

ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

---

---

**«ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ  
ΣΤΗ ΣΥΜΜΕΤΑΦΟΡΑ ΒΙΟΚΟΛΛΟΕΙΔΩΝ ΣΕ  
ΚΟΡΕΣΜΕΝΑ ΠΟΡΩΔΗ ΜΕΣΑ»**

---

---

Μεταπτυχιακή Διατριβή

που υποβλήθηκε στη

Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

Από την

**ΜΑΡΙΑ Π. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ**

**Διπλωματούχο Μηχανικό Περιβάλλοντος**

ΧΑΝΙΑ,

Δεκέμβριος 2018



Technical University of Crete  
Environmental Engineering Laboratory



«ΜΕΛΕΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ  
ΣΤΗ ΣΥΜΜΕΤΑΦΟΡΑ ΒΙΟΚΟΛΛΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΚΟΡΕΣΜΕΝΑ  
ΠΟΡΩΔΗ ΜΕΣΑ»

ΜΑΡΙΑ Π. ΓΕΩΡΓΟΠΟΥΛΟΥ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

---

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΧΡΥΣΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ,  
*ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ  
ΚΡΗΤΗΣ*

ΜΕΛΗ:

ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ,  
*ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΣΧΟΛΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ*

ΤΣΑΝΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ,  
*ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΣΧΟΛΗΣ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟΥ  
ΚΡΗΤΗΣ*

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 04/12/2018

*“We, as human beings, are planners, designers, builders, and achievers. We tinker, explore, invent, and create. This is part of our genetic heritage. We are the survivors of the natural selection process of human biological evolution. Our recent brain development has propelled us into a cultural evolution that has outstripped the capacities of our physical selves. Our vital organs break down, but our brains compel us to fix them, to renovate them, and to replace them. Technology and innovation are part of our inner drives...”*

*Shaw M.W., After Barney Clark.*

*UT Press, Austin, TX, 1984,*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή με τίτλο «Μελέτη επίδρασης οξειδίου του γραφενίου στη συµµεταφορά βιοκολλοειδών σε κορεσµένα πορώδη μέσα», εκπονήθηκε στο σύνολό της στο Εργαστήριο Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης, κατά το ακαδηµαϊκό έτος 2017-2018, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Κωνσταντίνου Χρυσικόπουλου, µε σκοπό την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώµατος ειδίκευσης στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράµµατος Σπουδών «Περιβαλλοντική Μηχανική» του Πολυτεχνείου Κρήτης. Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής επιτεύχθηκε µε πολλή προσωπική προσπάθεια και συστηµατική ενασχόληση στο αντικείµενο της έρευνας. Επιθυµώ να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωσή της, και πιο συγκεκριµένα:

- ❖ Τον επιβλέποντα καθηγητή, κ. Κωνσταντίνο Χρυσικόπουλο, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό µου, για τη συνεχή επίβλεψη και καθοδήγηση, αλλά και για την υποµονή και κατανόησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.
- ❖ Τα υπόλοιπα µέλη του Εργαστηρίου Τεχνολογίας του Περιβάλλοντος (TUCeeL) και πιο συγκεκριµένα, την υπεύθυνη του εργαστηρίου, κα. Σαρίκα Ροίκα – Ευαγγελία, την Περιβαλλοντολόγο και Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια, κα. Συγγούνα Βασιλική, τον Διδάκτορα του Τμήματος Πολιτικών Μηχανικών Πάτρας, κ. Κατζουράκη Βασίλειο, την Υποψήφια Διδάκτορα της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος, κα. Φουντούλη Θεοδοσία, καθώς και τη Διπλωματούχο Μηχανικό Περιβάλλοντος Κλειώ Κουρτάκη, για την πολύτιμη βοήθεια και τη συνεργασία.
- ❖ Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια της Σχολής Μηχανικών Περιβάλλοντος, κα. Δανάη Βενίερη, καθώς και την υπεύθυνη του Εργαστηρίου Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, Οικολογίας και Βιοποικιλότητας κα. Ιωσηφίνα Γουνάκη, για τις σημαντικές συµβουλές τους, καθώς και τη βοήθεια τους στην ανάπτυξη της μικροβιολογικής µεθόδου ανάλυσης των δειγµάτων µου.
- ❖ Τους φίλους, Μαριλένα Μαρινάκη, Μαρία Αναστασάκη, Σοφία Σαρχάνη, Γιώργο Παμφίλη, Χαρίσιο Λούκα, για την στήριξη, και πάνω από όλα για την διαρκή και ουσιαστική φιλία τους.
- ❖ Τους γονείς µου, Αντωνία και Παναγιώτη, καθώς και τον αδερφό µου, Χρήστο, που πιστεύουν σε µένα και µε στήριξαν ηθικά και υλικά καθ' όλη τη φοίτησή µου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το οξείδιο του γραφενίου (GO) πρόκειται για υλικό με μεγάλη ανάπτυξη στην παραγωγή του και ευρύ φάσμα εφαρμογής, συνεπώς τεχνητά νανοσωματίδια GO ενδέχεται να εισχωρήσουν στους υπόγειους σχηματισμούς των εδαφών, όπου υπάρχουν σε αφθονία βιοκολλοειδή ανθρωπογενούς προέλευσης.

Στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εξετάζεται η επίδραση των τεχνητά κατασκευασμένων νανοσωματιδίων GO στη μεμονωμένη μεταφορά και συµμεταφορά τριών κοινών βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* και *Staphylococcus aureus*) ανθρωπογενούς προέλευσης σε κορεσμένα πορώδη μέσα. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν πειράματα ροής σε στήλη κορεσμένη με διάλυμα χαμηλής ιοντικής ισχύος και πληρωμένη με χονδρόκοκκη χαλαζιακή άμμο, με σκοπό να προσδιοριστούν τα χαρακτηριστικά της μεταφοράς των νανοσωματιδίων GO και κάθε βακτηρίου. Στη συνέχεια, διερευνήθηκαν μεταβολές στη κινητικότητα ή/και στη παρακράτηση κάθε παθογόνου μικροοργανισμού, κατά την ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO από την στήλη. Επιπρόσθετα, εκτελέστηκαν πειράματα συµμεταφοράς των βακτηρίων, παρουσία και απουσία εναιωρήματος GO, με σκοπό να διερευνηθούν τυχόν μεταβολές στη μεταφορά που δύνανται να προκληθούν λόγω αλληλεπίδρασης (πχ., συνεργιστική ή μη δράση) των τριών εξεταζόμενων βακτηρίων. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν υπό τις ίδιες υδατικές συνθήκες ( $\text{pH} = 7$ ,  $I_s = 2 \text{ mM}$ ), με αρχική συγκέντρωση μικροοργανισμών  $\sim 10^5 \text{ CFU/mL}$  και οξειδίου του γραφενίου  $20 \text{ mg/L}$ , σε θερμοκρασία περιβάλλοντος  $25^\circ\text{C}$ .

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε μοντελοποίηση μόνο των πειραματικών δεδομένων μεμονωμένης μεταφοράς των βιοκολλοειδών και των νανοσωματιδίων GO, με χρήση του λογισμικού ColloidFit. Δημιουργήθηκαν καμπύλες για την περιγραφή των πειραματικών αποτελεσμάτων μεταφοράς και συµμεταφοράς, βάσει κανονικοποιημένων συγκεντρώσεων. Ακολούθησε στατιστική ανάλυση των δεδομένων με σκοπό τον υπολογισμό των ποσοστών ανακτώμενης μάζας και των χρονικών ροών. Από τις διαφορές στα ποσοστά ανακτώμενης μάζας των βακτηρίων, κατά την παρουσία και απουσία GO, έγινε έμμεση αξιολόγηση της επίδρασης των νανοσωματιδίων GO στη βακτηριακή μεταφορά και αδρανοποίηση και ελέγχθηκε η ενδεχόμενη αντιβακτηριδιακή δράση του GO. Επιπλέον, χρησιμοποιώντας την κλασική θεωρία διήθησης (CFT), υπολογίστηκαν οι αποδόσεις των συγκρούσεων, κατά την αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων σωματιδίων με το πληρωτικό υλικό της στήλης, καθώς και οι ρυθμοί προσκόλλησης των σωματιδίων στην άμμο. Τέλος δημιουργήθηκαν τα ενεργειακά προφίλ για όλους τους πιθανούς συνδυασμούς αλληλεπίδρασης (π.χ. νανοσωματίδια GO – βακτήρια, νανοσωματίδια GO – άμμος, βακτήρια – άμμος, και βακτήριο – βακτήριο). Τα ενεργειακά προφίλ περιγραφής των διεπιφανειακών και διασωματιδιακών αλληλεπιδράσεων προέκυψαν εφαρμόζοντας τις κλασικές θεωρίες DLVO και XDLVO και χρησιμοποιώντας τις μετρημένες τιμές υδροδυναμικής διαμέτρου και ζ-δυναμικού των βακτηρίων, του GO, και της άμμου για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

## ABSTRACT

Graphene oxide (GO) is a material with rapid production growth and wide range of applications, consequently engineered GO nanoparticles may enter subsurface formations, where biocolloids of human origin are in abundance. This master thesis examines the effect of engineered GO nanoparticles on the transport and co-transport of three common bacteria (i.e., *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, and *Staphylococcus aureus*) of human origin in saturated porous media. Initially, flowthrough experiments were conducted in water-saturated columns, packed with coarse quartz sand, in order to determine the transport characteristics of GO and each individual bacterium separately. Subsequently, changes in motility and/or column retention of each pathogenic microorganism were investigated under simultaneous pumping of GO suspension. Additionally, co-transport experiments of the bacteria were performed in the presence and absence of GO suspension, in order to investigate any changes in bacterial transport that may be caused by the interaction (e.g., synergistic or non-action) of the three examined bacteria. All experiments were conducted under the same aqueous chemistry conditions ( $\text{pH} = 7$ ,  $I_s = 2 \text{ mM}$ ) and at a constant ambient temperature of  $25^\circ\text{C}$ , with an initial concentration of  $\sim 10^5 \text{ CFU/mL}$  and  $20 \text{ mg/L}$  for the biocolloids and the graphene oxide suspension, respectively.

Mathematical modeling of the experimental transport data was performed with the ColloidFit fitting software and appropriate breakthrough curves were constructed to describe the transport and co-transport experiments. Mass recovery and temporal moment calculations were also performed. The differences in the recovered mass of the bacteria breakthrough curves in the presence and absence of GO suspension were used for evaluation of the influence of GO nanoparticles on the transport behavior of bacteria, as well as for indirect evaluation of the potential inactivation capacity and potential anti-bacterial action of GO. In addition, collision efficiencies were calculated using the classical filtering theory (CFT). Finally, the interaction energy profiles between GO-bacteria, GO-quartz sand, bacteria-quartz sand, bacterium-bacterium were constructed for the given experimental conditions by applying the classical DLVO and XDLVO theories, using the measured values of hydrodynamic diameter, and z-potential values of bacteria, GO and coarse quartz sand.

## Περιεχόμενα

Εισαγωγή.....	xii
Βιβλιογραφία.....	xv
<b>1. Κολλοειδή συστήματα.....</b>	<b>1</b>
1.1 Θεωρία σταθερότητας κολλοειδών συστημάτων .....	2
1.1.1 Ηλεκτρική διπλοστοιβάδα βάσει μοντέλου Stern .....	3
1.1.2 Θεωρία DLVO.....	6
1.1.3 Εκτεταμένη θεωρία DLVO (XDLVO).....	7
1.2 Περιβαλλοντική εμφάνιση βιοκολλοειδών με έμφαση στα βακτήρια .....	9
1.2.1 Εξεταζόμενα βιοκολλοειδή .....	12
1.3 Παραγωγή, χημικές ιδιότητες και περιβαλλοντική εμφάνιση οξειδίου του γραφενίου .....	16
1.4 Διεργασίες που ελέγχουν τη μεταφορά βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων σε πορώδη μέσα .....	19
1.4.1 Μεταγωγή - υδροδυναμική διασπορά και διάχυση .....	19
1.4.2 Μηχανισμοί που ελέγχουν τη διήθηση και τη συγκράτηση των αιωρούμενων κολλοειδών .....	22
1.5 Βιολογικές διεργασίες .....	25
1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή μεταφορά και επιβίωση .....	27
1.6 Δυνητική τοξικότητα με έμφαση στην αντιμικροβιακή δράση του GO κατά την ετεροσυσσωμάτωση του με βιοκολλοειδή .....	32
Βιβλιογραφία.....	43
<b>2. Υλικά και μέθοδοι .....</b>	<b>56</b>
2.1 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (Phosphate Buffer Solution).....	56
2.2 Παρασκευή εναιωρήματος GO και δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης.....	57
2.3 Παρασκευή μικροβιακών εναιωρημάτων.....	59
2.4 Πληρωτικό υλικό στήλης .....	61
2.5 Παρασκευή τρυβλίων με θρεπτικό υλικό .....	64
2.5.1 Τρυβλία μη εκλεκτικού θρεπτικού για την παρασκευή ανακαλλιεργειών .....	64
2.5.2 Τρυβλία εκλεκτικών θρεπτικών υλικών για την ποσοτικοποίηση της μικροβιακής συγκέντρωσης των δειγμάτων .....	64
2.6 Περιγραφή πειραματικής διάταξης και πειραματικής διαδικασίας .....	65
2.7 Ηλεκτροκινητικές μετρήσεις .....	72
Βιβλιογραφία.....	75

<b>3. Προσομοίωση μεταφοράς, σύλληψης, διήθησης και εκτίμηση σταθερότητας βιοκολλοειδών &amp; GO .....</b>	<b>77</b>
3.1 Μεταφορά βιοκολλοειδών.....	77
3.2 Μεταφορά νανοσωματιδίων GO .....	80
3.3 Ανάλυση χρονικών ροπών.....	82
3.4 Εμπειρικές σχέσεις προσδιορισμού ενεργειών διεπιφανειακού δυναμικού βάσει θεωριών DLVO και XDLVO .....	83
3.4.1 Σχέσεις αλληλεπίδρασης σφαίρας – επιφάνειας βάσει DLVO.....	84
3.4.2 Σχέσεις αλληλεπίδρασης σφαίρας – σφαίρας βάσει DLVO.....	86
3.4.3 Τροποποιήσεις εμπειρικών σχέσεων βάσει εκτεταμένης θεωρίας DLVO (XDLVO) .....	88
3.5 Μαθηματική περιγραφή σύλληψης & διήθησης βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO .....	90
Βιβλιογραφία.....	94
<b>4. Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων .....</b>	<b>98</b>
4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς βιοκολλοειδών.....	98
4.2 Επίδραση βακτηρίων στη μεταφορά των νανοσωματιδίων GO.....	104
4.3 Αποτελέσματα διασωματιδιακών και διεπιφανειακών αλληλεπιδράσεων με εφαρμογή XDLVO θεωρίας.....	107
4.4 Αποτελέσματα σύλληψης και διήθησης βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO .....	114
Βιβλιογραφία.....	123
<b>5. Συμπεράσματα .....</b>	<b>126</b>
Παράρτημα I: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης δεδομένων για όλες τις πειραματικές περιπτώσεις .....	131



## Περιεχόμενα Εικόνων

<b>Εικόνα 1.1:</b> Σχηματική αναπαράσταση κολλοειδούς σωματιδίου με το διπλό στρώμα και την κατανομή ηλεκτρικού δυναμικού.....	3
<b>Εικόνα 1.2:</b> Επίδραση ιοντικής ισχύος στη ηλεκτροστατική άπωση σωματιδίων συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού τους. ....	5
<b>Εικόνα 1.3:</b> Σχηματική παράσταση ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ σωματιδίων εξαιτίας απωστικών και ελκτικών δυνάμεων ( $\Phi_H$ είναι η ενέργεια της ηλεκτροστατικής άπωσης και $\Phi_{vdw}$ είναι η ενέργεια εξαιτίας των ελκτικών δυνάμεων van der Waals). ....	5
<b>Εικόνα 1.4:</b> Σχεδιάγραμμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο σωματιδίων συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού των σωματιδίων ( $h$ ). ....	6
<b>Εικόνα 1.5:</b> Σχεδιάγραμμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο σωματιδίων συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού των σωματιδίων ( $h$ ), λαμβάνοντας υπόψη και μη-DLVO δυνάμεις.....	8
<b>Εικόνα 1.6:</b> Κυτταρική δομή (a) Gram θετικών και (b) Gram αρνητικών βακτηριακών κυττάρων. ....	12
<b>Εικόνα 1.7:</b> Απεικόνιση κυτταρικής μορφολογίας <i>S. aureus</i> (αριστερά), <i>E. faecalis</i> (κέντρο) και <i>E. coli</i> (δεξιά), μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). ....	16
<b>Εικόνα 1.8:</b> (A) Σύνθεση οξειδίου του γραφίτη με οξείδωση του γραφίτη, ακολουθούμενη από αποκόλληση των στοιβάδων προς σχηματισμό οξειδίου του γραφενίου. Το γραφένιο σχηματίζεται κατόπιν αναγωγής του οξειδίου του γραφενίου με τη χρήση κατάλληλων χημικών αντιδραστηρίων. (B) και (C): Δομή του οξειδίου του γραφενίου. ....	17
<b>Εικόνα 1.9:</b> Μηχανισμοί μεταφοράς αιωρούμενων στερεών στην επιφάνεια σφαιρικού συλλέκτη.....	22
<b>Εικόνα 1.10:</b> Σχηματική αναπαράσταση διεργασιών βακτηριακής μεταφοράς σε υπόγεια πορώδη μέσα; [1] μεταγωγή-διασπορά, [2] εξαναγκασμένη συγκράτηση, [3] προσρόφηση, [4] έμφραξη, [5] συσσώρευση. ....	23
<b>Εικόνα 1.11:</b> Μηχανισμοί κυτταρικών αλληλεπιδράσεων των νανοϋλικών με βακτηρίδια. .	33
<b>Εικόνα 1.12:</b> (Δεξιά) Διείσδυση μονοστοιβάδας γραφενίου μέσα στη φωσφολιπιδική μεμβράνη. Τα στιγμιότυπα λήφθηκαν σε χρονικά διαστήματα των 2.9, 52.4, 120.0, 299.2, 356.4, και 516.4 ns, αντίστοιχα; (Αριστερά) Στιγμιότυπα προσομοιώσεων διαδικασίας εκχύλισης λιπιδίων από φύλλο γραφενίου συνδεδεμένο στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης βακτηριακού κυττάρου <i>E. coli</i> . ....	34
<b>Εικόνα 1.13:</b> Πλάσματα AFM και εικόνες 3D κυττάρων <i>E. coli</i> μετά από 2 ώρες επώαση με απιονισμένο νερό για 2 ώρες (A, B), με ένα εναιώρημα 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ GO-0 (C, D), με ένα εναιώρημα 40 $\mu\text{g} / \text{mL}$ GO-240 (E, F). ....	35
<b>Εικόνα 1.14:</b> Απεικόνιση μηχανισμών αντιμικροβιακής δράσης των νανοσωματιδίων της οικογένειας του γραφενίου (Graphene Family Nanoparticles GFN). 1: Αρχική εναπόθεση κυττάρων βακτηρίων στις επιφάνειες των υλικών; 2: Στρες μεμβράνης που προκαλείται από άμεση επαφή με αιχμηρά άκρα 3:Οξειδωτικό στρες του βακτηριακού κυτταροπλάσματος. .	37
<b>Εικόνα 2.1:</b> Ανάδευση άμμου κατά τη διαδικασία καθαρισμού της. ....	63
<b>Εικόνα 2.2:</b> Μορφή πειραματικής διάταξης. ....	65
<b>Εικόνα 2.3:</b> Διαδικασία προσδιορισμού ογκομετρικής παροχής της στήλης, εφόσον έχει προηγηθεί, πλήρωση, κορεσμός, και χαρακτηρισμός αυτής. ....	68
<b>Εικόνα 2.4:</b> Στιγμιότυπο κατά την συλλογή δείγματος, σε φιαλίδιο erpendorf, στην έξοδο της στήλης. ....	69
<b>Εικόνα 2.5:</b> Αναπαράσταση διαδικασίας διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.. ....	70

<b>Εικόνα 2.6:</b> Απεικόνιση τρυβλίων εκλεκτικών θρεπτικών υλικών μετά την ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών (α) <i>S. aureus</i> , (b) <i>E. faecalis</i> και (c) <i>E. coli</i> .....	71
<b>Εικόνα 2.7:</b> Τεχνική DLS, όπου ο διάχυτο φως που προσπίπτει στον ανιχνευτή. ....	72
<b>Εικόνα 2.8:</b> Απεικόνιση του πειραματικού προσδιορισμού του δυναμικού ζ. ....	73
<b>Εικόνα 4.1:</b> Περίπτωση εμφάνισης ασυμμετρίας στο εξαγόμενο προφίλ συγκράτησης διηθούμενου κολλοειδούς διαλύματος. Τα κινητά σωματίδια / συσσωματώματα παρουσιάζονται σε πράσινο, ενώ τα συγκρατούμενα σωματίδια / συσσωματώματα παρουσιάζονται σε κιτρινωπό καφέ χρώμα.....	107
<b>Εικόνα 4.2:</b> Παράδειγμα διαδικασίας μοντελοποίησης της μεταφοράς του <i>E. coli</i> στο πειραματικό κορεσμένο πορώδες μέσο, με χρήση του λογισμικού ColloidFit. ....	121

## Περιεχόμενοι Πίνακες

<b>Πίνακας 2.1:</b> Χημική σύνθεση πληρωτικού υλικού στήλης. ....	62
<b>Πίνακας 3.1:</b> Σταθερές Hamaker των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων και σύνθετες σταθερές Hamaker των αλληλεπιδρώντων συστημάτων. ....	89
<b>Πίνακας 3.2:</b> Τιμές ζ-δυναμικού και διαμέτρων των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων. ....	89
<b>Πίνακας 3.3:</b> Τιμές γωνίων επάφης των εξεταζόμενων σωματιδίων με το νερό. ....	90
<b>Πίνακας 3.4:</b> Τιμές πυκνότητας των βακτηρίων και των νανοσωματιδίων GO.....	93
<b>Πίνακας 4.1:</b> Υπολογισμένες τιμές παραμέτρων πειραμάτων μεταφοράς βακτηρίων κατά την παρουσία και απουσία εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO στη κορεσμένη στήλη.....	100
<b>Πίνακας 4.2:</b> Υπολογισμένες τιμές παραμέτρων πειραμάτων συμμεταφοράς βακτηρίων κατά την παρουσία και απουσία εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO στη κορεσμένη στήλη. ....	100
<b>Πίνακας 4.3:</b> Ποσοστιαίες μεταβολές των μέσων χρόνων παραμονής και των ανακτώμενων μαζών στην εκροή της στήλης κατά τη μεταφορά και συμμεταφορά των βακτηρίων, υπό την παρουσία και απουσία νανοσωματιδίων GO.....	102
<b>Πίνακας 4.4:</b> Υπολογισμένες τιμές παραμέτρων πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO κατά την παρουσία και απουσία βακτηρίων στη κορεσμένη στήλη.....	105
<b>Πίνακας 4.5:</b> Ποσοστιαίες μεταβολές των μέσων χρόνων παραμονής και των ανακτώμενων μαζών νανοσωματιδίων GO στην εκροή της στήλης κατά την ταυτόχρονη διέλευση μικροοβιακών εναιωρημάτων διαμέσου του πορέδες μέσου. ....	106
<b>Πίνακας 4.6:</b> Υπολογισθείσες τιμές $\Phi_{\max 1}$ , $\Phi_{\min 1}$ , and $\Phi_{\min 2}$ , όλων των πιθανών συστημάτων αλληλεπίδρασης, με χρήση της θεωρία XDLVO για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (μέσο διασποράς διάλυμα PBS, pH=7, $I_s=2$ mM). ....	111
<b>Πίνακας 4.7:</b> Υπολογισθείσες τιμές $\Phi_{AB(h=h_0)}$ , όλων των πιθανών συστημάτων αλληλεπίδρασης, με χρήση της θεωρία XDLVO για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (μέσο διασποράς διάλυμα PBS, pH=7, $I_s=2$ mM). ....	112
<b>Πίνακας 4.8:</b> Τιμές παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμούς των $\alpha$ , $\eta_0$ και $k_d$ .....	114
<b>Πίνακας 4.9:</b> Τιμές των συντελεστών $\alpha$ , $\eta_0$ , $k_d$ και $k_d/\alpha$ που προέκυψαν από τους υπολογισμούς. ....	118
<b>Πίνακας 4.10:</b> Εκτιμώμενες τιμές παραμέτρων (μαζί με τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95%) που προέκυψαν από την μοντελοποίηση των πειραματικών δεδομένων μενομένης μεταφοράς των βακτηρίων <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> και των νανοσωματιδίων GO, με χρήση του λογισμικού ColloidFit. ....	121

## Εισαγωγή

Η μόλυνση επιφανειακών και υπόγειων υδάτων από παθογόνα βιοκολλοειδή, δηλαδή μικροοργανισμούς με αποτελεσματικές διαμέτρους κυμαινόμενες από δεκάδες νανόμετρα έως μερικά μικρόμετρα, που βρίσκονται υπό καθεστώς αιώρησης σε ένα κινούμενο ρευστό, παραμένει ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας, που καλούνται να αντιμετωπίσουν τόσο οι ανεπτυγμένες όσο και οι αναπτυσσόμενες χώρες.

Παρά τη μεγάλη τεχνολογική πρόοδο που έχει σημειωθεί στον τομέα των μεθόδων απολύμανσης, τυχαία ή εκ προθέσεως εισαγωγή μικροοργανισμών σε υπόγεια και επιφανειακά ύδατα δύναται να προκληθεί κυρίως από ακατάλληλη διάθεση ιλύος (π.χ. εφαρμογή χαμηλής ποιότητας ιλύος αστικών λυμάτων ως εδαφοβελτιωτικό), απόρριψη μη επαρκώς επεξεργασμένων λυμάτων, διαρροές αποχετευτικών συστημάτων, τεχνητές πρακτικές επαναφόρτισης υπογείων υδάτων, ανεξέλεγκτη αποστράγγιση από χώρους υγειονομικής ταφής, διαρροές σηπτικών δεξαμενών, καθώς και από γεωργικές και κτηνοτροφικές δραστηριότητες (Sim and Chrysikopoulos, 2000; Anders and Chrysikopoulos, 1995a; Chrysikopoulos et al., 2010; Masciopinto et al., 2008; Syngouna and Chrysikopoulos, 2011; Katzourakis and Chrysikopoulos, 2015)

Συνεπώς, η μελέτη που αποσκοπεί στην κατανόηση της περιβαλλοντικής τύχης και μεταφοράς βιοκολλοειδών ανθρωπογενούς προέλευσης σε πορώδη μέσα αποτελεί ένα ανοιχτό, επίκαιρο και μείζονος σημασίας ερευνητικό πεδίο, άμεσα σχετιζόμενο με τη διαφύλαξη της δημόσιας υγείας. Ταυτόχρονα, η κατανόηση της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς των παθογόνων συνεισφέρει σημαντικά στη βελτίωση υφιστάμενων διαδικασιών επιτόπιας απορρύπανσης μολυσμένων εδαφών, στην ανάπτυξη νέων τεχνικών, συνδεδεμένων με το τομέα της βιο-εξυγίανσης (Sayler and Ripp, 2000; Weiss et al., 2012), αλλά και στην ανάπτυξη στρατηγικών προστασίας των αποθεμάτων πόσιμου νερού (Kilb et al., 2003; Schets et al., 2005).

Για τον λόγο αυτό, τις τελευταίες δυο δεκαετίες, έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τόσο σε θεωρητικό και εργαστηριακό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο μελετών εκτεταμένης κλίμακας (πεδίο), έχει επικεντρωθεί στη διερεύνηση των φυσικο-χημικών και βιολογικών παραγόντων που δρουν αναστέλλοντας ή ενισχύοντας τη μεταφορά των βιοκολλοειδών στο υπέδαφός και σε πορώδη μέσα, με σκοπό την αποσαφήνιση των γενικών αρχών που διέπουν τη συμπεριφορά των βιοκολλοειδών σε υδατικά και εδαφικά περιβάλλοντα. Μεταξύ των παραγόντων αυτών, σημαντική επίδραση στη κινητικότητα των βιοκολλοειδών φαίνεται να έχουν το σχήμα και το μέγεθος των κόκκων του πορώδους μέσου/συλλέκτη (Syngouna and Chrysikopoulos, 2011; Martin et al., 1996; Silliman et al., 2001; Bradford et al., 2007), οι συνθήκες ροής (δηλ. ενδοπορώδης ταχύτητα) (Syngouna and Chrysikopoulos, 2011; Camesano and Logan, 1998; Hendry et al., 1999; Tan et al., 1994), η χημική σύσταση, το pH, η

ιοντική ισχύς του εκάστοτε υδατικού ή εδαφικού διαλύματος (Kim et al., 2009; Kim and Walker, 2009; Wang et al., 2011) και η συγκέντρωση του βιοκολλοειδούς στο διάλυμα (Camesano and Logan, 1998; Tan et al., 1994; Camesano et al., 1999). Ταυτόχρονα, η περιβαλλοντική συμπεριφορά ή/και επιβίωση κάθε μεμονωμένου βιοκολλοειδούς εξαρτάται άμεσα από τον τύπο του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους (Silliman et al., 2001; Walker et al., 2005; Rijnaarts et al., 1996), το μέγεθος και το σχήμα του κυττάρου (Becker et al., 2004; Fontes et al., 1991), την κινητικότητα του (Camesano and Logan, 1998; Becker et al., 2004; De Kerchove and Elimelech, 2008; Camper et al., 1993; McCaulou et al., 1995) την σταθερότητα, την ικανότητα προσρόφησης ή παρακράτησης του στο πορώδες μέσο, τη φάση ανάπτυξης στην οποία βρίσκεται ο εξεταζόμενος μικροοργανισμός (Walker et al., 2005), καθώς και το είδος των πρωτεϊνών που συνθέτουν την εξωτερική ή/και εσωτερική του μεμβράνη (π.χ. μήκος και σύνθεση μακρομορίων κυτταρικής επιφάνειας) (Abu-Lail and Camesano, 2003; Rijnaarts et al., 1996; Walker et al., 2004; Williams and Fletcher, 1996; Tong et al., 2010). Όλοι οι παραπάνω παράγοντες καθορίζουν έμμεσα και την ανθεκτικότητά του.

Επιπρόσθετα, σε πιο πρόσφατες μελέτες αποδεικνύεται πως η παρουσία επιφανειακών επιστρώσεων (surface coatings) στον πορώδη συλλέκτη (Silliman et al., 2001; Becker et al., 2004; Bolster et al., 2001), το ποσοστό και το είδος της οργανικής ουσίας του εδάφους (NOM) (Yang et al., 2012a), το είδος και η συγκέντρωση αργιλικών σωματιδίων στο έδαφος (Yang et al., 2012b; Vasiliadou and Chrysikopoulos, 2011; Vasiliadou et al., 2011), καθώς και η παρουσία μεταλλικών ιόντων στο εδαφικό διάλυμα (Kapetas et al., 2012) είναι παράγοντες που διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο στην περιβαλλοντική μεταφορά και εναπόθεση των βιοκολλοειδών.

Από τα παραπάνω είναι εμφανές ότι το μεγαλύτερο μέρος των μελετών έχει εστιάσει στην κατανόηση της επίδρασης μεμονωμένων παραμέτρων στην μεταφορά των βιοκολλοειδών, ενώ αρκετά λιγότερες δημοσιευμένες μελέτες στοχεύουν στην διερεύνηση του τρόπου αλληλεπίδρασης μεταξύ βιοκολλοειδών και άλλων κολλοειδών σωματιδίων σε κορεσμένα μέσα. Εντούτοις, το έδαφος, τα ιζήματα και τα υπόγεια ύδατα εξυπηρετούν ως τελικοί αποδέκτες κολλοειδών σωματιδίων διαφόρων πηγών προέλευσης (Richardson and Ternes, 2011). Για παράδειγμα, τα τελευταία χρόνια η ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας οδήγησε στην εισαγωγή τεχνητών νανοϋλικών και νανοσωματιδίων στο περιβάλλον, τα οποία τουλάχιστον θεωρητικά, εμπίπτουν στην κατηγορία των κολλοειδών συστημάτων.

Πιο συγκεκριμένα, ως νανοϋλικό ορίζεται ένα φυσικό, τυχαίο ή κατασκευασμένο υλικό που περιέχει σωματίδια σε αδέσμευτη ή συσσωματωμένη κατάσταση, τα οποία σε ποσοστό 50% ή μεγαλύτερο της συνολικής κατανομής μεγέθους σωματιδίων του υλικού, διαθέτουν μια ή περισσότερες από τις εξωτερικές διαστάσεις τους στην περιοχή μεγέθους μεταξύ 1-100 nm (2011/696/EU). Τα σωματίδια αυτά εμφανίζουν πρωτότυπες φυσικοχημικές (π.χ. καλά καθορισμένες διαστάσεις, υψηλότερη αναλογία πλάτους προς ύψος, μεγάλη ειδική επιφάνεια, υψηλό πορώδες), ηλεκτρικές, θερμικές και οπτικές ιδιότητες και λειτουργίες οφειλόμενες στο μέγεθος, στο σχήμα ή στη σύνθεσή τους.

Λόγω των παραπάνω πλεονεκτημάτων, τα νανοϋλικά βρίσκουν σήμερα εφαρμογή σε ένα ευρύ φάσμα τομέων συμπεριλαμβανομένων αυτών της ενέργειας (π.χ. παραγωγή, κατάλυση, αποθήκευση), των συνθετικών και ενισχυμένων υλικών (π.χ. λιπαντικά, χρώματα, ελαστικά, αθλητικά είδη), της αεροδιαστημικής, της ηλεκτρονικής (π.χ. οθόνες, πλακέτες), των οπτικών συστημάτων, της περιβαλλοντικής αποκατάστασης (π.χ. διήθηση νερού, απολύμανση, νανο-παρασιτοκτόνα), των τροφίμων, των καλλυντικών και των φαρμάκων (Yang et al., 2013; Mauter et al., 2018; Mauter and Elimelech, 2008; Armentano et al., 2010; Baur and Silverman, 2007; Sahithi et al., 2010). Συνεπώς, η πιθανότητα απελευθέρωσης νανοςωματιδίων, μέσω διεργασιών καύσης (Farre et al., 2011), μέσω απόπλυσης από εμπορικά προϊόντα, αγροτικές περιοχές, αστικά και βιομηχανικά απόβλητα και μέσω απορροών ομβρίων υδάτων και η επακόλουθη είσοδός του στο περιβάλλον (νερό / υπόγεια ύδατα, ιζήματα και έδαφος), θεωρείται προφανής και αναπόφευκτη (Nowack and Bucheli, 2007; Petersen et al., 2011; Georgopoulou and Chrysikopoulos, 2018).

Ωστόσο, τα νανοςωματίδια συγκαταλέγονται σε μια νέα κατηγορία περιβαλλοντικά επιβλαβών ουσιών γνωστών ως «αναδυόμενοι ρύποι προτεραιότητας», η ανίχνευση των οποίων πραγματοποιήθηκε πρόσφατα (τελευταία 20 χρόνια) σε φυσικά περιβάλλοντα, λόγω της βελτιστοποίησης παλαιότερων μεθόδων ανίχνευσης και της ανάπτυξης νέων τεχνικών προσδιορισμού – ανάλυσης ιχνοποσοτήτων. Ως εκ τούτου, μέχρι πρότινος δεν είχαν κατηγοριοποιηθεί (Georgopoulou and Chrysikopoulos, 2018). Επιπλέον, η πρόβλεψη της περιβαλλοντικής τους δράσης καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολη.

Οι θεμελιώδεις ιδιότητες και οι μηχανισμοί που επηρεάζουν την περιβαλλοντική τύχη και διάδοσή τους, καθώς και οι εικαζόμενες δυσμενείς οικολογικές επιπτώσεις που δύνανται να προκαλέσουν δεν έχουν διερευνηθεί και κατανοηθεί πλήρως (Nowack and Bucheli, 2007). Ο βιοχημικός κύκλος των νανοϋλικών μπορεί να περιλαμβάνει φωτοχημικές αντιδράσεις στην ατμόσφαιρα, συσσωμάτωση, απορρόφηση, συσσώρευση, μετάλλαξη και αποικοδόμηση τους στους οργανισμούς. Λόγω τους μικρού μεγέθους τους, η μεταφορά τους σε μεγάλες αποστάσεις μέσω της ατμόσφαιρας και του υπεδάφους θεωρείται πιθανή. Ομοίως με την περίπτωση των κοινών κολλοειδών/βιοκολλοειδών συστημάτων, η περιβαλλοντική συμπεριφορά (δηλ. προσρόφηση, εναπόθεση, μεταφορά) των νανοςωματιδίων επηρεάζεται από τις ίδιες φυσικοχημικές παραμέτρους. Ταυτόχρονα όμως επηρεάζεται και από το βαθμό διαλυτότητας, την υδροφοβικότητα ή υδροφιλικότητα, το είδος επιφανειακής τροποποίησης/επεξεργασίας που πιθανόν έχουν δεχθεί (δηλ. την ύπαρξη ή μη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνειά τους), την τάση συσσωμάτωσης που εκδηλώνουν στην υδατική φάση, και το βαθμό μετατροπής τους από τη «παρθένα» ή «κατασκευασμένη» αρχική μορφή τους σε περισσότερο σύνθετα σωματίδια, με ιδιότητες πιθανώς διαφορετικές από αυτές της αρχικής τους κατάστασης (Lin et al., 2010)

Παράλληλα, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νανοςωματιδίων και φυσικών βιοκολλοειδών (π.χ. βακτηρίων) δεν έχουν μελετηθεί διεξοδικά. Τα πορίσματα των υπαρχόντων μελετών συμμεταφοράς υποδεικνύουν σημαντική επίδραση του ενός είδους κολλοειδούς στη περιβαλλοντική συμπεριφορά του άλλου, και αντιστρόφως.

Επιπλέον, κατά την αλληλεπίδρασή τους, θεωρείται πιθανή η επικράτηση μηχανισμών (π.χ. ομοσυσσωμάτωση και ετεροσυσσωμάτωση) των οποίων η δράση δεν έχει ως σήμερα αποσαφηνιστεί πλήρως (Yang et al., 2013; Gentile et al., 2016).

Τα τεχνητά νανοσωματίδια, αν και συχνά απαντώνται ενσωματωμένα σε μια μήτρα που εμποδίζει την άμεση επαφή τους με οργανισμούς σε περίπτωση περιβαλλοντικής απελευθέρωσης, παρόλα αυτά πορίσματα μελετών τοξικότητας υπέδειξαν τάση απορρόφησής τους από έμβιους οργανισμούς και βιοσυσσώρευσής τους σε αυτούς. Παράλληλα, άλλες μελέτες υποδεικνύουν πως ορισμένες κατηγορίες νανοσωματιδίων, όπως τα ανθρακικά (carbon-based nanoparticles), εμφανίζουν υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες αντιμικροβιακές ιδιότητες, χαράζοντας νέες κατευθύνσεις αναφορικά με την ελεγχόμενη χρήση της νανοτεχνολογίας (Gentile et al., 2016; Hassouna et al., 2017; Dijaz et al., 2015; Al-Jumaili et al., 2017; Maas, 2016).

Βάσει των παραπάνω καθίσταται αναγκαίο να διερευνηθεί περισσότερο ο τρόπος που επιδρούν τα νανοσωματίδια στη συµμεταφορά βιοκολλοειδών στο έδαφος. Προς την κατεύθυνση αυτή, στη παρούσα εργασία επιλέχθηκε να μελετηθεί η επίδραση νανοσωματιδίων οξειδίου του γραφενίου, υπό μορφή εναιωρήματος, στη μεμονομένη μεταφορά αλλά και ταυτόχρονη μεταφορά τριών κοινών βακτηριακών στελεχών (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) ανθρωπογενούς προέλευσης. Τα συγκεκριμένα βακτήρια απαντώνται συχνά στο έδαφος, καθώς και σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα και λειτουργούν ως δείκτες ρύπανσης κοπρανώδους προέλευσης.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

Abu-Lail, N. I.; Camesano, T. A. The role of lipopolysaccharides in the adhesion, retention, and transport of *Escherichia coli* JM109. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 2173–83.

Al-Jumaili, A.; Alancherry, S.; Bazaka, K.; Jacob, M. V. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials* **2017**, *10*, 1066.

Anders, R.; Chrysikopoulos, C.V. Virus fate and transport during artificial recharge with recycled water. *Water Resour. Res.* **1995a**, *41* (10), W10415.

Armentano, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95* (11), 2126-2146.

Baur, J.; Silverman, E. Challenges and opportunities in multifunctional nanocomposite structures for aerospace applications. *MRS Bull.* **2007**, *32* (4), 328-334.

Becker, M. W.; Collins, S. A.; Metge, D. W.; Harvey, R. W.; Shapiro, A. M. Effect of cell physicochemical characteristics and motility on bacterial transport in groundwater. *J. Contam. Hydrol.* **2004**, *69*, 195-213.

Bolster, C. H.; Mills, A. L.; Hornberger, G.; Herman, J. Effect of surface coatings, grain size, and ionic strength on the maximum attainable coverage of bacteria on sand surfaces. *J. Contam. Hydrol.* **2001**, *50*, 287-305.

Bradford, S. A.; Torkzaban, S.; Walker, S. L. Coupling of physical and chemical mechanisms of colloid straining in saturated porous media. *Water Res.* **2007**, *41* (13), 3012-3024.

Camesano, T. A.; Logan, B. E. Influence of fluid velocity and cell concentration on the transport of motile and nonmotile bacteria in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32* (11), 1699-1708.

Camesano, T. A.; Unice, K. M.; Logan, B.E. Blocking and ripening of colloids in porous media and their implications for bacterial transport. *Colloid. Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **1999**, *160*, 291-308.

Camper, A. K.; Hayes, J. T.; Sturman, P. J.; Jones, W. L.; Cunningham, A. B. Effects of motility and adsorption rate coefficient on transport of bacteria through saturated porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1993**, *59*, 3455-3462.

Chrysikopoulos, C.V.; Masciopinto, C.; La Mantia, R.; Manariotis, I.D. Removal of biocolloids suspended in reclaimed wastewater by injection in a fractured aquifer model. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44*, 971-977.

De Kerchove, A. J.; Elimelech, M. Bacterial swimming motility enhances cell deposition and surface coverage. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (12), 4371-4377.

Dijaz, S. M.; Mennati, A.; Jafari, S.; Khezri, K.; Adibkia, K. Antimicrobial activity of carbon-based nanoparticles. *Adv. Pharm. Bull.* **2015**, *5* (1), 19-23.

Farre, M.; Sanchis, J.; Barcelo, D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *TrAC Trends in Analyt. Chem.* **2011**, *30* (3), 517-527.

Fontes, D. E.; Mills, A.L.; Hornberger, G.; Herman, J.S. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2473-2481.

Gentile, G. J.; Fidalgo De Cortalezzi, M. M. Enhanced retention of bacteria by TiO<sub>2</sub> nanoparticles in saturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* **2016**, *191*, 66-75.

Georgopoulou, M.P.; Chrysikopoulos, C.V. Evaluation of carbon nanotubes and quartz sand for the removal of Formaldehyde-(2,4-Dinitrophenylhydrazine) from aqueous solutions. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2018**. doi: 10.1021/acs.iecr.8b03996.

Hassouna, M. E. M.; ElBably, M. A.; Mohammed, A. N.; Nasser, M. A. G. Assessment of carbon nanotubes and silver nanoparticles loaded clays as adsorbents for removal of bacterial contaminants from water sources. *J. Water Health* **2017**, *15* (1), 133-144.

Hendry, M. J.; Lawrence, J. R.; Maloszewski, P. Effects of velocity on the transport of two bacteria through saturated sand. *Ground Water* **1999**, *37*, 103-113.

Kapetas, L.; Ngwenya, B. T.; MacDonald, A. M.; Elphick, S. C. Thermodynamic and kinetic controls on cotransport of *Pantoea agglomerans* cells and Zn through clean and iron oxide coated sand columns. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (24), 13193-13201.

Katzourakis, V. E.; Chrysikopoulos, C. V. Modeling dense-colloid and virus cotransport in three-dimensional porous media. *J. Contam. Hydrol.* **2015**, *181*, 102-113.

Kilb, B.; Lange, B.; Schaule, G.; Flemming, H. C.; Wingender, J. Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **2003**, *206* (6), 563-573.

Kim, H. N.; Bradford, S. A.; Walker, S. L. Escherichia coli O157:H7 transport in saturated porous media: Role of solution chemistry and surface macromolecules. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43* (12), 4340-4347.

Kim, H. N.; Walker, S. L. Escherichia coli transport in porous media: Influence of cell strain, solution chemistry, and temperature. *Colloids Surf. B* **2009**, *71* (1), 160-167.



- Lin, D.; Tian, X.; Wu, F.; Xing, B. Fate and transport of engineered nanomaterials in the environment. *J. Environ. Qual.* **2010**, *39*, 1-13.
- Maas, M. Carbon nanomaterials as antibacterial colloids. *Materials* **2016**, *9*, 617.
- Martin, M.J.; Logan, B.E.; Johnson, W.P.; Jewett, D.G.; Arnold, R.G. Scaling bacterial filtration rates in different sized porous media. *J. Environ. Eng—ASCE* **1996**, *122*, 407-415.
- Masciopinto C., La Mantia R. and Chrysikopoulos C.V. Fate and transport of pathogens in a fractured aquifer in the Salento area, Italy. *Water Resour. Res.* **2008**, *44*, W01404. doi: 10.1029/2006WR005643.
- Mauter, M. S.; Elimelech, M. Environmental applications of carbon-based nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (16), 5843-5859.
- Mauter, M. S.; Zucker, I.; Perreault, F.; Werber, J. R.; Kim J-H.; Elimelech, M. The role of nanotechnology in tackling global water challenges. *Nat. Sustain.* **2018**, *1*, 166-175.
- McCaulou, D. R.; Bales, R. C.; Arnold, R. G. Effect of temperature controlled motility on transport of bacteria and microspheres through saturated sediment. *Water Resour. Res.* **1995**, *31*, 271-280.
- Nowack, B.; Bucheli, T.D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* **2007**, *150* (1), 5-22.
- Official Web Site of European Union. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=EN> (accessed August 26, 2018)
- Petersen, E. J.; Zhang, L. W.; Mattison, N. T.; O'Carroll, D. M.; Whelton, A. J.; Uddin, N.; Nguyen, T.; Huang, Q. G.; Henry, T. B.; Holbrook, R. D.; Chen, K. L. Potential release pathways, environmental fate, and ecological risks of carbon nanotubes. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (23), 9837-9856.
- Richardson, S.D.; Ternes, T.A. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4614-4648.
- Rijnaarts, H. H. M.; Norde, W.; Bouwer, E. J.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J. B. Bacterial deposition in porous media related to the clean bed collision efficiency and to substratum blocking by attached cells. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 2869-2876.
- Rijnaarts, H. H. M.; Norde, W.; Bouwer, E. J.; Lyklema, J.; Zehnder, A. J. B. Bacterial deposition in porous media: effects of cell-coating, substratum hydrophobicity, and electrolyte concentration. *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 2877-2883.
- Sahithi, K.; Swetha, M.; Ramasamy, K.; Srinivasan, N.; Selyamurugan, N. Polymeric composites containing carbon nanotubes for bone tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *46* (3), 281-283.
- Sayler, G. S.; Ripp, S. Field applications of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2000**, *11* (3), 286-289.
- Schets, F. M.; During, M.; Italiaander, R.; Heijnen, L.; Rutjes, S. A.; van der Zwaluw, W. K.; Husman, A. M. D. Escherichia coli O157:H7 in drinking water from private water supplies in the Netherlands. *Water Res.* **2005**, *39* (18), 4485-4493.
- Silliman, S.E.; Dunlap, R.; Fletcher, M.; Schneegurt, M. A. Bacterial transport in heterogeneous porous media: observations from laboratory experiments. *Water Resour. Res.* **2001**, *37*, 2699-2707.
- Sim, Y.; Chrysikopoulos, C.V. Virus transport in unsaturated porous media. *Water Resour. Res.* **2000**, *36*, 173-179.
- Syngouna, V. I.; Chrysikopoulos, C. V. Transport of biocolloids in water saturated columns packed with sand: Effect of grain size and pore water velocity. *J. Contam. Hydrol.* **2011**, *126* (3-4), 301-314.
- Tan, Y.; Gannon, J. T.; Baveye, P.; Alexander, M. Transport of bacteria in an aquifer sand: experiments and model simulations. *Water Resour. Res.* **1994**, *30*, 3243-3252.

Tong, M. P.; Long, G. Y.; Jiang, X. J.; Kim, H. N. Contribution of extracellular polymeric substances on representative Gram negative and Gram positive bacterial deposition in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (7), 2393-2399.

Vasiliadou, I. A.; Chrysikopoulos, C. V. Cotransport of *Pseudomonas putida* and kaolinite particles through water-saturated columns packed with glass beads. *Water Resour. Res.* **2011**, *47*, W02543.

Vasiliadou, I. A.; Papoulis, D.; Chrysikopoulos, C. V.; Panagiotaras, D.; Karakosta, E.; Fardis, M.; Papavassiliou, G. Attachment of *Pseudomonas putida* onto differently structured kaolinite minerals: A combined ATR-FTIR and <sup>1</sup>H NMR study. *Colloids Surf. B* **2011**, *84* (2), 354-359.

Walker, S. L.; Redman, J. A.; Elimelech, M. Influence of growth phase on bacterial deposition: Interaction mechanisms in packed-bed column and radial stagnation point flow systems. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (17), 6405-6411.

Walker, S. L.; Redman, J.A.; Elimelech, M. Role of cell surface lipopolysaccharides (LPS) in *Escherichia coli* K12 adhesion and transport. *Langmuir* **2004**, *20*, 7736-7746.

Wang, L. X.; Xu, S. P.; Li, J. Effects of phosphate on the transport of *Escherichia coli* O157:H7 in saturated quartz sand. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (22), 9566-9573.

Weiss, W. J.; Bouwer, E. J.; Aboytes, R.; LeChevallier, M. W.; O'Melia, C. R.; Le, B. T.; Schwab, K. J. River filtration for control of microorganisms results from field monitoring. *Water Res.* **2005**, *39* (10), 1990-2001.

Williams, V.; Fletcher, M. *Pseudomonas fluorescens* adhesion and transport through porous media are affected by lipopolysaccharide composition. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 100-104.

Yang, H. Y.; Kim, H.; Tong, M. P. Influence of humic acid on the transport behavior of bacteria in quartz sand. *Colloids Surf. B* **2012a**, *91*, 122-129.

Yang, H. Y.; Tong, M. P.; Kim, H. Influence of bentonite particles on representative Gram negative and Gram positive bacterial deposition in porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2012b**, *46* (21), 11627-11634.

Yang, H.; Tong, M.; Kim, H. Effect of carbon nanotubes on the transport and retention of bacteria in saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 11537-11544.

# *Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>*

## 1. Κolloειδή συστήματα

Ο όρος *κolloειδή συστήματα* χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη κατηγορία των υλικών μεταξύ των καθαρών συστατικών και των μοριακά διασπαρμένων συστημάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα κolloειδή συστήματα αποτελούνται από μια διασπαρμένη ή ασυνεχή φάση, σε κατάσταση λεπτού διαμερισμού, η οποία είναι κατανεμημένη ομοιόμορφα σε ένα μέσο διασποράς (συνεχή φάση). Τόσο η συνεχής, όσο και η ασυνεχής φάση μπορεί να είναι στερεή, υγρή ή αέρια (Παναγιώτου, 1998). Ανάλογα με τη φυσική κατάσταση των αναμειγνυόμενων ουσιών, διαφορετικά είδη κolloειδών (π.χ. αφρός, λύμα, στερεό λύμα, αερόλυμα, γαλάκτωμα, πηκτή) μπορούν να προκύψουν από διάφορους πιθανούς συνδυασμούς. Εξαίρεση αποτελεί ο συνδυασμός αέριου – αέριου, που δεν οδηγεί στο σχηματισμό κolloειδούς συστήματος, διότι τα αέρια είναι πλήρως αναμειζίμα. Ο όρος *κolloειδή σωματίδια* αναφέρεται σε σωματίδια κυμαινόμενης διαμέτρου από 1 nm έως 10μm, τα οποία αποτελούν τη διασπαρμένη φάση του κolloειδούς συστήματος (Sim and Chrysikopoulos, 2000).

Τα χαρακτηριστικά των κolloειδών συστημάτων διαφέρουν σε μεγάλο βαθμό από τα αντίστοιχα των μοριακών διαλυμάτων, αλλά όταν οι διαστάσεις της διασπαρμένης φάσης είναι  $< 1$  nm, τότε η κolloειδής συμπεριφορά ταυτίζεται με εκείνη των μοριακών διαλυμάτων. Τα κolloειδή διαλύματα είναι συνήθως θολά και άχρωμα, ωστόσο το μέγεθος των αιωρούμενων σωματιδίων τους βρίσκει στην ίδια τάξη μεγέθους με το μήκος κύματος του φωτός, με αποτέλεσμα όταν προσπίπτει πάνω τους λευκό φως να εκδηλώνουν το φαινόμενο Tyndall (σκέδαση ακτίνας λευκού φωτός σε μια γαλάζια ακτίνα υπό ορθή γωνία). Επίσης, εκδηλώνουν το φαινόμενο του πολυχρωισμού, δηλαδή δίνουν την εντύπωση ότι είναι πολύχρωμα, όταν μια λευκή δέσμη φωτός πέσει παράλληλα στο διάλυμα, γεγονός που οφείλεται στο σκεδασμό του φωτός λόγω της περίθλασής του στα σωματίδια (Ebbing and Gamman, 2011). Μια ακόμα σημαντική ιδιότητα των κolloειδών σωματιδίων είναι, πως παρά τις μικρές διαστάσεις τους, έχουν μεγάλη προσροφητική ικανότητα, λόγω μεγάλης ειδικής επιφάνειας, με αποτέλεσμα να συγκρατούν στην επιφάνειά τους μόρια και άτομα άλλων ουσιών. Επιπρόσθετα, τα κolloειδή σωματίδια έχουν μικρή ρευστότητα (μεγάλο ιξώδες), και κατανέμονται δυσκολότερα στην ασυνεχή φάση σε σχέση με άλλα μόρια, λόγω μικρότερης ταχύτητα διάχυσης.

Τόσο τα γηγενή/φυσικά όσο και τα ετερόχθονα κolloειδή σωματίδια που απαντώνται στα συστήματα υπογείων υδάτων διακρίνονται σε οργανικά (π.χ. ιλύς, χουμικές και φουλβικές ενώσεις, μακρομοριακά συστατικά οργανικής ύλης), ανόργανα γεωκolloειδή (π.χ. αργιλοπηριτικά ορυκτά, ίνες αμιάντου, αποσαθρωμένα ιζήματα, οξείδια σιδήρου, αλουμινίου, ασβεστίου, μαγγανίου και αργιλίου, πυριτικά άλατα, ανθρακικά άλατα, φωσφορικά άλατα, υδροξείδια, θραύσματα πετρωμάτων), ενώ μπορεί να έχουν βιολογική προέλευση (Sen and Khilar, 2006; McCarthy and McCay,

2004; Baalousha, 2007). Όσον αφορά στα νανοσωματίδια, λόγω της τάξης μεγέθους τους, θεωρείται πως εμπίπτουν στην κατηγορία των κολλοειδών σωματιδίων. Πιο συγκεκριμένα, οι ιδιότητες κολλοειδούς χαρακτήρα εμφανίζονται όταν οι διαστάσεις της διασπαρμένης φάσης κυμαίνονται μεταξύ 1 και 1000 nm. Συνεπώς, εναιωρήματα νανοσωματιδίων θα μπορούσαν, δυνητικά, να αντιμετωπιστούν ως κολλοειδή συστήματα.

### 1.1 Θεωρία σταθερότητας κολλοειδών συστημάτων

Οι δυνάμεις που επιδρούν μεταξύ των κολλοειδών είναι δυνάμεις ηλεκτροστατικού τύπου, *Van der Waals*, και *θερμικής κίνησης Brown*, οφειλόμενες στις τυχαίες συγκρούσεις των μορίων του μέσου διασποράς με τα αιωρούμενα κολλοειδή σωματίδια. Σημειώνεται ότι οι *δυνάμεις βαρύτητας* συνήθως θεωρούνται αμελητέες, λόγω του ότι η μάζα των κολλοειδών σωματιδίων είναι πολύ μικρή (Χρυσικόπουλος, 2014).

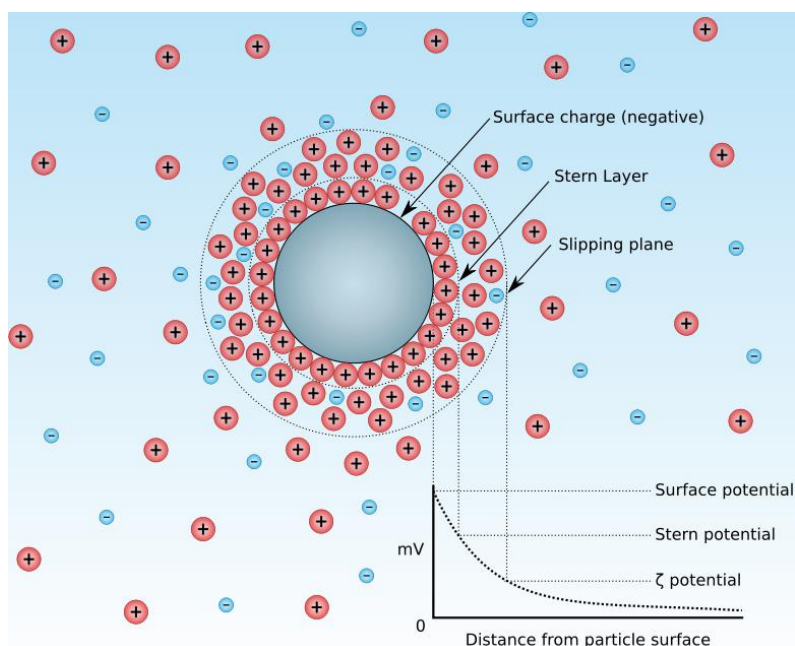
Στην ευρύτερη κατηγορία των δυνάμεων van der Waals περιλαμβάνονται οι ασθενείς ελκτικές διαμοριακές δυνάμεις διπόλου-διπόλου, διπόλου εξ επαγωγής και London. Οι ελκτικές διαμοριακές *δυνάμεις διπόλου-διπόλου* προκύπτουν από την τάση των πολικών μορίων (δηλ. μορίων με ανομοιόμορφη κατανομή φορτίου) να ευθυγραμμίζονται, έτσι ώστε το θετικό άκρο ενός μορίου να είναι κοντά στο αρνητικό άκρο ενός άλλου μορίου. Οι ελκτικές διαμοριακές *δυνάμεις διπόλου εξ επαγωγής* προκύπτουν όταν το ηλεκτρικό πεδίο ενός διπόλου επιδρά σ' ένα δεύτερο γειτονικό άτομο, με αποτέλεσμα να προκαλεί πόλωση από επαγωγή. Οι ασθενείς *δυνάμεις London*, που είναι γνωστές και ως δυνάμεις διασποράς, προκύπτουν από τα στιγμιαία δίπολα που δημιουργούνται σε όλα τα μόρια, λόγω της κίνησης των ηλεκτρονίων γύρω από τους πυρήνες, με αποτέλεσμα τη στιγμιαία ανομοιόμορφη κατανομή φορτίου.

Τα κολλοειδή σωματίδια εκτελούν κινήσεις ακαθόριστης κατεύθυνσης (zig-zag) και οι επιφανειακές δυνάμεις που τους ασκούνται είναι ανάλογες της συχνότητας των συγκρούσεων και της ταχύτητας των συγκρουόμενων μορίων του μέσου διασποράς (Παναγιώτου, 1998). Είναι προφανές ότι σε πυκνότερα μέσα διασποράς, πραγματοποιούνται συγκρούσεις μεταξύ των μορίων και των κολλοειδών σε μεγαλύτερη συχνότητα. Χαρακτηριστικότερα, λόγω των αλληλεπιδράσεων συγκρούσεων, στην επιφάνεια των κολλοειδών ασκούνται πολλαπλές, μη εξισορροπημένες δυνάμεις, με αποτέλεσμα η συνισταμένη δύναμη να μεταβάλλεται τυχαία και απρόβλεπτα. Αξίζει να σημειωθεί ότι αν και μακροσκοπικά η μέση πυκνότητα ενός υγρού μέσου διασποράς θεωρείται ότι παραμένει σταθερή, σε μικροσκοπική κλίμακα μεταβάλλεται διαρκώς, οδηγώντας το αιωρούμενο σωματίδιο σε άτακτες κινήσεις. Η σταθερότητα κάθε κολλοειδούς συστήματος εξαρτάται από τη φύση της διασωματιδιακής αλληλεπίδρασης κατ' αυτές τις συγκρούσεις (Παναγιώτου, 1998).

Όταν το μέσο διασποράς είναι νερό, τα κολλοειδή ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με τη τάση τους να διαλύονται στην υγρή φάση και τη σταθερότητα τους. Πιο συγκεκριμένα, χαρακτηρίζονται ως *υδρόφιλα/λυόφιλα*, όταν εμφανίζουν ισχυρή έλξη με το νερό (π.χ. ανάπτυξη δυνάμεων London ή δεσμών υδρογόνου), σχηματίζοντας ομογενή κολλοειδή διαλύματα, τα οποία δεν επηρεάζονται ιδιαίτερα από την παρουσία αλάτων και διακρίνονται από μεγάλη σταθερότητα. Αντίθετα, χαρακτηρίζονται ως *λυόφοβα/υδρόφοβα* όταν δημιουργούν μικρο – ετερογενή συστήματα, ιδιαίτερα ασταθή. Στην περίπτωση αυτή τα κολλοειδή δεν συγκρατούν στην επιφάνεια τους μόρια νερού αλλά αλληλεπιδρούν με τα αντίθετα φορτισμένα ιόντα της υδατικής φάσης, σχηματίζοντας γύρω από την επιφάνειά τους μια ηλεκτρική διπλή στοιβάδα (Εικόνα 1.1) με αποτέλεσμα να επικρατούν απωθητικές δυνάμεις μεταξύ τους. Στην τρίτη κατηγορία κολλοειδών συστημάτων ανήκουν τα κολλοειδή *συναρμογής/σύζευξης*. Πρόκειται για σωματίδια μεγέθους κολλοειδούς που σχηματίζονται στο νερό από τη σύζευξη μορίων ή ιόντων καθένα από τα οποία έχει ένα υδρόφοβο και ένα υδρόφιλο άκρο. Τα μόρια αυτά συμπλοκοποιούνται, σχηματίζοντας μικκύλια τα οποία καθιζάνουν στο εναιώρημα (Ebbing and Gamman, 2011).

### 1.1.1 Ηλεκτρική διπλοστοιβάδα βάσει μοντέλου Stern

Σε φυσικά υδατικά δείγματα, κάθε κολλοειδές σωματίδιο φέρει σταθερά φορτία επιφανείας (συνήθως αρνητικά), τα οποία περιβάλλονται από αντιθέτως φορτισμένα ιόντα της υδατικής φάσης.



Εικόνα 1.1: Σχηματική αναπαράσταση κολλοειδούς σωματιδίου με το διπλό στρώμα και την κατανομή ηλεκτρικού δυναμικού. (Πηγή: <https://www.slideshare.net/venkidshvenks/electrical-double-layer>, accessed November 19, 2018)

Γενικά έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα περιγραφής της ηλεκτρικής στοιβάδας (Electrical Double Layer/EDL) των σωματιδίων (π.χ. μοντέλο Helmholtz (1853), Gouy-Chapman (1910), Stern (1924), Grahame (1947), Bockris/Devanathan/Müller (BDM) (1963), Trasatti/Buzzanca (1971), Conway (1975-1980), Marcus (1992)). Ωστόσο, το μοντέλο Stern είναι το πιο διαδεδομένο έως σήμερα. Βάσει του μοντέλου Stern, τα σταθερά επιφανειακά φορτία των κολλοειδών σωματιδίων περιβάλλονται από μια διπλοστοιβάδα, η οποία χωρίζεται σε ένα εσωτερικό και ένα εξωτερικό μέρος, μέσω του διαχωριστικού επιπέδου Stern. Το επίπεδο αυτό είναι τοποθετημένο παράλληλα προς την επιφάνεια του σωματιδίου και σε απόσταση περίπου ίση με την ακτίνα των ενυδατωμένων ιόντων.

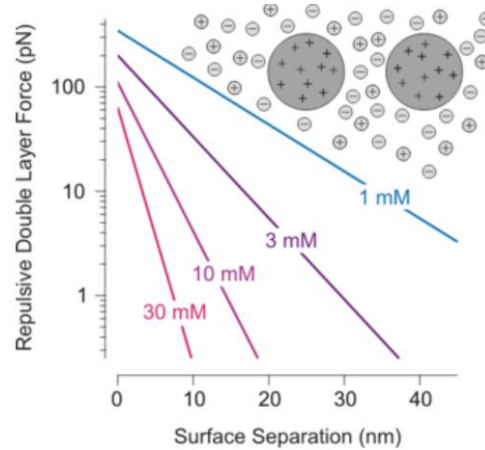
Στην Εικόνα 1.1 παρατηρείται ότι το στρώμα Stern αποτελείται από μια σταθερή στοιβάδα «ειδικά προσροφημένων» και αντιθέτως φορτισμένων ιόντων (counter ions) σε σχέση με το επιφανειακό φορτίο του κολλοειδούς. Τα ιόντα αυτά είναι, έστω και παροδικά, προσκολλημένα στην επιφάνεια με ηλεκτροστατικές δυνάμεις, οι οποίες είναι αρκετά ισχυρές, ώστε να υπερνικούν τη θερμική κίνηση Brown, η οποία διευκολύνει τη μεταφορά και διάχυση των ιόντων στο διάλυμα. Επίσης, τα ιόντα αυτά χαρακτηρίζονται ως «ειδικά προσροφημένα» επειδή η προσρόφηση οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην ειδική χημική φύση τους και όχι στο φορτίο του. Το στρώμα Stern αποτελεί το εσωτερικό, μη διάχυτο μέρος της διπλοστοιβάδας που είναι ισχυρά συνδεδεμένο με το ηλεκτρικό πεδίο του κολλοειδούς σωματιδίου.

Το δεύτερο μέρος της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας αποτελείται από μια διάχυτη στοιβάδα ιόντων (διάχυτο στρώμα Gouy), που περιβάλλει την στοιβάδα Stern. Το στρώμα Gouy εκτείνεται ως «σύννεφο» γύρω από το σωματίδιο, αποτελώντας το εξωτερικό τμήμα της διπλοστοιβάδας, όπου θεωρείται πως έχει αποκατασταθεί η ηλεκτρική ουδετερότητα του σωματιδίου. Συνεπώς, το στρώμα αυτό είναι ασθενέστερα συνδεδεμένο με το κολλοειδές σωματίδιο.

Αν το σωματίδιο κινηθεί στο διάλυμα, τότε μαζί του κινείται τόσο η σταθερή στοιβάδα Stern όσο και ένα μέρος της διάχυτης στοιβάδας. Πιο συγκεκριμένα, εντός του διάχυτου στρώματος υπάρχει ένα «πλασματικό όριο». Όσα ιόντα βρίσκονται εντός αυτού του ορίου, συμπαρασύρονται με το σωματίδιο κατά τη κίνησή του στο υγρό, ενώ τα ιόντα που βρίσκονται εκτός του ορίου, δεν συμπαρασύρονται. Το όριο μεταξύ συμπαρασυρόμενου και μη μέρους του διάχυτου στρώματος ονομάζεται επιφάνεια διάσπασης (Slipping plane). Το ηλεκτρικό δυναμικό στο επίπεδο διάτμησης της διάχυτης στοιβάδας κατά την κίνηση του κολλοειδούς (συνήθως λόγω βαρύτητας) ονομάζεται ζ-δυναμικό (ζ-potential).

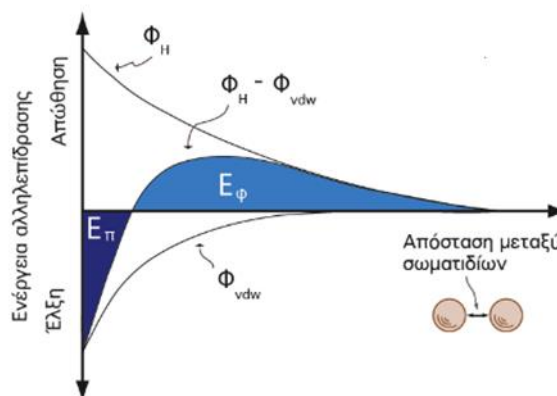
Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.2, τα κολλοειδή συστήματα επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την αλλαγή της συγκέντρωσης των αλάτων. Μάλιστα τα λυόφοβα κολλοειδή σωματίδια συσσωματώνονται (περίπτωση όμοσυσσωμάτωσης) και καθιζάνουν εντός του αιωρήματος κατά την αύξηση της ιοντικής ισχύος. Αυτό συμβαίνει διότι, η αύξηση της ιοντικής ισχύος οδηγεί σε μείωση της έκτασης του διάχυτου στρώματος, υποβοηθώντας την έλξη των σωματιδίων. Συνεπώς, προκαλεί αποσταθεροποίηση/αποδιαλύτωση των κολλοειδών σωματιδίων και αύξηση της

ελεύθερης ενέργειας του συστήματος. Αντίθετα, η μείωση της ιοντικής ισχύος ευνοεί τη διατήρηση της σταθερότητας, λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης των ομόσημα φορτισμένων σωματιδίων.



Εικόνα 1.2: Επίδραση ιοντικής ισχύος στη ηλεκτροστατική άπωση σωματιδίων συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού τους. (Πήγη: [https://en.wikipedia.org/wiki/Double\\_layer\\_forces](https://en.wikipedia.org/wiki/Double_layer_forces))

Βάσει της Εικόνα 1.3, η αντίσταση των κολλοειδών στη συσσωμάτωση ορίζεται από το ύψος του ενεργειακού φραγμού,  $E_{\phi}$ . Εάν η κινητική ενέργεια των σωματιδίων είναι αρκετά μεγάλη, ώστε να ξεπεραστεί ο ενεργειακός φραγμός και να ελαττωθεί η απόσταση διαχωρισμού των σωματιδίων στα όρια της ενεργειακής παγίδας,  $E_{\pi}$ , τότε είναι δυνατή η συσσωμάτωση των σωματιδίων (Χρυσικόπουλος, 2014). Επίσης, το ζ-δυναμικό αποτελεί μέγεθος χαρακτηρισμού του βαθμού σταθερότητας των κολλοειδών. Το ζ-δυναμικό λαμβάνει τόσο θετικές, όσο και αρνητικές τιμές. Όσο μεγαλύτερο, κατ' απόλυτη τιμή, είναι, τόσο πιο σταθερό θεωρείται το κολλοειδές σύστημα. Αντίθετα, όταν το ζ-δυναμικό τείνει να μηδενιστεί, τόσο ευκολότερη καθίσταται η αποσταθεροποίηση του κολλοειδούς συστήματος.



Εικόνα 1.3: Σχηματική παράσταση ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ σωματιδίων εξαιτίας απωστικών και ελκτικών δυνάμεων ( $\Phi_H$  είναι η ενέργεια της ηλεκτροστατικής άπωσης και  $\Phi_{vdw}$  είναι η ενέργεια εξαιτίας των ελκτικών δυνάμεων van der Waals) (Χρυσικόπουλος, 2014).

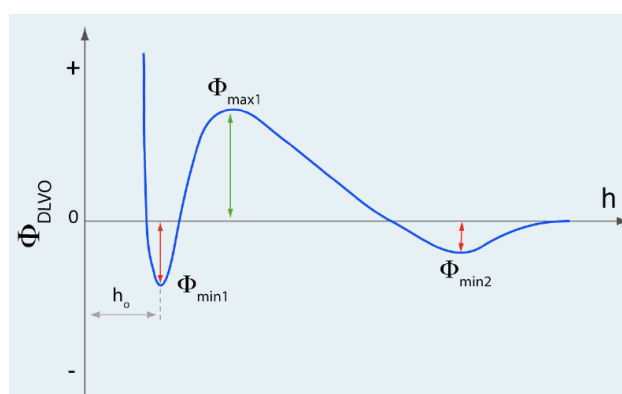


## 1.1.2 Θεωρία DLVO

Η μαθηματική μοντελοποίηση της ομοσυσσωμάτωσης (δηλ. συσσωμάτωση όμοιων σωματιδίων) και ετεροσυσσωμάτωσης (δηλ. συσσωμάτωση σωματιδίων διαφορετικού είδους) καθίσταται σημαντική για τη θεμελιώδη κατανόηση και πρόβλεψη της περιβαλλοντικής συμπεριφοράς, τύχης και μεταφοράς των κολλοειδών. μέχρι και σήμερα η κλασική, ποσοτική θεωρία εξέτασης/διερεύνησης της σταθερότητας των κολλοειδών συστημάτων θεωρία (DLVO theory) χρησιμοποιείται ευρέως, τόσο για να εξηγήσει τη συμπεριφορά συσσωμάτωσης και εναπόθεσης φορτισμένων σωματιδίων παρουσία απλών ηλεκτρολυτών, όσο και για να εξηγήσει τη σταθερότητα σωματιδίων μικρό/νάνο-κλίμακας σε εναιωρήματα (Wang et al., 2015).

Η θεωρία DLVO στηρίζεται στη μεταβολή της δυναμικής ενέργειας (δηλ. της συνολικής ενέργειας του διεπιφανειακού δυναμικού), που λαμβάνει χώρα κατά την προσέγγιση δύο κολλοειδών σωματιδίων (Derjaquin and Landau, 1941; Verwey and Overbeek, 1948). Βασιζόμενη στην ύπαρξη του διπλού στρώματος γύρω από τα αιωρούμενα κολλοειδή σωματίδια (Stern και διάχυτο στρώμα), η DLVO αποδεικνύει ότι τα εξωτερικά όρια ενός κολλοειδούς σωματιδίου εντοπίζονται στην επιφάνεια διάσπασης, λαμβάνοντας ένα καθαρό αρνητικό φορτίο, δηλαδή αρνητική τιμή ζ-δυναμικού.

Βάσει της εν λόγω θεωρίας, στη διαμόρφωση της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ κολλοειδών συμβάλλουν η **ηλεκτροστατική άπωση**, που αναπτύσσεται λόγω της επικάλυψης των διάχυτων διπλοστοιβάδων (double layers) των σωματιδίων ή/και λόγω της επικάλυψης των τροχιακών των μορίων που περιβάλλουν τα προσεγγίσιμα σωματίδια (λαμβάνεται υπόψη μόνο σε πολύ μικρές αποστάσεις διαχωρισμού), και η **διασωματιδιακή έλξη**, που προκαλείται από τις διαμοριακές δυνάμεις van der Waals. Με δεδομένες τις ιδιότητες των αλληλεπιδρώντων κολλοειδών σωματιδίων, καθίσταται δυνατή η δημιουργία της καμπύλης μεταβολής της δυναμικής ενέργειας συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού των σωματιδίων ( $h$ ) σαν και αυτή της Εικόνα 1.4.



Εικόνα 1.4: Σχεδιάγραμμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο σωματιδίων συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού των σωματιδίων ( $h$ ) (Χρυσικόπουλος, 2014).

Σε μια τυπική καμπύλη περιγραφής του συνολικού διεπιφανειακού δυναμικού ( $\Phi_{DLVO}$ ) μεταξύ δύο αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό, για πολύ μικρές αποστάσεις διαχωρισμού ( $h$ ), όπου  $\Phi_{DLVO} > 0$ , υπερσχύει η απωστική ενέργεια Born που οφείλεται στην επικάλυψη των τροχιακών των σωματιδίων. Σε λίγο μεγαλύτερες διασωματιδιακές αποστάσεις, όπου  $\Phi_{DLVO} < 0$ , αρχίζει να υπερσχύει η ελκτική ενέργεια van der Waals και όταν  $h = h_0$  (όπου,  $h_0$  συμβολίζεται το σημείο ελάχιστης απόστασης διαχωρισμού των σωματιδίων ή σημείο επαφής) εμφανίζεται ένα βαθύ πρωτοταγές ελάχιστο (primary minimum, deep energy well),  $\Phi_{min1}$ , η ύπαρξη του οποίου υποδεικνύει ικανότητα σύζευξης των διασπαρμένων σωματιδίων. Αν η καμπύλη της ενέργειας αλληλεπίδρασης έχει μόνο αρνητικές τιμές ( $\Phi_{DLVO} < 0, \forall h$ ), τότε επικρατεί έλξη, με αποτέλεσμα τα σωματίδια της διασπορά να είναι αποσταθεροποιημένα και εμφανίζουν έντονη τάση συσσωμάτωσης.

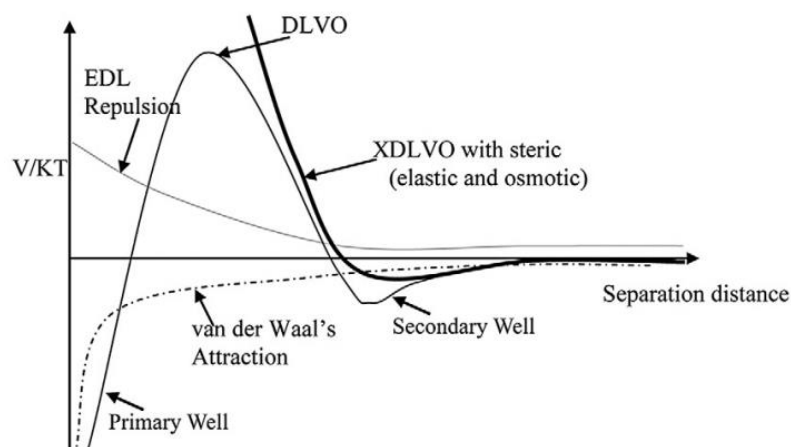
Σε μεγαλύτερες αποστάσεις διαχωρισμού, όπου  $\Phi_{DLVO} > 0$  και  $h > h_0$ , δύναται να επικρατήσει πάλι η ηλεκτροστατική άπωση, κυρίως λόγω επικάλυψης ηλεκτρικών διπλοστοιβάδων. Στο σημείο  $h$  όπου το διεπιφανειακό δυναμικό μεγιστοποιείται εντοπίζεται ένα μέγιστο απωστικής ενέργειας (primary maximum),  $\Phi_{max1}$ , το οποίο, όπως προαναφέρθηκε στην Παράγραφο 1.1.1, αποκαλείται ενεργειακό φράγμα προσκόλλησης – αποκόλλησης και εξαρτάται από το μέγεθος του επιφανειακού δυναμικού καθαυτό, καθώς και από την εμβέλεια των απωστικών δυνάμεων, δηλαδή του παράγοντα  $\kappa^{-1}$  που υποδηλώνει το πάχος του διπλού στρώματος. Στην περίπτωση που το ενεργειακό φράγμα είναι μεγάλο σε σχέση με τη θερμική ενέργεια  $k_B T$  των σωματιδίων, το κολλοειδές σύστημα χαρακτηρίζεται από σταθερότητα, με αποτέλεσμα να ανθίσταται σε φαινόμενα συσσωμάτωσης και προσκόλλησης. Επίσης, σε ακόμα μεγαλύτερες διασωματιδιακές αποστάσεις υπερσχύει εκ νέου η ελκτική ενέργεια van der Waals και μπορεί να παρατηρηθεί η εμφάνιση ενός δευτεροταγούς ελαχίστου  $\Phi_{min2}$ . Αν το  $\Phi_{min2}$  παρουσιάζει μέτριο βάθος σε σχέση με την θερμική ενέργεια  $k_B T$ , θα πρέπει να οδηγεί σε μια εύκολα αντιστρέψιμη προσκόλληση ή θρόμβωση των κολλοειδών.

### 1.1.3 Εκτεταμένη θεωρία DLVO (XDLVO)

Παρότι η κλασική θεωρία DLVO αποτελεί μια καλή προσεγγιστική μέθοδο περιγραφής των αλληλεπιδράσεων των κολλοειδών και των νανοσωματιδίων σε υδατική φάση, συχνά κατά την εφαρμογή της εντοπίζονται αποκλίσεις μεταξύ των πειραματικών δεδομένων και των θεωρητικά αναμενόμενων τιμών (van Oss, 1993). Οι εν λόγω αποκλίσεις οφείλονται στην δράση επιπρόσθετων ελκτικών ή απωστικών μη-DLVO δυνάμεων στην διεπιφάνεια των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων, οι οποίες επηρεάζονται σημαντικά από την ύπαρξη προσροφημένων ιόντων και μορίων (π.χ. επικαλύψεις μορίων οργανικής ύλης, πρωτεΐνες κλπ) στις αλληλεπιδρώντες επιφάνειες (Wu et al., 1999). Η κλασική θεωρία DLVO έχει δημιουργηθεί για την πρόβλεψη της σταθερότητας και της εναπόθεσης φορτισμένων σωματιδίων σε

συστήματα διασποράς απλών ηλεκτρολυτών. Συνεπώς, σε περιπτώσεις πολυσθενών ηλεκτρολυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις, η εφαρμογή της DLVO αποτυγχάνει λόγω μείωσης των ηλεκτροστατικών δυνάμεων και επικράτησης δυνάμεων διασποράς (Kim et al., 2001; Boström et al., 2001).

Ιδιαίτερα στην περίπτωση των νανοσωματιδίων (NPs) υπάρχει ακόμα μεγάλο κενό μεταξύ της πειραματικής μελέτης και της επιτυχούς μοντελοποίησης της συσσωμάτωσής τους, λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών και του μεγέθους τους (Zhang, 2014). Για παράδειγμα, κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι η θεωρία DLVO δεν παράγει έγκυρα αποτελέσματα όταν τα μεγέθη των σωματιδίων είναι μικρότερα από 10 nm, επειδή σε αυτήν την περιοχή, το μέγεθος του πυρήνα των σωματιδίων, το μήκος της αλυσίδας των μορίων επικάλυψης, και το πάχος της ηλεκτροστατικής διπλοστιβάδας προσεγγίζουν παρόμοιες διαστάσεις (Liu et al., 2013). Ταυτόχρονα, κατά την εφαρμογή της DLVO για την πρόβλεψη της ετεροσυσσωμάτωσης μεταξύ νανοσωματιδίων και άλλων κολλοειδών, όπως αργιλικά σωματίδια (π.χ. καολινίτη, μοντοριλονίτη κλπ), η χρήση εξισώσεων του μοντέλου σφαίρας – ημιάπειρης επιφάνειας (δείτε Παράγραφο 3.4.1) πιθανόν είναι ακατάλληλη για την διεξαγωγή ορθών συμπερασμάτων. Οι διαστάσεις των αργιλικών αυτών σωματιδίων (~500 nm) δεν είναι αρκετά μεγάλες ώστε να θεωρούνται ως ημιάπειρα μέσα για την εναπόθεση νανοσωματιδίων. Συνεπώς, καθίσταται αναγκαία η δημιουργία εκτεταμένων θεωρητικών προσεγγίσεων.



Εικόνα 1.5: Σχεδιάγραμμα της ενέργειας αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο σωματιδίων συναρτήσει της απόστασης διαχωρισμού των σωματιδίων ( $h$ ), λαμβάνοντας υπόψη και μη-DLVO δυνάμεις (Hotze et al., 2010).

Παραδείγματα μη DLVO δυνάμεων αποτελούν η πίεση ενυδάτωσης (hydration pressure), οι δυνάμεις δεσμού υδρογόνου (hydrogen bonding forces), οι υδρόφοβες επιδράσεις (hydrophobic effects), η πίεση αποσύνδεσης/διαχωριστικής επιφάνειας (disjoining pressure), διαρθρωτικές δυνάμεις (structural forces), μικρού εύρους ελκτικές δυνάμεις γεφύρωσης (bridging attraction forces), απωστικές δυνάμεις λόγω ώσμωσης (osmotic repulsion forces), οι μαγνητικές δυνάμεις έλξης, που προκύπτουν από την ευθυγράμμιση των spins των ηλεκτρονίων (magnetic attraction forces, καθώς

και οι δυνάμεις οξέος – βάσεως κατά Lewis (Israelachvili, 1992; van Oss, 1994; Swanton 1995; Bergendahl and Grasso, 1999; Fritz et al., 2002; Chen and Elimelech, 2007; Phenrat et al., 2008).

Οι προαναφερόμενες δυνάμεις μπορούν να αλληλεπιδρούν μεταξύ τους στην ίδια υδατική φάση, ιδιαίτερα στην περίπτωση των νανοσωματιδίων. Ωστόσο, πρέπει να σημειωθεί ότι ένας ακριβής προσδιορισμός κάθε δύναμης και της μεμονωμένης συνεισφοράς της είναι γενικά αδύνατος, καθώς η προέλευση των υδρόφοβων και υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων δεν είναι εύκολο να αποσαφηνιστεί. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί ότι οι δυνάμεις οξέος-βάσης κατά Lewis προκύπτουν κατά τον διαχωρισμό των δεσμών υδρογόνου στο νερό, λόγω αλλαγής της εντροπίας του συστήματος (Wu et al., 1999; Hoek and Agarwal, 2006). Ο van Oss (1993), αναγνώρισε και υπολόγισε τις μη DLVO δυνάμεις που προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις του τύπου ηλεκτρονιοδότη-ηλεκτρονιοδέκτη, οξέος-βάσεως κατά Lewis, μεταξύ των επιφανειών των συλλεκτών, των προσροφημένων ειδών, και του διαλύτη. Η ενσωμάτωση των εν λόγω πρόσθετων ενεργειών αλληλεπίδρασης στη κλασική θεωρία DLVO ονομάστηκε εκτεταμένη θεωρία DLVO ή XDLVO.

Η ποσοτική εκτίμηση της πρόσθετης ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού, που οφείλεται στη δράση δυνάμεων οξέος-βάσης κατά Lewis (Lewis acid-base interaction energy), στηρίζεται στην υδροφοβικότητα των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων. Η υδροφοβικότητα μιας στερεής επιφάνειας χαρακτηρίζεται από την γωνία επαφής της με το νερό,  $\beta$  [°]. Γενικά, τα υλικά χωρίζονται σε διαβρεχόμενα, όταν σχηματίζουν γωνία επαφής με το νερό  $\beta > 90^\circ$ , και μη διαβρεχόμενα, όταν η προκύπτουσα γωνία επαφής είναι  $\beta < 90^\circ$ . Σημειώνεται επίσης ότι οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιωρούμενων σωματιδίων καθίστανται ουσιαστικές, όταν  $\beta > 65^\circ$ , ενώ επικρατούν υδροφιλικές αλληλεπιδράσεις σε περιπτώσεις όπου  $\beta < 65^\circ$ .

### 1.2 Περιβαλλοντική εμφάνιση βιοκολλοειδών με έμφαση στα βακτήρια

Όταν τα εξεταζόμενα κολλοειδή είναι έμβιοι οργανισμοί όπως ιοί, βακτήρια, σπόρια, άλγη, πρωτόζωα, πλαγκτόν ή έχουν προκύψει από χημικές και βιολογικές διεργασίες στο νερό και στο έδαφος (π.χ. πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα ή/και άλλα άκαμπτα βιοπολυμερή μεγέθους 0.1-1  $\mu\text{m}$ ), τότε αναφέρονται ως βιοκολλοειδή. Συνήθως, τα βιοκολλοειδή που απαντώνται στα περιβαλλοντικά δείγματα είναι παθογόνοι μικροοργανισμοί, η παρουσία των οποίων σε επιφανειακά και υπόγεια ύδατα προκύπτει ως αποτέλεσμα μεταφοράς ή εισαγωγής κοπρανώδους υλικού από διαδικασίες σίτισης ζώων, αποκεντρωμένα συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (π.χ. σηπτικές δεξαμενές), διαρροές σωλήνων μεταφοράς λυμάτων, επεξεργασμένες ιλύς καθαρισμού λυμάτων (biosolids), καθώς και από τεχνητή επαναφόρτιση υδροφόρων στρωμάτων με επεξεργασμένα απόβλητα (Gebra and Smith, 2005).

Σε παγκόσμιο επίπεδο, τα συστήματα υπογείων υδάτων παρέχουν το 25 – 40 % του πόσιμου νερού και γενικά θεωρούνται λιγότερο επιρρεπή σε μόλυνση βιοκολλοειδούς προέλευσης σε σχέση με τα επιφανειακά. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, ο αυξημένος αριθμός παθογόνων που απαντάται σε αυτά έχει οδηγήσει σε σοβαρή υποβάθμιση της ποιότητάς τους (Chrysikopoulos and Aravantinou, 2014). Πιο συγκεκριμένα, η εντατικοποιημένη χρήση αντιβιοτικών, καθώς και η εμφάνιση φαρμακευτικών υπολειμμάτων σε απόβλητα έχει προκαλέσει αύξηση της ανθεκτικότητας των παθογόνων έναντι διεργασιών όπως αυτή της χλωρίωσης (Gebra, 1996), με αποτέλεσμα παθογόνα βιοκολλοειδή να εμφανίζονται στα απόβλητα εκροής σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από τις νομοθετικά και περιβαλλοντικά επιτρεπτές, μολύνοντας κατ' επέκταση τις υπόγειες παροχές πόσιμου νερού (Rose et al., 1996).

Ωστόσο, η εμφάνιση παθογόνων σε εκμεταλλεύσιμα προς πόση υπόγεια ύδατα προερχόμενα από εκσκαφές ή γεωτρήσεις, συσχετίζεται άμεσα με την εκδήλωση διάφορων κρουσμάτων υδατογενών ασθενειών (MacIer and Merkle, 2000; Bhattacharjee, 2002). Για παράδειγμα, πρόσφατη μελέτη (DeFelice, 2015) αναφέρει ότι στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 70% των επιδημιών μικροβιακών λοιμώξεων που παρατηρήθηκαν σε περιοχές πλησίον πλωτών οδών έχει αποδοθεί σε κατανάλωση μολυσμένων υπογείων υδάτων. Συνήθως, η εμφάνιση ιών σε υπόγεια ύδατα είναι πιο ανησυχητική. Ο έλεγχος της παρουσίας ιών στα περιβαλλοντικά συστήματα πραγματοποιείται με χρήση βακτηρίων-δεικτών κοπρανώδους μόλυνσης (π.χ. κοπρανώδη κολοβακτηρίδια, *Escherichia coli*, και κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι).

Ωστόσο και τα βακτήρια δύνανται να προκαλούν σοβαρές διαταραχές υγείας. Επικεντρώνοντας στην περίπτωση των βακτηρίων, σύμφωνα με την δημοσίευση των Wang et al. (2007) 76.000.000 ασθένειες (π.χ. γαστρεντερίτιδα, εντεροκολίτιδα, μηνιγγίτιδα, πνευμονία και αντιδραστική αρθρίτιδα), 5000 θάνατοι και 300.000 νοσηλείες στην Αμερική ετησίως οφείλονται σε μόλυνσης από βακτήρια, όπως *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* και *Salmonella* (Wang et al., 2007). Μάλιστα, η εμφάνιση του στελέχους *Staphylococcus aureus* σε διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα αποτελεί αιτιολογικό παράγοντα ανάπτυξης απειλητικών για τη ζωή ασθενειών, που προσβάλλουν εκατομμύρια ανθρώπους ετησίως (Yang et al., 2018). Επίσης, μόλυνση από βακτήριο *Vibrio cholera*, το οποίο είναι άμεσα συνδεδεμένο με γαστρεντερικές διαταραχές, μπορεί να οδηγήσει ακόμα και σε θάνατο (Williams and Berkley, 2018). Γενικά, η συνύπαρξη βακτηρίων και φαρμακευτικών υπολειμμάτων, καθιστά αναποτελεσματικές τις παραδοσιακές αντιβιοτικές θεραπείες. Ως εκ τούτου, τα βακτήρια εισβάλλουν στα κύτταρα ξενιστές προκαλώντας σοβαρά προβλήματα (Yang et al., 2018).

Ο εκάστοτε τρόπος συμπεριφοράς των βακτηρίων στα συστήματα υπογείων υδάτων (αδρανοποίηση, συγκράτηση και μεταφορά) καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τις κολλοειδείς ιδιότητές που εμφανίζουν στο εδαφικό διάλυμα. Συνήθως, εξετάζονται είτε ως σωματίδια (κολλοειδή) είτε ως διαλυμένα μόρια και για τον προσδιορισμό των ιδιοτήτων και της περιβαλλοντικής τους τύχης εφαρμόζονται οι ίδιες τεχνικές και τα ίδια μαθηματικά μοντέλα που χρησιμοποιούνται και για

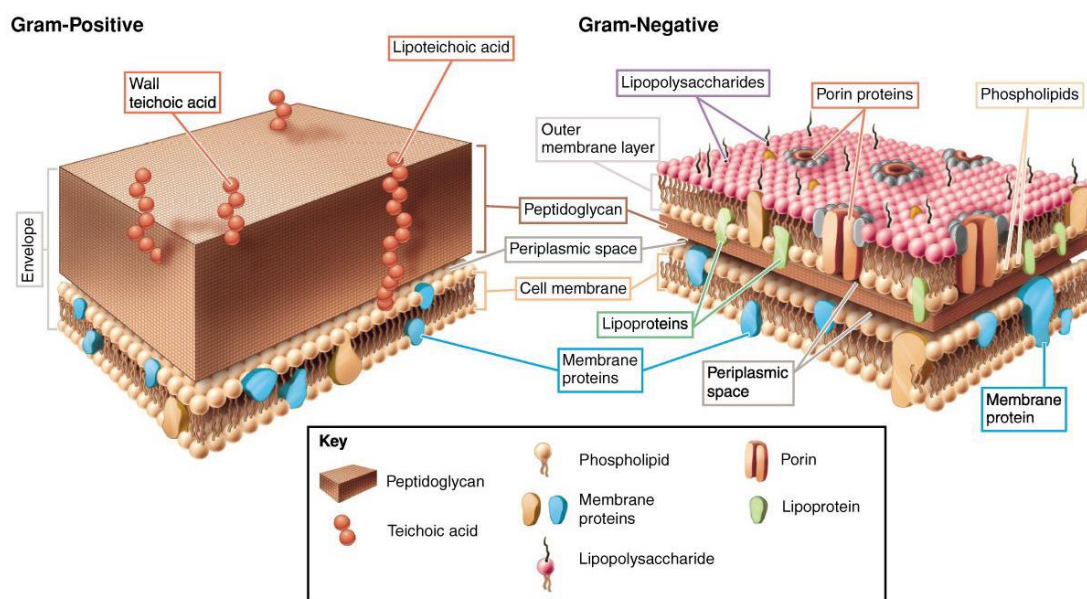
πρόγνωση της συμπεριφοράς των αμιγών κολλοειδών συστημάτων. Το μέγεθος τους ( $0.5 - 2 \mu\text{m}$ ), το σχήμα τους (π.χ. κόκκος, ραβδίο/βάκιλλος, σπείραμα, σπειροχαίτη, νηματοειδές, εκβλαστάνον και εξαρτηματοφόρο), οι φυσικές ιδιότητές τους, η χωρική διευθέτησή των κυττάρων τους (π.χ. ζεύγη κόκκων, αλυσίδες κυττάρων, συστάδες, δηλαδή ομάδες πολλών κυττάρων που μοιάζουν με τσαμπί σταφυλιού), η κινητικότητα ή μη των κυττάρων (π.χ. εμφάνιση ή απουσία βλεφαρίδων και μαστιγίων), αλλά και η επικάλυψή τους με μακρομόρια είναι μερικά από τα χαρακτηριστικά αυτά που καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη δυνατότητα εφαρμογής τεχνικών, όπως σκέδαση φωτός ή ηλεκτροφορητική κινητικότητα για τη πρόβλεψη της συμπεριφοράς τους σε καθεστός εναιώρησης (δείτε Παράγραφο 2.7).

Στις πλείστες των περιπτώσεων, τα βακτηρικά κύτταρα, με εξαίρεση το στέλεχος *Staphylococcus aureus*, όπου τα κύτταρα του δημιουργούν συστάδες ακανόνιστης χωρικής διευθέτησης, απαντώνται μονοδιασπαρμένα στην υδατική φάση, γεγονός που αυξάνει την πιθανότητα να διαθέτουν ομοιόμορφες κολλοειδείς επιφανειακές ιδιότητες. Ωστόσο, πρέπει να αναφερθεί πως τα βακτήρια είναι ιδιαίτερα σύνθετοι έμβιοι μικροοργανισμοί με μεγάλη τάση προσαρμογής στο εκάστοτε περιβάλλον, καθώς και ικανότητα τροποποίησης της επιφανειακής σύνθεσής τους, ανάλογα την αναπτυξιακή φάση τους. Για παράδειγμα αρκετά παθογόνα βακτήρια διαθέτουν βιοχημικά διακριτές επιφανειακές ομάδες για την ειδική αναγνώριση των καταλλήλων θέσεων πρόσδεσής τους στις επιφάνειες του ξενιστή. Συνεπώς, η αποσαφήνιση των κολλοειδών ιδιοτήτων τους αποτελεί αντικείμενο διεπιστημονικής μελέτης, που προϋποθέτει καλή γνώση των κυτταρικών/δομικών τους χαρακτηριστικών (Ubbink, 2007).

Βάσει του κυτταρικού τους τοιχώματός, τα βακτήρια διακρίνονται σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Η Gram ταξινόμηση<sup>1</sup> των βακτηρίων θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική κατά την μελέτη της περιβαλλοντικής τους συμπεριφοράς, διότι οι περισσότερες κυτταρικές τους ιδιότητες συσχετίζονται με τη δομή του κυτταρικού περιβλήματος (Prochnow, 2016). Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.6, τα Gram θετικά βακτήρια διαθέτουν ένα παχύ ( $20-80 \text{ nm}$ ), ομογενές κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης (sacculus) που προστατεύει την εσωτερική μεμβράνη του ενδοπλασματικού τους δικτύου. Αντίθετα, η δομή του κυτταρικού τοιχώματος των Gram αρνητικών βακτηρίων είναι πιο περίπλοκη, καθώς διαθέτουν μια επιπλέον εξωτερική πορώδη μεμβράνη αποτελούμενη από πρωτεΐνες, λιποσακχαρίτες και φωσφολιπίδια. Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης που εμφανίζουν είναι λεπτότερο ( $< 10 \text{ nm}$ ) και τοποθετείται στον περιπλασματικό χώρο που δημιουργείται μεταξύ της εξωτερικής μεμβράνης και της πλασματικής μεμβράνης τους (Ubbink, 2007).

---

<sup>1</sup> Η ταξινόμηση αυτή επινοήθηκε περίπου πριν από 100 χρόνια από τον Δανό γιατρό Hans Gram, μέσω μιας τεχνικής χρώσης των βακτηρίων που χρησιμοποιεί ως βάση το κρυσταλλικό ιώδες. Έπειτα από τη χρώση, ακολουθεί έκπλυση των βακτηρίων με αιθυλική αλκοόλη, όπου 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.



Εικόνα 1.6: Κυτταρική δομή (a) Gram θετικών και (b) Gram αρνητικών βακτηριακών κυττάρων. (Πηγή: <https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/CHEM2049/Envotnta%202.pdf>, accessed November 16, 2018)

Και για τους δύο τύπους βακτηρίων, καθοριστικής σημασίας είναι τα βιομόρια που καλύπτουν το εξωτερικό κυτταρικό τοίχωμα. Το είδος των εν λόγω μορίων καθορίζει τις επιφανειακές ιδιότητες των βακτηρίων και συνεπώς τις αλληλεπιδράσεις τους με το περιβάλλον. Όσον αφορά στα Gram θετικά βακτήρια το στρώμα πεπτιδογλυκάνης καλύπτεται κυρίως από πολυσακχαρίτες, ενώ στα Gram αρνητικά βακτήρια το αντίστοιχο στρώμα καλύπτεται από λιποπολυσακχαρίτες οι οποίοι ευθύνονται για την εκδήλωση παθογένειας των αντίστοιχων βακτηρίων (Ubbink, 2007). Σύμφωνα με αναφορά των Jay et al (1998), τα Gram θετικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά συγκριτικά με τα Gram αρνητικά σε υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την αδρανοποίηση των βακτηρίων σε περιβαλλοντικά δείγματα.

### 1.2.1 Εξεταζόμενα βιοκολλοειδή

#### 1.2.1.1 *Escherichia coli*

Το βακτήριο *Escherichia coli* (*E. coli*), ανήκει στην οικογένεια των *Enterobacteriaceae* και πρόκειται για προκαρυωτικό, Gram αρνητικό βακτήριο, δηλαδή τα κυττάρά του δεν εμφανίζουν σχηματισμένο πυρήνα και δομικά αποτελούνται από τρία μέρη, την κυτταροπλασματική μεμβράνη, το ενδιάμεσο στρώμα πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη. Το *E. coli* είναι ένα καλά χαρακτηρισμένο βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο που παρουσία οξυγόνου, δύναται να παράγει Τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP) μέσω αερόβιας αναπνοής, ενώ σε περιπτώσεις απουσίας οξυγόνου επιτελεί αναερόβια αναπνοή/ζήμωση. Είναι μη

σπορογόνο με αποτέλεσμα να εμφανίζει ραβδοειδή μορφή (βάκιλλος) και αποτελείται από κύτταρα, διαστάσεων 0.6  $\mu\text{m}$  σε πλάτος και έως 2.0  $\mu\text{m}$  μήκος (ή ισοδύναμης σφαιρικής διαμέτρου 0.25 – 1.20  $\mu\text{m}$ ) (Reshes et al., 2008). Περιμετρικά, τα κύτταρα του *E. coli* φέρουν μαστίγια, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν κινητικότητα (Darnton et al., 2007). Ο όγκος που καταλαμβάνουν τα κύτταρα κυμαίνεται από 0.6 – 0.7  $\mu\text{m}^3$  (Kubitschek, 1990). Όσον αφορά στις συνθήκες ανάπτυξής του, το *E. coli* είναι μεσόφιλο και η βέλτιστη κυτταρική του ανάπτυξη πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 37°C. Υπό ευνοϊκές συνθήκες, ο μέσος απαιτούμενος χρόνος κυτταρικής αναπαραγωγής (διπλασιασμού) για τα περισσότερα στελέχη *E. coli* είναι περίπου 20 min.

Το *E. coli* εντοπίζεται στις εντερικές οδούς των θερμόαιμων ζώων. Συνεπώς, η εμφάνιση του *E. coli* στον ανθρώπινο οργανισμό είναι αναμενόμενη, δεδομένου ότι αποτελεί αβλαβές συστατικό της φυσικής μικρο – χλωρίδας του εντέρου. Τα περισσότερα στελέχη του βακτηρίου αυτού είναι αβλαβή, ωστόσο, ορισμένα στελέχη λειτουργούν ως σοβαροί παθογόνοι παράγοντες για τον ανθρώπινο οργανισμό, οδηγώντας στην πρόκληση εντερικών, κυρίως, ασθενειών. Ανάλογα με τις επιπτώσεις που προκαλούν και τα χαρακτηριστικά της μολυσματικότητάς τους, τα παθογόνα στελέχη του *E. coli* διακρίνονται σε εντεροτοξιγενή, εντεροπαθογόνα, σε αυτά που παράγουν την επικίνδυνη τοξίνη shiga και σε στελέχη που η παρουσία τους προκαλεί εξωγενείς λοιμώξεις (Römer et al., 2012). Μερικά παραδείγματα ασθενειών, σχετιζόμενων με παθογόνα *E. coli* στελέχη, είναι λοιμώξεις του ουροποιητικού συστήματος, διάρροια, σηψαιμία ακόμη και νεογνική μηνιγγίτιδα (Kaper, 2004).

Συχνά το *E. coli* χρησιμοποιείται ως δείκτης για την εκτίμηση κοπρανόδους μόλυνσης σε εδαφικά και υδατικά δείγματα, καθώς η απόθεσή του στο περιβάλλον είναι αποτέλεσμα απελευθέρωσης περιττωματικών ουσιών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η περιβαλλοντική επιβίωση του εν λόγω βακτηρίου επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία, το κλίμα, τη διαθεσιμότητα θρεπτικών υλικών, τα ποσοστά υγρασίας του εδάφους, καθώς και την συνύπαρξη άλλων αιωρούμενων έμβιων ή αδρανών κολλοειδών σωματιδίων στο εδαφικό διάλυμα. Ιδιαίτερα η θερμοκρασία, έχει αποδειχθεί ότι ευθύνεται σε μεγάλο βαθμό για τη χρονική μεταβλητότητα της επιβίωσης που εμφανίζει το *E. coli* σε περιβαλλοντικά δείγματα (Lau and Ingham, 2001). Πιο συγκεκριμένα, σε χαμηλά θερμοκρασιακά εύρη (κοντά στη μεσόφιλη περιοχή), η επιβίωση του *E. coli* έχει διάρκεια μηνών, ενώ σε υψηλές θερμοκρασίες (45 °C – 65 °C) ο χρόνος επιβίωσης είναι μερικές μέρες.

Σημειώνεται ότι μεταξύ των πολλών διαθέσιμων στελεχών *E. coli*, τα στελέχη K-12 και B, είναι αυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί περισσότερο στο τομέα της μοριακής βιολογίας ως πρότυποι οργανισμοί για μελέτες εργαστηριακής κλίμακας. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το στέλεχος *Escherichia coli* (DMS 498, ATCC 23716, K-12 “wild type”).



### 1.2.1.2 *Enterococcus faecalis*

Το βακτήριο *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ανήκει επίσης στην οικογένεια των Enterobacteriaceae και συγκαταλέγεται στην κατηγορία των Gram θετικών βακτηρίων. Γενικά οι εντερόκοκκοι παλαιότερα συγκαταλέγονταν στο γένος Streptococci αλλά πρόσφατα αναταξινομήθηκαν ως δικό τους γένος (Enterococci). Μορφολογικά, τα κύτταρα του *E. faecalis* είναι ωοειδή (οβάλ), με τιμή μέσης διαμέτρου μεταξύ 0.5 – 1  $\mu\text{m}$ . Συνήθως, είναι διατεταγμένα σε ζεύγη (διπλόκοκκοι) ή σε μικρές αλυσίδες αποικιών και δεν εμφανίζουν κινητικότητα. Μετά από εμβολισμό και επώαση, οι αποικίες του *E. faecalis* εμφανίζονται λείες, σφαιρικές, λευκού χρώματος ή κρεμώδους, πάνω σε τρυβλία petri που περιέχουν μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό (Atlas of Oral Microbiology, 2015). Το βακτήριο *E. faecalis*, είναι δυνητικά αναερόβιο, μη σπορογόνο και ιδανικά αναπτύσσεται σε θερμοκρασία 35 °C.

Το *E. faecalis* αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της εντερικής χλωρίδας των ζώων, (ασπόνδων, θηλαστικών και πτηνών), συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Στον άνθρωπο εμφανίζεται φυσιολογικά στο παχύ έντερο και στην ουρογεννητική οδό. Μάλιστα, το ποσοστό εμφάνισής του στο ανθρώπινο παχύ έντερο ανέρχεται σε 90 – 95 %. Συνεπώς, λόγω του ότι αποικίζει σε γαστρεντερικές οδούς ανθρώπων και ζώων συχνά συναντάται στο έδαφος, τα φυτά, τα αστικά λύματα ακόμη και τα τρόφιμα.

Ωστόσο, το συγκεκριμένο βακτήριο εκδηλώνει μεγάλη σταθερότητα, ανθεκτικότητα και ικανότητα προσαρμογής σε ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών, όπως ακραίες θερμοκρασίες (10 – 45 °C), τιμές pH (4.5 – 10), καθώς επίσης και υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου (6.5 %) και χολικών αλάτων (40 %) (Zischka et al., 2005), με αποτέλεσμα να επιβιώνει ακόμα και σε δυσμενείς συνθήκες. Μάλιστα έχει εντοπιστεί επιβίωση του σε θερμοκρασία 60 °C, για χρονικό διάστημα 30 min (Stuart et al., 2006). Ταυτόχρονα, η παρουσία άλλων μικροοργανισμών δεν φαίνεται να επιδρά αρνητικά στην ανάπτυξη και στον πολλαπλασιασμό του (Zischka et al., 2005).

Εξαιτίας του παρασιτικού τους χαρακτήρα και λόγω του ότι δεν διαθέτουν δραστικές τοξίνες ή άλλους παράγοντες λοιμοτοξικότητας, οι εντερόκοκκοι, θεωρείτο για αρκετά χρόνια, ότι έχουν περιορισμένη δυνατότητα πρόκλησης νόσου. Παρόλα αυτά, τα τελευταία χρόνια οι εντερόκοκκοι, συμπεριλαμβανομένου και του βακτηρίου *E. faecalis*, θεωρούνται υψηλής επικινδυνότητας νοσοκομειακά παθογόνα (Cetinkaya, 2000), λόγω της μεγάλης ανθεκτικότητας που έχουν αναπτύξει έναντι αντιβιοτικών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το αντιβιοτικό βανκομυκίνη, το οποίο πλέον αποτελεί μη αποτελεσματική θεραπεία για την καταπολέμηση του *E. faecalis*.

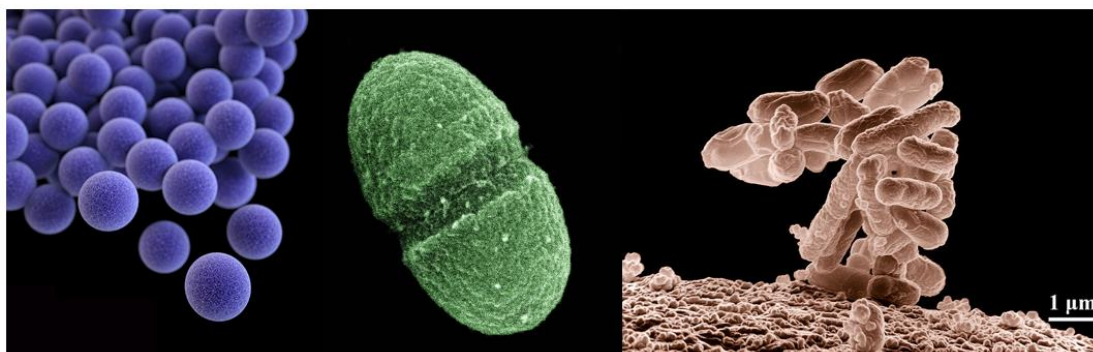
Αν και οι εντερόκοκκοι δεν εμφανίζονται στη φυσιολογική χλωρίδα της αναπνευστικής οδού ή του δέρματος, παρόλα αυτά, δύνανται να προκαλέσουν, απειλητικές για τη ζωή των νοσηλεύομενων, ασθένειες, όπως ενδοκαρδίτιδα, εκκολπωματίτιδα, μηνιγγίτιδα, ουροποιητικές λοιμώξεις, ενδοκοιλιακές, πυελικές και

πληγές τραύματος, επιληψίες και βακτηριαιμίες (Murray, 1990). Οι περισσότερες ανθρώπινες λοιμώξεις από εντερόκοκκους προκαλούνται από την εντερική χλωρίδα του ασθενούς, αν και οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορούν επίσης να μεταφερθούν από ασθενή σε ασθενή ή να αποκτηθούν από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή νερού. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το στέλεχος *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506, PCI 1325).

### 1.2.1.3 *Staphylococcus aureus*

Το *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) είναι Gram θετικό, μη σπορογόνο, και δυνητικά αναερόβιο βακτήριο. Ανήκει στην οικογένεια Staphylococcus. Υπολογίζεται ότι το 20 % έως 30 % του ανθρώπινου πληθυσμού είναι μακροχρόνιοι φορείς του *S. aureus* (Tong et al., 2015), καθώς συναντάται στη φυσική μικροβιακή χλωρίδα του ανθρώπινου οργανισμού και συγκεκριμένα στο δέρμα, στη μύτη, στην αναπνευστική οδό, καθώς και στο χαμηλότερο τμήμα της αναπαραγωγικής οδού των γυναικών (Senok et al., 2009). Μορφολογικά, τα κύτταρά του *S. aureus* είναι στρογγυλά (coccal), με διάμετρο 0.5 – 2  $\mu\text{m}$  (Bakri et al., 2018) και όγκο 0.4-3  $\mu\text{m}^3$  (Levin and Angert, 2015). Αποτελούνται κατά 90 % από πεπτιδογλυκάνη, ενώ το υπόλοιπο 10% των κυττάρων του *S. aureus* αποτελείται από άλλες επικαλύψεις όπως τεικό οξύ (Bakri et al., 2018). Επίσης, τα βακτηριακά κύτταρα δεν εμφανίζουν κινητικότητα και συχνά εφάπτονται σχηματίζοντας συστοιχίες αποικιών στο χώρο.

Το βακτήριο *S. aureus* θεωρείται μεσόφιλο και μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες και σε θερμοκρασιακό εύρος 7 – 48 °C (Taylor and Unakal, 2017). Αξίζει να αναφερθεί ότι το εν λόγω βακτήριο μπορεί να παραμείνει αδρανές στο σώμα του ξενιστή, χωρίς να προκαλεί συμπτώματα ή να είναι ανιχνεύσιμο. Η παθογένεια του εκδηλώνεται κατά τη συνεργιστική του δράση με άλλους μολυσματικούς παράγοντες. Επίσης, ανθίσταται σε αντιβιοτικά (πχ. μεθικιλίνη), ενώ σε θερμοκρασιακό εύρος 37 – 40 °C παράγει τοξίνες, όπως πρωτεΐνες κυτταρικής επιφανείας και εντεροτοξίνες, οι οποίες οδηγούν ακόμη και στην απενεργοποίηση αντισωμάτων. Εμφάνιση του βακτηρίου *S. aureus* σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 10<sup>5</sup> CFU/mL δύναται να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες ακόμη και σε χαμηλές τιμές pH (Bakri et al., 2018). Πέρα των δερματικών παθήσεων που επιφέρει το βακτήριο αυτό, μπορεί επίσης να προκαλέσει τροφικές δηλητηριάσεις και βαριές αναπνευστικές λοιμώξεις. Κατά την αδρανοποίησή του *S. aureus* αρχικά επηρεάζονται το κυτταρικό τοίχωμα και η κυτταρική μεμβράνη. Έπειτα διαταράσσεται η διαδικασία μεταφοράς θρεπτικών ουσιών από το εξωκυτταρικό περιβάλλον προς το εσωτερικό του κυττάρου, με αποτέλεσμα να σταματά η ενζυμική παραγωγή και τελικά η πρωτεϊνική σύνθεση και η παραγωγή γαλακτικού οξέος (Bakri et al., 2018). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε **στέλεχος *Staphylococcus aureus***, που είχε απομονωθεί **από δείγμα πουλερικών**.



Εικόνα 1.7: Απεικόνιση κυτταρικής μορφολογίας *S. aureus* (αριστερά), *E. faecalis* (κέντρο) και *E. coli* (δεξιά), μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). (Πηγή: <https://el.wikipedia.org/wiki/>)

### 1.3 Παραγωγή, χημικές ιδιότητες και περιβαλλοντική εμφάνιση οξειδίου του γραφενίου

Το οξείδιο του γραφενίου (graphene oxide, GO) πρόκειται για ένα διδιάστατο νανοσωματίδιο άνθρακα, αποτελούμενο από πολλά συνδεδεμένα κρυσταλλικά πλέγματα φύλλων γραφενίου, δηλαδή φύλλων άνθρακα εξαγωνικού πλαισίου (δηλ. κυψελωτής διδιάστατης διάταξης) και μονοατομικού πάχους (Geim, 2009). Το GO είναι τεχνητή ένωση που διαθέτει άφθονες δραστικές, οξυγονούχες λειτουργικές ομάδες (OCGs), με περιεκτικότητα σε οξυγόνα έως και 30 % w/v (Kurantowicz et al., 2015). Πιο συγκεκριμένα, διαθέτει ομάδες υδροξυλίου και εποξειδίου στην επιφάνεια του, ενώ καρβονυλικές και καρβοξυλικές ομάδες παρατηρούνται στις άκρες του (Dreyer et al., 2010; Kim et al., 2012; Chowdhury et al., 2014).

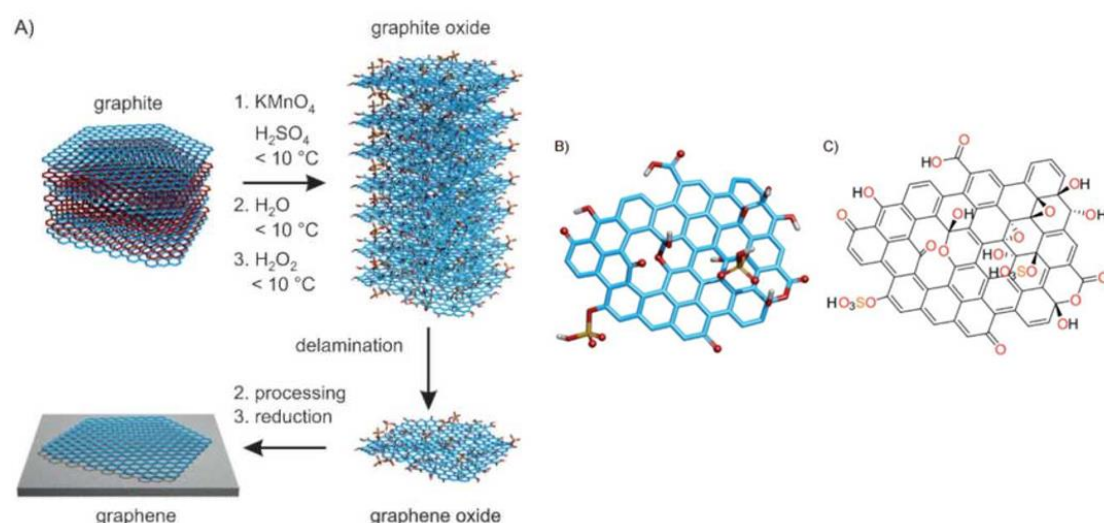
Η έναρξη για την έρευνά του GO τοποθετείται 150 χρόνια πριν, όταν παράχθηκε για πρώτη φορά μέσω χημικής επεξεργασίας του γραφίτη με χλωρικό κάλιο ( $\text{KClO}_3$ ) και ατμίζον νιτρικό οξύ ( $\text{HNO}_3$ ). Αρχικά, το οξείδιο του γραφενίου ονομάστηκε «οξύ του γραφίτη ή οξείδιο του γραφίτη» από το Βρετανό χημικό Brodie (Brodie, 1859), ωστόσο, το 2004, μετά την εκτεταμένης κλίμακας έρευνα για το γραφένιο, μετονομάστηκε σε οξείδιο του γραφενίου.

Το GO θεωρείται ως η σημαντικότερη πρόδρομη ένωση κατά την σύνθεση γραφενίου μέσω χημικών και θερμικών – αναγωγικών «bottom up<sup>2</sup>» τεχνικών όπως η χημική εναπόθεση ατμών (Chemical Vapor Deposition, CVD), η επιταξιακή ανάπτυξη σε μεταλλικά υποστρώματα και η επιταξιακή ανάπτυξη πάνω σε καρβίδια πυριτίου (silicon carbide, SiC) (Bae et al., 2010; Huang et al., 2012; Park, 2018). Επίσης, το GO αποτελεί τελικό ή ενδιάμεσο προϊόν κατά την παρασκευή γραφενίου, μέσω «top down<sup>3</sup>» τεχνικών αποφλοίωσης του γραφίτη. Ενδεικτικά παραδείγματα

<sup>2</sup> Τεχνικές παραγωγής γραφενίου από κατάλληλα σχεδιασμένες πρόδρομες ενώσεις που αντιδρούν χημικά μεταξύ τους προς σχηματισμό ομοιοπολικά συνδεδεμένων ατόμων άνθρακα τα οποία αποτελούν το διδιάστατο πλέγμα του γραφενίου.

<sup>3</sup> Πρόκειται για τεχνικές σύνθεσης γραφενίου που χρησιμοποιούν ως πρώτες ύλες υλικά τα οποία ήδη εμπεριέχουν τη δομή του γραφενίου.

τέτοιων τεχνικών είναι: η μηχανική αποφλοιώση με χρήση κολλητικής ταινίας (mechanical exfoliation based on scotch tape method) (Novoselov et al., 2004), η άλεση του γραφίτη με ανοξειδωτές σφαίρες (ball-milling) (León et al., 2011), καθώς και η χημική απολέπιση υγρής φάσης (liquid-phase exfoliation) με χρήση κατάλληλων διαλυτών ή/και επιφανειοδραστικών ουσιών, υπό την επίδραση ακτινοβολίας υπερήχων (Park et al., 2018). Η τελευταία αποτελεί και τη βασικότερη μέθοδο παραγωγής οξειδίου του γραφενίου κατά την οποία αρχικά πραγματοποιείται οξείδωση του γραφίτη από ισχυρά οξειδωτικά μέσα (π.χ.  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{KClO}_3$ ), σε διάλυμα ισχυρού οξέος (π.χ.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$ ) ή σε μίγματα αυτών (Hummers and Offeman, 1958; Marcano et al., 2010).



**Εικόνα 1.8:** (A) Σύνθεση οξειδίου του γραφίτη με οξείδωση του γραφίτη, ακολουθούμενη από αποκόλληση των στοιβάδων προς σχηματισμό οξειδίου του γραφενίου. Το γραφένιο σχηματίζεται κατόπιν αναγωγής του οξειδίου του γραφενίου με τη χρήση κατάλληλων χημικών αντιδραστηρίων. (B) και (C): Δομή του οξειδίου του γραφενίου (Eigler and Hirsch, 2014).

Αποτέλεσμα της χημικής οξείδωσης του γραφίτη είναι ο σχηματισμός διαφόρων οξυγονούχων χαρακτηριστικών ομάδων στις πλευρές των διδιάστατων πλεγμάτων του γραφενίου, καθώς και η εμφάνιση αρνητικών φορτίων σε αυτές. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 1.8, το προκύπτον οξείδιο του γραφίτη διατηρεί την αρχική τρισδιάστατη δομή του γραφίτη, αλλά η απόσταση μεταξύ των πλεγμάτων γραφενίου του αυξάνεται, λόγω της παρεμβολής των ατόμων οξυγόνου μεταξύ των επιπέδων. Τα οξειδωμένα πλέγματα του γραφενίου συγκρατούνται μεταξύ τους κυρίως με δεσμούς υδρογόνου, αλλά και με διαμοριακές ελκτικές αλληλεπιδράσεις τύπου van der Waals. Η ανάπτυξη διατμητικών δυνάμεων (shear forces), κατά την ακτινοβολία υπερήχων, επιφέρει διατάραξη των δεσμών van der Waals, που συγκρατούν τις στοιβάδες του γραφενίου. Συνεπώς, προκαλείται αποσταθεροποίηση της τρισδιάστατης δομής του οξειδίου του γραφίτη και απελευθέρωση διδιάστατων, αποφλοιωμένων φύλλων γραφενίου (οξειδίου του γραφενίου) στο διάλυμα, τα οποία απωθούνται λόγω αρνητικού φορτίου και σταθεροποιούνται από τον οργανικό διαλύτη, σχηματίζοντας σταθερά κolloειδή αιωρήματα (Eigler and Hirsch, 2014; Dreyer et al., 2010).

Αξίζει να τονισθεί ότι η δομή του οξειδίου του γραφενίου δεν είναι σταθερή και πλήρως καθορισμένη, λόγω της εξάρτησής της από τις εκάστοτε συνθήκες παρασκευής του GO, δηλαδή τη φύση του οξειδωτικού αντιδραστηρίου και τις συνθήκες της αντίδρασης. Ταυτόχρονα, οι σχηματιζόμενες οξυγονούχες λειτουργικές ομάδες στην δομή του GO έχουν διττό ρόλο και δράση. Αναλόγως του είδους τους, αφενός καθορίζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες, τη τάση συσσωμάτωσης, τη σταθερότητα, καθώς και την διαλυτότητα του GO (Azizighannad et al., 2018), αφετέρου λειτουργούν ως προσροφητικές θέσεις για διάφορους ρυπαντές (Ding et al., 2014). Γενικά το οξείδιο του γραφενίου εμφανίζει υδροφιλικότητα, με αποτέλεσμα να διασπείρεται εύκολα στο νερό, σχηματίζοντας κολλοειδή αιωρήματα τα οποία διατηρούν την σταθερότητά τους για πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα (Zhou et al., 2016).

Η δυνατότητα ελεγχόμενης διαμόρφωσης των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών του GO, η διατήρηση της διδιάστατης δομής του, η μεγάλη ειδική επιφάνεια (Loh et al., 2010) του, οι εξαιρετικές ηλεκτρικές (Novoselov et al., 2004), οπτικές (Nair et al., 2008) και μηχανικές ιδιότητες (π.χ. υψηλή αντοχή σε εφελκυσμό) που εμφανίζει, καθώς επίσης το γεγονός ότι εμπίπτει στην ίδια κλίμακα μεγέθους με άλλα βιολογικά μακρομόρια (π.χ. πρωτεΐνες), σε συνδυασμό με το χαμηλό κόστος παρασκευής του, λειτουργούν ως καθοριστικοί παράγοντες για την εκτεταμένη χρήση του GO σε διάφορες εφαρμογές. Χαρακτηριστικότερα, μεγάλο δυναμικό εφαρμογής του GO εντοπίζεται στους τομείς σύνθεσης πολυμερών υλικών, κατασκευής ηλεκτρονικών συσκευών, μετατροπής και αποθήκευση ηλεκτρικής ενέργειας, κατασκευής βιολογικών αισθητήρων και αισθητήρων ελέγχου ποιότητας αέρα εσωτερικών χώρων, αφαλάτωσης, φωτοκατάλυσης, επεξεργασίας/καθαρισμού νερού και υγρών αποβλήτων, βιοτεχνολογίας και βιοιατρικής (Zhao et al., 2015; He et al. 2015; Hegab and Zou 2015; Reddy et al. 2015; Song et al. 2015; Tang et al. 2015; Toda et al. 2015). Όσον αφορά στους τομείς της ιατρικής και της βιολογίας, αν και σε πρώιμο στάδιο μελέτης, έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προκληθεί αναφορικά με τη πιθανή χρήση του GO στη φωτοθερμική θεραπεία καρκίνου, στη μεταβίβαση γονιδίων, στη διερεύνηση της δομής του DNA, στην ανίχνευση πρωτεϊνών, ακόμα και στο διαχωρισμό και καθαρισμό βιολογικών μορίων και κυττάρων (Salata, 2004).

Ωστόσο, η εκτενής παραγωγή GO, σε συνδυασμό με το διευρυμένο πεδίο εφαρμογής του, αυξάνει δραματικά τις πιθανότητες διαφυγής του στο περιβάλλον, ιδιαίτερα από περιοχές ανεξέλεγκτης διάθεσης απορριμμάτων (Chrysikopoulos et al., 2017). Σε υδατικά περιβάλλοντα, λόγω της υδροφιλικότητάς του, το GO αναμένεται να εμφανίζει έντονη κινητικότητα (Chowdhury et al., 2013; Lanphere et al., 2013), επηρεάζοντας έτσι την εναπόθεση και μεταφορά των κολλοειδών σε πορώδη μέσα, ενώ ταυτόχρονα δρα ως μεταφορέας που ενισχύει την κινητικότητα οργανικών ενώσεων (Qi et al., 2014a) και μετάλλων (Zhou et al., 2016).

#### 1.4 Διεργασίες που ελέγχουν τη μεταφορά βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων σε πορώδη μέσα

Στο έδαφος τα κολλοειδή, μεταξύ αυτών βιοκολλοειδή και νανοσωματίδια, είτε μεταφέρονται ως ελεύθερα σωματίδια, είτε συνδέονται μεταξύ τους, καθώς και με άλλα κολλοειδή σωματίδια του εδάφους, οργανική ύλη ή και το λίπασμα (περιπτώσεις ομοσυσσωμάτωσης ή ετεροσυσσωμάτωσης). Οι κύριες φυσικές διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα είναι η μεταγωγή, η διασπορά, η διάχυση, η παρεμποδιζόμενη συγκράτηση και η φυσική διήθηση, η προσρόφηση, καθώς και η καθίζηση, σε περιπτώσεις που η επίδραση της συνισταμένης βαρυτικής δύναμης είναι σημαντική.

Έως σήμερα η δημοσιευμένη έρευνα που αφορά στη μεμονωμένη μεταφορά κολλοειδών και νανοσωματιδίων στο υπέδαφος είναι εκτενής, ωστόσο στο μεγαλύτερο μέρος της εστιάζει στην εξέταση της κορεσμένης ζώνης (Bales et al., 1989; Fontes et al., 1991; Harvey, 1997; Hornberger et al., 1992; McCarthy and McKay, 2004; Sen and Khilar 2006; Sen et al., 2004) παρά της ακόρεστης. Το γεγονός αυτό οφείλεται στην πολυπλοκότητα των επιπρόσθετων μηχανισμών μεταφοράς και συγκράτησης που επενεργούν στην ακόρεστη ζώνη, λόγω της ύπαρξης διεπιφάνειας υγρού – αέρα. Πιο συγκεκριμένα, στα ακόρεστα πορώδη μέσα εμφανίζονται φαινόμενα παρεμποδιζόμενης συγκράτησης κολλοειδών (Wan and Tokunaga, 1997; Bradford et al., 2006), συγκράτησης κολλοειδών στη διεπιφάνεια υγρού – αέρα (Crist et al., 2004, 2005; Gao et al., 2008; Zevi et al., 2005) και στερεού – υγρού – αέρα (Williams and Berg, 1992; Abdel-Fattah and El-Genk, 1998; Lazouskaya and Jin, 2006), καθώς και φαινόμενα εγκλωβισμού και εναπόθεσης κολλοειδών στην ακίνητη ζώνη (Cherrey et al., 2003; Gerner and Kaplan, 2001; Gao et al., 2006).

##### 1.4.1 Μεταγωγή - υδροδυναμική διασπορά και διάχυση

Η μεταφορά τόσο βακτηρίων όσο και των νανοσωματιδίων στο έδαφος ελέγχεται από τις υδραυλικές δυνάμεις της ροής των υπογείων υδάτων, ακολουθώντας τους ίδιους βασικούς μηχανισμούς που επικρατούν και κατά τη μεταφορά των αδρανών κολλοειδών και των μορίων των διαλυτών ενώσεων, δηλαδή τη μεταγωγή (advection), την υδροδυναμική διασπορά (hydrodynamic dispersion) και τη φυσικοχημική διασπορά ή μοριακή διάχυση (physico-chemical dispersion or molecular diffusion). Στην περίπτωση των έμβιων οργανισμών κατά τη μεταφορά υπάρχει ταυτόχρονη επενέργεια βιολογικών διαδικασιών/αντιδράσεων (για περισσότερες πληροφορίες δείτε Παράγραφο 1.5).

Με τον ευρύτερο όρο **διάχυση** αποδίδεται η αυθόρμητη τάση βακτηριακής μετακίνησης ή μετακίνησης νανοσωματιδίων από περιοχές μεγαλύτερης συγκέντρωσης κυττάρων ή νανοσωματιδίων προς περιοχές χαμηλότερης

συγκέντρωσης. Η διάχυση προκύπτει ως αποτέλεσμα της τυχαίας Brownian κίνησης των εν λόγω σωματιδίων, η οποία συνδέεται με την κινητική ενέργεια των μορίων. Η μοριακή διάχυση λαμβάνει χώρα όσο υπάρχει διαφορά συγκέντρωσης και είναι ανάλογη της αρνητικής βαθμίδας της συγκέντρωσης, αλλά δεν εξαρτάται από την κίνηση του νερού.

Ο ρυθμός αλλαγής στη συγκέντρωση κατά τη διάχυση περιγράφεται από τον πρώτο και δεύτερο νόμο του Fick (Logan, 2001). Η διάχυση ως διεργασία εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μοριακό βάρος και τη δομή των μορίων και δεν είναι συνάρτηση της κατεύθυνσης και της ταχύτητας διήθησης, δηλαδή έχει ίδια τιμή σε όλες τις κατευθύνσεις. Γενικά, ο ρυθμός μεταφοράς κολλοειδών λόγω μοριακής διάχυσης είναι αντιστρόφως ανάλογος του μεγέθους τους. Έχει παρατηρηθεί ότι η ταχύτητα των σωματιδίων αυξάνει κατά τη μείωση της διαμέτρου τους, με συνέπεια μικρότερα σωματίδια να εμφανίζουν υψηλότερους ρυθμούς διάχυσης.

Βάσει μελετών έχει αποδειχθεί πως κολλοειδή σωματίδια με διάμετρο 1 nm εμφανίζουν έως και τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερους ρυθμούς διάχυσης έναντι κολλοειδών με διαμέτρους της τάξης των μικρομέτρων ( $2.1 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  έναντι  $2.1 \times 10^{-13} \text{ m}^2/\text{s}$ ) (Shaw, 1998). Συνεπώς, η επίδραση της μοριακής διάχυσης στη μεταφορά των βακτηριακών κυττάρων στα συστήματα υπογείων υδάτων θεωρείται σχεδόν αμελητέα σε σχέση με την επίδραση της μεταγωγής, λόγω υπόγειας ροής, εξαιτίας του σχετικά μεγάλου μεγέθους τους ( $0.3 - 10 \text{ }\mu\text{m}$ ), (Chrysikopoulos and Sim, 1996). Για την περίπτωση των νανοσωματιδίων, η επίδραση της μοριακής διάχυσης ενδέχεται να είναι σχετικά μεγαλύτερη σε περιπτώσεις πολύ μικρών διαμέτρων της τάξης των nm, ωστόσο τις περισσότερες φορές στα διαθέσιμα μοντέλα μεταφοράς, θεωρείται και πάλι αμελητέα.

Σε ιδεατά πορώδη μέσα, αν θεωρηθεί πως η διάχυση πραγματοποιείται σε ευθύ κυλινδρικό πόρο παράλληλο στην κατεύθυνση της μεταφοράς μάζας, τότε η διαχυτότητα ταυτίζεται με την ολική διαχυτότητα. Ωστόσο, σε μη ιδεατά πορώδη μέσα (π.χ. εδαφική στερεά μήτρα) οι πόροι δεν είναι ευθείς, ούτε κυλινδρικοί, ούτε αναγκαστικά διατεταγμένοι παράλληλα στη κατεύθυνση της μεταφοράς μάζας. Επιπλέον, οι αποστάσεις των πορειών που διανύουν τα κολλοειδή σωματίδια, κατά την διάχυση τους εντός του πορώδους μέσου, είναι μεγαλύτερες συγκριτικά με το μήκος της απόστασης που θα εκτελούσαν αν ακολουθούσαν ευθεία πορεία παράλληλη στην κατεύθυνση της ροής.

Ο λόγος του πραγματικού μήκους της απόστασης που εκτελεί το κολλοειδές εντός του μέσου προς το μήκος της απόστασης στην περίπτωση ευθύγραμμης πορείας καλείται «δαιδαλώδες» των πόρων. Συνεπώς, για να προσδιοριστεί η **αποτελεσματική διαχυτότητα** (effective diffusion), η οποία εξαρτάται από τη στερεομετρία του πορώδους υλικού και βασίζεται στην ολική επιφάνεια που είναι εγκάρσια στην κατεύθυνση της διάχυσης, απαιτείται διόρθωση της ολικής διαχυτότητας, μέσω πολλαπλασιασμού με την τιμή του πορώδους του μέσου και διαίρεσης με την πειραματικά προσδιορισμένη τιμή του δαιδαλώδους, ώστε να συμπεριληφθούν και οι παράγοντες αυτοί.

Κατά τη **μεταγωγή** τα βιοκολλοειδή και τα νανοσωματίδια βρίσκονται υπό καθεστώς αιώρησης εντός ενός υδροφόρου στρώματος που ακολουθεί την κίνηση του υπόγειου ύδατος δια μέσω των πόρων. Η ενδοπορώδης ταχύτητα των υπογείων υδάτων εξαρτάται από την κλίση της υδραυλικής πίεσης, την κατανομή του πορώδους και τη διαπερατότητα (Keller and Auset, 2007; Ginn et al., 2002). Ακόμα και σε περιπτώσεις μέσων αποτελούμενων από πόρους σύνθετης γεωμετρίας, η επίλυση των εξισώσεων Navier – Stokes (σε κλίμακα πόρου) υποδεικνύει διατήρηση ενός σχεδόν παραβολικού τοπικού προφίλ ταχυτήτων, με τις μεγαλύτερες ταχύτητες να παρατηρούνται στο κέντρο των λαιμών των πόρων, και τις χαμηλότερες τιμές κατά μήκος των διεπιφανειών στερεού – νερού ή/και αέρα – νερού, καθώς και σε αδιέξοδες περιοχές των πόρων (dead – end pore spaces) (Baumann and Werth, 2004). Κατά συνέπεια, κολλοειδή που βρίσκονται πλησίον του κέντρου των πόρων, μεταφέρονται με υψηλότερους ρυθμούς ταχύτητας από εκείνα που βρίσκονται κατά μήκος διεπιφανειών και άλλων περιοχών χαμηλής ταχύτητας (π.χ. αδιέξοδοι πόροι).

Οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις στο πεδίο των ταχυτήτων του ρευστού και οι αλλαγές στη κατεύθυνσή του σε συνδυασμό με το δαιδαλώδες, που προκύπτει λόγω ετερογένειας των σωματιδίων του εδάφους και της δομής των πόρων, οδηγούν σε διαμήκη και εγκάρσια διασπορά των κολλοειδών, η οποία καλείται **μηχανική διασπορά** (mechanical dispersion) (Auset and Keller, 2004).

Η **υδροδυναμική διασπορά** προκύπτει ως αποτέλεσμα συνδυασμού των διεργασιών αποτελεσματικής διάχυσης και μηχανικής διασποράς. Ωστόσο, η μηχανική διασπορά διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στη μεταφορά των κολλοειδών σε σύγκριση με τη διάχυση, διότι εξαρτάται από την κατεύθυνση της ροής και αφορά σε κινηματικούς και δυναμικούς μηχανισμούς, που προκαλούνται από την ανομοιόμορφη ταχύτητα διήθησης στην κλίμακα των πόρων, μέσα στον ανομοιόμορφο χώρο των διακένων του πορώδους μέσου. Διαπιστώνεται άρα πως η ταχύτητα ροής του νερού είναι ο σημαντικότερος παράγοντας για τις διαδικασίες πρόσληψης και διασποράς.

Η μεταφορά των βιοκολλοειδών στα πορώδη μέσα μπορεί να περιγραφεί γενικά από την εξίσωση μεταγωγής (advection) – διασποράς (dispersion) – προσρόφησης (sorption) (ADS). Διάφορες εκφράσεις της εξίσωσης ADS έχουν χρησιμοποιηθεί για την περιγραφή της μεταφοράς των κολλοειδών και βιοκολλοειδών (Corapcioglu and Haridas, 1984, 1985; Murphy and Ginn, 2000; Powelson and Mills, 2001; Schijven and Hassanizadeh, 2001; Sen et al., 2005; Sim and Chrysikopoulos, 1995). Η μεταφορά των νανοσωματιδίων αποτελεί ακόμα ένα ανοιχτό ερευνητικό πεδίο. Τα νανοσωματίδια εκδηλώνουν τάση συσσωμάτωσης που επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις εκάστοτε συνθήκες υδατικής χημείας (π.χ. ιοντική ισχύ και pH), με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μικρότερη σταθερότητα σε σχέση με τα βιοκολλοειδή.

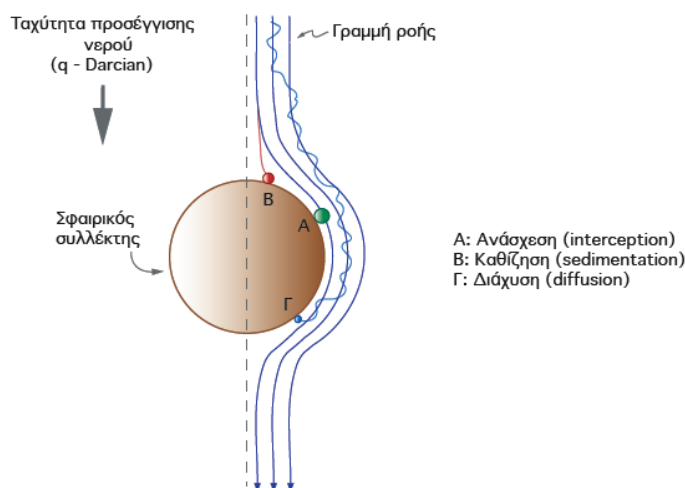
Μέχρι και σήμερα για την περιγραφή της μεταφοράς των νανοσωματιδίων εφαρμόζονται οι ίδιες εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για τα υπόλοιπα κολλοειδή, ωστόσο οι προσομοιώσεις μεταφοράς συχνά οδηγούν σε μη ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια πλήθος μελετών να



επικεντρώνουν στην ανάπτυξη περισσότερο αντιπροσωπευτικών μαθηματικών μοντέλων (Goldberg et al., 2014), που να λαμβάνουν υπόψη την επίδραση της συσσώματωσης (Katzourakis, 2018) και άλλων ενδεχόμενων μηχανισμών.

### 1.4.2 Μηχανισμοί που ελέγχουν τη διήθηση και τη συγκράτηση των αιωρούμενων κolloειδών

Οι σημαντικότεροι μηχανισμοί απόθεσης που ελέγχουν τη συγκράτηση, την αφαίρεση/απομάκρυνση και την προσρόφηση των αιωρούμενων κolloειδών σωματιδίων σε κορεσμένα πορώδη μέσα είναι η ανάσχεση (interception), η καθίζηση (sedimentation), η διάχυση (diffusion), η μηχανική διήθηση επιφάνειας, η παρεμποδιζόμενη συγκράτηση (straining), καθώς και η φυσικόχημική διήθηση (δηλ. προσκόλληση) (McDowell-Boyer et al., 1986; Yao et al., 1971).

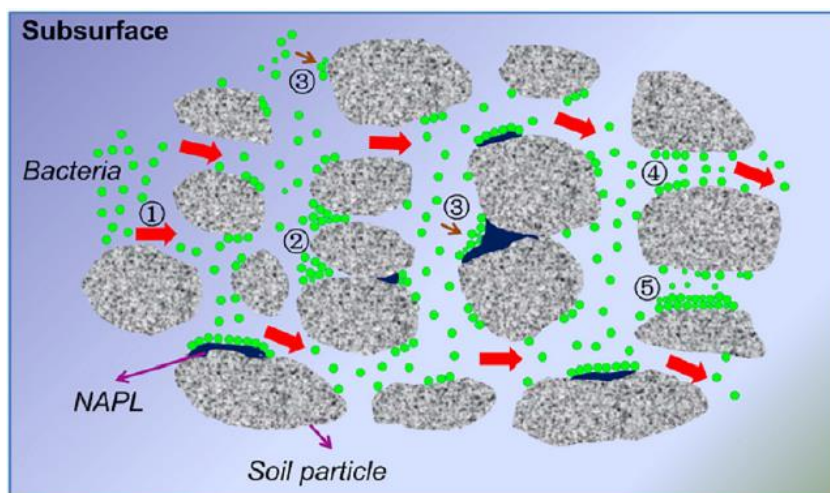


Εικόνα 1.9: Μηχανισμοί μεταφοράς αιωρούμενων στερεών στην επιφάνεια σφαιρικού συλλέκτη (Χρυσικόπουλος, 2014).

Η **ανάσχεση** των αιωρούμενων κolloειδών σε συλλέκτες (π.χ πληρωτικό υλικό στήλης, στερεό σκελετό πορώδους μέσου) επιτελείται σε περιπτώσεις μετακίνησής τους σε γραμμές ροής πολύ κοντά στην επιφάνεια του συλλέκτη, με αποτέλεσμα να ευνοείται η σύγκρουση μεταξύ αιωρούμενων σωματιδίων και συλλέκτη. Ο βαθμός ανάσχεσης αυξάνει όσο μεγαλώνει το μέγεθος των αιωρούμενων στερεών. Πιο συγκεκριμένα, θεωρείται ότι ο εν λόγω μηχανισμός επηρεάζει ως επί το πλείστον σωματίδια με μέγεθος μεγαλύτερο των 10  $\mu\text{m}$  (Χρυσικόπουλος, 2014).

Ο **μηχανισμός της καθίζησης** βασίζεται στη βαρύτητα και η συνεισφορά του είναι σημαντική μόνο σε περιπτώσεις που η ταχύτητα καταβύθισης των αιωρούμενων στερεών είναι αρκετά μεγαλύτερη από τη ταχύτητα διήθησης του νερού στην κλίση. Ο μηχανισμός αυτός καθίσταται σημαντικός για διαμέτρο σωματιδίων μεγαλύτερη από 1  $\mu\text{m}$  (Χρυσικόπουλος, 2014).

Όπως αναφέρθηκε και στην Παράγραφο 1.4.1, η **διάχυση** επηρεάζει τη μεταφορά, προκαλώντας αφαίρεση των σωματιδίων από την υδατική φάση, μόνο σε περιπτώσεις αιωρούμενων σωματιδίων μεγέθους μικρότερου από 1  $\mu\text{m}$ . Στις περιπτώσεις τόσο μικρών σωματιδίων παρατηρείται εκτροπή τους από την κύρια κατεύθυνση της γραμμής ροής (δείτε Εικόνα 1.9), λόγω έντονης επίδρασης της τυχαίας θερμικής κίνησης Brown, με αποτέλεσμα τα σωματίδια να μεταφέρονται στην επιφάνεια του συλλέκτη (Χρυσικοπουλος, 2014).



Εικόνα 1.10: Σχηματική αναπαράσταση διεργασιών βακτηριακής μεταφοράς σε υπόγεια πορώδη μέσα; [1] μεταγωγή-διασπορά, [2] εξαναγκασμένη συγκράτηση, [3] προσρόφηση, [4] έμφραξη, [5] συσσώρευση (Zhong et al., 2017).

Η **μηχανική διήθηση** εμφανίζεται όταν το μέγεθος των αιωρούμενων σωματιδίων στο εδαφικό διάλυμα είναι πολύ μεγάλο, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εισέλθουν στα κανάλια που σχηματίζονται μεταξύ των πόρων του μέσου. Η έμφραξη προκαλεί συσσώρευση σωματιδίων και οδηγεί στη δημιουργία ενός επιφανειακού στρώματος από την πλευρά του κόλπου του λαιμού των πόρων. Το επιφανειακό στρώμα πυκνώνει όσο στην περιοχή φτάνουν περισσότερα κολλοειδή σωματίδια, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός ροής, να αυξάνει τοπικά η τιμή της υδραυλικής κλίσης και να μειώνεται η διαπερατότητα.

Η **παρεμποδιζόμενη ή εξαναγκασμένη συγκράτηση** (straining) πρόκειται για μια διαδικασία φυσικής παγίδευσης των κολλοειδών σωματιδίων στους λαιμούς των πόρων. Λαμβάνει χώρα όταν οι διάμετροι των λαιμών των πόρων στους οποίους προσπαθούν να εισέλθουν τα βακτήρια ή τα νανοσωματίδια είναι πολύ μικρότεροι ή ίσοι με τη διάμετρό τους, ώστε να μην επιτρέπεται η διέλευση των σωματιδίων, με τελικό αποτέλεσμα την έμφραξή των πόρων, λόγω σύνδεσης των κολλοειδών στη διεπιφάνεια στερεού – νερού, καθώς και την αναστολή της μετακίνησής τους δια μέσου των πόρων (Porubcan and Xu, 2011).

Ο βαθμός συγκράτησης λόγω παρεμπόδισης εξαρτάται τόσο από τις ιδιότητες των διηθούμενων σωματιδίων όσο και τις ιδιότητες του πορώδους μέσου. Αρχικά, το μεγαλύτερο μέρος της δημοσιευμένης έρευνας εστίαζε στην μελέτη της επίδραση των

φυσικών παραγόντων (π.χ. μέγεθος βακτηρίων, κατανομή μεγέθους πόρων) στο δυναμικό παρεμποδιζόμενης συγκράτησης, με αποτέλεσμα η πρόβλεψη του κρίσιμου μεγέθους πόρων να στηρίζεται εξ' ολοκλήρου σε αυτές τις παραμέτρους (McDowell-Boyer et al., 1986; Bradford et al., 2002, 2003).

Ο βαθμός στον οποίο εμφανίζεται η παρεμπόδιση εξαρτάται από την αναλογία της διαμέτρου του σωματιδίου ( $d_p$ ) και του συλλέκτη ( $d_c$ ). Σε περίπτωση πορώδους μέσου αποτελούμενου από ομαλούς, σφαιρικούς συλλέκτες ομοιόμορφου μεγέθους, σημαντική έμφραξη κολλοειδών στην αυλάκωση (groove site or crevice sites) μεταξύ δύο εφαπτόμενων συλλεκτών και στις τριγωνικού σχήματος συστολές μεταξύ τριών εφαπτόμενων συλλεκτών έχει πειραματικά παρατηρηθεί, όταν ο λόγος των διαμέτρων κολλοειδών και διάμεσων κόκκων ( $d_p/d_c$ ) είναι μεγαλύτερος από 0.05 και 0.154 αντίστοιχα (Herzig et al., 1970). Μεταγενέστερες μελέτες (Bradford et al., 2002; 2005) έχουν αποδείξει ότι τα ανωτέρω θεωρητικά κριτήρια έμφραξης δημιουργούν σοβαρές υποεκτιμήσεις και ότι η παρεμπόδιση πρέπει να εξετάζεται όταν  $d_p/d_c > 0.002-0.005$ .

Ταυτόχρονα, η παρεμπόδιση εξαρτάται από το βάθος και μεγιστοποιείται στους κολπίσκους (εσωτερικό τμήμα) ή στην υφή της διεπιφάνειας μέσα στα πορώδη μέσα, όπου το μέσο μέγεθος κόκκου μειώνεται (Bradford et al., 2005). Επιπλέον, το σχήμα των βακτηριακών κυττάρων (Ginn et al., 2002; Lawrence and Hendry, 1996), ο βαθμός κορεσμού σε νερό (Stevik et al., 2004; Arturo and Auset, 2007), η υδατική χημεία καθώς και η υδροδυναμική (Bradford et al., 2007) αναμένεται να επηρεάζουν το βαθμό παρεμποδισμένης συγκράτησης. Ωστόσο ο τρόπος συνεισφοράς τους δεν έχει εξεταστεί διεξοδικά. Επίσης, τα επιφανειακά φορτία των βιοκολλοειδών μπορούν να προκαλέσουν άπωση από τις επιφάνειες των κόκκων, αποκλείοντας με τον τρόπο αυτό την βακτηριακή εμφάνιση σε ορισμένες περιοχές πόρων (Scheibe and Wood, 2003).

Στα φυσικά πορώδη μέσα, λόγω σύνθετης γεωμετρίας, οι περιοχές που αναμένεται να είναι πιο επιρρεπείς στην εμφάνιση παρεμποδισμένης συγκράτησης κολλοειδών είναι οι μικροί πόροι που διαμορφώνονται κοντά στα σημεία επαφής κόκκου – κόκκου, οι αδιέξοδους πόροι, η επιφάνεια του εδάφους, καθώς και τα όρια δύο διαφορετικών εδαφικών δομών, όπου τα κολλοειδή αντιμετωπίζουν ένα νέο δίκτυο πόρων (Cushing and Lawler, 1998; Bradford et al., 2003). Αν και ο μηχανισμός παρεμπόδισης συχνά κυριαρχεί κατά τη βακτηριακή μεταφορά στο φυσικό περιβάλλον (Bradford et al., 2006; Forppen et al., 2005; Forppen et al., 2007), παρόλα αυτά έχει λάβει λιγότερη προσοχή σε σχέση με τη διεργασία φυσικο – χημικής εναπόθεσης.

Ο μηχανισμός απομάκρυνσης/συγκράτησης μέσω *φυσικοχημικής εναπόθεσης*, που περιγράφεται από την κλασική θεωρία διήθησης, λαμβάνει χώρα όταν τα κολλοειδή σωματίδια είναι πολύ μικρά σε σχέση με το μέγεθος των πόρων και προσκολλώνται στο πορώδες μέσο, λόγω φυσικοχημικών αλληλεπιδράσεων με τους συλλέκτες (Xu et al., 2006). Όπως και στην περίπτωση των μοριακών συστημάτων, τα βιοκολλοειδή και τα νανοσωματίδια μπορούν να προσροφηθούν στις επιφάνειες

των γεωλογικών υλικών, με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται λεπτά στρώματα με αυξημένη συγκέντρωση βιοκολλοειδών ή νανοσωματιδίων κοντά στη διεπιφάνεια υγρού – στερεού (περίπτωση κορεσμένης ζώνης). Οι κύριες δυνάμεις που έλεγχουν το βαθμό και το είδος της προσρόφησης (π.χ. αντιστρεπτή ή μη – αντιστρεπτή) είναι η διασπορά και οι μικρού εύρους ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των κολλοειδών και των στερεών επιφανειών. Η μη αντιστρεπτή απόθεση πραγματοποιείται σε περιπτώσεις χημικής προσρόφησης, δηλαδή όταν αναπτύσσεται χημική σύζευξη μεταξύ κολλοειδούς σωματιδίου και επιφάνειας. Στις περιπτώσεις αυτές δεν παρατηρείται επαναιώρηση των κολλοειδών στην υδατική φάση (Adamczyk et al., 2005).

Στην παρούσα μελέτη για την ποσοτικοποίηση του δυναμικού προσκόλλησης των νανοσωματιδίων GO και των βακτηρίων στη χαλαζιακή άμμο, χρησιμοποιήθηκε η κλασική θεωρία διήθησης κολλοειδών (Classical Colloid Filtration Theory-CFT), λαμβάνοντας υπόψη τους μηχανισμούς της ανάσχεσης, καθίζησης και διάχυσης. Κύριες παραδοχές της CFT είναι πως (α) η αφαίρεση των σωματιδίων περιγράφεται από κινητικές πρώτης τάξης με ένα χωρο-χρονικά σταθερό ρυθμό απόθεσης σωματιδίων, και (β) πως οι συγκεντρώσεις των αιωρούμενων και συγκρατημένων σωματιδίων μειώνονται log-γραμμικά σε σχέση με την απόσταση.

Ωστόσο, σε αποτελέσματα μεταγενέστερων μελετών (Tufenkji and Elimelech, 2004) παρατηρήθηκε υπερ – εκθετική μείωση της συγκράτησης κολλοειδών σε σχέση με την απόσταση, γεγονός που υποδεικνύει πως ο συντελεστής ρυθμού προσκόλλησης δεν διατηρείται σταθερός. Απουσία παρεμποδιζόμενης συγκράτησης (straining), η παρατηρούμενη υπερ – εκθετική απόκλιση από την CFT θα μπορούσε να αποδοθεί στην συνύπαρξη ευνοϊκών και δυσμενών αλληλεπιδράσεων μεταξύ κολλοειδών και επιφανειών του συλλέκτη (Tufenkji and Elimelech, 2004). Στην περίπτωση ελκτικών ενεργειών αλληλεπίδρασης μεταξύ των κολλοειδών ενοείται η απόθεση τους στο συλλέκτη, ενώ δυσμενής εναπόθεση παρατηρείται κατά την επικράτηση απωθητικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κολλοειδών.

### 1.5 Βιολογικές διεργασίες

Εκτός των προαναφερθέντων διαδικασιών, στην περίπτωση υπόγειας μετακίνησης βιοκολλοειδών, πραγματοποιούνται επίσης βιολογικές διεργασίες, άμεσα συσχετιζόμενες με την παρουσία, τη φυσική κατάσταση και την πυκνότητα άλλων χημικών ουσιών στο εδαφικό διάλυμα. Επί παραδείγματι, ο χημειοτακτισμός είναι ένα φαινόμενο που επηρεάζει σημαντικά τη μεταφορά των κυττάρων στο έδαφος. Χαρακτηριστικότερα, τα κύτταρα κατά την πορεία κίνησής τους λαμβάνουν ερεθίσματα από ειδικούς υποδοχείς της επιφάνειάς τους, με αποτέλεσμα κατά την ανίχνευση μεταβολών στην πυκνότητα μιας χημικής ουσίας στο περιβάλλον να μεταβάλλουν την κινητικότητά τους. Κατά τη χημειόταξη, αναπτύσσεται είτε χημειοαπωθητική αντίδραση, δηλαδή περιορισμός της κίνησης του βακτηριακού

κυττάρου, με σκοπό την απομάκρυνση του από περιοχές υψηλής συγκέντρωσης χημειοαπωθητικών ενώσεων, που επηρεάζουν το σύστημα υποδοχέων – μαστιγίων, είτε χημειοελκτική αντίδραση, δηλαδή αύξηση της κίνησης του κυττάρου που αποσκοπεί σε προσέγγιση της χημειοελκυστικής ουσίας.<sup>4</sup>

Επιπλέον κατά την περιβαλλοντική μετακίνηση των βακτηριακών κυττάρων πραγματοποιούνται βιολογικές διαδικασίες αύξησης ή/και αποσύνθεσης/θανάτωσης. Σε αυτές περιλαμβάνονται η ενεργή προσκόλληση / αποκόλληση, η αδρανοποίηση, ο παρασιτισμός και από αυτές εξαρτάται άμεσα η βακτηριακή επιβίωσή σε πορώδη μέσα.

Με τον όρο αδρανοποίηση ορίζεται η διαδικασία κατά την οποία τα βιοκολλοειδή χάνουν την ικανότητα αναπαραγωγής τους. Η αδρανοποίηση των βακτηρίων στο υπέδαφος και τα απόγεια ύδατα συνήθως περιγράφεται με κινητική αντίδραση ψευδό-πρώτης τάξης (εξίσωση (1.5.1)) (Reddy et al., 1981; Chrysikopoulos and Sim, 1996), η οποία χαρακτηρίζεται από έναν χρονικά εξαρτώμενο συντελεστή περιγραφής του ρυθμού θνησιμότητας, που συχνά διαφέρει για κάθε είδος βιοκολλοειδούς.

$$C_{i,t} = C_{i,0} e^{-\lambda(t)t} \Rightarrow \ln \left[ \frac{C_{i,t}}{C_{i,0}} \right] = -\lambda(t)t$$
$$\text{ή } \log_{10} \left[ \frac{C_{i,t}}{C_{i,0}} \right] = -\frac{\lambda(t)}{2.3} t \quad (1.5.1)$$

Στην παραπάνω εξίσωση (1.5.1) με  $C_{i,t}$  συμβολίζεται η συγκέντρωση του εκάστοτε είδους μικροοργανισμών μετά από χρόνο  $t$ , με  $C_{i,0}$  συμβολίζεται η αρχική συγκέντρωση των μικροοργανισμών και  $\lambda(t)$  είναι ο χρονικά εξαρτημένος συντελεστής ρυθμού αδρανοποίησης, σε μονάδες  $[1/t]$ . Ο εν λόγω συντελεστής περιγράφεται από την ακόλουθη πρωτοβάθμια κινητική εξίσωση (1.5.2) στην οποία η παράμετρος  $\beta$  αντιπροσωπεύει τον συντελεστή ανθεκτικότητας του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους.

$$\lambda(t) = \lambda_0 e^{-\beta t} \quad (1.5.2)$$

<sup>4</sup> Ο χημειοτακτισμός επιτελείται μετά από αλληλεπίδραση των υποδοχέων με πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οδό μετάδοσης του σήματος ώστε το αρχικό ερέθισμα να τροποποιήσει τη φορά στροφής του μαστιγίου.

### 1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τη βακτηριακή μεταφορά και επιβίωση

Η περιβαλλοντική τύχη και η εξασθένηση των μικροοργανισμών εντερικής προέλευσης στο υπέδαφος και ιδιαίτερα στην κορεσμένη ζώνη επηρεάζονται σημαντικά από πληθώρα φυσικοχημικών και μικροβιολογικών παραγόντων (Bradford, 2013; Fontes, 1991). Στους φυσικοχημικούς παράγοντες συμπεριλαμβάνονται η θερμοκρασία, το ποσοστό υγρασίας, ο βαθμός κορεσμού, η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου, το είδος της οργανικής ύλης (π.χ. χουμικά, υματομελανικά και φουλβικά οξέα), το pH, η ύπαρξη διαλυτού και σωματιδιακού οργανικού άνθρακα (DOC, POC), η ιοντική ισχύς του εδαφικού διαλύματος, η αλατότητα, καθώς και η διαθεσιμότητα μετάλλων και θρεπτικών συστατικών (π.χ. άζωτο, φώσφορος, θείο, ανθρακικό ασβέστιο κλπ). Όσον αφορά στους μικροβιολογικούς παράγοντες, σε αυτούς περιλαμβάνονται ο μικροβιακός ανταγωνισμός λόγω ύπαρξης γηγενών πληθυσμών εδαφικών βακτηρίων, η ποσότητα σε πρωτεΐνες και προϊόντα αποσύνθεσης.

#### ➤ Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία συνιστά ίσως τον σημαντικότερο παράγοντα επηρεασμού της αδρανοποίησης των βιοκολλοειδών στο περιβάλλον. Οι Bigelow και Esty (1920) ήταν οι πρώτοι ερευνητές που ασχολήθηκαν με τη διεξοδική διερεύνηση του τρόπου επίδρασης της θερμοκρασίας στην αδρανοποίηση των θερμοφιλικών μικροοργανισμών. Παρατήρησαν ότι σε δεδομένη θερμοκρασία, η σχέση που συνδέει τον αριθμό των απομείναντων ζώντων μικροοργανισμών και τον χρόνο έκθεσής τους στη θερμοκρασία αυτή είναι σταθερή.

Η πλειοψηφία των εργαστηριακών μελετών υποδεικνύουν αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ θερμοκρασίας και βακτηριακής επιβίωσης (Jamieson et al., 2002). Κατά την εφαρμογή μεθόδων θερμικής επεξεργασίας σε διάφορους τύπους μικροοργανισμών (π.χ. βακτηριακά σπόρια, ζυμομύκητες, φυτικά βακτήρια κα) παρατηρήθηκε ότι η θερμική αντοχή των μικροοργανισμών ποικίλει εξαιτίας της διαφορετικής δομής και σύνθεσής τους (Cebrián et al., 2017). Συνεπώς, ανάλογα το είδος του εξεταζόμενου μικροοργανισμού, η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει σε διαφορετικό βαθμό το ρυθμό αδρανοποίησης. Σε μεσόφιλες θερμοκρασίες (10 – 30 °C) έχουν εντοπιστεί μεγάλες διαφοροποιήσεις στις τιμές των ρυθμών αδρανοποίησης των βακτηρίων, λόγω μεταβολής της φυσικής σταθερότητας της κυτταρικής τους μεμβράνης, η οποία από κρυσταλλική γέλη σε χαμηλές θερμοκρασίες λαμβάνει μία υγρή κρυσταλλική δομή σε υψηλότερες (Aronsson and Ronner, 2001).

Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί γρηγορότερη αδρανοποίηση των βακτηρίων κοπρανώδους προέλευσης (π.χ. *E.coli*, *Faecal coliforms*, *Faecal streptococci*) σε σχέση με τους ρυθμούς αδρανοποίησης των εντερικών ιών. Για παράδειγμα, οι ρυθμοί των βακτηρίων περίπου διπλασιάστηκαν κατά την άύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C (Reddy et al., 1981), ενώ στην περίπτωση των εντερικών ιών, θερμοκρασιακή αύξηση της τάξης των 20 °C οδήγησε σε αύξηση των ρυθμών αδρανοποίησης κατά

μια μόλις τάξη μεγέθους (Συγγούνα, 2012). Αντίθετα, αποτελέσματα άλλων μελετών υποδεικνύουν ότι συγκριτικά με τους ιούς τα κολοβακτηρίδια παρουσιάζουν μικρότερη ευαισθησία σε υψηλές θερμοκρασίες στα υπόγεια ύδατα (John and Rose, 2005).

Τα παραπάνω αντικρουόμενα πορίσματα προκύπτουν λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας που διακρίνει τα συστήματα υπογείων υδάτων. Συνεπώς, η παρατηρούμενη αύξηση στη θνησιμότητα των παθογόνων βακτηρίων στα υπόγεια νερά, ενδέχεται να οφείλεται στο γεγονός ότι η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να προκαλεί ταυτόχρονη αύξηση της δραστηριότητας των εγχώριων μικροοργανισμών και εμφάνιση ανταγωνιστικής δράσης. Αντίθετα, η άλλοτε αυξημένη ανθεκτικότητα μπορεί να προκύπτει ως αποτέλεσμα εναλλαγής μεταξύ των διαδικασιών αδρανοποίησης και αναπαραγωγής, υπό την επίδραση των υπολοίπων φυσικοχημικών παραγόντων στα υπόγεια ύδατα (John and Rose, 2005).

Παρότι καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολος ο εντοπισμός της ακριβούς κυτταρικής βλάβης που προκαλείται λόγω θερμοκρασιακής αύξησης (Manas et al., 2003), έχει προταθεί ότι ο κυτταρικός θάνατος μπορεί να επέλθει ως αποτέλεσμα εκτεταμένης δομικής βλάβης (π.χ. μη αναστρέψιμη μετουσίωση μεμβρανών), απώλειας ενδοκυτταρικού υλικού, αλλαγής της διαμόρφωσης του DNA και άλλων ριβοσωμικών αλλοιώσεων (Cebrián et al., 2017). Τέλος αξίζει να τονισθεί ότι μέχρι και σήμερα η διαθέσιμη πληροφορία σχετικά με τον ακριβή τρόπο επίδρασης της θερμοκρασίας στη μεταφορά των βακτηρίων στο έδαφος είναι περιορισμένη.

### ➤ pH

Για κάθε είδος αυτόχθονων ή/και εισαγόμενων μικροοργανισμών του υπεδάφους εντοπίζεται ένα στενό εύρος pH που είναι βέλτιστο για την αναπτυξή τους. Για τα περισσότερα ανθρώπινα παθογόνα βακτήρια (εντερικά βακτήρια), το βέλτιστο εύρος pH που προωθείται η αναπτυξή τους, βρίσκεται στην ουδέτερη περιοχή (~6-7) (Reddy et al., 1981). Λόγω της τάσης εκληματισμού και προσαρμογής τους, τα βακτήρια δύνανται να παρουσιάσουν αντοχή και σε ευρύτερα εύρη pH, αρκεί η έκθεσή τους στα εν λόγω περιβάλλοντα να είναι σύντομη. Αντίθετα, παρατεταμένη έκθεση σε ακραίες όξινες (<<7) ή βασικές τιμές (>>7) pH, προκαλεί έντονο στρες και αλλαγή των δομικών χαρακτηριστικών των βακτηρίων, οδηγώντας σε ταχεία θανάτωση των πληθυσμών (Forpen and Schijven, 2006).

Ο τρόπος με τον οποίο το pH, επηρεάζει την επιβίωση και τη μεταφορά των παθογόνων είναι ότι προκαλεί αλλαγή του επιφανειακού τους φορτίου, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και εδαφικής μήτρας. Σε γενικές γραμμές, τα βακτήρια φέρουν αρνητικό επιφανειακό φορτίο που προκύπτει από τον ιοντισμό των καρβοξυλικών ομάδων και αμινο-ομάδων των επιφανειακών τους πρωτεϊνών. Η μεταβολή του pH του εδαφικού διαλύματος, αλλάζει το βαθμό ιοντισμού των προαναφερόμενων χημικών ομάδων, προκαλώντας μετατόπιση του καθαρού σθένους και της πολικότητας του επιφανειακού φορτίου (Συγγούνα, 2012). Σε μια συγκεκριμένη τιμή pH που

καθορίζεται από το είδος και τη μοριακή δομή των επιφανειακών πρωτεϊνών, το καθαρό φορτίο μηδενίζεται. Το σημείο μηδενισμού ονομάζεται ισοηλεκτρικό σημείο ( $pH_{IEP}$ ) και διαφέρει για διαφορετικά βακτηριακά είδη. Όταν  $pH < pH_{IEP}$ , τότε τα βακτήρια είναι θετικά φορτισμένα, ενώ όταν  $pH > pH_{IEP}$ , τα βακτήρια είναι αρνητικά φορτισμένα. Ταυτόχρονα, η τιμή του  $pH$ , καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την προσρόφηση των βακτηρίων στην εδάφική μήτρα και επηρεάζει την κινητικότητά τους στους υπόγειους υδροφορείς. Ιδιαίτερα, η προσρόφηση προκαλεί μείωση του ρυθμού βακτηριακής αδρανοποίησης, προωθώντας την επιβίωση των παθογόνων.

Έχει παρατηρηθεί ότι το  $pH$  των ρυπασμένων υπογείων υδάτων χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα, εμπίπτοντας στη περιοχή 6.5-8.5 (Robertson and Edberg, 1997). Σε αυτές τις τιμές  $pH$  τόσο η επιφάνεια της εδαφικής μήτρας όσο και η επιφάνεια των βακτηρίων είναι αρνητικά φορτισμένες. Συνεπώς, στα περιβάλλοντα αυτά οι μικροοργανισμοί απωθούνται από τους κόκκους των γεωλογικών σχηματισμών, λόγω ομόσημου φορτίου, και παρατηρείται χαμηλή τάση προσρόφησης, με αποτέλεσμα να ευνοείται η βακτηριακή κινητικότητα και διασπορά. Αντίθετα, σε όξινα εδαφικά περιβάλλοντα, και κυρίως όταν στο υπέδαφος εμφανίζονται όξινοι γνεύσιοι και γρανίτες, το  $pH$  κυμαίνεται μεταξύ 5.5-6.5. Στις συνθήκες αυτές, το επιφανειακό φορτίο λαμβάνει θετικές τιμές με αποτέλεσμα να προωθείται η προσρόφηση των βακτηρίων στην αρνητικά φορτισμένη εδαφική μήτρα, λόγω ηλεκτροστατικής έλξης, και να μειώνεται η κινητικότητά τους.

Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η επιβίωση των βακτηρίων εντερικής προέλευσης είναι μεγαλύτερη σε αλκαλικά (66.11%) από ότι όξινα περιβάλλοντα (7.5%) (Wahyuni, 2014). Ωστόσο, υπάρχουν και βακτήρια τα οποία ευδοκιμούν σε όξινες συνθήκες παρόλο που στο εσωτερικό τους το  $pH$  είναι ουδέτερο, ενώ άλλα κατά την ανάπτυξή τους παράγουν οξέα με αποτέλεσμα να μεταβάλλουν και το  $pH$  του περιβάλλοντος χώρου τους. Η μεταβολή του  $pH$  στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, έχει σαν αποτέλεσμα την διακοπή της ανάπτυξής τους εκτός και αν κάποιος άλλος παράγοντας την εξουδετερώσει. Γενικά, τα γεωλογικά υλικά των περισσότερων υδροφορέων εκδηλώνουν σημαντική ρυθμιστική ικανότητα, που βοηθά στην εξουδετέρωση των αλλαγών και στη διατήρηση ενός σχετικά σταθερού  $pH$ .

### ➤ *Μικροβιακή δραστηριότητα*

Υπάρχουν διάφορα αντικρουμένα πορίσματα αναφορικά με τον τρόπο επίδρασης των αυτόχθονων μικροβιακών πληθυσμών στην αδρανοποίηση των νεοεισαχθέντων βακτηρίων στο υπέδαφος. Η δυσκολία διεξαγωγής ενός σαφούς συμπεράσματος έγκειται αφενός στο ότι οι μηχανισμοί οι οποίοι λαμβάνουν δράση σε κάθε περίπτωση δεν είναι πλήρως καθορισμένοι και αφετέρου στην ανικανότητα ανίχνευσης των πληθυσμών που δραστηριοποιούνται σε κάθε περίπτωση.

Στην περίπτωση των εντερικών βακτηρίων, οι περισσότερες διαθέσιμες εργαστηριακές μελέτες συγκλίνουν στο ότι η γηγενής μικροβιακή δραστηριότητα προκαλεί αύξηση του ρυθμού αδρανοποίησης. Γενικότερα, η ύπαρξη εγχώριων μικροοργανισμών οδηγεί σε αυξημένη ανταγωνιστικότητα αναφορικά με την



κατανάλωση των περιοριστικών θρεπτικών υποστρωμάτων. Ωστόσο, για να προκύψουν αξιόπιστα αποτελέσματα, είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθούν οι ίδιες πειραματικές δοκιμές σε αποστειρωμένες αλλά και μη αποστειρωμένες συνθήκες.

Σε μελέτη που εξετάστηκαν θερμοανθεκτικά κολοβακτηρίδια και *E. coli*, διαπιστώθηκε ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης των υπό δοκιμή οργανισμών σε αποστειρωμένα περιβάλλοντα, ενώ οι συγκεντρώσεις παρέμειναν στατικές ή μειώθηκαν σε μη αποστειρωμένα περιβάλλοντα (Gebra and McLeod, 1976). Στα ίδια αποτελέσματα κατέληξαν και άλλες μελέτες (Gordon and Toze, 2003) όπου παρατηρήθηκε μικρότερη απώλεια εισαχθέντων βακτηρίων σε υπόγειους υδροφορείς υπό συνθήκες απουσίας εγχώριων πληθυσμών.

Ωστόσο, ο τρόπος επίδραση της γηγενούς μικροβιακής δραστηριότητας στην επιβίωση των βακτηρίων σχετίζεται άμεσα με το είδος των αυτόχthonων πληθυσμών. Για παράδειγμα, ο ρυθμός αδρανοποίησης του βακτηρίου *E.coli* αυξήθηκε σημαντικά κατά την απελευθέρωση πληθυσμού πρωτόζωων στο ίδιο περιβάλλον (Tate, 1978). Επίσης, η παρουσία φάγων επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τη βακτηριακή επιβίωση, λόγω έντονης ανταγωνιστικής αλληλεπίδρασης (Bradford et al., 2013). Αντίθετα, σε περιπτώσεις συνύπαρξης βακτηρίων και ιών (*Coxsackie*) παρατηρήθηκε αδρανοποίηση των ιών, λόγω ικανότητας των βακτηρίων να απελευθερώνουν πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία καταστρέψαν την πρωτεϊνική κάψα των ιών (Cliver and Herrman, 1972). Η αντιϊκή δράση των βακτηρίων έχει επιβεβαιωθεί και από άλλους ερευνητές (Fujioaka et al., 1980). Σε αντίθετα αποτελέσματα κατέληξε η έρευνα των Matthess et al. (1987), σύμφωνα με την οποία ρυθμός αδρανοποίησης των ιών δεν διαφοροποιήθηκε κατά την μετάβαση από αποστειρωμένες σε μη αποστειρωμένες υδατικές συνθήκες. Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με τη θερμοκρασία, η ύπαρξη μικροβιακής δραστηριότητας δεν παρατηρήθηκε να επηρεάζει καθόλου την φάση αποσύνθεσης των βακτηρίων (Yates et al., 1990).

### ➤ *Εδαφική υγρασία*

Σε πολλές περιπτώσεις έχει παρατηρηθεί ότι η τύχη και η επιβίωση των βακτηρίων, και ιδιαίτερα αυτών εντερικής προέλευσης, στα εδαφικά συστήματα επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το ποσοστό της υγρασίας (Roberston and Edberg, 1997) σε συνδυασμό με την κατανομή του μεγέθους των σωματιδίων του εδάφους και το περιεχόμενο οργανικής ουσίας (Jamieson et al., 2002). Ωστόσο το μέγεθος της επίδρασης δεν έχει αποσαφινιστεί πλήρως.

Συχνά η υγρασία επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η ηλιακή ακτινοβολία. Ιδιαίτερα σε ξηρά εδάφη η απουσία υγρασίας ευνοεί την ταχύτερη και αποτελεσματικότερη διέλευση της ηλιακής ακτινοβολίας, η οποία υποβοηθά την αδρανοποίηση των μικροοργανισμών (Κουμάκη, 2017).

Για παράδειγμα, σε έρευνα κατά την οποία εξετάστηκε η αδρανοποίηση του βακτηρίου *E.coli* μετά από χρόνο επώασης 8 ημερών σε δύο εδαφικά δείγματα από τη νότια Φλόριντα (Roper and Marshall, 1978), παρατηρήθηκε ότι στο εδαφικό δείγμα με το μεγαλύτερο ποσοστό υγρασίας (63%) ο βαθμός επιβιώσής του βακτηρίου ήταν

τριπλάσιος σε σχέση με αυτόν που μετρήθηκε στο δείγμα χαμηλότερης περιεχόμενης υγρασίας (17%). Συνεπώς, θα μπορούσε να υποστηριχθεί ότι η υγρασία ευνοεί την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων στην κορεσμένη ζώνη και προωθεί τη βακτηριακή επιβίωση στην ακόρεστη ζώνη.

### ➤ *Παρουσία και συγκέντρωση αλάτων*

Η προώθηση ή η επιβράδυνση της περιβαλλοντικής μεταφοράς των παθογόνων μικροοργανισμών στο υπέδαφος καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη συγκέντρωση και το είδος των αλάτων/ιόντων που απαντώνται σε αυτό. Ωστόσο, υπάρχουν βακτήρια που εμφανίζουν ανθεκτικότητα σε αλατούχα περιβάλλοντα, αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, λόγω της ικανότητάς τους να εξισορροπούν τις συγκεντρώσεις αλάτων μεταξύ ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού περιβάλλοντος (Essendoubi et al., 2007). Αντίθετα, μικροοργανισμοί που δεν έχουν την ικανότητα εξισορρόπησης, οδηγούνται σε οσμωτικό στρες και αναστέλλεται η ανάπτυξή τους (Bradford et al., 2013).

Πολυάριθμες μελέτες μεταφοράς υποδεικνύουν ότι ιοντική ισχύς του υδατικού διαλύματος επηρεάζει τον αριθμό των διαθέσιμων προσροφητικών θέσεων στην εδαφική μήτρα καθώς και τη διαδικασία διεπιφανειακής γεφύρωσης μεταξύ μικροοργανισμών και συλλεκτών (Taylor et al., 1981; Simoni et al., 2000). Πιο συγκεκριμένα, αυξομειώσεις στην συγκέντρωση των αλάτων είναι ικανές να προκαλέσουν μεταβολές στο πάχος της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας που περιβάλλει τα βακτήρια και τα σωματίδια του εδάφους, με αποτέλεσμα να αλλάζουν οι μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της ιοντικής ισχύος επιφέρει συρρίκνωση του διπλού στρώματος, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η διεπιφανειακή έλξη μεταξύ συλλέκτη και βακτηριακών κυττάρων. Η έλξη ευνοεί τη σύνδεση των βακτηρίων στη στερεά μήτρα, δηλαδή την προσρόφηση, και άρα επιβραδύνεται η μεταφορά των βακτηρίων (Penrod et al., 1996).

Μάλιστα έχει διαπιστωθεί πειραματικά (Lance and Gebra, 1984) ότι τα δισθενή (π.χ.  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) και πολυσθενή κατιόντα, ενισχύουν αποτελεσματικότερα την προσρόφηση των μικροοργανισμών σε εδαφικά υλικά και στερεά υγρών αποβλήτων σε σχέση τα μονοσθενή, λόγω δημιουργίας γεφύρωσης (Shein and Devin, 2007). Επίσης, ανιόντα όπως τα  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  και  $H_2PO_4^-$  ενισχύουν περισσότερο την προσρόφηση σε σχέση με το ανιόν χλωρίου  $Cl^-$  (Lance and Gebra, 1984). Αντίθετα, μείωση της αλατότητας ή της ιοντικής ισχύος του εδαφικού διαλύματος, που σε πραγματικές συνθήκες μπορεί να προκληθεί λόγω διήθησης νερού στο υπέδαφος κατά τη διάρκεια βροχοπτώτικών συμβάντων, δύναται να προκαλέσει εκρόφηση των ροφημένων βακτηρίων (Gerba and Bitton, 1984), λόγω αύξησης της ηλεκτροστατικής άπωσης μεταξύ συλλεκτών και βακτηριακής επιφάνειας (δηλ. αύξηση του πάχους των διπλοστοιβάδων).

Προφανώς, η παρατεταμένη διατήρηση ευνοϊκών συνθηκών για προσρόφηση των μικροοργανισμών συμβάλλει στην μακροχρόνια επιβίωσή τους και άρα ελαχιστοποιεί την αδρανοποίησή τους. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα

ότι σε πραγματικές περιβαλλοντικές συνθήκες η ιοντική ισχύς αναμένεται να επηρεάζει περισσότερο τη βακτηριακή μεταφορά και αδρανοποίηση σε σχέση με το pH, διότι το pH συνήθως κυμαίνεται εντός της ουδέτερης περιοχής, όπου και ευνοείται η μικροβιακή ανάπτυξη.

### ➤ Παρουσία οργανικής ύλης

Η επίδραση της οργανικής ύλης στην μικροβιακή επιβίωση και μετακίνηση δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, ενώ φαίνεται να διαφέρει ακόμα και μεταξύ στελεχών της ίδιας βακτηριακής ομάδας.

Όσον αφορά στην επιβίωση, έχει παρατηρηθεί, ιδιαίτερα για την περίπτωση βακτηριδίων εντερικής προέλευσης, ότι η παρουσία οργανικής ύλης λειτουργεί ως πηγή θρεπτικών στοιχείων, προάγοντας την ανάπτυξη και επεκτείνοντας την βακτηριακή επιβίωση. Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια περιόδου οκτώ ημερών παρατηρήθηκε ότι η επιβίωση στελέχους *E. coli* σε οργανικό έδαφος που είχε εμπλουτιστεί με εφαρμογή λιπάσματος ήταν τρεις φορές μεγαλύτερη από την παρατηρούμενη επιβίωση του ίδιου στελέχους σε δείγμα αμμώδους εδάφους όπου απουσίαζε οργανικό περιεχόμενο.

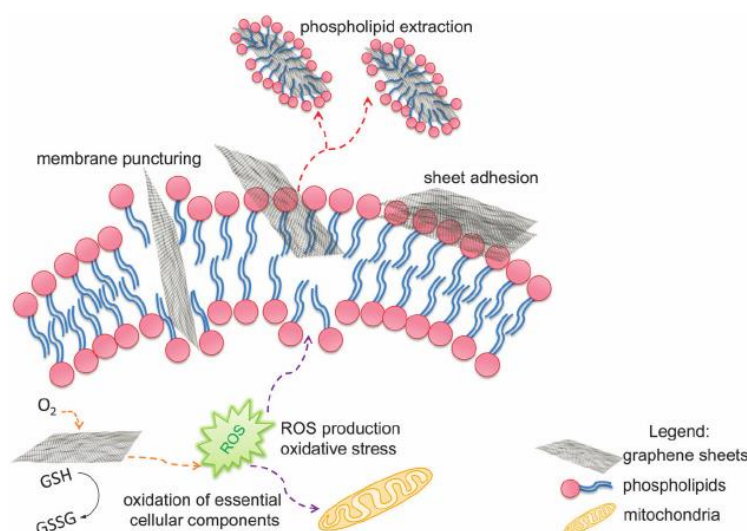
Όσον αφορά στη βακτηριακή μεταφορά, η παρουσία οργανικής ουσίας δύναται να περιορίσει τη διασπορά των βακτηρίων, λόγω του ότι προωθεί τα φαινόμενα προσρόφησης. Αξίζει να αναφερθεί ότι η σύνδεση/προσκόλληση των περισσότερων βακτηριακών ειδών σε στερεές επιφάνειες είναι χαρακτηριστικό του κύκλου ανάπτυξής του και προϋποθέτει την ύπαρξη ενέργειας (σε αντίθεση με τους ιούς που η προσκόλληση αποτελεί παθητική διαδικασία). Ωστόσο, η διαλυτή οργανική ύλη συχνά σχηματίζει μια ταινία-ζώνη οργανικών μορίων που επικάθεται στη στερεά επιφάνεια (Bitton and Harvey, 1992), διευκολύνοντας την πρόσδεση μικροοργανισμών και ευνοώντας τη δημιουργία βιοφίλμ. Έχει παρατηρηθεί ότι η δημιουργία βιοφίλμ ευνοεί την έναρξη της προσροφητικής διαδικασίας.

### 1.6 Δυνητική τοξικότητα με έμφαση στην αντιμικροβιακή δράση του GO κατά την ετεροσυσσωμάτωση του με βιοκολλοειδή

Το οξείδιο του γραφενίου εμπίπτει στη κατηγορία των νεοεμφανιζόμενων μικρορυπαντών προτεραιότητας, ωστόσο η περιβαλλοντική του δράση δεν είναι σαφώς καθορισμένη. Συνεπώς, η μετανάστευσή του σε επιφανειακά ύδατα και υπόγειους υδροφορείς εγείρει ανησυχία. Ήδη, πληθώρα μελετών υποδεικνύουν ότι υπό συγκεκριμένες συνθήκες, το οξείδιο του γραφενίου καθίσταται τοξικό για διάφορους έμβιους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των φυτικών οργανισμών, των ψαριών, των θηλαστικών, των βακτηριακών ακόμα και ανθρώπινων κυττάρων (Chang et al., 2011; Gurunathan et al., 2013; Seabra et al., 2014; Chen et al., 2015; Hu et al., 2015; Liang et al., 2015; Wu et al., 2016). Για παράδειγμα το GO σε συγκεντρώσεις > 50 mg/L καθίσταται τοξικό για τα ανθρώπινα ινοβλαστικά κύτταρα

(Wang et al., 2013). Μάλιστα, έχει παρατηρηθεί πως μεταξύ της οικογένειας των συγγενικών υλικών με δομική βάση το γραφένιο (π.χ. το γνήσιο γραφένιο (pG), τα νανόφυλλα γραφενίου (GNS), το οξείδιο του γραφίτη (GtO), το πολυστρωματικό γραφένιο (MLG) και το μειωμένο οξείδιο του γραφενίου (RGO)), το διαλυτό οξείδιο του γραφενίου (GO) εμφανίζει τη μεγαλύτερη κυτταροτοξική δράση έναντι βακτηρίων (Liu et al., 2011; Al-Thali et al., 2014; Al-Jumaili et al., 2017).

Έως και σήμερα, ο τρόπος επίδρασης του GO σε έμβιους οργανισμούς δεν έχει αποσαφηνιστεί. Η λεπτομερής κατανόηση των μηχανισμών αντιμικροβιακής ή μη δράσης του GO βρίσκεται ακόμη σε πρώιμο στάδιο, επειδή η μελέτη των δυνητικών αντιμικροβιακών ιδιοτήτων των παραγώγων του γραφενίου άρχισε μόλις το 2010. Ωστόσο, θεωρητικές προσομοιώσεις σε συνδυασμό με πειραματικές προσεγγίσεις υποδεικνύουν πως η φυσική βλάβη των μικροοργανισμών, κατά την αλληλεπίδραση τους με GO, μπορεί να προκύψει ως αποτέλεσμα επενέργειας πέντε πιθανών μηχανισμών: (α) κόψιμο κυτταρικής μεμβράνης και ενδοκυτταρική διείσδυση (cutting of cellular membrane and intracellular penetration), (β) εκχύλιση/εξαγωγή λιπιδίων (γ) τύλιγμα (wrapping), (δ) βακτηριακή παγίδευση (bacterial trapping) και (ε) οξειδωτικό stress, είτε μέσω απελευθέρωσης ενεργών οξυγονούχων ομάδων/ριζών μεγάλης δραστηριότητας (reactive oxygen species-ROS), είτε μέσω φαινομένων μεταφοράς φορτίου (Zhou et al., 2014; Palmieri et al., 2017).

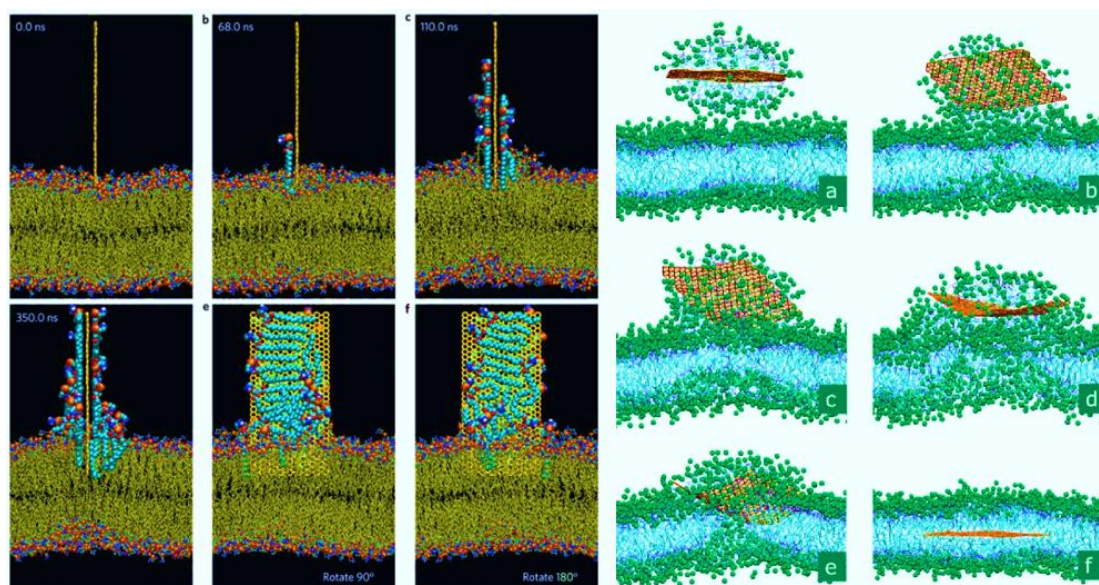


**Εικόνα 1.11: Μηχανισμοί κυτταρικών αλληλεπιδράσεων των νανοϋλικών με βακτηρίδια (Perreault et al., 2015).**

Στη πρώτη περίπτωση (στρεσάρισμα της μεμβράνης ή άσκηση εξωτερικής πίεσης στη μεμβράνη), τα διδιάστατα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου φαίνεται να δρουν ως κοπτήρες της κυτταρικής μεμβράνης. Πιο συγκεκριμένα, σε αποτελέσματα μοριακής δυναμικής προσομοίωσης παρατηρήθηκε ότι ένα φύλλο γραφενίου αιωρούμενο, σε μικρή κατακόρυφη απόσταση, μεταξύ 3.5 – 4.7 nm, πάνω από τις βακτηριακές μεμβράνες μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό των βακτηρίων, διαπερνώντας τόσο τις εξωτερικές (περίπτωση Gram – θετικών βακτηρίων) όσο και

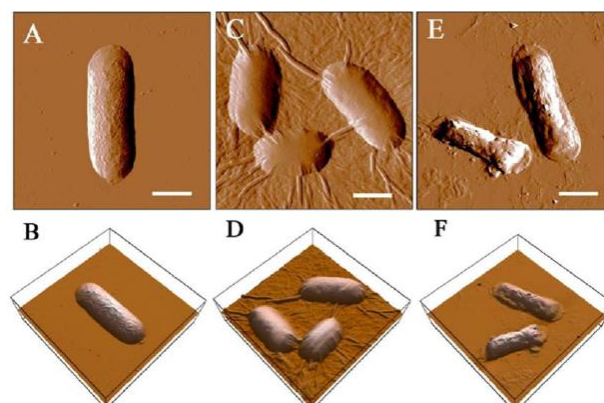
εσωτερικές κυτταρικές μεμβράνες (περίπτωση Gram – αρνητικών βακτηρίων). Η διαδικασία της εισαγωγής ξεκινά όταν το λεπτό φύλλο γραφενίου αρχίζει να δονείται προς τα εμπρός και πίσω, για μια περίοδο  $10 - 100 \times 10^{-9}$  s (Tu et al., 2013). Στη συνέχεια, το φύλλο κινείται και τα αιχμηρά άκρα του τρυπούν τις κυτταρικές μεμβράνες, λόγω υδρόφοβου αποτελέσματος και ισχυρών αλληλεπιδράσεων τύπου van der Waals με τα λιπίδια. Η τομή της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε διαρροή ενδοκυτταρικού κυτταροπλάσματος, δηλαδή απελευθέρωση πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων DNA ή RNA, κυρίως μέσω εκχύλισης φωσφολιπιδικών μορίων από τις λιπιδικές στιβάδες των μεμβρανών. Η εκχύλιση των φωσφολιπιδίων προκαλεί μείωση της πυκνότητας και του πάχους της λιπιδικής διπλοστοιβάδας, καθώς και παραμόρφωση της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω ισχυρών δυνάμεων σύμπτυξης από το φύλλο γραφενίου, με αποτέλεσμα να προκαλείται μη αναστρέψιμη βλάβη στα ζώντα συστήματα (Tu et al., 2013; Hegab et al., 2016).

Παρότι η εκχύλιση φωσφολιπιδίων προκύπτει ως επακόλουθο της τομής της κυτταρικής μεμβράνης, σε αρκετές περιπτώσεις θα μπορούσε να λειτουργήσει και ως ανεξάρτητος μηχανισμός. Η δράση του εν λόγω μηχανισμού σε επίπεδο νανοκλίμακας στηρίζεται στην ισχυρή υδροφοβική αλληλεπίδραση μεταξύ GO και λιπιδικών μορίων, φαινόμενο που αποδίδεται και με τον όρο αφυδάτωσης της μεμβράνης (nanoscale dewetting). Στην περίπτωση αυτή παρατηρείται μείωση της αντίστασης της κυτταρικής μεμβράνης στην εξωτερική πίεση που δέχεται με αποτέλεσμα να δημιουργούνται σήραγγες από τις οποίες απελευθερώνονται λιπίδια τα οποία προσκολλώνται, λόγω υδροφοβικότητας στην επιφάνεια του GO (Zou et al., 2016).



Εικόνα 1.12: (Δεξιά) Διείσδυση μονοστοιβάδας γραφενίου μέσα στη φωσφολιπιδική μεμβράνη. Τα στιγμιότυπα λήφθηκαν σε χρονικά διαστήματα των 2.9, 52.4, 120.0, 299.2, 356.4, και 516.4 ns, αντίστοιχα (Titov et al., 2009); (Αριστερά) Στιγμιότυπα προσομοιώσεων διαδικασίας εκχύλισης λιπιδίων από φύλλο γραφενίου συνδεδεμένο στην επιφάνεια της εξωτερικής μεμβράνης βακτηριακού κυττάρου *E. coli* (Tu et al., 2013).





Εικόνα 1.13: Πλάσματα AFM και εικόνες 3D κυττάρων *E. coli* μετά από 2 ώρες επώαση με απιονισμένο νερό για 2 ώρες (A, B), με ένα εναιώρημα 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$  GO-0 (C, D), με ένα εναιώρημα 40  $\mu\text{g} / \text{mL}$  GO-240 (E, F) (Liu et al., 2012).

Στην περίπτωση του μηχανισμού «wrapping», παρατηρείται περιτύλιξη του νανόφυλλου γύρω από το βακτήριον, η οποία καθίσταται εφικτή λόγω της ευκαμπτότητας της διδιάστατης δομής του GO. Το δημιουργούμενο κάλυμμα προκαλεί εξουδετέρωση του επιφανειακού φορτίου του βακτηρίου και απομόνωσή του οργανισμού από το εξωκυτταρικό του περιβάλλον, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η λήψη θρεπτικών ουσιών και η κατανάλωση γλυκόζης και κατ' επέκταση να σταματά ο πολλαπλασιασμός του βακτηριακού κυττάρου (Akhavan et al., 2011). Έχει παρατηρηθεί ότι κατά το «wrapping» δεν προκαλείται διαρροή ενδοκυτταρικού περιεχομένου, αλλά μειώνεται δραματικά η μεταβολική δραστηριότητα των απομονωμένων κυττάρων (Caprio et al., 2012).

Μετρήσεις προσδιορισμού της εναπομένουσας μεταβολικής δραστηριότητας στελεχών *E. coli* και *B. subtilis*, μετά από μία ώρα έκθεσής τους σε συγκέντρωση GO 1 g/L, έδειξαν ότι το ποσοστό των μεταβολικά ενεργών βακτηριακών κυττάρων ανήλθε μόλις σε 30% και 10%, αντίστοιχα (Caprio et al., 2012). Ωστόσο, ο τρόπος επίδρασης του εν λόγω μηχανισμού στο σχήμα και στην ακεραιότητα της μεμβράνης του βακτηριακού κυττάρου αποτελεί σημείο αμφιλεγόμενο. Σε ορισμένες μελέτες δεν διαπιστώθηκαν διαταραχές των κυτταρικών μεμβρανών (Musico et al., 2014), ενώ σε άλλες (Chen et al., 2014) διαπιστώθηκε ότι η απόφραξη των μεμβρανικών διαύλων ιοντανταλλαγής, κατά την περιτύλιξη, προκαλεί εκπόλωση της κυτταρικής μεμβράνης, λόγω αύξησης του εκδοκυτταρικού δυναμικού, γεγονός που οδηγεί σε σημαντική δομική φθορά των απομονωμένων βακτηρίων. Εντούτοις, σε αντίθεση με το μηχανισμό της ενδοκυτταρικής διείσδυσης, ο μηχανισμός της περιτύλιξης δεν οδηγεί πάντοτε σε μη αναστρέψιμες συνέπειες για τα βακτήρια, καθώς έχει παρατηρηθεί δυνατότητα εκ νέου απομάκρυνσης των φύλλων GO από τις βακτηριακές επιφάνειες μέσω μηχανικού διαχωρισμού (π.χ. sonication) (Akhavan et al., 2011; Perreault et al., 2015). Ωστόσο, η εφαρμογή ηχοβόλησης για τον διαχωρισμό δεν εγγυάται πάντοτε 100% βιωσιμότητα των κυττάρων. Για παράδειγμα,

κατά την προσπάθεια διαχωρισμού φύλλων GO από κυττάρα *E. coli* με χρήση υπερήχων, παρατηρήθηκε μηδενική ανάκτηση ζώντων κυττάρων (Liu et al., 2012).

Ο μηχανισμός της παγίδευση (trapping) στηρίζεται στην δυνητική τάση συσσωμάτωσης που εμφανίζει το GO κατά την διασπορά του σε υδατικά περιβάλλοντα ή υδατικά διαλύματα που επικρατούν συνθήκες υψηλής ιοντικής ισχύος (αυξημένης αλατότητας). Κατά την συσσωμάτωση των φύλλων οξειδίου του γραφενίου μειώνεται τόσο ο αριθμός των διαθέσιμων αιχμηρών ακρών, που θα μπορούσαν να προκαλέσουν οπές στη κυτταρική μεμβράνη, όσο και το ποσοστό της ελεύθερης επιφάνειας του GO (basal planes) που θα μπορούσε να προκαλέσει κάλυψη. Ωστόσο, τα βακτήρια που διαθέτουν μικρότερο μέγεθος από αυτό των κενών που σχηματίζονται στους ενδιάμεσους χώρους (ικριώματα) των συσσωματωμένων φύλλων γραφενίου δύνανται να εγκλωβίζονται στις κοιλότητες αυτές. Συνεπώς, όπως και στην περίπτωση του «wrapping», η φυσική αποσύνδεση των βακτηρίων από το άμεσο περιβάλλον τους αποτρέπει τη ζωτικής σημασίας κατανάλωση γλυκόζης και οδηγεί σε αδρανοποίηση των βακτηριδίων, περιορίζοντας την ικανότητα πολλαπλασιασμού τους.

Το οξειδωτικό στρες έχει προταθεί ως ένας εξίσου σημαντικός μηχανισμός κυτταροτοξικότητας/κυτοτοξικότητας του GO (Sanchez et al., 2011), και προκαλείται είτε μέσω παραγωγής ενεργών οξυγονούχων ομάδων/ριζών μεγάλης δραστηριότητας (ROS), είτε ανεξαρτήτως παραγωγής των ROS. Το οξειδωτικό stress επηρεάζει το βακτηριακό μεταβολισμό διαταράσσοντας βασικές κυτταρικές λειτουργίες και οδηγεί σε αδρανοποίηση των κυττάρων ή/και σε κυτταρικό θάνατο.

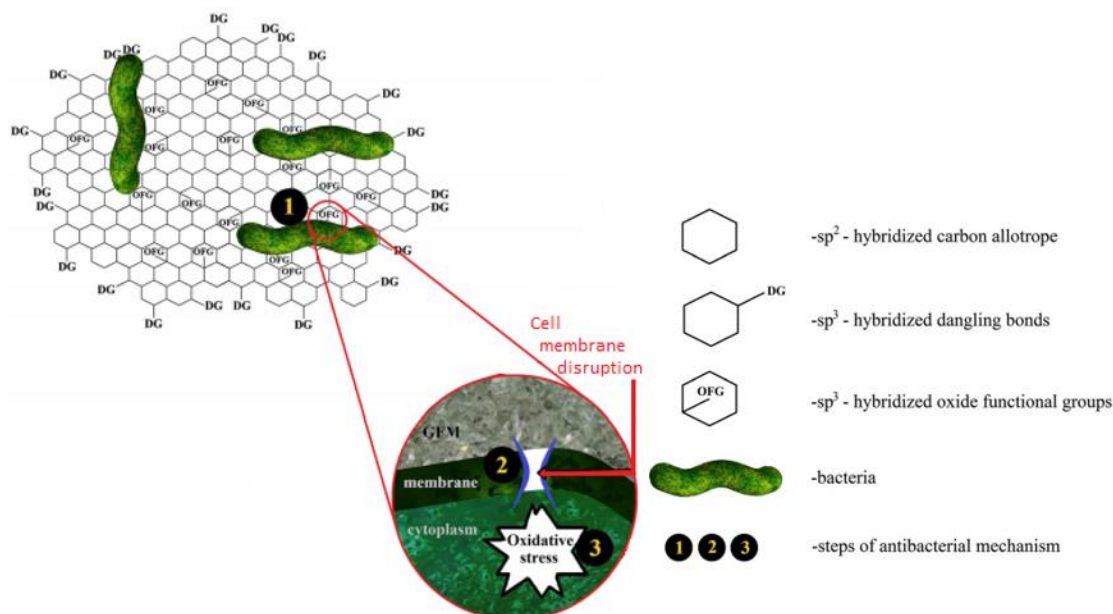
Αξίζει να τονισθεί ότι σε βιολογικά περιβάλλοντα, οι ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $\bullet\text{OH}$ ), ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν ( $\text{ClO}^-$ ), συνδυασμοί ελευθέρων ριζών και ιόντων, όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) και μόρια, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), σχηματίζονται ως παραπροϊόντα του φυσιολογικού μεταβολισμού του οξυγόνου στα μιτοχόνδρια (π.χ. διαρροή ενεργοποιημένου οξυγόνου από τα μιτοχόνδρια) και των ενζυμικών αντιδράσεων, ή/και ως κυτταρικά προϊόντα κατά τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος για την εξουδετέρωση βακτηρίων-εισβολέων. Συνεπώς, η παρουσία των ROS σε χαμηλές συγκεντρώσεις διαδραματίζει σημαντικό ρόλο για την κυτταρική σηματοδότηση και την ομοιόσταση (Devasagayam et al., 2004). Η οξειδωτική ισορροπία των κυττάρων ελέγχεται από κατάλληλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, αλλά σε περιπτώσεις αυξημένης συγκέντρωσης ROS προκαλούνται σοβαρές βλάβες.

Η πρώτη περίπτωση οξειδωτικού στρες στηρίζεται στην ικανότητα των παραγώγων γραφενίου να μεσολαβούν στην παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας ROS, μέσω προσρόφησης ατόμων οξυγόνου στις ελαττωματικές θέσεις της επιφάνειάς τους (π.χ. κενές θέσεις οξυγόνου) και στα άκρα τους. Στην συνέχεια, οι εν λόγω οξυγονούχες δραστικές ρίζες ανάγονται από διάφορα κυτταρικά αναγωγικά ένζυμα (π.χ. γλουταθειόνη (GSH), N-ακετυλοκυστεΐνη (NAC),  $\alpha$ -τοκοφερόλη/βιταμίνη E)). Ιδιαίτερα η γλουταθειόνη, που συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο σημαντικών αντιοξειδωτικών παραγόντων, έχει παρατηρηθεί πως παρουσία ROS οξειδώνεται

προς σχηματισμό δισουλφιδικής γλουταθειόνης (GSSG). Συνεπώς, η GSH θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως δείκτης ενδοκυτταρικής οξειδοαναγωγής και η σημαντική μείωση της συγκέντρωσής της να συνεπάγεται την επίδραση του οξειδωτικού στρες κατά των βακτηριδίων (Perreault et al., 2015; Zou et al., 2016).

Κατά την διερεύνηση της αντιμικροβιακής επίδρασης ενός PVK-GO τροποποιημένου φίλτρου μεμβρανών σε κύτταρα *E. coli* και *B. subtilis*, παρατηρήθηκε αυξημένη παραγωγή ROS που οδήγησε σε εκδήλωση έντονου οξειδωτικού στρες. Το γεγονός αποδόθηκε στη παρουσία μεγάλου αριθμού οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων (δηλ.  $-\text{COOH}$  και  $-\text{OH}$ ) στην επιφάνεια του GO, οι οποίες διευκόλυναν τη παραγωγή ROS. Συνεπακόλουθα του οξειδωτικού στρες είναι η απενεργοποίηση ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών, υπεροξείδωση λιπιδίων, δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων και βαθμιαία αποσύνθεση της κυτταρικής μεμβράνης, ακολουθούμενη από απόπτωση και τελικό κυτταρικό θάνατο.

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων θεωρείται το κυριότερο οξειδωτικό μονοπάτι κατά τη στενή αλληλεπίδραση του GO με τις κυτταρικές μεμβράνες. Πρόκειται για σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων που οδηγεί σε σχηματισμό ριζών υπεροξειδίου στα λιπίδια, οι οποίες μεταδίδουν την οξειδωτική βλάβη μέσω των κυτταρικών μεμβρανών. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να ανασταλεί μόνο με εκδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά. Μάλιστα παρατηρήθηκε ότι εναπόθεση κυττάρων, που είχαν υποστεί προ-επώαση με τη λιποδιαλυτή αντιοξειδωτική ένωση α-τοποφερόλη σε συγκέντρωση 10 mM, σε επιφάνειες οξειδίου του γραφενίου δεν οδήγησε σε ανάπτυξη οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η διαδικασία προ-επώαση δεν μπορεί να εφαρμοστεί για κύτταρα υπό καθεστώς αιώρησης.



Εικόνα 1.14: Απεικόνιση μηχανισμών αντιμικροβιακής δράσης των νανοσωματιδίων της οικογένειας του γραφενίου (Graphene Family Nanoparticles GFN). 1: Αρχική εναπόθεση κυττάρων βακτηρίων στις επιφάνειες των υλικών; 2: Στρες μεμβράνης που προκαλείται από άμεση επαφή με αιχμηρά άκρα 3: Οξειδωτικό στρες του βακτηριακού κυτταροπλάσματος (Kurantowicz et al., 2015).



Η δεύτερη περίπτωση οξειδωτικού στρες περιλαμβάνει διάσπαση ή οξείδωση μιας ζωτικής κυτταρικής δομής ή συστατικού όπως GSH, χωρίς παραγωγή ROS (π.χ.  $O_2^{\bullet-}$ ) και μπορεί να προκληθεί μέσω μεταφοράς φορτίου από την κυτταρική μεμβράνη στο GO ή στο ανηγμένο GO (reduced graphene oxide/rGO). Στην περίπτωση αυτή το GO ή το rGO μεσολαβούν ως αγωγίμες γέφυρες μεταφοράς ηλεκτρονίων από τη λιπιδική διπλοστοιβάδα και τα βακτηριακά ενδοκυτταρικά συστατικά στο εξωτερικό περιβάλλον (Liu et al., 2011). Εικάζεται ότι η ισχυρότερη οξειδωτική ικανότητα έναντι της GSH που εμφανίζει rGO προέρχεται από την σημαντικά υψηλότερη αγωγιμότητα του rGO σε σύγκριση με GO. Η εντονότερη αντιβακτηριακή δράση του rGO εξηγείται από την ύπαρξη πιο αιχμηρών ακμών στη δομή του, που χρησιμεύουν ως καλοί δέκτες ηλεκτρονίων και προάγουν ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις με τις κυτταρικές μεμβράνες ή/και αυξημένη μεταφορά φορτίου (Akhavan and Ghaderi, 2010). Προκειμένου να αποσαφηνιστεί το φαινόμενο μεταφοράς ηλεκτρονίων, διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή επίδραση τριών μονοστρωματικών φύλλων γραφενίου, εναποτιθέμενων σε υπόστρωμα ενός αγωγού (Cu), ενός ημιαγωγού (Ge) και ενός μονωτή ( $SiO_2$ ) σε Gram – αρνητικά (*E. coli*) και Gram – θετικά (*S. aureus*) βακτηρία. Τα εναποτιθέμενα στρώματα γραφενίου σε Cu και Ge παρεμπόδισαν σημαντικά την ανάπτυξη και των δύο βακτηρίων, ενώ στην περίπτωση του μονωτή η επικάλυψη γραφενίου δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση σε κανένα από τα δύο είδη.

Η πιθανότητα εκδήλωσης της τοξικότητά του GO, το είδος και η αποδοτικότητά του κυρίαρχου αντιμικροβιακού μηχανισμού εμφανίζουν πολυπαραμετρική εξάρτηση, τόσο από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νανσωματιδίου (π.χ. μέγεθος, χημική δομή, ειδική επιφάνεια, είδος, θέση και πυκνότητα οξυγονούχων ομάδων, τραχύτητα επιφανείας, ποσοστό ατελειών), που καθορίζονται από τη εκάστοτε μέθοδο σύνθεσής του (π.χ. μέθοδος Hofmann, μέθοδος Staudenmaier, μέθοδος Tour, μέθοδος Hummers), όσο και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων, τον τύπο, το μέγεθός και τη φάση ανάπτυξής τους (Tegou et al., 2016). Επιπλέον, για περιπτώσεις πειραμάτων «in vivo», καθοριστικής σημασίας για την εκδήλωση τοξικότητας του GO φαίνεται να είναι η οδός χορήγησης, η δόση και ο χρόνος έκθεσης (Seabra et al., 2014).

Το μέγεθος, το εμβαδόν της επιφάνειας και το πάχος των φύλλων GO θεωρούνται κρίσιμες παράμετροι καθορισμού της αντιμικροβιακής δράσης του, διότι ελέγχουν την προσροφητική τους ικανότητα αλλά και τον αριθμό των αιχμηρών άκρων τους. Έχει διαπιστωθεί ότι μικρότερα φύλλα γραφενίου ( $\sim 5.9 \times 6.2 \text{ nm}^2$ ) εμφανίζουν μεγαλύτερο δυναμικό εισαγωγής στη κυτταρική μεμβράνη, μέσω αργής διάχυσης, χωρίς να διαταράσσουν την διάταξη των φωσφολιπιδίων της διπλοστοιβάδας, ενώ μεγαλύτερα φύλλα GO ( $\sim 11 \text{ nm}$ ) επηρεάζουν έντονα την αλληλουχία, την πυκνότητα και την κατανομή των φωσφολιπιδίων λόγω ισχυρότερης υδρόφοβης αλληλεπίδρασης (Titov et al., 2009; Dallavalle et al., 2015). Επίσης, τα μεγαλύτερα φύλλα GO ( $\sim 0.753 \text{ }\mu\text{m}^2$ ) εμφανίζουν καλύτερη βακτηριακή προσροφητική ικανότητα, λόγω υψηλότερης επιφανειακής ενέργειας σε σχέση με

φύλλα μικρότερης επιφάνειας ( $\sim 0.010 \mu\text{m}^2$ ) (Liu et al., 2012). Ταυτόχρονα, έχει αναφερθεί ότι η αντιβακτηριακή δράση των φύλλων GO, στη περίπτωση του «wrapping», εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την έκταση της πλευρικής επιφάνειάς τους. Μέσω μικροσκοπίας ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy – AFM), εντοπίστηκε ότι τα μεγαλύτερα νανο – φύλλα εμφανίζουν υψηλότερη βακτηριοκτόνο απόδοση, διότι παρέχουν πλήρη, περιμετρική κάλυψη των βακτηρίων, αναστέλλοντας την ανάπτυξή τους. Ταυτόχρονα, η κάλυψη οδηγεί σε ομαλοποίηση της βακτηριακής επιφάνειας. (Liu et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, παρατηρήθηκε ότι η προσκόλληση μικρών φύλλων στην μικροβιακή επιφάνεια κυττάρων *E. coli* προκαλεί αύξηση της επιφανειακής τραχύτητας του κυττάρου, αλλά δεν οδηγεί σε πλήρη απομόνωση των κυττάρων από το μικροπεριβάλλον τους, λόγω διατήρησης ακάλυπτων τμημάτων της κυτταρικής μεμβράνης τους (Liu et al., 2012). Ταυτόχρονα, παρατηρήθηκε πως μείωση της επιφάνειας του νανόφυλλου από  $0.65$  σε  $0.01 \mu\text{m}^2$ , προκάλεσε εντονότερο οξειδωτικό στρες και αύξηση του ποσοστού οξείδωσης της GSH από  $49\%$  σε  $71\%$ , πιθανόν λόγω αύξησης της πυκνότητας των ατελειών. Μεγαλύτερος αριθμός ατελειών οδήγησε σε μεγαλύτερη δέσμευση μορίων οξυγόνου και κατ' επέκταση σε μεγαλύτερη παραγωγή ROS (Musico et al., 2014).

Επίσης, η αλληλεπίδραση μεταξύ φύλλων GO και βακτηρίων θεωρείται ιδιαίτερα εξαρτημένη από τον προσανατολισμό τους κατά την άμεση επαφή τους. Για παράδειγμα, οι αιχμηρές άκρες των φύλλων GO καθίστανται βιολογικά δραστικές ενάντια των βακτηρίων όταν η σχηματιζόμενη γωνία επαφής τους με τα βακτήρια είναι ορθή ( $90^\circ$ ), διότι τότε η κυτταρική μεμβράνη διατέμνεται ευκολότερα, ενώ από την άλλη είναι πιθανότερη η επικράτηση του μηχανισμού περιτύλιξης, όταν λόγω προσανατολισμού ευνοείται η διαθεσιμότητα και η αλληλεπίδραση των βακτηρίων με τις πλευρικές επιφάνειες των φύλλων GO (Tu et al., 2013; Hui et al., 2014; Perreault et al., 2015).

Ο μεγάλος βαθμός διαλυτότητας και η σταθερότητα που παρουσιάζει το GO σε υδατικά διαλύματα, λόγω των οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων του και της αρνητικής επιφανειακής του φόρτισης, μπορούν να επηρεαστούν σε μεγάλο βαθμό κατά την προσθήκη ηλεκτρολυτών. Η παρουσία θετικά φορτισμένων ιόντων μειώνει την ηλεκτροστατική άπωση και προκαλεί αποσταθεροποίηση των αιωρούμενων νανοσωματιδίων, η οποία οδηγεί σε ομοσυσσωμάτωσή τους. Τα δισθενή ιόντα (π.χ.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) αλληλεπιδρούν με τις επιφανειακές λειτουργικές ομάδες των φύλλων GO, προκαλώντας άκρη-με-άκρη (edge-to-edge) σύζευξή των νανόφυλλων και συνεισφέρουν περισσότερο στην αποσταθεροποίηση των νανοαιωρημάτων. Ταυτόχρονα τα δισθενή ιόντα καλύπτουν το αρνητικό φορτίο της επιφάνειας των φύλλων GO, με αποτέλεσμα να αυξάνεται το επιφανειακό του δυναμικό και να μειώνεται η απωστική αλληλεπίδρασή τους με τις αρνητικά φορτισμένες κυτταρικές μεμβράνες των βακτηρίων. Τα μονοσθενή (π.χ.  $\text{Na}^+$ ) προκαλούν πλευρική (face-to-face) σύζευξη. Με τον τρόπο αυτό μειώνεται η διαθεσιμότητα των εγκάρσιων πλευρών (basal planes) και αιχμηρών γωνιών των φύλλων GO για αλληλεπίδραση με βακτήρια (Wu et al., 2013; Romero-Vargas Castrillón et al., 2015). Πειραματικά έχει

επιβεβαιωθεί ότι εναιωρήματα GO απαλλαγμένα από ηλεκτρολύτες (π.χ. GO/ultra pure water) ή χαμηλής ιοντικής ισχύος εμφανίζουν καλύτερη επίδραση εναντίων παθογόνων (π.χ. *E. coli*, *X. Oryzae* pv. *Oryzae*), σε σχέση με το αντιμικροβιακό αποτέλεσμα που προκάλεσαν εναιωρήματα GO στα οποία χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών αλάτων (PBS) (Liu et al., 2012; Chen et al., 2013). Μάλιστα παρατηρήθηκε πλήρης αναστολή της δράσης του GO σε περίπτωση διαλύματος PBS συγκέντρωσης 0.1 mM (Chen et al., 2013). Η επίδραση της υψηλής ιοντικής ισχύος είναι μεγαλύτερη σε περίπτωση νανόφυλλων μεγαλύτερης επιφάνειας ( $\sim 0.753 \mu\text{m}^2$ ), οδηγώντας σε έντονη συσσωμάτωση. Ωστόσο σε διαλύματα μικρότερης αλατότητας που υπήρχαν δισθενή ιόντα, τα δημιουργούμενα συσσωματώματα οδηγούν σε παγίδευση των βακτηρίων (επενέργεια μηχανισμού wrapping) και προσωρινή αναστολή του πολλαπλασιασμού τους, ωστόσο η παγίδευση είναι αναστρέψιμη με ηχοβόληση (Perreault et al., 2015).

Σε επίπεδο μικροβιολογίας δύο είναι οι κύριες παράμετροι καθορισμού της αντιβακτηριδιακής επίδρασης του GO. Η πρώτη ποσοτικοποιεί τη βακτηριοστατική δραστηριότητα, δηλαδή είναι η ελάχιστη απαιτούμενη συγκέντρωση για την αναστολή της ανάπτυξης των μικροβίων (Minimum Inhibitory Concentration/MIC) και η δεύτερη καθορίζει τη βακτηριοκτόνο επίδραση, δηλαδή πρόκειται για την ελάχιστη δόση συγκέντρωσης που οδηγεί σε θανάτωση (Minimum Bactericidal Concentration/MBC). Για την περίπτωση διαλυμάτων χαμηλής ιοντικής ισχύος έχει παρατηρηθεί ότι χαμηλές συγκεντρώσεις ( $< 10 \text{ mg/L}$ ) GO, για παράδειγμα MIC 0.25-1 mg/L και MBC 0.5-6 mg/L, είναι αποτελεσματικότερες έναντι βακτηρίων όπως *E. coli*, *S. typhimurium*, *B. subtilis*, *E. faecalis* και *S. aureus* (Veerapandian et al., 2013; Palmieri et al., 2016). Πράγματι, σε χαμηλές υδατικές συγκεντρώσεις, το GO χαρακτηρίζεται από μεγάλη σταθερότητα και η παρουσία μικρής ποσότητας ιόντα στο διάλυμα ευνοεί τις συγκρούσεις μεταξύ των βακτηρίων και των ακμών GO, με αποτέλεσμα τα άκρα του να δρουν ως κοπτήρες διάτμησης της βακτηριακής μεμβράνης (επικράτηση μηχανισμού cutting).

Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται πολλά αντικρουόμενα αποτελέσματα αναφορικά με τις αποτελεσματικές τιμές συγκέντρωσης GO και συχνά αναφέρονται περιπτώσεις αύξησης της βακτηριοκτόνου δράσης σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Ωστόσο, πλέον αρχίζει να αποσαφηνίζεται ότι η αύξηση της συγκέντρωσης επιφέρει καλύτερα αποτελέσματα σε μόνο σε περιπτώσεις αιωρημάτων όπου διατηρείται η σταθερότητα του GO, ενώ η αύξησή της σε PBS διαλύματα υψηλή ιοντικής ισχύος δεν επιφέρει αλλαγές στη βακτηριακή ανάπτυξη, λόγω συσσωμάτωσης η οποία θωρακίζει τις αιχμηρές άκρες των φύλλων του. Επίσης, έχει διαπιστωθεί πως εναιωρήματα νανόφυλλων μεγάλου μεγέθους σε χαμηλές συγκεντρώσεις ( $< 10 \text{ mg/L}$ ) εμφανίζουν καλύτερη αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα, από ότι εναιωρήματα νανόφυλλων μεγάλου μεγέθους σε μεγαλύτερη συγκέντρωση ( $> 20 \text{ mg/L}$ ), ενώ η συγκέντρωση μικρού μεγέθους νανόφυλλων επηρεάζει λιγότερο τη αντιβακτηριδιακή δραστηριότητα του νανοσωματιδίου. Με άλλα λόγια, παρατηρείται εξάρτηση της αντιμικροβιακής επίδρασης της συγκέντρωσης του GO από το μέγεθος των

νανόφυλλων (Liu et al., 2012). Αξίζει να αναφερθεί επίσης ότι υπολειμματικές μεταλλικές ποσότητες στην επιφάνεια των νανόφυλλων, ως αποτέλεσμα της μεθόδου σύνθεσής τους, δύνανται να μειώσουν το pH του διαλύματος. Η μείωση του pH επηρεάζει τη διαλυτότητα του GO. Συνεπώς, η θανάτωση των μικροοργανισμών δεν προέρχεται από την δράση του GO, αλλά λόγω όξινων υδατικών συνθηκών που καθίστανται τοξικές για την ανάπτυξη των μικροβίων.

Επίσης, η παρουσία υγρών θρεπτικών υποστρωμάτων (π.χ. LB), έστω και σε επίπεδο ιχνοποσοτήτων (~5 %), σε εναιωρήματα μεγάλης συγκέντρωσης GO (250 – 300 mg/L), δύνανται να περιορίσει σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση του GO, αυξάνοντας τα ποσοστά βιωσιμότητας των βακτηρίων (Hui et al., 2014). Κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ GO και θρεπτικών είτε παρατηρείται προσκόλληση των θρεπτικών στην επιφάνεια του νανόφυλλου, με αποτέλεσμα να μειώνεται η διαθέσιμη πλευρική του επιφάνεια, είτε προκαλείται συσσωμάτωση του GO, με αποτέλεσμα την δημιουργία προστατευτικών κριωμάτων στα οποία ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των εναποτιθέμενων ή/και προσκολλημένων βακτηρίων.

Παρά τις εκτεταμένες μελέτες ο τρόπος επίδρασης του χρόνου έκθεσης των βακτηρίων στο GO δεν έχει κατανοηθεί πλήρως, αν και γενικά θεωρείται πως μεγαλύτεροι χρόνοι επαφής οδηγούν σε καλύτερα αποτελέσματα. Στην περίπτωση του βακτηρίου *E. coli*, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη βιωσιμότητα των κυττάρων κατά την πρώτη ώρα αλληλεπίδρασης με νανόφύλλα GO, η οποία ωστόσο μειώθηκε σημαντικά μετά το πέρας δύο ωρών έκθεσης (Liu et al., 2012). Για το ίδιο βακτήριο εντοπίστηκε σχεδόν πλήρης αδρανοποίησή του μετά από 3 ώρες επαφής με GO (Caprio et al., 2012). Στην περίπτωση του βακτηρίου *P. aeruginosa*, 100% κυτταρικός θάνατος προέκυψε μετά από το πέρας τεσσάρων ωρών επαφής, με το μεγαλύτερο ποσοστό θανάτωσης να σημειώνεται την πρώτη ώρα επαφής (Gurunathan et al., 2012). Σε άλλες ωστόσο περιπτώσεις, η αντιβακτηριδιακή επίδραση του GO έναντι του βακτηρίου *E. coli* που παρατηρήθηκε έως και τις πέντε πρώτες ώρες επαφής, εξαφανίστηκε μετά από 24 ώρες πιθανόν λόγω σταδιακής προσρόφησης των πρωτεϊνών, που υπήρχαν στο μέσο καλλιέργειας, στην επιφάνεια του GO (Kromba et al., 2016).

Η μεγάλη ετερογένεια των αποτελεσμάτων αναφορικά με την δράση του GO, οφείλεται στο ότι η σχέση μεταξύ δόσης GO, χρόνων έκθεσης και τελικής τοξικής επίδρασης καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από το είδος, τα δομικά χαρακτηριστικά του εκάστοτε εξεταζόμενου μικροοργανισμού, καθώς και τη φάση ανάπτυξής του (Tegou et al., 2016). Για παράδειγμα τα Gram αρνητικά βακτήρια (π.χ. *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*) εμφανίζουν κάποιες φορές μεγαλύτερη αντοχή κατά την αλληλεπίδραση με GO, πιθανόν λόγω της ύπαρξης εξωτερικής μεμβράνης στη δομή τους. Από την άλλη πλευρά, τα Gram θετικά βακτήρια (π.χ. *E. faecalis*, *S. aureus*, *B. subtilis*) δεν διαθέτουν εξωτερικό περίβλημα, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν μεγαλύτερη ευαισθησία. Ωστόσο, το στρώμα πεπτιδογλυκάνης που περιβάλλει το εσωτερικό κυτταρικό τοίχωμα των Gram θετικών βακτηρίων έχει μεγαλύτερο πάχος, (κυμαινόμενο συνήθως μεταξύ από 20 nm έως 80 nm) από αυτό του στρώματος

πεπτιδογλυκάνης που παρεμβάλλεται μεταξύ του εξωτερικού και εσωτερικού τοιχώματος των Gram θετικών βακτηρίων (~2 – 3 nm). Το πάχος του στρώματος πεπτιδογλυκάνης, το πάχος του κυτταρικού τοιχώματος, η παρουσία λιποπολυσακχαριτών, διαφορετικών Ο-αντιγόνων στην εξωτερική γλυκολιπιδική μεμβράνη, καθώς και η παρουσία ανιονικών γλυκοπολυμερών (teichoic acids) είναι εξίσου σημαντικές παράμετροι για τη ειδική ευαισθησία ή αντοχή που εμφανίζουν τα βακτήρια έναντι του GO (Tegou et al., 2016).

Αναφορικά με τη φάση ανάπτυξης, έχει διαπιστωθεί ότι τα Gram αρνητικά βακτήρια εκδηλώνουν μεγαλύτερη ευαισθησία κατά το εκθετικό στάδιο ανάπτυξής τους, πιθανόν λόγω μειωμένης παρουσίας επιφανειακών πολυμερών, που συνεπάγεται μειωμένη προστασία των κυττάρων, ενώ εμφανίζουν μικρότερη ευαισθησία σε GO κατά την στατική φάση. Αντίθετα, τα Gram θετικά βακτήρια είναι πιο ανθεκτικά κατά την εκθετική φάση, και περισσότερο ευαίσθητα κατά τη στατική φάση ανάπτυξής τους (Karahana et al., 2016). Επίσης, O Carpio και οι συνεργάτες του (2012) μέτρησαν υψηλότερη ευαισθησία θετικών Gram βακτηρίων μετά την πρώτη ώρα αλληλεπίδρασης με GO, ενώ μετά από 3 ώρες οι διαφορές ευαισθησίας δεν ήταν σχετιζόμενες με το είδος της στρώσης Gram.

Τέλος, η επιφανειακή τροποποίηση του GO με αντιμικροβιακούς παράγοντες (π.χ νανοσωματίδια αργύρου (Ag)), αναστέλλει την τάση συσσωμάτωσης του GO, και έχει διαπιστωθεί ότι ενισχύει σε μεγάλο βαθμό τη δραστηριότητά του έναντι παθογόνων, τόσο Gram θετικών, όσο και Gram αρνητικών βακτηρίων (π.χ. παρατηρήθηκε μείωση βιωσιμότητας του *E. coli* έως και 100%), με αποτέλεσμα να απαιτούνται μικρότερες συγκεντρώσεις (MIC) για αναστολή του πολλαπλασιασμού τους (Sun et al., 2008; Liu et al., 2011; Bao et al., 2011; Das et al., 2013; Tang et al., 2013; de Faria et al., 2014; Song et al., 2016).

Ολοκληρώνοντας την παρούσα βιβλιογραφική ανασκόπηση, που αφορά στη κυτταροτοξική και δυνητική αντιμικροβιακή δράση του οξειδίου του γραφενίου κατά την ετεροσυσσωμάτωσή του με παθογόνα βακτήρια, αξίζει να αναφερθεί ότι υπό ορισμένες συνθήκες το GO ενδέχεται να εμφανίσει βιοσυμβατότητα με ζώντες οργανισμούς, δρώντας είτε ως βακτηριοστατικός, είτε ακόμα και ως ενισχυτικός παράγοντας για τον πολλαπλασιασμό τους (Akhavan et al., 2011; Perreault et al., 2015; Barbolina et al., 2016; Luo et al., 2016). Για τον λόγο αυτό απαιτείται περεταίρω διερεύνηση προκειμένου να κατανοηθούν καλύτερα οι παράμετροι που καθορίζουν την εκάστοτε επίδρασή του. Ταυτόχρονα, τα μειονεκτήματα των υφιστάμενων αντιμικροβιακών παραγόντων (π.χ. χαμηλή θερμική ανθεκτικότητα, μικρή διάρκεια ζωής, και υψηλή τάση αποσύνθεσης), σε συνδυασμό με την ολοένα αυξανόμενη ανθεκτικότητα των παθογόνων έναντι αντιβιοτικών, καθιστά αναγκαία την ανάπτυξη και εφαρμογή εναλλακτικών αντιμικροβιακών ουσιών (Fang et al., 2006). Προς την κατεύθυνση αυτή το GO, χάρη στις εξαιρετικές ιδιότητες του, θα μπορούσε να αποτελέσει ένα πολλά υποσχόμενο υλικό.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

Abdel-Fattah, A. I.; EL-Genk, M. S. On colloidal particle sorption onto a stagnant air-water interface. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *78*, 237–266.

Adamczyk, Z.; Jaszczolt, K.; Siwelk, B. Irreversible adsorption of colloid particles on heterogeneous surfaces. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *252*, 723–729.

Akhavan, O.; Ghaderi, E. Toxicity of graphene and graphene oxide nanowalls against bacteria. *ASCNano*. **2010**, *4* (10), 5731–5736.

Akhavan, O.; Ghaderi, E.; Esfandiar, A. Wrapping bacteria by graphene nanosheets for isolation from environment, reactivation by sonication, and inactivation by near-infrared irradiation. *J. Phys. Chem. B*. **2011**, *115* (19), 6279–6288. doi: 10.1021/jp200686k.

Al-Lumaili, A.; Alancherry, S.; Bazaka, K.; Jacob, M. V. Review on the antimicrobial properties of carbon nanostructures. *Materials* **2017**, *10*, 1066. doi: 10.3390/ma10091066.

Al-Thani, R. F.; Patan, N. K.; Al-Maadeed, M. A. Graphene oxide as antimicrobial against two gram-positive and two gram negative bacteria in addition to one fungus *J. Biol. Sci. (Online)* **2014**, *14*, 230–239.

Aronsson, K.; Ronner, U. Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2001**, *2*, 105–112.

Arturo, A.K.; Auset, M.A review of visualization technique of biocolloid transport processes at the pore scale under saturated and unsaturated conditions. *Adv. Water Resour.* **2007**, *30*, 1392–1407.

Auset, M.; Keller, A. Pore scale processes that control dispersion of colloids in saturated porous media. *Water Resour. Res.* **2004**, *40*, W03503, doi: 10.1029/2003WR002800.

Azizighannad, S; Mitra, S. Stepwise reduction of graphene oxide (GO) and its effects on chemical and colloidal properties. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10083.

Baalousha, M.; Lead, J.R. Characterization of natural aquatic colloids (<5 nm) by flow-field flow fractionation and atomic force microscopy. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 1111–1117.

Bae, S.; Kim, H.; Lee, Y.; Xu, X.; Park, J-S.; Zheng, Y.; Balakrishnan, J.; Lei, T.; Kim, H. R.; Song, Y. I.; Kim, Y-J.; Kim, K. S.; Özyilmaz, B.; Ahn, J-H.; Hong, B. H.; Iijima. S. Roll-to-roll production of 30-inch graphene films for transparent electrodes. *Nat. Nanotech.* **2010**, *5*, 574 – 578.

Bakri, A.; Hariono, B.; Utami, M.M.D. Sutrisno. Inactivation of Bacteria *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* ATCC 14 028 influence of UV- HPEF. *J. Phys. Conf. Ser.* **2018**, 953.

Bales, R. C.; Gerba, C. P.; Grondrn, G. H.; Jensen S. L. Bacteriophage transport in sandy soil and fractured tuff. *Appl. Environ. Microbiol.* **1989**, *55*, 2061–2067.

Bao, Q.; Zhang, D.; Qi, P. Synthesis and characterization of silver nanoparticle and GO nanosheet composites as a bactericidal agent for water disinfection. *J. Colloid Interface Sci.* **2011**, *360*, 463–470.

Barbolina, I.; Woods, C. R.; Lozano, N.; Kostarelos, K.; Novoselov, K. S.; Roberts, I. S. Purity of graphene oxide determines its antibacterial activity. *2D Mater.* **2016**, *3*, 025025.

Baumann, T.; Werth C. J. Visualisation and modelling of polystyrol colloid transport in a silicon micromodel. *Vadose Zone J.* **2004**, 3, 434-443.

Bhattacharjee, S.; Ryan, J. N.; Elimelech, M. Virus transport in physically and geochemically heterogeneous subsurface porous media. *J. Contam. Hydrol.* **2002**, 57, 161–187.

Bigelow, W.D; Esty, J.R. The thermal death point in relation to time of thermophilic microorganisms. *J. Infect. Dis.* **1920**, 27, 602-617.

Bitton, G.; Harvey, R.W. (1992). Transport of pathogens through soils and aquifers. In: Environmental Microbiology, pp. 103 – 124, Wiley-Liss, New York.

Boström, M.; Williams, D.; Ninham, B. Specific ion effects: why DLVO theory fails for biology and colloid systems. *Phys. Rev. Lett.* **2001**, 87, 168103.

Bradford, S. A.; Simunek, J.; Walker S. L. Transport and straining of *E. coli* in saturated porous media. *Water Resour. Res.* **2006**, 42, W12S12, 1–12, doi: 10.1029/2005WR004805.

Bradford, S. A.; Simunek, M.; Bellahar, M. T.; Van, G.; Yates, S. R. Modelling colloid attachment, straining and exclusion in saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 2242–2250.

Bradford, S. A.; Simunek, T.; Bettahar, M.; Tadassa, Y. F.; van Genuchten M. T.; Yates, S. R. Straining of Water Air Soil Pollut colloids at textural interface. *Water Resour. Res.* **2005**, 41, W10404, 1–17. doi: 10.1029/2004WR003675.

Bradford, S. A.; Yates, S. R.; Bettahar, M.; Simunek, J. Physical factors affecting the transport and fate of colloids in saturated porous media. *Water Resour. Res.* **2002**, 38, 1327.

Bradford, S.A.; Morales, V.L.; Zhang, W.; Harvey, R.W.; Packman, A.I.; Mohanram, A.; Welty, C. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 43, 775-893.

Bradford, S.A.; Morales, V.L.; Zhang, W.; Harvey, R.W.; Packman, A.I.; Mohanram, A.; Welty, C. Transport and fate of microbial pathogens in agricultural settings. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, 43, 775 – 893.

Bradford, S.A.; Torkzaban, S.; Walker, S.L. Coupling of physical and chemical mechanisms of colloid straining in saturated porous media. *Water Res.* **2007**, 41, 3012–3024.

Brodie, B.C. On the atomic weight of graphite. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **1859**, 149, 249–259.

Carpio, I. E. M.; Santos, C. M.; Wei, X.; Rodrigues, D. F. Toxicity of a polymer-graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells. *Nanoscale.* **2012**, 4 (15), 4746-4756. doi: 10.1039/c2nr30774j.

Cebrián, G.; Condón, S.; Mañas, P. Physiology of the inactivation of vegetative bacteria by thermal treatments: Mode of action, influence of environmental factors and inactivation kinetics. *Foods.* 2017, 6 (12).

Cetinkaya, Y. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **2000**, 13, 686-707.

Chang, Y.; Yang, S. T.; Liu, J. H.; Dong, E.; Wang, Y.; Cao, A.; Liu, Y.; Wang, H. In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* **2011**, 200 (3), 201–210.

Chen, J.; Wang, X.; Han, H-Y. A new function of graphene oxide emerges: Inactivating phytopathogenic bacterium *Xanthomonas pryzae* pv. *Oryzae*. *J. Nanopart. Res.* **2013**, 15 (5), 1 – 14.

Chen, K.L.; Elimelech, M. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C<sub>60</sub>) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *309*, 126–34.

Chen, Y.; Ren, C.; Ouyang, S.; Hu, X.; Zhou, Q. Mitigation in multiple effects of graphene oxide toxicity in Zebrafish embryogenesis driven by humic acid. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (16), 10147–10154. doi:10.1021/acs.est.5b02220.

Cherrey, K. D.; Flury, M.; Harsh, J. B. Nitrate and colloid transport through coarse Hanford sediments under steady state variably saturated flow. *Water Resour. Res.* **2003**, *39* (6), 1165, doi: 10.1029/2002WR001944.

Chowdhury, I.; Duch, M. C.; Mansukhani, N. D.; Hersam, M. C.; Bouchard, D. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 6288–6296. doi: 10.1021/es400483.

Chowdhury, I.; Duch, M. C.; Mansukhani, N. D.; Hersam, M. C.; Bouchard, D. Deposition and release of graphene oxide nanomaterials using a quartz crystal microbalance. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48*, 961–969. doi:10.1021/es403247k.

Chrysikopoulos, C. V.; Sim, Y. One-dimensional virus transport in homogeneous porous media with time dependent distribution coefficient. *J. Hydrol.* **1996**, *185*, 199–219.

Chrysikopoulos, C.V.; Aravantinou, A.F. Virus attachment onto quartz sand: Role of grain size and temperature. *J. Environ. Chem. Eng.* **2014**, *2*, 796-801.

Chrysikopoulos, C.V.; Sotirelis, N. P.; Kallithrakas-Kontos N. G. Cotransport of graphene oxide nanoparticles and kaolinite colloids in porous media. *Transport Porous Med.* **2017**, *119*, 181-204. doi: 10.1007/s11242-017-0879-z.

Clover, D.O.; Herrmann, J.E. Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses. *Water Res. Pergamon Press* **1972**, *6*, 797 – 805.

Corapcioglu, M. Y.; Haridas, A. Microbial transport in soils and groundwater: a numerical model. *Adv. Water Resour.* **1985**, *8*, 188-200.

Corapcioglu, M. Y.; Haridas, A. Transport and fate of microorganisms in porous media: a theoretical investigation. *J. Hydrol.* **1984**, *72*, 149-169.

Crist, J. T., McCarthy, J. F.; Zevi, Y.; Baveye, P.; Throop, J. A.; Steenhuis, T. S. Pore-scale visualization of colloid transport and retention in partially saturated porous media. *Vadose Zone J.* **2004**, *3*, 444–450.

Crist, J. T.; Zevi, Y.; McCarthy, J. F.; Throop, J. A.; Steenhuis T. S. Transport and retention mechanisms of colloid in partially saturated porous media. *Vadose Zone J.* **2005**, *4*, 184–195.

Dallavalle, M.; Calvaresi, M.; Bottoni, A.; Melle-Franco, M.; Zerbetto, F. Graphene can wreak havoc with cell membranes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2015**, *7*, 4406 – 4414.

Darnton, N. C.; Turner, L.; Rojevsky, S.; Berg, H. C. On torque and tumbling in swimming *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **2007**, *189* (5), 1756 – 1764.

Das, M. R.; Sarma, R. K.; Borah, S. C.; Kumari, R.; Saikia, R.; Deshmukh, A. B.; Shelke, M. V.; Sengupta, P.; Szunerits, S.; Boukherroub, R. The synthesis of citrate-modified silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide nanosheets and their antibacterial activity. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2013**, *105*, 128-136. doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.12.033.

de Faria, A. F.; Martinez, D. S.; Meira, S. M.; de Moraes, A. C.; Brandelli, A.; Filho, A. G.; Alves, O. L. Anti-adhesion and antibacterial activity of silver nanoparticles supported on graphene oxide sheets. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* **2014**, *113*, 115-24. doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.08.006.



DeFelice, N.B.; Johnston, J.E.; Gibson, J.M. Acute gastrointestinal illness risks in North Carolina Community water systems: A methodological comparison. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49*, 10019-10027.

Derjaguin, B.V.; Landau, L. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solution of electrolytes. *Acta Physicochimica U.R.S.S.* **1941**, *14*, 633–662.

Devasagayam, T. P.; Tilak, J. C.; Boloor, K. K.; Sane, K. S.; Ghaskadbi, S. S.; Lele, R. D. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J. Assoc. Physicians India* 2004, *52*, 794–804.

Ding, Z.; Hu, X.; Morales, V. L.; Gao, B. Filtration and transport of heavy metals in graphene oxide enabled sand columns. *Chem. Eng. J.* **2014**, *257*, 248 – 252.

Dreyer, D.R.; Park, S.; Bielawski, C.W.; Ruoff, R.S. The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 228–240. doi: 10.1039/b917103g.

Eigler, S.; Hirsch, A. Chemistry with graphene and graphene oxide-Challenges for synthetic chemists. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 7720 – 7738.

Essendoubi, M.; Brhada, F.; Eljamali, J.E.; Filali-Maltouf, A.; Bonnassie, S.; Georgeault, S.; Blanco, C.; Jebbar, M. Osmoadaptative responses in the rhizobia nodulating Acacia isolated from south-eastern Moroccan Sahara. *Environ. Microbiol.* **2004**, *9*, 603 – 611.

Fang, M.; Chen, J. H.; Xu, X. L.; Yang, P. H.; Hidebrand, H. F. Antibacterial activities of onorganisc agents on six bacteria associated with oral infections by two susceptibility tests. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **2006**, *27*, 513 – 517.

Fontes, D. E.; Mills, A. L.; Hornberger, G. M.; Herman, J. S. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57*, 2473–2481.

Fontes, D.E.; Mills, E.A.; Hornberger, G.M.; Herman, J.S. Physical and chemical factors influencing transport of microorganisms through porous media. *Appl. Environ. Microbiol.* **1991**, *57* (9), 2473-2481.

Foppen, J.; Mporokoso, A.; Schijven, J. Determining straining of *Escherichia coli* from breakthrough curves. *J. Contam. Hydrol.* **2005**, *76* (3), 191–210.

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

Foppen, J.W.; Van Herwerden, M.; Schijven, J. Measuring and modelling straining of *Escherichia coli* in saturated porous media. *J. Contam. Hydrol.* **2007**, *93* (1), 236–254.

Fritz, G.; Schädler, V.; Willenbacher, N.; Wagner, N.J. Electrosteric stabilization of colloidal dispersions. *Langmuir* **2002**, *18*, 6381–6390.

Fujioka, R.S.; Loh, P.C.; Lau, L.S. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment: evidence for virus-inactivating microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **1980**, *39*, 1105 – 1110.

Gamerding, A. P.; Kaplan, D. I. Physical and chemical determinants of colloid transport and deposition in water-unsaturated sand and Yucca mountain tuff material. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 2497–2504.

Gao, B.; Saiers, J. E.; Ryan, J. N. Pore-scale mechanisms of colloid deposition and mobilization during steady and transient flow through unsaturated granular. *Water Resour. Res.* **2006**, *42*, W01410, doi: 10.1029/2005WR004233.

Gao, B.; Steenhuis, T. S.; Zevi, Y.; Morales, V. L.; Nieber, J. L.; Richards, B. K.; McCarthy, J. F.; Parlange, J.-Y. Capillary retention of colloids in unsaturated porous media *Water Resour. Res.* **2008**, 44, W04504 DOI: 10.1029/2006wr005332.

Geim, A. K. Graphene: Status and prospects. *Science* **2009**, 324 (5934), 1530–1534.

Gerba, C. P.; McLeod, J.S. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **1976**, 32, 114-120.

Gerba, C.P. (1996). Pathogens in the environment. In: "Pollution Science", (I.L. Pepper, C.P. Gerba and M.L. Brusseau Eds), pp. 279-299. John Wiley, NY.

Gerba, C.P.; Bitton, G. (1984). Microbial pollutants: their survival and transport pattern to groundwater, In: Groundwater Pollution Microbiology. Wiley Interscience, New York.

Gerba, C.P.; Smith, J.E. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J. Environ. Qual.* **2005**, 34, 42-48.

Ginn, T. R.; Wood, B. D.; Nelson, K. E.; Schiebe, T. D.; Murphy, E. M.; Clement, T. P. Processes in microbial transport in the natural subsurface. *Adv. Water Resour.* **2002**, 25, 1017–1042.

Goldberg, E.; Schrerenger, M.; Bucheli, T.D.; Hungerbuhler, K. Critical assessment of models for transport of engineered nanoparticles in saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, 48, 12732-12741.

Gordon, C.; Toze, S. Influence of groundwater characteristics on the survival of enteric viruses. *J. Appl. Microbiol.* **2003**, 95, 536-544.

Gurunathan, S.; Han, J. W.; Abdal Daye, A.; Eppakayala, V.; Kim, J. Oxidative stress-mediated antibacterial activity of GO and reduced GO in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomed.* **2012**, 7, 5901 – 5914.

Gurunathan, S.; Han, J. W.; Eppakayala, V.; Kim, J. H. Biocompatibility of microbially reduced graphene oxide in primary mouse embryonic fibroblast cells. *Colloids Surf. B* **2013**, 105, 58-66.

Harvey, R. W. Microorganisms as tracers in groundwater injection and recovery experiments: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* **1997**, 20, 461–472.

He, C.; Shi, Z. Q.; Ma, L.; Cheng, C.; Nie, C. X.; Zhou, M.; Zhao, C. S. Graphene oxide based heparin-mimicking and hemocompatible polymeric hydrogels for versatile biomedical applications. *J. Mater. Chem. B* **2015**, 3, 592–602. doi:10.1039/C4TB01806K.

Hegab, H. M.; El Mekawy, A.; Zou, L.; Mulcahy, D.; Saint, C. P.; Ginic-Markovic, M. The controversial antibacterial activity of graphene-based materials. *Carbon* **2016**, 105, 362–376.

Hegab, H. M.; Zou, L. Graphene oxide-assisted membranes: fabrication and potential applications in desalination and water purification. *J. Membr. Sci.* **2015**, 484, 95–106. doi:10.1016/j.memsci.2015.03.011.

Herzig, J. P.; Leclerc, D. M.; Legoff, P. Flow of suspensions through porous-media Application to deep filtration. *Ind. Eng. Chem.* **1970**, 62 (5), 8-35.

Hoek, E.M.; Agarwal, G.K. Extended DLVO interactions between spherical particles and rough surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, 298, 50–58.

Hornberger, G. M.; Mills, A. L.; Herman, J. S. Bacterial transport in porous media: evaluation of a model using laboratory observations. *Water Resour. Res.* **1992**, 28, 915–938.

Hotze, E.M.; Phenrat, T.; Lowry, G.V. Nanoparticle aggregation: Challenges to understanding transport and reactivity in the environment. *J. Environ. Qual.* **2010**, 39, 1909 – 1924.

Hu, C.; Wang, Q.; Zhao, H.; Wang, L.; Guo, S.; Li, X. Ecotoxicological effects of graphene oxide on protozoan *Euglena gracilis*. *Chemosphere* **2015**, *28*, 184–190. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.01.040.

Huang, X.; Qi, X.; Boey, F.; Zhang, H. Graphene-based composites. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 666–686.

Hui, L.; Piao, J. G.; Auletta, J.; Hu, K.; Zhu, Y.; Meyer, T.; Liu, H.; Yang, L. Availability of the basal planes of graphene oxide determines whether it is antibacterial. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. **2014**, *6* (15), 13183–13190. doi: 10.1021/am503070z.

Hummers, W. S.; Offeman, R. E. Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80* (6), 1339 – 1339.

Jamieson, R.C.; Gordon, R.J.; Sharples, K.E.; Stratton, G.W.; Madani, A. Movement and persistence of fecal bacteria in agricultural soils and subsurface drainage water: a review. *Can. Biosyst. Eng.* **2002**, *44*, 11 – 19.

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

John, D.E.; Rose, J.B. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. Critical review. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (19), 7345 – 7356.

Kaper, J.B.; Nataro, J.P.; Mobley, H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2004**, *2*, 123–140.

Karahan, H. E.; Wei, L.; Goh, K.; Liu, Z.; Birer, Ö.; Dehghani, F.; Xu, C.; Wei, J.; Chen, Y. Bacterial physiology is a key modulator of the antibacterial activity of GO. *Nanoscale* **2016**, *8*, 17181–17189.

Katzourakis, V.E. Three-dimensional transport and cotransport of pollutants in porous media (Τρισδιάστατη μεταφορά και συµµεταφορά ρύπων σε πορώδη µέσα). Dissertation, University of Patras (2018).

Keller, A. A.; Auset, M. A review of visualization techniques of biocolloid transport processes at the pore scale under saturated and unsaturated conditions. *Adv. Water Resour.* **2007**, *30*, 1392–1407.

Kim, H-K.; Tuite, E.; Nordén, B.; Ninham, B. Co-ion dependence of DNA nuclease activity suggests hydrophobic cavitation as a potential source of activation energy. *Eur. Phys. J. E. Soft. Matter.* **2001**, *4*, 411–417.

Kim, J.; Cote, L. J.; Huang, J. Two dimensional soft material: New faces of graphene oxide. *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45* (8), 1356–1364. doi: 10.1021/ar300047s.

Kromka, A.; Jira, J.; Stenclova, P.; Kriha, V.; Kozak, H.; Beranova, J.; Vretenar, V.; Skakalova, V.; Rezek, B. Bacterial response to nanodiamonds and GO sheets. *Phys. Status Solidi B* **2016**, *253* (12), 2481–2485.

Kubitschek, H.E. Cell volume increase in *Escherichia coli* after shifts to richer media. *J. Bacteriol.* **1990**, *172* (1), 94 –101.

Kurantowicz, N.; Jaworski, S. E.; Kutwin, S.; Strojny, M.; Wierzbicki, B.; Szeliga, M.; Hotowy, J.; Lipinska, A.; Koziski, L.; Jagieo, R.; André, J.C. Interaction of graphene family materials with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, 1 – 12.

Lanphere, J. D.; Luth, C. J.; Walker, S. L. Effects of solution chemistry on the transport of graphene oxide in saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47*, 4255–4261.

Lawrence, J. R.; Hendry, M. J. Transport of bacteria through geologic media. *Can. J. Microbiol.* **1996**, *42*, 410–422.

Lazouskaya, V.; Jin, Y. Interfacial interactions and colloid retention under steady flows in a capillary channel. *J. Colloid Interface Sci.* **2006**, *303*, 171–184.

León, V.; Quintana, M.; Herrero, M. A.; Fierro, J. L. G.; de la Hoz, A.; Prato, M.; Vázquez, E. Few-layer graphenes from ball-milling of graphite with melamine. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 10936–10938.

Levin, P. A.; Angert, E.R. Small but Mighty: Cell size and bacteria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2015**, 7 (7): a019216. doi: 10.1101/cshperspect.a019216.

Liang, S.; Xu, S.; Zhang, D.; He, J.; Chu, M. Reproductive toxicity of nanoscale graphene oxide in male mice. *Nanotoxicology* **2015**, 9 (1), 92–105. doi:10.3109/17435390.2014.893380

Liu, S.; Hu, M.; Zeng, T. H.; Wu, R.; Jiang, R.; Wei, J.; Wang, L.; Kong, J.; Chen, Y. Lateral dimension-dependent antibacterial activity of graphene oxide sheets. *Langmuir*. **2012**, 28 (33), 12364-12372. doi: 10.1021/la3023908

Liu, S.; Zeng, T. H.; Hofmann, M. E.; Wei, J.; Jiang, R.; Kong, J.; Chen, Y. Antibacterial activity of graphite, graphite oxide, graphene oxide, and reduced graphene oxide: membrane and oxidative Stress. *ACS Nano*. **2011**, 5, 6971-6980.

Logan, D. Transport modelling in hydrogeochemical systems New York: Springer **2001**.

Loh, K. P.; Bao, Q.; Eda, G.; Chhowalla, M. Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nat. Chem.* **2010**, 2 (12), 1015-1024. doi: 10.1038/nchem.907.

Luo, Y.; Yang, X.; Tan, X.; Xu, L.; Liu, Z.; Xiao, J.; Peng, R. Functionalized GO in microbial engineering: an effective stimulator for bacterial growth. *Carbon*. **2016**, 103, 172-180.

Macler, B.A.; Merkle, J.C. Current knowledge on groundwater microbial pathogens and their control. *Hydrogeol. J.* **2000**, 8 (1), 29-40.

Manas, P.; Pagan, R.; Raso, J.; Condon, S. Predicting thermal inactivation in media of different pH of Salmonella grown at different temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* **2003**, 87, 45–53.

Marcano, D.C.; Kosynkin, D.V.; Berlin, J.M.; Sinitskii, A.; Sun, Z.; Slesarev, A.; Alemany, L.B.; Lu, w.; Tour J.M. Improved Synthesis of Graphene Oxide. *ACS Nano*. **2010**, 4(8), 4806 – 4814.

Matthess, G.; Pekdeger, A.; Schroeter, J. Persistence and transport of bacteria and viruses in groundwater: a conceptual evaluation. *J. Contam. Hydrol.* **1987**, 2(2), 171 – 188.

McCarthy, J. F.; McKay, L. D. Colloid transport in the subsurface: past, present and future challenges. *Vadose Zone J.* **2004**, 3, 326–337.

McCarthy, J.F.; McKay, L.D. Colloid Transport in the Subsurface: Past, present, and future challenges. *Vadose Zone J.* **2004**, 3, 326-337.

McDowell-Boyer, L. M.; Hunt, J. R.; Sitar, N. Particle transport through porous media. *Water Resour. Res.* **1986**, 22, 1901-1921.

Murphy, E. M.; Ginn, T. R. Modeling microbial processes in porous media. *Hydrogeol. J.* **2000**, 8, 142-158.

Murray, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clin. Microbiol. Rev.* **1990**, 3, 46-65.

Musico, Y. L. F.; Santos, C. M.; Dalida, M. L. P.; Rodrigues, D. F. Surface modification of membrane filters using graphene and graphene oxide-based nanomaterials for bacterial inactivation and removal. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2014**, 2, 1559–1565.

Nair, R. R.; Blake, P.; Grigorenko, A. N.; Novoselov, K. S.; Booth, T. J.; Stauber, T.; Peres, N. M. R.; Geim, A. K. Fine structure constant defines visual transparency of graphene *Science* **2008**, 320 (5881), 1308. doi: 10.1126/science.1156965.

Novoselov, K. S.; Geim, A. K.; Morozov, S.V.; Jiang, D.; Zhang, Y.; Dubonos, S.V.; Grigorieva, I.V.; Firsov, A. A. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* **2004**, 306, 666-669.

Palmieri, V.; Papi, M.; Conti, C.; Ciasca, G.; Maulucci, G.; de Spirito, M. The future development of bacteria fighting medical devices: the role of graphene oxide. *Expert. Rev. Med. Devices*. **2016**, 13 (11), 1013 – 1019.

Palmieri, V.; Lauriola, M. C.; Ciasca, G.; Conti, C.; de Spirito, M.; Papi, M. The graphene oxide contradictory effects against human pathogens. *Nanotechnology* **2017**, 28, 152001.

Park, J.; Cho, Y.S.; Sae, S.J.; Byeon, M.; Yang, S.J.; Park, C.R.; Characteristics tuning of graphene-oxide-based-graphene to various end-uses. *Energy Storage Mater.* **2018**, 14, 8-21.

Penrod, S. L.; Olsen, T. M.; Grant, S. B. Deposition kinetics of two viruses in packed bed of quartz granular media. *Langmuir* **1996**, 12, 5576–5587.

Perreault, F.; de Faria, A. F.; Elimelech, M. ChemInform abstract: Environmental applications of graphene-based nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* 2015, 46 (39). doi: 10.1039/c5cs00021a.

Perreault, F.; de Faria, A.F.; Nejati, S.; Elimelech, M. Antimicrobial properties of graphene oxide nanosheets: Why size matters. *ACS Nano* 2015, 9, 7226–7236.

Phenrat, T.; Saleh, N.; Sirk, K.; Kim, H-J.; Tilton, R.D.; Lowry, G.V. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on aggregation and sedimentation. *J. Nanopart. Res.* **2008**, 10, 795–814.

Porubcan, A.A.; Xu, S. Colloid straining within saturated heterogeneous porous media. *Water Res.* **2011**, 45 (4), 1796–1806.

Powelson, D. K.; Mills, A. L. Transport of *Escherichia coli* in sand columns with constant and changing water contents. *J. Environ. Qual.* **2001**, 30, 238–245.

Prochnow, A.M.; Clauson, M.; Hong, J.; Murphy, A.B. Gram positive and Gram negative bacteria differ in their sensitivity to cold plasma. *Sci Rep.* **2016**, 6: 38610. doi: 10.1038/srep38610.

Qi, Z.; Hou, L.; Zhu, D.; Ji, R.; Chen, W. Enhanced transport of phenanthrene and 1-naphthol by colloidal graphene oxide nanoparticles in saturated soil. *Environ. Sci. Technol.* **2014a**, 48, 10136-10144.

Reddy, D. A.; Ma, R.; Choi, M.Y.; Kim, T. K. Reduced graphene oxide wrapped ZnS–Ag<sub>2</sub>S ternary composites synthesized via hydrothermal method: Applications in photocatalyst degradation of organic pollutants. *Appl. Surf. Sci.* **2015**, 324, 725–735. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.11.026.

Reddy, K.R.; Khaleel, R.; Overcash, M.R. Behavior and transport of microbial pathogen and indicator organisms in soils treated with organic wastes. *J. Environ. Qual.* **1981**, 10, 255–266.

Reshes, G.; Vanounou, S.; Fishov, I.; Feingold, M. Cell shape dynamics in *Escherichia coli*. *Biophys. J.* **2008**, 94 (1), 251 – 64.

Robertson, J.B.; Edberg, S.C. Natural protection of spring and well drinking water against surface microbial contamination. *Crit. Rev. Microbiol.* **1997**, 23(2), 143-178.

Römer, A.; Wieler, L.H.; Schierack, P. Analyses of intestinal commensal *Escherichia coli* strains from wild boars suggest adaptation to conventional pig production conditions. *Vet. Microbiol.* **2012**, *161*, 122-129.

Romero-Vargas Castrillón, S.; Perreault, F.; de Faria, A. F.; Elimelech, M. Interaction of GO with bacterial cell membranes: insights from force spectroscopy. *Environ. Sci. Technol. Lett.* **2015**; *2*, 112–117.

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.

Rose, J.; Dickson, L.; Farrah, S.; Carnahan, R. Removal of pathogenic and indicator microorganisms by a full-scale water reclamation facility. *Water Res.* **1996**, *30* (11), 2785-2797.

Salata. O. Applications of nanoparticles in biology and medicine. *J. Nanobiotechnol.* **2004**, *2* (1), 3. doi: 10.1186/1477-3155-2-3.

Sanchez, V.C.; Jachak, A.; Hurt, R.H.; Kane, A.B. Biological interactions of graphene-family nanomaterials: An interdisciplinary review. *Chem. Res. Toxicol.* **2011**, *25*, 15–34.

Scheibe, T.D.; Wood, B.D. A particle-based model of size or anion exclusion with application to microbial transport in porous media. *Water Resour. Res.* **2003**, *9* (4), 1080, doi: 10.1029/2001WR.

Schijven, J. F.; Hassanizadeh, S. M. Removal of viruses by soil passage: overview of modeling, processes and parameters. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **2000**, *30*, 49-127.

Seabra, A. B.; Paula, A. J.; de Lima, R.; Alves, O. L.; Durán, N. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.* **2014**, *27* (2), 159–168, doi: 10.1021/tx400385x.

Sen, K.T.; Khilar, K.C. Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *119*, 71-96.

Sen, T. K.; Das, D.; Khilar, K. C.; Suraishkumar, G. K. Bacterial transport in porous media: new aspects of the mathematical model. *Colloids Surf. A* **2005**, *260*, 53-62.

Sen, T. K.; Khilar, K. C. Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2006**, *119*, 71–96.

Sen, T. K.; Shanbag, S.; Khilar, K.C. Subsurface colloids in groundwater contamination: a mathematical model. *Colloids Surf. A* **2004**, *232*, 29–38.

Senok, A.C.; Verstraelen, H.; Temmerman, M.; Botta, G.A. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Sys. Rev.* **2009**. (4) CD006289. doi:10.1002/14651858.CD006289.pub2. PMID 19821358.

Shaw, D. J. *Colloid and Surface Chemistry* (4th Ed.) Oxford: Butterworth Heinemann. **1998**.

Sim, Y.; Chrysikopoulos, C.V. Analytical models for one-dimensional virus transport in saturated porous media. *Water Resour. Res.* **1995**, *31*, 1429-1437 (*Correction, Water Resour. Res.*, *32*, 1473, 1996).

Sim, Y.; Chrysikopoulos, C.V. Virus transport in unsaturated porous media. *Water Resour. Res.* **2000**, *36*, 173-179.

Simoni, S.F.; Bosma, T.N.P.; Harms, H.; Zehnder, A.J.B. Bivalent cations increase both the subpopulation of adhering bacteria and their adhesion efficiency in sand columns. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34* (6), 1011 – 1017.

Song, B.; Zhang, C.; Zeng, G.; Gong, J.; Chang, Y.; Jiang, Y. Antibacterial properties and mechanism of graphene oxide-silver nanocomposites as bactericidal agents for water disinfection. *Arch. Biochem. Biophys.* **2016**, *604*, 167-176. doi: 10.1016/j.abb.2016.04.018.

Song, Z.; Wang, X.; Zhu, G.; Nian, Q.; Zhou, H.; Yang, D.; Qin, C.; Tang, R. Virus capture and destruction by label-free graphene oxide for detection and disinfection applications. *Small* **2015**, *11*(9-10), 1171-1176. doi:10.1002/sml.201401706.

Stevik, T. K.; Ausland G.K.; Hanssen, J. F. Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Res.* **2004**, *38*, 1355-1367.

Stuart, C. H.; Schwartz, S. A.; Beeson, T. J.; Owatz, C. B. *Enterococcus faecalis*: Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J. Endod.* **2006**, *32* (2), 93-98.

Sun, X.; Liu, Z.; Welsher, K.; Robinson, J. T.; Goodwin, A.; Zaric, S.; Dai, H. Nano-graphene oxide for cellular imaging and drug delivery. *Nano Res.* **2008**, *1* (3), 203 - 212.

Swanton S.W. (1995), "Modelling colloid transport in groundwater: The prediction of colloid stability and retention behaviour", *Advances in Colloid and Interface Science*, Vol. 54, pp. 129 - 208.

Tang, H.; Zhang, J.; Zhang, Y. J.; Xiong, Q. Q.; Tong, Y. Y.; Li, Y.; Wang, X. L.; Gu, C. D.; Tu, J. P. Porous reduced graphene oxide sheet wrapped silicon composite fabricated by steam etching for lithium-ion battery application. *J. Power Sources* **2015**, *286*, 431-437. doi:10.1016/j.jpowsour.2015.03.185.

Tang, J.; Chen, Q.; Xu, L.; Zhang, S.; Feng, L.; Cheng, L.; Xu, H.; Liu, Z.; Peng, R. Graphene oxide-silver nanocomposite as a highly effective antibacterial agent with species-specific mechanisms. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2013**, *5* (9), 3867-74. doi: 10.1021/am4005495.

Tate, R.L. Cultural and environmental factors affecting the longevity of *Escherichia coli* in Histosolst. *Appl. Environ. Microbiol.* **1978**, *2*(2), 171-188.

Taylor, D.H.; Moore, R.S.; Sturman, L.S. Influence of pH and electrolyte composition on adsorption of poliovirus by soils and minerals. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *42*, 976 - 984.

Taylor, T.A.; Unakal, C.G. *Staphylococcus Aureus*. *StatPearls. NCBI Bookshelf* **2017**.

Tegou, E.; Magana, M.; Katsogridaki, A. E.; Ioannidis, A.; Raptis, V.; Jordan, S.; Chatzipanagiotou, S.; Chatzandroulis, S.; Ornelas, C.; Tegos, G. P. Terms of endearment: Bacteria meet graphene nanosurfaces. *Biomaterials.* **2016**, *89*, 38-55. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.02.030.

Titov, A.V.; Král, P.; Pearson, R. Sandwiched graphene-Membrane superstructures. *ACS Nano* **2009**, *4*, 229-234.

Toda, K.; Furue, R.; Hayami, S.: Recent progress in applications of graphene oxide for gas sensing: a review. *Anal. Chim. Acta.* **2015**, *878*, 43-53. doi:10.1016/j.aca.2015.02.002.

Tong, S.Y.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, *28* (3), 603 - 661.

Tu, Y.; Lv, M.; Xiu, P.; Huynh, T.; Zhang, M.; Castelli, M.; Liu, Z.; Huang, Q.; Fan, C.; Fang, H. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* **2013**, *8*, 594-601.

Tufenkji, N.; Elimelech, M. Correlation equation for predicting singlecollector efficiency in physicochemical filtration in saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 529–536.

Ubbink, J.; Schar-Zammaretti, P. Colloidal properties and specific interactions of bacterial subsurfaces. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2007**, *12*, 263 – 270.

van Oss C.J. Acid-base interracial interactions in aqueous media. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **1993**, *78*, 1-49.

Veerapandian, M.; Zhang, L.; Krishnamoorthy, K.; Yun, K. Surface activation of graphene oxide nanosheets by ultraviolet irradiation for highly efficient anti-bacterials. *Nanotechnol.* **2013**, *24* (39), 395706. doi: 10.1088/0957-4484/24/39/395706.

Verwey, E.J.W.; Overbeek, J.T.G. Theory of the Stability of Lyophobic Colloids. Elsevier, Amsterdam, pp. 205 (1948).

Wan, J.; Tokunaga, T. K. Film straining of colloids in unsaturated porous media: conceptual model and experimental testing. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 2413–2420.

Wang, A.; Pu, K.; Dong, B.; Liu, Y.; Zhang, L.; Zhang, Z.; Duan, W.; Zhu, Y. Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene oxide towards human lung fibroblast cells. *J Appl Toxicol.* **2013**, *33* (10), 1156–1164.

Wang, H.; Adeleye, A. S.; Huang, Y.; Li, F.; Keller, A. A. Heteroaggregation of nanoparticles with biocolloids and geocolloids. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2015**, *226*, 24-36.

Wang, L.; Zhao, W.; O'Donoghue, M.B.; Tan, W. Fluorescent nanoparticles for multiplexed bacteria monitoring. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *18*, 297 – 301.

Williams, D. F.; Berg, J. C. The aggregation of colloidal particles at the air-water interface. *J. Colloid Interface Sci.* **1992**, *152*, 218–229.

Williams, P.C.M.; Berkley, J.A. Guidelines for the management of paediatric cholera infection: a systematic review of the evidence (Review). *J. Paediatr. Child Health* **2018**, *38*, 16 – 31.

Wu, L.; Liu, L.; Gao, B.; Muñoz-Carpena, R.; Zhang, M.; Chen, H.; Zhou, Z.; Wang, H. Aggregation kinetics of GOs in aqueous solutions: experiments, mechanisms, and modeling. *Langmuir* **2013**, *29*, 15174 – 15181.

Wu, W.; Giese, R.; Van Oss, C. Stability versus flocculation of particle suspensions in water-correlation with the extended DLVO approach for aqueous systems, compared with classical DLVO theory. *Colloids Surf B Biointerfaces* **1999**, *14*, 47–55.

Wu, W.; Yan, L.; Wu, Q.; Li, Y.; Li, Q.; Chen, S.; Yang, Y.; Gu, Z.; Xu, H.; Yin, Z. Q. Evaluation of the toxicity of graphene oxide exposure to the eye. *Nanotoxicology.* **2016**, *10* (9), 1329–1340. doi:10.1080/17435390.2016.1210692.

Xu, S.; Gao, B.; Saiers, J. E. Straining of colloidal particles in saturated porous media. *Water Resour. Res.* **2006**, *42*, W12S16. doi: 10.1029/2006WR004948.

Yang, S.; Han, X.; Yang, Y.; Qiao, H.; Yu, Z.; Liu, Y.; Wang, J.; Tang, T. Bacteria-targeting nanoparticles with microenvironment-responsive antibiotic release to eliminate intracellular *Staphylococcus aureus* and associated infection. *Environ. Sci. Technol.* **2018**, *17*, 14299 – 14311.

Yates, M.V.; Stetzenbach, L.D.; Gerba, C.P.; Sinclair, N.A. The effect of indigenous bacteria on virus survival in ground water. *J. Environ. Sci. Health* **1990**, *25*, 81 – 100.

Zevi, Y.; Dathe, A.; McCarthy, J. F.; Richards, B. K.; Steenhuis, T. S.; Distribution of colloidal particles onto interface in partially saturated sand. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 7055–7064.

Zhang, W.; Nanoparticle aggregation: Principles and modeling. *Springer*, **2014**.



Zhao, J.; Liu, L.; Fen, L. Graphene oxide: Physics and applications. *Library of Congress* **2015**, Control Number: 201495422.

Zhou, D. D.; Jiang, X. H.; Lub, Y.; Fan, W.; Huo, M. X.; Crittenden, J. C. Cotransport of graphene oxide and Cu(II) through saturated porous media. *Sci. Total Environ.* **2016**, 550, 717–726. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.141.

Zhou, R.; Gao, H. Cytotoxicity of graphene: Recent advances and future perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2014**, 6, 452–474.

Zischka, M.; Künne, C.T.; Blom, J.; Wobser, D.; Sakıncı, 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.; Werner, G. Comprehensive molecular, genomic and phenotypic analysis of a major clone of *Enterococcus faecalis* MLST ST40. *BMC Genomics* **2005**, 16, 175.

Zou, X.; Zhang, L.; Wang, Z.; Luo, Y. Mechanisms of the antimicrobial activities of graphene materials. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 2064–2077.

## Ελληνική

Ebbing, D. D.; Gammon, S. D. Γενική Χημεία. 6η Έκδοση (μετάφραση Ν.Δ. Κλούρας, Ν.Δ.), Εκδοτικός Οίκος Π. Τραυλός, Αθήνα (**2011**).

Παναγιώτου, Κ. Διεπιφανειακά Φαινόμενα και Κolloειδή Συστήματα (**1998**), Εκδόσεις Ζήτη, ISBN: 9789604314553.

Συγγούνα, Β.Η. Αδρανοποίηση και μεταφορά βιοκolloειδών σε πορώδη μέσα, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Πανεπιστήμιο Πατρών, **2012**.

Χρυσικόπουλος, Κ.Β. (**2013**) Εισαγωγή στις διεργασίες καθαρισμού νερού και λυμάτων, Εκδόσεις Τζιολα.

## *Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>*

## 2. Υλικά και μέθοδοι

Στη παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εξετάζεται η επίδραση των τεχνητά κατασκευασμένων νανοσωματιδίων GO στη μεμονομένη μεταφορά και συµμεταφορά τριών βακτηρίων (*Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* και *Staphylococcus aureus*) ανθρωπογενούς προέλευσης σε κορεσμένα πορώδη μέσα. Για την προσοµοίωση του κορεσμένου μέσου χρησιµοποιήθηκε γυάλινη στήλη, πληρωµένη µε χονδρόκοκκη χαλαζιακή άµµο. Στον πρώτο κύκλο πειραµάτων, πραγµατοποιήθηκαν πειράµατα ροής διαμέσου της στήλης, η οποία είχε κορεστεί µε διάλυµα PBS χαµηλής ιοντικής ισχύος, µε σκοπό να προσδιοριστούν ξεχωριστά τα χαρακτηριστικά της µεταφοράς του εναιωρήµατος των σωματιδίων GO, καθώς και κάθε µεμονωµένου βακτηρίου. Κατά το δεύτερο πειραµατικό κύκλο, διερευνήθηκαν µεταβολές στη κινητικότητα ή/και στη παρακράτηση κάθε παθογόνου µικροοργανισµού κατά την ταυτόχρονη άντληση GO, υπό µορφή εναιωρήµατος, από την στήλη. Επιπρόσθετα, εκτελέστηκαν πειράµατα συµμεταφοράς των τριών βακτηρίων παρουσία και απουσία εναιωρήµατος GO, µε σκοπό να διερευνηθούν τυχόν µεταβολές στη µεταφορά που δύνανται να προκληθούν λόγω αλληλεπίδρασης µεταξύ των τριών εξεταζόµενων βακτηρίων (πχ., συνεργιστική ή µη δράση) καθώς και λόγω αλληλεπίδρασης τους µε το GO. Όλα τα πειράµατα διεξήχθησαν υπό τις ίδιες υδατικές συνθήκες (pH=7,  $I_s=2$  mM), µε αρχική συγκέντρωση µικροοργανισµών  $\sim 10^5$  CFU/mL και οξειδίου του γραφενίου 20 mg/L, σε θεµοκρασία 25 °C.

### 2.1 Παρασκευή ρυθµιστικού διαλύµατος (Phosphate Buffer Solution)

Για την δηµιουργία όλων των εξεταζόµενων εναιωρηµάτων (δηλ. των βιοκολλοειδών και των νανοσωµατιδίων GO) των πειραµάτων µεταφοράς χρησιµοποιήθηκε ρυθµιστικό διάλυµα φωσφορικών (PBS), χαµηλής ιοντικής ισχύος ( $\sim 2$  mM) και ουδέτερου pH ( $\sim 7$ ) ως διάλυµα υποβάθρου (background solution). Το εν λόγω διάλυµα παρασκευαζόταν πριν από την έναρξη κάθε πειράµατος, σε γυάλινη φιάλη (kimble glass bottle) χωρητικότητας 1 L µε διάλυση 0.0779 g άλατος διένυδρου, διβασικού φωσφορικού νατρίου (Sodium phosphate dibasic dihydrate,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), µε µοριακό βάρος  $\text{MW}=177.99$  g/mol, και 0.0943 g άλατος μονοβασικού φωσφορικού καλίου (Potassium phosphate monobasic,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) µε µοριακό βάρος  $\text{MW}=136.09$  g/mol, σε 1000 mL υπερέκαθαρου νερού (ultrapure water), αντίστασης  $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ . Οι απαιτούµενες ποσότητες των φωσφορικών αλάτων που χρησιµοποιούνται, υπολογίστηκαν µέσω της εξίσωσης Henderson-Hasselbalch (2.1.1), για επιθυµητό pH = 7 και σταθερά ισορροπίας  $K_a = 6.3 \times 10^{-8}$  M του οξέος, και ζυγίστηκαν σε εργαστηριακή ζυγαριά ακριβείας τεσσάρων ψηφίων (Model No ABS 220-4N, Analytical balance ABS-N/ABJ-NM, KERN & Sohn GmbH, Balingen, Germany):

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{HPO}_4^{-2}]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^{-}]} \quad (2.1.1)$$

Το εν λόγω διάλυμα παρασκευαζόταν σε όγκο τέτοιο, ώστε να καλύπτονται όλες οι πειραματικές ανάγκες, δηλαδή η πλήρωση της στήλης, η δημιουργία των εναιωρημάτων των νανοσωματιδίων GO και των βακτηρίων, η έκπλυση της στήλης, καθώς και οι αραιώσεις των δειγμάτων των βακτηρίων. Επίσης, το διάλυμα PBS πριν τη χρήση του αποστειρωνόταν σε κλίβανο προκειμένου να αποφευχθούν ενδεχόμενες επιμολύνσεις των μικροβιακών αιωρημάτων.

## 2.2 Παρασκευή εναιωρήματος GO και δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης

Στην παρούσα μελέτη, οξείδιο του γραφενίου υπό μορφή φύλλων (GO sheets) αγορασμένων από τη εταιρεία Sigma Aldrich (St. Louis, USA), χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του εναιωρήματος GO. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργείτο αρχικά πυκνό διάλυμα νανοσωματιδίων συγκέντρωσης 100 mg/L, με προσθήκη 0.01 g νανόφυλλων σε 100 mL αποστειρωμένου διαλύματος PBS, που είχαν ογκομετρηθεί σε γυάλινη αποστειρωμένη φιάλη χωρητικότητας 250 mL, η οποία που έφερε πώμα. Στη συνέχεια, η φιάλη τοποθετείτο σε λουτρό υπερήχων, που περιείχε απιονισμένο νερό (sonication bath Elmasonic S 30/(H), Elma Schmidbauer GmbH, Singen, Germany). Η διάρκεια της ηχοβόλισης ήταν δύο ώρες και η στάθμη του απιονισμένου νερού, έπρεπε καλύπτει την επιφάνεια του εναιωρήματος GO, ούτως ώστε να επιτευχθεί ομοιόμορφη διασπορά του GO σε όλο τον όγκο του δείγματος. Το απιονισμένο νερό στην συσκευή υπερήχων ανανεωνόταν ανά μισή ώρα περίπου, ώστε να αποφευχθεί η αύξηση της θερμοκρασίας του. Η αύξηση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος νερού, προκαλεί αύξηση της θερμοκρασίας του δείγματος, η οποία επιφέρει αύξηση της ταχύτητας των νανοσωματιδίων. Όσο μεγαλύτερες είναι οι ταχύτητες των σωματιδίων στο δείγμα, τόσο περισσότερες είναι και οι συγκρούσεις μεταξύ τους, εξαιτίας της τυχαίας κίνησης Brown, με αποτέλεσμα το εναιώρημα να αποσταθεροποιείται.

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων, η συγκέντρωση εναιωρήματος GO που μελετήθηκε ήταν 20 mg/L και η συνολική απαίτηση για κάθε πείραμα ήταν περίπου 180 mL εναιωρήματος. Ωστόσο, για λόγους ασφαλείας, πάντοτε παρασκευαζόταν μεγαλύτερος όγκος εναιωρήματος, από τον πειραματικά απαιτούμενο, και συγκεκριμένα 300 mL. Συνεπώς, 50 mL του πυκνού εναιωρήματος GO μεταφέρονταν κάθε φορά σε αποστειρωμένη γυάλινη φιάλη, όπου και αραιώνονταν με προσθήκη 250 mL αποστειρωμένου ρυθμιστικού διαλύματος PBS σε τελικό όγκο 300 mL.

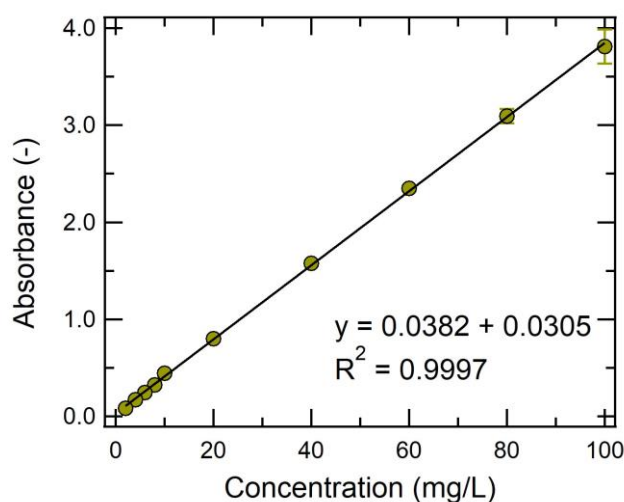
Για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων GO στα δείγματα που λαμβάνονταν στην έξοδο της στήλης, αλλά και για τον έλεγχο πιθανών μεταβολών στη σταθερότητά των αρχικών εναιωρημάτων GO που αντλούνταν από

την στήλη, κατασκευάστηκε καμπύλη βαθμονόμησης για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (pH = 7 και  $I_s = 2$  mM). Η καμπύλη βαθμονόμησης παρέχει τη δυνατότητα συσχέτισης δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης νανοσωματιδίων GO με την απορρόφηση που εμφανίζουν σε δεδομένο μήκος κύματος. Συνεπώς, η συγκέντρωση των δειγμάτων άγνωστης συγκέντρωσης μπορεί να προσδιοριστεί μέσω μέτρησης της τιμής απορρόφησης τους, στο επιλεγμένο μήκος κύματος και εν συνεχεία γραμμική παρεμβολή της τιμής απορρόφησης στην καμπύλη βαθμονόμησης. Ειδικά το GO εμφανίζει μέγιστο απορρόφησης στα 231 nm (Liu et al., 2013) της περιοχής της υπεριώδους ακτινοβολίας (10 nm - 400 nm) και για τον λόγο αυτό η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε σε αυτό το μήκος κύματος.

### ➤ Δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης

Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης 10 σημείων με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων νανοσωματιδίων GO (100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, και 2 mg/L). Τα εναιωρήματα GO γνωστής συγκέντρωσης (80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, και 2 mg/L) προέκυψαν με διαδοχικές αραιώσεις από το αρχικό πυκνό διάλυμα GO (100 mg/L) με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων αποστειρωμένου διαλύματος PBS. Οι αραιώσεις πραγματοποιήθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες χωρητικότητας 20 mL με βιδωτό καπάκι. Μετά το πέρας των αραιώσεων, και αφού είχε προηγηθεί μηδενισμός του οργάνου (φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης UV-Vis, μοντέλο UV-1900, της εταιρείας Shimadzu) με διάλυμα υποβάθρου (PBS), ποσότητα 1 mL από κάθε εναιώρημα, γνωστής συγκέντρωσης, μεταφέρονταν σε χαλαζιακή κυψελίδα, η οποία τοποθετείτο στο φασματοφωτόμετρο υπεριώδους-ορατού, με σκοπό τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του δείγματος στα 231 nm. Η κυψελίδα με το διάλυμα υποβάθρου παρέμενε εντός του φασματοφωτόμετρου καθ' όλη την διάρκεια των μετρήσεων, ώστε το όργανο να μηδενίζεται πριν από κάθε μέτρηση. Επίσης, πριν από κάθε νέα μέτρηση, η κυψελίδα του δείγματος καθαριζόταν εσωτερικά (με απιονισμένο νερό) και εξωτερικά με βαμβάκι εμποτισμένο με μικρή ποσότητα αραιού διαλύματος αιθανόλης, ούτως ώστε να μην υπάρχουν παρεμβολές στις μετρήσεις. Στη συνέχεια, γινόταν ομογενοποίηση της κυψελίδας με μικρή ποσότητα από το εκάστοτε δείγμα, η ποσότητα αυτή εγχυνόταν σε δοχείο αποβλήτων και η κυψελίδα πληρωνόταν εκ νέου με 1 mL από το ίδιο δείγμα.

Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι αντιπροσωπευτικά, για κάθε δείγμα γνωστής συγκέντρωσης, λαμβανόταν τριπλέτα μετρήσεων απορρόφησης. Η λήψη των μετρήσεων γινόταν σε σύντομα χρονικά διαστήματα, ώστε να διασφαλίζεται η διατήρηση της σταθερότητας των δειγμάτων και να αποφεύγονται τυχόν καθιζήσεις ή συσσωματώσεις των νανοσωματιδίων GO. Στο Γράφημα 2.1 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης. Η οπτική απορρόφηση του πυκνού εναιωρήματος των 100 mg/L ήταν  $3.8127 \pm 0.1738$  στο συγκεκριμένο μήκος κύματος, ενώ η οπτική απορρόφηση του εναιωρήματος GO συγκέντρωσης 20 mg/L είχε μετρηθεί στην τιμή  $0.7977 \pm 0.0015$ .



Γράφημα 2.1: Καμπύλη βαθμονόμησης νανοσωματιδίων GO για εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες (pH = 7,  $I_S = 2$  mM).

Η τιμή του συντελεστή συσχέτισης της εξίσωσης παλινδρόμησης (0.9997), υποδεικνύει καλή γραμμικότητα μεταξύ συγκέντρωσης νανοσωματιδίων GO και οπτικής απορρόφησης στα 231 nm. Αξίζει να σημειωθεί για τη μέτρηση της οπτικής απορρόφησης των δειγμάτων που λαμβάνονταν στην έξοδο της πειραματικής στήλης και προορίζονταν για ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του GO, γινόταν μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου διπλής δέσμης με κυψελίδα πληρωμένη με ποσότητα PBS που είχε εξέλθει της στήλης λίγο πριν την έναρξη της διοχέτευσης των εναιωρημάτων ( $t_0$ ). Αυτό ήταν σημαντικό, ώστε στις μετρήσεις να μην δημιουργούνται παρεμβολές από αιωρούμενα σωματίδια του πληρωτικού υλικού της στήλης.

### 2.3 Παρασκευή μικροβιακών εναιωρημάτων

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν δύο Gram θετικά βακτήρια και ένα Gram αρνητικό. Το Gram αρνητικό βακτηριακό στέλεχος που επιλέχθηκε ήταν το *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919 (DMS 498, ATCC 23716, K-12 “wild type”). Όσον αφορά στα Gram θετικά βακτήρια μελετήθηκε το στέλεχος *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506, PCI 1325) και ένα στέλεχος *Staphylococcus aureus*, απομονωμένο από δείγμα πουλερικών και βιοχημικά ταυτοποιημένο βάσει του πρωτοκόλλου API® Staph Test Biomerieux.

Τα τρία βακτηριακά στελέχη διατηρούνταν σε θερμοκρασία  $-80$  °C σε πλαστικά φιαλίδια (eppendorf safe lock tubes) που περιείχαν διάλυμα γλυκερόλης που επέτρεπε τη συντήρησή τους. Δύο ημέρες, πριν την έναρξη κάθε πειράματος, παρασκευάζονταν διπλές ανακαλλιέργειες του εκάστοτε βακτηριακού στελέχους σε μη εκλεκτικό θρεπτικό υλικό (για τον τρόπο παρασκευής τρυβλίων με θρεπτικού υλικού δείτε Παράγραφο 2.5). Πιο συγκεκριμένα, το κατεψυγμένο φιαλίδιο του εκάστοτε εξεταζόμενου βακτηρίου αφαιρούνταν από το ψυγείο και όταν έρχονταν σε

θερμοκρασία δωματίου λαμβανόταν 2 φορές μία μικρή ποσότητα μέσω αποστειρωμένου κρίκου, η οποία απλωνόταν σε 2 τρυβλία (petri dishes) που περιείχαν μη εκλεκτικό υλικό Nutrient Agar.

Οι βακτηριακές ανακαλλιέργειες επωάζονταν σε κλίβανο σε θερμοκρασία 37 °C για δύο ημέρες. Την ημέρα διεξαγωγής του πειράματος παρασκευαζόταν το εναιώρημα του βακτηρίου. Για την διαδικασία παρασκευής του εναιωρήματος λαμβανόταν από την επωασμένη, φρέσκια, ανακαλλιέργεια με αποστειρωμένο κρίνο μικρή ποσότητα μικροοργανισμών, η οποία διαλυόταν ομοιόμορφα σε 20 mL αποστειρωμένου διαλύματος PBS (σε θερμοκρασία δωματίου, 25°C) που είχαν τοποθετηθεί σε αποστειρωμένη μικρή κωνική φιάλη των 50 mL.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του αρχικού μικροβιακού εναιωρήματος γινόταν βάσει της θολομετρικής κλίμακας McFarland (McFarland Standard No. 0.5). Βάσει της εν λόγω κλίμακας, 0.1 οπτική απορρόφηση ομοιόμορφου μικροβιακού εναιωρήματος στα 600 nm αντιστοιχεί σε συγκέντρωση  $\sim 10^8$  CFU/mL. Συνεπώς, μικρή ποσότητα (2 mL) από το εναιώρημα μεταφερόταν με μηχανική πιπέτα των 1000  $\mu$ L, σε καθαρή πλαστική κυψελίδα με σκοπό την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του εναιωρήματος σε μήκος κύματος 600 nm. Πριν από κάθε μέτρηση πραγματοποιείτο μηδενισμός του φαρματοφωτόμετρου μονής δέσμης (UV-VIS Spectrophotometer, μοντέλο UVmini-1240, της εταιρείας Shimadzu) στο συγκεκριμένο μήκος κύματος με πλαστική κυψελίδα που περιείχε μόνο 2 mL διαλύματος PBS (διάλυμα υποβάθρου), ώστε τα συστατικά του ρυθμιστικού διαλύματος να μην επηρεάζουν την μέτρηση οπτικής απορρόφησης του βακτηριακού εναιωρήματος.

Εάν η προκύπτουσα τιμή οπτικής απορρόφησης ήταν  $< 0.1$  abs, τότε στην κωνική φιάλη του εναιωρήματος μεταφερόταν επιπλέον ποσότητα μικροοργανισμών από την ανακαλλιέργεια, με χρήση καθαρού κρίκου. Αντίθετα, αν η οπτική απορρόφηση ήταν  $> 0.1$  abs, τότε στην κωνική φιάλη, προστίθετο μικρή ποσότητα διαλύματος PBS, προκειμένου να αραιωθεί το μικροβιακό εναιώρημα. Σε κάθε περίπτωση νέας μέτρησης, η κυψελίδα καθαριζόταν με απιονισμένο νερό, ξεπλενόταν με μικρή ποσότητα PBS, προκειμένου να ομογενοποιηθεί με το διάλυμα υποβάθρου, και πληρωνόταν εκ νέου με 2 mL δείγμα εναιωρήματος, με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας (χρησιμοποιώντας καθαρό αποστειρωμένο tip, ώστε να μην δημιουργηθεί επιμόλυνση στο εναιώρημα).

Όταν η οπτική απορρόφηση λάμβανε τιμή 0.1, τότε το εναιώρημα θεωρείτο πως είχε συγκέντρωση  $10^8$  CFU/mL. Ωστόσο, τα πειράματα μεταφοράς εκτελούνταν αντλώντας από την στήλη μικροβιακά εναιωρήματα συγκέντρωσης  $\sim 10^5$  CFU/mL και όγκου 300 mL. Για τον λόγο αυτό, πραγματοποιούνταν 4 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις του αρχικού πυκνού εναιωρήματος συγκέντρωσης  $10^8$  CFU/mL. Αρχικά για την πρώτη αραιώση, με μηχανική πιπέτα μεταφερόταν 1 mL από το πυκνό εναιώρημα σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα χωρητικότητας 20 mL που περιείχε 9 mL διαλύματος PBS. Πραγματοποιούνταν αναδεύσεις με την πιπέτα ώστε να ομογενοποιηθεί το εναιώρημα και με τον τρόπο αυτό προέκυπτε τελική

συγκέντρωση εναιωρήματος  $10^7$  CFU/mL. Στη συνέχεια, 3 mL από το εναιώρημα με συγκέντρωση  $10^7$  CFU/mL μεταφέρονταν με πιπέτα σε καθαρή αποστειρωμένη κωνική φιάλη χωρητικότητας 50 mL, στην οποία είχαν τοποθετηθεί 27 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Η αραιώση αυτή οδηγούσε σε συγκέντρωση εναιωρήματος  $10^6$  CFU/mL και εκτελούνταν και πάλι αναδεύσεις, με σκοπό την ομοιόμορφη διασπορά των βακτηριακών κυττάρων. Τέλος, για την παρασκευή του τελικού μικροβιακού εναιωρήματος συγκέντρωσης  $10^5$  CFU/mL, τα 30 mL του εναιωρήματος συγκέντρωσης  $10^6$  CFU/mL, εγχύνονταν σε αποστειρωμένο γυάλινο δοχείο (Kimble bottle) χωρητικότητας 500 mL, που περιείχε 270 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS.

Στην περίπτωση των πειραμάτων συμμεταφοράς των βακτηρίων παρασκευάζονταν διπλές ανακαλλιεργειών από τα κατεψυγμένα δείγματα και για τα τρία βακτηριακά στελέχη, και ακολουθούσε ταυτόχρονη επώαση αυτών σε θερμοκρασία 37 °C. Την ημέρα διεξαγωγής των πειραμάτων συμμεταφοράς πραγματοποιούνταν τα ίδια βήματα που αναλύθηκαν προηγουμένως για κάθε ένα από τα 3 βακτήρια με την διαφορά ότι το τελικό εναιώρημα συγκέντρωσης  $10^5$  CFU/mL, προέκυπτε με ανάμιξη των τριών βακτηριακών εναιωρημάτων συγκέντρωσης  $10^6$  CFU/mL σε αποστειρωμένο γυάλινο δοχείο που περιείχε 210 mL ρυθμιστικού διαλύματος PBS. Σε κάθε περίπτωση, ο τελικός όγκος του εναιωρήματος βακτηρίου ή βακτηρίων που ετοιμαζόταν από την παραπάνω διαδικασία ήταν 300 mL. Ο όγκος των μικροβιακών εναιωρημάτων που αντλούνταν από την στήλη ήταν ~180 mL σε όλες τις εξεταζόμενες πειραματικές περιπτώσεις, ωστόσο για λόγους ασφαλείας, όπως και στην περίπτωση του εναιωρήματος GO, παρασκευαζόταν μεγαλύτερη ποσότητα εναιωρημάτων (300 mL). Έπειτα από την ολοκλήρωση της παρασκευής του επιθυμητού ομογενούς εναιωρήματος βακτηρίου ή βακτηρίων, ένας μικρός μαγνήτης που είχε υποστεί πλύσεις με αιθανόλη και απιονισμένο νερό τοποθετείτο εντός του γυάλινου δοχείου με το εναιώρημα και στην συνέχεια το δοχείο μεταφερόταν σε μαγνητικό αναδευτήρα (stirrer) και παρέμενε εκεί καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος. Η μαγνητική ανάδευση εξασφάλιζε συνεχή ομοιόμορφη διασπορά των κυττάρων εντός του μικροβιακού εναιωρήματος.

### 2.4 Πληρωτικό υλικό στήλης

Στα πειράματα μεταφοράς και συμμεταφοράς χρησιμοποιήθηκε χαλαζιακή άμμος ως πληρωτικό υλικό της γυάλινης στήλης. Η άμμος που χρησιμοποιήθηκε ήταν χονδρόκοκκη (0.841 – 1.000 mm, κόσκινο No. 20), αγοράστηκε την εταιρεία Filcolm (Filterzand & Grind) και κοσκινίστηκε στο επιθυμητό μέγεθος. Ο συντελεστής ομοιομορφίας,  $C_u = d_{60}/d_{10}$  (όπου,  $d_{10}$  και  $d_{60}$  συμβολίζεται η διάμετρος ενός κόκκου άμμου που δεν δύναται, οριακά, να διέλθει από κόσκινο που επιτρέπει την διέλευση στο 10% και 60% αντίστοιχα, του κοσκινιζόμενου υλικού), υπολογίστηκε στην τιμή  $C_u = 1.20$ . Η χημική σύσταση της άμμου όπως αναφερόταν από τον κατασκευαστή



φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 2.1 . Η περιεκτικότητα σε ολικό οργανικό άνθρακα (% TOC) της χονδρόκοκης άμμου, που μετριέται με τη μέθοδο Walkley – Black (δηλ. χημική οξείδωση του οργανικού μέρους) (Black, 1965) βρέθηκε ίση με  $0.08 \pm 0.04$  %. Όσον αφορά τα φυσικά χαρακτηριστικά της άμμου, η ειδική πυκνότητά της ήταν  $2.60 \text{ g/cm}^3$  ( $=2600 \text{ kg/m}^3$ ), η σκληρότητα 7 Mohs και η ξηρή φαινομενικής της πυκνότητα  $1.60 \pm 0.02 \text{ g/cm}^3$ .

Πίνακας 2.1: Χημική σύνθεση πληρωτικού υλικού στήλης.

Χημική σύνθεση χαλαζιακής άμμου (Filcom Filterzand & Grind)	
<b>NaO<sub>2</sub></b>	0.15%
<b>MgO</b>	0.02%
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	1.75%
<b>SiO<sub>2</sub></b>	96.2%
<b>K<sub>2</sub>O</b>	0.78%
<b>CaO</b>	0.11%
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0.46%
<b>TiO<sub>2</sub></b>	0.05%
<b>Loss of ignition</b>	0.28%

Πριν από την έναρξη κάθε πειράματος, πραγματοποιείται καθαρισμός της άμμου με διαλύματα οξέος και βάσης, βάσει συγκεκριμένου πρωτοκόλλου (Loveland et al., 1996; Syngouna and Chrysikopoulos et al., 2011), με σκοπό την αφαίρεση επιφανειακών προσμίξεων (π.χ., υδροξείδια σιδήρου), προερχόμενων από την κατεργασία που έχει υποστεί κατά την παραγωγή της, καθώς και για την απομάκρυνση εναποτιθέμενων υπολειμμάτων (βιοκολλοειδών ή νανοσωματιδίων GO) από προηγούμενο πείραμα. Βάσει του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου καθαρισμού, η αναλογία άμμου – υγρού ήταν 300 g άμμου /800 ml υγρού (Loveland et al., 1996). Πιο συγκεκριμένα, σε κωνική φιάλη χωρητικότητας 2 L μεταφέρονταν 300 g ξηρής άμμου. Σε άλλη καθαρή φιάλη του 1L, που περιείχε μικρή ποσότητα απιονισμένου νερού και βρισκόταν σε απαγωγό, μεταφέρονταν με ογκομετρικό σιφόνιο των 10 mL, 5.2 mL HNO<sub>3</sub> συγκέντρωσης 0.1M (70% v/v) και ακολουθούσε προσθήκη απιονισμένου νερού στη φιάλη έως τελικού όγκου 800 mL. Μετά από ομογενοποίηση, το διάλυμα του νιτρικού οξέος εγχυνόταν στην κωνική φιάλη των 2 L που περιείχε την άμμο και το στόμιο της φιάλης σκεπαζόταν με αλουμινόχαρτο, για να αποφευχθεί η εξάτμιση του νιτρικού οξέος. Η φιάλη εν συνεχεία, τοποθετείτο για τρεις ώρες σε τράπεζα ανάδευσης (orbital shaker PSU-20i) που περιστρεφόταν στα 145 rpm (rounds per minute). Κάθε επτά περιστροφές η φορά ανάδευσης εναλλασσόταν από δεξιόστροφη σε αριστερόστροφη και το αντίθετο. Με το πέρας των τριών ωρών η ανάδευση σταματούσε, η φιάλη απομακρυνόταν και το υπερκείμενο υγρό με τα αιωρούμενα στερεά εκχυνόταν σε κατάλληλο δοχείο συλλογής αποβλήτων. Έπειτα, ακολουθούσαν 4-5 πλύσεις της άμμου με 800 mL

απιονισμένου νερού, ώστε να απομακρυνθούν υπολείμματα από την κατεργασία με το οξύ που έχουν συγκρατηθεί μεταξύ των κόκκων της άμμου.



**Εικόνα 2.1:** Ανάδευση άμμου κατά τη διαδικασία καθαρισμού της.

Μετά την 5<sup>ο</sup> πλύση και το άδειασμα του υπερκείμενου νερού, ζυγίζονταν 3.20 g στερεού καυστικού νατρίου (NaOH), και η ποσότητα αυτή μεταφερόταν σε κωνική φιάλη 1 L που περιείχε 800 ml απιονισμένου νερού και βρισκόταν σε απαγωγό. Με συνεχόμενη ανακίνηση με το χέρι το στερεό καυστικό νάτριο διαλυόταν και το διάλυμα της βάσης εγχυνόταν στην κωνική φιάλη με την άμμο. Στη συνέχεια, η φιάλη της άμμου μεταφερόταν εκ νέου στην τράπεζα ανάδευσης για τρεις ώρες. Η προσθήκη υδροξειδίου του νατρίου (NaOH) προκαλούσε εξουδετέρωση των υπολειμματικών ποσοτήτων οξέος και ταυτόχρονα στην υπερκείμενη φάση εμφανίζονταν αρκετά αιωρούμενα σωματίδια με αποτέλεσμα το υγρό να είναι αρκετά θολό. Για τον λόγο αυτό, μετά την αφαίρεση του διαλύματος βάσης, η άμμος ξεπλενόταν αρκετές φορές με απιονισμένο νερό, έως ότου το υπερκείμενο υγρό να είναι διαυγές και απαλλαγμένο από σωματίδια.

Ταυτόχρονα, πραγματοποιούνταν μετρήσεις του pH του υπερκείμενου υγρού και οι πλύσεις με απιονισμένο νερό σταματούσαν όταν το pH λάμβανε τιμή κοντά σε αυτή του απιονισμένου νερού. Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας καθαρισμού, η άμμος συλλεγόταν σε ένα αλουμινένιο δοχείο και μεταφερόταν σε κλίβανο για ξήρανση στους 80°C για περίπου 12 ώρες. Έπειτα από την ξήρανση, η άμμος μεταφερόταν σε γυάλινο δοχείο και πραγματοποιείτο αποστείρωση αυτής σε αυτόκαυστο κλίβανο για μια ώρα σε θερμοκρασία 121°C. Το γυάλινο δοχείο με την αποστειρωμένη άμμο τοποθετείτο ξανά για ξήρανση στον κλίβανο με σκοπό την απομάκρυνση της πιθανής υγρασίας που είχε δημιουργηθεί κατά την υγρή αποστείρωση. Τέλος, η αποστειρωμένη και ξηρή άμμος παραμένει αποθηκευμένη στο αεροστεγώς σφραγισμένο γυάλινο δοχείο, έως να χρησιμοποιηθεί.

### 2.5 Παρασκευή τρυβλίων με θρεπτικό υλικό

#### 2.5.1 Τρυβλία μη εκλεκτικού θρεπτικού για την παρασκευή ανακαλλιεργειών

Για την παρασκευή των βακτηριακών ανακαλλιεργειών, πριν από κάθε πείραμα, χρησιμοποιείτο μη εκλεκτικό θρεπτικό Nutrient Agar της εταιρείας Acumedia (θυγατρική της εταιρείας Neogen) με κωδικό LAB008, το οποίο αγοράζοταν υπό μορφή σκόνης και αποθηκευόταν σε ξηρό μέρος. Αναλόγως τις απαιτήσεις των πειραμάτων παρασκευαζόταν ο αντίστοιχος όγκος διαλύματος θρεπτικού υλικού. Αρχικά γινόταν ζύγιση (με χρήση πλαστικών σκευών ζύγισης και μεταλλικών λαβών) και έπειτα διάλυσης της συγκεκριμένης ποσότητας σκόνης (προτεινόμενη αναλογία 28 g / 1 L) σε γυάλινη κωνική φιάλη χωρητικότητας 1000 mL που περιείχε απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, η φιάλη μεταφερόταν με σκεπασμένο το στόμιο (με αλουμινόχαρτο) σε αυτόκαυστο κλίβανο και το θρεπτικό υλικό αποστειρωνόταν σε θερμοκρασία 121°C για περίπου μισή ώρα. Μετά τη διαδικασία αποστείρωσης, η κωνική φιάλη με το θρεπτικό μεταφερόταν σε υδατόλουτρο και όταν η θερμοκρασία του υγρού έφτανε σε θερμοκρασία ~ 45 – 50 °C, τότε το διάλυμα μεγάλου ιξώδους του θρεπτικού υλικού απλωνόταν σε αποστειρωμένα τρυβλία (petri dishes) μιας χρήσης διαστάσεων 92 x 16 mm. Η ποσότητα του διαλύματος θρεπτικού υλικού που απλωνόταν σε κάθε τρυβλίο ήταν περίπου 15-20 mL και σχημάτιζε ομοιόμορφη στρώση και πάχους τουλάχιστον 4 mm, ώστε να είναι εφικτή η ανάπτυξη των βακτηρίων. Μετά την τοποθέτηση του θρεπτικού υλικού, τα τρυβλία παρέμεναν για τουλάχιστον 20 λεπτά σε καθαρό εργαστηριακό πάγκο, προκειμένου να στερεοποιηθεί πλήρως το υγρό περιεχόμενο. Έπειτα, τα τρυβλία ήταν έτοιμα για χρήση. Σε περίπτωση που δεν χρησιμοποιούνταν την ίδια μέρα τα τρυβλία με το θρεπτικό υλικό αποθηκεύονταν κατάλληλα σε καθαρό ψυγείο, όπου και διατηρούνταν μέχρι την επόμενη χρήση τους, για χρονικό διάστημα  $\leq 7$  ημερών, χωρίς να υποστούν αλλοιώσεις.

#### 2.5.2 Τρυβλία εκλεκτικών θρεπτικών υλικών για την ποσοτικοποίηση της μικροβιακής συγκέντρωσης των δειγμάτων

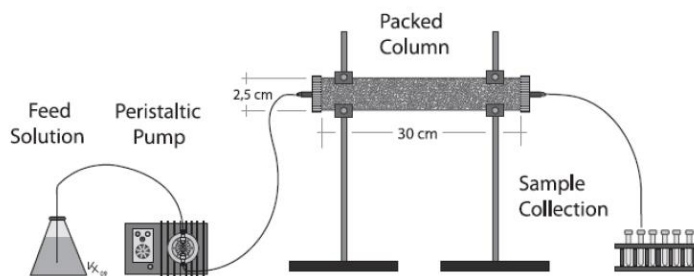
Η ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών που περιέχονταν σε κάθε δείγμα που λαμβανόταν στην έξοδο της πειραματικής στήλης, κατά τα πειράματα μεταφοράς και συμεταφοράς, γινόταν με έγχυση μικρής ποσότητας (300 mL) αραιωμένου δείγματος και ομοιόμορφης στρώσης αυτής, με αποστειρωμένο κρίκο μιας χρήσης, σε τρυβλία που περιείχαν εκλεκτικά θρεπτικά υλικά, κατάλληλα για την ανάπτυξη των αποικιών κάθε εξεταζόμενου βακτηριακού στελέχους. Για την περίπτωση του *E. coli* επιλέχθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Harlequin (*E. Coli*/Coliform Medium, με κωδικό HAL008), το οποίο είναι κατάλληλο για ανάπτυξη στελεχών *E. coli* και κολοβακτηριδίων απομονωμένων από δείγματα τροφίμων, καθώς και από περιβαλλοντικά δείγματα. Στην περίπτωση του στελέχους *E. faecalis*,

χρησιμοποιήθηκε το εκλεκτικό μέσο Slanetz and Bartely Agar (με κωδικό LAB 166), και για το στέλεχος *S. aureus* επιλέχθηκε το εκλεκτικό θρεπτικό μέσο Mannitol Salt Agar (με κωδικό 7143A), κατάλληλο για ανάπτυξη στελεχών σταφυλλοκόκκου προερχόμενων από δείγματα τροφών. Όλα τα εκλεκτικά προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Acumedia. Η διαδικασία παρασκευής των διαλύματων των μη εκλεκτικών θρεπτικών υλικών, ήταν ίδια με αυτή που εκτελείτο και στην περίπτωση του μη εκλεκτικού θρεπτικού υλικού. Οι προτεινόμενες ποσοότητες, υπό μορφή σκόνης, που διαλύονταν σε 1 L απιονισμένου νερού ήταν 36.6 g, 45.3 g και 108 g για την περίπτωση του Harlequin, Slanetz και Mannitol, αντίστοιχα. Οι τελικοί όγκοι των διαλυμάτων των εκλεκτικών θρεπτικών, διαμορφώνονταν ανάλογα τις πειραματικές απαιτήσεις (αριθμό δειγμάτων, διπλές καλλιέργειες κλπ).

Μετά από ομογενοποίηση με ελαφριά ανάδευση με το χέρι, τα διαλύματα θρεπτικών λάμβαναν χρώμα σταχίου (περίπτωση Harlequin), κόκκινο-πορτοκαλί (περίπτωση Manittol) και καφέ-ρόζ (περίπτωση Slanetz). Η αποστείρωση των διαλυμάτων των εκλεκτικών υλικών Harlequin και Mannitol, γινόταν σε αυτόκαυστο κλίβανο σε θερμοκρασία 121°C, για διάρκεια μισής ώρας, ενώ η αποστείρωση του διαλύματος Slanetz γινόταν με την χρήση μιας φιάλης βουτανίου (καμινέτου). Η κωνική φιάλη (χωρητικότητας 250 ή 500 mL) με το διαλυμένο θρεπτικό υπόστρωμα παρέμενε πάνω από δυνατή φωτιά για περίπου 10 – 15 λεπτά, και αναδεύονταν χειρωνακτικά δεξιόστροφα και αριστερόστροφα. Προς το τέλος της διαδικασίας αποστείρωσης το υλικό άφριζε και η αποστείρωση σταματούσε όταν το διάλυμα είχε γίνει διαυγές και είχε λάβει χρώμα σκούρο πορτοκαλί. Εφόσον τα θρεπτικά έφταναν σε θερμοκρασία 45-50 °C εντός του υδατόλουτρου, αφαιρούνταν από αυτό και απλώνονταν σε τρυβλία. Τα τρυβλία παρέμεναν στον εργαστηριακό πάγκο έως να στερεοποιηθούν πλήρως και έπειτα ήταν έτοιμα για χρήση. Η παρασκευή των θρεπτικών καθώς και η προετοιμασία των τρυβλίων πραγματοποιούνταν μια μέρα πριν την διεξαγωγή των πειραμάτων.

### 2.6 Περιγραφή πειραματικής διάταξης και πειραματικής διαδικασίας

Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν σε γυάλινη στήλη διαμέτρου ( $D_{\text{column}}$ ) 2.5 cm και μήκους (L) 30 cm.



Εικόνα 2.2: Μορφή πειραματικής διάταξης (Vasiliadou and Chrysikopoulos, 2011).

Η στήλη και τα εξαρτήματά της (καπάκια, βιδωτά καπάκια, λευκά πώματα, σωληνάκια και ενώσεις τύπου Y) αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο, μια μέρα πριν

από την έναρξη κάθε πειράματος, και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε κλίβανο για ξήρανση. Πρώτο βήμα για την έναρξη κάθε πειράματος ήταν η πλήρωση της στήλης με καθαρή, ξηρή και αποστειρωμένη άμμο και εν συνεχεία ο κορεσμός της με διάλυμα PBS. Αρχικά γινόταν μέτρηση του καθαρού βάρους της άδειας στήλης (column weight) μαζί με τα βιδωτά καπάκια, τα πώματα και τα μικρά σωληνάκια συνδεσμολογίας που προεξείχαν στα άκρα της. Στη συνέχεια, η στήλη τοποθετείτο σε κατακόρυφη θέση με το άνω άκρο/διατομή της ανοιχτό και με τη βοήθεια μικρού πλαστικού χωνιού πραγματοποιείτο γέμισμα αυτής με την άμμο. Κατά την διάρκεια της πλήρωσης το κάτω άκρο της στήλης ήταν κλειστό και βρισκόταν σε επαφή με όργανο vortex mixer. Οι δονήσεις που προκαλούνταν από το vortex βοηθούσαν στην καλύτερη κατανομή και πάκτωση των ανομοιομορφών κόκκων της άμμου εντός της στήλης.

Εφόσον η στήλη είχε πληρωθεί με άμμο, τοποθετείτο και πάλι στο άνω άκρο της το πώμα με το σωληνάκι καθώς και το βιδωτό καπάκι, και η στήλη ζυγιζόταν εκ νέου (column dry weight). Έπειτα, η στήλη στερεωνόταν με την χρήση stands σε θέση κατακόρυφη, με την έξοδο της προς τα πάνω, και το κάτω άκρο/διατομή της στήλης, που ήταν κλειστό, συνδεόταν με σωληνάκι σιλικόνης με την περισταλτική αντλία. Η περισταλτική αντλία είχε ρυθμιστεί, με την χρήση μικρού ογκομετρικού κυλίνδρου και χρονομέτρου (π.χ. 10 mL), στην επιθυμητή παροχή που διεξάγονταν τα πειράματα, δηλαδή 0.80 mL/min. Με την έναρξη της αντλίας, άρχιζε η διοχέτευση του ρυθμιστικού διαλύματος PBS στη στήλη. Ο κορεσμός της στήλης γινόταν κατακόρυφα, ώστε οι εγκλωβισμένες, μεταξύ των κόκκων, φυσαλίδες αέρα να μεταφέρονται ευκολότερα προς το άνω άκρο της στήλης και να εξέρχονται αυτής. Η διαδικασία του κορεσμού διαρκούσε περίπου μια ώρα και σταματούσε όταν είχαν καλυφθεί όλοι οι πόροι (κενός όγκος) και δεν παρατηρούνται άλλες εξερχόμενες φυσαλίδες στο σωληνάκι που βρίσκεται στην έξοδο (άνω διατομή).

Στην συνέχεια, η στήλη τοποθετείτο με προσοχή σε οριζόντια θέση και μετά από μερικά λεπτά, σταματούσε η παροχέτευση διαλύματος PBS από την αντλία. Τότε, η κορεσμένη στήλη αποσυνδεόταν προσεκτικά από την πειραματική διάταξη (stands), κλείνοντας καλά τα σωληνάκια στα άκρα τις, ώστε να μην υπάρξουν απώλειες υγρού από τη στήλη ή εισαγωγή αέρα. Ακολουθούσε ζύγιση της κορεσμένης στήλης (column wet weight). Μετά την ζύγιση, γινόταν εκ νέου οριζόντια τοποθέτηση της στήλης στην διάταξη, χρησιμοποιώντας ένα μικρό αλφάδι για επιβεβαίωση της οριζοντίωσης, και σύνδεση αυτής με την αντλία, με προσοχή ώστε να μη διέλθει αέρας εντός της στήλης.

Επιλέχθηκε οριζόντια θέση της στήλης κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων μεταφοράς, ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιπτώσεις της βαρύτητας. Η έναρξη του πειράματος ήταν εφικτή εφόσον πρώτα είχε ολοκληρωθεί ο χαρακτηρισμός της στήλης. Για το λόγο αυτό πραγματοποιούνται οι ακόλουθοι υπολογισμοί βάσει των εξισώσεων (2.6.1), (2.6.2), (2.6.3) και (2.6.4):

- **Υπολογισμός του βάρους του πληρωτικού υλικού:**

$$W_{\text{Porous media}} [\text{g}] = W_{\text{column dry weight}} [\text{g}] - W_{\text{column weight}} [\text{g}] \quad (2.6.1)$$

- **Υπολογισμός του φαινομενικής πυκνότητας (bulk density) πληρωτικού υλικού:**

$$\begin{aligned} \text{Bulk density} \left[ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right] &= \frac{W_{\text{Porous media}} [\text{g}]}{V_{\text{column}} [\text{cm}^3]} \\ &= \frac{W_{\text{Porous media}} [\text{g}]}{\left( \frac{\pi D_{\text{column}}^2 [\text{cm}^2]}{4} \right) L [\text{cm}]} = 4 \frac{W_{\text{Porous media}}}{\pi D_{\text{column}}^2 L} \end{aligned} \quad (2.6.2)$$

- **Υπολογισμός pore volume (PV):**

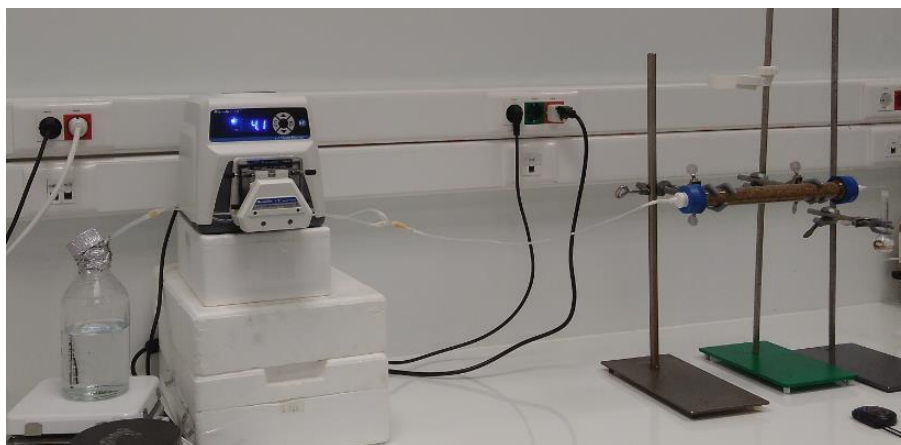
$$\text{PV} [\text{cm}^3] = \frac{(W_{\text{column wet weight}} - W_{\text{column dry weight}}) [\text{g}]}{\rho_{\text{water}} \left[ \frac{\text{g}}{\text{cm}^3} \right]} \quad (2.6.3)$$

- **Υπολογισμός πορώδους (porosity,  $\theta$ ):**

$$\theta [-] = \frac{\text{PV} [\text{cm}^3]}{V_{\text{column}} [\text{cm}^3]} \quad (2.6.4)$$

Σε όλα τα πειράματα, η πυκνότητα του PBS θεωρήθηκε ίση με  $1 \text{ g/cm}^3$ . Ο όγκος της στήλης ( $V_{\text{column}}$ ), που προσδιορίστηκε βάσει της διαμέτρου και του μήκους της, είχε σταθερή τιμή  $147.19 \text{ cm}^3$ . Επίσης, σε όλα τα πειράματα η ταχύτητα Darcy ( $q$ ), που υπολογίστηκε βάσει της ογκομετρικής παροχής και της εγκάρσιας διατομής της στήλης. Η μέση τιμή ταχύτητας Darcy των πειράτων ήταν  $0.16 \pm 0.01 \text{ cm/min}$ . Η τιμή αυτή είναι μικρή και προσεγγίζει την ταχύτητα διήθησης νερού σε κορεσμένα εδαφικά περιβάλλοντα. Η μέση τιμή του καθαρού βάρους της στήλης, βάσει των αποτελεσμάτων των ζυγίσεων, ήταν  $306.24 \text{ g} \pm 3.95 \text{ g}$ , ενώ η μέση τιμή της απαιτούμενης ποσότητας του πληρωτικού υλικού ήταν  $257.61 \text{ g} \pm 2.04 \text{ g}$ . Το βάρος της κορεσμένης στήλης προέκυπτε κατά μέσο όρο στη τιμή  $621.71 \text{ g} \pm 4.12 \text{ g}$ . Βάσει των προαναφερόμενων τιμών, η μέση φαινομενική πυκνότητα της άμμου λάμβανε τιμή  $1.75 \pm 0.04 \text{ g/cm}^3$  και 1 όγκος πόρου (1 PV) αντιστοιχούσε σε  $57.86 \text{ mL} \pm 2.04 \text{ mL}$  κατά μέσο όρο για όλα τα πειράματα. Το πορώδες της στήλης προσδιορίστηκε στη τιμή  $0.39 \pm 0.02$ . Η τιμή αυτή συμπίπτει με βιβλιογραφικά αναφερόμενες τιμές πορώδους για χονδρόκοκκες ανόργανες αμμόδεις αργίλους χαμηλής πλαστικότητας (Καλλέργης, 1999). Ο προσδιορισμός του πορώδους, καθώς και του όγκου που αντιστοιχεί σε 1 PV, ήταν ιδιαίτερης σημασίας, διότι βάσει των δύο αυτών

παραμέτρων μπορούσαν να υπολογιστούν η ενδοπορώδης ταχύτητα, δηλαδή η ταχύτητα Darcy διαιρεμένη με την τιμή του πορώδους, καθώς και οι απαιτούμενοι όγκοι εναιωρημάτων που διέρχονταν από την στήλη, αντίστοιχα.



**Εικόνα 2.3:** Διαδικασία προσδιορισμού ογκομετρικής παροχής της στήλης, εφόσον έχει προηγηθεί, πλήρωση, κορεσμός, και χαρακτηρισμός αυτής.

Με τη χρήση χρονομέτρου και ογκομετρικού κυλίνδρου γινόταν και πάλι έλεγχος και ρύθμιση (αν ήταν αναγκαίο) της ογκομετρικής παροχής στην έξοδο της στήλης, ώστε να είναι βέβαιο ότι η αντλία λειτουργεί στην επιθυμητή τιμή παροχής (0.8 mL/min).

Εφόσον η διαδικασία πλήρωσης, κορεσμού και χαρακτηρισμού της στήλης είχε ολοκληρωθεί, η αντλία έμπαινε και πάλι σε κατάσταση λειτουργίας και από την στήλη αντλούνταν περίπου 10 PV (~580 mL) PBS διαλύματος, ώστε το εσωτερικό της στήλης να έχει ξεπλυθεί καλά πριν την διοχέτευση των εξεταζόμενων εναιωρημάτων. Μετά την άντληση των 10 PV διαλύματος PBS, γινόταν αλλαγή των διαλυμάτων εισόδου, δηλαδή η αντλία δεν αντλούσε πλέον από το δοχείο με το PBS αλλά από το δοχείο του εναιωρήματος (βακτηρίου, βακτηρίων ή νανοσωματιδίων GO) που βρισκόταν υπό μαγνητική ανάδευση πριν την αντλία. Ο χρόνος έναρξης του πειράματος ( $t_0$ ) θεωρείτο κάθε φορά η στιγμή που το εναιώρημα άρχιζε να εισέρχεται στην κορεσμένη στήλη και την στιγμή αυτή γινόταν έναρξη της χρονομέτρησης. Την χρονική στιγμή μηδέν λαμβανόταν με μηχανική πιπέτα δείγμα ( $C_{in}(t_0)$ ) 2 mL από το δοχείο του αντλούμενου εναιωρήματος, με σκοπό να εκτιμηθεί η αρχική συγκέντρωση των βακτηριακών κυττάρων ή του αιωρήματος νανοσωματιδίων GO, αντίστοιχα. Ταυτόχρονα στην έξοδο της στήλης συλλεγόταν 2 mL ( $C_{out}(t_0)$ ) δείγμα. Το δείγμα εξόδου λαμβανόταν προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η στήλη ήταν καθαρή και ότι δεν υπήρχαν μικροβιακά υπολείμματα ή παρουσία νανοσωματιδίων από προηγούμενα πειράματα. Καθ' όλη την διάρκεια διέλευσης των 3 PV από το εξεταζόμενο εναιώρημα (όγκος που ισοδυναμεί με ~174 mL εναιωρήματος), λαμβάνονταν στην έξοδο της στήλης δείγματα ποσότητας 2 mL σε προκαθορισμένες χρονικές στιγμές. Έπειτα η αντλία και το χρονόμετρο σταματούσαν, και γινόταν

αλλαγή του διαλύματος εισόδου. Το δοχείο του εναιωρήματος απομακρυνόταν και η αντλία έμπαινε και πάλι σε κατάσταση λειτουργίας, αντλώντας πλέον από το δοχείο με το διάλυμα PBS. Την στιγμή που το PBS διάλυμα έμπαινε στη στήλη (έναρξη διαδικασίας έκπλυσης της πειραματικής στήλης), ξεκινούσε και πάλι η χρονομέτρηση. Συνολικά, καθ' όλη τη διάρκεια έκπλυσης αντλούνταν 4 – 5 PV PBS, δηλαδή διέρχονταν από την στήλη ~232 – 290 mL PBS διαλύματος. Κατά τη φάση έκπλυσης συλλέγονταν δείγματα στην έξοδο σε προεπιλεγμένες χρονικές στιγμές. Το πείραμα ολοκληρωνόταν, όταν πλέον στη στήλη είχε διέλθει και το 5<sup>ο</sup> PV διαλύματος PBS.



Εικόνα 2.4: Στιγμιότυπο κατά την συλλογή δείγματος, σε φιαλίδιο erpendorf, στην έξοδο της στήλης.

Στις περιπτώσεις πειραμάτων μεταφοράς βακτηριακών αιωρημάτων παρουσία αιωρήματος νανοσωματιδίων GO, ή κατά την διεξαγωγή πειραμάτων συμεταφοράς βακτηρίων παρουσία νανοσωματιδίων GO, ακολουθείτο η ίδια πειραματική διαδικασία, όπως περιγράφηκε παραπάνω, με μόνη διαφορά ότι κατά την διέλευση των 3 PV εναιωρημάτων από την στήλη, γινόταν ταυτόχρονη άντληση από δύο ξεχωριστά δοχεία, όπου το ένα περιείχε εναιώρημα βακτηρίου ή βακτηρίων, και το άλλο εναιώρημα νανοσωματιδίων GO. Πριν την είσοδό τους στην στήλη τα δύο ρεύματα εισόδου, ενώνονταν (χρήση ένωσης τύπου Y) σε ένα ενιαίο ρεύμα, παροχής 0.8 mL/min.

Συνολικά σε κάθε πείραμα μεταφοράς ενός είδους εναιωρήματος, συλλέγονταν 45 δείγματα των 2 mL. Στα πειράματα που υπήρχε ταυτόχρονη άντληση δύο εναιωρημάτων (βακτηρίου ή βακτηρίων και GO), συλλέγονταν 90 δείγματα που περιείχαν μικροοργανισμούς και νανοσωματίδια GO, εκ των οποίων τα μισά συλλέγονταν σε διαφορετικό χρονικό βήμα και αξιοποιούνταν για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης του GO. Όλα τα δείγματα συλλέγονταν σε αποστειρωμένα πλαστικά φιαλίδια (erpendorfs), χωρητικότητας 2 mL, που έφεραν καπάκι. Τα δείγματα που χρησιμοποιούνταν για την ποσοτικοποίηση της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών αποθηκεύονταν σε ψυγείο σε θερμοκρασία 4°C. Αντίθετα, στα δείγματα που προορίζονταν για την ποσοτικοποίηση του GO, γινόταν άμεση μέτρηση της οπτικής απορρόφησής τους στα 231 nm, αμέσως μετά την λήψη τους από την έξοδο της στήλης. Ο προσδιορισμός των δειγματοληπτικών

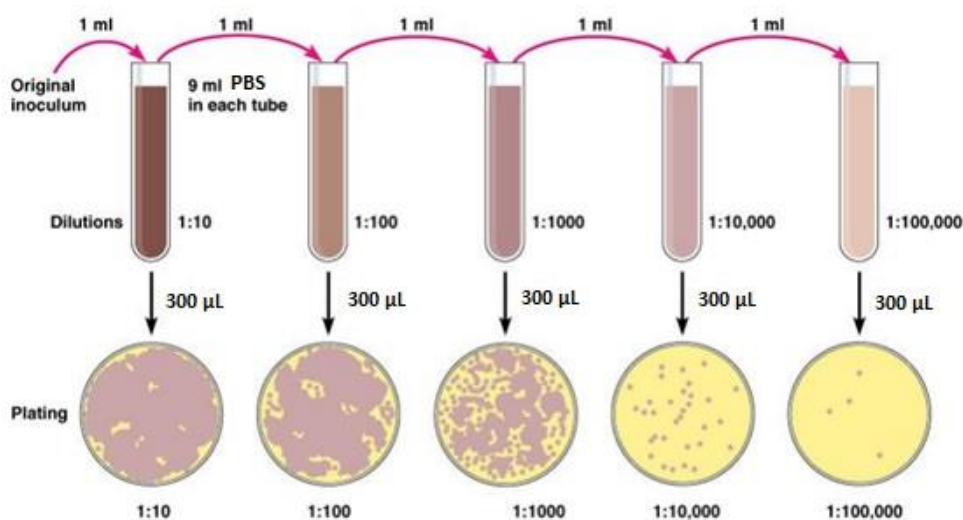


χρόνων ( $t_{\text{sample}}$ ) γινόταν με εφαρμογή της σχέσης (2.6.5), όπου  $U_x$  είναι η μέση ενδοπορώδης ταχύτητα.

$$PV [cm^3] = t_{\text{sample}} [min] \frac{U_x \left[ \frac{cm^3}{min} \right]}{L_{\text{column}} [cm]} \quad (2.6.5)$$

$$\Rightarrow t_{\text{sample}} [min] = \frac{PV [cm^3] L_{\text{column}} [cm]}{U_x \left[ \frac{cm^3}{min} \right]}$$

Μετά το τέλος κάθε πειράματος ακολουθούσε μικροβιολογική ανάλυση των δειγμάτων των μικροοργανισμών. Η αρχική συγκέντρωση όλων των εξεταζόμενων μικροβιακών εναιωρημάτων που διέρχονταν διαμέσου της στήλης ήταν  $10^5$  CFU/mL. Η συγκέντρωση αυτή είναι αρκετά υψηλή, συνεπώς τα πυκνά δείγματα δεν μπορούσαν να απλωθούν απευθείας στα τρυβλία με τα εκλεκτικά υλικά, αλλά πρώτα έπρεπε να υποστούν αραιώσεις, ώστε οι σχηματιζόμενες αποικίες στα τρυβλία να μπορούν να είναι μετρήσιμες. Γενικά ισχύει ότι ο αριθμός των σχηματιζόμενων αποικιών σε κάθε τρυβλίο θα πρέπει να είναι  $< 300$ , ώστε η μέτρηση να θεωρείται έγκυρη. Ως εκ τούτου, για τα πυκνά δείγματα που λαμβάνονταν μεταξύ των χρόνων που αντιστοιχούσαν σε 0.8 έως 4.9 PV, πραγματοποιούνταν 2 ή 3 δεκαδικές αραιώσεις. Τα δείγματα που λαμβάνονταν σε χρόνους που αντιστοιχούσαν σε  $< 0.8$  PV και  $> 5$  PB δεν ήταν πυκνά, συνεπώς δεν απαιτείτο αραιώση. Οι αραιώσεις γίνονταν, με χρήση vortex και μηχανικής πιπέτας, σε γυάλινους αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες, χωρητικότητας 20 mL, που έφεραν βιδωτά καπάκια, και περιείχαν 9 mL διαλύματος PBS.



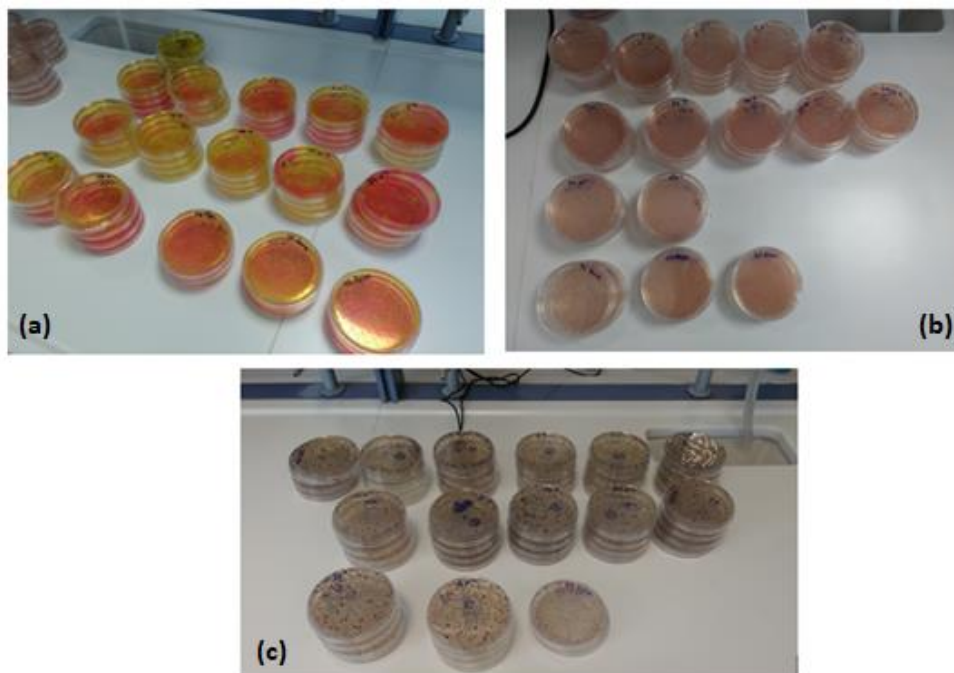
Εικόνα 2.5: Αναπαράσταση διαδικασίας διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων.

(Πηγή: <https://microbeonline.com/pour-plate-method-principle-procedure-uses-dis-advantages/>, accessed November 15, 2018).

Μετά την 2<sup>η</sup> ή 3<sup>η</sup> αραιώση λαμβάνονταν 2 φορές με μηχανική πιπέτα 300  $\mu\text{L}$  από το αραιωμένο δείγμα και οι ποσότητες απλώνονταν με κρίκο σε 2 τρυβλία που περιείχαν το ανάλογο εκλεκτικό θρεπτικό υπόστρωμα για κάθε βακτήριο. Διπλές τρυβλίων στρώνονταν για κάθε δείγμα, ενώ στις περιπτώσεις συμμεταφοράς και των τριών βακτηριών για κάθε αραιωμένο δείγμα στρώνονταν συνολικά 6 τρυβλία, τα οποία ανα δύο περιείχαν διαφορετικό εκλεκτικό θρεπτικό υλικό. Αφού το δείγμα απλωνόταν σε κάθε τρυβλίο, τα τρυβλία παρέμεναν για 20 λεπτά στον εργαστηριακό πάγκο, ώστε να απορροφηθεί όλη η ποσότητα του δείγματός στο υπόστρωμα, και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε επώαστικό θάλαμο που ήταν ρυθμισμένος σε σταθερή θερμοκρασία  $36.6 \pm 0.4^\circ \text{C}$ .

Για το βακτήριο *E. coli*, απαιτείτο χρόνος επώασης 18-24 ώρες, ώστε οι σχηματιζόμενες αποικίες του στα τρυβλία να είναι επαρκώς ανεπτυγμένες και ευκρινείς. Οι αντίστοιχοι χρόνοι επώασης για το βακτήριο *S. aureus* ήταν 24 ώρες και για το *E. faecalis* 48 ώρες. Μετά την επώαση ακολουθούσε οπτική καταμέτρηση των σχηματιζόμενων αποικιών (colony forming units, CFU) σε κάθε τρυβλίο και προσδιορισμός της βακτηριακής συγκέντρωσης μέσω αναγωγής του αριθμού των CFU από τα 300  $\mu\text{L}$  στο 1 mL μέσω της σχέσης (2.6.6), όπου ο δείκτης  $n$  συμβολίζει το αριθμό των δεκαδικών αραιώσεων που έχει υποστεί το αρχικό δείγμα:

$$\frac{\text{CFU}}{\text{mL}} = \frac{\text{number of CFU}}{300 \mu\text{L}} \times 10^n \quad (2.6.6)$$

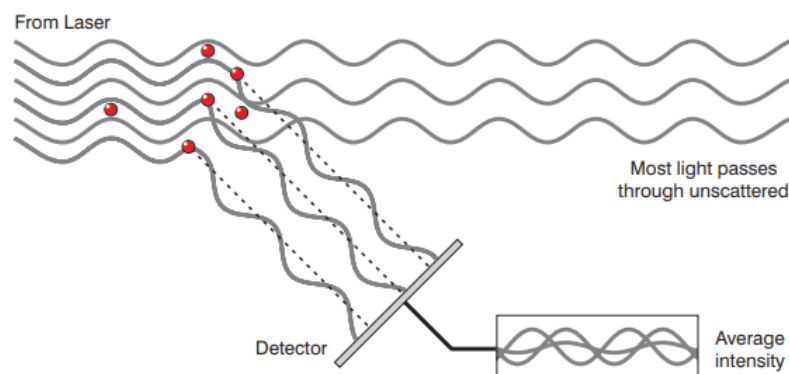


Εικόνα 2.6: Απεικόνιση τρυβλίων εκλεκτικών θρεπτικών υλικών μετά την ανάπτυξη βακτηριακών αποικιών (a) *S. aureus*, (b) *E. faecalis* και (c) *E. coli*.

## 2.7 Ηλεκτροκινητικές μετρήσεις

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης πραγματοποιήθηκαν επίσης μετρήσεις της υδροδυναμικής διαμέτρου και του ζ-δυναμικού των σωματιδίων των βακτηρίων και των νανοσωματιδίων GO σε διάλυμα PBS και συνθήκες ίδιες με αυτές που διεξήχθησαν τα πειράματα μεταφοράς και συµμεταφοράς (pH=7 και  $I_S=2$  mM στους 25 °C), µε σκοπό τον έλεγχο της σταθερότητάς τους υπό τις συνθήκες αυτές. Ως εκ τούτου, για τις μετρήσεις παρασκευάστηκαν αιωρήµατα συγκέντρωσης  $\sim 10^5$  CFU/mL για κάθε εξεταζόµενο βακτήριο και συγκέντρωσης 20 mg/L για το GO. Για τις εν λόγω μετρήσεις χρησιµοποιήθηκε ένα όργανο zetasizer (Nano ZS90, Malvern Instruments, Southborough, MA). Η υδροδυναμική διάµετρος των αιωρούµενων σωματιδίων ( $d_{Hydro}$ ) προσδιορίστηκε µε εφαρµογή της µεθόδου δυναµικής σκέδασης φωτός (Dynamic Light Scattering, DLS).

Βάση της αρχής λειτουργίας του οργάνου, κατά την εφαρµογή της µέθοδου DLS, µια µονοχρωµατική και συνεκτική ακτίνα φωτός (He-Ne) εκπέµπεται από πηγή λέιζερ σε µήκος κύματος 633 nm, και προσπίπτει στο δείγµα. Λόγω της ύπαρξης των αιωρούµενων σωματιδίων µικρού µεγέθους, στο δείγµα πραγµατοποιείται διασκορπισµός/σκέδαση της προσπίπτουσας ακτίνας φωτός προς όλες τις κατευθύνσεις.



Εικόνα 2.7: Τεχνική DLS, όπου ο διάχυτο φως που προσπίπτει στον ανιχνευτή.

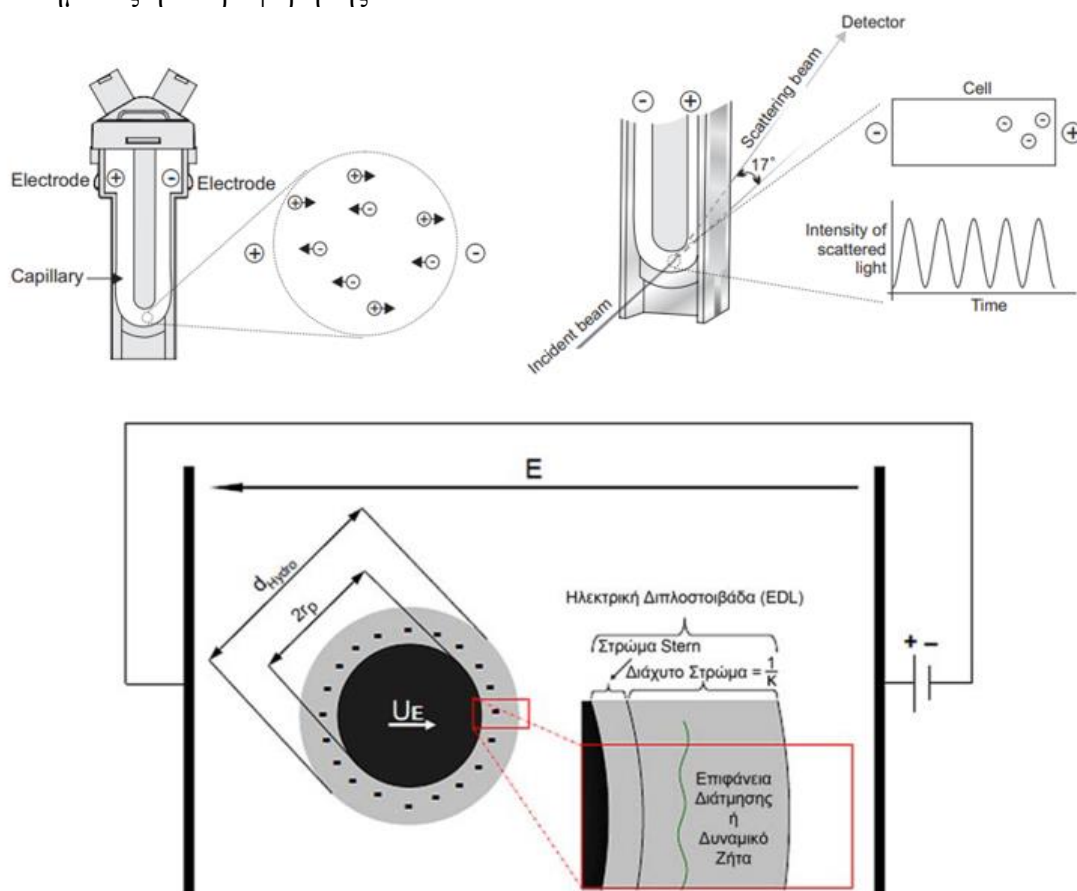
Το διάχυτο φως του φωτιζόµενου δείγµατος καταγράφεται από έναν ανιχνευτή φωτοδιόδου που σχηµατίζει γωνία 173° µε την πηγή λέιζερ, ώστε η διάχυση να είναι εξασφαλισµένη (Εικόνα 2.7). Η ένταση της σκέδασης µεταβάλλεται µε το χρόνο και εµφανίζονται διακυµάνσεις οφειλόµενες στη τυχαία Brownian κίνηση των αιωρούµενων σωματιδίων, η οποία προκαλεί συνεχή µεταβολή της απόστασης µεταξύ των αιωρούµενων σωματιδίων. Το όργανο κατέγραφε τις παρατηρούµενες χρονικές διακυµάνσεις και κατασκεύαζε µια καµπύλη συσχέτισης της έντασης από την οποία υπολογιζόταν η τιµή του συντελεστής µορικής διάχυσης ( $D$ ), καθώς και η κατανοµή του. Οι μετρήσεις πραγµατοποιήθηκαν µε το Λογισµικό Τεχνολογίας Διασποράς (Dispersion Technology Software Version 5.03), το οποίο έδωσε τις κατανοµές του µεγέθους των σωματιδίων (Particle Size Distribution, PSD) εκφρασµένες ως ποσοστιαίο κλάσµα της έντασης συναρτήσεως του µεγέθους των σωματιδίων.

Επιπλέον, το λογισμικό υπολόγισε την υδροδυναμική ακτίνα  $d_{\text{hydro}}$  βασισμένο στην Εξίσωση (2.7.1) Stokes – Einstein:

$$\mathcal{D} = \frac{k_B T}{3\pi\mu_w d_{\text{hydro}}} \Rightarrow d_{\text{hydro}} = \frac{k_B T}{3\pi\mu_w \mathcal{D}} \quad (2.7.1)$$

όπου  $\mu_w$  [kg/(m·s)] το ιξώδες του υγρού αιώρησης,  $k_B$  [J/K] είναι η σταθερά Boltzmann, και  $T$  [K] είναι η θερμοκρασία. Σημειώνεται ότι για την ανάλυση των αποτελεσμάτων θεωρήθηκε ότι η διάμετρος των εξεταζόμενων σωματιδίων ( $d_p$ ) ταυτίζεται με την υδροδυναμική διάμετρο ( $d_{\text{hydro}}$ ). Για τον λόγο αυτό στη συνέχεια της ανάλυσης η σχέση (2.7.1) ταυτίζεται με τη σχέση (3.5.12).

Το δυναμικό ζήτα  $\zeta$  των σωματιδίων, δηλαδή η διαφορά του ηλεκτρικού δυναμικού μεταξύ της φορτισμένης επιφάνειας και του υδατικού ηλεκτρολυτικού διαλύματος, που ισούται με το δυναμικό στη θέση της επιφάνειας διάτμησης του ενδιάμεσου διπλού στρώματος, καθορίστηκε με τη χρήση ενός συστήματος μικροηλεκτροφόρησης το οποίο είναι ενσωματωμένο στο Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Southborough, MA). Η Εικόνα 2.8 περιγράφει την αρχή του συστήματος ηλεκτροφόρησης.



Εικόνα 2.8: Απεικόνιση του πειραματικού προσδιορισμού του δυναμικού  $\zeta$ . (Πηγή: online εγχειρίδιο χρήσης Zetasizer Nano ZS90, διαθέσιμο @

[http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer\\_Nano\\_user\\_manual\\_Man0317-1.1.pdf](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf)  
accessed, November 15, 2018)

Η κίνηση των φορτισμένων σωματιδίων στο εναλλασσόμενο ηλεκτρικό πεδίο καθορίστηκε από τη μετατόπιση συχνότητας μεταξύ μιας ακτίνας λέιζερ αναφοράς και του φωτός που σκεδάζεται από τα φορτισμένα σωματίδια (Doppler Effect). Με βάση την αλλαγή συχνότητας, δύναται να προσδιοριστεί η ταχύτητα του σωματιδίου ( $v$ ). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των σωματιδίων ( $U_E$ ), δηλαδή η εξαρτώμενη από το μέγεθος του ηλεκτρικού πεδίου ταχύτητα των σωματιδίων, υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο ( $E$ ) και μετατράπηκε σε δυναμικό –  $\zeta$  με τη βοήθεια της εξίσωσης Helmholtz – Smoluchowski (2.7.2) (Giese and van Oss, 2002), η οποία λαμβάνει υπόψη την παραμόρφωση του ηλεκτρικού πεδίου που προκαλείται από μη αγώγιμα σωματίδια:

$$U_E = \frac{v}{E} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\mu_w} \quad (2.7.2)$$

όπου  $\epsilon = \epsilon_r/\epsilon_0$  είναι η διηλεκτρική σταθερά του υγρού,  $\epsilon_r$  είναι η αδιάστατη σχετική διηλεκτρική σταθερά του υγρού (μέσου αιώρησης) και  $\epsilon_0$  είναι η ηλεκτρική διηλεκτρική σταθερά ή διαπερατότητα του κενού. Βάσει της δομής της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας EDL, κατά τη θεωρία Stern που περιγράφηκε αναλυτικά στην Παράγραφο 1.1.1, είναι εμφανές ότι το επιφανειακό δυναμικό  $\Psi$  των σωματιδίων δεν ταυτίζεται με το  $\zeta$  δυναμικό, αλλά προκύπτει από τη σχέση (2.7.3) (van Oss et al., 1990):

$$\Psi = \zeta \left[ 1 + \frac{z}{r_p} \right] e^{kz} \quad (2.7.3)$$

όπου  $z$  είναι η απόσταση μεταξύ της φορτισμένης επιφάνειας των σωματιδίων και της επιφάνειας διάτμησης και κυμαίνεται από 3 έως 5 Å,  $r_p$  [Å] η υδροδυναμική ακτίνα του σωματιδίου και  $k$  [1/m] είναι το αντίστροφο του πάχους της διάχυτου στρώματος, γνωστή ως παράμετρος Debye- Hückel το οποίο δίνεται από την σχέση (3.4.6). Ωστόσο, στην συγκεκριμένη εργασία, κατά τον υπολογισμό των ενεργειών διεπιφανειακού δυναμικού βάσει της εκτεταμένης DLVO θεωρίας, έγινε θεώρηση ότι το επιφανειακό δυναμικό ταυτίζεται με το δυναμικό  $\zeta$ .

Τέλος αξίζει να τονισθεί ότι η χρήση της εξίσωσης Helmholtz – Smoluchowski (2.7.2) εμφανίζει τους ακόλουθους περιορισμούς. Αρχικά, το πάχος του διπλού στρώματος ( $1/k$ ) θα πρέπει να είναι μικρό συγκριτικά με τις διαστάσεις των σωματιδίων ( $\kappa \cdot r_p \gg 1$ ). Επίσης, η ουσία ενός σωματιδίου δε θα πρέπει να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα, και η επιφανειακή αγωγιμότητα στο περιβάλλον θα πρέπει να είναι τόσο μικρή που να επηρεάζει ελάχιστα την κατανομή του εξωτερικού ηλεκτρικού

πεδίου. Οι μετρήσεις διαμέτρου και ζ-δυναμικού που λήφθηκαν για τα εξεταζόμενα σωματίδια φαίνονται στον Πίνακα 3.2.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

Black, C.A. Ed. Method of soil analysis, Part 2, Chemical and microbiological properties; American Society of Agronomy, Inc; Madison: Wisconsin USA, **1965**.

Giese, R. F.; Van Oss, C. J. (**2002**) Colloid and surface properties of clays and related minerals. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 119–139.

Liu, L.; Gao, B.; Wu, L.; Morales, V. L.; Yang, L.; Zhou, Z.; Wang, H. Deposition and transport of graphene oxide in saturated and unsaturated porous media. *Chem. Eng. J.* 2013, 229, 444–449.

Loveland, J.P.; Ryan, J.N.; Amy, G.L.; Harvey, R.W. The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloids Surf. A* **1996**, 107, 205–221.

Syngouna, V. I.; Chrysikopoulos, C. V. Transport of biocolloids in water saturated columns packed with sand: Effect of grain size and pore water velocity. *J. Contam. Hydrol.* **2011**, 126 (3-4), 301-314.

van Oss, C. J.; Giese, R. F.; Costanzo, P. M. DLVO and NON-DLVO interactions in hectorite. *Clays Clay Miner.* **1990**, 38 (2), 151 – 159 .

### Ελληνική

Καλλέργης, Γ.Α. Εφαρμοσμένη Περιβαλλοντική Υδρογεωλογία, Τόμος Α. Δεύτερη έκδοση, Τεχνικό Επιμελητήριο Ελλάδας, **1999**.

## *Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>*

### 3. Προσομοίωση μεταφοράς, σύλληψης, διήθησης και εκτίμηση σταθερότητας βιοκολλοειδών & GO

#### 3.1 Μεταφορά βιοκολλοειδών

Για την περιγραφή της μονοδιάστατης μεμονωμένης μεταφοράς – διασποράς των εξεταζόμενων εναιωρημάτων βιοκολλοειδών (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*) σε ομογενή, κορεσμένα πορώδη μέσα, υπό θεώρηση μονοδιάστατης ομοιόμορφης ροής και πρώτης τάξης κινητική προσκόλλησης και αδρανοποίησης των βακτηρίων στην στερεά μήτρα, χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη μερική διαφορική εξίσωση (3.1.1) (Sim and Chrysikopoulos, 1995; Katzourakis and Chrysikopoulos, 2014).

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_i(t, x)}{\partial t} + \frac{\rho_b}{\theta} \frac{\partial C_{i^*}(t, x)}{\partial t} \\ = D_{x,i} \frac{\partial^2 C_i(t, x)}{\partial x^2} - U_x \frac{\partial C_i(t, x)}{\partial x} - \lambda_i C_i(t, x) \\ - \lambda_{i^*} \frac{\rho_b}{\theta} C_{i^*}(t, x) \end{aligned} \quad (3.1.1)$$

Όπου με  $C_i$  [ $M_i/L^3$ ] και  $C_{i^*}$  [ $M_i/M_s$ ], συμβολίζονται η συγκέντρωση του εκάστοτε βιοκολλοειδούς στην αιωρούμενη φάση και η συγκέντρωση του προσκολλημένου βιοκολλοειδούς στη στερεά πορώδη μήτρα, αντίστοιχα,  $x$  [ $L$ ] η Καρτεσιανή συντεταγμένη στην οριζόντια διεύθυνση,  $U_x$  [ $L/t$ ] είναι η μέση ενδοπορώδης ταχύτητα, με κύρια κατεύθυνση τον άξονα  $x$  των συντεταγμένων, η παράμετρος  $D_{x,i}$  [ $L^2/t$ ] αντιπροσωπεύει τον συντελεστή διαμήκους υδροδυναμικής διασποράς κάθε εξεταζόμενου αιωρούμενου βιοκολλοειδούς, που μαθηματικά αποδίδεται από την σχέση (3.1.2) (Bear, 1979).

$$D_{x,i} = D_{eff,i} + a_{L,i} U_x \quad (3.1.2)$$

Στη σχέση (3.1.2) με  $a_{L,i}$  [ $L$ ] συμβολίζεται η διαμήκης τάση διασποράς και ως  $D_{eff,i}$  [ $L^2/t$ ], ο συντελεστής αποτελεσματικής μοριακής διάχυσης του εκάστοτε εξεταζόμενου βιοκολλοειδούς. Ο εν λόγω συντελεστής εκφράζει την μοριακή διάχυση που επιτελείται μόνο εντός των διακένων του πορώδους μέσου και δίνεται από την σχέση (3.1.3):

$$D_{eff,i} = \frac{D_i}{\tau} \quad (3.1.3)$$



όπου  $D_i$  ο συντελεστής μοριακής διάχυσης [ $L^2/t$ ] του εξεταζόμενου βιοκολλοειδούς και  $\tau$  [-] είναι το δαιδαλώδες των πόρων (tortuosity), παράμετρος που λαμβάνει τιμές  $\geq 1$  και εκφράζεται ως το τετράγωνο του λόγου του πραγματικού μήκους της γραμμής ροής που ακολουθεί εντός του μέσου το σωματίδιο ( $L_t$ , [L]) και του χαρακτηριστικού μήκους του πορώδους μέσου ( $L_c$ , [L]). Επίσης στην εξίσωση (3.1.1), η παράμετρος  $\rho_b$  [ $M/L^3$ ] είναι το φαινόμενο ειδικό βάρος (φαινόμενη πυκνότητα) της στερεάς μήτρας,  $\lambda_i$  [ $1/t$ ] είναι ο συντελεστής μετασχηματισμού / αποσύνθεσης (π.χ. αδρανοποίησης) των αιωρούμενων βιοκολλοειδών,  $\lambda_{i^*}$  [ $1/t$ ] είναι ο συντελεστής μετασχηματισμού των προσκολλημένων στη στερεά μήτρα βιοκολλοειδών,  $\theta$  [-] είναι το πορώδες του μέσου και  $t$  [t] ο χρόνος. Σημειώνεται επίσης ότι ο δεύτερος όρος της εξίσωσης (3.1.1) περιγράφει τον ρυθμό προσκόλλησης (ή προσωρινής εναπόθεσης)-αποκόλλησης των αιωρούμενων βιοκολλοειδών στην στερεή μήτρα (δηλ. άμμο) και μαθηματικά αποδίδεται με την πρωτοβάθμια εξίσωση (3.1.4) (Sim and Chrysikopoulos, 1998; 1999):

$$\frac{\rho_b}{\theta} \frac{\partial C_{i^*}(t, x)}{\partial t} = r_{i-i^*} C_i(t, x) - r_{i^*-i} \frac{\rho_b}{\theta} C_{i^*}(t, x) \quad (3.1.4)$$

Όπου  $r_{i-i^*}$  [ $1/t$ ] και  $r_{i^*-i}$  [ $1/t$ ] είναι οι συντελεστές των ρυθμών προσκόλλησης και αποκόλλησης αντίστοιχα των βιοκολλοειδών προς και από την στερεά μήτρα.

Για την επίλυση της εξίσωσης (3.1.1), οι αντιπροσωπευτικές οριακές συνθήκες, καθώς και αρχική συνθήκη, στην περίπτωση ημιάπειρου μονοδιάστατου πορώδους μέσου, υπό την θεώρηση συνεχούς πηγής εισροής βιοκολλοειδών (broad pulse), περιγράφονται από τις ακόλουθες σχέσεις (Sim and Chrysikopoulos, 1995; Thomas and Chrysikopoulos, 2007):

1. **Αρχική συνθήκη** μηδενικής συγκέντρωσης – Τύπου I/Dirichlet:

$$C_i(0, x) = 0 \quad (3.1.5)$$

2. **Ανάντη οριακή συνθήκη** βηματικής διαταραχής με σταθερή ροή μάζας (pulse-type loading with constant input flux) – Τύπου III/Cauchy:

$$D_{x,i} \frac{\partial C_i(t, 0)}{\partial x} + U_x C_i(t, 0) = \begin{cases} U_x C_{0(i)} & , \quad t \leq t_p \\ 0 & , \quad t > t_p \end{cases} \quad (3.1.6)$$

3. **Κατάντη οριακή συνθήκη** για ημι-άπειρων διαστάσεων (semi-infinite) σύστημα – Τύπου II/Neuman:

$$\frac{\partial C_i(t, \infty)}{\partial x} = 0 \quad (3.1.7)$$

Όπου  $C_{0(i)}$  [ $M_i/L^3$ ] είναι η αρχική συγκέντρωση εισροής ή συγκέντρωση της πηγής και  $t_p$  [t] είναι ο ολικός χρόνος που διαρκεί η έγχυση του μικροβιακού εναιωρήματος.

Η αρχική οριακή συνθήκη (3.1.5) προϋποθέτει ότι δεν υπάρχει καμία αρχική συγκέντρωση βιοκολλοειδών εντός του μονοδιάστατου πορώδους μέσου. Η οριακή συνθήκη σταθερής ροής (3.1.6), για το άναπτες τμήμα του πορώδους μέσου, υποδεικνύει μια συνέχεια στον τρόπο εισαγωγής των βακτηριακών κυττάρων στο μέσο, δηλαδή διατήρηση του ισοζυγίου μάζας των εισερχόμενων βιοκολλοειδών για μια προκαθορισμένη χρονική περίοδο διήθησης ( $t_p$ ) (Sim and Chrysikopoulos, 1995). Αντιστοίχως, η εφαρμογή της οριακής συνθήκης (3.1.7) στο κάτω τμήμα του μέσου εκφράζει την διατήρηση συνεχούς συγκέντρωσης βιοκολλοειδών εντός του ημιάπειρου συστήματος.

Εφαρμόζοντας τις οριακές συνθήκες (3.1.6) , (3.1.7) και αρχική συνθήκη (3.1.5) για την επίλυση της μερικής διαφορικής εξίσωσης (3.1.1) προκύπτει η ακόλουθη αναλυτική λύση (3.1.8), όπως προτάθηκε από τους Sim and Chrysikopoulos (1995):

$$C_i(t, x) = \begin{cases} \Omega(t, x) & , \quad 0 < t \leq t_p \\ \Omega(t, x) - \Omega(t - t_p, x) & , \quad t > t_p \end{cases} \quad (3.1.8)$$

Όπου:

$$\begin{aligned} \Omega(t, x) = & \frac{U_x C_{0(i)}}{D_{x,i}^{0.5}} \exp \left[ \frac{U_x x}{2D_{x,i}} \right] \left\{ \int_0^t \int_0^\tau \text{He}^{-Ht} J_0 \left[ 2(B\xi(\tau - \xi))^{0.5} \right] \right. \\ & \cdot \left\{ \frac{1}{(\pi\xi)^{0.5}} \exp \left[ \frac{-x^2}{4D_{x,i}\xi} + \left( H - A - \frac{U_x^2}{4D_{x,i}} \right) \xi \right] \right. \\ & - \frac{U_x}{2D_{x,i}^{0.5}} \exp \left[ \frac{U_x x}{2D_{x,i}} + (H - A)\xi \right] \\ & \cdot \text{erfc} \left[ \frac{x}{2(D_{x,i}\xi)^{0.5}} + \frac{U_x}{2} \left( \frac{\xi}{D_{x,i}} \right)^{0.5} \right] \left. \right\} d\xi d\tau \\ & + e^{-Ht} \int_0^t J_0 \left[ 2(B\xi(\tau - \xi))^{0.5} \right] \\ & \cdot \left\{ \frac{1}{(\pi\xi)^{0.5}} \exp \left[ \frac{-x^2}{4D_{x,i}\xi} + \left( H - A - \frac{U_x^2}{4D_{x,i}} \right) \xi \right] \right. \\ & - \frac{U_x}{2D_{x,i}^{0.5}} \exp \left[ \frac{U_x x}{2D_{x,i}} + (H - A)\xi \right] \\ & \cdot \text{erfc} \left[ \frac{x}{2(D_{x,i}\xi)^{0.5}} + \frac{U_x}{2} \left( \frac{\xi}{D_{x,i}} \right)^{0.5} \right] \left. \right\} d\xi \Big\} \end{aligned} \quad (3.1.9)$$

Στην εξίσωση (3.1.9) με «exp(x)» και «erfc(x)» αναπαριστώνται η εκθετική συνάρτηση και η συμπληρωματική συνάρτηση λάθους, αντίστοιχα,  $J_0$  είναι η συνάρτηση Bessel πρώτου είδους και μηδενικής τάξης, ενώ  $\tau$  και  $\xi$  είναι οι αντικατεστημένες (dummy) μεταβλητές ολοκλήρωσης με σκοπό την απλοποίηση της προτεινόμενης λύσης. Οι παράμετροι  $A$ ,  $B$  και  $H$  ορίζονται από τις σχέσεις (3.1.10), (3.1.11) και (3.1.12) αντίστοιχα (Sim and Chrysikopoulos, 1998).

$$A = r_{i-i^*} + \lambda_i \quad (3.1.10)$$

$$B = r_{i-i^*}(\lambda_{i^*} - H) \quad (3.1.11)$$

$$H = r_{i^*-i} \quad (3.1.12)$$

Ο υπολογισμός των διαφόρων παραμέτρων του μοντέλου καθίσταται εφικτός με χρήση του προγράμματος μη γραμμικής συσχέτισης ελαχίστων τετραγώνων ColloidFit (Katzourakis and Chrysikopoulos, 2017), έπειτα από προσαρμογή της παραπάνω (3.1.8), ενσωματωμένης στο λογισμικό, αναλυτικής λύσης της εξίσωσης (3.1.1) στα πειραματικά δεδομένα.

### 3.2 Μεταφορά νανοσωματιδίων GO

Για την περιγραφή της μεμονομένης μεταφοράς του εναιωρήματος νανοσωματιδίων οξειδίου του γραφενίου (GO) στο μονοδιάστατο, ομογενές, πορώδες μέσο, υπό την θεώρηση ομοιόμορφης ροής και μικτής προσκόλλησης (δηλ, αντιστρέψιμης και μη-αντιστρέψιμης) μη μόνιμης κατάστασης (δηλ, το σύστημα δεν προλαβαίνει να φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας) χρησιμοποιήθηκε η ακόλουθη μερική διαφορική εξίσωση (3.2.1) (Sim and Chrysikopoulos, 1995; Katzourakis and Chrysikopoulos, 2014):

$$\frac{\partial C_{GO}(t, x)}{\partial t} + \frac{\rho_b}{\theta} \frac{\partial C_{GO^*}(t, x)}{\partial t} = D_{x,GO} \frac{\partial^2 C_{GO}(t, x)}{\partial x^2} - U_x \frac{\partial C_{GO}(t, x)}{\partial x} \quad (3.2.1)$$

Όπου με  $C_{GO}$  [ $M_{GO}/L^3$ ] και  $C_{GO^*}$  [ $M_{GO}/M_s$ ] συμβολίζονται η συγκέντρωση των νανοσωματιδίων GO στην αιωρούμενη φάση και η συγκέντρωση των προσκολλημένων νανοσωματιδίων GO στη στερεά πορώδη μήτρα, αντίστοιχα. Η παράμετρος  $D_{x,GO}$  [ $L^2/t$ ] αντιπροσωπεύει τον συντελεστή διαμήκους υδροδυναμικής διασποράς του εξεταζόμενου νανοσωματιδίου. Σημειώνεται ότι, οι υπόλοιπες παράμετροι της εξίσωσης (3.2.1) έχουν ήδη οριστεί στην Παράγραφο 3.1.

Για την περίπτωση μικτής προσκόλλησης (reversible – irreversible attachment), η παράμετρος  $C_{GO^*}$  περιγράφεται από την σχέση (3.2.2) (Katzourakis and Chrysikopoulos, 2014).

$$C_{GO^*} = C_{GO^*}^{(r)} + C_{GO^*}^{(i)} \quad (3.2.2)$$

Όπου με  $C_{GO^*}^{(r)} [M_{GO}/M_s]$  και  $C_{GO^*}^{(i)} [M_{GO}/M_s]$  συμβολίζονται η αντιστρέψιμη και μη αντιστρέψιμη προσκολλημένη συγκέντρωση των νανοσωματιδίων GO του εναιωρήματος στη στερεά πορώδη μήτρα, αντίστοιχα. Συνεπώς, ο όρος συσσώρευσης του GO (δηλ, ο 2<sup>ος</sup> όρος στο αριστερό μέρος της εξίσωσης (3.2.1) θα ορίζεται πλέον από την ακόλουθη σχέση (3.2.3) (Compere et al., 2001; Katzourakis and Chrysikopoulos, 2014):

$$\frac{\rho_b}{\theta} \frac{\partial C_{GO^*}(t, x)}{\partial t} = \frac{\rho_b}{\theta} \left[ \frac{\partial C_{GO^*}^{(r)}(t, x)}{\partial t} + \frac{\partial C_{GO^*}^{(i)}(t, x)}{\partial t} \right] \quad (3.2.3)$$

Επιπλέον για τον όρο αντιστρέψιμης προσκόλλησης ισχύει η σχέση (3.2.4) (Sim and Chrysikopoulos, 1995):

$$\frac{\rho_b}{\theta} \left( \frac{\partial C_{GO^*}^{(r)}(t, x)}{\partial t} \right) = r_{GO-GO^*(r)} C_{GO}(t, x) - r_{GO^*(r)-GO} \frac{\rho_b}{\theta} C_{GO^*}^{(r)}(t, x) \quad (3.2.4)$$

Όπου  $r_{GO-GO^*(r)} [1/t]$  και  $r_{GO^*(r)-GO} [1/t]$  είναι οι συντελεστές των ρυθμών αντιστρέψιμης προσκόλλησης και αποκόλλησης αντίστοιχα των νανοσωματιδίων GO προς και από την στερεά μήτρα. Ενώ για τον όρο μη-αντιστρέψιμης προσκόλλησης ισχύει η σχέση (3.2.5):

$$\frac{\rho_b}{\theta} \left( \frac{\partial C_{GO^*}^{(i)}(t, x)}{\partial t} \right) = r_{GO-GO^*(i)} C_{GO}(t, x) \quad (3.2.5)$$

Όπου  $r_{GO-GO^*(i)} [1/t]$  είναι ο συντελεστής του ρυθμού μη αντιστρέψιμης προσκόλλησης των νανοσωματιδίων GO στη στερεά μήτρα. Με αντικατάσταση των εξισώσεων (3.2.4) και (3.2.5) στην αρχική μερική διαφορική εξίσωση (3.2.1) προκύπτει η ακόλουθη αναθεωρημένη εξίσωση μεταφοράς (3.2.6).

$$\begin{aligned} \frac{\partial C_{GO}(t, x)}{\partial t} + \frac{\rho_b}{\theta} \frac{\partial C_{GO}^{(r)}(t, x)}{\partial t} \\ = D_{x, GO} \frac{\partial^2 C_{GO}(t, x)}{\partial x^2} - U_x \frac{\partial C_{GO}(t, x)}{\partial x} \\ - r_{GO-GO^{*(i)}} C_{GO}(t, x) \end{aligned} \quad (3.2.6)$$

Εφαρμόζοντας την ίδια αρχική συνθήκη (3.1.5) και τις ίδιες συνοριακές συνθήκες (3.1.6) και (3.1.7) με την περίπτωση μεταφοράς των βιοκολλοειδών (δείτε Παράγραφο 3.1), προκύπτει η ίδια αναλυτική λύση, δηλαδή ισχύουν οι σχέσεις (3.1.8) και (3.1.9), με την διαφορά ότι η παράμετρος  $\lambda_i$  αντικαθίσταται από την παράμετρο  $r_{GO-GO^{*(i)}}$  και η παράμετρος  $\lambda_i^*$  τίθεται ίση με μηδέν. Προφανώς, οι συντελεστές  $\Gamma_{i-i^*}$  και  $\Gamma_{i^*-i}$  στην περίπτωση της εξέτασης της μεταφοράς του GO αντικαθίστανται από τους συντελεστές  $\Gamma_{GO-GO^{*(r)}}$  και  $\Gamma_{GO^{*(r)}-GO}$  αντίστοιχα. Επίσης, στην περίπτωση μικτής προσκόλλησης κολλοειδών οι παράμετροι A, B, και H ορίζονται από τις σχέσεις (3.2.7), (3.2.8) και (3.2.9).

$$A = r_{GO-GO^{*(r)}} + r_{GO-GO^{*(i)}} \quad (3.2.7)$$

$$B = -r_{GO-GO^{*(r)}} \cdot \Gamma_{GO^{*(r)}-GO} \quad (3.2.8)$$

$$H = r_{GO^{*(r)}-GO} \quad (3.2.9)$$

### 3.3 Ανάλυση χρονικών ροπών

Τα πειραματικά δεδομένα συγκέντρωσης των βιοκολλοειδών που συλλέχθηκαν στην έξοδο της πειραματικής στήλης, δηλαδή στη θέση  $x = L$ , αναλύθηκαν με βάση τις απόλυτες χρονικές ροπές (absolute temporal moments). Η γενική εξίσωση περιγραφής των χρονικών ροπών αποδίδεται μαθηματικά από τη σχέση (3.3.1) (Syngouna and Chrysikopoulos, 2012):

$$m_n(x) = \int_0^\infty t^n C_i(x, t) dt \quad (3.3.1)$$

όπου ο δείκτης  $n=0, 1, 2, \dots$  υποδεικνύει την τάξη της στιγμής, και ο δείκτης  $i$  δείχνει το εκάστοτε εξεταζόμενο σωματίδιο (βιοκολλοειδές ή GO). Η απόλυτη χρονική στιγμή μηδενικής τάξης,  $m_0$  εκφρασμένη σε μονάδες  $[(CFU_{(t)} \times mL^{-1}) / (CFU_{(t_0)} \times mL^{-1})]$  για την περίπτωση των βακτηρίων και σε μονάδες  $[(mg_{(t)} \times L^{-1}) / (mg_{(t_0)} \times L^{-1})]$  για το GO, υπολογίζει τη συνολική μάζα των βιοκολλοειδών ή νανοσωματιδίων GO που έχει διέλθει από το πορώδες μέσο, δηλαδή το συνολικό εμβαδόν που περικλύεται κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης, η απόλυτη στιγμή πρώτης τάξης,  $m_1$  [t],

περιγράφει το μέσο χρόνο παραμονής των σωματιδίων στη στήλη και η απόλυτη χρονική στιγμή δεύτερης τάξης,  $m_2 [t^2]$ , περιγράφει το βαθμό διάδοσης/διασποράς της καμπύλης συγκέντρωσης του εκάστοτε σωματιδίου.

Οι κανονικοποιημένες χρονικές ροπές ορίζονται από τον ακόλουθο γενικό τύπο (3.3.2) (Syngouna and Chrysikopoulos, 2013; Chrysikopoulos et al., 2017):

$$M_n(x) = \frac{m_n(x)}{m_0(x)} = \frac{\int_0^\infty t^n C_i(x, t) dt}{\int_0^\infty C_i(x, t) dt} \quad (3.3.2)$$

Στα πλαίσια της παρούσας μελέτης προσδιορίστηκε μόνο η πρώτη κανονικοποιημένη χρονική ροπή,  $M_1 [t]$ , που χαρακτηρίζει το κέντρο της μάζας της καμπύλης συγκέντρωσης και καθορίζει το μέσο χρόνο παραμονής ή τη μέση ταχύτητα. Επιπλέον, ο προσδιορισμός της ανακτώμενης μάζας,  $M_r$ , των αιωρούμενων βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων στην έξοδο της στήλης γίνεται με εφαρμογή της ακόλουθης μαθηματικής σχέσης (3.3.3) (Mitropoulou et al., 2013):

$$M_{r(i)}(L) = \frac{\int_0^\infty C_i(L, t) dt}{\int_0^{t_p} C_i(0, t) dt} \quad (3.3.3)$$

### 3.4 Εμπειρικές σχέσεις προσδιορισμού ενεργειών διεπιφανειακού δυναμικού βάσει θεωριών DLVO και XDLVO

Με βάση την ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στην Παράγραφο 1.1.2, η συνολική ενέργεια του διεπιφανειακού δυναμικού (interface potential energy), σε δεδομένη απόσταση διαχωρισμού  $h [m]$  μεταξύ δύο ομαλών, ομοιογενών επιφανειών, με ιδανικές γεωμετρίες, προκύπτει ως το αλγεβρικό άθροισμα των απωστικών ενεργειών, λόγω επικάλυψης διπλών στρωμάτων,  $\Phi_{dl} [J]$  και τροχιακών,  $\Phi_{Born} [J]$ , καθώς και της ελκτικής ενέργειας των δυνάμεων van der Waals,  $\Phi_{vdW} [J]$ , σχέση (3.5.1) (Loveland et al., 1996; Χρυσικόπουλος, 2014).

$$\Phi_{DLVO}(h) = \Phi_{vdW}(h) + \Phi_{dl}(h) + \Phi_{Born}(h) \quad (3.4.1)$$

Εκτεταμένες αναλυτικές εξισώσεις και εμπειρικές μαθηματικές προσεγγίσεις έχουν αναπτυχθεί για την περιγραφή των ενεργειών διεπιφανειακού ή/και διασωματιδιακού δυναμικού,  $\Phi_{vdW}$ ,  $\Phi_{dl}$  και  $\Phi_{Born}$ , για όλες τις δυνατές περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ σωματιδίων και σωματιδίων – επιφανειών. Ωστόσο, οι δύο πιο συνήθεις περιπτώσεις είναι (α) η αλληλεπίδραση μεταξύ δύο παραλλήλων επίπεδων φορτισμένων πλακών, απείρου εμβαδού και πάχους, (περίπτωση επιφάνειας-επιφάνειας) και (β) μεταξύ δύο φορτισμένων σφαιρών (περίπτωση σφαίρας-σφαίρας) (Παναγιώτου, 1998).

Αν και οι εξισώσεις περιγραφής των ενεργειών διεπιφανειακών δυναμικών  $\Phi_{vdw}$ ,  $\Phi_{dl}$  και  $\Phi_{Born}$  διαφοροποιούνται ελαφρώς για τις περιπτώσεις (α) και (β), αξίζει να αναφερθεί πως το θεωρητικό μοντέλο αλληλεπίδρασης σφαίρας με επίπεδη επιφάνεια χρησιμοποιείται και για τον υπολογισμό αλληλεπίδρασης δύο σφαιρικών σωματιδίων, αρκεί η μία σφαίρα να είναι πολύ μεγαλύτερη (τουλάχιστον μια τάξη μεγέθους) από την άλλη (Vasiliadou and Chrysikopoulos, 2011). Κατά την αλληλεπίδραση ομογενών κολλοειδών σωματιδίων, η ενέργεια  $\Phi_{dl}$ , προσεγγίζεται, στις πλείστες των περιπτώσεων, μέσω εκθετικής συνάρτησης της διασωματιδιακής απόστασης, με εμβέλεια ανάλογη της τάξης του πάχους της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας. Στην παρούσα εργασία, οι αλληλεπιδράσεις ομοσυσσωμάτωσης και ετεροσυσσωμάτωσης βακτηρίου – βακτηρίου, βακτηρίου – GO και GO – GO, αντιμετωπίστηκαν ως αλληλεπιδράσεις σφαίρας-σφαίρας, ενώ οι αλληλεπιδράσεις των βακτηρίων και του GO με τη χαλαζιακή άμμο, θεωρήθηκαν ως αλληλεπιδράσεις σφαίρας – επιφάνειας, λόγω του ότι τα μεγέθη των εξεταζόμενων βιοκολλοειδών και των νανοσωματιδίων GO ήταν αρκετά μικρότερα από το μέγεθος των κόκκων της άμμου.

#### 3.4.1 Σχέσεις αλληλεπίδρασης σφαίρας – επιφάνειας βάσει DLVO

Πιο συγκεκριμένα, η εξίσωση υπολογισμού της ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού  $\Phi_{vdw}$  στην περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας – επιφάνειας που εφαρμόστηκε περιγράφεται από την ακόλουθη σχέση (3.4.2) (Chrysikopoulos et al., 2017; Gregory, 1981; Syngouna and Chrysikopoulos, 2012):

$$\Phi_{vdw}(h) = -\frac{A_{123}r_p}{6h} \left[ 1 + \left( \frac{14h}{\lambda_w} \right) \right]^{-1} \quad (3.4.2)$$

Όπου  $r_p$  [m] η ακτίνα του εξεταζόμενου σωματιδίου,  $h$  [nm] η απόσταση διαχωρισμού των δύο επιφανειών,  $\lambda \approx 10^{-7}$  m είναι το χαρακτηριστικό μήκος κύματος της αλληλεπίδρασης σφαίρας – επιφάνειας, και  $A_{123}$  [J] είναι η σύνθετη σταθερά Hamaker του συστήματος των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων. Οι δείκτες υποδεικνύουν την αλληλεπίδραση των σωματιδίων «1 (δηλ. βακτήριο ή νανοσωματίδι GO)» και «3 (δηλ. συλλέκτη/άμμο)» όταν αιωρούνται στο μέσο διασποράς «2 (δηλ. διάλυμα PBS)». Σε περίπτωση που διερευνάται ή ομοσυσσωμάτωση δύο σφαιρικών σωματιδίων ίδιας σύνθεσης (περίπτωση σφαίρας – σφαίρας, δείτε Παράγραφο 3.4.2), τότε η σύνθετη σταθερά Hamaker παρουσιάζεται ως  $A_{121}$ . Σημειώνεται ότι η σταθερά Hamaker εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά κάθε κολλοειδούς σωματιδίου. Επειδή ο ακριβής υπολογισμός της σύνθετης σταθεράς Hamaker του αλληλεπιδρώντος συστήματος δεν είναι πάντα εφικτός, συχνά υπολογίζεται μέσω του συνδυαστικού κανόνα γεωμετρικού μέσου (Israelachvili, 1992), που λαμβάνει υπόψη τα επιμέρους στοιχεία του συστήματος  $A_{11}$ ,  $A_{22}$ ,  $A_{33}$

(δείτε σχέση (3.4.3)), ή από τον συνδυαστικό κανόνα (Yoon et al., 1997), στην περίπτωση ασύμμετρων αλληλεπιδράσεων (σχέση (3.4.4)):

$$A_{123} = (\sqrt{A_{11}} - \sqrt{A_{22}})(\sqrt{A_{33}} - \sqrt{A_{22}}) \quad (3.4.3)$$

$$A_{123} = \sqrt{A_{121} \times A_{323}} \quad (3.4.4)$$

Σε περιπτώσεις που ο υπολογισμός της σύνθετης σταθεράς Hamaker δεν μπορεί να πραγματοποιηθεί λόγω έλλειψης των τιμών των επιμέρους σταθερών, τότε επιλέγονται βιβλιογραφικές τιμές  $A_{123}$  που να έχουν προκύψει για παρόμοια μέσα αλληλεπίδρασης. Η εξίσωση προσδιορισμού της ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού  $\Phi_{dl}$  στην περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας-επιφάνειας (Hogg et al., 1966; Voorn et al., 2007; Chrysikopoulos et al., 2017) που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία είναι η ακόλουθη (3.4.5):

$$\begin{aligned} \Phi_{dl}(h) = \pi \epsilon_r \epsilon_0 r_p \left[ (\Psi_1^2 + \Psi_2^2) \ln(1 - e^{-2\kappa h}) \right. \\ \left. + 2\Psi_1 \Psi_2 \ln\left(\frac{1 + e^{-\kappa h}}{1 - e^{-\kappa h}}\right) \right] \end{aligned} \quad (3.4.5)$$

όπου  $\Psi_1$  [V] είναι το επιφανειακό δυναμικό του βιοκολλοειδούς ή νανοσωματιδίου GO, και  $\Psi_2$  [V] είναι το επιφανειακό δυναμικό της άμμου. Σημειώνεται ότι η εξίσωση (3.4.5) ισχύει για επιφανειακά δυναμικά  $< 60$  mV. Στην συγκεκριμένη μελέτη θεωρήθηκε ότι το επιφανειακό δυναμικό ισούται με το ζ-δυναμικό (z-potential) της επιφάνειας διάσπασης (surface of hydrodynamic shear or slipping plane). Δηλαδή, το ζ-δυναμικό μετράται στο όριο της εξωτερικής επιφάνειας του διπλού διάχυτου στρώματος (δείτε Παράγραφο 2.7), όταν το στρώμα διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα ιόντα, που βρίσκονται σε ισορροπία εντός της υδατικής φάσης, κατά την μετατόπιση του σωματιδίου (κυρίως λόγω βαρύτητας). Επίσης, η παράμετρος  $\kappa$  [1/m] πρόκειται για το αντίστροφο του πάχους της διάχυτου στρώματος (διάχυτης διπλοστοιβάδας), γνωστή και ως παράμετρος Debye – Hückel και μαθηματικά περιγράφεται από την εξίσωση (3.4.6) (Gouy, 1910; Ruckenstein and Prieve, 1976):

$$\kappa = \left[ \frac{2000 I_s N_A e^2}{\epsilon_r \epsilon_0 k_B T} \right]^{1/2} \quad (3.4.6)$$

όπου  $I_s$  [mol/L] είναι η ιοντική ισχύς,  $N_A = 6.022 \times 10^{23}$  1/mol είναι ο αριθμός Avogadro,  $k_B = 1.381 \times 10^{-23}$  (kg·m<sup>2</sup>)/(s<sup>2</sup>·K) ή J/K είναι η σταθερά Boltzman,  $T = 298$



$K$  είναι η απόλυτη θερμοκρασία του ρευστού,  $e = 1.602 \times 10^{-19}$  C είναι το στοιχειώδες ηλεκτρικό φορτίο,  $\epsilon_r = \epsilon/\epsilon_0$  [-] είναι η αδιάστατη σχετική διηλεκτρική σταθερά του υγρού (μέσου αιώρησης),  $\epsilon$  [ $C^2/(J \cdot m)$ ] είναι η διηλεκτρική σταθερά του υγρού, και  $\epsilon_0 \approx 8.854 \times 10^{-12}$   $C^2/(J \cdot m)$  είναι η διαπερατότητα του κενού.

Τέλος, η ενέργεια διεπιφανειακού δυναμικού  $\Phi_{\text{Born}}$  [J] στην περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας – επιφάνειας προσδιορίστηκε από τη ακόλουθη εξίσωση (3.4.7) (Ruckenstein and Prieve, 1976):

$$\Phi_{\text{Born}}(h) = \frac{A_{123}\sigma_{\text{Born}}^6}{7560} \left[ \frac{8r_p + h}{(2r_p + h)^7} + \frac{6r_p + h}{h^7} \right] \quad (3.4.7)$$

όπου  $\sigma_{\text{Born}}$  [m] είναι η Born παράμετρος σύγκρουσης, παράμετρος που συνήθως θεωρείται στην τιμή  $\sigma_{\text{Born}} = 5 \text{ \AA}$  ( $= 0.5 \text{ nm}$ ) (Ruckenstein and Prieve, 1976). Για την συγκεκριμένη τιμή  $\sigma_{\text{Born}}$ , η ελάχιστη αποδεκτή απόσταση διαχωρισμού υπολογίζεται να είναι  $h \approx 2.5 \text{ \AA}$  ( $= 0.25 \text{ nm}$ ), τιμή που προσεγγίζει τις βιβλιογραφικά αναφερόμενες ( $h = 4 - 10 \text{ \AA}$ ) που έχουν προταθεί από άλλους ερευνητές (Frens and Overbeek, 1972; Kallay et al., 1986). Επίσης, σε υδατικά εναιωρήματα, η παρουσία ενυδατωμένων ιόντων τείνει να αποτρέψει την μείωση της απόστασης διαχωρισμού των κολλοειδών στην οριακή τιμή του  $h \approx 0.25 \text{ nm}$  (Elimelech et al., 1995). Συνεπώς, σε υδατικά συστήματα οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης  $\Phi_{\text{Born}}$  μπορούν με ασφάλεια να αγνοηθούν κατά τον υπολογισμό του συνολικού διεπιφανειακού δυναμικού ( $\Phi_{\text{DLVO}}$ ), για τιμές  $h < 0.25 \text{ nm}$ . Επίσης, η  $\Phi_{\text{Born}}$  μπορεί εύκολα να αγνοηθεί για  $h > 10 \text{ \AA}$  ( $= 1 \text{ nm}$ ). Στη παρούσα μελέτη, οι δυνάμεις αλληλεπίδρασης υπολογίστηκαν σκόπιμα για  $h > 0.25 \text{ nm}$ .

### 3.4.2 Σχέσεις αλληλεπίδρασης σφαίρας – σφαίρας βάσει DLVO

Ο υπολογισμός της ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού  $\Phi_{\text{vdw}}$  [J] στην περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας-σφαίρας, έγινε με εφαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης (3.4.8) (Feke et al., 1984; Ryan and Gschwend, 1994; Syngouna and Chrysikopoulos, 2012):

$$\Phi_{\text{vdw}}(h) = -\frac{A_{123}}{12} \left\{ \frac{R_p}{\xi^2 + \xi R_p + \xi} + \frac{R_p}{\xi^2 + \xi R_p + \xi + R_p} + 2 \ln \left[ \frac{\xi^2 + \xi R_p + \xi}{\xi^2 + \xi R_p + \xi + R_p} \right] \right\} \quad (3.4.8)$$

Όπου η παράμετρος  $R_p$  δίνεται από την σχέση (3.4.9) και περιγράφει το λόγο των ακτινών των δύο σφαιρικών αλληλεπιδρώντων σωματιδίων, για τα οποία ισχύει ότι  $r_{p1} [m] \leq r_{p2} [m]$ , ενώ η παράμετρος  $\xi$  ορίζεται από την σχέση (3.4.10) και λαμβάνει υπόψη την διασωματιδιακή απόσταση (interparticle distance) των σφαιρών, η οποία προκύπτει ως άθροισμα της διεπιφανειακής απόστασης διαχωρισμού  $h$  (intersurface distance) και των ακτινών των δύο σωματιδίων.

$$R_p = \frac{r_{p1}}{r_{p2}} \quad (3.4.9)$$

$$\xi = \frac{h + r_{p1} + r_{p2}}{2r_{p1}} \quad (3.4.10)$$

Η ενέργεια διεπιφανειακού δυναμικού  $\Phi_{dl}$  [J] στην περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας – σφαίρας, προσδιορίστηκε με εφαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης (3.4.11) (Hogg et al., 1966; Syngouna and Chrysikopoulos, 2012):

$$\begin{aligned} \Phi_{dl}(h) = \pi \epsilon_r \epsilon_0 \frac{r_{p1} r_{p2}}{(r_{p1} + r_{p2})} & \left[ (\Psi_1^2 + \Psi_2^2) \ln(1 - e^{-2\kappa h}) \right. \\ & \left. + 2\Psi_1 \Psi_2 \ln\left(\frac{1 + e^{-\kappa h}}{1 - e^{-\kappa h}}\right) \right] \end{aligned} \quad (3.4.11)$$

Τέλος, η ενέργεια  $\Phi_{Born}$  [J] στην περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας – σφαίρας, προσδιορίστηκε με εφαρμογή της ακόλουθης εξίσωσης (3.4.12) (Feke et al., 1984; Ryan and Gschwend, 1994; Syngouna and Chrysikopoulos, 2012):

$$\begin{aligned} \Phi_{Born}(h) &= \frac{A_{123}}{75600} \left( \frac{\sigma_{Born}}{r_{p1}} \right)^6 \left[ \frac{-4\xi^2 - 14(R_p - 1)\xi - 6(R_p^2 - 7R_p + 1)}{(2\xi - 1 + R_p)^7} \right. \\ &+ \frac{-4\xi^2 + 14(R_p - 1)\xi - 6(R_p^2 - 7R_p + 1)}{(2\xi + 1 - R_p)^7} \\ &+ \frac{4\xi^2 + 14(R_p - 1)\xi + 6(R_p^2 + 7R_p + 1)}{(2\xi + 1 + R_p)^7} \\ &\left. + \frac{4\xi^2 - 14(R_p - 1)\xi + 6(R_p^2 + 7R_p + 1)}{(2\xi - 1 - R_p)^7} \right] \end{aligned} \quad (3.4.12)$$

### 3.4.3 Τροποποιήσεις εμπειρικών σχέσεων βάσει εκτεταμένης θεωρίας DLVO (XDLVO)

Σύμφωνα με την θεωρία XDLVO (δείτε Παράγραφο 1.1.3), η συνολική ενέργει αλληλεπίδρασης μεταξύ δύο αιωρούμενων σωματιδίων προκύπτει ως άθροισμα (3.4.13) της ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού που προβλέπει η θεωρία DLVO,  $\Phi_{DLVO}$ , και της πρόσθετης ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού, που οφείλεται στη δράση δυνάμεων οξέος – βάσης κατά Lewis (Lewis acid – base interaction energy),  $\Phi_{AB}$  (Bergendahl and Grasso, 1999), η οποία φθίνει εκθετικά με την απόσταση διαχωρισμού των σωματιδίων (van Oss, 1994).

$$\begin{aligned}\Phi_{XDLVO}(h) &= \Phi_{DLVO}(h) + \Phi_{AB}(h) \\ &= \Phi_{vdW}(h) + \Phi_{dl}(h) + \Phi_{Born}(h) + \Phi_{AB}(h)\end{aligned}\quad (3.4.13)$$

Για την περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας – επίπεδης επιφάνειας η ενέργεια  $\Phi_{AB}$  [J] μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση (3.4.14) (van Oss, 1994; van Oss and Giese, 2004), ενώ στην περίπτωση σφαίρας-σφαίρας από την σχέση (3.4.15).

$$\Phi_{AB}(h) = 2\pi r_p \lambda_{AB} \Phi_{AB,(h=h_0)} e^{\left[\frac{h_0-h}{\lambda_{AB}}\right]} \quad (3.4.14)$$

$$\Phi_{AB}(h) = 2\pi \frac{r_{p1} r_{p2}}{(r_{p1} + r_{p2})} \lambda_{AB} \Phi_{AB,(h=h_0)} e^{\left[\frac{h_0-h}{\lambda_{AB}}\right]} \quad (3.4.15)$$

Όπου  $\Phi_{AB,(h=h_0)}$  [J/m<sup>2</sup>] ορίζεται η ελεύθερη ενέργεια οξέος-βάσης κατά Lewis για αλληλεπίδραση μεταξύ δύο σωματιδίων ή επιφανειών στο σημείο επαφής τους,  $h_0$  (δηλ. στο σημείο ελάχιστης απόστασης διαχωρισμού),  $\lambda_{AB}$  [nm] είναι το μήκος Debye στο νερό, το οποίο συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0.4 – 32 nm (Yoon et al., 1997). Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκε να εργαστούμε με  $\lambda_{AB} = 1$  nm (van Oss, 1993) και  $h_0 = 0.25$  nm.

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι για την εκτίμηση του παράγοντα  $\Phi_{AB,(h=h_0)}$ , ωστόσο η πλέον εύχρηστη είναι η παρακάτω εμπειρική προσέγγιση (3.4.16) που αναπτύχθηκε από τον Yoon και τους συνεργάτες του (Yoon et al., 1997) και βασίζεται στον υπολογισμό του βαθμού υδροφοβικότητας των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων χρησιμοποιώντας της γωνίες επαφής τους με το νερό.

$$\Phi_{AB,(h=h_0)} = -\frac{K_{123}}{2\pi h_0 \lambda_{AB}} \quad (3.4.16)$$

Όπου  $K_{123}$  [J] είναι ο συντελεστής υδροφοβικής δύναμης (hydrophobic force constant), που δίνεται από την εμπειρική σχέση (3.4.17), στην οποία με  $\beta_1$  και  $\beta_3$

συμβολίζονται οι γωνίες επαφής του νερού με τα στοιχεία «1 (π.χ., βακτήρια ή GO)» και «3 (π.χ. άμμος)», αντίστοιχα:

$$\log K_{123} = -7.0 \left( \frac{\cos \beta_1 + \cos \beta_3}{2} \right) - 18.0 \quad (3.4.17)$$

Στην παρούσα μελέτη οι τιμές  $A_{123}$ ,  $A_{121}$  και  $A_{323}$  που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αλληλεπιδρών σύστημα παρατίθενται στον Πίνακα 3.1. Οι τιμές δυναμικού ζ, καθώς και οι υδροδυναμικές διάμετροι των σωματιδίων που μετρήθηκαν πειραματικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2, ενώ οι τιμές των γωνιών επαφής που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3.

**Πίνακας 3.1: Σταθερές Hamaker των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων και σύνθετες σταθερές Hamaker των αλληλεπιδρώντων συστημάτων.**

Σταθερές Hamaker για εξέταση ομοσυσσωμάτωσης/ετεροσυσσωμάτωσης					
Σφαίρα-επιφάνεια	Αλληλεπιδρών σύστημα:	$A_{123}$ [J]	$A_{121}$ [J]	$A_{323}$ [J]	Πηγή:
	<i>E. coli</i> -νερό-άμμος	$6.5 \times 10^{-21}$			<i>Rijnaarts et al., 1995a;</i> <i>Simoni et al., 2000</i>
	<i>E. faecalis</i> -νερό-άμμος				
	<i>S. aureus</i> -νερό-άμμος				
Σφαίρα-σφαίρα	GO-νερό-άμμος	$1.92 \times 10^{-21}$			<i>Chrysikopoulos et al., 2017</i>
	<i>E. coli</i> -νερό- <i>E. faecalis</i>			$6.8 \times 10^{-20}$	<i>Rijnaarts et al., 1999</i>
	<i>E. coli</i> -νερό- <i>S. aureus</i>				
	<i>E. faecalis</i> -νερό- <i>S. aureus</i>				
	<i>E. coli</i> -νερό- <i>E. coli</i>				
	<i>E. faecalis</i> -νερό- <i>E. faecalis</i>				
	<i>S. aureus</i> -νερό- <i>S. aureus</i>				
	GO-νερό-GO		$2.23 \times 10^{-21}$		<i>McAllister et al., 2007;</i> <i>Chrysikopoulos et al., 2017</i>
	GO-νερό- <i>E. coli</i>	$1.23 \times 10^{-20}$			Με εφαρμογή συνδυαστικού κανόνα, δείτε σχέση (3.4.4)
	GO-νερό- <i>E. faecalis</i>				
	GO-νερό- <i>S. aureus</i>				
	Άμμος-νερό-άμμος			$1.6 \times 10^{-21}$	<i>Ackler et al., 1996</i>

**Πίνακας 3.2: Τιμές ζ-δυναμικού και διαμέτρων των αλληλεπιδρώντων σωματιδίων.**

Σωματίδια	Πειραματικές Συνθήκες			Μετρήσεις	
	pH	$I_s$ [mM]	T [°C]	z-potential [mV]	$d_H$ [nm]
<i>E. coli</i>	7	2	25	$-38.9 \pm 5.46$	$1090 \pm 62.00$
<i>E. faecalis</i>	7	2	25	$-43.10 \pm 2.28$	$1081.95 \pm 102.92$
<i>S. aureus</i>	7	2	25	$-36.74 \pm 1.88$	$729.86 \pm 85.88$
GO	7	2	25	$-39.56 \pm 1.92$	$546.25 \pm 43.42$
Χονδρόκοκκη άμμος	7	2	25	$-57.3 \pm 2.13$	$900 \times 10^3 \pm 57 \times 10^3$

Πίνακας 3.3: Τιμές γωνίων επαφής των εξεταζόμενων σωματιδίων με το νερό.

	Γωνία επαφής, $\beta$ [°]	Πηγή
GO-νερό (θεωρώντας τυπική συγκέντρωση οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων 20%)	26.8	Wei et al., 2014; Kim et al., 2012
<i>E. coli</i> -νερό	22.2 ( $\pm$ 0.6)	Daffonchio et al., 1995
<i>E. faecalis</i> -νερό	36.0 ( $\pm$ 2.0)	Gallardo-Moreno et al., 2002
<i>S. aureus</i> -νερό	21.9	Hamadi and Latrache, 2005
Άμμος-νερό (θεωρώντας καθαρή άμμο)	70.8 ( $\pm$ 0.5)	Che and Zhu, 2005

### 3.5 Μαθηματική περιγραφή σύλληψης & διήθησης βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO

Με σκοπό την εκτίμηση της ικανότητας σύλληψης των εξεταζόμενων βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO από το πληρωτικό υλικό της στήλης (χονδρόκοκκη άμμο) χρησιμοποιήθηκε ο αδιάστατος συντελεστής απόδοσης συγκρούσεων,  $\alpha$  [-], δηλαδή ο λόγος των επιτυχών συγκρούσεων που οδηγούν σε προσκόλληση ως προς τον συνολικό αριθμό των συγκρούσεων μεταξύ των σωματιδίων και των κόκκων του συλλέκτη. Ο συντελεστής απόδοσης κρούσεων ( $\alpha$ ) υπολογίστηκε, βάσει των εξαγόμενων καμπύλων συγκέντρωσης των βιοκολλοειδών και των νανοσωματιδίων GO, με χρήση της εξίσωσης (3.5.1) (Rajagopalan and Tien, 1976):

$$\alpha = -\frac{2d_c \ln(RC)}{3(1 - \theta)\eta_0 L} \quad (3.5.1)$$

Όπου  $d_c$  [L] είναι η μέση διάμετρος των κόκκων του συλλέκτη,  $\eta_0$  [-] είναι ο αδιάστατος συνολικός συντελεστής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη για περίπτωση ευνοϊκής εναπόθεσης (ελκτικές αλληλεπιδράσεις) και ο λόγος ανακτώμενης συγκέντρωσης του εκάστοτε βιοκολλοειδούς ή του εναιωρήματος GO,  $C_{t,(i \text{ or } GO)}$  [CFU/mL ή mg/L], στην εκροή της πειραματικής στήλης την χρονική στιγμή διέλευσης 2.2 όγκων πόρου (PV), σε σχέση με την αρχική συγκέντρωση του εκάστοτε εξεταζόμενου σωματιδίου,  $C_{0,(i \text{ or } GO)}$  [CFU/mL ή mg/L], ο οποίος προσδιορίζεται από την ακόλουθη σχέση (3.5.2) (Syngouna and Chrysikopoulos, 2013; Chrysikopoulos et al., 2017):

$$RC = \frac{C_{t,(i \text{ or } GO)}}{C_{0,(i \text{ or } GO)}} \quad (3.5.2)$$

Για τον υπολογισμό του λόγου ανακτώμενης συγκέντρωσης, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η συγκέντρωση τη χρονική στιγμή που έχει πραγματοποιηθεί η διέλευση 2.2 όγκων πόρου, λόγω του ότι τη στιγμή αυτή εκτιμάται ότι στο σύστημα έχει επέλθει ισορροπία. Πρέπει να σημειωθεί ότι η CFT ισχύει για διήθηση σε καθαρή κλίνη όπου θεωρείται πως τα αποτιθέμενα βιοκολλοειδή ή/και νανοσωματίδια δεν επηρεάζουν την επόμενη απόθεση βιοκολλοειδών ή/και νανοσωματιδίων. Η σχέση μεταξύ του συντελεστή του ρυθμού προσκόλλησης (forward rate or attachment rate), που συμβολίζεται ως  $r_{i-I}^*$  στην περίπτωση των βιοκολλοειδών και  $r_{GO-GO^{*(i)}}$  στην περίπτωση του GO ή εναλλακτικά ως  $k_d$  σε μονάδες [1/t] και της μέσης διαμέτρου των κόκκων του συλλέκτη ( $d_c$  [L]) ορίζεται ως εξής (3.5.3) (Harvey and Garabedian, 1991):

$$\begin{aligned} \frac{k_d}{\alpha} &= \frac{3(1-\theta)}{2d_c} \eta_0 U_x \Rightarrow \\ k_d &= U_x \frac{3(1-\theta)}{2d_c} \alpha \eta_0 = U_x \frac{3(1-\theta)}{2d_c} \eta \end{aligned} \quad (3.5.3)$$

Όπου η μέση ενδοπορώδης ταχύτητα  $U_x$  [L/t] ορίζεται ως (3.5.4):

$$U_x \left[ \frac{L}{t} \right] = \frac{q \left[ \frac{L}{t} \right]}{\theta [-]} \quad (3.5.4)$$

Ο αδιάστατος συνολικός συντελεστής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη,  $\eta_0$  [-], για συνθήκες ευνοϊκής εναπόθεσης (ελλείψει ενέργειας αλληλεπίδρασης διπλού στρώματος) υπολογίστηκε από τον ακόλουθη προσεγγιστική εξίσωση (3.5.5), η οποία χρησιμοποιείται αρκετά συχνά σε διάφορες εφαρμογές στη βιβλιογραφία (Syngouna and Chrysikopoulos, 2012). Ο συνολικός συντελεστής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη λαμβάνει υπόψη τους τρεις επιμέρους αδιάστατους συντελεστές  $\eta_D$ ,  $\eta_I$  και  $\eta_G$ , οι οποίοι εξαρτώνται από τους μηχανισμούς διάχυσης, ανάσχεσης και καθίζησης (δείτε Παράγραφο 1.4.2), αντίστοιχα. Συνεπώς, η παράμετρος  $\eta_0$  προκύπτει ως άθροισμα των εξισώσεων (3.5.6), (3.5.7) και (3.5.8) (Tufenkji and Elimelech, 2004):

$$\eta_0 = \eta_D + \eta_I + \eta_G \quad (3.5.5)$$

$$\eta_D = 2.4 A_s^{1/3} N_R^{-0.081} N_{Pe}^{-0.715} N_{vdW}^{0.052} \quad (3.5.6)$$

$$\eta_I = 0.55 A_s N_R^{1.675} N_A^{0.125} \quad (3.5.7)$$

$$\eta_G = 0.22 N_R^{-0.24} N_G^{1.11} N_{vdW}^{0.053} \quad (3.5.8)$$

όπου  $A_s$  είναι μια, εξαρτώμενη από το πορώδες του μέσου, παράμετρος ροής (Happel Model Parameter), η οποία προκύπτει από την σχέση (3.5.9):

$$A_s = \frac{2(1 - \varepsilon_\theta^5)}{2 - 3\varepsilon_\theta + 3\varepsilon_\theta^5 - 2\varepsilon_\theta^6} \quad (3.5.9)$$

Όπου,

$$\varepsilon_\theta = (1 - \theta)^{1/3}$$

- ❖  $N_R$ , ο όρος που αφορά στο σχετικό μέγεθος του σωματιδίου ορίζεται από τη σχέση (3.5.10) ως εξής:

$$N_R = \frac{d_p}{d_c} \quad (3.5.10)$$

- ❖  $N_{Pe}$ , ο αδιάστατος αριθμός Peclet, ο οποίος ορίζεται από τη σχέση (3.5.11) και υποδηλώνει την αναλογία του ρυθμού πρόσληψης μιας φυσικής ποσότητας από τη ροή προς τον ρυθμό διάχυσης της ίδιας ποσότητας που οδηγείται από μια κατάλληλη κλίση. Συνεπώς, ο αριθμός αυτός ελέγχει την επικράτηση της υδροδυναμικής διασποράς έναντι της διάχυσης και το αντίστροφο.

$$N_{Pe} = \frac{d_c q}{D} \quad (3.5.11)$$

- ✓ όπου  $D$  συμβολίζεται ο συντελεστής μοριακής διάχυσης που δίνεται από την εξίσωση Stokes-Einstein (3.5.12) (Russel et al., 1989):

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\mu_w d_p} \quad (3.5.12)$$

- ❖  $N_{vdW}$ , ο αριθμός van der Waals που εκφράζεται μαθηματικά από τη σχέση (3.5.13):

$$N_{vdW} = \frac{A_{123}}{k_B T} \quad (3.5.13)$$

- ❖  $N_A$ , ο αριθμός έλξης που εκφράζεται μαθηματικά από τη σχέση (3.5.14):

$$N_A = \frac{N_{vdW}}{N_{Pe} N_R} \quad (3.5.14)$$

❖  $N_G$ , ο όρος που αφορά στη βαρύτητα και ορίζεται από τη σχέση (3.5.15):

$$N_G = \frac{d_p^2(\rho_p - \rho_f)g}{18\mu_w\eta} \quad (3.5.15)$$

Σημειώνεται επίσης ότι  $A_{123} = 6.500 \times 10^{-21}$  J και  $A_{123} = 1.920 \times 10^{-21}$  J είναι η σύνθετη σταθερά Hamaker που λαμβάνεται υπόψη στην περίπτωση αλληλεπίδρασης με την άμμο των βιοκολλοειδών και του εναιωρήματος GO, αντίστοιχα (Murray and Parks, 1978; Syngouna and Chrysikopoulos, 2012),  $k_B = 1.300 \times 10^{-23}$  (kg·m<sup>2</sup>) / (s<sup>2</sup>·K) είναι η σταθερά Boltzman,  $T = 298$  K είναι απόλυτη θερμοκρασία του ρευστού,  $\rho_f = 999.7$  kg/m<sup>3</sup> είναι η πυκνότητα του ρευστού,  $\mu_w = 8.910 \times 10^{-4}$  kg/(m·s) είναι το απόλυτο ιξώδες του ρευστού, και  $g = 9.810$  m/s<sup>2</sup> είναι η επιτάχυνση λόγω βαρύτητας. Οι διάμετροι  $d_p$  των εξεταζόμενων σωματιδίων (δείτε Πίνακας 3.2) που χρησιμοποιήθηκαν στους υπολογισμούς ήταν  $1.090 \times 10^{-6}$  m για το *E. coli*,  $0.730 \times 10^{-6}$  m για το *S. aureus*,  $1.082 \times 10^{-6}$  m για το *E. faecalis* και  $0.546 \times 10^{-6}$  m το GO. Επίσης οι τιμές πυκνοτήτων ( $\rho_p$ ) των σωματιδίων φαίνονται στον Πίνακας 3.4.

**Πίνακας 3.4: Τιμές πυκνότητας των βακτηρίων και των νανοσωματιδίων GO.**

Σωματίδιο	Τιμή πυκνότητας	Μονάδες	Πηγή
<i>E. coli</i>	1091	kg/m <sup>3</sup>	Guerrero et al., 1985; Poole et al., 1976
<i>E. faecalis</i>	1132	kg/m <sup>3</sup>	Berryhill and Pattee, 1969
<i>S. aureus</i>	1693	kg/m <sup>3</sup>	Verhoff et al., 1971 Berryfill, 1971
<b>GO</b>	2200	kg/m <sup>3</sup>	Chrysikopoulos et al., 2017; Stankovich et al., 2006



## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

Ackler, H.D.; French, R.H.; Chiang, Y.M. Comparisons of hamaker constants for ceramic systems with intervening vacuum or water: from force laws and physical properties. *J. Colloid Interface Sci.* **1996**, *179*, 460-469.

Bear, J. *Hydraulics of Groundwater*, McGraw-Hill (1979).

Bergendahl, J.; Grasso, D. Prediction of colloid detachment in a model porous media: Thermodynamics. *AIChE J.* **1999**, *45*(3), 359-361.

Berryhill, D.L. Studies on the genome of *Staphylococcus aureus*. Dissertation, Iowa State University, Department of Bacteriology, **1971**.

Berryhill, D.L.; Patee, P.A. Buoyant density analysis of *Staphylococcal* Bacteriophage 80 transducing particles. *J. Virol.* **1969**, *4* (5), 804-806.

Chen, G.; Zhu, H. Bacterial adhesion to silica sand as related to Gibbs energy variations. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2005**, *44*, 41-48.

Chrysikopoulos, C.V.; Sotirelis, N.P.; Kallithrakas-Kontos, N.G. Cotransport of graphene oxide nanoparticles and kaolinite colloids in porous media. *Transport Porous Med.* **2017**, *119*, 181-204. doi: 10.1007/s11242-017-0879-z.

Compere, F.; Porel, G.; Delay, F. Transport and retention of clay particles in saturated porous media: influence of ionic strength and pore velocity. *J. Contam. Hydrol.* **2001**, *49*, 1-21.

Daffonchio, D.; Thaveesri, J.; Verstraete, W. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*(10), 3676-3680.

Elimelech, M.; Gregory, J.; Jia, X.; Williams, R.A. Particle deposition & aggregation: Measurement modelling and simulation. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. (1995).

Feke, D.L.; Prabhu, J.A.; Mann, Jr.; Mann, J.R. A formulation of the short-range repulsion between spherical colloidal particles. *J. Phys. Chem. A* **1984**, *88*, 5735-5739.

Frens, G.; Overbeek, J.Th.G. Repeptization and the theory of electrostatic colloids. *J. Colloid Interface Sci.* **1972**, *38*, 376-387.

Gallardo-Moreno, A. M.; González-Martín, M. L.; Bruque, J. M.; Pérez-Giraldo, C.; Gómez-García, A. C. Temperature influence on the physicochemical surface properties and adhesion behaviour of *Enterococcus faecalis* to glass and silicone. *J. Adhes. Sci. Technol.* **2002**, *16* (9), 1215-1223.

Gouy, M. Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un electrolyte. *J. Phys. Theor. Appl.* **1910**, *9*, 457-467.

Gregory, J. Approximate expressions for retarded van der Waals interaction. *J. Colloid Interface Sci.* **1981**, *83*, 138-145.

Guerrero, R.; Pedrós-Alió, C.; Schmidt, T.M.; Mas, J. A survey of buoyant density of microorganisms in pure cultures and natural samples. *Microbiologica SEM*, **1985**, *1*, 53-65.

Hamadi, F.; Latrache, H. Comparison of contact angle measurement and microbial adhesion to solvents for assaying electron donor–electron acceptor (acid–base) properties of bacterial surface. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **2008**, *65*, 134-139.

Hogg, R.; Healy, T.W.; Fuerstenau, D.W. Mutual coagulation of colloidal dispersions. *Trans. Faraday Soc.* **1966**, *62*, 1638.

- Israelachvili, J.N. Intermolecular and Surface Forces, 2<sup>nd</sup> Ed, Academic Press, London, **1992**.
- Kallay, N.; Bigkup, B.; Tomid, M.; Matijevid, E. Particle adhesion and removal in model systems: X. The effect of electrolytes on particle detachment. *J. Colloid Interface Sci.* **1986**, *114* (2), 357-362.
- Katzourakis V.E. and Chrysikopoulos C.V. Fitting the transport and attachment of dense biocolloids in one dimensional porous media: ColloidFit. *Groundwater*. 2017. doi:10.1111/gwat.12501.
- Katzourakis, V.E.; Chrysikopoulos, C.V. Mathematical modeling of colloid and virus cotransport in porous media: Application to experimental data. *Adv. Water Resour.* **2014**, *68*, 62-73.
- Kim, S.; Zhou, S.; Hu, Y.; Acik, M.; Chabal, Y.J.; Berger, C.; de Heer, W.; Bongiorno, A.; Riedo, E. Room-temperature metastability of multilayer graphene oxide films. *Nat. Mater.* **2012**, *11*, 544–549.
- Loveland, J.P.; Ryan, J.N.; Amy, G.L.; Harvey, R.W. The reversibility of virus attachment to mineral surfaces. *Colloids Surf. A* **1996**, *107*, 205–221.
- McAllister, M.J.; Li, J-L.; Adamson, D.H.; Schniepp, H.C.; Abdala, A.A.; Liu, J.; Herrera-Alonso, M.; Milius, D.L.; Car, R.; Prud'homme, R.K.; Aksay, I.A. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite. *Chem. Mater.* **2007**, *19* (18), 4396–4404.
- Mitropoulou, P.N.; Syngouna, V.I.; Chrysikopoulos, C.V. Transport of colloids in unsaturated packed columns: role of ionic strength and sand grain size. *Chem. Eng. J.* 2013, *232*, 237–248.
- Murray, J.P.; Parks, G.A. Particulates in water: characterization, fate, effects and removal. *Adv. Chem. Ser.* **1978**, *189*, in Kavanaugh, M.C. and Leckie J.O. (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC.
- Poole, R.K. Fluctuations in buoyant density during the cell cycle of *Escherichia coli* K12: Significance for the preparation of synchronous cultures by age selection. *J. Gen. Microbiol.* **1977**, *98*, 177-186.
- Rajagopalan, R.; Tien, C. Trajectory analysis of deep-bed filtration with the sphere-in-cell porous media model. *AIChE J.* **1976**, *22*, 523–533.
- Rijnaarts, H.H.; Norde, W.; Bouwer, E.J.; Lyklema, J.; Zehnder, A.J. Reversibility and mechanism of bacterial adhesion. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **1995a**, *4*, 5–22.
- Rijnaarts, H.H.M.; Norde, W.; Lyklema, J.; Zehnder, A.J.B. DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **1999**, *14*, 179–195.
- Ruckenstein, E.; Prieve, D.C. Adsorption and desorption of particles and their chromatographic separation. *AIChE J.* **1976**, *22*, 276-283.
- Russel, W.B.; Saville, D.A.; Schowalter, W.R. (1976). Colloidal Dispersions. Cambridge University Press, Cambridge, Great Britain, pp. 525.
- Ryan, J.N.; Gschwend, P.M. Effects of ionic strength and flow rate on colloid release: Relating kinetics to intersurface potential energy. *J. Colloid Interface Sci.* **1994**, *164*, 21-34.
- Sim, Y.; Chrysikopoulos C.V. Analytical solutions for solute transport in saturated porous media with semi-infinite or finite thickness. *Adv. Water Resour.* **1999**, *22*, 507-519.
- Sim, Y.; Chrysikopoulos, C.V. Analytical models for one-dimensional virus transport in saturated porous media. *Water Resour. Res.* **1995**, *31*, 1429-1437 (Correction, *Water Resour. Res.*, *32*, 1473, 1996).

Sim, Y.; Chrysikopoulos, C.V. Three-dimensional analytical models for virus transport in saturated porous media. *Transport Porous Med.* **1998**, *30*, 87-112.

Simoni, S.F.; Bosma, T.N.P.; Harms, H.; Zehnder, A.J.B. Bivalent cations increase both the subpopulation of adhering bacteria and their adhesion efficiency in sand columns. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 1011-1017.

Stankovich, S.; Dikin, D.A.; Dommett, G.H.; Kohlhaas, K.M.; Zimney, E.J.; Stach, E.A.; Piner, R.D.; Nguyen, S.T.; Ruoff, R.S. Graphene-based composite materials. *Nature* **2006**, *442*, 282-285, doi: 10.1038/nature04969.

Syngouna, V.I.; Chrysikopoulos, C.V. Cotransport of clay colloids and viruses in water saturated porous media. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.* **2013**, *416*, 56-65. doi:10.1016/j.colsurfa.2012.10.018.

Syngouna, V.I.; Chrysikopoulos, C.V. Transport of biocolloids in water saturated columns packed with sand: Effect of grain size and pore water velocity. *J. Contam. Hydrol.* **2012**, *120-130*, 11-24. doi:10.1016/j.jconhyd.2012.01.010.

Thomas, J.M.; Chrysikopoulos, C.V. Experimental investigation of acoustically enhanced colloid transport in water-saturated packed columns. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *308*, 200-207.

Tufenkji, N.; Elimelech, M. Correlation equation for predicting singlecollector efficiency in physicochemical filtration in saturated porous media. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 529-536.

van Oss, C.J. *Interfacial Forces in Aqueous Media*. Marcel Dekker, New York (1994).

van Oss, C.J.; Giese, R.F. Role of the properties and structure of liquid water in colloidal and interracial systems. *J. Dispers. Sci. Technol.* **2004**, *25*(5), 631-655.

Vasiliadou, I. A.; Chrysikopoulos, C. V. Cotransport of *Pseudomonas putida* and kaolinite particles through water-saturated columns packed with glass beads. *Water Resour. Res.* **2011**, *47*, W02543.

Verhoef, J.; Hoff, A.J.; Holtrigter, B.; van der Drift, A.C.M. Deoxyribonucleic acid base composition of *Staphylococcus epidermidis* and its phages. *J. Gen. Microbiol.* **1971**, *69*, 279-283.

Voorn, D.J.; Ming, W.; Laven, J.; Meuldijk, J.; de With, G.; van Herk, A.M. Plate-sphere hybrid dispersions: heterocoagulation kinetics and DLVO evaluation. *Colloids Surf. A* **2007**, *294* (1-3), 236-246. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.08.022.

Wei, N.; Lv, C.; Xu, Z. Wetting of graphene oxide: a molecular dynamics study. *Langmuir* **2014**, *30*, 3572-3578.

Yao, K.-M.; Habibian, M.T.; O'Melia, C.R. Water and waste water filtration: Concepts and applications. *Environ. Sci. Technol.* **1971**, *5* (11), 1105-1112.

Yoon R.-H.; Flin, D. H.; Rabinovich, Y.I. Hydrophobic interactions between dissimilar surfaces. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185*, 363-370.

## Ελληνική

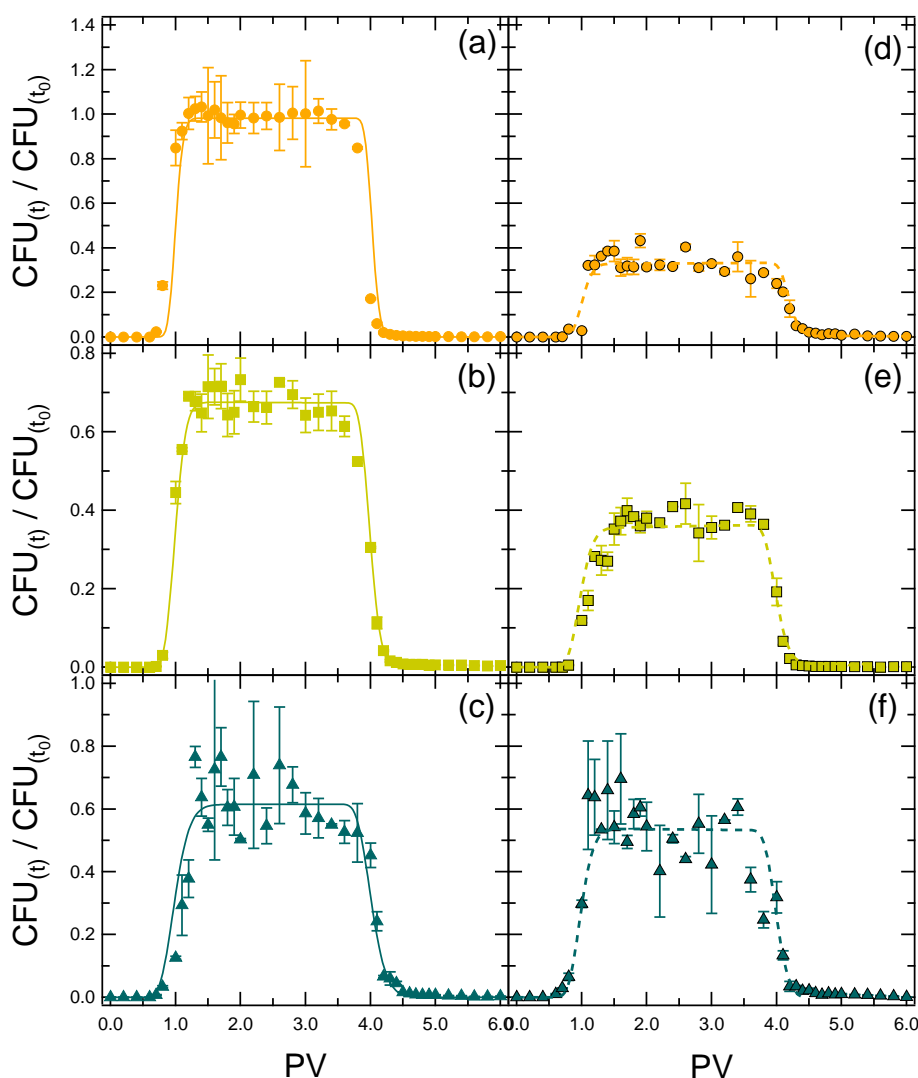
Παναγιώτου, Κ. (1998). Διεπιφανειακά Φαινόμενα και Κolloειδή Συστήματα. Εκδόσεις Ζήτη, Θεσσαλονίκη, Β' Έκδοση.

## *Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup>*

## 4. Αποτελέσματα ανάλυσης δεδομένων

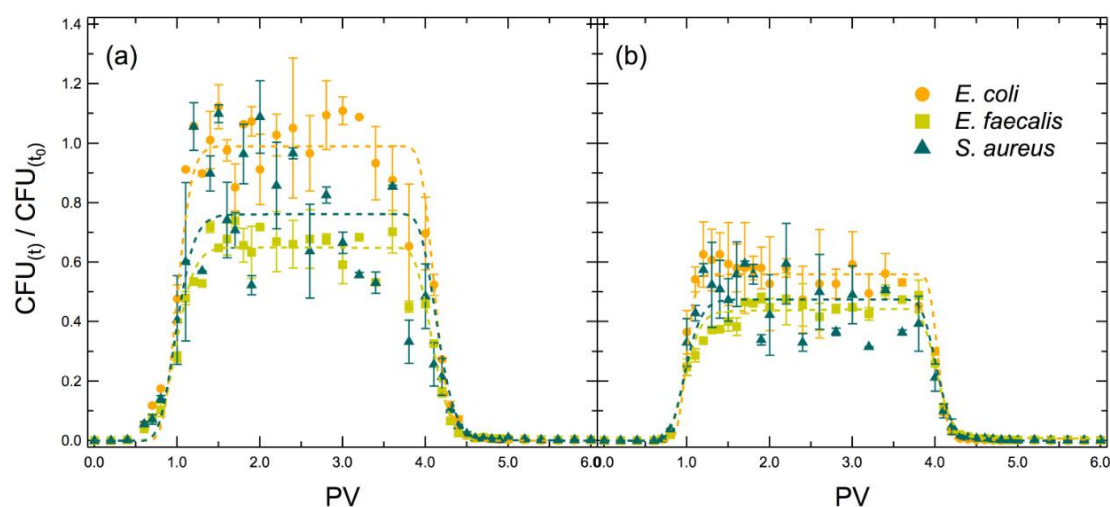
### 4.1 Αποτελέσματα πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς βιοκολλοειδών

Στα Γραφήματα 4.1(a), 4.1(b) και 4.1(c) παρουσιάζονται τα δεδομένα κανονικοποιημένης συγκέντρωσης (σύμβολα) των βακτηρίων *E. coli*, *E. faecalis* και *S. aureus*, αντίστοιχα, μαζί με τις προσαρμοσμένες τιμές του μοντέλου (συνεχείς καμπύλες). Στις εν λόγω περιπτώσεις, εξετάζεται η μεταφορά κάθε βακτηρίου εντός της κορεσμένης στήλης, που είναι πληρωμένη με χονδρόκοκκη χαλαζιακή άμμο, όταν δεν πραγματοποιείται ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO.



Γράφημα 4.1: (Αριστερά) Πειραματικά δεδομένα κανονικοποιημένων συγκέντρωσεων (σύμβολα) και προσαρμοσμένες προβλέψεις του μαθηματικού μοντέλου (συνεχείς καμπύλες) των βακτηρίων *E. coli* (a), *E. faecalis* (b) και *S. aureus* (c), απουσία επίδρασης νανοσωματιδίων GO. (Δεξιά) Πειραματικά δεδομένα κανονικοποιημένων συγκέντρωσεων (σύμβολα), που δεν έχουν υποστεί μοντελοποίηση, των βακτηρίων *E. coli* (d), *E. faecalis* (e) και *S. aureus* (f), υπό την επίδραση νανοσωματιδίων GO.

Η προσομοίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων, για την περιγραφή της μονοδιάστατης μεταφοράς κάθε βακτηρίου, πραγματοποιήθηκε με χρήση του του λογισμικού ColloidFit (Katzourakis and Chrysikopoulos, 2017), εφαρμόζοντας την λύση (δείτε σχέση (3.1.8)) της μερικής διαφορική εξίσωσης (3.1.1). Όλα τα διαγράμματα δημιουργήθηκαν με χρήση του προγράμματος Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA). Στα Γραφήματα 4.1(d), 4.1(e) και 4.1(f) παρουσιάζονται τα πειραματικά δεδομένα κανονικοποιημένης βακτηριακής συγκέντρωσης των αντίστοιχων στελεχών, όπως προέκυψαν κατά την ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος νανοςωματιδίων GO από την στήλη.



Γράφημα 4.2: (a) Πειραματικά δεδομένα κανονικοποιημένων συγκέντρωσεων (σύμβολα) των βακτηρίων *E. coli* (κύκλοι), *E. faecalis* (τετράγωνα) και *S. aureus* (τρίγωνα), κατά την συμμεταφορά τους στην κορεσμένη στήλη, απουσία επίδρασης νανοςωματιδίων GO. (b) Πειραματικά δεδομένα κανονικοποιημένων συγκέντρωσεων των βακτηρίων κατά την συμμεταφορά τους, υπό την επίδραση νανοςωματιδίων GO. Τα δεδομένα συμμεταφοράς δεν έχουν υποστεί μοντελοποίηση.

Στο Γράφημα 4.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα κανονικοποιημένων συγκεντρώσεων κάθε εξεταζόμενου βακτηρίου κατά την συμμεταφορά τους εντός της στήλης. Στην πρώτη περίπτωση (4.2(a)) δεν υπάρχει επίδραση νανοςωματιδίων GO, ενώ στη δεύτερη περίπτωση (4.2(b)), κατά την διήθηση του εναιωρήματος των τριών βιοκολλοειδών, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος GO. Πρέπει να σημειωθεί πως τα δεδομένα μεταφοράς βακτηρίων/GO, συμμεταφοράς βακτηρίων και συμμεταφοράς βακτηρίων/GO δεν έχουν προσομοιωθεί, λόγω του ότι το μοντέλο μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε δεν δύναται να εφαρμοστεί σε περιπτώσεις ταυτόχρονης μεταφοράς δύο ή περισσότερων διαφορετικών ειδών κολλοειδών σωματιδίων. Συνεπώς, οι ασυνεχείς καμπύλες των Γραφημάτων 4.1(d-f), 4.2(a) και 4.2(b) υποδεικνύουν απλώς μια μέση τάση που μπόρεσε να εξαχθεί, βάσει των πειραματικών και μόνο τιμών, αναφορικά με την κίνηση των βακτηρίων.

Τα ποσοστά ανακτώμενης μάζας ( $M_r$ ) των Πινάκων 4.1 και 4.2 προέκυψαν με χρήση του λογισμικού ColloidFit, μέσω στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων που προέκυψαν σε κάθε πειραματική περίπτωση. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση του εμβαδού/επιφάνειας που περικλύεται κάτω από κάθε καμπύλη, με

εφαρμογή του κανόνα του τραπέζιου. Ο μέσος χρόνος παραμονής ( $t_d$ ) κάθε βακτηρίου εντός της πειραματικής στήλης προσδιορίστηκε, μέσω υπολογισμού της πρώτης κανονικοποιημένης στατιστικής ροπής (δείτε Παράγραφο 3.3).

**Πίνακας 4.1:** Υπολογισμένες τιμές παραμέτρων πειραμάτων μεταφοράς βακτηρίων, κατά την παρουσία και απουσία εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO στη κορεσμένη στήλη.

Πείραμα		$C_0$ [CFU/mL]	$U_x$ [cm/min]	$\theta$ [-]	$\rho_b$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$q$ [cm/min]	$t_d$ [min]	$M_r$ [%]
Μεταφορά	<i>E. coli</i>	$9.5 \times 10^4$	0.44	0.38	1.76	0.17	173.08	98.2
	<i>E. faecalis</i>	$1.1 \times 10^5$	0.42	0.39	1.77	0.16	176.28	67.1
	<i>S. aureus</i>	$7.9 \times 10^4$	0.43	0.38	1.77	0.16	175.42	61.5
Μεταφορά βακτηρίου/GO	<i>E. coli</i> /GO	$1.1 \times 10^5$	0.41	0.39	1.74	0.16	190.01	32.8
	<i>E. faecalis</i> /GO	$8.2 \times 10^4$	0.41	0.40	1.76	0.17	187.54	36.1
	<i>S. aureus</i> /GO	$1.5 \times 10^5$	0.40	0.41	1.74	0.16	182.33	52.7

**Πίνακας 4.2:** Υπολογισμένες τιμές παραμέτρων πειραμάτων συµμεταφοράς βακτηρίων, κατά την παρουσία και απουσία εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO στη κορεσμένη στήλη.

Πείραμα συµμεταφοράς βακτηρίων		$C_0$ [CFU/mL]	$U_x$ [cm/min]	$\theta$ [-]	$\rho_b$ [g/cm <sup>3</sup> ]	$q$ [cm/min]	$t_d$ [min]	$M_r$ [%]
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	$1.2 \times 10^5$	0.40	0.41	1.74	0.16	188.35	100.3
	<i>E. faecalis</i>	$1.5 \times 10^5$					190.33	64.8
	<i>S. aureus</i>	$5.2 \times 10^5$					182.22	68.3
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i> /GO	<i>E. coli</i>	$1.6 \times 10^5$	0.40	0.41	1.73	0.16	182.69	55.3
	<i>E. faecalis</i>	$1.7 \times 10^5$					192.29	44.5
	<i>S. aureus</i>	$5.6 \times 10^5$					180.40	46.1

Βάσει των ποσοστών ανακτώμενης μάζας και των μέσων χρόνων παραμονής των πειραμάτων μεμονωμένης μεταφοράς, παρατηρείται ότι το βακτήριο *E. coli* συγκρατείται λιγότερο στην άμμο και εξέρχεται γρηγορότερα της στήλης σε σχέση με τα άλλα δύο βακτήρια. Αξίζει να τονισθεί πως το εν λόγω βακτηριακό στέλεχος εμφανίζει κινητικότητα (motile), ενώ τα δύο άλλα εξεταζόμενα βακτηριακά στελέχη δεν εμφανίζουν κινητικότητα (non-motile). Δεδομένου ότι δεν παρατηρούνται μεγάλες αποκλίσεις στις τιμές ενδοπορώδους ταχύτητας, η ικανότητα εμφάνισης κινητικότητας θα μπορούσε να εξηγήσει μερικώς την παρατηρούμενη ταχύτερη

εκροή του *E. coli*. Επιπλέον, παρατηρείται ότι η παρουσία νανοσωματιδίων GO επηρεάζει περισσότερο τη μεταφορά του *E. coli*. Πιο συγκεκριμένα, κατά την ταυτόχρονη άντληση του εν λόγω εναιωρήματος, παρατηρείται μεγαλύτερη μείωση στην ανακτώμενη μάζα του *E. coli*, της τάξης του 66.6 %, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης για το *E. faecalis* και το *S. aureus* είναι 46.2% και 14.3%. Από τα παραπάνω καθίσταται εμφανές ότι μεταξύ των τριών βακτηρίων, το *S. aureus* επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό από τα νανοσωματίδια GO. Επιπρόσθετα, η ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO από την στήλη, κατά τη μεμονωμένη διήθηση των μικροβιακών αιωρημάτων, προκαλεί αύξηση των μέσων χρόνων παραμονής των βακτηρίων εντός του κορεσμένου πορώδους μέσου κατά 9.8% (*E. coli*), 6.4 % (*E. faecalis*) και 3.9 % (*S. aureus*), αντίστοιχα.

Τα ποσοστά ανάκτησης μάζας ( $M_r$ ) του Πίνακα 4.2 υποδεικνύουν ότι η συμμεταφορά των βακτηρίων δεν επηρεάζει σημαντικά την συγκράτηση των βιοκολλοειδών. Πιο συγκεκριμένα, συγκρίνοντας τα ποσοστά ανάκτησης μάζας, που προέκυψαν από τα πειράματα μεμονωμένης μεταφοράς κάθε βακτηρίου, του Πίνακα 4.1 με τα αντίστοιχα ποσοστά του Πίνακα 4.2, διαπιστώνεται ότι η ανάκτηση του *E. coli* στην εκροή της στήλης αυξήθηκε κατά 2.1 % , η ανάκτηση του *E. faecalis* μειώθηκε κατά 3.4 % και η ανάκτηση του *S. aureus* αυξήθηκε κατά 11.1 %. Αν και οι παραπάνω διαφοροποιήσεις στα ποσοστά ανάκτησης δεν υποδεικνύουν μια ξεκάθαρη τάση, παρόλα αυτά η συμμεταφορά φαίνεται να ευνοεί περισσότερο την ανάκτηση του *S. aureus*. Κατά την συμμεταφορά, οι μέσοι χρόνοι παραμονής των βακτηρίων εντός της στήλης αυξήθηκαν κατά 8.8 % (*E. coli*), 8.0 % (*E. faecalis*) και 3.9 % (*S. aureus*), σε σχέση με τους χρόνους παραμονής που παρατηρήθηκαν κατά τη μεμονωμένη μεταφορά των βακτηρίων. Η αύξηση των χρόνων παραμονής πιθανόν προέκυψε λόγω ανταγωνιστικής ή και συνεργιστικής δράσης μεταξύ των βακτηρίων κατά την αλληλεπίδρασή τους.

Επιπλέον, στην περίπτωση συμμεταφοράς, υπό την παρουσία GO παρατηρήθηκε μείωση των ποσοστών ανακτώμενης μάζας των βακτηρίων *E. coli*, *E. faecalis* και *S. aureus* κατά 44.9 %, 31.3 % και 32.5 % αντίστοιχα. Όπως και στην περίπτωση των πειραμάτων μεμονωμένης μεταφοράς, παρατηρείται ότι το *E. coli* επηρεάζεται περισσότερο από την παρουσία των νανοσωματιδίων GO. Όσον αφορά στους χρόνους παραμονής, υπό την παρουσία GO κατά τη συμμεταφορά, παρατηρήθηκε μείωση αυτών κατά 3 % και 1 % στην περίπτωση των βακτηρίων *E. coli* και *S. aureus*, ενώ ο μέσος χρόνος παραμονής του *E. faecalis* αυξήθηκε κατά 1 %. Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την μεμονωμένη μεταφορά κάθε βακτηρίου υπό την παρουσία εναιωρήματος GO, δεν παρατηρήθηκε μείωση των χρόνων παραμονής.

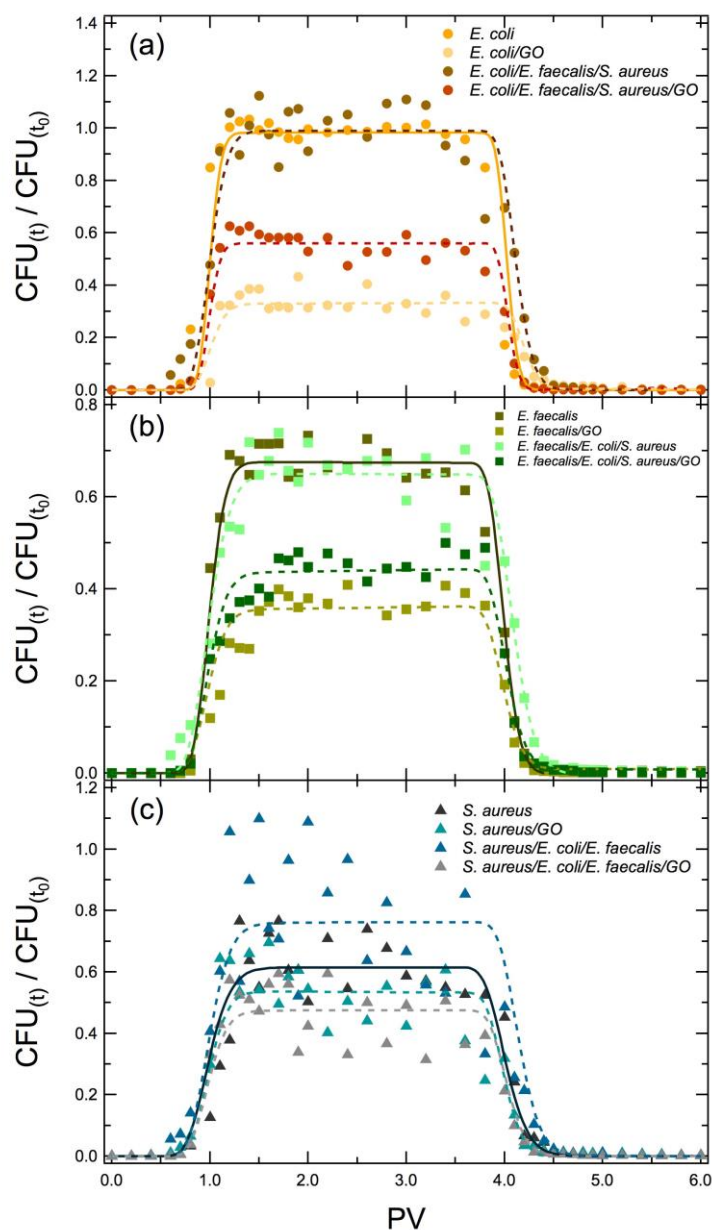
Χρήζει ιδιαίτερου σχολιασμού το γεγονός ότι η παρουσία εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO επηρέασε περισσότερο την μεμονωμένη μεταφορά των βακτηρίων *E. coli* και *E. faecalis*, ενώ κατά την ταυτόχρονη διέλευση των τριών βακτηρίων η επίδραση του GO ήταν μικρότερη για τα εν λόγω στελέχη. Πιο συγκεκριμένα, η ανάκτηση του *E. coli* κατά την μεταφορά του στη στήλη με ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος GO προσδιορίστηκε σε 32.8 %, ενώ κατά τη



συμμεταφορά του παρουσία των δύο άλλων στελεχών και εναιωρήματος νανοσωματιδίων η ανάκτηση του συγκεκριμένου στελέχους εκτιμήθηκε σε 55.3 %, δηλαδή εμφανίσε αύξηση κατά 68.6 %. Για το *E. faecalis*, το ποσοστό αύξησης της ανακτώμενης μάζας στην εκροή, για τις αντίστοιχες πειραματικές περιπτώσεις, ήταν 23.3 %. Αντίθετα, η ανάκτηση του *S. aureus* από 52.7%, που εκτιμήθηκε κατά την μεμονωμένη μεταφορά του παρουσία εναιωρήματος GO, μειώθηκε κατά 12.5% κατά την συμμεταφορά του παρουσία των δύο άλλων στελεχών και του εναιωρήματος.

**Πίνακας 4.3:** Ποσοστιαίες μεταβολές των μέσων χρόνων παραμονής και των ανακτώμενων μαζών στην εκροή της στήλης κατά τη μεταφορά και συμμεταφορά των βακτηρίων, υπό την παρουσία και απουσία νανοσωματιδίων GO.

Πείραμα		$t_d$ [min]	$M_r$ [%]	% Μεταβολή, κατά τη μεταφορά / συμμεταφορά παρουσία GO, σε σχέση με τη μεμονωμένη μεταφορά /συμμεταφορά απουσία GO		% Μεταβολή, κατά τη συμμεταφορά σε σχέση με τη μεμονωμένη μεταφορά (απουσία GO)		% Μεταβολή, κατά τη συμμεταφορά σε σχέση με τη μεταφορά (παρουσία GO)	
				$t_d$	$M_r$	$t_d$	$M_r$	$t_d$	$M_r$
Μεμονωμένη μεταφορά βακτηρίου	<i>E. coli</i>	173.08	98.2						
	<i>E. faecalis</i>	176.28	67.1						
	<i>S. aureus</i>	175.42	61.5						
Μεταφορά βακτηρίου/GO	<i>E. coli</i>	190.01	32.8	+9.8	-66.6				
	<i>E. faecalis</i>	187.54	36.1	+6.4	-46.2				
	<i>S. aureus</i>	182.33	52.7	+3.9	-14.3				
Συμμεταφορά βακτηρίων	<i>E. coli</i>	188.35	100.3			+8.8	+2.1		
	<i>E. faecalis</i>	190.33	64.8			+8.0	-3.4		
	<i>S. aureus</i>	182.22	68.3			+3.9	+11.1		
Συμμεταφορά βακτηρίων/GO	<i>E. coli</i>	182.69	55.3	-3.0	-44.9			-3.9	+68.6
	<i>E. faecalis</i>	192.29	44.5	+1.0	-31.3			+2.5	+23.3
	<i>S. aureus</i>	180.40	46.1	-1.0	-32.5			-1.1	-12.5

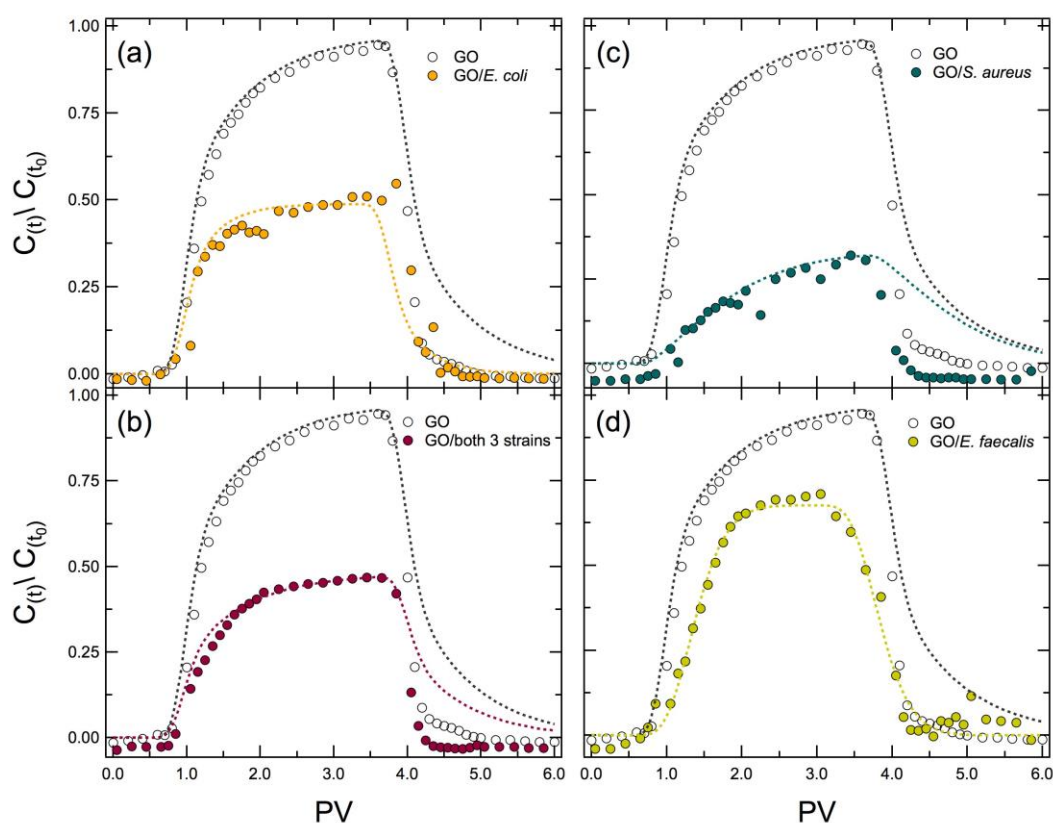


Γράφημα 4.3: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς των βακτηρίων *E. coli* (a), *E. faecalis* (b) και *S. aureus* (c).

Στον Πίνακα 4.3 συνοψίζονται όλες οι παρατηρούμενες ποσοστιαίες μεταβολές που προαναφέρθηκαν για κάθε βακτήριο και στα Γραφήματα 4.3(a-c) παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε μικροοργανισμό σε κάθε πειραματική περίπτωση. Από τα παραπάνω γραφήματα, καθίσταται εμφανές ότι η παρουσία νανοςωματιδίων GO έχει μικρότερη επίδραση στη μεταφορά του *S. aureus*, ενώ δύναται να επηρεάσει περισσότερο τη μεταφορά και συμμεταφορά του *E. coli* και του *E. faecalis* σε όλες τις εξεταζόμενες πειραματικές περιπτώσεις. Η συμμεταφορά των βακτηρίων φαίνεται ότι ευνοεί περισσότερο την μεταφορά και επιβίωση του *S. aureus*.

## 4.2 Επίδραση βακτηρίων στη μεταφορά των νανοσωματιδίων GO

Προκειμένου να εξαχθεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα αναφορικά με την αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και των νανοσωματιδίων GO, κατασκευάστηκαν καμπύλες μεταφοράς του εναιωρήματος GO, βάσει των δεδομένων κανονικοποιημένης συγκέντρωσης των νανοσωματιδίων, που προέκυψαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς. Η καμπύλη αναφοράς για το GO κατασκευάστηκε βάσει των δεδομένων συγκέντρωσης που λήφθηκαν από το πείραμα μεμονωμένης μεταφοράς του εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO στη κορεσμένη στήλη. Η εν λόγω καμπύλη αναφοράς μοντελοποιήθηκε βάσει του λογισμικού ColloidFit (Katzourakis and Chrysikopoulos, 2017), εφαρμόζοντας την λύση της μερικής διαφορικής εξίσωσης (3.2.1).



Γράφημα 4.4: Πειραματικά δεδομένα κανονικοποιημένων συγκέντρωσεων (σύμβολα) για το εναιωρήμα νανοσωματιδίων GO κατά την ταυτόχρονη μεταφορά του *E. coli* (a), του εναιωρήματος των τριών βακτηρίων (b), του *S. aureus* (c), και του *E. faecalis* (d) στη κορεσμένη στήλη. Σε κάθε γράφημα εμφανίζεται η καμπύλη αναφοράς για τη μεμονωμένη μεταφορά του εναιωρήματος σε συνδυασμό με τις προσαρμοσμένες προβλέψεις του μαθηματικού μοντέλου (ασυνεχής, γκρι καμπύλη).

Στο Γραφήματα 4.3(a-d), παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο μεταβάλλεται η καμπύλη συγκέντρωσης του εναιωρήματος GO κατά την ταυτόχρονη διέλευση μικροβιακών εναιωρημάτων *E. coli* (a), *E. faecalis* (d), *S. aureus* (c) και κατά την συμμεταφορά του τριπλού μικροβιακού εναιωρήματος (b) (δηλ. παρουσία και των τριών βακτηρίων εντός της στήλης). Πρέπει να σημειωθεί ότι, όπως και στις

περιπτώσεις των βακτηρίων, δεν πραγματοποιήθηκε προσομοίωση των πειραματικών αποτελεσμάτων, για την περιγραφή της μεταφοράς των νανοσωματιδίων GO, κατά την ταυτόχρονη διέλευση βακτηρίων στη στήλη. Συνεπώς, οι ασυνεχείς καμπύλες των Γραφημάτων 4.3(a-d) υποδεικνύουν απλά μια μέση τάση που μπόρεσε να εξαχθεί, βάσει των πειραματικών και μόνο τιμών, αναφορικά με την κίνηση των νανοσωματιδίων υπό την επίδραση των βακτηριακών εναιωρημάτων.

**Πίνακας 4.4:** Υπολογισμένες τιμές παραμέτρων πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO κατά την παρουσία και απουσία βακτηρίων στη κορεσμένη στήλη.

Πείραμα μεταφοράς/συμμεταφοράς	C <sub>0</sub> [mg/L]	U <sub>x</sub> [cm/min]	θ [-]	ρ <sub>b</sub> [g/cm <sup>3</sup> ]	q [cm/min]	t <sub>d</sub> [min]	M <sub>r</sub> [%]
GO	19.7	0.43	0.38	1.71	0.16	185.51	83.1
GO/ <i>E. coli</i>	21.9	0.41	0.39	1.74	0.16	185.82	48.5
GO/ <i>E. faecalis</i>	20.2	0.41	0.40	1.76	0.17	194.44	68.8
GO/ <i>S. aureus</i>	22.1	0.40	0.41	1.74	0.16	178.79	16.1
GO/ <i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i>	21.1	0.40	0.41	1.73	0.16	185.08	36.4

Στον Πίνακα 4.4 παρουσιάζονται τα ποσοστά ανάκτησης μάζας εκροής για το εναιώρημα νανοσωματιδίων GO, καθώς και οι μέσοι χρόνοι παραμονής των νανοσωματιδίων εντός της πειραματικής στήλης. Οι τιμές αυτές προέκυψαν μέσω του λογισμικού ColloidFit με στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων και των σχηματιζόμενων καμπυλών μεταφοράς, που προέκυψαν σε κάθε πειραματική περίπτωση.

Βάσει των αποτελεσμάτων, παρατηρείται ότι η συγκράτηση των νανοσωματιδίων GO στη στήλη αυξάνεται υπό την παρουσία βακτηρίων. Μάλιστα, μεγιστοποιείται κατά την ταυτόχρονη παρουσία του βακτηρίου *S. aureus*. Πιο συγκεκριμένα, υπό την ταυτοχρονή μεταφορά του *S. aureus*, το ποσοστό ανακτώμενης μάζας των νανοσωματιδίων GO μειώθηκε κατά 80.6 % σε σχέση με το αντίστοιχο ποσοστό ανάκτησης που προέκυψε κατά τη μεμονωμένη μεταφορά του ίδιου εναιωρήματος στο κορεσμένο πορώδες μέσο. Τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης της μάζας των ανακτώμενων νανοσωματιδίων GO κατά τη διέλευση των μικροβιακών εναιωρημάτων του *E. coli* και του *E. faecalis* ήταν 41.6 % και 17.2 %.

Άρα, είναι εμφανές ότι μεταξύ των τριών βακτηρίων, το *E. faecalis* επηρεάζει σε μικρότερο βαθμό τη μεταφορά και τη συγκράτηση των νανοσωματιδίων GO. Στην περίπτωση μεταφοράς του εναιωρήματος, υπό την ταυτόχρονη συμμεταφορά των τριών βακτηρίων, παρατηρήθηκε ανάκτηση μάζας νανοσωματιδίων σε ποσοστό 36.4 %, δηλαδή η ανάκτηση μειώθηκε κατά 56.2 % σε σχέση με την περίπτωση μεμονωμένης μεταφοράς του εναιωρήματος νανοσωματιδίων. Όσον αφορά στους

χρόνους παραμονής, οι διαφοροποιήσεις ήταν μικρές της τάξης του 0.2 - 5.0 %. Η παραμονή των νανοσωματιδίων στη στήλη αυξήθηκε κατά 4.8% στην περίπτωση παρουσίας του *E. faecalis*, ενώ μειώθηκε κατά 3.6 % στη περίπτωση παρουσίας του *S. aureus*. Αντίθετα, τόσο κατά την παρουσία του *E. coli* όσο και κατά την ταυτόχρονη παρουσία των τριών βακτηριακών ειδών εντός της στήλης, ο χρόνος παραμονής των νανοσωματιδίων δεν φαίνεται να επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό.

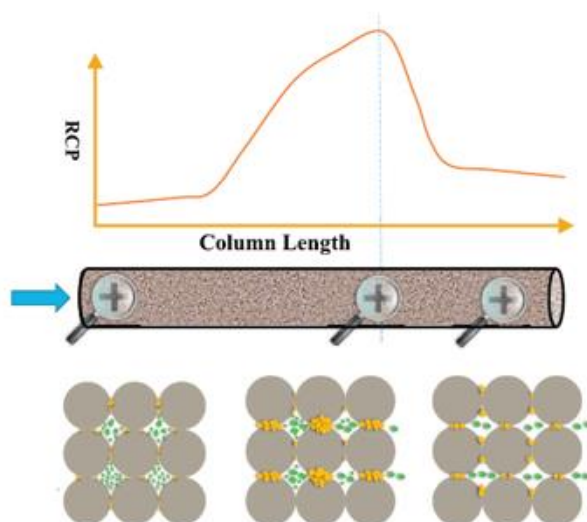
**Πίνακας 4.5:** Ποσοστιαίες μεταβολές των μέσων χρόνων παραμονής και των ανακτώμενων μαζών νανοσωματιδίων GO στην εκροή της στήλης κατά την ταυτόχρονη διέλευση μικροοβιακών εναιωρημάτων διαμέσου του πορέδες μέσου.

Πείραμα μεταφοράς/συμμεταφοράς	$t_d$ [min]	$M_r$ [%]	% Μεταβολή, κατά τη ταυτόχρονη διέλευση μικροοβιακού εναιωρήματος ενός είδους βακτηρίου		% Μεταβολή, κατά τη ταυτόχρονη διέλευση του εναιωρήματος των 3 βακτηριακών ειδών	
			$t_d$	$M_r$	$t_d$	$M_r$
<b>GO</b>	185.51	83.1				
<b>GO/<i>E. coli</i></b>	185.82	48.5	+0.2	-41.6		
<b>GO/<i>E. faecalis</i></b>	194.44	68.8	+4.8	-17.2		
<b>GO/<i>S. aureus</i></b>	178.79	16.1	-3.6	-80.6		
<b>GO/<i>E. coli</i>/<i>E. faecalis</i>/<i>S. aureus</i></b>	185.08	36.4			-0.2	56.2

#### ➤ Σχολιασμός αποτελεσμάτων προσομοίωσης μεταφοράς νανοσωματιδίων

Από το αποτέλεσμα της προσομοίωσης (γκρί ασυνεχής καμπύλη) παρατηρείται αστοχία του μοντέλου να περιγράψει επιτυχώς τα πειραματικά δεδομένα μεταφοράς του εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO. Αξίζει να τονισθεί ότι το μοντέλο που μεταφοράς που χρησιμοποιήθηκε λαμβάνει υπόψη μόνο τις διεργασίες αντιστρέψιμης προσκόλλησης και αποκόλληση των σωματιδίων στη στερεά μήτρα, καθώς και την περίπτωση μη αντιστρέψιμης προσκόλλησης. Η μορφή των πειραματικά εξαγόμενων καμπυλών μεταφοράς για το εναιωρήμα νανοσωματιδίων GO, που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη, έχει παρατηρηθεί και σε πλήθος άλλων δημοσιευμένων μελετών υπό την επίδραση αντίστοιχων πειραματικών συνθηκών (Kasel et al., 2013; Sun et al., 2015; Han et al., 2016; Babakhani et al., 2017; Chrysikopoulos et al., 2017; Dong et al., 2017; Wang et al., 2018). Πιο συγκεκριμένα, όλα τα εξαγόμενα προφίλ συγκράτησης που προέκυψαν βάσει των πειραματικών δεδομένων ήταν μη-μονοτονικά (non-monotonic retention profiles) και στις καμπύλες μεταφοράς του διηθούμενου εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO, τόσο κατά την παρουσία όσο και κατά την απουσία βακτηριακών αιωρημάτων, εμφανίστηκε έντονη ασυμμετρία.

Η μορφή των σχηματιζόμενων καπυλών μεταφοράς των νανοσωματιδίων GO της παρούσας εργασίας μοιάζει με αυτή της Εικόνα 4.1. Τα δεδομένα δείχνουν ότι η συσγκέντρωση των νανοσωματιδίων αυξάνει διαρκώς εντός της στήλης, και μετά από τα 4 PV αρχίζει να μειώνεται απότομα. Βάσει πορισμάτων προηγούμενων μελετών, η συγκεκριμένη συμπεριφορά υποδεικνύει έντονη τάση αντιστρέψιμης, ή/και μη, προσκόλλησης των νανοσωματιδίων στην άμμο, καθώς και την ενδεχόμενη ταυτόχρονη δράση μηχανισμών όπως η παρεμποδιζόμενη συγκράτηση (straining) και η μηχανική διήθηση σε περιπτώσεις εκδηλώσης φαινόμενων ομοσυσσωμάτωσης ή/και ετεροσυσσωμάτωσης. Το εφαρμοζόμενο μοντέλο δεν λαμβάνει υπόψη την ταυτόχρονη επενέργεια τέτοιου είδους μηχανισμών και φαινομένων με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς.



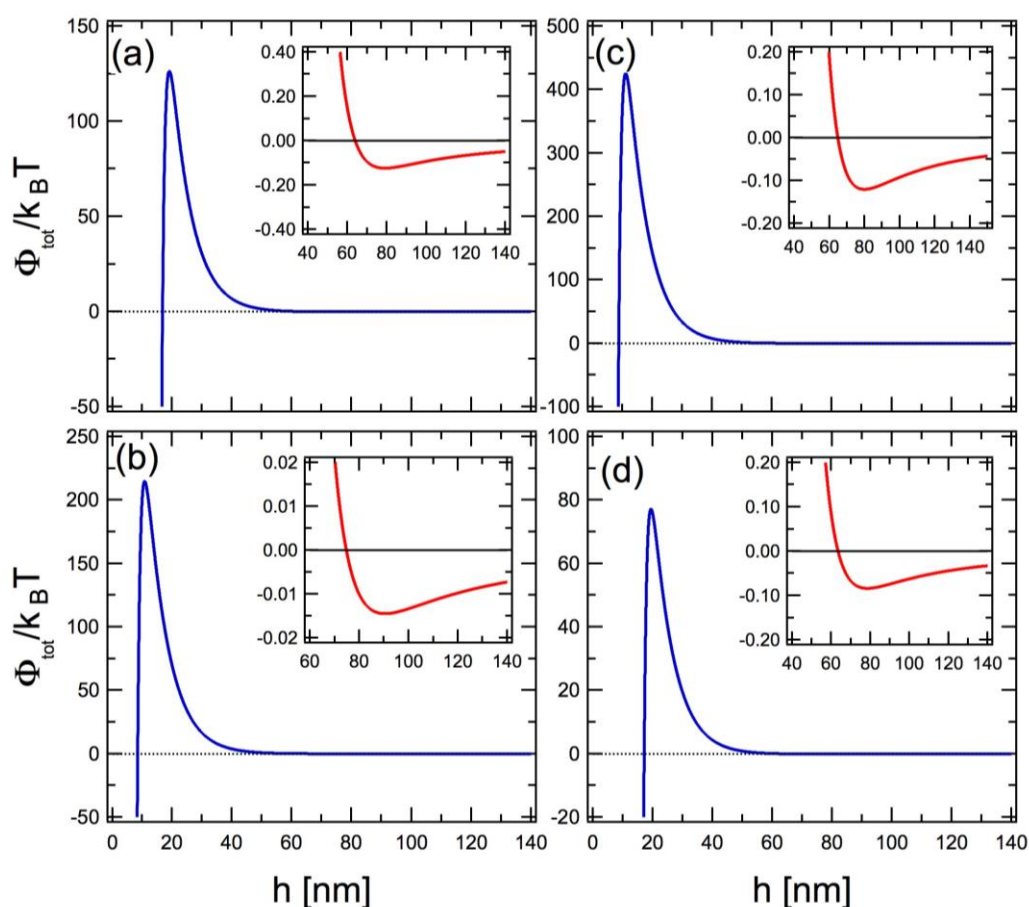
Εικόνα 4.1: Περίπτωση εμφάνισης ασυμμετρίας στο εξαγόμενο προφίλ συγκράτησης διηθούμενου κολλοειδούς διαλύματος. Τα κινητά σωματίδια / συσσωματώματα παρουσιάζονται σε πράσινο, ενώ τα συγκρατούμενα σωματίδια / συσσωματώματα παρουσιάζονται σε κιτρινωπό καφέ χρώμα (Babakhani et al., 2017).

#### 4.3 Αποτελέσματα διασωματιδιακών και διεπιφανειακών αλληλεπιδράσεων με εφαρμογή XDLVO θεωρίας

Η μελέτη των εξαγόμενων προφίλ συγκράτησης και μεταφοράς των βιοκολλοειδών και των νανοσωματιδίων GO, δεν επαρκεί για την κατανόηση των αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται μεταξύ των εν λόγω σωματιδίων, καθώς και κατά την επαφή τους με τους κόκκους της άμμου. Για τον λόγο αυτό στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε υπολογισμός των ενεργειών διεπιφανειακού και διασωματιδιακού δυναμικού,  $\Phi_{vdw}$ ,  $\Phi_{dl}$ ,  $\Phi_{Born}$ , και  $\Phi_{AB}$ , για όλες τις δυνατές περιπτώσεις αλληλεπιδράσεων μεταξύ εξεταζόμενων σωματιδίων και σωματιδίων – άμμου, με σκοπό να προβλεφθεί η δυνητική τάση ομοσυσσωμάτωσης και ετεροσυσσωμάτωσης. Όπως αναλύθηκε και στην Παράγραφο 3.4 αλληλεπιδράσεις ομοσυσσωμάτωσης και ετεροσυσσωμάτωσης βακτηρίου – βακτηρίου, βακτηρίου –

GO και GO – GO, αντιμετωπίστηκαν ως αλληλεπιδράσεις σφαίρας – σφαίρας, ενώ οι αλληλεπιδράσεις των βακτηρίων και του GO με τη χαλαζιακή άμμο, θεωρήθηκαν ως αλληλεπιδράσεις σφαίρας – επιφάνειας, λόγω του ότι τα μεγέθη των εξεταζόμενων βιοκολοειδών και των νανοσωματιδίων GO ήταν αρκετά μικρότερα από το μέγεθος των κόκκων της άμμου.

➤ **Ετεροσυσσωμάτωση για την περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας-επιφάνειας**

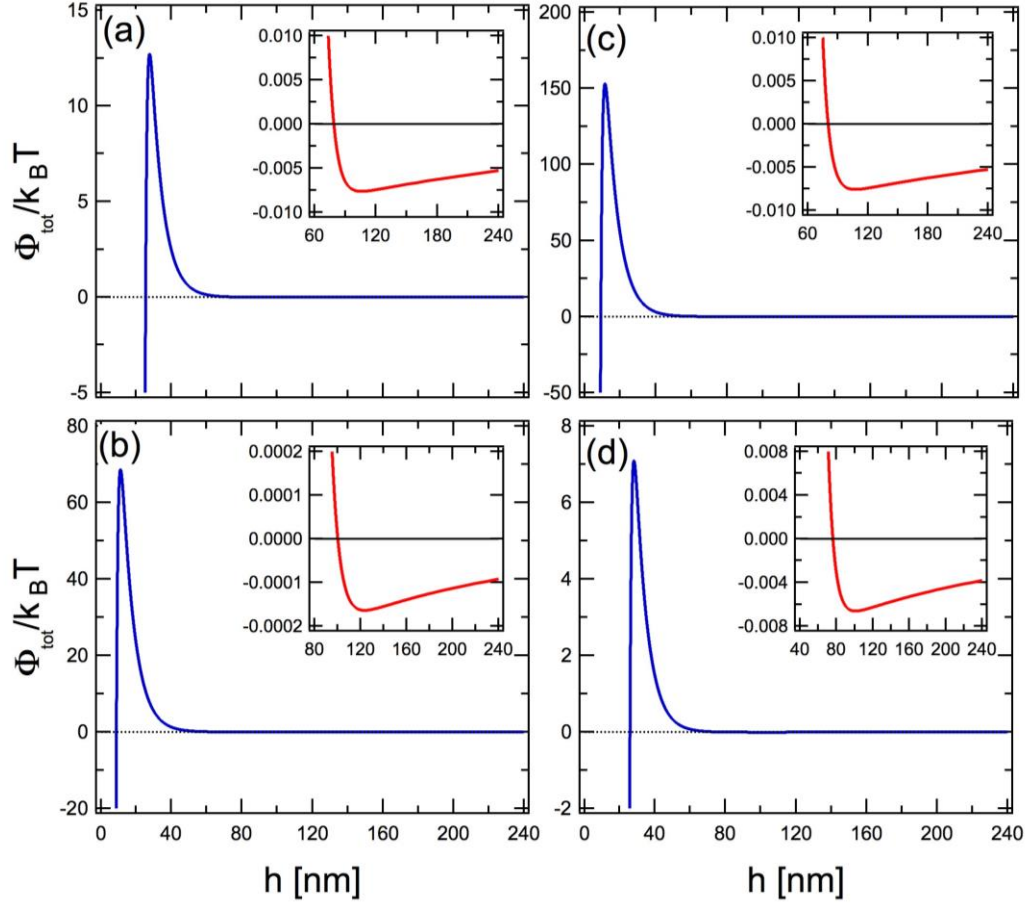


Γράφημα 4.5: Προβλεπόμενα συνολικά ενεργειακά προφίλ, βάσει XDLVO θεωρίας, για αλληλεπίδραση μεταξύ: (a) άμμου - *E. coli*, (b) άμμου - GO, (c) άμμου - *E. faecalis* και (d) άμμου - *S. aureus*, ως συνάρτηση της απόστασης διαχωρισμού για τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (δηλ.  $I_s$  2mM, pH 7). Κάθε ένθετο γράφημα επισημαίνει τα αντίστοιχα δευτεροταγή ελάχιστα ενέργειας ( $\Phi_{min2}$ ).

Στο Γράφημα 4.5 παρουσιάζονται τα προβλεπόμενα προφίλ συνολικής ενέργειας αλληλεπίδρασης, βάσει της εκτεταμένης DLVO θεωρίας, όπως προέκυψαν για την περίπτωση ετεροσυσσωμάτωσης μεταξύ κάθε εξεταζόμενου σωματιδίου και του συλλέκτη (άμμου). Τα συγκεκριμένα προφίλ κατασκευάστηκαν, για κάθε περίπτωση αλληλεπιδρώντος συστήματος, με χρήση των εξισώσεων (3.4.2), (3.4.5), (3.4.7), (3.4.13) και (3.4.14), αντικαθιστώντας σε αυτές τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων που συνοψίζονται στους Πίνακες 3.1, Πίνακας 3.2 και Πίνακας 3.3.



➤ Ομοσυσσωμάτωση για την περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας-σφαίρας

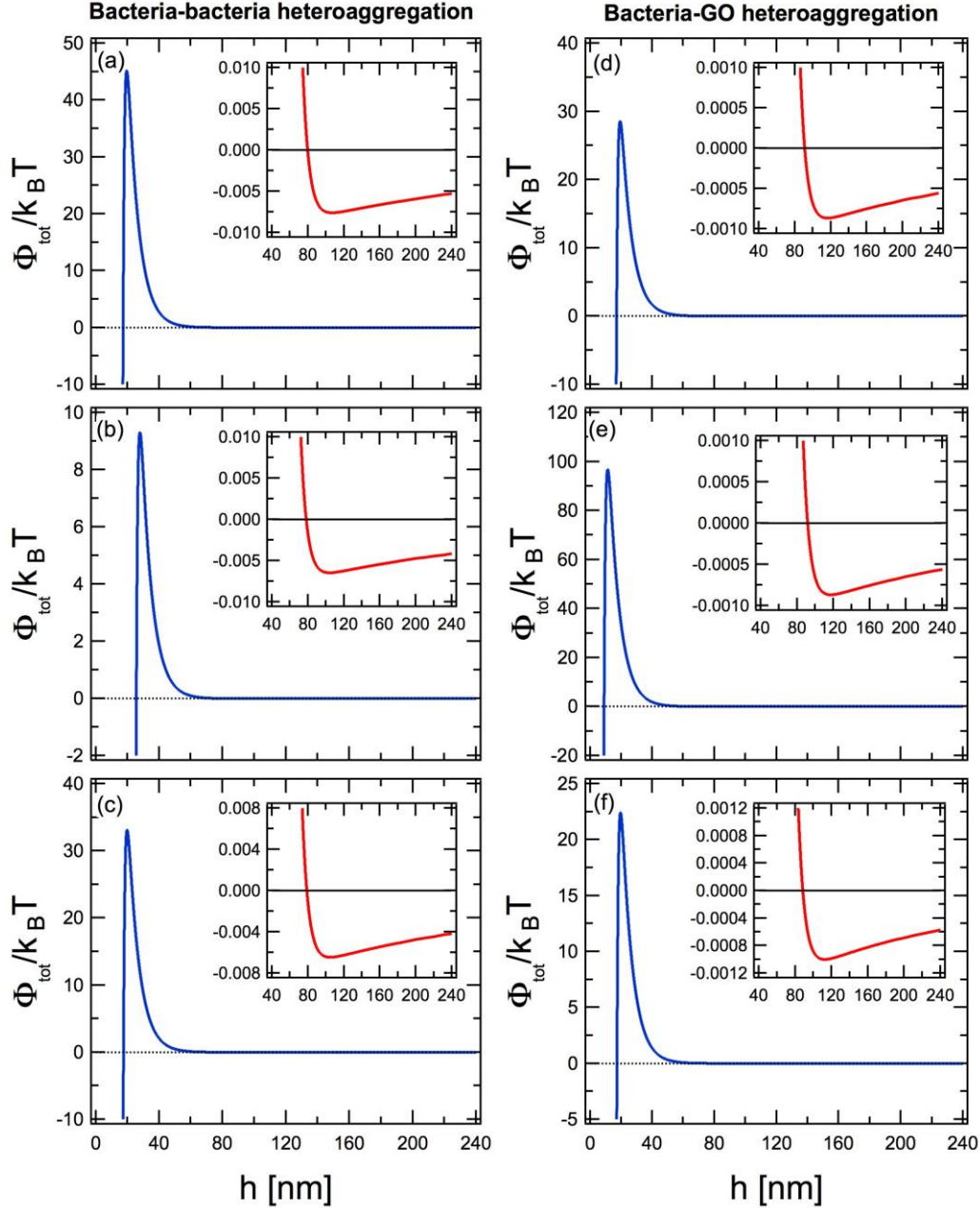


Γράφημα 4.6: Προβλεπόμενα συνολικά ενεργειακά προφίλ, βάσει XDLVO θεωρίας, για αλληλεπίδραση μεταξύ: (a) *E. coli* - *E. coli*, (b) GO - GO, (c) *E. faecalis* - *E. faecalis* και (d) *S. aureus* - *S. aureus*, ως συνάρτηση της απόστασης διαχωρισμού για τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (δηλ.  $I_s$  2mM, pH 7). Κάθε ένθετο γράφημα επισημαίνει τα αντίστοιχα δευτεροταγή ελάχιστα ενέργειας ( $\Phi_{\min2}$ ).

Στο Γράφημα 4.6 παρουσιάζονται τα προβλεπόμενα προφίλ συνολικής ενέργειας αλληλεπίδρασης, βάσει της εκτεταμένης DLVO θεωρίας, όπως προέκυψαν για την περίπτωση ομοσυσσωμάτωσης μεταξύ σωματιδίων ίδιου είδους. Τα συγκεκριμένα προφίλ κατασκευάστηκαν, για κάθε περίπτωση αλληλεπιδρώντος συστήματος, με χρήση των εξισώσεων (3.4.8), (3.4.11), (3.4.12), (3.4.13) και (3.4.15), αντικαθιστώντας σε αυτές τις αντίστοιχες τιμές των παραμέτρων που συνοψίζονται στους Πίνακες 3.1, Πίνακας 3.2 και Πίνακας 3.3.



➤ Ετεροσυσσωμάτωση για την περίπτωση αλληλεπίδρασης σφαίρας-σφαίρας



Γράφημα 4.7: (Αριστερή) Προβλεπόμενα συνολικά ενεργειακά προφίλ, βάσει XDLVO θεωρίας, για αλληλεπίδραση μεταξύ: (a) *E. coli* - *E. faecalis*, (b) *E. coli* - *S. aureus*, (c) *S. aureus* - *E. faecalis*, ως συνάρτηση της απόστασης διαχωρισμού. (Δεξιά) Προβλεπόμενα συνολικά ενεργειακά προφίλ, βάσει XDLVO θεωρίας, για αλληλεπίδραση μεταξύ: (d) *E. coli* - GO, (e) *E. faecalis* - GO, (f) *S. aureus* - GO, ως συνάρτηση της απόστασης διαχωρισμού. Κάθε ένθετο γράφημα επισημαίνει τα αντίστοιχα δευτεροταγή ελάχιστα ενέργειας ( $\Phi_{min2}$ ).

Η αριστερή στήλη στο Γράφημα 4.7 παρουσιάζει τα αποτελέσματα για τα προβλεπόμενα προφίλ συνολικής ενέργειας αλληλεπίδρασης, βάσει της εκτεταμένης DLVO θεωρίας, όπως προέκυψαν για την περίπτωση ετεροσυσσωμάτωσης μεταξύ βακτηρίων. Στην δεξιά στήλη του ίδιου γραφήματος παρουσιάζονται τα

προβλεπόμενα προφίλ συνολικής ενέργειας αλληλεπίδρασης, βάσει της εκτεταμένης DLVO θεωρίας, όπως προέκυψαν για την περίπτωση ετεροσυσσωμάτωσης μεταξύ των νανοσωματιδίων GO και των τριών διαφορετικών βακτηριακών ειδών.

Πίνακας 4.6: Υπολογισθείσες τιμές  $\Phi_{\max 1}$ ,  $\Phi_{\min 1}$ , and  $\Phi_{\min 2}$ , όλων των πιθανών συστημάτων αλληλεπίδρασης, με χρήση της θεωρία XDLVO για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (μέσο διασποράς διάλυμα PBS, pH=7,  $I_s=2$  mM).

	Συνθήκες pH, I <sub>s</sub> [mM]	h [nm]	Φ <sub>min1</sub> [k <sub>B</sub> T]	h [nm]	Φ <sub>max1</sub> [k <sub>B</sub> T]	h [nm]	Φ <sub>min2</sub> [k <sub>B</sub> T]
Ετεροσυσσωμάτωση	Αλληλεπίδραση Σφαίρα – Επιφάνεια						
	GO-Quartz sand						
	7, 2	-	n.d. <sup>5</sup>	10.93	214.70	90.43	-1.448 x 10 <sup>-2</sup>
	E. coli-Quartz sand						
	7, 2	-	n.d.	19.20	126.30	79.00	-1.239 x 10 <sup>-1</sup>
	E. faecalis-Quartz sand						
	7, 2	-	n.d.	11.17	425.60	79.93	-1.205 x 10 <sup>-1</sup>
	S. aureus-Quartz sand						
	7, 2	-	n.d.	19.41	77.14	78.47	-8.392 x 10 <sup>-2</sup>
Ομοσυσσωμάτωση	Αλληλεπίδραση Σφαίρα – Σφαίρα						
	GO-GO						
	7, 2	-	n.d.	11.23	68.60	123.55	-1.639 x 10 <sup>-4</sup>
	E. coli- E. coli						
	7, 2	-	n.d.	27.73	12.71	106.07	-7.633 x 10 <sup>-3</sup>
	E. faecalis- E. faecalis						
	7, 2	-	n.d.	11.61	153.00	107.43	-7.583 x 10 <sup>-3</sup>
	S. aureus- S. aureus						
	7, 2	-	n.d.	28.19	7.093	100.89	-6.625 x 10 <sup>-3</sup>
Ετεροσυσσωμάτωση μεταξύ βακτηρίων	Αλληλεπίδραση Σφαίρα – Σφαίρα						
	E. coli- E. faecalis						
	7, 2	-	n.d.	19.63	45.11	106.75	-7.608 x 10 <sup>-3</sup>
	E. coli- S. aureus						
	7, 2	-	n.d.	27.95	9.308	104.09	-6.467 x 10 <sup>-3</sup>
	E. faecalis-S. aureus						
	7, 2	-	n.d.	19.85	33.08	104.75	-6.465 x 10 <sup>-3</sup>
Ετεροσυσσωμάτωση βακτηρίων & GO	Αλληλεπίδραση Σφαίρα – Σφαίρα						
	GO- E. coli						
	7, 2	-	n.d.	19.43	28.55	116.41	-8.670 x 10 <sup>-4</sup>
	GO- E. faecalis						
	7, 2	-	n.d.	11.41	97.61	117.07	-8.685 x 10 <sup>-4</sup>
	GO- S. aureus						
	7, 2	-	n.d.	19.65	22.40	112.45	-1.001 x 10 <sup>-3</sup>

<sup>5</sup> n.d. : Not detected

Πίνακας 4.7: Υπολογισθείσες τιμές  $\Phi_{AB(h=h_0)}$ , όλων των πιθανών συστημάτων αλληλεπίδρασης, με χρήση της θεωρίας XDLVO για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες (μέσο διασποράς διάλυμα PBS, pH=7,  $I_s=2$  mM).

Αλληλεπιδρόν σύστημα		$\Phi_{AB(h=h_0)}$ [J/m <sup>2</sup> ]
Ετεροσυσσωμάτωση σωματιδίων/άμμου	GO - Quartz sand	-3.465
	<i>E. coli</i> - Quartz sand	-4.231 x 10 <sup>3</sup>
	<i>E. faecalis</i> - Quartz sand	-4.472
	<i>S. aureus</i> - Quartz sand	-4.876 x 10 <sup>3</sup>
Ομοσυσσωμάτωση μεταξύ σωματιδίων	GO - GO	-3.007
	<i>E. coli</i> - <i>E. coli</i>	-4.485 x 10 <sup>6</sup>
	<i>E. faecalis</i> - <i>E. faecalis</i>	-5.008
	<i>S. aureus</i> - <i>S. aureus</i>	-5.954 x 10 <sup>6</sup>
Ετεροσυσσωμάτωση μεταξύ βακτηρίων	<i>E. coli</i> - <i>E. faecalis</i>	-4.739 x 10 <sup>3</sup>
	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i>	-5.168 x 10 <sup>6</sup>
	<i>E. faecalis</i> - <i>S. aureus</i>	-5,460 x 10 <sup>3</sup>
Ετεροσυσσωμάτωση βακτηρίων/GO	GO - <i>E. coli</i>	-3.672 x 10 <sup>3</sup>
	GO - <i>E. faecalis</i>	-3.880
	GO - <i>S. aureus</i>	-4.231 x 10 <sup>3</sup>

Στον Πίνακα 4.6 συνοψίζονται, για όλα τα πιθανά συστήματα αλληλεπίδρασης, οι τιμές ενέργειας διεπιφανειακού δυναμικού, που υπολογίστηκαν στα σημεία εμφάνισης του πρωτοταγούς μέγιστου ( $\Phi_{\max1}$ ) και δευτεροταγούς ελαχίστου ( $\Phi_{\min2}$ ) κανονικοποιημένες ως προς τη θερμική ενέργεια (γινόμενο  $k_B T = 4.14 \times 10^{-21}$  J). Βάσει της ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε στην Παράγραφο 1.1.2, στο σημείο εμφάνισης του  $\Phi_{\max1}$ , εμφανίζεται ενεργειακός φραγμός και η απωστική ενέργεια μεταξύ των σωματιδίων ή/και μεταξύ των σωματιδίων και των κόκκων της άμμου μεγιστοποιείται, ενώ στο σημείο εμφάνισης του  $\Phi_{\min2}$  μεγιστοποιείται εκ νέου η ελκτική ενέργεια μεταξύ των αλληλεπιδρώντων συστημάτων. Στον Πίνακα 4.7 συνοψίζονται οι τιμές ελεύθερης ενέργειας οξέος-βάσης κατά Lewis ( $\Phi_{AB(h=h_0)}$ ) για αλληλεπίδραση μεταξύ δύο σωματιδίων ή επιφανειών στο σημείο επαφής τους,  $h_0$  (δηλ. στο σημείο ελάχιστης απόστασης διαχωρισμού).

Παρατηρώντας το Γράφημα 4.5 διαπιστώνεται ότι, για τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, οι ενέργειες αλληλεπίδρασης σε περίπτωση ετεροσυσσωμάτωσης μεταξύ άμμου και νανοσωματιδίων GO, καθώς και μεταξύ άμμου και βακτηρίων ήταν εξαιρετικά απωθητικές για σχετικά μεγάλες αποστάσεις διαχωρισμού. Πιο συγκεκριμένα, τα νανοσωματίδια GO και τα βακτήρια κατά την αλληλεπίδραση με άμμο εμφάνισαν ενεργειακούς φραγμούς  $\Phi_{\max1} = 214.70$  και  $77.14 - 425.60$   $k_B T$ , αντίστοιχα. Συνεπώς, είναι σχεδόν αδύνατο τόσο για τα νανοσωματίδια GO, όσο και για βακτήρια να ξεπεράσουν το εμφανιζόμενο ενεργειακό φράγμα  $\Phi_{\max1}$  και να προσκολληθούν στις επιφάνειες άμμου σε βαθιά πρωτοταγή ελάχιστα,  $\Phi_{\min1}$ .

Άρα, σε μικρές αποστάσεις διαχωρισμού τα υπό μελέτη διεσπαρμένα κολλοειδή σωματίδια δεν εμφανίζουν τάση σύζευξης με την επιφάνεια της άμμου. Παρόλα αυτά,

σε αποστάσεις διαχωρισμού μεγαλύτερες των 78 nm, παρατηρείται η εμφάνιση ενός δευτεροταγούς ελαχίστου  $\Phi_{\min 2}$ . Η ύπαρξη του  $\Phi_{\min 2}$  υποδηλώνει τη δυνατότητα εύκολα αντιστρέψιμης προσκόλλησης (unfavorable attachment) των εξεταζόμενων κολλοειδών σωματιδίων στην άμμο. Παρόμοια προφίλ ενεργειακής αλληλεπίδρασης μεταξύ χαλαζιακής άμμου και νανοσωματιδίων GO και χαλαζιακής άμμου και βακτηρίων σε διαλύματα PBS χαμηλής ιοντικής ισχύος και ουδέτερου pH έχουν αναφερθεί και σε άλλες δημοσιευμένες μελέτες (Chrysikopoulos and Syngouna, 2012; Chrysikopoulos et al., 2017; Zhong et al., 2017).

Κατά την αλληλεπίδραση μεταξύ των σωματιδίων και της άμμου στο σημείο ελάχιστης απόστασης διαχωρισμού, προέκυψαν περισσότερο αρνητικές τιμές ελεύθερης ενέργειας οξέος-βάσης κατά Lewis ( $\Phi_{AB,(h=h_0)}$ ) στην περίπτωση του *E. coli* και του *S. aureus*, και λιγότερο αρνητικές στην περίπτωση του *E. faecalis* και του GO (δείτε αντίστοιχες τιμές

Πίνακας 4.7). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι τα *E. coli* και *S. aureus* εμφανίζουν μεγαλύτερη πιθανότητα εναπόθεσης στην επιφάνεια της άμμου, λόγω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης, συγκριτικά με τα άλλα δύο σωματίδια.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν αναφορικά με την τάση ομοσυσσωμάτωσης των εξεταζόμενων βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO παρουσιάζονται στο Γράφημα 4.6. Υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες το *E. faecalis* και τα νανοσωματίδια GO δεν αναμένεται να εκδηλώσουν φαινόμενα ομοσυσσωμάτωσης, λόγω υψηλών ενεργειακών φραγμάτων ( $\Phi_{\max 1} = 87.64$  και  $\Phi_{\max 1} = 176$  kBT, αντίστοιχα). Συνεπώς, τα εναιωρήματα των συγκεκριμένων σωματιδίων εμφανίζουν σταθερότητα στις εξεταζόμενες πειραματικές συνθήκες. Αντίθετα, τα εναιωρήματα του *E. coli* και του *S. aureus* παρατηρείται ότι είναι πιο αποσταθεροποιημένα. Δεδομένων των χαμηλότερων τιμών ενεργειακών φραγμών που εμφανίστηκαν για τα δύο αυτά βιοκολλοειδή ( $\Phi_{\max 1} = 12.71$  και  $\Phi_{\max 1} = 7.093$  kBT) υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εκδήλωσης φαινομένου ομοσυσσωμάτωσης, υπό τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Η έντονη τάση ομοσυσσωμάτωσης που εμφανίζει το *S. aureus* είναι αναμενόμενη δεδομένου έχει παρατηρηθεί ότι εντός υδατικών εναιωρημάτων τα βακτηριακά του κύτταρα συχνά εφάπτονται σχηματίζοντας συστοιχίες αποικιών.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα αλληλεπίδρασης μεταξύ των βακτηρίων (Γράφημα 4.7 (a-c)), εξάγεται το συμπέρασμα ότι η πιθανότητα ετεροσυσσωμάτωσης είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση του αλληλεπιδρώντος ζευγούς *E. coli* – *S. aureus* (μικρότερος ενεργειακός φραγμός) και μικρότερη στις περιπτώσεις των αλληλεπιδρώντων συστημάτων *E. coli* – *E. faecalis* και *S. aureus* – *E. faecalis*.

Τέλος τα αποτελέσματα αλληλεπίδρασης μεταξύ νανοσωματιδίων GO και βακτηρίων (Γράφημα 4.7 (d-f)), υποδεικνύουν ότι τα εν λόγω νανοσωματίδια εκδηλώνουν μικρότερη τάση ετεροσυσσωμάτωσης με το *E. faecalis*, ενώ η πιθανότητα συσσωμάτωσής τους με τα άλλα δύο βακτήρια είναι μεγαλύτερη.

#### 4.4 Αποτελέσματα σύλληψης και διήθησης βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO

Για την εκτίμηση της ικανότητας σύλληψης των εξεταζόμενων βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων GO από το πληρωτικό υλικό της στήλης (χονδρόκοκκη άμμο) προσδιορίστηκαν ο αδιάστατος συντελεστής απόδοσης συγκρούσεων,  $\alpha$  [-], βάσει της σχέσης (3.5.1), ο αδιάστατος συνολικός συντελεστής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη για περίπτωση ευνοϊκής εναπόθεσης (ελκτικές αλληλεπιδράσεις),  $\eta_0$  [-], βάσει της σχέσης (3.5.5), καθώς και ο συντελεστής του ρυθμού προσκόλλησης  $k_d$  (forward rate or attachment rate) σε μονάδες [1/t], βάσει της σχέσης (3.5.3). Στον Πίνακα 4.8 παρουσιάζονται αναλυτικά οι τιμές των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για τους υπολογισμούς των  $\alpha$ ,  $\eta_0$  και  $k_d$  σε κάθε πειραματική περίπτωση. Λόγω του ότι η ιοντική ισχύς του διαλύματος PBS που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν πολύ μικρή, θεωρήθηκε ότι η πυκνότητα του και το ιξώδες του διαλύματος υποβάθρου ταυτίζονται με την πυκνότητα και το ιξώδες του νερού σε θερμοκρασία 25°C.

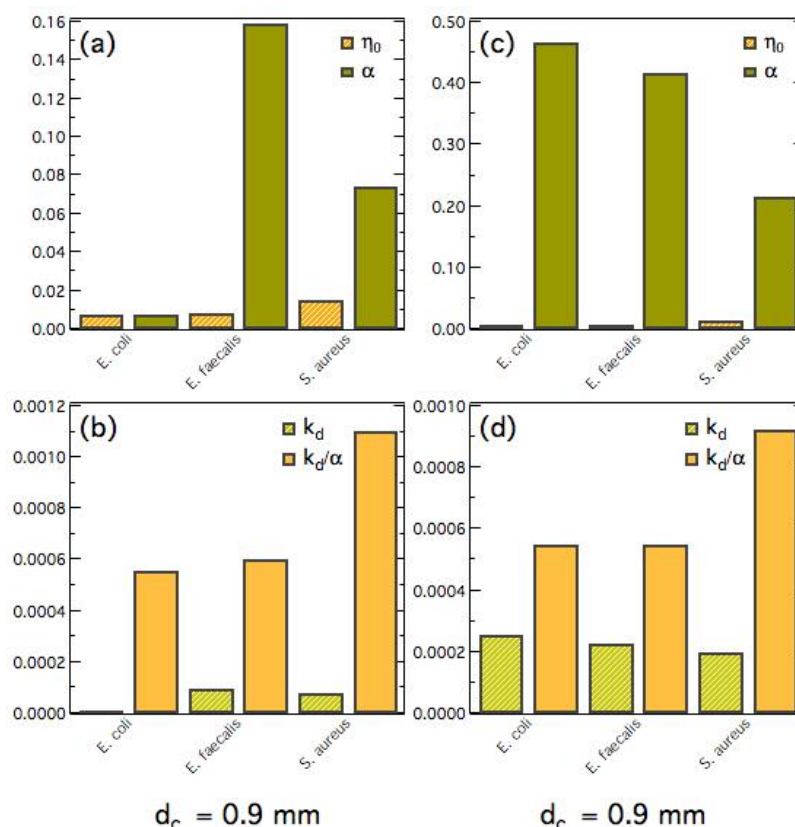
Πίνακας 4.8: Τιμές παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των  $\alpha$ ,  $\eta_0$  και  $k_d$

Παραδοχές	
T, [K]	298
Πυκνότητα νερού ( $\rho_f$ ), [kg/m <sup>3</sup> ]	999.7
Ιξώδες ( $\mu_w$ ), [Pa·s]=[kg/(m·s)]	$8.91 \times 10^{-4}$
Σταθερά Hamaker ( $A_{123}$ ) για το σύστημα βακτήριο-PBS-άμμος, [J]	$6.5 \times 10^{-21}$
Σταθερά Hamaker ( $A_{123}$ ) για το σύστημα GO-PBS-άμμος, [J]	$1.92 \times 10^{-21}$
Διάμετρος μοναδιαίου συλλέκτη/κόκκου ( $d_c$ ), [ $\mu$ m]	900
Μήκος στήλης (L), [m]	0.3
Διάμετροι σωματιδίων, $d_p$ [nm]	
<i>E. coli</i>	1090
<i>E. faecalis</i>	1082
<i>S. aureus</i>	730
GO	546
Πυκνότητα σωματιδίων, $\rho_p$ [kg/m <sup>3</sup> ]	
<i>E. coli</i>	1091
<i>E. faecalis</i>	1132
<i>S. aureus</i>	1693
GO	2200

Στον Πίνακα 4.9, παρουσιάζονται οι τιμές των συντελεστών  $\alpha$ ,  $\eta_0$  και  $k_d$  που προέκυψαν από τους υπολογισμούς. Για καλύτερη σύγκριση των αποτελεσμάτων και

ευκολότερη διεξαγωγή συμπερασμάτων, στα Γραφήματα 4.8, 4.9, 4.10 και 4.11 απεικονίζονται, υπό μορφή ραβδογραμμάτων, οι τιμές των παραμέτρων  $\alpha$ ,  $\eta_0$  και  $k_d$  που προσδιορίστηκαν για κάθε βακτήριο, καθώς και για τα νανοσωματίδια GO.

➤ **Τιμές συντελεστών βάσει των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μεμονωμένης μεταφοράς βακτηρίων, απουσία/παρουσία νανοσωματιδίων GO**

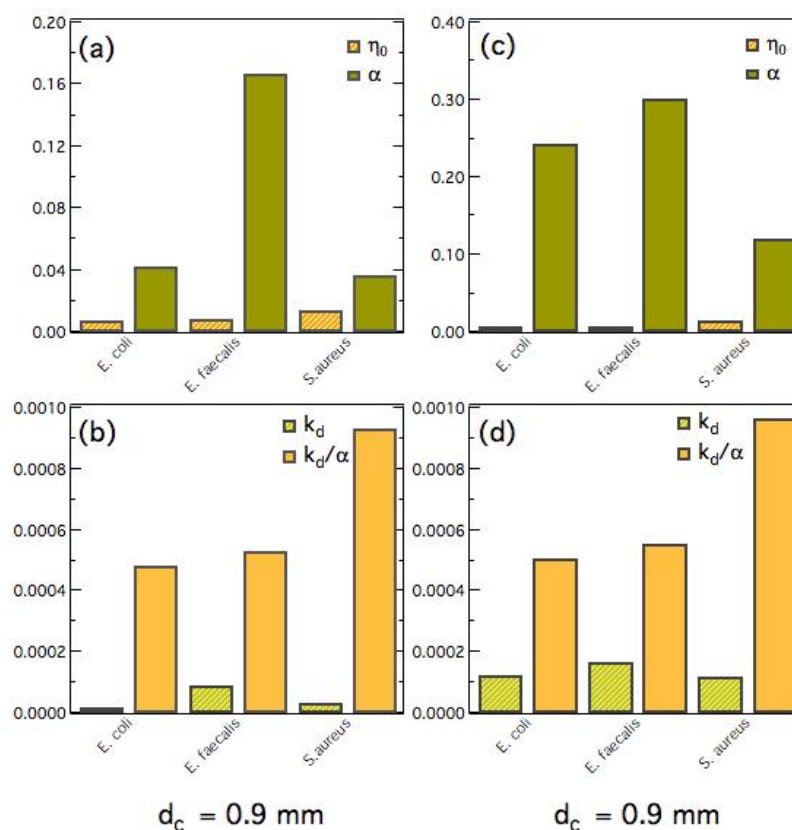


Γράφημα 4.8: (Αριστερά): (a) Απεικόνιση, υπό μορφή ραβδογραμμάτων, των τιμών των αδιάστατων συντελεστών απόδοσης συγκρούσεων ( $\alpha$ ) και συνολικής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη ( $\eta_0$ ), και (b) των τιμών του συντελεστή προσκόλλησης  $k_d$  [1/min] και του κανονικοποιημένου, ως προς τον συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων, συντελεστή προσκόλλησης  $k_d/\alpha$  [1/min], όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα μεμονωμένης μεταφοράς κάθε βακτηρίου, απουσία νανοσωματιδίων GO. (Δεξιά) Στα ραβδογράμματα (c) και (d) παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές των ίδιων συντελεστών, όπως προέκυψαν για κάθε βακτήριο υπό την ταυτόχρονη διέλευση αιωρήματος νανοσωματιδίων GO διαμέσου της στήλης.

Όσον αφορά στα πειράματα που εξετάστηκε η μεμονωμένη μεταφορά των βακτηρίων χωρίς ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO, παρατηρείται ότι για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες ευνοείται περισσότερο η εναπόθεση των *E. faecalis* και *S. aureus* στην άμμο. Ο συντελεστής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη ( $\eta_0$ ) για περίπτωση ευνοϊκής εναπόθεσης είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση του *S. aureus* σε σχέση με την τιμή που λαμβάνει στην περίπτωση αλληλεπίδρασης του *E. faecalis* με την άμμο. Ωστόσο, ο συντελεστής απόδοσης συγκρούσεων είναι μεγαλύτερος στην περίπτωση του *E. faecalis*, με αποτέλεσμα το *E. faecalis* να εκδηλώνει μεγαλύτερο ρυθμό προσκόλλησης στην άμμο.

Στην περίπτωση που η μεταφορά κάθε βακτηρίου πραγματοποιήθηκε με ταυτόχρονη διέλευση εναιωρήματος GO, παρατηρούνται διαφορετικά αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, κατά την παρουσία νανοσωματιδίων GO εμφανίζεται πολύ μεγάλη αύξηση του συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων για το βακτήριο *E. coli*, ενώ παρατηρείται μείωση του εν λόγω συντελεστή στην περίπτωση των δύο άλλων βακτηρίων. Παρόλα αυτά και στις τρεις περιπτώσεις βακτηρίων, κατά την παρουσία νανοσωματιδίων GO, αυξάνονται σημαντικά οι ρυθμοί προσκόλλησης τους στην άμμο, ενώ ευνοϊκότερη εναπόθεση παρατηρείται για το *E. coli*.

➤ **Τιμές συντελεστών βάσει των αποτελεσμάτων των πειραμάτων συμμεταφοράς βακτηρίων, απουσία/παρουσία νανοσωματιδίων GO**



Γράφημα 4.9: (Αριστερά): (a) Δεικνύει, υπό μορφή ραβδογραμμάτων, των τιμών των αδιάστατων συντελεστών απόδοσης συγκρούσεων ( $\alpha$ ) και συνολικής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη ( $\eta_0$ ), και (b) των τιμών του συντελεστή προσκόλλησης  $k_d$  [1/min] και του κανονικοποιημένου, ως προς τον συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων, συντελεστή προσκόλλησης  $k_d/\alpha$  [1/min], όπως προέκυψαν από τα αποτελέσματα συμμεταφοράς των τριών βακτηρίων, απουσία νανοσωματιδίων GO. (Δεξιά) Στα ραβδογράμματα (c) και (d) παρουσιάζονται οι αντίστοιχες τιμές συντελεστών, όπως προέκυψαν για κάθε βακτήριο υπό την ταυτόχρονη διέλευση αιωρήματος νανοσωματιδίων GO διαμέσου της στήλης.

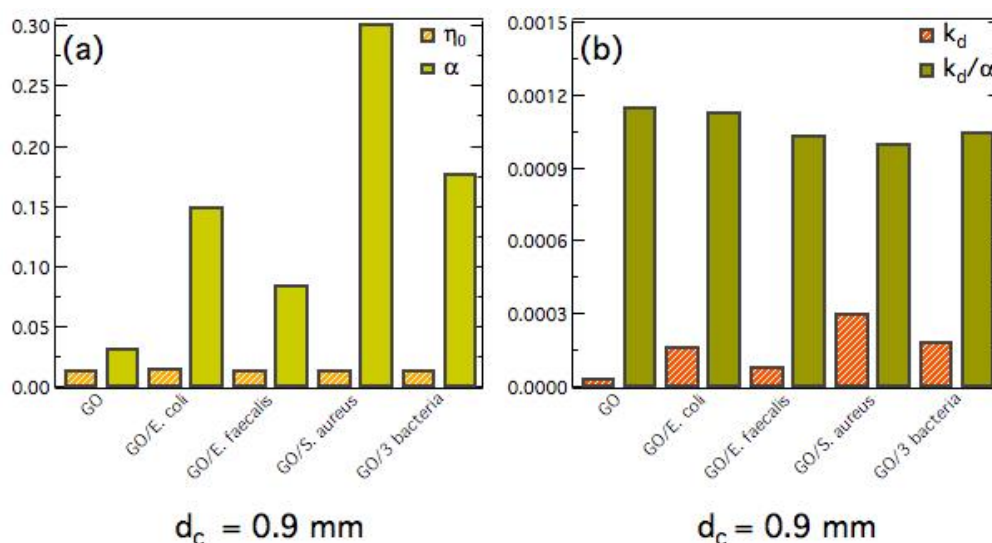
Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων συμμεταφοράς των τριών βακτηρίων, απουσία νανοσωματιδίων GO, δεν εντοπίζονται σημαντικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά στην ικανότητα σύλληψης του μοναδιαίου συλλέκτη. Μάλιστα, οι τιμές που εκτιμήθηκαν για τον συγκεκριμένο συντελεστή είναι ίδιας τάξης μεγέθους, με τις



αντίστοιχες των πειραμάτων μεμονωμένης μεταφοράς των βακτηρίων για τις ίδιες συνθήκες. Ωστόσο, κατά τη συμμεταφορά παρατηρείται μεγάλη αύξηση του συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων του βακτηρίου *E. coli*, με αποτέλεσμα ο ρυθμός προσκόλλησης του στην άμμο να αυξάνει συγκριτικά με την περίπτωση μεμονωμένης μεταφοράς του. Στην περίπτωση του *S. aureus*, η παρουσία των δύο άλλων βακτηριακών στελεχών φαίνεται να επηρεάζει ελαφρώς την αλληλεπίδρασή του με τους κόκκους του συλλέκτη, καθώς τόσο ο συντελεστής απόδοσης συγκρούσεων, όσο και ο ρυθμός προσκόλλησης του στην άμμο μειώθηκαν. Ωστόσο, οι τιμές τους κινούνται στα ίδια επίπεδα τιμών που υπολογίσθηκαν και κατά την μεμονωμένη μεταφορά του εν λόγω βακτηρίου εντός της στήλης. Όπως και στην περίπτωση μεμονωμένης μεταφοράς των βακτηρίων, κατά τη συμμεταφορά τους φαίνεται πως ευνοείται περισσότερο η προσκόλληση/εναπόθεση του *E. faecalis* στην άμμο συγκριτικά με τα δύο άλλα βακτήρια.

Συγκρίνοντας τις περιπτώσεις (a) και (c) στο Γράφημα 4.8, παρατηρείται ότι ούτε η παρουσία νανοσωματιδίων κατά τη συμμεταφορά των βακτηρίων επηρεάζει ιδιαίτερα την ικανότητα σύλληψης του μοναδιαίου συλλέκτη, ωστόσο ο συντελεστής απόδοσης συγκρούσεων αυξάνεται και για τις τρεις περιπτώσεις βακτηρίων. Ως εκ τούτου οι ρυθμοί αναπόθεσης των βακτηρίων κατά την συμμεταφορά τους αυξάνονται, υπό την επίδραση εναιωρήματος νανοσωματιδίων. Μεταξύ των τριών βακτηρίων, η εναπόθεση του *E. faecalis* ευνοείται κατά τη συμμεταφορά τους ανεξαρτήτως της παρουσίας νανοσωματιδίων στο πορώδες μέσο. Αντίθετα, η ταυτόχρονη άντληση νανοσωματιδίων GO κατά τη βακτηριακή συμμεταφορά επιφέρει μεγαλύτερη μεταβολή στην εναπόθεση του *E. coli*.

➤ **Τιμές συντελεστών βάσει των αποτελεσμάτων των πειραμάτων μεταφοράς και συμμεταφοράς των νανοσωματιδίων GO**



Γράφημα 4.10: (a) Απεικόνιση, υπό μορφή ραβδογράμματος, των τιμών των αδιάστατων συντελεστών απόδοσης συγκρούσεων ( $\alpha$ ) και συνολικής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη ( $\eta_0$ ), όπως προέκυψαν για όλες

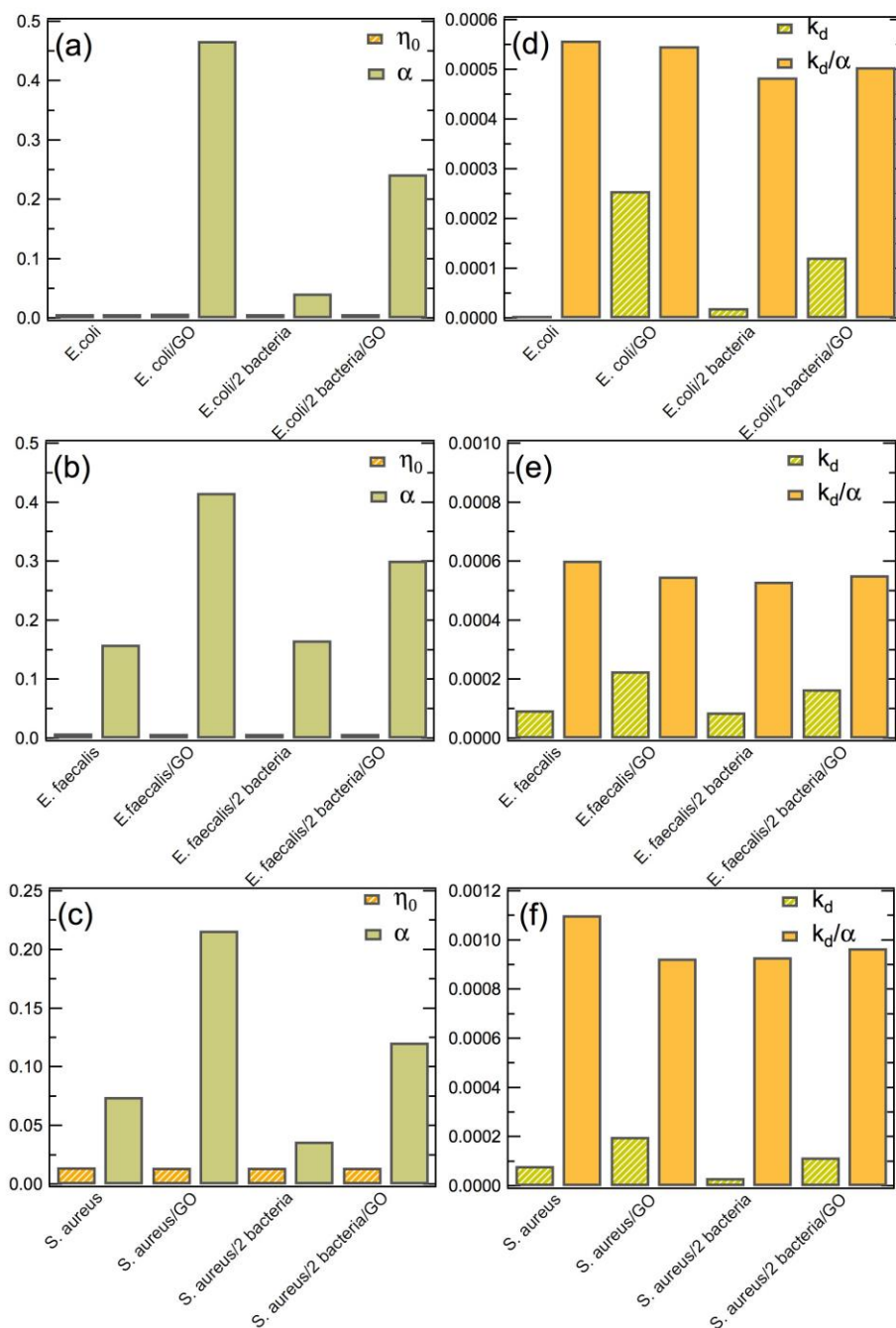


τις εξεταζόμενες πειραματικές περιπτώσεις, για τα νανοσωματίδια GO. (b) Απεικόνιση, υπό μορφή ραβδογράμματος, των τιμών του συντελεστή προσκόλλησης  $k_d$  [1/min] και του κανονικοποιημένου, ως προς τον συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων, συντελεστή προσκόλλησης  $k_d/\alpha$  [1/min] για τα νανοσωματίδια GO.

Τόσο κατά τη μεμονωμένη μεταφορά του εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO, όσο και στις περιπτώσεις ταυτόχρονης παρουσίας μικροβιακών εναιωρημάτων στην πειραματική στήλη, από το Γράφημα 4.10(a) δεν διαπιστώνονται σημαντικές μεταβολές στις τιμές του συνολικού συντελεστή σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη. Ωστόσο, ο συντελεστής απόδοσης συγκρούσεων για τα νανοσωματίδια, αυξάνεται υπό την παρουσία βακτηρίων στην υδατική φάση. Μάλιστα μεγιστοποιείται στην περίπτωση ταυτόχρονης διέλευσης εναιωρήματος του βακτηρίου *S. aureus*. Ταυτόχρονα, από το Γράφημα 4.10(b) είναι εμφανές ότι τα νανοσωματίδια χαρακτηρίζονται από μικρή τάση προσκόλλησης στην άμμο. Ωστόσο, η τάση εναπόθεσής τους βελτιώνεται σημαντικά κατά την αλληλεπίδραση με τα εξεταζόμενα βιοκολλοειδή. Σημειώνεται, ότι πρόσκόλληση των νανοσωματιδίων ευνοείται ιδιαίτερα στην περίπτωση αλληλεπίδρασης με βακτηριακά εναιωρήματα *E. coli* και *S. aureus*, καθώς και κατά την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση και με τα τρία βακτηριακά στελέχη. Ωστόσο είναι εμφανές ότι ο μεγαλύτερος ρυθμός προσκόλλησης των νανοσωματιδίων GO στην άμμο παρατηρείται όταν στην στήλη πραγματοποιείται ταυτρόχρονη άντληση εναιωρήματος *S. aureus*.

Πίνακας 4.9: Τιμές των συντελεστών  $\alpha$ ,  $\eta_0$ ,  $k_d$  και  $k_d/\alpha$  που προέκυψαν από τους υπολογισμούς.

Πείραμα Μεταφοράς/Συμμεταφοράς		RC [-] $C_{(2.2PV)}/C(t_0)$	$\theta$ [-]	$q$ $\times 10^{-5}$ [m/s]	$\eta_0$ [-]	$\alpha$ [-]	$\eta$ [-]	$k_d$ [1/s]	$k_d/\alpha$ [1/s]
<i>E. coli</i> -Quartz sand		0.983	0.38	2.80	$7.49 \times 10^{-3}$	$7.32 \times 10^{-3}$	$5.48 \times 10^{-5}$	$4.09 \times 10^{-6}$	$5.58 \times 10^{-4}$
<i>E. faecalis</i> -Quartz sand		0.664	0.39	2.71	$8.37 \times 10^{-3}$	$1.59 \times 10^{-1}$	$1.33 \times 10^{-3}$	$9.63 \times 10^{-5}$	$6.04 \times 10^{-4}$
<i>S. aureus</i> -Quartz sand		0.709	0.38	2.70	$1.48 \times 10^{-2}$	$7.45 \times 10^{-2}$	$1.10 \times 10^{-3}$	$8.21 \times 10^{-5}$	$1.10 \times 10^{-3}$
GO-Quartz sand		0.851	0.38	2.72	$1.58 \times 10^{-2}$	$3.31 \times 10^{-2}$	$5.24 \times 10^{-4}$	$3.84 \times 10^{-5}$	$1.16 \times 10^{-3}$
<i>E. coli</i> /GO-Quartz sand	<i>E. coli</i>	0.324	0.39	2.62	$7.85 \times 10^{-3}$	$4.67 \times 10^{-1}$	$3.67 \times 10^{-3}$	$2.56 \times 10^{-4}$	$5.47 \times 10^{-4}$
	GO	0.468			$1.63 \times 10^{-2}$	$1.52 \times 10^{-1}$	$2.47 \times 10^{-3}$	$1.72 \times 10^{-4}$	$1.14 \times 10^{-3}$
<i>E. faecalis</i> /GO-Quartz sand	<i>E. faecalis</i>	0.368	0.40	2.76	$8.04 \times 10^{-3}$	$4.16 \times 10^{-1}$	$3.34 \times 10^{-3}$	$2.28 \times 10^{-4}$	$5.49 \times 10^{-4}$
	GO	0.676			$1.53 \times 10^{-2}$	$8.59 \times 10^{-2}$	$1.31 \times 10^{-3}$	$8.95 \times 10^{-5}$	$1.04 \times 10^{-3}$
<i>S. aureus</i> /GO-Quartz sand	<i>S. aureus</i>	0.402	0.41	2.69	$1.42 \times 10^{-2}$	$2.16 \times 10^{-1}$	$3.08 \times 10^{-3}$	$2.00 \times 10^{-4}$	$9.26 \times 10^{-4}$
	GO	0.250			$1.55 \times 10^{-2}$	$3.03 \times 10^{-1}$	$4.69 \times 10^{-3}$	$3.05 \times 10^{-4}$	$1.01 \times 10^{-3}$
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i> -Quartz sand	<i>E. coli</i>	0.912	0.41	2.70	$7.40 \times 10^{-3}$	$4.20 \times 10^{-2}$	$3.11 \times 10^{-4}$	$2.03 \times 10^{-5}$	$4.84 \times 10^{-4}$
	<i>E. faecalis</i>	0.669			$8.12 \times 10^{-3}$	$1.67 \times 10^{-1}$	$1.35 \times 10^{-3}$	$8.87 \times 10^{-5}$	$5.32 \times 10^{-4}$
	<i>S. aureus</i>	0.858			$1.42 \times 10^{-2}$	$3.64 \times 10^{-2}$	$5.18 \times 10^{-4}$	$3.39 \times 10^{-5}$	$9.32 \times 10^{-4}$
<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i> /GO-Quartz sand	<i>E. coli</i>	0.581	0.40	2.71	$7.46 \times 10^{-3}$	$2.43 \times 10^{-1}$	$1.81 \times 10^{-3}$	$1.23 \times 10^{-4}$	$5.05 \times 10^{-4}$
	<i>E. faecalis</i>	0.477			$8.17 \times 10^{-3}$	$3.02 \times 10^{-1}$	$2.47 \times 10^{-3}$	$1.67 \times 10^{-4}$	$5.54 \times 10^{-4}$
	<i>S. aureus</i>	0.595			$1.43 \times 10^{-2}$	$1.21 \times 10^{-1}$	$1.73 \times 10^{-3}$	$1.17 \times 10^{-4}$	$9.68 \times 10^{-4}$
	GO	0.432			$1.55 \times 10^{-2}$	$1.79 \times 10^{-1}$	$2.78 \times 10^{-3}$	$1.89 \times 10^{-4}$	$1.05 \times 10^{-3}$



Γράφημα 4.11: (Αριστερά) Απεικόνιση, υπό μορφή ραβδογραμμάτων, των τιμών των αδιάστατων συντελεστών απόδοσης συγκρούσεων (α) και συνολικής σύλληψης μοναδιαίου συλλέκτη ( $\eta_0$ ), όπως προέκυψαν για όλες τις εξεταζόμενες πειραματικές περιπτώσεις, για τα βακτήρια *E. coli* (α), *E. faecalis* (β) και *S. aureus* (γ). (Δεξιά) Απεικόνιση, υπό μορφή ραβδογραμμάτων, των τιμών του συντελεστή προσκόλλησης  $k_a$  [1/min] και του κανονικοποιημένου, ως προς τον συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων, συντελεστή προσκόλλησης  $k_a/\alpha$  [1/min] για τα βακτήρια *E. coli* (δ), *E. faecalis* (ε) και *S. aureus* (ς).

Στο Γράφημα 4.11 απεικονίζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα που προέκυψαν για κάθε βακτήριο ξεχωριστά και για κάθε πειραματική περίπτωση. Μεταξύ των τριών βακτηρίων, το *E. faecalis* εμφανίζει τη μεγαλύτερη δυνητική τάση προσκόλλησης στην άμμο, τόσο κατά την μεμονωμένη μεταφορά του, όσο και κατά

την συµµεταφορά του µε τα δύο άλλα βακτηριακά είδη. Αντίθετα το *E. coli* εμφανίζει τη µικρότερη τάση προσκόλλησης και στις δύο αντίστοιχες πειραµατικές περιπτώσεις. Όσον αφορά στο *S. aureus* παρατηρείται µείωση του ρυθµού προσκόλλησης του στην άµµο κατά τη συµµεταφορά του µε τα δύο άλλα στελέχη.

Διαπιστώνεται ότι η παρουσία εναιωρήµατος οξειδίου του γραφενίου επιδρά θετικά στην προσκόλληση και των τριών βακτηρίων στην άµµο, καθώς οι ρυθµοί σύλληψής τους εμφανίζουν άυξηση. Ωστόσο εντοπίζεται ότι η επίδρασή του είναι µεγαλύτερη στις περιπτώσεις µεμονωµένης µεταφοράς κάθε βιοκολλοειδούς εναιωρήµατος από ότι στις περιπτώσεις ταυτόχρονης µεταφοράς και των τριών µικροβιακών εναιωρηµατών. Μάλιστα το εναιώρηµα GO κατά την συµµεταφορά του µε κάθε ένα µικροβιακό εναιώρηµα ξεχωριστά, φαίνεται να υποβοηθά περισσότερο την προσκόλληση του *E. coli*, ενώ όταν τα τρία µικροβιακά εναιωρήµατα αλληλεπιδρούν εντός της στήλης, η παρουσία GO δρά ενισχύοντας περισσότερο την προσκόλληση του *E. faecalis*.

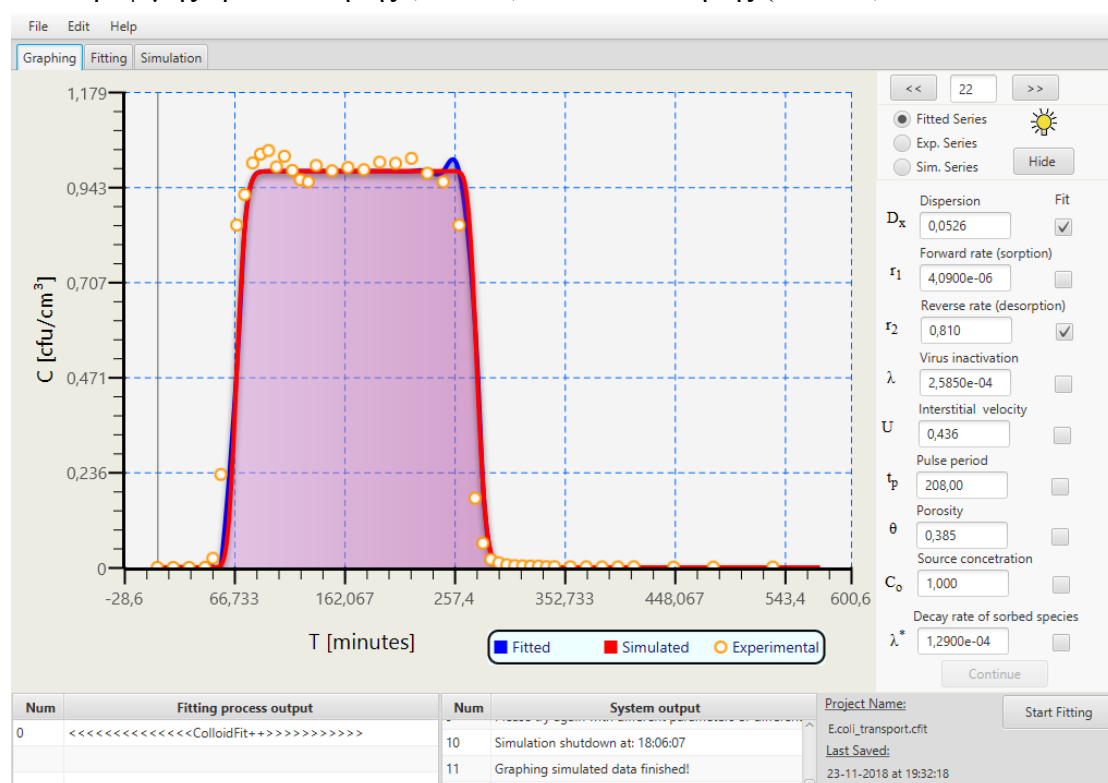
Όσον αφορά στο συντελεστή απόδοσης συγκρούσεων, αξίζει να σημειωθεί ότι, οι τιμές που προβλέφθηκαν σε όλες τις πειραµατικές περιπτώσεις, βάσει της CFT θεωρίας, συγκλίνουν µε αντίστοιχες βιβλιογραφικά αναφερόµενες τιμές για τα εξεταζόµενα βακτήρια (0.008 – 0.875 και 0.026 – 0.937) (Forppen and Schijven, 2005; Forppen et al., 2007).

Όπως εξηγήθηκε στην αρχή της Παραγράφου 4.1, στην παρούσα µελέτη πραγµατοποιήθηκε µοντελοποίηση µόνο της µεμονωµένης µεταφοράς των βακτηρίων και των νανοσωµατιδίων GO. Για την µοντελοποίηση έπρεπε να θεωρηθούν κάποιες παράµετροι σταθερές, ούτε ώστε το µοντέλο να µπορέσει να προβλέψει τις άγνωστες παραµέτρους. Ως σταθερές παράµετροι θεωρήθηκαν οι παράµετροι που προέκυπταν από τη διαδικασία χαρακτηρισµού της στήλης, δηλαδή το πορώδες ( $\theta$ ), η ενδοπορώδης ταχύτητα ( $U_x$ ), ο χρόνος άντλησης του εκάστοτε εναιωρήµατος ( $t_p$ ), καθώς και ο συντελεστής του ρυθµού προσκόλλησης που γενικά συµβολίζεται ως  $k_d$ .

Στην παρούσα εργασία, ο εν λόγω συντελεστής συµβολίζεται ως  $r_{i-i^*}$  στην περίπτωση των βιοκολλοειδών και ως  $r_{GO-GO^*(i)}$  στην περίπτωση των νανοσωµατιδίων GO (δείτε Παραγράφους 3.1 και 3.2), και περιγράφει το ρυθµό µη αντιστρεπτής προσκόλλησης των σωματιδίων στους κόκκους του συλλέκτη (άµµο). Οι τιμές που θεωρήθηκαν για τον συντελεστή µη αντιστρεπτής προσκόλλησης ήταν αυτές που προβλέφθηκαν από την εφαρµογή της θεωρίας CFT και φαίνονται στην τέταρτη στήλη του Πίνακα 4.10. Σε όλες τις περιπτώσεις µοντελοποίησης θεωρήθηκε ότι η κανονικοποιηµένη συγκέντρωση της πηγής ( $C_0$ ) ήταν 1.

Βάσει των δεδοµένων εισόδου (κανονικοποιηµένες τιμές συγκέντρωσεων), το µοντέλο εκτελούσε την προσοµοίωση. Στην περίπτωση των βιοκολλοειδών, το µοντέλο προέβλεπε το συντελεστή διαμήκους υδροδυναµικής διασποράς ( $D_{x,i}$ ), καθώς και τιμές για τους συντελεστές των ρυθµών µη αντιστρεψίµης αποκόλλησης ( $r_{i^*-i}$ ), αδρανοποίησης των αιωρούµενων βιοκολλοειδών ( $\lambda_i$ ), και αδρανοποίησης των προσκολληµένων στην άµµο βιοκολλοειδών ( $\lambda_{i^*}$ ). Στην περίπτωση των νανοσωµατιδίων, το λογισµικό έκανε προέβλεψη για το συντελεστή διαμήκους

υδροδυναμικής διασποράς ( $D_{x,GO}$ ), καθώς και για τους συντελεστές των ρυθμών αντιστρέψιμης προσκόλλησης ( $r_{GO-GO}^{*(r)}$ ) και αποκόλλησης ( $r_{GO}^{*(r)}-GO$ ).



Εικόνα 4.2: Παράδειγμα διαδικασίας μοντελοποίησης της μεταφοράς του *E. coli* στο πειραματικό κορεσμένο πορώδες μέσο, με χρήση του λογισμικού ColloidFit.

Επίσης, σε όλες τις περιπτώσεις το λογισμικό είχε την ικανότητα πρόβλεψης της διαμήκουσ τάσης διασποράς (dispersivity) των εξεταζόμενων βακτηρίων ( $a_{L,i}$ ) και νανοσωματιδίων ( $a_{L,GO}$ ). Η συγκεκριμένη παράμετρος προέκυπτε κάθε φορά ως γινόμενο της τιμής του συντελεστή υδροδυναμικής διασποράς με την τιμή της ενδοπορώδους ταχύτητας. Στον Πίνακα 4.10 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης για τα πειράματα απλής μεταφοράς των τεσσάρων εξεταζόμενων σωματιδίων.

Πίνακας 4.10: Εκτιμώμενες τιμές παραμέτρων (μαζί με τα διαστήματα εμπιστοσύνης 95%) που προέκυψαν από την μοντελοποίηση των πειραματικών δεδομένων μεμονωμένης μεταφοράς των βακτηρίων *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* και των νανοσωματιδίων GO, με χρήση του λογισμικού ColloidFit.

Πείραμα μεταφοράς	$D_{x,i}$ [cm <sup>2</sup> /min]	$a_{L,i}$ [cm]	$r_{i-i^*}$ [1/min]	$r_{i^*-i}$ [1/min]	$\lambda_i$ [1/min]	$\lambda_{i^*}$ [1/min]
<i>E. coli</i>	$0.053 \pm 0.026$	0.121	$4.09 \times 10^{-6}$	$8.10 \times 10^{-1}$	$2.58 \times 10^{-4}$ $\pm 1.61 \times 10^{-4}$	$1.29 \times 10^{-4}$ $\pm 8.07 \times 10^{-5}$
<i>E. faecalis</i>	$0.106 \pm 0.073$	0.251	$9.63 \times 10^{-5}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$5.40 \times 10^{-3}$ $\pm 8.07 \times 10^{-5}$	$2.60 \times 10^{-3}$ $\pm 4.04 \times 10^{-5}$
<i>S. aureus</i>	$0.214 \pm 0.109$	0.498	$8.21 \times 10^{-5}$	$4.74 \times 10^{-2}$	$6.90 \times 10^{-3}$ $\pm 1.61 \times 10^{-3}$	$3.45 \times 10^{-3}$ $\pm 8.10 \times 10^{-4}$

Πείραμα μεταφοράς	$D_{X,GO}$ [cm <sup>2</sup> /min]	$a_{L,GO}$ [cm]	$r_{GO-GO^*(r)}$ [1/min]	$r_{GO^*(r)-GO}$ [1/min]	$r_{GO-GO^*(i)}$ [1/min]	
GO	0.180	0.422	$8.20 \times 10^{-3}$	$2.27 \times 10^{-2}$	$3.20 \times 10^{-4}$	

Όσον αφορά στα βακτήρια παρατηρείται ότι μεταξύ αυτών, το *E. coli* εμφανίζει την μικρότερη τάση μη αντίστροπτης προσκόλλησης στην άμμο και την ισχυρότερη τάση αποκόλλησης από αυτήν, ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει τους μικρότερους ρυθμούς αδρανοποίησης. Μεταξύ των *E. faecalis* και *S. aureus*, το *S. aureus* εμφανίζει μεγαλύτερη τάση αποκόλλησης από την άμμο, ωστόσο οι ρυθμοί αδρανοποίησής του στην αιωρούμενη και προσροφημένη φάση είναι γρηγορότεροι σε σχέση με τους ρυθμούς αδρανοποίησης που προβλέπονται για το *E. faecalis*. Παράλληλα εντοπίζεται αρκετά μεγαλύτερη διαμήκης διασπορά στην περίπτωση του βακτηρίου *S. aureus*.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η διασπορά επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος του εκάστοτε σωματιδίου και έχει παρατηρηθεί ότι, για μεγαλύτερες υδροδυναμικές διαμέτρους σωματιδίων, η διασπορά αυξάνεται (Chrysikopoulos and Katzourakis, 2015). Στην παρούσα μελέτη η υδροδυναμική διάμετρος του *S. aureus* (730 nm) ήταν μικρότερη συγκριτικά με τις υδροδυναμικές διαμέτρους των δύο άλλων βακτηρίων (1091 nm για το *E. coli* και 1082 nm για το *E. faecalis*). Ωστόσο, κατά την διερεύνηση της σταθερότητας των μικροβιακών εναιωρημάτων παρατηρήθηκε ότι το *S. aureus* εκδηλώνει έντονη τάση ομοσυσσωμάτωσης στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Σε περιπτώσεις ομοσυσσωμάτωσης το μέγεθος του συσσωματώματος αυξάνει. Συνεπώς, η τάση ομοσυσσωμάτωσης του *S. aureus* θα μπορούσε να δικαιολογήσει τη μεγαλύτερη διαμήκη διασπορά που εμφανίζει το εν λόγω βακτήριο.

Οι τιμές που προέκυψαν από την μοντελοποίηση των νανοσωματιδίων υπόδεικνύουν πολύ μικρή τάση μόνιμης προσκόλλησης στους κόκκους της άμμου και μεγαλύτερη τάση για αντιστρεπτή εναπόθεση. Οι τιμές των συντελεστών προσκόλλησης/αποκόλλησης και διαμήκους και υδροδυναμικής διασποράς που προέκυψαν για τα νανοσωματίδια έχουν την ίδια τάξη μεγέθους με αντίστοιχες τιμές που έχουν προταθεί για τις ίδιες παραμέτρους και σε άλλες δημοσιευμένες μελέτες που εξετάζεται η μεταφορά του εν λόγω υλικού (Chrysikopoulos et al., 2017). Ωστόσο, όπως φαίνεται και στο Γράφημα 4.4, το μοντέλο που χρησιμοποιήθηκε δεν δύναται να περιγράψει πλήρως τη συμπεριφορά των νανοσωματιδίων GO. Συνεπώς, οι προβλεφθείσες τιμές των παραμέτρων στην περίπτωση του GO, είναι ενδεικτικές και δεν επαρκούν για την διεξαγωγή γενικευμένων συμπερασμάτων αναφορικά με τον τρόπο μεταφοράς των νανοσωματιδίων στο πορώδες.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

Babakhani, P.; Bridge, J.; Doong, R.; Phenrat, T. Continuum-based models and concepts for the transport of nanoparticles in saturated porous media: A state-of-the-science review. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *246*, 75 – 104.

Chrysikopoulos, C.V.; Katzourakis, V.E. Colloid particle size-dependent dispersivity. *Water Resour. Res.* **2015**, *51*, 4668 – 4683.

Chrysikopoulos, C.V.; Sotirelis, N. P.; Kallithrakas-Kontos N. G. Cotransport of graphene oxide nanoparticles and kaolinite colloids in porous media. *Transport Porous Med.* **2017**, *119*, 181-204. doi: 10.1007/s11242-017-0879-z.

Chrysikopoulos, C.V.; Syngoyna, V.I. Attachment of bacteriophages MS2 and ΦX174 onto kaolinite and montmorillonite: Extended-DLVO interaction. *Colloids Surf. B* **2012**, *92*, 74 – 83.

Dong, S.; Sun, Y.; Gao, B.; Shi, X.; Xu, H.; Wu, J.; Wu, J. Retention and transport of graphene oxide in water saturated limestone media. *Chemosphere* **2017**, *180*, 506 – 512.

Foppen J.W., van Herwerden, M.; Schijven, J. Transport of *Escherichia coli* in saturated porous media: Dual mode deposition and intra-population heterogeneity. *Water Resour.* **2007**, *41*, 1743–1753.

Foppen, J.W.A.; Schijven, J.F. Transport of *E. coli* in columns of geochemically heterogeneous sediment. *Water Resour.* **2005**, *39*, 3082 – 3088.

Han, P.; Zhou, D.; Tong, M.; Kim, H. Effect of bacteria on the transport and deposition of multi-walled carbon nanotubes in saturated porous media. *Environ. Pollut.* **2016**, *213*, 895 – 903.

Jewett, D.G.; Hilbert, T.A.; Logan, B.E.; Arnold, R.G.; Bales, R.C. Bacterial transport in laboratory columns and filters: influence of ionic strength and pH on collision efficiency. *Water Resour.* **1995**, *29*, 1673 – 1680.

Jin, Y.; Yates, M.V.; Thompson, S.S.; Jury, W.A. Sorption of viruses during flow through saturated sand columns. *Environ. Sci. Technol.* **1997**, *31*, 548 – 555.

Johnson, W.P.; Logan, B.E. Enhanced transport of bacteria in porous media by sediment-phase and aqueous-phase natural organic matter. *Water Resour.* **1996**, *30*, 923–931.

Kasel, D.; Bradford, S.A.; Simunek, J.; Heggen, M.; Vereecken, H.; Klumpp, E. Transport and retention of multi-walled carbon nanotubes in saturated porous media: Effects of input concentration and grain size. *Water Res.* **2013**, *47*, 933 – 944.

Katzourakis V.E. and Chrysikopoulos C.V. Fitting the transport and attachment of dense biocolloids in one dimensional porous media: ColloidFit. *Groundwater*. 2017. doi:10.1111/gwat.12501.

Mills, A.L.; Herman, J.S.; Hornberger, G.M.; De Jesús, T.H. Effect of solution ionic strength and iron coatings on minerals grains on the sorption of bacterial cells to quartz sand. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 3300 – 3306.

Sun, Y.; Gao, B.; Bradford, S.A.; Wu, L.; Chen, H.; Shi, X.; Wu, J. Transport, retention, and size perturbation of graphene oxide in saturated porous media: Effects of input concentration and grain size. *Water Res.* **2015**, *68*, 24 – 33.

Wang, M.; Gao, B.; Tang, D.; Yu, C. Concurrent aggregation and transport of graphene oxide in saturated porous media: Roles of temperature, cation type, and electrolyte concentration. *Environ. Pollut.* **2018**, *235*, 350 – 357.

Zhong, H.; Liu, G.; Jiang, Y.; Yang, J.; Liu, Y.; Yang, X.; Liu, Z.; Zeng, G. Transport of bacteria in porous media and its enhancement by surfactants for bioaugmentation: A review. *Biotechnolo. Adv.* **2017**, *35*, 490 – 504.

## *Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup>*



## 5. Συμπεράσματα

Βάσει των αποτελεσμάτων της μεμονωμένης μεταφοράς των τριών εξεταζόμενων βακτηρίων παρατηρείται ότι εμφανίζουν διαφοροποιήσεις όσον αφορά στη συγγένεια τους με το πληρωτικό υλικό της στήλης και την ικανότητα παρακράτησής τους από αυτό. Πιο συγκεκριμένα το ποσοστό ανάκτησης του *E. coli* (98.2%) στην εκροή ήταν μεγαλύτερο συγκριτικά με τα ποσοστά ανακτώμενης μάζας των *E. faecalis* (67.1%) και *S. aureus* (61.5%), γεγονός που υποδεικνύει ότι το συγκεκριμένο βακτήριο εμφανίζει μικρότερη τάση εναπόθεσης στην άμμο. Επιπλέον μεταξύ των τριών βακτηρίων το *E. coli* εξέρχεται γρηγορότερα της στήλης, ενώ οι χρόνοι παραμονής των *E. faecalis* και *S. aureus* στην πειραματική στήλη ήταν μεγαλύτεροι. Τα ευρήματα αυτά συγκλίνουν με τα αποτελέσματα σύλληψης και διήθησης των βακτηρίων, που προέκυψαν από την εφαρμογή της CFT θεωρίας, και από τα οποία επιβεβαιώνεται ότι ο ρυθμός προσκόλλησης του *E. coli* στους κόκκους της άμμου είναι μικρότερος σε σχέση με τους ρυθμούς προσκόλλησης των δύο άλλων βακτηρίων.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονιστεί ότι για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες τα προφίλ αλληλεπίδρασης άμμου-βακτηρίων, που προέκυψαν από την εφαρμογή της διευρυμένης DLVO θεωρίας, υποδεικνύουν την επικράτηση ισχυρών απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των βακτηρίων και της άμμου. Η άπωση διατηρείται για σχετικά μεγάλες αποστάσεις διαχωρισμού. Άρα, λόγω εμφάνισης υψηλών ενεργειακών φραγμάτων, καθίσταται ανέφικτη, για μικρές αποστάσεις διαχωρισμού, η μη αντιστρεπτή (μόνιμη) προσκόλληλη των τριών βακτηρίων στην επιφάνεια της άμμου σε βαθιά πρωτοταγή ελάχιστα. Ωστόσο, σε μεγαλύτερες αποστάσεις (>78 nm), η εμφάνιση δευτεροταγών ελαχίστων, που παρατηρήθηκε και στις τρεις περιπτώσεις βακτηριακής αλληλεπίδρασης με την άμμο, υποδεικνύουν την πιθανότητα εύκολα αντιστρέψιμης προσκόλλησης (ή/και ετεροσυσσωμάτωσης) των βιοκολλοειδών στην επιφάνεια των κόκκων της άμμου.

Μάλιστα, τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης υποδεικνύουν ότι για τις δεδομένες πειραματικές συνθήκες το *E. coli* εμφανίζει ισχυρότερη τάση αποκόλλησης από την άμμο και μικρότερους ρυθμούς αδρανοποίησης, τόσο στην αιωρούμενη όσο και στην προσροφημένη φάση. Αντίθετα, τα *E. faecalis* και *S. aureus*, εμφανίζουν μεγαλύτερους ρυθμούς εναπόθεσης στην άμμο και κατ'επέκταση ισχυρότερο δυναμικό μη αντιστρεπτής προσκόλλησης σε αυτή. Μεταξύ των *E. faecalis* και *S. aureus*, το *S. aureus* εκδηλώνει σχετικά μεγαλύτερη τάση αποκόλλησης από την άμμο, ωστόσο οι ρυθμοί αδρανοποίησής του στην αιωρούμενη και προσροφημένη φάση είναι γρηγορότεροι σε σχέση με τους ρυθμούς αδρανοποίησης που προβλέφθηκαν, από το μοντέλο μεταφοράς, για το *E. faecalis*. Συνεπώς, ο ταχύτερος ρυθμός αδρανοποίησης του *S. aureus* θα μπορούσε εν μέρει να εξηγήσει το σχετικά μικρότερο ποσοστό ανάκτησής του σε σχέση με την ανακτώμενη μάζα του *E. faecalis* στην εκροή.

Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων εικάζεται ότι επηρεάζουν σημαντικά την μεταφορά τους. Το *E. coli* εκδηλώνει κινητικότητα και είναι Gram αρνητικό, δηλαδή δομικά το περίβλημα του αποτελείται από την κυτταροπλασματική μεμβράνη, ένα ενδιάμεσο στρώμα μικρού πάχους πεπτιδογλυκάνης και την εξωτερική μεμβράνη. Αντίθετα, τα *E. faecalis* και *S. aureus* δεν εμφανίζουν κινητικότητα και είναι Gram θετικά, δηλαδή δεν φέρουν εξωτερική μεμβράνη, αλλά η εσωτερική πλασματική τους μεμβράνη περιβάλλεται από ένα πολύ παχύτερο ομογενές στρώμα πεπτιδογλυκάνης. Συνεπώς, η μεγαλύτερη τάση εναπόθεσης των εν λόγω βακτηρίων στη άμμο μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το στρώμα πεπτιδογλυκάνης εμφανίζει καλύτερη συγγένεια με τους κόκκους του συλλέκτη. Αντίθετα, η ύπαρξη εξωτερικής μεμβράνης στη δομή του *E. coli* θα μπορούσε να περιορίζει την τάση σύζευξής του με την άμμο. Επίσης, σε όλα τα πειράματα επικρατούσαν τα ίδια χαρακτηριστικά ροής συνεπώς, η ικανότητα κίνησης των κυττάρων του *E. coli* εικάζεται πως συνέδραμε στη παρατηρούμενη ταχύτερη εκροή του.

Όσον αφορά στην επίδραση του μεγέθους των σωματιδίων στη μεταφορά και διασπορά τους εντός του κορεσμένου μέσου, δεν μπορούν να εξαχθούν ακριβή συμπεράσματα. Μεταξύ των τριών βακτηρίων το *S. aureus* διέθετε τη μικρότερη υδροδυναμική διάμετρο (730 nm, έναντι 1091 nm για το *E. coli* και 1082 nm για το *E. faecalis*). Εντούτοις, υπό τις εξεταζόμενες υδατικές συνθήκες, προβλέφθηκε ότι εμφανίζει και την μεγαλύτερη τάση ομοσυσσωμάτωσης. Βάσει της συμπεριφοράς που εμφανίζει συχνά σε περιβαλλοντικά δείγματα το *S. aureus*, η ομοσυσσωμάτωση του είναι αναμενόμενη, καθότι τα κύτταρά του τείνουν να σχηματίζουν συστοιχίες αποικιών. Το μεγαλύτερο δυναμικό ομοσυσσωμάτωσης που εμφάνισε το εν λόγω βακτηριακό στέλεχος ενδέχεται ότι ευνόησε τη διαμήκη διασπορά του στη στήλη, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους των σχηματιζόμενων συσσωματωμάτων, και την παρακράτηση του στην άμμο, λόγω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης.

Κατά τη συμμεταφορά των τριών βακτηρίων στο κορεσμένο πορώδες μέσο θεωρείται πιθανή η εκδήλωση φαινομένων ανταγωνισμού, αναφορικά με την πλήρωση των διαθέσιμων προσροφητικών θέσεων στην επιφάνεια της άμμου, και συσσωμάτωσης (ομοσυσσωμάτωσης και ετεροσυσσωμάτωσης). Τα αποτελέσματα της XDLVO υποδεικνύουν ότι κατά την ταυτόχρονη αλληλεπίδραση των τριών βακτηρίων υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα συσσωμάτωσης μεταξύ των *E. coli* και *S. aureus*, καθώς και εναπόθεσης αυτών στην άμμο λόγω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης. Ωστόσο, οι προβλέψεις της XDLVO δεν συγκλίνουν με τα αποτελέσματα της συμμεταφοράς. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του *E. coli*, παρατηρήθηκε αύξηση του χρόνου παραμονής του εν λόγω βακτηρίου στη στήλη κατά 8.8% και αύξηση του ρυθμού εναπόθεσης του στην άμμο κατά μια τάξη μεγέθους, αλλά το ποσοστό ανάκτησης του αυξήθηκε κατά 2.1 %. Οι ρυθμοί εναπόθεσης των βακτηρίων *E. faecalis* και *S. aureus* δεν εμφάνισαν σημαντικές μεταβολές, ωστόσο αυξήθηκαν οι χρόνοι παραμονής τους κατά 8.0% και 3.6%, αντίστοιχα. Επιπλέον παρατηρήθηκε μείωση στην ανακτώμενη μάζα του *E. faecalis* κατά 3.4%, δηλαδή το συγκεκριμένο βακτήριο συγκρατήθηκε περισσότερο εντός της στήλης σε σχέση με τα δύο άλλα

βακτήρια. Αντίθετα, η ανάκτηση του *S. aureus* αυξήθηκε κατά 11.1% σε σχέση με αυτή που υπολογίστηκε κατά τη μεμονωμένη μεταφορά του. Τα συνολικά αποτελέσματα της μελέτης δείχνουν ότι κατά τη συμμεταφορά ευνοείται περισσότερο η εναπόθεση του *E. faecalis* στην άμμο και ταυτόχρονα αυξάνεται το ποσοστό επιβίωσης του *S. aureus*. Συνεπώς, κατά την συμμεταφορά η θεωρία XDLVO δεν μπορεί να προβλέψει επιτυχώς της συμπεριφορά των βακτηρίων.

Οι αποκλίσεις που παρατηρούνται μεταξύ της θεωρίας και των αποτελεσμάτων συμμεταφοράς μπορεί να οφείλονται σε σύνθετες αντιδράσεις επιφανείας που επιτελούνται μεταξύ των βακτηρίων και της άμμου. Ταυτόχρονα, κατά τη συμμεταφορά μπορεί να αναπτυχθεί είτε συνεργιστική είτε ανταγωνιστική δράση μεταξύ των βακτηρίων. Εντούτοις, από την παρούσα μελέτη δεν μπορούν να εξαχθούν σαφή συμπεράσματα αναφορικά με το είδος της επικρατούσας αλληλεπίδρασης και του τρόπου που αυτή δύναται να επηρεάσει την εναπόθεση των βιοκολλοειδών.

Γενικότερα παρατηρήθηκε ότι το εναιώρημα των νανοσωματιδίων GO, καθώς και το μικροβιακό εναιώρημα του *E. faecalis*, χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη σταθερότητα σε σχέση με τα εναιωρήματα των *E. coli* και *S. aureus*. Για τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες προβλέφθηκε χαμηλή τάση προσκόλληση των νανοσωματιδίων GO στην άμμο και μεγαλύτερη τάση για αντιστρεπτή εναπόθεση. Η συμπεριφορά αυτή των νανοσωματιδίων επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα της μοντελοποίησης και μάλιστα κατά την μεταφορά πιθανολογείται η επένεργεια πρόσθετων μηχανισμών όπως η παρεμποδιζόμενη συγκράτηση (straining) και η μηχανική διήθηση. Λόγω του μικρότερου μεγέθους, τα νανοσωματίδια αναμένεται να εναποτίθενται στις επιφάνειες των βακτηρίων. Ωστόσο, κρίνοντας από τις τιμές των ενεργειακών φραγμάτων, τα νανοσωματίδια εμφανίζουν αρκετά μικρή πιθανότητα συσσωμάτωσης με το *E. faecalis* είναι ενώ η πιθανότητα συσσωμάτωσής τους με το *E. coli* και το *S. aureus* είναι μεγαλύτερη. Σε περιπτώσεις ετεροσυσσωμάτωσης του GO με τα βακτήρια αυτά, το μεγαλύτερο μέγεθος των συσσωματωμάτων ευνοεί την επικράτηση μηχανισμών όπως αυτό της παρεμποδιζόμενης συγκράτησης, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η παρακράτηση των νανοσωματιδίων εντός της στήλης. Οι θεωρητικές αυτές προβλέψεις, συγκλίνουν με τα αποτελέσματα μεταφοράς των νανοσωματιδίων, όπου παρατηρήθηκε μικρότερη ανάκτηση νανοσωματιδίων στην εκροή κατά την ταυτόχρονη άντληση εναιωρημάτων του *E. coli* και του *S. aureus*. Αντίθετα, η παρουσία του *E. faecalis* επηρεάζει λιγότερο τη μεταφορά των νανοσωματιδίων.

Όσον αφορά στην επίδραση των νανοσωματιδίων στη βακτηριακή μεταφορά, παρατηρήθηκε ότι η ταυτόχρονη άντληση εναιωρήματος νανοσωματιδίων GO έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του ρυθμού των συγκρούσεων που πραγματοποιούνται μεταξύ των βακτηρίων και κόκκων της άμμου, με αποτέλεσμα να παρατηρείται αύξηση των ρυθμών εναπόθεσης και σύλληψης των αιωρούμενων βιοκολλοειδών. Αν και οι τιμές του συντελεστή  $\alpha$  αυξάνονται υπό την παρουσία νανοσωματιδίων GO,

παρατηρείται ότι εμφανίζουν μεταβλητότητα μεταξύ των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών.

Συνεπώς, από τους συντελεστές απόδοσης συγκρούσεων δεν θα μπορούσαν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα αναφορικά με την αναμενόμενη συμπεριφορά των εν λόγω βακτηρίων σε πραγματικά πορώδη μέσα, διότι ο συντελεστής  $\alpha$  εξαρτάται και καθορίζεται από ποικίλες παραμέτρους συμπεριλαμβανομένης της φύσης της επιφάνειας των κόκκων (Mills et al., 1994), της ιοντικής ισχύος του διαλύματος (Jewett et al., 1995), της παρουσίας φυσικής οργανικής ουσίας (Johnson and Logan, 1996), και των ιδιοτήτων της επιφάνειας του βιοκολλοειδούς (Jin et al., 1997).

Επιπρόσθετα, εντοπίζεται ότι η επίδρασή του εναιωρήματος νανοσωματιδίων είναι μεγαλύτερη στις περιπτώσεις μεμονωμένης μεταφοράς κάθε βιοκολλοειδούς εναιωρήματος από ότι στις περιπτώσεις ταυτόχρονης μεταφοράς και των τριών μικροβιακών εναιωρημάτων. Πιο συγκεκριμένα, κατά τη μεμονωμένη μεταφορά παρουσία GO διαπιστώθηκε μείωση στις ανακτώμενες μάζες των *E. coli*, *E. faecalis* και *S. aureus* κατά 66.6%, 46.2% και 14.3%, αντίστοιχα. Τα αντίστοιχα ποσοστά μείωσης ανακτώμενης μάζας κατά τη συμμεταφορά παρουσία GO ήταν 44.9%, 31.3% και 32.5%. Είναι προφανές ότι το εναιώρημα GO τόσο κατά την συμμεταφορά, όσο και κατά τη μεμονωμένη μεταφορά των μικροβιακών εναιωρημάτων, επιδρά περισσότερο στη προσκόλληση και συγκράτηση του *E. coli*.

Ωστόσο, λόγω έλλειψης δεδομένων αναφορικά με τους ρυθμούς αδρανοποίησης των βακτηρίων κατά την παρουσία νανοσωματιδίων GO, δεν μπορεί να προταθεί η ακριβής αντιμικροβιακή ή/και βακτηριοστατική επίδραση του GO στα εξεταζόμενα βακτήρια. Όπως αναλύθηκε και στην Παράγραφο 1.6, υπάρχουν πολλοί πιθανοί μηχανισμοί εκδήλωσης των αντιβακτηριδιακών ή/και βιοστατικών ιδιοτήτων του GO, ωστόσο η επικράτηση κάθε μηχανισμού εμφανίζει πολυπαραγοντική εξάρτηση τόσο από τις χημικές-επιφανειακές ιδιότητες του GO, όσο και από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηριακών κυττάρων και τις εκάστοτε συνθήκες αλληλεπίδρασης (π.χ. υδατικές συνθήκες, συγκέντρωση μικροβίων, δόση GO, χρόνο έκθεσης κλπ.). Παρόλα αυτά φαίνεται πως για το δεδομένο χρόνο επαφής και τη συγκεκριμένη συγκέντρωση (20 mg/L), το οξείδιο του γραφενίου επηρεάζει λιγότερο τα Gram θετικά βακτήρια και περισσότερο το *E. coli* που είναι Gram θετικό. Εντούτοις, για την καλύτερη κατανόηση του αντιμικροβιακού αποτελέσματος του GO, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση.

Προς την κατεύθυνση αυτή θα είχε ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον, η πραγματοποίηση των ίδιων πειραμάτων υπό διαφορετικές συνθήκες έκθεσης των βακτηρίων στο εναιώρημα GO. Η συγκέντρωση του εναιωρήματος νανοσωματιδίων που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη ήταν 20 mg/L και ο χρόνος αλληλεπίδρασης των βακτηρίων με το εναιώρημα ήταν 3 ώρες. Η τιμή της εξεταζόμενης συγκέντρωσης νανοσωματιδίων είναι σχετικά υψηλή, ενώ σε περιβαλλοντικές συνθήκες αναμένονται χαμηλότερες συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων GO σε υπόγεια ύδατα. Συνεπώς, θα μπορούσε να εξεταστεί το αντιμικροβιακό αποτέλεσμα εναιωρημάτων χαμηλότερων συγκεντρώσεων,

προκειμένου να εξαχθούν καλύτερα συμπεράσματα σχετικά με τον τρόπο επίδρασης της δόσης.

Επίσης, στην παρούσα μελέτη ως πληρωτικό υλικό της στήλης χρησιμοποιήθηκε χαλαζιακή άμμος, η οποία εμφανίζει χαμηλή συγγένεια με το GO, με αποτέλεσμα το GO να εμφανίζει μεγαλύτερη διαθεσιμότητα για αλληλεπίδραση με τα βακτήρια. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως άλλα αργιλικά κολλοειδή που απαντώνται σε κορεσμένα εδαφικά στρώματα εμφανίζουν μεταλύτερη τάση προσρόφησης του GO και ετεροσυσσωμάτωσης με αυτό. Δεδομένου ότι έως σήμερα δεν έχουν αποσαφιστεί οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης μεταξύ κολλοειδών και νανοσωματιδίων, καθώς και μεταξύ βιοκολλοειδών και νανοσωματιδίων, θα μπορούσε να προταθεί η διεξαγωγή αντίστοιχων πειραμάτων μεταφοράς σε κορεσμένα πορωδή μέσα πληρωμένα με διαφορετικά αργιλικά υλικά όπως καολινίτης, μοντμοριλλονίτης, προκειμένου να ελεγχθεί ο τρόπος με τον οποίο φαινόμενα όπως η προσρόφηση και η συσσωμάτωση επηρεάζουν τη δράση του GO έναντι βακτηρίων.

Η πιθανότητα αξιοποίησης υλικών της οικογένειας του γραφενίου (π.χ. οξειδίο του γραφενίου, νανοσωλήνες άνθρακα, φουλερένια κλπ), για την αναστολή του πολλαπλασιασμού και την αδρανοποίηση των παθογόνων, δύναται να χαράξει νέες προοπτικές αναφορικά με την ελεγχόμενη εφαρμογή της νανοτεχνολογίας στους τομείς της υγείας και της περιβαλλοντικής διαχείρισης. Ήδη πληθώρα τροποποιημένων ανθρακικών νανοϋλικών χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων, καλύτερων τεχνικών διήθησης (φίλτρων) και απολύμανσης νερού και λυμάτων. Συνεπώς, κάθε νέα πληροφορία που εξάγεται από τη διερεύνηση των μικροβιακών δυνατοτήτων του οξειδίου του γραφενίου θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική.

**Παράρτημα Ι: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης  
δεδομένων για όλες τις πειραματικές περιπτώσεις**

Πείραμα			Στατιστικές ροπές ανά τάξη				Κανονι- κοποιη- μένη	Ανακτώ- μενη μάζα [-]
			0 <sup>ης</sup> (min cfu/cm <sup>3</sup> )	1 <sup>ης</sup> (min <sup>2</sup> cfu/cm <sup>3</sup> )	2 <sup>ης</sup> (min <sup>3</sup> cfu/cm <sup>3</sup> )	3 <sup>ης</sup> (min <sup>4</sup> cfu/cm <sup>3</sup> )		
Μεταφορά	<i>E. coli</i>		204.32	3.54E+04	6.87E+06	1.45E+09	173.08	0.982
	<i>E. faecalis</i>		143.01	2.52E+04	4.95E+06	1.04E+09	176.28	0.671
	<i>S. aureus</i>		129.79	2.28E+04	4.50E+06	9.65E+08	175.42	0.615
	GO		174.44	3.24E+04	6.62E+06	1.45E+09	185.51	0.831
Συμμεταφορά	<i>E. coli</i> /GO	<i>E. coli</i>	76.77	1.46E+04	3.16E+06	7.57E+08	190.01	0.328
		GO	99.36	1.85E+04	3.78E+06	8.24E+08	185.82	0.485
	<i>E. faecalis</i> /GO	<i>E. faecalis</i>	79.22	1.49E+04	3.09E+06	6.97E+08	187.54	0.361
		GO	123.19	2.40E+04	5.03E+06	1.12E+09	194.44	0.688
	<i>S. aureus</i> /GO	<i>S. aureus</i>	120.25	2.20E+04	4.59E+06	1.07E+09	182.33	0.527
		GO	36.67	6.56E+03	8.41E+05	-6.88E+07	178.79	36.67
	<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	235.59	4.44E+04	9.49E+06	2.22E+09	188.35	1.003
		<i>E. faecalis</i>	151.74	2.89E+04	6.25E+06	1.49E+09	190.33	0.648
		<i>S. aureus</i>	178.9	3.26E+04	6.81E+06	1.58E+09	182.22	0.683
	<i>E. coli</i> / <i>E. faecalis</i> / <i>S. aureus</i> /GO	<i>E. coli</i>	126.05	2.30E+04	4.77E+06	1.08E+09	182.69	0.553
		<i>E. faecalis</i>	101.41	1.95E+04	4.20E+06	9.84E+08	192.29	0.445
		<i>S. aureus</i>	105.02	1.89E+04	3.90E+06	8.85E+08	180.4	0.461
		GO	83.09	1.54E+04	2.80E+06	4.23E+08	185.08	0.364