



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ
ΚΑΙ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΜΕ ΗΛΙΑΚΗ
ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗ**

ΕΚΠΟΝΗΣΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ: ΦΑΝΟΥΡΓΙΑΚΗΣ ΣΩΤΗΡΗΣ

A.M: 2003050014

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΜΑΝΤΖΑΒΙΝΟΣ ΔΙΟΝΥΣΙΟΣ

Χανιά, 2012

*Η παρούσα διπλωματική είναι αφιερωμένη
στην οικογένεια μου.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα προπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης. Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών και Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων και το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Διονύσιο Μαντζαβίνο για την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής και για τις πολύτιμες συμβουλές και τη βοήθεια του σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της.

Επίσης θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή κ. Θεοχάρη Τσούτσο και Λέκτορα κ. Δανάη Βενιέρη για τη συμμετοχή τους, αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές τους κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διπλωματικής.

Θερμά επίσης θέλω να ευχαριστήσω τους Διδάκτορες κ.κ. Θάλεια Χατζησυμεών και Ζαχαρία Φροντιστή για την καθημερινή τους βοήθεια, συνεργασία αλλά και για την υπομονή τους, τόσο για τη διεκπεραίωση του εργαστηριακού μέρους όσο και για τη συγγραφή της διπλωματικής διατριβής.

Η βοήθεια της Βιολόγου κ. Ιωσηφίνας Γουνάκη ήταν επίσης σημαντική και την ευχαριστώ.

Τέλος θα ήθελα πολύ να ευχαριστήσω όσους ήταν δίπλα μου τα χρόνια των σπουδών μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Το H ₂ O και η σημασία της άριστης ποιότητάς του	7
1.2. Απολύμανση	8
2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	10
2.1 Ενδοκρινικοί Διαταράκτες	10
2.1.1 Ορισμός ενδοκρινικών διαταρακών	10
2.1.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ	11
2.1.3 Προέλευση και τύχη ενδοκρινικών διαταρακών.....	13
2.1.4 Επιπτώσεις της παρουσίας ενδοκρινικών διαταρακών στο περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο.....	15
2.1.5 Συνθετική ορμόνη 17α-Αιθινυλοιστραδιόλη – ΕΕ2	16
2.1.6 Εφαρμογές φωτοκατάλυσης στην απομάκρυνση ενδοκρινικών διαταρακών.	18
2.2 ΟΡΙΣΜΟΣ-ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ.....	19
2.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ.....	19
2.2.2 Μηχανισμοί Απολύμανσης	19
2.3 Φωτοκατάλυση	20
2.3.1 Η επίδραση πέντε φυσικών παραμέτρων στην φωτο – ενεργότητα	23
2.3.2 Ενίσχυση φωτοκαταλυτών	26
2.4 Βακτήρια.....	28
2.5 ΜΕΘΟΔΟΣ PCR	33
2.5.1 Αρχή Λειτουργίας της Αντίδρασης της PCR	33
2.5.2 Στάδια κύκλου PCR.....	33
2.5.3 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ.....	34
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	36
3.1 ΥΛΙΚΑ	36
3.1.1 ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ TiO ₂	36

3.1.2 ΕΕ2	37
3.1.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	37
Εικόνα 3.1.3.1 Τριβλίο με Hicrome Agar για θρεπτικό υλικό	37
3.1.4 ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΑΠΟΒΛΗΤΟ	37
3.1.5 ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ <i>E. COLI</i>	37
3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ	38
3.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	39
3.3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ <i>E. coli</i>	40
3.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)	41
4. Συζήτηση – Αποτελέσματα	43
4.1. Απόδοση ηλιακής φωτοκατάλυσης	43
4.2. Επίδραση του τύπου του καταλύτη	44
4.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη	45
4.4. Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των <i>E. Coli</i>	48
4.5. Μετρήσεις real-time PCR	49
4.6. Μετρήσεις οιστρογονικότητας	50
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	52
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της ηλιακής φωτοκαταλυτικής διαδικασίας παρουσία καταλύτη TiO_2 , υπό μορφή αιωρήματος, για την απομάκρυνση της ορμόνης 17 α - αιθινυλοιστραδιόλης (EE2) και των βακτηρίων *Escherichia coli* από νερό και λύματα που προέρχονται από την έξοδο της Δευτεροβάθμιας Επεξεργασίας της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων του Δ. Χανίων.

Ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών *E. coli* και στο ποσοστό αδρανοποίησης αυτών κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας του αποβλήτου. Επίσης, μετρήθηκε και η μεταβολή της συγκέντρωσης της EE2 με το χρόνο χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) .

Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη ως προς την απόδοση της φωτοκαταλυτικής διεργασίας. Επιπρόσθετα, μελετήθηκαν και άλλες παράμετροι που συνήθως επηρεάζουν την απόδοση της φωτοκαταλυτικής οξείδωσης. Αυτές ήταν το είδος του καταλύτη, η αρχική συγκέντρωση των βακτηρίων, η επίδραση της υδατικής μήτρας και ο χρόνος της επεξεργασίας.

Η EE2 είναι συνθετική ορμόνη που χρησιμοποιείται στα αντισυλληπτικά χάπια και προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία αλλά και σε άλλους οργανισμούς του περιβάλλοντος.

Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη βοήθεια της μεθόδου μοριακής βιολογίας, της real-time PCR, ώστε να διερευνηθεί κατά πόσο το DNA των βακτηρίων υπέστη αλλοιώσεις ή μεταλλάξεις από την αρχική του κατάσταση.

Τέλος, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις της οιστρογονικότητας των δειγμάτων πριν, κατά τη διάρκεια και μετά το πέρας της ηλιακής φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το H₂O και η σημασία της άριστης ποιότητάς του

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

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

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

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

μικροοργανισμούς. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενοι δείκτες είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή , η *Escherichia coli*, οι *Enterococci* sp..

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

1.2. Απολύμανση

Η διαχείριση και επεξεργασία των αποβλήτων αποτελεί μια από τις σημαντικότερες διαδικασίες προστασίας του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας. Όμως, κατά την διάθεση των επεξεργασμένων λυμάτων στους υδάτινους αποδέκτες έχει παρατηρηθεί η ύπαρξη ουσιών λεγόμενες ως ενδοκρινικοί διαταράκτες οι οποίες προκαλούν ορμονικές διαταραχές στον άνθρωπο αλλά και σε άλλους οργανισμούς. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες (EDCs) είναι ουσίες που δύσκολα διασπώνται κατά την επεξεργασία τους στον βιολογικό καθαρισμό λόγω των πολύπλοκων μορίων τους με αποτέλεσμα να εισβάλλουν στο ενδοκρινικό σύστημα ενός οργανισμού προκαλώντας δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία αυτού. Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες παρατηρούνται επίσης σε εκροές βιομηχανικών λυμάτων, σε γεωργικές απορροές, στα διασταλλάγματα Χ.Υ.Τ.Α. και γενικότερα στη φύση λόγω της ατμοσφαιρικής κατακρήνη και απορροής. Οι EDCs είναι μια πιθανή αιτία προβλημάτων αναπαραγωγής στην υγεία των ανδρών με τη μορφή μειωμένης ποιότητας και ποσότητας του σπέρματος, με αυξήσεις του καρκίνου των όρχεων και του προστάτη, με μη κατερχόμενους όρχεις, με δυσμορφία του πέους και στα θηλυκά με καρκίνο του μαστού. Στην παρούσα εργασία διερευνάται η διάσπαση της 17α- αιθινυλοιστραδιόλης (EE2) η οποία ανήκει στους ενδοκρινικούς διαταράκτες. Η ουσία αυτή χρησιμοποιείται στα αντισυλληπτικά χάπια και σε θεραπείες αντικατάστασης οιστρογόνων, οι οποίες εφαρμόζονται σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση. Έχουν βρεθεί υψηλά ποσοστά της EE2 σε νερά ποταμών, λιμνών αλλά και στη

θάλασσα και μελέτες έδειξαν ότι επηρεάζεται αρνητικά η υγεία των θηλαστικών (πουλιά, ψάρια) και του ανθρώπου. Οι επιπτώσεις που έχουν καταγραφεί είναι μείωση της ευθραυστότητας των αυγών σε πτηνά ψάρια και χελώνες, θηλυκοποίηση των αρσενικών ψαριών, προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα των ψαριών, ερπετών ,πτηνών και θηλαστικών καθώς και αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα θαλάσσιων θηλαστικών. Σε κάποιες περιπτώσεις ,οι παραπάνω επιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν και μείωση στους διάφορους πληθυσμούς. Η ανάγκη αντιμετώπισης αυτών των επιπτώσεων έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη των Εξελιγμένων Διεργασιών Οξειδωσης όπως η ετερογενής φωτοκατάλυση με την οποία θα διερευνηθεί η διάσπαση της ΕΕ2 στην παρούσα εργασία.

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

2. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Ενδοκρινικοί Διαταράκτες

2.1.1 Ορισμός ενδοκρινικών διαταρακτών

Έχουν προταθεί πολλοί ορισμοί για ενδοκρινικούς διαταράκτες οι οποίοι έχουν γίνει αντικείμενο επισταμένων ερευνών. Ο όρος “ενδοκρινικός διαταράκτης” διατυπώθηκε για να συμπεριλάβει οποιοσδήποτε δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία που είναι επακόλουθο μεταβολών κάθε τμήματος του ενδοκρινικού συστήματος. Η Διεύθυνση Περιβαλλοντικής Προστασίας των Η.Π.Α. (U.S. Environmental Protection Agency, EPA, 1997) προτείνει έναν λεπτομερή ορισμό ενδοκρινικού διαταράκτη: Ενδοκρινικός διαταράκτης, είναι ένας εξωγενής παράγοντας που παρεμβαίνει με τη σύνθεση, απέκκριση, μεταφορά, πρόσδεση, κίνηση ή εξάλειψη των φυσικών ορμονών στο σώμα και είναι υπεύθυνος για τη διατήρηση της αναπαραγωγής, ανάπτυξης και / ή συμπεριφοράς. Ο ορισμός της EPA εκφράζει την ευρεία ποικιλία των μηχανισμών που πρόκειται απευθείας να εμπλακούν στη διαταραχή του ενδοκρινικού συστήματος. Κύριες χημικές ουσίες μπορούν να παρεμβάλλονται στο ενδοκρινικό σύστημα (endocrine system) για την παραγωγή μιας ανεπιθύμητης αντίδρασης ή διαταραχής η, οποία ενδέχεται να επηρεάσει την υγεία, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή μιας ευρείας ποικιλίας οργανισμών. Αυτές οι ουσίες καλούνται ουσίες που προκαλούν ορμονικές διαταραχές (Endocrine Disrupting Chemicals - EDCs). Οι EDCs μπορούν να εκδηλώσουν οιστρογονικότητα (estrogenic activity) ή ανδρογονικότητα (androgenic activity). Ως οιστρογόνα (estrogens), ορίζονται "οι ορμόνες οι οποίες παράγονται από τις ωοθήκες και είναι υπεύθυνες για την εμφάνιση και ανάπτυξη των χαρακτηριστικών του θηλυκού φύλου" (Birkett and Lester, 2003). Βρίσκονται σε αντισυλληπτικά χάπια και σε θεραπείες αντικατάστασης οιστρογόνων, οι οποίες εφαρμόζονται σε γυναίκες που βρίσκονται στην εμμηνόπαυση. Όπως όλες οι στεροειδείς ορμόνες, έτσι και τα οιστρογόνα γρήγορα διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και μέσα στο κύτταρο αλληλεπιδρούν με τους οιστρογόνους υποδοχείς. Οι τύποι των οιστρογόνων που υπάρχουν είναι τα στεροειδή και τα μη-στεροειδή:

Στεροειδή

Τα τρία κύρια φυσικά οιστρογόνα που υπάρχουν στις γυναίκες είναι η οιστρόνη (E1), η οιστραδιόλη (E2) και η οιστριόλη (E3). Η οιστραδιόλη είναι η επικρατούσα μορφή οιστρογόνου στις μη εγκυμονούσες γυναίκες, η οιστρόνη παράγεται κατά την διάρκεια της εμμηνόπαυσης και η οιστριόλη είναι το κύριο οιστρογόνο κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης.

Μη-Στεροειδή

Ένα εύρος συνθετικών και φυσικών ουσιών που έχουν ανιχνευθεί ότι παρουσιάζουν οιστρογονική δραστηριότητα παρουσιάζονται παρακάτω:

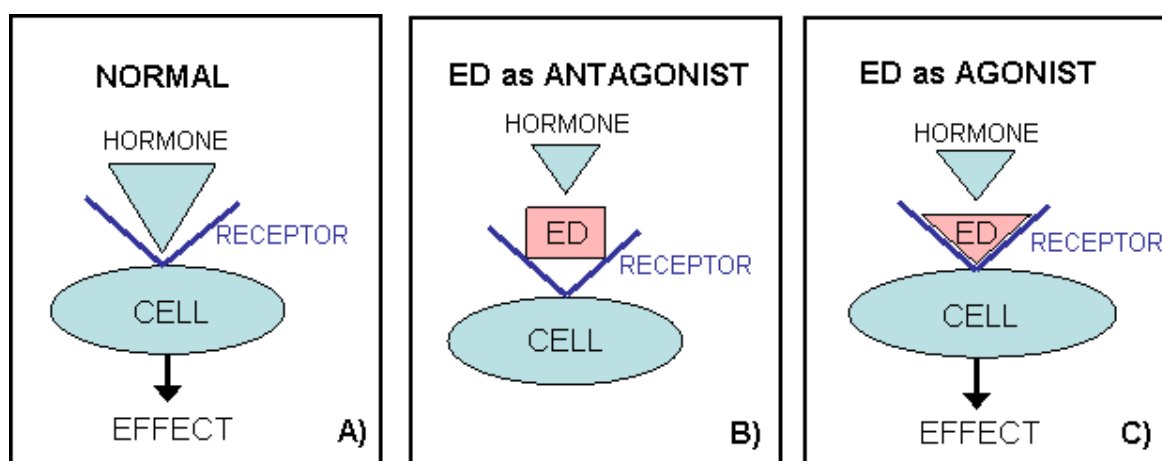
- Συνθετικές ουσίες αυτού του είδους είναι γνωστές ως ξενοοιστρογόνα.
- Φυτικά προϊόντα με οιστρογονική δραστηριότητα ονομάζονται φυτοοιστρογόνα.
- Προϊόντα που προέρχονται από μύκητες και είναι γνωστά ως μυκοοιστρογόνα.
- Ανεπιθύμητα οιστρογόνα προερχόμενα από θηλαστικά δεν είναι απαραίτητα στεροειδή (Δραγανίγος, 2009).

Ως ανδρογόνα (androgens), ορίζονται "οι ορμόνες που παράγονται στους όρχεις και τα επινεφρίδια και συντελούν στη διαμόρφωση των δευτερευόντων γενετικών χαρακτηριστικών του αρσενικού φύλου " (Birkett and Lester, 2003).

2.1.2 ΕΝΔΟΚΡΙΝΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Στους πολυκύτταρους οργανισμούς είναι απαραίτητο να ρυθμιστεί και να ολοκληρωθεί η λειτουργικότητα των κυττάρων. Τα δύο συστήματα που καλούνται να το κάνουν αυτό είναι το νευρικό σύστημα και το ενδοκρινικό σύστημα. Το ενδοκρινικό σύστημα είναι σημαντικό τόσο στα φυτά όσο και τους οργανισμούς διότι αυτό είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη, αναπαραγωγή, συντήρηση και τον μεταβολισμό (U.S. Environmental Protection Agency, 1997). Σε διαφορετικές περιοχές του σώματος αρκετοί αδένες που αποτελούν το ενδοκρινικό σύστημα παράγουν ορμόνες με διαφορετικές λειτουργίες (Birkett and Lester, 2003). Οι ενδοκρινείς αδένες αποτελούνται από υποθαλάμιους, βλεννογόνους, θυρεοειδείς, παραθυρεοειδείς, επινεφρίδιους αδένες, νευραδένες και όρχεις. Στη συνέχεια αυτές οι ορμόνες μεταφέρονται δια μέσου της κυκλοφορίας του αίματος στα όργανα στόχους όπου χρησιμοποιούνται για να υλοποιήσουν μια φυσική αντίδραση. Αυτά τα κύτταρα στόχοι αποτελούνται από μια "θέση πρόσδεσης" (binding site) (δέκτης) και μια "θέση επηρεαστή" (effector site) (Birkett and Lester, 2003). Όταν οι ορμόνες προσκολληθούν στο δέκτη η

“θέση επηρεαστή” εναλλάσσεται και διαδοχικά παράγει την επιθυμητή αντίδραση (Σχήμα 1.2α). Κάποια μόρια “ελεύθερων” ορμονών δε θα φθάσουν ποτέ στους δέκτες και είναι αδρανοποιημένα πριν την απέκκριση, κυρίως από το ήπαρ και τους νεφρούς, σε μια διαδικασία που αποκαλείται “μεταβολική απέκκριση”. Αυτή η διαδικασία διαφέρει ανάλογα με το είδος των ορμονών. Η διάρκεια ζωής μιας ορμόνης στο σώμα ποικίλει καθώς κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως αρκετές ώρες. Κατά συνέπεια εάν ο ρυθμός μεταβολικής απέκκρισης είναι χαμηλός η ορμόνη παραμένει στο σώμα περισσότερο, άρα αυξάνεται η διαθεσιμότητα της για αλληλεπίδραση με τους δέκτες καταλήγοντας σε περισσότερες αντιδράσεις. Όπως αναφέρθηκε τα μόρια των ορμονών έχουν γενικά μικρή διάρκεια ζωής στο σώμα εξαιτίας των μηχανισμών μεταβολικής απέκκρισης. Παρόλα αυτά, όταν οι EDCs είναι παρούσες αυτοί οι μηχανισμοί μπορεί να μην εφαρμοστούν οδηγώντας έτσι σε βιοσυσσώρευση αυτών των χημικών ουσιών στο σώμα.



Σχήμα 2.1. Διαδικασίες ορμονικών διαταραχών: (α) Φυσική αντίδραση, (β) Ανταγωνιστική επίδραση, (γ) Αγωνιστική επίδραση (Sumpter, 1998).

Οι EDCs μπορεί τελικώς να αλληλεπιδράσουν με το ενδοκρινικό σύστημα (τέτοια αλληλεπίδραση τείνει να επηρεάσει τα συστήματα σταθερών σταδίων σεξουαλικής ανάπτυξης, π.χ. τα ανήλικα άτομα να είναι πιο ευαίσθητα). Οι θέσεις του δέκτη έχουν μεταξύ τους πολύ μεγάλη συγγένεια για μια συγκεκριμένη ορμόνη κι έτσι απαιτούνται μόνο πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις για να επιτευχθεί αντίδραση. Συνεπώς οι ορμόνες που χρησιμοποιούνται από τα κύτταρα έχουν υψηλή δραστικότητα η οποία μπορεί να οριστεί ως “η ποσότητα της ουσίας που απαιτείται για να επιτευχθεί ένα δεδομένο αποτέλεσμα” (π.χ. όσο μεγαλύτερη είναι η δραστικότητα τόσο λιγότερη ορμόνη απαιτείται). Παρά την υψηλή συγγένεια των θέσεων του δέκτη με ορμόνες είναι ωστόσο δυνατόν να προσδεθούν κι άλλες χημικές ενώσεις στους δέκτες αυτούς. Αυτό σημαίνει ότι όσες EDCs είναι παρούσες σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν μια επίδραση και να καταλήξουν επίσης σε μια αντίδραση. Ορμονική διαταραχή συμβαίνει όταν οι EDCs αλληλεπιδρούν με δέκτες

των ορμονών μεταβάλλοντας τις μορφές των φυσικών αντιδράσεων του ενδοκρινικού συστήματος. Τα είδη των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.1β και 2.1γ. Η χημική ουσία μπορεί να προσδεθεί στο δέκτη και να ενεργοποιήσει μια αντίδραση και για αυτό το λόγο να δράσει σαν “μίμος” ορμόνης. Αυτό ορίζεται ως αγωνιστική επίδραση (agonistic effect) (Σχήμα 2.1γ). Εάν η χημική ουσία (σε αυτή την περίπτωση παρεμποδιστής ορμόνης) προσδεθεί σε ένα δέκτη χωρίς να δημιουργηθεί αντίδραση αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προλαμβάνεται η φυσική ορμόνη από αλληλεπίδραση και αυτό εκφράζεται ως ανταγωνιστική επίδραση (antagonistic effect) (Σχήμα 2.1β). Άλλες επιδράσεις που μπορούν να λάβουν χώρα στο ενδοκρινικό σύστημα είναι διαταραχή των συνθέσεων και αφαίρεση των ορμονών όπως και των δεκτών τους και αλληλεπίδραση με πολλαπλές ορμόνες, από τα παραπάνω φαίνεται ότι οι ορμονικές διαταραχές είναι πολύπλοκες διαδικασίες. Οι περισσότερες EDCs είναι μικρά μόρια και επομένως “μιμούνται” ή ανταγωνίζονται μικρές ορμόνες, όπως στεροειδείς και θυρεοειδείς ορμόνες (Sumpter, 1998).

2.1.3 Προέλευση και τύχη ενδοκρινικών διαταρακτών

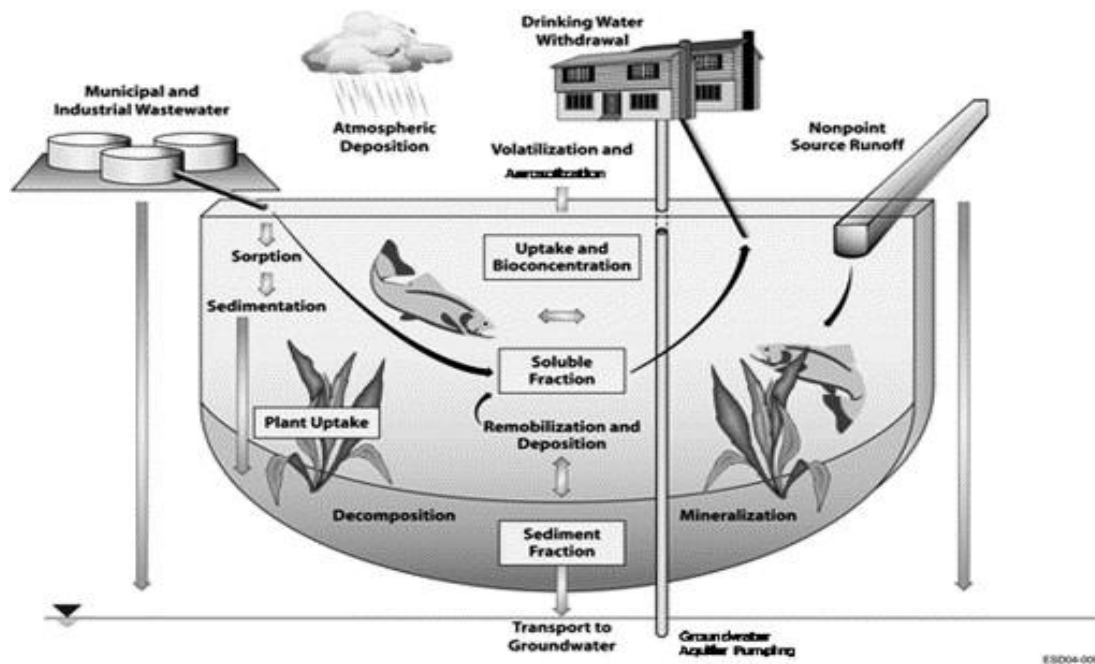
Οι ενδοκρινικοί διαταράκτες όπως και οι άλλοι ρύποι προέρχονται από αρκετές πηγές. Οι ρυπαντές αυτοί μπορεί να έχουν επίδραση στην ανθρώπινη έκθεση καθώς και την πανίδα αλλά και επίδραση στην συσσώρευση τους στο περιβάλλον. Γενικά οι πηγές ρύπανσης χωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες, δηλαδή σημειακές και μη σημειακές (επιφανειακές) πηγές και συνοψίζονται στον Πίνακα 2.1.3.1

Σημειακές πηγές

Μια σημειακή πηγή είναι ένα αδιαμφισβήτητο σημείο εισόδου του ρύπου σε ένα περιβαλλοντικό μέσο (συνήθως σε έναν υδατικό πόρο). Θα μπορούσε να είναι ένας αγωγός εκροών επεξεργασμένων υγρών αποβλήτων, μια υπερχείλιση (πλημμύρα), ή ένα γνωστό σημείο όπου πετάγονται κατ’ επανάληψη απορρίμματα. Οι σημειακές πηγές είναι ευκολότερο να ελεγχθούν από τις μη σημειακές επομένως, όποτε είναι δυνατόν, οι μη σημειακές πηγές μετατρέπονται σε σημειακές. Οι σημειακές πηγές μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με την υπό μελέτη περιοχή. Σε ένα ποτάμιο σύστημα, η αποχέτευση από μια εγκατάσταση επεξεργασίας λυμάτων είναι συνήθως ο κύριος παράγοντας ρύπανσης.

Πίνακας 2.1.3.1 Κύριες πηγές ενδοκρινικών διαταρακτών. Όξινοι φθαλικοί εστέρες (PAEs), Δισφαινόλη Α (BPA), πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), πολυχλωριωμένα διφενύλια (PCBs), πολυβρωμιούχοι διφενυλεστερες (PBDE), τεταρτο-βρωμοδισφαινόλη Α, (TBBA), τριβουτυλοκασσίτερος (TBT), πολυχλωριωμένες διβενζό-διοξίνες (PCDDs) και πολυχλωριομένα διβενζοφουράνια (PCDFs) (Φροντιστής, 2011).

Πηγή EDCs	Υδατικοί αποδέκτες	Τύπος πηγής	Τύπος Ε.Δ.
Εκροή αστικών λυμάτων	Επιφανειακά νερά	Σημειακή	Οιστρογόνα, Επιφανειοδραστικές, PAEs, BPA
	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	
Εκροή βιομηχανικών λυμάτων	Επιφανειακά νερά	Σημειακή	Επιφανειοδραστικές, PAHs, PCBs, PBDEs, φυτοφάρμακα, PAEs, BPA
	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	
Χρώματα για πλοία	Επιφανειακά νερά	Σημειακός	TBT
Γεωργικές απορροές (ζώα)	Επιφανειακά νερά	Μη σημειακή	Οιστρογόνα
	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	
Αστικές απορροές	Επιφανειακά νερά	Μη σημειακή	Φυτοφάρμακα, PAHs
	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	
Διασταλλάγματα Χ.Υ.Τ.Α	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	PAHs, PBDEs, TBBA, BPA, PAEs
Ατμοφαιρική εναπόθεση	Επιφανειακά νερά	Μη σημειακή	PAHs, PCBs, PCDDs, PCDFs, PBDEs, TBBA, φυτοφάρμακα
	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	
Φύση	Επιφανειακά νερά	Μη σημειακή	PAHs, ορμόνες
	Υπόγεια νερά	Μη σημειακή	



Σχήμα 2.1.3.2. Σχηματική αναπαράσταση της μεταφοράς και της τύχης των ενδοκρινικών διαταρακτών στο περιβάλλον (Φροντιστής, 2011).

2.1.4 Επιπτώσεις της παρουσίας ενδοκρινικών διαταρακτών στο περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο

Τα ζώα και τα φυτά έχουν ένα σύστημα χημικών “αγγελιοφόρων”, οι οποίοι ελέγχουν ποικίλες βασικές λειτουργίες όπως αναπαραγωγή, ανάπτυξη και συντήρηση. Στα ζώα αυτό το σύστημα χρησιμοποιεί διάφορους αδένες στους οποίους παράγονται αυτοί οι χημικοί “αγγελιοφόροι” (ορμόνες), οι οποίοι στη συνέχεια μεταφέρονται στα όργανα στόχους (target organs). Κύριες χημικές ουσίες μπορούν να παρεμβάλλονται στο ενδοκρινικό σύστημα (endocrine system) για την παραγωγή μιας ανεπιθύμητης αντίδρασης ή διαταραχής η, οποία ενδέχεται να επηρεάσει την υγεία, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή μιας ευρείας ποικιλίας οργανισμών. Αυτές οι ουσίες καλούνται ουσίες που προκαλούν ορμονικές διαταραχές (Endocrine Disrupting Chemicals - EDCs). Το πρόβλημα των ορμονικών διαταραχών (Endocrine Disruption - ED) ήταν εμφανές από την αρχή των δεκαετιών του 20ου αιώνα (Birkett and Lester, 2003), αλλά σχετικά πρόσφατα ήρθε στο προσκήνιο ως ένα σοβαρό θέμα για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία. Το φαινόμενο των ορμονικών διαταραχών αποτελεί θέμα που απασχολεί την κοινωνία από τις αρχές της δεκαετίας του ‘90. Ο λόγος που ήλθε στο προσκήνιο ήταν ότι μελέτες αποκάλυψαν πως οι EDCs είναι μια πιθανή αιτία

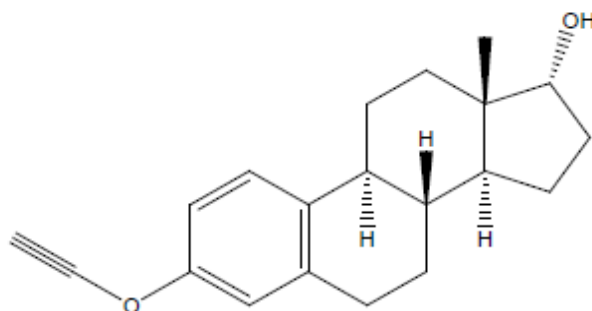
προβλημάτων αναπαραγωγής στην υγεία των ανδρών με τη μορφή μειωμένης ποιότητας και ποσότητας του σπέρματος, με αυξήσεις του καρκίνου των όρχεων και του προστάτη, με μη κατερχόμενους όρχεις, με δυσμορφία του πέους και στα θηλυκά με καρκίνο του μαστού (Birkett and Lester, 2003).

Σε μελέτη των Carlsen et al. (1992) που βασίστηκε σε 61 προγενέστερες μελέτες εξετάστηκε η ποιότητα του σπέρματος κατά τη διάρκεια των τελευταίων 50 ετών και διαπιστώθηκε ότι υπήρχε μια μείωση στην ποιότητα και στην ποσότητα του σπέρματος κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Παράλληλα από τη δεκαετία του '50 υπάρχουν ενδείξεις για ορμονικές διαταραχές στα συστήματα αναπαραγωγής κυρίως της άγριας πανίδας που προκύπτουν από την έκθεση της σε περιβαλλοντικούς ρύπους (π.χ. λεπτό κέλυφος αυγών εξαιτίας μικροβιοκτόνων και οιστρογόνων) (Birkett and Lester, 2003). Από τη δεκαετία του '40 έχουν απελευθερωθεί στο περιβάλλον μεγάλες ποσότητες χημικών ουσιών παραγομένων από τον άνθρωπο. Η γενιά μεταξύ 1950 και 1960 ήταν η πρώτη που υπέφερε από την έκθεση ρύπων (που ήταν συσσωρευμένοι στον παχύ μητρικό ιστό) καθώς αναπτύσσονταν στη μήτρα. Βέβαια, μετά το 2020 θα διαπιστωθεί πραγματικά κατά πόσο αυτές οι χημικές ουσίες επηρεάζουν την υγεία των παιδιών που συλ-λαμβάνονται σήμερα τότε δηλαδή που εκείνα θα ενηλικιωθούν. Πολυάριθμες μελέτες στα θηλαστικά, πουλιά και ψάρια υποδεικνύουν πιθανές ορμονικές διαταραχές, η πλειονότητα των οποίων περιλαμβάνουν ανωμαλίες στην αναπαραγωγή και την ανάπτυξη (Φροντιστής, 2011). Οι ερευνητές αλλά και η κοινή γνώμη έστρεψαν την προσοχή τους στην δυσμενή δράση των ενδοκρινικών διαταρακτών όταν έγινε ή σύνδεση μεταξύ του αντισυλληπτικού χαπιού (που περιέχει την συνθετική ορμόνη αιθινυλοιστραδιόλη) και της τοξικής επίδρασης του στα ψάρια. Ωστόσο, ο συσχετισμός μεταξύ της έκθεσης στους ενδοκρινικούς διαταράκτες και της υγείας της άγριας ζωής και του ανθρώπου καθώς και οι πιθανές μακροπρόθεσμες συνέπειες είναι μια πολύπλοκη και αμφιλεγόμενη υπόθεση (Chang et al., 2009). Οι επιπτώσεις που έχουν καταγραφεί είναι μείωση της ευθραυστότητας των αυγών σε πτηνά ψάρια και χελώνες, θηλυκοποίηση των αρσενικών ψαριών, προβλήματα στο αναπαραγωγικό σύστημα των ψαριών, ερπετών, πτηνών και θηλαστικών καθώς και αλλαγές στο ανοσοποιητικό σύστημα θαλάσσιων θηλαστικών. Σε κάποιες περιπτώσεις, οι παραπάνω επιπτώσεις μπορεί να προκαλέσουν και μείωση στους διάφορους πληθυσμούς (Esplugas et al., 2007).

2.1.5 Συνθετική ορμόνη 17α-Αιθινυλοιστραδιόλη – ΕΕ2

Η αιθινυλοιστραδιόλη είναι ένα παράγωγο της οιστραδιόλης. Θεωρείται ως ένα βιοενεργό οιστρογόνο και εισέρχεται στον ανθρώπινο οργανισμό δια στόματος καθώς χρησιμοποιείται σχεδόν

σε όλες τις νέες συνταγές παρασκευής του αντισυλληπτικού χαπιού. Η 17α-αιθινυλοιστραδιόλη είναι ένα από τα πιο κοινά φάρμακα και η δομή της φαίνεται στην εικόνα 2.1.5.1 παρακάτω:



Εικόνα 2.1.5.1 Δομή Αιθινυλοιστραδιόλης – EE2 (Δραγανίγος, 2009).

Ο χημικός της τύπος είναι : $C_{20}H_{24}O_2$

Το πρώτο ενεργό συνθετικό στεροειδές οιστρογόνο, η αιθινυλοιστραδιόλη (EE2), παρασκευάστηκε το 1938 από τον Hans Herloff Inhoffen και τον Walter Hohlweg στο Βερολίνο. Η EE2 εγκρίθηκε από την FDA στις ΗΠΑ στις 25 Ιουνίου 1943 και προωθήθηκε στην αγορά από την φαρμακευτική εταιρία Schering – Plough με το όνομα Estinyl. Η FDA ανακάλεσε την έγκριση αποτελεσματικότητας του Estinyl στις 4 Ιουνίου 2004 ύστερα από αίτημα της Schering – Plough Corporation, που είχε διακόψει την παραγωγή και πώληση του φαρμάκου.

Αν και η οιστραδιόλη απορροφείται αμέσως όταν λαμβάνεται στοματικά, το ίδιο γρήγορα αδρανοποιείται από το συκώτι. Η προσθήκη μιας αιθινυλο-ομάδας στο στεροειδές, αποδείχθηκε ότι εξασφαλίζει ένα οιστρογόνο το οποίο είναι πολύ πιο ανθεκτικό στο να διασπάται και προετοίμασε το δρόμο για την ανάπτυξη των αντισυλληπτικών χαπιών.

Η EE2 απορροφείται στο λεπτό έντερο και φτάνει σε όριο αιχμής 2 ώρες μετά. Στη συνέχεια υποβάλλεται σε εκτεταμένο μεταβολισμό στο συκώτι. Η Αιθινυλοιστραδιόλη και τα προϊόντα μεταβολισμού της εκκρίνονται μαζί με την χολή. Λόγω του φαινομένου της εντεροηπατικής κυκλοφορίας, παρατηρείται μια δεύτερη κορυφή αρκετές ώρες μετά. Μεγάλες αποκλίσεις υπάρχουν στην συνολική διαδικασία απορρόφησης η οποία μπορεί να τροποποιηθεί από φάρμακα (π.χ. αντιβιοτικά) που επηρεάζουν την εντεροηπατική κυκλοφορία ή τα ένζυμα του συκωτιού. Σ' αυτή την κυκλοφορία η EE2 είναι σχεδόν πλήρως δεσμευμένη σε αλβουμίνη του πλάσματος. Μεταβολίζεται με υδροξύλωση του αρωματικού δακτυλίου και εκκρίνεται με τα περιττώματα και τα ούρα. Η EE2 είναι ορμονικά δραστική ενεργοποιώντας τον οιστρογενή υποδοχέα και έτσι είναι ένα οιστρογόνο και απελευθερώνεται στο περιβάλλον, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σαν

ξενοοιστρογόνο από τα ούρα και τα περιττώματα των γυναικών που έχουν πάρει το αντισυλληπτικό χάπι.

Τέλος αξίζει να αναφέρουμε ότι παρόλο που στο βιολογικό καθαρισμό αλλά και στα νερά ποταμών και λιμνών η EE2 υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις (ng/L), μπορεί να προκαλέσει βλαβερές συνέπειες στον ανθρώπινο οργανισμό. Εκτός από τις ανωμαλίες στην αναπαραγωγή, τη μείωση του αριθμού των σπερματοζωαρίων και την αύξηση των καρκίνων στους όρχεις και στο μαστό που προκαλεί όταν δρα ως EDC, υπάρχουν και οι παρακάτω επιπτώσεις που ενδέχεται να προκληθούν. Οι επιπτώσεις αυτές περιλαμβάνουν πόνους στην ουροδόχο κύστη, κόκκινο ή θολό χρώμα στα ούρα, πόνους σε όλο το κορμί, βήχα και βλέννα, μείωση της ποσότητας των ούρων, δύσκολη και οδυνηρή ούρηση, ξήρανση του λαιμού, πόνο στα αυτιά, υπερβολικά αέρια στο στομάχι ή στο έντερο, αίσθημα φόβου, θυμού ή λύπης, συχνή ανάγκη για ούρηση, γενικό αίσθημα αδιαθεσίας και τέλος πονοκέφαλο πολύ δυνατό και παρατεταμένο (Δραγανίγος, 2009).

2.1.6 Εφαρμογές φωτοκατάλυσης στην απομάκρυνση ενδοκρινικών διαταρακτών.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες αναφορικά με την φωτοκαταλυτική απομάκρυνση των EDCs. Οι Ohko et al. (2002) μελέτησαν την διάσπαση της E2 παρουσία UV ακτινοβολίας και TiO_2 . Βρέθηκε ότι το οιστρογόνο αρχικής συγκέντρωσης 10^{-6} M υπέστη ανοργανοποίηση ύστερα από 3 ώρες αντίδρασης παρουσία 1 g/L καταλύτη με ένταση της UV ακτινοβολίας ίση με 6 mW/cm^2 . Παράλληλα προσδιορίστηκε και η οιστρογονικότητα και βρέθηκε ότι τα παραπροϊόντα της διάσπασης της E2 είναι οιστρογονικώς ανενεργά. Σε μια παρόμοια μελέτη των Coleman et al. (2004) μελετήθηκε η απομάκρυνση των οιστρογόνων E2 και EE2 σε απιονισμένο νερό με την χρήση ακινητοποιημένου TiO_2 πάνω σε χαλαζία. Ο χρόνος ημίσειας ζωής των ορμονών ήταν μικρότερος από 10 λεπτά ενώ σημαντικό ρόλο φαίνεται ότι παίζει και η φωτόλυση μιας και η λάμπα που χρησιμοποιήθηκε εκπέμπει και στις UVB και UVC περιοχές. Οι Zhang et al. (2007) μελέτησαν την φωτοκαταλυτική διάσπαση των E2 και EE2 παρουσία UV ακτινοβολίας και TiO_2 . Η διάσπαση των οιστρογόνων αυξήθηκε όταν το pH αυξήθηκε από το 2 στο 7.5, ενώ πάνω από αυτή την τιμή άρχισε να μειώνεται. Παράλληλα έγιναν πειράματα παρουσία χουμικών οξέων, γεγονός που αύξησε την απομάκρυνση των ουσιών λόγω της φωτοευαισθητοποίησης από τα χρωμοφόρα κέντρα των χουμικών οξέων. Η επίδραση του pH ως προς την φωτοκαταλυτική οξειδωση της E2 μελετήθηκε εκτενέστερα στην εργασία των Malygina et al. (2005). Η φωτοκατάλυση φαίνεται να ευνοείται σε αλκαλικά pH (9-11) γεγονός που οφείλεται σε σημαντική αύξηση της προσρόφησης άρα και της

μεταφοράς μάζας προς την επιφάνεια του καταλύτη που πραγματοποιείται σε αλκαλικές συνθήκες (Φροντιστής, 2011).

2.2 ΟΡΙΣΜΟΣ-ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

2.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ

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

2.2.2 Μηχανισμοί Απολύμανσης

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

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

Απολυμαντικά μέσα όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα απορρυπαντικά μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης. Αυτές οι ενώσεις καταστρέφουν την εκλεκτική

διαπερατότητα της μεμβράνης και επιτρέπουν τη διαφυγή ζωτικών συστατικών όπως το άζωτο και ο φώσφορος.

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

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

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

2.3 Φωτοκατάλυση

Ετερογενής φωτοκατάλυσης

Βασικές αρχές

Την τελευταία δεκαετία υπήρξε ραγδαία ανάπτυξη της φωτοκατάλυσης ως μέθοδος αντιρρύπανσης λόγω του ότι πρόκειται για μία διεργασία, η οποία λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον (Orpenlander, 2003; Parsons, 2004). Η παρουσία του καταλύτη επιταχύνει κατά πολλές τάξεις μεγέθους την αποδόμηση. Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου συγκαταλέγονται τα εξής (Χατζησυμεών, 2009):

- Η χρήση φωτοκαταλυτών σχετικά χαμηλού κόστους.
- Η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης των καταλυτών, γεγονός που συνεπάγεται, αφενός τη μείωση του λειτουργικού κόστους της μεθόδου, αφετέρου την αποφυγή της επιπλέον επιβάρυνσης του περιβάλλοντος με χημικούς ρύπους.

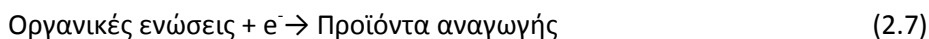
- Η δυνατότητα εκμετάλλευσης του ηλιακού φωτός (ανανεώσιμη πηγή ενέργειας) για την ενεργοποίηση του καταλύτη, πλεονέκτημα που αποκτά ιδιαίτερη βαρύτητα σε περιοχές μεγάλης ηλιοφάνειας.
- Η απολυμαντική ικανότητα της μεθόδου.

Η διεργασία της ετερογενούς φωτοκατάλυσης βασίζεται στη δημιουργία ριζών υδροξυλίου, κατά τον φωτισμό ενός συστήματος ημιαγωγού/ηλεκτρολύτη με τεχνητό ή ηλιακό φως. Οι $\text{HO}^\bullet$ αποτελούν το κύριο οξειδωτικό μέσο της διεργασίας, το οποίο προσβάλλει τα οργανικά μόρια του αποβλήτου και μέσω υπεροξειδικών ριζών και τα αποδομεί προς CO_2 και ανόργανα άλατα (Carp et al., 2004). 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 ημιαγωγίμου υλικού, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, τα ηλεκτρόνια της ΖΣ (e^-) διεγείρονται, απορροφώντας φωτόνια ενέργειας ίσης ή μεγαλύτερης από αυτή που αντιστοιχεί στο ενεργειακό χάσμα του ημιαγωγού ($h\nu \geq E_g$), και μεταπηδούν στην ΖΑ δημιουργώντας παράλληλα θετικά φορτισμένες οπές (h^+) στην ΖΣ, όπως περιγράφεται και στην παρακάτω αντίδραση (Oppenlander, 2003; Parsons, 2004; Konstantinou and Albanis, 2004; Pekakis et al., 2006):

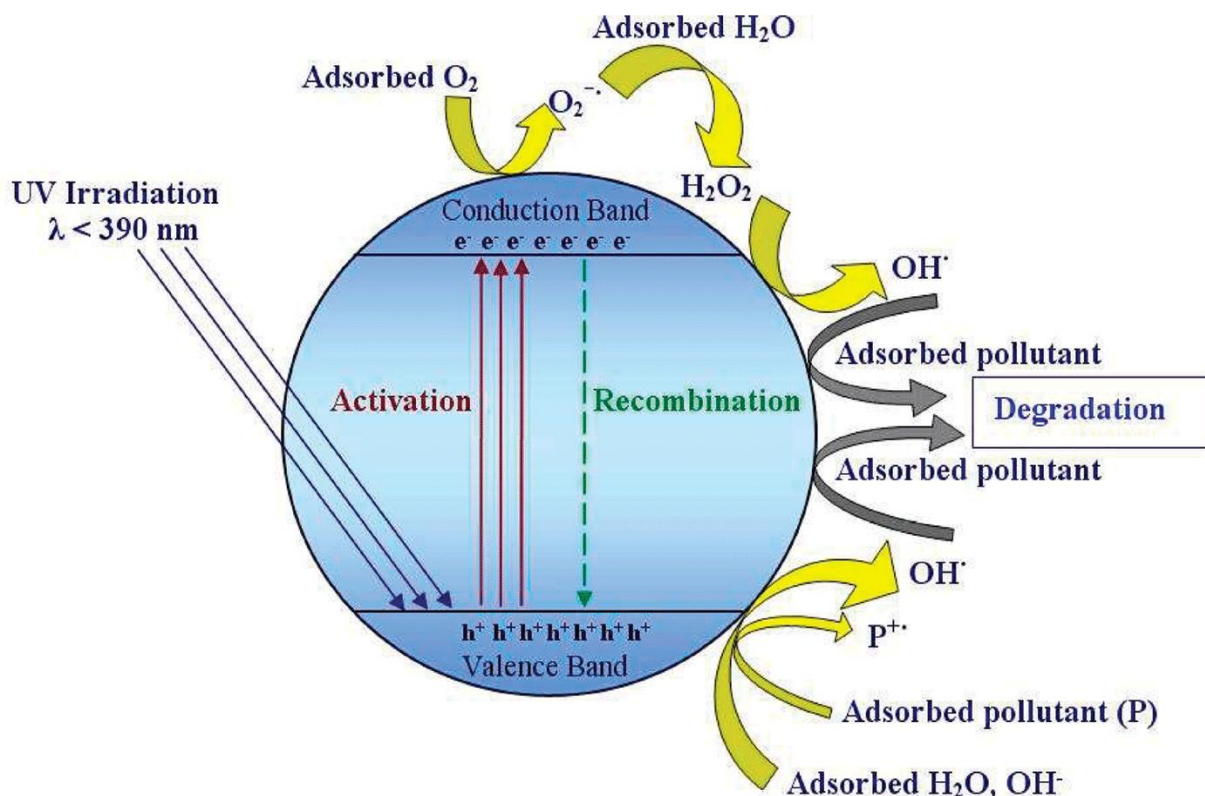
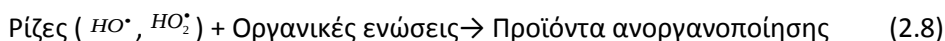


Τα φωτοπαραγόμενα ζεύγη οπών/ηλεκτρονίων διαχωρίζονται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου της διαφασικής περιοχής και στην περίπτωση ενός n – τύπου ημιαγωγού, όπως το TiO_2 , τα μεν ηλεκτρόνια κινούνται προς το εσωτερικό του κρυστάλλου, ενώ οι οπές ρέουν προς την επιφάνεια, όπου και αντιδρούν με το υπάρχον οξειδοαναγωγικό σύστημα. Σε υδατικά διαλύματα οι φωτο-παραγόμενες οπές αντιδρούν με τα ιόντα HO^- ή με τα μόρια του H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς τις αντίστοιχες ρίζες του υδροξυλίου (Σχήμα 2.5), σύμφωνα με τις παρακάτω αντιδράσεις:





Ακολουθως, οι ρίζες υδροξυλίου και υπερυδροξυλίου δύνανται να ανοργανοποιήσουν τις περισσότερες εκ των οργανικών ενώσεων συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο σημαντικά στην μείωση του οργανικού φορτίου των αποβλήτων.



Σχήμα 2.5. Κύριες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μέσα σε κόκκο ημιαγωγικής κόνεως, κατά τη φωτοδιέγερσή του από ακτινοβολία $h\nu \geq E_g$: (Α) και (Β) επανασύνδεση ζεύγους σπών/ηλεκτρονίων στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του κόκκου αντίστοιχα, (C) αναγωγή του δέκτη Α και (D) οξείδωση του δότη D (Hermann, 2010).

Ο ρόλος του ημιαγωγού στη φωτοκαταλυτική οξείδωση οργανικών ρύπων είναι αποφασιστικής σημασίας. Τόσο οι φυσικές του ιδιότητες όσο και οι φυσικοχημικές, αποτελούν παραμέτρους, οι οποίες επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος. Ο καταλύτης TiO_2 είναι σχεδόν ο ιδανικός καταλύτης για τις φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις οξείδωσης καθώς χαρακτηρίζεται από τις παρακάτω ιδιότητες (Carp et al., 2004; Gaya and Abdullah, 2008):

- Ικανότητα προσρόφησης αντιδρώντων ενώσεων υπό κατάλληλη ακτινοβολία $h\nu \geq E_g$.
- Χαμηλό ρυθμό επανασύνδεσης των h^+/e^- , τόσο στο εσωτερικό όσο και την επιφάνεια του κόκκου.
- Χημικά και βιολογικά αδρανής.
- Μεγάλη ανθεκτικότητα στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση.
- Χαμηλό κόστος.
- Εύκολη παραγωγή και χρήση.

Έν τούτοις, το μεγάλο μειονέκτημα του TiO_2 είναι το μεγάλο ενεργειακό του χάσμα, $E_g=3.2$ eV, εξαιτίας του οποίου η ενεργοποίηση του επιτυγχάνεται με ακτινοβολία μικρότερη των 385 nm και έτσι είναι δυνατή η αξιοποίηση μικρού μόνο μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας (5%) (Carp et al., 2004). Επιπρόσθετα, πρόσφατες έρευνες (Adams et al., 2006; Long et al., 2006; Xia et al., 2006) κατέδειξαν πιθανές τοξικές επιδράσεις από τη χρήση του TiO_2 στον ανθρώπινο οργανισμό.

Το TiO_2 απαντάται συνήθως σε τρεις κρυσταλλικές δομές, οι οποίες είναι η ανατάση, το ρουτίλιο και ο μπρουκίτης. Η δομή που υπερτερεί, όσον αφορά στη φωτοκαταλυτική της δραστηριότητα, είναι η πρώτη λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των HO^- και H_2O στην επιφάνειά της και επιπλέον λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτο-διεγερμένων e^- και h^+ . Ωστόσο, η ανατάση TiO_2 είναι θερμοδυναμικά πιο ασταθής και για θερμοκρασίες >600 °C μετασχηματίζεται στη σταθερή φάση του ρουτιλίου, με αποτέλεσμα τη μείωση της φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας του καταλύτη (Carp et al., 2004).

2.3.1 Η επίδραση πέντε φυσικών παραμέτρων στην φωτο – ενεργότητα

Συγκέντρωση αντιδρώντων

Απαραίτητη για την εκκίνηση μίας φωτοκαταλυτικής αντίδρασης είναι η προσρόφηση στην επιφάνεια του καταλύτη τουλάχιστον ενός από τα αντιδραστήρια. Η προσρόφηση ενός αντιδραστηρίου i στην επιφάνεια του καταλύτη μπορεί να περιγραφεί από την ισόθερμη του Langmuir (Parsons, 2004) :

$$\theta_i = \frac{K_i C_i}{1 + K_i C_i} \quad (2.9)$$

όπου θ_i είναι η κάλυψη της επιφάνειας από την ουσία i (η οποία μπορεί να παρουσιάζει σημαντική διαφορά στο σκοτάδι και κατά τον φωτισμό), K_i η σταθερά ισορροπίας προσρόφησης και C_i η αρχική συγκέντρωση των αντιδρώντων στο διάλυμα. Η ακτινοβολία του ημιαγωγού στο στάδιο της

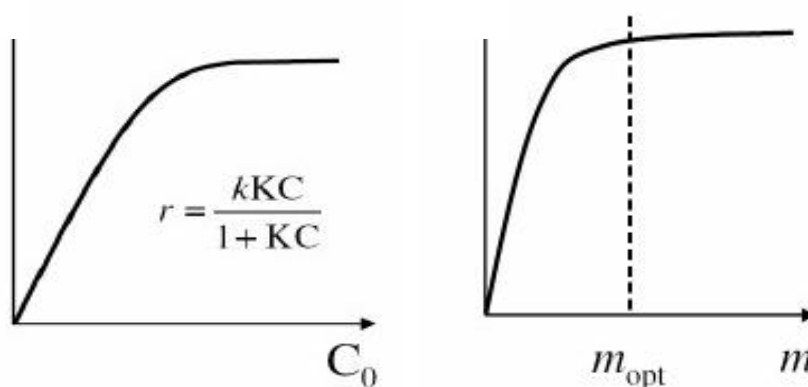
χημικής ρόφησης είναι ικανή να μεταβάλλει τη θέση ισορροπίας του συστήματος (διάλυμα/ημιαγωγού) επιδρώντας στην ισχύ του δεσμού μεταξύ του προσροφημένου μορίου και της επιφάνειας του ημιαγωγού. Ο ρυθμός της φωτοκαταλυτικής αντίδρασης εξαρτάται από την επιφανειακή κάλυψη των αντιδρώντων και προϊόντων και γι' αυτό χρησιμοποιούνται εξισώσεις ανάλογες με αυτές των θερμικών καταλυτικών αντιδράσεων. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η κινητική των φωτοκαταλυτικών διεργασιών περιγράφεται επαρκώς από το μοντέλο Langmuir-Hinselwood (LH) :

$$r=k\theta=k \frac{K_i C_i}{1+K_i C_i} \quad (2.10)$$

όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.6.

Μάζα καταλύτη

Γενικά, ο ρυθμός των φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του καταλύτη, ως συνέπεια της αύξησης της διαθέσιμης επιφάνειας για τη ρόφηση των αντιδρώντων και στα ενεργά κέντρα που είναι διαθέσιμα για την διεξαγωγή των αντιδράσεων (Δασκαλάκη, 2009). Για αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε αιωρήματα, ο ρυθμός της αντίδρασης αρχικά αυξάνεται γραμμικά με αύξηση της μάζας του καταλύτη μέχρι μια ορισμένη τιμή και στη συνέχεια φτάνει σε πλάτο (Σχήμα 2.6β). Η γραμμική περιοχή αντιστοιχεί στην πραγματική ετερογενή καταλυτική περιοχή ενώ το όριο της (m_{opt}) αντιστοιχεί στη μέγιστη ποσότητα φωτοκαταλύτη, για την οποία η επιφάνεια όλων των σωματιδίων ακτινοβολείται πλήρως. Για μεγαλύτερες ποσότητες καταλύτη παρατηρείται μείωση του ρυθμού της αντίδρασης, η οποία οφείλεται, κυρίως σε μείωση της διείσδυσης του φωτός στο διάλυμα (Hermann, 2010).



Σχήμα 2.6. Ο ρυθμός φωτοκαταλυτικής αντίδρασης συναρτήσει (α) της αρχικής συγκέντρωσης και (β) της μάζας του καταλύτη.

Θερμοκρασία

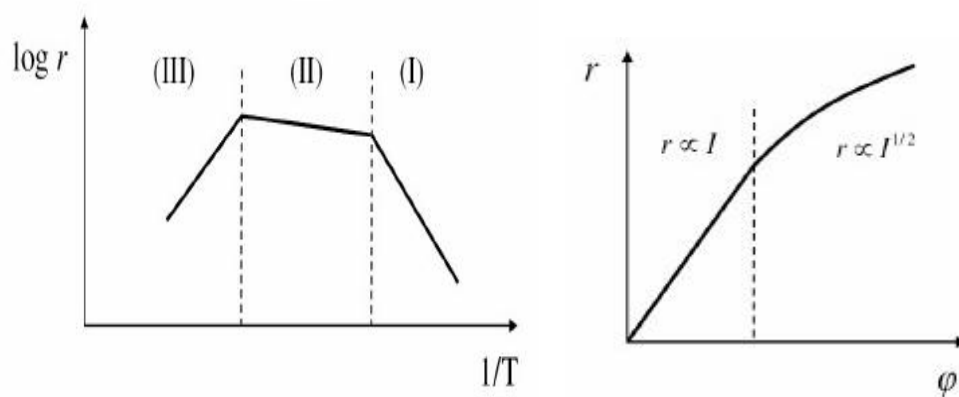
Ένας ημιαγωγός λόγω της υψηλής ενέργειας χάσματος που έχει, δεν μπορεί να διεγερθεί θερμικά σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Για το λόγο αυτό τα διάφορα στάδια μιας φωτοκαταλυτικής αντίδρασης δεν επηρεάζονται από μικρές μεταβολές της θερμοκρασίας και η πραγματική ενέργεια ενεργοποίησης είναι θεωρητικά μηδέν. Παρόλα αυτά ο συνολικός ρυθμός της αντίδρασης εξαρτάται από την θερμοκρασία λόγω της ύπαρξης σκοτεινών αντιδράσεων, οι οποίες έχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της αντίδρασης (Δασκαλάκη, 2009). Τέτοιου είδους αντιδράσεις είναι οι ισορροπίες ρόφησης – εκρόφησης των αντιδρώντων και προϊόντων της αντίδρασης, η σταθεροποίηση των ενδιάμεσων, η διάχυση των ροφημένων ειδών και οι θερμικές καταλυτικές αντιδράσεις, τόσο στην επιφάνεια του ημιαγωγού όσο και στην επιφάνεια του εναποτεθειμένου στον φορέα μέταλλου όταν υπάρχει, κ.λπ. Όταν η θερμοκρασία κυμαίνεται σε εύρος τιμών που δεν πραγματοποιείται θερμικός μετασχηματισμός των αντιδρώντων ο ρυθμός της αντίδρασης συνήθως μεταβάλλεται με τη θερμοκρασία όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.7α. Η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι μια τιμή οδηγεί αρχικά σε αύξηση του καταλυτικού ρυθμού (περιοχή I) και έπειτα στη σταθεροποίησή του (περιοχή II). Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση του ρυθμού (περιοχή III). Η συμπεριφορά αυτή ερμηνεύεται με βάση το μοντέλο Langmuir – Hinshelwood (LH) υποθέτοντας ότι η ρόφηση και η εκρόφηση είναι θερμικά ενεργοποιούμενες διεργασίες (Δασκαλάκη, 2009).

Ενέργεια και ένταση προσπίπτουσας ακτινοβολίας

Οι φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις ενεργοποιούνται από φωτόνια επομένως και ο καταλυτικός ρυθμός μεταβάλλεται συναρτήσει της έντασης της ακτινοβολίας, I. Για τιμές έντασης της τάξεως μερικών mW/cm^2 ο ρυθμός της αντίδρασης αυξάνεται γραμμικά με αύξηση της έντασης, ενώ για τιμές μεγαλύτερες μιας κρίσιμης τιμής ο ρυθμός είναι ανάλογος της τετραγωνικής ρίζας της έντασης όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.7β.

pH διαλύματος

Ο ρυθμός των καταλυτικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε υδατικό περιβάλλον επηρεάζεται σημαντικά από το pH του διαλύματος, μιας και αυτό μεταβάλλει τις θέσεις των ζωνών σθένους και αγωγιμότητας καθώς και την ισορροπία προσρόφησης και την κατανομή των φορτίων στην επιφάνεια του ημιαγωγού.

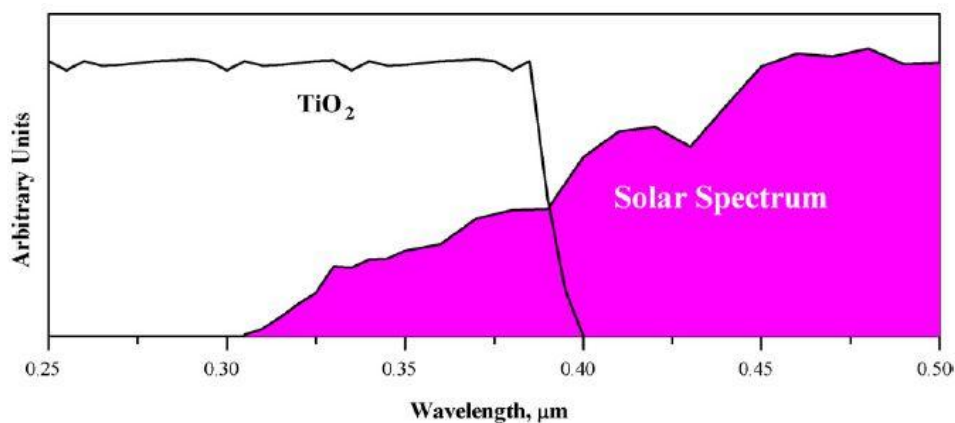


Σχήμα 2.7. Μεταβολή του ρυθμού της αντίδρασης συναρτήσει (α) του αντιστρόφου της θερμοκρασίας και (β) της έντασης προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

2.3.2 Ενίσχυση φωτοκαταλυτών

Το TiO_2 είναι ένας καταλύτης που δουλεύει σε ήπιες συνθήκες με ήπια οξειδωτικά. Παρόλα αυτά όταν η συγκέντρωση και ο αριθμός των ρύπων αυξάνει, η διεργασία γίνεται πιο πολύπλοκη και προκύπτουν προβλήματα όπως η απενεργοποίηση του καταλύτη, η αργή κινητική, η χαμηλή αποδοτικότητα στο φως και μηχανισμοί που δεν είναι δυνατόν να προβλεφθούν. Είναι φανερό λοιπόν ότι το καθαρό TiO_2 συνήθως χρειάζεται ενίσχυση για να ανταπεξέλθει σε πρακτικές βιομηχανικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε άρση του πλεονεκτήματος των ήπιων συνθηκών λειτουργίας. Επίσης στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ορατό φως, το κόστος θα είναι πολύ μικρότερο από ότι στην περίπτωση του τεχνητού φωτισμού με λάμπες και η διεργασία θα είναι περισσότερο περιβαλλοντικά φιλική. Η οξειδοαναγωγική διαδικασία βασίζεται στην απομάκρυνση των οπών και των ηλεκτρονίων στην επιφάνεια του ημιαγωγού και δύο επιπλέον οξειδωτικά και αναγωγικά βήματα. Υπάρχουν δύο παράλληλες προσπάθειες έρευνας για να ισορροπήσουν αυτές τις ταχύτητες αντίδρασης, η μία είναι προσθέτοντας δότες ηλεκτρονίων (επιπρόσθετα οξειδωτικά) και η άλλη τροποποιώντας την δομή και την σύσταση του καταλύτη. Και στις δύο περιπτώσεις, η προσπάθεια είναι να ενισχυθεί ο ανταγωνισμός για τα ηλεκτρόνια και να αποφευχθεί η επανασύνδεση των ζευγών οπών και ηλεκτρονίων. Μια τρίτη προσέγγιση εστιάζει όχι μόνο στην αύξηση της κβαντικής απόδοσης αλλά

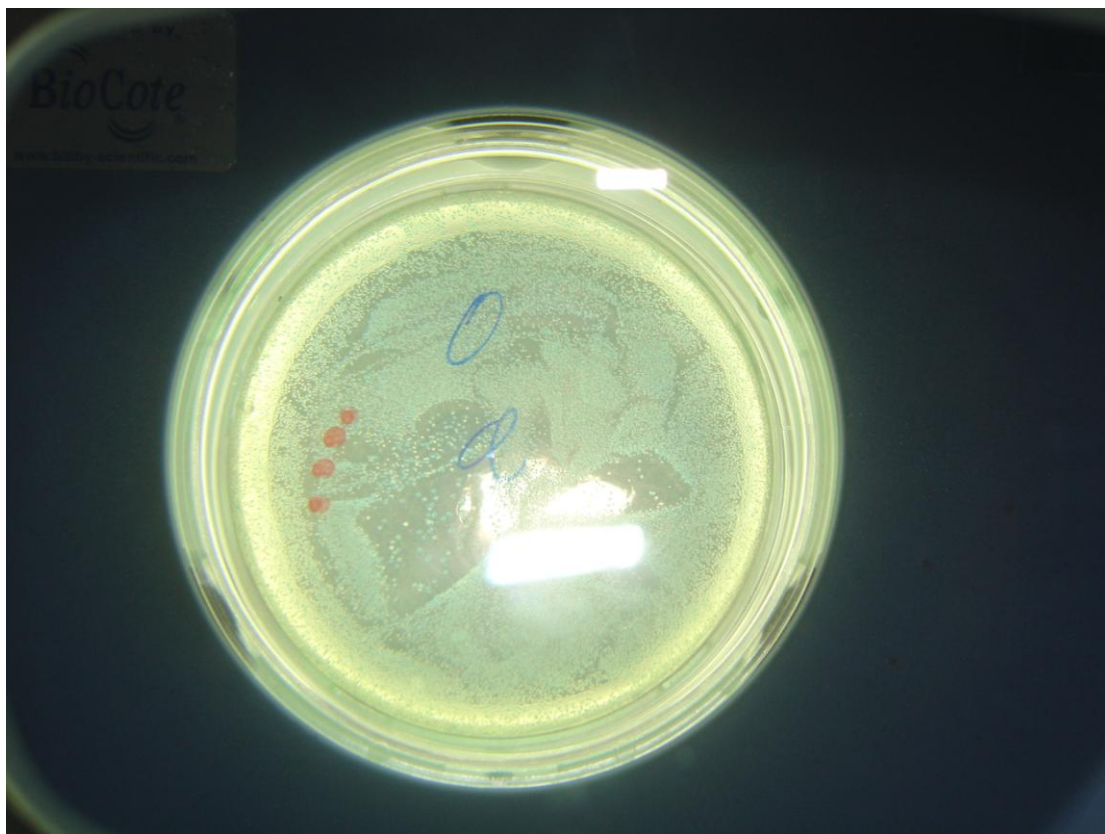
στην εύρεση νέων καταλυτών με ενεργειακό χάσμα, στο οποίο ταιριάζει καλύτερα το ηλιακό φάσμα. Στο Σχήμα 2.8 φαίνεται το φάσμα απορρόφησης του TiO_2 .



Σχήμα 2.8. Φάσμα απορρόφησης του TiO_2 και φάσμα εκπομπής ηλιακής ακτινοβολίας.

Η ανάπτυξη φωτοκαταλυτών που επιδεικνύουν μεγαλύτερη ενεργότητα στο ηλιακό φως ($\lambda > 400 \text{ nm}$) επιτρέπει να χρησιμοποιηθεί μεγάλο μέρος της ηλιακής ακτινοβολίας, ακόμη και κάτω από λιγοστή ακτινοβολή εσωτερικού φωτισμού. Δυστυχώς η επιλογή εναλλακτικών υλικών αντί για το TiO_2 είναι περιορισμένη. Αυτό συμβαίνει γιατί ο κατάλληλος ημιαγωγός θα πρέπει να είναι (α) μη τοξικός, (β) σταθερός σε υδατικά διαλύματα που περιέχουν δραστικά ή/και τοξικά χημικά, (γ) να μην υφίσταται φωτοδιάβρωση και (δ) χαμηλού κόστους

2.4 Βακτήρια



Εικόνα 2.4. Τριβλίο με αποικίες *E.coli*

Βακτήρια - Μικροοργανισμοί-Δείκτες ποιότητας υδάτινου περιβάλλοντος

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

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

Τα βακτήρια είναι ετερότροφοι ή αυτότροφοι (συνήθως χημειοσυνθετικοί) οργανισμοί, αερόβιοι, αναερόβιοι. Βρίσκονται στον αέρα, στο νερό, σε οργανικές ουσίες ή σε ζωντανούς οργανισμούς των φυτών και των ζώων. Ζουν κάτω από μεγάλη ποικιλία συνθηκών θερμοκρασίας, οξυγόνου, pH και

αναπτύσσονται ταχύτατα όταν υπάρχει επαρκής τροφή και τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά. Τα ετερότροφα βακτηρίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων, γιατί καταναλώνουν ως τροφή τις οργανικές ουσίες των αποβλήτων (Μαντζαβίνος Δ., 2003).

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

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

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

Ανίχνευση και ποσοτικοποίηση δεικτών

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

- Απευθείας καταμέτρηση σε μικροσκόπιο

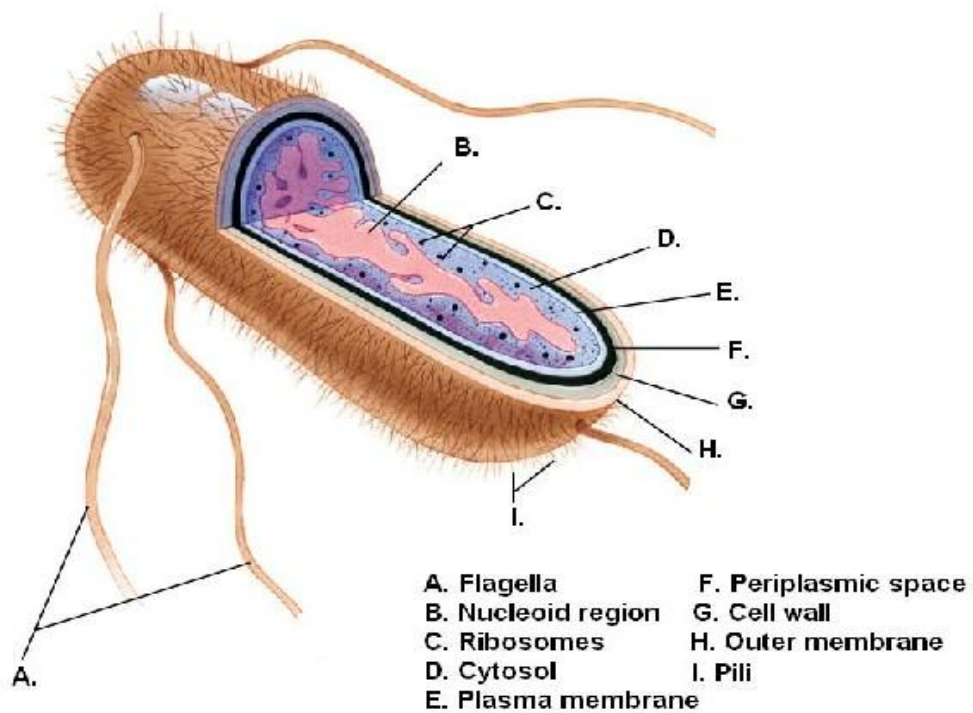
- Καλλιεργητική μέθοδος, ύστερα από:
 - Διήθηση υπό κενό σε μεμβράνες
 - Μέθοδος πολλαπλών σωλήνων

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

Escherichia coli



Εικόνα 2.4.1 :Στελέχη *E.coli* (<http://www.ebiologie.fr/gallery-ocount-gv33.html>)



Εικόνα 2.4.2:Δομή *E.coli*

(Α)μαστίγια,(Β)πυρήνας,(C)ΡΙβοσώματα, (D)Κυτταρόπλασμα, (E)πλασματική μεμβράνη, (F)Περιπλασματικός χώρος, (G)Κυτταρικό τοίχωμα,(Η)εξωτερική μεμβράνη, (Ι)τριχίδια

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

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

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

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

Αδρανοποίηση *E.coli* με φωτοκαταλυτική οξείδωση

Ο μηχανισμός του κυτταρικού θανάτου έχει αποτελέσει θέμα έρευνας τα τελευταία χρόνια. Ένα κοινό χαρακτηριστικό σε όλο τον μηχανισμό φαίνεται να είναι η αρχική φθορά της κυτταρικής

μεμβράνης που ακολουθείται από την καταστροφή των ενδοκυτταρικών συστατικών. Παρουσία των κατάλληλων οξειδοαναγωγικών ζευγών, αυτοί οι μεταφορείς ηλεκτρικών φορτίων είναι σε θέση να προκαλέσουν μειώσεις και οξειδώσεις. Οι ρίζες υδροξυλίου είναι πλέον δεκτές ως αντιδρώντα στην φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση πολλών οργανικών ενώσεων (Δρόσου, 2007).

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

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

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

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

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

Ο αρχικός μηχανισμός της υπεριώδους ακτινοβολίας στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών είναι η άμεση καταστροφή των κυψελοειδών νουκλεϊνικών οξέων (DNA, RNA). Το υπεριώδες φως, μήκους κύματος γύρω στα 260 nm προκαλεί την περισσότερη ζημιά στο κύτταρο. Το μήκος κύματος

συμπίπτει πολύ με αυτό της μέγιστης απορρόφησης των νουκλεϊνικών οξέων. Οι λαμπτήρες χαμηλής πίεσεως υδραργύρου, εκπέμπουν περίπου το 92% του φωτός τους σε ένα μήκος κύματος στα 254 nm. Κατά συνέπεια, αυτοί οι λαμπτήρες είναι σχεδόν ιδανικές μικρές γεννήτριες υπεριώδους ακτινοβολίας (McCullagh et al., 2007).

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

2.5 ΜΕΘΟΔΟΣ PCR

2.5.1 Αρχή Λειτουργίας της Αντίδρασης της PCR

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

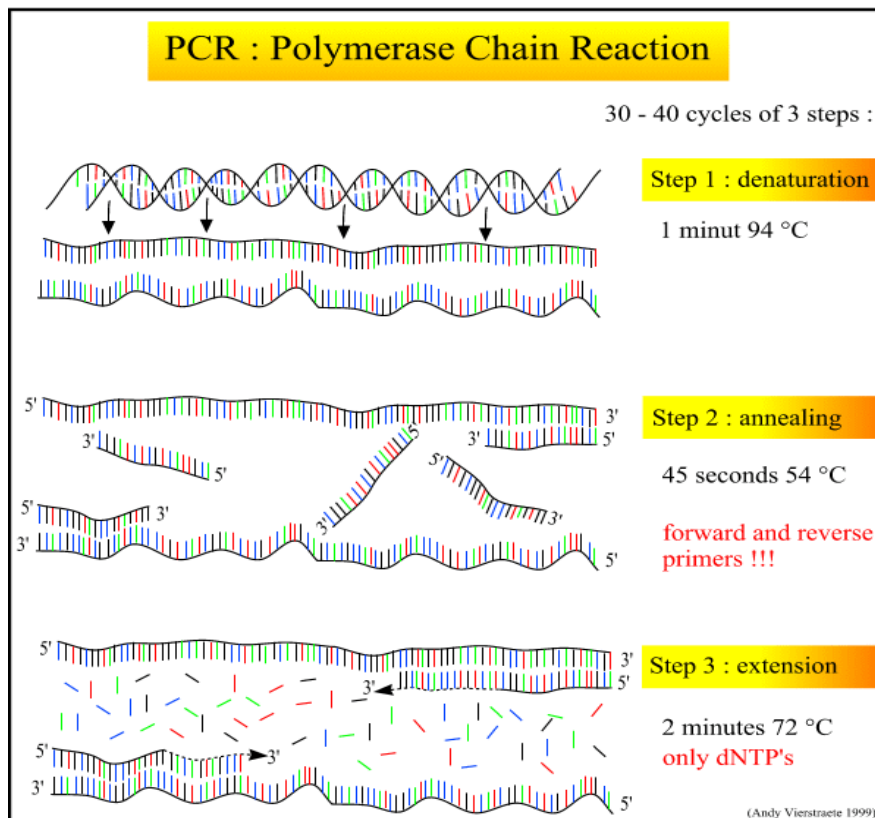
2.5.2 Στάδια κύκλου PCR

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

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

Κατά την διάρκεια του πρώτου σταδίου το τμήμα DNA που μας ενδιαφέρει υποβάλλεται σε θερμοκρασία 94°C προκειμένου να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των αλυσίδων του δίκλωνου αυτού DNA (αποδιάταξη/denaturation, Εικ. 2.5.2.1). Στο δεύτερο στάδιο η θερμοκρασία μειώνεται στους

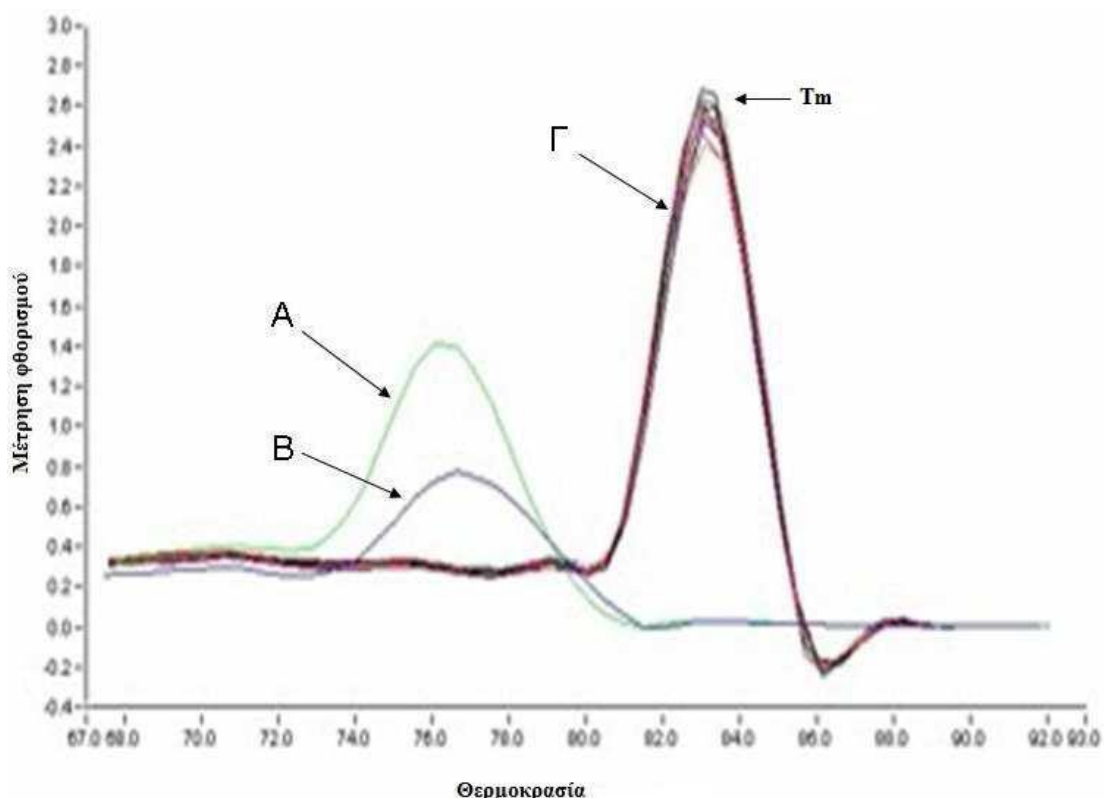
50-60°C και έτσι επιτυγχάνεται η ένωση των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA σε κάθε αλυσίδα (υβριδοποίηση εκκινητών/primer annealing, Εικ. 2.5.2.1). Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C και με την βοήθεια της DNA πολυμεράσης, που προσθέτει τα νουκλεοτίδια (dNTP's) στο 3' άκρο των εκκινητών, επιτυγχάνεται η σύνθεση των νέων συμπληρωματικών αλυσίδων DNA. Η σύνθεση των αντιγράφων γίνεται από την DNA πολυμεράση πάντα με κατεύθυνση 5' προς 3' (Εικ. 2.5.2.1). (Σοφιανός,2011)



Εικόνα 2.5.2.1 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)

2.5.3 ΚΑΜΠΥΛΗ ΑΠΟΔΙΑΤΑΞΗΣ

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



Εικόνα 2.5.3.1 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 2.5.3.1), επειδή για κάθε προϊόν η αποδιάταξη γίνεται σε διαφορετική θερμοκρασία. (Πολίτη, 2012)

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 ΚΑΤΑΛΥΤΗΣ TiO_2



Εικόνα 3.1.1. Καταλύτης TiO_2

Μελετήθηκαν διάφοροι εμπορικά διαθέσιμοι καταλύτες TiO_2 και αυτοί φαίνονται στον παρακάτω πίνακα 3.1.1.1.

Πίνακας 3.1.1.1 Φωτοκαταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Καταλύτης	Πρόσμιξη	Μορφή	BET m^2/g	Μέγεθος σωματιδίου, nm	Προμηθευτής
P25	Όχι	A 75% P 25%	50	21	Degussa AG
Kronos vlp 7000	άνθρακας	A>87.5%	>225	15	Kronos Worldwide

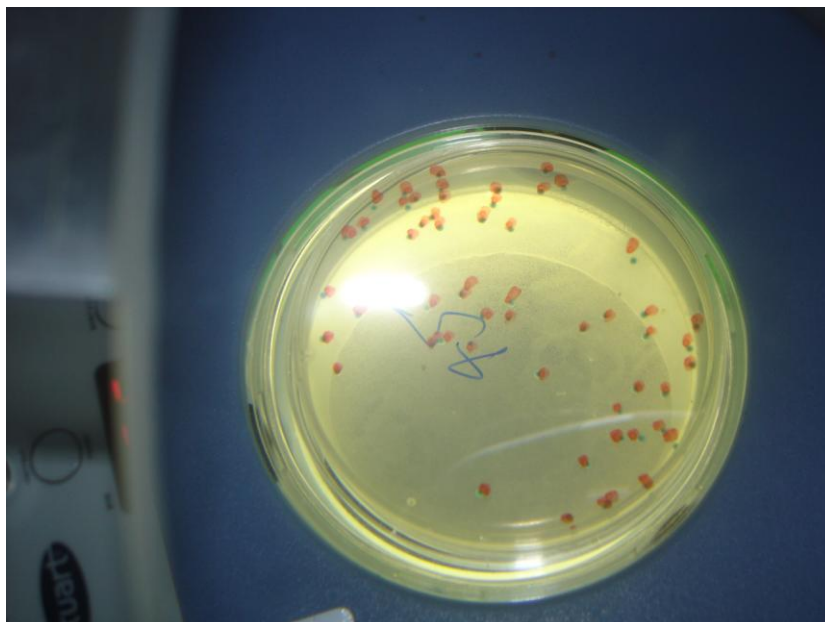
3.1.2 EE2

Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε οιστρογόνο 17α-Αιθινυλοιστραδιόλη – EE2 (17α – ethinylestradiol ή EE2, *p.a.* > 98%, *Fluka*)

3.1.3 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

Nutrient Agar (*Oxoid*)

Hicrome Agar (*Sigma*)



Εικόνα 3.1.3.1 Τριβλίο με Hicrome Agar για θρεπτικό υλικό

3.1.4 ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΟ ΑΠΟΒΛΗΤΟ

Το πραγματικό απόβλητο που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία συλλέχθηκε από την εξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, της εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων του Δ. Χανίων, και πριν την είσοδο του στο στάδιο της χλωρίωσης.

3.1.5 ΠΡΟΤΥΠΟ ΣΤΕΛΕΧΟΣ *E. COLI*

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

3.2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΑ ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ



Εικόνα 3.2.1 Πειραματική διάταξη φωτοκαταλυτικού αντιδραστήρα

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων φωτοκατάλυσης χρησιμοποιήθηκε ως πηγή φωτός η λάμπα Newport 67005 Solar Simulator system ισχύος 150 watt. Η πειραματική διάταξη φαίνεται στην εικόνα 3.2.1 με τη λάμπα solar, τον αντιδραστήρα όγκου 300 mL, ο οποίος είχε στο εσωτερικό του ένα μαγνήτη. Έτσι γινόταν η συνεχής ανάδευση του εκάστοτε μείγματος.

Αρχικά πραγματοποιήθηκε η ανακαλλιέργεια των εκάστοτε βακτηρίων που χρησιμοποιούνταν σε κάθε πείραμα. Για την ανακαλλιέργεια των *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε Nutrient Agar ως θρεπτικό υλικό, μη επιλεκτικό. Στη συνέχεια αφού τα βακτήρια επωζόταν για 24 ώρες στους 37 °C λαμβανόταν μια ποσότητα βακτηρίων, χρησιμοποιώντας κρίκους εμποτισμού και επιμολυνόταν κάθε φορά το αντίστοιχο υδατικό διάλυμα. Το υδατικό διάλυμα ήταν είτε αποστειρωμένο

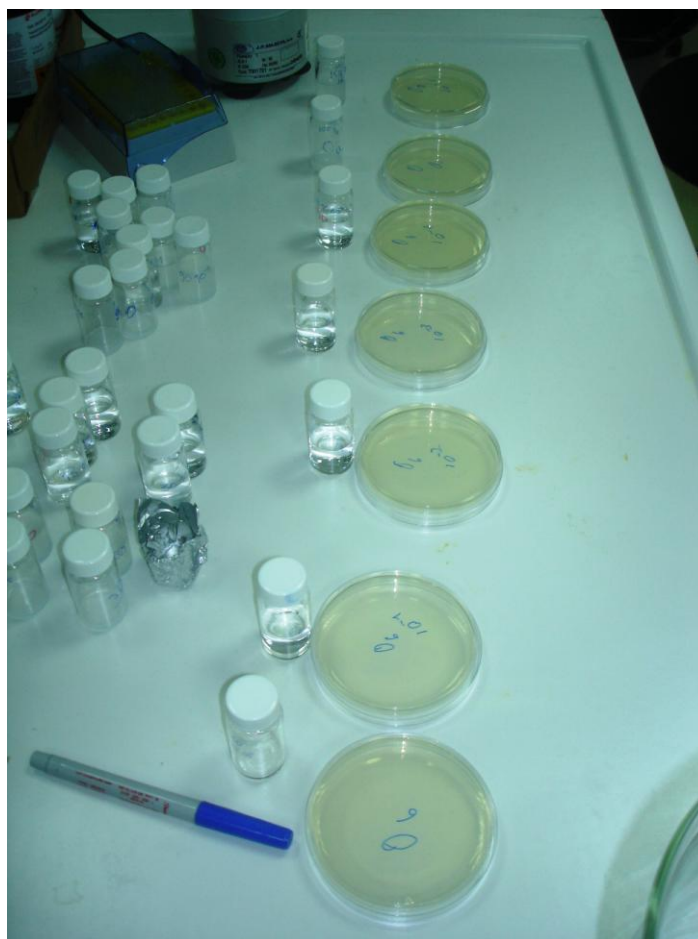
απεσταγμένο υδατικό διάλυμα είτε δείγμα από το βιολογικό καθαρισμό της ΕΕΛ31 Χανίων μετά τη διαδικασία της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα 300 mL με συγκέντρωση αιθινυλοιστραδιόλης [ΕΕ2] =100μg/L και εμποτίστηκε με μερικούς κρίκους από το εκάστοτε βακτήριο και μετρήθηκε η απορρόφηση του. Σύμφωνα με την κλίμακα Mcfarland έπρεπε να κυμαίνεται από 0,05-0,06 ώστε η συγκέντρωση των μικροοργανισμών στα 300 mL να είναι της τάξης των 1000 CFU/mL.

Πριν τοποθετηθεί ο αντιδραστήρας πάνω στον αναδευτήρα έγινε η προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας καταλύτη, ΕΕ2 και βακτηρίων. Στη συνέχεια τοποθετείται ο αντιδραστήρας πάνω στον αναδευτήρα και γίνεται ανάδευση για 30 min ,χωρίς την ενεργοποίηση της λάμπας, ώστε να επιτευχθεί η ισορροπία προσρόφησης/εκρόφησης των βακτηρίων και της ΕΕ2 πάνω στην επιφάνεια του καταλύτη. Στη συνέχεια έγινε ενεργοποίηση της λάμπας ώστε να ξεκινήσει το πείραμα. Η λήψη των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σε χρόνους 15, 30, 45, 60 και 90 min και γινόταν άμεση τοποθέτηση τους στο ψυγείο και σε κυψελίδες για την μετέπειτα τοποθέτηση τους στη στήλη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης. Μετά το πέρας της λήψης των δειγμάτων γινόταν η συλλογή τους από το ψυγείο και η ανάδευση τους με μηχανικό αναδευτήρα τύπου vortex. Έπειτα γινόταν η επίστρωση τους σε τριβλία και πιο συγκεκριμένα 200 μL σε ένα τριβλίο για τα δείγματα 15,30 και 45 min και 200 μL σε 5 τριβλία για τα δείγματα 60 και 90 min. Στη συνέχεια, αφότου τελείωσε η διαδικασία της επίστρωσης τα δείγματα τοποθετούνταν σε επωαστικό θάλαμο για 24 h ώστε να γίνει έπειτα η καταμέτρηση των αποικιών των μικροοργανισμών. Ο αριθμός των μικροοργανισμών έπρεπε να αναχθεί σε ποσότητα δείγματος 1 mL. Οπότε στην περίπτωση του ενός τριβλίου γινόταν πολλαπλασιασμός με το 5 του αριθμού των μικροοργανισμών ώστε να γίνει η αναγωγή τους στο 1 mL ενώ στους χρόνους των 60 και 90 min όπου έγινε επίστρωση σε 5 τριβλία έγινε πρόσθεση τους.

3.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

3.3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ *E. coli*



Εικόνα 3.3.1.1 Καλλιερρητική μέθοδος – Τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων

Η ανίχνευση και η καταμέτρηση του βακτηρίου *E. coli* στο διάλυμα της αντίδρασης πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας την τεχνική των διαδοχικών αραιώσεων και την επίστρωση των δειγμάτων σε θρεπτικό υλικό (καλλιερρητική μέθοδος). Για τη σωστή καταμέτρηση των αποικιών των βακτηρίων, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, κυρίως των 10 λεπτών, λαμβάνεται δείγμα των 4 mL από το υπό επεξεργασία απόβλητο. Το δείγμα αυτό υφίσταται αραιώση σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 mL. Συγκεκριμένα, λαμβάνεται 1 mL από το αρχικό δείγμα το οποίο αναδεύεται με 9 mL αποστειρωμένου υδατικού διαλύματος απιονισμένου νερού. Ακολούθησαν 6 διαδοχικές αραιώσεις για κάθε δείγμα και για καθεμία από τις αραιώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν 200 μ L για την επίστρωσή τους σε θρεπτικό Hicrome Agar και την καταμέτρηση των αποικιών. Τα τριβλία επώστηκαν στους 37°C για 20-24 ώρες πριν την καταμέτρηση των αποικιών. Ο ελάχιστος ανιχνεύσιμος αριθμός των βακτηρίων σε αυτά τα πειράματα ήταν 1 CFU/mL (δεδομένου ότι 1000 μ L ($5 \times 200 \mu$ L) είχαν επιστρωθεί σε κάθε τριβλίο).

Οι αποικίες από τα τριβλία μετρήθηκαν στο όργανο που φαίνεται στην παρακάτω εικόνα 3.3.1.2



Εικόνα 3.3.1.2

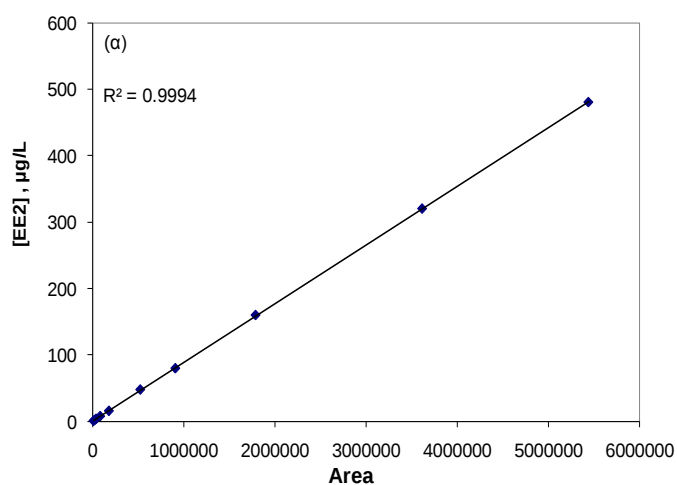
3.4 ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ (HPLC)

Η αναλυτική μεθοδολογία στηρίχθηκε στην υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με ανιχνευτές υπεριώδους – ορατού και φθορισμού (High Performance Liquid Chromatography – UV/Vis Diode Array/Fluorescence, HPLC – DAD/Fluorescence). Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε χρωματογράφο τύπου Alliance 2690 του οίκου Waters ο οποίος φέρει ανιχνευτές UV/Vis Diode Array (2996 PDA Detector) και φθορισμού (474 Scanning Fluorescence Detector). Ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφική στήλη του τύπου Luna C₁₈ με διαστάσεις 250×4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm, στην οποία έχει συνδεθεί προ – στήλη (Security guard) διαστάσεων 4×3 mm επίσης του οίκου Phenomenex. Η στήλη θερμοστατήθηκε στους 30 °C και ο όγκος εισαγωγής του μίγματος ήταν 100 μL. Η κινητή φάση αποτελούνταν από ισοκρατικό μίγμα ακετονιτρίλιου/υπερκάθαρου νερού σε αναλογία 65/35 κατ' όγκο, με ροή 1 mL/min. Η ένωση EE2 ανιχνεύτηκε με τον ανιχνευτή φθορισμού, στον οποίο το μήκος κύματος της διεγείρουσας ακτινοβολίας ήταν 280 nm, ενώ το μήκος κύματος της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας ήταν 305 nm. Ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 7 λεπτά. Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης, πρότυπα διαλύματα της ουσίας EE2 συγκέντρωσης 100 mg/L σε ακετονιτρίλιο αραιώθηκαν με υπερκάθαρο νερό σε συγκεντρώσεις που κυμάνθηκαν από 1 έως 480 μg/L. Όλα τα πρότυπα διαλύματα αναλύθηκαν δύο φορές και λήφθηκε ο μέσος όρος των δύο τιμών. Στον Πίνακα 3.4.1 δίνονται οι χρόνοι συγκράτησης των ουσιών, t_R , καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των οιστρογόνων και της BPA. Επιπλέον, στο Σχήμα 3.4.2 δίνεται η καμπύλη βαθμονόμησης για την EE2 (Φροντιστής, 2011).

Πίνακας 3.4.1 Χρόνοι συγκράτησης, t_R , όρια ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και όρια ποσοτικοποίησης (Limit of Quantitation, LOQ) των ενδοκρινικών διαταρακτών (Φροντιστής, 2011).

	Οιστρόνη (E1)	17β – Οιστραδιόλη (E2)	17α – Αιθινυλ – οιστραδιόλη (EE2)	Δισφαινόλη Α (BPA)
t_R , λεπτά	5.716	4.664	5.126	4.334
LOD, $\mu\text{g/L}$	2.95	1.95	2.11	2.32
LOQ, $\mu\text{g/L}$	9.83	0.59	0.63	0.68

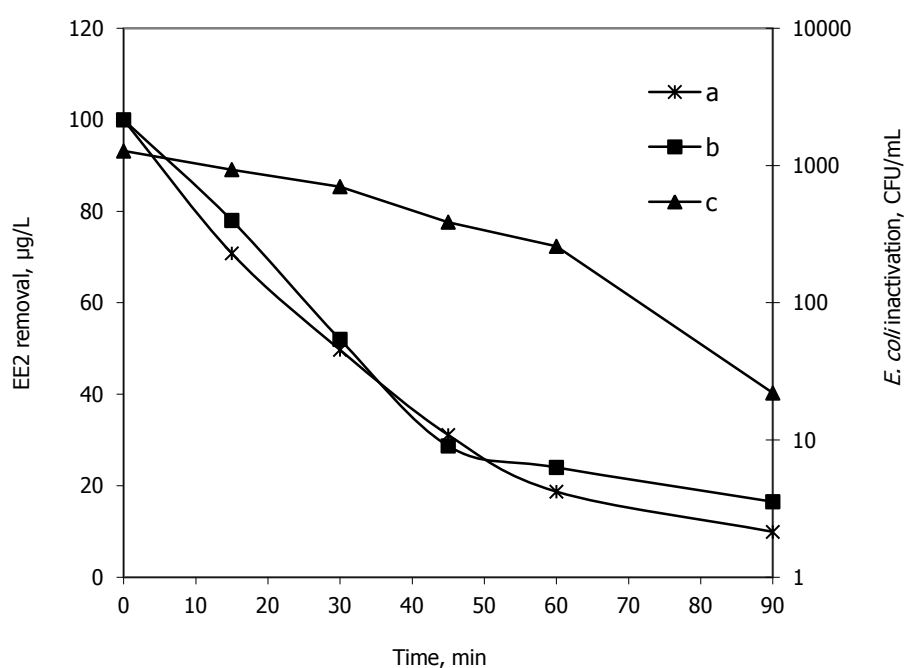
Σχήμα 3.4.2 Καμπύλη βαθμονόμησης (α) EE2 (Φροντιστής, 2011).



4. Συζήτηση – Αποτελέσματα

4.1. Απόδοση ηλιακής φωτοκατάλυσης

Αρχικά, διερευνήθηκε η ικανότητα της ηλιακής ακτινοβολίας να διασπά και να αδρανοποιεί συγχρόνως την οργανική ένωση EE2 και τα παθογόνα βακτήρια *E. coli*. Για αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν πειράματα φωτοκατάλυσης και τα αποτελέσματα φαίνονται στο διάγραμμα 4.1. Παρατηρήθηκε ότι η απομάκρυνση της EE2 είναι περίπου ίδια και στις 2 περιπτώσεις, δηλαδή α) στην παρουσία EE2 μόνη της στο υδατικό διάλυμα αποβλήτου, και b) στην παρουσία EE2 και βακτηρίων στο υδατικό διάλυμα αποβλήτου.



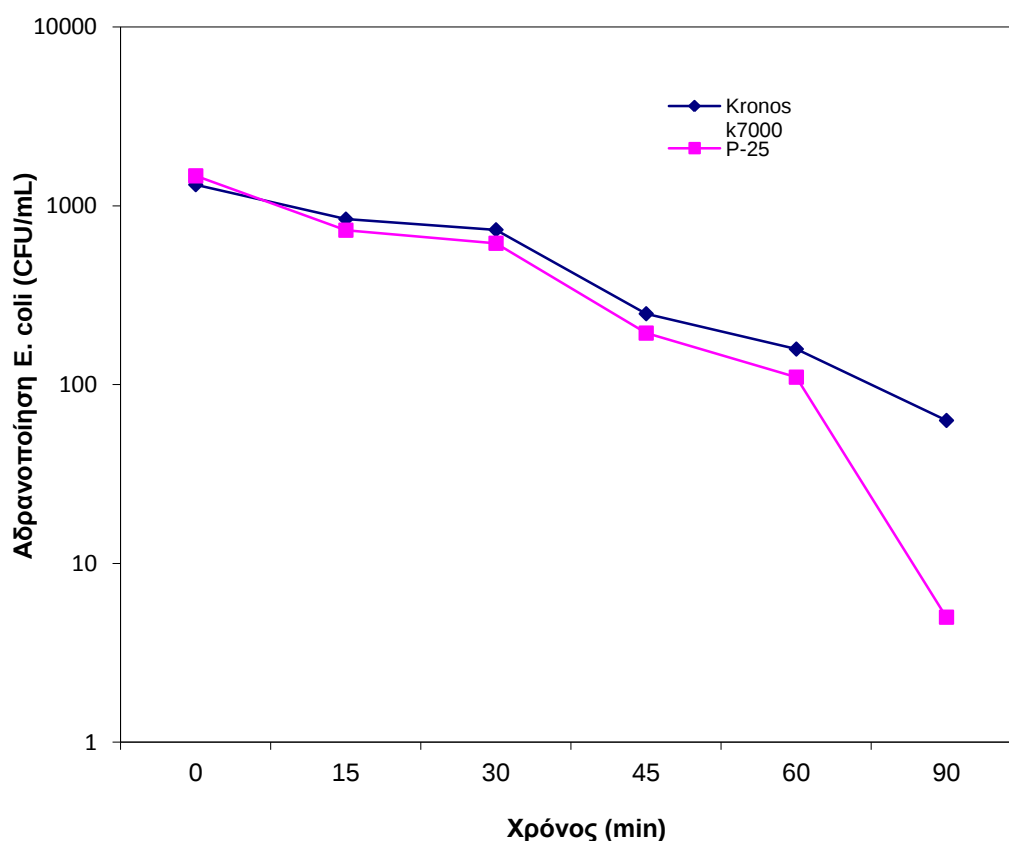
Διάγραμμα 4.1. Απόδοση φωτοκατάλυσης υπό την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας. (a) απομάκρυνση της EE2 από συνθετικό απόβλητο επιμολυσμένο με 100 µg/L EE2, (b) απομάκρυνση της EE2 από συνθετικό απόβλητο επιμολυσμένο με 100 µg/L EE2 και 10^3 CFU/mL *E. coli*, και (c) αδρανοποίηση των *E. coli* σε συνθετικό επιμολυσμένο με 100 µg/L EE2 και 10^3 CFU/mL *E. coli*.

Επίσης, φαίνεται στο διάγραμμα 4.1 ότι η ηλιακή ακτινοβολία μπορεί αποτελεσματικά μετά από 90 min φωτοκαταλυτικής διεργασίας να αποδομήσει την EE2 κατά περίπου 90%.

Ωστόσο, η απολύμανση του υδατικού διαλύματος απαιτεί περισσότερο από 90 min ηλιακής φωτοκατάλυσης. Παρατηρείται ότι μετά από 90 min φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας οι εναπομείνουσες αποικίες των βακτηρίων *E. coli* είναι 22 CFU/mL.

Επομένως, από τα προκαταρκτικά αυτά πειράματα φαίνεται ότι η ηλιακή ακτινοβολία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σαν τριτοβάθμια επεξεργασία σε μονάδες επεξεργασίας λυμάτων. Ωστόσο, είναι απαραίτητη η περαιτέρω βελτιστοποίηση της διαδικασίας όσον αφορά στις παραμέτρους λειτουργίας του συστήματος. Αυτές μπορεί να είναι ο τύπος και η συγκέντρωση του καταλύτη, ο χρόνος της επεξεργασίας και άλλες οι οποίες και μελετούνται παρακάτω.

4.2. Επίδραση του τύπου του καταλύτη



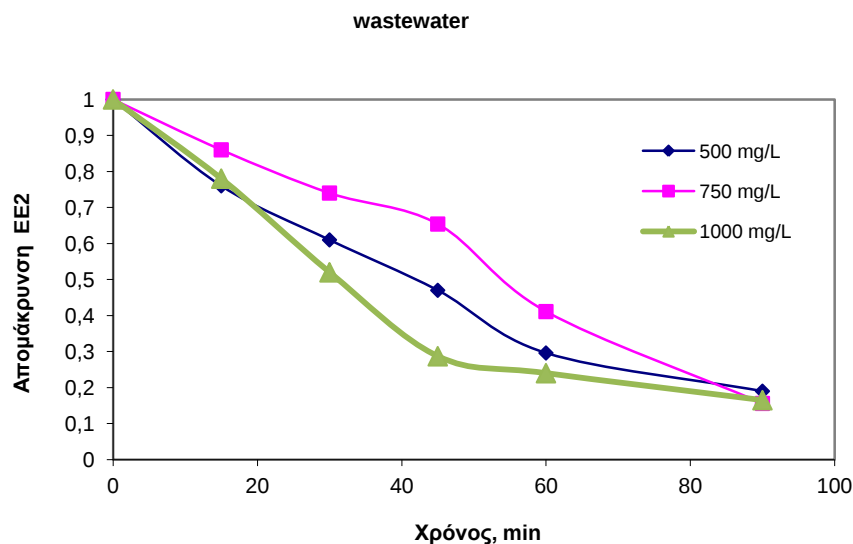
Διάγραμμα 4.2. Αδρανοποίηση *E. coli* υπό την επίδραση δύο διαφορετικών καταλυτών: Kronos k7000, P-25

Διερευνήθηκε και η επίδραση του τύπου του καταλύτη. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν ίδιες συγκεντρώσεις από διαφορετικούς τύπους καταλύτη για να γίνει αυτή η σύγκριση. Οι τύποι καταλύτη αναφέρονται στο πειραματικό μέρος και παρατηρείται ότι ο Degussa-Evonik P-25 είναι πιο αποτελεσματικός από τον Kronos nlr 7000 της εταιρείας Kronos Worldwide όπως φαίνεται στο παραπάνω διάγραμμα 4.2. Παρόλο που ο καταλύτης Kronos nlr 7000 θα έπρεπε να εμφανίζει

υψηλότερη απόδοση υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας, καθώς είναι εμπλουτισμένος με άνθρακα για να απορροφά στην περιοχή του ορατού ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, εντούτοις αυτό δεν ισχύει στην προκειμένη περίπτωση. Η φωτοκαταλυτική δραστηριότητα του P-25 είναι τόσο υψηλή που, παρόλο που απορροφά μόνο στην περιοχή του υπεριώδους (UV) ηλεκτρομαγνητικού φάσματος, έχει την ικανότητα να αδρανοποιεί ικανοποιητικά τα βακτήρια ακόμα και υπό την επίδραση ηλιακής ακτινοβολίας. Η ηλιακή ακτινοβολία αποτελείται κατά περίπου 5% από UVA, 45% ορατή και 50% υπέρυθρη ακτινοβολία.

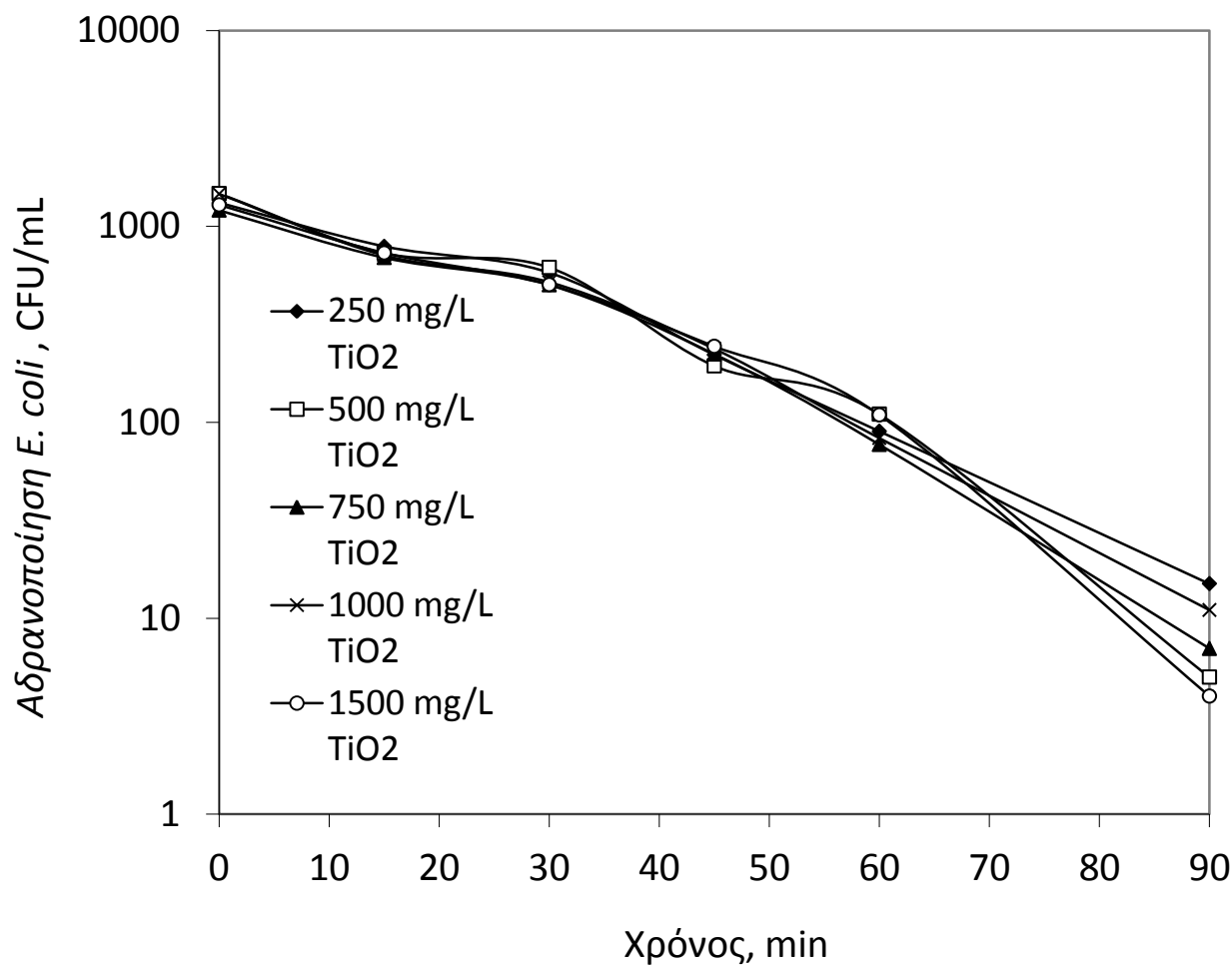
4.3. Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη

Όπως έχει αναφερθεί και στο Θεωρητικό μέρος, γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη, μέχρι μια βέλτιστη τιμή προκαλεί βελτίωση της δραστηριότητας της διεργασίας της φωτοκατάλυσης. Αυτό οφείλεται στην αύξηση της διαθεσιμότητας ενεργών κέντρων του καταλύτη. Ωστόσο, όταν η βέλτιστη αυτή συγκέντρωση ξεπεραστεί, η περίσσεια καταλύτη αρχικά δεν μεταβάλει και στη συνέχεια μειώνει την ενέργεια που μεταφέρεται στα σωματίδια, λόγω της θολότητας που αυτά προκαλούν. Έχει επίσης παρατηρηθεί και καθίζηση του φωτοκαταλύτη σε περίπτωση υπερβολικής φόρτισης.

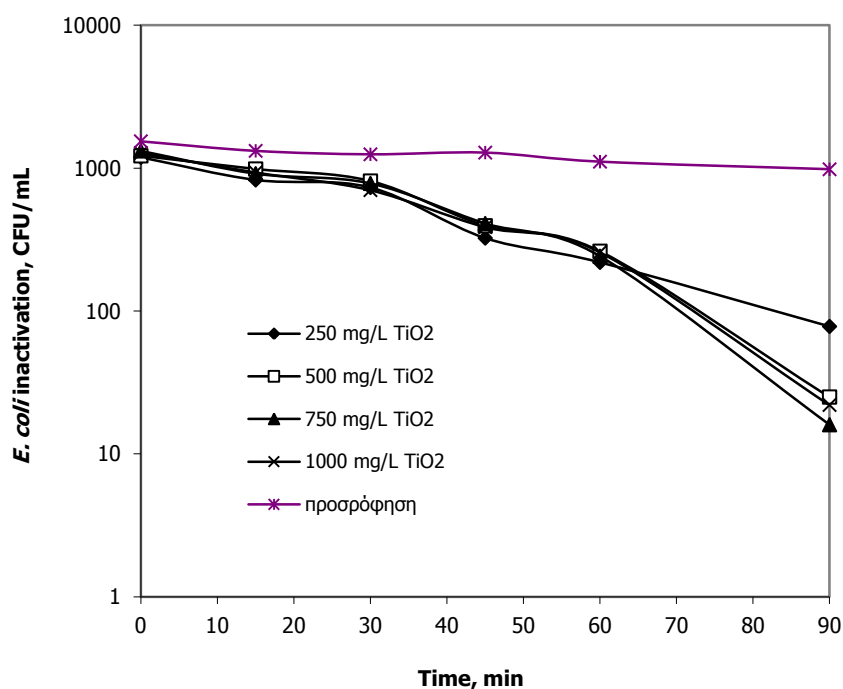


Διάγραμμα 4.3 Απομάκρυνση EE2 υπό την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων καταλύτη TiO_2 σε πραγματικό απόβλητο

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, όσον αφορά στην ΕΕ2, παρατηρείται ότι το τελικό αποτέλεσμα είναι το ίδιο στον επιθυμητό χρόνο ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης καταλύτη TiO_2 (από μια συγκέντρωση και μετά).



Διάγραμμα 4.4 Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη στην απόδοση της απολύμανσης με φωτοκατάλυση σε συνθετικό απόβλητο.



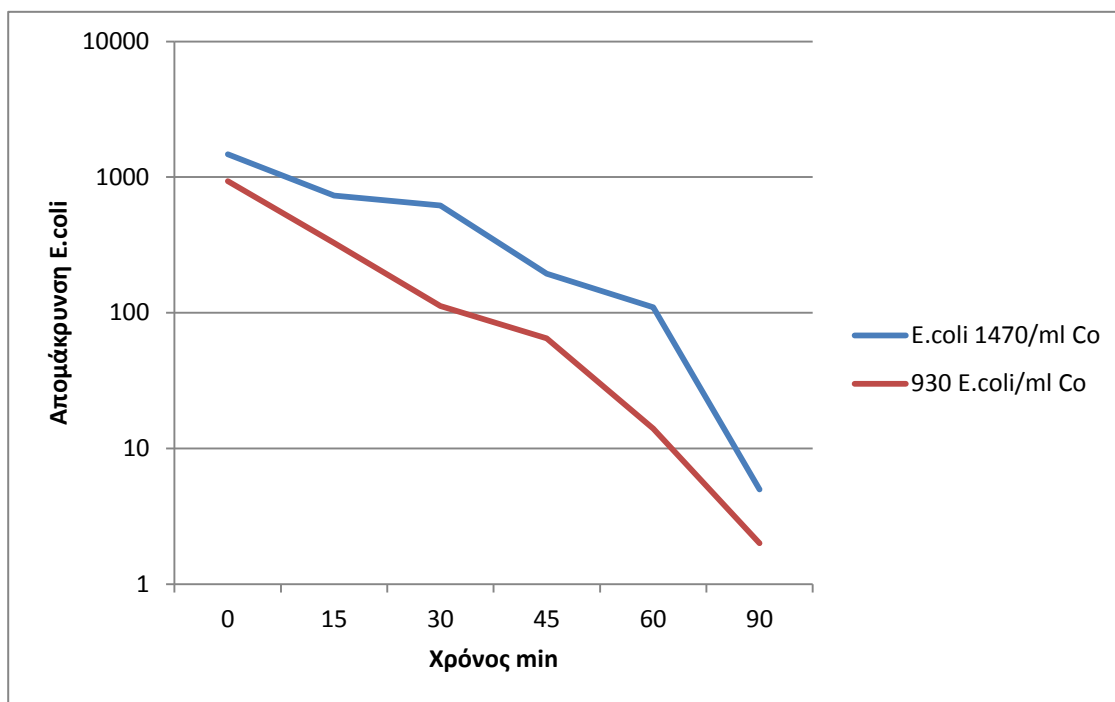
Διάγραμμα 4.5 Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη στην απόδοση της απολύμανσης με φωτοκατάλυση σε πραγματικό απόβλητο. (επίσης φαίνεται και η πορεία της αντίδρασης χωρίς καταλύτη)

Διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη στην απόδοση της απολύμανσης με φωτοκατάλυση σε συνθετικό και πραγματικό απόβλητο. Παρατηρείται ότι μετά από μια ορισμένη συγκέντρωση καταλύτη το αποτέλεσμα είναι σχεδόν ίδιο και στις δύο περιπτώσεις. Ειδικά στην περίπτωση του συνθετικού αποβλήτου με αύξηση του καταλύτη πάνω από 500 mg/L, αν δε μειώνεται, παραμένει σταθερή η απόδοση της διεργασίας όπως ήταν αναμενόμενο.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.5 από τη γραμμή της προσρόφησης η διεργασία δεν είναι αποτελεσματική χωρίς την παρουσία καταλύτη. Επίσης, παρατηρείται ότι το ποσοστό της προσρόφησης των βακτηρίων στην επιφάνεια του καταλύτη δεν είναι πολύ μεγάλο, καθώς ο πληθυσμός των βακτηρίων στην υδατική φάση έχει μειωθεί ελάχιστα μετά από 90 min ανάμιξης, απουσία φωτός.

Τα συμπεράσματα που βγαίνουν είναι ότι η απολύμανση από τα ολικά βακτήρια δεν μπορεί να επιτευχθεί σε 90 λεπτά φωτοκαταλυτικής διεργασίας. Τέλος, ο ρυθμός απολύμανσης είναι μικρός για πραγματικά λύματα πιθανότατα λόγω της πολυπλοκότητας του πραγματικού λύματος που οφείλεται στην παρουσία άλλων μικροοργανισμών, οργανικών και ανόργανων ενώσεων.

4.4. Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των *E. Coli*

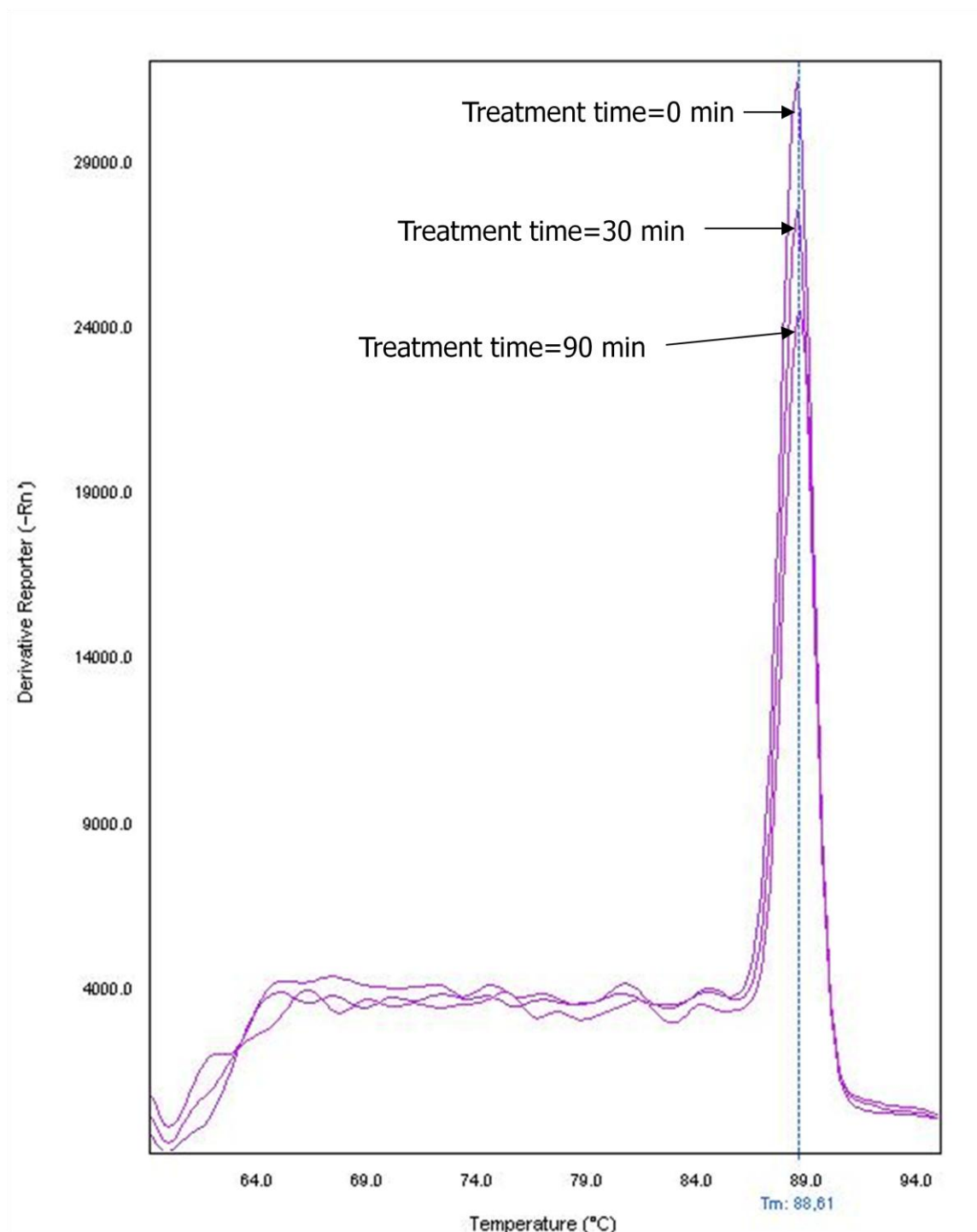


Διάγραμμα 4.6 Επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των *E.coli* στην απόδοση της ηλιακής φωτοκατάλυσης (συνθετικό διάλυμα)

Στο παραπάνω διάγραμμα μελετήθηκε η επίδραση της αρχικής συγκέντρωσης των *E. coli* στην απόδοση της ηλιακής φωτοκατάλυσης. Για αυτό το σκοπό πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα στα οποία τοποθετήθηκε στο υδατικό διάλυμα διαφορετική αρχική συγκέντρωση *E. coli*. Στο πρώτο πείραμα η αρχική συγκέντρωση ήταν 1470 CFU/ml και στο δεύτερο ήταν 930 CFU/ml.

Όπως μπορεί να συμπεράνει κανείς από τα αποτελέσματα τα οποία φαίνονται στα διάγραμμα 4.6 η αρχική συγκέντρωση των *E. coli* δεν επηρεάζει την τελική απόδοση της διεργασίας.

4.5. Μετρήσεις real-time PCR



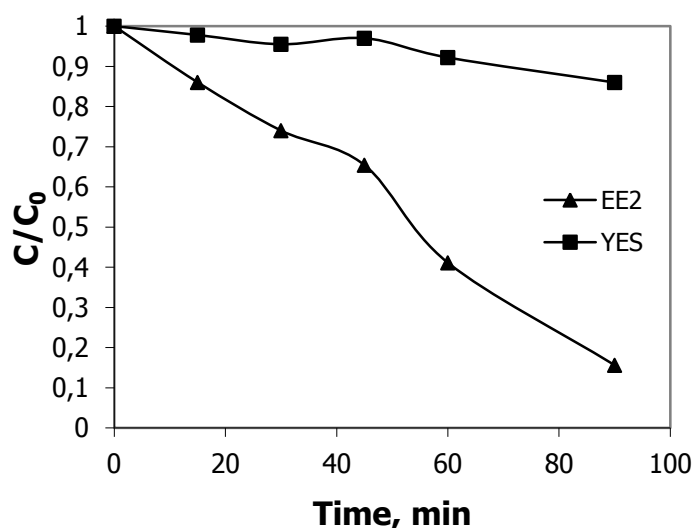
Διάγραμμα 4.5.1 Καμπύλες αποδιάταξης σε πραγματικό χρόνο για συνθετικά δείγματα υγρών αποβλήτων κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής διεργασίας, στην παρουσία των 100 $\mu\text{g} / \text{L}$ EE2.

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ορμόνη EE2 μπορεί να διαταράξει το ενδοκρινικό σύστημα και το μεταβολισμό των οργανισμών. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη μέθοδο της real-time PCR ώστε να διερευνηθεί κατά πόσον η παρουσία της ορμόνης επηρεάζει το DNA των *E. coli*.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 4.5.1 η θερμοκρασία αποδιάταξης (T_m) των *E. coli* εμφανίζεται στους 88,61 °C. Επίσης παρατηρείται ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση ή αλλοίωση του γενετικού υλικού των βακτηρίων καθώς η θερμοκρασία αποδιάταξης παραμένει σταθερή μετά από 90 min φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας του αποβλήτου. Σε περίπτωση μόλυνσης ή αλλοίωσης, DNA προσμίξεως ή άλλα διμερή θα εμφανίζονταν σαν πρόσθετη κορυφή ξεχωριστή από τη βασική κορυφή. Συνεπώς, δεν υπάρχουν γενετικές μεταλλάξεις ή αλλοιώσεις στο DNA των *E. coli* κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής διεργασίας.

Επομένως η παρουσία της ορμόνης EE2 δε προκαλεί αλλοιώσεις ή μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό των βακτηρίων στο σύντομο χρονικό διάστημα των 90 min.

4.6. Μετρήσεις οιστρογονικότητας



Διάγραμμα 4.6.1. Ρυθμός απομάκρυνσης της οιστρογονικότητας (YES) και της EE2 από πραγματικό απόβλητο.

Έρευνες έχουν αποδείξει ότι η ορμόνη EE2 μπορεί να διαταράξει το ενδοκρινικό σύστημα και το μεταβολισμό των οργανισμών. Γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις με τη μέθοδο της

Yeast Estrogen Screening Test (YES) (Φροντιστής,2011) ώστε να διερευνηθεί η οιστρογονικότητα του πραγματικού αποβλήτου κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής διεργασίας.

Στο διάγραμμα 4.6.1. παρατηρείται ότι, αν και η EE2 αποδομείται κατά περίπου 85%, μετά από 90 min φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας, η οιστρογονική δραστηριότητα του δείγματος λυμάτων παραμένει σε υψηλές τιμές. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι (α) υπάρχουν και άλλες οργανικές ουσίες ή παραπροϊόντα από τη διάσπαση της EE2 στο διάλυμα αποβλήτου που συνεισφέρουν σημαντικά στην οιστρογονική δραστηριότητα των λυμάτων και (β) υπάρχουν εκκρίσεις από τους μικροοργανισμούς που έχουν εκτεθεί στην EE2, οι οποίες πιθανώς να συνεισφέρουν και αυτές στην οιστρογονική δράση του υδατικού δείγματος.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε κυρίως η απομάκρυνση των βακτηρίων *E. coli* από συνθετικά και πραγματικά απόβλητα παρουσία της συνθετικής ορμόνης 17α-Αιθινυλοιστραδιόλη – EE2. Τα συμπεράσματα που προέκυψαν είναι τα εξής :

- ✓ Ο ρυθμός απολύμανσης είναι χαμηλότερος για πραγματικά λύματα, πιθανότατα λόγω της πολυπλοκότητας των πραγματικών περιβαλλοντικών δειγμάτων όσον αφορά στην παρουσία άλλων μικροοργανισμών, όπως και ανόργανων και οργανικών ενώσεων στο απόβλητο.
- ✓ Ο καταλύτης P-25 Degussa-Evonik είναι πιο αποτελεσματικός από τον Kronos nlp 7000 ως προς τη φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση των *E. coli*, υπό την παρουσία ηλιακής ακτινοβολίας.
- ✓ Η αρχική συγκέντρωση των *E. coli* δεν επηρεάζει την τελική απόδοση της φωτοκαταλυτικής επεξεργασίας του αποβλήτου.
- ✓ Δεν υπάρχουν γενετικές αλλαγές ή αλλοιώσεις στο DNA των βακτηρίων των *E. coli* κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής τους επεξεργασίας, παρουσία της EE2, σε συνθετικό λύμα.
- ✓ Υπάρχουν άλλες οργανικές ουσίες ή παραπροϊόντα αποδόμησης της EE2 στο διάλυμα, τα οποία συνεισφέρουν σημαντικά στην οιστρογονική δραστηριότητα.
- ✓ Η ηλιακή ακτινοβολία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σαν τριτοβάθμια επεξεργασία λυμάτων, με την προϋπόθεση τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας όσον αφορά στις παραμέτρους της (δηλαδή τον τύπο του καταλύτη και τη συγκέντρωσή του καθώς και το χρόνο διεργασίας).

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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.

Δραγανίγος Β., Ετερογενής φωτοκαταλυτική διάσπαση της συνθετικής ορμόνης EE2 στο νερό, Μάρτιος 2009.

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.

Κωσταδήμα Μ. (2011), *ΗΛΙΑΚΗ ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΟΙΣΤΡΟΓΟΝΩΝ: ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΗΜΙΑΓΩΓΩΝ*, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

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.

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

Πολίτη Ν. (2012), *ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΛΥΣΗ ΚΑΙ ΦΩΤΟΗΛΕΚΤΡΟΚΑΤΑΛΥΣΗ*, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

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

Σοφιανός Σ. (2011), *ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΛΥΜΑΤΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΦΩΤΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ ΚΑΙ ΦΩΤΟΗΛΕΚΤΡΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ*, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Φροντιστής Ζ., Διδακτορική Διατριβή, Απομάκρυνση διαταρακτών ενδοκρινικής δράσης από την υδατική φάση με την χρήση προχωρημένων διεργασιών οξείδωσης, Χανιά 2011.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abellan, M.N., Gimenez, J. and Esplugas, S. (2009) Photocatalytic degradation of antibiotics: The case of sulfamethoxazole and trimethoprim. *Catalysis Today* 144(1-2), 131-136.

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

Birkett, J.W. and Lester, J.N. (2003) Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes, CRC.

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

Chang H.S., Choo K.H., Lee B., Choi S.J., The methods of identification, analysis and removal of endocrine disrupting compounds (EDC's) in water. *Journal of Hazardous Materials* 172, 1-12, 2009.

Herrmann, J.M. (2010) Fundamentals and misconceptions in photocatalysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*.216 (3), 85-93

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

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

McCullagh, Robertson, Bahneman, The applications of TiO₂ photocatalysis for disinfection of water contaminated with pathogenic micro-organisms: a review, *Res. Chem.Intermed.*,Vol. 33, (2007)

Palaologou A., Marakas H., Xekoukoulotakis N., Moya A., Vergara Y., Kalogerakis N., Gikas P., Mantzavinos D. (2007), *Disinfection of water and wastewater by TiO₂ photocatalysis, sonolysis and UV-C irradiation*, *Catal. Today*.

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

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