

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ
ΧΑΛΑΖΙΑΚΗΣ ΑΜΜΟΥ ΚΑΙ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ
ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Διπλωματική εργασία

Από την Προπτυχιακή φοιτήτρια

ΚΟΥΡΤΑΚΗ Ι. ΚΛΕΑΝΘΗ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: **ΧΡΥΣΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

ΜΕΛΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ: **ΚΑΡΑΤΖΑΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ**
ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2018, ΧΑΝΙΑ

Αφιερώνεται στην οικογένειά μου,
αρωγό σε κάθε βήμα μου.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας με τίτλο "Διερεύνηση της επίδρασης χαλαζιακής άμμου και νανοσωματιδίων σε βακτήρια" πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης κατά το ακαδημαϊκό έτος 2018 με επιβλέποντα τον Καθηγητή κ. Χρυσικόπουλο Κωνσταντίνο.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους αυτούς που συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της:

- Τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Χρυσικόπουλο Κωνσταντίνο για την ανάθεση του θέματος αυτής εργασίας. Επίσης, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου από την πρώτη κιόλας συνάντησή μας, την καθοδήγηση καθώς και για την κατανόηση καθ'όλη την διάρκεια της εκπόνησής της.
- Τους καθηγητές κ.. Καρατζά Γεώργιο και κ. Βενιέρη Δανάη που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της τριμελούς επιτροπής μου.
- Τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος (TuceeL) και πιο συγκεκριμένα, την υπεύθυνη του εργαστηρίου, κα. Σαρίκα Ροίκα-Ευαγγελία, την Υποψήφια Διδάκτορα της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος, κα. Φουντούλη Θεοδοσία καθώς και τον προπτυχιακό φοιτητή Παμφίλη Γεώργιο, για τη στήριξη και τη συνεργασία κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου και της ολοκλήρωσης της εργασίας μου.
- Την κα Γουνάκη Ιωσηφίνα από το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος για την άψογη συνεργασία, τις συμβουλές και τη βοήθεια στην ανάπτυξη των μικροβιολογικών μεθόδων.
- Την κα Παντίδου Αριάδνη και τα υπόλοιπα μέλη του Εργαστηρίου Βιοχημικής Μηχανικής και Περιβαλλοντικής Βιοτεχνολογίας της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος για την άψογη συνεργασία και την καθοδήγηση για το χρονικό διάστημα που μας παραχωρούσαν το αυτόκαυστο μηχάνημα.
- Τη Μεταπτυχιακή φοιτήτρια του Εργαστηρίου Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος Γεωργοπούλου Μαρία για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και το χρόνο της από την πρώτη στιγμή που πήγα στο εργαστήριο έως και την ολοκλήρωση της εργασίας μου.
- Το Διδάκτορα του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών Πάτρας, Κατζουράκη Βασίλειο, για την υπομονή, για το χρόνο που αφιέρωσε και την πολύτιμη βοήθειά του στη προσομοίωση των δεδομένων μου με το λογισμικό ColloidFit.
- Τη Διδάκτορα του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών Πάτρας, Συγγούνα Βασιλική για την εξαιρετική συνεργασία μας, το χρόνο της, την πολύτιμη βοήθεια και την καθοδήγηση που μου παρείχε με κάθε τρόπο.
- Την οικογένειά μου για την ηθική και υλική στήριξη που μου παρέχουν αδιάκοπα όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και την υπομονή και επιμονή που μου δίδαξαν και μου διδάσκουν.

- Τους συμφοιτητές και πλέον φίλους μου Άγγελο, Δέσποινα, Ελένη, Ελένη και Κωστή για το χρόνο τους αλλά και τη στήριξη που όλο αυτό το διάστημα εντός και εκτός εργαστηρίου που μου παρείχαν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ένα από τα σημαντικότερα περιβαλλοντικά προβλήματα της σύγχρονης εποχής αποτελεί η μείωση της ποσότητας και η υποβάθμιση της ποιότητας διαφόρων περιβαλλοντικών πόρων. Η αυξημένη εκμετάλλευση των περιβαλλοντικών πόρων για ανθρωπογενείς δραστηριότητες σε συνδυασμό με τη ραγδαία μεταβολή των καιρικών συνθηκών και την εμφάνιση φαινομένων λειψυδρίας καθιστά αναγκαία την προστασία και την αποκατάσταση όλων και ιδιαίτερα των υδάτινων πόρων. Οι υδάτινοι, επιφανειακοί ή υπόγειοι πόροι καθημερινά εκτίθενται σε διαφόρων τύπων ρύπων (οργανικές και ανόργανες ουσίες, μικροοργανισμούς) κάθε ένας από τους οποίους μπορεί να οδηγήσει στη διατάραξη της ισορροπίας τους ή και στην καταστροφή τους. Οι ρύποι αυτοί μπορεί να προέρχονται από γεωργικές δραστηριότητες (φυτοφάρμακα, λιπάσματα), από διεργασίες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων (βιοκολλοειδή, απόβλητα με υψηλό οργανικό φορτίο) αλλά και από βιομηχανικές διεργασίες κατά την παραγωγή διαφόρων προϊόντων ή και την απόθεση τους (μέταλλα, νανοσωματίδια, υπολείμματα υλών).

Λαμβάνοντας υπόψη τις περιβαλλοντικές ανάγκες που αναφέρθηκαν παραπάνω, στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας αυτής διερευνήθηκε η περίπτωση ρύπανσης υπόγειων ή επιφανειακών υδάτων από βιοκολλοειδή και νανοσωματίδια. Τα βιοκολλοειδή τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι τρία βακτήρια, δείκτες κοπρανώδους μόλυνσης, *Esherichia coli*, *Enterococcus faecalis* και *Staphylococcus aureus*. Όσον αφορά στα νανοσωματίδια που χρησιμοποιήθηκαν είναι το οξειδίο του γραφενίου (GO) και το διοξειδίο του τιτανίου (TiO_2) τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλές βιομηχανικές, περιβαλλοντικές, ηλεκτρονικές και άλλες εφαρμογές μέσω των οποίων μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον. Στην παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκαν τρεις κύκλοι δυναμικών πειραμάτων διαλείποντος έργου στα οποία εξετάστηκε η επίδραση ύπαρξης χαλαζιακής άμμου, νανοσωματιδίου οξειδίου του γραφενίου και νανοσωματιδίου διοξειδίου του τιτανίου στα βακτήρια.. Οι συνθήκες στις οποίες διεξήχθησαν τα πειράματα αυτά ήταν τέτοιες ώστε να προσομοιάζουν συνθήκες υπαρκτών περιβαλλοντικών προβλημάτων. Η χαλαζιακή άμμος η οποία επιλέχθηκε και χρησιμοποιήθηκε ήταν χονδρόκοκκη για την προσομοίωση εδαφικών συστημάτων και οι αρχικές συγκεντρώσεις μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων που επιλέχθηκαν ήταν πάντα ίδιες και ίσες με 10^5 cfu/ml και 20ppm αντίστοιχα. Η θερμοκρασία σε κάθε περίπτωση διατηρούνταν ίση με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος $T=25^\circ\text{C}$ και η ιοντική ισχύς ίση με $I_s=2\text{mM}$. Οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων σε κάθε περίπτωση διατηρούνταν ίδιες ώστε τα αποτελέσματα να μπορούν να είναι συγκρίσιμα.

Βάσει των αποτελεσμάτων, διαπιστώθηκε ότι όσον αφορά στην επιρροή που ασκεί η παρουσία χαλαζιακής άμμου δεν ήταν ίδια για κάθε βακτήριο. Όσον αφορά στα βακτήρια *E.coli* και *St.aureus* απουσία νανοσωματιδίων φαίνεται ότι μείωσε την αδρανοποίησή τους. Αντίθετα, για το βακτήριο *E.faecalis* η παρουσία άμμου συνέβαλε στην αδρανοποίησή του. Όσον αφορά στην παρουσία GO για τα βακτήρια *E.coli* και *St.aureus* παρατηρήθηκε μείωση της αδρανοποίησής τους ενώ αντίθετα για το βακτήριο *E.faecalis* παρουσίασε αντιβακτηριακές ιδιότητες. Αναφορικά με την παρουσία άμμου στην επίδραση του GO στα βακτήρια ενίσχυσε τις αντιβακτηριακές ιδιότητες καθώς αύξησε σε μεγάλο βαθμό την αδρανοποίησή τους. Τελειώνοντας όσον αφορά στη δράση του TiO_2 απουσία άμμου οι αντιβακτηριακές του ιδιότητες ήταν εμφανείς για τα εντερικά βακτήρια *E.coli* και *E.faecalis*.

Ωστόσο αρκετά μεγάλη επίδραση φαίνεται να άσκησε η παρουσία του και για το βακτήριο *St.aureus* η οποία όμως δεν συνέβαλε στην αδρανοποίησή του. Τα συμπεράσματα αυτά διαφοροποιήθηκαν με παρουσία άμμου καθώς το TiO_2 συνέβαλε στην αδρανοποίηση και των τριών βακτηρίων.

Συγκρίνοντας την συμπεριφορά των βακτηρίων παρουσία και απουσία χαλαζιακής άμμου και νανοσωματιδίων μπορεί εύκολα να προκύψει το συμπέρασμα ότι το βακτήριο *St.aureus* παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία σε σχέση με τα άλλα δύο ενώ μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσίασε η *E.coli*.

ABSTRACT

One of the most important environmental problems of the modern era is the reduction of the quantity and the degradation of the quality of the various environmental resources. Their increased exploitation for man-made activities, coupled with the rapid change in weather conditions and the occurrence of water scarcity, necessitates the protection and rehabilitation of all and especially water resources. Water, surface or underground resources are exposed daily to various types of pollutants (organic and inorganic, micro-organisms), each of which can lead to disruption or destruction. These substances can be derived from agricultural activities (from pesticides, fertilizers), from municipal waste treatment (bio-colloids, high-load organic waste), but also from industrial processes in the production and distribution of various products (metal, nanoparticles, residual materials).

Considering the environmental needs mentioned before, in this work investigated the case of pollution of underground or surface waters by biocolloids and nanoparticles. The biocolloids used were three bacteria, fecal infection markers, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. The nanoparticles used were graphene oxide (GO) and titanium dioxide (TiO_2), which are widely used in many industrial, environmental, electronic and other applications through which they can enter the environment.

In this diploma thesis, three cycles of dynamic batch experiments were conducted, examining the effect of the presence of quartz sand, graphene oxide nanoparticles and titanium dioxide nanoparticles, on the intestinal origin bacteria.

The conditions that these experiments conducted were such to simulate existing environmental problems.

The quartz sand selected and used was coarse for soil systems simulation and the initial concentrations of microorganisms and nanoparticles selected were always the same and equal to 10^5 cfu/ml and 20 ppm respectively. The temperature in each case was maintained at ambient temperature $T = 25^\circ\text{C}$ and the ionic power equal to $I_s = 2\text{mM}$. The conditions of the experiments were always the same so that the results could be comparable.

Based on the results, it was found that the influence of quartz sand was different for each bacterium. Concerning the *E.coli* and *St.Aureus* bacteria in the absence of nanoparticles, it seems to reduce their inactivation. On the contrary, for the *E. faecalis* bacteria the presence of sand contributed to its inactivation. Regarding the presence of GO for *E. coli* and *St.Aureus*, a decrease in their inactivation was observed, whereas for the *E.faecalis* bacterium it showed antibacterial properties. Regarding the presence of sand in the effect of GO on bacteria, it enhanced antibacterial properties as it greatly increased their inactivation. Finally, with regard to the effect of TiO_2 in the absence of sand its antibacterial properties? It was evident for the intestinal bacteria *E. coli* and *E.faecalis*. However, it appears to have had a rather large effect on the presence of the bacterium *St.aureus*, which did not help to inactivate it. These conclusions were differentiated in the presence of sand as TiO_2 contributed to the inactivation of all three bacteria.

Comparing the behavior of bacteria in the presence and absence of quartz sand and nanoparticles, it can easily be concluded that the bacterium *St.Aureus* was more susceptible than the other two, while *E.coli* was more resistant.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ-ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
1.1 ΚΟΛΛΟΕΙΔΗ-ΒΙΟΚΟΛΛΟΕΙΔΗ.....	19
1.2 ΚΟΛΛΟΕΙΔΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ	20
1.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΚΟΛΛΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ.....	27
1.4 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	30
1.4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ Η ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	31
1.5 ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ	37
1.6 ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ	38
1.7 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ	40
1.8 ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO ₂).....	44
1.9 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO ₂)	47
2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ	50
2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	50
2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	51
2.2.1 ΥΛΙΚΑ	51
2.2.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ.....	52
2.2.3 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ	54
2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ	54
2.2.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	54
2.2.4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ (GO).....	55
2.2.4.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ (GO).....	56
2.2.4.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO ₂)	56
2.2.4.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΜΜΟΥ	57
2.2.4.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	58
2.2.4.7 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΡΙΒΛΙΩΝ ΜΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	59
2.2.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	59
3. COLLOIDFIT	62

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	64
4.1 <i>E.COLI</i>	64
4.2 <i>E.FAECALIS</i>	69
4.3 <i>ST.AUREUS</i>	74
4.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΠΕΙΡΑΜΑ .	78
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΞΕΝΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΗ	87

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ:

Σχήμα 1.2.1: Απεικόνιση Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων έπειτα από χρώση τους με ιώδες χρώμα	21
Σχήμα 1.2.2: Απεικόνιση της δομής των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων.....	22
Σχήμα 1.2.3: Απεικόνιση της δομής του βακτηρίου <i>E.coli</i>	23
Σχήμα 1.2.4 και σχήμα 1.2.5: Απεικόνιση αποικιών σε τρυβλία Petri έπειτα από καλλιέργεια του βακτηρίου <i>E.coli</i> στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της καταμέτρησης.....	23
Σχήμα 1.2.6 και σχήμα 1.2.7: Απεικόνιση του σχήματος και της διάταξης ως αλυσίδες του βακτηρίου <i>E.faecalis</i> στο χώρο	24
Σχήμα 1.2.8: Απεικόνιση διάταξης στο χώρο με μορφή τσαμπιών του βακτηρίου <i>St.aureus</i> ..	26
Σχήμα 1.2.9 και σχήμα 1.2.10: Απεικόνιση αποικιών σε τρυβλία Petri έπειτα από καλλιέργεια του βακτηρίου <i>St.aureus</i> στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της καταμέτρησης.....	26
Σχήμα 1.2.11: Τρυβλία petri από τα τρία βακτήρια για καταμέτρηση αποικιών στο εργαστήριο.....	27
Σχήμα 1.6.1: Απεικόνιση της δομής στο χώρο.....	38
Σχήμα 1.6.2: Διαδρομές ρύθμισης των χαρακτηριστικών του GO ανάλογα τον τελικό προορισμό εφαρμογής τους	39
Σχήμα 1.7.1: Απεικόνιση τρόπου επίδρασης νανο-φύλλων γραφενίου κύτταρο <i>E.coli</i>	41
Σχήμα 1.7.2 : Απεικόνιση τρόπου επίδρασης αλατούχου διαλύματος, GO και rGO στα κύτταρα της <i>E.coli</i>	42
Σχήμα 1.7.3: Απεικόνιση μηχανισμών αντιμικροβιακής δράσης των νανοσωματιδίων της οικογένειας του γραφενίου (Graphene Family Nanoparticles GFN).....	43
Σχήμα 1.8.1 και σχήμα 1.8.2: Απεικόνιση δομής ρουτιλίου όπου απεικονίζονται με μεγαλύτερες μπλε σφαίρες τα άτομα TiO_2 ενώ με μικρότερες κόκκινες τα άτομα οξυγόνου.....	44
Σχήμα 1.8.3 και σχήμα 1.8.4: Απεικόνιση δομής ανατάση, όπου με μεγάλες σφαίρες συμβολίζεται το οξυγόνο και με μικρές σφαίρες το τιτάνιο.....	45
Σχήμα 1.8.5 και σχήμα 1.8.6: Απεικόνιση δομής μπρουκίτη	45
Σχήμα 1.9.1: Απεικόνιση του μηχανισμού αντιβακτηριακής δράσης του διοξειδίου του τιτανίου.....	48
Σχήμα 1.9.2: Απεικόνιση του μηχανισμού αντιβακτηριακής δράσης του διοξειδίου του τιτανίου σε κύτταρα του βακτηρίου <i>E.coli</i>	48

Σχήμα 3.1: Απεικόνιση περιβάλλοντος εργασίας λογισμικού ColloidFit.....	63
--	----

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ:

Διαγράμματα 4.1.1-4.1.6: Κανονικοποιημένη συγκέντρωση (Normalized concentration) συναρτήσει του χρόνου όπου απεικονίζεται ο τρόπος δράσης χαλαζιακής άμμου, GO και TiO ₂ στο βακτήριο <i>E.coli</i> με παρουσία των άλλων μικροοργανισμών (mo).....	66
Διαγράμματα 4.2.1-4.2.6: Κανονικοποιημένη συγκέντρωση (Normalized concentration) συναρτήσει του χρόνου όπου απεικονίζεται ο τρόπος δράσης χαλαζιακής άμμου, GO και TiO ₂ στο βακτήριο <i>E.faecalis</i> με παρουσία των άλλων μικροοργανισμών (mo).....	71
Διαγράμματα 4.3.1-4.3.6: Κανονικοποιημένη συγκέντρωση (Normalized concentration) συναρτήσει του χρόνου όπου απεικονίζεται ο τρόπος δράσης χαλαζιακής άμμου, GO και TiO ₂ στο βακτήριο <i>St.aureus</i> με παρουσία των άλλων μικροοργανισμών (mo).....	76
Διάγραμμα 4.4.1: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου.....	79
Διάγραμμα 4.4.2: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία άμμου.....	80
Διάγραμμα 4.4.3: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία GO.....	81
Διάγραμμα 4.4.4: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία GO και άμμου.....	82
Διάγραμμα 4.4.5: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία TiO ₂	83
Διάγραμμα 4.4.6: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία TiO ₂ και άμμου.....	83

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ:

Πίνακας 1.4.1: Παράθεση του τρόπου δράσης διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων σε ιούς και βακτήρια.....	31
Πίνακας 4.1.1: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του <i>E.coli</i> παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με απουσία χαλαζιακής άμμου.....	64
Πίνακας 4.1.2: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του <i>E.coli</i> παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με παρουσία χαλαζιακής άμμου.....	64
Πίνακας 4.1.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης πειραματικών αποτελεσμάτων του βακτηρίου <i>E.coli</i> από την έκφραση ψευδο-πρώτης τάξης μέσω του λογισμικού ColloidFit, όπου λ ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής του ρυθμού αδρανοποίησης, λ_0 ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης και α ο συντελεστής ανθεκτικότητας	67
Πίνακας 4.2.1: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του <i>E.faecalis</i> παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με απουσία χαλαζιακής άμμου.....	69
Πίνακας 4.2.2: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του <i>E.faecalis</i> παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με παρουσία χαλαζιακής άμμου.....	69
Πίνακας 4.2.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης πειραματικών αποτελεσμάτων του βακτηρίου <i>E.faecalis</i> από την έκφραση ψευδο-πρώτης τάξης μέσω του λογισμικού ColloidFit, όπου λ ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής του ρυθμού αδρανοποίησης, λ_0 ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης και α ο συντελεστής ανθεκτικότητας.....	72
Πίνακας 4.3.1: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του <i>St.aureus</i> παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με απουσία χαλαζιακής άμμου.....	74
Πίνακας 4.3.2: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του <i>St.aureus</i> παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με παρουσία χαλαζιακής άμμου.....	74
Πίνακας 4.3.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης πειραματικών αποτελεσμάτων του βακτηρίου <i>St.aureus</i> από την έκφραση ψευδο-πρώτης τάξης μέσω του λογισμικού ColloidFit, όπου λ ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής του ρυθμού αδρανοποίησης, λ_0 ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης και α ο συντελεστής ανθεκτικότητας.....	77

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μία από τις περιβαλλοντικές προκλήσεις την οποία καλείται να αντιμετωπίσει η επιστήμη του μηχανικού Περιβάλλοντος είναι η προστασία αλλά και η αποκατάσταση επιφανειακών και υπογείων υδάτων. Για να μπορεί σε κάθε περίπτωση αυτό να καταστεί εφικτό θα πρέπει να είναι γνωστοί όλοι οι μηχανισμοί οι οποίοι επηρεάζουν τη δράση του μηχανικού. Στις πλείστες των περιπτώσεων η ανάγκη για προστασία και αποκατάσταση περιβαλλοντικών συστημάτων είναι αποτέλεσμα ανθρωπογενούς δράσης.

Το νερό αποτελεί πηγή ζωής κάθε μορφής οργανισμού στον πλανήτη. Αποτελεί βασικό συστατικό όλων των ζωικών αλλά και φυτικών οργανισμών καθώς αποτελεί το 70% του συνολικού βάρους τους. Ωστόσο αν και το 70% του πλανήτη μας αποτελείται από νερό, μόνο ένα 3,5% από αυτό είναι γλυκό και μόνο το 1% αυτού είναι αξιοποιήσιμο (Χρυσικόπουλος, 2017). Ταυτόχρονα, πέρα από βασικό συστατικό κάθε οργανισμού αποτελεί και κύριο πόρο διαχείρισης ανθρωπογενών δραστηριοτήτων. Πέρα από τη χρήση του για άρδευση γεωργικών εκτάσεων, χρησιμοποιείται για βιομηχανικές χρήσεις κατά την παραγωγή προϊόντων, για οικιακούς σκοπούς ακόμη και για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω υδροηλεκτρικών φραγμάτων. Για την κάλυψη όλων των αναγκών αυτών πραγματοποιούνται αντλήσεις από υπόγειους ή επιφανειακούς υδροφόρους ορίζοντες. Η υπεράντλησή τους τα τελευταία χρόνια έχει οδηγήσει στη σημαντική μείωση των αποθεμάτων γλυκού νερού σε τέτοιο βαθμό ώστε να γίνεται λόγος για φαινόμενα λειψυδρίας για τις επόμενες γενεές.

Έως τώρα το νερό θεωρούνταν ανανεώσιμος πόρος και γι' αυτό η εκμετάλλευσή του δεν προκαλούσε ιδιαίτερες ανησυχίες. Πλέον, αποτελεί αντικείμενο εκτεταμένων ερευνών όχι μόνο η διαχείρισή των απομεινάντων αλλά και η αποκατάσταση των υποβαθμισμένων ποιοτικών αποθεμάτων. Η υποβάθμιση της ποιότητας υπογείων και επιφανειακών αποθεμάτων φρέσκου νερού είναι αποτέλεσμα ανθρωπογενούς δραστηριότητας. Συχνά προκαλείται από παράνομη διάθεση ανεπεξέργαστων αστικών και αγροβιομηχανικών αποβλήτων, από διαρροές σε σωλήνες αποχετευτικού συστήματος, σπηπικές δεξαμενές, καταβόθρες, από επιφανειακή απορροή λιπασμάτων και φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται κατά την εκμετάλλευση γεωργικών εκτάσεων κα.

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετάται η ταυτόχρονη ύπαρξη δύο διαφορετικών τύπων ρύπων, η οποία μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση υδάτινων ή και εδαφικών συστημάτων. Ο πρώτος τύπος αφορά στην ύπαρξη βιοκολλοειδών, ενώ ο δεύτερος στην ύπαρξη νανοσωματιδίων σε περιβαλλοντικά συστήματα. Και οι δύο τύποι ρύπων μπορούν μεμονωμένα να προκαλέσουν σημαντικά προβλήματα στην ισορροπία ενός συστήματος, αλλά τον τελευταίο καιρό ο συνδυασμός τους αποτελεί αντικείμενο μελέτης διαφόρων επιστημονικών κλάδων. Ωστόσο, να αναφερθεί ότι οι δύο παραπάνω τύποι ρύπων εξετάστηκαν και σε συνδυασμό με χαλαζιακή άμμο για την προσομοίωση εδαφικών συστημάτων, καθώς αποτελεί το πιο συχνό ορυκτό στη Γη. Αν και ο όρος βιοκολλοειδή περιλαμβάνει ιούς, βακτήρια, πρωτόζωα (Bicki, 1984), στα πλαίσια της εργασίας αυτής μελετώνται τρία βακτήρια (*E.coli*, *E.faecalis*, *St.aureus*). Τα βακτήρια *E.coli*, *E.faecalis*, είναι βακτήρια εντερικής προέλευσης και στο περιβάλλον υπάρχουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.

Ωστόσο, δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις κατά τις οποίες ο αριθμός τους συναντάται αυξημένος σε υπόγεια και επιφανειακά νερά. Η μόλυνση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων συχνά είναι

αποτέλεσμα παράνομης διάθεσης υγρών αστικών αποβλήτων των οποίων η σύσταση είναι βεβαρυμμένη με αυτά τα βακτήρια, τα οποία αποτελούν δείκτες περιττωματικών ουσιών. Τέτοιου τύπου προβλήματα απαιτούν άμεση και αποτελεσματική παρέμβαση για την αντιμετώπισή τους λόγω της σπουδαιότητας ύπαρξης καλής ποιότητας νερού. Τα προβλήματα γίνονται εντονότερα για την περίπτωση μόλυνσης υπογείων υδάτων καθώς αποτελεί κύρια προέλευση πόσιμου νερού. Σε τέτοιες περιπτώσεις σημαντικό είναι το πρόβλημα να γίνει άμεσα αντιληπτό. Σε διαφορετική περίπτωση ανάλογα το είδος των γεωλογικών σχηματισμών (πορώδες, σύσταση, ύπαρξη καρστικών πετρωμάτων) και του είδους του υδροφορέα, η καταστροφή η οποία μπορεί να προκληθεί είναι δυνατόν να είναι τεράστια και μη αναστρέψιμη.

Με τον όρο νανοσωματίδια, ορίζονται σωματίδια των οποίων η διάμετρος κυμαίνεται από 1-100nm. Η προέλευσή τους μπορεί να είναι φυσική είτε συνθετική και λόγω των μοναδικών φυσικοχημικών ιδιοτήτων που διαθέτουν η εφαρμογή τους έχει αυξηθεί (Yu et al. 2011; Zhao et al. 2014). Πιο συγκεκριμένα, μερικοί μόνο από τους τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή τα νανοσωματίδια είναι για την παρασκευή καλλυντικών, για απορρόπηση υγρών αποβλήτων, για ηλεκτρονικές συσκευές κ.α που θα αναφερθούν παρακάτω. Στην οικογένεια των νανοσωματιδίων κατατάσσονται διάφορα μέταλλα και οξείδια μετάλλων, νανοσωματίδια άνθρακα και μαγνητικά νανοσωματίδια. Για τις ανάγκες της εργασίας αυτής και για την διερεύνηση της επιρροής που αυτά ασκούν στους μικροοργανισμούς χρησιμοποιούνται το οξείδιο του γραφενίου (GO) το οποίο είναι οργανικό νανοσωματίδιο και το διοξείδιο του τιτανίου TiO_2 το οποίο είναι ανόργανο. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ξαφνική και αυξημένη χρήση των νανοσωματιδίων στα πλαίσια της εξέλιξης της τεχνολογίας έχει προκαλέσει ανησυχία για την τύχη και τη συμπεριφορά τους κατά τη διάθεσή τους στο περιβάλλον.

1.1 ΚΟΛΛΟΕΙΔΗ-ΒΙΟΚΟΛΛΟΕΙΔΗ

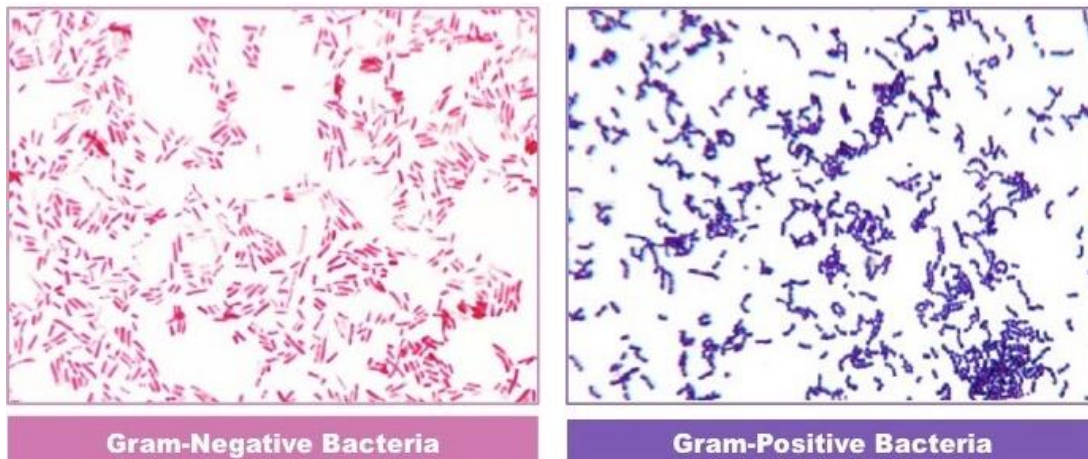
Με τον όρο κολλοειδή, εννοούμε σύνθετα μίγματα φυσικών, χημικών και βιολογικών φάσεων που ορίζονται ως υλικά στερεής φάσης. Το ενδιαφέρον διάφορων επιστημονικών κλάδων έχει προσελκύσει η συμπεριφορά, η τύχη και η μεταφορά τους σε διάφορα φυσικά συστήματα καθώς μπορούν να υπάρχουν σε οποιαδήποτε φάση πέραν αυτής της αέριας (Baalousha, 2007). Τα υλικά αυτά διαθέτουν τουλάχιστον μία διάσταση στην περιοχή 1nm-1μm και εκτιμάται ότι διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο σε περιβαλλοντικά ζητήματα όπως η αποκατάσταση ρυπασμένων εδαφών, αλλά και η προστασία υπογείων και επιφανειακών πόσιμων υδάτων (Peng, 2017). Υπάρχουν διάφορα είδη κολλοειδών, μεταξύ αυτών βιοκολλοειδή (ιοί, βακτήρια και πρωτόζωα), χουμικές ουσίες, ορυκτά ιζήματα (κυρίως οξείδια σιδήρου, αλουμινίου, ασβεστίου και μαγνησίου, υδροξείδια, ανθρακικά άλατα, πυριτικά άλατα και φωσφορικά άλατα), θραύσματα πετρωμάτων και ορυκτών και μακρομοριακά συστατικά οργανικής ύλης (Sen and Khilar, 2006; McCarthy and McCay, 2004). Τα φυσικά κολλοειδή περιλαμβάνουν συμπαγή ανόργανα κολλοειδή ή και γεωκολλοειδή (άργιλοι), μεγάλα και άκαμπτα βιοπολυμερή (0,1-1μm) και φουλβικές ενώσεις που προέρχονται από το έδαφος (μερικά νανόμετρα) (Baalousha, 2007). Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι τα νανοσωματίδια είναι τα μικρότερα σε μέγεθος σε σχέση με τα υπόλοιπα κολλοειδή (<100nm) (Lead and

Wilkinson, 2006). Ωστόσο, για τον πλήρη προσδιορισμό του ρόλου τους απαραίτητη είναι η αναγνώριση αφενός της μορφολογίας, δομής και σύνθεσης των κολλοειδών και αφετέρου των πηγών προέλευσής τους και των επιπτώσεων που προκαλούν στα φυσικά συστήματα. Αν και εξαιτίας της πολυπλοκότητας και της ετερογένειας που παρουσιάζουν τα κολλοειδή, αυτό δεν είναι εύκολο (Baalousha, 2007), στη συνέχεια του κεφαλαίου θα δοθεί μία προσέγγιση μέσω βιβλιογραφικής ανασκόπησης.

1.2 ΚΟΛΛΟΕΙΔΕΙΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Λόγω του ότι τα βακτήρια είναι σύνθετοι ζωντανοί μικροοργανισμοί οι οποίοι προσαρμόζονται εύκολα στο περιβάλλον τους, η αποσαφήνιση και ο προσδιορισμός των κολλοειδών ιδιοτήτων τους απαιτεί συνεργασία πολλών επιστημονικών κλάδων (Ubbink, 2007). Πολλές φορές για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων τους χρησιμοποιούνται τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για την μελέτη αμιγών κολλοειδών συστημάτων. Μαθηματικά μοντέλα τα οποία χρησιμοποιούνται για την πρόβλεψη της συμπεριφοράς και κίνησής τους στους υδροφορείς, τα λαμβάνουν υπόψη είτε ως σωματίδια (κολλοειδή) είτε ως διαλυμένα μόρια (Chrysikopoulos and Sim, 1996). Το μέγεθος το οποίο φτάνει μέγιστο στο 1μm, το σχήμα τους άλλοτε ραβδοειδές και άλλοτε σφαιρικό, οι φυσικές ιδιότητές τους αλλά και η επικάλυψή τους με μακρομόρια είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά αυτά που επιτρέπουν την χρήση τεχνικών, όπως σκέδαση φωτός ή ηλεκτροφορητική κινητικότητα για τη πρόβλεψη της συμπεριφοράς τους. Το γεγονός ότι στις πλείστες των περιπτώσεων είναι μονοδιασπαρμένοι, με εξαίρεση τον *Staphylococcus aureus*, που συχνά συναντάται σε αλυσίδες, αυξάνει την πιθανότητα να διαθέτουν ομοιόμορφες κολλοειδείς επιφανειακές ιδιότητες. Ωστόσο, το χαρακτηριστικό τους αυτό δεν λύνει τα προβλήματα που αντιμετωπίζει η μελέτη τους, καθώς λόγω του ότι τα βακτήρια είναι ζωντανοί οργανισμοί έχουν την δυνατότητα να τροποποιούν την σύνθεση της επιφάνειάς τους κατά την φάση ανάπτυξης. Αυτό παρατηρείται ιδιαίτερα στα παθογόνα βακτήρια τα οποία διαθέτουν βιοχημικά διακριτές επιφανειακές ομάδες για την ειδική αναγνώριση των καταλλήλων θέσεων πρόσδεσής τους στις επιφάνειες του ξενιστή (Ubbink, 2007; Waar, 2005).

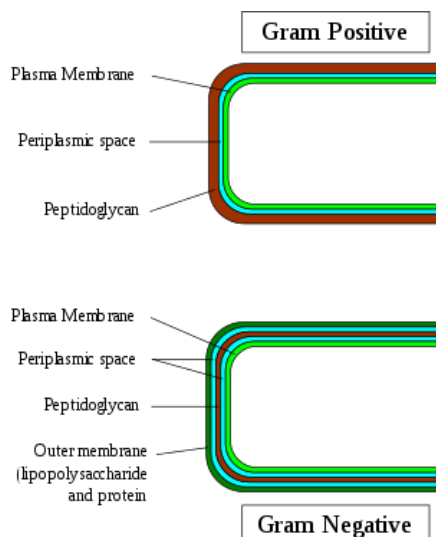
Μία διάκριση στην οποία υπόκεινται τα βακτήρια βάσει του κυτταρικού τοιχώματός τους είναι σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Η ταξινόμηση αυτή επινοήθηκε περίπου 100 χρόνια πριν περίπου από τον Δανό γιατρό Hans Gram, ο οποίος μέσω μιας τεχνικής η οποία χρησιμοποιεί ως βάση το κρυσταλλικό ιώδες ή ιώδες της γεντιανής για χρώση των βακτηρίων. Έπειτα από έκπλυση με αιθυλική αλκοόλη τα βακτήρια είτε αποχρωματίζονται είτε διατηρούν ένα βαθύ μπλε χρώμα. Εκείνα τα οποία αποχρωματίζονται είναι τα Gram αρνητικά, ενώ εκείνα τα οποία διατηρούν το χρώμα τους είναι τα Gram θετικά.



Σχήμα 1.2.1: Απεικόνιση Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων έπειτα από χρώση τους με ιώδες χρώμα Πηγή: Wikipedia

Η Gram ταξινόμηση των βακτηρίων είναι πολύ σημαντική καθώς πολλές κυτταρικές ιδιότητες μπορούν να συσχετιστούν με το κυτταρικό περίβλημα (Prochnow, 2016). Τα θετικά Gram βακτήρια διαθέτουν ένα παχύ (20-80nm) κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης (sacculus) που προστατεύει τη μεμβράνη του πλάσματος που βρίσκεται στο εσωτερικό. Αν και το κυτταρικό τοίχωμα των Gram αρνητικών, το οποίο αποτελείται επίσης από πεπτιδογλυκάνη είναι λεπτότερο από αυτό των θετικών <10nm, η δομή του είναι πιο περίπλοκη και διαθέτουν μία επιπλέον εξωτερική μεμβράνη με διάφορους πόρους, η οποία αποτελείται από πρωτεΐνες, λιποσακχαρίτες και φωσφολιπίδια. Το κενό μεταξύ του δικτύου πεπτιδογλυκάνης και της εξωτερικής μεμβράνης καλείται περιπλασματικός χώρος (Ubbink, 2007). Τα Gram θετικά βακτήρια διαθέτουν στο κυτταρικό τοίχωμά τους υδρόφοβη αμινοξική αλανίνη ενώ τα Gram αρνητικά διαθέτουν στο κυτταρικό τους τοίχωμα υδρόφιλη πλευρά με καρβοξύλιο, αμίνη ή υδροξύλιο. Στα Gram θετικά βακτήρια παγιδεύεται η ένωση ιωδίου μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταροπλασματικής μεμβράνης του. Αντίθετα στα Gram αρνητικά βακτήρια η απομάκρυνση λιπιδικών ουσιών από το κυτταρικό τοίχωμα επιτρέπει στα κύτταρα με ξέπλυμα με αλκοόλη να εξαφανιστούν.

Και για τους δύο τύπους βακτηρίων τα βιομόρια που καλύπτουν το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα είναι αυτά τα οποία καθορίζουν τις επιφανειακές ιδιότητες των βακτηρίων και συνεπώς και τις αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον. Όσον αφορά στα Gram θετικά βακτήρια τα βιομόρια αυτά που καλύπτουν το στρώμα της πεπτιδογλυκάνης στις πλείστες των περιπτώσεων είναι πολυσακχαρίτες ενώ για τα Gram αρνητικά βακτήρια το αντίστοιχο στρώμα καλύπτεται από λιποπολυσακχαρίτες οι οποίοι ευθύνονται για την παθογένεια των αντίστοιχων βακτηρίων (Ubbink, 2007). Σύμφωνα με αναφορές του Jay (1998), τα Gram θετικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα Gram αρνητικά σε υψηλές θερμοκρασίες, κάτι που συνιστά έναν από τους βασικότερους για την αδρανοποίηση των βακτηρίων όπως θα αναφερθεί παρακάτω.



Σχήμα 1.2.2: Απεικόνιση της δομής των Gram θετικών και Gram αρνητικών βακτηρίων. Πηγή: Wikipedia

Περαιτέρω ταξινομήσεις οι οποίες επίσης επηρεάζουν τις ιδιότητες των βιοκολλοειδών αφορούν στο σχήμα, στη δομή, τη μορφολογία και στο μέγεθος των βακτηρίων. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται μία αναφορά στα χαρακτηριστικά καθενός από τα τρία βακτήρια τα οποία μελετήθηκαν στην διπλωματική εργασία αυτή.

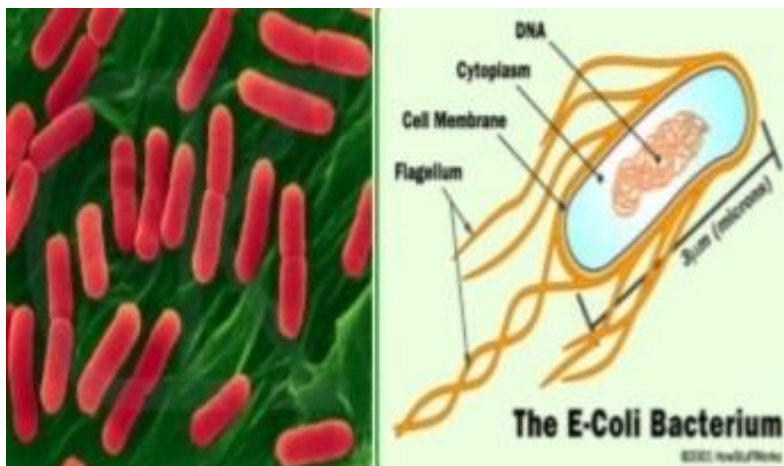
Escherichia coli

Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E.coli*) ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και είναι παρόν στις εντερικές οδούς των θερμόαιμων ζώων. Το βακτήριο αυτό συχνά χρησιμοποιείται ως δείκτης για την εκτίμηση μικροβιολογικού κινδύνου σε εδαφικά και υδατικά δείγματα καθώς απόθεσή του στο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα απελευθέρωσης περιττωματικών ουσιών. Αν και τα περισσότερα στελέχη του βακτηρίου αυτού είναι αβλαβή δεν είναι λίγες οι φορές που η παρουσία τους οδηγεί στην πρόκληση εντερικών ασθενειών. Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με τις επιπτώσεις τις οποίες προκαλούν και τα χαρακτηριστικά της μολυσματικότητάς τους διακρίνονται σε εντεροτοξigenή, εντεροπαθογόνα, σε βακτήρια που παράγουν την επικίνδυνη τοξίνη shiga και σε βακτήρια που η παρουσία τους προκαλεί εξωγενείς λοιμώξεις (Romer, 2012). Τα παθογόνα στελέχη του βακτηρίου αυτού είναι υπεύθυνα για την εμφάνιση εσωεντερικών και εξωεντερικών ασθενειών όπως λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, διάρροια, σηψαιμία ακόμη και νεογνική μηνιγγίτιδα (Kaper, 2004).

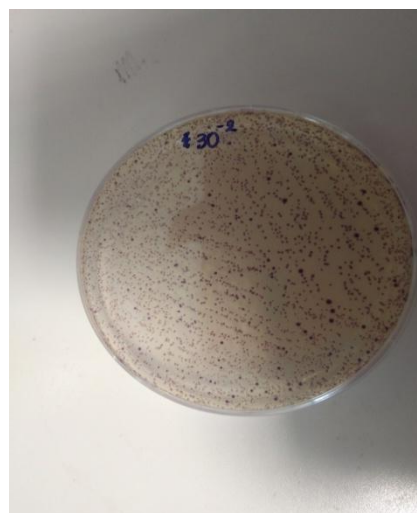
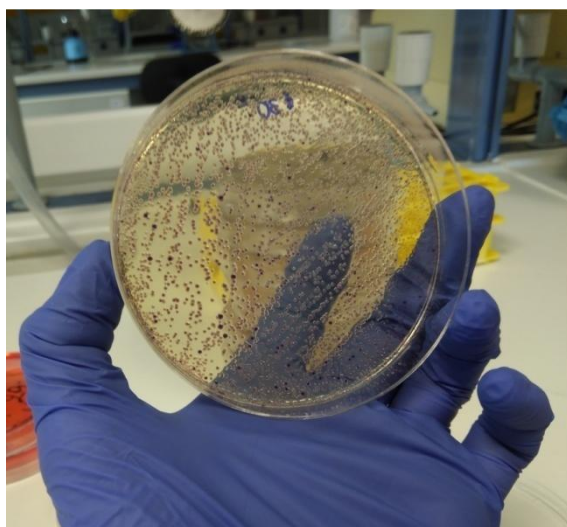
Η επιβίωση των βακτηρίων αυτών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες μεταξύ αυτών η θερμοκρασία, το κλίμα, η διαθεσιμότητα θρεπτικών υλικών, τα ποσοστά υγρασίας, η ύπαρξη κι άλλων βακτηρίων κα. Από τους Lau and Ingham (2001), έχει αποδειχτεί ότι η επιβίωσή τους παρουσιάζει μεγάλη χρονική μεταβλητότητα εξαιτίας της θερμοκρασίας και συγκεκριμένα από μερικές ημέρες για υψηλές θερμοκρασίες έως και μερικούς μήνες για χαμηλότερες.

Κατά την έκπλυση με αιθυλική αλκοόλη έπειτα από την Gram χρώση στελεχών βακτηρίων *E.coli* πραγματοποιείται πλήρης αποχρωματισμός επομένως κατατάσσονται στα Gram αρνητικά βακτήρια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω τα Gram αρνητικά βακτήρια αποτελούνται από τρία στρώματα, την κυτταροπλασματική μεμβράνη, την πεπτιδογλυκάνη και

την εξωτερική μεμβράνη. Το σχήμα των βακτηρίων αυτών εξαρτάται από την πεπτιδογλυκάνη η οποία προσδίδει ένα ραβδοειδές σχήμα (Reshes, 2008). Ωστόσο αν και το συγκεκριμένο βακτήριο αποτελεί ένα από τα πρότυπα μοντέλα στην μικροβιολογία λόγω της εκτενούς μελέτης η οποία έχει πραγματοποιηθεί σε αυτό, οι μελέτες οπτικής μικροσκοπίας έχουν περιοριστεί εξαιτίας του μικρού μεγέθους που διαθέτει το οποίο κυμαίνεται από 1 έως 3μm (Reshes, 2008).



Σχήμα 1.2.3: Απεικόνιση της δομής του βακτηρίου *E.coli* Πηγή: Kaushik (2018)



Σχήμα 1.2.4 και Σχήμα 1.2.5: Απεικόνιση αποικιών σε τρυβλία Petri έπειτα από καλλιέργεια του βακτηρίου *E.coli* στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της καταμέτρησης

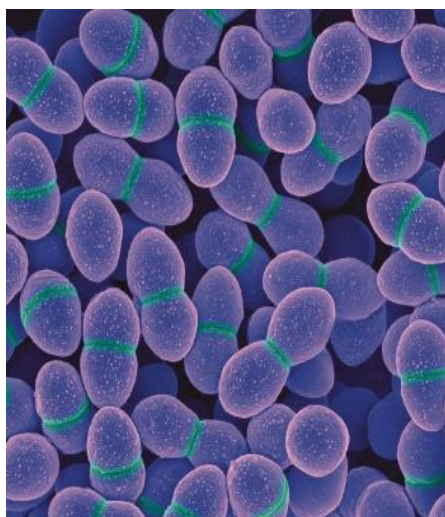
Enterococcus faecalis

Το βακτήριο αυτό όπως και η *E.coli* ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae*. Αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της εντερικής χλωρίδας ζώων, ασπόνδηλων, θηλαστικών πτηνών συμπεριλαμβανομένων και των ανθρώπων. Ο *Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) λόγω του ότι αποικίζει σε γαστρεντερικές οδούς ανθρώπων και ζώων συχνά συναντάται στο έδαφος, τα

φυτά, τα αστικά λύματα ακόμη και τα τρόφιμα. Λόγω της σταθερότητας και της ανθεκτικότητας που το χαρακτηρίζουν επιβιώνει ακόμη και σε δυσμενείς συνθήκες. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με πρόσφατη ανασκόπηση από την Zischka (2005), το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται και να επιβιώνει σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών (10-45°C) και pH(4,5-10). Ταυτόχρονα, υψηλά επίπεδα αλατότητας και η παρουσία άλλων μικροοργανισμών δεν φαίνεται να επιδρούν αρνητικά στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό του.

Τα βακτήρια αυτά αρχικά θεωρούνταν ως μέρος του γένους *Streptococci* αλλά πρόσφατα αναταξινομήθηκαν ως δικό τους γένος *Enterococci*. Για αρκετό καιρό λόγω της παρουσίας τους στις γαστρεντερικές οδούς ανθρώπων και ζώων θεωρούνταν αβλαβείς μικροοργανισμοί. Τα τελευταία χρόνια όμως αυτό έχει αλλάξει και πλέον η ύπαρξή τους προκαλεί φόβο για ενδοκαρδίτιδα, ουροποιητικές λοιμώξεις, ενδοκοιλιακές, πνευλικές και πληγές τραύματος ακόμη και επιληψίες και βακτηριαιμίες (Murray, 1990). Οι επιπτώσεις αυτές, που μπορεί να προκαλέσει η ύπαρξή τους στην υγεία, τα έχουν καταστήσει ως κορυφαία νοσοκομειακά παθογόνα (Cetinkaya, 2000). Αυτό θεωρείται ότι είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης πολλών αντιβιοτικών στα οποία τα βακτήρια αυτά έχουν αναπτύξει υψηλή ανθεκτικότητα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτού αποτελεί το αντιβιοτικό βανκομυκίνη, το οποίο πλέον αποτελεί μη αποτελεσματική θεραπεία για την καταπολέμηση του βακτηρίου αυτού.

Έπειτα από την έκπλυσή τους με αιθυλική αλκοόλη κατά την εφαρμογή της Gram χρώσης δεν παρατηρείται αποχρωματισμός των βακτηρίων αλλά παραμένει το ιώδες χρώμα. Σύμφωνα με αυτό τα *Enterococcus faecalis* βακτήρια ταξινομούνται ως Gram θετικά βακτήρια. Όσον αφορά την μορφολογία τους, τα περισσότερα από αυτά είναι ωοειδή με μέση διάμετρο που κυμαίνεται μεταξύ 0,5-1μm. Είναι διατεταγμένα ως ζεύγη ή μικρές αλυσίδες με αποικίες οι οποίες μπορούν να είναι λείες, μη διαφανείς, σφαιρικές, λευκές ή κρεμώδεις πάνω σε τρυβλία petri οι οποίες περιέχουν κατάλληλο θρεπτικό υλικό (Atlas of Oral Microbiology, 2015).



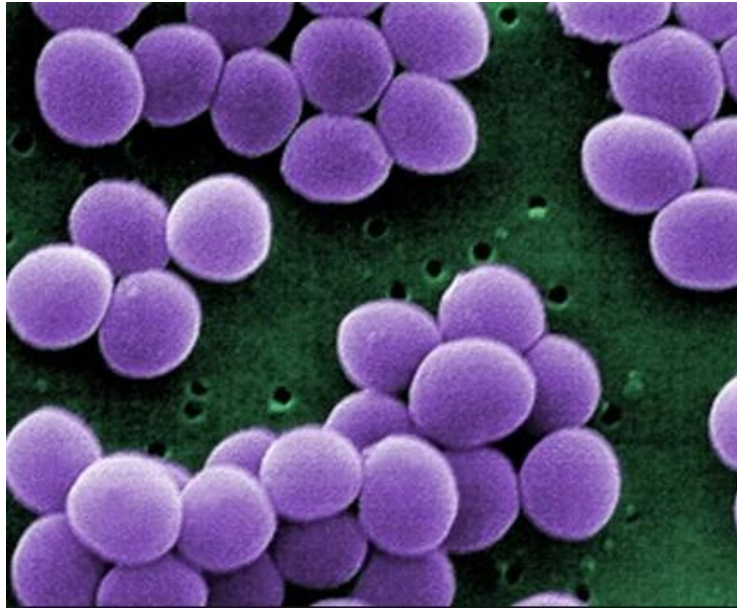
Σχήμα 1.2.6 και Σχήμα 1.2.7: Απεικόνιση του σχήματος και της διάταξης ως αλυσίδες του βακτηρίου *E.faecalis* στο χώρο Πηγή: Wikipedia

Staphylococcus aureus

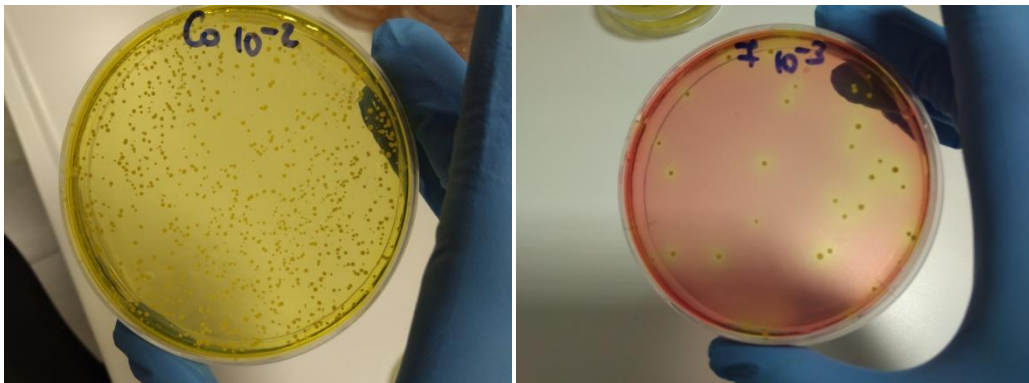
Το βακτήριο αυτό της οικογένειας *Staphylococcus* συναντάται τις περισσότερες φορές στη φυσική μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπινου σώματος και συγκεκριμένα το δέρμα, την μύτη και την αναπνευστική οδό. Όσον αφορά το σχήμα των κυττάρων του είναι στρογγυλό, με διάμετρο 0,5-2μm (Bakri, 2018) με όγκο 0,4-3 μm³ (Levin, 2015) και συχνά οι αποικίες του τείνουν να εφάπτονται με αποτέλεσμα να παρομοιάζονται ως τσαμπιά σταφυλιών. Ως προς την ταξινόμησή του με την Gram μέθοδο ανήκει στα Gram θετικά βακτήρια και επομένως κατά την χρώση του διατηρεί το ιώδες χρώμα. Με σκοπό τη διάκρισή του από άλλα βακτήρια της ίδιας οικογένειας υπόκεινται σε ταξινομήσεις βιοχημικής ταυτοποίησης όπως αυτές των καταλάσης, κοαγκουλάσης και ζύμωσης μανιτόλης. Και στις τρεις ταξινομήσεις που αναφέρθηκαν είναι θετικός ο *Staphylococcus aureus* και πραγματοποιούνται με σκοπό τη διάκρισή του από όλα τα άλλα στελέχη *Staphylococcus*.

Τα βακτήρια αυτά ανήκουν στους μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορούν να επιβιώνουν και να αναπτύσσονται σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και σε ένα εύρος θερμοκρασιών 10-45°C (Taylor, 2017). Ωστόσο αν και από μόνο του το βακτήριο αυτό δεν θεωρούνταν παθογόνο, τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ότι δρα συναινετικά με άλλους μολυσματικούς παράγοντες και προκαλούν λοιμώξεις. Αυτό, σε συνδυασμό με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά π.χ. μεθικιλίνη, οδηγεί στην παραγωγή τοξινών όπως για παράδειγμα πρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας οι οποίες οδηγούν ακόμη και στην απενεργοποίηση αντισωμάτων. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι το βακτήριο αυτό μπορεί να παραμείνει αδρανές στο σώμα ενός ξενιστή χωρίς να προκαλεί συμπτώματα και να είναι ανιχνεύσιμο. Πέρα από δερματικές παθήσεις για τις οποίες οφείλεται το βακτήριο αυτό, προκαλεί αναπνευστικές λοιμώξεις ακόμη και τροφική δηλητηρίαση. Θεωρείται μεσόφιλο καθώς επιβιώνει σε ένα εύρος θερμοκρασιών 7-48°C ενώ μόνο σε εύρος 37-40°C μπορεί να παράγει την εντεροτοξίνη.

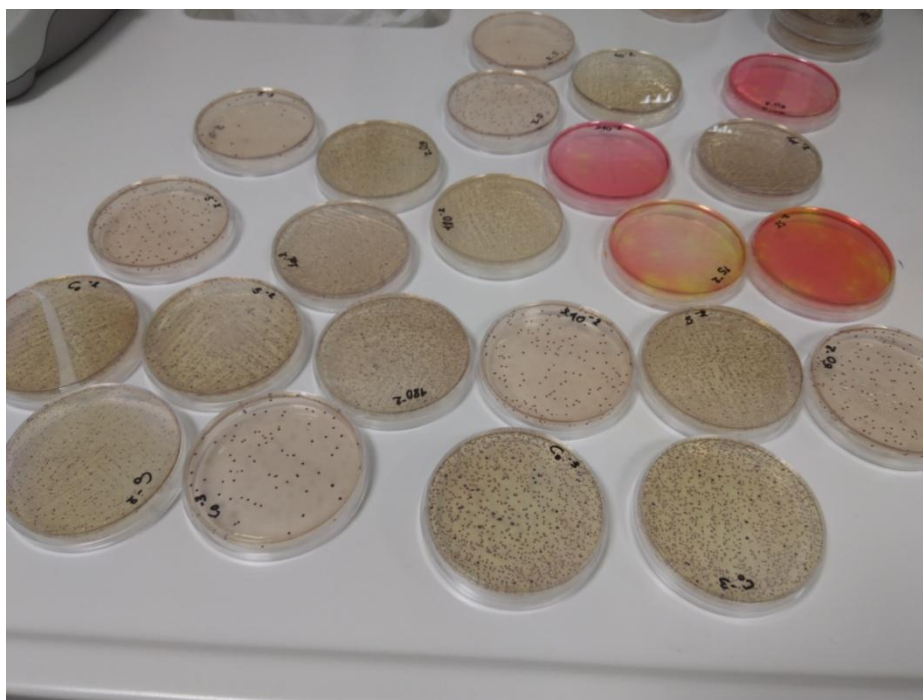
Τα βακτηριακά του κύτταρα αποτελούνται σε ένα ποσοστό 90% από πεπτιδογλυκάνη, ενώ το υπόλοιπο 10% αποτελείται από άλλες επικαλύψεις όπως τείκό οξύ (Bakri, 2018). Όταν το βακτήριο αυτό υπάρξει σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10⁵ cfu/ml είναι ικανό να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες ακόμη και σε χαμηλές τιμές pH (Bakri, 2018). Κατά την αδρανοποίησή του επηρεάζονται αρχικά το κυτταρικό τοίχωμα, έπειτα η κυτταρική μεμβράνη και η διαδικασία μεταφοράς θρεπτικών ουσιών, το ένζυμο και στο τέλος η πρωτεϊνική σύνθεση και το γαλακτικό οξύ (Bakri, 2018).



Σχήμα 1.2.8: Απεικόνιση διάταξης στο χώρο με μορφή τσαμπιών του βακτηρίου *St.aureus* Πηγή: Wikipedia



Σχήμα 1.2.9 και σχήμα 1.2.10: Απεικόνιση αποικιών σε τρυβλία Petri έπειτα από καλλιέργεια του βακτηρίου *St.aureus* στο εργαστήριο κατά τη διάρκεια της καταμέτρησης



Σχήμα 1.2.11: Τρυβλία petri από τα τρία βακτήρια για καταμέτρηση αποικιών στο εργαστήριο

1.3 ΜΟΛΥΝΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΑΠΟ ΒΙΟΚΟΛΛΟΕΙΔΗ ΚΑΙ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΠΟΥ ΠΡΟΚΑΛΟΥΝ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί με τον όρο βιοκολλοειδή αναφερόμαστε σε παθογόνους μικροοργανισμούς όπως μύκητες, βακτήρια, πρωτόζωα και ιούς.

Με τον όρο μικροοργανισμός εννοούμε κάθε μικροσκοπικό μικροοργανισμό ο οποίος δεν μπορεί να παρατηρηθεί χωρίς την χρήση ειδικού μικροσκοπίου και δηλαδή είναι σε μέγεθος μικρότερο του 0,1mm. Συχνά θεωρείται ότι με τον όρο μικροοργανισμοί αναφερόμαστε μόνο σε μονοκύτταρους μικροοργανισμούς. Αντίθετα, υπάρχουν και πολυκύτταροι μικροοργανισμοί οι οποίοι, όμως, αποτελούν την μειονότητα οι οποίοι επίσης δεν μπορούν να παρατηρηθούν με γυμνό μάτι. Λόγω του ότι στην κατηγορία αυτή ανήκουν μονοκύτταροι και πολυκύτταροι μικροοργανισμοί διαφέρουν μεταξύ τους όχι μόνο ως προς το μέγεθος, τη δομή, τη μορφολογία, τον μεταβολισμό και ως προς άλλα χαρακτηριστικά.

Όλοι οι μικροοργανισμοί κατατάσσονται σε έναν από τους τρεις τομείς της ζωής: Αρχαία, Βακτήρια και Ευκάρυα. Μία ακόμη κατηγοριοποίηση στην οποία υπόκεινται οι μικροοργανισμοί είναι τα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Στα προκαρυωτικά κύτταρα ανήκουν τα Αρχαία και τα Βακτήρια, ενώ στα ευκαρυωτικά κύτταρα ανήκουν τα Ευκάρυα, οι μύκητες, τα άλγη και τα πρωτόζωα. Όλοι οι μικροοργανισμοί που ανήκουν στα προκαρυωτικά κύτταρα, δεν διαθέτουν κυτταρικό τοίχωμα ή άλλο δεσμό μεμβράνης. Αντίθετα, στα ευκαρυωτικά κύτταρα ανήκουν οι μικροοργανισμοί των οποίων τα κύτταρα περιέχουν πυρήνα. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι στους μικροοργανισμούς ανήκουν και ιοί οι οποίοι αποτελούν μία κατηγορία από μόνοι τους, καθώς είναι ακύτταροι και αποτελούνται από πρωτεΐνες και γενετικό υλικό.

Οι μικροοργανισμοί διαφέρουν μεταξύ τους όχι μόνο ως προς το μέγεθος αλλά και ως προς τη δομή, το μεταβολισμό και ως προς πολλά άλλα χαρακτηριστικά. Αν και οι περισσότεροι είναι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί (βακτήρια), υπάρχουν και πολυκύτταροι (πολλοί μύκητες) ακόμη και ακύτταροι μικροοργανισμοί όπως οι ιοί.

Η ανάγκη διερεύνησης των μηχανισμών που καθορίζουν και τη συμπεριφορά και μεταφορά των βιοκολλοειδών στο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα της ανάδειξης των δυσχερών καταστάσεων που προκαλούν σε ζωικούς και φυτικούς οργανισμούς. Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα συστήματα υπογείων υδάτων παρέχουν το 25-40% του πόσιμου νερού. Η ικανότητα εκμετάλλευσής τους ως πόρος βασίζεται στο γεγονός ότι είναι ελεύθερα από βιοκολλοειδή (Bhattacharjee, 2002). Ωστόσο, αν και τα υπόγεια υδάτινα συστήματα είναι λιγότερο επιρρεπή σε μόλυνση από βιοκολλοειδή σε σχέση με τα επιφανειακά, τον τελευταίο καιρό αυξημένος αριθμός βιοκολλοειδών συναντάται σε αυτά (Chrysikopoulos and Aravantinou, 2014). Το φαινόμενο αυτό έχει καταστήσει αναγκαία την διερεύνηση των πηγών προέλευσής τους στους περιβαλλοντικούς πόρους αυτούς με σκοπό τον περιορισμό της έκθεσής τους αλλά και τον προσδιορισμό τους, ώστε η παρέμβαση να είναι άμεση και οι πιθανές επιπτώσεις ελαχιστοποιημένες.

Μία ακόμη από τις περιπτώσεις κατά τις οποίες συναντώνται βιοκολλοειδή όπως ιοί σε υπόγεια υδατικά συστήματα εξαιτίας ανθρωπογενών δραστηριοτήτων αφορά στην επαναφόρτιση υπογείων υδάτων. Πιο συγκεκριμένα, η επαναφόρτιση υπογείων υδροφορέων λαμβάνει χώρα σε περιοχές όπου εξαιτίας της υπεράντλησης γεωτρήσεων η στάθμη των υδροφορέων έχει πέσει σε τέτοιο βαθμό όπου η επαναφόρτισή τους κρίνεται αναγκαία. Η αναστροφή της ταχείας εξάντλησης χρησιμοποιείται ως μέθοδος παρεμπόδισης του φαινομένου υφαλμύρισης, δηλαδή της εισόδου νερού με υψηλή περιεκτικότητα αλατιού στους παράκτιους υδροφόρους ορίζοντες. Το μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι ότι η επαναφόρτιση των υδροφορέων στις πλείστες των περιπτώσεων πραγματοποιείται με την χρήση ανακυκλωμένων λυμάτων (Chrysikopoulos et al., 1996; Levine, 2004). Εάν τα ανακυκλωμένα αυτά λύματα που χρησιμοποιούνται δεν πληρούν τις απαιτούμενες περιβαλλοντικές προϋποθέσεις πριν διοχετευθούν στον υδροφόρα τότε πιθανόν να εμπεριέχουν βιοκολλοειδή και άλλα συστατικά τα οποία να αλλοιώσουν την ποιότητά του. Με τον τρόπο αυτό αντί να εμπλουτιστούν τα οικοσυστήματα εκείνα θα υποβαθμιστούν εντελώς και πλέον το νερό το οποίο θα περιέχουν θα είναι ακατάλληλο για την οποιαδήποτε χρήση. Το μέγεθος του προβλήματος που θα προκύψει ωστόσο εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά του ίδιου του υδροφόρα αλλά και από τα συστατικά τα βιοκολλοειδή τα οποία περιέχει.

Μία από τις περιπτώσεις κατά την οποία πρόσφατα έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη βιοκολλοειδών σε εδαφικά και υδατικά συστήματα αφορά στα αστικά λύματα. Πιο συγκεκριμένα, αν και κατά την επεξεργασία των αστικών λυμάτων στις ΕΕΛ εφαρμόζονται διεργασίες απομάκρυνσης και αδρανοποίησης των μικροοργανισμών που εμπεριέχονται δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις όπου στην εκροή ο αριθμός τους είναι μεγαλύτερος από αυτόν των νομοθετικών ορίων. Όπως έχουν πρόσφατα αναφέρει οι Liguan Li et al. (2018) οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων πλέον θεωρούνται δεξαμενές και πηγές γονιδίων αντιστάσεως αντιβιοτικών.

Τα βιοκολλοειδή και συγκεκριμένα τα βακτήρια εντερικής προέλευσης που εμπεριέχονται στα προς επεξεργασία λύματα κατά την μεταφορά και εξέλιξη των διεργασιών εκτίθενται σε φαρμακευτικά υπολείμματα με αποτέλεσμα να ευνοείται η πιθανή γενετική μεταβολή τους. Τα βακτήρια που είναι απλά προκαρυωτικά μικρόβια μπορούν να μεταβολιστούν και αναπαράγονται πολύ γρήγορα, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζονται με αξιοσημείωτη ενετική πλαστικότητα και προσαρμοστικότητα. Η ύπαρξη ενός μόνο βακτηριδιακού κυττάρου με μια γενετική μεταβολή που προσδίδει αντίσταση σε αντιβιοτικό παράγοντα που απαντάται στο περιβάλλον, είναι

επαρκής για τον επακόλουθο πολλαπλασιασμό νέων κυττάρων ανθεκτικών στα αντιβιοτικά (Perper et al., 2018). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα οι διεργασίες με τις οποίες είναι σχεδιασμένες οι εγκαταστάσεις να μην διαθέτουν δυναμικό για την απομάκρυνση ή και πλήρη αδρανοποίηση τέτοιων βακτηρίων. Έτσι, οι διεργασίες απολύμανσης των εγκαταστάσεων όπως η χλωρίωση να μην είναι αποτελεσματικές και τέτοιου τύπου βιοκολλοειδή να εμπεριέχονται στο ρεύμα εκροής και να εναποτίθενται σε κάποιο φυσικό αποδέκτη.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι στις πλείστες των περιπτώσεων η ύπαρξη βιοκολλοειδών σε εδαφικά ή υδάτινα συστήματα είναι αποτέλεσμα κάποιας διαρροής. Πολλές από αυτές παρατηρούνται κατά την επεξεργασία των αστικών αποβλήτων όπου οι διεργασίες πραγματοποιούνται σε δεξαμενές των οποίων το επάνω μέρος είναι ακάλυπτο. Έτσι είτε σε περιπτώσεις έντονων κατακρημνίσεων είτε κατά τη βλάβη κάποιας αντλίας η οποία ρυθμίζει την παροχή των λυμάτων, το εσωτερικό της δεξαμενής υπερχειλίζει και ρέει στον χώρο της εγκατάστασης. Το ίδιο ισχύει και για γηρασμένα συστήματα επεξεργασίας πόσιμου νερού τα οποία είναι ακόμη πιο ευάλωτα σε υψηλότερα ποσοστά συντήρησης ή επισκευής του εξοπλισμού του δικτύου ή κατά την πτώση πιέσεων οδηγούν σε σενάρια προσβολής από παθογόνους μικροοργανισμούς (Ebacher et al., 2012). Παράλληλα, οι υπόνομοι, οι σηπτικές δεξαμενές και τα στραγγίδια από Χώρους Υγειονομικής Ταφής Απορριμμάτων (ΧΥΤΑ) είναι ζώνες υψηλής επικινδυνότητας για την απελευθέρωση βιοκολλοειδών (Chrysikopoulos and Aravantinou, 2014). Εάν η αντιμετώπιση του προβλήματος δεν είναι έγκαιρη και μεγάλη ποσότητα λυμάτων βρεθεί στον εδαφικό χώρο της μονάδας, το λύμα διηθείται με αποτέλεσμα την πιθανή είσοδο βιοκολλοειδών σε επιφανειακούς και υπόγειους υδροφορείς. Το αποτέλεσμα είναι το ίδιο και για την περίπτωση όπου η διαρροή πραγματοποιείται σε κάποιον αγωγό αποχέτευσης ή απλά μεταφοράς των λυμάτων. Ιδιαίτερα στις περιπτώσεις αυτές όπου η πλειονότητα των αγωγών είναι υπόγειοι η είσοδος ανεπιθύμητων συστατικών σε κάποιο περιβαλλοντικό σύστημα είναι γρηγορότερη. Η περίπτωση αυτή είναι ακόμη σοβαρότερη καθώς αφού οι αγωγοί είναι υπόγειοι, στην περίπτωση διαρροής τις περισσότερες φορές ο εντοπισμός του προβλήματος δεν λαμβάνει χώρα απευθείας και το χρόνος αντίδρασης αυξάνεται.

Πέρα από αυτά όμως πηγή βιοκολλοειδών όπως τοξικά κυανοβακτήρια ή *Legionella pneumophila* μπορεί να αποτελεί και η φυσική ύπαρξη υδάτων ιδιαίτερα στην περίπτωση που είναι στάσιμα ή θερμά (Sales-Ortells and Medema, 2014). Μία ακόμη πηγή μέσω της οποίας πραγματοποιείται μόλυνση των υδροφορέων και των εδαφικών συστημάτων από βιοκολλοειδή αφορά την υπαίθρια εκτροφή ζώων, την δραστηριοποίηση σφαγείων ή και την ύπαρξη υδρόβιων πτηνών (Sales-Ortells and Medema, 2014). Όσον αφορά την εκτροφή ζώων η διαδικασία σίτισής τους και το είδος της τροφής η οποία τους παρέχεται συχνά είναι εστία βακτηρίων όπως ζωνοσογόνα βακτήρια. Αυτό σε συνδυασμό με τα κόπρανα τα οποία πιθανόν να εμπεριέχουν εντερικά βακτήρια τα οποία επίσης δεν απομακρύνονται από τα σημεία εκτροφής συμβάλλουν στην πρόκληση μόλυνσης και υποβάθμισης των πόρων.

Όσον αφορά στις επιπτώσεις τις οποίες προκαλεί η ύπαρξη βιοκολλοειδών σε εκμεταλλεύσιμους υδατικούς πόρους οι περισσότερες αυτών αφορούν την υγεία. Πολλά είναι τα κρούσματα ασθενειών τα οποία έχουν παρατηρηθεί και συνδεθεί με την κατανάλωση υπογείων υδάτων τα οποία έχουν μολυνθεί με παθογόνους μικροοργανισμούς (Bhattacharjee, 2002). Για αρκετές αναπτυσσόμενες χώρες σε άνυδρες περιοχές κύρια πηγή πόσιμου νερού είναι τα υπόγεια ύδατα τα οποία αντλούνται από εκσκαφές ή γεωτρήσεις. Μικροβιολογικά ρυπαντικά όπως πρωτόζωα, ιοί και βακτήρια αποτελούν τους μεγαλύτερους κινδύνους στους υδατινούς πόρους. Περίπου το 70% των επιδημιών των μικροβιακών ασθενειών από τις πλωτές οδούς στις Ηνωμένες Πολιτείες έχει αποδοθεί στα υπόγεια ύδατα (Defelice, 2015). Η ύπαρξη βακτηρίων όπως *Staphylococcus aureus* σε διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα για την ύπαρξη απειλητικών για την ζωή ανθρώπινων

ασθενειών που προσβάλλουν εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως (Yang et al., 2018). Σύμφωνα με την δημοσίευση των Wang et al. (2007) 76.000.000 ασθένειες, 5000 θάνατοι και 300.000 νοσηλείες στην Αμερική ετησίως οφείλονται σε τροφικές ασθένειες εξαιτίας βακτηριδιακής μόλυνσης. Οι τροφικές αυτές ασθένειες πιθανολογείται ότι έχουν προκληθεί από βακτήρια όπως *E.coli*, *St.aureus* και *P.salmonella* (Wang et al., 2007). Γενικά, λόγω της συνύπαρξης βακτηρίων και φαρμακευτικών υπολειμμάτων κατά την επεξεργασία αστικών αποβλήτων όπως έχει αναφερθεί παραπάνω, οι παραδοσιακές αντιβιοτικές θεραπείες καθίστανται λιγότερο αποτελεσματικές καθώς τέτοιου τύπου βακτήρια εισβάλλουν στα κύτταρα ξενιστές προκαλώντας ανεπανόρθωτα προβλήματα (Yang et al., 2018). Μία ακόμη από τις μολυσματικές ασθένειες για τις οποίες είναι υπεύθυνα τα βακτήρια αφορά το βακτήριο *Vibrio Cholera* το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο διαρροϊκές ασθένειες ακόμη και σε παιδιά (Williams and Berkley, 2018).

Μία ακόμη επίπτωση η οποία αφορά την ύπαρξη βιοκολλοειδών και συγκεκριμένα βακτηρίων στα νερά πέρα από τον τομέα της υγείας αφορά πετρελαιοειδείς εργασίες. Πιο συγκεκριμένα, η έγχυση νερού για την ισορροπία της πίεσης σε σωλήνες ύδρευσης πετρελαίου μπορεί να προκαλέσει ανεπιθύμητα προβλήματα εάν περιέχει μικροοργανισμούς. Το πιο σημαντικό από αυτά είναι η διάβρωση των σωλήνων της εγκατάστασης. Για την αποφυγή τέτοιων προβλημάτων, οι εταιρείες εφαρμόζουν συστήματα παλμικών ηλεκτρικών πεδίων (PEF) τα οποία έχουν σαν αποτέλεσμα την απενεργοποίηση όποιων μικροοργανισμών εμπεριέχονται στα νερά που χρησιμοποιούνται (Xin, 2008).

Ωστόσο για την αντιμετώπιση τέτοιων προβλημάτων και των επιπτώσεων που προκαλούν έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι παρακολούθησης μικροβιακών πηγών (microbial source tracking MSC) μόλυνσης κοπράνων σε υδάτινες οδούς και χρησιμοποιούν μοριακούς δείκτες που στοχεύουν τα βακτήρια που σχετίζονται με τον ξενιστή σε ζωικά ή ανθρώπινα κόπρανα (Brown et al., 2017).

1.4 ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Ένας από τους παράγοντες ο οποίος επηρεάζει την τύχη και την επιβίωση των μικροοργανισμών έπειτα από την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον είναι η αδρανοποίησή τους. Με τον όρο αδρανοποίηση ενός μικροοργανισμού εννοούμε την εξάλειψη της δυνατότητάς του να πολλαπλασιάζεται όπως ένα ζωντανό κύτταρο (Cebrian et al., 2017). Η επαρκής γνώση για τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και τον τρόπο που αυτοί επηρεάζουν την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών είναι απαραίτητη για την εφαρμογή κατάλληλων τεχνικών αντιμετώπισής τους αλλά και αποφυγή συνθηκών που ευνοούν την επιβίωση και ανάκτηση των κυττάρων τους. Ταυτόχρονα, απαραίτητος κρίνεται και ο προσδιορισμός των κρίσιμων παραγόντων και παραγόντων αντίστασης για την ορθή ερμηνεία των κινητικών και μοντέλων που εκφράζουν και προβλέπουν την μικροβιολογική αδρανοποίηση σε ένα ευρύ φάσμα συνθηκών (Manas and Pagan, 2004).

Οι Sim and Chrysikopoulos (1996) και Chrysikopoulos and Vogler (2004) έχουν δείξει ότι τα πειραματικά δεδομένα από τις πολυάριθμες μελέτες διαλείποντος έργου αδρανοποίησης μπορούν να περιγραφούν από μια έκφραση ψευδο-πρώτης-τάξης με έναν χρονικά εξαρτημένο συντελεστή ρυθμού αδρανοποίησης ως εξής:

$$\frac{dC}{dt} = -\lambda C \quad (2.1)$$

όπου το C είναι η συγκέντρωση των αιωρούμενων μικροοργανισμών στην υγρή φάση, t είναι ο χρόνος, λ_0 είναι ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης, α είναι ο συντελεστής

ανθεκτικότητας και λ είναι ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης των αιωρούμενων μικροοργανισμών που δίνεται από:

$$\lambda(t) = \lambda_0 e^{-\alpha t} \quad (2.2)$$

Αντικαθιστώντας την εξίσωση (2.2) στην (2.1) και λύνοντας την προκύπτουσα έκφραση λαμβάνοντας υπόψη την αρχική συνθήκη $C(0) = C_0$, όπου C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών, παίρνουμε:

$$C = C_0 \left[\frac{\lambda_0}{\lambda_0 + \alpha} e^{-\lambda_0 t} + \frac{\alpha}{\lambda_0 + \alpha} e^{-\alpha t} \right] \quad (2.3)$$

Για την περιοριστική περίπτωση όπου ο συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης θεωρείται σταθερά ($\lambda(t) = \lambda$), η προηγούμενη εξίσωση καταλήγει στη μορφή:

$$\left[\frac{C_t}{C_0} \right] = -\lambda t \quad (2.4)$$

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι παράμετροι λ_0 και α μπορούν να ληφθούν με εγκατάσταση στην εξίσωση (2.3), και με εγκατάσταση στην εξίσωση (2.4), των συλλεχθέντων δεδομένων από τα στατικά ή δυναμικά διαλείποντος έργου πειράματα αδρανοποίησης ιών.

1.4.1 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΕΞΑΡΤΑΤΑΙ Η ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Ωστόσο, η τύχη και η μεταφορά των μικροοργανισμών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από ελλιπώς χαρακτηρισμένες αλληλεπιδράσεις με ποικίλες περιβαλλοντικές επιφάνειες που σχετίζονται με πληθώρα περιβαλλοντικών φυσικών, χημικών και μικροβιολογικών παραγόντων (Bradford, 2013).

Ορισμένοι από αυτούς έχουν να κάνουν με το είδος του μικροοργανισμού όπως το μέγεθος, φυσικά χαρακτηριστικά του μέσου στο οποίο βρίσκονται όπως θερμοκρασία, pH, βαθμός κορεσμού, φυσικοχημικά χαρακτηριστικά στερεής φάσης κα (Fontes, 1991). Σε αυτά να προστεθούν χημικές παράμετροι όπως η ιοντική ισχύς, η αλατότητα, αλλά και η περιβαλλοντική μικροβιακή ποικιλομορφία και η ύπαρξη διαλυτού και σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (DOC, POC) (Bradford, 2013).

Παράγοντας	Ιοί	Βακτήρια
Περιεκτικότητα υγρασίας	Αυξάνουν την μείωση στα ξηρά εδάφη	Μεγαλύτερη επιβίωση σε υγρά εδάφη
Τύπος εδάφους	Η προσρόφηση στις επιφάνειες αυξάνει τους χρόνους επιβίωσης	Αργιλικές επιστρώσεις μπορούν να εμποδίσουν τις παρασιτικές επιδράσεις. Η προσρόφηση μπορεί να αυξήσει τους χρόνους επιβίωσης

pH	Έμμεσες επιδράσεις μέσω της ικανότητας προσρόφησης. Οι περισσότεροι εντερικοί ιοί σταθεροποιούνται μεταξύ 3 και 9	Μικρότερη επιβίωση σε όξινα εδάφη
Κατιόντα	Γενικά η αύξηση κατιόντων αυξάνει την επιβίωση των ιών. Ωστόσο έχει παρατηρηθεί και το αντίθετο	Η αύξηση κατιόντων αυξάνει την προσρόφηση τους η οποία αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης
Διαλυτά οργανικά	Πιθανόν προστατεύουν τους ιούς από αδρανοποίηση. Μερικές αποδείξεις προτείνουν αναστρέψιμη μείωση της μολυσματικότητας	Αυξημένη επιβίωση και πιθανή αναγέννηση όταν υπάρχουν επαρκείς ποσότητες οργανικής ύλης.
Θερμοκρασία	Η αύξηση της θερμοκρασίας μειώνει την επιβίωση των ιών	Η χαμηλότερη θερμοκρασία αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης
Ηλιακό φως	Μικρή επιρροή στα επιφανειακά εδάφη. Στα υπόγεια νερά δεν εφαρμόζεται	Χαμηλότερη επιβίωση στα επιφανειακά εδάφη όπου το φως είναι πιο έντονο. Στα υπόγεια νερά δεν εφαρμόζεται
Μικροβιακοί παράγοντες	Η παρουσία ενδογενών μικροοργανισμών έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τους χρόνους επιβίωσης. Η επιβίωση ποικίλλει μεταξύ των τύπων των ιών	Τα ενδογενή βακτήρια τείνουν να ανταγωνίζονται τους εισαγόμενους μικροοργανισμούς.
Τύποι και είδη παθογόνων	Διαφορετικοί ιοί ποικίλουν στην ικανότητά τους να αντέχουν σε περιβαλλοντικές συνθήκες. Η επιβίωση μπορεί να ποικίλλει σε διαφορετικά περιβάλλοντα	Διαφέρει ανάλογα τη φυσιολογία των βακτηρίων, το μεταβολισμό, την ικανότητα σχηματισμού βιοφιλμ κα

Πίνακας 1.4.1: Παράθεση του τρόπου δράσης διαφόρων περιβαλλοντικών παραγόντων σε ιούς και βακτήρια, Τροποποίηση από Rorper and Marshall (1978)

pH

Ένας από τους επίσης πολύ βασικούς παράγοντες που επηρεάζει την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών και ιδιαίτερα των βακτηρίων είναι το pH. Το pH το οποίο μπορεί να είναι όξινο <7, ουδέτερο =7 ή αλκαλικό >7 μπορεί να έχει μεγάλες επιδράσεις στην δομή των μικροοργανισμών. Γενικά, κάθε περιβαλλοντικό μέσο χαρακτηρίζεται από ένα εύρος τιμών της μεταβλητής αυτής στο οποίο αναπτύσσονται οι αυτόχθονες και εισαγόμενοι μικροοργανισμοί. Ωστόσο για τους περισσότερους μικροοργανισμούς, βέλτιστο εύρος για την ανάπτυξή τους αποτελεί αυτό το οποίο είναι κοντά στο ουδέτερο και συγκεκριμένα στην περιοχή 6-7.

Επομένως η επίδραση του pH στη μικροβιολογική αδρανοποίηση είναι ελάχιστη για ουδέτερο pH και μεγαλύτερη για όξινο και αλκαλικό (Forpen and Schijven, 2006). Το ίδιο αποτέλεσμα προέκυψε και σε έρευνα που διεξάχθηκε από Wahyuni (2014) όπου συγκεκριμένα καταδείχθηκε ότι η επιβίωση βακτηρίων εντερικής προέλευσης είναι μεγαλύτερη σε αλκαλικά (66,11%) από ότι όξινα περιβάλλοντα (7,5%) και μάλιστα με μία αρκετά μεγάλη διαφορά της τάξεως 58%. Ωστόσο υπάρχουν και βακτήρια τα οποία ευδοκιμούν σε όξινες συνθήκες παρόλο που στο εσωτερικό τους το pH είναι ουδέτερο. Ταυτόχρονα υπάρχουν και άλλα που κατά την ανάπτυξή τους παράγουν οξέα με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν και το pH του περιβάλλοντος χώρου τους. Η μεταβολή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα την διακοπή της ανάπτυξής τους εκτός και αν κάποιος άλλος παράγοντας την εξουδετερώσει (Bacterial growth and pH-slideshare) . Ακραίες τιμές της μεταβλητής αυτής επηρεάζουν τις δομές των μακρομορίων. Σε αλκαλικά περιβάλλοντα όπου οι τιμές του pH είναι υψηλές οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τα σκέλη του DNA διασπώνται και τα λιπίδια υδρολύονται. Από όλα τα δομικά συστατικά των μικροοργανισμών, οι πρωτεΐνες είναι τα πιο ευαίσθητα στις μεταβολές. Ακόμη και μέτριες μεταβολές μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα την προώθηση της καταστροφικής δραστηριότητας καθώς προκαλεί αλλαγές στην αναδίπλωση των μορίων.

ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Ο ρόλος της θερμοκρασίας είναι πάντα πολύ σημαντικός όσον αφορά τον τρόπο με τον οποίο αυτή επηρεάζει τις διεργασίες και ιδιαίτερα όταν αυτές σχετίζονται με έμβιους οργανισμούς. Η κατανόηση των μηχανισμών αδρανοποίησης μικροοργανισμών εξαιτίας της θερμοκρασίας είναι δυνητικά χρήσιμη για την βελτιστοποίηση των θερμικών διεργασιών ιδιαίτερα αυτών που σχετίζονται με την παραγωγή και συντήρηση βρώσιμων προϊόντων (Lee and Kaletunc, 2002). Θερμικές επεξεργασίες εφαρμόζονται σε διάφορους τύπους μικροοργανισμών μεταξύ αυτών βακτηριακά σπόρια, ζυμομύκητες, φυτικά βακτήρια κα, των οποίων η θερμική αντοχή εξαιτίας της διαφορετικής δομής και σύνθεσής τους, ποικίλει (Cebrian, 2017). Έχει συσχετιστεί ότι ο θάνατος των κυττάρων πιθανόν να αποδίδεται από βλάβη στην δομή των κυττάρων, με μη αναστρέψιμη μετουσίωση μεμβρανών, αλλαγές διαμόρφωσης του DNA ή και ριβοσωμικές αλλοιώσεις. Στην πραγματικότητα όμως για να μπορέσει να αποδειχθεί κάτι τέτοιο, λόγω του ότι κάθε κυτταρική δομή επηρεάζεται από τις αυξημένες θερμοκρασίες είναι δύσκολο να επιβεβαιωθεί ποια βλάβη από όλες είναι αυτή η οποία οδηγεί στον θάνατο (Manas and Pagan, 2004). Σύμφωνα με έρευνα της Kristina Arronson (2001) για ένα εύρος μεσόφιλων θερμοκρασιών (10-30°C) η διαφοροποίηση στην αδρανοποίηση βακτηρίων μπορεί να είναι πολύ μεγάλη. Σύμφωνα με την έρευνα αυτή θεωρείται ότι αυτό είναι αποτέλεσμα της μεταβολής της φυσικής σταθερότητας της κυτταρικής μεμβράνης η οποία από κρυσταλλική γέλη σε χαμηλές θερμοκρασίες λαμβάνει μία υγρή κρυσταλλική δομή σε υψηλότερες. Ο θερμοκρασιακός παράγοντας πέρα από την άμεση επιρροή που ασκεί στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών, είναι ο μοναδικός από τους παράγοντες που θα αναφερθούν ο οποίος επηρεάζει τους μικροοργανισμούς και κατά την φάση αποσύνθεσης (Yates et al., 1990). Ωστόσο αξίζει να αναφερθεί ότι συγκριτικά με τους ιούς τα βακτήρια και ιδιαίτερα τα κολοβακτήρια στα υπόγεια ύδατα δεν παρουσιάζουν τόσο ευαισθησία σε υψηλές θερμοκρασίες όσο οι ιοί. Αυτό σύμφωνα με αναφορά των John and Rose (2005) οφείλεται σε πιθανή πολύπλοκη αλληλεπίδραση αδρανοποίησης και αναπαραγωγής υπό την επίδραση των υπολοίπων φυσικών παραγόντων των υπόγειων νερών. Ταυτόχρονα να αναφερθεί ότι μία ακόμη εκδοχή αύξησης της θνησιμότητας των παθογόνων βακτηρίων στα υπόγεια νερά αποτελεί το γεγονός ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας των εγχώριων μικροοργανισμών.

Ο Gould (1989) υπέθεσε ότι η σχέση η οποία συνδέει τον αριθμό των απομεινάντων ζωντανών μικροοργανισμών και τον χρόνο έκθεσής τους σε μία σταθερή θερμοκρασία είναι σταθερή. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξαν στην έρευνά τους και οι Bigelow and Esty (1920). Οι Bigelow and Esty ήταν οι πρώτοι ερευνητές οι οποίοι ασχολήθηκαν διεξοδικά με τον τρόπο τον οποίο η θερμοκρασία αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς. Τα πειράματα αυτών κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε ίσα χρονικά διαστήματα, το ποσοστό των μικροοργανισμών που αδρανοποιείται είναι σταθερό. Έτσι είναι επιτρεπτό σε κάθε περίπτωση να υπολογίζεται το χρονικό διάστημα στο οποίο το 90% των μικροοργανισμών έχει αδρανοποιηθεί (DT).

ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Ο τρόπος με τον οποίο επιδρά στην αδρανοποίηση βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών η ύπαρξη αυτόχθονων μικροοργανισμών δεν είναι ακόμη σαφής. Αφενός οι μηχανισμοί οι οποίοι λαμβάνουν δράση σε κάθε περίπτωση δεν είναι πλήρως καθορισμένοι αλλά το μεγαλύτερο πρόβλημα έγκειται στην δυσκολία ανίχνευσης των πληθυσμών που δραστηριοποιούνται σε κάθε περίπτωση. Σύμφωνα με έρευνα των Gordon and Toze (2003) και Kim and Unno (1996) από τους παράγοντες που εξετάστηκαν, η δραστηριοποίηση των εγχώριων μικροοργανισμών κρίθηκε ως ο πιο σημαντικός. Ωστόσο η ύπαρξη μικροβιακής δραστηριότητας δεν παρατηρήθηκε να επηρεάζει καθόλου την φάση αποσύνθεσης των βακτηρίων σε αντίθεση με την θερμοκρασία (Yates et al., 1990).

Για να μπορέσουν να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα όσον αφορά την επίδραση της γηγενούς μικροβιακής δραστηριότητας στους εισαγόμενους μικροοργανισμούς απαραίτητο είναι να πραγματοποιηθούν ίδιου τύπου μελέτες για αποστειρωμένες και μη συνθήκες περιβάλλοντος. Σε μία σειρά μελετών που πραγματοποιήθηκαν από τους Gordon et al. (2003), παρατηρήθηκε ότι η φθορά των βακτηρίων που εντοπίστηκαν σε υπόγειους υδροφορείς ήταν πολύ μικρότερη κάτω από συνθήκες απουσίας εγχώριων μικροοργανισμών.

Για τις περιπτώσεις όπου εξετάστηκε η συνύπαρξη βακτηρίων και ιών σε περιβαλλοντικό μέσο παρατηρήθηκε αδρανοποίηση του ιού. Οι παράγοντες οι οποίοι οδήγησαν στο αποτέλεσμα αυτό είναι βιολογικοί καθώς από ορισμένα βακτήρια απελευθερώνονται πρωτεολυτικά ένζυμα τα οποία έχουν τη δυνατότητα να καταστρέψουν την πρωτεϊνική κάψα των ιών όπως αυτού του ιού *Coxsackie* (Cliver and Herrman, 1972). Και άλλοι ερευνητές όπως Fujioka (1980), έχουν ερευνήσει και επιβεβαιώσει την αντίική δράση των βακτηρίων. Σε αντίθετα αποτελέσματα κατέληξε η έρευνα των Mathess et al. (1987) σύμφωνα με τους οποίους ο ρυθμός αδρανοποίησης των ιών δεν ήταν διαφορετικός για αποστειρωμένα και μη ύδατα. Η συνύπαρξη των βακτηρίων με άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς δεν είναι πάντα ευνοϊκή για τα βακτήρια, γεγονός που αποδεικνύεται κατά τον Tate (1978). Σύμφωνα με την έρευνα αυτή αποδείχθηκε ότι ο ρυθμός αδρανοποίησης του βακτηρίου *E.coli* αυξήθηκε σημαντικά όταν ένας πληθυσμός πρωτόζων αφέθηκε στο ίδιο περιβάλλον. Ωστόσο το αποτέλεσμα αυτό είναι βάσιμο καθώς το ίδιο πείραμα πραγματοποιήθηκε σε στείρες συνθήκες, απουσίας των πρωτόζων και το βακτήριο όχι μόνο δεν αδρανοποιήθηκε αλλά πολλαπλασιάζονταν ακόμη. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι η ύπαρξη μικροβιακής δραστηριότητας πέραν της μολυσματικής κοινότητας έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανταγωνιστικότητας για τα υποστρώματα περιορισμένης ανάπτυξης και τα θρεπτικά υλικά. Το πρόβλημα αυτό είναι πάρα πολύ έντονο ιδιαίτερα κατά την συνύπαρξη φάγων και βακτηρίων καθώς οι φάγοι είναι πολυάριθμοι και πανταχού παρόντες (Bradford, 2013).

ΕΔΑΦΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ

Οι πληθυσμοί μικροβίων είναι αρκετά ευαίσθητοι από τις μεταβολές στην περιεκτικότητα σε υγρασία. Όσον αφορά στους ιούς αρκετοί ερευνητές, μεταξύ αυτών και Gerba and Bitton (1984) έχουν δείξει ότι η αύξηση των ποσοστών υγρασίας ευνοεί την αδρανοποίησή τους. Η υγρασία πολλές φορές διαθέτει συνεργιστική δράση με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες μεταξύ αυτών και η ηλιακή ακτινοβολία. Σε πολλές περιπτώσεις και ιδιαίτερα σε ξηρά εδάφη η απουσία υγρασίας ευνοεί την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη διέλευση της ηλιακής ακτινοβολίας η οποία ευνοεί την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών (Κουμάκη, 2017). Όπως φαίνεται και στον πίνακα ο οποίος παρατίθεται παραπάνω σύμφωνα με τους Rorper and Marshall (1978), η υγρασία ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξε και έρευνα του Tate (1977) όπου εξετάστηκε η αδρανοποίηση του βακτηρίου *E.coli* σε 2 εδαφικά δείγματα της νότιας Φλόριντα. Το πρώτο αφορούσε εδαφικό δείγμα με περιεκτικότητα σε υγρασία 63% ενώ το δεύτερο ήταν δείγμα άμμου με ποσοστό υγρασίας 17%. Και στα 2 δείγματα το βακτήριο επωάστηκε για 8 ημέρες. Έπειτα από το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος παρατηρήθηκε ότι η αδρανοποίηση του βακτηρίου ήταν πολύ μεγαλύτερη στο δείγμα της άμμου. Συγκεκριμένα, ο βαθμός επιβίωσής του στο εδαφικό δείγμα με το μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας ήταν τριπλάσιος σε σχέση με το δείγμα άμμου.

ΑΛΑΤΑ

Οι τύποι και οι συγκεντρώσεις των αλάτων που υπάρχουν κάθε φορά μπορεί να έχουν σημαντική επίδραση στην τύχη και την μεταφορά πολλών παθογόνων μικροοργανισμών. Ακόμη και μικρές αυξομειώσεις στην συγκέντρωσή τους είναι ικανές για να προκαλέσουν αλλαγές στην συμπεριφορά ορισμένων μικροοργανισμών. Υπάρχουν βακτήρια και halophiles τα οποία όχι μόνο αντέχουν αλλά και ευδοκιμούν στα αλατούχα περιβάλλοντα λόγω της ικανότητά τους να ορομετρούν (Essendoubi et al. (2007); Bradford et al. (2013). Αντίθετα, μικροοργανισμοί λόγω έλλειψης της ικανότητας ορομέτρησης, παθαίνουν οσμωτικό σοκ και η ανάπτυξή τους διακόπτεται (Bradford et al. 2013). Η ύπαρξη αλάτων και συνεπώς η αυξημένη ιοντική ισχύς έχει αποδειχθεί ότι ευνοεί την προσρόφηση των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με έρευνα των Shein and Devin (2007), η ύπαρξη πολυσθενών κατιόντων όπως αυτών του μαγνησίου (Mg^{2+}) και του ασβεστίου (Ca^{2+}) μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία μιας γέφυρας μεταξύ στερεάς επιφάνειας και μικροοργανισμού. Η δημιουργία της γέφυρας αυτής δημιουργεί ακόμη και πιο ευνοϊκές συνθήκες για την προσρόφησή τους και ιδιαίτερα κατά την ύπαρξη πολυσθενών και όχι μονοσθενών ιόντων. Οι ευνοϊκές συνθήκες για την προσρόφηση των μικροοργανισμών συμβάλλουν στην μακροχρόνια επιβίωσή τους και άρα ελαχιστοποιεί την αδρανοποίησή τους. Μία μείωση της ιοντικής ισχύος θα οδηγήσει στην επέκταση του πάχους διπλής στρώσης και αύξηση του μεγέθους επιφανειακού δυναμικού (Elimelech et al., 1995). Η μείωση της συγκέντρωσης των αλάτων και άρα και της ιοντικής ισχύος η οποία μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω αυξημένης επιφανειακής ροής (πχ βροχόπτωσης) μπορεί να επιφέρει την εκρόφηση βακτηρίων από τα σωματίδια του εδάφους (Gerba and Bitton, 1984).

ΕΙΔΟΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ

Αν και τα μικροβιολογικά παθογόνα έχουν διαφορετικά δυναμικά επιβίωσης και αδρανοποίησης σε διαφορετικά περιβάλλοντα, ο τύπος κάθε παθογόνου ασκεί μεγάλη επιρροή στο χρόνο επιβίωσής του. Παράγοντες όπως το είδος, το μέγεθος του κυττάρου, η δομή του κυτταρικού τοιχώματος και το στάδιο ανάπτυξης κάθε μικροοργανισμού αποτελούν

παράγοντες οι οποίοι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την διερεύνηση της αδρανοποίησής τους (Hulsheger et al., 1983). Ο αποσαφήνιση των ιδιοτήτων τους είναι δύσκολη αφενός εξαιτίας της πολυπλοκότητας που τους χαρακτηρίζει ως ζώντες οργανισμοί και αφετέρου εξαιτίας της προσαρμοστικότητας που παρουσιάζουν στα περιβάλλοντα τα οποία συναντώνται. Όπως αναφέρεται και παραπάνω στον πίνακα που παρατίθεται από την έρευνα των Ropper and Marshall (1978), ένας ακόμη παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την συμπεριφορά των μικροοργανισμών στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοφιλμ. Βιοφιλμ παρατηρείται σε σχεδόν όλα τα υδάτινα οικοσυστήματα και δημιουργείται όταν πλήθος βακτηρίων ή και άλλων μικροοργανισμών αποικίζουν στις στερεές επιφάνειες των συστημάτων, στους εδαφικούς κόκκους, σε ιζήματα ακόμη και σε επιφάνειες φυτών. Ένα βιοφιλμ μπορεί να σχηματιστεί ακόμη και σε περιπτώσεις επαναφόρτισης φρεάτων. Πολλά παθογόνα έχουν τη δυνατότητα αλληλεπίδρασης με τη μήτρα βιοφίλμ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτών αποτελούν οι ιοί σύμφωνα με έρευνα των Banning et al. (2003). Σε αντίθεση με τους ιούς από την ίδια έρευνα προέκυψε ότι ενώ το βακτήριο *E. coli* είχε την δυνατότητα να εισέλθει στο εσωτερικό των επιφανειών των βιοφίλμ η επιρροή που ασκούσε ήταν μηδαμινή. Ωστόσο τα ερευνητικά δεδομένα όσο αφορά στην επίδραση παθογόνων μικροοργανισμών σε βιοφιλμ στους υδροφόρους ορίζοντες είναι ελλιπή και ανίκανα να αποδώσουν ολοκληρωμένα συμπεράσματα.

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΑ ΚΑΙ ΥΠΟΓΕΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Ο τρόπος επιρροής των υδάτινων συστημάτων στην επιβίωση και αδρανοποίηση των μικροοργανισμών είναι ιδιαίτερα σημαντικός ιδιαίτερα για περιοχές με ρηχούς υδροφορείς ή μολυσμένα ύδατα τα οποία μπορεί να έρθουν σε άμεση επαφή με τον κύριο υδροφορέα (John and Rose, 2005). Όσο περισσότερο επιβιώνουν σε περιβάλλον όπως τα υπόγεια ύδατα, η πιθανότητα κινητοποίησής τους αυξάνεται και ιδιαίτερα εάν οι φυσικές, χημικές και υδραυλικές συνθήκες το ευνοούν (Toze, 2004). Πέρα από την αδρανοποίηση η οποία είναι ο κύριος μηχανισμός απομάκρυνσης βιοκολλοειδών, ένας ακόμη μηχανισμός ο οποίος αποτελεί και παράγοντα για την αδρανοποίηση είναι η προσρόφηση. Η προσρόφηση των βακτηρίων σε στερεές επιφάνειες περιλαμβάνει την συσσώρευσή τους στις επιφάνειες αυτές. Ο παράγοντας αυτός ασκεί ιδιαίτερη επιρροή στην τύχη και μεταφορά των περισσότερων μικροοργανισμών. Ιδιαίτερα για τα βακτήρια η προσρόφησή τους στις υδροφοβικές επιφάνειες των υλικών κάθε μέσου, όχι μόνο αυξάνει την ικανότητά τους να λαμβάνουν θρεπτικές ουσίες που διαθέτει το περιβάλλον τους αλλά και την ικανότητά τους να διεισδύσουν στο εσωτερικό ενός βιοφίλμ. Σύμφωνα με έρευνα των Ropper and Marshall (1978) η προσρόφηση σε εδαφικά υλικά όπως αυτό του αργίλου μειώνει την αδρανοποίηση για βακτήρια *E. coli*. Αντίθετο όμως ήταν το αποτέλεσμα για το ίδιο βακτήριο του οποίου η αδρανοποίηση μειώθηκε παρουσία μοντμοριλλονίτη.

1.5 ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

Τα φυσικά νανοσωματίδια συναντώνται εδώ και αιώνες φυσιολογικά στο περιβάλλον ως ανόργανα άλατα, προϊόντα βακτηριδίων κα (Mauer-Jones, 2013). Στα εδάφη συναντώνται ως άργιλοι, οργανική ύλη, οξείδια σιδήρου και άλλα ορυκτά που παίζουν ρόλο στις βιογεωχημικές διεργασίες (Klaine, 2008). Το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια στα τεχνητά νανοσωματίδια τα οποία εξαιτίας των πολυάριθμων προϊόντων και διαδικασιών παραγωγής τους στις οποίες βρίσκουν εφαρμογή απελευθερώνονται συναντώνται πλέον στο περιβάλλον (Zhao et al., 2014), μεταξύ αυτών το οξείδιο του γραφενίου (GO) και το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2).

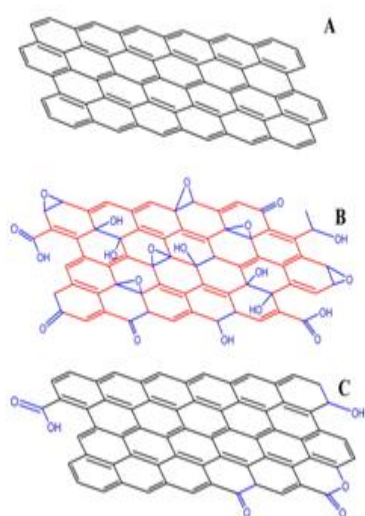
Ως νανοσωματίδια ορίζονται τα υλικά αυτά τα οποία έχουν μέγεθος μικρότερο των 100nm ή τα υλικά εκείνα τα οποία διαθέτουν τουλάχιστον 2 διαστάσεις μεταξύ 1 και 100nm (Klaine, 2008). Η αύξηση της παραγωγής και της χρήσης των τεχνητών νανοσωματιδίων γεννά όλο και περισσότερο ανησυχία σχετικά με την πιθανότητα έκθεσης του φυσικού περιβάλλοντος στις ενώσεις αυτές και τις επιπτώσεις τις οποίες θα προκληθούν (Nowack, 2007). Εξαιτίας της ανακάλυψης των πολυάριθμων δυνατοτήτων τους υπήρξε μία παγκόσμια αύξηση των επενδύσεων της έρευνας στον τομέα της νανοτεχνολογίας. Οι επενδύσεις αυτές έχουν βρει πρόσφορο έδαφος καθώς επιστήμονες και μηχανικοί εφαρμόζοντας τις νέες τεχνικές σχεδιάζουν συσκευές και υλικά τα οποία υπερτερούν σε ταχύτητα, αποτελεσματικότητα και δύναμη (Guzman, 2006). Η χρήση των νανοσωματιδίων ολοένα και αυξάνεται με αποτέλεσμα το 2004 η ποσότητά τους προσεγγίστηκε ίση με μερικές χιλιάδες τόνοι και αναμένεται να ξεπεράσει το 2020 το μισό εκατομμύριο τόνους (Royal Academy of Engineering, 2004).

Ωστόσο το γεγονός ότι τα υλικά αυτά είναι καινούρια και ολοένα και δημιουργούνται νέα σε συνδυασμό με το ότι οι ιδιότητες και η συμπεριφορά τους παραμένουν ακόμη αδιευκρίνιστες, οι τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον χαρακτηρισμό τους έχουν αναπτυχθεί βιβλιογραφικά με δεδομένα για τα κolloειδή, μη λαμβάνοντας υπόψη του περιορισμούς εφαρμογής τους (Pinheiro, 2006). Η τύχη, η κινητικότητα και η βιοδιαθεσιμότητα των νανοσωματιδίων στο περιβάλλον εξαρτώνται από το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο και άλλες ιδιότητες που τα χαρακτηρίζουν (Klaine, 2008). Τα νανοϋλικά βρίσκουν εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων μεταξύ αυτών φαρμακευτικά, καλλυντικά, ηλεκτρονικά, ενεργειακές και άλλες περιβαλλοντικές εφαρμογές (Nowack, 2007). Μερικές από τις ιδιότητες χάρη στις οποίες βρίσκουν εφαρμογή σε τόσους κλάδους είναι η ηλεκτρική αγωγιμότητα, καταλυτικές, οπτικές και μηχανικές ιδιότητες κα (Klaine, 2008). Η εκτίμηση του κινδύνου που μπορεί να προκαλέσει μία νέα ουσία όπως ένα νανοσωματίδιο που εκτίθεται στο περιβάλλον είναι αρκετά δύσκολη καθώς είναι δύσκολος ο προσδιορισμός της συγκέντρωσής της. Για το λόγο αυτό για τον πλήρη προσδιορισμό των επιπτώσεων που προκαλούν θα πρέπει να πραγματοποιείται παρακολούθηση του ρύπου καθ'όλη την διάρκεια του κύκλου ζωής του.

Ωστόσο, ήδη έχουν αναγνωριστεί μερικές από τις επιπτώσεις τις οποίες προκαλεί η ύπαρξή τους στα περιβαλλοντικά συστήματα και ιδιαίτερα τα υδάτινα, μεταξύ αυτών η τοξικότητα σε ζώντες οργανισμούς (ανθρώπους, βακτήρια, ζώα) μέσω διείσδυσής τους στα κύτταρά τους.

1.6 ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

Το γραφένιο είναι ένα νανοϋλικό το οποίο αποτελείται από μία λεπτή δισδιάστατη βάση άνθρακα (Chowdhury, 2013). Η βάση αυτή αποτελείται από ένα στρώμα sp^2 υβριδισμένων δατόμων ανθράκων συνδεδεμένων μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς (Zhao, 2014). Η κατασκευή του πραγματοποιείται μέσω σύζευξης 6 ατόμων άνθρακα σε κυψελοειδές πλέγμα (Akhavan, 2011; Novoselov, 2004). Εξαιτίας της δυσκολίας που παρουσιάζει η απομόνωση του γραφενίου με μόνο ένα στρώμα, συχνά γίνεται λόγος ως οικογένεια υλικών γραφενίου συμπεριλαμβανομένων και αυτών με λίγα (2-5) ή και περισσότερα (5-10) στρώματα γραφενίου (Zhao, 2014). Οι πιο συχνές μορφές που συναντώνται και χρησιμοποιούνται σε διάφορες μορφές είναι το οξείδιο του γραφενίου (Graphene oxide GO) και το μειωμένο οξείδιο του γραφενίου (reduced GO-rGO) (Chowdhury, 2013).



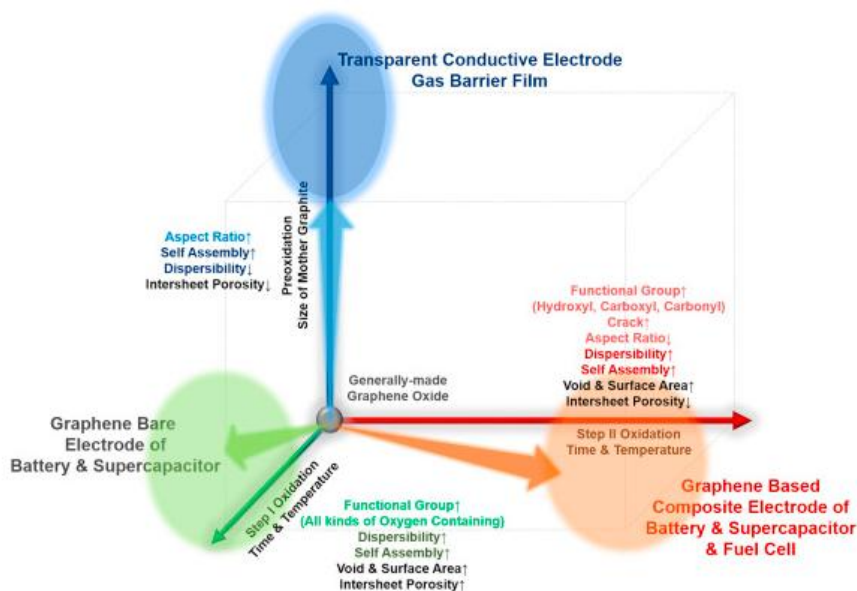
Σχήμα 1.6.1: Απεικόνιση της δομής στο χώρο
(Α) Μονή στοιβάδα γραφενίου
(Β) Οξείδιο του γραφενίου
(Γ) Μειωμένο Οξείδιο του γραφενίου
Πηγή: Zhao (2014)

Το οξείδιο του γραφενίου παράγεται εδώ και 150 χρόνια και αποτελεί ενδιάμεσο προϊόν τεχνικών βασισμένων στην χημική απολέπιση του γραφενίου. Η τεχνική αυτή είναι η πιο κοινή συγκριτικά με άλλες όπως χημική εναπόθεση ατμών (CVD) ή φυσική απολέπιση εξαιτίας της υψηλής αποδοτικότητας και χαμηλού κόστους εφαρμογής που τη χαρακτηρίζουν (Park, 2018). Όπως και το γραφένιο, έτσι και το οξείδιο του γραφενίου είναι ένα δισδιάστατο φύλλο άνθρακα πάχους περίπου 1nm και με πλευρικές διαστάσεις που κυμαίνονται από μερικά νανόμετρα έως και εκατοντάδες μικρόμετρα (Kim, 2012). Περιμετρικά της επιφάνειάς του αλλά και στο εσωτερικό του υπάρχουν διάφορες λειτουργικές ομάδες οι οποίες περιέχουν οξυγόνα σε περιεκτικότητα 30% w/v (Kurantowicz, 2015) με τη μορφή υδροξυλίων, εποξυδίων, καρβονυλικές και καρβοξυλικές ομάδες. Η ύπαρξη των ομάδων που περιέχουν οξυγόνο κατέχουν σημαντικό ρόλο όσον αφορά τον προσδιορισμό των φυσικών, χημικών αλλά και ιδιοτήτων συσσωμάτωσης, σταθερότητας και διαλυτότητας του GO σε υδατικά διαλύματα

(Azizighannad et al., 2018). Πέρα από την ενίσχυση της διαλυτότητας του GO στο νερό, οι ομάδες οξυγόνου που περιέχει παρέχουν μία ποικιλία θέσεων απορρόφησης για διάφορους ρυπαντές (Ding et al., 2014). Η ύπαρξη των οξυγονωμένων αυτών πεδίων προσδίδει στο οξείδιο του γραφενίου μία υδρόφιλη περιφέρεια και αρκετά υδρόφοβο κέντρο (Kim, 2012). Επομένως λαμβάνοντας ως δεδομένο από την βιβλιογραφία ότι ένα φύλλο GO μπορεί να χαρακτηριστεί ως αμφίφιλο καθώς αποτελείται από υδρόφιλα αλλά και υδρόφοβα τμήματα. Ωστόσο στην βιβλιογραφία συναντάται και ως υδρόφιλη ένωση και ο διασκορπισμός του στο νερό είναι ικανοποιητικός θεωρείται μαλακό υλικό το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή λεπτών φιλμ αλλά και ως επιφανειοδραστική ένωση. Η επιφανειακή τάση του νερού βοηθάει τα φύλλα του GO να παραμένουν επίπεδα ώστε να ελαχιστοποιείται η παραμόρφωσή τους. Μερικές ακόμη από τις ιδιότητες χάρη στις οποίες η εφαρμογή του πραγματοποιείται με τόσο μεγάλη έκταση είναι η μεγάλη αντοχή του σε εφελκυσμό, το χαμηλό κόστος χρήσης και παραγωγής του, οι ηλεκτρονικές, θερμικές και ηλεκτρικές αγωγιμότητές του (Wu et al., 2007) και η μεγάλη ειδική επιφάνειά του. Εξαιτίας αυτών το GO παρουσιάζει μεγάλο δυναμικό εφαρμογής στα ηλεκτρονικά τμήματα περιβαλλοντικών, ενεργειακών αλλά

και ιατρικών εφαρμογών (Novoselov, 2004). Μερικές από αυτές είναι τα ηλιακά κύτταρα, αισθητήρες βαρέων μετάλλων, κα. Σύμφωνα με έρευνα των Li et al. (2015) προηγμένα υλικά όπως το GO βρίσκουν εφαρμογή σε ενεργειακές τεχνολογίες όπως αυτές της αποθήκευσης και μετατροπής ενέργειας (φωτοκαταλυτική διάσπαση νερού, μπαταρίες λιθίου, αποθήκευση υδρογόνου κα).

Ταυτόχρονα σε πρώιμο στάδιο είναι η χρήση του γραφενίου και των παραγώγων του σε βιολογικές εφαρμογές. Μελέτες όπως αυτές των Salata (2004) εστιάζουν στην πιθανή χρήση του GO κατά την φωτοθερμική θεραπεία καρκίνου ακόμη και κατά την μεταμόσχευση γονιδίων. Ακόμη η διερεύνηση της δομής του DNA, η ανίχνευση πρωτεϊνών αλλά και ο διαχωρισμός και καθαρισμός βιολογικών μορίων και κυττάρων είναι κάποιοι ακόμη από τους βιολογικούς τομείς στους οποίους βρίσκουν εφαρμογή GFN (Mahtab, 1995; Nam et al., 2003). Το μέγεθος των νανοσωματιδίων είναι ένα από τα πολύ βασικά χαρακτηριστικά τους το οποίο τους επιτρέπει να βρίσκουν εφαρμογή σε τέτοιους τομείς καθώς βρίσκονται στην ίδια περιοχή μεγέθους με τις πρωτεΐνες (Salata, 2004). Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του οξειδίου του γραφενίου μπορούν να διαμορφωθούν ανάλογα από τις διαδικασίες που εφαρμόζονται κατά την παραγωγή του. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η διαδικασία παραγωγής η οποία θα εφαρμόζεται θα είναι στοχευόμενη ώστε το προϊόν να διαθέτει τα χαρακτηριστικά τα οποία είναι κατάλληλα για την τελική προοριζόμενη χρήση του (Park, 2018). Ωστόσο σε κάθε περίπτωση ανάλογα τη διαδικασία οξείδωσης και το βαθμό στον οποίο αυτή εφαρμόζεται τα φυσικά και χημικά χαρακτηριστικά του όπως η διασπορά του σε διαλύτες, ο αριθμός, η θέση και οι τύποι των λειτουργικών ομάδων που διαθέτει πρέπει να είναι πλήρως ορισμένα για την ασφαλή χρήση του. Αν και από πολλούς ερευνητές το GO έχει κριθεί ως το πιο τοξικό νανοϋλικό η τύχη και η συμπεριφορά του στο περιβάλλον παραμένει ακόμη ασαφής (Crowdhury et al., 2013).



Σχήμα 1.6.2: Διαδρομές ρύθμισης των χαρακτηριστικών του GO ανάλογα τον τελικό προορισμό εφαρμογής τους. Πηγή: Park (2018)

1.7 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

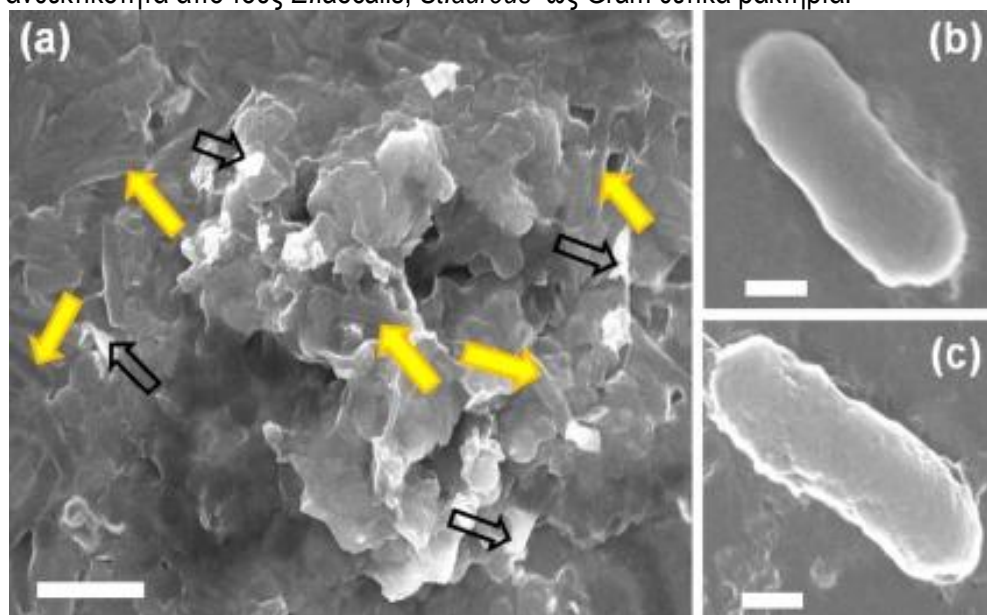
Η ύπαρξη βακτηρίων σε περιβαλλοντικά συστήματα αλλά και βαφές, υφάσματα, ιατρικές συσκευές έχει προκαλέσει ανησυχία στην ερευνητική κοινότητα με αποτέλεσμα την διερεύνηση τρόπων μείωσης της μεταφοράς τους ή ακόμη και αδρανοποίησής τους (Krishnamoorthy et al., 2012). Οι έως τώρα αντιμικροβιακοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται διακρίνονται σε οργανικούς και ανόργανους όσον αφορά την ύπαρξη ή απουσία του άνθρακα στα συστατικά τους. Η χρήση οργανικών αντιμικροβιακών παραγόντων εμφανίζει αρκετά μειονεκτήματα μεταξύ αυτών η χαμηλή θερμική ανθεκτικότητα, μικρή διάρκεια ζωής αλλά και υψηλή αποσυνθεσιμότητα. Η ύπαρξη των μειονεκτημάτων αυτών σε συνδυασμό με την αυξημένη ανθεκτικότητα τους εξαιτίας της ύπαρξης αντιβιοτικών προκαλεί περιορισμό στην χρήση και εφαρμογή τους με αποτέλεσμα το ερευνητικό ενδιαφέρον να έχει στραφεί στην χρήση ανόργανων αντιμικροβιακών παραγόντων (Fang et al., 2006). Αντιθέτως, οι ανόργανοι αντιμικροβιακοί παράγοντες, μεταξύ αυτών και το οξείδιο του γραφενίου ολοένα και περισσότερο εφαρμόζονται εξαιτίας της σταθερότητας, θερμικής αντοχής που παρουσιάζουν αλλά και της αναστολής της βακτηριακής ανάπτυξης που προκαλούν.

Η αντιβακτηριακή δράση του οξειδίου του γραφενίου βασίζεται στο μέγεθος, τη δομή, τη σύνθεση και τις ιδιότητές του ως υλικό. Το γραφένιο και τα παράγωγά του όπως GO αλλά και το rGO έχει αποδειχθεί ότι είναι τοξικά προς τα βακτήρια από πολλούς ερευνητές, με πιο τοξικό από όλα το GO (Liu et al., 2011; Al-Thani et al., 2014). Μεταξύ αυτών ο Gao, ο οποίος ανέφερε ότι σε βακτήρια *E.coli*, *St.aureus* τα GO, rGO είναι πιο τοξικά σε σχέση με το γραφένιο. Η τοξικότητα αυτή οφείλεται σύμφωνα με τον ερευνητή αυτόν σε βλάβη η οποία προκαλείται στα κύτταρά τους μέσω της επαφής τους με τις αιχμηρές άκρες των νανοσωματιδίων αυτών. Τα νανο-φύλλα λειτουργούν ως κοπτήρες οι οποίοι προκαλούν απώλεια της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης προκαλώντας απελευθέρωση ενδοκυτταρικών περιεχομένων όπως την διαρροή του γενετικού τους υλικού DNA ή RNA (Akhavan et al., 2010) ή και τον θάνατό τους (Liu et al., 2011). Από προσομοιώσεις του μοριακού δυναμικού που έχουν πραγματοποιηθεί έχει διαπιστωθεί ότι η ικανότητα του GO να διαπερνά και να τέμνει τις κυτταρικές μεμβράνες εξαρτάται από το μέγεθος, το βαθμό οξειδωσής του αλλά και στη δομή της μεμβράνης (Li et al., 2013).

Πέρα από την τομή την οποία προκαλεί η αλληλεπίδραση GO και βακτηρίων, μία ακόμη επίδραση του GO αποτελεί η κάλυψη των κυτταρικών επιφανειών των βακτηρίων χωρίς να τις διαπερνά. Η κάλυψη αυτή τα απομονώνει από το περιβάλλον και τα απαραίτητα για αυτά θρεπτικά συστατικά και αδρανοποιούνται. Η αποδοτικότητα του μηχανισμού αυτού εξαρτάται ως επί το πλείστον από το μέγεθος των νανο-φύλλων τα οποία όσο πιο μεγάλα είναι τόσο πιο καλή η καλυπτικότητα που έχουν στα βακτήρια. Παράλληλα με αυτό να αναφερθεί ότι ένας ακόμη μηχανισμός είναι η παγίδευση των βακτηρίων σε ένα πλέγμα GO (Palmieri et al., 2017). Η παγίδευση των βακτηρίων σε πλέγματα νανόφυλλων δημιουργείται έπειτα από συσσωμάτωσή τους. Με αυτόν τον τρόπο οι εκτεθειμένες αιχμηρές άκρες μειώνονται με αποτέλεσμα να επανακτάται η βακτηριακή δραστηριότητα. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι οι μηχανισμοί κάλυψης και παγίδευσης είναι αναστρέψιμοι έπειτα από ηχοβόλωση του νανοσωματιδίου. Οι Chen et al., (2013) μεταξύ αυτών πρόσθεσαν και την πιθανότητα δημιουργίας αντιδραστικών ειδών οξυγόνου (Reactive Oxygen Species ROS) ως αντιμικροβιακό παράγοντα. Το ανιόν του υπεροξειδίου το οποίο παράγεται ως υποπροϊόν του μεταβολισμού οξυγόνου σε περίπτωση που δεν εξουδετερωθεί προκαλεί διαφόρων τύπων κυτταρικές βλάβες, φαινόμενο το οποίο καλείται οξειδωτικό στρες (Jira, 2018). Μαζί μ' αυτό να προστεθεί ότι η τάση μεμβράνης και η διάσπαση του κυτοπλάσματος είναι επίσης δύο επιδράσεις στις οποίες μπορεί να οδηγήσει η αλληλεπίδραση βακτηρίων και νανοσωματιδίων GO (Palmieri et al., 2017).

Ωστόσο αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί όσον αφορά την τοξικότητα του οξειδίου

του γραφενίου με σκοπό τον προσδιορισμό του ρόλου της κυτταρικής μεμβράνης σε Gram αρνητικά και Gram θετικά βακτήρια (Akhavan et al. (2010), Krishnamoorthy et al. (2012)). Σύμφωνα με έρευνα από Krishnamoorthy et al. (2012), κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση του GO σε Gram θετικό (*E. faecalis*) αλλά και σε Gram αρνητικό (*E. coli*) προσδιορίστηκε ότι η *E. coli* παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία στην ύπαρξη νανοσωματιδίων της οικογένειας του γραφενίου (Graphene Family Nanoparticles, GFN) συγκριτικά με τον *E. faecalis* ο οποίος αντίθετα έδειξε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα. Ωστόσο ο ρόλος της ύπαρξης της εξωτερικής μεμβράνης των Gram αρνητικών βακτηρίων παραμένει ακόμη ασαφής, καθώς σύμφωνα με την έρευνα των Akhavan et al. (2010) η *E. coli* παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τον *St. aureus* ο οποίος δεν διαθέτει την εξωτερική μεμβράνη αυτή. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξε και η έρευνα των Al-Thani et al. (2014) κατά την οποία διαπιστώθηκε ότι η *E. coli* ως Gram αρνητικό παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα από τους *E. faecalis*, *St. aureus* ως Gram θετικά βακτήρια.

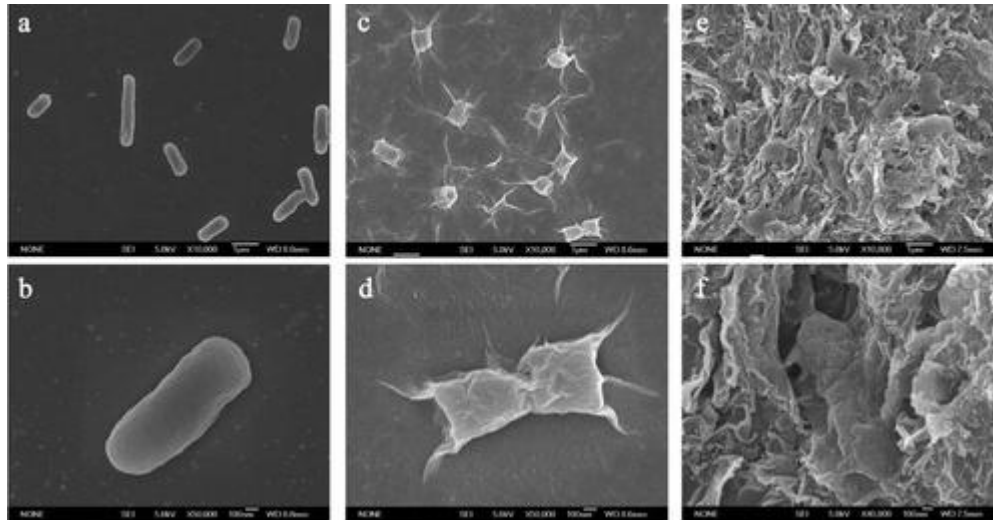


Σχήμα 1.7.1: Απεικόνιση τρόπου επίδρασης νανο-φύλλων γραφενίου κύτταρο *E. Coli*. Πηγή: Krishnamoorthy et al., (2012)

- (a): Με τα κίτρινα βέλη απεικονίζονται οι θέσεις του βακτηρίου *E. coli* μεταξύ των φύλλων γραφενίου ενώ με μαύρα βέλη απεικονίζονται οι θέσεις των νανο-φύλλων γραφενίου
 (b): Μορφή κυτάρου *E. coli* πριν από την επεξεργασία με νανο-φύλλα γραφενίου
 (c): Μορφή κυτάρου *E. coli* μετά από την επεξεργασία με νανο-φύλλα γραφενίου

Από έρευνα των Liu et al. (2011) όπου εξετάστηκε η επίδραση της έκθεσης GO και rGO σε βακτήρια *E. coli* παρατηρήθηκε όπως και από προηγούμενες έρευνες ότι πράγματι χάνεται η κυτταρική τους ακεραιότητα. Από την ίδια έρευνα διαπιστώθηκε επίσης ότι η απώλεια της κυτταρικής ακεραιότητας αυτής είναι εξαρτώμενη από το μέγεθος των φύλλων του GO. Πιο συγκεκριμένα, αναφέρθηκε ότι για τις περιπτώσεις όπου τα φύλλα ήταν μεγάλα περιέκλειαν τα βακτήρια με αποτέλεσμα η απομόνωση αυτή να εμποδίζει τις αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον, ενώ για τις περιπτώσεις κατά τις οποίες τα φύλλα ήταν μικρά αλληλεπιδρούσαν με μη επιβλαβή τρόπο με τις επιφάνειες των βακτηρίων (Jira, 2018). Η συσώρευση των νανοσωματιδίων πιθανόν να προκαλείται από την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση αυτών με αρνητικά φορτισμένη κυτταρική επιφάνεια. Ωστόσο οι ηλεκτροκινητικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των νανοσωματιδίων και των βακτηριακών επιφανειών πιθανόν να μην είναι αποκλειστικά υπεύθυνες για την αναστολή της βακτηριακής ανάπτυξης καθώς

ταυτοχρόνως συμβαίνουν και άλλες μηχανικές ή χημικές αλληλεπιδράσεις (Jira, 2018). Όπως εύκολα μπορεί να παρατηρηθεί από την Σχήμα 13 η συνύπαρξη των νανοσωματιδίων με το βακτήριο προκαλεί μία πεπλάτυνση μη αναστρέψιμη των κυττάρων τους. Ακόμη από το Σχήμα 13 παρατηρείται επίσης ότι το βακτήριο αναμειγνύεται με τα 2 νανοσωματίδια με διαφορετικούς τρόπους καθώς η διασπορά του GO σχηματίζει λεπτά φύλλα ενώ αντίθετα η διασπορά του rGO σχηματίζει μεγάλα συσσωματωμένα σωματίδια.

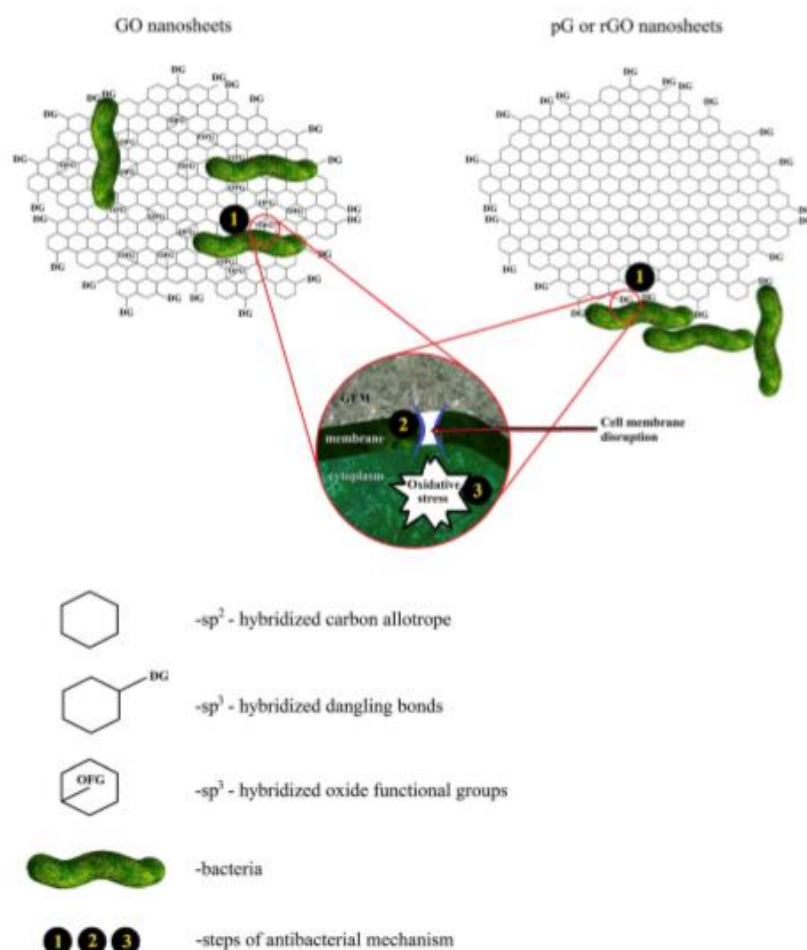


Σχήμα 1.7.2 : Απεικόνιση τρόπου επίδρασης αλατούχου διαλύματος, GO και rGO στα κύτταρα της *E.coli*. Πηγή: Liu et al., 2011

(a),(b):Επώαση του *E.coli* με αλατούχο διάλυμα για 2h

(c),(d):Επώαση του *E.coli* για 2h με αιώρημα GO συγκέντρωσης 40ppm

(e),(f): Επώαση του *E.coli* για 2h με αιώρημα rGO συγκέντρωσης 40ppm



Σχήμα 1.7.3: Απεικόνιση μηχανισμών αντιμικροβιακής δράσης των νανοσωματιδίων της οικογένειας του γραφενίου (Graphene Family Nanoparticles GFN). Πηγή: Kurantowicz et al. (2015)

- 1: Αρχική εναπόθεση κυττάρων βακτηρίων στις επιφάνειες των υλικών
- 2: Τάση μεμβράνης που προκαλείται από άμεση επαφή με αιχμηρά άκρα
- 3: Οξειδωτικό στρες που προκαλείται στο βακτηριακό κυτταρόπλασμα

Ωστόσο σε κάθε δοκιμή πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος. Ένας πολύ σημαντικός παράγοντας ο οποίος πρέπει σε κάθε περίπτωση να λαμβάνεται υπόψη είναι η εξάρτηση της βακτηριακής αδρανοποίησης από το χρόνο και τη συγκέντρωση έκθεσης στο υλικό (Liu, 2011). Ιδιαίτερα όσον αφορά την συγκέντρωση των υλικών οι Kurantowicz (2015) διαπίστωσαν ότι οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις έκθεσης απεδείχθησαν επιβλαβέστερες κατά την βακτηριακή ανάπτυξη. Ταυτόχρονα, οι φυσικοχημικές ιδιότητες κάθε υλικού αλλά και το είδος και τα χαρακτηριστικά των εκάστοτε μικροοργανισμών, και η διαθεσιμότητα του υποστρώματος αποτελούν παραμέτρους οι οποίοι θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη (Akhavan et al., 2011). Σε έρευνα των Barbolina et al. (2016) υποστηρίζεται ότι το GO προκαλούσε μικροβιακή θνησιμότητα μόνο κατά τις περιπτώσεις όπου χαρακτηρίζονταν από χαμηλό pH εξαιτίας κακού καθαρισμού των φύλλων του και όχι εξαιτίας των ιδιοτήτων του.

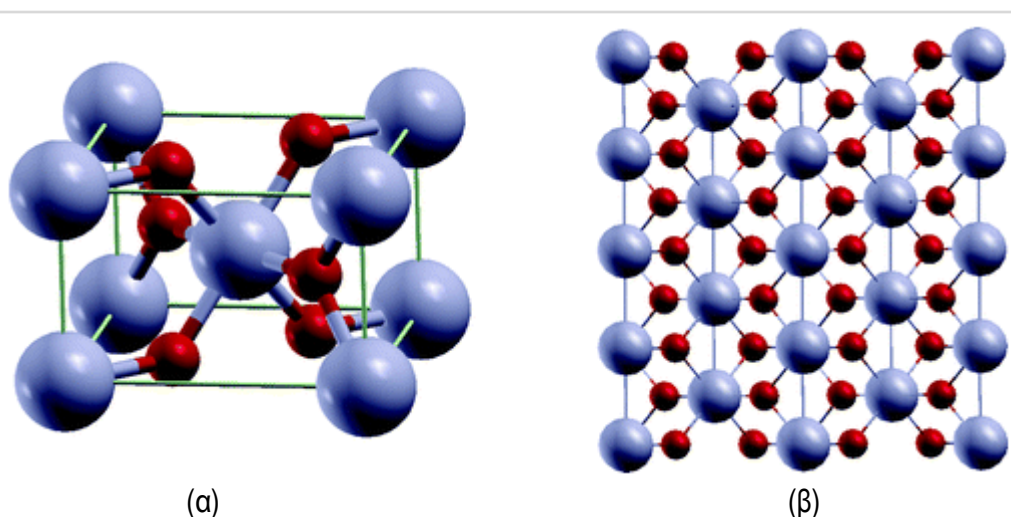
Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι παρόλο που οι έρευνες οι οποίες έχουν διαπιστώσει την αντιμικροβιακή δράση του GO είναι αρκετές, λόγω του ότι η εμφάνισή του είναι νέα δεν

μπορεί ακόμη κάτι τέτοιο να εξακριβωθεί. Ωστόσο υπάρχουν και έρευνες βάσει των οποίων το GO όχι μόνο δεν διαθέτει αντιβακτηριακές ιδιότητες αλλά δρα σε ορισμένες περιπτώσεις με ενισχυτικό τρόπο ως προς την ανάπτυξη των βακτηρίων. Όταν συναντάται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 400ppm τότε οι αντιβακτηριακές δραστηριότητές του είναι ανύπαρκτες (Barbolina et al., 2016). Πέρα από αυτό να σημειωθεί ότι σε έρευνά τους οι Ruiz et al. (2011) ανέφεραν ότι σε συγκεντρώσεις πείπου ίσες με 25ppm η παρουσία του ενισχύει όχι μόνο την επιβίωση αλλά και τον πολλαπλασιασμό του.

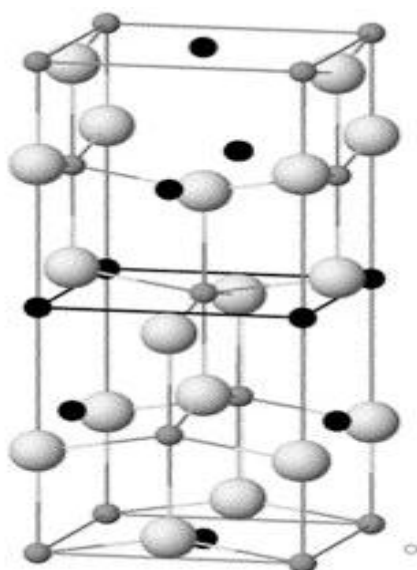
1.8 ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO₂)

Το διοξείδιο του τιτανίου αποτελεί μία ακόμη ένωση της οικογένειας των νανοσωματιδίων. Απαντάται με την μορφή κρυστάλλων σε τρεις διαφορετικές δομές: το ρουτίλιο, τον ανατάση και τον μπρουκίτη. Σε κάθε μία από τις τρεις αυτές κρυσταλλικές δομές υπάρχουν 3 άτομα τιτανίου γύρω από κάθε οξυγόνο και 6 άτομα οξυγόνου γύρω από κάθε άτομο τιτανίου, τα οποία σχηματίζουν κάθε φορά ένα οκτάεδρο (Davis, 1990). Οι 3 μορφές αυτές διαφέρουν μόνο ως προς τον οκταεδρικό δεσμό τους (Klein, 2003). Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το ρουτίλιο, αποτελείται από οκτάεδρες αλυσίδες TiO₆ οι οποίες μοιράζονται 2 άκρες, ο ανατάσης αποτελείται από οκτάεδρες αλυσίδες TiO₆ οι οποίες μοιράζονται 4 άκρες και ο μπρουκίτης ο οποίος αποτελείται από αλυσίδες τεταρτημοριακών οκταέδρων που μοιράζονται 3 άκρες (Mogyorosi, 2003).

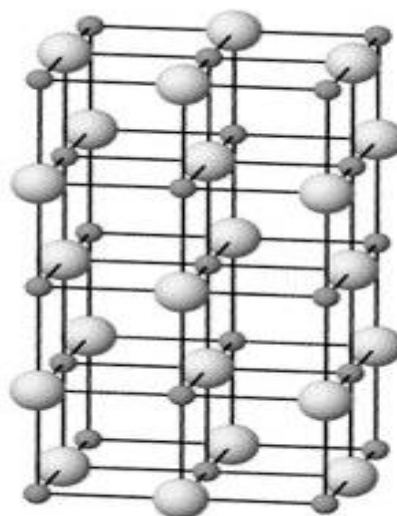
Όσον αφορά την δομή τους στο χώρο οι κρύσταλλοι του ρουτιλίου εμφανίζονται τετράγωνοι, του ανατάσης ως λεπτά τετραγωνισμένα πρίσματα και του μπρουκίτη ως επίπεδες ορθογωνικές πλάκες (Davis, 1990). Με την κρυσταλλική δομή του μπρουκίτη συνδέεται και η σχετικά εύκολη παραμορφωσιμότητά του σε σχέση με τις άλλες δύο μορφές καθώς είναι η μορφή TiO₂ με τις λιγότερες ομοιότητες μεταξύ τους σε σχέση με τις άλλες δύο και το λιγότερο σταθερό.



Σχήμα 1.8.1 και σχήμα 1.8.2: Απεικόνιση δομής ρουτιλίου όπου απεικονίζονται με μεγαλύτερες μπλε σφαίρες τα άτομα TiO₂ ενώ με μικρότερες κόκκινες τα άτομα οξυγόνου.
 (α) Συμβατικό κύτταρο μονάδας αποτελούμενο από δύο τύπους TiO₂
 (β) Εκτεταμένη δομή όπου απεικονίζεται κάθε άτομο TiO₂ να περιβάλλεται από έξι άτομα O
 Πηγή: Aryanpour et al. (2009)



(α)

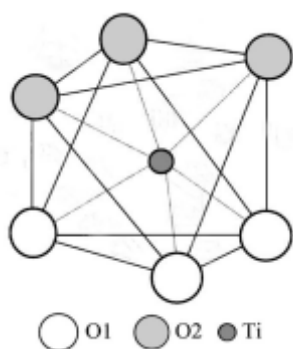


(β)

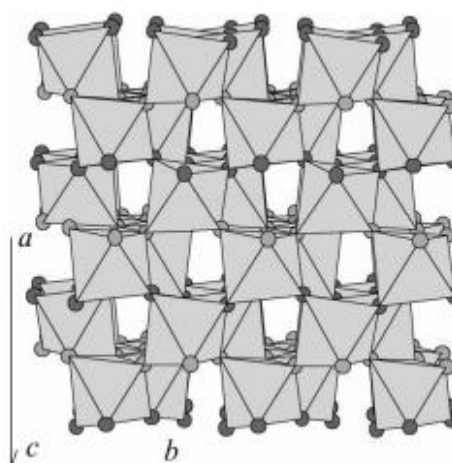
Σχήμα 1.8.3 και σχήμα 1.8.4: Απεικόνιση δομής ανατάση όπου με μεγάλες σφαίρες είναι συμβολίζεται το οξυγόνο και με μικρές σφαίρες το τιτάνιο. Πηγή: Hengeler et al. (2000)

(α): Συμβατικό κύτταρο ανατάσης με οκταεδρικές ενδιάμεσες θέσεις-σφαίρες με μαύρο χρώμα

(β): Διπλή μονάδα κυττάρων



(α)



(β)

Σχήμα 1.8.5 και σχήμα 1.8.6: Απεικόνιση δομής μπρουκίτη Πηγή: Di Paola et al. (2013)

(α) Απεικόνιση οκταέδρου της κρυσταλλικής δομής του μπρουκίτη

(β): Απεικόνιση της κρυσταλλικής δομής του μπρουκίτη

Να σημειωθεί ότι έπειτα από θέρμανση των κρυσταλλικών δομών, εξαιτίας της ισορροπίας ενέργειας μεταξύ των μεγεθών των σωματιδίων, αυτών πραγματοποιούνται διάφορες αλληλουχίες μετασχηματισμών όπως από ανατάση σε μπρουκίτη και έπειτα σε ρουτίλιο, ή από μπρουκίτη σε ανατάση σε ρουτίλιο και άλλοι (Chen, 2007). Σύμφωνα με έρευνα των (Aryanpour et al., 2009) ο μπρουκίτης επανέρχεται σε μορφή ρουτιλίου με θερμική επεξεργασία στους 750°C, ενώ σύμφωνα με έρευνα των Klein et al. (2003) το ρουτίλιο μπορεί να προκύψει έπειτα από θέρμανση των δύο άλλων μορφών σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 600°C. Βέβαια να αναφερθεί ότι η θερμοκρασία μετασχηματισμού κάθε φορά, είναι παράμετρος η οποία επηρεάζεται από άλλες όπως η πίεση, η σύνθεση της ατμόσφαιρας αλλά και το μέγεθος των κόκκων.

Η εμπορική παραγωγή του ξεκίνησε στις αρχές του 20^{ου} αιώνα και έκτοτε χρησιμοποιείται σε πολλές εφαρμογές ενέργειας και περιβάλλοντος. Βιομηχανικά, η παραγωγή του TiO₂ πραγματοποιείται μέσω διεργασιών θειικών και χλωριούχων αλάτων. Άλλες μέθοδοι σύνθεσης οι οποίες επίσης χρησιμοποιούνται ευρέως περιλαμβάνουν την συμπύκνωση αδρανούς αερίου και άλλες υδροθερμικές μεθόδους σύνθεσης όπως αυτής της τιτάνιας (Klein, 2003). Ο τρόπος εφαρμογής του κάθε φορά εξαρτάται αφενός από τις ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του ίδιου του υλικού αλλά και από τις τροποποιήσεις του ξενιστή υλικού με το οποίο θα έρθει σε επαφή κάθε φορά (Chen, 2007). Η μορφή του TiO₂ με την οποία εφαρμόζεται κάθε φορά πιθανόν να διαφέρει καθώς υπάρχει η δυνατότητα χρήσης του ως αιώρημα είτε μέσω σύνδεσης με ένα υλικό υποστήριξης πχ μεμβράνες ακόμη και σε συστοιχίες νανοσωλήνων.

Το TiO₂ εξαιτίας των πολλαπλών ιδιοτήτων που το χαρακτηρίζουν, μεταξύ αυτών η δομή, οι ηλεκτρονικές ιδιότητες, η σύνθεση και δομή της επιφάνειάς του, η αντιδραστικότητά του, η σταθερότητα και η αλληλεπίδρασή του με οργανικά μόρια καθίσταται κατάλληλο υλικό για βιομηχανικές εφαρμογές. Μεταξύ αυτών είναι η εφαρμογή τους σε φαρμακοβιομηχανίες, τρόφιμα, βαφές και χρώματα, αισθητήρες και οπτικά (Aryanpour et al. (2009), Chen et al. (2007)). Οι οπτικές ιδιότητες του TiO₂ τα τελευταία χρόνια αποτελούν σημαντικό ερευνητικό κομμάτι για το νανοσωματίδιο αυτό καθώς λόγω του ότι στην περιοχή του ορατού φωτός είναι συνήθως διαφανή, παράγοντας καθοριστικός για την ευρύ εφαρμογή τους. Ο υψηλός λόγος επιφανείας -όγκου του υλικού αυτού σε συνδυασμό με το μικρό μέγεθος σωματιδίων αποτελεί βασικό παράγοντα στις βιομηχανικές εφαρμογές του καθώς διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις και αντιδράσεις μεταξύ των επιφανειών των υλικών (Chen, 2007). Επίσης συχνά συναντάται ως χρωστική ουσία σε καλλυντικά προϊόντα όπως, κρέμες αντηλιακά, αλοιφές ακόμη και οδοντόκρεμες. Η ευρεία χρήση του στα προϊόντα που αναφέρθηκαν, βασίζεται στον υψηλό δείκτη διάθλασης (IR) ο οποίος το χαρακτηρίζει και του προσδίδει υψηλές λευκαντικές και καλυπτικές ιδιότητες.

Πέρα από τις εφαρμογές του υλικού αυτού στα τεχνολογικά προϊόντα, πλέον χρησιμοποιείται ευρέως και για περιβαλλοντική φωτοκατάλυση, με τον ανατάση την πιο φωτοκαταλυτική δραστική μορφή (Fujishima, 2000). Η ευρεία χρήση του στις παραπάνω εφαρμογές έχει οδηγήσει στο αποτέλεσμα μεγάλες ποσότητες τέτοιων νανοσωματιδίων να απελευθερώνονται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων ή και απευθείας σε υπόγεια και επιφανειακά συστήματα. Η αλληλεπίδρασή τους με βιοκολλοειδή, οργανικά υλικά και αργίλους χρήζει άμεσης εξέτασης καθώς εξαιτίας των ενεργών επιφανειών που διαθέτουν δημιουργούν σταθερά συσσωματώματα τα οποία μετακινούνται σε μεγάλες αποστάσεις (Fang et al., 2009).

Ωστόσο στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι τα νανοϋλικά TiO₂ ποικίλλουν ως προς το

μέγεθος, το σχήμα αλλά και την κρυσταλλική δομή με αποτέλεσμα μεγάλη ποικιλία να εμφανίζουν και οι ιδιότητες αυτών. Επομένως, η εφαρμογή τους πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή και ιδιαίτερα κατά τις περιπτώσεις τις οποίες τα υλικά αυτά υπόκεινται σε μεταβολές φάσεων όπως πίεσης ή θερμοκρασίας κατά τις οποίες οι ιδιότητες μεταβάλλονται. Το διοξείδιο του τιτανίου χρησιμοποιείται συχνά με την μορφή μεμβρανών ως καταλύτες στερεής φάσης, σε ηλιακά κύτταρα, σε φωτεινές συσκευές έπειτα από θερμική επεξεργασία τους στους 450°C. Λόγω του ότι η θερμική επεξεργασία αυτή είναι ασύμφορη οικονομικά και περιβαλλοντικά ως εναλλακτικός τρόπος επεξεργασίας τους ερευνήθηκε με την χρήση αρωματικών καρβοξυλικών οξέων (Canon and Warner, 2004).

1.9 ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO₂)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ενσωμάτωση βιοκτόνων παραγόντων σε νανοσύνθετα υλικά έχει οδηγήσει στην ευρεία χρήση τους ως αντιμικροβιακά μέσα. Μεταξύ αυτών συναντώνται και νανοσύνθετα που έχουν ως βάση την τιτάνια. Αν και η εφαρμογή των υλικών αυτών είναι δύσκολη εξαιτίας θερμοδυναμικών και κινητικών φραγμών οι οποίοι εμποδίζουν την διασπορά ανόργανων και συχνά υδρόφιλων υλικών στις υδρόφοβες μήτρες των βακτηρίων, έπειτα από αρκετές έρευνες έχει διαπιστωθεί η αποδοτικότητά τους για τις εφαρμογές αυτές.

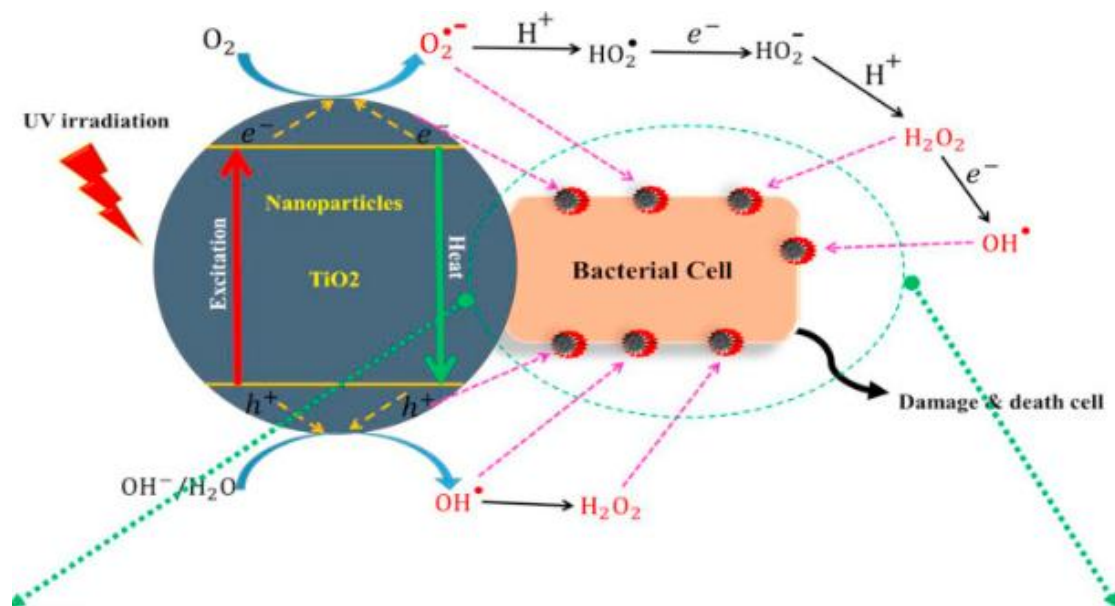
Δύο από τα πλεονεκτήματα της τιτάνιας εξαιτίας των οποίων καθιερώθηκε η εφαρμογή της για αντιμικροβιακές δραστηριότητες είναι αρχικά το ευρύ φάσμα δραστηριότητας έναντι βακτηρίων, μυκήτων και άλλων μικροοργανισμών οι οποίοι έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε φάρμακα.

Ένα ακόμη σημαντικό πλεονέκτημα αφορά στον αντιμικροβιακό τρόπο δράσης της τιτάνιας ο οποίος επέρχεται και χωρίς άμεση επαφή. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι υψίστης σημασίας καθώς η ποσότητα η οποία θα πρέπει να χρησιμοποιείται και να απελευθερώνεται κάθε φορά δεν απαιτείται να είναι υψηλή ώστε να έρχεται σε άμεση επαφή με τον μικροοργανισμό.

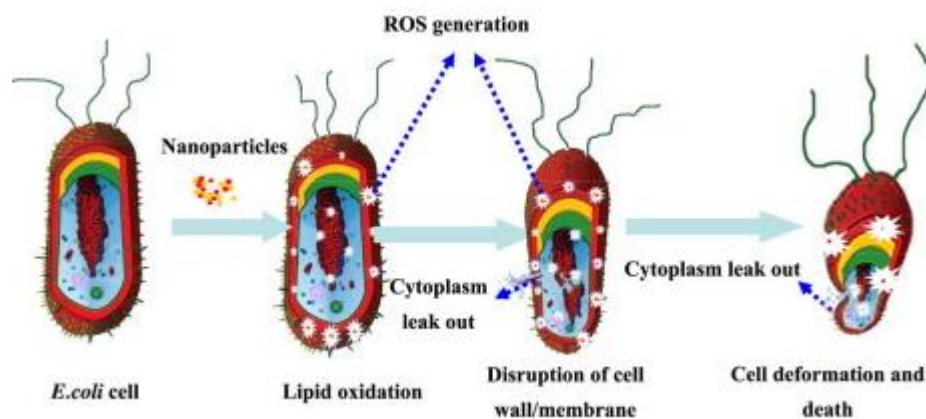
Παράλληλα, με τον τρόπο αυτό θα αποφεύγεται να απελευθερώνονται στα περιβαλλοντικά μέσα υψηλές συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων αυτών οι οποίες θα διαταράσσουν την ισορροπία τους και θα δημιουργούν τοξικές συνθήκες (Kubacka et al., 2014).

Επιπλέον σύμφωνα με έρευνα των Nandakumar et al. (2017) αναφέρεται ότι η κρυσταλλική μορφή του τιτανίου έχει ισχυρές φωτοκαταλυτικές ιδιότητες μέσω της υπεριώδους ακτινοβολίας. Με τον όρο φωτοκατάλυση εννοείται η επιτάχυνση του ρυθμού μιας αντίδρασης μέσω ενεργοποίησης του καταλύτη με κατάλληλης ενέργειας φωτόνια. Το ερευνητικό ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί στην δυνατότητα απόκτησης αντιμικροβιακών δραστηριοτήτων της ανατάσης και στο φάσμα του ορατού φωτός. Αφού αρχικά εξετάστηκε το ενδεχόμενο χρήσης του διοξειδίου του τιτανίου για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές στο ορατό φάσμα και διαπιστώθηκε ότι δεν διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες, μέσω τροποποίησης της επιφάνειάς του από τους Asahi et al. (2001) με νιτρώδες άζωτο οι αντιμικροβιακές ιδιότητες αυξήθηκαν. Στο ίδιο αποτέλεσμα κατέληξε και η έρευνα των Chen et al. (2014), σύμφωνα με την οποία οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του νανοσωματιδίου αυτού εντοπίστηκαν και απουσίας ηλιακού φωτός μέσω της ενίσχυσής τους με χαλκό (Cu).

Όπως και για την περίπτωση του οξειδίου του γραφενίου έτσι και για το διοξείδιο του τιτανίου έρευνες έχουν αποδείξει ότι τα ιόντα του παράγουν ελεύθερες ρίζες υδροξυλίου και υπεροξειδίου (ROS) τα οποία προκαλούν οξειδωτικό στρες στα κύτταρα των μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την πρόκληση μη αναστρέψιμης βλάβης στα δομικά συστατικά τους (μιτοχόνδρια, πρωτεΐνες, γενετικό υλικό κ). Οι δραστικές αυτές ρίζες παράγονται μέσω αντίδρασης ζευγών ηλεκτρονίων από το φωτοεκκινημένο από την ακτινοβολία TiO₂ με το προσροφημένο νερό στην διεπιφάνεια νερού και καταλύτη.



Σχήμα 1.9.1: Απεικόνιση του μηχανισμού αντιβακτηριακής δράσης του διοξειδίου του τιτανίου
Πηγή: Khezerlou et al. (2018)



Σχήμα 1.9.2: Απεικόνιση του μηχανισμού αντιβακτηριακής δράσης του διοξειδίου του τιτανίου
σε κύτταρα του βακτηρίου *E. coli* Πηγή: Chen et al. (2014)

Μία από τις περιπτώσεις κατά τις οποίες το νανοσωματίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκε με την μορφή μεμβρανών ήταν κατά την έρευνα των Liang et al. (2018) όπου εξετάστηκε και επιβεβαιώθηκε η αδρανοποίηση του Gram αρνητικού βακτηρίου *E. coli*. Η αντιμικροβιακή ιδιότητα του νανοσωματιδίου αυτού έχει διαπιστωθεί και σε Gram θετικά βακτήρια όπως *St. aureus* εξαιτίας της πολυπλοκότητας της επιφανείας τους που παρουσιάζουν (Zhu, 2016; Yue, 2013). Ωστόσο λόγω των ευνοϊκών ιδιοτήτων που χαρακτηρίζουν το διοξείδιο του τιτανίου σε συνδυασμό με τις πολυάριθμες υδατογενείς ασθένειες που προκαλεί η ύπαρξη παθογόνων βακτηρίων, έχει καθιερωθεί η εφαρμογή τους ως αντιβακτηριακές επιφάνειες ακόμη και σε τυπικές μονάδες επεξεργασίας αστικών αποβλήτων (Han et al., 2015). Αν και έως τώρα για τις εγκαταστάσεις αυτές η χλωρίωση χρησιμοποιούνταν ως κύριο απολυμαντικό μέσο, εξαιτίας των καρκινικών παραπροϊόντων που δημιουργεί η εφαρμογή της η χρήση αντιμικροβιακών επιφανειών ολοένα και αυξάνεται. Το γεγονός ότι η απολυμαντική δραστηριότητα του μέσου αυτού δεν απαιτεί άμεση επαφή με το ρύπο, η φιλικότητα που

παρουσιάζει προς το περιβάλλον και η επαναχρησιμοποίησή του χωρίς ιδιαίτερη επεξεργασία είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά τα οποία προωθούν την εφαρμογή τους.

Ωστόσο η εφαρμογή τους καθίσταται ελπιδοφόρα και για νοσοκομειακές ή βιομηχανικές εγκαταστάσεις καθώς η αποτελεσματικότητά τους έχει εξακριβωθεί σε βακτήρια (*E.coli*, *St.aureus*, *E.faecalis*), μύκητες, τοξίνες φυκών και άλλους ανόργανους και οργανικούς ρύπους (Han et al., 2015). Από έρευνα των Babaei et al. (2016) κατά την οποία διερευνήθηκε η επίδραση του TiO_2 σε βακτήρια *E.coli* και *St.Aureus* διαπιστώθηκαν οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του TiO_2 . Μαζί με αυτό να προστεθεί ότι κατά την έρευνα αυτή με την αύξηση της συγκέντρωσης του νανοσωματιδίου μειώνονταν ο αριθμός του ζωντανού μικροβιακού πληθυσμού. Τα πειράματα αυτά διεξήχθησαν και παρουσία ακτινοβολίας η οποία ενίσχυσε σε μεγάλο βαθμό την αδρανοποίηση των βακτηρίων. Το αποτέλεσμα αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι με την παρουσία της υπεριώδους ακτινοβολίας αυξάνονταν η συγκέντρωση των ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου των οποίων η παρουσία όπως έχει προαναφερθεί οδηγεί σε βλάβες των δομικών συστατικών των κυττάρων. Παρόμοια πειράματα εξετάστηκαν και σε έρευνα των Xing et al. (2012) από την οποία προέκυψε ότι ο *St.Aureus* παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία στην παρουσία του TiO_2 συγκριτικά με την *E.coli*. Το αποτέλεσμα αυτό δικαιολογήθηκε λαμβάνοντας υπόψη την κατά Gram ταξινόμηση των βακτηρίων. Πιο συγκεκριμένα, λόγω του ότι ο *St.Aureus* είναι Gram θετικό βακτήριο και σε αντίθεση με το Gram αρνητικό βακτήριο, *E.coli* διαθέτει μόνο ένα παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης το οποίο δεν περιβάλλεται από μία εξωτερική μεμβράνη. Από παρόμοια πειράματα που διεξάχθηκαν από τον Grieken et al. (2010), όπου μελετήθηκαν η *E.coli* ως Gram αρνητικό και ως Gram θετικό ο *E.faecalis* αποφάνθηκε ότι η αντιβακτηριακή δράση των GFN εξαρτάται από το είδος του βακτηρίου και όχι τη δομή του.

2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ

Για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια. Αποτελούνταν από 14 δοκιμαστικούς σωλήνες χωρητικότητας 20ml, κάθε ένας από τους οποίους αποτελούσε και ένα χρονικό δείγμα. Τα δείγματα τα οποία λαμβάνονταν αντιστοιχούσαν σε χρόνο 0, 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 720, 1440, 2880, 5760, 8640 και 11520 min. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 3 κύκλοι πειραμάτων. Ο πρώτος κύκλος εξέταζε την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών μεταξύ τους και με την άμμο. Ο δεύτερος κύκλος περιελάμβανε το νανοσωματίδιο οξειδίου του γραφενίου (GO) ενώ ο τελευταίος το νανοσωματίδιο διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2).

2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Όσον αφορά την πειραματική διαδικασία η οποία πραγματοποιήθηκε περιελάμβανε διατάξεις πειραμάτων διαλείποντος έργου (Batch experiments) με δειγματοληψίες χρονικής διάρκειας έως και 8 ημερών. Οι πειραματικές διατάξεις αυτές είχαν ως σκοπό της διερεύνηση της επίδρασης χαλαζιακής άμμου και νανοσωματιδίων οξειδίου του γραφενίου (GO) και διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) σε τρία εντερικά βακτήρια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα βακτήρια που εξετάστηκαν είναι η *E.coli*, ο *E.faecalis* και ο *St.aureus*. Η διερεύνηση αυτή πραγματοποιήθηκε μέσω καλλιέργειας αποι κιών των βακτηρίων σε τριβλία petri. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε δυναμικές συνθήκες (12 rpm) και οι περιβαλλοντικές συνθήκες που εξετάστηκαν κάθε φορά ήταν ίδιες ($T=25^\circ\text{C}$).

Το σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν ήταν χωρισμένο σε τρεις κύκλους. Ο πρώτος κύκλος περιελάμβανε δύο πειράματα και αφορούσε την διερεύνηση της επίδρασης της χαλαζιακής άμμου στα βακτήρια. Για να είναι δυνατή η διερεύνηση της επίδρασης της χαλαζιακής άμμου στα βακτήρια αρχικά πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα το οποίο αποτελούνταν από δεκατέσσερις (14) δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι ήταν πλήρως κορεσμένοι με το διάλυμα των μικροοργανισμών. Με τον τρόπο αυτό πραγματοποιούνταν έλεγχος της αλληλεπίδρασης των βακτηρίων μεταξύ τους. Αντιστοίχως, όσον αφορά την διερεύνηση της επίδρασης της χαλαζιακής άμμου στα βακτήρια, εξετάστηκε μέσω ενός πειράματος του οποίου οι δοκιμαστικοί σωλήνες ήταν πληρωμένοι με 14g άμμου και 14ml διαλύματος μικροοργανισμών.

Ο δεύτερος κύκλος πειραμάτων περιελάμβανε το οξύδιο του γραφενίου και αποτελούνταν επίσης από δύο πειράματα. Πιο συγκεκριμένα, για την εξέταση της επίδρασης του οξειδίου του γραφενίου (GO) στα βακτήρια πληρώθηκαν 14 δοκιμαστικοί σωλήνες με 10ml αιωρήματος GO και 10ml διαλύματος βακτηρίων. Για την εξέταση του τρόπου δράσης του οξειδίου του γραφενίου (GO) σε συνδυασμό με την χαλαζιακή άμμο στα βακτήρια το δεύτερο πείραμα του κύκλου αυτού περιελάμβανε 14 δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι πληρώθηκαν με 7g άμμο, 7ml αιωρήματος GO και 7ml διαλύματος βακτηρίων. Με τον τρόπο αυτό οι δοκιμαστικοί σωλήνες ήταν πλήρως κορεσμένοι και με αναλογία συστατικών 1:1.

Ο τρίτος κύκλος πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την εξέταση της επίδρασης του νανοσωματιδίου διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) στα βακτήρια και περιελάμβανε αντιστοίχως δύο πειράματα των οποίων η δομή ήταν αντίστοιχη με αυτήν που ακολουθήθηκε για το GO.

Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι οι συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων και μικροοργανισμών που εξετάστηκαν σε όλα τα πειράματα ήταν ίδιες. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα δύο νανοσωματίδια αν και ο τρόπος παρασκευής των αιωρημάτων τους δεν ήταν πανομοιότυπος οι συγκεντρώσεις που εξετάστηκαν ήταν ίδιες (20ppm). Για την επίτευξη της συγκέντρωσης αυτής στους δοκιμαστικούς σωλήνες, λόγω του ότι η αναλογία των συστατικών τους νανοσωματίδιο- διάλυμα βακτηρίων ήταν 1:1 η αρχική συγκέντρωση των νανοσωματιδίων που παρασκευάζονταν ήταν 40ppm. Με τον τρόπο αυτό Όμως, λόγω του ότι η ποσότητα του διαλύματος αυτού αναμειγνύονταν με ίση ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος που περιείχε μικροοργανισμούς η τελική συγκέντρωση η οποία εξετάζονταν ήταν 20ppm.

Τα πειραματικά αποτελέσματα των μικροοργανισμών λαμβάνονταν μέσω καταμέτρησης των αποικιών που καλλιεργούνταν στα θρεπτικά υλικά. Πιο συγκεκριμένα, λόγω της ταυτόχρονης εξέτασης τριών μικροοργανισμών, τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιούνταν ήταν εκλεκτικά ώστε να είναι εφικτός ο διαχωρισμός των βακτηρίων. Επιπροσθέτως, λόγω του ότι η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών είναι υψηλή και ίση με 10^5 cfu/ml, για να είναι εφικτή και έγκυρη η καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία το δείγμα αραιώνονταν 2 και 3 φορές. Σε κάθε περίπτωση όμως η ποσότητα δείγματος η οποία προστίθεται κάθε φορά στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού στο τριβλίο ήταν 300μl. Για κάθε δειγματοληψία που πραγματοποιούνταν και για κάθε βακτήριο απλώνονταν διπλέτα τριβλίων ώστε να υπάρχει βεβαιότητα στον αριθμό των αποικιών που μετρήθηκαν. Ακολουθώντας τον τρόπο αυτό για κάθε δείγμα απλώνονταν τουλάχιστον 6 τριβλία θρεπτικού υλικού. Μετά το πέρας της καταμέτρησης των αποικιών των τριβλίων, ο αριθμός των αποικιών κάθε τριβλίου ανάγονταν σε αριθμό δείγματος διαιρώντας με τον όγκο 0,3ml ο οποίος είναι όπως έχει αναφερθεί παραπάνω ο όγκος του δείγματος που απλώνεται σε κάθε τριβλίο.

2.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 ΥΛΙΚΑ

- ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία τα νανοσωματίδια που εξετάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ήταν το οξειδίο του γραφενίου (GO) και το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2). Όσον αφορά το οξειδίο του γραφενίου (GO) το εργαστήριο το διέθετε σε μορφή φύλλων τα οποία προμηθεύονταν από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Όσον αφορά το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2), αποτελούνταν από ένα μίγμα νανόσκονης ρουτίλιου (rutile) και ανατάσης (anatase), προϊόν το οποίο επίσης προμηθεύτηκε από την εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Η νανόσκονη αυτή χαρακτηριζόταν από μέγιστο μέγεθος σωματιδίων τα 100nm.

- ΒΑΚΤΗΡΙΑ

Αναφορικά με τα βακτήρια των οποίων η συμπεριφορά εξετάστηκε παρουσία και απουσία άμμου και νανοσωματιδίων αποτελούσαν πρότυπα στελέχη. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το βακτήριο *E.coli* προμηθεύτηκε από την εταιρεία DSM με κωδικό 498. Το βακτήριο αυτό αναπτύσσεται κάτω από ευνοϊκές συνθήκες στους 37°C. Αντιστοίχως το βακτήριο *E.faecalis* προμηθεύτηκε από την εταιρεία American Type Culture Collection με κωδικό 14506. Το βακτήριο αυτό όπως και η *E.coli* αναπτύσσεται κάτω από ευνοϊκές συνθήκες στους 37°C. Όσον αφορά το βακτήριο *St.aureus* το οποίο χρησιμοποιήθηκε απομονώθηκε από δείγμα τροφίμου και συγκεκριμένα από πουλερικά και ταυτοποιήθηκε βιοχημικά σύμφωνα με το API® Staph Test Biomerieux.

- ΧΑΛΑΖΙΑΚΗ ΑΜΜΟΣ (QUARZ SAND)

Η χαλαζιακή άμμος η οποία χρησιμοποιήθηκε και για τους τρεις κύκλους πειραμάτων ώστε να εξεταστεί η πιθανή επίδραση που ασκεί στους μικροοργανισμούς προέρχονταν από την εταιρεία Filcolm (FILTERZAND&GRIND) και χαρακτηρίζονταν από χονδρή κοκκομετρία. Πιο συγκεκριμένα, το μέγεθος των κόκκων της άμμου ήταν μεγαλύτερο από 850μm καθώς προέρχονταν από κόσκινο No. 20 και χαρακτηριζόταν από χημική σύσταση 0.15 % Na₂O, 0.02 % MgO, 1.75 % Al₂O₃, 96.2 % SiO₂, 0.03 % P₂O₅, 0.06 % SO₃, 0.78 % K₂O, 0.11 % CaO, 0.05 % TiO₂ και 0.46 % Fe₂O₃. Όσον αφορά τα φυσικά χαρακτηριστικά της άμμου αυτά είναι η ειδική πυκνότητα, η σκληρότητα και η μαζική πυκνότητα των οποίων οι τιμές είναι 2,6 g/cm³, 7 Mohs και 1.6 tn/m³ αντιστοίχως. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι η άμμος που χρησιμοποιούνταν για κάθε πείραμα είτε ήταν αχρησιμοποίητη είτε επαναχρησιμοποιημένη καθαριζόταν σύμφωνα με το πρωτόκολλο το οποίο παρατίθεται παρακάτω και ξαναχρησιμοποιούνταν.

Στην συνέχεια, παρατίθενται τα αναλώσιμα υλικά και χημικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία και διεξαγωγή των πειραμάτων.

2.2.2 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

- ΓΥΑΛΙΝΑ-ΠΛΑΣΤΙΚΑ ΣΚΕΥΗ

Οι διατάξεις κάθε πειράματος αποτελούνταν από δοκιμαστικούς σωλήνες (vials) των 20ml οι οποίοι κάθε φορά ήταν πληρωμένοι με το προς εξέταση μείγμα. Αυτού του τύπου δοκιμαστικών σωλήνων, χρησιμοποιούνταν λόγω του ότι προσομοίωναν αντιδραστήρες διαλείποντος έργου (batch reactors). Κάθε πείραμα αποτελούνταν από 14 δοκιμαστικούς σωλήνες, καθώς 14 ήταν τα δείγματα τα οποία λαμβάνονταν εύρος χρονικής διάρκειας 8 ημερών. Ο τύπος των δοκιμαστικών σωλήνων, ήταν Pyrex glass screw-cap tubes (Fisher Scientific by Thermo Fischer Scientific, Hampton, New Hampshire, VA, U.S.).

Η πλήρωση των δοκιμαστικών σωλήνων, πραγματοποιούνταν μέσω ογκομετρικών σιφωνίων των 10,5, και 2 ml ανάλογα τον απαιτούμενο όγκο κάθε φορά. Τα σιφώνια, τα οποία αποτελούνταν από γυαλί ήταν βαθμονομημένα ώστε να είναι ακριβής η ογκομέτρηση κάθε φορά. Κάθε ένα από αυτά, μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την ογκομέτρηση οποιουδήποτε

συστατικού (νανοσωματιδίων, μείγματος μικροοργανισμών, ρυθμιστικό διάλυμα) έπειτα από διεξοδική και επιμελή πλύση και αποστείρωσή του. Ο επιθυμητός όγκος άντλησης κάθε φορά για την πλήρωση του σιφωνίου πραγματοποιούνταν με την χρήση πουάρ δηλαδή αντλιών πιπετών με εύκαμπτη υποδοχή μέγιστης αντλητικής ικανότητας τα 10ml. Το εργαστήριο ήταν εξοπλισμένο με 2 τύπους πληρωτών πιπετών, ο ένας εκ των οποίων ήταν ελαστικός τριών βαλβίδων ενώ ο άλλος μηχανικός τύπου “PI-Pump”.

Ένας άλλος τύπος πιπετών ο οποίος χρησιμοποιήθηκε όμως μόνο για την συμπλήρωση μικροποσοτήτων διαλυμάτων ως την χαραγή σε μεγαλύτερους ογκομετρικούς σωλήνες ήταν αυτές τύπου Pasteur. Οι πιπέτες αυτές αποτελούνταν επίσης από γυαλί όμως ήταν μιας χρήσης. Λόγω του μικρότερου όγκου δείγματος που μπορούσαν να συλλέξουν, τα πουάρ που χρησιμοποιούνταν για τις πιπέτες αυτές ήταν κατάλληλα μικρότερης υποδοχής.

Πέρα από τις πιπέτες αυτές το εργαστήριο ήταν εξοπλισμένο και με μηχανικές Eppendorf μέγιστης χωρητικότητας δείγματος 20-200μl και 10-1000μl. Με τις πιπέτες αυτές οι οποίες διέθεταν ρυθμιστή συλλογής όγκου, το δείγμα συλλεγόταν σε πλαστικά tips κατάλληλου μεγέθους μιας χρήσης.

Οι μετρήσεις στο UV φασματοφωτόμετρο λαμβάνονταν μέσω ειδικών χαλαζιακών κυψελίδων ή κυβέτων (cuvette) χωρητικότητας 1ml, οι οποίες πληρώνονταν με δείγμα είτε μέσω μηχανικών πιπετών eppendorf είτε μέσω πιπετών Pasteur. Έπειτα από την πλήρωσή τους με το δείγμα και πριν από την τοποθέτησή τους στην θήκη του φασματοφωτομέτρου για την λήψη μέτρησης καθαρίζονταν εξωτερικά με λίγο χαρτί ώστε να αποφευχθούν τυχόν αλλοιώσεις κατά τη λήψη των μετρήσεων. Οι κυψελίδες αυτές χρησιμοποιούνταν για την λήψη οπτικών απορροφήσεων των νανοσωματιδίων μέσω των οποίων η ελέγχονταν η σταθερότητα των αιωρημάτων αλλά και για την παρασκευή διαλύματος με το μίγμα των τριών μικροοργανισμών με αρχική συγκέντρωση 10^5 cfu/ml. Η διαδικασία παρασκευής του διαλύματος αυτού αναφέρεται αναλυτικά παρακάτω στην παράγραφο διαδικασία παρασκευής διαλυμάτων. Μετά το πέρας της χρήσης τους πλένονταν με αρκετό απιονισμένο νερό, αφήνονταν να στεγνώσουν και έπειτα φυλασσόντουσαν στην ειδική θήκη τους έως ότου να επαναχρησιμοποιηθούν.

Για την παρασκευή των αιωρημάτων των νανοσωματιδίων, των ρυθμιστικών διαλυμάτων, των διαλυμάτων μίγματος μικροοργανισμών χρησιμοποιούνταν είτε γυάλινες Pyrex κωνικές φιάλες χωρητικότητας από 50-250ml είτε γυάλινα μπουκάλια τύπου Kimble χωρητικότητας από 250-1000ml.

Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιούνταν τριβλία petri διαστάσεων 92*16mm μιας χρήσης, πάνω στα οποία απλώνονταν το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό με την μορφή διαλύματος μεγάλου ιξώδους για τις καλλιέργειες των μικροοργανισμών. Για κάθε θρεπτικό υλικό το οποίο ήταν με μορφή σκόνης, χρησιμοποιούνταν πλαστικά ταψάκια στα οποία ζυγίζονταν η επιθυμητή ποσότητα με τη χρήση μεταλλικών λαβών (κουτάλια, κουταλάκια και σπάτουλες). Όταν το θρεπτικό υλικό ήταν έτοιμο για χρήση, το δείγμα τοποθετούνταν πάνω στο τριβλίο και με τη χρήση πλαστικών κρίκων μιας χρήσης απλωνόταν

έως ότου απορροφηθεί πλήρως. Η ποσότητα του θρεπτικού υλικού η οποία απλώνονταν σε κάθε τριβλίο petri ήταν περίπου 20ml και πάχους τουλάχιστον 4mm ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη των βακτηρίων.

2.2.3 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΑΛΩΣΙΜΑ

Για όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, σε σταθερό pH=7 χρησιμοποιήθηκε το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Για την Παρασκευή του ρυθμιστικού αυτού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν τα φωσφορικά άλατα $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και KH_2PO_4 . Πιο συγκεκριμένα, αναφερόμαστε στα Sodium phosphate dibasic dihydrate(98.5-101%, calc. to the dried substance, ProductNo04272, CASNo10028-24-7, Molecular Weight: 177.99, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.) και το Potassium phosphate monobasic (100.5%, calc. to the dried substance, Product No 04243, CAS No 7778-77-0, Molecular Weight: 136.09, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.), με τα οποία ήταν εξοπλισμένο το εργαστήριο. Οι ποσότητες των αλάτων αυτών διαλύονταν σε υπερκάθαρο νερό @ 18.2 MΩ·cm (ultrapure ή milliQ water), το οποίο παραλαμβάνονταν από ειδική συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού, στην οποία διοχετεύονταν απιονισμένο νερό, το οποίο παραλαμβάνονταν από την έξοδο στήλης ιονταλλακτικών ρητινών.

Ακόμη, για τις καλλιέργειες των μικροβιακών αποικιών, το εργαστήριο διέθετε τα εκλεκτικά θρεπτικά υλικά για τους τρεις μικροοργανισμούς. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά, το βακτήριο *E.coli*, το θρεπτικό υλικό στο οποίο γίνονταν οι καλλιέργειες των αποικιών της είναι το Harlequin το οποίο προμηθεύονταν το εργαστήριο από την εταιρεία LAB με κωδικό HAL008. Αντιστοίχως, για τον εντερόκοκκος (*E.faecalis*) χρησιμοποιούνταν το θρεπτικό υλικό Slannetz & Bartley Medium της ίδιας εταιρείας με κωδικό LAB166. Τελειώνοντας, για τον σταφυλόκοκκο (*St.aureus*) χρησιμοποιούνταν το Mannitol Salt Agar με κωδικό LAB007.

2.2.4 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ

2.2.4.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Για την διεξαγωγή του πειράματος αλληλεπίδρασης βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων σε πειράματα διαλείποντος έργου(Batch experiments) και πειράματα μεταφοράς, χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα με PH=7 σε θερμοκρασία δωματίου T=25°C και τιμή Ιοντικής ισχύος Is=2mM.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στα πειράματα διαλείποντος έργου (Batch experiments) στα οποία μελετήθηκαν η επίδραση των νανοσωματιδίων οξειδίου του γραφενίου (graphene oxide GO) και διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) και χαλαζιακής άμμου στο μείγμα των τριών μικροοργανισμών (*E.coli*, *E.faecalis*, *St.aureus*) χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer Solution, PBS). Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν μία φιάλη των 1000ml μέσω της οποίας ογκομετρώνται 1000ml υπερκάθαρου νερού (ultrapure water @18,2 MΩ·cm). Το υπερκάθαρο νερό λαμβάνεται μέσω της συσκευής με την οποία ήταν εξοπλισμένο το εργαστήριο και στην οποία διοχετεύεται απιονισμένο νερό. Για να επιτευχθεί το επιθυμητό pH και η επιθυμητή ιοντική ισχύς στα

1000ml υπερκάθαρου νερού προστίθενται δύο φωσφορικά άλατα. Το ένα από αυτά είναι το διένυδρο διφασικό φωσφορικό νάτριο (Sodium Phosphate dibasic dehydrate, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) με μοριακό βάρος $\text{MW}=141.96 \text{ g/mol}$ και προστίθεται σε ποσότητα $m=0.0779\text{g}$ και το άλλο είναι το μονοβασικό φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4), με μοριακό βάρος $\text{MW}=136.09 \text{ g/mol}$. Κάθε μία από τις παραπάνω ποσότητες ζυγίζονται με τη χρήση ζυγαριάς ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Για την ολοκλήρωση της παρασκευής του διαλύματος αυτού, προστίθενται τα δύο άλατα στην ογκομετρική που περιέχει το υπερκάθαρο νερό και αφού ανακινηθεί καλά μετράται η θερμοκρασία και το PH. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι για τα πειράματα που περιλαμβάνουν και τα βιοκολλοειδή το ρυθμιστικό διάλυμα αποστειρώνεται και έπειτα χρησιμοποιείται. Οι απαιτούμενες ποσότητες των φωσφορικών αλάτων που χρησιμοποιούνται, υπολογίστηκαν μέσω της εξίσωσης Henderson-Hasselbach για επιθυμητό pH και σταθερά ισορροπίας K_a του οξέος:

$$\text{pH}=\text{pK}_a+\log\frac{[\text{HPO}_4]}{[\text{H}_2\text{PO}_4]}$$

2.2.4.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ (GO)

Για τα πειράματα διαλείποντος έργου και μεταφοράς που περιλαμβάνουν οξειδίο του γραφενίου παρασκευάζεται πριν από κάθε πείραμα ένα αιώρημα συγκέντρωσης 100rpm. Το αιώρημα αυτό παρασκευάζεται χρησιμοποιώντας φύλλα οξειδίου γραφενίου.

Χρησιμοποιώντας την ζυγαριά ακριβείας του εργαστηρίου ζυγίζεται κάθε φορά η απαιτούμενη ποσότητα GO η οποία είναι ίση με 0.01g και αναμιγνύεται με 100ml ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (PBS) τα οποία έχουν ογκομετρηθεί σε μία φιάλη. Λόγω του ότι το GO είναι αδιάλυτο στο ρυθμιστικό διάλυμα αυτό, για την ομογενοποίησή του, το μίγμα τοποθετείται για δύο ώρες σε σύστημα υπερήχων μέσω της συσκευής (Elmasonic S 30/(H)) με την οποία ήταν εξοπλισμένο το εργαστήριο. Η φιάλη στην οποία ήταν τοποθετημένη το αιώρημα ήταν ταπωμένη με parafilm. Η ηχοβόλιση πραγματοποιούνταν μέσω απιονισμένου νερού με το οποίο ήταν πληρωμένη η λεκάνη (sonication bath). Η στάθμη του απιονισμένου νερού, έπρεπε να είναι τέτοια ώστε να καλύπτει όλο το διάλυμα του GO για να πραγματοποιείται ομοιόμορφη διασπορά σε όλο τον όγκο του δείγματος. Το απιονισμένο νερό αυτό όσο το δείγμα ήταν στην συσκευή των υπερήχων (sonication bath) ανανεωνόταν ανά μισή ώρα περίπου ώστε να αποφευχθεί η αύξηση της θερμοκρασίας του. Η αύξηση της θερμοκρασίας του απιονισμένου νερού συνεπάγεται και την αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος που οδηγεί στην αύξηση της ταχύτητας των νανοσωματιδίων. Όσο μεγαλύτερες είναι οι ταχύτητες των σωματιδίων στο δείγμα τόσο περισσότερες είναι και οι συγκρούσεις μεταξύ τους εξαιτίας των τυχαίων κινήσεων, με αποτέλεσμα την συσσωμάτωσή τους.

Έπειτα από το πέρας των δύο ωρών και αφού στο δείγμα έχουν διαλυθεί ομοιόμορφα τα φύλλα οξειδίου του γραφενίου έχει παρασκευαστεί το αιώρημα συγκέντρωσης 100rpm. Από το πυκνό αυτό διάλυμα, συλλέγεται ορισμένη ποσότητα η οποία αναμιγνύεται με μία ποσότητα από το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) ώστε να προκύψει νέο αραιωμένο διάλυμα εναιωρήματος συγκέντρωσης 20rpm, το οποίο είναι αυτό το οποίο χρησιμοποιείται κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Έπειτα από δοκιμές παρατηρήθηκε ότι επιλέγοντας

αυτόν τον τρόπο παρασκευής το τελικό διάλυμα που προκύπτει είναι σταθερότερο συγκριτικά με αυτό που προέκυπτε όταν κατασκευαζόταν απευθείας αιώρημα συγκέντρωσης 20ppm. Ωστόσο, πριν από την έναρξη αλλά και κατά τη διάρκεια κάθε πειράματος λαμβανόταν μέτρηση οπτικής απορρόφησης για τα εναιωρήματα νανοσωματιδίων συγκεντρώσεων 100 και 20ppm για να ελέγχεται η πιθανή μεταβολή της σταθερότητάς τους. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων οι μετρήσεις απορρόφησης των δειγμάτων δίνουν τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις των νανοσωματιδίων μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης, οι οποίες κατασκευάζονται ξεχωριστά για κάθε πείραμα. Η μεθοδολογία κατασκευής των καμπυλών βαθμονόμησης παρατίθεται αναλυτικά παρακάτω.

2.2.4.3 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΚΑΜΠΥΛΩΝ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ (GO)

Για την δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης, δηλαδή γραμμικών σχέσεων που συνδέουν την απορρόφηση με την συγκέντρωση των νανοσωματιδίων χρησιμοποιείται ένα πυκνό αιώρημα GO συγκέντρωσης 100ppm. Χρησιμοποιώντας αρχικά το πυκνό αυτό αιώρημα θα κατασκευάσουμε με την χρήση δοκιμαστικών σωλήνων (vials) χωρητικότητας 20ml τις συγκεντρώσεις 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2ppm. Αυτό θα γίνει αναμιγνύοντας κάθε φορά μία ποσότητα από την αμέσως μεγαλύτερη συγκέντρωση νανοσωματιδίου που έχει παρασκευαστεί, ορισμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος. Οι ποσότητες του ρυθμιστικού διαλύματος που προστίθενται σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα για την παρασκευή των επιθυμητών συγκεντρώσεων είναι αντιστοίχως 4, 5, 6.7, 10, 10, 4, 5, 6.7, 10ml. Αφού έχουν πλέον ετοιμαστεί οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τις επιθυμητές συγκεντρώσεις ανακινούνται για την ομογενοποίηση του περιεχομένου τους με χρήση του vortex και λαμβάνεται τριπλέτα μετρήσεων οπτικής απορρόφησης για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα με τη χρήση του UV-Vis Spectrophotometer. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η λήψη της μέτρησης της οπτικής απορρόφησης πρέπει να λαμβάνεται όσο το δείγμα είναι ομογενοποιημένο ώστε να αποφεύγονται τυχόν καθιζήσεις των νανοσωματιδίων και τα αποτελέσματα να είναι αντιπροσωπευτικά. Οι μετρήσεις αυτές λαμβάνονταν στο μήκος κύματος οπτικής απορρόφησης 231nm για το GO και 400nm για το TiO₂ μέσω μιας χαλαζιακής κυψελίδας χωρητικότητας 1ml. Μετά το πέρας της λήψης των αποτελεσμάτων, κατασκευάζεται μέσω της χρήσης του excel η σχηματική απεικόνιση των δεδομένων και υπολογίζεται η ευθεία που τα συνδέει. Μέσω αυτής μπορούμε για κάθε δείγμα που θα παίρνουμε μετρώντας την οπτική απορρόφησή του να υπολογίζουμε την συγκέντρωση του νανοσωματιδίου στην οποία αντιστοιχεί.

2.2.4.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΑΙΩΡΗΜΑΤΟΣ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO₂)

Ο τρόπος παρασκευής του αιωρήματος αυτού είναι ίδιος με αυτός ο οποίος ακολουθούνταν και για την παρασκευή του εναιωρήματος οξειδίου του γραφενίου (GO) με διαφορά ότι μετά από την ανάμειξη μάζας TiO₂ 0.01g με όγκο 100ml ρυθμιστικού διαλύματος για παρασκευή διαλύματος συγκέντρωσης 100ppm το διάλυμα αντί για δύο ώρες ηχοβόλισης σε λουτρό υπερήχων τοποθετούνταν αρχικά για μία ώρα στην τράπεζα ανάδευσης του εργαστηρίου και

έπειτα για μία ώρα σε ηχοβόλιση. Με τον τρόπο αυτόν το αιώρημα το οποίο παρασκευαζόταν χαρακτηριζόταν από μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με αυτό που προέκυπτε εάν μόνο ηχοβολούνταν για δύο ώρες όπως το GO.

2.2.4.5 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΑΜΜΟΥ

Για τα πειράματα τα οποία περιελάμβαναν χαλαζιακή άμμο ακολουθούνταν ειδικό πρωτόκολλο καθαρισμού της πριν από την χρήση της. Μερικές μέρες πριν από την διεξαγωγή κάθε πειράματος, η άμμος καθαριζόταν σχολαστικά ώστε να απομακρυνθούν από αυτήν οποιεσδήποτε ανεπιθύμητες προσμείξεις που πιθανόν να εμπεριέχει είτε από προηγούμενο πείραμα στο οποίο είχε χρησιμοποιηθεί είτε από την κατεργασία που έχει υποστεί κατά την παραγωγή της. Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία (Syngouna and Chrysikopoulos et al. (2011)) αρχικά, για 300g άμμου 5,2ml HNO_3 συγκέντρωσης 0,1M (70% v/v) λαμβάνονταν μέσω μιας πιπέτας των 10ml στον επαγωγό του εργαστηρίου και προστίθενταν σε μία κωνική φιάλη των 2L. Στη συνέχεια, στην ίδια κωνική φιάλη συμπληρώνονταν απιονισμένο νερό μέχρι να υπάρχει τελικός όγκος υγρού 800ml. Το συλλεγόταν σε δοχεία από την στήλη απιονισμένου νερού που υπήρχε στο εργαστήριο. Αφού με τη χρήση μιας γυάλινης ράβδου το υγρό αναδεύονταν και ομογενοποιούνταν, στην κωνική αυτή προστίθενταν και τα 300g άμμου τα οποία είχαν ζυγιστεί στον ζυγό του εργαστηρίου. Με τον τρόπο αυτό είχε δημιουργηθεί μία αναλογία 300g άμμου/800ml υγρού. Το στόμιο της κωνικής αυτής σκεπαζόταν με αλουμινόχαρτο, για να αποφευχθεί η εξάτμιση του νιτρικού οξέος, και τοποθετούνταν για τρεις ώρες στον αναδευτήρα του εργαστηρίου στις 200rpm. Με τον τρόπο αυτό απομακρύνονταν από αυτήν οι όποιες επιφανειακές προσμείξεις μπορεί να υπήρχαν όπως υδροξειδία σιδήρου. Μετά το πέρας των τριών ωρών από την κωνική φιάλη αφαιρούνταν και ρίχνονταν στον νεροχύτη του εργαστηρίου το υγρό κλάσμα. Μετά από πολλά ξεπλύματα με απιονισμένο νερό, ζυγίζονταν με τον ζυγό 3,2g NaOH. Η μάζα αυτή προστίθενταν σε μία άλλη κωνική με 500ml απιονισμένου νερού και αναδεύονταν έως ότου να διαλυθεί πλήρως. Στην κωνική αυτή προστίθενταν άλλα 300ml απιονισμένου και πλέον αφού το υγρό ήταν ομογενοποιημένο προστίθενταν στην κωνική των 2L όπου ήταν τα 300g άμμου. Η κωνική αυτή τοποθετούνταν ξανά στον αναδευτήρα για ακόμη τρεις ώρες. Λόγω του ότι η άμμος είναι θετικά φορτισμένη, με την προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) πραγματοποιούνταν εξουδετέρωση και απομακρύνονταν οι όποιες ουσίες (όπως φυσικά αργιλικά σωματίδια) που πιθανόν να είχαν κατακρατηθεί. Μετά το χρονικό διάστημα αυτό, πραγματοποιούνταν πολλά ξεπλύματα με απιονισμένο νερό. Για τον αποτελεσματικότερο καθαρισμό της άμμου, πολλές φορές ανακινούνταν με 800ml απιονισμένου νερού έως ότου το απιονισμένο νερό που απομακρύνεται να είναι διαυγές και να μην εμπεριέχει ακαθαρσίες. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής η άμμος συλλεγόταν σε ένα ταψάκι και τοποθετούνταν στον κλίβανο για ξήρανση στους 70°C περίπου. Όταν η πλέον είχε ξηραθεί πλήρως ήταν κατάλληλη για επαναχρησιμοποίηση. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι για τα πειράματα τα οποία περιελάμβαναν και βιοκολλοειδή η άμμος μετά από την διαδικασία της ξήρανσης τοποθετούνταν σε αυτόκαυστο κλίβανο για αποστείρωση στους 120°C για μία ώρα, για την αποφυγή επιμολύνσεων από άλλους μικροβιακούς πληθυσμούς. Έπειτα από την αποστείρωσή της τοποθετούνταν ξανά για ξήρανση στο φούρνο για την απομάκρυνση της πιθανής υγρασίας που επήλθε από την αποστείρωση.

2.2.4.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ

Λόγω του ότι στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία εξετάζονται τρεις μικροοργανισμοί (*E.coli*, *E.faecalis*, *St.aureus*) παρασκευάζονταν ένα διάλυμα στο οποίο η αρχική συγκέντρωσή τους να είναι ίδια. Δύο ημέρες πριν από την έναρξη κάθε πειράματος παρασκευάζονταν μία διπλέτα με ανακαλλιέργειες κάθε βακτηρίου ξεχωριστά, σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό, Nutrient Agar. Από τα στελέχη μικροοργανισμών τα οποία διαθέτει το τμήμα των Μηχανικών Περιβάλλοντος κατεψυγμένα λαμβάνεται μία μικρή ποσότητα μέσω ενός κρίκου και απλώνεται σε τριβλίο petri με N.Agar. Η ανακαλλιέργεια αυτή αφήνονταν σε φούρνο στους 36,6°C για επώαση για δύο ημέρες. Την ημέρα που επρόκειτο να τεθεί το πείραμα και παρασκευαζόταν ένα διάλυμα στο οποίο για κάθε μικροοργανισμό η συγκέντρωση είναι 10^5 cfu/ml. Η παρασκευή γίνονταν σταδιακά, δηλαδή πρώτα επιτυγχάνονταν η επιθυμητή συγκέντρωση για κάθε μικροοργανισμό μεμονωμένα και ύστερα αναμιγνύονταν σε ένα διάλυμα. Κατά την έναρξη της προετοιμασίας του διαλύματος λαμβάνονταν μία κωνική φιάλη των 50ml για κάθε έναν από τους μικροοργανισμούς. Κάθε μία από τις μικρές αυτές κωνικές πληρώνονταν με 20ml από το ήδη αποστειρωμένο ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) το οποίο βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C. Με την βοήθεια ενός πλαστικού κρίκου αρχικά για το πρώτο βακτήριο, λαμβάνονταν από μία φρέσκια ανακαλλιέργεια μία ποσότητα η οποία τοποθετούνταν στην αντίστοιχη κωνική φιάλη με PBS. Έπειτα από ομογενοποίηση του διαλύματος αυτού μέσω μιας κυψελίδας πληρωμένης με PBS λαμβάνονταν οπτική μέτρηση απορρόφησης στα 600nm. Το δείγμα αυτό αποτελούσε το τυφλό ώστε οι επόμενες μετρήσεις απορρόφησης που θα λαμβάνονταν να αφορούσαν μόνο το βακτήριο και όχι βακτήριο και ρυθμιστικό διάλυμα. Έπειτα με τη χρήση μιας πιπέτας Eppendorf λαμβάνονταν μέτρηση του διαλύματος με το βακτήριο. Εάν η απορρόφηση ήταν μεγαλύτερη από 0,1, τότε προστίθενταν στην κωνική λίγη ποσότητα PBS και αναδεύονταν έως ότου την ομογενοποίηση του αραιωμένου διαλύματος. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι πριν από την λήψη νέας μέτρησης απορρόφησης ξεπλένονταν η κυψελίδα με PBS και αντικαθιστούσαν το tip στην πιπέτα Eppendorf ώστε να μην επηρεαζόταν το αποτέλεσμα από το προηγούμενο δείγμα. Εάν η αρχική απορρόφηση ήταν μικρότερη από 0,1 τότε λαμβάνονταν λίγη ακόμη παραπάνω ποσότητα βακτηρίου από την ανακαλλιέργεια και διαλύονταν στην ίδια κωνική φιάλη. Στην περίπτωση που η απορρόφηση που λαμβάνονταν ήταν 0,1 τότε τοποθετούνταν η κωνική στο ψυγείο για να ενυδατωθεί και επαναλαμβάνονταν η ίδια διαδικασία για τα επόμενα βακτήρια. Όταν πλέον ολοκληρώνονταν η ίδια διαδικασία διατίθενταν 20ml περίπου από κάθε βακτήριο σε συγκέντρωση 10^8 cfu/ml. Στη συνέχεια λαμβάνονταν τρεις ογκομετρικοί σωλήνες (ένας για κάθε βακτήριο) σε κάθε έναν από τους οποίους πραγματοποιούνταν δεκαδική αραιώση από 10^8 cfu/ml σε 10^7 cfu/ml. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνονταν δύο φορές έως την επίτευξη της επιθυμητής συγκέντρωσης, 10^5 cfu/ml. Ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος μικροοργανισμών μεταβάλλονταν σε κάθε πείραμα καθώς μεταβάλλονταν τα συστατικά πλήρωσης των δοκιμαστικών σωλήνων. Παρ' όλα αυτά όμως, ο τρόπος με τον οποίο παρασκευάζονταν το διάλυμα μικροοργανισμών ήταν ίδιος. Για κάθε πείραμα υπολογίζονταν ο απαιτούμενος όγκος διαλύματος μικροοργανισμών βάσει του οποίου διαμορφώνονταν και οι όγκοι στους οποίους πραγματοποιούνταν οι δεκαδικές αραιώσεις. Έπειτα από την ολοκλήρωση της παρασκευής του επιθυμητού διαλύματος η κωνική φιάλη τοποθετούνταν σε μαγνητικό αναδευτήρα.

2.2.4.7 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΡΙΒΛΙΩΝ ΜΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Απαραίτητα αναλώσιμα για την διεξαγωγή των πειραμάτων στο κομμάτι των βιοκολλοειδών ήταν τα τριβλία με το θρεπτικό υλικό για κάθε μικροοργανισμό πάνω στα οποία κάθε φορά απλώνονταν το δείγμα. Η παρασκευή των τριβλίων αποτελεί τμήμα της προετοιμασίας του πειράματος και πραγματοποιούνταν πριν από την ημέρα διεξαγωγής του. Το υγρό μέσα στο οποίο διαλύονταν η σκόνη κάθε θρεπτικού υλικού ήταν απιονισμένο το οποίο λαμβάνονταν από την στήλη απιονισμού του εργαστηρίου. Μέσα σε αποστειρωμένες κωνικές φιάλες χωρητικότητας 500ml ή 1000ml, ανάλογα με την ποσότητα που απαιτούνταν κάθε φορά, τοποθετούνταν το ογκομετρημένο απιονισμένο νερό και η ζυγισμένη ποσότητα σκόνης θρεπτικού υλικού σε αναλογία η οποία αναγράφεται στο πίσω μέρος κάθε συσκευασίας. Πιο συγκεκριμένα, για το θρεπτικό υλικό Harlequin, για το βακτήριο *Escherichia coli*, απαιτούνταν 36,6g σε 1lt απιονισμένου νερού. Για το Slanetz & Bartley Medium το οποίο αποτελεί θρεπτικό υλικό για τον *E.faecalis* απαιτούνταν 43,5g σε 1lt απιονισμένου νερού ενώ για το Mannitol Salt Agar το οποίο αποτελεί θρεπτικό υλικό για τον *St.aureus* σε ίδιο όγκο απιονισμένου νερού απαιτούνταν 108g. Ανάλογα με τον αριθμό τριβλίων που απαιτούνταν κάθε φορά η παρασκευαζόμενη ποσότητα θρεπτικού υλικού μπορούσε να είναι μεγαλύτερη ή μικρότερη δεδομένου ότι η χρησιμοποιούμενη αναλογία κάθε φορά παρέμενε ίδια. Έπειτα από την ανάμιξη των συστατικών στις κωνικές φιάλες, το Mannitol Salt Agar και το Harlequin τοποθετούνταν στο αυτόκαυστο για περίπου 1 ώρα στους 121°C. Μετά το πέρας της ολοκλήρωσης και αφού αφήνονταν οι κωνικές φιάλες να κρυώσουν λίγο απλώνονταν σε αποστειρωμένα τριβλία έως ότου να στερεοποιηθεί πλήρως το θρεπτικό υλικό και να είναι έτοιμο για χρήση. Όσον αφορά το Slanetz & Bartley Medium, έπειτα από την ανάμιξη των συστατικών δεν τοποθετούνταν στον κλίβανο, αλλά με την χρήση μιας φιάλης βουτανίου (καμινέτου) θερμαίνονταν έως ότου το μείγμα να είναι πλήρως διαυγές. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι καθ'όλη τη διάρκεια θέρμανσης του δείγματος η κωνική φιάλη αναδεύονταν συνεχώς χειρωνακτικά ώστε να μην υπερθερμανθεί ένα τμήμα μόνο του θρεπτικού υλικού. Έπειτα από την ολοκλήρωση της διαδικασίας αυτής, το μίγμα αφήνονταν να κρυώσει ελαφρώς και απλώνονταν σε τριβλία

2.2.5 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΖΥΓΑΡΙΑ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ

Η εργαστηριακή ζυγαριά ακριβείας με την οποία ήταν εξοπλισμένη το εργαστήριο ήταν το μοντέλο ABS 220-4N, της εταιρείας KERN & Sohn GmbH (Model No ABS 220-4N, Analytical balance ABS-N/ABJ-NM, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany) με μέγιστη ποσότητα ζύγισης 220g και ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων. Η ζυγαριά αυτή χρησιμοποιούνταν για πολλές χρήσεις κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, για την προετοιμασία των πειραμάτων χρησιμοποιούνταν για την μέτρηση των ποσοτήτων μάζας των αλατιών Na_2HPO_4 ($m=0.0779\text{g}$) KH_2PO_4 ($m=0.0943\text{g}$) για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος

PBS, για τον υπολογισμό των επιθυμητών ποσοτήτων μάζας θρεπτικών υλικών (Harlequin 36.6 g/ L deionised water, Slannetz 43.5 g/ L deionised water , Mannitol 108 g/ L deionised water), για την ζύγιση 7g άμμου για τις πειραματικές διατάξεις οι οποίες συμπεριελάμβαναν και χαλαζιακή άμμο quartz sand, για την ζύγιση 0,01g του νανοσωματιδίου που μελετούνταν σε κάθε περίπτωση και τέλος για την ζύγιση των 3,2g NaOH που αποτελεί μέρος της διαδικασίας καθαρισμού της άμμου μετά το πέρας κάθε πειράματος.

- ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΖΥΓΑΡΙΑ

Το μοντέλο PCB 10000-1, της εταιρείας KERN & Sohn GmbH (Model PCB 10000-1, Precision balance, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany) της εργαστηριακή αυτής ζυγαριάς με ακρίβεια ενός δεκαδικού ψηφίου και μέγιστη δυνατότητα ζύγισης 1kg χρησιμοποιούνταν για την ζύγιση 300g χαλαζιακής άμμου η οποία προοριζόταν για καθαρισμό.

- UV-VISIBLE ΦΑΣΜΑΤΟΦΩΤΟΜΕΤΡΟ

Το φασματοφωτόμετρο μοντέλου UVmini-1240, της εταιρείας Shimadzu Corp. (ModelNoUVmini-1240,UV-VISSpectrophotometer,ShimadzuCorp.,Kyoto,Japan) με το οποίο ήταν εξοπλισμένο το εργαστήριο αποτέλεσε σημαντικό κομμάτι της διεξαγωγής των πειραμάτων. Μέσω αυτού μετρούνταν σε κάθε περίπτωση η οπτική απορρόφηση του νανοσωματιδίου που εξεταζόταν σε κάθε περίπτωση η οποία μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης που πάλι μέσω του φωτομέτρου αυτού είχε κατασκευαστεί αναγόταν σε γνωστή συγκέντρωση. Πιο συγκεκριμένα, το νανοσωματίδιο οξειδίου του γραφενίου μετρούνταν σε μήκος κύματος απορρόφησης $\lambda=231\text{nm}$ ενώ το διοξείδιο του τιτανίου TiO_2 σε $\lambda=400\text{nm}$. Οι τιμές αυτές καθορίστηκαν μέσω εξέτασης του Spectrum Mode του οργάνου. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι πριν από κάθε χρήση του οργάνου με την χρήση χαλαζιακών κυψελίδων πραγματοποιούνταν μηδενισμός της απορρόφησης στο επιθυμητό μήκος κύματος. Η χαλαζιακή κυψελίδα πληρωνόταν με τυφλό διάλυμα που στην περίπτωση μας είναι το ρυθμιστικό μέσω του οποίου γινόταν η παρασκευή των εναιωρημάτων των νανοσωματιδίων. Στο σημείο αυτό να σημειωθεί ότι μέσω αυτού του οργάνου και με τον τρόπο που ήδη έχει αναφερθεί λαμβάνονταν οι μετρήσεις των control πειραματικών διατάξεων οι οποίες αφαιρούνταν από αυτές των εξεταζόμενων ώστε να εξετάζεται η οπτική απορρόφηση που οφείλεται στα νανοσωματίδια. Πέρα από αυτό όμως, με την χρήση του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιούνταν και η παρασκευή των διαλυμάτων κάθε μικροοργανισμού επιθυμητής συγκέντρωσης 10^8cfu/mL . Όσον αφορά το βακτήριο της *E.coli* η συγκέντρωση αυτή επιτυγχάνονταν σε οπτική απορρόφηση 0.1, του *E.faecalis* σε οπτική απορρόφηση 0.650 ενώ του *St.aureus* σε οπτική απορρόφηση 0.3. Και για την περίπτωση αυτή πριν από την χρήση του οργάνου πραγματοποιούνταν μηδενισμός με τυφλό διάλυμα PBS καθώς μέσα σε αυτό διαλυόταν η επιθυμητή ποσότητα των μικροοργανισμών. Οι μετρήσεις αυτές λαμβάνονταν σε μήκος κύματος $\lambda=600\text{nm}$.

- ΠΕΡΙΣΤΡΕΦΟΜΕΝΟΣ ΔΙΣΚΟΣ/ ΑΝΑΔΕΥΤΗΡΑΣ (ROTATOR)

Μία ακόμη συσκευή πολύ βασική για την διεξαγωγή των πειραμάτων είναι οι περιστρεφόμενοι δίσκοι πάνω στους οποίους τοποθετούνταν οι πλήρως κορεσμένοι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν το εξεταζόμενο κάθε φορά διάλυμα. Το μοντέλο το οποίο υπήρχε στο εργαστήριο

ήταν το 3002512 Agitador rotativo “Orbit”, JP SELECTA S.A., Abrera Barcelona, Spain. Μέσω των αναδευτήρων αυτών εξασφαλιζόνταν δυναμικές συνθήκες στα πειράματα, καθώς περιστρέφονταν με σταθερό ρυθμό 12rpm. Μέσω της αριστερόστροφης περιστροφής αυτής επιτυγχάνονταν ομογενοποίηση του δείγματος και συνεχή αλληλεπίδραση όλων των συστατικών μεταξύ τους. Πάνω στον αναδευτήρα υπήρχαν τοποθετημένες ειδικές υποδοχές οι οποίες συγκρατούσαν τους δοκιμαστικούς σωλήνες που χρησιμοποιούνταν στα πειράματα. Κάθε φορά που χρειαζόταν να γίνει δειγματοληψία μέσω του διακόπτη που διέθετε η συσκευή απενεργοποιούνταν και μετά την αφαίρεση του επιθυμητού δοκιμαστικού σωλήνα ξανάενεργοποιούνταν για την ανάδευση των υπολοίπων.

- ΛΟΥΤΡΟ ΥΠΕΡΗΧΩΝ (SONICATION BATH)

Το μοντέλο της συσκευής αυτής που διέθετε το εργαστήριο ήταν το Elma Schmidbauer GmbH (Model No Elmasonic S 30/(H), Ultrasonic Cleaner Elmasonic S, Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany, μέσα στο οποίο τοποθετούνταν κάθε φορά ένα μπουκάλι Kimble 300ml. Το δοχείο το οποίο τοποθετούνταν κάθε φορά το εξεταζόμενο νανοσωματίδιο με το ρυθμιστικό διάλυμα έπρεπε να έχει τέτοιες διαστάσεις ώστε όλος του ο όγκος να καλύπτεται με απιονισμένο νερό μέσω του οποίου πραγματοποιούνταν η ηχοβόλιση. Με τον τρόπο αυτόν, έσπαγαν τα συσσωματώματα των νανοσωματιδίων και δημιουργούνταν ένα σταθεροποιημένο αιώρημα.

- ΠΕΧΑΜΕΤΡΟ (pH METER)

Μέσω του πεχαμέτρου που υπήρχε στο εργαστήριο, pH 7110, της εταιρείας WTW (Model No pH 7110, Lab pH meter inoLab®, WTW, Weilheim, Germany) ελεγχόταν η ρυθμιστική ικανότητα του ρυθμιστικού διαλύματος που παρασκευαζόταν κάθε φορά (pH=7). Πριν από κάθε χρήση της συσκευής το ηλεκτρόδιο το οποίο ήταν βυθισμένο σε ηλεκτρολύτη ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό και ύστερα χρησιμοποιούνταν για λήψη μέτρησης. Ακόμη το όργανο αυτό χρησιμοποιούνταν συχνά προληπτικά και για την μέτρηση του pH του απιονισμένου νερού που λαμβανόταν από την έξοδο της στήλης που διέθετε το εργαστήριο (pH \approx 6.5).

- ΤΡΑΠΕΖΑ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ (ORBITAL SHAKER)

Η τράπεζα ανάδευσης μοντέλου PSU-20i, Orbital Shaker PSU-20i, Multi-functional Orbital Shaker, Biosan, Riga, Latvia, χρησιμοποιούνταν για την ανακίνηση των κωνικών φιαλών (2L) μέσα στις οποίες ήταν τοποθετημένη η άμμος η οποία καθαριζόταν αλλά και τα μπουκάλια τα οποία περιείχαν διοξείδιο του τιτανίου TiO₂ και ανακινούνταν για 1 ώρα.

- ΣΥΣΚΕΥΗ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ (AUTOCLAVE)

Για όλα τα πειράματα τα οποία συμπεριελάμβαναν την χρήση των μικροβίων, λαμβανόταν υπόψη μία ακόμη παράμετρος, αυτή της αποστείρωσης. Το αυτόκαυστο το οποίο χρησιμοποιούνταν για αποστείρωση είναι μία συσκευή στην οποία τοποθετούνταν όλα τα πυρίμαχα σκεύη, τα διαλύματα και ο υλικός εξοπλισμός τα οποία θα ερχόντουσαν σε επαφή με τα μικρόβια. Με τον τρόπο αυτό διασφαλιζόνταν η αποφυγή επιμόλυνσης από κάποιο άλλο μικροοργανισμό. Η αποστείρωση πραγματοποιούνταν σε υψηλή θερμοκρασία 121°C για μία

ώρα περίπου. Στην ίδια διαδικασία υπόκεινται και όλα τα σκεύη και ο εξοπλισμός ο οποίος χρησιμοποιούνταν σε κάθε τρέχον πείραμα. Έτσι, τα ίδια αναλώσιμα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται για κάθε πείραμα χωρίς κανένα κίνδυνο επιμόλυνσης. Στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι για αποστείρωση οδηγούνταν όλα τα ρυθμιστικά διαλύματα που θα χρησιμοποιούνταν αλλά και το μίγμα απιονισμένου νερού και σκόνης θρεπτικού υλικού για την *E.coli* και τον *St.aureus*.

Τέλος να αναφερθεί ότι για την διεξαγωγή των πειραμάτων απαραίτητος ήταν ο φούρνος με τον οποίο ήταν εξοπλισμένο το εργαστήριο, ο οποίος ήταν ρυθμισμένος στους 37°C για την επώαση των βακτηρίων στα θρεπτικά υλικά. Πέρα από τον φούρνο χρησιμοποιούνταν και ένα ψυγείο μέσα στο οποίο αποθηκεύονταν προϊόντα τα οποία απαιτούσαν συντήρηση. Τέτοια ήταν τα τριβλία και τα ρυθμιστικά διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί αλλά δεν θα χρησιμοποιούνταν την ίδια ημέρα.

3. COLLOIDFIT

Η προσομοίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε μέσω του λογισμικού ColloidFit (Katzourakis and Chrysikopoulos, 2016). Το μοντέλο αυτό είναι ένα αυτόνομο λογισμικό προσομοίωσης της τύχης και μεταφοράς κολλοειδών σε πορώδη μέσα.

Περιλαμβάνει την μεταφορά κολλοειδών και ιών, προσκόλληση και αποσύνθεση. Όσον αφορά την μεταφορά κολλοειδών αντιπροσωπεύει αναστρέψιμη και μη αναστρέψιμη προσρόφηση, την μεταφορά ιών αντιπροσωπεύει την αποσύνθεση σε υδάτινη και στερεή φάση ενώ όλα τα προσροφητικά μοντέλα είναι εξαρτώμενα από τον τύπο του ρυπαντή. Χρησιμοποιείται για την μετανάστευση κολλοειδών και βιοκολλοειδών μορίων μέσω μονοδιάστατων, ομογενών και πλήρως κορεσμένων πορώδων μέσων.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τον το μοντέλο για την αποσύνθεση/αδρανοποίηση βιοκολλοειδών αποτελείται από δύο μορφές. Η πρώτη μορφή αφορά στην προσομοίωση δύο παραμέτρων C_0 και λ , ενώ η εξίσωση η οποία χρησιμοποιείται είναι η :

$$\ln\left(\frac{C}{C_0}\right)=-\lambda t$$

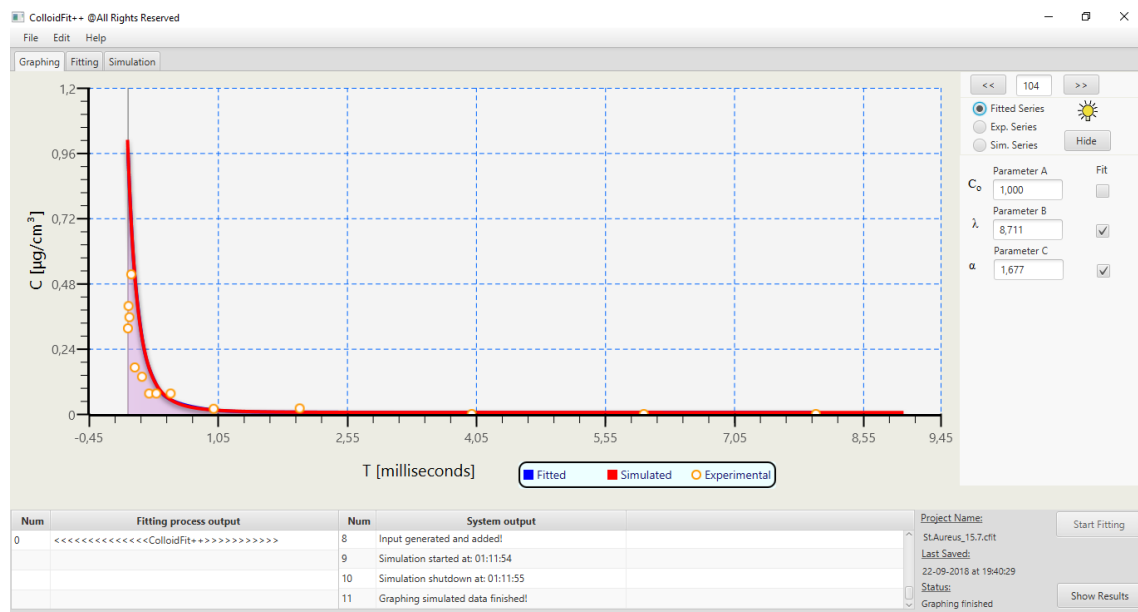
Όπου C: Η συγκέντρωση των αιωρούμενων βιοκολλοειδών στην υγρή φάση

C_0 : η αρχική συγκέντρωση των αιωρούμενων βιοκολλοειδών στην αιωρούμενη φάση

λ : ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής αδρανοποίησης

$$\ln \frac{C}{C_0} = \frac{2}{\alpha} \ln \left(\frac{1}{1 - \frac{C}{C_0}} \right)$$

Έπειτα από την εισαγωγή των απαραίτητων πληροφοριών εισόδου και την προσομοίωσή τους ως πληροφορίες εξόδου του μοντέλου λαμβάνονται οι τιμές των παραμέτρων και τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους 95%.



Σχήμα 3.1: Απεικόνιση περιβάλλοντος εργασίας λογισμικού ColloidFit

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 *E. COLI*

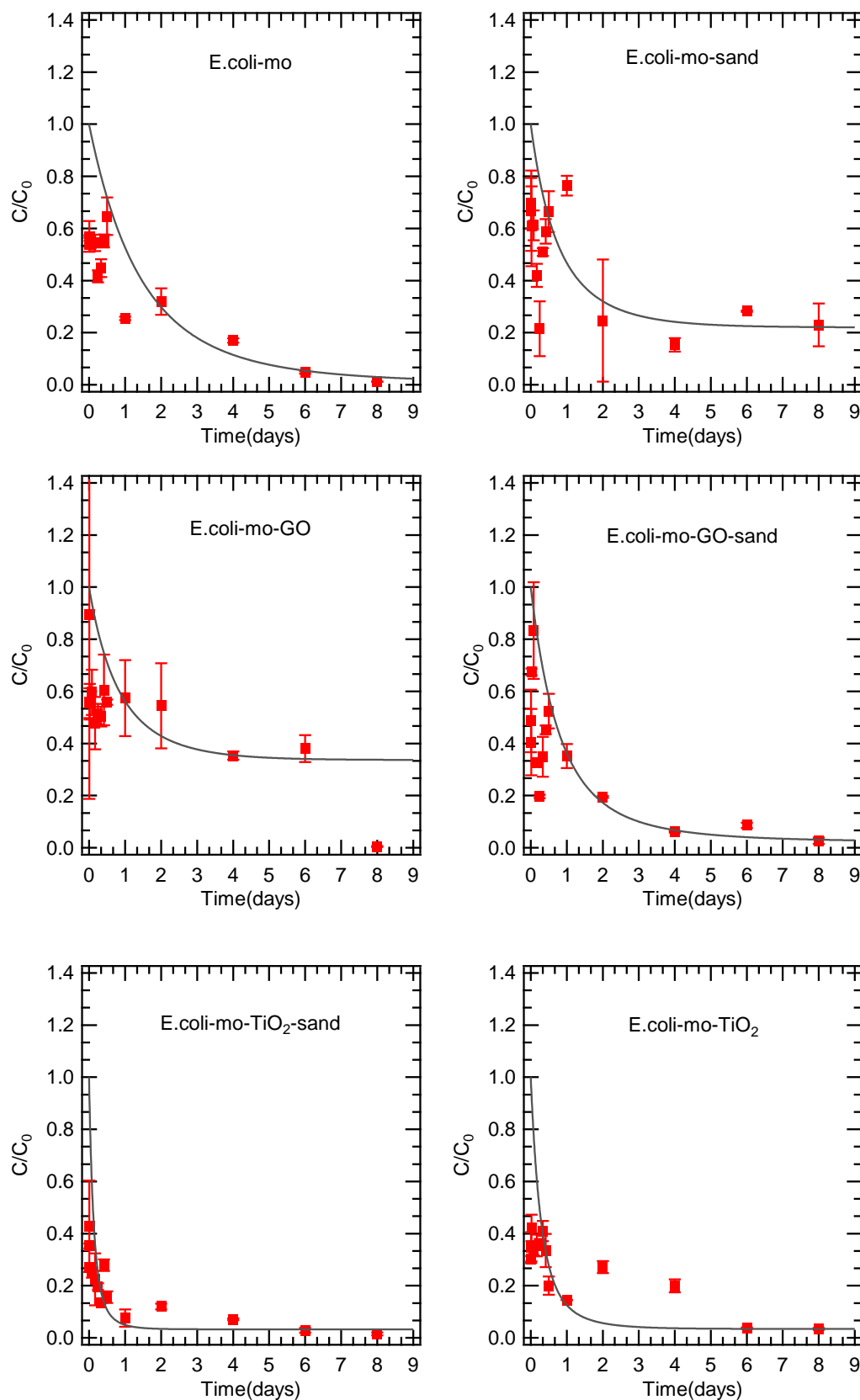
Χρόνος (d)	<i>E.coli</i> -mo			<i>E.coli</i> -mo - GO			<i>E.coli</i> -mo -TiO ₂		
	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές
0	1.000	0.589	1.000	1.000	0.164	1.000	1.000	0.391	1.000
0.0035	0.570	0.059	0.998	0.893	0.706	0.997	0.346	0.059	0.989
0.0104	0.570	0.004	0.993	0.554	0.057	0.992	0.303	0.010	0.967
0.0208	0.540	0.013	0.986	0.560	0.068	0.983	0.422	0.051	0.936
0.4167	0.552	0.025	0.972	0.605	0.136	0.967	0.335	0.064	0.877
0.0833	0.541	0.011	0.945	0.596	0.087	0.936	0.341	0.023	0.773
0.1667	0.544	0.032	0.894	0.478	0.100	0.880	0.354	0.042	0.609
0.25	0.416	0.023	0.846	0.513	0.039	0.830	0.360	0.019	0.489
0.3333	0.447	0.034	0.801	0.503	0.037	0.785	0.409	0.039	0.399
0.5	0.647	0.072	0.719	0.558	0.010	0.711	0.200	0.035	0.278
1	0.255	0.006	0.527	0.574	0.146	0.562	0.145	0.000	0.126
2	0.319	0.051	0.298	0.545	0.163	0.429	0.272	0.023	0.056
4	0.170	0.008	0.115	0.354	0.016	0.355	0.199	0.025	0.037
6	0.047	0.005	0.054	0.380	0.051	0.341	0.037	0.003	0.034
8	0.012	0.000	0.030	0.004	0.002	0.337	0.034	0.004	0.034

Πίνακας 4.1.1: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του *E.coli* παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με απουσία χαλαζιακής άμμου

Χρόνος (d)	<i>E.coli</i> -mo –sand			<i>E.coli</i> -mo – GO-sand			<i>E.coli</i> -mo -TiO ₂ -sand		
	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές
0	1.000	0.419	1.000	1.000	0.372	1.000	1.000	0.220	1.000
0.0035	0.696	0.098	0.996	0.486	0.120	0.996	0.428	0.176	0.975
0.0104	0.668	0.154	0.989	0.405	0.128	0.988	0.353	0.009	0.929
0.0208	0.608	0.153	0.978	0.674	0.013	0.976	0.268	0.000	0.864
0.4167	0.589	0.047	0.958	0.452	0.017	0.952	0.279	0.022	0.750
0.0833	0.612	0.057	0.918	0.834	0.185	0.908	0.251	0.020	0.577
0.1667	0.420	0.044	0.847	0.326	0.003	0.826	0.224	0.099	0.363
0.25	0.215	0.106	0.785	0.197	0.007	0.753	0.197	0.013	0.247
0.3333	0.509	0.015	0.731	0.349	0.076	0.688	0.135	0.004	0.178
0.5	0.664	0.078	0.641	0.525	0.066	0.579	0.156	0.022	0.108
1	0.764	0.037	0.468	0.351	0.046	0.363	0.076	0.033	0.049
2	0.247	0.234	0.320	0.194	0.003	0.173	0.120	0.011	0.034
4	0.153	0.026	0.242	0.061	0.003	0.067	0.071	0.003	0.033

6	0.283	0.003	0.225	0.086	0.011	0.040	0.029	0.010	0.033
8	0.229	0.082	0.221	0.027	0.012	0.031	0.015	0.005	0.033

Πίνακας 4.1.2: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του *E.coli* παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με παρουσία χαλαζιακής άμμου



Διαγράμματα 4.1.1-4.1.6: Κανονικοποιημένη συγκέντρωση (Normalized concentration) συναρτήσει του χρόνου όπου απεικονίζεται ο τρόπος δράσης χαλαζιακής άμμου, GO και TiO₂ στο βακτήριο *E.coli* με παρουσία των άλλων μικροοργανισμών (mo)

<i>E.Coli</i> –mo	λ (d ⁻¹)	λ_0 (d ⁻¹)	α (d ⁻¹)
Διάλυμα μικροοργανισμών (mo)	0.591±0.054	0.679±0.094	0.118±0.097
Διάλυμα μικροοργανισμών και άμμος (mo-sand)	0.234±0.084	1.055±0.198	0.697±0.150
Διάλυμα μικροοργανισμών και GO (mo-GO)	0.297±0.062	0.819±0.137	0.752±0.169
Διάλυμα μικροοργανισμών, GO και άμμος (mo-GO-sand)	0.950±0.134	1.180±0.173	0.311±0.122
Διάλυμα μικροοργανισμών και TiO ₂ (mo-TiO ₂)	2.713±1.026	3.214±1.370	0.951±0.590
Διάλυμα μικροοργανισμών, TiO ₂ και άμμος (mo-TiO ₂ -sand)	4.849±0.836	7.198±2.080	2.102±1.250

Πίνακας 4.1.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης πειραματικών αποτελεσμάτων του βακτηρίου *E.coli* από την έκφραση ψευδο-πρώτης τάξης μέσω του λογισμικού ColloidFit, όπου λ ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής του ρυθμού αδρανοποίησης, λ_0 ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης και α ο συντελεστής ανθεκτικότητας

Παρατηρώντας τα διαγράμματα στα οποία απεικονίζονται τα πειραματικά δεδομένα για το βακτήριο *E.coli* σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων αυτών για τον υπολογισμό των συντελεστών αδρανοποίησης προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα.

Αρχικά όσον αφορά στην διερεύνηση της επίδρασης χαλαζιακής άμμου στο βακτήριο *E.coli* από το πείραμα το οποίο περιελάμβανε την αλληλεπίδραση των βακτηρίων μεταξύ τους με απουσία και παρουσία χαλαζιακής άμμου μπορεί να διαπιστωθεί μία πτώση του ρυθμού αδρανοποίησης του βακτηρίου. Ενώ απουσία της άμμου η *E.coli* φαίνεται ως την 8^η ημέρα ο αριθμός των ζώντων στελεχών να είναι σχεδόν μηδενικός, με παρουσία άμμου η κανονικοποιημένη συγκέντρωση του βακτηρίου φαίνεται να σταθεροποιείται την 8^η ημέρα στο 0,3. Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώνουν και οι συντελεστές αδρανοποίησης που προέκυψαν, οι οποίοι ισούται με $\lambda=0.591 \text{ d}^{-1}$ και $\lambda=0.234 \text{ d}^{-1}$ με απουσία και παρουσία άμμου αντίστοιχα. Ωστόσο, ο τρόπος αυτός επίδρασης της άμμου αλλάζει με παρουσία των νανοσωματιδίων καθώς φαίνεται ότι συμβάλλει στην αύξηση του ρυθμού αδρανοποίησης. Αυτό ισχύει και για τα δύο νανοσωματίδια των οποίων η δράση εξετάστηκε με απουσία και παρουσία άμμου. Όσον αφορά το οξείδιο του γραφενίου (GO), ενώ αρχικά ο συντελεστής του ήταν $\lambda=0.297 \text{ d}^{-1}$ με απουσία άμμου, με παρουσία άμμου ήταν $\lambda=0.950 \text{ d}^{-1}$. Το ίδιο προέκυψε και από τα

πειράματα με το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) του οποίου η δράση χαρακτηρίστηκε με συντελεστή αδρανοποίησης $\lambda=2.713 \text{ d}^{-1}$ απουσία της άμμου, ενώ παρουσία της άμμου με συντελεστή αδρανοποίησης $\lambda=4.849 \text{ d}^{-1}$.

Ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αποτελέσματα της επίδρασης του νανοσωματιδίου του GO στην *E.coli* για τα οποία αρχικά λαμβάνονται υπόψη τα πειράματα που εμπεριέχουν τους μικροοργανισμούς απουσία και παρουσία GO. Συγκρίνοντας την απεικόνιση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων αυτών είναι εύκολο να γίνει αντιληπτό ότι το νανοσωματίδιο αυτό με απουσία άμμου όχι μόνο δεν παρουσιάζει αντιβακτηριακές ιδιότητες αλλά φαίνεται να συμβάλλει στην μείωση της αδρανοποίησης. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από τους συντελεστές αδρανοποίησης που προέκυψαν από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων των πειραμάτων, καθώς απουσίας του GO προέκυψε συντελεστής αδρανοποίησης $\lambda=0.591 \text{ d}^{-1}$ ενώ παρουσία του $\lambda=0.297 \text{ d}^{-1}$. Σε αντίθετο αποτέλεσμα οδηγεί η μελέτη της επίδρασης του νανοσωματιδίου αυτού με παρουσία άμμου. Πιο συγκεκριμένα, αν και στο πείραμα που περιλαμβάνει τους μικροοργανισμούς με παρουσία άμμου ο συντελεστής αδρανοποίησης προέκυψε ίσος με $\lambda=0.234 \text{ d}^{-1}$, κατά την διεξαγωγή του ίδιου πειράματος με παρουσία GO ο συντελεστής υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=0.950 \text{ d}^{-1}$. Το συμπέρασμα αυτό μπορεί να διεξαχθεί και παρατηρώντας τα πειραματικά και προσομοιωμένα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών, όπου συγκρίνοντας τα ο ρυθμός με τον οποίο απενεργοποιείται το βακτήριο με παρουσία άμμου και GO είναι μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν απουσία του GO.

Όσον αφορά την μελέτη του τρόπου δράσης του TiO_2 στην *E.coli* όπως και για την περίπτωση του GO αρχικά συγκρίνονται τα πειράματα τα οποία περιλαμβάνουν τους τρεις μικροοργανισμούς απουσία και παρουσία του νανοσωματιδίου αυτού. Αρχικά μελετώντας τις καμπύλες των πειραμάτων αυτών παρατηρείται πτώση της συγκέντρωσης του βακτηρίου από την πρώτη κιόλας μέρα. Η υπόθεση αυτή έρχεται σε άμεση ταύτιση με τις τιμές των συντελεστών αδρανοποίησης που προέκυψαν για τα πειράματα αυτά. Πιο συγκεκριμένα, ενώ όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω ο συντελεστής για το πείραμα το οποίο περιλαμβάνει μόνο μικροοργανισμούς ήταν $\lambda=0.591 \text{ d}^{-1}$, στο αντίστοιχο πείραμα παρουσίας του TiO_2 προέκυψε $\lambda=2.713 \text{ d}^{-1}$. Η διαφορά αυτή επιβεβαιώνει τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του TiO_2 για την *E.coli* απουσίας της άμμου. Ωστόσο και με παρουσία άμμου το αποτέλεσμα που προκύπτει είναι το ίδιο καθώς ο αρχικός συντελεστής με απουσία άμμου ισούταν με $\lambda=0.234 \text{ d}^{-1}$, ενώ με παρουσία άμμου $\lambda=4.849 \text{ d}^{-1}$.

Στο σημείο αυτό αξίζει να πραγματοποιηθεί μία σύγκριση μεταξύ της επίδρασης των δύο νανοσωματιδίων στο συγκεκριμένο βακτήριο. Από τα πειράματα που περιλαμβάνουν τους μικροοργανισμούς και τα νανοσωματίδια με απουσία και με παρουσία άμμου καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι και για τις δύο περιπτώσεις το TiO_2 εμφανίζει καλύτερες αντιμικροβιακές ιδιότητες σε σχέση με το GO. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα πειράματα στα οποία δεν υπήρχε άμμος το GO έδωσε συντελεστή αδρανοποίησης $\lambda=0.297 \text{ d}^{-1}$ στην *E.coli*, ενώ για το αντίστοιχο πείραμα με το TiO_2 ο ίδιος συντελεστής υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=2.713 \text{ d}^{-1}$. Όσον αφορά τα πειράματα στα οποία υπήρχε άμμος ο συντελεστής αδρανοποίησης για το πείραμα που εξέταζε το GO υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=0.950 \text{ d}^{-1}$, ενώ για το TiO_2 αντίστοιχα ίσος με $\lambda=4.849 \text{ d}^{-1}$. Ωστόσο όπως ήδη αναφέρθηκε η παρουσία άμμου και για τα δύο νανοσωματίδια ενίσχυσε τις αντιβακτηριακές ιδιότητες τους.

4.2 E.FAECALIS

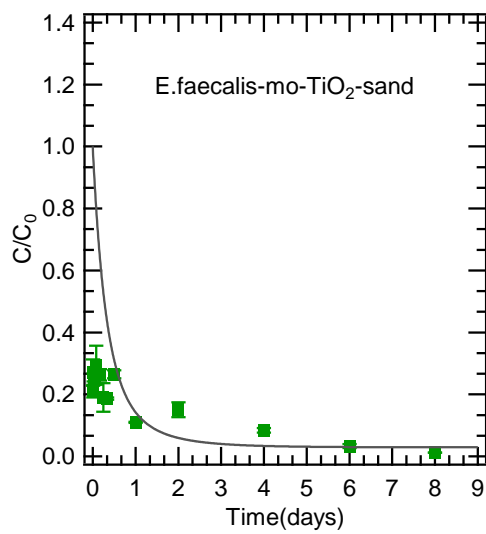
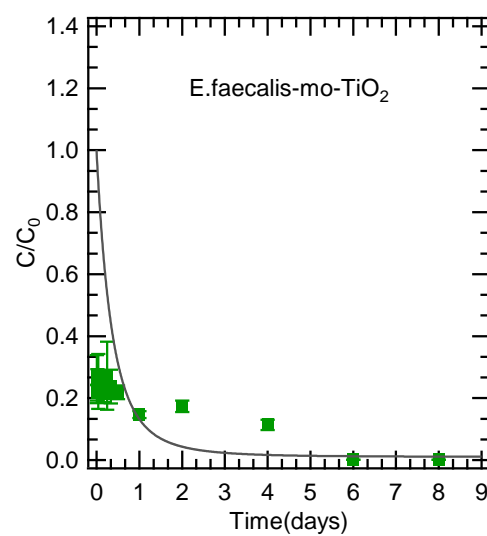
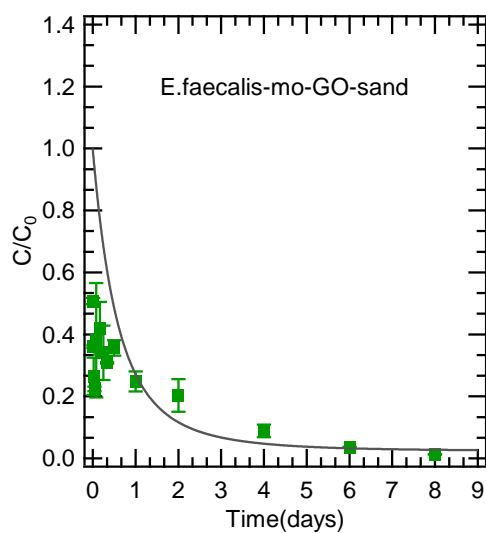
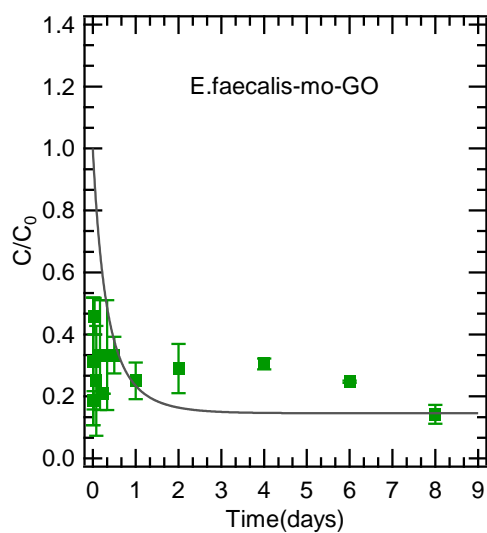
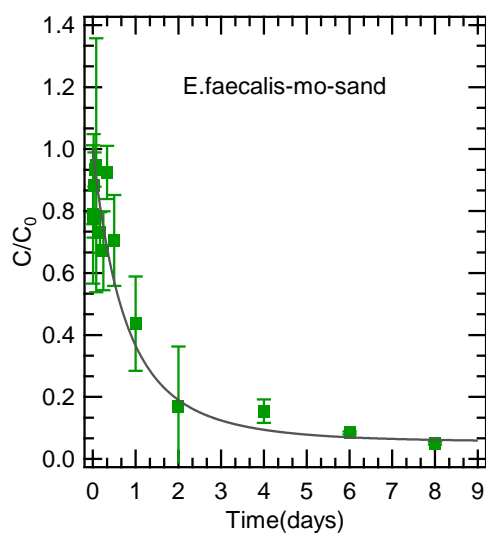
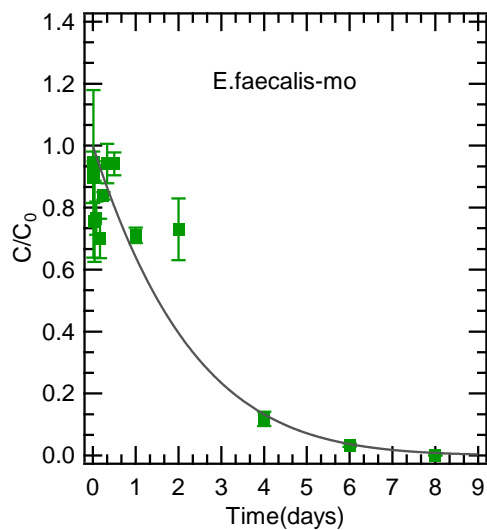
Χρόνος (d)	<i>E.faecalis</i> –mo			<i>E.faecalis</i> -mo-GO			<i>E.faecalis</i> -mo-TiO ₂		
	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομ οιωμένε ς τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομ οιωμένε ς τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομ οιωμένε ς τιμές
0	1.000	0.124	1.000	1.000	0.236	1.000	1.000	0.137	1.000
0.0035	0.898	0.083	0.999	0.313	0.206	0.991	0.270	0.043	0.991
0.0104	0.909	0.270	0.996	0.313	0.206	0.973	0.211	0.020	0.973
0.0208	0.944	0.006	0.991	0.188	0.029	0.946	0.255	0.013	0.946
0.4167	0.756	0.131	0.982	0.458	0.059	0.897	0.251	0.020	0.895
0.0833	0.766	0.054	0.965	0.250	0.177	0.809	0.295	0.063	0.804
0.1667	0.700	0.063	0.931	0.333	0.177	0.670	0.263	0.019	0.653
0.25	0.838	0.012	0.898	0.208	0.000	0.567	0.190	0.046	0.536
0.3333	0.942	0.063	0.866	0.333	0.177	0.488	0.186	0.004	0.444
0.5	0.941	0.037	0.804	0.333	0.059	0.380	0.265	0.013	0.313
1	0.710	0.025	0.641	0.250	0.059	0.234	0.110	0.002	0.132
2	0.730	0.099	0.396	0.290	0.080	0.164	0.151	0.024	0.043
4	0.118	0.023	0.133	0.304	0.018	0.147	0.084	0.007	0.017
6	0.033	0.005	0.037	0.247	0.004	0.146	0.033	0.006	0.012
8	0.000	0.000	0.008	0.142	0.030	0.146	0.012	0.000	0.011

Πίνακας 4.2.1: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του *E.faecalis* παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με απουσία χαλαζιακής άμμου

Χρόνος (d)	<i>E.faecalis</i> -mo -sand			<i>E.faecalis</i> -mo – GO-sand			<i>E.faecalis</i> -mo-TiO ₂ -sand		
	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομ οιωμένε ς τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομ οιωμένε ς τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομ οιωμένε ς τιμές
0	1.000	0.112	1.000	1.000	0.040	1.000	1.000	0.137	1.000
0.0035	0.789	0.223	0.996	0.508	0.010	0.994	0.270	0.043	0.990
0.0104	0.776	0.019	0.987	0.360	0.005	0.983	0.211	0.020	0.971
0.0208	0.882	0.167	0.975	0.265	0.060	0.967	0.255	0.013	0.943
0.4167	0.934	0.056	0.950	0.224	0.007	0.936	0.251	0.020	0.890
0.0833	0.947	0.409	0.904	0.381	0.185	0.877	0.295	0.063	0.796
0.1667	0.731	0.066	0.820	0.420	0.085	0.772	0.263	0.019	0.643
0.25	0.672	0.128	0.746	0.340	0.087	0.683	0.190	0.046	0.526
0.3333	0.924	0.086	0.681	0.309	0.002	0.607	0.186	0.004	0.437
0.5	0.705	0.146	0.574	0.356	0.025	0.485	0.265	0.013	0.311
1	0.437	0.152	0.366	0.249	0.032	0.271	0.110	0.002	0.142
2	0.168	0.195	0.190	0.203	0.052	0.117	0.151	0.024	0.059
4	0.154	0.038	0.094	0.088	0.020	0.047	0.084	0.007	0.034
6	0.084	0.004	0.070	0.036	0.001	0.032	0.033	0.006	0.030

8	0.051	0.005	0.061	0.013	0.001	0.028	0.012	0.000	0.029
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Πίνακας 4.2.2: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του *E.faecalis* παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με παρουσία χαλαζιακής άμμου



Διαγράμματα 4.2.1-4.2.6: Κανονικοποιημένη συγκέντρωση (Normalized concentration) συναρτήσει του χρόνου όπου απεικονίζεται ο τρόπος δράσης χαλαζιακής άμμου, GO και TiO₂ στο βακτήριο *E.faecalis* με παρουσία των άλλων μικροοργανισμών (mo).

<i>E.faecalis</i>	$\lambda(d^{-1})$	$\lambda_0(d^{-1})$	$\alpha(d^{-1})$
Διάλυμα μικροοργανισμών (mo)	0.474±0.080	0.429±0.126	-0.080±0.190
Διάλυμα μικροοργανισμών και άμμος (mo-sand)	0.865±0.134	1.235±0.320	0.428±0.243
Διάλυμα μικροοργανισμών και GO (mo-GO)	1.416±0.613	2.696±1.048	1.400±0.634
Διάλυμα μικροοργανισμών, GO και άμμος (mo-GO-sand)	1.175±0.394	1.608±0.626	0.434±0.329
Διάλυμα μικροοργανισμών και TiO ₂ (mo-TiO ₂)	2.053±0.276	2.684±0.639	0.593±0.437
Διάλυμα μικροοργανισμών, TiO ₂ και άμμος (mo-TiO ₂ -sand)	2.390±1.022	2.833±1.185	0.801±0.483

Πίνακας 4.2.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης πειραματικών αποτελεσμάτων του βακτηρίου *E.faecalis* από την έκφραση ψευδο-πρώτης τάξης μέσω του λογισμικού ColloidFit, όπου λ ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής του ρυθμού αδρανοποίησης, λ_0 ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης και α ο συντελεστής ανθεκτικότητας

Έπειτα από μελέτη των αντίστοιχων καμπυλών και των αποτελεσμάτων των συντελεστών αδρανοποίησης, αναλύονται παρακάτω οι τρόποι με τους οποίους δρουν η χαλαζιακή άμμος και τα δύο νανοσωματίδια στο βακτήριο *E.faecalis*.

Αρχικά όσον αφορά την επίδραση που ασκεί η χαλαζιακή άμμος μελετώνται τα πειράματα τα οποία περιλαμβάνουν τους μικροοργανισμούς με απουσία και παρουσία χαλαζιακής άμμου. Από το πείραμα που περιλαμβάνει μόνο τους μικροοργανισμούς το βακτήριο *E.faecalis*, παρουσιάζει μία σταθερότητα στην συγκέντρωσή του έως και την 2^η ημέρα ενώ μετά το πέρας των 8 ημερών έχει αδρανοποιηθεί πλήρως. Αντίθετα, από το πείραμα που περιλαμβάνει τους μικροοργανισμούς με παρουσία άμμου παρατηρείται ότι αν και μέχρι την 8^η ημέρα υπάρχει ένα μικρό ποσοστό επιζώντων στελεχών. Ο ρυθμός με τον οποίο αδρανοποιείται το βακτήριο καθόλη την διάρκεια διεξαγωγής του πειράματος είναι πολύ μεγαλύτερος σε σχέση με αυτόν

απουσίας της άμμου. Από αυτό προκύπτει ότι ο συντελεστής αδρανοποίησης απουσίας της άμμου, $\lambda=0.474\text{ d}^{-1}$, να είναι μικρότερος από τον αντίστοιχο παρουσία άμμου, $\lambda=0.865\text{ d}^{-1}$, αποτελέσματα που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η άμμος ενίσχυσε την αδρανοποίηση του βακτηρίου. Ωστόσο ενδιαφέρον εμφανίζουν τα αποτελέσματα του τρόπου δράσης της χαλαζιακής άμμου με παρουσία των νανοσωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά το πείραμα που περιλαμβάνει μικροοργανισμούς και GO με απουσία άμμου ο συντελεστής αδρανοποίησης υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=1.416\text{ d}^{-1}$, ενώ για το ίδιο πείραμα παρουσία της άμμου, ο συντελεστής υπολογίστηκε ίσως με $\lambda=1.175\text{ d}^{-1}$. Από αυτό μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η παρουσία άμμου συνέβαλε στην μείωση της δράσης του GO στο βακτήριο *E.faecalis*. Ωστόσο, αντίθετο αποτέλεσμα προέκυψε και από τα αντίστοιχα πειράματα για το TiO_2 όπου ο συντελεστής με απουσία άμμου υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=2.053\text{ d}^{-1}$ ενώ παρουσίας της $\lambda=2.390\text{ d}^{-1}$ αντίστοιχα.

Όσον αφορά την διερεύνηση της επίδρασης του GO στον *E.faecalis* παρατηρήθηκε ότι ανεξάρτητα της παρουσία ή απουσία χαλαζιακής άμμου οι αντιβακτηριακές ιδιότητές του ήταν εμφανείς. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά το πείραμα το οποίο περιελάμβανε μικροοργανισμούς απουσία του GO όπως έχει ήδη αναφερθεί ο συντελεστής υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=0.474\text{ d}^{-1}$, ενώ για το πείραμα παρουσία τους GO υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=1.416\text{ d}^{-1}$. Παρατηρώντας τις τιμές αυτές μπορούμε να συμπεράνουμε ότι μία διαφορά στην τιμή του συντελεστή ίση με $\Delta\lambda\approx 1.000\text{ d}^{-1}$ είναι αρκετά μεγάλη. Ίδια τάση παρατηρήθηκε και για την περίπτωση με παρουσία άμμου όπου απουσία του GO ο συντελεστής υπολογίστηκε ίσος με $\lambda=0.865\text{ d}^{-1}$ ενώ με παρουσία του $\lambda=1.175\text{ d}^{-1}$. Μεταξύ των πειραμάτων τα οποία περιελάμβαναν GO με απουσία και παρουσία άμμου ο συντελεστής αυτός παρουσίασε μία διαφορά $\Delta\lambda\approx 0.300\text{ d}^{-1}$.

Παρόμοια αποτελέσματα με την επίδραση του GO προέκυψαν από την παρουσία τιτάνιας στο βακτήριο *E.faecalis*. Όπως και προηγουμένως έπειτα από σύγκριση των πειραμάτων που περιελάμβαναν το νανοσωματίδιο αυτό με απουσία και με παρουσία άμμου ο συντελεστής αδρανοποίησης παρουσίασε μία διαφορά στην τιμή του ίση με $\Delta\lambda\approx 0,3\text{ d}^{-1}$. Όσον αφορά τα πειράματα που περιελάμβαναν μικροοργανισμούς και άμμο με απουσία και με παρουσία του TiO_2 ο συντελεστής αδρανοποίησης προέκυψε $\lambda=0.865\text{ d}^{-1}$ ενώ με παρουσία άμμου προέκυψε $\lambda=2.390\text{ d}^{-1}$. Αντιστοίχως οι συντελεστές αδρανοποίησης απουσία άμμου ήταν $\lambda=0.474\text{ d}^{-1}$ και $\lambda=2.053\text{ d}^{-1}$. Από τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνεται ότι ανεξάρτητα από την απουσία ή παρουσία άμμου οι αντιβακτηριακές ιδιότητες της τιτάνιας ήταν ενισχυμένες.

Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι και τα δύο νανοσωματίδια εμφανίζουν αντιβακτηριακές ιδιότητες για το βακτήριο *E.faecalis* για τις περιπτώσεις απουσία και παρουσία της χαλαζιακής άμμου. Ωστόσο εάν συγκρίνουμε τα πειράματα που περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς και GO με τα αντίστοιχα που περιλαμβάνουν μικροοργανισμούς και TiO_2 , μπορούμε να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι με απουσία άμμου η τιτάνια εμφανίζει καλύτερες αντιβακτηριακές ιδιότητες ($\lambda_{\text{GO}}=1.416\text{ d}^{-1}$, $\lambda_{\text{TiO}_2}=2.053\text{ d}^{-1}$). Το ίδιο αποτέλεσμα προκύπτει με παρουσία άμμου καθώς ο συντελεστής αδρανοποίησης με παρουσία GO ισούται με $\lambda=1,175\text{ d}^{-1}$ ενώ με παρουσία TiO_2 ισούται με $\lambda=2.390\text{ d}^{-1}$.

4.3 ST.AUREUS

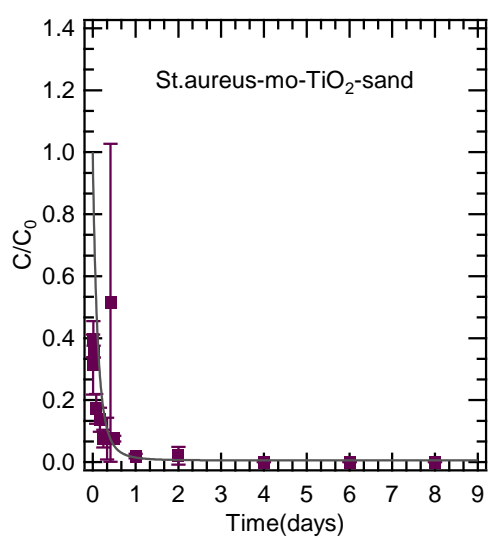
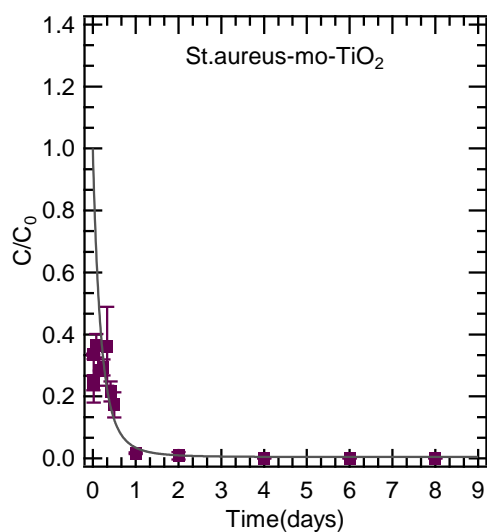
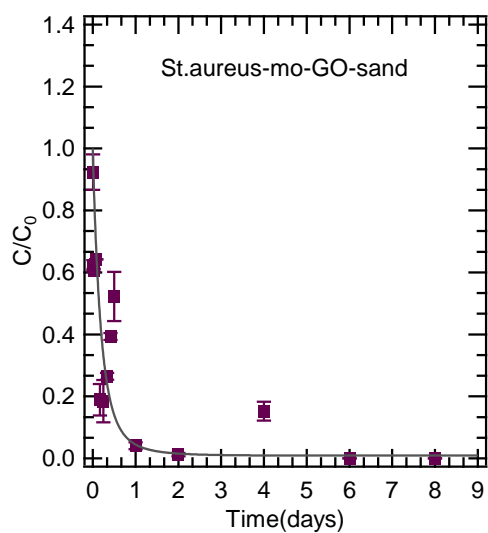
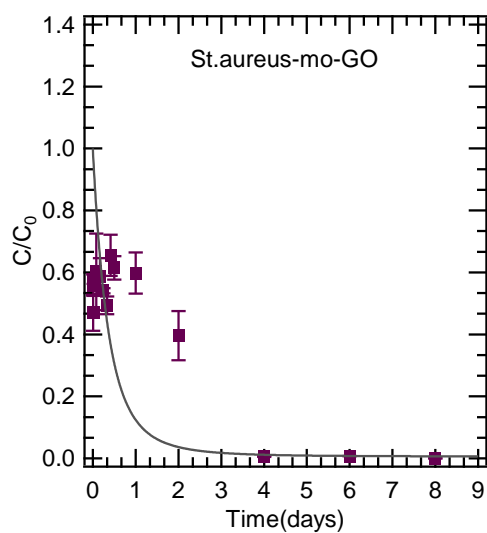
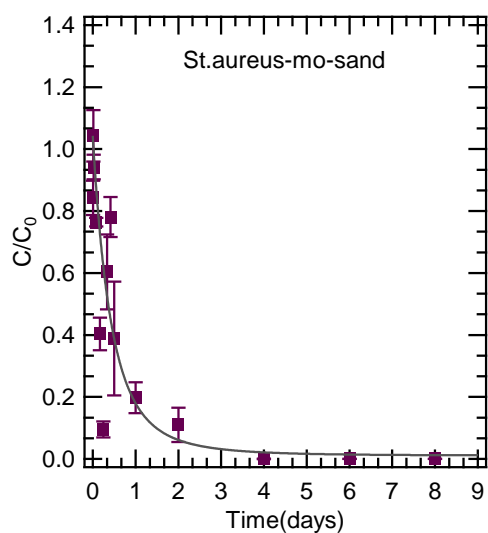
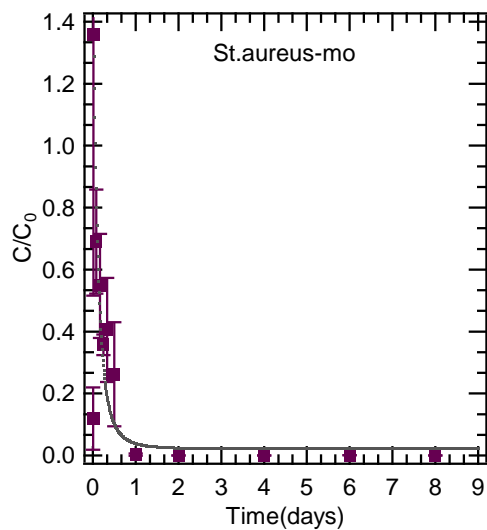
	<i>St.aureus</i> –mo			<i>St.aureus</i> -mo- GO			<i>St.aureus</i> -mo-TiO ₂		
Χρόνος (d)	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές
0	1.000	0.067	1.670	1.000	0.012	1.000	1.000	0.386	1.000
0.0035	0.119	0.101	1.619	0.469	0.058	0.991	0.335	0.003	0.982
0.0104	1.357	0.842	1.523	0.559	0.035	0.973	0.242	0.023	0.947
0.0208	1.667	0.404	1.391	0.578	0.014	0.946	0.251	0.070	0.898
0.4167	1.667	0.269	1.167	0.655	0.066	0.895	0.216	0.032	0.807
0.0833	0.690	0.168	0.840	0.602	0.124	0.804	0.363	0.038	0.657
0.1667	0.548	0.168	0.471	0.588	0.058	0.652	0.283	0.000	0.446
0.25	0.357	0.034	0.290	0.541	0.009	0.533	0.294	0.026	0.312
0.3333	0.405	0.168	0.193	0.494	0.029	0.440	0.361	0.128	0.225
0.5	0.262	0.168	0.103	0.614	0.038	0.308	0.172	0.041	0.125
1	0.002	0.003	0.038	0.598	0.066	0.124	0.016	0.003	0.035
2	0.000	0.000	0.024	0.396	0.079	0.036	0.008	0.012	0.010
4	0.000	0.000	0.023	0.007	0.002	0.012	0.000	0.000	0.005
6	0.000	0.000	0.023	0.007	0.000	0.008	0.000	0.000	0.004
8	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.004

Πίνακας 4.3.1: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του *St.aureus* παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με απουσία χαλαζιακής άμμου

	<i>St.aureus</i> -mo -sand			<i>St.aureus</i> -mo- GO –sand			<i>St.aureus</i> -mo-TiO ₂ -sand		
Χρόνος (d)	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές	$\frac{Cfu(t)}{Cfut(t_0)}$	Error bars	Προσομοιωμένες τιμές
0	1.000	0.102	1.043	1.000	0.119	1.000	1.000	0.174	1.000
0.0035	0.843	0.056	1.035	0.924	0.057	0.982	0.315	0.097	0.970
0.0104	1.043	0.083	1.019	0.622	0.017	0.949	0.397	0.058	0.914
0.0208	0.943	0.039	0.996	0.606	0.006	0.901	0.356	0.019	0.837
0.4167	0.780	0.065	0.952	0.394	0.011	0.813	0.514	0.513	0.704
0.0833	0.764	0.014	0.870	0.643	0.000	0.668	0.171	0.048	0.508
0.1667	0.403	0.053	0.731	0.189	0.051	0.462	0.137	0.039	0.282
0.25	0.095	0.026	0.618	0.185	0.068	0.329	0.075	0.029	0.169
0.3333	0.603	0.121	0.526	0.265	0.011	0.242	0.075	0.068	0.108
0.5	0.389	0.184	0.389	0.522	0.080	0.141	0.075	0.010	0.052
1	0.198	0.050	0.180	0.040	0.011	0.045	0.019	0.008	0.015
2	0.110	0.055	0.061	0.012	0.006	0.015	0.021	0.029	0.007
4	0.000	0.001	0.021	0.153	0.031	0.009	0.000	0.000	0.006
6	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.006

8	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.006
---	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Πίνακας 4.3.2: Πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές κανονικοποιημένης συγκέντρωσης του *St.aureus* παρουσία μικροοργανισμών και νανοσωματιδίων με παρουσία χαλαζιακής άμμου



Διαγράμματα 4.3.1-4.3.6: Κανονικοποιημένη συγκέντρωση (Normalized concentration) συναρτήσει του χρόνου όπου απεικονίζεται ο τρόπος δράσης χαλαζιακής άμμου, GO και TiO₂ στο βακτήριο *St.aureus* με παρουσία των άλλων μικροοργανισμών (mo).

<i>St.aureus</i>	$\lambda(d^{-1})$	$\lambda_0(d^{-1})$	$\alpha(d^{-1})$
Διάλυμα μικροοργανισμών (mo)	7.524±2.139	8.982±2.779	2.086±1.766
Διάλυμα μικροοργανισμών και άμμος (mo-sand)	1.883±0.206	2.224±0.371	0.489±0.400
Διάλυμα μικροοργανισμών και GO (mo-GO)	2.500±0.291	2.684±0.367	0.529±0.475
Διάλυμα μικροοργανισμών, GO και άμμος (mo-GO-sand)	4.326±0.745	5.065±1.093	1.071±0.900
Διάλυμα μικροοργανισμών και TiO ₂ (mo-TiO ₂)	4.272±0.828	5.240±1.291	0.966±0.741
Διάλυμα μικροοργανισμών, TiO ₂ και άμμος (mo-TiO ₂ -sand)	5.849±1.221	8.711±2.925	1.678±1.116

Πίνακας 4.3.3: Αποτελέσματα προσομοίωσης πειραματικών αποτελεσμάτων του βακτηρίου *St.aureus* από την έκφραση ψευδο-πρώτης τάξης μέσω του λογισμικού ColloidFit, όπου λ ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής του ρυθμού αδρανοποίησης, λ_0 ο αρχικός συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης και α ο συντελεστής ανθεκτικότητας

Η διεξαγωγή των αποτελεσμάτων για το βακτήριο *St.aureus* πραγματοποιείται με τρόπο όμοιο όπως αυτών που ακολουθήθηκαν για τα δύο άλλα βακτήρια.

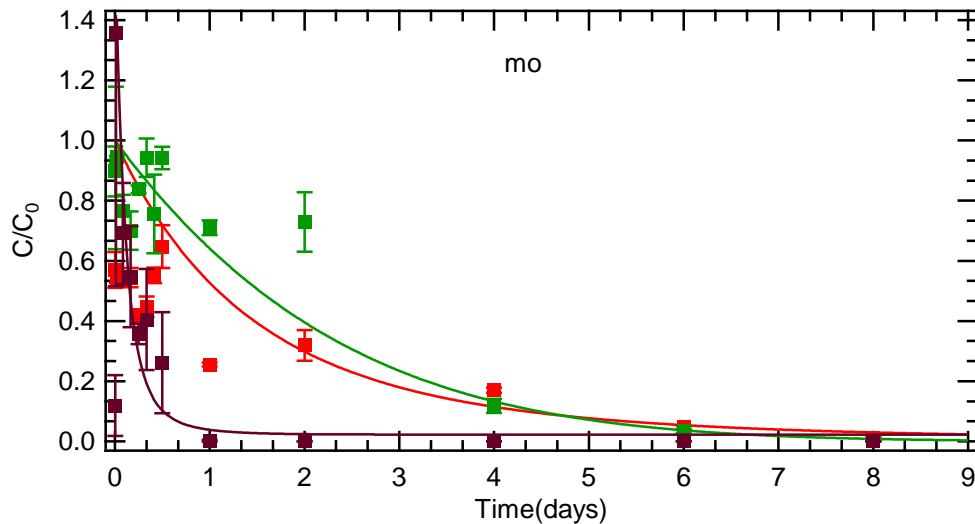
Αρχικά πριν από την διερεύνηση της επίδρασης της χαλαζιακής άμμου στο βακτήριο αυτό να αξίζει να αναφερθεί ότι ο ρυθμός αδρανοποίησης που εμφανίζεται στο πείραμα στο οποίο εξετάζεται η αλληλεπίδραση των βακτηρίων μεταξύ του είναι αρκετά υψηλός. Πιο συγκεκριμένα, από το πείραμα αυτό παρατηρείται ότι η συγκέντρωση του βακτηρίου έπεσε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε χρόνο λιγότερο από αυτό της μιας ημέρας. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα η καμπύλη που αντιστοιχεί στο πείραμα αυτό να έχει πολύ απότομη κλίση, με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται από συντελεστή αδρανοποίησης $\lambda=7.524 d^{-1}$.

Όσον αφορά την επίδραση της χαλαζιακής άμμου από το πείραμα που περιελάμβανε τους μικροοργανισμούς με παρουσία άμμου προέκυψε συντελεστής $\lambda=1.883 d^{-1}$. Αν και η τιμή αυτή είναι επίσης αρκετά υψηλή σε σχέση με αυτές που είχαν προκύψει από τα προηγούμενα πειράματα, συγκριτικά με την τιμή του αρχικού πειράματος είναι χαμηλότερη. Εξετάζοντας τις καμπύλες των δύο αυτών πειραμάτων γίνεται αντιληπτή η ομαλότητα της κλίσης με την οποία

μειώνεται το ποσοστό των επιζώντων στελεχών *St.aureus* παρουσία της άμμου συγκριτικά με την αντίστοιχη καμπύλη απουσία της. Για την πλήρη αποσαφήνιση του τρόπου δράσης της άμμου στο βακτήριο αυτό, εξετάζονται τα πειράματα που περιλαμβάνουν τα δύο νανοσωματίδια απουσία και παρουσία άμμου. Όσον αφορά στο GO παρατηρείται ότι ενώ στο πείραμα απουσία άμμου ο συντελεστής λ προέκυψε ίσος με 2.500 d^{-1} , παρουσία της προέκυψε ίσος με $\lambda=4.326\text{ d}^{-1}$. Συγκρίνοντας τις δύο αυτές τιμές συμπεραίνουμε ότι είτε η ύπαρξη της άμμου ενίσχυσε την αδρανοποίηση του βακτηρίου, είτε ενίσχυσε τις αντιβακτηριακές ιδιότητες του GO. Ωστόσο η ίδια τάση παρατηρείται και όσον αφορά το TiO_2 . Συγκρίνοντας τα δύο πειράματα που εμπεριέχουν το νανοσωματίδιο αυτό παρατηρούμε ότι απουσία άμμου $\lambda=4.272\text{ d}^{-1}$, ενώ παρουσία της $\lambda=5.849\text{ d}^{-1}$. Επομένως, η παρουσία άμμου έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των συντελεστών αδρανοποίησης και για τα δύο νανοσωματίδια.

Στο σημείο αυτό, χρήσιμη θα ήταν μία σύγκριση μεταξύ των αντιβακτηριακών ιδιοτήτων που εμφανίζουν τα δύο αυτά νανοσωματίδια στο βακτήριο *St.aureus*. Έπειτα από σύγκριση των συντελεστών αδρανοποίησης των πειραμάτων που περιλαμβάνουν τα νανοσωματίδια αυτά, το συμπέρασμα που προκύπτει είναι ότι ανεξάρτητα από την απουσία ή παρουσία της άμμου το TiO_2 παρουσιάζει καλύτερες αντιβακτηριακές ιδιότητες. Πιο συγκεκριμένα απουσία άμμου $\lambda_{\text{GO}}=2.500\text{ d}^{-1}$ ενώ $\lambda_{\text{TiO}_2}=4.272\text{ d}^{-1}$. Αντιστοίχως, παρουσία άμμου προκύπτουν οι συντελεστές $\lambda_{\text{GO}}=4.326\text{ d}^{-1}$ ενώ $\lambda_{\text{TiO}_2}=5.849\text{ d}^{-1}$.

4.4 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΓΙΑ ΚΑΘΕ ΠΕΙΡΑΜΑ



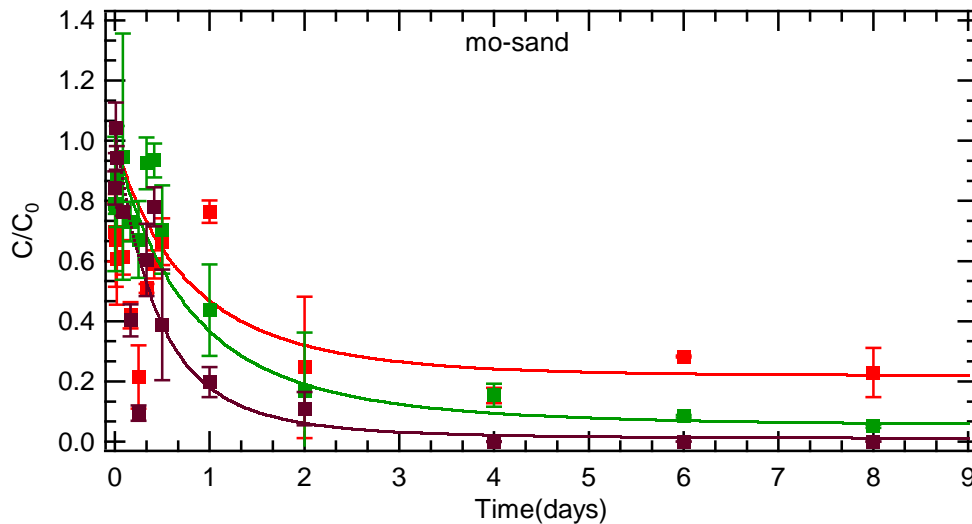
Διάγραμμα 4.4.1: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου

Πράσινο χρώμα: *E. faecalis*

Κόκκινο χρώμα: *E. coli*

Μωβ χρώμα: *St. aureus*

Στο σημείο αυτό χρήσιμο θα ήταν να διεξαχθούν κάποια συμπεράσματα αναφορικά με τον τρόπο με τον οποίο δρα κάθε παράμετρος ξεχωριστά, συγκριτικά και στα τρία βακτήρια. Όσον αφορά το παραπάνω διάγραμμα απεικονίζει το πείραμα το οποίο εξετάζει την αλληλεπίδραση των τριών βακτηρίων μεταξύ τους. Συγκρίνοντας τις καμπύλες των βακτηρίων μεταξύ τους είναι κατανοητό ότι ο *St. aureus* εμφανίζει την μεγαλύτερη αδρανοποίηση σε σχέση με τα άλλα δύο βακτήρια. Αυτό έρχεται σε απόλυτη ταύτιση με τις τιμές των συντελεστών αδρανοποίησης εάν συγκριθούν και για το πείραμα αυτό όπου $\lambda_{St.aureus}=7,524 \text{ d}^{-1}$, $\lambda_{E.coli}=0.591 \text{ d}^{-1}$ ενώ $\lambda_{E.faecalis}=0,474 \text{ d}^{-1}$. Αμέσως μετά τον *St. aureus* μεγαλύτερη αδρανοποίηση εμφανίζει η *E. coli* και έπειτα ο *E. faecalis*. Λόγω του ότι οι τιμές των συντελεστών αδρανοποίησης των δύο τελευταίων βακτηρίων (*E. coli*, *E. faecalis*) είναι αρκετά κοντινές μπορεί να υποθεθεί ότι εμφανίζουν συνεργιστική δράση και εμποδίζουν την επιβίωση του *St. aureus*.



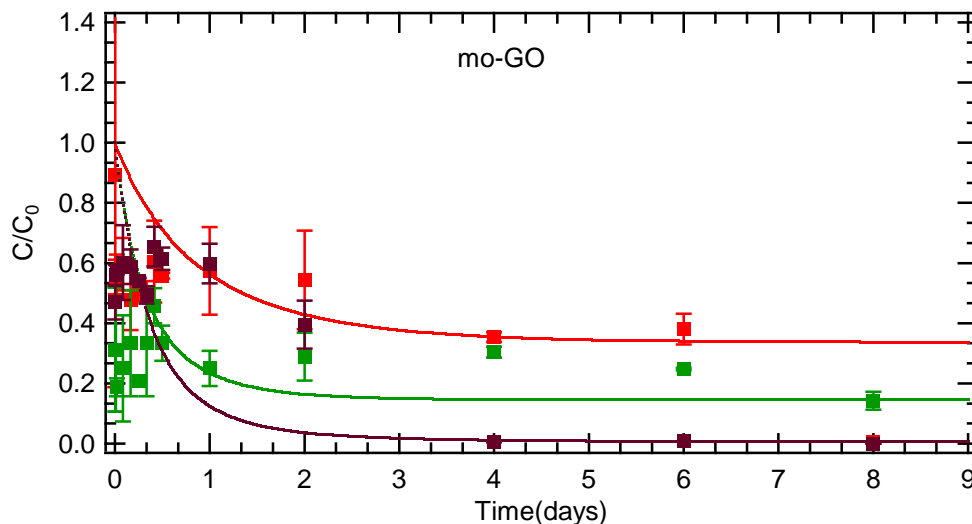
Διάγραμμα 4.4.2: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία άμμου.

Πράσινο χρώμα: *E. faecalis*

Κόκκινο χρώμα: *E. coli*

Μωβ χρώμα: *St. aureus*

Μελετώντας το παραπάνω διάγραμμα όπου απεικονίζεται η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών μεταξύ τους αλλά και με την άμμο και σε αυτήν την περίπτωση καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η μεγαλύτερη επίδραση ασκείται στον *St. aureus*. Ο ρυθμός με τον οποίο μειώνεται η κανονικοποιημένη συγκέντρωσή του φαίνεται από τις καμπύλες ότι είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις αντίστοιχες των υπολοίπων δύο βακτηρίων. Λαμβάνοντας υπόψη τους συντελεστές αδρανοποίησης όπου $\lambda_{St.aureus}=1.883\text{ d}^{-1}$, $\lambda_{E.coli}=0.234\text{ d}^{-1}$ ενώ $\lambda_{E.faecalis}=0.865\text{ d}^{-1}$ επιβεβαιώνεται ότι ο *St. aureus* εμφανίζει τον μεγαλύτερο ρυθμό αδρανοποίησης. Ακολουθεί ο *E. faecalis* ενώ την μεγαλύτερη συγκριτικά επιβίωση εμφανίζει η *E. coli*. Επομένως θα μπορούσε να υποθεθεί ότι η άμμος επηρεάζει σε μεγαλύτερο βαθμό τον *St. aureus* γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται από την μεταβολή του συντελεστή αδρανοποίησής του σε σχέση με το πείραμα στο οποίο εξεταζόταν μόνο η αλληλεπίδραση των βακτηρίων μεταξύ τους, $d\lambda=5,641\text{ d}^{-1}$. Αντίθετα, για τα άλλα δύο βακτήρια, $d\lambda_{E.coli}=0,357\text{ d}^{-1}$ ενώ $d\lambda_{E.faecalis}=0,391\text{ d}^{-1}$.



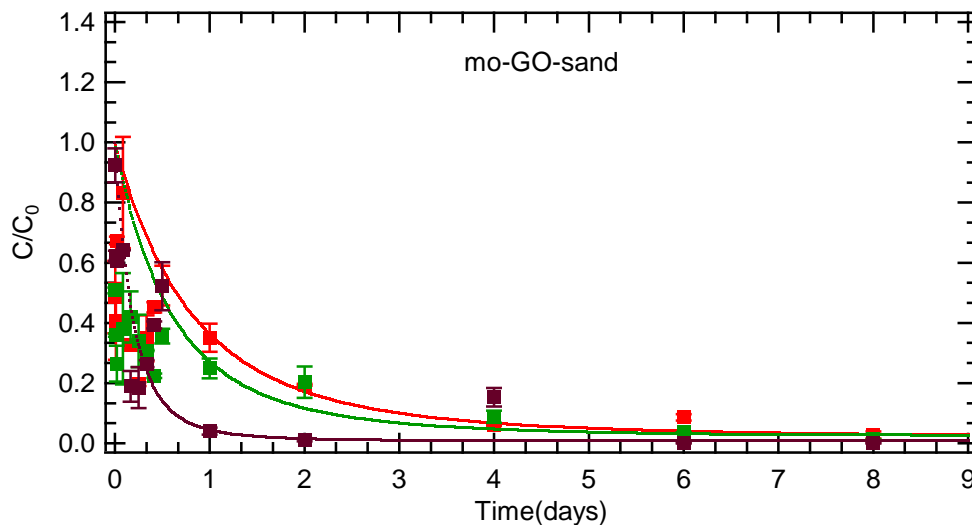
Διάγραμμα 4.4.3: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία GO.

Πράσινο χρώμα: *E. faecalis*

Κόκκινο χρώμα: *E. coli*

Μωβ χρώμα: *St. aureus*

Στο παραπάνω διάγραμμα απεικονίζονται οι καμπύλες των τριών βακτηρίων όπως διαμορφώνονται έπειτα από επίδραση του νανοσωματιδίου GO. Συγκρίνοντάς τες με αυτές του προηγούμενου διαγράμματος με παρουσία των μικροοργανισμών και άμμου φαίνεται να ακολουθούν παρόμοια τάση. Ακόμη, και για την περίπτωση αυτή μεγαλύτερη αδρανοποίηση υφίσταται ο *St. aureus*, ο οποίος χαρακτηρίζεται από συντελεστή αδρανοποίησης μεγαλύτερο σε σχέση με των υπολοίπων δύο βακτηρίων $\lambda_{St.aureus}=2,500\text{ d}^{-1}$. Αμέσως μεγαλύτερη αδρανοποίηση παρουσιάζει ο *E. faecalis* με $\lambda=1,416\text{ d}^{-1}$ και έπειτα η *E. coli* με $\lambda=0,297\text{ d}^{-1}$. Πέρα από αυτό όμως και για την περίπτωση αυτή, ο *St. aureus* φαίνεται να υφίσταται τη μεγαλύτερη επίδραση καθώς η μεταβολή του συντελεστή του συγκριτικά με το πείραμα το οποίο περιλαμβάνει μόνο την επίδραση των μικροοργανισμών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με των άλλων δύο βακτηρίων και ίση με $d\lambda_{St.aureus}=5,024\text{ d}^{-1}$. Αντίστοιχα, παρατηρώντας τις τιμές αυτές φαίνεται το GO να ασκεί μεγάλη επιρροή και στον *E. faecalis* καθώς $d\lambda_{E.faecalis}=0,942\text{ d}^{-1}$, ενώ μικρότερη στην *E. coli* για την οποία $d\lambda_{E.coli}=0,294\text{ d}^{-1}$. Η ανθεκτικότητα που παρουσιάζει η *E. coli* στο GO πιθανόν να είναι αποτέλεσμα της κυτταρικής δομής της. Όπως έχει αναφερθεί και παραπάνω το βακτήριο αυτό ανήκει στα Gram αρνητικά. Τα βακτήρια αυτά σε αντίθεση με τα Gram θετικά βακτήρια διαθέτουν πέρα από το στρώμα πεπτιδογλυκάνης και ένα επιπλέον εξωτερικό τοίχωμα το οποίο προστατεύει το εσωτερικό. Αυτό μπορεί να συνδεθεί με τον μηχανισμό με τον οποίο το GO οδηγεί στην αδρανοποίησή τους. Ο λόγος αφορά την σχάση της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων αυτών η οποία οδηγεί στην απελευθέρωση των ενδοκυτταρικών περιεχομένων της. Επομένως, η επαφή του στρώματος πεπτιδογλυκάνης με τις αιχμηρές άκρες του GO είναι πιο εύκολη στα Gram θετικά βακτήρια τα οποία παρουσιάζουν σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτά μεγαλύτερη ευαισθησία στο νανοσωματίδιο αυτό.



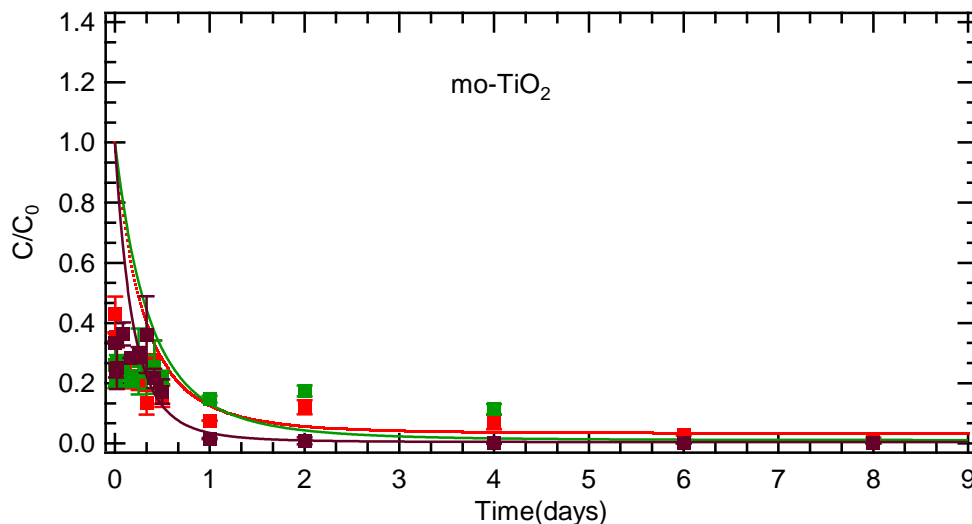
Διάγραμμα 4.4.4: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία GO και άμμου.

Πράσινο χρώμα: *E. faecalis*

Κόκκινο χρώμα: *E. coli*

Μωβ χρώμα: *St. aureus*

Σύμφωνα με το διάγραμμα (3.4.4) στο οποίο απεικονίζονται τα πειραματικά και προσομοιωμένα αποτελέσματα των τριών βακτηρίων παρατηρείται ότι αρχικά ο *St. aureus* φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα για τα πρώτα δείγματα, έως και την 2η ημέρα, καθώς από εκεί και έπειτα μεγάλη πτώση φαίνεται να παρουσιάζουν και τα άλλα δύο βακτήρια. Πιο συγκεκριμένα, για το πείραμα αυτό τα βακτήρια χαρακτηρίζονται από συντελεστές αδρανοποίησης $\lambda_{St.aureus}=4,326d^{-1}$, $\lambda_{E.faecalis}=1,175d^{-1}$ και $\lambda_{E.coli}=0,950d^{-1}$. Και κάτω υπό τις συνθήκες αυτές ο *St. aureus* παρουσιάζει την μεγαλύτερη αδρανοποίηση ενώ ακολουθεί ο *E. faecalis* και έπειτα η *E. coli*. Όπως και στην προηγούμενη περίπτωση η ανθεκτικότητα του βακτηρίου *E. coli* μπορεί να αποδοθεί στο επιπλέον κυτταρικό τοίχωμα το οποίο διαθέτει.



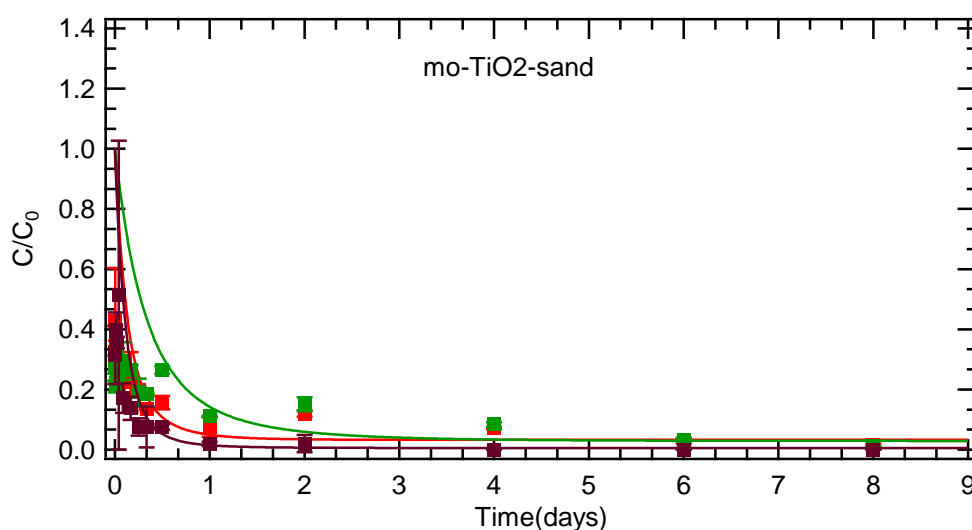
Διάγραμμα 4.4.5: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία TiO₂.

Πράσινο χρώμα: *E. faecalis*

Κόκκινο χρώμα: *E. coli*

Μωβ χρώμα: *St. aureus*

Για την διερεύνηση του τρόπου δράσης του νανοσωματιδίου της τιτάνιας στα βακτήρια παρατίθενται οι πειραματικές και προσομοιωμένες τιμές τους στο διάγραμμα (3.4.5). Με μία πρώτη ματιά επιβεβαιώνονται οι αντιβακτηριακές ιδιότητές της απουσία άμμου ιδιαίτερα για την *E. coli* και τον *E. faecalis*. Αν και από την ανάλυση των αποτελεσμάτων που αφορούν στο πείραμα στο οποίο συνυπήρχαν μόνο τους τα βακτήρια, διαπιστώθηκε ότι όσον αφορά τον *St. aureus* δεν συμβάλει στην ενίσχυση της αδρανοποίησης του. Ωστόσο επηρεάζει την κλίση της καμπύλης του η οποία βέβαια εξακολουθεί να πέφτει με υψηλό ρυθμό. Συγκεκριμένα οι συντελεστές αδρανοποίησης που προέκυψαν από το πείραμα αυτό είναι $\lambda_{St.aureus}=4,272d^{-1}$, $\lambda_{E.faecalis}=2,053d^{-1}$ και $\lambda_{E.coli}=2,713d^{-1}$, ενώ ο *E. faecalis* είναι το βακτήριο το οποίο εμφανίζει την μέγιστη ανθεκτικότητα κάτω από τις συνθήκες αυτές.



Διάγραμμα 4.4.6: Απεικόνιση πειραματικών και προσομοιωμένων τιμών κανονικοποιημένης

συγκέντρωσης όλων των βακτηρίων συναρτήσει του χρόνου, παρουσία TiO_2 και άμμου.

Πράσινο χρώμα: *E. faecalis*

Κόκκινο χρώμα: *E. coli*

Μωβ χρώμα: *St. aureus*

Τελειώνοντας, όσον αφορά το πείραμα το οποίο εξετάζει την αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών με παρουσία χαλαζιακής άμμου και τιτάνιας με μία πρώτη ματιά φαίνεται ο *E. faecalis* να παρουσιάζει τον μικρότερο συντελεστή αδρανοποίησης. Την υπόθεση αυτή επιβεβαιώνει ο υπολογισμός του συντελεστή αυτού ο οποίος ισούται με $\lambda_{E. faecalis} = 2.390 \text{ d}^{-1}$. Ωστόσο ο *St. aureus* και για το πείραμα αυτό εμφανίζει την μεγαλύτερη αδρανοποίηση με συντελεστή $\lambda_{St. aureus} = 5.849 \text{ d}^{-1}$. Η *E. coli* για το πείραμα αυτό εμφανίζει την μέγιστη τιμή του συντελεστή αδρανοποίησής της, $\lambda_{E. coli} = 4.849 \text{ d}^{-1}$. Ολοκληρώνοντας, από το πείραμα αυτό έπειτα από σύγκριση των αντίστοιχων τιμών των συντελεστών αδρανοποίησης του πειράματος με παρουσία άμμου και απουσίας τιτάνιας μπορεί να επιβεβαιωθεί η αντιβακτηριακή ιδιότητα που διαθέτει με παρουσία άμμου και για τα τρία βακτήρια.

Κατά την διεξαγωγή των δυναμικών αυτών πειραμάτων υπάρχουν διάφοροι παράγοντες εξαιτίας των οποίων η βιωσιμότητα των βακτηρίων μπορεί να επηρεαστεί θετικά ή αρνητικά. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η απουσία ή παρουσία άμμου, νανοσωματιδίων, θρεπτικών υλικών και η δραστηριότητα αυτόχθονων μικροοργανισμών είναι μερικοί από αυτούς. Λόγω του ότι οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων κάθε φορά ήταν σταθερές θα αναλυθεί ο τρόπος με τον οποίο επιδρούν στα βακτήρια η απουσία ή παρουσία των παραμέτρων άμμου και νανοσωματιδίων που ερευνώνται στην διπλωματική εργασία αυτή.

Όσον αφορά την παρουσία άμμου κύριοι μηχανισμοί οι οποίοι καθορίζουν την συμπεριφορά των βακτηρίων είναι η προσρόφηση και η αδρανοποίηση. Την αλληλεπίδραση της χαλαζιακής άμμου και των βακτηρίων καθορίζουν οι ηλεκτρικές ιδιότητες των παραμέτρων αυτών βάσει των οποίων η μεταξύ διαφορετικά φορτισμένων ιόντων η ελκυστικότητα η οποία οδηγεί στην προσρόφηση είναι εντονότερη (Mills et al., 1994). Μελετώντας έρευνες οι οποίες περιλαμβάνουν πειράματα δυναμικά με μικροοργανισμούς και άμμο παρατηρείται ότι ο ρόλος της άμμου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Πέρα από αυτά λόγω του ότι εξετάζεται η επίδραση της χαλαζιακής άμμου, ο τρόπος με τον οποίο δρα σε κάθε έναν μικροοργανισμό μπορεί να διαφέρει. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η έρευνα των Anders and Chrysikopoulos (2006), στην οποία μέσω στατικών και δυναμικών πειραμάτων αξιολογήθηκαν οι παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν τους συντελεστές αδρανοποίησης για βακτηριοφάγους. Μεταξύ των παραγόντων που εξετάστηκαν ήταν και η χαλαζιακή άμμος η οποία όσον αφορά τα δυναμικά πειράματα φαίνεται να επηρεάζει με διαφορετικό τρόπο τους βακτηριοφάγους MS2 και PRD1. Πιο συγκεκριμένα, από τα αποτελέσματα των πειραμάτων παρατηρήθηκε ότι για τον MS2 σε θερμοκρασία 15°C παρουσία άμμου ο συντελεστής αδρανοποίησης λ μειώθηκε συγκριτικά με το αντίστοιχο πείραμα απουσία της άμμου. Αντίθετα, όσον αφορά τον PRD1 για τα αντίστοιχα πειράματα παρουσία άμμου ο συντελεστής αδρανοποίησης αυξήθηκε. Σε ακόμη πιο πρόσφατα πειράματα που έγιναν με τον βακτηριοφάγο MS2 απουσίας και παρουσίας άμμου (Syngouna and Chrysikopoulos, 2017), διαπιστώθηκε ότι με απουσία άμμου η αδρανοποίηση πραγματοποιήθηκε γρηγορότερα. Το αποτέλεσμα αυτό

ταυτίζεται πλήρως με αυτό της προηγούμενης έρευνας που αφορούσε τον ίδιο βακτηριοφάγο. Από τις έρευνες αυτές μπορεί να υποτεθεί ότι η παρουσία άμμου οδηγεί σε προσκόλληση των ιών η οποία εμποδίζει την αδρανοποίησή τους. Παρόμοια εξήγηση θα μπορούσε να αποδοθεί και για τα πειράματα της διπλωματικής αυτής κατά τα οποία η παρουσία άμμου μειώνει την αδρανοποίησή τους. Αυτό ισχύει για την περίπτωση της *E.coli* και του *St.aureus* όπου με απουσία νανοσωματιδίων, η παρουσία άμμου αποδίδει μικρότερο συντελεστή αδρανοποίησης. Το ίδιο θα μπορούσε να ισχύει και για την περίπτωση του *E.faecalis*, όπου με παρουσία άμμου και GO ο συντελεστής αδρανοποίησης μειώνεται.

Στη συνέχεια θα αναφερθούν μερικά συμπεράσματα τα οποία προέκυψαν εξαιτίας της δράσης του GO. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τα βακτήρια *E.coli* και *St.aureus* παρατηρείται ότι το GO τα επηρεάζει με τον ίδιο τρόπο απουσία αλλά και παρουσία χαλαζιακής άμμου. Απουσία άμμου και για τα δύο βακτήρια το GO φαίνεται όχι μόνο να μην προκαλεί αντιβακτηριακή επίδραση αλλά αντίθετα συμβάλλει στην μείωση της αδρανοποίησής τους. συμπεράσμα αυτό θα μπορούσε να τεκμηριωθεί βάσει των μηχανισμών οι οποίοι ενισχύουν την βιωσιμότητα των βακτηρίων οι οποίοι αναφέρονται και παραπάνω. Το γεγονός ότι η συγκέντρωση του νανοσωματιδίου που εξετάζεται κάθε φορά είναι 20ppm μπορεί να συνδυαστεί με την έρευνα των Ruiz et al. (2011). Βάσει τις έρευνες αυτής, για συγκεντρώσεις GO περίπου 25ppm τα βακτήρια αναπτύσσονται γρηγορότερα καθώς χρησιμοποιούν το νανουλικά ως μέσο πολλαπλασιασμού. Ωστόσο όσον αφορά τα βακτήρια αυτά παρουσίας χαλαζιακής άμμου οι αντιβακτηριακές ιδιότητες του νανοσωματιδίου αυτού είναι ενισχυμένες. Η ομοιότητα αυτή στη συμπεριφορά παρουσία του GO είχε διαπιστωθεί και από τον Wei Gao, ο οποίος υποστήριζε ότι τα βακτήρια αυτά είναι πιο ευαίσθητα στην έκθεση του GO. Αναφορικά με το βακτήριο *E.faecalis* παρουσία άμμου παρατηρήθηκε ότι το GO συμβάλλει στην αδρανοποίησή του. Η αδρανοποίηση αυτή, η οποία έχει διαπιστωθεί από πολλές έρευνες (Liu et al., 2011; Al-Thani et al., 2014) έχει αποδοθεί είτε στην τομή της κυτταρικής μεμβράνης, είτε την παγίδευση είτε την κάλυψη των βακτηρίων από το GO. Στη συνέχεια, να πραγματοποιηθεί μία συσχέτιση της συμπεριφοράς των βακτηρίων παρουσία GO αναφορικά με την ταξινόμησή τους κατά την Gram χρώση. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την μεταβολή του συντελεστή αδρανοποίησης σε κάθε περίπτωση παρατηρείται ότι απουσίας άμμου η *E.coli* παρουσίασε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τα άλλα δύο βακτήρια. Ωστόσο, το αποτέλεσμα αυτό έρχεται σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της έρευνας των Krishnamoorthy et al. (2012) βάσει της οποίας η *E.coli* παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία με τον *E.faecalis*. Παρ' όλα αυτά όμως η ανθεκτικότητα της *E.coli* έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες έρευνες (Akhavan et al. (2011); Al-Thani et al. (2014)) σύμφωνα με τις οποίες η συμπεριφορά αυτή έχει αποδοθεί στην ταξινόμησή τους κατά Gram χρώση. Αναλύοντας την υπόθεση αυτή προκύπτει ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια λόγω της εξωτερικής μεμβράνης που διαθέτουν, αντίθετα με τα Gram θετικά είναι πιο ανθεκτικά στην έκθεση σε GO. Όσον αφορά την μεταβολή του συντελεστή αδρανοποίησης των βακτηρίων παρουσία άμμου ο *E.faecalis* και *E.coli* φαίνεται να παρουσιάζουν την μεγαλύτερη ανθεκτικότητα σε σχέση με τον *St.aureus*. Αν και η μεταβολή των συντελεστών για τον *E.faecalis* και την *E.coli* είναι σχετικά παρόμοια, αποτέλεσμα το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στην κοινή προέλευσή τους η οποία είναι εντερική, το γεγονός ότι η *E.coli* είναι πιο ευαίσθητη συγκριτικά με τον *E.faecalis* ταυτίζεται με τα αποτελέσματα των ερευνών Krishnamoorthy et al. (2012).

Από τα πειράματα τα οποία περιελάμβαναν το νανοσωματίδιο του διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) επιβεβαιώθηκε η επίδραση η οποία ασκείται και στα τρία βακτήρια. Το αποτέλεσμα αυτό ισχύει ανεξάρτητα της παρουσίας ή απουσίας της χαλαζιακής άμμου. Πιο συγκεκριμένα όσον αφορά τα βακτήρια *E.faecalis* και *E.coli*, παρουσίας του νανοσωματιδίου αυτού η μεταβολή στους συντελεστές αδρανοποίησής τους ήταν αυξημένη. Απουσία και παρουσία χαλαζιακής άμμου ο ρυθμός με τον οποίο αδρανοποιήθηκαν τα βακτήρια αυτά ήταν μεγαλύτερος από κάθε άλλη περίπτωση που εξετάστηκε στην εργασία αυτή. Ωστόσο το ίδιο ισχύει και για το βακτήριο *St.aureus*, το οποίο με παρουσία άμμου επίσης εμφάνισε μεγαλύτερη αδρανοποίηση από αυτήν απουσία του νανοσωματιδίου. Αν και τα βιβλιογραφικά δεδομένα που εξετάζουν την επίδραση του νανοσωματιδίου αυτού σε μικροοργανισμούς είναι περιορισμένα, από αυτά που υπάρχουν επιβεβαιώνεται η αντιμικροβιακή δράση τους. Η αντιμικροβιακή αυτή δράση για την περίπτωση αυτή πιθανόν να είναι αποτέλεσμα πρόκλησης βλάβης των δομικών συστατικών των βακτηρίων έπειτα από οξειδωτικό στρες στο οποίο υπόκεινται. Όπως έχει ήδη αναφερθεί και παραπάνω το οξειδωτικό στρες προκαλείται έπειτα από απελευθέρωση ριζών υδροξυλίου και υπεροξειδίου από τα ιόντα της τιτάνιας. Από έρευνα των Babaei et al. (2016) διαπιστώθηκε η αντιβακτηριακή δράση του TiO_2 σε βακτήρια *St.aureus* και *E.coli*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΞΕΝΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΗ

Akhavan O., Ghaderi E. and Esfandiar A., (2011), "Wrapping Bacteria by Graphene Nanosheets for Isolation from Environment, Reactivation by Sonication, and Inactivation by Near-Infrared Irradiation ", The Journal of Physical Chemistry, Vol. 115, pp. 6279-6288.

Akhavan O. and Ghaderi E., (2010), "Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria", ACS Publications, Vol. 4, pp. 5731-5736.

Al-Thani R.F., Patan N.K. and Al-Maadeed M.A., (2014), " Graphene oxide as antimicrobial against two gram-positive and two gram negative bacteria in addition to one fungus", Online Journal of Biological Sciences, Vol. 14, pp. 230-239.

Aronsson K., Ronner U. (2001), "Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae by pulsed electric fields", Innovative Food Science & Emerging Technologies, Vol. 2, pp. 105-112.

Aryanpour M., Hoffmann R. and DiSalvo F.J., (2009), "Tungsten-Doped Titanium Dioxide in the Rutile Structure: Theoretical Considerations", Vol. 21, pp. 1627-1635.

Asahi R., Morikawa T., Ohwaki T., Aoki K., Taga Y., (2001), " Visible-Light Photocatalysis in Nitrogen-Doped Titanium Oxides", Science, Vol. 293, Issue 5528, pp. 269-271.

Azizighannad S. and Mitra S. (2018), "Stepwise Reduction of Graphene Oxide (GO) and Its Effects on Chemical and Colloidal Properties", Scientific Reports, Vol. 8.

Baalousha M. and Lead J.R. (2007) " Characterization of Natural Aquatic Colloids (<5 nm) by Flow-Field Flow Fractionation and Atomic Force Microscopy", Environmental Science and Technology, Vol. 41, pp. 1111-1117.

Babei E., Dehnad A., Hajizadeh N., Valizadeh H., Reihani F.S (2016), " A study on Inhibitory Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles and its Photocatalytic Type on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Aspergillus flavus", Applied Food Biotechnology, Vol.3, pp. 115-123.

Bakri A., Hariono B., Utami M.M.D., Sutrisno (2018), "Inactivation of Bacteria S. aureus ATCC 25923 and S. Typhimurium ATCC 14 028 Influence of UV-HPEF, Journal of Physics: Conference Series, Vol. 953.

Banning N., Toze S. and Mee B.J. (2003), "Persistence of biofilm-associated Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in groundwater and treated effluent in a laboratory model system", Microbiology, Vol. 149, pp. 47-55.

Barbolina I., Woods C.R., Lozano N. Kostarelos K., Novoselov K.S. and Roberts I.S., (2006), "Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity, IOP Publishing, Vol. 3.

Bicki T. J., Brawn R.S., Collins M.E., Mansell R.S. and Rothwell D.F. (1984) "Impact of On-site Sewage Disposal Systems" Report to Florida Department of Health and Rehabilitative Services under contract number, Soil Science 11/84.

Bigelow W.D., and Esty J.R (1920), " The thermal death point in relation to time of thermophilic microorganisms.", The Journal of Infectious Diseases, Vol. 27, pp. 602-617.

Bradford S.A., Morales V.L., Zhang W., Harvey R.W., Packman A.I., Mohanram A. and Welty C. (2013) "Transport and Fate of Microbial Pathogens in Agricultural Settings", Environmental Science and Technology, Vol.43, pp. 775-893.

Brown C.M., Staley C., Wang P., Dalzell P., Chun C.L. and Sadowsky M.J. (2017), "A High-Throughput DNA-Sequencing Approach for Determining Sources of Fecal Bacteria in a Lake Superior Estuary", Environmental Science and Technology, Vol. 51, pp. 8263-8271.

Cannon A.S. and Warner J.S., (2004), " Structure-Activity Relationship of Organic Acids in Titanium Dioxide Nanoparticle Dispersions ", American Chemical Society, Vol. 16, pp. 5138-5140.

Cebrián G., Condón S., Mañas P. (2017) " Physiology of the Inactivation of Vegetative Bacteria by Thermal Treatments: Mode of Action, Influence of Environmental Factors and Inactivation Kinetics ", Vol. 12.

Cetinkaya Y (2000), "Vancomycin-resistant enterococci", Clinical Microbiology reviews, Vol. 13, pp. 686-707.

Chen J., Wand X. and Han H.,(2013), " A new function of graphene oxide emerges: inactivating phytopathogenic bacterium *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* ", Journal of Nanoparticle Research.

Chen X. and Mao S.S., (2007), "Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications", American Chemical Society, Vol. 107, pp. 2891-2959.

Chen S., Guo Y., Zhong H., Chen S., Li J., Ge Z. and Tang J. (2014), "Synergistic antibacterial mechanism and coating application of copper/titanium dioxide nanoparticles", Chemical Engineer Journal, Vol. 256, pp. 238-246.

Chowdhury I., Duch M.C., Mansukhani N.D., Hersam M.C. and Bouchard D., (2013), "Colloidal Properties and Stability of Graphene Oxide Nanomaterials in the Aquatic Environment ", Environmental Science and Technology, Vol. 47, pp. 6288-6296.

Chrysikopoulos C. V. and Sim Y (1996), "One-dimensional virus transport in homogeneous porous media with time-dependent distribution coefficient", Water Resources Research, Vol. 32, pp. 2607-2611.

Chrysikopoulos C.V. and Aravantinou A.F (2014), "Virus attachment onto quartz sand: Role of grain size and temperature", Journal of Environmental Chemical Engineering, Vol. 2, pp 796-801.

Chrysikopoulos C.V. and Vogler E.T. (2004), " Acoustically Enhanced Multicomponent NAPL Ganglia Dissolution in Water Saturated Packed Columns", Stochastic Environmental Research, Vol. 18, pp. 67-78.

Cliver D.O. and Herrmann J.E. (1972), "Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses", Water Research Pergamon Press, Vol. 6, pp. 797-805.

Davis K.A., (1990), "Titanium dioxide", Chemical of the month.

DeFelice N.B., Johnston J.E. and Gibson J.M. (2015), " Acute Gastrointestinal Illness Risks in North Carolina Community Water Systems: A Methodological Comparison", *Environmental Science and Technology*, Vol. 49, pp. , 10019–10027.

Di Paola A., Bellardita M. and Palmisano L.,(2013),"Brookite, the Least Known TiO₂ Photocatalyst ", *Catalysts*, Vol. 3, pp. 36-73.

Ding Z., Hu X., Morales Verónica L., Gao B., (2014), " Filtration and transport of heavy metals in graphene oxide enabled sand columns ", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 257, pp 248-252.

Ebacher G., Besner M.C., Clément B. and Prévost M. (2012) "Sensitivity analysis of some critical factors affecting simulated intrusion volumes during a low pressure transient event in a full-scale water distribution system ", *Water Research*, Vol. 13, pp. 4017-4030.

Elimelech M., J.. Jia G.X. and Williams R.A. (1995), "Particle Deposition and Aggregation".

Essendoubi M, Brhada F, Eljamali JE, Filali-Maltouf A, Bonnassie S, Georgeault S, Blanco C, Jebbar M (2007), " Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating *Acacia* isolated from south-eastern Moroccan Sahara ",*Environmental Microbiology* Vol. 9, pp. 603-611.

Fang J., Shan X., Wen B., Lin J., Owens G., (2009), "Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns", *Environmental Pollution*, Vol.157, pp 1101-1109.

Fang M., Chen J.H., Xu X.L., Yang P.H., Hidebrand H.F., (2006), "Antibacterial activities of onorganisc agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests", *Antimicrobial Agents*, Vol. 27, pp. 513-517.

Fen Li , Xue Jiang , Jijun Zhao, Shengbai Zhang (2015), " Graphene oxide: A promising nanomaterial for energy and environmental applications ", *Nano-energy*, Vol.16.pp 488-515.

Fontes D.E., Mills E.A., Hornberger G.M., and Herman J.S. (1991), "Physical and Chemical Factors Influencing Transport of Microorganisms through Porous Media", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, No. 9, pp. 2473-2481.

Foppen J.W., Schijven J.F. (2006), "Evaluation of data from the literature on the transport and survival of *Escherichia coli* and thermotolerant coliforms in aquifers under saturated conditions ", *Water Research*, Vol.40, pp. 401-426.

Fujioka R.S., Loh P.C. and Lau L.S. (1980) "Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 39, pp. 1105-1110.

Fujishima A., Rao T.N., Tryk D.A., (2000), "Titanium dioxide photocatalysis ", *Journal of Photochemistry of Photobiology*, pp. 1-21.

Gao W., "The Chemistry of Graphene Oxide".

Gerba P. C. and Bitton G. (1984), " Microbial pollutants their survival and transport pattern to groundwater",*Groundwater Pollution Microbiology*, Vol. 11, No. 4, pp.372-374.

Gordon C. and Toze S. (2003), " Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses ", Journal of Applied Microbiology, Vol. 95, pp. 536-544.

Gould G. W. (1989), " Heat-induced injury and inactivation ", Mechanisms of action of food preservation procedures, Elsevier Science Publishers, pp. 11-42.

Grieken R., Marugan J., Pablos C., Furones L., Lopez A. (2010), " Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E. faecalis* and Gram-negative *E. coli* faecal contamination indicator microorganisms ", Applied Catalysis B: Environmental, Vol. 100, pp. 212-220.

Guzmaan K.A.D., Taylor M.R. and Banfield J.F. (2006), "Environmental Risks of Nanotechnology: National Nanotechnology Initiative Funding", Environmental Science and Technology, Vol. 40, pp. 1401-1407.

Han C., Lalley J., Namboodin D., Cromer K. and Nadagouda M.N., (2015), " Titanium dioxide-based antibacterial surfaces for water treatment", Chemical Engineering, Vol. 11, pp. 46-51.

Hengerer R. , Bolliger B., Erbudakb M., Gratzel M., (2000), "Structure and stability of the anatase TiO₂ and surfaces ", Surface Science, Vol. 460, pp. 162-169.

Hulsheger H., Potel J. and Niemann EG. (1983), " Electric field effects on bacteria and yeast cells ", Radiation and Environmental biophysics, Vol. 22, pp. 149-162.

Jay J.M., Loessner M.J, Golden D. A. (1998), "Modern food microbiology".

Jira J., Rezek B. , Kriha V. , Artemenko A. , Matolínová I. , Skakalova V., Stenclova P. and Kromka A., (2018), "Inhibition of *E. coli* Growth by Nanodiamond and Graphene Oxide Enhanced by Luria-Bertani Medium", Nanomaterials, Vol. 8.

John D.E. and Rose J.B. (2005) " Review of Factors Affecting Microbial Survival in Groundwater ", Critical Review, Environmental Science and Technology, Vol. 39, No. 19, pp. 7345-7356.

Kaper J.B., Nataro J.P. and Mobley H.L. (2004) "Pathogenic *Escherichia coli*", Nature reviews Microbiology, Vol. 2, pp. 123-140.

Khezerloua A., Alizadeh-Sanib M., Azizi-Lalabadib M., Ehsani A.(2018), "Nanoparticles and their antimicrobial properties against pathogens including bacteria, fungi, parasites and viruses", Microbial Pathogenesis, Vol. 123, pp. 505-526.

Kim J., Cote L.J. and Huang J., (2012), " Two Dimensional Soft Material: New Faces of Graphene Oxide ", Accounts of Chemical Research, Vol. 45, No. 8, pp.1356-1364.

Kim T.D and Unno H. (1996), "The roles of microbes in the removal and inactivation of viruses in a biological wastewater treatment system", Water Science and Technology, Vol. 33, Issues 10-11, pp. 243-250.

Klaine S.J., Alvarez P.J.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., Mclaughlin M.J. and Lead J.R. (2008), " Nanomaterials in the environment: Behaviour, fate, bioavailability and effects", Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 27, No. 9, pp. 1825-1851.

Klein S.M. and Choi J.H., (2003), "Synthesis of rutile titania powders: Agglomeration, dissolution, and reprecipitation phenomena", Vol. 18, No. 6, pp. 1457-1464.

Krishnamoorthy K., X Veerapandian M., Zhang L.H., Yun K. and Kim S.J. (2012), "Antibacterial Efficiency of Graphene Nanosheets against Pathogenic Bacteria via Lipid Peroxidation", The Journal of Physical Chemistry, Vol. 116, pp. 17280-17287.

Kubacka A., Diez M.S., Rojo D., Bargiela R., Ciordia S., Zapico I., Albar J.P., Barbas C., Vitor A. P., Fernandez-Garcia M. and Ferrer M., (2004), "Understanding the antimicrobial mechanism of TiO₂-based nanocomposite films in a pathogenic bacterium", Scientific Reports, Vol. 4.

Kurantowicz N., Jaworski S.E., Kutwin S., Strojny M., Wierzbicki B., Szeliga M., Hotowy J., Lipinska A., Koziski L., Jagieo R., J.C. André (2015) "Interaction of graphene family materials with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*", Nanoscale Research Letters, Vol. 10 pp. 1-12.

Lau M.M. and Ingham S.C (2001), "Survival of faecal indicator bacteria in bovine manure incorporated into soil", Letters in Applied Microbiology, Vol. 33, pp. 131-136.

Lead J.R. and Wilkinson K.J. (2006), "Aquatic colloids and Nanoparticles: Current Knowledge and future trends", Environmental Chemistry, Vol.3, pp.159-171.

Lee J. and Kaletunç G (2002), "Evaluation of the Heat Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by Differential Scanning Calorimetry", Environmental Applied Microbiology, Vol. 68, pp. 5379-5386.

Levin P.A. and Angert E.R. (2015) "Small but Mighty: Cell size and bacteria", Cold Spring Harbor perspectives in biology, Vol. 7.

Levine A.D. and Asano T. (2004), "Recovering sustainable water from wastewater", Environmental Science and Technology, Vol. 38, pp. 201A-208A.

Li F., Yang C., Liu B. and Sun X., (2013), "Properties of a GO-baclofloxacin composite and its effect on bacteriostasis", Analytical letters, Vol. 46, pp. 2279-2289.

Li L., Dechesne A., He Z., Madsen J.S., Nesme J., Sørensen S.J., and Smets B.F., (2018) "Estimating the Transfer Range of Plasmids Encoding Antimicrobial Resistance in a Wastewater Treatment Plant Microbial Community", Environmental Science and Technology, Vol. 5, pp. 260-265.

Liang S., Lin H., Habteselassie M., Huang J., (2018), "Electrochemical inactivation of bacteria with a titanium sub-oxide reactive membrane", Water Research, Vol. 145, pp. 172-180.

Lipson S. M. and Stotzky G. (1983), "Adsorption of reovirus to clay minerals: Effects of cation-exchange capacity, cation saturation, and surface area", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 46, pp. 673-682.

Liu S., Zeng T.H., Hofmann M., E., Wei J., Jiang R., Kong J., and Chen Y., (2011) "Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress", ACS Nano Publications, Vol. 5, pp. 6971-6980.

Mahtab R., Rogers J.P. and Murphy C.J., (1995), " Protein-Sized Quantum Dot Luminescence Can Distinguish between "Straight", "Bent", and "Kinked" Oligonucleotides ", American Chemistry Society, Vol. 17, pp. 9099-9100.

Mai-Prochnow A., Clauson M., Hong J. and Murphy A.B. (2016) "Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma", Scientific Reports.

Manas P. and Paga R. (2004), " Microbial inactivation by new technologies of food preservation", Journal of Applied Microbiology, Vol. 98, pp. 1387-1399.

Matthess G., Pekdeger A. and Schroeter J.(1987), "Persistence and transport of bacteria and viruses in groundwater — a conceptual evaluation", Journal of Contaminant Hydrology, Vol. 2, Issue 2, pp. 171-188.

Maurer-Jones M.A, Gunsolus I.L., Murphy C.J. and Haynes C.L. (2013), "Toxicity of Engineered Nanoparticles in the Environment ", Analytical Chemistry, Vol. 85, pp. 3036-3049.

McCarthy J.F. and McKay L.D. (2004), " Colloid Transport in the Subsurface: Past, Present, and Future Challenges", Vadose Zone Journal, Vol. 3, pp.326–337.

Mills A. L., Herman J.S., Hornberger G.M. and Dejesu T.H. (1994) ,"Effect of Solution Ionic Strength and Iron Coatings on Mineral Grains on the Sorption of Bacterial Cells to Quartz Sand ", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 60, No. 9, pp. 3300-3306.

Mogyorosi K., Dekany I. and Fendler J. H., (2003), "Preparation and Characterization of Clay Mineral Intercalated Titanium Dioxide Nanoparticles ", Langmuir, Vol. 19, No. 7, pp. 2938-2946.

Murray B.E. (1990), "The life and times of the Enterococcus ", Clinical Microbiology reviews, Vol. 3, pp. 46-65.

Nam J.M., Thaxton C.S., Mirkin C.A., (2003), " Nanoparticle-Based Bio–Bar Codes for the Ultrasensitive Detection of Proteins", Science, Vol. 301, pp. 1884-1886.

Nandakumar V., Han Z., Fritz Z., Krishna V., Koopman B. and Moudgil B., (2017), " Visible Light Photocatalytic Bacterial Inactivation on Titanium Dioxide Coatings ", Original Research Paper, No. 34, pp. 234-240.

Novoselov K. S., Geim A. K., Morozov S. V., Jiang D., Zhang Y., Dubonos S. V., Grigorieva I. V., Firsov A. A., (2004), " Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films ", Reports, Vol. 306, pp. 666-669.

Nowack B. Bucheli T.D. (2007) , "Occurrence, Behaviour and effects of nanoparticles in the environment", Science Direct, Environmental pollution, Vol. 150, pp. 5-22.

Palmieri V., Lauriola M.C., Ciasca G., Conti C., Spirito M.D. and Papi M., (2017), "The grapheme oxide contradictory effects against juman pathogens", Nanotechnology, Vol. 28, pp. 18

Parka J., Choa Y.S., Sunga S.J., Byeona M., Yang S.J., Parka C.R., (2018), "Characteristics tuning of graphene-oxide-based-graphene to various end-uses ", Energy Storage Materials, Vol. 14, pp. 8-21.

Peng S., Wu D., Ge Z., Tong M. ,and Kim H. (2017) " Influence of grahene oxide on the transport and deposition behaviors of colloids in saturated porous media", Environmental Pollution, Vol. 225, pp.141-149.

Pepper I.L, Brooks J.P. and Gerba C.P. (2018), "Antibiotic Resistant Bacteria in Municipal Wastes: Is There Reason for Concern", Environmental Science and technology, Vol. 52, pp.3949-3959.

Pinheiro J.P., Domingos R. , Lopez R. , Brayner R. , Fievet F., Wilkinson K. (2006), "Determination of diffusion coefficients of nanoparticles and humic substances using scanning stripping chronopotentiometry (SSCP) ", Science Direct, Colloids and Surfaces, Vol. 295, pp. 200-208.

Reshes G, Vanounou S., Fishov I. and Feingold M. (2004), "Cell Shape Dynamics in *Escherichia coli* ", Biophysical Journal, Vol. 94, pp. 251-264.

Robert L. Tate (1978) " Cultural and Environmental Factors Affecting the Longevity of *Escherichia coli* in Histosols", Applied and Environmental Microbiology, Vol. 2, Issue 2, pp. 171-188.

Römer A., Wieler L.H and Schierack P. (2012), "Analyses of intestinal commensal *Escherichia coli* strains from wild boars suggest adaptation to conventional pig production conditions", Veterinary Microbiology, Vol. 161, pp. 122-129.

Roper M.M. and Marshall K.C.,(1978), "Effects of a Clay Mineral on Microbial Predation and Parasitism of *Escherichia coli*", Microbial Ecology, Vol. 4, pp. 279-289.

Salata O., (2004), "Applications of nanoparticles in biology and medicine", Journal of Nanobiotechnology, Vol. 2.

Sales-Ortells H. and Medema G. (2014), "Screening-Level Microbial Risk Assessment of Urban Water Locations: A Tool for Prioritization", Environmental Science and Technology, Vol. 48, pp. 9780-9789.

Sen K.T. and Khilar K.C.(2006) "Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media" Advances in Colloid and Interface Science, Vol. 119, pp. 71-96.

Shein E. V. and Devin B. A. (2007), " Current Problems in the Study of Colloidal Transport in Soil ", Eurasian Soils Science Vol. 40, No. 4, pp. 399-408.

Syngouna, V.I., and Chrysikopoulos C. V., "Transport of pathogens in water saturated sand columns, in Advances in the Research of Aquatic Environment, Vol. 2, pp. 417-425.

Taylor A.T. and Unakal G.G. (2017), "Staphylococcus aureus ", StatPearls.

The Royal Society & The Royal Academy of Engineering (2004), " Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties".

Toze S. (2004), "Pathogen survival in groundwater during artificial recharge ", Wastewater Re-use and Groundwater Quality.

Ubbink J. and Schar-Zammaratti P. (2007), "Colloidal properties and specific interactions of bacterial subsurfaces ", Current Opinion in Colloid and Interface Science, Vol. 12, pp. 263-270.

Waar K., Mei H.C, Harmsen H.J.M., Vries J., Ateman-Smit J., Degener J.E. and H.J. Busscher (2005), "Atomic force microscopy study on specificity and non-specificity of interaction forces between *Enterococcus faecalis* cells with and without aggregation", Microbiology, Vol. 151, pp. 2459-2464.

Wang L., Zhao W., O'Donoghue M.B. and TanFluorescent W. (2007), "Nanoparticles for Multiplexed Bacteria Monitoring ", *Environmental Science and Technology*, Vol. 18, pp. 297–301.

Williams P.C.M. and Berkley J.A. (2018) " Guidelines for the management of paediatric cholera infection: a systematic review of the evidence(Review)", *Paediatrics and International Child Health*, Vol. 38, pp. 16-31.

Wu J., Pisula W. and Müllen K. (2007), "Graphenes as potential material for electronics", *Environmental Science and Technology*, Vol. 107, pp 718-747.

Xin Q., Zhang X., and Lei L. (2008), " Inactivation of Bacteria in Oil-Field Reinjection Water by Pulsed Electric Field (PEF) Process ", *American Chemical Society*, Vol. 47, pp. 9644–9650.

Xing Y., Li X.,Zhang L., Xu Q., Che Z., Li W., Bai Y., Li K. (2012), " Effect of TiO₂ nanoparticles on the antibacterial and physical properties of polyethylene-based film", *Progress in Organic Coatings*, Vol. 73, pp. 219-224.

Xu S., Liao Q. and. Saiers J.E., (2008), "Straining of Nonspherical Colloids in Saturated Porous Media" *Environmental Science and Technology*, Vol. 42, pp. 771–778.

Yang S., Han X., Yang Y., Qiao H., Yu Z., Liu Y., Wang J., and Tang T. (2018), "Bacteria-Targeting Nanoparticles with Microenvironment-Responsive Antibiotic Release To Eliminate Intracellular *Staphylococcus aureus* and Associated Infection", *Environmental Science and Technology*, Vol. 17, pp. 14299–14311.

Yates M. V., Stetzenbach L.D., Gerba C.P. and Sinclair N.A. (1990), " The effect of indigenous bacteria on virus survival in ground water ", *Environmental Science and Health*, Vol. 25, pp. 81-100.

Yu Y., Wang J. and Parr J.F, (2011), " Preparation and properties of TiO₂/fumed silica composite photocatalytic materials ", *Procedia Engineering*, Vol. 27, pp 448-456.

Yue C., Kuijter R., Kaper H.J., Mei H.C., Busscher H.J., (2013), "Simultaneous interaction of bacteria and tissue cells with photocatalytically activated, anodized titanium surfaces", *Biomaterials*, Vol. 35, pp. 2580-2587.

Zhao J., Wang Z., White J.C. and Xing B. (2014), "Graphene in the Aquatic Environment: Adsorption, Dispersion, Toxicity and Transformation", *Environmental Science and Technology*, Vol. 48, pp. 9995-10009.

Zhou X. and Li Y. (2015), " Atlas of Microbiology".

Zhu C., Bao N.R., Chen S., Zhao (2016) J.N., " Antimicrobial design of titanium surface that kill sessile bacteria but support stem cells adhesion ", *Applied Surface Science*, Vol. 389, pp. 7-16.

Zischka M., Künne C.T., Blom J., Wobser D., Sakinç T., Schmidt-Hohagen K., Dabrowski P.W., Nitsche A., Hübner J., Hain T., Chakraborty T., Linke B., Goesmann A., Voget S., Daniel R., Schomburg D., Hauck R., Hafez H.M., Tielen P., Jahn D., Solheim M., Sadowy E., Larsen J., Jensen L.B, Ruiz-Garbajosa P., Pérez D.Q., Mikalsen T., Bender J., Steglich M., Nübel U., Witte W., and Werner G. (2005), "Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40", *BioMed Central Genomics*, Vol. 16, p.175.

Αραβαντινού Φ.Α. (2010), "Αδρανοποίηση και προσρόφηση ιών σε εδαφικό υλικό διαφορετικής κοκκομετρίας", Μεταπτυχιακή Διατριβή, Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πολυτεχνική Σχολή Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών.

Κουμάκη Κ., (2017), "Έλεγχος αδρανοποίησης μικροοργανισμών σε υγρά απόβλητα κατά την επεξεργασία τους και σε πιλοτική μονάδα φωτοκατάλυση", Μεταπτυχιακή Διατριβή, Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Πολυτεχνείο Κρήτης

Συγγούνα Β. (2012), " Αδρανοποίηση και Μεταφορά Βιοκολλοειδών", Διδακτορική Διατριβή, Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πολυτεχνική Σχολή Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών.

Σωτηρέλης Ν. (2014), "Μελέτη της αλληλεπίδρασης Οξειδίου γραφενίου με την άμμο", Διπλωματική εργασία, Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Σωτηρέλης Ν. (2016), "Μελέτη της αλληλεπίδρασης Οξειδίου γραφενίου και καολινίτη σε πειράματα διαλείποντος έργου και κορεσμένης στήλης", Διπλωματική εργασία, Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Χρυσικοπουλος Κ.Β 2013 Εισαγωγή στις διεργασίες καθαρισμού νερού και υγρών αποβλήτων, Εκδόσεις Τζιόλα.

Γιανναδάκης Ι.Γ. (2017), "Μελέτη προσρόφησης του οξειδίου του γραφενίου σε άμμο παρουσία του αργιλικού μοντμοριλλονίτη", Διπλωματική εργασία, Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.

Παπαϊωάννου Α. (2017), "Αλληλεπίδραση νανοσωματιδίων TiO_2 με χαλαζιακή άμμο", Διπλωματική εργασία, Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.