



ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΔΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΚΑΙ ΥΓΕΙΟΝΟΜΙΚΗ ΜΗΧΑΝΙΚΗ

Μεταπτυχιακή Διατριβή

**Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* στα  
απόβλητα και διερεύνηση μεταβολών του προφίλ  
ανθεκτικότητάς σε ποικιλία αντιβιοτικών**

**Μαρία Μπικουβαράκη**

**Μηχανικός Ορυκτών Πόρων**

**Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Βενιέρη Δανάη**

**Μέλη επιτροπής:**

**Διαμαντόπουλος Ευάγγελος**

**Ξεκουκουλωτάκης Νικόλαος**

**Ιούνιος 2016**



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Βενιέρη Δανάη, για την εξαιρετική καθοδήγησή της και την αμέριστη υποστήριξή της καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής. Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τους καθηγητές που μου έκαναν την τιμή να συμμετέχουν στην επιτροπή, Διαμαντόπουλο Ευάγγελο και Ξεκουκουλωτάκη Νικόλαο. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα υπεύθυνη του εργαστηρίου όπου εκπονήθηκε η μελέτη για την υπομονή και την επιμονή με την οποία μου μετέφερε πολλές από τις πολύτιμες γνώσεις της, και την αναντικατάστατη βοήθειά της. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με στήριξε ηθικά καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Πίνακας περιεχομένων

1.Εισαγωγή.....	8
1.1 Αναγκαιότητα της απολύμανσης.....	8
1.2 Μέθοδοι απολύμανσης .....	12
1.2.1 Χλωρίωση .....	12
1.2.2 Φωτοκατάλυση.....	17
1.2.2.1 Ηλιακή φωτοκατάλυση.....	17
1.2.2.2 Φωτοκατάλυση με UVC ακτινοβολία .....	20
1.2.2.2.1 Καταλύτης που χρησιμοποιείται στην απολύμανση με UVC.....	22
1.2.2.2.3 Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών στην απολύμανση με UVC ...	24
1.3 Αντιβιοτικά.....	25
1.3.1 Αντοχή βακτηρίων στα αντιβιοτικά .....	27
1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	27
2. Σκοπός της μελέτης.....	29
3. Υλικά και πειραματική διαδικασία .....	30
3.1 Υλικά .....	30
3.2 Πειραματική διαδικασία .....	32
3.2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών.....	32
3.2.2 Φωτοκατάλυση.....	32
3.2.2.1 Παρασκευή δείγματος.....	33
3.2.2.2 Πραγματοποίηση πειράματος ηλιακής φωτοκατάλυσης.....	33
3.2.2.3 Πραγματοποίηση πειράματος προσομοιωμένης ηλιακής ακτινοβολίας .....	34
3.2.2.4 Πραγματοποίηση πειράματος φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVC .....	35
3.2.3 Χλωρίωση .....	35
3.2.4 Καλλιέργεια .....	38
3.2.5 Δοκιμή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά.....	38
3.2.6 Απομόνωση γενετικού υλικού .....	40
3.2.7 PCR.....	41

3.2.7.1 Γονίδια ανθεκτικότητας .....	43
4. Αποτελέσματα – Συζήτηση .....	44
4.1 Καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν .....	44
4.2 Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> με προσομοιωμένο ηλιακό φως....	48
4.3 Φυσικό φως του ήλιου και αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> .....	52
4.4 Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> με ακτινοβολία UVC.....	54
4.5 Αδρανοποίηση της <i>K. pneumoniae</i> με χλωρίωση.....	56
4.6 Σύγκριση μεθόδων.....	57
4.7 Φωτοενεργοποίηση .....	60
4.8 Αντιβιοτικό προφίλ ανθεκτικότητας της <i>K. pneumoniae</i> και MICs μετά από επεξεργασία .....	61
Βιβλιογραφία.....	73

## Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1 : Εξέλιξη της χλωρίωσης του νερού (5).....	15
Εικόνα 2: Διαδικασία φωτοκατάλυσης α) με $\text{TiO}_2$ και β) με τροποποιημένο $\text{TiO}_2$ με πρόσμειξη μετάλλου (9).....	18
Εικόνα 3: Βλάβες που προκαλούνται σε μικροβιακά κύτταρα από την ακτινοβολία UVC (1).....	21
Εικόνα 4: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου - SEM, καταλύτη $\text{TiO}_2$ ενισχυμένου με Mn. ....	44
Εικόνα 5: UV–VIS απορρόφηση του $\text{P25}$ και του $\text{Mn}:\text{TiO}_2(0.02\text{--}1 \text{ wt}\%)$ (a), του $\text{Co}:\text{TiO}_2(0.02\text{--}1 \text{ wt}\%)$ (b) και του $\text{Mn}/\text{Co}:\text{TiO}_2$ (εύρος συγκέντρωσης των δυο ενισχυτών: $0.04\text{--}1 \text{ wt}\%$ )(c).....	45
Εικόνα 6: Εικόνες XRD από καταλύτες : (a) $\text{Mn}-\text{TiO}_2(0.02\text{--}1 \text{ wt}\%)$ , (b) $\text{Co}-\text{TiO}_2(0.02\text{--}1 \text{ wt}\%)$ και (c) Mn με Co δυαδικός $\text{TiO}_2$ (εύρος συγκέντρωσης: $0.04\text{--}0.1 \text{ wt}\%$ ) (31).....	47
Εικόνα 7: Αδρανοποίηση της <i>K.pneumoniae</i> υπό την επίδραση τεχνητής ηλιακής ακτινοβολίας με τον καταλύτη $\text{P25}$ και με καταλύτες $\text{TiO}_2$ ενισχυμένους με Mn (σπόγγος), με Mn, με Co και με Mn και Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: $10^7$ cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L. ....	48
Εικόνα 8: Κύτταρα <i>K. pneumoniae</i> πριν και μετά από φωτοκαταλυτική επεξεργασία με χρήση καταλύτη $\text{TiO}_2$ ενισχυμένου με Mn, Co, και δυαδικό Mn-Co. ....	51
Εικόνα 9: Αδρανοποίηση της <i>K.pneumoniae</i> υπό την επίδραση φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας με τον καταλύτη $\text{P25}$ και με καταλύτες $\text{TiO}_2$ ενισχυμένους με Mn (σπόγγος), με Mn, με Co και με Mn και Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: $10^7$ CFU/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.....	53
Εικόνα 10: Αδρανοποίηση της <i>K.pneumoniae</i> με ακτινοβολία UVC και χρήση καταλύτη $\text{TiO}_2$ .....	55
Εικόνα 11: Αδρανοποίηση της <i>K.pneumoniae</i> με χλωρίωση, με τη χρήση του NaOCl σε συγκεντρώσεις 0,3, 1 και 5 mg / L .....	57
Εικόνα 12: Σύγκριση αποτελεσμάτων φωτοκαταλυτικών μεθόδων, με χρήση $\text{TiO}_2$ ..	58
Εικόνα 13: Σύγκριση αποτελεσματικότερων καταλυτών στις φωτοκαταλυτικές μεθόδους απολύμανσης, και στη χλωρίωση .....	59
Εικόνα 14: Έλεγχος φωτοενεργοποίησης βακτηρίου.....	61
Εικόνα 15: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) αντιβιοτικών πριν (ανέπαφα κύτταρα <i>K. pneumoniae</i> ) και μετά την επεξεργασία .....	65
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tetM στην <i>K. pneumoniae</i> προ επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 & 6 → θετικό δείγμα (προϊόν 600bp στην <i>K. pneumoniae</i> ), 7 → αρνητικό control. ....	68
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tetM στην <i>K. pneumoniae</i> κατόπιν επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → ανέπαφο στέλεχος, 3 → 0.04% Mn/Co: $\text{TiO}_2$ (sun), 4 → 0.04% Mn: $\text{TiO}_2$ sponge (sun), 5 → 0.1% Mn: $\text{TiO}_2$ (solar), 6 → $\text{TiO}_2$ (solar), 7 → UV-C, 8 → φωτονεργοποίηση 48 h, 9 → χλωρίωση 5 mg/L, 10 → χλωρίωση 1 mg/L, 11 → ανέπαφο στέλεχος.....	68
Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου tetA στην <i>K. pneumoniae</i> κατόπιν επεξεργασίας.	

Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → ανέπαφο στέλεχος, 3 → 0.04% Mn/Co:TiO <sub>2</sub> (sun), 4 → 0.04% Mn:TiO <sub>2</sub> sponge (sun), 5 → 0.1% Mn:TiO <sub>2</sub> (solar), 6 → TiO <sub>2</sub> (solar), 7 → UV-C, 8 → φωτονεροποίηση 48 h, 9 → χλωρίωση 5 mg/L, 10 → χλωρίωση 1 mg/L, 11 → ανέπαφο στέλεχος, 12 → αρνητικό control. ....	68
Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου <i>sul1</i> στην <i>K. pneumoniae</i> προ επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2, 3 & 4 → θετικό δείγμα (προϊόν 417bp στην <i>K. pneumoniae</i> ), 5 → αρνητικό control. ....	69
Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου <i>ampC</i> στην <i>K. pneumoniae</i> κατόπιν επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 3 → χλωρίωση 1 mg/L, 4 → χλωρίωση 5 mg/L, 5 → 0.1% Co:TiO <sub>2</sub> (solar), 6 → 0.04% Mn:TiO <sub>2</sub> sponge (solar), 7 → 0.1% Mn:TiO <sub>2</sub> (solar), 8 → TiO <sub>2</sub> (solar), 9 → 0.04% Mn/Co:TiO <sub>2</sub> (solar), 10 → UV-C, 11 → ανέπαφο στέλεχος, 12 → αρνητικό control. ....	69

## Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 1 : Μικροβιολογικές παράμετροι νερού (6).....	10
Πίνακας 2 : Παθογόνοι μικροοργανισμοί που πιθανώς να βρεθούν στο νερό, και λοιμώξεις που δύνανται να προκαλέσουν (4).....	10
Πίνακας 3 :Ποσοστά HOCl - OCl σε διάφορες τιμές pH στους 15 °C (5) .....	13
Πίνακας 4 : Αριθμός χλωριομετρήσεων σύμφωνα με τον πληθυσμό (7).....	14
Πίνακας 5 : Ενώσεις που παράγονται στο νερό κατά τη χλωρίωση .....	16
Πίνακας 6: Χρόνοι απενεργοποίησης μικροοργανισμών, με έκθεση στον ήλιο (1) ....	19
Πίνακας 7: Δόση ακτινοβολίας που απαιτείται, κατά προσέγγιση, για να επιτευχθεί λόγος επιβίωσης 0,1 στα 253,7 nm (5). ....	24
Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (ng/L) και απολυμαντικών στο υδάτινο περιβάλλον (15) .....	26
Πίνακας 9: Ημέρες και ώρες διεξαγωγής των πειραμάτων ηλιακής φωτοκατάλυσης	34
Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που δοκιμάστηκαν .....	39
Πίνακας 11: Γονίδια και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν .....	42
Πίνακας 12: Μέσο μέγεθος σωματιδίων, σύνθεση φάσης και ενεργειακό χάσμα των καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν. ....	46
Πίνακας 13: Σταθερές ρυθμού και γραμμική προσαρμογή (R <sup>2</sup> ) των κινητικών της απενεργοποίησης της <i>K. pneumoniae</i> .....	60
Πίνακας 14: Παρουσία (+) και απουσία (-) ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων <i>K. pneumoniae</i> σε ανέπαφα και απομένοντα κύτταρα μετά την επεξεργασία (φωτοκατάλυση με προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία, χλωρίωση και UVC ακτινοβολία).....	69

## Περίληψη

Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στα λύματα και η ανθεκτική στα αντιβιοτικά φύση τους, επιβάλλει την εφαρμογή αποτελεσματικών τεχνικών απολύμανσης προκειμένου να προστατευθεί το περιβάλλον και η δημόσια υγεία. Στην παρούσα εργασία, οι μέθοδοι της φωτοκατάλυσης σε φυσικό ηλιακό φως και τεχνητό ηλιακό φως με καταλύτες οι οποίοι είναι ενισχυμένοι με μέταλλα, η χλωρίωση και η χρήση ακτινοβολίας UV-C, αξιολογούνται ως προς την ικανότητά τους να απενεργοποιήσουν την *Klebsiella pneumoniae* μέσα σε λύμα. Επίσης μελετήθηκε η συνολική τους επίδραση στο προφίλ ανθεκτικότητάς της στα αντιβιοτικά καθώς και στα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά (Antibiotic Resistance Genes - ARGs). Πιο συγκεκριμένα, έγιναν πειράματα με καταλύτες  $\text{TiO}_2$  ενισχυμένους με Mn και Co, καθώς και με δυαδικούς καταλύτες Mn/Co, οι οποίοι είχαν σαν αποτέλεσμα τη βακτηριακή μείωση από 4 έως 6 Log κατά την έκθεση σε τεχνητό ηλιακό φως για 90 min. Η απόκριση των καταλυτών υπό φυσικό ηλιακό φως σημειώθηκε ανεπαρκής, καθώς η μείωση των βακτηρίων ήταν μόλις 2 Log ακόμα και μετά από έκθεση 60 min.

Η σχετική δράση των εφαρμοζόμενων μεθόδων για την απενεργοποίηση της *K. pneumoniae* μειώθηκε με την ακόλουθη σειρά: : φωτοκατάλυση με το δυαδικό καταλύτη Co/Mn- $\text{TiO}_2$  σε τεχνητό ηλιακό φως > χλωρίωση με δόση 5 mg/L ελεύθερου χλωρίου > UV-C ακτινοβολία, σε αρχική συγκέντρωση βακτηρίων  $10^7$  CFU/mL. Οι εφαρμοζόμενες μέθοδοι κατέδειξαν ποικίλες επιδράσεις στο προφίλ ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, στα εναπομείναντα κύτταρα.

Μεταξύ των αντιβιοτικών τα οποία δοκιμάστηκαν (αμπικιλίνη, τετρακυκλίνη, κεφακλόρη και σουλφαμεθοξαζόλη), αξιοσημείωτες μεταβολές της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC) παρατηρήθηκαν στην τετρακυκλίνη και την κεφακλόρη.

Η ανθεκτικότητα των κυττάρων που επιβίωσαν από τις διεργασίες απολύμανσης παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα αντανakλώντας την πληθώρα των ARGs που μελετήθηκαν (tetA, tetM, sul1, blaTEM και ampC). Η αξιοσημείωτη παρουσία των ARGs μετά την απενεργοποίηση προκαλεί ανησυχίες και καθιστά τα λύματα φορέα στοιχείων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, στο υδάτινο περιβάλλον.

## Abstract

The presence of pathogenic microorganisms in wastewater and their resistant nature to antibiotics impose effective disinfection treatment for public health and environmental protection. In this work, photocatalysis with metal-doped titania under artificial and natural sunlight, chlorination and UV-C irradiation were evaluated for their potential to inactivate *Klebsiella pneumoniae* in real wastewater. Their overall effect on antibiotic resistance profile and target antibiotic resistance genes (ARGs) was also investigated. In particular, Mn-, Co- and binary Mn/Co-TiO<sub>2</sub> were tested resulting in bacterial decrease from 4 to 6 Logs upon 90 min of exposure to simulated solar irradiation. The response of catalysts under natural solar light was insufficient, as only a 2 Log reduction was recorded even after 60 min of treatment.

The relative activity of the applied methods for *K. pneumoniae* inactivation was decreased in the order: photocatalysis with the binary Co/Mn-TiO<sub>2</sub> under artificial light > chlorination with dose of 5 mg/L of free chlorine > UV-C irradiation, at an initial bacterial concentration of 10<sup>7</sup> CFU/mL. The applied methods showed various effects on antibiotic resistance profile in residual cells. Among the tested antibiotics (ampicillin, cefaclor, sulfamethoxazole and tetracycline), considerable changes in MIC values were recorded for cefaclor and tetracycline. Resistance of surviving cells after treatment remained in high levels, reflecting the abundance of the corresponding target ARGs, namely tetA, tetM, sul1, blaTEM and ampC. The notable presence of target ARGs post disinfection raises concerns and makes wastewater effluent a carrier of antibiotic resistance elements into the aquatic environment.



## **1.Εισαγωγή**

### **1.1 Αναγκαιότητα της απολύμανσης**

Ένα από τα πιο βασικά προβλήματα που επηρεάζουν τους ανθρώπους σε όλο τον κόσμο είναι ανεπαρκής πρόσβαση σε καθαρό νερό και οι ανεπαρκείς συνθήκες υγιεινής. Οι ανάγκες της σύγχρονης κοινωνίας έχουν οδηγήσει σε αυξημένες ανάγκες για νερό, και τα προβλήματα αναμένεται να επιδεινωθούν στη διάρκεια των επόμενων δεκαετιών, με τη λειψυδρία που εμφανίζεται σε παγκόσμιο επίπεδο με αυξανόμενη συχνότητα και διάρκεια, ακόμη και σε περιοχές που σήμερα θεωρούνται πλούσιες σε νερό. Η αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων απαιτεί μεθόδους καθαρισμού του νερού με χαμηλό κόστος και σχετικά μικρή κατανάλωση ενέργειας, ενώ ταυτόχρονα να ελαχιστοποιούνται η χρήση χημικών ουσιών και οι επιπτώσεις στο περιβάλλον.

Τα προβλήματα σε όλο τον κόσμο που σχετίζονται με την έλλειψη καθαρού, γλυκού νερού είναι γνωστά: 1,2 δισεκατομμύρια άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε καθαρό πόσιμο νερό και εκατομμύρια άνθρωποι πεθαίνουν κάθε χρόνο από ασθένειες που μεταδίδονται μέσω του μη ασφαλούς νερού (1). Τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και βιομηχανικές χώρες, αυξανόμενος αριθμός ρύπων εισέρχονται στην παροχή του νερού από τις ανθρώπινες δραστηριότητες. Η εξοικονόμηση του νερού αποτελεί πρώτη προτεραιότητα για όλες τις χρήσεις ύδατος και αποτελεί σημαντικό στόχο της διαχείρισης των υδατικών πόρων συμβάλλοντας στην παροχή επαρκούς ποσότητας και καλής ποιότητας νερού για τον άνθρωπο και το φυσικό περιβάλλον.

Η ολοκληρωμένη διαχείριση των υδάτινων πόρων ορίζεται ως ένα πλαίσιο για το σχεδιασμό, την οργάνωση και τον έλεγχο των συστημάτων νερού (2). Προβλέπει την εφαρμογή κατασκευαστικών και μη κατασκευαστικών μέτρων για την ρύθμιση φυσικών και τεχνητών υδατικών συστημάτων προς όφελος του ανθρώπου και του περιβάλλοντος με σκοπό τη διατήρηση των υπαρχόντων φυσικών υδατικών συστημάτων, τη σχεδιασμένη επαναχρησιμοποίηση υδατικών πόρων, την αναβάθμιση της ποιότητας των υδατικών πόρων και τη διαχείριση της ζήτησης του νερού, με σκοπό την εξοικονόμηση (3).

Από τους πρώτους που αντιλήφθηκαν τη σημασία της υγιεινής ύδρευσης και αποχέτευσης ήταν οι πολιτισμοί που αναπτύχθηκαν στον Ελληνικό χώρο, με πρωτοπόρους τους κατοίκους της Κνωσού, της Φαιστού και της Ζάκρου όπου

ανακαλύφθηκαν τέλεια συστήματα ύδρευσης που χρονολογούνται από το 1700 π. Χ. Οι αρχαιολόγοι υποστηρίζουν ότι οι υγιεινολογικές γνώσεις των κατοίκων της Μινωικής Κρήτης είχαν επηρεάσει και βρήκαν εφαρμογή αργότερα και στα ανάκτορα της Τίρυνθας και των Μυκηνών (4)

Στη νεότερη ιστορία, η ανάγκη να απομακρυνθούν ή να καταστραφούν οι νοσογόνοι παράγοντες από το πόσιμο νερό, έγινε προφανής το 1849 όπου ο Δρ. John Snow υποψιάστηκε ότι η χολέρα μεταδίδεται μέσω του νερού. Κατέστη δυνατό να αποδειχθεί αυτή η θεωρία μερικά χρόνια αργότερα, το 1854, όπου έπεισε τις αρχές να παρεμποδίσουν το διαμοιρασμό νερού από τη δημόσια αντλία της Broad Street με αποτέλεσμα να εξαλειφθεί μία τοπική, αλλά σοβαρή, επιδημία χολέρας. Στη συνέχεια, μετά την ταχεία ανάπτυξη της επιστήμης της μικροβιολογίας κατά το δεύτερο μισό του 19ου αιώνα, έγινε γρήγορα σαφές ότι οι ουσίες που προκαλούν τις ασθένειες ήταν στην πραγματικότητα μικροοργανισμοί, κυρίως βακτήρια και ιοί. Η ανάγκη να εξαλειφθούν αυτοί από την παροχή πόσιμου νερού ήταν πλέον εμφανής (5).

Η απολύμανση είναι ένας όρος ο οποίος αναφέρεται στις διαδικασίες οι οποίες σχετίζονται με την απενεργοποίηση ή την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό. Ο όρος αυτός συνεπάγεται την απενεργοποίηση ή καταστροφή μόνο των παθογόνων μικροοργανισμών παρουσιάζοντας μείωσή τους κατά πέντε λογαριθμικές μονάδες και όχι απαραίτητα την ολική καταστροφή όλων των μικροοργανισμών μέσα στο νερό. Η ολική καταστροφή των μικροοργανισμών στο νερό θα απαιτούσε διαδικασίες αποστείρωσης, κάτι που δεν είναι επιθυμητό δεδομένου ότι δεν υπάρχει ανάγκη για κάτι τέτοιο, ούτε εύκολο να επιτευχθεί μέσα στα λειτουργικά όρια που υπαγορεύει η χρήση των περισσότερων απολυμαντικών μέσων, όσον αφορά την συγκέντρωσή τους, την γεύση και την οσμή του προϊόντος, καθώς επίσης το χρόνο και το κόστος της μεθόδου (5).

Η νεότερη μέχρι στιγμής νομοθεσία στην Ελλάδα, καθορίζει τις οριακές τιμές των μικροβιακών δεικτών (Πίνακας 1), οι οποίοι χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού και η παρουσία τους υποδηλώνει την ταυτόχρονη παρουσία και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών.

**Πίνακας 1 : Μικροβιολογικές παράμετροι νερού (6)**

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή (αριθμός / 100 mL)
<i>Escherichia coli</i> (E.coli)	0
Εντερόκοκκοι	0

Για το νερό που πωλείται σε φιάλες ή δοχεία, ισχύουν τα ακόλουθα:

Παράμετρος	Παραμετρική τιμή
<i>Escherichia coli</i> (E.coli)	0 / 250 mL
Εντερόκοκκοι	0 / 250 mL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 / 250 mL
Αριθμός αποικιών σε 22 °C	100 / mL
Αριθμός αποικιών σε 37 °C	20 / mL

Οι υδατογενείς λοιμώξεις προκαλούνται από παθογόνους μικροοργανισμούς που βρίσκονται μέσα στο νερό (Πίνακας 2). Οι ασθένειες εκδηλώνονται υπό την προϋπόθεση να καλύπτεται η μολυσματική δόση, δηλαδή ο ελάχιστος αριθμός μικροοργανισμών που απαιτείται, προκειμένου ένας άνθρωπος να νοσήσει.

**Πίνακας 2 : Παθογόνοι μικροοργανισμοί που πιθανώς να βρεθούν στο νερό, και λοιμώξεις που δύναται να προκαλέσουν (4)**

Βακτήρια	
<i>Salmonella typhi</i>	Τυφοειδής πυρετός
<i>Salmonella paratyphi A, B</i>	Παράτυφος
<i>Shigella spp</i>	Μικροβιακή δυσεντερία
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Μικροβιακή γαστρεντερίτιδα
<i>E. coli</i>	Μικροβιακή γαστρεντερίτιδα
<i>Campylobacter jejuni</i>	Μικροβιακή γαστρεντερίτιδα
<i>Vibrio cholerae</i>	Χολέρα
<i>Legionella pneumophila</i>	Πνευμονία, Πυρετός Pontiac

<i>Atypical Mycobacteria</i>	Κοκκιώματα, Νοσήματα αναπνευστικού όπως φυματίωση κ.α.
<i>Aeromonas hydrophila, sobria</i>	Δερματικές-μυϊκές λοιμώξεις, διάρροιες, πνευμονίες, σηψαιμία
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ωτίτιδες, επιπεφυκίτιδες, δερματίτιδες, πνευμονία
<i>Staphylococcus spp</i>	Δερματίτιδες, αποστήματα δέρματος, επιμολύνσεις τραυμάτων κ.ά.
<i>Vibrio: vulnificus, parahaemolyticus, alginolyticus</i>	Σηψαιμία σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα, γαστρεντερίτιδες, ωτίτιδες
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Πνευμονία
<b>Μύκητες</b>	
<i>Candida albicans</i>	Δερματίτιδες
<i>Aspergillus</i>	Δερματίτιδες
<i>Mucor</i>	Δερματίτιδες
<i>Fusarium</i>	Δερματίτιδες
<i>Rhizopus</i>	Δερματίτιδες
<b>Ιοί</b>	
<i>HAV</i>	Ηπατίτιδα Α
<i>Polio I, II, III viruses</i>	Εντεροϊώσεις
<i>Coxsackie A, B viruses</i>	Εντεροϊώσεις
<i>Echo viruses</i>	Εντεροϊώσεις
<i>Rota virus</i>	Εντεροϊώσεις
<i>Parvo virus</i>	Εντεροϊώσεις
<i>Norwalk agent virus</i>	Εντεροϊώσεις
<b>Παράσιτα</b>	
<i>Entamoeba histolytica</i>	Γαστρεντερίτιδες
<i>Giardia lamblia</i>	Γαστρεντερίτιδες
<i>Cryptosporidium spp</i>	Γαστρεντερίτιδες
<i>Balantidium coli</i>	Γαστρεντερίτιδες
<i>Naegleria fowleri</i>	Μηνιγγίτιδα
<i>Leptospira hictrohaemorrhagiae</i>	Μηνιγγίτιδα με ηπατονεφρική ανεπάρκεια
<i>Acanthamoeba spp</i>	Κερατίτιδα, αποστήματα & έμφρακτα εγκεφάλου

## 1.2 Μέθοδοι απολύμανσης

Το απολυμαντικό μέσο πρέπει:

- Να είναι δραστικό σε όλες τις κατηγορίες μικροοργανισμών που παρουσιάζονται ή αναμένεται να παρουσιασθούν στο σύστημα.
- Να συμφέρει οικονομικά η εφαρμογή του.
- Να μην δημιουργεί παρενέργειες στο σύστημα και να μη διευκολύνει την ανεξέλεγκτη ανάπτυξη ανεπιθύμητων ειδών.
- Να μην δημιουργεί σοβαρούς κινδύνους για το προσωπικό και το περιβάλλον.

### 1.2.1 Χλωρίωση

Η πιο συνηθισμένη σήμερα μέθοδος απολύμανσης είναι η χλωρίωση η οποία επιτυγχάνεται με προσθήκη στο νερό είτε ελεύθερου χλωρίου είτε χημικών ενώσεων του χλωρίου (κυρίως άλατα νατρίου και καλίου) και ανήκει στις λεγόμενες συμβατικές μεθόδους απολύμανσης. Το χλώριο αντιδρά οξειδωτικά με ανόργανες και οργανικές ενώσεις, που δεσμεύουν το «απαιτούμενο» και παραμένει το «υπολειμματικό» χλώριο.

Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι πρώτον η υδρόλυση:



Η δραστική ένωση από αυτή την αντίδραση είναι το HOCl και η παρουσία του εξαρτάται κυρίως από το pH. Σε όξινο pH η ποσότητα HCl είναι μεγαλύτερη και κατά συνέπεια παρουσιάζεται μεγαλύτερη μικροβιοκτόνος δράση.

Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα ο ιοντισμός:



Η δραστική ένωση από αυτή την αντίδραση είναι το OCl<sup>-</sup>.

Παρ' όλο που και οι δύο μορφές χλωρίου είναι απολυμαντικοί παράγοντες, το υποχλωριώδες οξύ HOCl έχει πολύ μεγαλύτερη μικροβιοκτόνο δράση έναντι του υποχλωριώδους ιόντος OCl<sup>-</sup> στο νερό (80 φορές περισσότερο, για *E.coli*, 300-500 φορές για *E. histolytica*). Τα ποσοστά υποχλωριώδους οξέος και υποχλωριώδους ιόντος σε διάφορες τιμές pH στους 15<sup>0</sup>C παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.

**Πίνακας 3 :Ποσοστά HOCl - OCl σε διάφορες τιμές pH στους 15 °C (5)**

pH	HOCl (%)	OCl (%)
5	99,7	0,3
6	97,5	2,5
7	79,7	20,3
8	28,0	72,0
9	3,8	96,2

Η Ελληνική νομοθεσία έχει θεσπίσει τις παρακάτω οδηγίες για τη χλωρίωση του πόσιμου νερού :

- ΚΥΑ 2600/01 για την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης , σε εναρμόνιση προς την οδηγία 98/83 ΕΚ.
- Υ.Μ. 5673/ 4.12.57 Υγειονομική Διάταξη για την απολύμανση του ύδατος των υδρεύσεων.

Σύμφωνα με αυτές, η απολύμανση του ύδατος των υδρεύσεων θα ενεργείται δια χλωρίου. Το ποσό εισαγομένου χλωρίου, πρέπει να είναι τόσο ώστε να παρέχει υπόλειμμα χλωρίου στα ακρότατα σημεία υδρεύσεως τουλάχιστον 0,2 mg/l. Η δράση του χλωρίου θα πρέπει να εξασφαλίζεται για χρονικό διάστημα τουλάχιστον 20 λεπτών από την εισαγωγή του μέχρι την κατανάλωση. Για τον έλεγχο της χλωρίωσης καθορίζεται ελάχιστος αριθμός χλωριομετρήσεων σε συνάρτηση με τον υδροδοτούμενο πληθυσμό (Πίνακας 4 ) (7).

**Πίνακας 4 : Αριθμός χλωριομετρήσεων σύμφωνα με τον πληθυσμό (7)**

Πληθυσμός	Σημεία ελέγχου (κατ' ελάχιστον)
< 3000	3
5000	15
25000	40

Γενικά, η μικροβιοκτόνος δράση του χλωρίου εξαρτάται από :

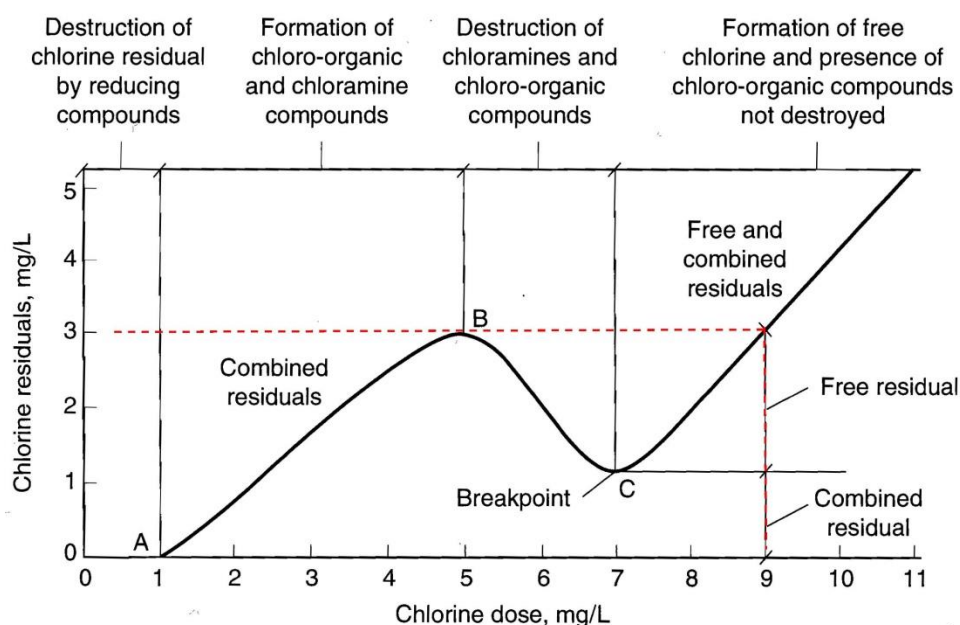
- τη μορφή (ελεύθερο, χλωραμίνες)
- το pH
- Τη συγκέντρωση (δόση)
- Τη θερμοκρασία
- Το είδος των μικροβίων

Το χλώριο και το υποχλωριώδες οξύ της απολύμανσης αντιδρούν με πολλές ενώσεις, ανόργανες και οργανικές και ιδιαίτερα με τις αναγωγικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένης και της αμμωνίας, δημιουργώντας χλωραμίνες. Αυτές οι αντιδράσεις είναι και το σημαντικό μειονέκτημα της χλωρίωσης. Η απαίτηση των ενώσεων αυτών για χλώριο πρέπει να ικανοποιηθεί πριν υπάρξει διαθέσιμο (υπολειμματικό) χλώριο για την απολύμανση. Οι αντιδράσεις που γίνονται μεταξύ του χλωρίου, σε μορφή υποχλωριώδους νατρίου, και της αμμωνίας είναι οι εξής:



Ο σχηματισμός των χλωραμινών εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, και την αναλογία του χλωρίου ως προς την αμμωνία. Συγκεκριμένα, όταν η τιμή της αναλογίας είναι μέχρι 1, σχηματίζεται η μονο- και δι- χλωραμίνη με τις σχετικές τους συγκεντρώσεις να είναι συνάρτηση του pH. Παραπέρα αύξηση του λόγου χλώριο/αμμωνία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό τριχλωραμίνης ή ακόμα και οξείδωση της αμμωνίας σε άζωτο. Από αυτές τις αντιδράσεις, η πρώτη είναι γενικά γρήγορη και το ιδανικό pH για τη μέγιστη αποτελεσματικότητα είναι 8,3. Η δεύτερη

αντίδραση είναι αργή, εκτός αν το pH πέσει σε τιμές κάτω από 5,5. (5). Γενικά σε τιμές του pH πάνω από 8,5 επικρατεί η μονοχλωραμίνη, μεταξύ 8,5 και 5,5 ανιχνεύονται ταυτόχρονα η μονο - και δι- χλωραμίνη, μεταξύ 5,5 και 4,5 η διχλωραμίνη, ενώ κάτω από 4,4 παράγεται η τριχλωραμίνη. Κατά τη χλωρίωση νερών ή λυμάτων με σχετικά χαμηλή συγκέντρωση αμμωνίας χρησιμοποιείται η καμπύλη υπολειμματικού χλωρίου (Εικόνα 1) για να εκτιμηθεί η ποσότητα του προστιθέμενου χλωρίου που απαιτείται, έτσι ώστε να υπάρχει ελεύθερο υπολειμματικό χλώριο παρουσία αμμωνιακού αζώτου.



**Εικόνα 1 : Εξέλιξη της χλωρίωσης του νερού (5)**

Η σημασία της υγιεινής των ενώσεων που παράγονται ως αποτέλεσμα της χλωρίωσης του νερού ύδρευσης (Πίνακας 5) εξακολουθεί να είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες, κυρίως λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων στις οποίες υπάρχουν αυτές οι ενώσεις στο νερό. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος, δεν υπάρχει κανένας πρακτικός τρόπος με τον οποίο μπορεί να γίνουν πειράματα σε θηλαστικά, με οποιαδήποτε ρεαλιστική προσδοκία, για πιθανές ιδιότητες καρκινογένεσης. Ως εκ τούτου, κρίθηκε αναγκαίο να γίνουν βραχυπρόθεσμες, δοκιμές σε βακτήρια για να διαπιστωθεί κατά πόσον ή όχι, οι εν λόγω ενώσεις έχουν μεταλλαξιογόνες ιδιότητες.



**Πίνακας 5 : Ενώσεις που παράγονται στο νερό κατά τη χλωρίωση**

<b>Τριαλογονομεθάνια</b>	<b>Αλογονωμένες αλδεΐδες</b>
Χλωροφόρμιο	Χλωροακεταλδεΐδη
Βρωμοδιχλωρομεθάνιο	Διχλωροακεταλδεΐδη
Διβρωμοχλωρομεθάνιο	Τριχλωροακεταλδεΐδη
Βρωμοφόρμιο	Βρωμοακεταλδεΐδη
<b>Αλογονωμένα οξικά οξέα</b>	Διβρωμοακεταλδεΐδη
Χλωροοξικό οξύ	Τριβρωμοακεταλδεΐδη
Διχλωροοξικό οξύ	<b>Αλογονωμένες κετόνες</b>
Τριχλωροοξικό οξύ	1,1 Διχλωροπροπανόνη
Βρωμοοξικό οξύ	1,3 Διχλωροπροπανόνη
Διβρωμοοξικό οξύ	1,1,1 Τριχλωροπροπανόνη
Τριβρωμοοξικό οξύ	<b>Αλογονωμένες φαινόλες</b>
Βρωμοχλωροοξικό οξύ	2 Χλωροφαινόλη
Βρωμοδιχλωροοξικό οξύ	2,4 Διχλωροφαινόλη
Διβρωμοχλωροοξικό οξύ	2,4,6 Τριχλωροφαινόλη
<b>Αλογονωμένα ακετονιτρίλια</b>	<b>Αλογονοκυάνια</b>
Διχλωροακετονιτρίλιο	Χλωροκυάνιο
Τριχλωροακετονιτρίλιο	Βρωμοκυάνιο
Τριβρωμοακετονιτρίλιο	Χλωροπικρίνη
Βρωμοχλωροακετονιτρίλιο	Βρωμοπικρίνη
Χλωροοξικό οξύ	3-χλωρο-4-(διχλωρομέθυλ )-5 2( 5H)-φουρανόνη

Ο μηχανισμός της καταστροφής των βακτηριακών κυττάρων κατά τη χλωρίωση, σχετίζεται με τη διατάραξη της κυτταρικής μεμβράνης και την αναστολή της ενζυματικής δράσης. Η αναπνοή είναι εξασθενημένη, η επιλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης καταστρέφεται, και προκαλείται ανεπανόρθωτη ζημιά στις μεταβολικές λειτουργίες. Όσον αφορά τους ιούς, η απενεργοποίησή τους προέρχεται από την αλλοίωση του πρωτεϊνικού καψιδίου τους (5).

### 1.2.2 Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση ανήκει σε μία ευρύτερη κατηγορία μεθόδων απολύμανσης γνωστές ως «Προηγμένες Διεργασίες Οξειδωσης». Οι προηγμένες διεργασίες οξειδωσης αναπτύχθηκαν για την επεξεργασία νερού και υγρών αποβλήτων όταν μέσα σε αυτά υπάρχουν οργανικοί ρύποι ή παθογόνοι μικροοργανισμοί. Αυτές οι μέθοδοι βασίζονται στον σχηματισμό πολύ δραστικών χημικών ειδών τα οποία διασπούν ακόμη και τα πιο ανθεκτικά μόρια σε βιοαποικοδομήσιμες ενώσεις.

Ο μηχανισμός οξειδωσης περιλαμβάνει το σχηματισμό ελευθέρων ριζών υδροξυλίου,  $\text{HO}\cdot$ , αλλά κάτω από ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης και συγκεκριμένα, θερμοκρασία περιβάλλοντος και ατμοσφαιρική πίεση. Οι ρίζες υδροξυλίου δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα ως προς το είδος των ενώσεων τις οποίες μπορούν να οξειδώσουν και η ταχύτητα των αντιδράσεων είναι πολύ μεγάλη, σε αντίθεση με άλλα οξειδωτικά μέσα. Το αποτέλεσμα της οξειδωσης είναι η αδρανοποίηση των περισσοτέρων οργανικών μορίων, αποδίδοντας  $\text{CO}_2$  και ανόργανα ιόντα.

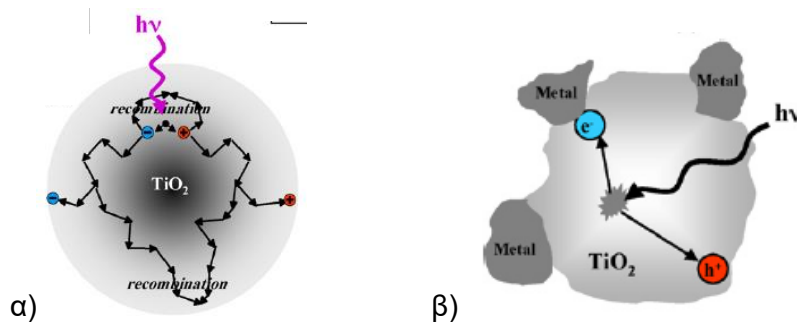
#### 1.2.2.1 Ηλιακή φωτοκατάλυση

Η ηλιακή φωτοκατάλυση περιλαμβάνει τη χρήση της εγγύς υπεριώδους ζώνης του ηλιακού φάσματος, ώστε να φωτο-διεγερθεί ένας ημιαγωγός-καταλύτης που βρίσκεται στο νερό, παρουσία οξυγόνου. Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί αρκετή σημασία στη φωτοκατάλυση, με έμφαση στην αδρανοποίηση, κατά κύριο λόγο, των βακτηρίων, και λιγότερο των ιών και των παρασίτων. Οι πιο σημαντικές ιδιότητες αυτής της μεθόδου, οι οποίες την κάνουν εφαρμόσιμη στην επεξεργασία νερού και αποβλήτων είναι οι παρακάτω:

- Η διαδικασία λαμβάνει χώρα σε περιβαλλοντικές συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης.
- Η οξείδωση των ουσιών σε  $\text{CO}_2$  και ανόργανες ουσίες, είναι πλήρης.
- Το οξυγόνο που χρειάζεται για την αντίδραση μπορεί να ληφθεί απευθείας από την ατμόσφαιρα.
- Ο καταλύτης είναι φθηνός, ακίνδυνος και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί.

- Ο καταλύτης μπορεί να ροφηθεί πάνω σε πολλών ειδών αδρανή υλικά.
- Η ενέργεια που χρειάζεται για τη φωτο-ενεργοποίηση του καταλύτη μπορεί να ληφθεί από τον Ήλιο. (1)

Καθώς η συγκέντρωση και ο αριθμός των μολυσματικών προσμείξεων αυξάνεται, η διαδικασία καθίσταται πιο περίπλοκη και εμφανίζονται κάποια προβλήματα όπως χαμηλές ταχύτητες αντιδράσεων. Ο καταλύτης που χρησιμοποιείται στη φωτοκατάλυση για την αύξηση της ταχύτητας αντίδρασης, είναι το διοξείδιο του τιτανίου  $\text{TiO}_2$  (Ανατάσης) γιατί είναι φθηνός, εμπορικά διαθέσιμος, μη τοξικός και φωτοχημικά σταθερός, έχει χημική και θερμική σταθερότητα, είναι βιολογικά αδρανής, έχει δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, και είναι εύκολη η παραγωγή και χρήση του (8) (Εικόνα 2α). Παρ' όλο που αυτός ο καταλύτης είναι πολύ αποτελεσματικός, το φάσμα απορρόφησής του αντιπροσωπεύει μόνο το 5% του ηλιακού φάσματος (9). Η βελτίωση του καταλύτη μπορεί να επιτευχθεί με την τροποποίηση του προσθέτοντας μεταλλικά ιόντα και οξείδια, με σκοπό την μετατόπιση του φάσματος απορρόφησής του προς το ορατό φως (Εικόνα 2β).



**Εικόνα 2: Διαδικασία φωτοκατάλυσης α) με  $\text{TiO}_2$  και β) με τροποποιημένο  $\text{TiO}_2$  με πρόσμειξη μετάλλου (9)**

Εκτός από τις εξελίξεις που αφορούν την αύξηση του ρυθμού της φωτοκαταλυτικής αντίδρασης, η πιο σημαντική εξέλιξη στην ηλιακή φωτοκατάλυση τα τελευταία χρόνια, σχετίζεται με το συνδυασμό της με τη βιολογική επεξεργασία και την εφαρμογή τοξικολογικών αναλυτικών μεθόδων. Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 91/271/EEC, στο άμεσο μέλλον οι περισσότερες μονάδες επεξεργασίας

νερού θα περιλαμβάνουν ένα στάδιο φωτοκαταλυτικής προ-επεξεργασίας και μετά θα οδηγούνται στο συμβατικό βιολογικό καθαρισμό (9).

Το φυσικό φως του ήλιου ως παράγοντας θανάτωσης μικροοργανισμών περιγράφηκε πρώτα το 1877. Η οξειδωτική δράση στους μικροοργανισμούς λαμβάνει χώρα στην κυτταρική μεμβράνη, όπου προοδευτικά αυξάνεται η διαπερατότητά της, οξειδώνονται τα ενδοκυτταρικά συστατικά και επέρχεται η απώλεια βασικών κυτταρικών λειτουργιών και στη συνέχεια ο θάνατος του κυττάρου. Η αντοχή των μικροοργανισμών στη φωτοκατάλυση εξαρτάται από τη φύση τους. Γενικά, τα Gram-αρνητικά βακτήρια είναι τα περισσότερο ευαίσθητα, λιγότερο ευαίσθητα είναι τα Gram-θετικά βακτήρια, τα πρωτόζωα, οι μύκητες και οι ιοί (1) (Πίνακας 6 ).

**Πίνακας 6: Χρόνοι απενεργοποίησης μικροοργανισμών, με έκθεση στον ήλιο**  
(1)

Μικροοργανισμοί	Χρόνος απενεργοποίησης με ένταση ακτινοβολίας 1000 W/m <sup>2</sup>
<i>Bacillus subtilis endospores</i>	Όχι απενεργοποίηση μετά από 8 h
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3 h
<i>Enteropathogenic E. coli</i>	1,5 h
<i>Staphylococcus epidermis</i>	35 min
<i>Cambylobacer jejuni</i>	20 min
<i>Fusarium solani</i>	5 h
<i>Fusarium oxysporum</i>	5 h
<i>Cryptosporidium parvum</i>	8 h
<i>Giardia muris cysts</i>	4 h
<i>Acanthamoeba polyphaga (cysts)</i>	6 h
<i>Polio virus (NCPV #503)</i>	6 h (40 °C)
<i>A. polyphaga (Trophozoites)</i>	6 h
<i>Escherichia coli DH5 α</i>	2,5 h
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 h
<i>Candida albicans</i>	6 h

Τα προβλήματα που παρουσιάζονται με τη χρήση της ακτινοβολίας με σκοπό την απολύμανση του νερού είναι:

- Δεν εξασφαλίζει υπολειμματική δράση.
- Απαιτεί επιμελημένη συντήρηση και σταθερότητα στην ένταση της ακτινοβολίας.
- Θολότητα, χουμικές ουσίες και προσμίξεις εμποδίζουν τη μετάδοση της ακτινοβολίας. (7)
- Τα αιωρούμενα στερεά μπορεί να απορροφήσουν την ακτινοβολία, μειώνοντας την απόδοση. (10)

#### **1.2.2.2 Φωτοκατάλυση με UVC ακτινοβολία**

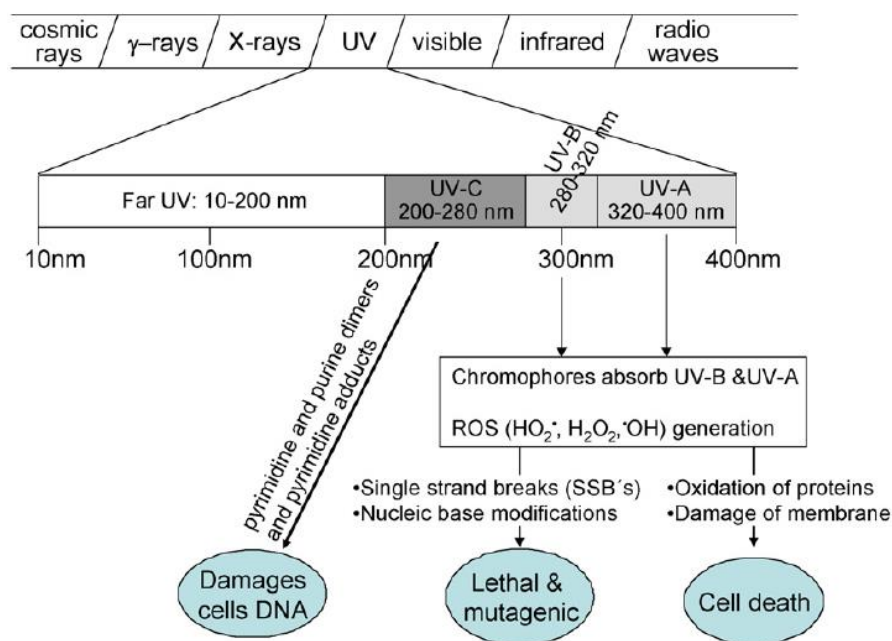
Η UV ακτινοβολία είναι ένα τμήμα της ηλιακής ακτινοβολίας και αποτελείται από την περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος που έχει μήκη κύματος μεταξύ 15 και 400 nm. Από αυτά, μόνο το τμήμα που βρίσκεται μεταξύ 200 και 310 nm (UVC) έχει μικροβιοκτόνο δράση παρουσιάζοντας μία σαφή αιχμή στα 255 nm περίπου (5). Ο τρόπος απολύμανσης χρησιμοποιώντας ακτινοβολία UVC είναι αντίστοιχος με την απολύμανση η οποία χρησιμοποιεί ηλιακή ακτινοβολία.

Η ακτινοβολία UVC (200-280 nm) όταν απορροφηθεί από το DNA των κυττάρων, προκαλεί βλάβες στα νουκλεϊκά οξέα, ιδιαιτέρως στο DNA, που απορροφά κυρίως κοντά στα 260 nm (Εικόνα 3). Η διάχυση της ενέργειας φέρεται να προκαλεί διάσπαση των ακόρεστων δεσμών, γεγονός που προκαλεί την παραγωγή μιας προοδευτικής θανατηφόρας βιοχημικής αλλαγής. Αυτή η θανατηφόρα επίδραση προκαλείται από βλάβες στις πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα και τα συστατικά των νουκλεϊκών οξέων. Δευτερεύουσες επιπτώσεις μπορεί να περιλαμβάνουν θραύσεις κλώνου DNA, διαταράξεις γενετικού κώδικα και αντιγραφής του DNA. Μπορεί επίσης να προκύψουν ορισμένες κυτταρικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένης της μειωμένης σύνθεσης DNA, RNA και πρωτεϊνών, καθώς και μειωμένη μίτωση ως αποτέλεσμα των βλαβών στις πρωτεΐνες (5).

Η πρώτη εφαρμογή της ακτινοβολίας UV σε πόσιμο νερό, ως μέθοδος απολύμανσης, έγινε το 1910 στη Μασσαλία μετά από την εξέλιξη της λάμπας ατμών

υδραργύρου και του σωλήνα χαλαζία, καθώς και την επιβεβαίωση της μικροβιοκτόνου δράσης της ακτινοβολίας UV. Η γενικευμένη χρήση της, όμως, παρεμποδίστηκε λόγω του υψηλού κόστους της μεθόδου, της χαμηλής αξιοπιστίας του εξοπλισμού, τα προβλήματα συντήρησης, και την έλευση της χλωρίωσης (11).

Η επανάσταση στη χρήση της ακτινοβολίας UV ως πρωτεύουσα μέθοδο απολύμανσης στην Ευρώπη και τις Ηνωμένες Πολιτείες, έγινε μετά την ανακάλυψη της υψηλής αποτελεσματικότητάς της εναντίον των πρωτόζωων *Cryptosporidium* και *Giardia*. Η χημική απολύμανση με χλωρίωση δεν είναι αποτελεσματική ενάντια σε αυτούς τους παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ άλλες τεχνικές, όπως η οζόνωση, έχει πολύ χαμηλή δράση ενάντια στη μολυσματικότητα από κύστες πρωτόζωων. Αντιθέτως, η μολυσματικότητα αυτών των μικροοργανισμών μειώνεται δραστικά με τη χρήση της UV ακτινοβολίας, η οποία μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε πόσιμο νερό. Η UV θεωρείται ότι είναι ευρέως αποτελεσματική εναντίων όλων των παθογόνων μικροοργανισμών, βακτηρίων, πρωτόζωων και ιών, τα οποία μπορεί να μεταδοθούν μέσω του πόσιμου νερού (11).



**Εικόνα 3: Βλάβες που προκαλούνται σε μικροβιακά κύτταρα από την ακτινοβολία UVC (1)**

Ο ρυθμός της απολύμανσης με τη χρήση ακτινοβολίας, είναι ανάλογος με την ένταση της ακτινοβολίας και τη θερμοκρασία, και αντιστρόφως ανάλογος με το βάθος του νερού, λόγω της διάχυσης της ακτινοβολίας. Η απολύμανση του νερού με υπεριώδη ακτινοβολία εξαρτάται από έναν αριθμό παραγόντων. Αυτοί είναι, κυρίως, το φάσμα εκπομπής της πηγής UV, η ένταση της ακτινοβολίας και η διάρκεια της έκθεσης, η ευαισθησία των διαφόρων μικροοργανισμών που εμπλέκονται, και η απόδοση των αντιδραστήρων. Η ένταση της ακτινοβολίας θα επηρεαστεί σε κάποιο βαθμό από τη γήρανση της πηγής υπεριώδους ακτινοβολίας και επίσης, σε μεγάλο βαθμό, από την ποιότητα του νερού, η οποία σε αυτή την περίπτωση σχετίζεται με την διαφάνεια του υπό επεξεργασία νερού με τα μικροβιοκτόνα μήκη κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (5).

#### **1.2.2.2.1 Καταλύτης που χρησιμοποιείται στην απολύμανση με UVC**

Στην απολύμανση με ακτινοβολία UVC χρησιμοποιείται ως καταλύτης το  $\text{TiO}_2$ . Η ποσότητα του καταλύτη που χρησιμοποιείται, εξαρτάται από τη γεωμετρία και τις συνθήκες λειτουργίας του φωτοαντιδραστήρα. Η ιδανική ποσότητα καταλύτη είναι η μέγιστη κατά την οποία όλα τα σωματίδιά του έχουν οπτική επαφή με την ακτινοβολία αλλά η ποσότητά του δεν υπερβαίνει ένα ανώτατο όριο κατά το οποίο παρεμποδίζεται η διάχυση της ακτινοβολίας στον αντιδραστήρα. Σε οποιαδήποτε δεδομένη εφαρμογή, αυτή η βέλτιστη μάζα καταλύτη πρέπει να βρεθεί, προκειμένου να αποφευχθεί η υπερβολική ποσότητα καταλύτη και να εξασφαλιστεί η συνολική απορρόφηση των φωτονίων (1).

Η προσπίπτουσα ακτινοβολία και η διαδρομή που ακολουθεί αυτή μέσα στον αντιδραστήρα είναι θεμελιώδεις για τον προσδιορισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης του καταλύτη. Στην περίπτωση αντιδραστήρων με διαδρομή μερικά εκατοστά, η κατάλληλη ποσότητα καταλύτη είναι της τάξεως των μερικών εκατοντάδων mg ανά λίτρο.

#### 1.2.2.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την απολύμανση με UVC

Το pH του μείγματος επηρεάζει σημαντικά το  $\text{TiO}_2$ , συμπεριλαμβανομένης της φόρτισης των σωματιδίων, το μέγεθος των συσσωματωμάτων που σχηματίζει, και τις θέσεις αγωγιμότητας. Παρ' όλα αυτά, ο ρυθμός φωτοκαταλυτικής ανοργανοποίησης δεν είναι συνήθως ισχυρά εξαρτώμενος από το pH όταν αυτό κυμαίνεται σε τιμές από 4 έως 10. Το pH στο οποίο η επιφάνεια του  $\text{TiO}_2$  έχει μηδενική φόρτιση εξαρτάται από τη μέθοδο παρασκευής του και κυμαίνεται από 4,5 ως 7. Πάνω και κάτω από αυτές τις τιμές, ο καταλύτης είναι αρνητικά ή θετικά φορτισμένος. Το μέγεθος των συσσωματωμάτων που σχηματίζονται από τα σωματίδια του  $\text{TiO}_2$  εξαρτάται επίσης από το pH. Στην περιοχή pH όπου τα σωματίδια είναι ουδέτερα φορτισμένα, η επιφάνειά τους δεν λειτουργεί απωθητικά, κατά συνέπεια προκαλείται ένα φαινόμενο συσσωμάτωσης και τα συσσωματώματα αυξάνονται σε μέγεθος. Αυτό το φαινόμενο σχετίζεται με την ικανότητα του μείγματος να απορροφά το φως, καθώς επίσης λόγω της αύξησης της μάζας και της καθίζησης των σωματιδίων επιβάλλεται εντονότερη προσπάθεια διατήρησης της ομοιομορφίας του καταλύτη στο μείγμα (1).

Λόγω της φωτονικής ενεργοποίησης, τα φωτοκαταλυτικά συστήματα δεν απαιτούν θέρμανση και λειτουργούν σε θερμοκρασία δωματίου. Η πραγματική ενέργεια ενεργοποίησης είναι μηδενική, ενώ και η φαινόμενη ενέργεια ενεργοποίησης είναι συχνά πολύ μικρή (λίγα  $\text{kJ} / \text{mol}$ ) εντός μιας μέσης περιοχής θερμοκρασιών (μεταξύ 20 και 80  $^{\circ}\text{C}$ ). Ωστόσο, σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 0  $^{\circ}\text{C}$ ) η φαινόμενη ενέργεια ενεργοποίησης αυξάνεται. Η εκρόφηση του τελικού προϊόντος γίνεται το περιοριστικό στάδιο του ρυθμού. Από την άλλη πλευρά, όταν αυξάνεται η θερμοκρασία πάνω από 80  $^{\circ}\text{C}$  και πλησιάζει στο σημείο βρασμού του νερού, η εξώθερμη προσρόφηση των αντιδρώντων παρεμποδίζεται και τείνει να γίνει το βήμα περιορισμού του ρυθμού. Κατά συνέπεια, η ιδανική θερμοκρασία είναι 20-80  $^{\circ}\text{C}$ , γεγονός που κάνει πολύ ελκυστική την φωτοκαταλυτική διαδικασία δεδομένου ότι δεν σπαταλιέται ενέργεια για έλεγχο της θερμοκρασίας (θέρμανση-ψύξη) (1).

Έχει αποδειχθεί, για όλους τους τύπους των φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων, ότι ο ρυθμός της αντίδρασης είναι ανάλογος με την ροή ακτινοβολίας. Αυτό επιβεβαιώνει την φωτο-επαγόμενη φύση της ενεργοποίησης της καταλυτικής διαδικασίας, με τη συμμετοχή των φωτο-επαγόμενων ηλεκτρικών φορτίων στο μηχανισμό της αντίδρασης (1).



#### 1.2.2.2.3 Ανθεκτικότητα μικροοργανισμών στην απολύμανση με UVC

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών στην ακτινοβολία UVC είναι αντίστοιχη με αυτή της ηλιακής ακτινοβολίας (Πίνακας 7). Πιο ανθεκτικοί παρουσιάζονται οι μικροοργανισμοί οι οποίοι βρίσκονται σε μορφή που έχει προστατευμένο το DNA τους, όπως είναι τα σπόρια των μυκήτων και των βακτηρίων, ή μικροοργανισμοί στους οποίους η περιοχή του νουκλεϊκού οξέος είναι πολύ μικρή, όπως είναι στους ιούς, και κυρίως οι μικροοργανισμοί που έχουν την ικανότητα να επανενεργοποιηθούν κάποιο χρονικό διάστημα μετά τη ακτινοβολήση.

Οι μηχανισμοί επανενεργοποίησης, μπορεί να είναι είτε η φωτοενεργοποίηση είτε η σκοτεινή επανενεργοποίηση, είτε και οι δύο. Η φωτοενεργοποίηση, η οποία είναι ενζυματικώς ρυθμιζόμενη και αυξάνεται η αποτελεσματικότητά της με την αύξηση της θερμοκρασίας, λαμβάνει χώρα στο ορατό φως και στην εγγύς UV. Η σκοτεινή επανενεργοποίηση είναι κυρίως θέμα αποκατάστασης στη φάση του διπλασιασμού του κυττάρου όπου απομακρύνονται τα επηρεασμένα από τη UV νουκλεοτίδια, και την αντικατάστασή τους με νέα (5).

Πίνακας 7: Δόση ακτινοβολίας που απαιτείται, κατά προσέγγιση, για να επιτευχθεί λόγος επιβίωσης 0,1 στα 253,7 nm (5).

Μικροοργανισμός	Δόση (J/m <sup>2</sup> )
<b>Βακτήρια</b>	
<i>E. coli</i>	30
<i>Eberthella typhosa</i>	21
<i>Salmonella enteritis</i>	40
<i>Shigella dysenteriae</i>	22
<i>S. aureus</i>	26
<i>Bacillus subtilis</i>	70
<i>B. subtilis</i> (spores)	120

<b>Ζύμες</b>	
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	60
<i>Torula sphaerica</i>	23
<b>Αλγη</b>	
Green algae	3600-6000
<b>Πρωτόζωα</b>	
<i>Paramecium</i>	640-1000
<b>Σπόρια μούχλας</b>	
<i>Aspergillus amstelodami</i>	667
<i>Aspergillus niger</i>	1320
<i>Cladosporium herburum</i>	600
<i>Penicillium digitatum</i>	440
<i>Rhizopus nigricans</i>	1110

### 1.3 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως για τη βελτίωση της υγείας των ανθρώπων, των ζώων και των φυτών, για την πρόληψη και θεραπεία των λοιμώξεων, ως πρόσθετα ζωοτροφών για την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των ζώων και ως κοκκιδιοστατικά φάρμακα στην βιομηχανία πουλερικών (12) (13). Αυτή η ευρύτητα των εφαρμογών προκάλεσε αύξηση στην κατανάλωση των αντιβιοτικών.

Τα αντιβιοτικά μπορούν να εισέλθουν στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων από την ανθρώπινη απέκκριση και από την άμεση διάθεση ιατρικών και βιομηχανικών αποβλήτων. Μόλις εισαχθούν τα αντιβιοτικά στα οικοσυστήματα, μπορούν να επηρεάσουν την εξέλιξη της δομής της κοινότητας, η οποία επηρεάζει

αναλόγως τη λειτουργία του οικοσυστήματος του νερού. Έτσι, έχουν διατυπωθεί ανησυχίες για τις πιθανές επιπτώσεις των υπολειμμάτων των αντιβιοτικών στο υδάτινο περιβάλλον (Πίνακας 8) (14).

**Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών (ng/L) και απολυμαντικών στο υδάτινο περιβάλλον (15)**

Τύπος	Χημική ένωση	Νοσοκομειακά λύματα	Αστικά λύματα	Επιφανειακό νερό	Υπόγειο νερό
Πενικιλίνες	Αμπικιλίνη	Έως 80			
Τετρακυκλίνες			1		
Μακρολίδες	Ερυθρομυκίνη-H <sub>2</sub> O		Έως 6	0,1-1,7	0,05
	Κλαριθρομυκίνη και Ροξυθρομυκίνη		<1	0,1-0,6	0,03
Κινολόνες	Σιπροφλοξασίνη	Έως 124,5	0,4	0,1	
Σουλφοναμί- δες	Σουλφαμεθοξαζόλη		Έως 1	0,1-0,2	0,4
	Τριμεθοπρίμη κ.α.		<0,2	Έως 0,03	
Απολυμαντικά	Ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου	Έως 5000			

Εκτός από τη χημική ρύπανση που προκαλείται από τα αντιβιοτικά η ίδια η χρήση αντιβιοτικών μπορεί επίσης να ευνοήσει την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηρίων στα αντιβιοτικά, που περιλαμβάνει κινδύνους για την υγεία ανθρώπων και ζώων. Μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών, τα οποία απελευθερώνονται στα αστικά λύματα λόγω ατελούς μεταβολισμού σε ανθρώπους ή που οφείλονται στη διάθεση των αχρησιμοποίητων αντιβιοτικών, καταλήγουν σε διάφορα φυσικά στοιχεία του περιβάλλοντος. Σύμφωνα με πολλές μελέτες, οι συνθήκες σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων είναι ευνοϊκές για την εξάπλωση των ανθεκτικών βακτηρίων (16). Η ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα αντιβιοτικά αποτελεί σοβαρό πρόβλημα για τη δημόσια υγεία.

### 1.3.1 Αντοχή βακτηρίων στα αντιβιοτικά

Η μεταβολή στην αντοχή που εμφανίζουν τα βακτήρια απέναντι στα αντιβιοτικά, μετά από την απολύμανση των λυμάτων, είναι ένα θέμα στο οποίο υπάρχει διχογνωμία. Σε κάποιες μελέτες, υποστηρίζεται ότι η απολύμανση ευνοεί την επικράτηση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων, κάποιες μελέτες προτείνουν ότι δεν υπάρχει κάποια αλλαγή στην ανθεκτικότητα των βακτηρίων, ενώ σε κάποιες άλλες αναφέρεται ότι τα ποσοστά των ανθεκτικών βακτηρίων μειώθηκαν μετά από απολύμανση. Οι αντικρουόμενες αναφορές θα μπορούσαν να αποδοθούν στα διαφορετικά είδη βακτηρίων που μελετήθηκαν, στον τύπο των λυμάτων, στην εποχή, στη δόση του απολυμαντικού που χρησιμοποιήθηκε ή στη διαφορετική επεξεργασία στην οποία υποβλήθηκαν τα λύματα.

Διάφορες μελέτες έχουν διεξαχθεί επάνω σε αυτό το θέμα. Στη μελέτη δύο εγκαταστάσεων επεξεργασίας νερού στο Wisconsin των Ηνωμένων Πολιτειών, όπου εξετάστηκαν γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη, βρέθηκε συγκρίσιμος αριθμός τους, στις δοκιμές πριν και μετά την απολύμανση (16). Στη μελέτη εγκατάστασης επεξεργασίας λυμάτων στο Michigan των Ηνωμένων Πολιτειών, όπου εξετάστηκαν γονίδια ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη και στη σουλφαμεθοξαζόλη, βρέθηκε ότι οι συγκεντρώσεις των ανθεκτικών βακτηρίων στα λύματα μετά την απολύμανση, ήταν σημαντικά μειωμένες, εντούτοις ήταν υψηλότερες από τις συγκεντρώσεις που υπήρχαν σε ποτάμια νερά (14). Η μελέτη δεκατεσσάρων εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων σε διάφορες πόλεις της Πορτογαλίας, έδειξε ότι η βιολογική επεξεργασία, δεν εμπόδισε τα ανθεκτικά βακτήρια να φθάσουν στο περιβάλλον. Όμως, όταν στο τελευταίο στάδιο επεξεργασίας, υπήρχε επεξεργασία με υπεριώδη ακτινοβολία, εμφανιζόταν μαζική μείωση του αριθμού των ανθεκτικών στελεχών που απελευθερώνονταν στο περιβάλλον (17).

### 1.4 *Klebsiella pneumoniae*

Η *K. pneumoniae* ανήκει στην οικογένεια των Εντεροβακτηρίων και είναι ένας Gram-αρνητικός, δυνητικά αναερόβιος, μη-κινούμενος και χωρίς μαστίγια, βάκιλος. Ζει σε επιφανειακά νερά, στο χώμα, σε φυτά και είναι συμβιωτικός κάτοικος της ρινοφαρυγγικής και γαστρεντερικής οδού, των θηλαστικών. Η παθογένειά της, οφείλεται σε διάφορους λοιμογόνους παράγοντες που της επιτρέπουν να ξεπεράσει την εγγενή ανοσία του ξενιστή και να προκαλέσει λοίμωξη σε ένα θηλαστικό ξενιστή.

Αυτοί οι παράγοντες περιλαμβάνουν λιποπολυσακχαρίτες, αδεσίνες, ανθεκτικότητα σε ορό και σχηματισμό βιοφίλμ.

Η *K. pneumoniae* ευθύνεται για το 8% περίπου, των ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων. Αυτές οι λοιμώξεις περιλαμβάνουν πνευμονία, μόλυνση τραυμάτων, μηνιγγίτιδα, ενδοαγγειακές λοιμώξεις, λοιμώξεις των μαλακών ιστών, ενδοκοιλιακές λοιμώξεις, βακτηριαιμία (18), διάρροια, λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, καθώς και σύνδρομο ηπατικού αποστήματος το οποίο πρόσφατα αποτέλεσε αντικείμενο πολλών αναφορών στις χώρες της Ασίας (19). Η σοβαρότητα αυτών των λοιμώξεων αυξάνεται, καθώς έχουν κάνει την εμφάνισή τους ανθεκτικά στελέχη τα οποία συχνά παράγουν ευρέος φάσματος ένζυμα βήτα-λακταμάσης, με σχετιζόμενη αύξηση στη νοσηρότητα και τη θνησιμότητα, κυρίως στις μονάδες εντατικής θεραπείας, τα τμήματα νεογνών, και στα χειρουργικά τμήματα (20).

Ευρέος φάσματος β-λακταμάσες (ESBLs) είναι μία ποικίλη ομάδα ενζύμων που προέρχονται κυρίως από τις οικογένειες TEM και SHV, και έχουν ένα υψηλό επίπεδο δραστηριότητας κατά των κεφαλοσπορινών ευρέως φάσματος. Η *K. pneumoniae* είναι με διαφορά το πιο κοινό είδος στο οποίο συναντώνται οι ευρέος φάσματος β-λακταμάσες και οι εκδήλωσεις κρουσμάτων λοιμώξεων αναφέρονται με αυξανόμενη συχνότητα (21). Το ποσοστό συχνότητας της *K. pneumoniae* σε πυογόνα ηπατικά αποστήματα είναι 78% στην Ταϊβάν και 41% στις ΗΠΑ. Αυτό την κατατάσσει τέταρτη ως αιτία εισαγωγής στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) από πνευμονία, πέμπτη ως αιτίες εισαγωγής στη ΜΕΘ από βακτηριαιμία και έκτη ως αιτία εισαγωγής στη ΜΕΘ από λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος (22).

Η διάδοση των οργανισμών αυτών σε ένα νοσοκομείο μπορεί να είναι ένα σύμπλεγμα γεγονότων που σχετίζεται διάφορους τρόπους μετάδοσης. Ο πιο κοινός τρόπος μετάδοσης της *K. pneumoniae* είναι μέσω των χεριών του νοσηλευτικού και ιατρικού προσωπικού. Έχει βρεθεί ότι αν το προσωπικό πλένει συχνά τα χέρια του με κατιονικά μικροβιοκτόνα (όπως χλωρεξιδίνη) προκαλείται 98-100% ελάττωσης του αριθμού των μολυσμένων με *K. pneumoniae*, ασθενών (20).

## 2. Σκοπός της μελέτης

- Έλεγχος αδρανοποίησης *K. pneumoniae* σε υγρά απόβλητα με εφαρμογή:
  - Φωτοκατάλυσης με χρήση καταλυτών μη ενισχυμένων ή ενισχυμένων με ένα ή δύο μέταλλα, υπό τεχνητά προσομοιωμένο και φυσικό ηλιακό φως
  - Ακτινοβολίας UV-C με χρήση καταλύτη
  - Χλωρίωσης
  - Σύγκριση αποτελεσματικότητας μεθόδων απολύμανσης
  - Σύγκριση αποτελεσματικότητας καταλυτών
  - Έλεγχος φωτοενεργοποίησης της *K. pneumoniae* μετά τη φωτοκατάλυση με UVC
- Έλεγχος ανθεκτικότητας της *K. pneumoniae* σε ποικιλία αντιβιοτικών. Ο έλεγχος πραγματοποιήθηκε σε ανέπαφα κύτταρα και σε κύτταρα που επιβίωσαν κατόπιν των επεξεργασιών απολύμανσης.
  - Σύγκριση των προφίλ ανθεκτικότητας στα βακτήρια προ και κατόπιν απολύμανσης, για κάθε επεξεργασία απολύμανσης
- Έλεγχος για την ύπαρξη γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν
  - Έλεγχος για μεταβολές σε αυτά τα γονίδια της *K. pneumoniae* μετά την απολύμανση

### 3. Υλικά και πειραματική διαδικασία

#### 3.1 Υλικά

##### Θρεπτικά υλικά

- Nutrient Agar (Lab M)
- Nutrient Broth (Himedia)
- Mueller-Hinton Broth (Lab M)

##### Χημικά υλικά

- NaCl (Sigma Aldrich)
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich)
- CH<sub>3</sub>COOH (Sigma Aldrich)
- KI (Sigma Aldrich)
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Panreac)
- NaOCl (Sigma-Aldrich)
- TiO<sub>2</sub> (P25 Degussa)
- Καταλύτες TiO<sub>2</sub> εμπλουτισμένοι με Mn ή Co ή και τα δύο (Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser του Ινστιτούτου Τεχνολογίας και Έρευνας - Μπίνας και συνεργάτες, Ηράκλειο Κρήτης)
- EtBr (Sigma-Aldrich)

##### Διαλύματα

- Διάλυμα NaCl 0.8% w/v (Sigma-Aldrich)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-EDTA (TE) (Sigma Aldrich)  
10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0 μετά αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Lysozyme lysis buffer:  
100mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500mM Tris [pH 8.0] (Sigma-Aldrich), lysozyme 30mg/ml (Applichem)
- CTAB- NaCl (Sigma Aldrich)  
4.1 g NaCl, 10 g CTAB, 100ml dd H<sub>2</sub>O.

- Διάλυμα 10% w/v SDS (Sigma Aldrich)
- Διάλυμα πρωτεΐνάσης K 20mg/ml (Sigma Aldrich)
- Αγαρόζη (Biotools)
- Ρυθμιστικό διάλυμα, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Biotools)
- AmpliTaq DNA πολυμεράσης (Biotools)
- dNTPs (Biolabs)
- 1XPCR ρυθμιστικό διάλυμα (Biotools)

#### Αντιβιοτικά

- Cefaclor (Sigma Aldrich)
- Sulfamethoxazole (Fluka)
- Tetracycline (Sigma Aldrich)
- Ampicillin (Fluka)

#### Εξοπλισμός

- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240)
- Σύστημα προσωμοιωμένου ηλιακού φωτός (Newport 96000 Solar Simulator System)
- Αναγνώστης μικροπλακών (Labtech LT-4000 Plate Reader)
- Λογισμικό Manta LML
- Φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Varian Cary 400
- Θερμικός κυκλοποιητής Peqlab (advanced Primus 25)
- Λογισμικό UVbandmap - UVITEC Cambridge

#### Στέλεχος *K. pneumoniae*

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



## Λύμα

Τα δείγματα πραγματικών λυμάτων που χρησιμοποιούνται σε όλα τα πειράματα απολύμανσης συλλέχθηκαν από τη μονάδα επεξεργασίας αστικών λυμάτων (117.500 ισοδύναμοι κάτοικοι) η οποία βρίσκεται στα Χανιά, Δ. Κρήτη, Ελλάδα. Ελήφθησαν δείγματα από τον Ιανουάριο έως Αύγουστο του 2014 από τις εκροές της διαδικασίας βιολογικής επεξεργασίας (ενεργός ιλύς) από τη μονάδα ιλύος πριν από την απολύμανση (χλωρίωση). Όλα τα δείγματα αποστειρώθηκαν πριν από κάθε επεξεργασία απολύμανσης.

### 3.2 Πειραματική διαδικασία

Όλος ο εργαστηριακός εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις διαδικασίες είχε προηγουμένως αποστειρωθεί είτε σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης στους 185°C για 2h είτε σε αυτόκαυστο στους 121°C και σε 1,1atm για 30min.

#### 3.2.1 Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Έγινε παρασκευή διαλύματος θρεπτικού υλικού για στερεή και υγρή καλλιέργεια. Το θρεπτικό υλικό που επιλέχθηκε ήταν το Nutrient agar για τη στερεή και το Nutrient Broth για την υγρή καλλιέργεια, τα οποία παρασκευάστηκαν σύμφωνα με τις αναγραφόμενες στη συσκευασία οδηγίες της εταιρίας. Ακολούθως έγινε η αποστείρωσή τους σε αυτόκαυστο σε πίεση 1.1 atm και θερμοκρασία 121°C για 30min. Στη συνέχεια έγινε επίστρωση τρυβλίων με το Nutrient agar και στερεοποίησή τους. Τα τρυβλία συσκευάστηκαν καταλλήλως ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσής τους και τέλος φυλάχθηκαν στους 4°C.

#### 3.2.2 Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση έγινε σε λύμα το οποίο είχε αποστειρωθεί και στη συνέχεια επιμολυνθεί με *K. pneumoniae*. Οι καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι καταλύτες TiO<sub>2</sub> εμπλουτισμένοι με Mn ή Co ή και τα δύο, κατασκευασμένοι από το Εργαστήριο

### 3.2.2.1 Παρασκευή δείγματος

Αρχικώς παρασκευάστηκε διάλυμα NaCl 0.8% με διαλύτη απιονισμένο νερό, το οποίο αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο (1.1 atm , 121°C για 30min).

Έγινε ανακαλλιέργεια στελέχους *K. pneumoniae* που φυλασσόταν στους -80°C, σε τρυβλίο με Nutrient agar. Στη συνέχεια έγινε επώαση του μικροοργανισμού σε επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 20-24h.

Φυλάχθηκε το τρυβλίο που περιείχε αποικίες υπόλευκου χρώματος στους 4°C ώστε να χρησιμοποιείται για τη λήψη αποικίας για επόμενες ανακαλλιέργειες.

Η φασματοφωτομέτρηση του δείγματος από την παραπάνω καλλιέργεια στα 600nm έγινε ως εξής: Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα NaCl 0.8% στο οποίο εισάχθηκε ποσότητα αποικιών *K.pneumoniae*. Η επιθυμητή συγκέντρωση του μικροοργανισμού ήταν  $10^8$  cfu/mL. Σύμφωνα με την κλίμακα McFarland, για να επιτευχθεί αυτή η συγκέντρωση, θα πρέπει η τιμή της απορρόφησης του δείγματος που φωτομετράται στα 600nm (Shimadzu UV 1240 φασματοφωτόμετρο) να είναι 0,1. Για να επιτευχθεί αυτό, έγινε μία σειρά διαδοχικών αραιώσεων και φωτομετρήσεων.

Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμού  $10^7$  cfu/mL. Έγινε επιμόλυνση κατάλληλου όγκου αποστειρωμένου λύματος με το εναιώρημα συγκέντρωσης  $10^8$  cfu/mL που παρασκευάστηκε, ώστε η συγκέντρωση του μικροοργανισμού στο λύμα να είναι  $10^7$  cfu/mL.

### 3.2.2.2 Πραγματοποίηση πειράματος ηλιακής φωτοκατάλυσης

Χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα 200 mL λύματος, με  $10^7$  cfu/mL *K. pneumoniae* σε αντιδραστήρα τύπου batch. Εισήχθηκε στο εναιώρημα 250 mg/L από τον εκάστοτε καταλύτη. Αναμείχθηκε το δείγμα για 20 min ώστε να αναμειχθεί και να προσροφηθεί ο καταλύτης, σε συνθήκες έλλειψης φωτός (κεκαλυμμένο δοχείο).

Το πείραμα έλαβε χώρα στη στέγη του κτιρίου Κ2 της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης (35.532706N , 24.068734W). Επιλέχθηκαν ημέρες με ανεμπόδιστη ηλιοφάνεια, και ώρες μέγιστης ηλιοφάνειας (Πίνακας 9) με την ηλιακή ακτινοβολία και τη θερμοκρασία στην περιοχή των 12,7 - 13,4 W / m<sup>2</sup> και 29 έως 32,7 °C, αντίστοιχα. Το εναιώρημα εκτέθηκε στον ήλιο, υπό συνεχή ανάδευση, και λήφθηκαν δείγματα 1,5 mL σε χρόνους: 0, 3, 6, 10, 15, 30, 45, 60 min.

**Πίνακας 9: Ημέρες και ώρες διεξαγωγής των πειραμάτων ηλιακής φωτοκατάλυσης**

Ημερομηνία	Ωρα
26/9/14	12:20
1/10/14	12:40
7/10/14	11:45
14/10/14	12:10
17/10/14	12:05
30/10/14	11:55
7/11/14	12:00

### **3.2.2.3 Πραγματοποίηση πειράματος προσομοιωμένης ηλιακής ακτινοβολίας**

Τα πειράματα φωτοκατάλυσης πραγματοποιήθηκαν σε αντιδραστήρα τύπου batch με τη χρήση συστήματος προσομοιωμένου ηλιακού φωτός (Newport 96000 Solar Simulator System) στο οποίο περιλαμβάνεται μια λάμπα ξένου, χωρίς όζον, ισχύος 160Watt και ένα φίλτρο Air Mass 1.5 Global Filter (Newport, model 81094). Η συσκευή δημιουργεί προσομοίωση της ηλιακής ακτινοβολίας που φθάνει στην επιφάνεια της γης σε μια γωνία ζενίθ 48.2°. Η φασματική απόδοση της λυχνίας ήταν από 200 nm έως περίπου 2400 nm Σύμφωνα με τον κατασκευαστή, η προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία περιέχει περίπου 5% UV-A και 0.1% UV-B. Ακτινοβολίες με μήκη κύματος κάτω από 280 nm αποκόπτονται από το φίλτρο.

Χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα 200 mL λύματος, με 10<sup>7</sup> cfu/mL *K. pneumoniae*. Εισήχθηκε στο εναιώρημα 250 mg/L από τον εκάστοτε καταλύτη. Αναμείχθηκε το

δείγμα για 20 min ώστε να αναμειχθεί και να προσροφηθεί ο καταλύτης, σε συνθήκες έλλειψης φωτός (κεκαλυμμένο δοχείο).

Ενεργοποιήθηκε η λάμπα και το εναιώρημα αναδεύονταν καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η θερμοκρασία διατηρήθηκε στους  $25 \pm 2$  °C τη διάρκεια της επεξεργασίας και η εξωτερική επιφάνεια του δοχείου αντίδρασης καλύφθηκε με αλουμινόχαρτο για να ανακλάται η ακτινοβολία ώστε να μην εξέρχεται του δοχείου. Λήφθηκαν δείγματα 1,5 mL σε χρόνους: 0, 3, 6, 10, 15, 30, 45, 60 min.

#### **3.2.2.4 Πραγματοποίηση πειράματος φωτοκατάλυσης με ακτινοβολία UVC**

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας τύπου batch ο οποίος χρησιμοποιεί λάμπα που εκπέμπει στην UV-C περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και συγκεκριμένα στα 254 nm και είχε ισχύ 11 W (Philips, TUV, 11 W, PL-S).

Χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα 400 mL λύματος, με  $10^7$  cfu/mL *K. pneumoniae*. Εισήχθηκε στο εναιώρημα 250 mg/L  $\text{TiO}_2$ . Αναμείχθηκε το δείγμα για 20' ώστε να αναμειχθεί και να προσροφηθεί ο καταλύτης, σε συνθήκες έλλειψης φωτός (κεκαλυμμένο δοχείο).

Ενεργοποιήθηκε η λάμπα ακτινοβολίας UVC καθώς και το σύστημα ψύξης του δοχείου ώστε να μην υπάρξει υπερθέρμανση του εναιωρήματος, το οποίο βρίσκονταν σε συνθήκες συνεχούς ανάδευσης. Η λάμπα βυθίστηκε στο δοχείο με το εναιώρημα με παρεμβολή προστατευτικού χαλαζιακού γυαλιού. Λήφθηκαν δείγματα 1,5 mL σε χρόνους: 0, 1, 2, 4, 6, 10, 15, 30, 45, 60 min.

#### **3.2.3 Χλωρίωση**

Χρησιμοποιήθηκε πυκνό διάλυμα NaOCl το οποίο τιτλοδοτήθηκε πριν από κάθε πείραμα και στη συνέχεια αραιώθηκε ώστε να είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.

Πραγματοποιήθηκε πείραμα χλωρίωσης σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις: 5, 1, 0.3 mg/L. Χρησιμοποιήθηκε εναιώρημα 300 mL λύματος, με  $10^7$  cfu/mL *K. pneumoniae*. Το αρχικό δείγμα με συγκέντρωση  $10^8$  cfu/mL *K. pneumoniae*

με το οποίο επιμολύνθηκε το λύμα, παρασκευάστηκε με χρήση αποστειρωμένου απιονισμένου νερού. Λήφθηκαν δείγματα 1,5 mL σε χρόνους: 0, 1, 2, 4, 6, 10, 15, 30, 45, 60 min. Πριν από την καλλιέργεια και αμέσως μετά τη συλλογή του δείγματος, διάλυμα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  προστέθηκε στα δείγματα για τον τερματισμό της αντίδρασης.

### **3.2.3.1 Προετοιμασία και πειραματική διαδικασία της απολύμανσης με τη μέθοδο της χλωρίωσης**

#### **Αντιδραστήρια**

- Διάλυμα  $\text{NaOCl}$  συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς  $\text{Cl}_2$
- 5mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 1g KI
- Διάλυμα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ : 0,1N (η απαιτούμενη ποσότητα διαφοροποιείται κάθε φορά που κάνουμε τιτλοδότηση)
- Διάλυμα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ : 18mg/L
- Αποστειρωμένο νερό

#### **Προετοιμασία**

- 1) Σε κάθε πείραμα, η δόση χλωρίου στα διαλύματα επιλέχθηκε να είναι ίση με 0.05, 0.1 και 0,3 mg/L.
- 2) Από διάλυμα  $\text{NaOCl}$   $50 \times 10^3$  mg/L σε  $\text{Cl}_2$  παρασκευάστηκε διάλυμα συγκέντρωσης 1000 mg/L από το οποίο θα χρησιμοποιηθεί, κάνοντας συχνές τιτλοδοτήσεις, τέτοια ποσότητα ώστε κάθε φορά να επιτευχθεί η αντίστοιχη δόση στο δοχείο ζέσεως όπου θα γίνεται η χλωρίωση.
- 3) Ο αρχικός αριθμός αποικιών στο δείγμα, προβλέπεται να είναι ίσος με  $10^7$  CFU/mL. Έτσι, παρασκευάστηκε εναιώρημα αποτελούμενο από αποστειρωμένο νερό και αποικίες του βακτηρίου, ώστε κατά τη φωτομέτρηση να έχει απορρόφηση  $A=0,1$  η οποία αντιστοιχεί σε  $10^8$  CFU/mL. Έπειτα, με τις

κατάλληλες αραιώσεις η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε κάθε πείραμα ήταν  $10^7$  CFU/mL.

- 4) Τοποθετήθηκε ποσότητα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ίση με 50μL σε κάθε eppendorf (χωρητικότητας 1,5mL), με στόχο να σταματήσει η δράση του υπολειμματικού χλωρίου του δείγματος σε κάθε χρονική στιγμή t όπου θα ληφθεί δείγμα.

### Πειραματική διαδικασία

#### Τιτλοδότηση

Για να ελεγχθεί πόσο δραστικό παραμένει το αρχικό διάλυμα NaOCl που έχει κατασκευαστεί ( $1000 \text{ mg/L Cl}_2$ ), γίνεται τιτλοδότηση ώστε να εξακριβωθεί η μεταβολή της συγκέντρωσής του ως προς  $\text{Cl}_2$  με την πάροδο του χρόνου.

Έτσι, σε μία κωνική φιάλη τοποθετούνται:

- 10 mL από το διάλυμα NaOCl  $1000 \text{ mg/L Cl}_2$
- 5mL  $\text{CH}_3\text{COOH}$
- 1g KI

Στη συνέχεια, τιτλοδοτείται με διάλυμα  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (0,1N), μέχρι να αποχρωματιστεί το δείγμα και αριθμείται η ποσότητα του διαλύματος  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  που καταναλώθηκε.

Εφαρμόζοντας την παρακάτω σχέση, υπολογίζεται πόσα g/L  $\text{Cl}_2$  περιέχει το διάλυμα που έχει παρασκευαστεί:

$$\frac{g}{L} \text{Cl}_2 = \frac{(ml \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ που καταναλώθηκαν}) \times 0.1N \times 35.5}{10 ml} \quad [6]$$

Όπου:

10mL είναι τα mL διαλύματος που χρησιμοποιήθηκαν για την τιτλοδότηση

35.5 είναι το Ar του χλωρίου

### **3.2.3.2. Συνοπτική περιγραφή της διεργασίας της χλωρίωσης**

Χρησιμοποιήθηκε ως απολυμαντικό μέσο, διάλυμα NaOCl συγκέντρωσης 1000 mg/L ως προς Cl<sub>2</sub> και εφαρμόστηκε η διεργασία της χλωρίωσης στα βακτήρια της *K.pneumoniae*.

Για κάθε πείραμα διαφορετικής συγκέντρωσης, παρασκευάστηκε διάλυμα 300mL σε δοχείο ζέσεως, αποτελούμενο από αποστειρωμένο νερό και εναιώρημα μικροοργανισμών. Στη συνέχεια, αφού εισάχθηκε η απαραίτητη ποσότητα χλωρίου, άρχισε η πειραματική διαδικασία.

### **3.2.4 Καλλιέργεια**

Για κάθε απολυμαντική διαδικασία που ακολουθήθηκε, μετά το πέρας της έγιναν διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων και ακολούθησε καλλιέργεια σε τρυβλία με θρεπτικό υλικό. Τα τρυβλία τοποθετήθηκαν σε επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία 37 °C για 24 ώρες. Στη συνέχεια έγινε καταμέτρηση των αποικιών για κάθε χρονική στιγμή.

Τα εναπομείναντα κύτταρα μετά από κάθε πείραμα απολύμανσης φυλάχθηκαν στους -80°C για μεταγενέστερη επεξεργασία. Η φύλαξη έγινε σε υγρό θρεπτικό υλικό, στο οποίο προστέθηκε γλυκερόλη.

### **3.2.5 Δοκιμή ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά**

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών εξετάστηκε βάσει της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC). Η MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση αντιβιοτικού που θα αναστείλει την ορατή ανάπτυξη του μικροοργανισμού μετά από ολονύκτια επώαση. Θεωρείται ότι είναι το πρότυπο για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά (23). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την χαρτογράφηση της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών είναι η μέθοδος μικροαραιώσεων σε ζωμό (Broth Microdilution Method).

Πραγματοποιήθηκε σειρά πειραμάτων ανθεκτικότητας της *K. pneumoniae* στα αντιβιοτικά: τετρακυκλίνη (Tetracycline), αμπικιλλίνη (Ampicillin), κεφακλόρη (Cefaclor ) και σουλφαμεθοξαζόλη (Sulfamethoxazole).

Οι συγκεντρώσεις των αντιβιοτικών που δοκιμάστηκαν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 10: Συγκεντρώσεις αντιβιοτικών που δοκιμάστηκαν**

Αντιβιοτικά	Συγκεντρώσεις µg/µL								
Τετρακυκλίνη	256	128	64	32	16	8	4	2	
Αμπικιλλίνη	256	128	64	32	16	8	4	2	1
Κεφακλόρη	512	256	128	64	32	16	8	4	2
Σουλφαμεθοξαζόλη	128	64	32	16	8	4	2		

Αυτή η συγκεκριμένη επιλογή έγινε με βάση τα πρότυπα που προτείνει EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Standards). Το προφίλ αντίστασης της *K. pneumoniae* μελετήθηκε σε ανέπαφα κύτταρα (χωρίς επεξεργασία απολύμανσης), και σε υπολειμματικές αποικίες μετά από κάθε επεξεργασία αδρανοποίησης.

Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν πλακέτες μικροτιτλοδότησης με 96 πηγάδια. Για την εφαρμογή της μεθόδου μικροαραιώσεων σε ζυμό. Το βακτηριακό εμβόλιο σε κάθε περίπτωση παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ζυμό Mueller-Hinton και προστέθηκε σε κάθε πηγάδι. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε σε όλα τα χρησιμοποιούμενα πηγάδια της πλάκας μικροτιτλοδότησης το ίδιο θρεπτικό υλικό (100µL). Στη συνέχεια προστέθηκε η προβλεπόμενη ποσότητα αντιβιοτικού στα πηγάδια της πρώτης στήλης, επιτυγχάνοντας έτσι αραίωση 1/2. Διαμοιράζοντας 100 µL στα επόμενα πηγάδια εξέτασης, επιτυγχάνεται αραίωση 1/2 κάθε φορά που μεταφέρεται το αντιβιοτικό από τη μία στήλη στην επόμενη, ώστε να διαμορφωθούν οι συγκεντρώσεις που φαίνονται στον Πίνακα 11.

Στην τελευταία στήλη δεν προστίθεται αντιβιοτικό, καθώς επιδιώκεται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού απουσία αντιβιοτικού (control). Τέλος, προστίθενται 5 µL βακτηριακής καλλιέργειας συγκέντρωσης  $10^8$  CFU/mL σε όλα τα πηγάδια εξέτασης, εκτός της τελευταίας σειράς όπου θα έχουμε το τυφλό διάλυμα (blank). Το



τυφλό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο πιθανής επιμόλυνσης των πηγαδιών. Σε περίπτωση υψηλής οπτικής απορρόφησης του τυφλού, θεωρείται ότι έχει υπάρξει μόλυνση είτε των πηγαδιών είτε του θρεπτικού υλικού, και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Κάθε πλακέτα μικροτιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση δύο μικροοργανισμών.

Οι δίσκοι μικροτιτλοδότησης επώαστηκαν στους 37 ° C για 18-24 ώρες, ακολουθούμενη από μέτρηση οπτικής πυκνότητας στα 630 nm, χρησιμοποιώντας έναν αναγνώστη μικροπλακών (Labtech LT-4000 Plate Reader) και λογισμικό Manta LML.

### 3.2.6 Απομόνωση γενετικού υλικού

Χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα *K. pneumoniae* τα οποία λήφθηκαν μετά από κάθε διαδικασία απολύμανσης και αντιστοιχούν στο μεγαλύτερο χρόνο στον οποίο παρέμειναν ζωντανά τα βακτήρια, καθώς και σε ανέπαφους μικροοργανισμούς. Ακολουθήθηκε τυπικό πρωτόκολλο απομόνωσης γενετικού υλικού (24)

Η απομόνωση γενετικού υλικού των *Gram-* και *Gram+*, στελεχών πραγματοποιείται με τη μέθοδο φαινόλης-χλωροφορμίου σε συνδυασμό με τη χρήση ενζύμων, της πρωτεΐνάσης K και της λυσοζύμης. Αναλυτικά ακολουθούνται τα εξής στάδια:

- ❖ Καλλιέργεια του μικροοργανισμού σε *TSB* και επώαση στους 37°C για 18-20 ώρες.
- ❖ Λήψη 1.5 ml από την υγρή καλλιέργεια (στατική φάση ανάπτυξης) και τοποθέτηση σε *eppendorf*.
- ❖ Φυγοκέντρηση 10 min στα 14000 X g για καθίζηση των κυττάρων.
- ❖ Αναρρόφηση του υπερκείμενου υγρού με πιπέτα.
- ❖ Διάλυση του ιζήματος προσθέτοντας 467 µl διαλύματος *TE*.
- ❖ Προσθήκη 30 µl *SDS* συγκέντρωσης 10% w/v.
- ❖ Προσθήκη 3 µl διαλύματος ενζύμου πρωτεΐνάση-K συγκέντρωσης 20mg/ml και 100 µl διαλύματος *Lysozyme lysis buffer* . Ανάδευση με πιπέτα.
- ❖ Επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Η επώαση γίνεται σε *Block heater*.
- ❖ Προσθήκη 80 µl *CTAB* που περιέχει 0.7M χλωριούχο νάτριο.
- ❖ Επώαση στους 65°C για 10 min.

- ❖ Προσθήκη 750 µl διαλύματος Φαινόλη / Χλωροφόρμιο / Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
- ❖ Έντονη ανάδευση με τη χρήση μηχανικού αναδευτήρα (*Vortex*).
- ❖ Φυγοκέντρωση στα 14000 X g για 10 min.
- ❖ Λήψη της υδατικής φάσης και μεταφορά της σε νέο *eppendorf*.
- ❖ Προσθήκη 500 µl ισοπροπανόλης και ανάδευση με πιπέτα.
- ❖ Παραμονή στους -20°C κατά τη διάρκεια της νύχτας.
- ❖ Φυγοκέντρωση στα 14000 X g και στους 4 °C για 20 min.
- ❖ Απόρριψη του υπερκείμενου και λήψη του ιζήματος (DNA).
- ❖ Καθαρισμός του γενετικού υλικού προσθέτοντας 500 µl αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και αναδεύοντας με πιπέτα.
- ❖ Φυγοκέντρωση στα 10000 X g και στους 4 °C για 20 min.
- ❖ Απόρριψη της αιθανόλης, λήψη του ιζήματος και επανάληψη της διαδικασίας καθαρισμού του γενετικού υλικού με προσθήκη αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και εκ νέου φυγοκέντρωση στα 10000 X g και στους 4 °C για 10 min.
- ❖ Λήψη του ιζήματος κα τοποθέτηση του *eppendorf* στους 37°C (*Block heater*) προκειμένου να εξατμιστεί η αιθανόλη.
- ❖ Επαναδιάλυση του γενετικού υλικού σε 50 µl TE.
- ❖ Φύλαξη του απομονωμένου γενετικού υλικού στους -20°C.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκαν φωτομετρικά η ποσότητα & καθαρότητα του γενετικού υλικού που απομονώθηκε. Χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Varian Cary 400 και η φωτομέτρηση έγινε σε μήκη κύματος 260 και 280 nm.

### 3.2.7 PCR

Ειδικά γονίδια αντίστασης έναντι των β-λακταμών (αμπικιλίνη & κεφακλόρη), σουλφοναμιδίων (σουλφαμεθοξαζόλη) και τετρακυκλινών, επιλέχθηκαν για την ανίχνευση τους στα κύτταρα *K. pneumoniae* χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της PCR. Οι εκκινητές και τα αντίστοιχα προϊόντα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

.Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε για έλεγχο στα γονίδια ανθεκτικότητας σε:

- Τετρακυκλίνη: tetA, tetM
- Β-λακτάμες (αμπικιλίνη, κεφακλόρη) ampC, blaTEM
- Σουλφαμεθοξαζόλη: Sul1

**Πίνακας 11: Γονίδια και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν**

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία νουκλεοτιδίων (5'→3')	PCR product (bp)	Αναφορά
ampC	ampC-F	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	(25)
	ampC-R	CCYTTTTATGTACCCAYGA		
blaTEM	blaTEM-F	AAAGATGCTGAAGATCA	425	(26)
	blaTEM-R	TTTGGTATGGCTTCATTC		
sul1	sul1-R	CTTCGATGAGAGCCGGCGGC	417	(27)
	sul1-F	GCAAGGCGGAAACCCGCGCC		
tetA	tetA-F	CGATATCACTGATGGCGATG	318	(28)
	tetA-R	TGTCCGACAAGTTGCATGAT		
tetM	tetM-F	GTTAAATAGTGTTCTTGGAG	600	(29)
	tetM-R	CTAAGATATGGCTCTAACAA		

Για την ενίσχυση των ειδικών αλληλουχιών DNA χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Peqlab (advanced Primus 25). Οι αντιδράσεις PCR διεξήχθησαν σε τελικό όγκο 40  $\mu$ L που περιείχαν 0,3  $\mu$ M από κάθε εκκινητή σε κάθε περίπτωση, 1XPCR ρυθμιστικό διάλυμα, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 0.3 mM dNTPs και 2 U AmpliTaq DNA πολυμεράσης. Η μήτρα DNA που προστέθηκε στο μίγμα ήταν 100 ng.

Τα δεδομένα που χρησιμοποιούνται στην παρούσα ανάλυση δημιουργήθηκαν στις ακόλουθες συνθήκες κύκλων: στάδιο μετουσίωσης στους 94 °C για 5 λεπτά, 35 κύκλους των 94 °C για 1 min. Θερμοκρασία αναδιάταξης, 72 °C για 1 min ακολουθούμενη από μία τελική επέκταση στους 72 °C για 10 λεπτά. Η θερμοκρασία αναδιάταξης για τους εκκινητές ampC και blaTEM ήταν 49 και 42 °C, αντίστοιχα, ενώ για τους sul1, tetA και tetM η αναδιάταξη πραγματοποιήθηκε στους 55 °C (Παράρτημα 1).

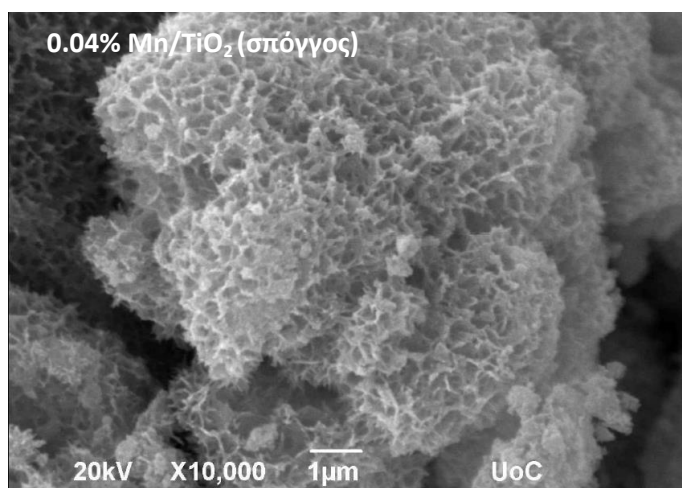
### **3.2.7.1 Γονίδια ανθεκτικότητας**

Τα προϊόντα της PCR αναλύθηκαν ηλεκτροφορητικά σε 1.5 (w / v) γέλη αγαρόζης, που περιείχε 1 mg/mL βρωμιούχο αιθίδιο, με ένα δείκτη μοριακού μεγέθους 100 bp. Ως αναφορά σε όλες τις ηλεκτροφορήσεις χρησιμοποιήθηκε ένας ladder 100 bp. Μετά από περίπου 1 h ηλεκτροφόρησης τα αποτελέσματα οπτικοποιήθηκαν και φωτογραφήθηκαν κατόπιν έκθεσης σε UV ακτινοβολία (λογισμικό UVbandmap - UVITEC Cambridge).

## 4. Αποτελέσματα – Συζήτηση

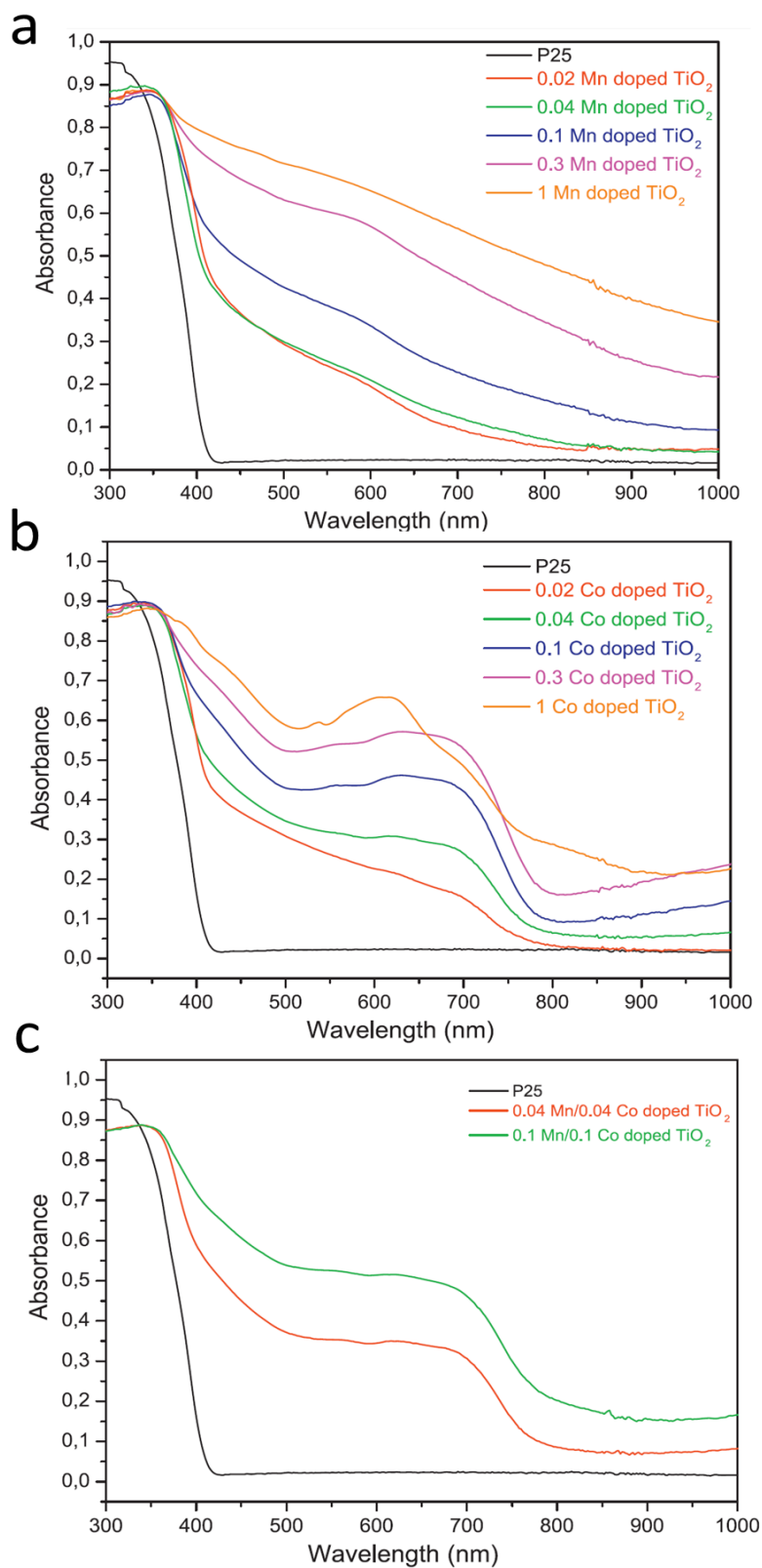
### 4.1 Καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με χρήση διαφόρων καταλυτών, και σειρά διαφορετικών απολυμαντικών διαδικασιών προς απολύμανση της *K.pneumoniae* μέσα σε πραγματικό λύμα, χρησιμοποιώντας φωτοκαταλυτικές τεχνικές, υπό φυσικό και τεχνητό ηλιακό φως. Σκοπός ήταν να γίνει συγκριτική αξιολόγηση των καταλυτών και των απολυμαντικών διαδικασιών σε συσχετισμό μεταξύ τους. Οι καταλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι το P25 το οποίο είναι  $\text{TiO}_2$  σε μορφή ανατάση και καταλύτες οι οποίοι περιέχουν  $\text{TiO}_2$ , ενισχυμένοι με τα μέταλλα Mn ή Co (Εικόνα 4), καθώς και σε συνδυασμό μεταξύ τους (Πίνακας 12).



**Εικόνα 4: Φωτογραφία ηλεκτρονικού μικροσκοπίου - SEM, καταλύτη  $\text{TiO}_2$  ενισχυμένου με Mn.**

Το  $\text{TiO}_2$  σε μορφή ανατάση, έχει ένα ενεργειακό χάσμα 3,2 eV και μπορεί να ενεργοποιηθεί με UV ακτινοβολία με μήκος κύματος έως και 387 nm περιορίζοντας έτσι την εφαρμογή του ως φωτοκαταλύτη υπό ορατό φως. Ωστόσο, με πρόσμιξη ιόντων μετάλλων στο  $\text{TiO}_2$ , έχει αναφερθεί ότι προκαλείται μείωση του ανασυνδυασμού φορέα φόρτισης και διευκολύνεται η εμφάνιση μετατόπισης στην απορρόφηση του ενεργειακού χάσματος στην ορατή περιοχή, ενισχύοντας έτσι φωτοκαταλυτική δράση του καταλύτη (Εικόνα 5) (30).

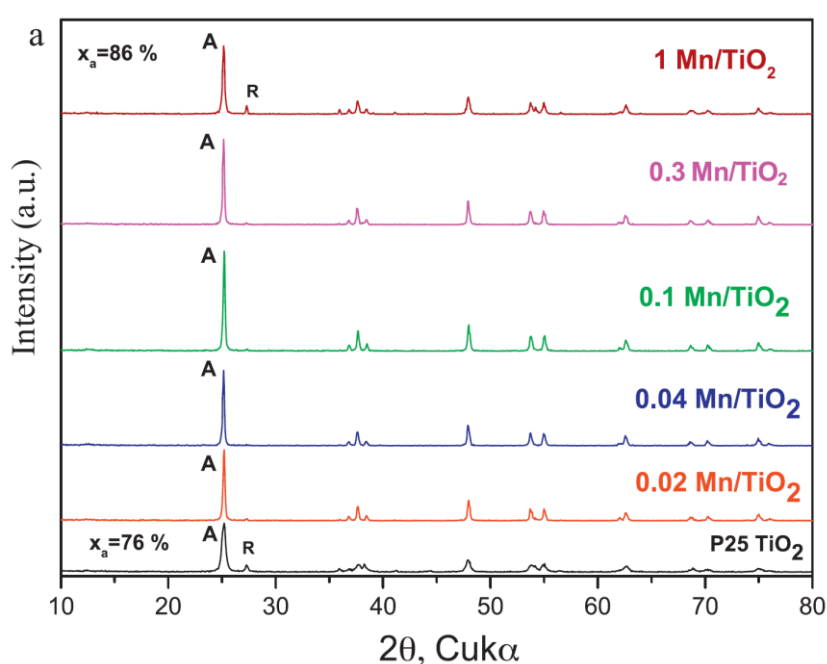


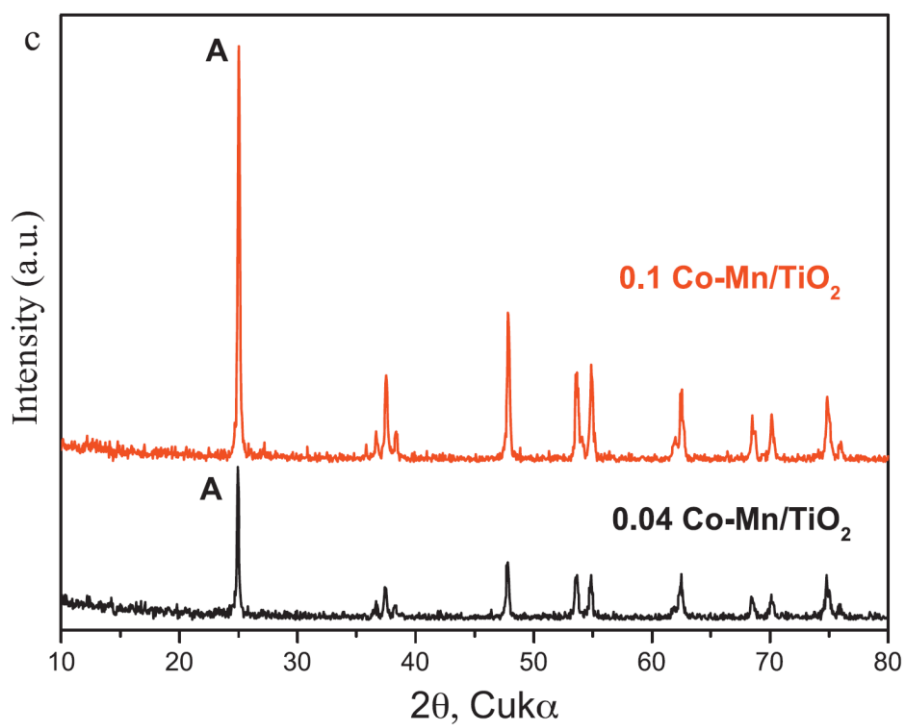
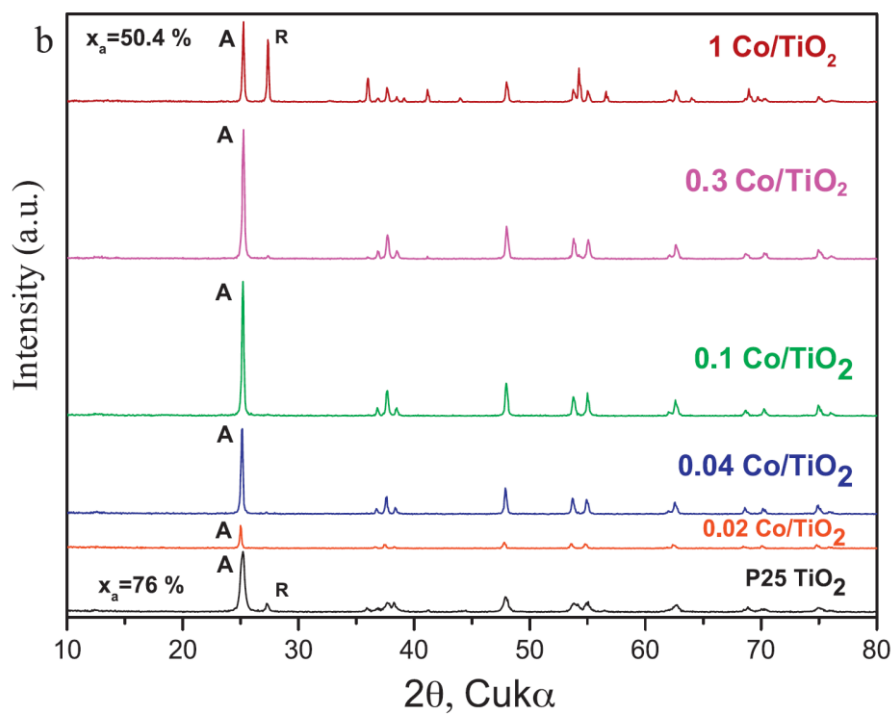
**Εικόνα 5:** UV–VIS απορρόφηση του P25 και του Mn:TiO<sub>2</sub>(0.02–1 wt%) (a), του Co:TiO<sub>2</sub>(0.02–1 wt%) (b) και του Mn/Co:TiO<sub>2</sub> (εύρος συγκέντρωσης των δυο ενισχυτών: 0.04–1 wt%)(c)

**Πίνακας 12: Μέσο μέγεθος σωματιδίων, σύνθεση φάσης και ενεργειακό χάσμα των καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν.**

Καταλύτης	Μέγεθος σωματιδίων, (nm) anatase / rutile	Σύνθεση φάσης, $f_A$ % anatase	Ενεργειακό χάσμα (eV)
0.1% Mn/TiO <sub>2</sub>	38.7 / 0	100	2.75
0.04% Mn/TiO <sub>2</sub> (σπόγγος)	39.4 / 0	100	2.85
0.1% Co/TiO <sub>2</sub>	40.1 / 0	100	2.83
0.04% Mn-Co/TiO <sub>2</sub>	40.1 / 0	100	3

Στη Εικόνα 6 φαίνεται το διάγραμμα που προέκυψε από την εξέταση των καταλυτών με τη μέθοδο περίθλασης ακτινών Χ (XRD) για τις διάφορες συγκεντρώσεις των μετάλλων Mn, Co και το δυαδικό Mn-Co, σε καταλύτες με βάση το TiO<sub>2</sub>. Η κορυφή που παρουσιάζεται στη γωνία 25,3° αντιστοιχεί στο κρυσταλλικό επίπεδο (1 0 1) του ανατάση. Όταν η συγκέντρωση του μετάλλου ενίσχυσης βρισκόταν στο εύρος των 0.02–0.3 wt% τα δείγματα ήταν μονοφασικά οπότε ανιχνεύονταν μόνο η φάση του ανατάση. Οι καταλύτες με 1 wt% Mn- και Co-, παρουσίασαν μία μίξη φάσεων ανατάση και ρουτιλίου (31).





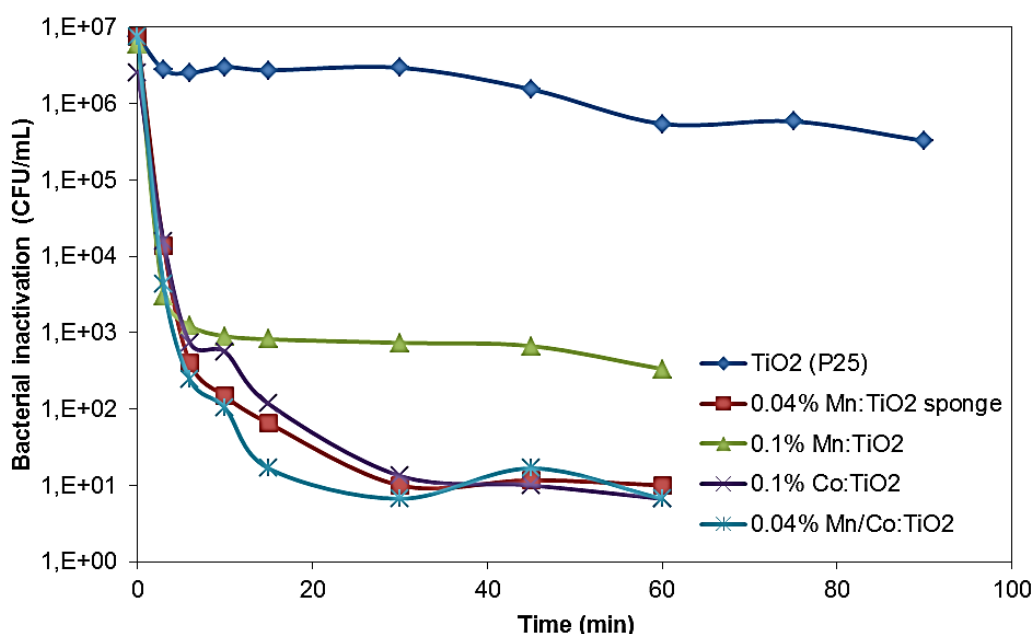
Εικόνα 6: Εικόνες XRD από καταλύτες : (a) Mn- TiO<sub>2</sub>(0.02–1 wt%), (b) Co- TiO<sub>2</sub>(0.02–1 wt%) και (c) Mn με Co δυαδικός TiO<sub>2</sub> (εύρος συγκέντρωσης:0.04–0.1 wt%) (31)



#### 4.2 Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* με προσομοιωμένο ηλιακό φως

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης τονίζουν την υπεροχή των μεταλλικών καταλυτών με προσμίξεις σε σύγκριση με το  $\text{TiO}_2$ , από την άποψη της βακτηριακής απομάκρυνσης σε υδατικά δείγματα υπό προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία. Από την άποψη αυτή, έγινε μια προσπάθεια να εντοπιστούν οι πιθανοί λόγοι για την βελτιωμένη δραστικότητα των ενισχυμένων καταλυτών.

Οι ενισχυμένοι με μέταλλα καταλύτες παρουσίασαν ικανοποιητική αδρανοποίηση, όπως μπορεί να παρατηρηθεί στην Εικόνα 7. Οι προσμίξεις βελτίωσαν την φωτοκαταλυτική δράση του καθαρού τιτανίου (P25), που πέτυχε μείωση 1-Log μετά από 90 λεπτά διαδικασίας. Φαίνεται καθαρά ότι ο καταλύτης που περιείχε το συνδυασμό μετάλλων (0,04% κ.β. Mn / Co:  $\text{TiO}_2$ ) κατέδειξε υψηλά ποσοστά απενεργοποίησης, καθώς υπήρξε μια συνολική μείωση 7-Log μικροβιακού πληθυσμού μέσα σε 60 λεπτά ακτινοβολίας.



Εικόνα 7: Αδρανοποίηση της *K.pneumoniae* υπό την επίδραση τεχνητής ηλιακής ακτινοβολίας με τον καταλύτη P25 και με καταλύτες  $\text{TiO}_2$  ενισχυμένους με Mn (σπόγγος), με Mn, με Co και με Mn και Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου:  $10^7$  cfu/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

Το εύρημα σχετικά με τον συνδυαστικό καταλύτη  $\text{TiO}_2$  με πρόσμιξη Mn / Co επαληθεύει την γενική άποψη ότι τα σύνθετα ενισχυτικά προκαλούν ένα συνεργιστικό αποτέλεσμα ξεπερνώντας τα μειονεκτήματα των επιμέρους συστατικών (32). Η ενισχυμένη αποτελεσματικότητα των εμπλουτισμένων καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα αυτά τα πειράματα ερμηνεύεται από πιθανή δράση των ενισχυτών πάνω στην επιφάνεια του  $\text{TiO}_2$  ως παγίδα ηλεκτρονίων, προωθώντας έτσι τη μεταφορά φορτίων στη διεπιφάνεια και καθυστερώντας την επανασύνδεση του ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής (33).

Ένα σημείο διερεύνησης θα πρέπει να είναι η βιοκτόνος φύση των μετάλλων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των καταλυτών. Σε μερικές περιπτώσεις, οι καταλύτες μετάλλου με προσμίξεις επάγουν την κυτταρική καταστροφή των βακτηρίων, λόγω της τοξικότητας των μεταλλικών ιόντων που απελευθερώνεται στο διάλυμα της αντίδρασης (34). Στην παρούσα εργασία, τα μέταλλα ενίσχυσης των καταλυτών που χρησιμοποιήθηκαν δεν παρουσιάζουν τοξική δράση έναντι στα κύτταρα της *K. pneumoniae*, και η δράση τους οφείλεται αποκλειστικά στην από κοινού επίδραση καταλύτη και ακτινοβολίας (33).

Η ανωτερότητα των συνδυαστικών καταλυτών έχει ήδη εξεταστεί σε άλλες περιπτώσεις με *E. coli* με μέση μείωση 4-Log της πυκνότητάς του μετά από 90 λεπτά έκθεσης στο ορατό φως (35). Η αναλογία της συγκέντρωσης μεταλλικών προσμίξεων (0.04% κ.β. Mn / Co) αποδείχθηκε ότι είναι η βέλτιστη για την ταχεία θανάτωση της *K.pneumoniae* σε δείγματα υγρών αποβλήτων, αν και δεν θα πρέπει να αγνοηθεί το γεγονός ότι οι προσμίξεις έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν φωτο-επαγόμενη διάβρωση και προάγουν το δυναμικό ανασυνδυασμού σε ορισμένες θέσεις μετάλλου (36).

Όσον αφορά τους δύο καταλύτες που περιείχαν Mn, αυτοί παρουσίασαν διαφορετική συμπεριφορά, η οποία θα μπορούσε να αποδοθεί στα δομικά χαρακτηριστικά τους. Υψηλότερες επιδόσεις καταγράφηκαν με το σύνθετο σπόγγο τιτανίου (0,04% κ.β. Mn:  $\text{TiO}_2$  - σπόγγος) που συντέθηκε με επεξεργασία αλκαλικού διαλύματος.

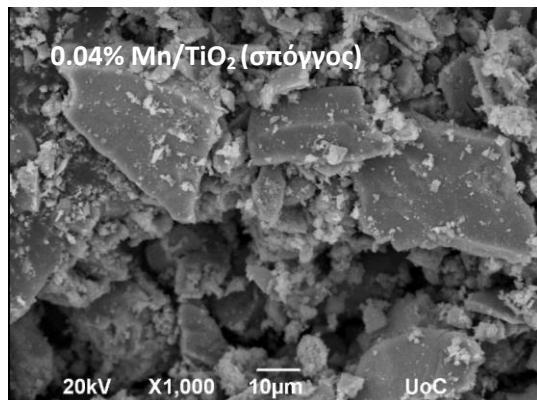
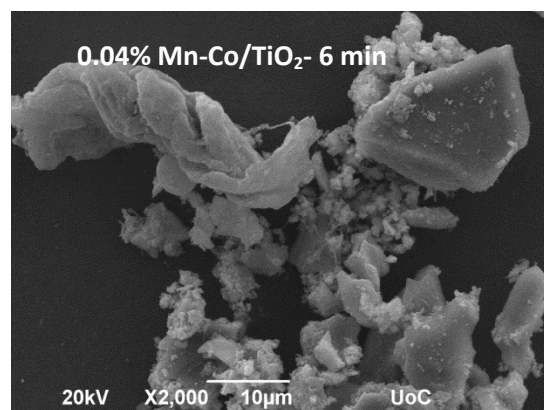
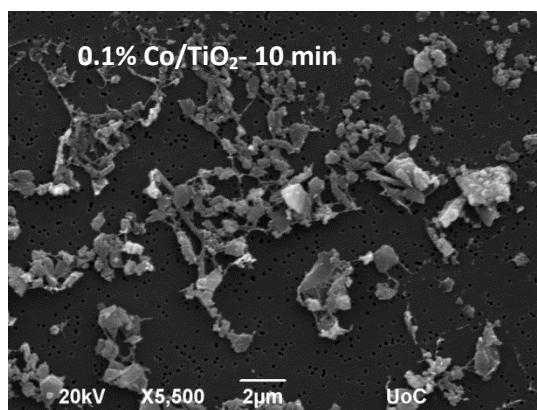
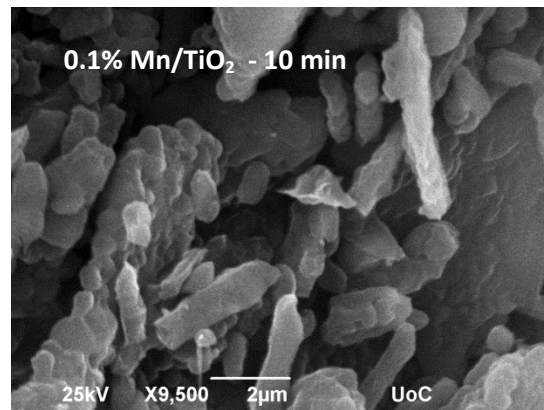
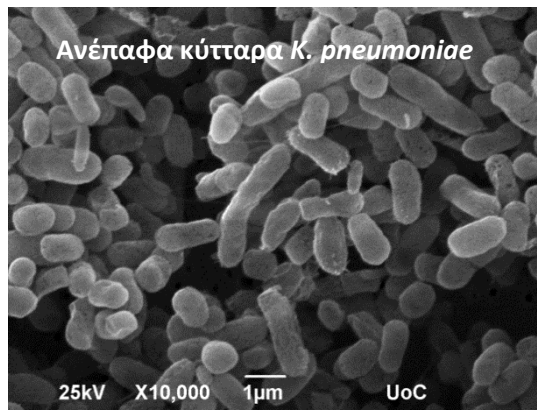
Οι καταλύτες οι οποίοι περιείχαν προσμίξεις 0,1% κ.β. Mn- και 0,1% κ.β. Co πέτυχαν μια μείωση σχεδόν 4 και 6-Log του βακτηριακού πληθυσμού, αντίστοιχα μετά από 90 λεπτά έκθεσης σε προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία. Ο δυαδικός

καταλύτης έδειξε ίση απόδοση με τον Co-TiO<sub>2</sub>, παρά το ότι η συνολική συγκέντρωση του ήταν σημαντικά χαμηλότερη (0,04% κ.β.).

Από την άλλη πλευρά, το προσομοιωμένο ηλιακό φως αποδείχθηκε ανεπαρκές για τη διέγερση του P25 και για τη σωστή απολύμανση, με την έννοια της μείωσης 99,9% του βακτηριακού πληθυσμού κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, ενώ οι καταλύτες με πρόσμιξη μετάλλων έφτασαν σε αυτήν την τιμή εντός 15 λεπτών από την επεξεργασία.

Για να διερευνηθεί περαιτέρω η καταστροφή της κυτταρικής δομής των στελεχών αναφοράς που προκαλείται από φωτοκατάλυση, χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM) και επιλεγμένες εικόνες φαίνονται στην Εικόνα 8. Κατά τη διάρκεια της φωτοκατάλυσης, το πρώτο οξειδωτικό στρες προκαλείται στα βακτήρια όταν τα νανοσωματίδια του καταλύτη αλληλεπιδρούν με τα ακέραια κύτταρα. Η βλαπτική επίδραση επεκτείνεται προς την κυτταροπλασματική μεμβράνη, αυξάνοντας τη διαπερατότητα των κυττάρων και επιτρέπει την έξοδο των ενδοκυττάριων συστατικών, γεγονός το οποίο προκαλεί τελικά κυτταρικό θάνατο (37) (38). Η προοδευτική μαζική παραγωγή ριζών υδροξυλίου κατά την διάρκεια της διαδικασίας υπερνικά κάθε μηχανισμό προστασίας των βακτηριακών κυττάρων, των οποίων η πυκνότητα στο μίγμα αντίδρασης μειώνεται με την αύξηση του χρόνου.

Επιπλέον, μπορεί να παρατηρηθεί ότι η βακτηριακή απενεργοποίηση έφτασε σε ένα πλατό και στη συνέχεια έγινε αργή, οδηγώντας στην ύπαρξη εναπομεινάντων κυττάρων, στο τέλος της διαδικασίας. Παρόμοια ευρήματα ελήφθησαν σε άλλη μελέτη που αναφέρεται στην αδρανοποίηση της *K.pneumoniae* με τη χρήση αντιδραστικής νανοκρυσταλλικής σκόνης TiO<sub>2</sub> επεξεργασμένης με πλάσμα (39). Οι Vijay κ.α. (39) παρατήρησαν επιβράδυνση της αποσύνθεσης αυτού του βακτηριακού στελέχους κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας, αποδίδοντας αυτό το αποτέλεσμα στην απελευθέρωση μεταβολιτών από τα θανατωμένα βακτήρια, οι οποίοι σχηματίζουν ένα παραπέτασμα προστατεύοντας τα υπόλοιπα δραστικά κύτταρα. Το ίδιο συμπέρασμα αυτό εξήχθη στο έργο του Yousef κ.ά., οι οποίοι διερεύνησαν την επίδραση των νανοϊνών CuO / TiO<sub>2</sub> στην εξάλειψη της *K.pneumoniae* υπό ορατό φως (40).



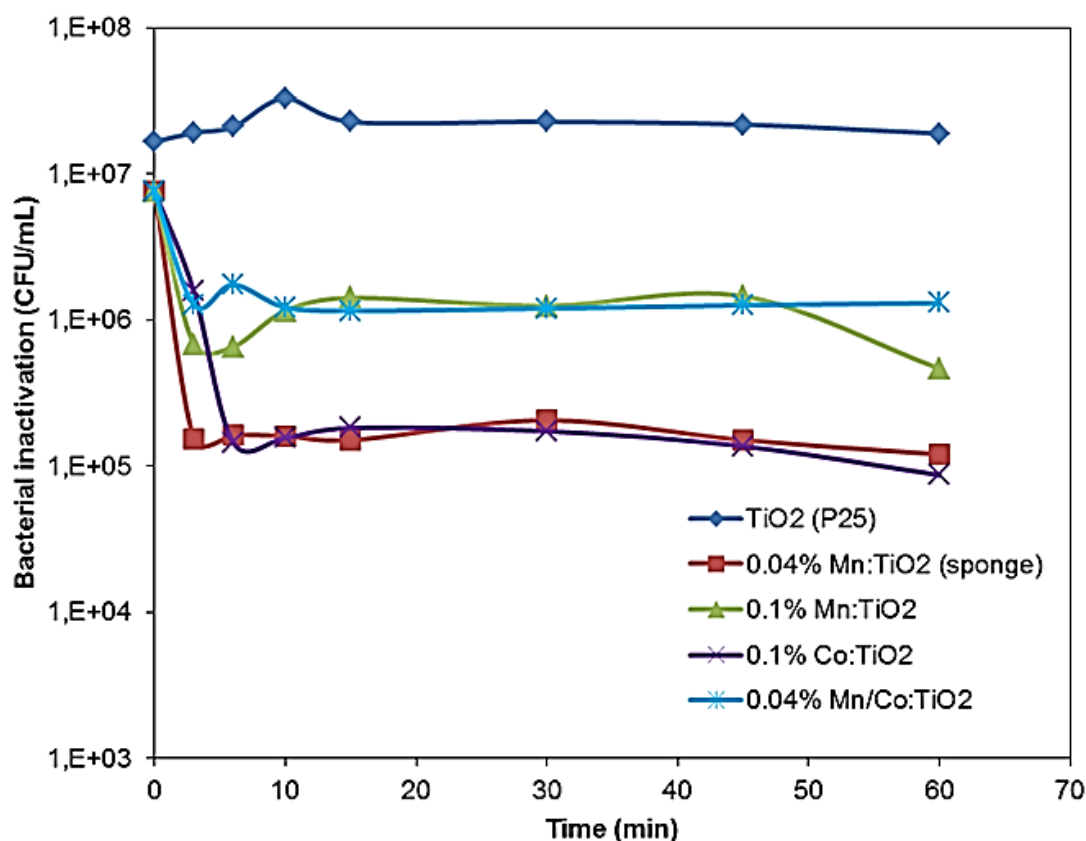
**Εικόνα 8:** Κύτταρα *K. pneumoniae* πριν και μετά από φωτοκαταλυτική επεξεργασία με χρήση καταλύτη TiO<sub>2</sub> ενισχυμένου με Mn, Co, και δυαδικό Mn-Co.

Παρά το γεγονός ότι αυτός ο συγκεκριμένος παθογόνος μικροοργανισμός θεωρείται επίμονος κατά τη διάρκεια διαφόρων επεξεργασιών και τεχνικών απολύμανσης, η φωτοκατάλυση με ντοπαρισμένους με μέταλλα καταλύτες φαίνεται αρκετά υποσχόμενη, δεδομένου ότι μπορεί να προκαλέσει την πλήρη αδρανοποίηση σε σύντομες περιόδους με υψηλή αρχική πυκνότητα κυττάρων,  $10^7$  CFU / mL, σε συμπλέγματα όπως είναι τα λύματα.

#### 4.3 Φυσικό φως του ήλιου και αδρανοποίηση της *K. pneumoniae*

Επιπλέον πειράματα απολύμανσης διεξήχθησαν στο φυσικό ηλιακό φως, προκειμένου να συγκριθούν τα αποτελέσματα της αδρανοποίησης με εκείνα που ελήφθησαν με προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία. Υπό συνθήκες πλήρους ανεμπόδιστης ηλιακής ακτινοβολίας, δείγματα λυμάτων μολύνθηκαν με *K. pneumoniae*, εκτέθηκαν σε εξωτερικούς χώρους στο φως του ήλιου για 1 ώρα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην Εικόνα 9. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων με φυσικό ηλιακό φως, το εύρος της ηλιακής ακτινοβολίας και θερμοκρασίας ήταν 12,7 - 13,4 W / m<sup>2</sup> και 29 έως 32,7 °C , αντίστοιχα, με μέσες τιμές των 13,1 W / m<sup>2</sup> και 30,1 °C. Επίσης, καμία απενεργοποίηση δεν καταγράφηκε α) σε σκοτεινές συνθήκες, με ή χωρίς τους εν λόγω καταλύτες και β) κάτω από φυσικό φως του ήλιου χωρίς τη χρήση οποιουδήποτε καταλύτη.

Συγκρίνοντας τους ρυθμούς απενεργοποίησης μεταξύ του φυσικού (Εικόνα 9) και του τεχνητού (Εικόνα 7) ηλιακού φωτός παρατηρείται ότι υπάρχει μία συνολική επιβράδυνση της διαδικασίας. Υπό τις συνθήκες της παρούσας μελέτης, η βακτηριακή αποσύνθεση καθυστέρησε όταν η απολύμανση έγινε σε εξωτερικούς χώρους, με αποτέλεσμα σε μείωση της τάξεως των 1-2 Log μετά από 60 λεπτά έκθεσης. Παρόμοιοι περίοδοι επιβράδυνσης παρουσιάστηκαν από τον Suri κ.ά. (41), ο οποίος μελέτησε τα ποσοστά αδρανοποίησης της *E. coli* σε νερό με καταλύτες τιτανίου με Pt και Ag. Παρά το γεγονός ότι το φως του ήλιου ήταν αποτελεσματικό για την ενεργοποίηση της φωτοκατάλυσης και την εξάλειψη του βακτηρίου, τα ποσοστά μείωσης ήταν βραδύτερα σε σύγκριση με εκείνα που λαμβάνονται με τεχνητό φως.



Εικόνα 9: Αδρανοποίηση της *K.pneumoniae* υπό την επίδραση φυσικής ηλιακής ακτινοβολίας με τον καταλύτη P25 και με καταλύτες TiO<sub>2</sub> ενισχυμένους με Mn (σπόγγος), με Mn, με Co και με Mn και Co. Αρχική συγκέντρωση μικροβίου: 10<sup>7</sup> CFU/mL, Συγκέντρωση καταλύτη: 250mg/L.

Συνολικά, η φωτοκατάλυση με ενισχυμένο οξείδιο του τιτανίου παρουσιάζεται ως μια κατάλληλη μέθοδος με υψηλά υποσχόμενα ποσοστά αδρανοποίησης της *K. pneumoniae* σε λύματα, παρά την ανθεκτική φύση αυτού του είδους σε περιβαλλοντικά δείγματα (42) (43). Προσμίξεις που ενσωματώνονται σε νανοσωματίδια οξειδίου του τιτανίου έχουν ήδη δείξει αξιοσημείωτο δυναμικό απολύμανσης, εξαλείφοντας διάφορους παθογόνους μικροοργανισμούς, κυρίως σε δείγματα νερού υπό ορατό φως (44) (45) (46). Αυτό που είναι σημαντικό στην περίπτωση μας είναι η συγκεκριμένη μήτρα, η οποία αποτελούνταν από πραγματικά λύματα και το είδος του οργανισμού, γνωστό για την αναδυόμενη τοξικότητα και παθογένεια του.

Το πλατό, το οποίο δημιουργήθηκε μετά τα πρώτα 10 λεπτά της επεξεργασίας τόσο με την προσομοιωμένη, όσο και με τη φυσική ηλιακή ακτινοβολία, αναδεικνύει ακόμη περισσότερο την ανθεκτικότητας του είδους αυτού. Παρόμοια επιβράδυνση της αποσύνθεσης της *K. pneumoniae* κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας έχει παρουσιαστεί και σε άλλες μελέτες. Η κύρια αιτία είναι η απελευθέρωση των μεταβολιτών και των υπολειμμάτων από τα λυμένα κύτταρα, τα οποία χρησιμεύουν τελικά ως πρόσθετο φίλτρο προστασίας υπέρ των ζώντων κυττάρων (39).

Ωστόσο, η κύρια ανησυχία παραμένει σχετικά με τη συμπεριφορά των υπολειμματικών κυττάρων. Οι προκαλούμενες μεταβολές στην κυτταρική δομή και το γενετικό υλικό μπορεί να οδηγήσει σε ακόμα πιο ανθεκτικούς και ως εκ τούτου παθογόνους πληθυσμούς, ως επακόλουθο της διαδικασίας απολύμανσης.

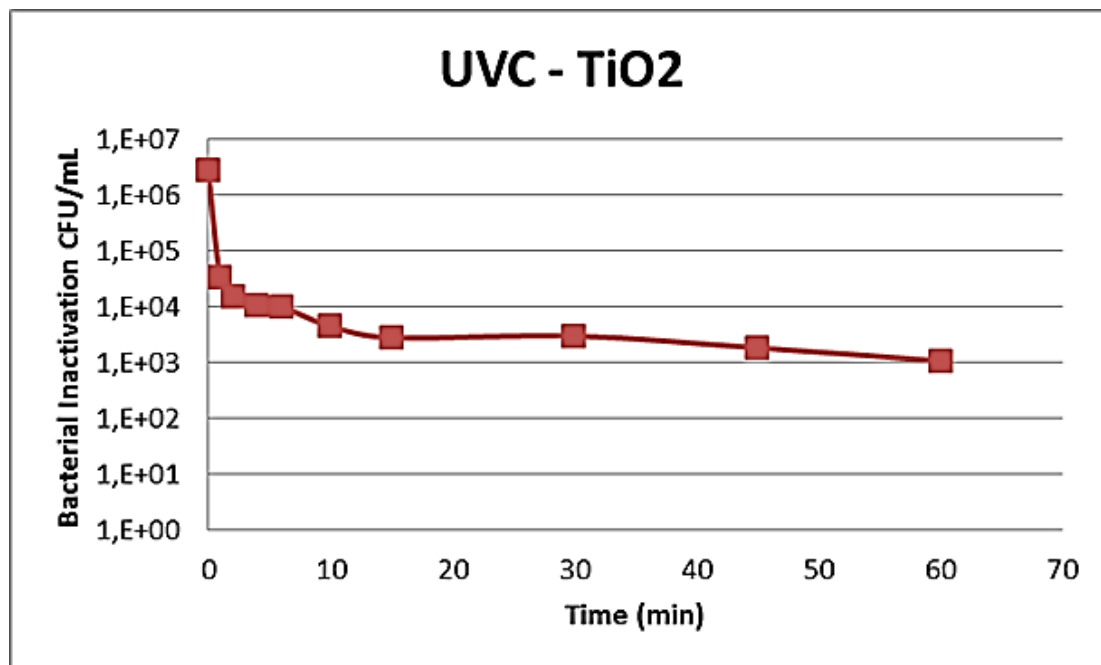
#### **4.4 Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* με ακτινοβολία UVC**

Επιπλέον πειράματα διεξήχθησαν με χρήση ακτινοβολίας UVC (Εικόνα 10) προκειμένου να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων, σε σχέση με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα με φυσικό και τεχνητό ηλιακό φως. Ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε μόνο το  $\text{TiO}_2$  και το πείραμα είχε διάρκεια 60 λεπτών. Η μείωση του μικροοργανισμού ήταν της τάξεως των 4-Log και η πιο ραγδαία μείωση προκλήθηκε κατά τη διάρκεια των πρώτων λεπτών της επεξεργασίας.

Οι βακτηριοκτόνες ιδιότητες της UVC αναφέρονται κυρίως σε βλάβες στο μικροβιακό DNA ή το RNA, που προκαλούνται από το διμερισμό της θυμίνης, η οποία εμποδίζει την αντιγραφή του νουκλεϊκού οξέος και αδρανοποιεί τελικά το κύτταρο (42).

Εκτός από τη σχέση της έντασης του φωτός, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να διαφοροποιήσουν την πορεία της διαδικασίας. Η φωτοκαταλυτική δράση μπορεί να επηρεαστεί από άλλες επιδράσεις, με αποτέλεσμα τη μείωση ή την μεταβολή των παρατηρούμενων τιμών μικροβιακής αδρανοποίησης. Στην περίπτωση μας, η πειραματική μήτρα ήταν λύμα, του οποίου οι συγκεντρώσεις των χημικών παραμέτρων δεν διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων που εξετάστηκαν σε κάθε περίπτωση. Η αποτελεσματικότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας εμφανίζεται μειωμένη στα λύματα, επειδή τα συστατικά τους, όπως

χουμικές ουσίες ή φαινολικές ενώσεις, μπορεί να δρουν ως αναστολείς της μετάδοσης του φωτός.



**Εικόνα 10: Αδρανοποίηση της *K.pneumoniae* με ακτινοβολία UVC και χρήση καταλύτη  $\text{TiO}_2$**

Η πολύπλοκη σύνθεση των δειγμάτων υγρών αποβλήτων σε σχέση με τα αιωρούμενα σωματίδια και διάφορες οργανικές και ανόργανες ουσίες μπορεί να αντισταθμίζουν την δράση των φωτοκαταλυτών που χρησιμοποιούνται σε όλη τη διαδικασία. Θεωρείται, για παράδειγμα, ότι τα φωσφορικά ιόντα μπορεί να μπλοκάρουν την πρόσδεση των βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών στα νανοσωματίδια  $\text{TiO}_2$  (47). Κάποια συστατικά των λυμάτων συνήθως βοηθούν στην αντίσταση των μικροοργανισμών κατά την διάρκεια της απολύμανσης, καθώς δρουν ως ασπίδες προστασίας που παρεμβαίνουν στη διείσδυση του φωτός. Αυτό μπορεί να εξηγήσει υψηλότερες ποσότητες καταλύτη που συχνά απαιτούνται για ικανοποιητική αδρανοποίηση και επιτάχυνση των ρυθμών αδρανοποίησης του μικροβιακού πληθυσμού. Για παράδειγμα, οι Rizzo et al. (48), που εργάστηκαν με *E. coli* σε λύματα και  $\text{TiO}_2$  με πρόσμιξη N, χρειάστηκε υψηλότερες συγκεντρώσεις καταλύτη σε σύγκριση με τη μελέτη μας (δηλαδή 250 mg / L), φθάνοντας τιμές έως και 500 mg / L για μια μείωση κατά 80% του βακτηριακού πληθυσμού.



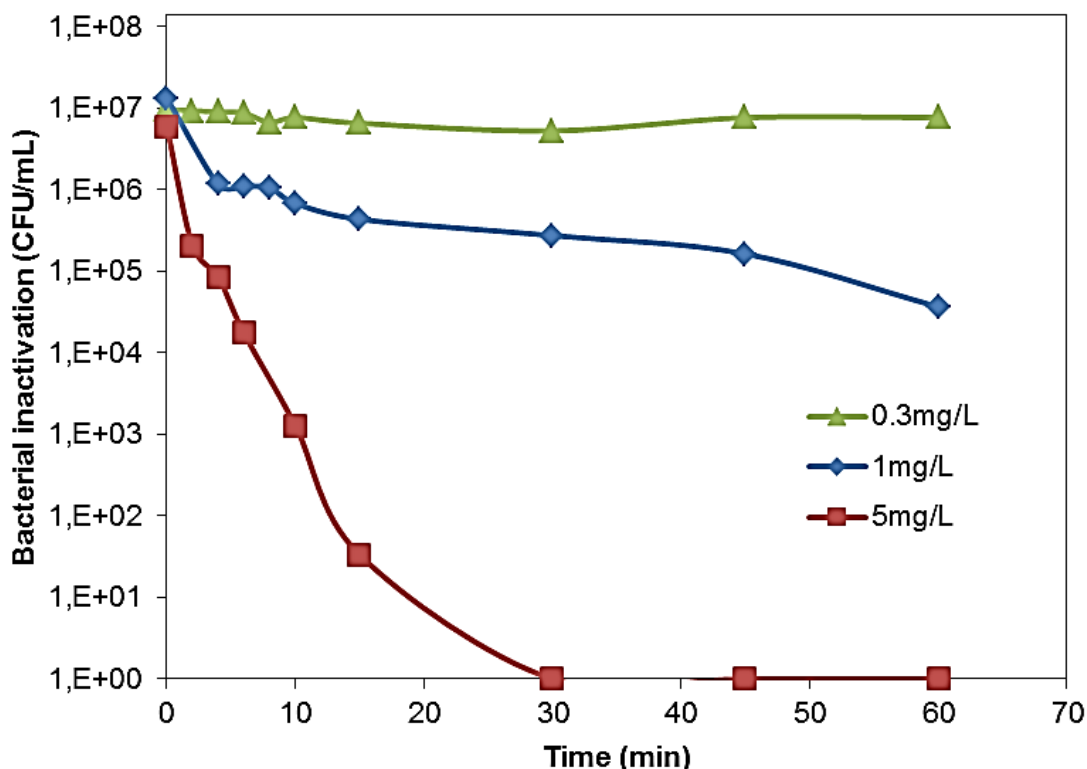
Ωστόσο, το αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης αναδεικνύει την αποτελεσματικότητα της ηλιακής φωτοκατάλυσης για την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών όπως η *K. pneumoniae* σε μήτρα λυμάτων σε τεχνητές και φυσικές συνθήκες. Πρόσθετο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι το γεγονός ότι μπορεί να συμβάλει στη μείωση των προδρόμων ουσιών που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό των υποπροϊόντων απολύμανσης (DBPs), τα οποία συχνά παράγονται, ιδιαίτερα αν η απολύμανση των λυμάτων περιλαμβάνει χλωρίωση (41).

Συνήθως, η ικανότητα απολύμανσης των κοινών τεχνικών είναι αντιστρόφως ανάλογη προς την αρχική βακτηριακή συγκέντρωση. Ωστόσο, ο απαιτούμενος χρόνος για την πλήρη αδρανοποίηση εξαρτάται από τα δοκιμαζόμενα βακτηριακά είδη σε κάθε περίπτωση. Η ύπαρξη υπολειμματικών κυττάρων των στελεχών αναφοράς μετά από περιόδους μακράς επεξεργασίας ( > 30 λεπτά) όταν χρησιμοποιηθούν υψηλές αρχικές πυκνότητες, μπορεί να εξηγηθεί από την επιβίωση ενός ανθεκτικού υποπληθυσμού ως αποτέλεσμα της προστασίας από την συσσώρευση μικροοργανισμών ή ακόμη και από γενετικά υφιστάμενη αντίσταση.

#### **4.5 Αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* με χλωρίωση**

Στην παρούσα μελέτη, η χλωρίωση (Εικόνα 11) με τη χρήση του NaOCl σε συγκεντρώσεις 0,3, 1 και 5 mg / L παρουσίασαν υψηλά ποσοστά αδρανοποίησης της *K pneumoniae* σε δείγματα λυμάτων. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης 0,3 mg/L δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη μείωση, και στη συγκέντρωση 1 mg/L η μείωση ήταν της τάξεως των 1-Log. Υψηλά ποσοστά απενεργοποίησης, καθώς επίσης δραστική και πλήρη βακτηριακή θανάτωση επιτεύχθηκε με τη συγκέντρωση χλωρίου 5 mg/L όπου η μείωση έφτασε την τιμή των 7-Log. Ωστόσο, η πολύπλοκη σύνθεση των δειγμάτων λυμάτων εγείρει ορισμένες ανησυχίες σχετικά με χλωρίωση και τη συνολική επίδρασή της όσον αφορά την προστασία της δημόσιας υγείας.

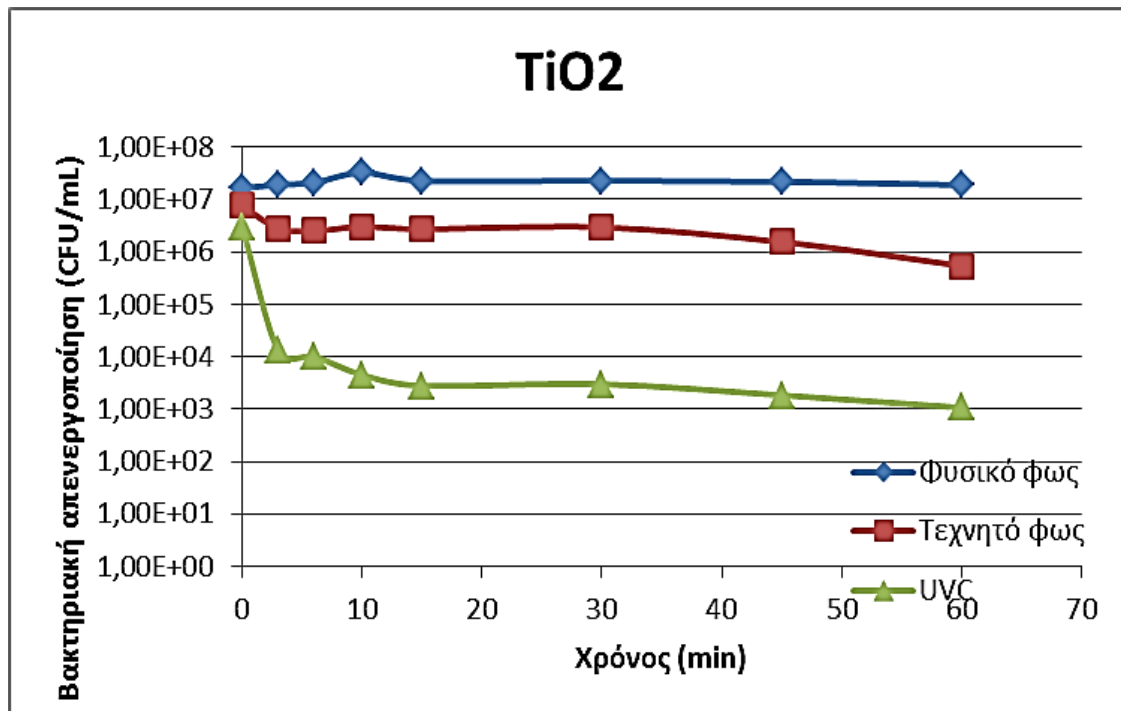
Τα ευεργετικά αποτελέσματα της χλωρίωσης προέρχονται από τις κρίσιμες αλλαγές που προκαλεί στη δομή των κυττάρων και τη λειτουργικότητά τους. Οι μεταβολές στη διαπερατότητα του κυττάρου, η παρεμπόδιση των λειτουργιών της μεμβράνης και των ενζύμων και η μετουσίωση των νουκλεϊκών οξέων είναι κάποια από τα σημαντικότερα αποτελέσματα της χλωρίωσης, που αδρανοποιούν εν τέλει τα βακτήρια (49).



Εικόνα 11: Αδρανοποίηση της *K.pneumoniae* με χλωρίωση, με τη χρήση του NaOCl σε συγκεντρώσεις 0,3, 1 και 5 mg / L

#### 4.6 Σύγκριση μεθόδων

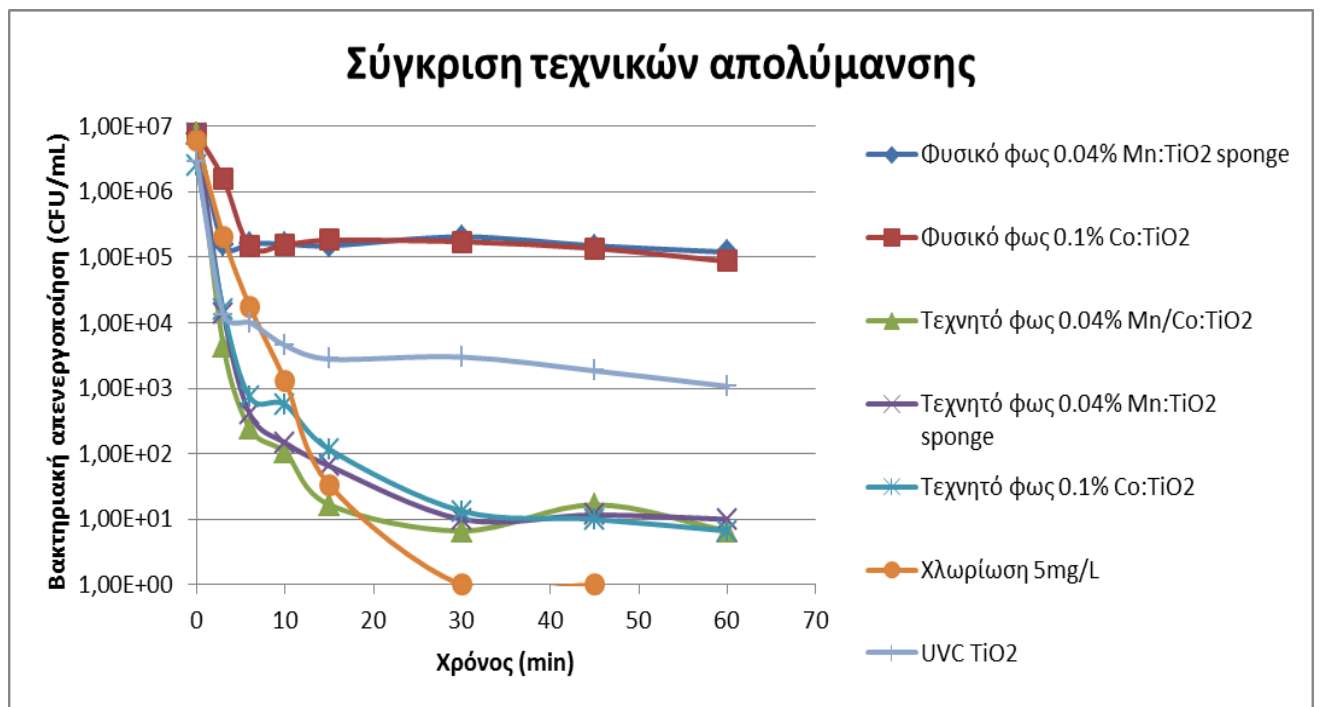
Συγκρίνοντας την αποτελεσματικότητα που είχαν οι τρεις διαφορετικές φωτοκαταλυτικές μέθοδοι που μελετήθηκαν, χρησιμοποιώντας τον ίδιο καταλύτη  $\text{TiO}_2$  (Εικόνα 12) χωρίς ενίσχυση με μέταλλα, παρατηρούμε ότι η μικρότερη βακτηριακή απενεργοποίηση σημειώθηκε κατά την έκθεση του δείγματος σε φυσικό ηλιακό φως, όπου η μείωση ήταν μηδαμινή. Κατά την έκθεση σε τεχνητό ηλιακό φως η μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων, ήταν της τάξης του 1,5 Log στο τέλος της διαδικασίας των 60 λεπτών, ενώ με τη χρήση της ακτινοβολίας UVC η μείωση έφτασε τα τέσσερα Log, στα 60 λεπτά.



**Εικόνα 12: Σύγκριση αποτελεσμάτων φωτοκαταλυτικών μεθόδων, με χρήση  $\text{TiO}_2$**

Στο παρακάτω γράφημα (Εικόνα 13) γίνεται η σύγκριση των τεχνικών απολύμανσης που εφαρμόστηκαν. Σε κάθε τεχνική παρατίθενται τα αποτελέσματα των πειραμάτων με τη χρήση των καταλυτών που προκάλεσαν τη μεγαλύτερη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού, καθώς και της συγκέντρωσης του χλωρίου με το αντίστοιχο αποτέλεσμα.

Η τεχνική απολύμανσης με τη μικρότερη αποτελεσματικότητα είναι με τη χρήση του φυσικού φωτός που με τη χρήση των πλέον δραστικών καταλυτών, φτάνει σε μείωση του βακτηριακού πληθυσμού 2 Log. Μετά το πέρας των 20 λεπτών, η χλωρίωση παρουσιάζεται ως η πιο αποτελεσματική μέθοδος (-6 Log), όμως μπορεί να παρατηρηθεί ότι στα 15 λεπτά είναι εξ' ίσου αποτελεσματική με την απολύμανση με τεχνητό ηλιακό φως που προκαλεί μείωση της τάξεως των 5,5 Log, ενώ πριν τα 10 λεπτά είναι λιγότερο αποτελεσματική. Επιπλέον, μέχρι τα 6 λεπτά η χλωρίωση είναι λιγότερο αποτελεσματική και από τη UVC. Όμως από τα 30 λεπτά κ μετά η μείωση είναι στα -7 Log και είναι μεγαλύτερη από όλες τις άλλες τεχνικές απολύμανσης.



**Εικόνα 13: Σύγκριση αποτελεσματικότερων καταλυτών στις φωτοκαταλυτικές μεθόδους απολύμανσης, και στη χλωρίωση**

Συγκρίνοντας την απενεργοποίηση που προκύπτει με φωτοκατάλυση με  $\text{TiO}_2$ , τη χλωρίωση και τη UVC ακτινοβολία, τα ποσοστά απολύμανσης θα μπορούσαν να εκφραστούν ικανοποιητικά με κινητικές ψευδο-πρώτης τάξης και να υπολογιστούν οι σταθερές ρυθμού της κινητικής που παρουσιάζονται στον Πίνακας 13.

Η υψηλότερη τιμή της σταθεράς ρυθμού υπολογίστηκε στα πειράματα που διεξάχθηκαν με το δυαδικό καταλύτη ( $0.527 \text{ min}^{-1}$ ), ακολουθούμενα από εκείνα με τη δόση χλωρίου των  $5 \text{ mg / L}$  ( $0.498 \text{ min}^{-1}$ ) και τη UVC ακτινοβολία ( $0.454 \text{ min}^{-1}$ ). Η επεξεργασία με το δυαδικό καταλύτη ( $0.04\% \text{ κ.β. Mn / Co-TiO}_2$ ) οδήγησε σε ταχεία βακτηριακή αποσύνθεση, με μείωση κατά 4 Log η οποία καταγράφηκε σε λιγότερο από 10 λεπτά υπό προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία. Παρόμοια αποσύνθεση επιτεύχθηκε σε μεγαλύτερες περιόδους με άλλους καταλύτες και διεργασίες. Στην περίπτωση των πειραμάτων με ηλιακό φως, ουσιαστική αδρανοποίηση δεν έλαβε χώρα, πιθανώς λόγω της μήτρας του δείγματος και του βακτηρίου του ενδιαφέροντος μας. Σε άλλες μελέτες, όπου δείγματα νερού υπέστησαν επεξεργασία με Pt- και Ag- $\text{TiO}_2$  σε φυσικό ηλιακό φως, η αδρανοποίηση του *E. coli* έλαβε εν τέλει χώρα, αλλά καταγράφηκαν περίοδοι υστέρησης σε αντίθεση με την επεξεργασία με τεχνητό φως (41).

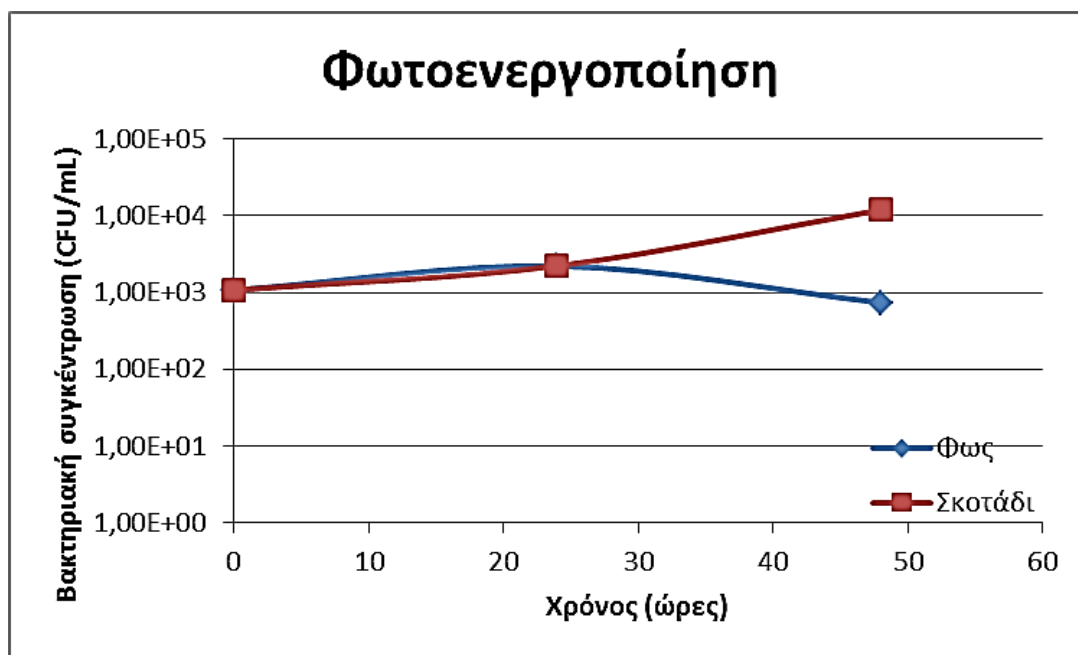
**Πίνακας 13: Σταθερές ρυθμού και γραμμική προσαρμογή ( $R^2$ ) των κινητικών της απενεργοποίησης της *K. pneumoniae***

Πειραματικές Συνθήκες		$k$ (min <sup>-1</sup> )	$R^2$
Τεχνητό φως	P25	0.032	0.89
	0.1% Mn:TiO <sub>2</sub>	0.040	0.97
	0.1% Co:TiO <sub>2</sub>	0.427	0.94
	0.04 Mn/Co:TiO <sub>2</sub>	0.527	0.94
Χλωρίωση	5 mg/L	0.498	0.91
	1 mg/L	0.057	0.96
UVC		0.454	0.89

#### 4.7 Φωτοενεργοποίηση

Ύστερα από την εκπόνηση του κάθε πειράματος φωτοκατάλυσης με χρήση ακτινοβολίας UVC (μετά τα 60 min) έγινε πείραμα ελέγχου φωτοενεργοποίησης όπου δείγματα τοποθετήθηκαν στο απόλυτο σκοτάδι και άλλα δείγματα στο φως, σε θερμοκρασία 23-25 °C, χωρίς προσθήκη θρεπτικού υλικού. Ύστερα από 24h και 48h έγινε δειγματοληψία και στη συνέχεια καλλιέργεια και μέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης είναι πολύ σημαντικό για την συγκεκριμένη μέθοδο απολύμανσης καθώς, εν μέρει, 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.



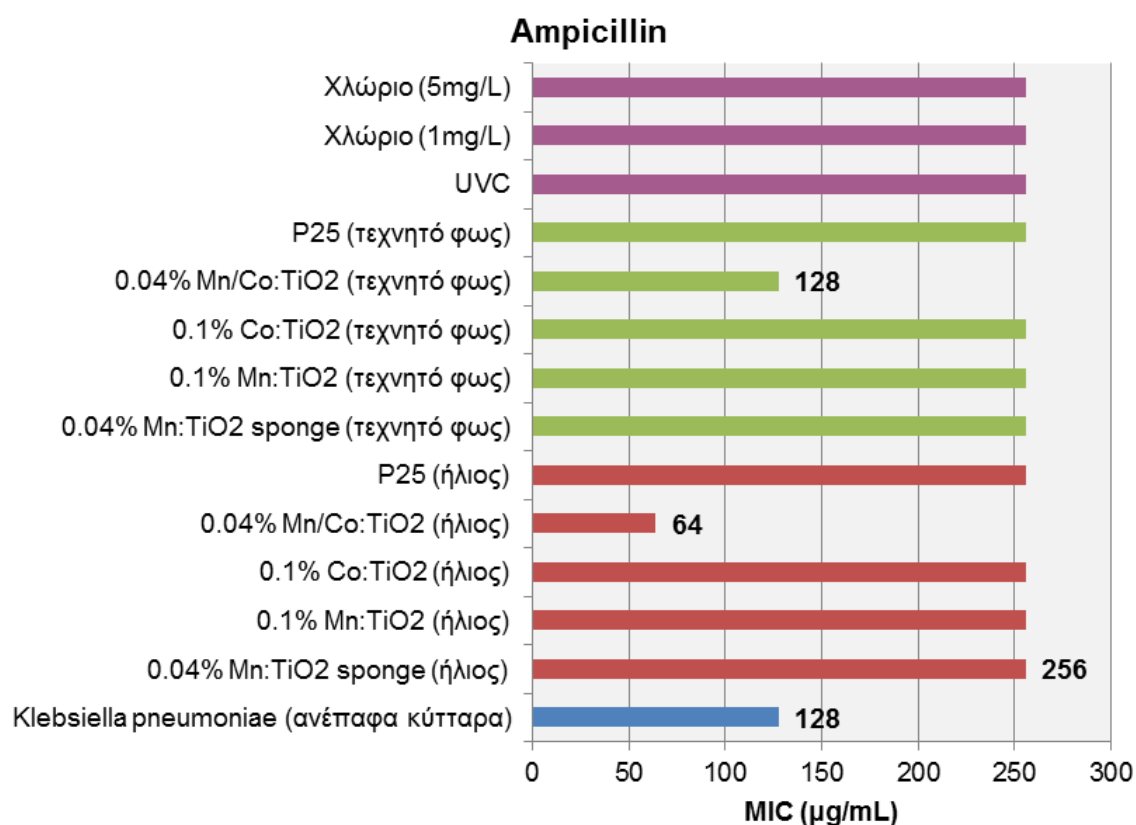
**Εικόνα 14: Έλεγχος φωτοενεργοποίησης βακτηρίου**

Από το γράφημα Εικόνα 14, βγαίνει το συμπέρασμα ότι τις πρώτες 24 ώρες τα βακτήρια αναπτύσσονται με χαμηλούς ρυθμούς, τόσο στο φως όσο και στο σκοτάδι. Στη συνέχεια τα βακτήρια που βρίσκονται σε φυσικό φως παρουσιάζουν μείωση του πληθυσμού τους ο οποίος φτάνει σε ελαφρώς χαμηλότερο επίπεδο από τον αρχικό πληθυσμό, ενώ τα βακτήρια που βρίσκονται στο σκοτάδι συνεχίζουν να αυξάνονται μέχρι το πέρας των 48 ωρών κατά 1 Log συνολικά.

#### **4.8 Προφίλ ανθεκτικότητας της *K. pneumoniae* στα αντιβιοτικά και MICs μετά από επεξεργασία**

Σύμφωνα με πολλές μελέτες, οι διαδικασίες απολύμανσης φαίνεται να επηρεάζουν την αναλογία των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά βακτηρίων στα λύματα. Το αποτέλεσμα διαφέρει σε κάθε περίπτωση, ανάλογα με το είδος και τη δοσολογία του απολυμαντικού.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) των επιλεγμένων αντιβιοτικών σε ανέπαφα κύτταρα της *K.pneumoniae* και σε απομένοντα κύτταρα μετά από κάθε επεξεργασία απολύμανσης. Το προφίλ ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά ελέγχθηκε έναντι τεσσάρων αντιβιοτικών διαφορετικών κατηγοριών και τα αποτελέσματα φαίνονται στην

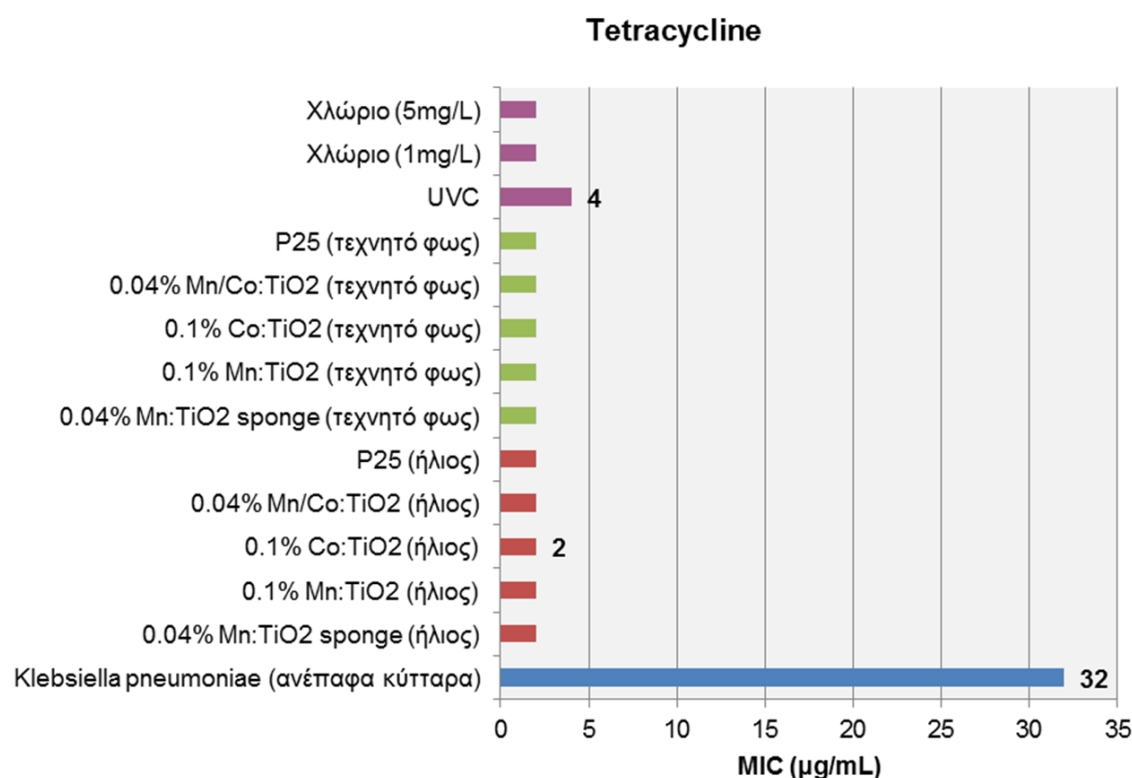


Εικόνα 15. Με σκοπό την ανίχνευση πιθανών αλλαγών στη συμπεριφορά, καταγράφηκε η MIC του κάθε αντιβιοτικού η οποία έδειξε παραλλαγές στις βακτηριακές αποκρίσεις που σχετίζονται με τον τύπο της διαδικασίας και την αντιμικροβιακή ένωση.

Η αμπικιλίνη και το cefaclor ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των β-λακταμών, η παρουσία των οποίων στο υδάτινο περιβάλλον και στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας των λυμάτων έχει ήδη παρατηρηθεί (49). Όλα τα βακτήρια που δοκιμάστηκαν παρέμειναν ανθεκτικά στις β-λακτάμες (cefaclor & αμπικιλίνη), σύμφωνα με τα πρότυπα της EUCAST (Ευρωπαϊκή επιτροπή προτύπων αντιμικροβιακής ευαισθησίας), αλλά η αντίστοιχη ανασταλτική συγκέντρωση αυτών των αντιβιοτικών μεταβλήθηκε μέσω της επεξεργασίας.

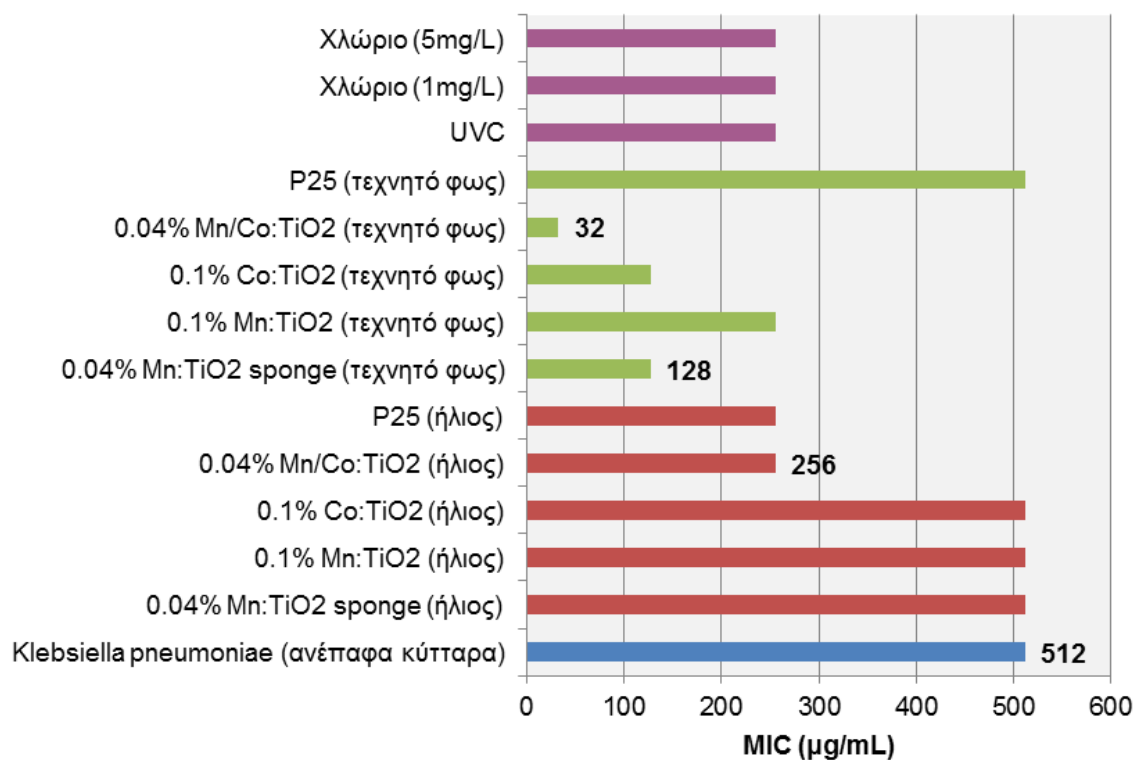
Για παράδειγμα η MIC του cefaclor μειώθηκε από 512  $\mu\text{g/mL}$  σε ανέπαφα κύτταρα, σε 256  $\mu\text{g/mL}$  μετά τη χλωρίωση. Αντίθετα, όταν η αμπικιλίνη δοκιμάστηκε, στις περισσότερες περιπτώσεις η MIC ήταν υψηλότερη μετά την απολύμανση, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ανοχή σε σύγκριση με αυτή που παρουσιάζεται σε μη επεξεργασμένα κύτταρα.

Σύμφωνα με τα ευρήματά μας, οι αποικίες της *K. pneumoniae* που επιβίωσαν, διατήρησαν την ανοχή τους στην αμπικιλίνη και το cefaclor με εύρος MIC 64-256  $\mu\text{g/mL}$  και 32 έως 512  $\mu\text{g/mL}$ , αντίστοιχα, μετά την απολύμανση. Ωστόσο, κάθε διαδικασία είχε αρνητικές συνέπειες για την τάση μεταβολής της MIC. Στην περίπτωση της σουλφαμεθοξαζόλης το πρότυπο της ανθεκτικότητας παρέμεινε σχεδόν το ίδιο, ενώ η MIC της τετρακυκλίνης ήταν σαφώς μικρότερη μετά όλες τις διαδικασίες (από 32 έως 2  $\mu\text{g/mL}$ ). Σε γενικές γραμμές, η απολύμανση δεν ήταν επιλεκτική προς τα ανθεκτικά σε αντιβιοτικά βακτήρια και προκάλεσε την ανάπτυξη είτε ανοχής στα αντιβιοτικά είτε ευαισθησίας.

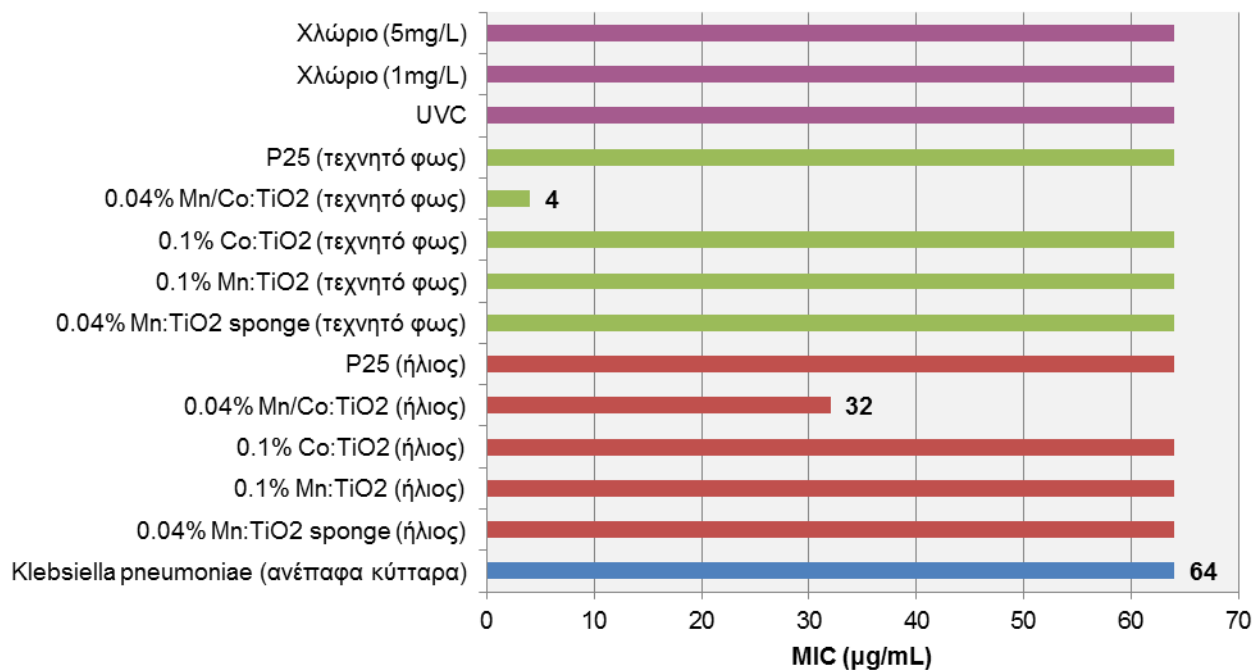


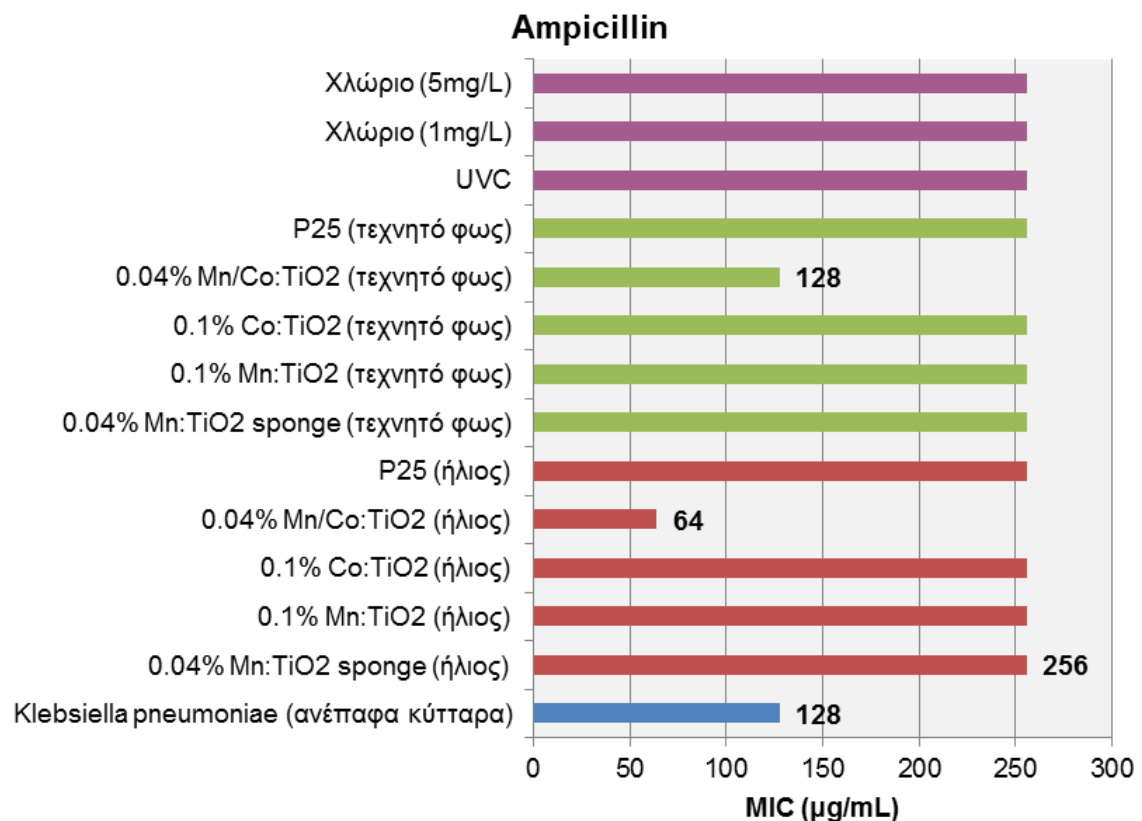


### Cefaclor



### Sulfamethoxazole





**Εικόνα 15: Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC) αντιβιοτικών πριν (ανέπαφα κύτταρα *K. pneumoniae*) και μετά την επεξεργασία**

Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση της αμπικιλλίνης η συντριπτική πλειοψηφία των επεξεργασιών οδήγησε σε αύξηση της MIC από 128 έως 256 µg/mL. Η μόνη εξαίρεση ήταν η φωτοκατάλυση με το δυαδικό καταλύτη TiO<sub>2</sub> μετά από την οποία η MIC παρέμεινε η ίδια όταν επεξεργάστηκε με προσομοίωση ηλιακού φωτός, ενώ μειώθηκε σε 64 µg/mL μετά την έκθεση στο φυσικό φως του ήλιου. Παρ'όλα αυτά, τα επίπεδα ανθεκτικότητας παρέμειναν αρκετά υψηλά μετά από όλες τις διαδικασίες, αφού η το σημείο αναστολής της MIC για την αμπικιλλίνη και την *K. pneumoniae* είναι μόνο 8 µg/mL, σύμφωνα με τα πρότυπα EUCAST. Εξίσου υψηλές τιμές MIC μετρήθηκαν με τους Rizzo et al. (50) σε πληθυσμούς *E.coli* στα λύματα κατά την επεξεργασία με χλωρίωση. Αν και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η τεχνική αυτή προσφέρει σημαντικά ποσοστά απενεργοποίησης (όπως καταγράφηκε και στην παρούσα μελέτη), ευνοεί την αύξηση της ανθεκτικότητας των εναπομεινάντων στελεχών σε ορισμένα αντιβιοτικά.

Τα δημιουργηθέντα προφίλ που αφορούν την κεφακλόρη ήταν αρκετά διαφορετικά, σε σύγκριση με εκείνα της αμπικιλλίνης. Όπως φαίνεται, οι

περισσότερες επεξεργασίες οδήγησαν σε μείωση της MIC, φθάνοντας την τιμή του 94% σχεδόν, μετά από την ηλιακή φωτοκατάλυση με το δυαδικό καταλύτη  $\text{TiO}_2$ . Ωστόσο, δεδομένης της μεταβλητής απόκρισης της *K. pneumoniae* σε αυτό το αντιβιοτικό, ακόμα και αυτές οι χαμηλότερες τιμές MIC δείχνουν την συνεχή ανθεκτικότητα στην κεφακλόρη. Η ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι η φωτοκατάλυση με το δυαδικά ντοπαρισμένο οξειδίο του τιτανίου φαίνεται να επηρεάζει τα εναπομείναντα κύτταρα σε σημαντικό βαθμό. Η MIC ήταν ιδιαίτερα μειωμένη ή, τουλάχιστον, παρέμεινε η ίδια σε όλες τις περιπτώσεις των δοκιμών αντιβιοτικών και μετά την επεξεργασία με είτε τεχνητό είτε φυσικό φως του ήλιου.

Η τρέχουσα έρευνα και οι μεταβολές στα προφίλ ανθεκτικότητας της *K. pneumoniae* επισημαίνουν περισσότερο την απόδοση αυτών των καταλυτών, λαμβάνοντας υπόψη τη σημαντική μείωση των τιμών της MIC, η οποία θα μπορούσε να είναι ενδεικτική των μεταλλάξεων ή των σημαντικών βλαβών στο γενετικό υλικό των επιβιωσάντων κυττάρων. Τέτοια αποτέλεσμα προέρχονται από την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου κατά τη διάρκεια των φωτοκαταλυτικών διεργασιών, η οποία επιταχύνεται με την παρουσία πολλαπλών προσμίξεων. Οι προσμίξεις μετάλλων φαίνεται να επηρεάζουν όχι μόνο τα ποσοστά αποσύνθεσης των μικροβίων, αλλά και τη γενική κατάσταση και την απόκρισή τους στους βακτηριοκτόνους παράγοντες όπως τα αντιβιοτικά.

Μεταξύ των αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στη μελέτη αυτή, οι τιμές MIC της τετρακυκλίνης μετά την επεξεργασία φαίνεται να παρέχουν μια καλύτερη εικόνα της αντίδρασης των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας απολύμανσης. Εκτός από την ακτινοβολία UVC όλες οι άλλες τεχνικές οδήγησαν σε μείωση της MIC στην τιμή των 2  $\mu\text{g/mL}$ , σύμφωνα με την οποία, τα κύτταρα της *K. pneumoniae* μπορεί να χαρακτηριστούν μάλλον ευαίσθητα στην αυτή την ένωση. Αντίθετα, άλλα ευρήματα με *E. coli* και φωτοκατάλυση με χρήση οξειδίου του τιτανίου δείχνουν μια στατιστικά σημαντική ανοδική τάση στην ανθεκτικότητα στην τετρακυκλίνη κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας (51).

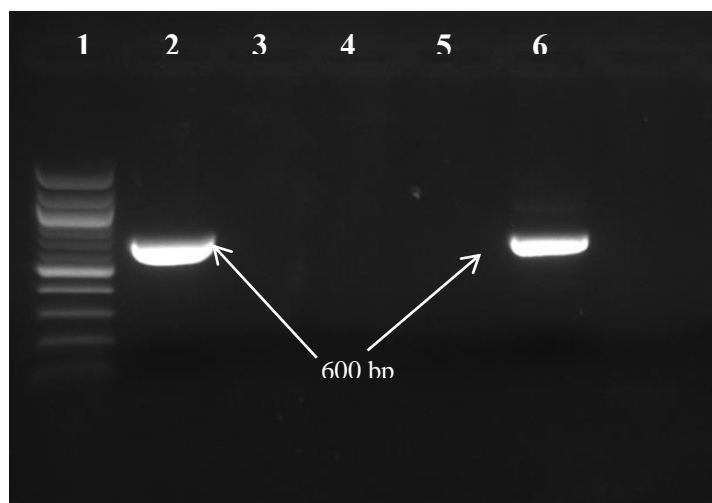
Ωστόσο, ένας σημαντικός παράγοντας που πρέπει να εξετάζεται είναι ο χρόνος επεξεργασίας, η οποία καθορίζει την δυνατότητα μίας μεθόδου για την άρση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Έχει συμπεραθεί από πολλές μελέτες ότι ο μεγάλος χρόνος επεξεργασίας των λυμάτων τείνει να ευνοεί την αύξηση της αντοχής στα αντιβιοτικά στην τελική εκροή (52).

Η γενική παρατήρηση είναι ότι οι διάφορες μέθοδοι απολύμανσης δείχνουν συνήθως αρνητικές συνέπειες για τα επίπεδα της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά

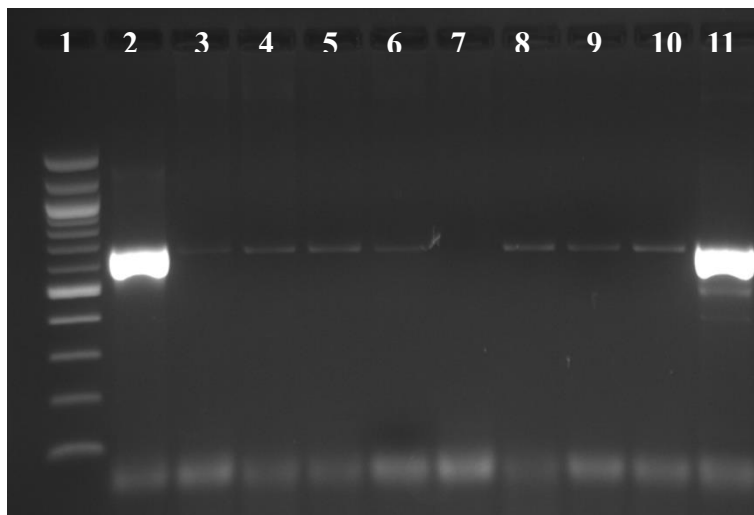
στους επιζώντες μικροβιακούς πληθυσμούς. Η χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας, για παράδειγμα, μπορεί είτε να αλλάξει είτε όχι αυτά τα επίπεδα, ανάλογα με τις εφαρμοζόμενες συνθήκες και τον τύπο του μικροοργανισμού, ο οποίος φαίνεται να παίζει ένα βασικό ρόλο (50). Σε μια άλλη μελέτη, η απόκριση της *E. coli* στο cefaclor μετά από φωτοκαταλυτική επεξεργασία με  $\text{TiO}_2$  ενισχυμένο με N ήταν ελαφρώς επηρεασμένη. Ωστόσο, έδειξε πτωτική τάση, όπως αυτό τεκμηριώνεται στη μελέτη μας (48).

Η επικράτηση των ανθεκτικών στα αντιβιοτικά στελεχών στα λύματα επιβάλλει την ύπαρξη των αντίστοιχων γονιδίων, τα οποία με τη σειρά τους μπορεί να μεταφερθούν μέσω των επεξεργασιών, και υπάρχουν στα τελικά λύματα. Τα ανθεκτικά βακτήρια απελευθερώνονται στο περιβάλλον και μέσω της γενετικής μετατροπής εξαπλώνουν εύκολα και γρήγορα την ανθεκτικότητα μεταξύ των μικροβιακών πληθυσμών (53). Σε μια προσπάθεια να διερευνηθεί η τύχη των ανθεκτικών βακτηρίων κατά τη διάρκεια της επεξεργασία της απολύμανσης, επιλέχθηκαν πέντε διαφορετικά γονίδια, και συγκεκριμένα τα *tetA*, *tetM*, *sul1*, *blaTEM* και *ampC*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την επίκτητη ανθεκτικότητα ενάντια στα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν (29) (27) (25) (26) (28).

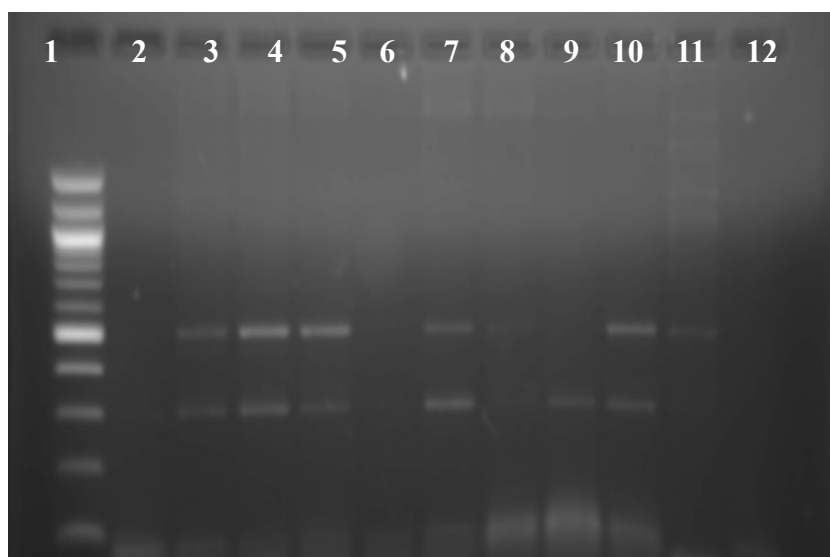
Τα επιλεγμένα γονίδια ανθεκτικότητας ελέγχθηκαν σε ανέπαφα κύτταρα *K. pneumoniae* όπου ανιχνεύθηκε η παρουσία τους. Στη συνέχεια, ελέγχθηκαν τα απομένοντα κύτταρα μετά από κάθε επεξεργασία απολύμανσης, για την παρουσία αυτών των γονιδίων. Τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης φαίνονται στις Εικόνες 16-20, και τα γονίδια που ανιχνεύθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 14.



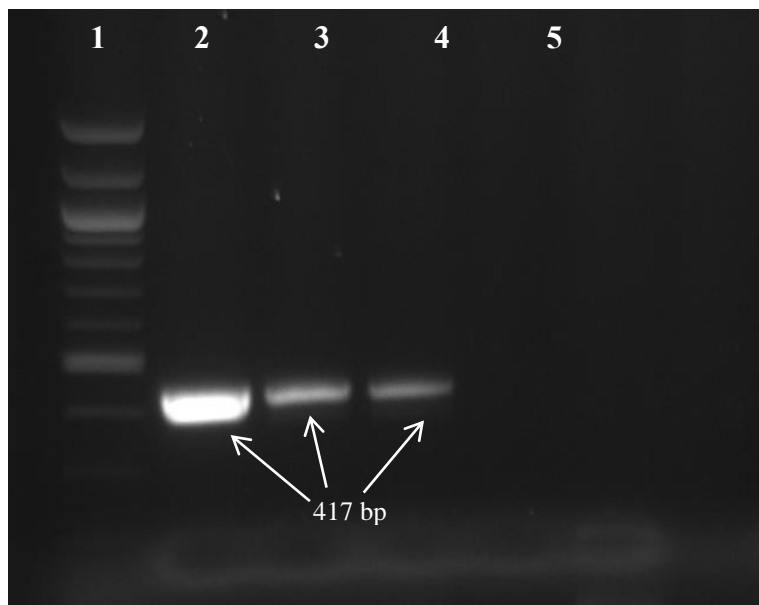
Εικόνα 16: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tetM* στην *K. pneumoniae* προ επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 & 6 → θετικό δείγμα (προϊόν 600bp στην *K. pneumoniae*), 7 → αρνητικό control.



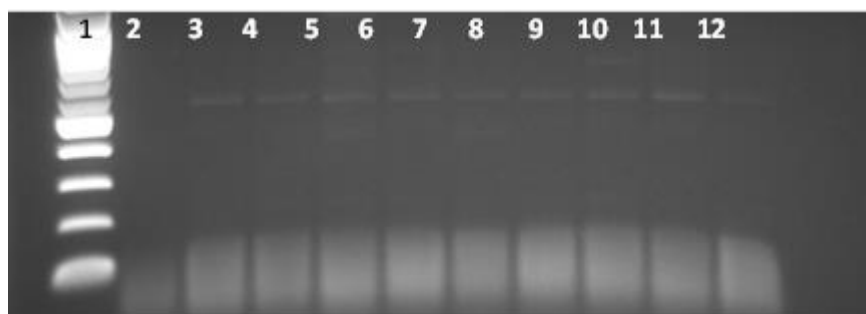
Εικόνα 17: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tetM* στην *K. pneumoniae* κατόπιν επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → ανέπαφο στέλεχος, 3 → 0.04% Mn/Co:TiO<sub>2</sub> (sun), 4 → 0.04% Mn:TiO<sub>2</sub> sponge (sun), 5 → 0.1% Mn:TiO<sub>2</sub> (solar), 6 → TiO<sub>2</sub> (solar), 7 → UV-C, 8 → φωτονεργοποίηση 48 h, 9 → χλωρίωση 5 mg/L, 10 → χλωρίωση 1 mg/L, 11 → ανέπαφο στέλεχος.



Εικόνα 18: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *tetA* στην *K. pneumoniae* κατόπιν επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2 → ανέπαφο στέλεχος, 3 → 0.04% Mn/Co:TiO<sub>2</sub> (sun), 4 → 0.04% Mn:TiO<sub>2</sub> sponge (sun), 5 → 0.1% Mn:TiO<sub>2</sub> (solar), 6 → TiO<sub>2</sub> (solar), 7 → UV-C, 8 → φωτονεργοποίηση 48 h, 9 → χλωρίωση 5 mg/L, 10 → χλωρίωση 1 mg/L, 11 → ανέπαφο στέλεχος, 12 → αρνητικό control.



Εικόνα 19: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *sul1* στην *K. pneumoniae* προ επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 2, 3 & 4 → θετικό δείγμα (προϊόν 417bp στην *K. pneumoniae*), 5 → αρνητικό control.



Εικόνα 20: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (1,5%) των προϊόντων PCR για την ανίχνευση του γονιδίου *ampC* στην *K. pneumoniae* κατόπιν επεξεργασίας. Διαδρομές: 1→ DNA ladder (100 bp - Biolabs), 3 → χλωρίωση 1 mg/L, 4 → χλωρίωση 5 mg/L, 5 → 0.1% Co:TiO<sub>2</sub> (solar), 6 → 0.04% Mn:TiO<sub>2</sub> sponge (solar), 7 → 0.1% Mn:TiO<sub>2</sub> (solar), 8 → TiO<sub>2</sub> (solar), 9 → 0.04% Mn/Co:TiO<sub>2</sub> (solar), 10 → UV-C, 11 → ανέπαφο στέλεχος, 12 → αρνητικό control.

Πίνακας 14: Παρουσία (+) και απουσία (-) ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων *K pneumoniae* σε ανέπαφα και απομένοντα κύτταρα μετά την

επεξεργασία (φωτοκατάλυση με προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία, χλωρίωση και UVC ακτινοβολία).

Επεξεργασία	Γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά- ARGs				
	ampC (β lactams)	blaTEM (β lactams)	sul1 (sulfamethoxazole)	tetA (tetracycline)	tetM (tetracycline)
	<i>K. pneumoniae</i> – ανέπαφα κύτταρα				
	+	+	+	+	+
	<i>K. pneumoniae</i> – κατόπιν επεξεργασίας				
P25	+	-	+	+	-
0.1% Mn:TiO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+
0.1% Co:TiO <sub>2</sub>	+	-	-	-	-
0.04 Mn/Co:TiO <sub>2</sub>	+	-	+	-	-
Χλωρίωση 5 mg/L	+	-	+	+	-
Χλωρίωση 1 mg/L	+	-	+	+	+
UVC	+	-	-	-	+

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε έφερε και τα πέντε γονίδια, σύμφωνα με τα αποτελέσματα της PCR, εξηγώντας την υψηλή ανθεκτικότητα που εμφάνισε στα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν. Τα σημαντικά επίπεδα ανθεκτικότητας στις β-λακτάμες (αμπικιλίνη και κεφακλόρη) σε επιβιώσαντα κύτταρα θα μπορούσε να αποδοθεί στην παρουσία του ampC μετά από όλες τις διεργασίες. Αντιθέτως, το blaTEM ανιχνεύθηκε σε κύτταρα μόνο μετά από τη φωτοκατάλυση με 0,1% Mn: TiO<sub>2</sub> υπό τεχνητό ηλιακό φως. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε με το γονίδιο sul1, το οποίο βρέθηκε να είναι παρόν στις περισσότερες περιπτώσεις, προκαλώντας τις υψηλές τιμές της MIC για τη σουλφαμεθοξαζόλη για την αναστολή της ανάπτυξης της *K pneumoniae* μετά την επεξεργασία.

Αντιστρόφως, η εμφάνιση των γονιδίων tet δεν δικαιολογεί τη σημαντική μεταβολή των προφίλ ανθεκτικότητας όσον αφορά την τετρακυκλίνη. Η ανοχή στην τετρακυκλίνη καθώς επίσης και στα άλλα αντιβιοτικά θα μπορούσε να αποδοθεί σε μια μεγάλη ποικιλία ανθεκτικών βακτηρίων. Στην παρούσα μελέτη η επιλογή των

ανθεκτικών βακτηρίων αναφέρεται σε αυτά που έχουν συστηματική παρουσία στα λύματα, ακόμα και μετά τις επεξεργασίες απολύμανσης (54) (52) (55) (53) (56).

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται, η ακτινοβολήση με UVC φαίνεται να επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την παρουσία των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων μετά την επεξεργασία. Η ακτινοβολία UVC είναι γνωστή για τις θανατηφόρες βλάβες που προκαλεί στο γενετικό υλικό και τις σημαντικές αλλοιώσεις στο DNA των εναπομεινάντων κυττάρων (56). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις απολύμανσης λυμάτων με UVC, υψηλά ποσοστά ανθεκτικών βακτηρίων παραμένουν αμετάβλητα, οπότε τελικά καταλήγουν στο υδάτινο περιβάλλον (52).

Σύμφωνα με τους Mao et al (55), απαιτούνται υψηλές εντάσεις ακτινοβολίας για τη βέλτιστη απομάκρυνση των ανθεκτικών βακτηρίων από τα λύματα. Επιπλέον, μία άλλη κατάλληλη προσέγγιση θα ήταν ο συνδυασμός της UV με μία φωτοκαταλυτική επεξεργασία, η οποία έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματική για την εξάλειψη των ανθεκτικών βακτηρίων. Τα ευρήματά μας αποδεικνύουν ότι υπάρχει αυτή η δυνατότητα ακόμη και στην περίπτωση της προσομοιωμένης ηλιακής ακτινοβολίας, καθώς η πληθώρα των γονιδίων ανθεκτικότητας μειώθηκε μετά την απολύμανση. Όσον αφορά τη χλωρίωση, δεν επηρεάζει ουσιαστικά την παρουσία ανθεκτικών βακτηρίων σε εναπομεινάντα κύτταρα. Αν και υπάρχουν πολλές αναφορές για θετικά αποτελέσματα για την απομάκρυνση τέτοιων γονιδίων, οι περισσότερες από αυτές έχουν ασχοληθεί με το εξωκυτταρικό γενετικό υλικό που περιέχεται στα λύματα και όχι στα έμβια μικρόβια (52) (56).

Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει κάποιες μελέτες σχετικά με τις δυνατότητες των διαδικασιών απολύμανσης για να απομάκρυνση των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων από τα λύματα. Παρ' όλα αυτά, τα αποτελέσματα είναι αρκετά αντιφατικά και απαιτείται περισσότερη έρευνα επάνω σε αυτό το θέμα. Η ποσότητα των γονιδίων ανθεκτικότητας καθώς και των ανθεκτικών σε αντιβιοτικά βακτηρίων, μπορεί να είναι είτε υψηλότερη είτε χαμηλότερη στα επεξεργασμένα λύματα σε σύγκριση με τα ακατέργαστα λύματα (54) (57). Το κοινό σημείο όμως, είναι ότι τα λύματα είναι μία σημαντική πηγή ανθεκτικών βακτηρίων, που απαιτούν πιο αποτελεσματικές από τις συμβατικές εφαρμογές, έτσι ώστε τα λύματα να είναι πιο ασφαλή για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον.



## 5 Συμπεράσματα

Οι στόχοι της παρούσας μελέτης περιλάμβαναν το δυναμικό των φωτοκαταλυτικών και άλλων τεχνικών απολύμανσης για την εξάλειψη της *K. pneumoniae* σε πραγματικά λύματα, καθώς και τη συνολική τους επίδραση στο αντιβιοτικό προφίλ αντίστασης και στα γονίδια ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά. Ειδικότερα, εφαρμόστηκαν και αξιολογήθηκαν η φωτοκατάλυση με οξείδιο του τιτανίου εμπλουτισμένου με μέταλλα, η χλωρίωση και η ακτινοβολία UV-C. Τα βασικά συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτή την εργασία μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- Η φωτοκατάλυση με εμπλουτισμένο με μέταλλα  $\text{TiO}_2$  αδρανοποιεί γρήγορα την *K. pneumoniae* σε λύματα, υπό προσομοιωμένη ηλιακή ακτινοβολία.

- Ο καταλύτης με Co και ο δυαδικός Co / Μη- $\text{TiO}_2$  παρουσίασαν ικανοποιητική φωτοκαταλυτική απόδοση, καθώς μετά από 30 λεπτά έκθεσης σε τεχνητό φως σημειώθηκε μια μείωση 6 Log του βακτηριακού πληθυσμού.

- Η απόκριση των καταλυτών υπό φυσικό ηλιακό φως δεν οδήγησε σε αποδεκτά επίπεδα βακτηριακής αποσύνθεσης διότι η μείωση του πληθυσμού δεν έφτασε το επιθυμητό επίπεδο του 99,9%.

- Με βάση τις σταθερές ρυθμού η σχετική δυνατότητα των κύριων διεργασιών για την αδρανοποίηση της *K. pneumoniae* μειώθηκε στην φωτοκατάλυση και τη χλωρίωση, με την εξής σειρά: Δυαδικός καταλύτης Co / Μη- $\text{TiO}_2$  υπό τεχνητό φως ( $0.527 \text{ min}^{-1}$ ) > χλωρίωση με δόση  $5 \text{ mg} / \text{L}$  ( $0.498 \text{ min}^{-1}$ ) > UV-C ακτινοβολία ( $0.454 \text{ min}^{-1}$ ).

- Το αντιβιοτικό προφίλ ανθεκτικότητας επηρεάστηκε σε κάποιο βαθμό, αναλόγως κυρίως με τον τύπο της επεξεργασίας. Σημαντικές αλλαγές στις τιμές της MIC καταγράφηκαν για την κεφακλόρη και την τετρακυκλίνη.

- Η αξιοσημείωτη παρουσία γονιδίων ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά στα κύτταρα που επιβίωσαν, εγείρει ανησυχίες σχετικά με τις δυνατότητες των τεχνικών απολύμανσης να μειώσουν την αφθονία τους σε επεξεργασμένα λύματα.

## Βιβλιογραφία

1. **S. Malato, P. Fernandez-Ibanez, M.I. Maldonado, Blanco, W. Gernjak.** Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today*. 2009, 147, 1-59.
2. **N.S.Grigg.** A new paradigm for water management. *SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GESTÃO DE RECURSOS HÍDRICOS*. 1998.
3. **Μ.Κουμαρτσιώτου.** Ανάγκες & δυνατότητες επαναχρησιμοποίησης ύδατος στην Ελλάδα. 2008.
4. **Ε.Ν.Βελονάκης.** Μικροβιολογική ποιότητα ποσιμου νερού και δημοσια υγεια.
5. **K.V.Ellis.** Water disinfection: A review with some consideration of the requirements of the third world. *Critical Reviews in Environmental Control*. 2009, Vol. 20, 5-6, pp. 341-407.
6. **ΦΕΚ892/Β/110701.** Ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης. 2001.
7. **Β.Ε.Καραούλη.** Απολύμανση του πόσιμου νερού με χλωρίωση – Άλλες τεχνικές.
8. **N. Lydakis-Simantiris, D. Riga, E. Katsivela, D. Mantzavinos, N. P. Xekoukoulotakis.** Disinfection of spring water and secondary treated municipal wastewater by TiO<sub>2</sub> photocatalysis. *Desalination*. 2010, Τόμ. 250, 1, 351-355.
9. **S. Malato, J. Blanco, D. C. Alarcon, M. I. Maldonado, P. Fernandez-Ibanez, W. Gernjak.** Photocatalytic decontamination and disinfection of water with solar collectors. *Catalysis Today*. 2007, Τόμ. 22, 1-2, 1-59.
10. **J. Wist, J. Sanabria, C. Dierolf, W. Torres, C. Pulgarin.** Evaluation of photocatalytic disinfection of crude water for drinking-water production. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 2002, Τόμ. 147, 3, 241-246.
11. **W.A.M. Hijnen, E.F. Beerendonk, G.J. Medema.** Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: A review. *WATER RESEARCH*. 2006, Τόμ. 40, 1, 3-22.
12. **H.C.Wegener.** Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*. 2003, Τόμ. 6, 5, 439-445.
13. **J.I.R.Castanon.** History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*. 2007, 86, 2466-2471.
14. **M. Munir, K. Wong, I. Xagorarakis.** Release of antibiotic resistant bacteria and genes in the effluent and biosolids of five wastewater utilities in Michigan. *Water research*. 2011, Τόμ. 45, 2, 682-693.
15. **K.Kummerer.** Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2004, 54, 311-320.

16. **E. A. Auerbach, E. E. Seyfried, K. D. McMahon.** Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. *Water research*. 2007, Τόμ. 41, 5, 1143-1151.
17. **P. Martins da Costa, P. Vaz-Pires, F. Bernardo.** Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research*. 2006, Τόμ. 40, 8, 1735-1740.
18. **L.K. Siu, D. B Huang, T. Chiang.** Plasmid transferability of KPC into a virulent K2 serotype *Klebsiella pneumoniae*. *BMC Infectious Diseases*. 2014, 14, 14-176.
19. **R. El Fertas-Aissani, Y. Messai, S. Alouache, R. Bakour.** Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie Biologie*. 2013, Τόμ. 61, 5, 209–216.
20. **A. Abuzaid, A. Hamouda, S.G.B. Amyes.** *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacDE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *Journal of Hospital Infection*. 2012, 81, 87-91.
21. **H. Chetoui, E. Delhalle, P. Melin, A. Sabri, P. Thonart, P. De Mol.** Epidemiological typing of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility patterns. *Res. Microbiol.* 150. 1999, Τόμ. 150, 4, σ. 265–272.
22. **D. L. Paterson, K. L. K. Siu, F. Yee Chang.** *Klebsiella* species (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae* and *K. rhinoscleromatis*). *Journal of Medical Microbiology*. 2001, 50, 396-406.
23. **J.M. Andrews.** Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2001, 48, 5-16.
24. **D. Venieri, A. Fraggadaki, V. Binas, A. Zachopoulos, G. Kyriakidis, D. Mantzavinos.** Study of generated genetic polymorphisms during the photocatalytic elimination of *Klebsiella pneumoniae* in water. *Photochemical and photobiological sciences*. 2015, 14, 506-513.
25. **T. Schwartz, W. Kohnen, B. Jansen, U. Obst.** Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*. 2003, 43, 325-335.
26. **V. Speldooren, B. Heym, R. Labia, M.H. Nicolas-Chanoine.** Discriminatory detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*. 1998, Τόμ. 42, 4, 879-884.
27. **L. Jacobs, H.Y. Chenia.** Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. *International journal of food microbiology*. 2007, 114, 295-306.
28. **T. Tennstedt, R. Szczepanowski, I. Krahn, A. Pühler, A. Schlüter.** Sequence of the 68,869 bp IncP-1 $\alpha$  plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integrin and other transposable elements. *Plasmid*. 2005, 53, 218-238.

29. **O.L. Akinbowale, H. Peng, M.D. Barton.** Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *Journal of applied microbiology*. 2007, 103, 2016-2025.
30. **V.D. Binas, K. Sambani, T. Maggos, A. Katsanaki, G. Kiriakidis.** Synthesis and photocatalytic activity of Mn-doped TiO<sub>2</sub> nanostructured powders under UV and visible light. *Applied Catalysis B: Environmental* 113– 114. 2012, 113-114, 79– 86.
31. **D.Venieri, A. Fraggadaki, M. Kostadima, E. Chatzisyneon, V. Binas, A. Zachopoulos, G. Kiriakidis, D. Mantzavinos.** Solar light and metal-doped TiO<sub>2</sub> to eliminate water-transmitted bacterial pathogens: Photocatalyst characterization and disinfection performance. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2014, 154–155, 93–101.
32. **M. Pelaez, N. T. Nolan, S. C. Pillai, M. K. Seery, P. Falaras.** A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental*. 2012, 125, 331-349.
33. **Α.Φραγγεδάκη.** Απολύμανση νερού με τη χρήση φωτοκατάλυσης: Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* και επίδραση στο γενετικό υλικό της. 2014.
34. **J.A. Rengifo-Herrera, E. Mielczarski, J. Mielczarski, N.C. Castillo, J. Kiwi, C. Pulgarin.** Escherichia coli inactivation by N, S co-doped commercial TiO<sub>2</sub> powders under UV and visible light. *Appl. Catal. B: Environ.* 2008, 84, 448–456.
35. **B. Wu, R. Huang, M. Sahu, X. Feng, P. Biswas, Y. J. Tang.** Bacterial responses to Cu-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Science of the Total Environment*. 2010, 408, 1755–1758.
36. **V. C. Papadimitriou, V. G. Stefanopoulos, M. N. Romanias, P. Papagiannakopoulos, K. Sambani, V. Tudose, G. Kiriakidis.** Determination of photo-catalytic activity of un-doped and Mn-doped TiO<sub>2</sub> anatase powders on acetaldehyde under UV and visible light. *Thin Solid Films*. 2011, 520, 1195–1201.
37. **C. Karunakaran, G. Abiramasundari, P. Gomathisankar, G. Manikandan, V. Anandi, J.** Cu-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles for photocatalytic disinfection of bacteria under visible light. *Colloid Interf. Sci.* 2010, 352, 68–74.
38. **J. Marugán, P. Christensen, T. Egerton, H. Purnama.** Synthesis, characterization and activity of photocatalytic sol–gel TiO<sub>2</sub> powders and electrodes. *Appl. Catal. B: Environ.* 2009, 89, 273–283.
39. **M. Vijay, K. Ramachandran, P.V. Ananthapadmanabhan, B. Nalini, B.C. Pillai, Federica Bondioli, A. Manivannan, R.T. Narendhirakannan.** Photocatalytic inactivation of Gram-positive and Gram-negative bacteria by reactive plasma processed nanocrystalline TiO<sub>2</sub> powder. *Current Applied Physics*. 2013, 13, 510-516.
40. **A. Yousef, N. A.M. Barakat, T. Amna, S. S. Al-Deyab, M. S. Hassan, A. Abdel-hay, H. Y. Kim.** Inactivation of pathogenic *Klebsiella pneumoniae* by CuO/TiO<sub>2</sub> nanofibers: A multifunctional nanomaterial via one-step electrospinning. *Ceramics International*. 2012, Τόμ. 38, 6, 4525–4532.

41. **R. P.S. Suri, H. M. Thornton, M. Muruganandham.** Disinfection of water using Pt- and Ag-doped TiO<sub>2</sub> photocatalysts. *Environmental Technology*. 2013, Τόμ. 33, 14, 1651-1659.
42. **G.Bitton.** *Wastewater microbiology 4th ed.* s.l. : Wiley-Blackwell, 2011.
43. **M. Sinha, A. Kapley, H.J. Purohit.** Study of biodiversity of Klebsiella sp. *World journal of microbiology and biotechnology*. 2008, 24, 203-207.
44. **M.B. Fisher, D.A. Keane ,P. Fernández-Ibáñez, J. Colreavy, S.J. Hinder, K.G. McGuigan, S.C. Pillai.** Nitrogen and copper doped solar light active TiO<sub>2</sub> photocatalysts for water decontamination. *Applied catalysis B: Environmental*. 2013, 130-131, 8-13.
45. **D. Sethi, A. Pal, R. Sakthivel, S. Pandey, T. Dash, T. Das, R. Kumar.** Water disinfection through photoactive modified titania. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 2014, 130, 310-317.
46. **G. Xiao, X. Zhang, W. Zhang, S. Zhang, H. Su, T. Tan.** Visible-light-mediated synergistic photocatalytic antimicrobial effects and mechanism of Ag-nanoparticles@chitosan-TiO<sub>2</sub> organic-inorganic composites for water disinfection. *Applied catalysis B: Environmental*. 2015, 170-171, 255-262.
47. **I.B. Ditta, A. Steele, C. Liptrot, J. Tobin, H. Tyler, H.M. Yates, D.W. Sheel, H.A. Foster.** Photocatalytic antimicrobial activity of thin surface films of TiO<sub>2</sub>, CuO and TiO<sub>2</sub>/CuO dual layers on Escherichia coli and bacteriophage T4. *Applied microbiology and biotechnology*. 2008, 79, 27-133.
48. **L. Rizzo, D. Sannino, V. Vaiano, O. Sacco, A. Scarpa, D. Pietrogiacomì.** Effect of solar simulated N-doped TiO<sub>2</sub> photocatalysis on the inactivation and antibiotic resistance of an E. coli strain in biologically treated urban wastewater. *Applied Catalysis B: Environmental* 144. 2014, 144, 369– 378.
49. **C. Bouki, D. Venieri, E. Diamantopoulos.** Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 91. 2013, 91, 1-9.
50. **L. Rizzo, A. Fiorentino, A. Anselmo.** Advanced treatment of urban wastewater by UV radiation: Effect on antibiotics and antibiotic-resistant E. coli strains. *Chemosphere*. 2013, 92, 171–176.
51. **L. Rizzo, A. Della Sala, A. Fiorentino, G. Li Puma.** Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp and TiO<sub>2</sub> photocatalysis: Effect on a multi drug resistant Escherichia coli strain. *Water research* 53. 2014, 53, 145-152.
52. **C. M. Manaia, G. Macedo, D. Fatta-Kassinos, O. C. Nunes.** Antibiotic resistance in urban aquatic environments: can it be controlled? *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016, 100, 1543–1557.

53. **A. Naquin, A. Shrestha, M. Sherpa, R.r Nathaniel, R. Boopathy.** Presence of antibiotic resistance genes in a sewage treatment plant in Thibodaux, Louisiana, USA. *Bioresource Technology*. 2015, 188, 79–83.
54. **N. Makowska, R. Koczura, J. Mokracka.** Class 1 integrase, sulfonamide and tetracycline resistance genes in wastewater treatment plant and surface water. *Chemosphere*. 2016, 144, 1665–1673.
55. **D. Mao, S. Yu, M. Rysz, Y. Luo, F. Yang, F. Li, Jie Hou, Q. Mu, P.J.J. Alvarez.** Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Research*. 2015, 85, 458-466.
56. **Y. Zhang, Y. Zhuang, J. Geng, H. Ren, Y. Zhang, L. Ding, K. Xu.** Inactivation of antibiotic resistance genes in municipal wastewater effluent by chlorination and sequential UV/chlorination disinfection. *Science of the Total Environment*. 2015, 512-513, 125–132.
57. **S. Rodriguez-Mozaz, S. Chamorro, E. Marti, B. Huerta, M.I Gros, A. Sanchez-Melsio, C.s M. Borrego, D. Barcelo, J. Luis Balcazar.** Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in hospital and urban wastewaters and their impact on the receiving river. *water research*. 2015, 69, 234-242.

## Παράρτημα 1

### Antibiotic Resistance genes

#### Genomic DNA

#### 1. a.TETA b.TETM (Για την τετρακυκλίνη)

Όγκος αντίδρασης 40λ

PCR mixture	Ποσότητα
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	4mM
dNTPs	0.3mM
Primer F	0.25μM
Primer R	0.25μM
Taq	2U
DNA	0.4μg

#### PCR cycling

94 °C	5min
94 °C 1min	<u>30 cycles</u>
55 °C 1min	
72 °C 5min	
72 °C	5min

#### 2.amp C (Γονίδια ανθεκτικότητας στις Β-λακτάμες)

Όγκος αντίδρασης 40λ

PCR mixture	Ποσότητα
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	4mM
dNTPs	0.3mM
Primer F	0.3μM
Primer R	0.3μM
Taq	2U
DNA	0.5μg

**PCR cycling**

94 °C		5min
94 °C	30sec	<b><u>35 cycles</u></b>
49 °C	30sec	
72 °C	1min	
72 °C		7min

**3. bla TEM**

Όγκος αντίδρασης 40λ

PCR mixture	Ποσότητα
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
dNTPs	0.4mM
Primer F	0.5μM
Primer R	0.5μM
Taq	2U
DNA	0.5μg

**PCR cycling**

94 °C		5min
94 °C	30sec	<b><u>35 cycles</u></b>
42 °C	30sec	
72 °C	1min	
72 °C		5min



## 5. Sul1 (Γονίδια ανθεκτικότητας στις σουλφοναμίδες)

### a.Sul1

Όγκος αντίδρασης 50λ

PCR mixture	Ποσότητα
Buffer	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM
dNTPs	200μM
Primer F	1.5μM
Primer R	1.5μM
Taq	2U
DNA	100ng

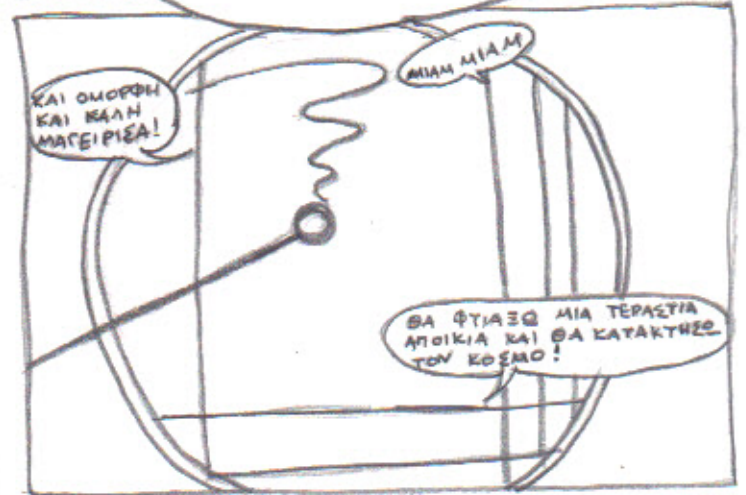
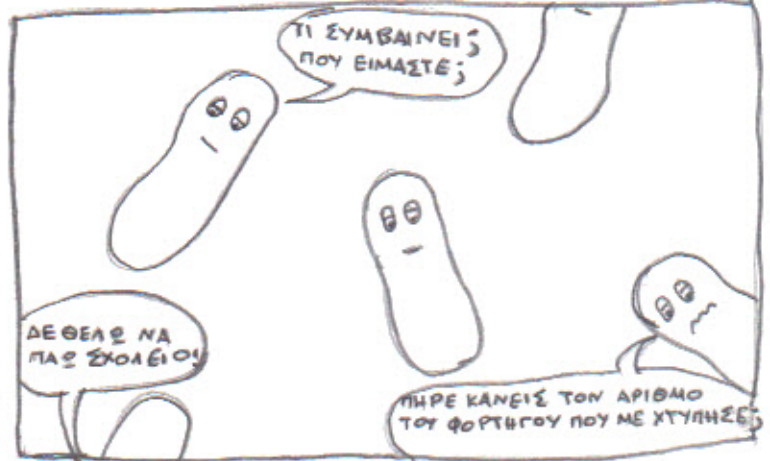
### PCR cycling

95 °C	5min
94 °C 30sec	<b><u>35 cycles</u></b>
55 °C 1min	
72 °C 2min	
72 °C	10min

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 (BONUS)

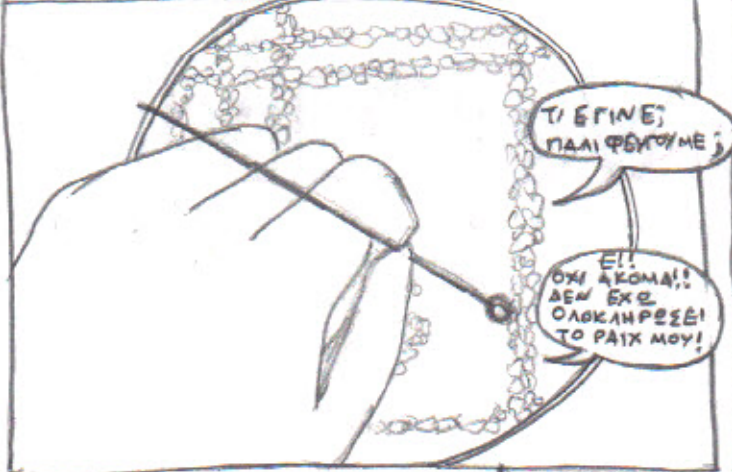
ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΚΚΟΝΟΛΟΓΗΜΕΝΗ

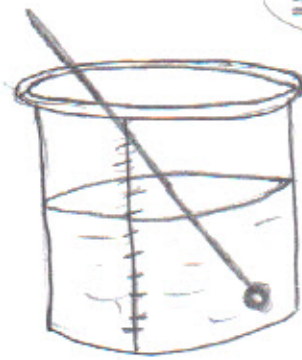




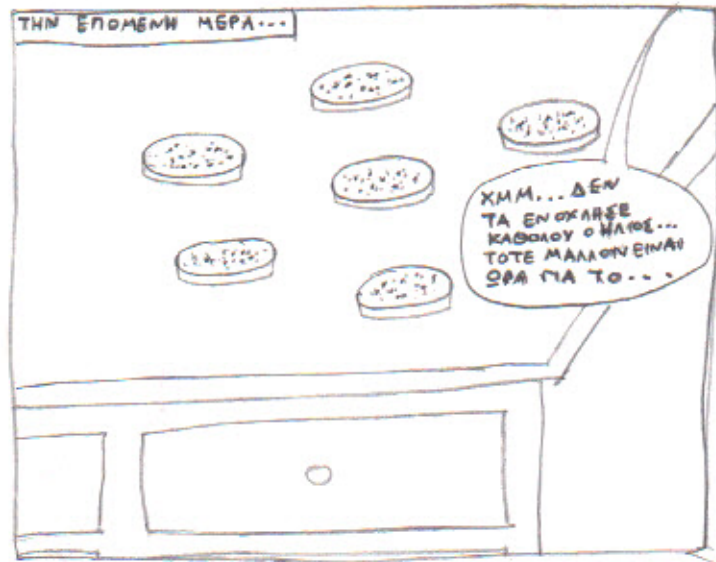
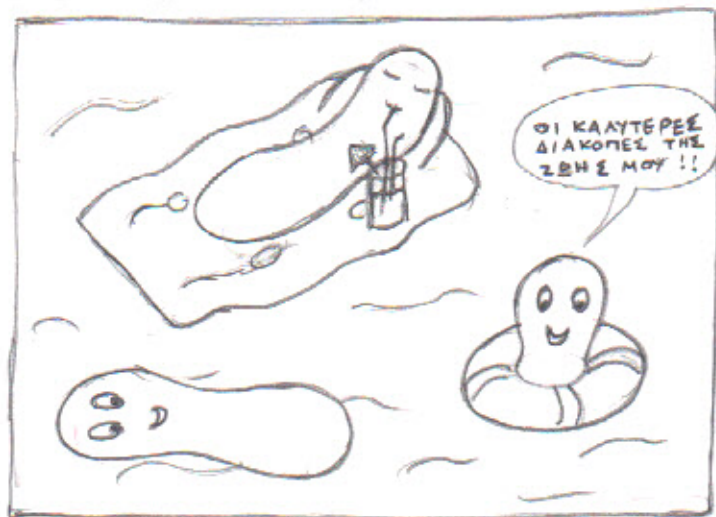
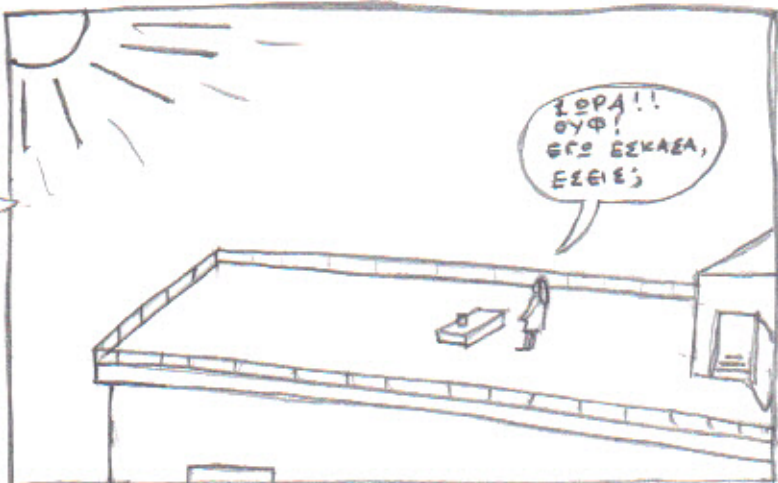
24 ΟΡΕΣ ΚΑΙ 37°C ΜΕΤΑ...



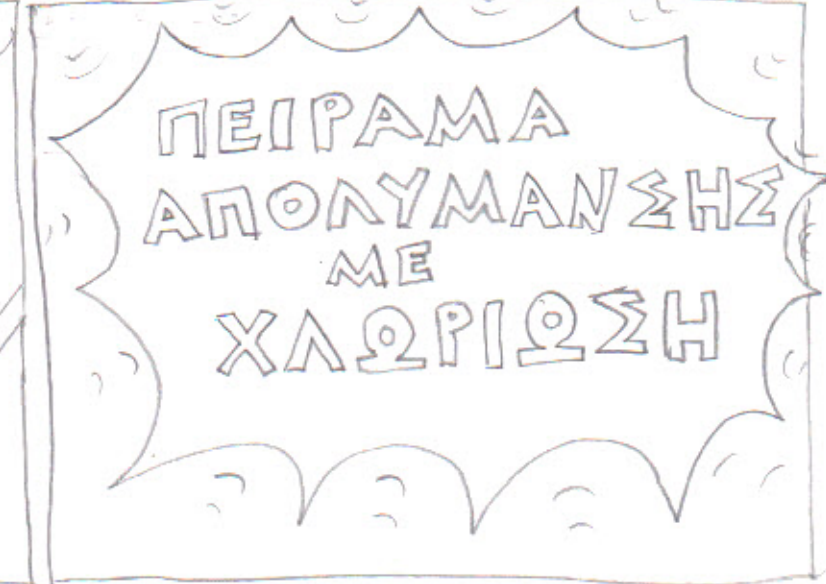
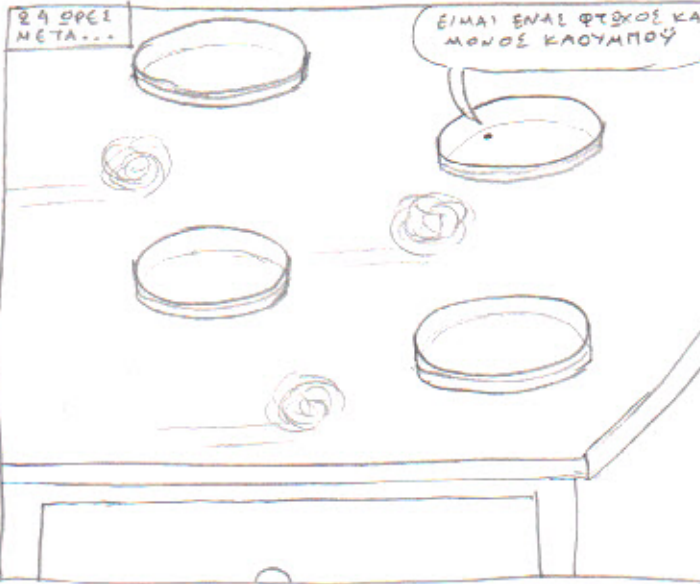
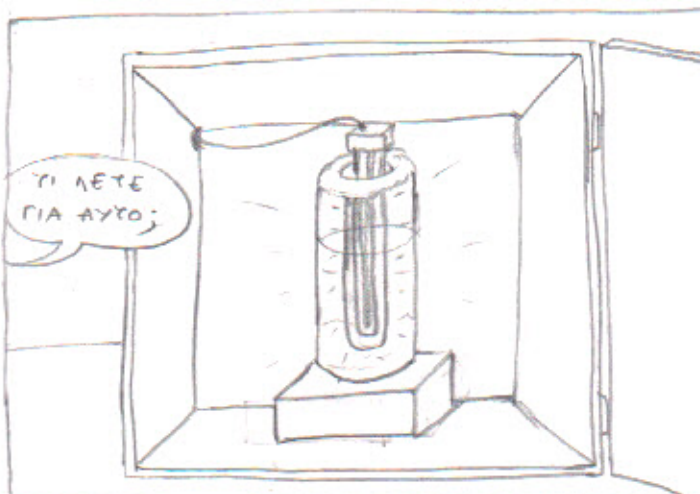
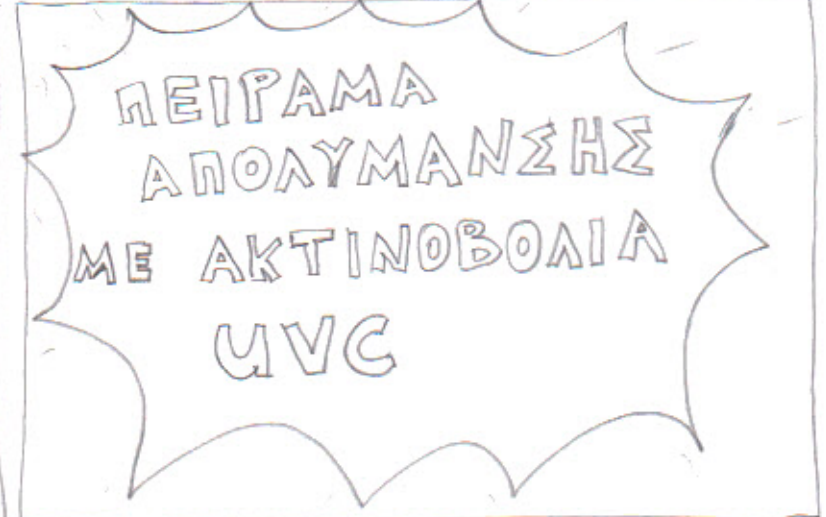
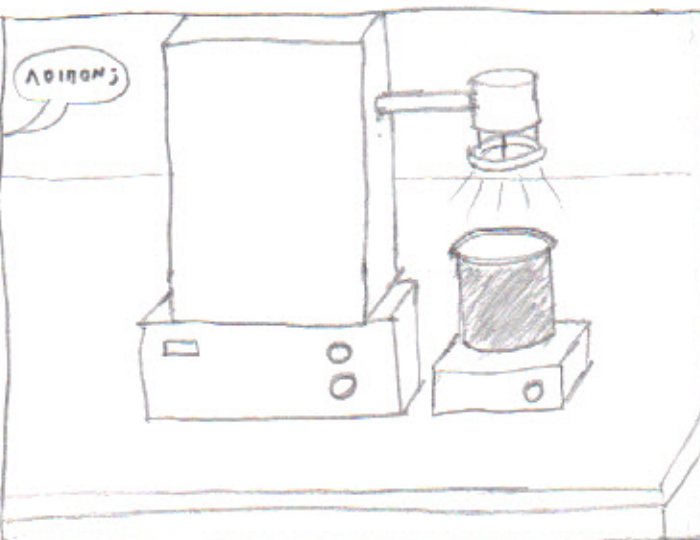
ΕΙΣΤΕ ΕΤΟΙΜΟΙ;  
ΞΕΚΙΝΑΜΕ!



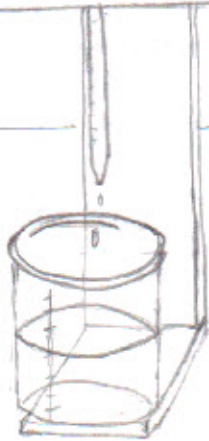
# ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΜΕ ΦΥΣΙΚΟ ΗΛΙΑΚΟ ΦΩΣ



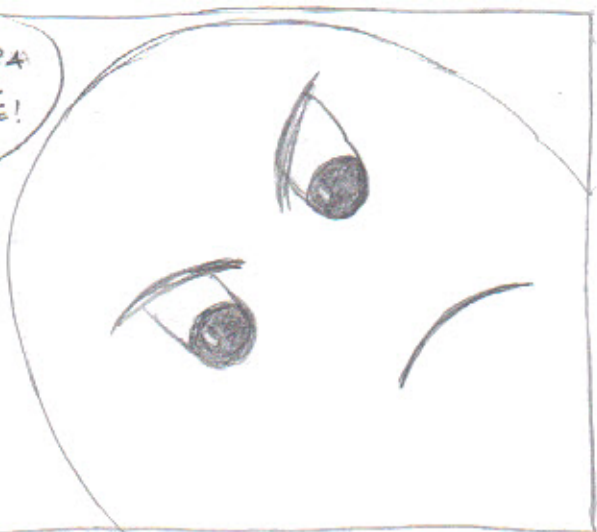
# ΠΕΙΡΑΜΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΜΕ ΤΕΧΝΗΤΟ ΗΛΙΑΚΟ ΦΩΣ







ΤΕΛΕΥΤΑΙΑ ΦΟΡΑ  
ΑΠΟΛΥΜΑΝΗΣΕ!  
ΜΕΤΑ ΑΠΕΡΓΟΥΜΕ!  
ΣΤΑΝΕΙ ΠΙΑ!



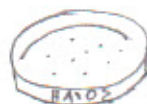
ΤΗΝ ΕΠΟΜΕΝΗ ΜΕΡΑ...



ΤΡΙΠ ΤΡΙΠ  
ΤΡΙΠ

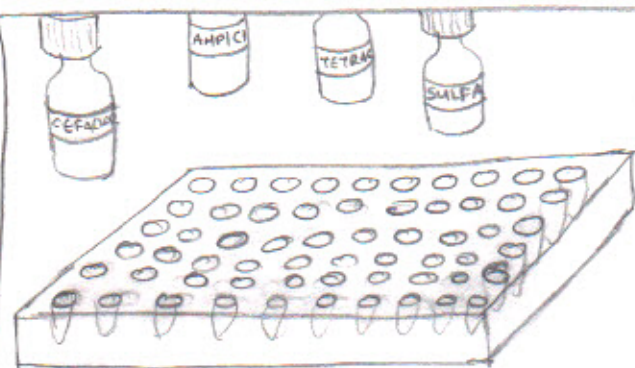
ΓΥΛΟΣ  
(ΗΓ. ΣΥΜΒΟΛΙΖΕΙ  
ΤΗΝ ΕΡΗΜΙΑ)

ΜΕΡΙΚΕΣ ΜΕΡΕΣ ΜΕΤΑ



ΞΑΣ ΚΑΛΕΣΑ ΣΗΜΕΡΑ ΕΔΩ, ΓΙΑΤΙ ΕΙΣΤΕ  
ΟΙ ΠΙΟ ΔΥΝΑΤΟΙ ΑΠ' ΤΟΥΣ ΔΥΝΑΤΟΥΣ, ΟΙ  
ΠΙΟ ΣΚΛΗΡΟΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΕΚΛΗΡΟΥΣ, ΟΙ  
ΠΙΟ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΙ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΥΣ!  
ΞΑΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΝΩ ΜΕ ΧΑΡΑ ΟΤΙ  
ΠΕΡΑΣΑΤΕ ΕΤΗΝ ΕΠΟΜΕΝΗ ΦΑΣΗ !!!

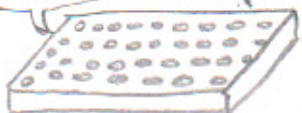
# ΔΟΚΙΜΗ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ



ΑΝΤΕ ΣΤΗΝ  
ΥΓΕΙΑ ΜΑΣ !!

ΑΧ ΜΑΚΗ ΜΟΥ! ΤΙ  
ΤΗΝ ΘΩΛΕΙ ΤΗΝ  
ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ!  
ΤΗΝ ΕΦΑΓΕΣ ΚΑΙ  
ΣΕ ΕΦΑΓΕ!

ΜΕΤΑ ΤΟ ΤΡΙΤΟ ΕΡΗΝΑΚΙ  
ΚΕΦΑΛΟΡΙΝΗΣ ΔΕ ΝΟΙΣΘΩ  
ΕΛΘΟΛΟΥ ΚΑΛΑ...  
ΘΑ ΚΑΤΑΡΡΕΥΣΩ...



ΚΑΙ ΜΟΥ ΕΙΧΕ ΠΕΙ  
Η ΜΑΜΑ ΜΟΥ ΓΙΑ ΤΟ  
ΜΠΑΡ ΠΟΥ ΣΟΥ ΒΑΖΩΝ  
ΠΡΑΓΜΑΤΑ ΕΣΤΟ ΠΟΤΟ...

ΚΑΛΑ, ΑΥΤΗ Η  
ΛΕΥΚΟΚΑΛΙΜΗ  
ΕΙΝΑΙ ΠΡΩΤΟ  
ΠΡΑΜΑ!

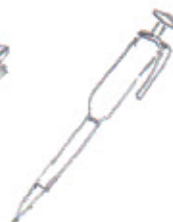
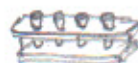
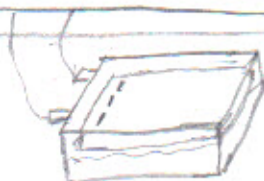
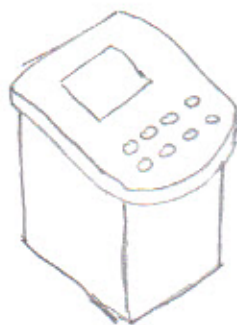
ΠΑΙΔΙΑ ΚΕΡΝΑΩ  
ΣΟΥΛΦΑΜΕΘΟΞΑΖΟΛΗ!

ΚΑΝΟΝΙΑ ΑΝΤΕΧΕΤΕ ΠΟΛΥ  
ΘΛΕΡΟ! ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΔΟΥΜΕ  
ΤΟ ΓΙΑΤΙ...

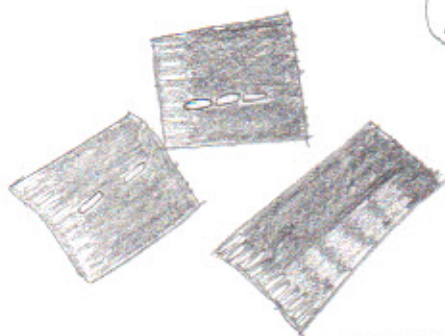


# ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

PCR



ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΣΗ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

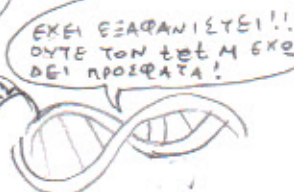


ΧΜ... ΟΣΤΕ  
ΕΤΕΙ ΛΟΙΜΟΝ..

ΜΑ ΠΟΥ ΕΙΝΑΙ  
Ο blaTEM;



blaTEM



ΕΧΕΙ ΕΞΑΦΑΝΙΣΤΕΙ!!  
ΟΥΤΕ ΤΟΝ ΕΓΩ Μ ΕΧΩ  
ΔΕΙ ΠΡΟΣΦΑΤΑ!

Ααααχ!!  
Θα καταργήσω



HASTA LA VISTA...  
BABY!



ΑΥΤΑ ΛΟΙΜΟΝ...

## ΤΕΛΟΣ (;