



**«Αποτελεσματικότητα μεθόδων απολύμανσης όσον
αφορά στην αδρανοποίηση βακτηρίων του υδάτινου
περιβάλλοντος»**

Διπλωματική εργασία

Ευαγγελία Καλέμη

Εξεταστική επιτροπή

Βενιέρη Δανάη (Επιβλέπουσα)

Διαμαντόπουλος Ευάγγελος

Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος

Χανιά,

Οκτώβριος 2015

Ευχαριστίες

Πέρασαν έξι όμορφα χρόνια στο Πολυτεχνείο Κρήτης και ακόμη δεν μπορώ να πιστέψω ότι έφτασε το τέλος. Ειδικά τον τελευταίο χρόνο, στάθηκα πολύ τυχερή να δουλέψω με ανθρώπους που με έμαθαν να συνεργάζομαι και να μην εγκαταλείπω ποτέ τους στόχους μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Βενιέρη Δανάη που μου πρότεινε ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα και μου έδωσε την ευκαιρία να δώ στην πράξη πολλά πράγματα που διάβαζα όλα αυτά τα χρόνια. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου την κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα που ήταν δίπλα μου κάθε στιγμή με επιμονή και κυρίως υπομονή, πάντα πρόθυμη να μου διδάξει και να με κάνει να αγαπήσω αυτό που κάνω. Ευχαριστώ τους φίλους αλλά και συναδέλφους μου στο εργαστήριο, Νιάρχο Γιώργο και Χατζηβγέρη Αργυρώ, για την όμορφη συνεργασία που είχαμε και για όλα όσα έμαθα από αυτούς. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου που με στήριζαν όλα αυτά τα χρόνια με κάθε τρόπο· χωρίς αυτούς δεν θα ήμουν εδώ που είμαι τώρα.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της χλωρίωσης και της φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA σε μικροοργανισμούς που συλλέχθηκαν από διάφορα είδη του υδάτινου περιβάλλοντος, όπως: θαλασσινό νερό, νερό λίμνης και ποταμού, πόσιμο νερό, λύμα εισόδου και λύμα εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού καθώς και νερό πισίνας. Η δειγματοληψία που πραγματοποιήθηκε περιλάμβανε 22 υδατικά δείγματα τα οποία συλλέχθηκαν σε διάρκεια τριών μηνών (Μάιος, Σεπτέμβριος, Οκτώβριος 2014). Απομονώθηκαν ορισμένες αποικίες οι οποίες υποβλήθηκαν σε βιοχημικά *apri tests*. Τα είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Pseudomonas cepacia*, *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus lentus*, *Staphylococcus caprae*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Raoultella ornitholytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia odorifera*.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε έλεγχος αδρανοποίησης 28, συνολικά, βακτηρίων σε υδατική μήτρα. Αρχικά, εφαρμόστηκε απολύμανση με NaOCl συγκέντρωσης 0,3 mg/L ως προς Cl₂ συνολικής διάρκειας 45 min. Το κριτήριο με το οποίο έγινε η επιλογή των βακτηρίων που θα υποβάλλονταν σε χλωρίωση ήταν η προέλευση και το είδος ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου πάνω σε ένα συγκεκριμένο είδος όπως πχ. *Staphylococcus lentus* που μπορεί να προέρχεται από θαλασσινό νερό ή νερό πισίνας.

Τα βακτήρια που παρουσίασαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα υποβλήθηκαν και στη μέθοδο της φωτοκατάλυσης με UVA ακτινοβολία παρουσία καταλύτη TiO₂ συγκέντρωσης 50mg/L για συνολική χρονική διάρκεια 45 min.

Τα αποτελέσματα έδειξαν να επηρεάζονται τόσο από το είδος όσο και από το περιβάλλον από το οποίο απομονώθηκαν τα βακτήρια, γεγονός που κέντρισε το ενδιαφέρον ως προς τη μελέτη πιθανών μεταλλάξεων των γονιδίων τους. Έτσι, τα βακτήρια που υποβλήθηκαν και στις δύο μεθόδους απολύμανσης εξετάστηκαν ως προς γενετικούς πολυμορφισμούς με την μέθοδο RAPD – PCR.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	1
Περίληψη	2
1. Εισαγωγή	5
1.1. Μικροοργανισμοί στο υδάτινο περιβάλλον	5
1.1.1. Μικροβιολογία υδάτινου περιβάλλοντος.....	5
1.1.2. Ταξινόμηση των βακτηρίων.....	5
1.1.3. Είδη σχέσεων των μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον	7
1.1.4. Μικροοργανισμοί - δείκτες που καθορίζουν την ποιότητα των υδάτων.....	8
1.2. Απολύμανση	9
1.2.1. Γενικά.....	9
1.2.2. Μέσα και μέθοδοι απολύμανσης	9
1.2.3. Μηχανισμοί των απολυμαντικών.....	9
1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη χρήση των απολυμαντικών	9
1.2.5. Νόμος του Chick.....	12
1.2.6. Χλωρίωση	13
1.2.6.1. Αντιδράσεις του χλωρίου με το νερό.....	13
1.2.6.2. Πλεονεκτήματα της χλωρίωσης.....	14
1.2.6.3. Μειονεκτήματα της χλωρίωσης	14
1.2.6.4. Παραπροϊόντα χλωρίωσης.....	14
1.2.7. Οζόνωση	16
1.2.7.1. Πλεονεκτήματα της οζόνωσης.....	16
1.2.7.2. Μειονεκτήματα της οζόνωσης.....	16
1.2.8. Απολύμανση με χρήση ακτινοβολίας UVA.....	16
1.2.8.1. Προσδιορισμός της δόσης ακτινοβολίας	17
1.2.8.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της απολύμανσης με ακτινοβολία UVA.....	17
1.2.9. Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης	17
1.2.9.1. Φωτοκατάλυση	18
1.2.9.2. Ετερογενής φωτοκατάλυση με UVA ακτινοβολία	18
2. Σκοπός.....	21
3. Υλικά και μέθοδοι.....	22
3.1. Υλικά	22
3.1.1. Θρεπτικά υλικά απομόνωσης μικροοργανισμών	22

3.1.2. Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν	22
3.1.3. Διαλύματα που παρασκευάστηκαν	23
3.1.4. Καταλύτες	23
3.1.5. Άλλα υλικά/όργανα που χρησιμοποιήθηκαν.....	23
3.2. Μέθοδοι	24
3.2.1. Απομόνωση βακτηρίων.....	24
3.2.2. Πρωτόκολλα ανάλυσης δείγματος νερού για την ανίχνευση μικροοργανισμών	26
3.2.3. Βιοχημικά api tests ταυτοποίησης μικροοργανισμών	28
3.3. Μεθοδολογίες απολύμανσης.....	30
3.3.1. Χλωρίωση	30
3.3.2. Φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA	33
3.4. RAPD – PCR	34
3.4.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού Gram+ & Gram- βακτηρίων.....	34
3.4.2. Φωτομέτρηση.....	35
3.4.3. RAPD-PCR	35
4. Αποτελέσματα.....	38
4.1. Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών με τα Api ® Tests.....	38
4.1.1. Api ® 20 NE TM : Gram+ βακτήρια	38
4.1.2. Api ® 20 E TM : Gram- βακτήρια.....	39
4.1.3. Api ® Staph	40
4.1.4. Api ® Strep	41
4.1.5. Αποτελεσματικότητα των Api® tests ως προς το ποσοστό ταυτοποίησης.....	42
4.2. Ομαδοποίηση των βακτηρίων βάσει οικογένειας	42
4.3. Χλωρίωση	44
4.4. Φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA	55
4.5. Φωτοενεργοποίηση	61
4.6. RAPD-PCR	63
4.6.1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την RAPD	64
5. Συμπεράσματα	72
5.1. Σύγκριση χλωρίωσης και φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA	72
5.2. RAPD – PCR	73
6. Παράρτημα.....	75
7. Βιβλιογραφία	76

1. Εισαγωγή

1.1. Μικροοργανισμοί στο υδάτινο περιβάλλον

1.1.1. Μικροβιολογία υδάτινου περιβάλλοντος

Τα φυσικά νερά περιέχουν ποικιλία μικροοργανισμών, οι περισσότεροι από τους οποίους αποτελούν μέρος της φυσικής χλωρίδας του νερού. Οι πηγές από τις οποίες οδηγούνται στα φυσικά νερά είναι φαινόμενα όπως βροχές, κατολισθήσεις κ.α. αλλά και πηγές ανθρώπινης προέλευσης όπως απόβλητα, αστικά λύματα κ.α. Η κατάταξη των μικροοργανισμών ως προς την επίδρασή τους στον άνθρωπο μπορεί να γίνει ως εξής (Βενιέρη, 2010):

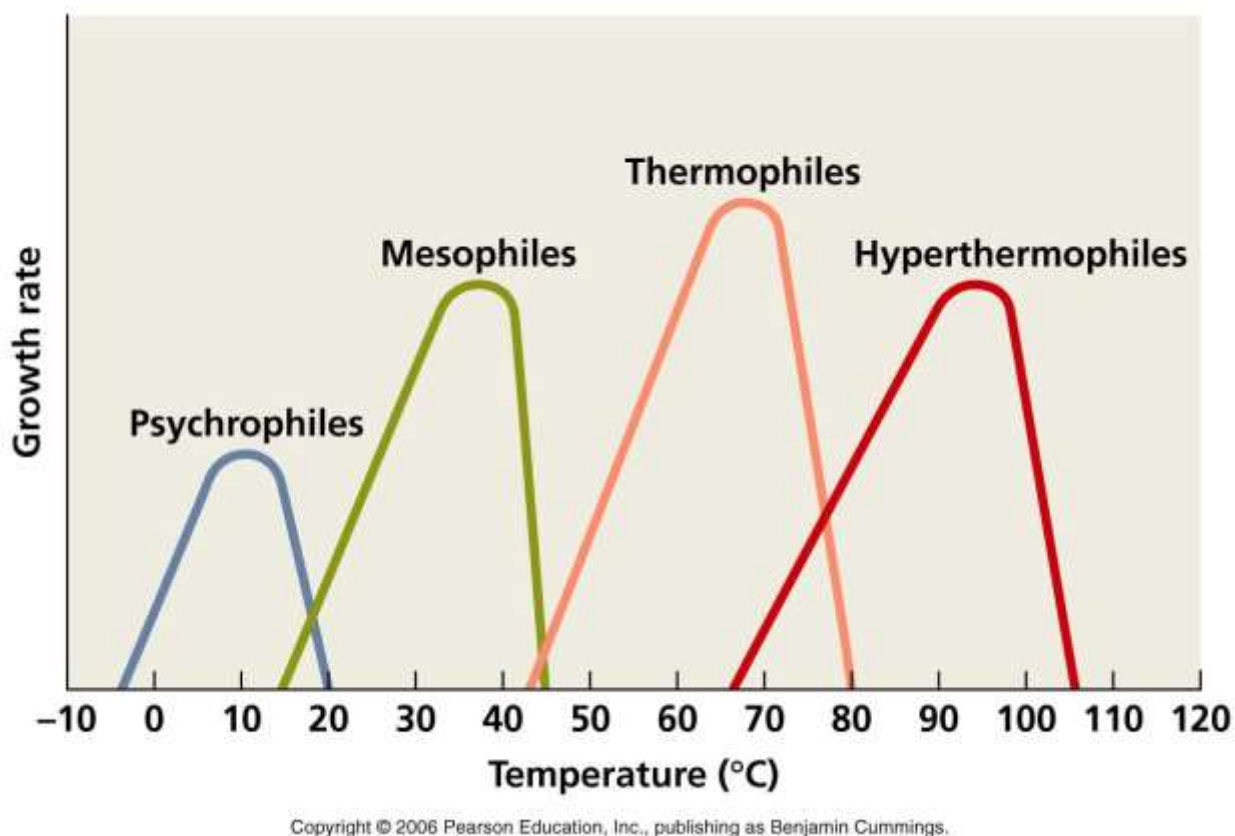
- Μικροοργανισμοί που συμβιώνουν με τον άνθρωπο και επιδρούν θετικά στον ανθρώπινο μεταβολισμό. Αν αυτοί αποικίσουν στον ανθρώπινο οργανισμό θα αποτελέσουν μέρος της φυσικής του χλωρίδας.
- Παθογόνοι μικροοργανισμοί οι οποίοι αν βρουν οδούς εισόδου και μηχανισμούς εγκατάστασης στο σώμα μπορούν να προκαλέσουν νόσο.
- Δυνητικά παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι μπορεί να αποτελούν φυσική χλωρίδα για ορισμένους ανθρώπους και είναι παθογόνοι για ορισμένες κατηγορίες πληθυσμού (παιδιά, ασθενείς, υπερήλικες, ανοσοκατεσταλμένοι).

1.1.2. Ταξινόμηση των βακτηρίων

1.1.2.1. Χαρακτηριστικά ταξινόμησης

- **Μορφολογία.** Το σχήμα, το μέγεθος, η διάταξη των μικροβιακών κυττάρων, ο σχηματισμός ελύτρου αποτελούν μορφολογικά χαρακτηριστικά μεγάλης αξίας. Πολύ χρήσιμη είναι η μελέτη με το μικροσκόπιο αντίθεσης της φάσης που δίνει τη δυνατότητα να παρατηρήσει κανείς τα βακτήρια ζωντανά. Σπουδαιότατο χαρακτηριστικό είναι η ύπαρξη οργανιδίων κίνησης και διάταξής τους. Εάν δηλαδή υπάρχουν μία ή περισσότερες βλεφαρίδες ή άλλης μορφής οργανίδια, που βρίσκονται και πώς κινείται το βακτήριο. Αν δεν υπάρχει μικροσκόπιο αντίθεσης της φάσης τότε γίνεται ειδική χρώση για τις βλεφαρίδες. Για τη μελέτη του βακτηρίου σε παρασκευάσματα, χρησιμοποιούνται πολλές χρώσεις, ιδιαίτερα η Gram, η Ziehl-Neelsen και άλλες. Με την **Gram** διαχωρίζονται τα βακτήρια σε δύο μεγάλες ομάδες. Τα Gram-θετικά και τα Gram-αρνητικά. Η παραγωγή σπόρου, η θέση του στα βακτηριακά κύτταρα, η τυχόν προκαλούμενη διόγκωση του σώματος έχουν επίσης ταξινομική αξία. Η χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου είναι αρκετά περιορισμένη για τη μελέτη της μορφολογίας για την ταξινόμηση των μικροοργανισμών.
- **Καλλιέργεια σε θρεπτικά υλικά.** Τα βακτήρια αναπτύσσονται στα υλικά αυτά και παράγουν χαρακτηριστικές αποικίες. Εξετάζεται η μορφή, το σχήμα, το χρώμα, η οσμή. Η παραγωγή χρωστικής έχει ιδιαίτερη σημασία σε ορισμένες περιπτώσεις.

- **Απαιτήσεις διατροφής.** Τα βακτήρια διακρίνονται σε αυτότροφα και σε ετερότροφα. Οι υποδιαίρεσεις των βακτηρίων αναλόγως των απαιτήσεων διατροφής (πηγή άνθρακα, ενέργεια) είναι χρήσιμες στην ταξινόμηση.
- **Απαιτήσεις O_2 – CO_2 .** Την ταξινόμηση ενδιαφέρει εάν τα βακτήρια είναι υποχρεωτικά αερόβια, υποχρεωτικά αναερόβια ή δυνητικά αναερόβια (Σημειώσεις μαθήματος *Μικροβιολογία*, Τμήμα Βιολογικών εφαρμογών και τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων).
- **pH**
Acidophiles: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα βακτήρια που αναπτύσσονται σε ένα εύρος pH από 0 έως 6,5.
Neutralophiles: Για την επιβίωση των βακτηρίων αυτής της ομάδας απαιτείται pH μεταξύ 6,5 και 7,5. Τα παθογόνα των ανθρώπων και των ζώων, που ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, είναι συνήθως ανθεκτικά σε μικρές αλλαγές του pH.
Alkaliphiles: Για αυτή την κατηγορία βακτηρίων το εύρος pH κυμαίνεται από 7,5 έως 14.
- **Θερμοκρασία**
Ψυχρόφιλα: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα είδη βακτηρίων που αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες -5 έως 20°C. Αυτή η κατηγορία βακτηρίων ευθύνεται για την αλλοίωση των τροφίμων που διατηρούνται στο ψυγείο.
Μεσόφιλα: Ιδανική θερμοκρασία αυτής της ομάδας βακτηρίων είναι ένα εύρος από 15 έως 45°C. Ορισμένα βακτήρια της ομάδας αυτής είναι θερμοανθεκτικά, που σημαίνει ότι μπορούν να αντέξουν θερμοκρασίες ελαφρώς υψηλότερες από αυτές στις οποίες αναπτύσσονται ιδανικά.
Θερμόφιλα: Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής τους κυμαίνεται από 45 έως 80°C.
Υπερθερμόφιλα: Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν ορισμένα Αρχαιοβακτήρια που μπορούν να επιβιώσουν σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 65 έως 105°C (Roberts, 2012).



Εικόνα 1. Απεικόνιση του ρυθμού ανάπτυξης των βακτηρίων συναρτήσει του εύρους θερμοκρασίας στο οποίο δύναται να αναπτυχθούν (Roberts K., 2012)

1.1.3. Είδη σχέσεων των μικροοργανισμών στο υδάτινο περιβάλλον

Οι μικροοργανισμοί που ζουν και αναπαράγονται στο ίδιο κλειστό σύστημα παρουσιάζουν συχνά ορισμένα είδη σχέσεων ανάμεσά τους. Οι σχέσεις αυτές είναι οι εξής (Kevin N., 2013):

- *Συμβίωση (Symbiosis)*: Η ομαλή ανάπτυξη των ειδών χωρίς να επηρεάζει αρνητικά το ένα το άλλο.
- *Αλληλοβοήθεια (mutualism)*: Συνεργασία, δηλαδή, αμοιβαία βοήθεια ανάμεσα σε κάποια είδη μικροοργανισμών με στόχο το κοινό συμφέρον.
- *Ομοσιτισμός (commensalism)*: Η σχέση στην οποία το ένα είδος επωφελείται ενώ το άλλο δεν επωφελείται αλλά ούτε ζημιώνεται.
- *Ανταγωνισμός (antagonism)*: Σχέση η οποία στηρίζεται στην αναστολή ανάπτυξης ενός είδους από ένα άλλο
- *Συναγωνισμός (competition)*: Σχέση που βασίζεται στην «πάλη» για τροφή ανάμεσα σε δύο είδη που τρέφονται με τα ίδια θρεπτικά.
- *Παρασιτισμός (Parasitism)*: Σχέση στην οποία το ένα είδος είναι το παράσιτο το οποίο αναπτύσσεται και επιβιώνει σε βάρος ενός άλλου είδους που αποτελεί τον ξενιστή.

- *Θήρευση (predation)*: Σχέση στην οποία το ένα είδος είναι τροφή του άλλου, σχέση θηρευτή – θηράματος.

Όταν δύο είδη μικροοργανισμών μπορούν να χρησιμοποιήσουν την ίδια πηγή τροφής αλλά επηρεάζονται διαφορετικά από τις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως είναι η παροχή αέρα και η θερμοκρασία, τότε θα αναπτυχθεί γρηγορότερα το είδος που ευνοείται περισσότερο από τις συνθήκες αυτές και θα μπορέσει στη συνέχεια να καταστείλει την ανάπτυξη του άλλου είδους (Waksman S., 2010).

Ακόμη, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βακτηρίων μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές, να έχουν δηλαδή σχέσεις συνύπαρξης ή ανταγωνισμού, γεγονός που καθορίζει σημαντικά την υπεροχή κάποιου είδους έναντι κάποιου άλλου. Η συνύπαρξη ή μη των διαφόρων ειδών σε ένα συγκεκριμένο και οριοθετημένο σύστημα εξαρτάται από την υδρόλυση σύνθετων υδρογονανθράκων και την επακόλουθη ζύμωση των προϊόντων της υδρόλυσης καθώς και από τις υπάρχουσες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ο ανταγωνισμός των ειδών οφείλεται συνήθως στην κατανάλωση της ίδιας τροφής, από δύο ή περισσότερα είδη, στην προσκόλληση στελεχών ενός είδους πάνω σε στελέχη ενός άλλου, με σκοπό την μείωση ανάπτυξής του ή και αποτροπής του από την κατανάλωση τροφής (εφόσον τα δύο είδη τρέφονται από την ίδια τροφή), στην παραγωγή τοξικών προϊόντων μεταβολισμού και πιο συγκεκριμένα στην παραγωγή ενώσεων όπως οι βακτηριοσίνες. Οι βακτηριοσίνες είναι πρωτεΐνες που παράγουν ορισμένα βακτήρια και είναι τοξικές προς άλλα. Έρευνες έδειξαν πως επηρεάζουν μόνο βακτήρια του ίδιου γένους, ωστόσο τελευταία αποδείχθηκε ότι επηρεάζουν και βακτήρια με τα οποία δεν ανήκουν στο ίδιο γένος (Moreira G., Ribeiro A., Silva F., Carvalho A., Farias L., Nicoli J., Moreira E., 2011)

1.1.4. Μικροοργανισμοί - δείκτες που καθορίζουν την ποιότητα των υδάτων

Η μικροβιολογική ποιότητα των υδάτων αξιολογείται από την ύπαρξη κοπρανώδους μόλυνσης, δηλαδή από την ανίχνευση σε αυτά ορισμένων μικροοργανισμών – δεικτών. Τέτοιοι μικροοργανισμοί είναι τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή και οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι. Η παρουσία τους σχετίζεται άμεσα με κοπρανώδες υλικό ποικίλης προέλευσης, το οποίο μπορεί να αποτελέσει σημαντικό περιβαλλοντικό πρόβλημα, καθώς μπορεί να περιέχει παθογόνα βακτήρια, πρωτόζωα και ιούς (Βενιέρη Δ., 2010).

Οι μικροοργανισμοί δείκτες οφείλουν να πληρούν ορισμένους όρους (Βενιέρη Δ., 2010):

- Να είναι μετρήσιμοι στα περιβαλλοντικά δείγματα με εύκολες και μη δαπανηρές τεχνικές που ωστόσο πρέπει να είναι ακριβείς και επαναλήψιμες.
- Να είναι ανθεκτικοί στις περιβαλλοντικές πιέσεις.
- Να υπάρχουν σε ικανό αριθμό στο περιβαλλοντικό δείγμα χωρίς να πολλαπλασιάζονται ή να υφίστανται σημαντικές γενετικές αλλαγές ώστε να επιτυγχάνεται ικανοποιητικά η εκτίμησή τους.
- Να έχουν σταθερή και αποκλειστική σχέση με την πηγή των παθογόνων.
- Να έχουν σταθερά χαρακτηριστικά.

1.2. Απολύμανση

1.2.1. Γενικά

Η απολύμανση είναι μια διεργασία μερικής θανάτωσης των οργανισμών που προκαλούν ασθένειες. Έτσι, δεν πρέπει να συγχέεται σαν διεργασία με αυτή της αποστείρωσης, γιατί με την αποστείρωση θανατώνονται όλοι οι οργανισμοί που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες.

Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης είναι οι παρακάτω:

- Χλωρίωση
- Απολύμανση με ακτινοβολία UV
- Οζόνωση

Εναλλακτικές μέθοδοι απολύμανσης θεωρούνται οι εξής μέθοδοι/απολυμαντικά μέσα:

- Μονοχλωραμίνη (NH_2Cl)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- Υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO_4)
- Προχωρημένες Τεχνικές Οξειδωσης (AOP)

1.2.2. Μέσα και μέθοδοι απολύμανσης

Η απολύμανση του νερού επιτυγχάνεται με τη χρήση:

- Χημικών αντιδραστηρίων: χλώριο και ενώσεις του, βρώμιο, ιώδιο, όζον, φαινόλη και φαινολικές ενώσεις κλπ.
- Φυσικών αντιδραστηρίων: θερμότητα, φως και ηχητικά κύματα όπως είναι ο βρασμός, η UV ακτινοβολία κλπ.
- Μηχανικών μέσων: χημική κατακρήμνιση, βιολογικά φίλτρα κλπ.
- Ακτινοβολίας: ηλεκτρομαγνητική, ηχητική και σωματιδιακή.

1.2.3. Μηχανισμοί των απολυμαντικών

Οι βασικοί μηχανισμοί που δικαιολογούν την δράση και χρήση των απολυμαντικών που προαναφέρθηκαν είναι οι εξής:

- Φθορά του κυτταρικού τοιχώματος
- Μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας
- Μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος
- Μεταβολή του DNA ή RNA των οργανισμών
- Παρεμπόδιση της ενζυμικής δράσης

1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν τη χρήση των απολυμαντικών

- *Χρόνος επαφής:*

Είναι μία από τις σημαντικότερες μεταβλητές στην διεργασία απολύμανσης. Ο Harriet Chick, εργαζόμενος στην Αγγλία στις αρχές του 1900, παρατήρησε ότι για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής,

τόσο μεγαλύτερη είναι η θανάτωση. Σε διαφορική μορφή, ο νόμος του Chick, αποτυπώνεται ως εξής (Metcalf & Eddy, 2007):

$$\frac{dN_t}{dt} = -kN_t$$

Όπου,

$\frac{dN_t}{dt}$ = ρυθμός μεταβολής συγκέντρωσης των οργανισμών με το χρόνο

k = σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης, T^{-1}

N_t = αριθμός των οργανισμών σε χρόνο t

t = χρόνος

- *Συγκέντρωση του απολυμαντικού*

Ο Hebert Watson, Hebert Watson, εργαζόμενος στην Αγγλία στις αρχές του 1900, ανέφερε ότι η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης σχετίζεται με τη συγκέντρωση ως εξής (Metcalf & Eddy, 2007):

$$k = k' C^n$$

όπου,

k = σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης

k' = σταθερά θανάτωσης

C = συγκέντρωση του απολυμαντικού

n = συντελεστής διάλυσης

- *Η ισχύς και η φύση των φυσικών μέσων απολύμανσης*

Η θερμότητα και το φως είναι φυσικά μέσα απολύμανσης που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς για την απολύμανση των υγρών αποβλήτων. Παρατηρήθηκε ότι η απόδοσή τους εξαρτάται από την ισχύ τους. Για παράδειγμα, αν η αποσύνθεση των οργανισμών μπορεί να περιγραφεί με μία 1^{ης} τάξεως αντίδραση, τότε η επίδραση της ισχύος του φυσικού απολυμαντικού αντιπροσωπεύεται με τη σταθερά k μέσω κάποιων συναρτησιακών σχέσεων (Metcalf & Eddy, 2007).

- *Η θερμοκρασία*

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό θανάτωσης με χημικά απολυμαντικά μπορεί να προσδιοριστεί από μία μορφή της εξίσωσης Van't Hoff – Arrhenius. Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα μία πιο γρήγορη θανάτωση. Η σχέση για τον απαιτούμενο χρόνο t ώστε να πραγματοποιηθεί συγκεκριμένο ποσοστό θανάτωσης, είναι:

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

Όπου,

t_1, t_2 = χρόνος για το δεδομένο ποσοστό θανάτωσης σε θερμοκρασίες T_1 και T_2 , K, αντίστοιχα

E = ενέργεια ενεργοποίησης J/mole (cal/mole)

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

- *Τα είδη των μικροοργανισμών*

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται από τη φύση και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Γενικά, είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν, λόγω της κυτταρικής τους δομής, τα πρωτόζωα και ακολουθούν οι ιοί και τα βακτήρια. Αυξημένη αντίσταση στην απολύμανση παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν ανθεκτικές μορφές όπως κύστες και σπόρια. Επίσης, είναι σαφές ότι μικροοργανισμοί που για κάποιο λόγο έχουν καταστεί λιγότερο ακμαίοι, είναι πιο ευαίσθητοι στα διάφορα απολυμαντικά (Φραγγεδάκη, 2014).

- *Το βιοφίλμ*

Η ύπαρξη συσσωματωμάτων μικροοργανισμών που έχουν προσκολληθεί στις διάφορες επιφάνειες (π.χ. δίκτυο ύδρευσης, αντιδραστήρες) φαίνεται ότι δυσχεραίνει τη διαδικασία της απολύμανσης. Οι ποικίλοι μικροοργανισμοί, που δημιουργούν το βιοφίλμ εκκρίνοντας πολυσακχαρίτες, προστατεύονται ως ένα βαθμό από τη δράση των απολυμαντικών μέσων καθώς τα τελευταία δυσκολεύονται να διεισδύσουν στο εσωτερικό του υμενίου. Ταυτόχρονα, η επιβίωση των προσκολλημένων μικροβίων διευκολύνεται και από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών ενώ παράλληλα υποβοηθάται ο πολλαπλασιασμός τους λόγω των ευνοϊκών συνθηκών (κατάλληλο pH, θερμοκρασία) που επικρατούν στο υμένιο σε σχέση με το ελαιώδη, καθιστώντας τη διαδικασία της απολύμανσης ακόμη πιο δύσκολη (Φραγγεδάκη, 2014).

- *Η φύση του υγρού*

Κατά την ανασκόπηση της ανάπτυξης διαφόρων σχέσεων που προτάθηκαν για την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών, είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι οι περισσότερες δοκιμές έγιναν σε αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας με τη χρήση απεσταγμένου νερού ή νερού με ρυθμιστικό διάλυμα υπό συνθήκες εργαστηρίου. Στην πράξη η φύση του υγρού πρέπει να εξεταστεί προσεκτικά. Για παράδειγμα, ξένα οργανικά υλικά θα αντιδράσουν με τα περισσότερα οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα και θα μειώσουν την αποδοτικότητά τους. Η παρουσία αιωρούμενης ύλης θα μειώσει την αποδοτικότητα των απολυμαντικών με την απορρόφηση του απολυμαντικού και με την προστασία των παγιδευμένων βακτηρίων. Τα χαρακτηριστικά του υγρού εξετάζονται με περισσότερες λεπτομέρειες στις ακόλουθες ενότητες και στη συζήτηση που αφορά την απολύμανση με UV (Metcalf & Eddy, 2007).

- pH

Η επίδραση του pH στην απολύμανση, μπορεί ανάλογα με το απολυμαντικό μέσο να είναι διαφορετική. Για παράδειγμα, αυξημένες τιμές pH ενισχύουν την απολυμαντική δράση ενώσεων του αμμωνίου ενώ μειώνουν εκείνη των υποχλωριωδών, των φαινολών και του ιωδίου (Φραγγεδάκη, 2014).

Πίνακας 1. Χαρακτηριστικά ενός ιδανικού απολυμαντικού (Metcalf & Eddy, 2007)

Χαρακτηριστικά	Ιδιότητες/απόκριση
Διαθεσιμότητα	Πρέπει να είναι διαθέσιμο σε μεγάλες ποσότητες και λογικές τιμές
Ικανότητα εξουδετέρωσης οσμών	Πρέπει να εξουδετερώνει τις οσμές ενώ απολυμαίνει
Ομοιογένεια	Οι αραιώσεις του πρέπει να είναι ομοιόμορφες στη σύσταση
Αλληλεπίδραση με ξένα υλικά	Δεν πρέπει να απορροφάται από άλλα οργανικά υλικά εκτός από τα κύτταρα των βακτηρίων
Μη διαβρωτικό και μη χρωστικό	Δεν πρέπει να παραμορφώνει τα μέταλλα ή να λεκιάζει τα ρούχα
Μη τοξικό στις ανώτερες μορφές ζωής	Πρέπει να είναι τοξικό τους μικροοργανισμούς και μη τοξικό στους ανθρώπους και τα ζώα
Διείσδυση	Πρέπει να έχει την ικανότητα να διεισδύει δια μέσω επιφανειών
Ασφάλεια	Πρέπει να είναι ασφαλές κατά τη μεταφορά, την αποθήκευση, τον χειρισμό και τη χρήση
Διαλυτότητα	Πρέπει να είναι διαλυτό στο νερό και στους κυτταρικούς ιστούς
Σταθερότητα	Πρέπει να έχει χαμηλή απώλεια της μικροβιοκτόνου δράσης με το χρόνο
Τοξικότητα στους μικροοργανισμούς	Πρέπει να είναι αποτελεσματικό σε υψηλές αραιώσεις
Τοξικότητα σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος	Πρέπει να είναι αποδοτικό σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος

1.2.5. Νόμος του Chick

Ο νόμος του Chick περιγράφει την απολυμαντική δράση ενός απολυμαντικού μέσου και δίνεται από την εξής σχέση (Metcalf & Eddy, 2007):

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = -kt$$

Όπου:

N_0 = ο αρχικός αριθμός μικροοργανισμών στο σύστημα

N = ο αριθμός των μικροοργανισμών μετά από χρόνο t της απολύμανσης

1.2.6. Χλωρίωση

Ο λόγος που το χλώριο είναι το πιο διαδεδομένο μέσο απολύμανσης είναι γιατί ικανοποιεί τα περισσότερα χαρακτηριστικά που καθιστούν ένα απολυμαντικό ιδανικό αλλά και γιατί καταστρέφει αποτελεσματικά το κυτταρικό τοίχωμα των περισσότερων μικροοργανισμών.

Όλα τα διαλύματα χλωρίου είναι ισχυρά οξειδωτικά, διασπώνται με το χρόνο και παρουσία φωτός. Είναι ουσίες ασταθείς γι' αυτό πρέπει κατά την μεταφορά και αποθήκευση τους να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή.

Οι κύριες ενώσεις χλωρίου που χρησιμοποιούνται σε διάφορες μονάδες επεξεργασίας, κυρίως υγρών αποβλήτων είναι οι εξής:

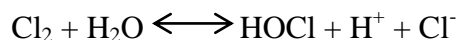
- Χλώριο (Cl_2): Διατίθεται σε υγρή και αέρια μορφή. Το αέριο χλώριο είναι κιτρινοπράσινο και 2,48 φορές βαρύτερο από τον αέρα σε αντίθεση με το υγρό χλώριο που είναι φαιοκίτρινο και είναι περίπου 1,44 φορές βαρύτερο του νερού. Το αέριο χλώριο έχει έντονη οσμή και χαρακτηρίζεται ως τοξικό. Έτσι, αποφεύγεται η χρήση του και συνήθως χρησιμοποιείται μόνο σε μεγάλες εγκαταστάσεις επεξεργασίας πόσιμου νερού.
- Υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl): Άλας χλωρίου και η πιο διαδεδομένη ένωση χλωρίου που χρησιμοποιείται. Οι συνήθεις διαθέσιμες στο εμπόριο ενώσεις NaOCl κυμαίνονται μεταξύ 5 και 15%, έχει χρώμα υποκίτρινο, χαρακτηριστική οσμή και είναι ισχυρά αλκαλικό και διαβρωτικό.
- Υποχλωριώδες ασβέστιο [Ca(OCl)_2]: Άλας χλωρίου και αυτό, διατίθεται σε ξηρή και υγρή μορφή. Μπορεί να περιέχει και 70% περιεκτικότητα σε χλώριο αν είναι καλής ποιότητας. Το μειονέκτημα του είναι το υψηλότερο κόστος του σε σχέση με το υγρό Cl_2 και ότι επίσης έχει την τάση να κρυσταλλώνεται.
- Διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2)

1.2.6.1. Αντιδράσεις του χλωρίου με το νερό

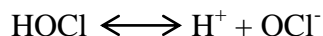
Όταν το αέριο χλώριο ClO_2 έρθει σε επαφή με το νερό θα λάβουν χώρα δύο βασικές αντιδράσεις:

- Η υδρόλυση
- Ο ιονισμός

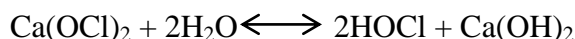
Η υδρόλυση είναι η διαδικασία κατά την οποία το αέριο ClO_2 ενώνεται με το νερό και σχηματίζεται το υποχλωριώδες οξύ (HOCl):

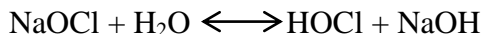


Ο ιονισμός του υποχλωριώδους οξέως σε υποχλωριώδες ιόν (OCl^-) γίνεται ως εξής:



Το υποχλωριώδες ασβέστιο και νάτριο όταν έρθουν σε επαφή με το νερό υδρολύονται για να σχηματίσουν υποχλωριώδες οξύ (HOCl):





Μετά ακολουθεί όπως παραπάνω ο ιονισμός του χλωριούχου οξέως (HOCl).

1.2.6.2. Πλεονεκτήματα της χλωρίωσης

Η χλωρίωση σαν μέθοδος παρουσιάζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Είναι οικονομική σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους απολύμανσης
- Είναι απλή στην εφαρμογή
- Η δραστηριότητα των μορφών χλωρίου που χρησιμοποιούνται είναι αποτελεσματική για ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών

Ωστόσο, παρά τα πλεονεκτήματά της, δεδομένου ότι το χλώριο είναι μια ουσία που μπορεί να προκαλέσει διαταραχές σε διάφορα οικοσυστήματα αλλά και στην υγεία του ανθρώπου, είναι σημαντικό να τονιστούν και τα μειονεκτήματα της μεθόδου.

1.2.6.3. Μειονεκτήματα της χλωρίωσης

- Αναφέρθηκε ήδη πως η απολύμανση σαν μέθοδος δεν καταστρέφει το 100% των μικροοργανισμών όπως κάνει η αποστείρωση. Έτσι, η χλωρίωση δεν καθιστά το νερό απόλυτα καθαρό καθώς πολλά είδη μικροοργανισμών μπορεί να παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στη μέθοδο, ανάλογα πάντα με την προέλευσή τους.
- Το χλώριο και τα παράγωγά του όταν έρθουν σε επαφή με οργανικές ενώσεις δημιουργούν τριαλομεθάνια (όπως έχει ήδη αναφερθεί) τα οποία είναι καρκινογόνες ενώσεις, ενώ όλα αυτά μαζί προσδίδουν έντονη γεύση και οσμή στο νερό.
- Αν το νερό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση είναι απαραίτητη η αποχλωρίωση προς αποφυγή ζημιών σε οικοσυστήματα λόγω της έντονης δράσης του υπολειμματικού χλωρίου.

1.2.6.4. Παραπροϊόντα χλωρίωσης

Η αντίδραση του χλωρίου με μερικές οργανικές ενώσεις έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενώσεων που αναφέρονται με τον γενικό όρο παραπροϊόντα χλωρίωσης. Τα πιο κοινά παραπροϊόντα χλωρίωσης είναι τα τριαλογονομεθάνια ή τριαλομεθάνια (THM, Trihalomethanes). Τα τριαλομεθάνια έχουν ταξινομηθεί ως ύποπτα καρκινογόνα (Τσώνης, 2004).

Το τριχλωρομεθάνιο προκύπτει από την αντίδραση του υποχλωριώδους οξέος με διάφορες οργανικές ενώσεις όπως π.χ. με χουμικά οξέα (Τσώνης, 2004).

Υπάρχουν ωστόσο και άλλες ενώσεις, εκτός από τα τριαλομεθάνια που προκύπτουν σαν παραπροϊόντα χλωρίωσης και θεωρούνται ως ύποπτα καρκινογόνα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται ορισμένες από αυτές τις ενώσεις και οι επιτρεπτές συγκεντρώσεις αυτών:

Πίνακας 2. Οδηγίες για τα παραπροϊόντα απολύμανσης στο νερό (Φραγγελδάκη, 2014)

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

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

^bProvisional guideline value

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

^dOntario, Canada

^eCalifornia, U.S.

Ο ρυθμός σχηματισμού των παραπροϊόντων εξαρτάται από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες όπως (Metcalf & Eddy, 2007):

- Την παρουσία πρόδρομων οργανικών ενώσεων
- Την συγκέντρωση ελεύθερου χλωρίου
- Την συγκέντρωση βρωμίου
- Το pH
- Την θερμοκρασία

1.2.7. Οζόνωση

Το όζον χρησιμοποιείται κυρίως ως εναλλακτική μέθοδος για την απολύμανση του πόσιμου νερού. Χαρακτηριστικό του όζοντος είναι ότι δεν είναι δυνατόν να προμηθευτείται από κάποια εξωτερική πηγή αλλά θα πρέπει να παράγεται επί τόπου προκειμένου να χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες απολύμανσης (Τσώνης, 2004).

1.2.7.1. Πλεονεκτήματα της οζόνωσης

- Το όζον προτιμάται σαν απολυμαντικό μέσο σε αντίθεση με το χλώριο καθώς δεν παράγει τριαλομεθάνια ή άλλα παραπροϊόντα όπως αυτά που σχετίζονται με την χλωρίωση, τα οποία είναι καρκινογόνα. Παρ' όλα αυτά στην απολύμανση με όζον είναι δυνατό να παραχθούν αλδεϋδες και ενώσεις βρωμίου.
- Το όζον είναι ισχυρότερο οξειδωτικό μέσο σε σχέση με το χλώριο.

1.2.7.2. Μειονεκτήματα της οζόνωσης

- Η οζόνωση είναι μία μέθοδος ακριβότερη σε σχέση με την χλωρίωση, σε ό, τι αφορά την απολύμανση του πόσιμου νερού κυρίως.
- Μετά την οζόνωση, δεν παραμένει στο νερό κάποια υπολειμματική ουσία η οποία να συνεχίζει να δρα ακόμη και μετά την εφαρμογή της μεθόδου, όπως γίνεται στην χλωρίωση όπου το υπολειμματικό χλώριο εξακολουθεί να δρα ακόμη και μετά το πέρας της μεθόδου.

1.2.8. Απολύμανση με χρήση ακτινοβολίας UVA

Η υπεριώδης ακτινοβολία περιλαμβάνει μήκη κύματος από 100 έως 400 nm και υποδιαιρείται σε τρεις περιοχές οι οποίες αντιστοιχούν στις ακτινοβολίες UVA, UVB και UVC.

Η μικροβιοκτόνος δράση της οφείλεται στην φωτοχημική προσβολή του DNA των μικροοργανισμών, το οποίο απορροφά ενέργεια στην περιοχή μηκών κύματος από 240 έως 280 nm (Τσώνης, 2004).

Η ακτινοβολία UV παράγεται από λάμπες ατμών υδραργύρου οι οποίες μοιάζουν με τις λάμπες φθορισμού που χρησιμοποιούνται για φωτισμό. Η βασική διαφορά είναι ότι η επιφάνεια του γυαλιού της λάμπας φθορισμού έχει καλυφθεί με φωσφορίζουσα ουσία που μετατρέπει την υπεριώδη ακτινοβολία σε φωτεινή ακτινοβολία μικρότερης ενέργειας η οποία αντιστοιχεί σε ορατή περιοχή. Στην περίπτωση των λαμπτήρων UV η επιφάνεια του γυαλιού δεν είναι

καλυμμένη με αποτέλεσμα να εξέρχεται η ακτινοβολία UV αφού βέβαια απορροφηθεί ένα σχετικά μικρό ποσοστό από το γυαλί της λάμπας (Τσώνης, 2004).

1.2.8.1. Προσδιορισμός της δόσης ακτινοβολίας

Ο βαθμός αδρανοποίησης ή θανάτωσης των μικροοργανισμών από την UV ακτινοβολία είναι ανάλογος της δόσης UV που εφαρμόζεται. Η δόση αυτή υπολογίζεται από τη σχέση (Τσώνης, 2004):

$$D = I t$$

Όπου:

D = η δόση UV, $m W \cdot s/cm^2$

I = η ένταση της ακτινοβολίας, $m W/cm^2$

t = ο χρόνος έκθεσης, s

1.2.8.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της απολύμανσης με ακτινοβολία UVA

Η απολύμανση με ακτινοβολία UV έχει σημαντικά πλεονεκτήματα τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις την καθιστούν αποδοτικότερη σε σχέση με άλλες μεθόδους απολύμανσης:

Τα πλεονεκτήματά της είναι τα εξής (Metcalf & Eddy, 2007):

- Μη υπολειμματική τοξικότητα
- Μεγαλύτερη αποδοτικότητα στην καταστροφή ιών, σπόρων και κυστών σε σχέση με το χλώριο
- Αποδοτικότητα στην καταστροφή των ανθεκτικών οργανικών συστατικών όπως η NDMA
- Βελτιωμένη ασφάλεια σχετικά με τη χρήση χημικών απολυμαντικών

Αντίθετα, η απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα:

- Υψηλό κόστος εφαρμογής και συντήρησης του συστήματος απολύμανσης
- Μη άμεση μέτρηση για τον έλεγχο της επιτυχίας της απολύμανσης

1.2.9. Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης

Τα τελευταία χρόνια η χρήση των Προηγμένων διεργασιών οξείδωσης έχει αυξηθεί πολύ καθώς πρόκειται για μεθόδους απολύμανσης που στοχεύουν στην γρηγορότερη και αποτελεσματικότερη απολύμανση το νερού, σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους απολύμανσης.

Χαρακτηριστικό των μεθόδων αυτών είναι πως καταστρέφουν τα κύτταρα των μικροοργανισμών μέσω της αύξησης των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου. Η αύξηση των ελευθέρων ριζών υδροξυλίου στις διεργασίες έντονης οξείδωσης μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους (Τσώνης, 2004):

- Οζόνωση σε υψηλές τιμές pH
- Οζόνωση με παράλληλη προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου (O_3/H_2O_2)
- Οζόνωση με παράλληλη εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας (O_3/UVB)

- Χρήση υπεροξειδίου του υδρογόνου και παράλληλη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{UVB}$)
- Οζόνωση ή εφαρμογή ακτινοβολίας UV παρουσία καταλύτη (πχ. O_3/TiO_2 ή TiO_2/UVA)

Άλλες μέθοδοι απολύμανσης που ανήκουν στις Προηγμένες Διεργασίες Οξείδωσης είναι οι παρακάτω (Πολίτη, 2012):

- το αντιδραστήριο Fenton και Photo-Fenton (ομοιογενής φωτοκατάλυση)
- η υγρή οξείδωση
- η ηλεκτροχημική οξείδωση
- η (καταλυτική ή μη) οξείδωση σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες κ.ά.

1.2.9.1. Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση είναι μία από τις Προηγμένες Μεθόδους Οξείδωσης που χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια και πρόκειται για απολύμανση με ακτινοβολία UV παρουσία καταλύτη, ο οποίος επιταχύνει μια διαδικασία που χωρίς τη χρήση του, θα χρειαζόταν αρκετός χρόνος για να δράσει αποτελεσματικά η διαδικασία απολύμανσης με ακτινοβολία UV.

Επίσης, η φωτοκατάλυση μπορεί να είναι ομογενής ή ετερογενής, δηλαδή ο καταλύτης να είναι της ίδιας μορφής με το διάλυμα (υγρή μορφή) ή διαφορετικής μορφής από το διάλυμα (συνήθως στερεής μορφής).

1.2.9.2. Ετερογενής φωτοκατάλυση με UVA ακτινοβολία

Η ετερογενής φωτοκατάλυση που χρησιμοποιεί ημιαγωγικούς καταλύτες (TiO_2 , ZnO , Fe_2O_3 , CdS , GaP and ZnS) έχει επιδείξει μεγάλη αποτελεσματικότητα τόσο στη μετατροπή πλήθους σταθερών οργανικών σε εύκολα βιοδιασπώμενες ενώσεις και τελικά στη μετατροπή τους σε αβλαβές διοξείδιο του άνθρακα και νερό όσο και στην απολύμανση νερού (Φραγγεδάκη, 2014).

Η ετερογενής φωτοκατάλυση με ακτινοβολία UVA, η οποία εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία, εκτείνεται στο φάσμα 315 έως 400 nm. Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε αυτή τη μέθοδος απολύμανσης είναι γιατί έχει αποδειχθεί πως αδρανοποιεί αποτελεσματικά ένα μεγάλο εύρος μικροοργανισμών. Ωστόσο, θα ήταν δυνατή και η εφαρμογή UVC ακτινοβολίας, επειδή είναι η ισχυρότερη από τις τρεις και η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών θα επιτυγχάνονταν σε μικρότερο χρονικό διάστημα και με περισσότερες πιθανότητες επιτυχίας. Προτιμήθηκε όμως η εφαρμογή ετερογενούς φωτοκατάλυσης με UVA ακτινοβολία για τους εξής λόγους:

- Είναι πιο απλή στην εφαρμογή της σε αντίθεση με την UVC η οποία δεν πρέπει σε καμία περίπτωση να έρθει σε επαφή με το δέρμα ή τα μάτια καθώς μπορεί να προκαλέσει ανεπανόρθωτες βλάβες
- Είναι προτιμότερη η εφαρμογή της UVA ακτινοβολίας με απώτερο σκοπό την σταδιακή αδρανοποίηση του εκάστοτε βακτηρίου σε ένα χρονικό διάστημα 45 min. Αν χρησιμοποιούνταν ακτινοβολία UVC το πιθανότερο θα ήταν το βακτήριο να αδρανοποιηθεί στα πρώτα κιόλας λεπτά με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατό να παρατηρηθεί ο ρυθμός με τον οποίο ανταποκρίνεται στην απολύμανση.

Είναι σημαντικό να τονιστεί σε αυτό το σημείο πως η UVA ακτινοβολία δεν μπορεί από μόνη της να αδρανοποιήσει τους μικροοργανισμούς, για το χρονικό διάστημα στο οποίο εφαρμόστηκε το πείραμα (45 min). Επίσης, το φάσμα της εκτείνεται από 315 έως 400 nm ενώ το DNA και RNA των μικροοργανισμών καταστρέφεται στα 240 έως 280 nm. Έτσι, θα χρησιμοποιηθεί καταλύτης προκειμένου να επιταχυνθεί η διαδικασία αδρανοποίησης. Με τη χρήση καταλύτη, η απολύμανση με UV ακτινοβολία ονομάζεται ετερογενής φωτοκατάλυση με ακτινοβολία UV και περιλαμβάνεται στις Προηγμένες Τεχνικές Οξείδωσης (AOP).

1.2.9.2.1. Καταλύτες

Για να επιταχυνθεί η φωτοκατάλυση με UVA ακτινοβολία, είναι αναγκαία η προσθήκη καταλύτη ο οποίος έχει τέτοιες ιδιότητες ώστε να επιταχύνει την εν λόγω διαδικασία. Ένας τέτοιος καταλύτης ονομάζεται φωτοκαταλύτης και η δράση του ενεργοποιείται όταν έρθει σε επαφή με υπεριώδη ακτινοβολία φυσικής ή τεχνητής πηγής. Ένας φωτοκαταλύτης είναι αποτελεσματικός στις παρακάτω περιπτώσεις.

Όταν είναι:

- Αδρανής ως προς τις φυσικές και χημικές του ιδιότητες
- Φωτοκαταλυτικά ενεργός
- Φωτοσταθερός
- Μη τοξικός
- Χαμηλού σχετικά κόστους

1.2.9.2.2. Χρήση TiO_2 ως καταλύτη

Το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) είναι μία ουσία που χρησιμοποιείται ευρέως χωρίς να προκαλεί προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία. Χρησιμοποιείται σε βιομηχανίες παρασκευής χρωμάτων, μελανιών, συνθετικών υφασμάτων, μολυβιών, κεραμικών κ.α.

Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στη φωτοκαταλυτική τεχνολογία μέχρι τώρα στρέφεται στο TiO_2 καθώς συγκεντρώνει τα περισσότερα θετικά χαρακτηριστικά μεταξύ των διάφορων φωτοκαταλυτών (Φραγγεδάκη, 2014).

Συναντάται σε τρεις κρυσταλλικές μορφές, οι οποίες είναι η ανατάση (η πιο σταθερή δομή στις χαμηλές θερμοκρασίες, ανήκει στο τετράγωνο κρυσταλλικό σύστημα), το ρουτίλιο (η πιο σταθερή δομή στις υψηλές θερμοκρασίες κι έτσι βρίσκεται ακόμη και σε πυριγενή πετρώματα, ανήκει στο τετράγωνο κρυσταλλικό σύστημα) και ο μπρουκίτης (συναντάται σε διάφορα ορυκτά και ανήκει στο ορθορομβικό κρυσταλλικό σύστημα). Η ανατάση είναι η πιο δραστική φωτοκαταλυτικά, λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των ανιόντων OH^- και του H_2O στην επιφάνειά της, καθώς και λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτοπαραγόμενων e^- και h^+ . Έτσι, μετά από πλήθος ερευνών τις τελευταίες δύο δεκαετίες που υποστηρίζουν το παραπάνω, χρησιμοποιείται κυρίως στη μορφή της ανατάσης ή στη συνδυασμένη μορφή ανατάσης – ρουτιλίου (Φραγγεδάκη, 2014).

Όταν ο καταλύτης TiO_2 έρθει σε επαφή με υπεριώδη ακτινοβολία, είτε από τον ήλιο είτε από κάποια τεχνητή πηγή, καταλύει την παραγωγή ριζών υδροξυλίου, οι οποίες στη συνέχεια έρχονται σε επαφή με οργανικές ενώσεις και τις καταστρέφουν. Εκτός από οργανικές ενώσεις, καταστρέφουν και μικροοργανισμούς όπως βακτήρια, ιούς, μήκυτες, άλγη, ακόμη και πτητικές οργανικές ενώσεις (VOC).

Για να είναι αποτελεσματικός ο φωτοκαταλύτης θα πρέπει να δοθεί σημασία σε ορισμένες παραμέτρους. Παράμετροι της χρήσης του είναι οι εξής:

- Πρέπει να δοθεί προσοχή ως προς την ποσότητα του TiO_2 που χρησιμοποιείται για το εκάστοτε διάλυμα ώστε να μην εμποδίζει, λόγω αυξημένης θολερότητας, την υπεριώδη ακτινοβολία να έρθει σε επαφή με τα κύτταρα των μικροοργανισμών ή τις οργανικές ενώσεις.
- Χρειάζεται ένα μικρό χρονικό διάστημα προσαρμογής του καταλύτη στο δείγμα προτού αρχίσει η δράση του.

1.2.9.2.3. Φωτοενεργοποίηση

Το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης λαμβάνει χώρα για ορισμένες από τις ζώντες αποικίες, που έχουν ήδη υποστεί απολύμανση με UVA ακτινοβολία, όταν αυτές εκτεθούν σε ακτινοβολία του ορατού φάσματος μεταξύ 300 και 500 nm. Τα καταστροφικά αποτελέσματα της υπεριώδους ακτινοβολίας διορθώνονται από ένα ένζυμο το οποίο φωτοενεργοποιείται και στη συνέχεια δεσμεύει και διαιρεί τα διμερή της θυμίνης.

Ωστόσο, η «επιδιόρθωση» του DNA και του RNA είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί και στο απόλυτο σκοτάδι μέσω ενός μηχανισμού σύμφωνα με τον οποίο οι πυριμιδίνες του μορίου του DNA αλλά και του RNA επιδιορθώνονται μέσω της δράσης ειδικών ενζύμων. Το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης των μικροοργανισμών και στις δύο περιπτώσεις, εξαρτάται αποκλειστικά από το είδος και τις ιδιότητες του βακτηρίου (Maier, Pepper, Gerba, 2000).

2. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της αποτελεσματικότητας της χλωρίωσης και της φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA σε μικροοργανισμούς που συλλέχθηκαν από διάφορα είδη του υδάτινου περιβάλλοντος, όπως: θαλασσινό νερό, νερό λίμνης και ποταμού, πόσιμο νερό, λύμα εισόδου και λύμα εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού καθώς και νερό πισίνας.

Στόχος της εφαρμογής των μεθόδων απολύμανσης ήταν να παρατηρηθεί η σταδιακή μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων, ώστε να μελετηθεί η κινητική απολύμανσης της κάθε μεθόδου. Επίσης, θα μελετάται η αποτελεσματικότητα των μεθόδων απολύμανσης σε σχέση με το είδος του βακτηρίου σε συνδιασμό με την πηγή προέλευσής τους.

Τέλος, εφαρμόστηκε η μέθοδος RAPD-PCR έτσι ώστε να μελετηθούν οι γενετικοί πολυμορφισμοί των βακτηρίων, στους οποίους ενδεχομένως να οφείλεται και η διαφορετική συμπεριφορά στα δύο είδη απολυμάνσεων.

3. Υλικά και μέθοδοι

3.1. Υλικά

3.1.1. Θρεπτικά υλικά απομόνωσης μικροοργανισμών

Για τις ανάγκες απομόνωσης ορισμένων μικροοργανισμών παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής διαλύματα εκλεκτικών θρεπτικών υλικών για στερεή καλλιέργεια:

- 1) Manitol soft agar: επιλεκτικό θρεπτικό υλικό για το γένος *Staphylococcus* της εταιρείας Lab M Limited.
- 2) Pseudomonas agar base: επιλεκτικό θρεπτικό υλικό για το γένος *Pseudomonas* και *Aeromonas* της εταιρείας Himedia.
- 3) Slanetz and Barney medium: επιλεκτικό θρεπτικό υλικό για το βακτήριο *Enterococcus* της εταιρείας Himedia.
- 4) Hicrome Coliform Agar: επιλεκτικό θρεπτικό υλικό για το βακτήριο *E. coli* της εταιρείας Himedia.
- 5) Plate count agar: θρεπτικό υλικό που χρησιμοποιείται την ολική μικροβιακή χλωρίδα της εταιρείας Himedia.
- 6) Bile Esculin azide agar: θρεπτικό υλικό επιβεβαίωσης εντερόκοκκου κοπρανώδους προέλευσης της εταιρείας Himedia.
- 7) Nutrient agar: μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό της εταιρείας Himedia.
- 8) Nutrient Broth: μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό της εταιρείας Himedia.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα, εκτός από το Slanetz and Barney medium, τοποθετήθηκαν για υγρή αποστείρωση στους 120°C για 30min. Το Slanetz and Barney medium δεν τοποθετείται σε υγρή αποστείρωση γιατί σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής πρέπει να βραστεί μέχρις ότου γίνει διαυγές. Στη συνέχεια ακολουθεί η επίστρωση και στερεοποίηση των τριβλίων. Αφού στερεοποιηθούν, τοποθετούνται στο ψυγείο προσεκτικά (αφαιρείται ο αέρας και κλείνονται καλά οι συσκευασίες τους) ώστε να αποφευχθεί η επιμόλυνσή τους.

3.1.2. Χημικά που χρησιμοποιήθηκαν

Στο πείραμα της χλωρίωσης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω χημικά:

Οξικό οξύ

Ιωδιούχο κάλιο (Κατασκευαστής: Sigma-Aldrich®)

Θειοθειικό νάτριο κανονικότητας 0,1N

Χλωριούχο νάτριο (Κατασκευαστής: SDS®)

Για την RAPD PCR χρησιμοποιήθηκαν:

Πίνακας 3. Αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

	Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Βιβλιογραφική αναφορά
1	M13	GAG GGT GGC GGT TCT	Decimo et al., 2014
2	1290	GTG GAT GCG A	Regua-Mangia et al., 2004
3	RAPD4	AAG ACG CCD T	Deschaght et al., 2011
4	RAPD7	GTG GAT GCG A	Ashayeri-panah et al., 2012

3.1.3. Διαλύματα που παρασκευάστηκαν

Διάλυμα NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L v/v (ως προς Cl₂)

Διάλυμα Na₂S₂O₃ συγκέντρωσης 18mg/L w/v

Διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0.9 % w/v

Διάλυμα γλυκερόλης συγκέντρωσης 30% v/v

Για την απομόνωση του γενετικού υλικού:

Ρυθμιστικό διάλυμα Tris EDTA (TE)

Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme lysis buffer

Διάλυμα SDS 10% w/v

Διάλυμα πρωτεΐνης-K 20 mg/L

3.1.4. Καταλύτες

Στο πείραμα της φωτοκατάλυσης με UVA ακτινοβολία χρησιμοποιήθηκε καταλύτης TiO₂ (P25) της εταιρίας Degussa AG®.

3.1.5. Άλλα υλικά/όργανα που χρησιμοποιήθηκαν

3.1.5.1. Φίλτρα νιτροκυτταρίνης

Τα φίλτρα νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0,45μm χρησιμοποιήθηκαν για την κατακράτηση των βακτηρίων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διήθησης κενού. Κατασκευαστήκαν από την εταιρεία Whatman®.

3.1.5.2. Λάμπα ακτινοβολίας UVA

Η λάμπα που χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια της φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA έχει ισχύ 9W και είναι τύπου compact low pressure. Κατασκευάστηκε από την εταιρεία Radium Lampenwerk GmbH®.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Απομόνωση βακτηρίων

3.2.1.1. ΣΤΑΔΙΟ 1^ο : Δειγματοληψία

Όλα τα δείγματα προέρχονται από διαφορετικές πηγές και είδη υδάτων. Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε για την κάθε δειγματοληψία είναι η εξής:

- Με αποστειρωμένα μπουκάλια συλλέχθηκε το δείγμα νερού από την κάθε πηγή
- Στη συνέχεια, διατηρήθηκε το δείγμα με παγοκύστες και σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα (για λιγότερο από 1 ώρα) τοποθετήθηκε σε ψύξη ώστε να διατηρηθεί το πλήθος των μικροοργανισμών που συλλέχθηκαν σταθερό.
- Η διήθηση των δειγμάτων έγινε σε διάστημα 24h±5h

Πίνακας 4. Στοιχεία σχετικά με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν

Δείγμα	Ημερομηνία	Τοποθεσία	Είδος νερού	Καιρικές συνθήκες	
1	5/5/2014	Καλαθάς	θαλασσινό	Ηλιοφάνεια και ελαφρύς κυμματισμός	
2		Τερσανάς	θαλασσινό		
3		Κουμ-καπί	θαλασσινό		
4		Άγιος Ονούφριος	θαλασσινό		
5	10/5/2014	Βατόλακος	πόσιμο		Συννεφιά και υγρασία
6	13/5/2014	Χανιά	πόσιμο		
7	10/5/2014	Καβρός	πόσιμο		
8	13/5/2014	Πολυτεχνείο	πόσιμο		
9	11/5/2014	Ν.Χώρα	θαλασσινό		
10	10/5/2014	Λίμνη Κουρνά	επιφανειακό		
11	18/5/2014	Βατόλακκος			
12	18/5/2014	Βατόλακκος			
13	18/5/2014	Βατόλακκος			
14	18/5/2014	Αγιά	πισίνα	Ηλιοφάνεια	
15	12/9/2014	Κολυμβητήριο Χανίων			
16	12/9/2014	Πισίνα ξενοδοχείου			
17	12/9/2014	Πισίνα ξενοδοχείου			
18	12/9/2014	Πισίνα ξενοδοχείου			
19	17/9/2014	Βιολογικός καθαρισμός Χανίων – είσοδος (1:10000)	Βιολογικός καθαρισμός		
20	17/9/2014	Βιολογικός καθαρισμός Χανίων – είσοδος (1:5000)			
21	17/9/2014	Βιολογικός καθαρισμός Χανίων – έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας (1:100)			

22	17/9/2014	Βιολογικός καθαρισμός Χανίων – έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας		
----	-----------	--	--	--

Διευκρινίσεις σχετικά με την 4^η σειρά πειραμάτων:

Παρατηρήθηκε ότι στα τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για το βακτήριο *Pseudomonas* sp. δεν εντοπίστηκε καμία αποικία σε κανένα δείγμα. Αυτό ίσως σημαίνει πώς η μορφή χλωρίου που απολυμαίνουν τις παραπάνω πισίνες καταστρέφει ολοσχερώς τα πιθανά είδη *Pseudomonas* sp. ή ίσως τα υπόλοιπα βακτήρια υπερτερούν αριθμητικά και δεν την αφήνουν να αναπτυχθεί. Η παρατήρηση αυτή, συγκεκριμένα για το *Pseudomonas* sp., γίνεται γιατί είναι πολύ σύνηθες να την εντοπίζουμε σε νερά πισίνας.

3.2.1.2. ΣΤΑΔΙΟ 2^ο: Μέθοδος διήθησης διαμέσου μεμβρανών υπό κενό

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση μικροοργανισμών από τα δείγματα που συλλέχθηκαν. Χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα νιτροκυτταρίνης με διάμετρο πόρων 45μm, ώστε να κατακρατούνται σε αυτό οι μικροοργανισμοί που ψάχνουμε στο εκάστοτε δείγμα.

Στη συνέχεια, τα φίλτρα τοποθετούνται σε εκλεκτικό στερεό θρεπτικό υπόστρωμα σε τριβλία τα οποία τοποθετούνται σε επωαστικό θάλαμο, στην κατάλληλη πάντα θερμοκρασία (30 – 37°C) ώστε να αναπτυχθούν οι μικροοργανισμοί που έχουν κατακρατηθεί στο φίλτρο. Εφόσον επωαστούν, στον κατάλληλο για το κάθε βακτήριο χρόνο, μετρώνται οι αποικίες που έχουν αναπτυχθεί και σημειώνονται ο αριθμός και το χρώμα τους. Στη συνέχεια, θεωρείται ότι κάθε μία αποικία προήλθε από ένα βακτήριο και υπολογίζεται ο αριθμός των βακτηρίων ανά 100 ml με αναγωγή από τον ολικό όγκο διήθησης.

Περιοριστικοί παράγοντες κατά την πειραματική διαδικασία:

- Θολερότητα του δείγματος λόγω μεγάλης ποσότητας TSS (TSS = Ολικά αιωρούμενα στερεά).
- Μεγάλη ποσότητα βακτηρίων τα οποία δεν ανήκουν στην ομάδα βακτηρίων που προσπαθούμε να εντοπίσουμε με αποτέλεσμα να εμποδίζουν την ανάπτυξη εκείνων που ψάχνουμε τα οποία μπορεί να υστερούν αριθμητικά.

3.2.1.3. ΣΤΑΔΙΟ 3^ο : Καλλιέργεια αποικιών που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό *nutrient agar*

Η διαδικασία που ακολουθεί, ύστερα από επώαση των βακτηρίων, είναι η εξής:

- Γίνεται καταμέτρηση των αποικιών και καταγραφή του χρώματός τους.
- Απομονώνονται επιλεκτικά ορισμένες αποικίες από το κάθε τριβλίο και πραγματοποιείται καλλιέργεια σε θρεπτικό υλικό *nutrient agar*.

- Τοποθετούνται οι καλλιέργειες στο θάλαμο επώασης για 24h.
- Συλλέγονται έτσι όλα τα πιθανά προς μελέτη στελέχη και στη συνέχεια ακολουθεί στο 4^ο στάδιο της διαδικασίας συλλογής και φύλαξης στελεχών.

3.2.1.4. ΣΤΑΔΙΟ 4^ο : Προετοιμασία φύλαξης μικροοργανισμών σε βαθιά ψύξη (-80°C)

Για την φύλαξη των στελεχών που καλλιεργήθηκαν σε τριβλία με nutrient agar, θα χρησιμοποιηθούν δοκιμαστικοί σωλήνες χωρητικότητας 5 ml στους οποίους τοποθετούνται τα εξής:

- 1ml διαλύματος γλυκερόλης 30% v/v
- 2ml θρεπτικού υλικού nutrient broth
- 1 κρική από την ανακαλλιέργεια

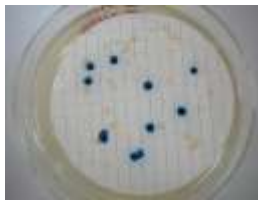
Στη συνέχεια, τοποθετούνται οι δοκιμαστικοί σωλήνες στον επωαστικό θάλαμο για 24h με τα καπάκια ελαφρώς ανοιχτά ώστε η ποσότητα οξυγόνου που χρειάζονται το κάθε βακτήριο για να αναπτυχθεί φυσιολογικά να είναι επαρκής.

Αφού γίνει η επώαση των βακτηρίων, αποθηκεύονται σε βαθιά ψύξη στους -80°C, σύμφωνα με τη διαδικασία που προτείνεται στο αντίστοιχο πρωτόκολλο.

3.2.2. Πρωτόκολλα ανάλυσης δείγματος νερού για την ανίχνευση μικροοργανισμών

Escherichia coli

1. Διήθηση 100ml δείγματος νερού υπό κενό από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45μm.
2. Τοποθέτηση του φίλτρου σε χρωμογόνο θρεπτικό υλικό Hicrome Coliform Agar.
3. Επώαση στους 37°C για 24h (Hicrome Coliform Agar).
4. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών: Στο υλικό Hicrome Coliform Agar οι τυπικές αποικίες *E. coli* είναι σκούρο μπλε - μωβ χρώματος.



Εικόνα 2. Τυπικές αποικίες *E. coli* σε θρεπτικό υλικό Hicrome Coliform Agar

Enterococcus sp.

1. Διήθηση 100ml δείγματος νερού υπό κενό από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45μm.
2. Τοποθέτηση του φίλτρου σε θρεπτικό υλικό Slanetz and Bartley medium.
3. Επώαση στους 36°C±2°C για 44h±4h (Slanetz and Bartley medium).

4. Μετά την επώαση, εάν έχουν αναπτυχθεί τυπικές αποικίες (καφέ, κόκκινου ή ροζ χρώματος) μεταφέρουμε το φίλτρο διήθησης σε θρεπτικό υλικό Bile-Aesculin-Azide Agar, το οποίο έχει προθερμανθεί στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.
5. Επώαση στους $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ για 2h.
6. Καταμέτρηση των αποικιών που έχουν μαύρο διάχυτο χρώμα στο θρεπτικό υλικό. Οι αποικίες αυτές λαμβάνονται ως κοπρανώσεις εντερόκοκκοι.

Pseudomonas sp.

1. Διήθηση 100ml δείγματος νερού υπό κενό από φίλτρο μεγέθους πόρων $0,45\mu\text{m}$.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε θρεπτικό υλικό *Pseudomonas* Agar Base που περιέχει C-N supplement.
3. Καταμέτρηση των τυπικών αποικιών οι οποίες είναι πράσινου-μπλε χρώματος (πυοκυανίνη) και φθορίζουν υπό ακτινοβολία $360 \pm 20\text{nm}$.
4. Αποικίες που δεν παράγουν πυοκυανίνη αλλά φθορίζουν υπό UV θεωρούνται ύποπτες και απαιτείται επιβεβαίωση με το ζωμό ακεταμιδίου.
5. Καφέ-κόκκινες αποικίες που δεν φθορίζουν υπό UV θεωρούνται ύποπτες και απαιτείται επιβεβαίωση με το test οξειδάσης, το ζωμό ακεταμιδίου και το King's B media.



Εικόνα 3. Αποικίες που φθορίζουν υπό το φως ακτινοβολίας UV

Ολική μικροβιακή χλωρίδα

1. Διήθηση 100ml δείγματος νερού υπό κενό από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45μm.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε θρεπτικό υλικό Plate Count Agar.
3. Επώαση στους 37°C για 24h.
4. Καταμέτρηση και καταγραφή χρώματος όλων των αποικιών που αναπτύσσονται.



Εικόνα 4. Αποικίες που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Plate count agar

Staphylococcus sp.

1. Διήθηση 100ml δείγματος νερού υπό κενό από φίλτρο μεγέθους πόρων 0,45μm.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε θρεπτικό υλικό Manitol soft agar.
3. Επώαση στους 37°C για 24h.
4. Καταμέτρηση των αποικιών κίτρινου χρώματος. Στο θρεπτικό υλικό Manitol soft agar οι κίτρινες αποικίες ανήκουν στο γένος του βακτηρίου *Staphylococcus*.



Εικόνα 5. Πιθανές αποικίες του είδους *Staphylococcus* sp. που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό υλικό Manitol soft agar

3.2.3. Βιοχημικά api tests ταυτοποίησης μικροοργανισμών

Api ® Staph

Το Api ® Staph test εφαρμόστηκε για αποικίες που εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν από τα τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Manitol soft agar. Οι αποικίες που επιλέχθηκαν προέρχονταν από θαλασσινά υδατικά δείγματα αλλά και δείγματα κολυμβητικών δεξαμενών. Επιλέχθηκε κίτρινο χρώμα αποικιών καθώς σύμφωνα με το πρωτόκολλα ανάλυσης δειγμάτων για την ανίχνευση μικροοργανισμών, οι αποικίες αυτού του χρώματος σε θρεπτικό υλικό Manitol soft agar πιθανώς ανήκουν στο είδος *Staphylococcus* sp.

Προετοιμασία για το Api ® Staph test:

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του βακτηρίου προς ταυτοποίηση σε nutrient agar και τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο για 24h στους 37°C. Παρασκευάστηκε ομογενές βακτηριακό εναιώρημα με θολερότητα ισοδύναμη με 0,5 McFarland, με χρήση για κάθε στέλεχος μία φύσιγγα API Staph Medium μέσα στην οποία είχαν τοποθετηθεί τόσες αποικίες από το στέλεχος όσες να δημιουργηθεί η απαραίτητη θολερότητα. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιήθηκαν τα απαραίτητα αντιδραστήρια και μετά την ολοκλήρωση του test, πραγματοποιήθηκε ανάγνωση και ερμήνευση των αποτελεσμάτων.

Api ® Strep

Το Api ® Strep πραγματοποιήθηκε για τις σκούρο καφέ αποικίες που εντοπίστηκαν και απομονώθηκαν από τα τριβλία με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Bile aesculine azide agar. Επιλέχθηκαν στελέχη από θαλασσινά υδατικά δείγματα καθώς και υδατικά δείγματα ποταμού και λίμνης.

Προετοιμασία για το Api ® Strep test:

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του βακτηρίου προς ταυτοποίηση σε nutrient agar και τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο για 24h στους 37°C. Παρασκευάστηκε ομογενές βακτηριακό εναιώρημα με θολερότητα ισοδύναμη με 4 McFarland, χρησιμοποιώντας για κάθε στέλεχος 2ml NaCl 0.9% τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια, με τη χρήση κρίκου απομονώθηκαν τόσες αποικίες ώστε να παρασκευαστεί εναιώρημα της ζητούμενης θολερότητας. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιήθηκαν τα απαραίτητα αντιδραστήρια και μετά την ολοκλήρωση του test, πραγματοποιήθηκε ανάγνωση και ερμήνευση των αποτελεσμάτων.

Api ® 20 E™

Το test αυτό προορίζεται για βακτήρια που έχει πιστοποιηθεί μέσω test οξείδωσης πως είναι Gram-αρνητικά.

Προετοιμασία του εναιωρήματος:

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του βακτηρίου προς ταυτοποίηση σε nutrient agar και τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο για 24h στους 37°C. Στη συνέχεια, παρασκευάστηκε ομογενές βακτηριακό εναιώρημα για κάθε στέλεχος με τη χρήση 5ml NaCl 0.9% τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιήθηκαν τα απαραίτητα αντιδραστήρια και μετά την ολοκλήρωση του test, πραγματοποιήθηκε ανάγνωση και ερμήνευση των αποτελεσμάτων.



Εικόνα 6. Ορισμένες από τις ταινίες του test Api® 20E™ ύστερα από τη δράση των τελευταίων αντιδραστηρίων

Api ® 20 NE™

Το test αυτό προορίζεται για βακτήρια που έχει πιστοποιηθεί μέσω test οξείδωσης πως είναι Gram-θετικά. Τα βακτήρια που συλλέξαμε από το θρεπτικό υλικό pseudomonas agar base ήταν όλα Gram-θετικά άρα χρησιμοποιήσαμε αυτό το test. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη από δείγματα πόσιμου, θαλασσινού και επιφανειακού(λίμνη & ποτάμι) ύδατος.

Προετοιμασία του Api ® 20 NE™ test:

Πραγματοποιήθηκε καλλιέργεια του βακτηρίου προς ταυτοποίηση σε nutrient agar και τοποθετήθηκε στον επωαστικό θάλαμο για 24h στους 37°C. Στη συνέχεια παρασκευάστηκε ομογενές βακτηριακό εναιώρημα με θολερότητα ισοδύναμη με 0.5 McFarland, με τη χρήση 2ml NaCl 0.9% για κάθε στέλεχος, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Στη συνέχεια, με τη χρήση κρίκου απομονώθηκαν δύο με τρεις αποικίες και προστέθηκαν στο εναιώρημα. Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, χρησιμοποιήθηκαν τα απαραίτητα αντιδραστήρια και μετά την ολοκλήρωση του test, πραγματοποιήθηκε ανάγνωση και ερμηνευση των αποτελεσμάτων.

3.3. Μεθοδολογίες απολύμανσης

3.3.1. Χλωρίωση

3.3.1.1. Προετοιμασία

- 1) Για την παρασκευή του διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl₂ πραγματοποιήθηκε αραιώση πυκνού διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 50*10³ mg/L ως προς Cl₂.
- 2) Απαιτείται αρχική συγκέντρωση βακτηρίου στο διάλυμα ίση με 10⁷ CFUs/mL. Αρχικά, παρασκευάζεται εναιώρημα το οποίο, βάσει της κλίμακας McFarland, όταν φωτομετρηθεί στα 600nm και έχει απορρόφηση περίπου ίση με A=0.1, υπολογίζεται πως περιέχει

συγκέντρωση αποικιών ίση με 10^8 CFUs/mL. Έπειτα, με την κατάλληλη αραίωση επιτυγχάνεται η απαιτούμενη αρχική συγκέντρωση στο διάλυμα.

- 3) Προετοιμάζονται σωλήνες erendorf (χωρητικότητας 1,5ml) στους οποίους τοποθετείται ποσότητα διαλύματος $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (συγκέντρωσης 18mg/L) ίση με 90μL, με σκοπό την διακοπή της δράσης του υπολειμματικού χλωρίου στο δείγμα, σε κάθε χρονική στιγμή t της δειγματοληψίας.

3.3.1.2. Πειραματική διαδικασία

Τιτλοδότηση

Για τον έλεγχο της δραστηριότητας του διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl_2 , πραγματοποιείται τιτλοδότηση με στόχο τον υπολογισμό της συγκέντρωσής του ως προς Cl_2 με την πάροδο του χρόνου.

Έτσι, σε μία κωνική φιάλη προστίθενται τα εξής:

- 10 ml διαλύματος NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl_2
- 5ml οξικού οξέος
- 1g ιωδιούχου καλίου

Στη συνέχεια, τιτλοδοτείται διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ κανονικότητας 0,1N μέχρι να αποχρωματιστεί το δείγμα και μετράται η ποσότητα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ που καταναλώθηκε.

Με την εφαρμογή της παρακάτω σχέσης υπολογίζονται πόσα g/L Cl_2 περιέχονται στο αρχικό διάλυμα NaOCl :

$$\frac{g}{L} \text{Cl}_2 = \frac{(ml \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ που καταναλώθηκαν}) \times 0.1N \times 35.5}{10 \text{ mL}}$$

Όπου:

10mL είναι η ποσότητα διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε για την τιτλοδότηση

35.5 είναι το Ar του χλωρίου

3.3.1.3. Συνοπτική περιγραφή της χλωρίωσης

Χρησιμοποιήθηκε ως απολυμαντικό μέσο NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl_2 και εφαρμόστηκε απολύμανση με χλώριο σε 28 διαφορετικά βακτήρια.

Για κάθε στέλεχος, παρασκευάστηκε διάλυμα 300ml. Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο νερό, ως υδατική μήτρα και εναιώρημα που παρασκευάστηκε από αποστειρωμένο νερό και αποικίες του βακτηρίου που πρόκειται να υποβληθεί σε απολύμανση. Στη συνέχεια, με την προσθήκη χλωρίου δόσης 0.3 mg/L αρχίζει η πειραματική διαδικασία.

Ο λόγος που δεν αναφέρεται ακριβώς η ποσότητα διαλύματος NaOCl που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά, είναι γιατί ανάλογα με την τιτλοδότηση που γινόταν σε κάθε πείραμα, άλλαζε η αναγκαία ποσότητα που χρησιμοποιούνταν από το αρχικό διάλυμα, ώστε η συγκέντρωση στο δείγμα να παραμένει πάντα 0,3 mg/L.

Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να σημειωθεί πως υπάρχει λόγος που η δόση χλωρίου είναι 0,3 mg/L στο συγκεκριμένο πείραμα.

Αρχικά, για το πρώτο πείραμα χλωρίωσης επιλέχθηκε δόση χλωρίου 1 mg/L, καθώς σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές αυτή η δόση είναι αρκετά για την αδρανοποίηση βακτηρίων που ευθύνονται για κοπρανώδη μόλυνση. Ωστόσο, παρατηρήθηκε πως το βακτήριο που επιλέχθηκε να υποβληθεί σε χλωρίωση θανατώθηκε ολοσχερώς τα πρώτα 4 λεπτά του πειράματος. Αυτό είναι κάτι θετικό, εφόσον ο στόχος της απολύμανσης είναι η θανάτωση των βακτηρίων. Όμως, εάν όλος ο πληθυσμός του βακτηρίου θανατώνεται σε τόσο μικρό χρονικό διάστημα δεν είναι εύκολο να κατασκευαστεί η καμπύλη απολύμανσης ώστε να φανεί η σταδιακή μείωση του πληθυσμού και η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στη δράση του απολυμαντικού.

Έτσι, επιλέχθηκε μία αρκετά μικρότερη δόση χλωρίου, προκειμένου η μείωση του πληθυσμού του εκάστοτε βακτηρίου να γίνεται σταδιακά και να παρατηρείται με αυτόν τον τρόπο ευκολότερα η αντίδραση του βακτηρίου στη μέθοδο απολύμανσης.

3.3.1.4. Πειραματική διαδικασία χλωρίωσης

Βήμα 1^ο: Πριν την έναρξη του χρονόμετρου, απομονώνεται δείγμα ποσότητας 1mL με αυτόματα πιπέτα και τοποθετείται σε σωλήνα erendorf. Το δείγμα μεταφέρεται στο ψυγείο ώστε να σταματήσει η πιθανή ανάπτυξη του βακτηρίου.

Βήμα 2^ο: Προστίθεται η απαραίτητη δόση χλωρίου, ενώ η ανάδευση συνεχίζει και ενεργοποιείται το χρονόμετρο. Για κάθε χρονική στιγμή t , λαμβάνεται και τοποθετείται σε erendorf ποσότητα ίση με 1mL.

Βήμα 3^ο: Αφού ολοκληρωθεί δειγματοληψία, έως και τον χρόνο $t = 45 \text{ min}$, το πείραμα ολοκληρώνεται ως εξής:

Για κάθε χρονική στιγμή t προετοιμάζονται δύο τριβλία με στερεό θρεπτικό υλικό nutrient agar. Αναδεύεται καλά το περιεχόμενο των erendorf και επιστρώνεται στο κάθε τριβλίο ποσότητα ίση με 300μL.

Βήμα 4^ο: Αφήνονται τα τριβλία για 20 min προκειμένου να ενσωματωθεί στο θρεπτικό υλικό το δείγμα και στη συνέχεια τοποθετούνται ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης για 24h στους 37°C.

Ύστερα από την ολοκλήρωση των πειραμάτων της χλωρίωσης, εφαρμόστηκε σε κάποια από τα βακτήρια φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA παρουσία καταλύτη TiO_2 .

Κριτήριο για την επιλογή των βακτηρίων ήταν η ανθεκτικότητά τους στην χλωρίωση. Βακτήρια που αδρανοποιήθηκαν πολύ γρήγορα κατά την διαδικασία της χλωρίωσης, δεν υποβλήθηκαν καθόλου σε φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA.

3.3.2. Φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA

3.3.2.1. Συνοπτική περιγραφή της μεθόδου

Παρασκευάζεται διάλυμα 300ml αποτελούμενο από αποστειρωμένο νερό και εναιώρημα αποικιών του βακτηρίου που επρόκειτο να υποβληθεί σε απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA.

Προτού τοποθετηθεί το εναιώρημα στο αποστειρωμένο νερό, προστίθεται καταλύτης TiO_2 συγκέντρωσης 50 mg/L και αφήνεται να αναδευτεί για περίπου 20 min προκειμένου να ενσωματωθεί στο διάλυμα. Στη συνέχεια, προστίθεται το εναιώρημα και ξεκινά η εκπομπή της υπεριώδους ακτινοβολίας UVA. Η δειγματοληψία γίνεται για τις ίδιες χρονικές στιγμές με αυτές του πειράματος της χλωρίωσης.

Στόχος είναι να σύγκριση των δύο μεθόδων. Έτσι, τα αποτελέσματα και των δύο μεθόδων για τις ίδιες χρονικές στιγμές θα δείξουν πόσο αποτελεσματική είναι η κάθε μια ανάλογα το είδος και την προέλευση του βακτηρίου.



Εικόνα 7. Πειραματική διάταξη φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA

3.3.2.2. Βήματα που ακολουθήθηκαν για την εκπόνηση του πειράματος της φωτοκατάλυσης με υπεριώδη ακτινοβολία UVA

Βήμα 1^ο: Χρησιμοποιήθηκε υδατική μήτρα ποσότητας 270 ml και στη συνέχεια προστίθενται 15 mg καταλύτης TiO_2 . Ακολουθεί αργή ανάδευση για 20min προκειμένου να ενσωματωθεί ο καταλύτης στο διάλυμα.

Βήμα 2^ο: Παρασκευάζεται εναιώρημα του βακτηρίου που πρόκειται να υποβληθεί σε απολύμανση, αποτελούμενο από αποστειρωμένο νερό και αποικίες του βακτηρίου. Στόχος είναι η παρασκευή εναιωρήματος απορρόφησης $A = 0,1$ το οποίο, σύμφωνα με την κλίμακα McFarland σημαίνει πως, προσεγγιστικά, ο πληθυσμός του βακτηρίου κυμαίνεται στα 10^8 CFUs/mL.

Βήμα 3^ο: Επιμολύνεται κατάλληλη ποσότητα νερού με την απαραίτητη ποσότητα του παραπάνω εναιωρήματος, ώστε να παρασκευαστεί διάλυμα 300 mL στο οποίο η συγκέντρωση του βακτηρίου θα είναι περίπου 10^7 CFUs/mL.

Βήμα 4^ο: Ενεργοποιείται στη συνέχεια ο λαμπτήρας εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας UVA και αρχίζει η δειγματοληψία στις ίδιες χρονικές στιγμές με αυτές του πειράματος της χλωρίωσης ($t = 2, 4, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 45$ min). Για κάθε χρονική στιγμή, λαμβάνεται δείγμα και επιστρέφεται σε δύο τριβλία ποσότητα ίση με 300 μ L.

Βήμα 5^ο: Αφήνονται τα τριβλία για 20 min προκειμένου να ενσωματωθεί στο θρεπτικό υλικό το δείγμα και στη συνέχεια τοποθετούνται ανεστραμμένα στο θάλαμο επώασης για 24h στους 37°C .

3.3.2.3. Έλεγχος ως προς το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης

Παρ' όλο που μετά από 24h επώασης το πείραμα μπορεί να δείξει ότι υπάρχει πολύ μεγάλη μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου ή και εξόντωσή του, πρέπει να ελεγχθεί κατά πόσο το βακτήριο που υποβλήθηκε σε φωτοκατάλυση με UV-A ακτινοβολία μπορεί να ανασυγκροτηθεί και να αρχίσει ξανά να αναπτύσσεται, βάσει του φαινομένου της φωτοενεργοποίησης. Με αυτόν τον τρόπο ελέγχεται πόσο αποτελεσματική είναι η μέθοδος αυτή στην καταστροφή του βακτηριακού κυττάρου. Έτσι, θα εξεταστεί κατά πόσο τα ζώντα κύτταρα του κάθε βακτηρίου αναπτύσσονται σε συνθήκες φυσικού φωτισμού αλλά και σε συνθήκες απόλυτου σκοταδιού.

Έτσι, πραγματοποιήθηκαν τα εξής βήματα:

1. Μετά το πέρας της δειγματοληψίας ($t=45$ min) χωρίστηκε το διάλυμα των 300 ml σε δύο μέρη και τοποθετήθηκε σε δύο κωνικές φιάλες.
2. Η μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκε δίπλα στο παράθυρο όπου η ακτινοβολία του ήλιου είναι έντονη και η άλλη τοποθετήθηκε μέσα σε ένα συρτάρι ώστε να επικρατούν συνθήκες απόλυτου σκοταδιού.
3. Ύστερα από 24h και 48h έγιναν καλλιέργειες από τα διαλύματα και των δύο φιαλών, ώστε να ελεγχθεί αν το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης πραγματοποιείται ή όχι.

3.4. RAPD – PCR

3.4.1. Πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού Gram+ & Gram- βακτηρίων

Η απομόνωση γενετικού υλικού των Gram+ & Gram- βακτηρίων πραγματοποιείται με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου σε συνδυασμό με τη χρήση ενζύμων, της πρωτεΐνάσης K και της λυσοζύμης.

Παρασκευή διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια απομόνωσης του γενετικού υλικού.

- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris – EDTA (TE): Το διάλυμα αποτελείται από 50mM Tris και 50mM EDTA. Το pH του διαλύματος πρέπει να είναι 8 και αφού παρασκευαστεί τοποθετείται σε αυτόκαυστο για 15 min στους 121°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme Lysis buffer: Το διάλυμα αποτελείται από 100mM NaCl, 500mM Tris [pH 8.0] και από το ένζυμο lysozyme συγκέντρωσης 30mg/mL.
- Διάλυμα CTAB: Το διάλυμα αποτελείται από 4.1g NaCl, 10g CTAB και 100mL H₂O αποστειρωμένο.

3.4.2. Φωτομέτρηση

Μια από τις μεθόδους για τον προσδιορισμό της ποσότητας και της καθαρότητας του DNA είναι η φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης ορατού-υπεριώδους. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται φωτομέτρηση του γενετικού υλικού στα μήκη κύματος 260 nm και 280 nm. Η οπτική απορρόφηση (Optical Density – OD) στα 260 nm επιτρέπει τον προσδιορισμό συγκέντρωσης του γενετικού υλικού στο υπό εξέταση δείγμα. Η αναλογία των οπτικών απορροφήσεων στα δύο μήκη κύματος 260 nm και 280 nm, αντίστοιχα (OD₂₆₀/OD₂₈₀) επιτρέπει τον προσδιορισμό της καθαρότητας του νουκλεϊκού οξέος.

3.4.3. RAPD-PCR

Για τον κάθε εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε χρειάστηκε να παρασκευαστούν διαφορετικά μίγματα για τις αντιδράσεις PCR, των οποίων τα περιεχόμενα φαίνονται αναλυτικά στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR με τη χρήση του *primer RAPD 1290* (όγκος αντίδρασης 40μL)

PCR mixture	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	2.5mM
dNTPs	0.25mM
Primer	0.5μM
Taq	2U
DNA	50ng

Πίνακας 6. Κύκλοι αντίδρασης PCR για τον primer RAPD 1290

94 °C	4min	45 cycles
94 °C	1min	
38 °C	5min	
72 °C	2min	
72 °C	7min	

Πίνακας 7. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR με τη χρήση του *primer* RAPD M13 (όγκος αντίδρασης 40μL)

PCR mixture	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	2.5mM
dNTPs	0.2mM
Primer	0.4μM
Taq	2U
DNA	50ng

Πίνακας 8. Κύκλοι αντίδρασης PCR για τον primer RAPD M13

94 °C	2min	40 cycles
94 °C	1min	
37 °C	1min	
72 °C	90sec	
72 °C	90sec	

Πίνακας 9. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR με τη χρήση του *primer* RAPD4 (όγκος αντίδρασης 40μL)

PCR mixture	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	2.5mM
dNTPs	0.25mM
Primer	0.5μM
Taq	2U
DNA	50ng

Πίνακας 10. Κύκλοι αντίδρασης PCR για τον primer RAPD4

94 °C	4min	45 cycles
94 °C	1min	
38 °C	5min	
72 °C	2min	
72 °C	7min	

Πίνακας 11. Περιεχόμενα αντίδρασης PCR με τη χρήση του *primer* RAPD7 (όγκος αντίδρασης 40μL)

PCR mixture	Συγκέντρωση
Buffer	1X
MgCl ₂	2.5mM
dNTPs	0.25mM
Primer	0.5μM
Taq	2U
DNA	50ng

40μL)

Πίνακας 12. Κύκλοι αντίδρασης PCR για τον primer RAPD7

94 °C	4min	45 cycles
94 °C	1min	
38 °C	5min	
72 °C	2min	
72 °C	7min	

4. Αποτελέσματα

4.1. Βιοχημική ταυτοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών με τα Api® Tests

Στους παρακάτω πίνακες έχουν καταγραφεί τα αποτελέσματα των βιοχημικών tests που πραγματοποιήθηκαν για ορισμένα βακτήρια.

4.1.1. Api® 20 NE™ : Gram+ βακτήρια

Πίνακας 13. Αποτελέσματα Api® 20 NE™

Είδος ύδατος	Είδος βακτηρίου	Ποσοστό ταυτοποίησης (%)
Πόσιμο	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99.9
Θαλασσινό	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99.9
Επιφανειακό (ποτάμι)	<i>Aeromonas hydrophila</i>	99.1
Επιφανειακό (λίμνη)	<i>Pseudomonas cepacia</i>	99.3

Είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με το βιοχημικό test Api® 20 NE™

Pseudomonas sp.

Το *Pseudomonas* sp. είναι ένα Gram θετικό, αερόβιο βακτήριο που ανήκει στο γένος των *Gamma Proteobacteria* της βακτηριακής οικογένειας *Pseudomonadaceae*. Τα είδη της εμφανίζουν μεταβολική ποικιλομορφία με αποτέλεσμα να μπορούν να αποικίσουν σε ένα ευρύ φάσμα περιοχών. Έχει ένα ή περισσότερα μαστίγια τα οποία της επιτρέπουν να κινείται με ευελιξία.

Ένα βασικό χαρακτηριστικό της, το οποίο συνδέεται σχεδόν με όλα τα είδη της (με κάποιες εξαιρέσεις βέβαια), είναι η έκκριση pyoverdine, μιας ουσίας κιτρινοπράσινης η οποία φθορίζει όταν τοποθετηθεί σε συνθήκες UV ακτινοβολίας.

Είναι ένα βακτήριο ολιγαρκές καθώς μπορεί να αναπτυχθεί ακόμη και σε απεσταγμένο νερό, γεγονός που αποδεικνύει τις ελάχιστες διατροφικές του ανάγκες. Ευδοκίμει σε θερμοκρασίες από 37 έως και 42°C σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συνθήκες υγρασίας. Είναι ανθεκτικό σε συνθήκες όπως οι υψηλές θερμοκρασίες καθώς και σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, αδύναμων αντισηπτικών καθώς και σε πολλές μορφές αντιβιοτικών. Επίσης, έχει την τάση στις επιφάνειες που εγκαθίσταται να σχηματίζει βιοφίλμ.

Το *Pseudomonas* sp. είναι ένα βακτήριο που συναντάται συχνά στο έδαφος και στο νερό. Τα περισσότερα είδη του είναι δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Γενικότερα θα το χαρακτηρίζαμε σαν ένα δυνητικά παθογόνο βακτήριο καθώς εκμεταλλεύεται την αδυναμία του ξενιστή την κατάλληλη στιγμή, όταν δηλαδή αυτός θα είναι αδύναμος.

Aeromonas hydrophila

Το *Aeromonas hydrophila* είναι ένα Gram θετικό βακτήριο, ραβδόμορφου σχήματος που συχνά συναντάται σε υδάτινα οικοσυστήματα και ανήκει στη οικογένεια *Aeromonadaceae*. Η ύπαρξη του στο νερό πολλές φορές προμηνύει την ύπαρξη του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* και το αντίστροφο, γι' αυτό στην περίπτωση ελέγχου υδατινού δείγματος για την ανίχνευση του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* ή *Aeromonas sp.* χρησιμοποιείται το ίδιο θρεπτικό υλικό, καθώς τα δύο αυτά βακτήρια τρέφονται με παρόμοιες πηγές. Η ανίχνευση του *A. hydrophila* σε διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα είναι συνηθισμένος, καθώς αποτελεί μέρος της μικροχλωρίδας τους. Έτσι, η ύπαρξη της στο νερό δεν σημαίνει πως το νερό αυτό είναι απαραίτητα μολυσμένο.

4.1.2. Api® 20 E™: Gram- βακτήρια

Πίνακας 14. Αποτελέσματα Api® 20 E™

Είδος ύδατος	Είδος βακτηρίου	Ποσοστό ταυτοποίησης (%)
Πόσιμο	<i>Enterobacter sakazakii</i>	98
Θαλασσινό	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-
Επιφανειακό (ποτάμι)	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
Επιφανειακό (λίμνη)	<i>Serratia odorifera</i>	99.9
Κολυμβητική δεξαμενή	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-

Είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με το βιοχημικό test Api® 20 E™

Raoultella ornithinolytica

Το είδος *Raoultella ornithinolytica* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες και είναι καταλάση θετικό βακτήριο. Ιδανική θερμοκρασία ανάπτυξής του είναι οι 37°C. Εντοπίζεται σε υδάτινα περιβάλλοντα αλλά και σε νοσοκομεία. Υπάρχει συμβιωτικά στο ανθρώπινο ουροποιητικό σύστημα (Khajuria A., Praharaj A., Grover N., Kumar M., 2013)

Klebsiella oxytoca

Το είδος *Klebsiella oxytoca* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, ραβδόμορφου σχήματος και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Γενικά, το γένος *Klebsiella* ευθύνεται συχνά για νοσοκομειακές λοιμώξεις και έχει χαρακτηριστεί ως ένα βακτήριο ανθεκτικό σε ένα μεγάλο εύρος αντιβιοτικών. Πιθανές πηγές του βακτηρίου αυτού είναι το γαστρεντερικό σύστημα των θηλαστικών, ενώ ευνοϊκά περιβάλλοντα ανάπτυξής του θεωρούνται τα επιφανειακά ύδατα, το έδαφος, τα φυτά, αλλά και διαφόρων ειδών λύματα. Το είδος *K. oxytoca* είναι ένα από τα πέντε είδη του γένους *Klebsiella* το οποίο αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μικρότερες από 44,5 °C για

αυτό το λόγο και ευνοείται η ανάπτυξή του στα επιφανειακά ύδατα. Επίσης, τα είδη *K. oxytoca* και *K. pneumoniae* είναι αυτά που συναντώνται περισσότερο στο περιβάλλον.

Serratia odorifera

Το βακτήριο *Serratia odorifera* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, ραβδόμορφου σχήματος δυνητικά αναερόβιο όπως και δυνητικά παθογόνο, το οποίο, επίσης, ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Σπάνια έχουν αναφερθεί περιστατικά παθογένειας από το συγκεκριμένο είδος *Serratia*. Το είδος *Serratia marcescens* είναι αυτό που έχει αναφερθεί συχνά να σχετίζεται με νοσοκομειακές λοιμώξεις. Τα περισσότερα είδη *Serratia* εντοπίζονται τόσο σε υδάτινα περιβάλλοντα αλλά και στο έδαφος.

Enterobacter sakazakii

Το βακτήριο *Enterobacter sakazakii* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο, ραβδόμορφου σχήματος που δεν σχηματίζει σπόρια. Το γένος *Enterobacter* είναι παρόμοιο με αυτό της *Klebsiella* ως προς τα βιοχημικά του χαρακτηριστικά. Επίσης, το είδος *E. sakazakii* έχει αποδειχθεί πως είναι πιο ανθεκτικό σε ξηρά περιβάλλοντα, σε σχέση με τα υπόλοιπα μέλη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*. Η πηγή του *E. sakazakii* παραμένει άγνωστη. Ύστερα από έρευνες που έχουν γίνει, η μόνη «πηγή» που εντοπίστηκε ήταν στα σπλάχνα μυγών. Επίσης, έχει εντοπιστεί και σε εργοστάσια παραγωγής γάλακτος σε σκόνη. Σε μία έρευνα όπου ελέγχθηκαν 141 διαφορετικά παιδικά γάλατα σε σκόνη, 20 από αυτά βρέθηκαν θετικά σε *Enterobacter sakazakii*. Επομένως, δεν είναι γνωστή η προέλευσή του, σε περίπτωση που εντοπιστεί σε ένα υδάτινο περιβάλλον.

4.1.3. Api ® Staph

Πίνακας 15. Αποτελέσματα Api ® Staph

Είδος ύδατος	Είδος βακτηρίου	Ποσοστό ταυτοποίησης (%)
Θαλασσινό	<i>Staphylococcus xylosus</i>	99.8
Θαλασσινό	<i>Staphylococcus lentus</i>	80.1
Επιφανειακό (λίμνη)	<i>Staphylococcus lentus</i>	98.8
Επιφανειακό (λίμνη)	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-
Κολυμβητική δεξαμενή 1	<i>Staphylococcus xylosus</i>	-
Κολυμβητική δεξαμενή 2	<i>Staphylococcus caprae</i>	36.9

Είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με το βιοχημικό test Api ® Staph

Staphylococcus sp.

Ο σταφυλόκοκκος είναι ένα Gram+ βακτήριο και είναι κυρίως ανθρωπογενούς προέλευσης. Τα κύτταρά του είναι απόλυτα σφαιρικά διαμέτρου, περίπου, 1µm.

Αναπτύσσεται σε συστάδες, δηλαδή τα κύτταρα που δημιουργούνται, ουσιαστικά διαιρούνται σε τρία διαδοχικά επίπεδα κάθετα με τα γονεϊκά τους κύτταρα και παραμένουν στερεωμένα πάνω στο άλλο μετά από κάθε διαδοχική διαίρεση. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργούνται μικρές συστάδες κυττάρων που μοιάζουν με σταφύλια. Ο σταφυλόκοκκος έχει προταθεί ως δείκτης μόλυνσης του θαλάσσιου νερού και των κολυμβητικών δεξαμενών, καθώς παρουσιάζει ιδιαίτερη ανθεκτικότητα, σε σχέση με άλλα βακτήρια, στο αλάτι και το χλώριο. Οι αποικίες του έχουν συνήθως κίτρινο χρώμα και είναι σχετικά μεγάλες, όταν χρησιμοποιείται θρεπτικό υλικό απομόνωσής του, Manitol Soft agar. Αναπτύσσεται σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 15-45°C και σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις NaCl.

Είδη σταφυλόκοκκου που ταυτοποιήθηκαν μέσω των βιοχημικών tests

- *Staphylococcus xylosus*: Αυτό το είδος σταφυλόκοκκου αναπτύσσεται στο δέρμα κυρίως των ζώων αλλά και των ανθρώπων. Επίσης, έχει βρεθεί και σε τρόφιμα όπως γαλακτοκομικά προϊόντα.
- *Staphylococcus caprae*: Αυτό το είδος σταφυλόκοκκου προέρχεται από κατσίκες (caprae σημαίνει «από την κατσίκα») αλλά ορισμένα στελέχη του είδους αυτού έχουν απομονωθεί και από τον άνθρωπο.
- *Staphylococcus lentus*: Έτσι και αυτό το είδος όπως και τα άλλα δύο που αναφέρθηκαν, εντοπίζεται τόσο σε γαλακτοκομικά προϊόντα αλλά και στο ουροποιητικό σύστημα του ανθρώπου και ορισμένων ζώων όπως οι κατσίκες και τα πρόβατα.

4.1.4. Api ® Strep

Πίνακας 16. Αποτελέσματα Api ® Strep

Είδος ύδατος	Είδος βακτηρίου	Ποσοστό ταυτοποίησης (%)
Θαλασσινό	<i>Enterococcus faecium</i>	-
Επιφανειακό (λίμνη)	<i>Enterococcus faecium</i>	-
Επιφανειακό (ποτάμι)	<i>Enterococcus faecium/Enterococcus uberis</i>	-

Είδη βακτηρίων που ταυτοποιήθηκαν με το βιοχημικό test Api ® Strep

Το *Enterococcus sp.* ανήκει στην ομάδα των Gram θετικών βακτηρίων και στην οικογένεια *Enterococcaceae*. Αναπτύσσεται σε ζεύγη κόκκων ή βραχείες αλυσίδες. Είναι δύσκολο να διαχωριστεί από το γένος του στρεπτόκοκκου καθώς τα φυσικά χαρακτηριστικά τους είναι πολύ κοντινά. Είναι ένας μικροοργανισμός που αναπτύσσεται τόσο σε αερόβιες αλλά και αναερόβιες συνθήκες. Παρ' όλο που δεν έχει τη δυνατότητα να δημιουργήσει σπόρια, ο εντερόκοκκος είναι αρκετά ανθεκτικός σε ένα μεγάλο φάσμα καιρικών συνθηκών. Για παράδειγμα, είναι ανθεκτικός

σε ακραίες θερμοκρασίες όπως 10 – 45 °C, σε pH 4,5 – 10 και υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου. Τα είδη εντερόκοκκου που υπάρχουν συμβιωτικά στο έντερο των ανθρώπων είναι ο *E. faecalis* (90-95%) και ο *E. faecium* (5-10%).

Σε ό, τι αφορά την ύπαρξη του στο νερό και την αξιολόγηση της ποιότητας των υδάτων, τα αποδεκτά επίπεδά του στο νερό είναι πολύ χαμηλά, καθώς είναι ένας δείκτης ποιότητας του νερού. Επίσης, ο λόγος που μικρή ποσότητά του μπορεί να καθιστά μία πηγή νερού μολυσμένη είναι γιατί ακόμα και μία μικρή ποσότητα του είναι αρκετή για να προκαλέσει παθογένεια σε ζώντες οργανισμούς.

4.1.5. Αποτελεσματικότητα των Api® tests ως προς το ποσοστό ταυτοποίησης

Σε ορισμένα στελέχη δεν έχει οριστεί ποσοστό ταυτοποίησης. Το ποσοστό ταυτοποίησης ουσιαστικά ορίζει κατά πόσο το στέλεχος προς ταυτοποίηση είναι αυτό που δίνει το test σαν αποτέλεσμα. Ο λόγος που σε ορισμένες περιπτώσεις δεν δίνεται κάποιο ποσοστό ταυτοποίησης είναι γιατί τα στελέχη έχουν συλλεχθεί από περιβαλλοντικά δείγματα, ενώ τα tests έχουν σχεδιαστεί για κλινικά δείγματα. Επομένως, από τη στιγμή που υπάρχουν αποκλίσεις ανάμεσα στα στελέχη που εντοπίζονται σε περιβαλλοντικά δείγματα και στα ίδια στελέχη που θα μπορούσαν να συλλεχθούν από κάποιον οργανισμό, είναι λογικό το test σε κάποιες περιπτώσεις να μην μπορεί να δώσει κάποια ξεκάθαρη απάντηση.

4.2. Ομαδοποίηση των βακτηρίων βάσει οικογένειας

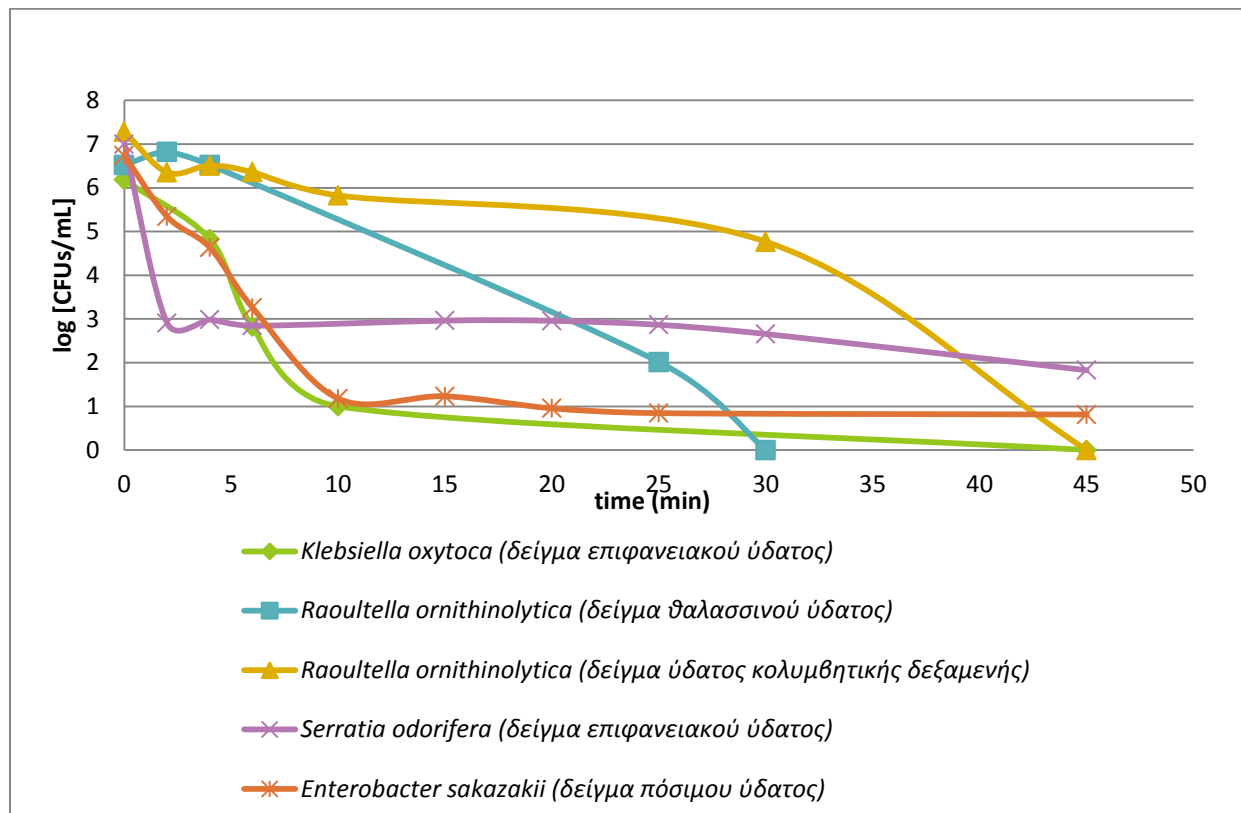
Πίνακας 17. Ομαδοποίηση των βακτηρίων βάσει οικογένειας

α/α	Βακτηριακό στέλεχος	Οικογένεια	Προέλευση
1	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Επιφανειακό νερό
2	<i>Raoultella ornitholytica</i>		Θαλασσινό νερό
3	<i>Raoultella ornitholytica</i>		Κολυμβητική δεξαμενή
4	<i>Serratia odorifera</i>		Επιφανειακό νερό
5	<i>Enterobacter sakazakii</i>		Πόσιμο νερό νερό
6	<i>Escherichia coli</i>		Θαλασσινό νερό
7	<i>Escherichia coli</i>		Επιφανειακό νερό
8	<i>Escherichia coli</i>		Απόβλητο (έξοδος δευτεροβάθμιας)

9	<i>Escherichia coli</i>		Θαλασσινό νερό
10	<i>Escherichia coli</i>		Επιφανειακό νερό
11	<i>Escherichia coli</i>		Απόβλητο (είσοδος)
12	<i>Staphylococcus lentus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Επιφανειακό νερό
13	<i>Staphylococcus lentus</i>		Θαλασσινό νερό
14	<i>Staphylococcus xylosus</i>		Θαλασσινό νερό
15	<i>Staphylococcus xylosus</i>		Επιφανειακό νερό
16	<i>Staphylococcus xylosus</i>		Κολυμβητική δεξαμενή
17	<i>Staphylococcus caprae</i>		Κολυμβητική δεξαμενή
18	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonadaceae</i>	Θαλασσινό νερό
19	<i>Aeromonas hydrophila</i>		Επιφανειακό νερό
20	<i>Aeromonas hydrophila</i>		Πόσιμο νερό νερό
21	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	Επιφανειακό νερό
22	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Enterococcaceae</i>	Θαλασσινό νερό
23	<i>Enterococcus</i> sp.		Απόβλητο (είσοδος)
24	<i>Enterococcus</i> sp.		Θαλασσινό νερό
25	<i>Enterococcus faecium</i>		Επιφανειακό νερό
26	<i>Enterococcus faecium</i>		Θαλασσινό νερό
27	<i>Enterococcus</i> sp.		Επιφανειακό νερό
28	<i>Enterococcus</i> sp.		Απόβλητο (έξοδος δευτεροβάθμιας)

4.3. Χλωρίωση

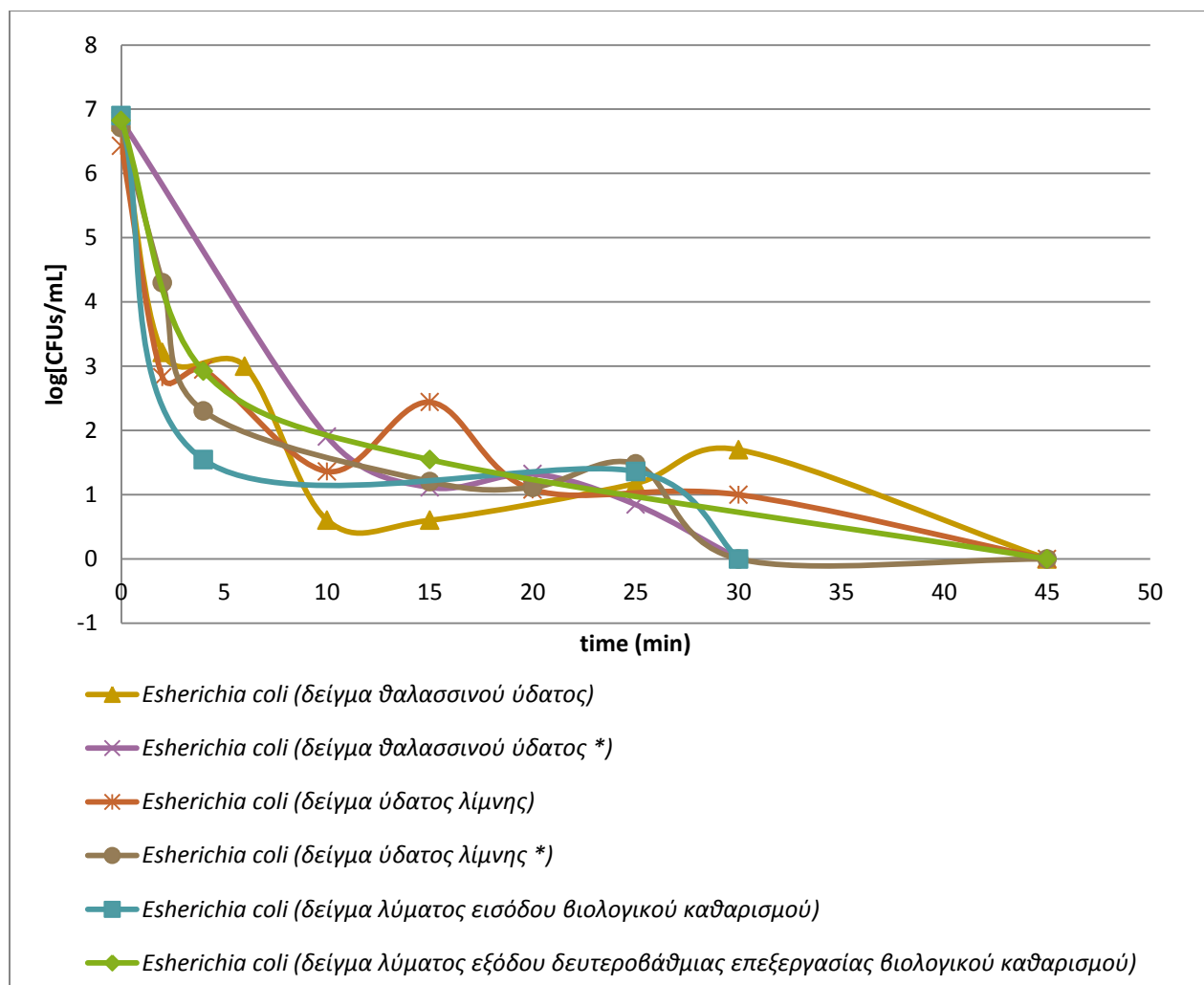
Για να τονιστεί τη διαφοροποίηση της αντίδρασης του κάθε βακτηρίου στην χλωρίωση, ανάλογα την προέλευση και το είδος του, κατασκευάστηκαν ορισμένα συγκεντρωτικά γραφήματα με τις καμπύλες απολύμανσης των βακτηρίων προς σύγκριση. Από τα παρακάτω γραφήματα φαίνεται πως η κινητική η οποία ακολουθείται είναι ψευδοπρώτης τάξης.



Εικόνα 8. Αδρανοποίηση των απομονωμένων βακτηρίων με NaOCl ($C_{NaOCl}=0.3$ mg/L).

Από το συγκεντρωτικό γράφημα όλων των βακτηρίων που απομονώθηκαν από θρεπτικό υλικό plate count agar, φαίνεται πως τα πιο ανθεκτικά βακτήρια είναι το *E. sakazakii* που απομονώθηκε από δείγμα ύδατος πόσιμου νερού και το βακτήριο *S. odorifera* που απομονώθηκε από δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής, των οποίων ο πληθυσμός έχει μεν μειωθεί πολύ σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό που υποβλήθηκε σε χλωρίωση. Αντίθετα, το βακτήριο *K. oxytoca* και το βακτήριο *R. ornithinolytica*, είναι λιγότερο ανθεκτικά καθώς στα 45 min δεν εμφανίζουν καθόλου αποικίες.

Μία σημαντική παρατήρηση σχετικά με το βακτήριο *R. ornithinolytica* είναι ότι ανεξάρτητα από την προέλευσή, του παρουσίασε πολύ απότομη μείωση πληθυσμού. Ωστόσο, το στέλεχος *R. ornithinolytica* που απομονώθηκε από δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής ήταν εμφανώς πιο ανθεκτικό, σε σχέση με αυτό που απομονώθηκε από δείγμα θαλασσινού ύδατος, γεγονός που οφείλεται, όπως έχει αναφερθεί και για άλλα βακτήρια προερχόμενα από κολυμβητική δεξαμενή, στην ανθεκτικότητα που έχει αναπτύξει στις ενώσεις χλωρίου.



Εικόνα 9. Αδρανοποίηση των απομονωμένων στελεχών *E. coli* με χρήση NaOCl [$C_{NaOCl} = 0.3$ mg/L].

Το *E. coli* είναι ένα Gram αρνητικό βακτήριο ραβδοειδούς σχήματος που ζει στην εντερική κοιλότητα των ζώων και των ανθρώπων και ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae*. Τα περισσότερα είδη της δεν βλάπτουν τον άνθρωπο ή τα ζώα, ωστόσο υπάρχουν στελέχη της τα οποία είναι παθογενή και μπορούν να προκαλέσουν λοιμώξεις του ουροποιητικού αλλά και του πεπτικού συστήματος. Τα παθογενή είδη *E. coli* προσβάλλουν τον οργανισμό μέσω μολυσμένου νερού ή φαγητού, ή ακόμη και με την επαφή ατόμων/ζώων τα οποία έχουν ήδη προσβληθεί με κάποιο παθογόνο στέλεχός της.

Έχει την ευελιξία να προσαρμόζεται με μοναδικό θρεπτικό υλικό τη γλυκόζη, μέσω της οποίας δημιουργεί απλούστερες μακρομοριακές ενώσεις, τρέφοντας έτσι τα κύτταρά της. Η παρουσία της στο νερό σημαίνει την πιθανή παρουσία και άλλων μικροβίων, όπως είναι ο εντερόκοκκος, καθώς επίσης, ιούς αλλά και πρωτόζωα.

Προέλευση: Δείγματα θαλασσινού ύδατος

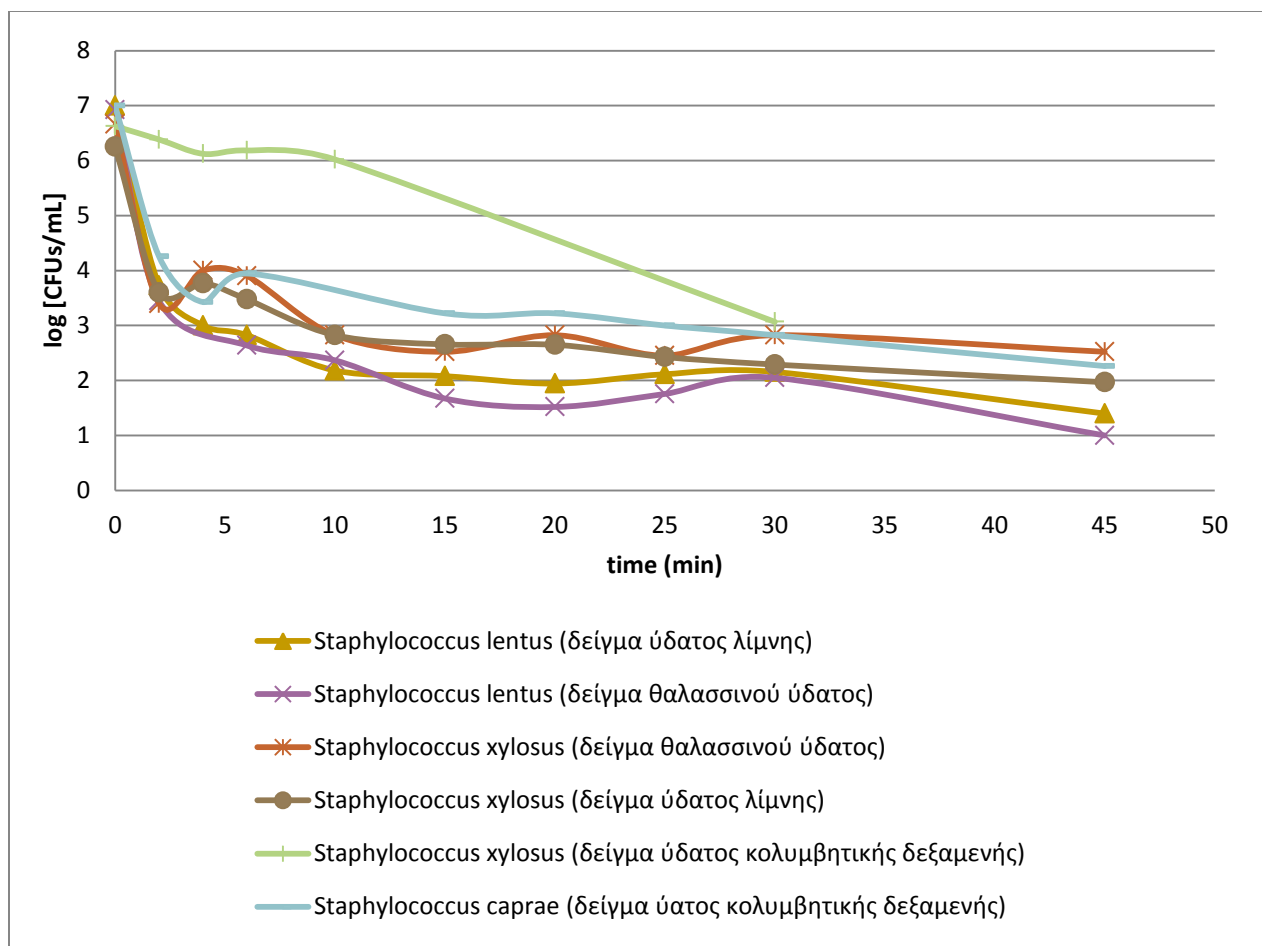
Παρατηρώντας τις καμπύλες μείωσης πληθυσμού των βακτηρίων *E.coli* θαλασσινής προέλευσης, φαίνεται πως δεν έχουν την ίδια συμπεριφορά στην απολύμανση. Το βακτήριο *E. coli* του πρώτου θαλασσινού δείγματος αδρανοποιείται εντελώς στα 30 min της απολύμανσης ενώ το αντίστοιχο βακτήριο του δεύτερου δείγματος δείχνει να είναι ανθεκτικότερο, καθώς στα 30 min της απολύμανσης εμφανίζει ακόμη κάποιες ζώντες αποικίες. Έτσι, αποφαίνεται πως παρότι και τα δύο βακτήρια *E.coli* προέρχονται από θαλασσινά δείγματα, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του εκάστοτε θαλασσινού νερού και η προέλευση του βακτηρίου στο νερό, μπορεί να παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην συμπεριφορά του βακτηρίου όσον αφορά στη χλωρίωση.

Προέλευση: Δείγματα επιφανειακού ύδατος

Στα βακτήρια *E. coli* που απομονώθηκαν από δείγματα ύδατος λιμνών φαίνεται μία αρκετά διαφορετική συμπεριφορά. Και τα δύο βακτήρια παρουσίασαν μία μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα βακτήρια *E.coli* θαλασσινής προέλευσης, αφού ο πληθυσμός τους μηδενίστηκε στα 45 min και όχι στα 30 min.

Προέλευση: Λύματα βιολογικού καθαρισμού

Τέλος, στα στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από λύμα βιολογικού καθαρισμού δείχνει να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο η επεξεργασία του λύματος. Ο πληθυσμός του βακτηρίου *E. coli* προερχόμενο από δείγμα λύματος εισόδου βιολογικού καθαρισμού, μηδενίστηκε στα 30 min με τρόπο απότομο και γρήγορο, όπως φαίνεται στο γράφημα. Αντίθετα, Ο πληθυσμός του βακτηρίου *E. coli* που προέρχεται από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας δείχνει πιο ανθεκτικό και η καμπύλη απολύμανσης είναι πιο ομαλή. Παρατηρείται, δηλαδή, πως η επεξεργασία που έχει υποστεί το βακτήριο *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα λύματος της εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας το έχει κάνει πιο ισχυρό σε σχέση με το βακτήριο *E.coli* που απομονώθηκε από δείγμα λύματος της εισόδου του βιολογικού καθαρισμού.



Εικόνα 10. Αδρανοποίηση των απομονωμένων στελεχών *Staphylococcus* sp. με χρήση NaOCl [$C_{NaOCl} = 0.3 \text{ mg/L}$].

Staphylococcus sp.

Γενικά ο σταφυλόκοκκος αποδείχθηκε πως είναι ένα πολύ ανθεκτικό βακτήριο στην απολύμανση με χλώριο, γεγονός που οφείλεται στην κυτταρική δομή του καθώς ανήκει στους βάκιλλους οι οποίοι είναι πολύ ανθεκτικοί σε ακραίες συνθήκες. Σε αντίθεση με άλλα βακτήρια που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση, τα περισσότερα στελέχη του, ανεξαρτήτως είδους, εμφάνιζαν μεγάλη ανθεκτικότητα μέχρι και τα 45 min της διαδικασίας.

Σχολιασμός ανάλογα την προέλευση του στελέχους

Παρατηρήθηκε πως σε ό, τι αφορά αυτό το συγκεκριμένο βακτήριο δεν έχει τόσο σημασία η προέλευση αλλά το είδος. Δηλαδή, οι διαφοροποιήσεις που παρατηρήθηκαν οφείλονται κυρίως στα διαφορετικά είδη σταφυλόκοκκου. Οι καμπύλες απολύμανσης, για παράδειγμα, για τα στελέχη που προέρχονται από θαλασσινό νερό είναι περίπου οι ίδιες. Όμοια, συμβαίνει το ίδιο και για τα υπόλοιπα είδη νερού που εξετάστηκαν.

Σχολιασμός ανάλογα το είδος του σταφυλόκοκκου

Staphylococcus xylosus

Παρατηρείται ότι και τα τρία στελέχη που εξετάστηκαν είναι πολύ ανθεκτικά καθώς ακόμη και στα 45 min εξακολουθούν να υπάρχουν αποικίες. Είναι εμφανές από την τάξη μεγέθους πως έχει μειωθεί σημαντικά ο πληθυσμός, αλλά συγκριτικά με άλλα βακτήρια η ανθεκτικότητά του είναι πολύ μεγάλη. Το πιο ανθεκτικό βακτήριο *S. xylosus* είναι αυτό που απομονώθηκε από δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής το οποίο έχει την μικρότερη ελάττωση πληθυσμού, συγκριτικά με τα στελέχη *S. xylosus* που απομονώθηκαν από δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής και από δείγμα θαλασσινού ύδατος. Αυτό ήταν αναμενόμενο, δεδομένης της απολύμανσης στην οποία υπόκειται η λίμνη, ειδικά τους καλοκαιρινούς μήνες, προκειμένου να παραμένει καθαρή. Έτσι, αυτό το στέλεχος ανέπτυξε μια εμφανώς μεγαλύτερη αντοχή στο χλώριο. Παρ' όλα αυτά, και τα άλλα δύο βακτήρια *S. xylosus* εμφανίζουν αντοχή στη χλωρίωση με ελαφρώς πιο αδύναμο το βακτήριο που προέρχεται από την κολυμβητική δεξαμενή.

Staphylococcus lentus

Τα βακτήρια *S. lentus* που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση ήταν επίσης ανθεκτικά έως και τα 45 min, παρουσιάζοντας βέβαια πολύ σημαντική μείωση, αρκετών τάξεων μεγέθους πιο κάτω, σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό. Τα δύο βακτήρια *S. lentus*, παρ' ότι ήταν από διαφορετικές πηγές παρουσιάζουν σχεδόν ίδιες καμπύλες απολύμανσης.

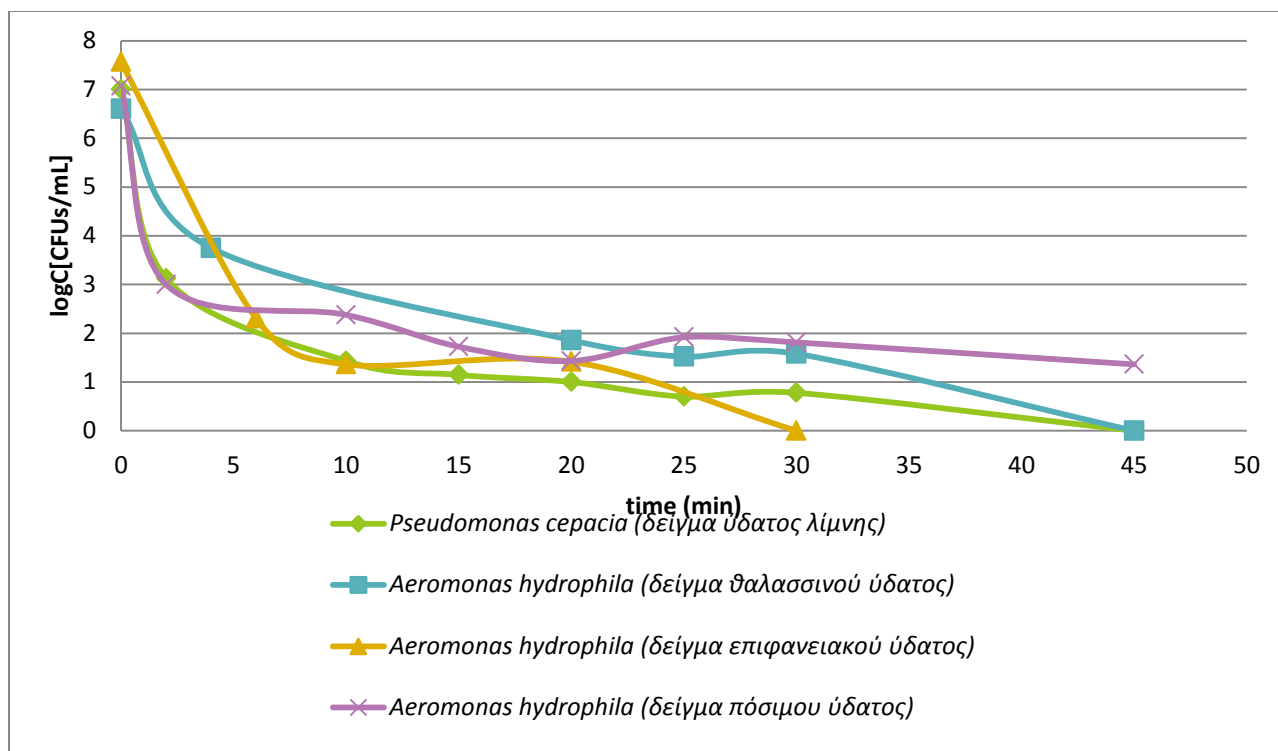
Staphylococcus caprae

Απομονώθηκε και υπέστη απολύμανση μόνο ένα βακτήριο *S. caprae* από δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής. Η σύγκριση που μπορεί να γίνει είναι ανάμεσα σε αυτό το βακτήριο και το βακτήριο *S. xylosus* που προέρχεται από δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής επίσης. Φαίνεται λοιπόν πως αμέσως μετά από αυτό το βακτήριο *S. xylosus*, το βακτήριο *S. caprae* είναι το δεύτερο πιο ανθεκτικό στέλεχος του γένους *Staphylococcus*, καθώς ακόμη και στα 45 min εμφανίζει αποικίες και μάλιστα, όχι λίγες.

Σύγκριση ειδών σταφυλόκοκκου

Σε μια γενική σύγκριση των ειδών σταφυλόκοκκου, φαίνεται πως τα δύο βακτήρια του είδους *S. xylosus* είναι τα ανθεκτικότερα με μια μικρή παρεμβολή του είδους *S. caprae* που φαίνεται να είναι το δεύτερο ανθεκτικότερο στέλεχος. Αμέσως μετά βακτήριο *S. xylosus* έρχεται το βακτήριο *S. lentus*. Ωστόσο, τα είδη δεν παρουσιάζουν πολύ μεγάλες διαφορές ως προς την ανθεκτικότητα γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σαν γένος ο σταφυλόκοκκος είναι πολύ ανθεκτικός.

Η παρατήρηση που μπορεί να γίνει είναι πως τα στελέχη του ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής εμφανίζουν την μεγαλύτερη αντοχή από όλα τα στελέχη καθώς έχουν υποστεί πολλές φορές χλωρίωση, με αποτέλεσμα να συνηθίσουν την απολυμαντική δράση του χλωρίου και να χρειάζεται μεγαλύτερη δόση από αυτή που χρησιμοποιήθηκε ώστε να εξοντωθούν πλήρως.



Εικόνα 11. Αδρανοποίηση των βακτηρίων που απομονώθηκαν από από θρεπτικό υλικό *Pseudomonas agar base* [$C_{NaOCl} = 0.3 \text{ mg/L}$].

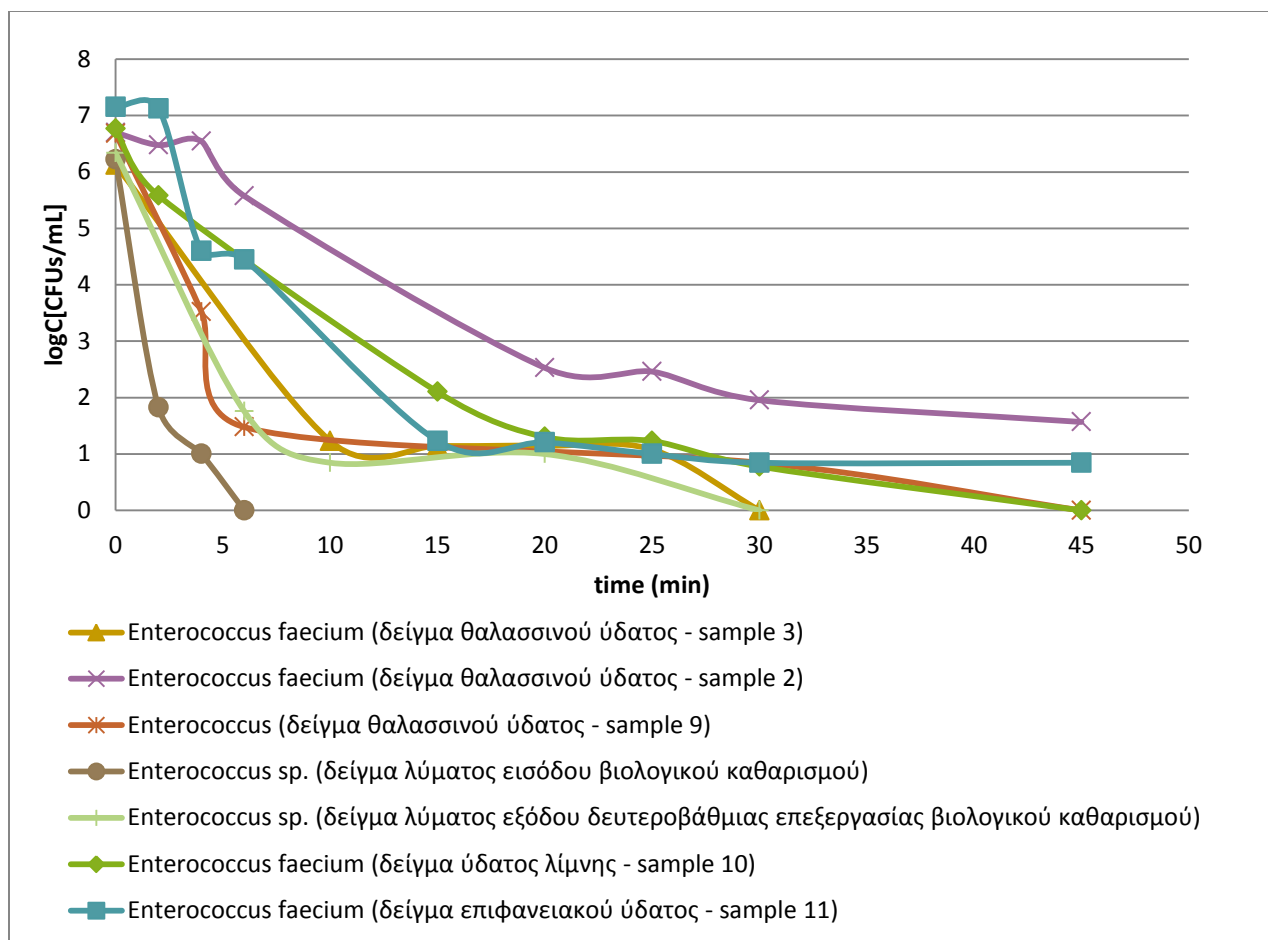
Pseudomonas ceracia - *Aeromonas hydrophila*

Σχολιασμός ανάλογα την προέλευση και το είδος του στελέχους

Από τα βιοχημικά tests ταυτοποίησης των μικροοργανισμών που επιλέχθηκαν από το θρεπτικό υλικό *Pseudomonas agar base*, βρέθηκαν τρία βακτήρια *Aeromonas hydrophila* και ένα βακτήριο *Pseudomonas ceracia*. Συγκρίθηκαν και τα τέσσερα βακτήρια μέσω ενός συγκεντρωτικού γραφήματος, με την προϋπόθεση ότι τα δύο αυτά είδη μοιάζουν αρκετά ως προς τις ιδιότητές τους.

Το βακτήριο *A. hydrophila* που απομονώθηκε από δείγμα πόσιμου ύδατος, είναι αρκετά ανθεκτικό στην χλωρίωση καθώς μέχρι και τα 45 min δεν έχει μηδενιστεί ο πληθυσμός του. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι το πόσιμο νερό έχει υποστεί χλωρίωση ήδη, με αποτέλεσμα το συγκεκριμένο βακτήριο να παρουσιάζει μια μορφή ανθεκτικότητας σε σχέση με τα αντίστοιχα βακτήρια *A. hydrophila* που απομονώθηκαν από δείγμα θαλασσινού ύδατος και δείγμα επιφανειακού ύδατος. Τα άλλα δύο βακτήρια *A. hydrophila* που απομονώθηκαν από δείγμα θαλασσινού ύδατος και από δείγμα επιφανειακού ύδατος, παρουσίασαν μικρότερη ανθεκτικότητα καθώς ο πληθυσμός τους μηδενίστηκε στα 30 και 45 min, αντίστοιχα.

Το βακτήριο *P. ceracia* παρουσιάζει την πιο ομαλή καμπύλη απολύμανσης σε σχέση με το βακτήριο *A. hydrophila* και είναι ένα σχετικά ανθεκτικό βακτήριο καθώς αδρανοποιείται εντελώς στα 45 min.



Εικόνα 12. Αδρανοποίηση των απομονωμένων στελεχών *Enterococcus sp.* [$C_{NaOCl} = 0.3 \text{ mg/L}$].

Enterococcus sp.

Τα στελέχη *Enterococcus sp.* που προέρχονται από δείγμα λύματος εισόδου βιολογικού καθαρισμού και από δείγμα ύδατος εξόδου της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, παρουσιάζουν μεγάλη διαφορά αναμεσά τους, καθώς το στέλεχος εντερόκοκκου που προέρχεται από την είσοδο του βιολογικού καθαρισμού δείχνει πολύ αδύναμο, αφού εξοντώθηκε στα 6 min της διαδικασίας απολύμανσης. Αντίθετα, ο πληθυσμός του στελέχους από την έξοδο της δευτεροβάθμιας επεξεργασίας, εξοντώθηκε στα 30 min της διαδικασίας απολύμανσης. Αξίζει να σημειωθεί πως η ανακαλλιέργεια των δύο αυτών στελεχών, που απομονώθηκαν από λύματα του βιολογικού καθαρισμού, από τους -80°C όπου φυλάσσονταν, ήταν πολύ δύσκολη καθώς τα βακτήρια έδειχναν να είναι πολύ αδύναμα, σε σχέση, για παράδειγμα, με τα στελέχη του ίδιου γένους που απομονώθηκαν από δείγματα θαλασσινού ύδατος και επιφανειακών υδάτων.

E. faecium

Το βακτήριο *E. faecium*, που απομονώθηκε από δείγμα ύδατος θάλασσας, ποταμού και λίμνης, παρουσιάζει διάφορες διακυμάνσεις που οφείλονται στην προέλευσή του. Ο πληθυσμός του

βακτηρίου *E. faecium* που απομονώθηκε από δείγμα θαλασσινού ύδατος μειώνεται με μικρότερο ρυθμό σε σχέση με τα άλλα δύο βακτήρια του ίδιου είδους, αλλά διαφορετικής προέλευσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι η προέλευση έχει επηρεάσει την συμπεριφορά του συγκεκριμένου είδους σε ό, τι αφορά την διαδικασία της χλωρίωσης.

Παρατηρήσεις σχετικά την αντίδραση των βακτηρίων στη χλωρίωση, ανάλογα το είδος και την προέλευση

Γενικά

Το γενικό συμπέρασμα που αποφαίνεται από τα αποτελέσματα της διαδικασίας της χλωρίωσης είναι ότι τα πιο ανθεκτικά βακτήρια ήταν εκείνα που απομονώθηκαν από δείγματα ύδατος κολυμβητικών δεξαμενών αλλά και από δείγματα πόσιμων υδάτων. Η αντοχή αυτή δικαιολογείται από της εξοικείωση των βακτηρίων αυτών με τα μέσα χλωρίωσης του νερού από το οποίο προήλθαν, καθώς η χλωρίωση είναι η πιο κοινή μέθοδος απολύμανσης του πόσιμου νερού αλλά και των κολυμβητικών δεξαμενών.

Αντίθετα, ορισμένα βακτήρια δεν ήταν καθόλου ανθεκτικά γεγονός που δείχνει ότι οι συνθήκες ανάπτυξης και διαβίωσής τους στην πηγή προέλευσής τους, δεν ευνόησαν την αντοχή τους στην απολύμανση. Παρατηρήθηκε ότι τα βακτήρια αυτά προέρχονταν από επιφανειακά ύδατα.

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται όλα τα είδη βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με NaOCl συγκέντρωσης 0.3 mg/L ως προς Cl₂.

Πίνακας 18. Συγκεντρωτικός πίνακας για την αδρανοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών με τη χλωρίωση

Είδος βακτηρίου	Είδος ύδατος από το οποίο απομονώθηκε	logC _{αρχικό} (CFUs/mL)	logC _{τελικό} (CFUs/mL)	Μείωση πληθυσμού* (%)	k (κινητική σταθερά αδρανοποίησης)	R ² (συντελεστής γραμμικής συσχέτισης)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ποτάμι	6.18	0	100	1.235	0.967
<i>Raoultella ornitholytica</i>	Θάλασσα	6.52	0	100	-	-
<i>Raoultella ornitholytica</i>	Πισίνα	7.28	4.76	53	0.165	0.877
<i>Serratia odorifera</i>	Λίμνη	7	1.82	74	0.2408	0.746
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Πόσιμο	6.73	0.81	87.9	0.292	0.833
<i>Staphylococcus lentus</i>	Λίμνη	7	1.4	80	0.282	0.762
<i>Staphylococcus lentus</i>	Θάλασσα	6.92	1	85.5	0.295	0.750
<i>Staphylococcus</i>	θάλασσα	6.66	2.52	62.2	0.223	0.929

<i>xylosus</i>						
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Λίμνη	6.25	1.96	68.6	0.324	0.944
<i>Staphylococcus xylosus</i>	πισίνα	6.62	2.82	57.4	0.215	0.945
<i>Staphylococcus caprae</i>	πισίνα	7	2.26	67.7	0.244	0.833
<i>Esherichia coli</i>	Θάλασσα	6.8	0	100	0.314	0.825
<i>Esherichia coli</i>	Λίμνη	6.71	0	100	0.444	0.858
<i>Esherichia coli</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	6.82	0	100	0.699	0.742
<i>Esherichia coli</i>	Θάλασσα	6.82	0	100	0.519	0.816
<i>Esherichia coli</i>	Λίμνη	6.42	1	84.4	0.440	0.881
<i>Esherichia coli</i>	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	6.9	1	85.5	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Θάλασσα	6.6	0	100	0.346	0.825
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ποτάμι	7.56	0	100	0.708	0.743
<i>Aeromonas hydrophila</i>	πόσιμο	7.07	1.36	80.8	0.307	0.861
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Λίμνη	7	0	100	0.491	0.810
<i>Enterococcus faecium</i>	Θάλασσα	6.12	0	100	0.307	0.889
<i>Enterococcus sp.</i>	Είσοδος βιολογικού καθαρισμού	6.22	0	100	3.006	0.865
<i>Enterococcus sp.</i>	Θάλασσα	6.68	0	100	0.372	0.812
<i>Enterococcus faecium</i>	Λίμνη	6.76	0	100	0.462	0.922
<i>Enterococcus faecium</i>	Ποτάμι	6.69	1.57	76.5	0.340	0.817
<i>Enterococcus sp.</i>	Θάλασσα	7.15	0.84	88.3	0.372	0.812
<i>Enterococcus sp.</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	6.33	0	100	0.614	0.728

Ο συντελεστής K εκφράζει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου απολύμανσης. Όσο πιο μεγάλος είναι ο συντελεστής K, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η μέθοδος απολύμανσης. Αν παρατηρηθεί το ποσοστό μείωση πληθυσμού (%), του παραπάνω πίνακα, συγκριτικά με τον συντελεστή K, είναι εμφανείς οι διακυμάνσεις του ανάλογα τη μείωση του πληθυσμού του εκάστοτε βακτηρίου.

Υπολογισμός του C·t

Με την σχέση C·t μετράται η αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού μέσου. Όπου C αντικαθίσταται η συγκέντρωση του απολυμαντικού μέσου σε mg/L και t αντιστοιχεί στον χρόνο που χρειάστηκε ώστε να επέλθει 99% αδρανοποίηση του πληθυσμού των βακτηρίων ο οποίος υποβλήθηκε σε απολύμανση. Όσο χαμηλότερο είναι το αποτέλεσμα C·t, τόσο αποτελεσματικότερο είναι το απολυμαντικό μέσο για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό. Ακόμη, αυτή η σχέση επιτρέπει την σύγκριση διαφόρων απολυμαντικών μέσων ως προς την αποτελεσματικότητά τους έναντι διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών.

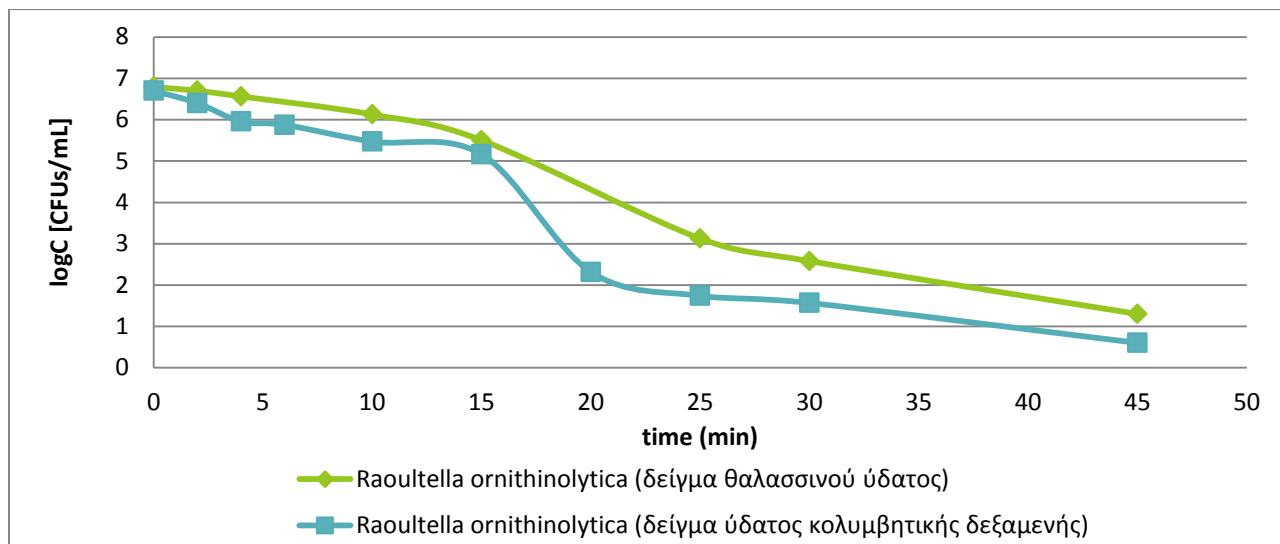
Πίνακας 19. Τιμές C·t για 95% μείωση πληθυσμού των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε χλωρίωση με χρήση NaOCl συγκέντρωσης 0,3 mg/L ως προς Cl₂.

Είδος βακτηρίου	Πηγή	C·t
<i>Klebsiella oxytoca</i>	επιφανειακό δείγμα ύδατος	13.5
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	9
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής	13.5
<i>Serratia odorifera</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>13.5
<i>Enterobacter sakazakii</i>	Δείγμα ύδατος νερό	>13.5
<i>Staphylococcus lentus</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>13.5
<i>Staphylococcus lentus</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	>13.5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	>13.5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>13.5
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής	>13.5
<i>Staphylococcus caprae</i>	Δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής	13.5
<i>Escherichia coli</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	9
<i>Escherichia coli</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	13.5

<i>Esherichia coli</i>	λύμα εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	13.5
<i>Esherichia coli</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος *	13.5
<i>Esherichia coli</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>13.5
<i>Esherichia coli</i>	λύμα εισόδου βιολογικού καθαρισμού	9
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	13.5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	13.5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	επιφανειακό δείγμα ύδατος	9
<i>Aeromonas hydrophila</i>	πόσιμο δείγμα ύδατος	>13.5
<i>Enterococcus faecium</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	9
<i>Enterococcus sp.</i>	λύμα εισόδου βιολογικού καθαρισμού	1.8
<i>Enterococcus sp.</i>	λύμα εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	9
<i>Enterococcus sp.</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος	>13.5
<i>Enterococcus faecium</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>13.5
<i>Enterococcus sp.</i>	θαλασσινό δείγμα ύδατος *	>13.5
<i>Enterococcus faecium</i>	επιφανειακό δείγμα ύδατος	>13.5

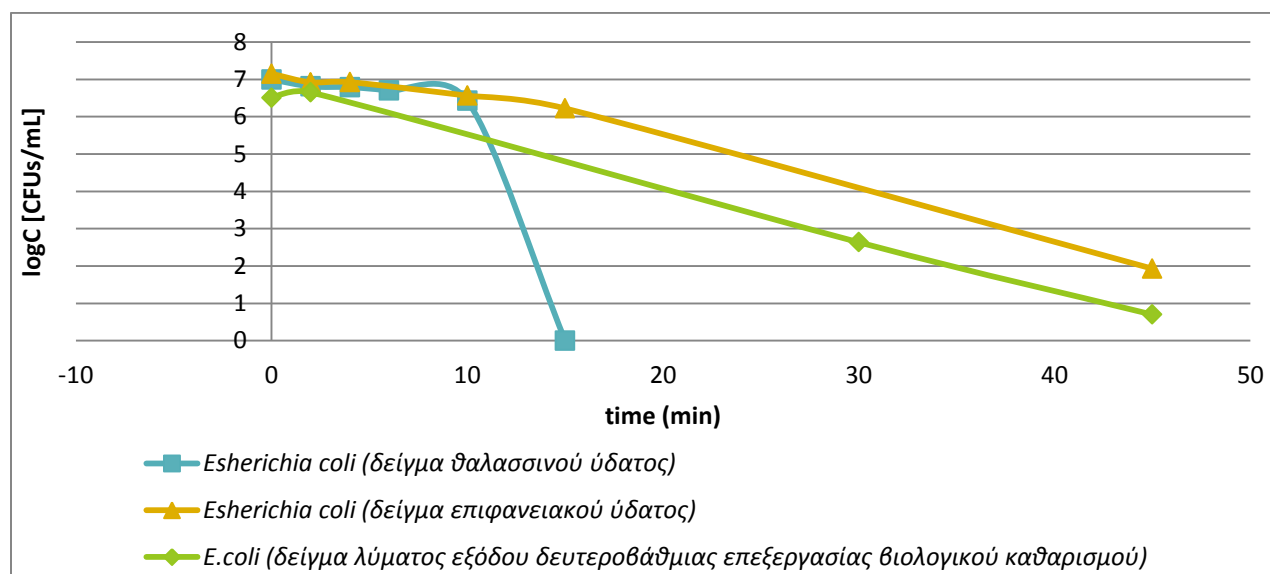
4.4. Φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA

Στα παρακάτω γραφήματα φαίνεται η μείωση του πληθυσμού με την πάροδο του χρόνου του κάθε βακτηρίου που υποβλήθηκε σε φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA.



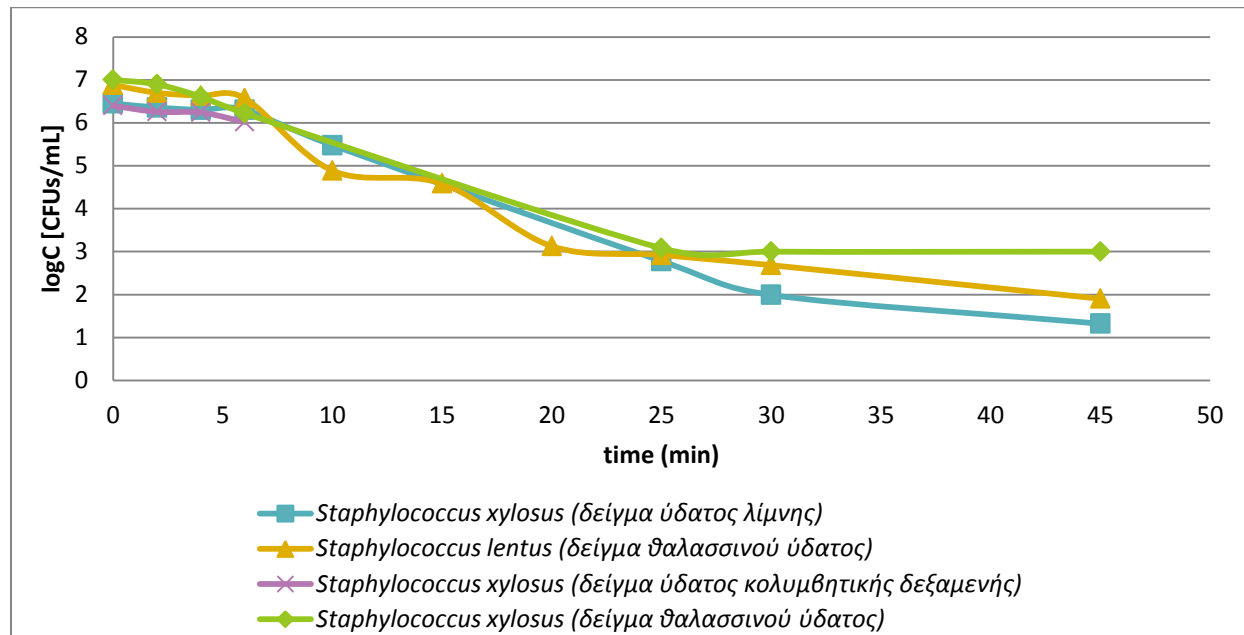
Εικόνα 13. Αδρανοποίηση των στελεχών *R. ornithinolytica* με εφαρμογή φωτοκατάλυσης & χρήση ακτινοβολίας UVA [$C_{TiO_2} = 50 \text{ mg/L}$].

Το είδος *R. ornithinolytica* παρουσίασε σχεδόν την ίδια ανθεκτικότητα στην φωτοκατάλυση με ακτινοβολία UVA, ανεξάρτητα από την πηγή προέλευσης.



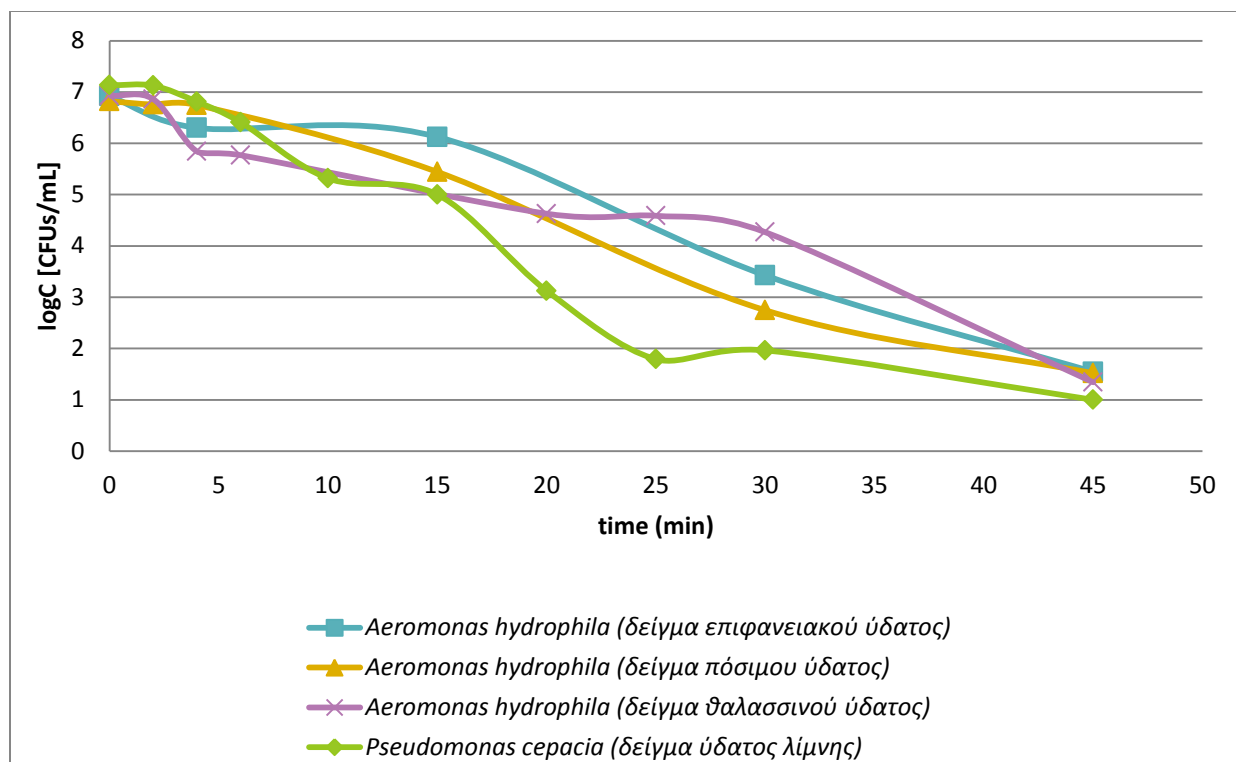
Εικόνα 14. Αδρανοποίηση των στελεχών *E. coli* με εφαρμογή φωτοκατάλυσης & χρήση ακτινοβολίας UVA [$C_{TiO_2} = 50 \text{ mg/L}$].

Παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *E. coli* που απομονώθηκε από θαλασσινό νερό δεν ήταν καθόλου ανθεκτικό στην φωτοκατάλυση με χρήση ακτινοβολίας UVA καθώς όλος ο πληθυσμός θανατώθηκε μέσα στα 15 πρώτα λεπτά της απολύμανσης. Αντίθετα, τα στελέχη *E. coli* που απομονώθηκαν από δείγμα εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού και δείγμα επιφανειακού ύδατος, παρουσίασαν σχεδόν την ίδια συμπεριφορά.



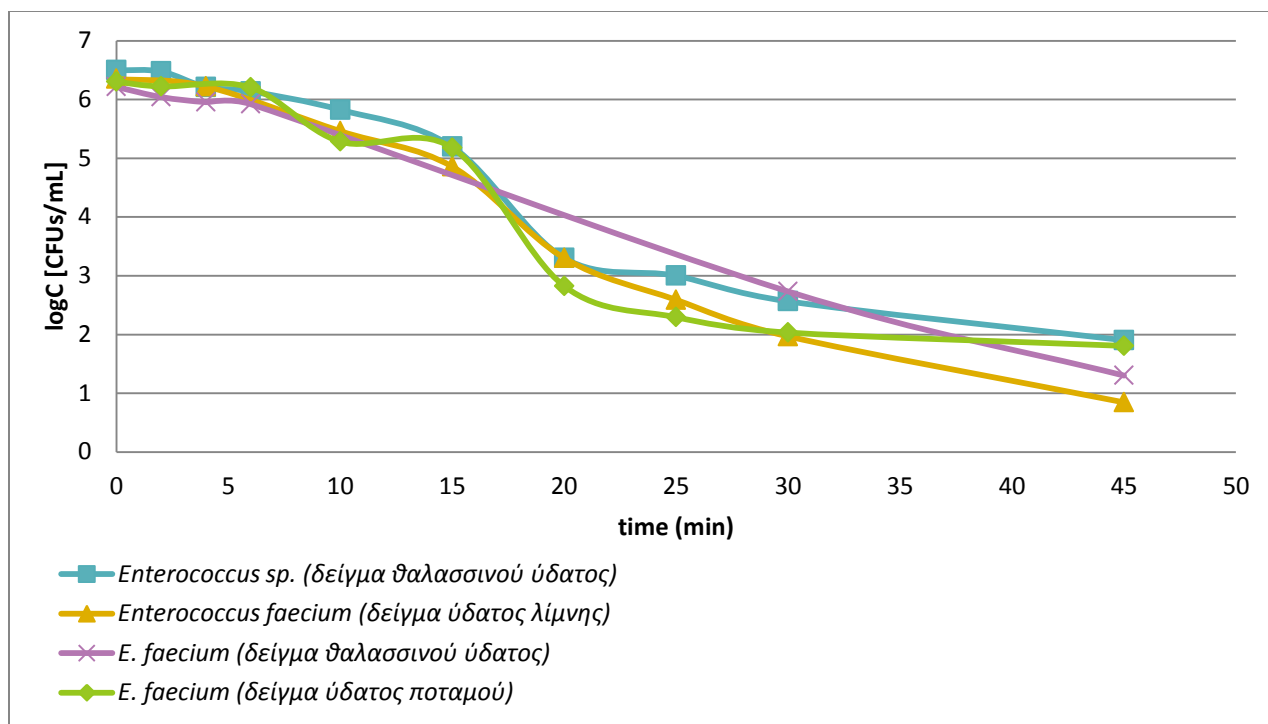
Εικόνα 15. Αδρανοποίηση των στελεχών Απεικόνιση του ρυθμού μείωσης του πληθυσμού των βακτηρίων *S. xylosus* και *S. lentus* με εφαρμογή φωτοκατάλυσης με χρήση ακτινοβολίας UVA [$C_{TiO_2} = 50 \text{ mg/L}$].

Όλα είδη σταφυλόκοκκου, τόσο το *S. lentus* αλλά και το *S. xylosus*, παρουσίασαν την ίδια συμπεριφορά και ήταν αρκετά ανθεκτικά στη συγκεκριμένη μέθοδο απολύμανσης.



Εικόνα 16. Αδρανοποίηση των στελεχών *P.ceracia* και *A. hydrophila* με εφαρμογή φωτοκατάλυσης & χρήση ακτινοβολίας UVA [$C_{TiO_2} = 50 \text{ mg/L}$].

Τα βακτήρια *A. hydrophila* και *P. ceracia* παρουσίασαν σχεδόν την ίδια συμπεριφορά, ήταν δηλαδή αρκετά ανθεκτικά στην φωτοκατάλυση με χρήση ακτινοβολίας UVA. Παρατηρείται ότι από τα 30 έως τα 45 min υπήρχε μια αρκετά απότομη μείωση πληθυσμού των βακτηρίων *A. hydrophila* προερχόμενο από δείγμα θαλασσινού ύδατος και *A. hydrophila* προερχόμενο από δείγμα επιφανειακού ύδατος.



Εικόνα 17. Αδρανοποίηση των στελεχών *Enterococcus sp.* και *E. faecium* με εφαρμογή φωτοκατάλυσης & χρήση ακτινοβολίας UVA [$C_{TiO_2} = 50 \text{ mg/L}$].

Παρατηρήθηκε ότι όλα τα στελέχη *Enterococcus sp.* Παρουσίασαν παρόμοιο ρυθμό μείωσης του πληθυσμού τους. Καθοριστικό ήταν το διάστημα από 15 έως 20 min κατά τη διάρκεια του οποίου μειώθηκε απότομα ο πληθυσμός όλων των στελεχών εκτός από το *E. faecium* θαλασσινού ύδατος, το οποίο δείχνει να έχει μία πολύ ομαλή καμπύλη απολύμανσης.

Στον παρακάτω συγκεντρωτικό πίνακα παρουσιάζονται όλα τα είδη βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA, καθώς και το ποσοστό μείωσης τους ύστερα από την εφαρμογή της συγκεκριμένης απολυμαντικής μεθόδου.

Πίνακας 20. Συγκεντρωτικός πίνακας για την αδρανοποίηση των απομονωμένων βακτηριακών στελεχών με την ετερογενή φωτοκατάλυση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και συγκέντρωση καταλύτη $\text{TiO}_2 = 50 \text{ mg/L}$.

Είδος βακτηρίου	Είδος δείγματος (νερό ή λύμα) από το οποίο απομονώθηκε	$\log C_{\text{αρχικό}}$ (CFUs/mL)	$\log C_{\text{τελικό}}$ (CFUs/mL)	Μείωση πληθυσμού (%)	k (κινητική σταθερά αδρανοποίησης)	R^2 (συντελεστής γραμμικής συσχέτισης)
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Λίμνη	6.45	1.32	79.5	0.355	0.959
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Θάλασσα	7.001	3	57.1	0.373	0.996
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Κολυμβητική δεξαμενή	6.39	6.01	5.9	0.089	0.828
<i>Staphylococcus lentus</i>	Θάλασσα	6.88	1.9	72.4	0.444	0.943
<i>E.coli</i>	Θάλασσα	6.99	6.42	8.2	0.118	0.828
<i>E.coli</i>	Λίμνη	7.15	1.92	73	0.270	0.969
<i>E.coli</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	6.5	0.698		-	-
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Λίμνη	7.13	1	85.9	0.498	0.969
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Ποτάμι	6.92	1.54	77.7	0.276	0.959
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Πόσιμο	6.82	1.52	77.7	0.292	0.982
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Θάλασσα	6.93	1.34	80.6	0.247	0.928
<i>Enterococcus</i> sp.	Θάλασσα	6.49	1.9	70.7	0.334	0.866
<i>Enterococcus faecium</i>	Λίμνη	6.35	0.84	86.8	0.316	0.957
<i>Enterococcus faecium</i>	Ποτάμι	6.3	1.8	71.4	0.357	0.814
<i>Enterococcus faecium</i>	Θάλασσα	6.21	1.3	79.06	0.263	0.993
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Θάλασσα	6.79	1.3	80.8	0.325	0.920
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Πισίνα	5.87	0.6	89.8	0.422	0.833

Υπολογισμός του I·t

Αντίστοιχα, στην μέθοδο απολύμανσης φωτοκατάλυσης με χρήση ακτινοβολίας UVA, χρησιμοποιείται η σχέση I·t. Όπου I, αντιστοιχεί η δόση ακτινοβολίας σε W/cm² και όπου t αντιστοιχεί η χρόνος που χρειάστηκε για να αδρανοποιηθεί ο πληθυσμός του βακτηρίου κατά 99%.

Γνωρίζουμε ότι η λάμπα που χρησιμοποιήθηκε είχε ισχύ 9W ενώ το δοχείο ζέσεως που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά είχε διάμετρο 8 cm. Άρα, το εμβαδό της επιφάνειας ισούται με 50.24 cm, με αποτέλεσμα η δόση ακτινοβολίας να ισούται με $I = 9W/50.24 \text{ cm}^2 = 0.174 \text{ W/cm}^2$.

Πίνακας 21. Τιμές I·t για 95% μείωση πληθυσμού των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε ετερογενή φωτοκατάλυση με ακτινοβολία UVA παρουσία καταλύτη TiO₂ συγκέντρωσης 50 mg/L.

Είδος βακτηρίου	Πηγή	I·t
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	>8.055
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής	>8.055
<i>Staphylococcus lentus</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	>8.055
<i>Staphylococcus xylosus</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>8.055
<i>Esherichia coli</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	2.610
<i>Esherichia coli</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>8.055
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>8.055
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Δείγμα επιφανειακού ύδατος	>8.055
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Δείγμα πόσιμου ύδατος	>8.055
<i>Enterococcus faecium</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	>8.055
<i>Enterococcus faecium</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	>8.055

4.5. Φωτοενεργοποίηση

Ύστερα από την εκπόνηση του κάθε πειράματος ετερογενούς φωτοκατάλυσης με χρήση ακτινοβολίας UVA (μετά τα 45 min) έγινε καλλιέργεια δείγματος 1ml σε θρεπτικό υλικό nutrient agar, σε 4 τριβλία, 2 εκ των οποίων τοποθετήθηκαν στο απόλυτο σκοτάδι και τα υπόλοιπα 2 στο φως. Ύστερα από 24h και 48h μετρήθηκαν οι αποικίες σε όλα τα τριβλία.

Το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης είναι πολύ σημαντικό για την συγκεκριμένη μέθοδο απολύμανσης καθώς, εν μέρη, δείχνει την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Το φως ή το σκοτάδι αντίστοιχα, μπορούν να βοηθήσουν το βακτήριο που υποβλήθηκε σε απολύμανση να ενεργοποιήσει ορισμένους μηχανισμούς, όπως για παράδειγμα ορισμένα ένζυμα, οι οποίοι το βοηθούν να «θεραπεύσει» τις καταστροφές που μπορεί να προκάλεσε η υπερϊώδης ακτινοβολία στα κύτταρά του.

Πίνακας 22. Αποτελέσματα φωτοενεργοποίησης βακτηρίων ύστερα από παραμονή τους στο φως του ήλιου από 24h έως 48h (TMTC = Too Much To Count).

ΦΩΣ			
	Πηγή	Αριθμός αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από 24h	Αριθμός αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από 48h
<i>S. xylosus</i>	Λίμνη	1	1
<i>S. xylosus</i>	Πισίνα	71	TMTC
<i>S. xylosus</i>	Θάλασσα	TMTC	175
<i>S. lentus</i>	Θάλασσα	2	0
<i>P. cepacia</i>	Πισίνα	1	0
<i>E. coli</i>	Θάλασσα	30	TMTC
<i>E. coli</i>	Λίμνη	0	0
<i>E. coli</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	0	0
<i>A. hydrophila</i>	Πόσιμο	0	0
<i>A. hydrophila</i>	Ποτάμι	0	0
<i>A. hydrophila</i>	Θάλασσα	15	2
<i>Enterococcus sp.</i>	Θάλασσα	TMTC	10
<i>E. faecium</i>	Λίμνη	1	0
<i>E. faecium</i>	Θάλασσα	4	0
<i>E. faecium</i>	Ποτάμι	18	55
<i>R. ornithinolytica</i>	Θάλασσα	9	45
<i>R. ornithinolytica</i>	πισίνα	0	0

Πίνακας 23. Αποτελέσματα ενεργοποίησης των βακτηρίων ύστερα από παραμονή τους στο σκοτάδι από 24h έως 48h (TMTC = Too Much To Count).

ΣΚΟΤΑΔΙ			
	Πηγή	Αριθμός αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από 24h	Αριθμός αποικιών που αναπτύχθηκαν μετά από 48h
<i>S. xylosus</i>	Λίμνη	4	1
<i>S. xylosus</i>	Πισίνα	90	TMTC
<i>S. xylosus</i>	Θάλασσα	TMTC	200
<i>S. lentus</i>	Θάλασσα	5	2
<i>P. cepacia</i>	Πισίνα	1	0
<i>E. coli</i>	Θάλασσα	300	100
<i>E. coli</i>	Λίμνη	2	0
<i>E. coli</i>	Έξοδος δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	0	0
<i>A. hydrophila</i>	Πόσιμο	2	3
<i>A. hydrophila</i>	Ποτάμι	1	0
<i>A. hydrophila</i>	Θάλασσα	2	1
<i>Enterococcus sp.</i>	Θάλασσα	0	1
<i>E. faecium</i>	Λίμνη	2	0
<i>E. faecium</i>	Θάλασσα	2	2
<i>E. faecium</i>	Ποτάμι	5	28
<i>R. ornithinolytica</i>	Θάλασσα	8	7
<i>R. ornithinolytica</i>	πισίνα	3	0

Αυτό που παρατηρείται από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι τα περισσότερα από τα βακτήρια φωτοενεργοποιούνταν ευκολότερα στο σκοτάδι παρά στο φυσικό φως.

Επίσης, παρατηρείται ότι αυξημένος αριθμός αποικιών στις 24h επώασης δεν συνεπάγεται περαιτέρω αύξηση τους στις 48h. Για παράδειγμα, το βακτήριο *E. coli* θαλασσινής προέλευσης, σε συνθήκες φυσικού φωτισμού και χρονικό διάστημα 24h παρουσίασε 30 αποικίες, ενώ σε διάστημα 48h οι αποικίες δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν (TMTC) γεγονός που σημαίνει ότι η ακτινοβολία UVA δεν κατέστρεψε ικανοποιητικά τα κύτταρα του βακτηρίου αυτού. Αντίθετα, το βακτήριο *E. faecium*, θαλασσινής προέλευσης, σε συνθήκες φυσικού φωτισμού και χρονικό διάστημα 24h παρουσίασε αποικίες που δεν ήταν δυνατό να μετρηθούν (TMTC), ενώ σε διάστημα 48h οι αποικίες ήταν περίπου 10.

Γενικά, η φωτοενεργοποίηση είναι ένα φαινόμενο που εξαρτάται αποκλειστικά από το είδος και τη δομή του κυττάρου του κάθε βακτηρίου. Επίσης, παρατηρώντας τους παραπάνω πίνακες φαίνεται

ότι τόσο το είδος αλλά και η προέλευση του βακτηρίου παίζει ρόλο στην διαδικασία της φωτοενεργοποίησης, καθώς παρατηρείται ότι βακτήρια που απομονώθηκαν από θαλασσινό νερό φωτοενεργοποιούνται ευκολότερα σε αντίθεση με βακτήρια που απομονώθηκαν από νερό κολυμβητικών δεξαμενών ή από πόσιμο νερό.

4.6. RAPD-PCR

Σκοπός της εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου ήταν ο εντοπισμός πολυμορφισμών που πιθανά να συνδέονται με την αντοχή των βακτηρίων στις μεθόδους απολύμανσης που εφαρμόστηκαν.

Έτσι, χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης που βασίζεται σε τυχαίους πολυμορφισμούς του DNA (RAPD-PCR). Χρειάστηκε να ελεγχθούν αρκετοί τύποι εκκινητών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν αυτοί που επιλέχθηκαν (βλ. *Υλικά και μέθοδοι*), καθώς αυτοί έδωσαν τα πιο ικανοποιητικά αποτυπώματα.

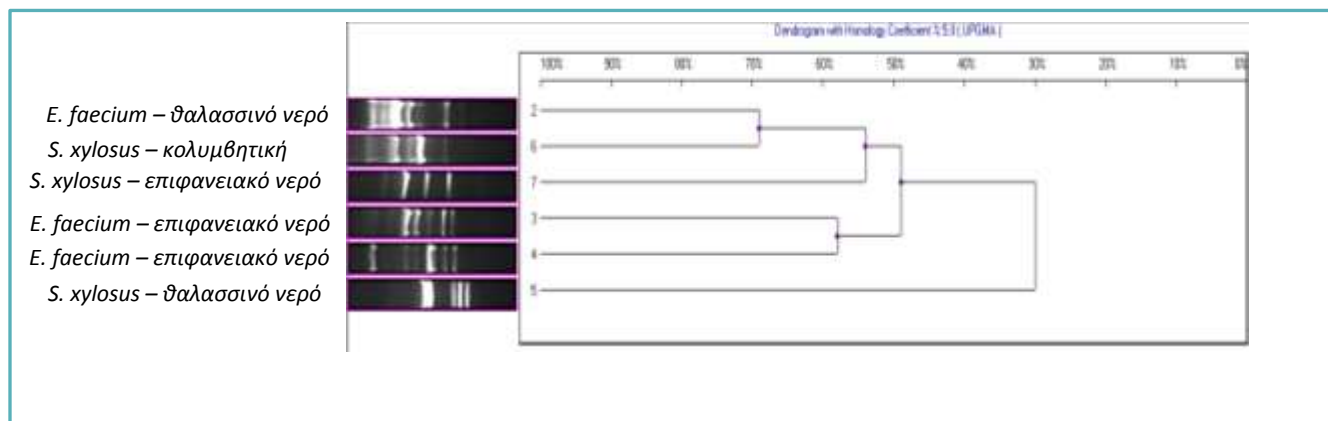
Η RAPD-PCR πραγματοποιήθηκε με θερμικό κυκλοποιητή, στον οποίο τοποθετήθηκαν όγκοι αντίδρασης 40 μ L. Ανάλογα τον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε, οι ποσότητες των υλικών του όγκου αντίδρασης διαφοροποιήθηκαν (βλ. *Υλικά και μέθοδοι*).

Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της RAPD-PCR

Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία της RAPD-PCR, εφαρμόστηκε ηλεκτροφόρηση σε γέλη αгарόζης 1,5% w/v, το οποίο περιείχε 1 mg/mL βρωμιούχο αιθίδιο. Σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις που έγιναν χρησιμοποιήθηκε ένας ladder 100 bp. Ύστερα από 3 ώρες ηλεκτροφόρησης, η γέλη φωτογραφιζόταν σε ειδικό θάλαμο με χρήση ακτινοβολίας UVA, με σκοπό την απεικόνιση των προφίλ που σχηματίζονταν.

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

4.6.1. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την RAPD

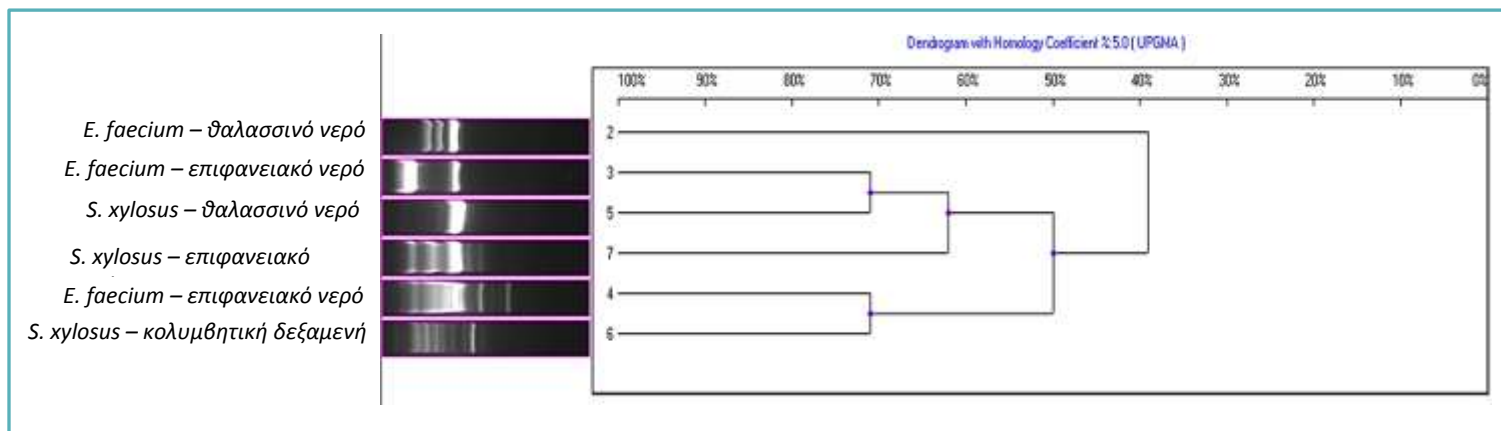


Εικόνα 18. RAPD_primer 1290 - Gram θετικά στελέχη

Πίνακας 24. Τιμές συντελεστή *Jaccard* μεταξύ των Gram θετικών στελεχών, βάσει ομοιοτήτων στα RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τον εκκινητή 1290

RAPD_primer 1290	<i>E. faecium</i> θαλασσινό νερό	<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	<i>S. xylosus</i> θαλασσινό νερό	<i>S. xylosus</i> κολυμβητική δεξαμενή	<i>S. xylosus</i> επιφανειακό νερό
<i>E. faecium</i> θαλασσινό νερό	1.00					
<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	0.46	1.00				
<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	0.54	0.58	1.00			
<i>S. xylosus</i> θαλασσινό νερό	0.31	0.23	0.31	1.00		
<i>S. xylosus</i> κολυμβητική δεξαμενή	0.69	0.40	0.47	0.36	1.00	
<i>S. xylosus</i> επιφανειακό νερό	0.55	0.33	0.42	0.27	0.36	1.00

Παρατηρείται ότι RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τον εκκινητή 1290, δεν παρουσιάζουν μεγάλες ομοιότητες. Για παράδειγμα, δύο διαφορετικά στελέχη *E. faecium* που προέρχονται από επιφανειακό νερό ίδιας πηγής (2 διαφορετικά ποτάμια που πηγάζουν από την ίδια πηγή) παρουσίασαν συντελεστή *Jaccard* 0.58. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *S. xylosus* προερχόμενο από διαφορετική πηγή, παρουσίασε συντελεστή *Jaccard* 0.27, δηλαδή πολύ μικρή ομοιότητα, γεγονός που αποδεικνύει ότι το περιβάλλον στο οποίο αναπτύχθηκαν τα στελέχη παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην δομή του DNA τους.



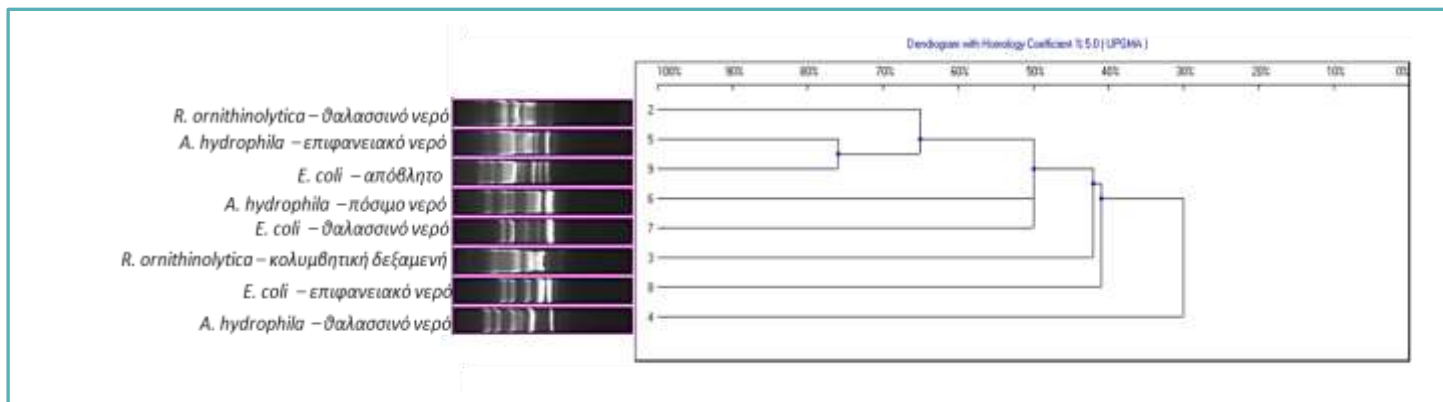
Εικόνα 19. RAPD_primer M13 - Gram θετικά στελέχη

Πίνακας 25. Τιμές συντελεστή Jaccard μεταξύ των Gram θετικών στελεχών, βάσει ομοιοτήτων στα RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τον εκκινητή M13

RAPD_primer M13	<i>E. faecium</i> θαλασσινό νερό	<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	<i>S. xylosus</i> θαλασσινό νερό	<i>S. xylosus</i> κολυμβητική δεξαμενή	<i>S. xylosus</i> επιφανειακό νερό
<i>E. faecium</i> θαλασσινό νερό	1.00					
<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	0.43	1.00				
<i>E. faecium</i> επιφανειακό νερό	0.36	0.55	1.00			
<i>S. xylosus</i> θαλασσινό νερό	0.67	0.71	0.55	1.00		
<i>S. xylosus</i> κολυμβητική δεξαμενή	0.31	0.46	0.71	0.46	1.00	
<i>S. xylosus</i> επιφανειακό νερό	0.38	0.63	0.50	0.63	0.43	1.00

Τα αποτελέσματα των RAPD προφίλ με τη χρήση του εκκινητή M13 παρουσίασαν μεγάλες διαφορές συγκριτικά με τα αποτελέσματα του εκκινητή 1290. Παρατηρούνται μεγάλες τιμές συντελεστή Jaccard ανάμεσα σε βακτήρια διαφορετικού είδους και ίδιας πηγής: Το στέλεχος *S. xylosus* και *E. faecium* προερχόμενα και τα δύο από θαλασσινό νερό, παρουσίασαν συντελεστή Jaccard 0.67. Αρκετό ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι δύο βακτήρια διαφορετικής προέλευσης και διαφορετικού είδους, είχαν αρκετά μεγαλύτερη ομοιότητα σε σχέση με τα βακτήρια ίδιου είδους και διαφορετικής προέλευσης: Το στέλεχος *S. xylosus* (θαλασσινό νερό) και *E. faecium* (επιφανειακό νερό) παρουσίασαν συντελεστή Jaccard 0.71, ενώ την ίδια ακριβώς τιμή συντελεστή Jaccard εμφάνισαν τα στελέχη *S. xylosus* (νερό κολυμβητικής δεξαμενής) και *E. faecium* (επιφανειακό νερό). Βακτήρια ίδιου είδους και διαφορετικής προέλευσης παρουσίασαν συντελεστή Jaccard από 0.43 έως 0.63, γεγονός που υποδεικνύει, όπως και στην περίπτωση του

εκκινητή 1290, ότι το DNA των βακτηρίων επηρεάζεται σημαντικά από το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται.

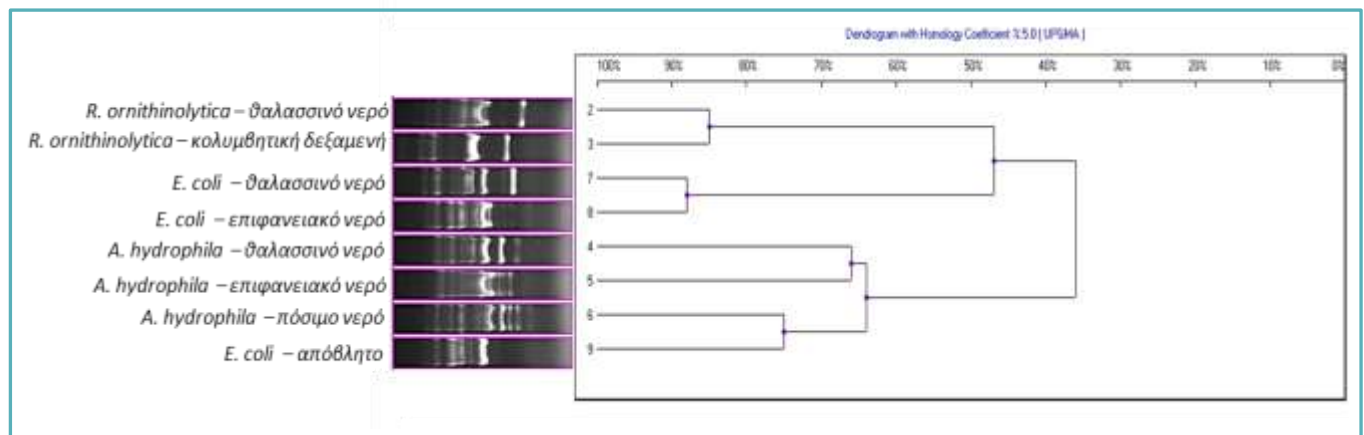


Εικόνα 20. RAPD_primer RAPD7 - Gram αρνητικά στελέχη

Πίνακας 26. Τιμές συντελεστή *Jaccard* μεταξύ των Gram αρνητικών στελεχών, βάσει ομοιοτήτων στα RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τον εκκινητή RAPD7

RAPD_primer	<i>R. ornithinolytica</i> θαλασσινό νερό	<i>R. ornithinolytica</i> κολυμβητική δεξαμενή	<i>A. hydrophila</i> θαλασσινό νερό	<i>A. hydrophila</i> επιφανειακό νερό	<i>A. hydrophila</i> πόσιμο νερό	<i>E. coli</i> θαλασσινό νερό	<i>E. coli</i> επιφανειακό νερό	<i>E. coli</i> απόβλητο
<i>R. ornithinolytica</i> θαλασσινό νερό	1.00							
<i>R. ornithinolytica</i> κολυμβητική δεξαμενή	0.43	1.00						
<i>A. hydrophila</i> θαλασσινό νερό	0.31	0.21	1.00					
<i>A. hydrophila</i> επιφανειακό νερό	0.69	0.29	0.36	1.00				
<i>A. hydrophila</i> πόσιμο νερό	0.50	0.40	0.50	0.64	1.00			
<i>E. coli</i> θαλασσινό νερό	0.50	0.38	0.50	0.54	0.46	1.00		
<i>E. coli</i> επιφανειακό νερό	0.42	0.42	0.40	0.46	0.50	0.50	1.00	
<i>E. coli</i> απόβλητο	0.62	0.40	0.38	0.77	0.57	0.46	0.29	1.00

Η χρήση του Primer RAPD7 οδήγησε στη δημιουργία ιδιαίτερων RAPD προφίλ. Παρατηρήθηκε ότι βακτήρια διαφορετικού είδους και διαφορετικής προέλευσης παρουσίασαν ομολογία γενετικού υλικού σε πολύ μεγάλο βαθμό: Τα βακτήρια *E. coli* (απόβλητο) και *R. ornithinolytica* (θαλασσινό νερό) παρουσίασαν συντελεστή Jaccard 0.62 ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομοιότητα των στελεχών *E.coli* (απόβλητο) και *A. hydrophila* (επιφανειακό νερό) καθώς ο συντελεστής Jaccard αγγίζει το 0.77. Στα βακτήρια ίδιου είδους και διαφορετικής προέλευσης παρουσιάζονται μικρές αλλά και μεγάλες ομοιότητες με τον συντελεστή Jaccard να κυμαίνεται από 0.29 έως 0.64. Σε ό, τι αφορά αυτή την ομάδα βακτηρίων (Gram αρνητικά) δεν υπήρξαν βακτήρια ίδιου είδους και ίδιας προέλευσης ώστε α γίνει κάποια σύγκριση ως προς την ομοιότητα ειδών που συλλέχθηκαν από το ίδιο περιβάλλον.

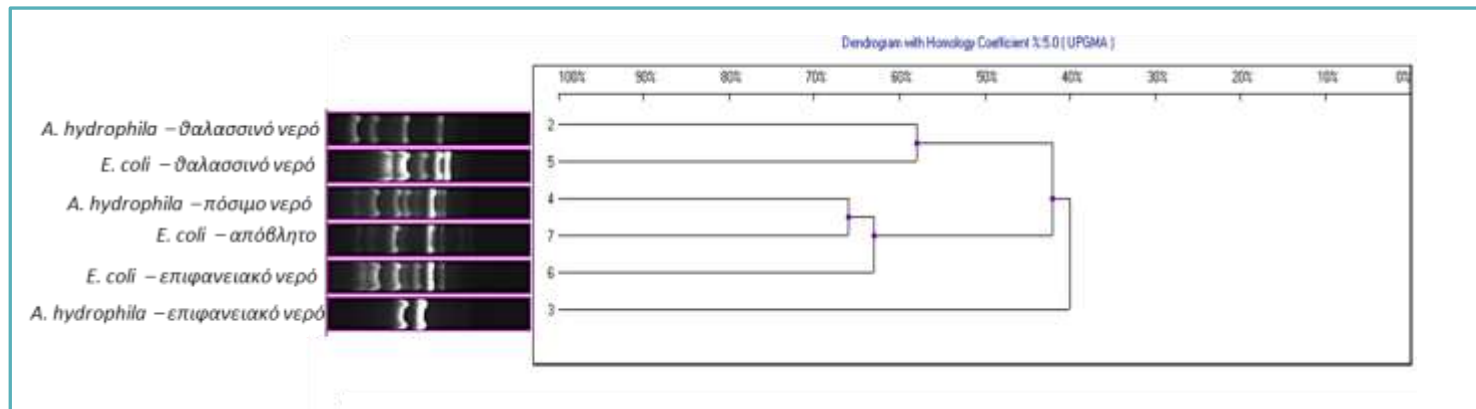


Εικόνα 21. RAPD_primer RAPD4 - Gram αρνητικά στελέχη

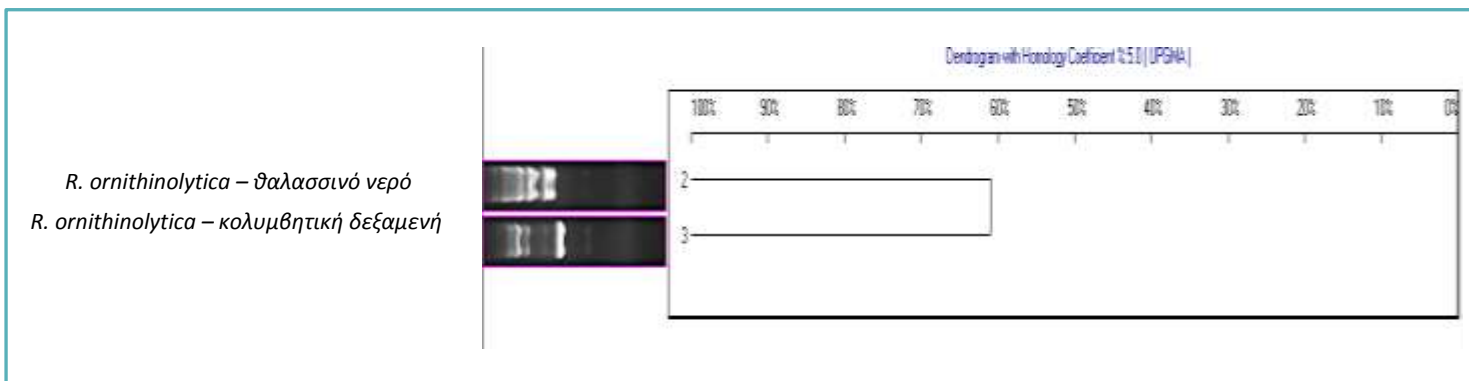
Η χρήση του εκκινητή RAPD4 είχε ως αποτέλεσμα την δημιουργία πολύ διαφορετικών RAPD προφίλ σε σχέση με τον εκκινητή RAPD7. Παρατηρήθηκε ότι στελέχη ίδιου είδους αλλά διαφορετικής προέλευσης παρουσίασαν μεγάλες ομοιότητες καθώς ο συντελεστής Jaccard κυμαίνεται από 0.67 έως 0.89. Ακόμη, βακτήρια διαφορετικού είδους και προέλευσης παρουσίασαν μεγάλες ομοιότητες: Τα στελέχη *E.coli* (απόβλητο) και *A. hydrophila* (πόσιμο νερό) παρουσίασαν τιμή συντελεστή Jaccard 0.75, γεγονός που αποδεικνύει την ομολογία γενετικού υλικού των δύο αυτών στελεχών σε μεγάλο βαθμό.

Πίνακας 27. Τιμές συντελεστή *Jaccard* μεταξύ των Gram αρνητικών στελεχών, βάσει ομοιοτήτων στα RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τον εκκινητή RAPD4

RAPD_primer RAPD7	<i>R. ornithinolytica</i> θαλασσινό νερό	<i>R. ornithinolytica</i> κολυμβητική δεξαμενή	<i>A. hydrophila</i> θαλασσινό νερό	<i>A. hydrophila</i> επιφανειακό νερό	<i>A. hydrophila</i> πόσιμο νερό	<i>E. coli</i> θαλασσινό νερό	<i>E. coli</i> επιφανεια κό νερό	<i>E. coli</i> απόβλητο
<i>R. ornithinolytica</i> θαλασσινό νερό	1.00							
<i>R. ornithinolytica</i> κολυμβητική δεξαμενή	0.86	1.00						
<i>A. hydrophila</i> θαλασσινό νερό	0.40	0.30	1.00					
<i>A. hydrophila</i> επιφανειακό νερό	0.36	0.56	0.67	1.00				
<i>A. hydrophila</i> πόσιμο νερό	0.25	0.40	0.67	0.60	1.00			
<i>E. coli</i> θαλασσινό νερό	0.50	0.56	0.50	0.60	0.60	1.00		
<i>E. coli</i> επιφανειακό νερό	0.45	0.50	0.45	0.70	0.70	0.89	1.00	
<i>E. coli</i> απόβλητο	0.44	0.50	0.63	0.56	0.75	0.75	0.67	1.00



Εικόνα 22. RAPD_primer 1290_Gram αρνητικά στελέχη



Εικόνα 23. RAPD_primer 1290_Gram αρνητικά στελέχη

Πίνακας 28. Τιμές συντελεστή *Jaccard* μεταξύ των Gram αρνητικών στελεχών, βάσει ομοιοτήτων στα RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τον εκκινητή 1290

RAPD_primer 1290	<i>R. ornithinolytica</i> θαλασσινό νερό	<i>R. ornithinolytica</i> κολυμβητική δεξαμενή	<i>A. hydrophila</i> θαλασσινό νερό	<i>A. hydrophila</i> επιφανειακό νερό	<i>A. hydrophila</i> πόσιμο νερό	<i>E. coli</i> θαλασσινό νερό	<i>E. coli</i> επιφανειακ ό νερό	<i>E. coli</i> απόβλητο
<i>R. ornithinolytica</i> θαλασσινό νερό	1.00							
<i>R. ornithinolytica</i> κολυμβητική δεξαμενή	0.62	1.00						
<i>A. hydrophila</i> θαλασσινό νερό	0.27	0.45	1.00					
<i>A. hydrophila</i> επιφανειακό νερό	0.69	0.29	0.40	1.00				
<i>A. hydrophila</i> πόσιμο νερό	0.31	0.29	0.50	0.36	1.00			
<i>E. coli</i> θαλασσινό νερό	0.50	0.38	0.58	0.30	0.43	1.00		
<i>E. coli</i> επιφανειακό νερό	0.27	0.33	0.31	0.22	0.64	0.33	1.00	
<i>E. coli</i> απόβλητο	0.24	0.29	0.58	0.30	0.67	0.29	0.60	1.00

Τα RAPD προφίλ που αναπτύχθηκαν με τη χρήση του εκκινητή 1290 δεν παρουσίασαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ τους. Τα βακτήρια ίδιου είδους αλλά διαφορετικής προέλευσης παρουσίασαν ποικίλα αποτελέσματα καθώς ο συντελεστής Jaccard κυμαίνεται από 0.29 έως 0.62. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα στελέχη *E. coli* προερχόμενα από θαλασσινό νερό και απόβλητο παρουσίασαν συντελεστή Jaccard 0.29 με τη χρήση του εκκινητή 1290 ενώ τα ίδια ακριβώς στελέχη παρουσίασαν συντελεστή Jaccard 0.75 με τη χρήση του εκκινητή RAPD4. Το αποτέλεσμα αυτό αποδεικνύει πόσο σημαντική είναι η επίδραση των διαφορετικών εκκινητών στη δημιουργία ενός RAPD προφίλ. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι βακτήρια διαφορετικού είδους αλλά και προέλευσης παρουσίασαν μικρές ομοιότητες (τιμές συντελεστή Jaccard <0.50), με εξαίρεση τρία ζεύγη βακτηρίων των οποίων η ομοιότητα ήταν σχετικά μεγάλη (τιμές συντελεστή Jaccard 0.58 -0.69).

Πίνακας 29. Μέσος δείκτης ομολογίας (S_{xy}) των δημιουργούμενων προφίλ RAPD στα βακτήρια διαφορετικής προέλευσης

Ομάδα βακτηρίων	Είδος βακτηρίου διαφορετικής προέλευσης	Μέσος δείκτης ομολογίας (S_{xy})			
		Εκκινητής M13	Εκκινητής 1290	Εκκινητής RAPD4	Εκκινητής RAPD7
Gram θετικά βακτήρια	<i>E. faecium</i>	0.61 ± 0.08	0.65 ± 0.05	-	-
	<i>S. xylosus</i>	0.50 ± 0.04	0.34 ± 0.05	-	-
Gram αρνητικά βακτήρια	<i>R. ornithinolytica</i>	-	0.67	0.62	0.60
	<i>A. hydrophila</i>	-	0.54 ± 0.13	0.74 ± 0.06	0.66 ± 0.23
	<i>E. coli</i>	-	0.36 ± 0.14	0.8 ± 0.06	0.51 ± 0.18

Η διαφορετικότητα του προφίλ ζωνών του κάθε εκκινητή, είχε ως αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικών μέσων δεικτών ομολογίας S_{xy} . Αναφορικά με τα Gram θετικά βακτήρια, φαίνεται πως δεν μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση σχετικά με το μέσο δείκτη ομολογίας καθώς οι εκκινητές 1290 και M13 φαίνεται να είχαν περίπου το ίδιο αποτέλεσμα. Σχετικά με τα Gram αρνητικά βακτήρια, είναι εμφανές ότι ο μεγαλύτερο μέσο δείκτη ομολογίας παρουσίασε ο εκκινητής RAPD4.

5. Συμπεράσματα

Τα συμπεράσματα της παρούσας εργασίας επικεντρώνονται στην σύγκριση της χλωρίωσης και της φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA, ως προς την αποτελεσματικότητα αδρανοποίησης των βακτηρίων σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Η αποτελεσματικότητα των δύο μεθόδων έχει δύο άξονες:

- Η συσχέτιση της αποτελεσματικότητας της κάθε μεθόδου με την πηγή προέλευσης του βακτηρίου: πρέπει να δοθεί σημασία στην προέλευση καθώς είναι σημαντικό το περιβάλλον από το οποίο συλλέχθηκε ο μικροοργανισμός. Για παράδειγμα, ένα βακτήριο που έχει συλλεχθεί από πόσιμο νερό, ίσως είναι πιο ανθεκτικό χλωρίωση λόγω της διαρκούς χλωρίωσης στην οποία υπόκειται το πόσιμο νερό, σε αντίθεση με κάποιο βακτήριο, του ίδιου είδους που δεν έχει υποστεί καθόλου χλωρίωση.
- Η συσχέτιση της αποτελεσματικότητας της κάθε μεθόδου με το είδος του βακτηρίου: είναι σημαντικό να δοθεί προσοχή στα χαρακτηριστικά του κυττάρου του βακτηρίου, όπως αν έχει τη δυνατότητα δημιουργίας σπορίων ή αν για παράδειγμα, ευδοκιμεί σε υψηλές θερμοκρασίες.

Επίσης, θα σχολιασθούν τα RAPD profiles των βακτηρίων ως προς πολλές διαφορετικές παραμέτρους (πχ. Τι ρόλο έπαιξε το είδος και η προέλευση του βακτηρίου αλλά και το είδος του εκκινητή).

5.1. Σύγκριση χλωρίωσης και φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVA

Κάθε είδος βακτηρίου αντέδρασε διαφορετικά στην κάθε μέθοδο απολύμανσης. Η ανθεκτικότητα εξαρτάται από τις συνθήκες στις οποίες αναπτύχθηκε οι οποίες οφείλονται τόσο στις λειτουργίες του κυττάρου όσο και στο περιβάλλον από το οποίο απομονώθηκε. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή των δύο μεθόδων είναι τα εξής:

- Η προέλευση των βακτηρίων έπαιξε πολύ σημαντικό ρόλο στα αποτελέσματα των δύο μεθόδων. Αποδείχθηκε ότι βακτήρια που συλλέχθηκαν από ύδατα κολυμβητικών δεξαμενών αλλά και πόσιμο νερό ήταν πολύ ανθεκτικά στην χλωρίωση καθώς ακόμη και μετά από 45 min που διαρκούσε το εκάστοτε πείραμα, εξακολουθούσαν να παρουσιάζουν σημαντικό αριθμό αποικιών. Όμοια, στην φωτοκατάλυση με ακτινοβολία UVA παρατηρήθηκε ότι βακτήρια προερχόμενα από επιφανειακά ύδατα ήταν ανθεκτικότερα σε σχέση με βακτήρια προερχόμενα από κολυμβητικές δεξαμενές, καθώς η εξοικείωσή τους με την ηλιακή ακτινοβολία είχε αυξήσει την αντοχή τους σε αυτή τη μέθοδο απολύμανσης.
- Το είδος των βακτηρίων επίσης καθόρισε την ανθεκτικότητά τους στην κάθε μέθοδο απολύμανσης, λαμβάνοντας υπόψη διαφορετικά κριτήρια σύγκρισης των δύο μεθόδων: Βακτήρια όπως το *Staphylococcus* sp. και *Enterococcus* sp., ήταν πιο ανθεκτικά στην απολύμανση λόγω της δομής των κυττάρων τους. Αντίθετα, το πιο επιρρεπές βακτήριο και στα δύο είδη απολύμανσης ήταν το *E. coli*. Τα υπόλοιπα είδη παρουσίασαν ποικίλες

αντιδράσεις συγκριτικά με την προέλευσή τους, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να γίνει κάποια σύγκριση ως προς την ανθεκτικότητα ανάλογα το είδος τους.

Σε γενικές γραμμές, το ποσοστό μείωσης του πληθυσμού αγγίζει το 95% γεγονός που καθιστά τις δύο αυτές μεθόδους ικανοποιητικά αποτελεσματικές για τα συγκεκριμένα βακτήρια.

5.2. RAPD – PCR

Έπειτα από την εφαρμογή των μεθόδων απολύμανσης που αναλύονται στην παρούσα εργασία, δημιουργήθηκε η ανάγκη για την ανάλυση των γενετικών πολυμορφισμών των κυττάρων των στελεχών που υπέστησαν απολύμανση. Για την μελέτη της γονοτυπικής εγγύτητας των βακτηρίων που υπέστησαν χλωρίωση και ετερογενή φωτοκατάλυση με χρήση ακτινοβολίας UVA, επιλέχθηκε η μέθοδος RAPD – PCR λόγω ευχρηστίας και αποτελεσματικότητας.

Κατά τη διάρκεια εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου PCR, τα θραύσματα DNA που πολλαπλασιάζονται είναι τυχαία, με αποτέλεσμα να δημιουργούν διαφορετικά πρότυπα για κάθε στέλεχος. Χρησιμοποιείται ένας εκκινητής μικρού μήκους (8-12 νουκλεοτιδίων) του οποίου η δράση, δηλαδή αν θα ξεκινήσει ή όχι να πολλαπλασιάζει ένα τμήμα DNA, εξαρτάται από τις θέσεις που είναι συμπληρωματικές προς την αλληλουχία του εκκινητή. Δεν μπορεί να παραχθεί θραύσμα στην περίπτωση που οι εκκινητές υβριδοποιήθηκαν πολύ μακριά ή τα 3 άκρα των εκκινητών δεν είναι απέναντι το ένα από το άλλο. Έτσι, αν μια μετάλλαξη συμβεί στο DNA-μήτρα στη θέση που πριν ήταν συμπληρωματική με τον εκκινητή, δε θα παραχθεί προϊόν, με αποτέλεσμα τη δημιουργία διαφορετικού προτύπου ζωνών στο gel (NCBI). Η επιλογή της σωστής αλληλουχίας του εκκινητή είναι πολύ σημαντική καθώς διαφορετικές αλληλουχίες θα παράγουν διαφορετικά πρότυπα ζωνών και ίσως επιτρέπουν μια πιο εξειδικευμένη αναγνώριση των στελεχών (Williams et al., 1990).

Σε αντίθεση με την απλή PCR, στην RAPD-PCR δεν απαιτείται γνώση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού-στόχου καθώς οι εκκινητές θα συνδεθούν σε κάποιο σημείο της αλληλουχίας αλλά δεν είναι ξεκάθαρο το πού ακριβώς (Mbwana et al., 2006). Αυτό κάνει τη μέθοδο ιδανική για τη σύγκριση του DNA βιολογικών συστημάτων που δε βρίσκονται στο επίκεντρο της επιστημονικής έρευνας, επομένως δε γνωρίζουμε πολλά στοιχεία για την αλληλουχία του γενετικού τους υλικού ή για ένα σύστημα όπου συγκρίνονται σχετικά λίγες αλληλουχίες DNA, αλλά δεν είναι κατάλληλη για τη δημιουργία βάσης δεδομένων (Φραγγεδάκη, 2014). Στην παρούσα εργασία τα δείγματα που συλλέχθηκαν προέρχονταν όλα από φυσικές πηγές με αποτέλεσμα να μην γνωρίζουμε πολλά για τον γονότυπό τους, καθώς αυτός επηρεάζεται σημαντικά από το περιβάλλον ανάπτυξης του βακτηρίου. Έτσι, η RAPD – PCR αποτέλεσε την ιδανική μέθοδο ανίχνευσης των γενετικών πολυμορφισμών των κυττάρων των βακτηρίων.

Παρά τα πλεονεκτήματά της, η μέθοδος αυτή έχει δεχτεί κριτική που βασίζεται κυρίως στην απουσία επαναληψιμότητας, εξαιτίας των συνθηκών χαμηλής αυστηρότητας στις οποίες πραγματοποιείται, όπως και των πολυάριθμων παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν τα

προφίλ της. Έχει φανεί ότι τα πρότυπα της RAPD επηρεάζονται από τη συγκέντρωση του εκκινητή, των νουκλεοτιδίων, της πολυμεράσης και του $MgCl_2$, από το δείγμα του DNA και την καθαρότητά του, από το προφίλ των θερμικών κύκλων και από τον τύπο του θερμοκυκλοποιητή (Φραγγεδάκη, 2014).

Ωστόσο, θεωρείται μία αξιόπιστη μέθοδος για την ανίχνευση γενετικών πολυμορφισμών, αν τα πρωτόκολλα χρήσης της εφαρμοστούν σωστά και προσεκτικά.

Φαίνεται ότι το είδος των βακτηρίων σε συνδυασμό με την προέλευση, έπαιξε σημαντικό ρόλο στο αποτελέσματα των RAPD profiles. Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρήθηκε μεγάλη ομολογία γενετικού υλικού βακτηρίων διαφορετικού είδους και προέλευσης (συντελεστής Jaccard έως 0.77) γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών. Για παράδειγμα, ανεξάρτητα από τον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε, τα βακτήρια *A. hydrophila* και *E. coli* παρουσίασαν ομοιότητα με συντελεστές Jaccard από 0.67 έως 0.77. Η εξήγηση για την τόσο μεγάλη γενετική ομολογία, ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι είναι και τα δύο Gram- βακτήρια, με παρόμοια δομή κυττάρων (τόσο ως προς το σχήμα αλλά και το μέγεθος).

Ακόμη ένα στοιχείο που υποδεικνύει τη ύπαρξη γενετικών πολυμορφισμών, είναι ότι βακτήρια διαφορετικής προέλευσης, αλλά ίδιου είδους, παρουσίασαν πολύ μικρές ομοιότητες (τιμές συντελεστή Jaccard <0.50). Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *E. coli* προερχόμενα από θαλασσινό νερό και απόβλητο παρουσίασαν συντελεστή Jaccard 0.29 με τη χρήση του εκκινητή 1290. Το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι η μικρή αυτή ομοιότητα οφείλεται στο περιβάλλον ανάπτυξης του κάθε στελέχους. Οι σχέσεις που αναπτύσσονται ανάμεσα στα βακτήρια που υπάρχουν στο θαλασσινό νερό σε σχέση με το απόβλητο που επεξεργάζεται σε μία μονάδα ΕΕΥΑ είναι σαφώς πολύ διαφορετικές. Ανάλογα τα είδη και τον πληθυσμό αυτών, οι σχέσεις συνύπαρξης και ανταγωνισμού καθώς και οι πηγές τροφής, διαφέρουν, με αποτέλεσμα η κυτταρική δομή να αλλάζει ανάλογα τις συνθήκες που επικρατούν στο κάθε περιβάλλον.

Πολύ σημαντικός παράγοντας στα αποτελέσματα των RAPD profiles υπήρξε η επίδραση του εκκινητή. Καθώς κάθε εκκινητής αποτελείται από μια διαφορετική αλληλουχία αζωτούχων βάσεων, τα αποτελέσματα των RAPD profiles είναι λογικό να διαφέρουν. Οι τιμές του συντελεστή Jaccard και του μέσου συντελεστή ομολογίας S_{xy} δείχνουν ότι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν δίνουν πολύ διαφορετικά αποτελέσματα ανάλογα την χρώση Gram στην οποία ανήκει το κάθε βακτήριο. Ο εκκινητής 1290 που χρησιμοποιήθηκε τόσο για τα Gram+ αλλά και τα Gram- βακτήρια έδωσε πολύ διαφορετικά αποτελέσματα, με μεγαλύτερες ομοιότητες για τα Gram- βακτήρια, γεγονός που τον καθιστά καταλληλότερο στη συγκεκριμένη ομάδα βακτηρίων.

Ανάμεσα στους εκκινητές 1290, RAPD4 και RAPD7 που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη RAPD profiles Gram αρνητικών βακτηρίων, αποδείχθηκε ότι ο δεύτερος είναι σαφώς πιο αποτελεσματικός σε σχέση με τους υπόλοιπους καθώς παρουσίασε τον μεγαλύτερο μέσο δείκτη ομολογίας. Για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα Gram θετικά βακτήρια (1290 & M13) δεν είναι δυνατό να βγει κάποιο συμπέρασμα, καθώς τα αποτελέσματα του μέσου δείκτη ομολογίας δεν διαφέρουν κατά πολύ μεταξύ τους.

6. Παράρτημα

Πίνακας 30. Προσδιορισμός ποσότητας DNA βακτηρίων με τη μέθοδο της φωτομέτρησης

α/α	Είδος βακτηρίου	Πηγή από την οποία απομονώθηκε το βακτήριο	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	R (OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀)	Συγκέντρωση DNA (ng/μL)
1	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	0.03657	0.01909	1.9	292.6
2	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	Δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής	0.04142	0.02174	1.9	331.4
3	<i>Enterococcus faecium</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	0.03696	0.01969	1.8	295.7
4	<i>Enterococcus faecium</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	0.01628	0.014	1.6	130.2
5	<i>Enterococcus faecium</i>	Δείγμα ύδατος ποταμού	0.03236	0.01839	1.7	258.9
6	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	0.06144	0.0323	1.8	491.5
7	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Δείγμα ύδατος κολυμβητικής δεξαμενής	0.07017	0.04979	1.4	561.4
8	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	0.07295	0.04860	1.5	583.4
9	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	0.06617	0.04133	1.6	529.4
10	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Δείγμα ύδατος ποταμού	0.07	0.03835	1.8	560
11	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Δείγμα πόσιμου ύδατος	0.07190	0.03610	1.9	575.2
12	<i>Escherichia coli</i>	Δείγμα θαλασσινού ύδατος	0.0414	0.02149	1.9	331.2
13	<i>Escherichia coli</i>	Δείγμα ύδατος λίμνης	0.05828	0.02296	2.5	466.2
14	<i>Escherichia coli</i>	Δείγμα λύματος εξόδου δευτεροβάθμιας επεξεργασίας βιολογικού καθαρισμού	0.03657	0.01894	1.9	292.6

7. Βιβλιογραφία

Andreozzi R., Caprio V., Insola A., Marotta R., (1999), Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery, Elsevier: Catalysis Today, 53, 51-59.

Ashayeri-panah, M., Eftekhari, F., Feizabadi, M.M., 2012, Development of an optimized random amplified polymorphic DNA protocol for fingerprinting of *Klebsiella pneumoniae*. Letters in Applied Microbiology, 54, 272-279.

Bernabeu A., Vercher R.F., Santos Juanes L., Simon P.J., Lardin C., Martinez M.A., Vicente J.A., Gonzalez R., Llosa C., Arques A., Amat A.M., 2011, Solar photocatalysis as a tertiary treatment to remove emerging pollutants from wastewater treatment plant effluents. Elsevier, Catalysis today, 161, 235-240.

Decimo M., Morandi S., Silvetti T., Brasca M., 2014, Characterization of Gram-Negative psychotropic bacteria isolated from Italian bulk tank milk, Journal of Food Science, 10, 2081-2090, doi: 10.1111/1750-3841.12645.

Deschaght, P., Van Simaey, L., Decat, E., Van Mechelen, E., Brisse, S., Vanechoutte, M., 2011. Rapid genotyping of *Achromobacter xylosoxidans*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolates using melting curve analysis of RAPD-generated DNA fragments (McRAPD). Research in Microbiology, 162, 386-392.

Grosberg R., Levitan D., Cameron B. (1996), Molecular Zoology: Advances, Strategies and Protocols, Wiley-Liss, Inc.

Ian L. Pepper, Charles P. Gerba, Terry J. Gentry, (2011), Environmental Microbiology, China, Academic Press.

Khajuria A., Praharaj A., Grover N., Kumar M., 2013, First Report of bla_{NDM-1} in *Raoultella ornithinolytica*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57(2): 1092-1093.

Metcalf & Eddy, 2007, Μηχανική Υγρών Αποβλήτων: Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση, Αθήνα, Εκδόσεις Τζιόλα.

Moreira G., Ribeiro A., Silva F., Carvalho A., Farias L., Nicoli J., Moreira E., 2011, Synergistic growth effect among bacteria covered from root canal infections. Brazilian Journal of Microbiology, 1517:8382.

Pérez, T., Albornoz, J., Domínguez, A., 1998, An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. Molecular Ecology, 7, 1347-57.

Rengua – Mangia A., Guth B., Andrade J., Irino K., Pacheco F., Ferreira S., Zahner V., Teixeira L., 2004, Genotypic and phenotypic characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strains isolated in Rio de Janeiro city, Brazil, FEMS Immunology and Medical Microbiology, 40, 155 – 162.

Robert D., Malato S., 2002, Solar Photocatalysis: A clean process for water detoxification. Elsevier: The Science of the total environment, 291, 85-97.

Βενιέρη Δ., Γουνάκη Ι., 2011, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος « Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Βενιέρη Δ., Γουνάκη Ι., 2009, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Οικολογία», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Διαμαντόπουλος Ε., 2014, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Χημικές διεργασίες στην επεξεργασία νερού & υγρών αποβλήτων», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, 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.

Μάνιος Θ., 2003, Φωτοκαταλυτική απολύμανση δευτεροβάθμια επεξεργασμένων αστικών υγρών αποβλήτων, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Κρήτης, Ηράκλειο.

Οικονομόπουλος Α., Οικονομοπούλου Μ., 2005, Πανεπιστημιακές σημειώσεις μαθήματος «Ρύπανση και έλεγχος ρύπανσης νερών», Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Πολίτη Α., 2012, Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και του pH στην καταλυτική δραστηριότητα εμπορικών στελεχών ζύμης *Saccharomyces cerevisiae*, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Ρούτσιας Ι., 2008, Ταξινόμηση και Ταυτοποίηση Μικροοργανισμών, Σημειώσεις μαθημάτων ειδικευόμενων, Μικροβιολογικό εργαστήριο.

Τσώνης Σ., (2004), Επεξεργασία Λυμάτων, Αθήνα, Εκδόσεις Παπασωτηρίου.

Φεσά, Μ., 2009, Τεχνικές απολύμανσης πόσιμου νερού, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

Φραγγεδάκη Α., 2014, Απολύμανση νερού με τη χρήση φωτοκατάλυσης: Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* και επίδραση στο γενετικό υλικό της, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.

Ηλεκτρονικές πηγές:

Roberts K., 2012, Lecture and laboratory notes from the lesson “Microbiology”, Available at: <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%206/physical.html>, (accessed July 2014), Prince George’s Community college, Maryland, United States.

Kevin N., 2013, Lecture and laboratory notes from the lesson “Introductory Microbiology LS”, Available at: https://www.snow.edu/kevins/Biol_2060_PDF_files/Ch_30_31_Environmental.pdf, (accessed July 2014), Snow college, Utah, United States.

Polz M., 1.89, *Environmental Microbiology: Lecture 15*, Department of Civil and Environmental Engineering, Massachusetts Institute of Technology, Retrieved from: http://ocw.mit.edu/courses/civil-and-environmental-engineering/1-89-environmental-microbiology-fall-2004/lecture-notes/11_02_04.pdf

United States Environmental Protection Agency: www.water.epa.gov
Todar's Online Textbook of Bacteriology <http://textbookofbacteriology.net/>
UCSC Genome Bioinformatics <https://genome.ucsc.edu/>