται. Για αρχική συγκέντρωση 10^3 και 10^5 CFU/mL επιτυγχάνεται πλήρης αδρανοποίηση σε χρόνο 15 και 30 min, αντίστοιχα (Εικόνα

8.6). Ωστόσο, για τη μέγιστη αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU/mL η αδρανοποίηση λαμβάνει χώρα μέχρι ένα όριο, 10^2 CFU/mL, που δηλώνει μια συνολική μείωση της αρχικής συγκέντρωσης κατά 5 τάξεις μεγέθους. Αυτή η υψηλή αρχική συγκέντρωση δε μπορεί να μηδενιστεί, καθώς στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες υπάρχει ένα όριο μέγιστης αδρανοποίησης και καταστροφής του χρησιμοποιούμενου βακτηριακού στελέχους.

Το αντίστοιχο διάγραμμα της Real time PCR είναι το ακόλουθο.

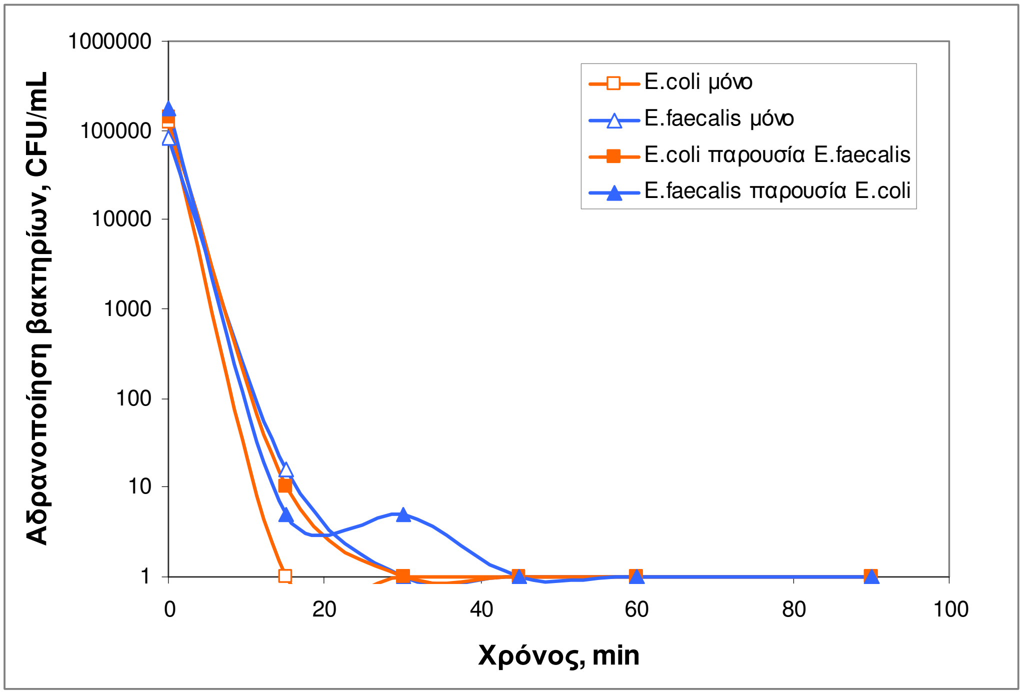


Εικόνα 8.7 Αντίγραφα γονιδιώματος *E.faecalis* σε δείγμα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με αυτά τα βακτήρια και για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις τους. Ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο **Real time PCR** για πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης υπό σταθερή τάση **2 V**.

Συγκρίνοντας τα 2 διαγράμματα (Εικόνες 8.6 και 8.7), τα αποτελέσματα της Real time PCR συμφωνούν με αυτά της καλλιεργητικής μεθόδου όσον αφορά την επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης στο χρόνο απολύμανσης, αφού όσο αυξάνεται η αρχική συγκέντρωση των εντερόκοκκων η αδρανοποίηση λαμβάνει χώρα πιο αργά. Τα αποτελέσματα, όμως, των 2 μεθόδων διαφοροποιούνται όσον αφορά τον χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί σημαντική βακτηριακή μείωση. Από τη μέθοδο PCR προέκυψε ότι για αρχική ποσότητα 10^3 και 10^5 αντίγραφα γονιδιώματος/mL, δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω αδρανοποίηση από τα 45 min επεξεργασίας και μετά, σε αντίθεση με την καλλιεργητική μέθοδο που για τις ίδιες αρχικές συγκεντρώσεις έδειξε ότι 30 min επαρκούν για πλήρη αδρανοποίηση. Αυτό όμως που είναι σημαντικό από την άποψη της δημόσιας υγείας είναι ότι σύμφωνα με τη Real time PCR, ακόμα και μετά από 60 min επεξεργασίας, εξακολουθούν να υπάρχουν αντίγραφα γονιδιώματος στο δείγμα, προκαλώντας προβληματισμό σχετικά με την καταλληλότητα της φωτοηλεκτροκατάλυσης ως μεθόδου απολύμανσης. Οι συνθήκες στρες στις οποίες υποβάλλονται τα βακτήρια κατά τη διάρκεια της φωτοηλεκτροκατάλυσης τα ωθούν στην κατάσταση όπου είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα, VBNC, καθιστώντας την καλλιεργητική μέθοδο ανεπαρκή για την εκτίμηση του βαθμού αδρανοποίησης. Η εφαρμογή της Real time PCR, χάρη στην ευαισθησία της κι εφόσον σχεδιάζεται σωστά, συμβάλλει στην εξαγωγή περισσότερο αξιόπιστων αποτελεσμάτων και στην παρούσα μελέτη παρέχει έναν συμπληρωματικό έλεγχο της απολύμανσης με φωτοηλεκτροκατάλυση.

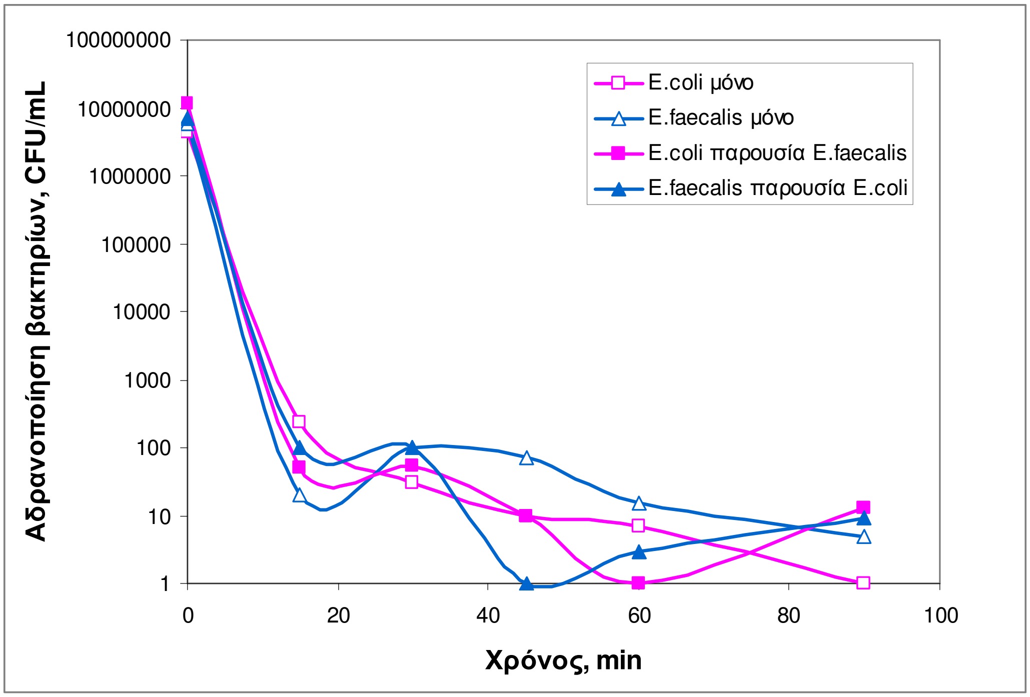
8.4 Επίδραση του είδους του μικροοργανισμού στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για πραγματικό λύμα)

Σε μια τελική σειρά πειραμάτων έγινε προσπάθεια να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με φωτοηλεκτροκατάλυση σε πραγματικές συνθήκες, δηλαδή χρησιμοποιώντας δείγματα με πολύπλοκη σύνθεση τα οποία περιέχουν διάφορους βακτηριακούς πληθυσμούς. Για να γίνει αυτό, συλλέχθηκε πραγματικό λύμα από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας της ΕΕΛ Χανίων, λίγο πριν την είσοδό του στο στάδιο της χλωρίωσης. Αφού αποστειρώθηκε έτσι ώστε να ρυθμιστεί η περιεκτικότητά του σε βακτήρια, ακολούθησε η επιμόλυνσή του είτε μόνο με *E.coli*, είτε μόνο με *E.faecalis* ή ακόμα και με συνδυασμό των 2 ειδών βακτηρίων. Ο όγκος αποβλήτου που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα ήταν 60 mL. Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε σταθερή τάση 5 V. Η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων ήταν 10^5 ή 10^7 CFU/mL. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την καλλιεργητική μέθοδο και τη Real time PCR παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα όπου απεικονίζεται σε λογαριθμική κλίμακα η αδρανοποίηση των βακτηρίων σε σχέση με τον χρόνο.



Εικόνα 8.8 Αδρανοποίηση *E.coli* και *E.faecalis* σε πραγματικό λύμα με χρήση φωτοηλεκτροκατάλυσης υπό σταθερή τάση **5 V** και αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^5 CFU/mL**. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την **καλλιεργητική μέθοδο**.

Παρατηρούμε ότι και για πραγματικό λύμα η αδρανοποίηση είναι ταχύτερη στην περίπτωση που κάθε είδος βακτηρίου βρίσκεται μόνο του στο δείγμα. Επίσης, παρατηρώντας τα προφίλ αδρανοποίησης των 2 μικροοργανισμών χωριστά (*E.coli* μόνο ή *E.faecalis* μόνο, Εικόνα 8.8) η *E.coli* εμφανίζεται πάλι λιγότερο ανθεκτική σε σχέση με τον *E.faecalis*, ο οποίος απαιτεί περισσότερο χρόνο επεξεργασίας για την αδρανοποίησή του. Αξίζει να σημειωθεί ότι επειδή η αρχική συγκέντρωση βακτηρίων 10^5 CFU/mL είναι σχετικά χαμηλή, επιτυγχάνεται πλήρης αδρανοποίηση σε κάθε ένα από τα 4 πειράματα. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση μελετήθηκε καθώς ορισμένοι μικροοργανισμοί περιέχονται με συγκέντρωση αυτής της τάξης σε λύματα που έχουν υποστεί δευτεροβάθμια επεξεργασία.



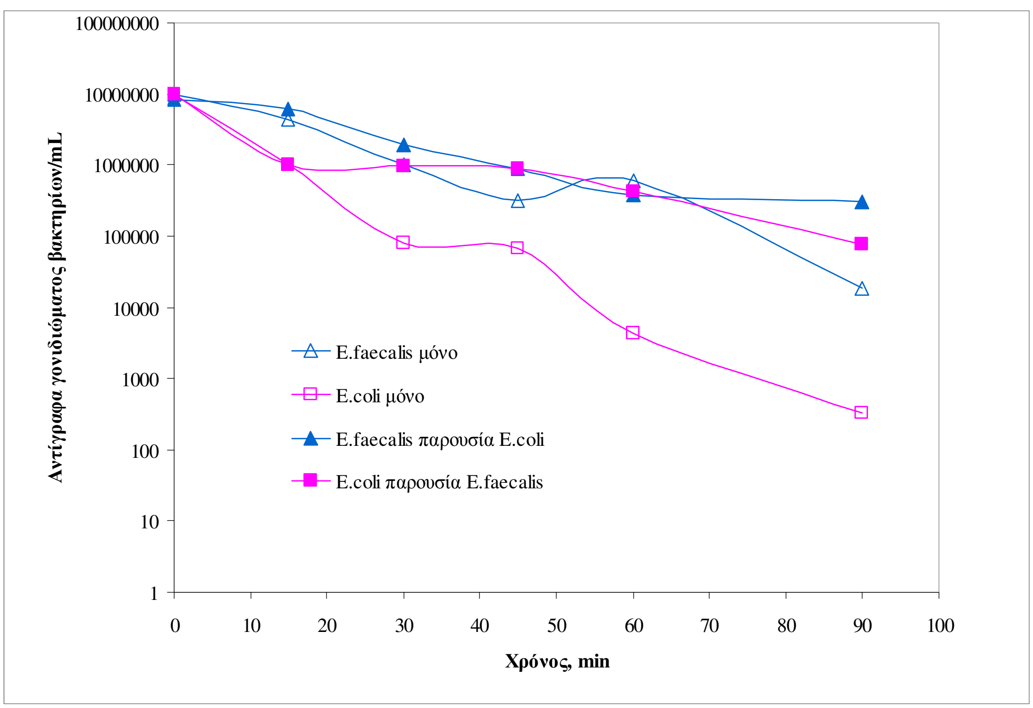
Εικόνα 8.9 Αδρανοποίηση *E.coli* και *E.faecalis* σε πραγματικό λύμα με χρήση φωτοηλεκτροκατάλυσης υπό σταθερή τάση **5 V** και αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^7 CFU/mL**. Η ποσοτικοποίηση έγινε με την **καλλιεργητική μέθοδο**.

Στο διάγραμμα παρατηρούμε ότι κατά τη συνδυαστική επιμόλυνση του λύματος με *E.coli* και *E.faecalis*, ο βαθμός αδρανοποίησης κάθε στελέχους καταλήγει τελικά να είναι μικρότερος σε σχέση με την επεξεργασία κάθε είδους βακτηρίου χωριστά. Αυτός ο χαμηλότερος βαθμός αδρανοποίησης μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην αυξημένη αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων, λόγω της οποίας η πυκνότητα των μικροοργανισμών του συνδυαστικού δείγματος είναι πολύ υψηλή, καθιστώντας δυσκολότερη την απολύμανση. Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι κατά την επεξεργασία δειγμάτων πραγματικού αποβλήτου, η βιωσιμότητα των βακτηρίων και το κατά πόσον αυτά είναι καλλιεργήσιμα επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία άλλων ανταγωνιστικών μικροοργανισμών και την αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Δείγματα που περιέχουν πολλαπλούς βακτηριακούς πληθυσμούς παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα έναντι συμβατικών μεθόδων απολύμανσης κι απαιτούν μεγαλύτερους χρόνους επεξεργασίας ή πιο ακραίες συνθήκες (Hong et al., 2008).

Τα προφίλ αδρανοποίησης των βακτηρίων όταν βρίσκονται μόνα τους στο δείγμα, δηλώνουν ότι ο *E.faecalis* είναι περισσότερο ανθεκτικός σε σχέση με την *E.coli*, πράγμα αναμενόμενο καθώς οι εντερόκοκκοι διαθέτουν πολύπλοκη κυτταρική δομή και απαιτούν μεγαλύτερη διάρκεια επεξεργασίας για την αδρανοποίησή τους στον ίδιο βαθμό με την *E.coli*. Ο σημαντικά μικρότερος χρόνος επεξεργασίας που απαιτείται για την αδρανοποίηση Gram-αρνητικών βακτηρίων όπως η *E.coli* οφείλεται πιθανόν στη μεγαλύτερη ευαισθησία τους προς τις ρίζες υδροξυλίου κοντά στην επιφάνεια της φωτοανόδου (Cho et al., 2005).

Επίσης, σε κανένα πείραμα δεν επιτυγχάνεται πλήρης αδρανοποίηση, εκτός μόνο στην περίπτωση που τα *E.coli* βρίσκονται μόνα τους στο δείγμα. Ο μηδενισμός της συγκέντρωσης στα 45 και 60 min των συνδυαστικών πειραμάτων οφείλεται πιθανόν σε σφάλμα της καλλιεργητικής μεθόδου. Η υψηλή αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU/mL εμποδίζει την πλήρη αδρανοποίηση στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στο ακόλουθο διάγραμμα.



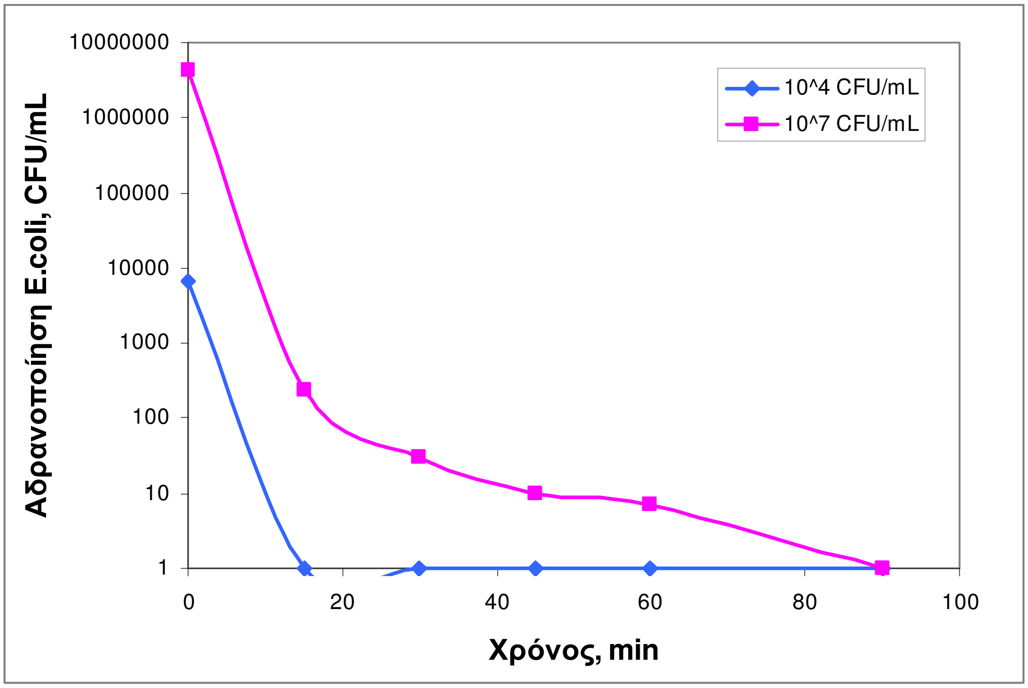
Εικόνα 8.10 Αντίγραφα γονιδιώματος *E.coli* και *E.faecalis* σε πραγματικό λύμα. Ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο **Real time PCR** για πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης υπό σταθερή τάση **5 V** και αρχική συγκέντρωση βακτηρίων **10^7 CFU/mL**.

Συγκρίνοντας τα διαγράμματα των 2 μεθόδων (Εικόνες 8.9 και 8.10), παρατηρούμε ότι τα αποτελέσματα της Real time PCR συμφωνούν σε γενικές γραμμές με αυτά της καλλιεργητικής μεθόδου. Ωστόσο, η PCR παρέχει μια πιο ξεκάθαρη εικόνα για την απόδοση της απολύμανσης, καθώς στην καλλιεργητική μέθοδο υπεισέρχονται συνήθως περισσότερα σφάλματα. Στην εικόνα 8.10, η αδρανοποίηση κάθε μικροοργανισμού όταν βρίσκεται μόνος του στο δείγμα, κάνει ολοφάνερη τη μεγαλύτερη ανθεκτικότητα των *E.faecalis* σε σχέση με τα *E.coli.*, που έχει ήδη εξηγηθεί.

Όσον αφορά το DNA και την ακεραιότητά του κατά τη φωτοηλεκτροκαταλυτική επεξεργασία πραγματικού λύματος, τα κυτταρικά συσσωματώματα που σχηματίζονται από μεγάλους βακτηριακούς πληθυσμούς μπορεί να παρέχουν φυσική προστασία στα εμπεριεχόμενα εσωτερικά κύτταρα, περιορίζοντας έτσι την έκταση της βλάβης του DNA. Αυτός ο μηχανισμός οδηγεί αναπόφευκτα στην ανίχνευση μεγάλου αριθμού αντιγράφων γονιδιώματος μέσω της PCR, ακόμα και για μεγάλη διάρκεια επεξεργασίας. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, ακόμα και μετά από 90 min πειράματος, εντοπίστηκε σημαντικός αριθμός αντιγράφων γονιδιώματος/mL που δεν μπορεί να αγνοηθεί, τονίζοντας τη σημασία της βακτηριακής σύστασης των λυμάτων στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης.

8.5 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των *Escherichia coli* στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης (για πραγματικό λύμα)

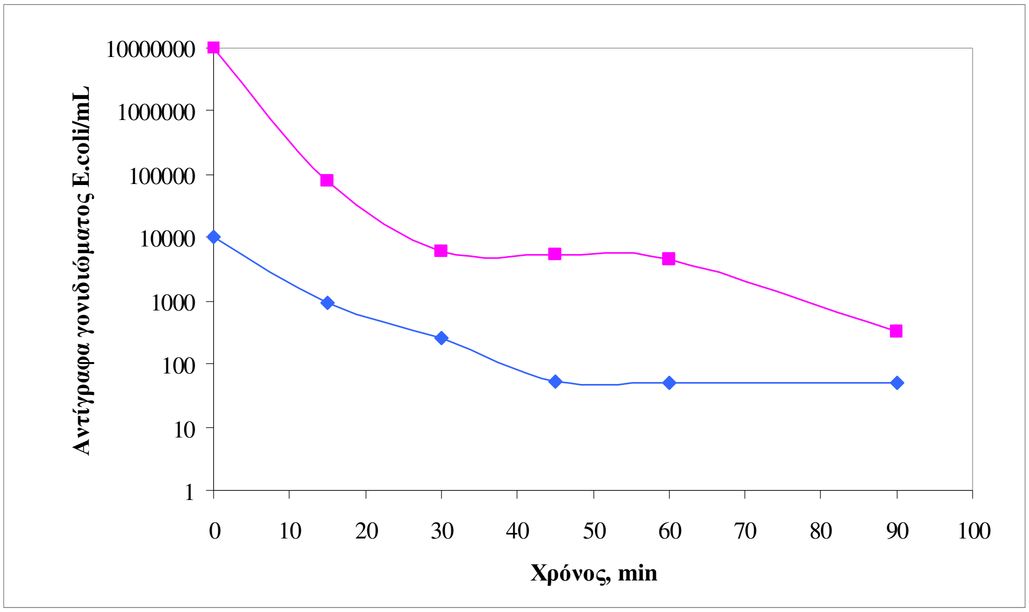
Τα παρακάτω διαγράμματα αφορούν πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης στα οποία χρησιμοποιήθηκε πραγματικό λύμα προερχόμενο από δευτεροβάθμια επεξεργασία, το οποίο μετά την αποστείρωσή του επιμολύνθηκε με 10^4 CFU/mL ή με 10^7 CFU/mL *E.coli*. Μελετήθηκε το πώς επηρεάζεται η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης από την αρχική συγκέντρωση των *E.coli*. Εφαρμόστηκε σταθερή τάση 5 V και αυτή η σχετικά υψηλή τιμή επιλέχθηκε δεδομένου ότι το αυξημένο δυναμικό της ανόδου ενισχύει τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία. Η ποσότητα δείγματος ήταν 60 mL.



Εικόνα 8.11 Αδρανοποίηση *E.coli* σε πραγματικό λύμα με φωτοηλεκτροκατάλυση υπό σταθερή τάση **5 V** για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις του βακτηρίου. Ποσοτικοποίηση με την **καλλιεργητική μέθοδο**.

Παρατηρούμε ότι για αρχική συγκέντρωση *E.coli* 10^4 CFU/mL επιτυγχάνεται πλήρης αδρανοποίηση σε 15 min, ενώ για αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU/mL ο απαιτούμενος χρόνος αυξάνεται στα 90 min (Εικόνα 8.11).

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα της PCR φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα.

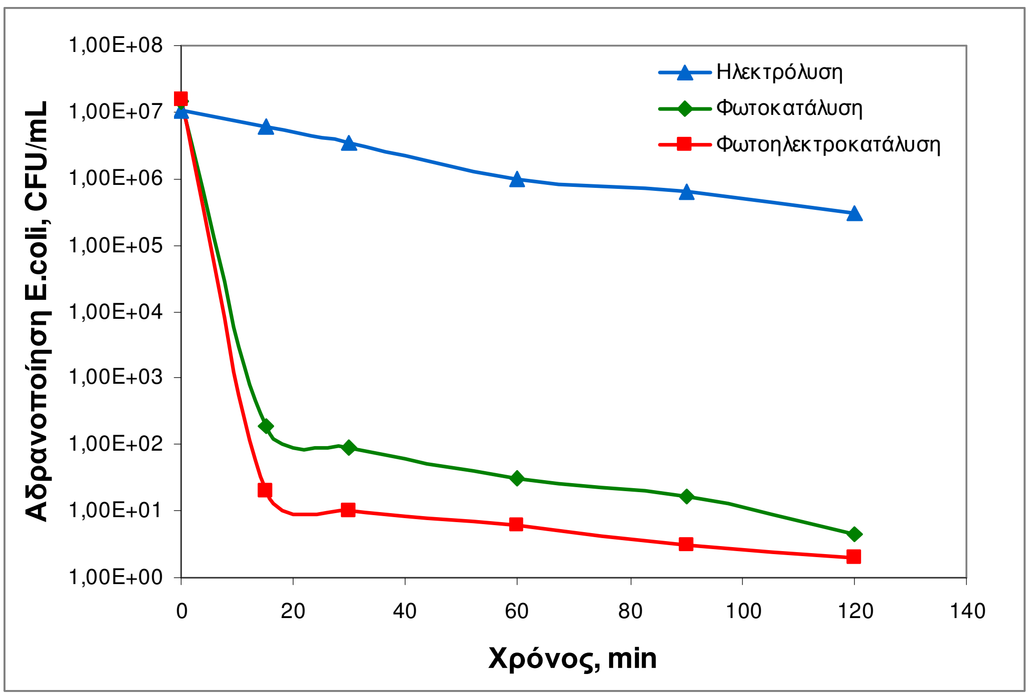


Εικόνα 8.12 Αντίγραφα γονιδιώματος *E.coli* σε πραγματικό λύμα για διάφορες αρχικές συγκεντρώσεις του βακτηρίου. Ποσοτικοποίηση με τη μέθοδο **Real time PCR** για πειράματα φωτοηλεκτροκατάλυσης υπό σταθερή τάση **5 V**.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των 2 μεθόδων (Εικόνες 8.11 και 8.12) προέκυψε μια σημαντική αντίθεση μεταξύ τους. Η μοριακή μέθοδος Real time PCR έδειξε ότι ακόμα και μετά από 90 min φωτοηλεκτροκαταλυτικής επεξεργασίας υπό σταθερή τάση 5 V, τα αντίγραφα γονιδιώματος του μικροοργανισμού-δείκτη μειώθηκαν μόνο κατά 4 τάξεις μεγέθους το πολύ, ενώ με την καλλιεργητική μέθοδο δεν εντοπίστηκαν καθόλου αποικίες *E.coli* μετά το πέρας του πειράματος. Εκτός από παράγοντες όπως το όριο ανίχνευσης της καλλιεργητικής μεθόδου ή τα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα κύτταρα (VBNC), μία ακόμα σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η παρουσία αιωρούμενων σωματιδίων στο λύμα. Το σωματιδιακό αυτό υλικό ενισχύει την αντίσταση των μικροοργανισμών απέναντι στην απολύμανση, καθώς μπορεί να παρέχει ένα είδος φυσικής προστασίας στα βακτηριακά κύτταρα και να προασπίζει την ακεραιότητα του περιεχόμενου DNA. Έτσι, περιορίζεται η πρόκληση βλάβης στο DNA με αποτέλεσμα να ανιχνεύεται από την PCR μεγάλος αριθμός αντιγράφων ακόμα και για μεγάλη διάρκεια επεξεργασίας. Επομένως, η καλλιεργητική μέθοδος συνιστάται να συνδιάζεται με τη μοριακή μέθοδο PCR, για να έχουμε μια πιο αξιόπιστη και σφαιρική αξιολόγηση της εκάστοτε απολυμαντικής μεθόδου.

8.6 Σύγκριση μεθόδων απολύμανσης για την αδρανοποίηση *Escherichia coli* σε νερό

Στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκαν 3 διαφορετικές μέθοδοι απολύμανσης, ηλεκτρόλυση, φωτοκατάλυση και φωτοηλεκτροκατάλυση, και μελετήθηκε η μείωση της συγκέντρωσης βακτηρίων σε δείγματα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με βακτήρια. Το ακόλουθο διάγραμμα απεικονίζει την αδρανοποίηση του βακτηρίου *E.coli* που περιέχεται μόνο του στο δείγμα σε αρχική συγκέντρωση 10^7 CFU/mL. Στα πειράματα ηλεκτρόλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης η άνοδος ήταν TiO_2 και εφαρμόστηκε σταθερή τάση 2 V. Η ποσοτικοποίηση του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με την καλλιεργητική μέθοδο και παρέχει μια ξεκάθαρη εικόνα για την απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης και των άλλων 2 μεθόδων.



Εικόνα 8.13 Αδρανοποίηση *E.coli* με ηλεκτρόλυση (2 V), φωτοκατάλυση και φωτοηλεκτροκατάλυση (2 V). Ποσοτικοποίηση με την **καλλιεργητική μέθοδο** για δείγμα αποστειρωμένου νερού επιμολυσμένου με **10^7 CFU/mL** *E.coli*.

Από το διάγραμμα προκύπτει ότι η φωτοηλεκτροκατάλυση στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες λειτουργεί πιο αποτελεσματικά σε σχέση με τη φωτοκατάλυση. Η καλύτερη απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης φαίνεται ήδη στα πρώτα 15 min διάρκειας του πειράματος, όπου ο βαθμός αδρανοποίησης είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τον αντίστοιχο των άλλων 2 μεθόδων. Ωστόσο, με την εφαρμογή τόσο φωτοηλεκτροκατάλυσης όσο και φωτοκατάλυσης επιτυγχάνεται σχεδόν πλήρης αδρανοποίηση μετά από 120 min επεξεργασίας. Όσον αφορά την ηλεκτρόλυση, παρουσιάζεται εντελώς ανεπαρκής και είναι φανερό ότι η μέθοδος αυτή κρίνεται ακατάλληλη για την απολύμανση νερού στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, καθώς ο βαθμός αδρανοποίησης που επιτυγχάνεται με αυτήν είναι σχεδόν αμελητέος. Η εξαιρετικά χαμηλή απόδοση της ηλεκτρόλυσης μπορεί να οφείλεται στην μικρή επιφάνεια του ηλεκτροδίου που είναι υπεύθυνη για τη χαμηλή πυκνότητα ρεύματος στο δείγμα. Με τη φωτοηλεκτροκατάλυση επιτυγχάνεται ταχύτερη απολύμανση σε σχέση με τη φωτοκατάλυση, καθώς πέρα από τη χρήση λάμπας που προσομοιώνει την ηλιακή ακτινοβολία, η ταυτόχρονη εφαρμογή τάσης πιθανόν μειώνει το ρυθμό επανασύνδεσης των φωτοπαραγόμενων φορέων, δηλαδή των οπών και ηλεκτρονίων. Με άλλα λόγια, το ηλεκτρικό πεδίο ωθεί τα ηλεκτρόνια προς την κάθοδο, αφήνοντας έτσι τις οπές να αντιδράσουν στην άνοδο με μόρια H_2O ή/και OH^- για να παραχθούν ρίζες υδροξυλίου στις οποίες βασίζεται η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα πειράματα ηλεκτρόλυσης με άνοδο BDD και άνοδο TiO_2, φωτοκατάλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία μπορούν να εξαχθούν τα παρακάτω συμπεράσματα :

1. Η ηλεκτρόλυση με άνοδο BDD λειτουργεί πολύ αποτελεσματικά στην απολύμανση νερού, το οποίο ήταν αναμενόμενο λόγω της μεγάλης οξειδωτικής ικανότητας του ηλεκτροδίου BDD που είναι ιδανική για την αδρανοποίηση βακτηρίων.

2. Αντίθετα, η ηλεκτρόλυση με άνοδο TiO_2 παρουσιάζεται εντελώς ανεπαρκής και κρίνεται ακατάλληλη για την απολύμανση νερού στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες, καθώς ο βαθμός αδρανοποίησης που επιτυγχάνεται με αυτήν είναι σχεδόν αμελητέος.

3. Ο *E.faecalis* είναι πιο ανθεκτικός σε σχέση με την *E.coli* κατά τη φωτοηλεκτροκατάλυση, λόγω της πιο σύνθετης κυτταρικής δομής του. Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται άμεσα από τη σύνθεση και το μικροβιακό περιεχόμενο του δείγματος. Σε σύνθετα δείγματα, που περιέχουν διάφορους βακτηριακούς πληθυσμούς, τα βακτήρια εξασφαλίζουν μεγαλύτερη φυσική προστασία με αποτέλεσμα το χαμηλότερο βαθμό αδρανοποίησής τους.

4. Η αρχική συγκέντρωση του εκάστοτε βακτηρίου παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση της φωτοηλεκτροκατάλυσης, καθώς όσο αυξάνεται απαιτείται μεγαλύτερος χρόνος επεξεργασίας για να επιτευχθεί καλύτερη ή πλήρης αδρανοποίηση.

5. Η φωτοηλεκτροκατάλυση είναι πιο αποτελεσματική από τη φωτοκαταλύση, πιθανόν επειδή ευνοεί την παραγωγή περισσότερων ριζών υδροξυλίου, οι οποίες αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο για την αδρανοποίηση των βακτηρίων.

6. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη συμβατική καλλιεργητική μέθοδο ήρθαν σε αντίθεση με εκείνα της Real time PCR, όσον αφορά τον απαιτούμενο χρόνο για πλήρη αδρανοποίηση των βακτηρίων. Με βάση τα δεδομένα της PCR, απαιτείται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για να έχουμε πλήρη καταστροφή των βακτηρίων σε σύγκριση με τη διάρκεια που εκτιμήθηκε από την καλλιεργητική μέθοδο. Οι αντίξοες συνθήκες στις οποίες υποβάλλονται τα βακτήρια κατά τη φωτοηλεκτροκατάλυση ενδέχεται να τα ωθήσουν σε μια κατάσταση όπου είναι βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα, VBNC, κι έτσι θα μπορούσε να εξηγηθεί η διαφορά μεταξύ των 2 μεθόδων ποσοτικοποίησης.

7. Στην καλλιεργητική μέθοδο είναι εύκολο να υπεισέλθουν πειραματικά σφάλματα τα οποία ευθύνονται για τυχόν μη αναμενόμενα αποτελέσματα από την καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία.

8. Η Real time PCR, που είναι μοριακή μέθοδος, παρέχει μια πιο ασφαλή εκτίμηση για την απόδοση της απολύμανσης, χάρη στην ευαισθησία της. Ωστόσο, επειδή επικρατεί προβληματισμός σχετικά με το κατά πόσον μπορεί να ανιχνεύσει DNA που ανήκει μόνο σε βιώσιμα κύτταρα, τα πειράματα πρέπει να σχεδιάζονται σωστά (μέγεθος αλληλουχίας-στόχου, αλληλουχία εκκινητών, συνθήκες κύκλου PCR). Έτσι, τα αποτελέσματα θα είναι περισσότερο αξιόπιστα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

Ανδρεαδάκης Α., Μαμάης Δ., Γαβαλάκη Ε. (2005), *Διαχείριση υγρών αποβλήτων με αποκεντρωμένα συστήματα επεξεργασίας*, Καρδίτσα.

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

Βερβερίδης Φ. (2003), *Εργαστηριακές ασκήσεις Βιοτεχνολογίας φυτών*, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.

Γεωργίου-Μπούφα Π. (2005), *Ποιότητα νερού ανθρώπινης κατανάλωσης – Σχετική νομοθεσία*, Αθήνα.

Δεληγιώργης Α. (2007), *Ηλεκτροχημική επεξεργασία αποβλήτου κατεργασίας βρώσιμης ελιάς σε ηλεκτρόδιο αδάμαντα εμπλουτισμένου με βόριο*, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

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.

Ιωαννίδη Α. (2010), *Ανίχνευση και ταυτοποίηση μέσω μεθοδολογίας PCR και Real time PCR του φυτοπαθογόνου βακτηρίου Clavibacter michiganensis spp. Sepedonicus*, Διπλωματική εργασία, ΤΕΙ Κρήτης, Ηράκλειο.

Λαζανάκη Β. (2010), *Η χρήση της Real Time PCR (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.

Μαντζαβίνος Δ. (2003), *Επεξεργασία υγρών αποβλήτων*, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Διαλέξεων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Μάρακας Χ. (2006), *Απολύμανση επεξεργασμένων αστικών λυμάτων με χρήση εξελιγμένων διεργασιών οξείδωσης και χλωρίωσης με συνδυασμό και σύγκριση των μεθόδων*, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Μήτρακας Μ. (2001), *Ποιοτικά χαρακτηριστικά και επεξεργασία νερού*, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Metcalf and Eddy (2007), *Μηχανική υγρών αποβλήτων, επεξεργασία και επαναχρησιμοποίηση*, Τόμος Β, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Νταρακάς Ε. (2009), *Βασικές παράμετροι ελέγχου ποιότητας νερού και λυμάτων*, Θεσσαλονίκη.

Πούλιος Ι. (2007), *Φωτοηλεκτροχημεία των Ημιαγωγών - Βασικές αρχές και Εφαρμογές*, Θεσσαλονίκη.

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 Νέσσωνος για το πόσιμο νερό*, Διπλωματική εργασία, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα.

Ξένη βιβλιογραφία

Baram N., Starosvetsky D., Starosvetsky J., Epshtein M., Armon R., Ein-Eli Y. (2009), Electrochim Acta 54: 3381.

Bartosch S., Fite A., Macfarlane G.T., McMurdo M.E.T. (2004), *Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota*. Appl Environ Microbiol 70: 3575–3581.

Berg J., Tymoczko J., Stryer L. (2002), *Biochemistry, 5th edition*, Sections 27.2 and 27.2.4, W.H. Freeman and Company, New York.

Bustin S.A**.** (2000), *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*, J Mol Endocrinol 25.

Carp O., Huisman C.L., Reller A. (2004), *Photoinduced reactivity of titanium dioxide*, Progress in Solid State Chemistry 32, 33-177.

Chen Y.C., Higgins M.J., Maas N.A., Murthy S.N. (2006), *DNA extraction and Escherichia coli quantification of anaerobically digested biosolids using the competitive touchdown PCR method*. Water Res 40: 3037–3044.

Cho M., Chung H.M., Choi W.Y., Yoon J.Y. (2005), *Different inactivation behaviors of MS-2 phage and Escherichia coli in TiO_2 photocatalytic disinfection*. Appl Environ Microbiol 71: 270–275.

Cho M., Cates E.L., Kim J.H. (2011), Water Res 45: 2104.

Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. (2001), *An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression*, Methods 25.

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.

Houghton S. and Cockerill F. (2006), *Real Time PCR : Overview and applications*, Surgery, Vol. 139, No. 1, p.p. 1-5.

Hong S.H., Jeong J., Shim S., Kang H., Kwon H., Ahn K.H., Yoon J. (2008), *Effect of electric currents on bacterial detachment and inactivation*. Biotechnol Bioeng 100: 379–386.

Hunt M. (2006), *Real Time PCR Tutorial*, University of South Carolina.

Jüttner K., Galla U., Schmieder H. (2000), *Electrochemical approaches to environmental problems in the process industry*, Electrochimica Akta 45, 2575-2594.

Lambert RJ.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, Vol. 88, p.p. 907-913.

Lleo M.M., Bonato B., Tafi M.C., Signoretto C., Pruzzo C., Canepari P. (2005), Lett Appl Microbiol 40: 289.

Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001), *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2-DDC T Method*, Vol. 25, p.p. 402-408., Elsevier, Methods,USA.

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

Panizza M., Carisola G. (2005), *Application of diamond electrodes to electrochemical processes*, Electrochimica Akta 51, 191-199.

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

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 Shammas N.K., Vol. 4, p.p. 317-365, The Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Pfaffl M.W. (2002), *Chapter 3: A-Z of quantitative PCR*, p.p. 1-23, S.A. Bustin Publications, International University Line, La Jolla, CA.

Rincon A.-G., Pulgarin C. (2005), *Use of coaxial photocatalytic reactor (CAPHORE) in the TiO_2 photo-assisted treatment of mixed E.coli and Bacillus sp. and bacterial community present in wastewater*, Science Direct, Catalysis today.

Schoenen D. (2002), *Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens with drinking water: possibilities and limitations*, Water Research, Vol. 36, p.p. 3784-3888.

Stratagene (2006), *Introduction to Quantitative PCR*, p.p. 3-8, 9-11, 23-26. Stratagene, La Jolla, CA.

Van Guilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. (2008), *Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis*, BioTechniques.

Vierstraete A. (1999), *Principles of PCR*, University of Ghent.

Wong M.L. and Medrano J.F. (2005), *Real Time PCR for m-RNA quantitation*, Vol. 39, p.p. 75-85, BioTechniques, Hillsborough.

<u>**Σελίδες στο διαδίκτυο**</u>

http://biology.kenyon.edu/courses/biol09/tetrahymena/serialdilution3.htm

http://library.tee.gr/digital/m2093/m2093_andreadakis.pdf

http://library.tee.gr/digital/m2077/m2077_georgiou.pdf

http://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Enterococcus_faecalis

http://www.bbc.co.uk/news/health-13639241

http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/bacteria/Enterococcus_faecalis.html

http://www.laboratorytalk.com/news/lbm/lbm147.html

http://www.microbeworld.org/index.php?option=com_jlibrary&view=article&id=7018

http://www.watermicro.gr/wp-content/uploads/sklivaniotis1.pdf

http://www.watersave.gr/site/images/stories/PDFs/04ekp.pdf

http://www.steadyhealth.com/articles/Escherichia_coli_infection__Symptoms___Treatment_a146.html

http://users.auth.gr/~dtsiplak/files/Download/%CE%A0%CE%B5%CF%81%CE%B9%CE%B2%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%BF%CE%BD%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%20%CE%97%CE%BB%CE%B5%CE%BA%CF%84%CF%81%CE%BF%CF%87%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CE%AF%CE%B1-II.pdf

http://el.wikipedia.org/wiki/%CE%91%CF%80%CE%BF%CE%B9%CE%BA%CE%AF%CE%B1_%28%CE%BC%CE%B9%CE%BA%CF%81%CE%BF%CE%B2%CE%B9%CE%BF%CE%BB%CE%BF%CE%B3%CE%AF%CE%B1%29

Εικόνα εξωφύλλου: Αποικίες *E.coli* σε τριβλίο

http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/C79DF52317778F70C12574C700383D89?opendocument&LG=EN&