



Πολυτεχνείο Κρήτης
Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος

«ΕΛΕΓΧΟΣ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑΣ ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ (Zn) ΚΑΙ ΧΑΛΚΟΥ (Cu) ΣΕ ΒΑΚΤΗΡΙΑ ΕΔΑΦΟΥΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΝΟΥ ΝΕΡΟΥ»

Διπλωματική εργασία

ΝΙΟΛΑΚΗ ΜΑΡΙΑ
Α.Μ. : 2013050092

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:
ΒΕΝΙΕΡΗ ΔΑΝΑΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ)
ΓΚΙΚΑΣ ΠΕΤΡΟΣ
ΧΡΥΣΙΚΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΧΑΝΙΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

« Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για μη κερδοσκοπικό σκοπό, εκπαιδευτικού ή ερευνητικού χαρακτήρα, με την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για άλλη χρήση θα πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σε αυτό το έγγραφο εκφράζουν τον συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευθεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Πολυτεχνείου Κρήτης. »

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιομηχανοποίηση βελτίωσε τις συνθήκες ζωής των ανθρώπων, ωστόσο προκάλεσε σοβαρά προβλήματα ρύπανσης. Μια από τις αρνητικές επιπτώσεις της βιομηχανοποίησης είναι η ρύπανση με βαρέα μέταλλα. Τα βαρέα μέταλλα αποτελούν μια σοβαρή απειλή για το περιβάλλον και την ανθρώπινη υγεία λόγω του μεγάλου χρόνου παραμονής τους στο περιβάλλον, καθώς είναι μη διασπάσιμα και έχουν την τάση να βιοσυσσωρεύονται. Τα πιο συνήθη βαρέα μέταλλα είναι τα ακόλουθα: ψευδάργυρος, χαλκός, μόλυβδος, υδράργυρος, χρώμιο, νικέλιο και αρσενικό. Αυτά καταλήγουν στον υπόγειο υδροφόρο και το έδαφος είτε από τα νερά της βροχής είτε από την απευθείας απόρριψη ανεπεξέργαστων βιομηχανικών αποβλήτων. Παρόλη, την πρόοδο της επιστήμης και τεχνολογίας δεν έχουν επιλυθεί όλα τα προβλήματα της βιομηχανοποίησης.

Για την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής στρατηγικής βιοαποκατάστασης των ρυπασμένων περιοχών είναι απαραίτητη η απομόνωση αλλά και ο χαρακτηρισμός μικροοργανισμών ικανών να αντιστέκονται σε υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η απομόνωση περιβαλλοντικών βακτηρίων και ο έλεγχος της δυνατότητάς τους να απομακρύνουν Ψευδάργυρο και Χαλκό από υδατικά δείγματα.

Αρχικά, διερευνήθηκε η αλληλεπίδραση μεταξύ των βαρέων μετάλλων και των βακτηρίων και στη συνέχεια, μελετήθηκε ο βαθμός απομάκρυνσης των βαρέων μετάλλων με τη δράση των μικροοργανισμών σε δείγμα θαλασσινού νερού.

Απομονώθηκαν βακτηριακά στελέχη από το θαλασσινό νερό και από το έδαφος από διάφορες περιοχές του Νομού Χανίων. Τα βαρέα μέταλλα που χρησιμοποιήθηκαν βρίσκονταν υπό τη μορφή αλάτων και ήταν ο θειϊκός ψευδάργυρος ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) και ο θειϊκός χαλκός ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Το εύρος των συγκεντρώσεων, που μελετήθηκε, για τον Ψευδάργυρο ήταν από 1,5 mg/L έως 200 mg/L και για τον Χαλκό ήταν από 0,01 mg/L έως 1,25 mg/L.

Η ανθεκτικότητα των μικροοργανισμών εξετάστηκε βάσει της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (Minimum Inhibitory Concentration – MIC). Για τον προσδιορισμό της ανθεκτικότητας των μικροοργανισμών, εφαρμόστηκε η μέθοδος των μικρο-αραιώσεων σε θρεπτικό ζωμό (Broth Microdilution Method), η οποία βασίστηκε στο πρωτόκολλο CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Μεταξύ των μετάλλων που εξετάστηκαν, παρατηρήθηκε ότι ο Χαλκός είναι πιο τοξικός από τον Ψευδάργυρο, συνεπώς τα βακτήρια φάνηκαν να παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά ανθεκτικότητας στον Ψευδάργυρο. Καθώς ο Χαλκός προκαλούσε μείωση του πληθυσμού των περισσότερων βακτηρίων από την μικρότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Αναλυτικότερα, η τοξική συγκέντρωση (MIC_{60}) του Ψευδαργυρού για τα περισσότερα βακτήρια, που απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό, κυμαίνονταν από 100 mg/L έως 150 mg/L ενώ του Χαλκού κυμαίνονταν από 0,04 mg/L έως 0,62 mg/L.

Για τα βακτήρια, που απομονώθηκαν από το έδαφος, βρέθηκε ότι η τοξική συγκέντρωση (MIC_{60}) του Ψευδαργύρου κυμαίνονταν από 50 mg/L έως 75 mg/L, ενώ του Χαλκού κυμαίνονταν από 0,01 mg/L έως 0,04 mg/L.

Στο στάδιο της βιοαποκατάστασης του θαλασσινού νερού, που έχει υποστεί ρύπανση από τα εξεταζόμενα μέταλλα, για να βρεθεί η τελική συγκέντρωση μετάλλου στο θαλασσινό νερό, εφαρμόστηκε η μέθοδος της ICP-MS. Παρατηρήθηκε ότι η δράση των βακτηρίων ήταν αρκετά αποτελεσματική για την απομάκρυνση του Ψευδαργύρου (επί τοις εκατό απομάκρυνση Ψευδαργύρου από 82% και άνω). Η απομάκρυνση του Χαλκού δε δοκιμάστηκε, διότι τα βακτήρια κατά το στάδιο του εγκλιματισμού τους στο μέταλλο αυτό, παρουσίαζαν αργή ανάπτυξη, αλλά και μείωση του πληθυσμού τους μετά το πέρας των επτά (7) ημερών.

ABSTRACT

Industrialization has improved the human living conditions however it has caused severe pollution problems. One of these negative impacts was heavy metal pollution. Heavy metals constitute a serious threat to the environment and public health mainly because of their long term exposure to the environment and their bioaccumulation. Most common heavy metals are the following: zinc, copper, lead, mercury, chromium, nickel and arsenic. These end up into the ground water and the soil either from rainfall or directly from disposal of unprocessed industrial waste. Besides scientific and technological progress all industrialization problems are yet to be resolved.

An efficient bioremediation strategy for the resoration of polluted areas requires specific environmental microorganisms that are resistant to high concentrations of heavy metals.

The main objective of the present study was to isolate environmental bacteria and to assess their ability to remove Zn and Cu from aquatic samples.

Firstly, bacteria were isolated from soil and seawater and the interaction between them and heavy metals was studied. Secondly the resistant bacterial isolates were tested for their efficiency to remove Zn and Cu from seawater samples.

Bacteria strains were isolated from seawater and soil from various areas of Chania region. Heavy metals used were in the form of salts, zinc sulphate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and copper sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). The concentration range, that was examined, for the Zinc was from 1.5 mg/L to 200mg/L and for the Copper was from 0.01 mg/L to 1,25mg/L.

The resistance of microorganisms was tested based on the Minimum Inhibitory Concentration (MIC_{60}). For that purpose the microdilution method was applied to nutrient broth (Broth Microdillution), based on the CLSI protocol (Clinical and Laboratory Standards Institute).

Among metals examined, it was observed that copper is more toxic than zinc, therefore bacteria appeared to exhibit higher resistance against Zinc. As copper causes a reduction of most bacteria population of the minimum concentration examined.

Specifically, toxic concentration (MIC_{60}) of Zinc for most bacteria, isolated from seawater, varied from 100 mg/L to 150 mg/L while Cu concentration varied from 0.04 mg/L to 0.62 mg/L.

For bacteria isolated from soil, it was found that toxic concentration (MIC_{60}) of Zinc varied from 50 mg/L to 75 mg/L while Cu concentration varied from 0.01 mg/L to 0.04 mg/L.

During bioremediation experiments seawater samples were spiked with the metals of our interest and subsequently, were inoculated with the resistant bacterial strains. The metal concentration was measured applying the ICP-MS method. It was observed that bacteria were highly effective for Zinc removal (higher than 82% Zinc removal). On the other hand, Copper removal was not tested because bacteria at acclimation stage in this metal displayed slow growth but also a decrease in their population after seven (7) days of incubation.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όσους συνέλαβαν στην υλοποίηση της παρούσας διπλωματικής εργασίας στα πλαίσια των προπτυχιακών σπουδών μου στο Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω την εργασία αυτή.

Από καρδιάς ευχαριστώ την Επιβλέπουσα καθηγήτρια κυρία Βενιέρη Δανάη για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση, την προσφορά σε εκπαιδευτικό υλικό αλλά και την επίβλεψη κατά τη διάρκεια της εργασίας.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στην κυρία Γουνάκη Ιωσηφίνα που χωρίς την υπομονή και την πολύτιμη βοήθειά της δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση των εργαστηριακών πειραμάτων αλλά και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Υδρογεωχημικής Μηχανικής και Αποκατάστασης Εδαφών του κυρίου Νικολαΐδη Νικόλαου για τη διεκπεραίωση ορισμένων εργαστηριακών αναλύσεων.

Ακόμη, θα ήθελα ευχαριστήσω τον κύριο Χρυσικόπουλο Κωνσταντίνο και τον κύριο Γκίκα Πέτρο για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την αξιολόγηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ από καρδιάς την οικογένειά μου για την δυνατότητα που μου προσέφερε να φοιτήσω, αλλά και την ψυχολογική υποστήριξη που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ.....	10
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	12
1.2 ΠΗΓΕΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ	14
1.2.1 Φυσικές πηγές.....	14
1.2.2 Γεωργικές πηγές	15
1.2.3 Βιομηχανικές πηγές.....	15
1.2.4 Αστικές πηγές	15
1.3 ΓΙΑΤΙ ΕΛΕΓΧΟΥΜΕ ΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	17
1.4 ΡΥΠΑΝΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΜΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	20
1.5 ΧΑΛΚΟΣ- ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ	23
1.5.1 Χαλκός (Copper- Cu).....	23
1.5.2 Ψευδάργυρος (Zinc- Zn)	24
1.6 ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.....	25
1.6.1 Βιοπροσρόφηση (Biosorption) και Βιοσυσσώρευση (Bioaccumulation).....	26
1.6.2 Αναγωγή (Reduction)	27
1.6.3 Μεθυλίωση (Methylation)	27
1.6.4 Κατακρήμνιση (Precipitation)	27
ΣΚΟΠΟΣ	29
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	30
3.1 ΥΛΙΚΑ	30
3.1.1 Εργαστηριακά υλικά.....	30
3.1.2 Θρεπτικά υλικά.....	30
3.1.3 Συσκευές και Όργανα	30
3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	31
3.2.1 Δειγματοληψία.....	31
3.2.2 Απομόνωση βακτηριακών στελεχών	31
3.2.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας.....	32
3.2.4 Έλεγχος απομάκρυνσης.....	35

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ	38
4.1 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ	38
4.1.1 Βακτήρια που απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό.....	38
4.1.2 Βακτήρια που απομονώθηκαν από το έδαφος	39
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΜΕΤΑΛΛΑ.....	40
4.2.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Ψευδαργύρου.....	40
4.2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Χαλκού	43
4.2.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων εδάφους στο άλας Ψευδαργύρου	45
4.2.4 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων εδάφους στο άλας Χαλκού	48
4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (MIC ₆₀ , MBC) ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΚΑΙ ΧΑΛΚΟΥ.....	51
4.3.1 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου σε βακτήρια θαλασσινού νερού	51
4.3.2 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου σε βακτήρια εδάφους	53
4.3.3 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Χαλκού σε βακτήρια θαλασσινού νερού	55
4.4 ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΜΕΣΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ ..	57
4.4.1 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Ψευδαργύρου	57
4.4.2 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο άλας Ψευδαργύρου.....	58
4.4.3 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Χαλκού	59
4.4.4 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο άλας Χαλκού	60
4.5 ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΠΟΥ ΕΧΕΙ ΥΠΟΣΤΕΙ ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	61
4.5.1 Δοκιμή βιοαποκατάστασης νερού που έχει υποστεί ρύπανση από Ψευδάργυρο.....	62
4.5.2 Δοκιμή βιοαποκατάστασης νερού που έχει υποστεί ρύπανση από Χαλκό	64
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	66
6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ	69
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70
7.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	70
7.2 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	72

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Περιοχές δειγματοληψίας	31
Πίνακας 2: Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα	31
Πίνακας 3: Εύρος συγκεντρώσεων μετάλλων	32
Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις μετάλλων κατά τον εγκλιματισμό των ανθεκτικών βακτηρίων ..	35
Πίνακας 5: Συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS	36
Πίνακας 6: Ονοματολογία βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό	38
Πίνακας 7: Ονοματολογία βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν από το έδαφος	39
Πίνακας 8: Ποσοστό απομάκρυνσης του Ψευδαργύρου από το θαλασσινό νερό.....	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Σχέση επικινδυνότητας και συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στους ζώντες οργανισμούς.....	13
Εικόνα 2: Βιοσυσσώρευση βαρέων μετάλλων στις ρίζες των καλλιεργούμενων φυτών	14
Εικόνα 3: Προϊόντα νοικοκυριού που περιέχουν βαρέα μέταλλα	16
Εικόνα 4: Φάσεις παρουσίας βαρέων μετάλλων και ευνοϊκές συνθήκες ανά φάση	18
Εικόνα 5: Τρόποι μεταφοράς βαρέων μετάλλων στον άνθρωπο.....	19
Εικόνα 6: Πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τον άνθρωπο	19
Εικόνα 7: Σειρά τοξικότητας κυριότερων βαρέων μετάλλων.....	20
Εικόνα 8: Ρύπανση από βαρέα μέταλλα	22
Εικόνα 9: Οι κυριότερες κατηγορίες ρύπων στο έδαφος και στα υπόγεια νερά. Στοιχεία Ευρωπαϊκής Επιτροπής Περιβάλλοντος, 2011.....	25
Εικόνα 10: Καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό ζωμό (Nutrient Broth)	33
Εικόνα 11: Διάταξη της πλακέτας μικρο-τιτλοδότησης.....	34
Εικόνα 12: Τα μέρη ενός φασματόμετρου μάζας με απαγωγικά συζευγμένο πλάσμα.....	37

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών E. coli παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.....	40
Διάγραμμα 2: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών Enterococcus sp. παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου..	42
Διάγραμμα 3: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών E. coli παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.	43
Διάγραμμα 4: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών Enterococcus sp. παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.	44
Διάγραμμα 5: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.....	45
Διάγραμμα 6: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.....	46
Διάγραμμα 7: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.....	47
Διάγραμμα 8: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.	48
Διάγραμμα 9: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.	49
Διάγραμμα 10: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.	50
Διάγραμμα 11: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του θαλασσινού νερού παρουσία Ψευδαργύρου	52
Διάγραμμα 12: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του εδάφους παρουσία Ψευδαργύρου.	54
Διάγραμμα 13: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του θαλασσινού νερού παρουσία Χαλκού	55
Διάγραμμα 14: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του εδάφους παρουσία Χαλκού	56
Διάγραμμα 15: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων νερού στο Ψευδάργυρο κατά το στάδιο εγκλιματισμού	57
Διάγραμμα 16: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο Ψευδάργυρο κατά το στάδιο εγκλιματισμού	58
Διάγραμμα 17: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων νερού στο Χαλκό κατά το στάδιο εγκλιματισμού	59
Διάγραμμα 18: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο Χαλκό κατά το στάδιο του εγκλιματισμού.....	60
Διάγραμμα 19: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων νερού σε θαλασσινό νερό παρουσία Ψευδαργύρου	62
Διάγραμμα 20: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων εδάφους σε θαλασσινό νερό παρουσία Ψευδαργύρου	62

Διάγραμμα 21: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων νερού σε θαλασσινό νερό παρουσία Χαλκού	64
Διάγραμμα 22: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων εδάφους σε θαλασσινό νερό παρουσία Χαλκού	64

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα βαρέα μέταλλα αν και συνιστούν μαζί με τα ραδιενεργά και τα συνθετικά οργανικά τις τρεις κυριότερες ομάδες ρύπων στο περιβάλλον, είναι φυσικά συστατικά του στερεού φλοιού της Γης.

Τυπικά, ως βαρέα μέταλλα χαρακτηρίζονται τα χημικά ανόργανα σταθερά στοιχεία, τα οποία έχουν Σχετική Ατομική Μάζα μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του σιδήρου (Fe). Συναντώνται τόσο στους βιοτικούς οργανισμούς, όσο και στην αβιοτική ύλη (στον φλοιό της Γης). Τα κυριότερα στοιχεία που ανήκουν σε αυτή τη κατηγορία είναι ο χαλκός (Cu), ο ψευδάργυρος (Zn), ο σίδηρος (Fe), το χρώμιο (Cr), το κάδμιο (Cd), το νικέλιο (Ni), ο υδράργυρος (Hg) και ο μόλυβδος (Pb). Η τοξικότητά τους ποικίλει από στοιχείο σε στοιχείο. Τα βασικότερα χαρακτηριστικά τους είναι :

- η τάση τους να συσσωρεύονται σε περιβάλλοντα με υψηλά pH και
- η μειωμένη δυνατότητα απομάκρυνσής τους από αυτά. [Νικηφόρου, 2013]

Τα περισσότερα βαρέα μέταλλα απαντώνται στη φύση σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (μικρότερες από 1 ppm (μg/mL)) και χαρακτηρίζονται ως **ιχνοστοιχεία**. Εξαιρέση αποτελούν δύο μέταλλα, ο σίδηρος και το αργίλιο, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στη λιθόσφαιρα σε συγκεντρώσεις εκφραζόμενες σε επί τις εκατό κατά βάρος. Παρά τις χαμηλές συγκεντρώσεις τους, επηρεάζουν σημαντικά τις μεταβολικές διεργασίες αλλά και τη φυσιολογία των οργανισμών.

Τα βαρέα μέταλλα, ανάλογα με την χρησιμότητά τους στους έμβιους οργανισμούς, μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής τρεις κατηγορίες:

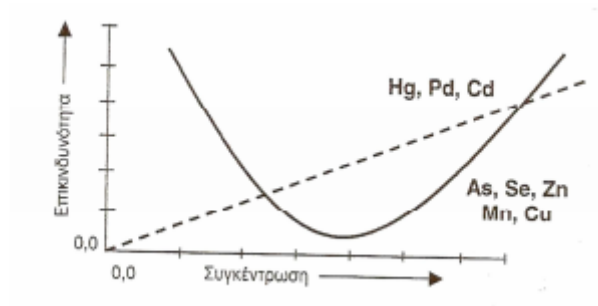
- Απαραίτητα: Τα μέταλλα αυτά είναι απαραίτητα για την επιβίωση και τη φυσιολογική λειτουργία κάποιων έμβιων οργανισμών (όπως ασβέστιο, κάλιο, σίδηρος, ψευδάργυρος, μαγνήσιο).
- Ωφέλιμα: Κάποιοι οργανισμοί επωφελούνται από την ύπαρξή τους, χωρίς όμως να είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους (όπως σελήνιο, βανάδιο).
- Μη απαραίτητα: Δεν είναι γνωστή κάποια χρήσιμη λειτουργία τους, ενώ εάν υπερβούν κάποια συγκέντρωση μπορούν να γίνουν τοξικά (όπως κάδμιο, υδράργυρος, μόλυβδος, αρσενικό).

Τα μεταλλικά στοιχεία που δεν χρησιμοποιεί ο οργανισμός ή/και είναι τοξικά για αυτόν αντικαθιστούν τα ωφέλιμα ιχνοστοιχεία στα ενεργά κέντρα των ενζύμων και προκαλούν μία σειρά από ανεπιθύμητες επιδράσεις. Η κυριότερη ιδιότητα που τα καθιστά επικίνδυνα είναι ότι δομικά μοιάζουν με τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία και έτσι ο

οργανισμός δε μπορεί να τα ξεχωρίσει με αποτέλεσμα να τα δεσμεύει και να τα κατακρατά στους ιστούς του, προκαλώντας συσσώρευση και τοξικότητα.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να σημειωθεί ότι από τα τριάντα (30) απαραίτητα στοιχεία για τη ζωή μόλις δεκαεπτά (17) από αυτά είναι μέταλλα και τέσσερα (4) μεταλλοειδή. [Κρουσταλά, 2010]

Ορισμένα βαρέα μέταλλα, όπως ο χαλκός, ο ψευδάργυρος, το νικέλιο, είναι απαραίτητα για τον μεταβολισμό του ανθρώπινου σώματος σε χαμηλές μόνο συγκεντρώσεις, καθώς σε υψηλές καθιστώνται ιδιαίτερα τοξικά. Πιο συγκεκριμένα, ο χαλκός είναι σημαντικός για την αιμοκυανίνη (ουσία που συναντάται στους ασπόνδυλους οργανισμούς για τη μεταφορά οξυγόνου), ο ψευδάργυρος είναι σημαντικός για τη λειτουργία διαφόρων ενζύμων, ο σίδηρος περιέχεται στην αιμοσφαιρίνη (ουσία που συμβάλλει στη μεταφορά οξυγόνου στα σπονδυλωτά) και το κοβάλτιο περιέχεται στη βιταμίνη B₁₂. Άλλα στοιχεία, όπως είναι ο μόλυβδος, το κάδμιο και ο υδράργυρος είναι τοξικά ανεξαρτήτου συγκέντρωσης. Έτσι, επιβεβαιώνεται η βασική αρχή της τοξικολογίας του Παράκελσου (1493-1541) ότι : **«Όλες οι ουσίες είναι δηλητήρια, αλλά η τοξική δράση τους διαφοροποιείται από τη δόση»**. [Κουϊμτζης, 1998]



Εικόνα 1: Σχέση επικινδυνότητας και συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων στους ζώντες οργανισμούς (Πηγή: Ανδρέου, 2010)

1.2 ΠΗΓΕΣ ΡΥΠΑΝΣΗΣ ΒΑΡΕΩΝ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Τα τελευταία χρόνια η σύγχρονη βιομηχανική ανάπτυξη οδήγησε στο σχηματισμό επικίνδυνων χημικών ουσιών, που ελευθερώθηκαν στο περιβάλλον, οι οποίες είναι γνωστές ως χημικοί ρυπαντές. Οι ουσίες αυτές αποτελούν αντικείμενο πολλών επιστημονικών ερευνών, αφού μέσω του εδάφους και του αέρα περνάνε στα φυτά και στα ζώα και ακολούθως στη τροφική αλυσίδα. Στη κατηγορία αυτή ανήκουν και τα βαρέα μέταλλα.

Τα βαρέα μέταλλα εισχωρούν στον υδροφόρο ορίζοντα από τα νερά της βροχής ή τα ανεπεξέργαστα βιομηχανικά απόβλητα, βιοσυσσωρευόμενα έτσι στα καλλιεργούμενα φυτά, αλλά και στα ζώα που τρέφονται με το ρυπασμένο χορτάρι. Με αυτό τον τρόπο εισέρχονται στον οργανισμό μας μέσω της διατροφής και είναι πολύ δύσκολο στη σημερινή εποχή να αποφύγει κανείς την επαφή ή την έκθεση σε οποιοδήποτε από τα πολλά επιβλαβή βαρέα μέταλλα που έχουν βιοσυσσωρευτεί στο περιβάλλον. [Σαμαρίδης, 2009]



Εικόνα 2: Βιοσυσσώρευση βαρέων μετάλλων στις ρίζες των καλλιεργούμενων φυτών (Πηγή: www.greenmed.gr)

Οι πηγές ρύπανσης από τα βαρέα μέταλλα διακρίνονται στις εξής κατηγορίες :

1.2.1 Φυσικές πηγές

Κατά τις φυσικές διεργασίες αποσάθρωσης και διάβρωσης των πετρωμάτων και του εδάφους απελευθερώνονται συχνά βαρέα μέταλλα στα υδάτινα οικοσυστήματα και στον αέρα. Άλλες μη σημειακές συνεισφορές προέρχονται από τη σήψη των φυτών και τα κατάλοιπα των ζώων, την ατμοσφαιρική εναπόθεση των αερομεταφερόμενων σωματιδίων από την ηφαιστειακή δραστηριότητα, τη διάβρωση που προκαλεί ο αέρας, τον καπνό της δασικής πυρκαγιάς, τα εκκρίματα των φυτών, και άλλα. Λόγω των φυσικών πηγών, τα φυσικά επιφανειακά νερά περιέχουν πάντοτε ίχνη μετάλλων. [Dieter, 1997]

1.2.2 Γεωργικές πηγές

Στις γεωργικές πηγές βαρέων μετάλλων συμπεριλαμβάνεται η χρήση οργανικών και ανόργανων λιπασμάτων, η προσθήκη ασβεστίου προκειμένου να αυξηθεί το pH του εδάφους, η λάσπη επεξεργασμένων αποβλήτων και τα μικροβιοκτόνα- μυκητοκτόνα. Τα ανόργανα (φωσφορικά άλατα) λιπάσματα έχουν διαφορετικά επίπεδα Cd, Cr, Ni, Pb και Zn. Το Cd συσσωρεύεται στα φύλλα πολλών φυτών και μπορεί να καταναλωθεί ως τροφή από τα ζώα και τον άνθρωπο. Η λάσπη επεξεργασμένων αποβλήτων έχει υψηλή συγκέντρωση σε Zn, Cr, Pb, Ni, Cd και Cu. Το έδαφος μπορεί να μολυνθεί με μόλυβδο και κάδμιο από το νερό άρδευσης. Η μόλυνση καθώς και η συσσώρευση εξαρτώνται από τη πηγή προέλευσης του νερού (βαθιά θέσεις, ποτάμια, λίμνες ή αρδευτικά κανάλια). [Υψηλάντη, 2012]

1.2.3 Βιομηχανικές πηγές

Οι μεγαλύτερες ποσότητες βαρέων μετάλλων, που καταλήγουν είτε στα ύδατα είτε στα εδάφη, προέρχονται κυρίως από τη βιομηχανία. Οι κυριότερες βιομηχανικές πηγές μόλυνσης είναι τα μεταλλουργεία, η βιομηχανία παραγωγής χρωμάτων, παρασιτοκτόνων, πυρομαχικών, υφασμάτων και ηλεκτρονικών ειδών και η επεξεργασία χαρτιού, ξύλου και πλαστικού. Οι βιομηχανίες αυτές χρησιμοποιούν πλήθος βαρέων μετάλλων είτε ως πρώτη ύλη είτε ως καταλύτες. [Ανδρέου, 2010], [Υψηλάντη, 2012]

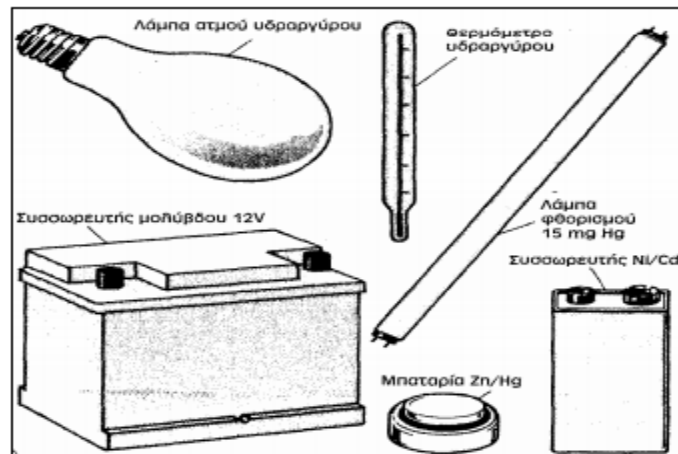
1.2.4 Αστικές πηγές

Τα αστικά λύματα περιέχουν σημαντικές ποσότητες βαρέων μετάλλων, τα οποία προέρχονται κυρίως από την κατανάλωση βιομηχανικών προϊόντων και τη χρήση ορισμένων απορρυπαντικών. Η άσκοπη εισαγωγή ανεπεξέργαστων αστικών λυμάτων ή βιομηχανικών αποβλήτων στα ύδατα επιβαρύνει σημαντικά τα υδάτινα οικοσυστήματα και κατ' επέκταση τον άνθρωπο.

Επιπλέον, οι χώροι απόρριψης στερεών αποβλήτων (βιομηχανικών και αστικών) καθώς και η εσφαλμένη χρήση αγροχημικών ουσιών οδηγούν στη δημιουργία διηθημάτων, τα οποία επιβαρύνουν σημαντικά τα υπόγεια ύδατα με βαρέα μέταλλα.

Ακόμη, διάφορες ανθρώπινες εκπομπές μπορούν να τροφοδοτήσουν την ατμόσφαιρα με μεγάλες ποσότητες βαρέων μετάλλων. Οι δασικές πυρκαγιές, οι καύσεις φυσικών καυσίμων όπως πετρελαίου και κάρβουνου, οι εκπομπές από τα μέσα μεταφοράς και οι σταθμοί παραγωγής ενέργειας με την καύση υδρογονανθράκων, η αποτέφρωση απορριμάτων προκαλούν αύξηση των συγκεντρώσεων των βαρέων μετάλλων στο περιβάλλον. Έχει εκτιμηθεί ότι η καύση του κάρβουνου είναι υπεύθυνη για την εναπόθεση περίπου 34% Cd και 31% Ni στο έδαφος. Επίσης, η καύση πετρελαίου θέρμανσης συμβάλλει στην αύξηση του Fe, Ni και Pb.

Τα βαρέα μέταλλα καταλήγουν στον άνθρωπο μέσω της αναπνευστικής και της διαδερμικής οδού, καθώς αυτός εκτίθεται σε ρυπασμένο περιβάλλον εισπνέει αιωρούμενα σωματίδια ή υδρατμούς και πλήθος αερίων διαπερνούν τους πόρους του δέρματός του. [Υψηλάντη, 2012]



Εικόνα 3: Προϊόντα νοικοκυριού που περιέχουν βαρέα μέταλλα (Πηγή : Μαντέλα, 2007)

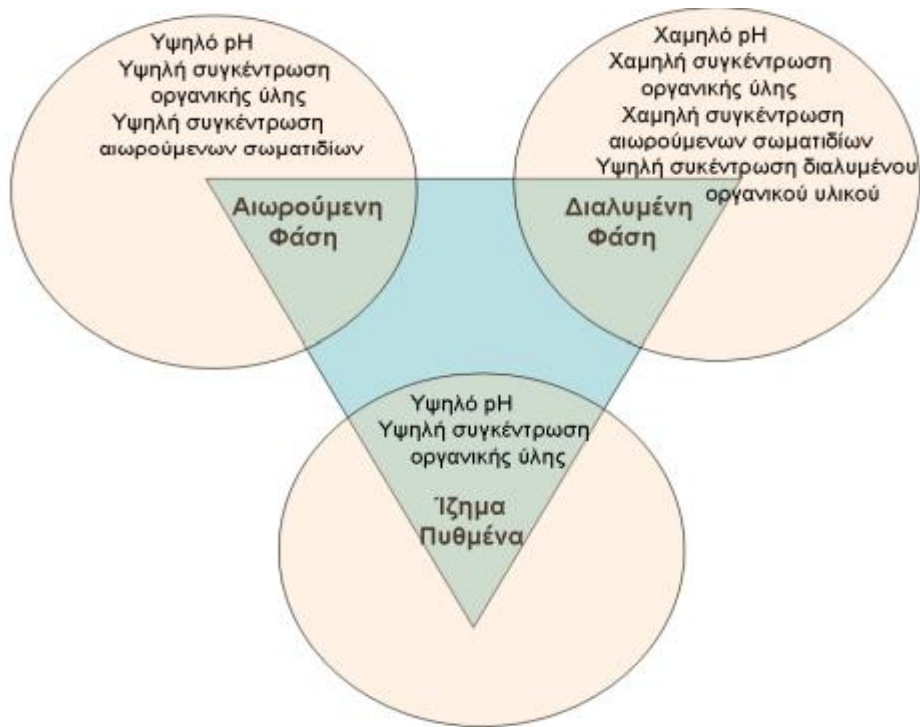
1.3 ΓΙΑΤΙ ΕΛΕΓΧΟΥΜΕ ΤΑ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα βαρέα μέταλλα βρίσκονται είτε σε **διαλυμένη** είτε σε **αιωρούμενη** φάση στο περιβάλλον. Μεγαλύτερη **βιοδιαθεσιμότητα** στους οργανισμούς έχουν τα **διαλυμένα** βαρέα μέταλλα. Τα βαρέα μέταλλα έχουν την ικανότητα με ιδιαίτερη ευκολία να μετασχηματίζονται, δηλαδή να περνάνε από τη μία φάση στην άλλη. Οι κυριότερες διεργασίες μετασχηματισμού τους είναι η προσρόφηση (adsorption), η συμπλοκοποίηση (complexation), η κατακρήμνιση (precipitation) και η βιολογική πρόσληψη (biological uptake). Η προσρόφηση είναι συνήθως η κυρίαρχη διεργασία καθώς τα μέταλλα έχουν τη τάση να προσροφώνται από το οργανικό υλικό και τα λεπτόκοκκα αιωρούμενα σωματίδια. Τα διαλυμένα μέταλλα σε αντίθεση με τα αιωρούμενα έχουν τη δυνατότητα της ταχύτατης ιοντοανταλλαγής αλλά και της μείξης με το νερό κυρίως σε ανοικτές θάλασσες κι έτσι ελαττώνουν σταδιακά τις συγκεντρώσεις τους. [Γρηγορόπουλος, 2005]

Η διαλυμένη φάση ευνοείται από το χαμηλό pH, το χαμηλό φορτίο αιωρούμενων σωματιδίων και τις υψηλές συγκεντρώσεις διαλυμένου οργανικού υλικού. Το χαμηλό pH είναι σημαντικό, διότι:

- i. Η διαλυτοποίηση των υδροξειδίων των μετάλλων αυξάνει όσο το pH ελαττώνεται
- ii. Η προσρόφηση των στερεών επιφανειών των αιωρούμενων σωματιδίων μειώνεται, και
- iii. Τα κατιόντα υδρογόνου ανταγωνίζονται με τα μέταλλα για τη συμμετοχή τους στα μόρια οργανικών ουσιών.

Επιπλέον, η αύξηση της αλατότητας συνεπάγεται με μείωση των διαλυμένων συγκεντρώσεων βαρέων μετάλλων καθώς τα οργανικά μόρια και τα λεπτόκοκκα αιωρούμενα υλικά σχηματίζουν συσσωματώματα αποκτώντας υψηλή ταχύτητα καταβύθισης. Οι συνθήκες υψηλού pH και οι αυξημένες συγκεντρώσεις αιωρούμενου οργανικού υλικού ευνοούν την αιωρούμενη φάση των βαρέων μετάλλων και τη τελική μεταφορά τους στο πυθμένα. [Hellowell, 1988]

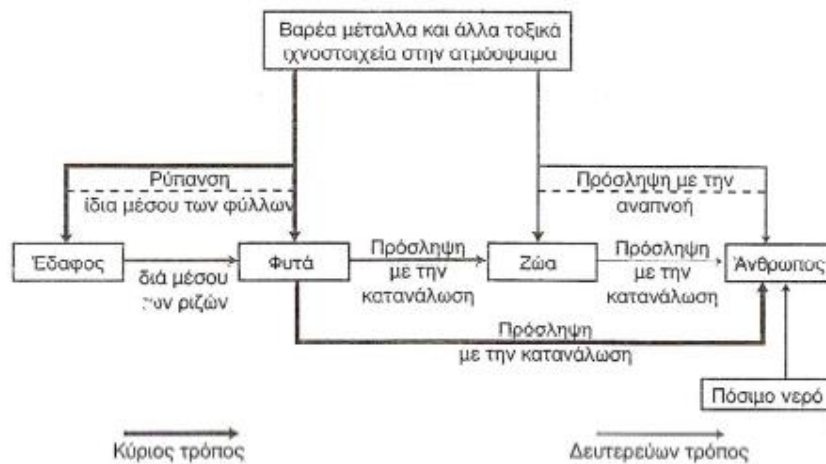


Εικόνα 4: Φάσεις παρουσίας βαρέων μετάλλων και ευνοϊκές συνθήκες ανά φάση (Πηγή: www.lenntech.gr)

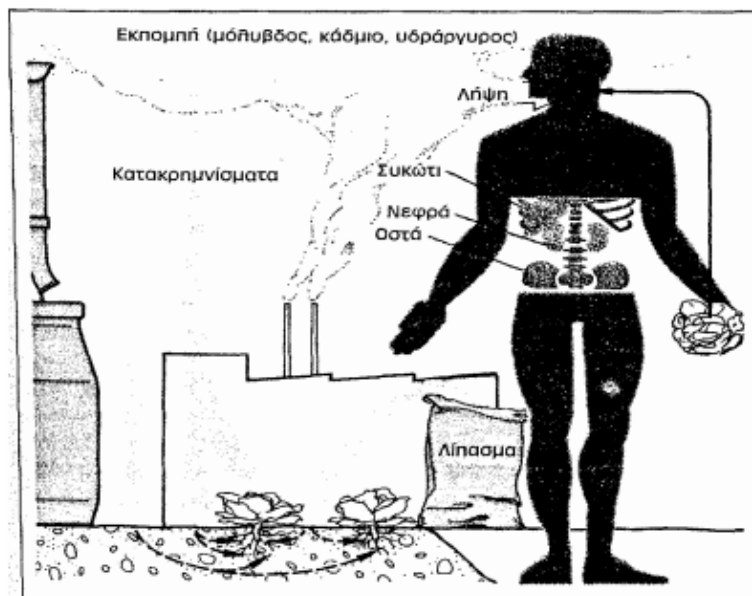
Τα βαρέα μέταλλα θεωρούνται **συντηρητικοί ρύποι**, διότι δε διασπώνται εύκολα από τους μικροοργανισμούς ή τα βακτήρια, αλλά διατηρούν τη χημική τους σύσταση. Οι περισσότεροι ζωικοί και φυτικοί οργανισμοί έχουν την ικανότητα να ελέγχουν – ως ένα βαθμό – τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στον οργανισμό τους. Παρόλα αυτά, τα μέταλλα που δεν αποβάλλονται φυσικά από τους οργανισμούς, παραμένουν σε αυτούς και συσσωρεύονται εκλεκτικά σε ορισμένους ιστούς τους (όπως συκώτι, νεφρά) (**Βιο-συσσώρευση ή Bioaccumulation**). Επειδή δεν είναι όλοι οι μικροοργανισμοί ανθεκτικοί στη βιοσυσσώρευση, παρουσιάζεται μείωση της βιοποικιλότητας. [Κοκκόρης, 2014]

Οι ζωικοί οργανισμοί μέσω της **τροφικής αλυσίδας** καταναλώνουν βιο-συσσωρευτές προσλαμβάνοντας έτσι βαρέα μέταλλα, τα οποία μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας σε οργανισμούς που βρίσκονται σε ένα ανώτερο επίπεδο. Οι οργανισμοί αυτοί μέσω της διατροφής αυξάνουν τις συγκεντρώσεις των βαρέων μετάλλων στους ιστούς τους, λόγω βιο-συσσώρευσης. Συνεπώς, οι οργανισμοί που βρίσκονται στη κορυφή της τροφικής αλυσίδας και έχουν τη μεγαλύτερη διάρκεια ζωής βιο-συσσωρεύουν στους ιστούς τους και τις υψηλότερες συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων (**Βιο-μεγέθυνση ή Biomagnification**) . [Κίρλαππου, 2004]

Τα βαρέα μέταλλα μπορούν να μεταφερθούν από την ατμόσφαιρα στο έδαφος και στο υπεργείο μέρος των φυτών μέσω της βροχής και της μεταφοράς αιωρούμενων σωματιδίων. Το έδαφος αποτελεί τον τελικό αποδέκτη των βαρέων μετάλλων από τις διάφορες πηγές ρύπανσης. Από το καλλιεργούμενο έδαφος, οι τοξικές αυτές ουσίες, μεταφέρονται στο παραγόμενο φυτό και καταλήγουν στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές. Στη συνέχεια, τα βαρέα μέταλλα που περιέχονται στις τροφές φυτικής προέλευσης και στις ζωοτροφές μεταφέρονται μέσω των βιοϊστών στους επόμενους κρίκους της τροφικής αλυσίδας. [Σαμαρίδης, 2009], [Allen, 1998]



Εικόνα 5: Τρόποι μεταφοράς βαρέων μετάλλων στον άνθρωπο (Πηγή: Σαμανίδου, 1988)



Εικόνα 6: Πρόσληψη βαρέων μετάλλων από τον άνθρωπο (Πηγή: Φυτιανός, 1988)

1.4 ΡΥΠΑΝΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΜΕ ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

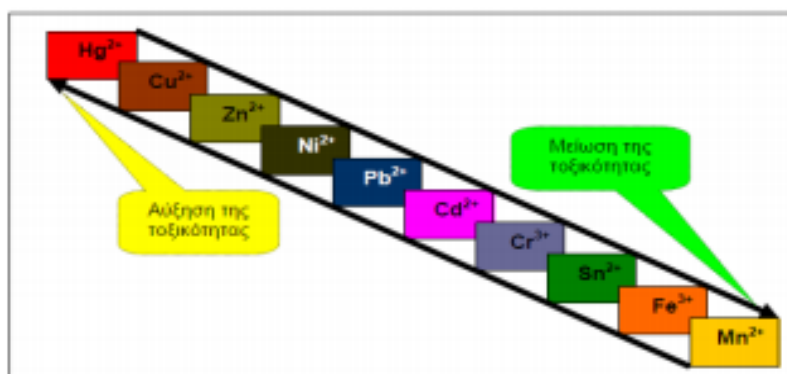
Τα βαρέα μέταλλα είναι μία μη ορατή αλλά αρκετά σημαντική μορφή ρύπανσης τόσο για το θαλάσσιο όσο και για το χερσαίο περιβάλλον εξαιτίας της τοξικότητάς τους, δηλαδή της ικανότητάς τους να επηρεάζουν τις ζωτικές λειτουργίες ενός βιολογικού συστήματος ή ενός ζώντος οργανισμού. Παρόλο που η τοξική τους δράση ήταν γνωστή από την αρχαιότητα, η αναγνώριση των τοξικών ιδιοτήτων τους αποτελεί προϊόν πρόσφατων ερευνών. [Παϊταρίδης, 2010]

Όλα τα μέταλλα, ανεξάρτητα αν είναι απαραίτητα για τη ζωή ή όχι, παρουσιάζουν τοξικές ιδιότητες σε υψηλές συγκεντρώσεις. Όταν βρεθεί σε επαφή ένας ρυπαντής με ένα ζωντανό οργανισμό, ο ρυπαντής συχνά εκδηλώνει τη βλαβερή του δράση. Συνεπώς, η επίδραση του ρυπαντή είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη συγκέντρωσή του στον χώρο δράσης του. [Φυτιανός, 1996]

Η τοξικότητα των μετάλλων εξαρτάται από:

- το pH του περιβάλλοντος (όξινο περιβάλλον ευνοεί τη δράση τους)
- τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά (έλλειψη θρεπτικών ουσιών ευνοεί τη δράση τους)
- τη φυσική κατάσταση (κακή φυσική κατάσταση ευνοεί τη δράση τους)
- το σθένος
- την ικανότητά τους να συνδέονται με άλλα στοιχεία
- τη συγκέντρωσή τους
- το είδος του μετάλλου και
- το είδος του οργανισμού
- τη θερμοκρασία (χαμηλές θερμοκρασίες ευνοούν την τοξικότητά τους)
- τη σκληρότητα
- τη παρουσία στερεών ή οργανικής ύλης [Υψηλάντη, 2012]

Η σειρά τοξικότητας για τα πιο γνωστά βαρέα μέταλλα είναι η εξής :



Εικόνα 7: Σειρά τοξικότητας κυριότερων βαρέων μετάλλων (Πηγή: www.hellanicus.lib.aegean.gr)

Η παρουσία των βαρέων μετάλλων στα επιφανειακά ύδατα επηρεάζεται από ορισμένα χαρακτηριστικά των νερών, όπως η μη κατευθυνόμενη κίνηση υλικών. Έτσι, διασκορπίζονται και αραιώνονται οι ρυπαντές από την πηγή τους και στη περίπτωση ύπαρξης βιο-διασπάσιμων υλικών πραγματοποιείται αυτοκαθαρισμός του νερού, καθώς αυτό κινείται. Τα βαρέα μέταλλα συχνά καθιζάνουν στον βυθό ως ιζήματα. Η φυσική ποικιλία σε εκχύσεις και ταχύτητα μπορεί να βοηθήσει στον καθαρισμό ρυακιών και ποταμών, μειώνοντας έτσι τη μόλυνση από καθιζάνοντες ρυπαντές. Η τοξικότητα πολλών βαρέων μετάλλων μεταβάλλεται από την ποιότητα του νερού. Έχει αποδειχτεί ότι τα βαρέα μέταλλα είναι πιο τοξικά σε μαλακά από ότι σε σκληρά νερά. [Σαμπατάκης, 1991]

Η τοξικότητα των βαρέων μετάλλων μπορεί να προκαλέσει μείωση της γονιμότητας των εδαφών, ρύπανση του υπόγειου υδροφορέα και κατ επέκταση σοβαρά προβλήματα για την ανθρώπινη υγεία. Κάποια από αυτά είναι νευροφυσιολογικές διαταραχές, γενετικές αλλοιώσεις των κυττάρων (μεταλλάξεις), επιδράσεις στην ενζυμική και ορμονική δραστηριότητα, στις βασικές λειτουργίες του οργανισμού, στην αναπαραγωγή και στη καρκινογένεση.

Σύμφωνα με μελέτη του περιοδικού Biological Element Research, ερευνητές από το Πανεπιστήμιο της Αριζόνα αναφέρουν ότι τα παιδιά που διαγνώσκονται με αυτισμό έχουν υψηλότερα επίπεδα αρκετών τοξικών μετάλλων στο αίμα και στα ούρα τους, σε σύγκριση με μη διαγνωσμένα παιδιά. Τα αποτελέσματα της στατιστικής αυτής έρευνας αφορούσαν υψηλό αριθμό παιδιών. Η ομάδα των παιδιών με αυτισμό παρουσίαζαν αυξημένα επίπεδα μολύβδου στο αίμα (41%) και στα ούρα (74%), θάλλιο (77%), κασσίτερο (115%) και βολφράμιο (44%). Επίσης, βρέθηκε ότι το 38 έως 47% των συμπτωμάτων σχετίζονται με τα επίπεδα διαφόρων μετάλλων, με κυριότερο το κάδμιο και τον υδράργυρο. Η αφαίρεση των μετάλλων έδειξε σημαντική βελτίωση σε πολλές πτυχές της συμπτωματολογίας και κυρίως στα παιδιά που είχαν τη μεγαλύτερη συσσώρευση. [Παϊταρίδης, 2010]

Ακόμη, πολλά είναι τα επεισόδια δηλητηρίασης, τα οποία προέρχονται από τα βαρέα μέταλλα, και έχουν παρουσιαστεί σε διάφορες χώρες. Η δηλητηρίαση από βαρέα μέταλλα μπορεί να προκύψει από τη μόλυνση πόσιμου νερού, από υψηλές συγκεντρώσεις στον περιβάλλοντα αέρα κοντά σε πηγές εκπομπής ή από εισαγωγή μέσω της τροφικής αλυσίδας. [Κίρλαππου, 2004]

Η σημασία της μελέτης και του ελέγχου των βαρέων μετάλλων κατανοείται καλύτερα από τα παρακάτω παραδείγματα :

- 1932 - Minamata: Λύματα πλούσια σε υδράργυρο καταλήγουν στον κόλπο Minamata στην Ιαπωνία από εργασίες χημικών εταιρειών. Ο υδράργυρος συσσωρεύεται στους θαλάσσιους οργανισμούς και δηλητηριάζει ένα μεγάλο μέρος του υδάτινου πληθυσμού.
- 1952 - Σύνδρομο Minamata: Τα πρώτα αποτελέσματα από την ρύπανση του υδροφόρου ορίζοντα εμφανίζονται το 1952. Έπειτα από κατανάλωση ψαριών στον κόλπο Minamata παρουσιάστηκαν πάνω από 500 θάνατοι ανθρώπων από δηλητηρίαση. Από τότε η Ιαπωνία εφαρμόζει τους πιο αυστηρούς περιβαλλοντικούς νόμους για τον βιομηχανοποιημένο κόσμο.
- 1986 – Sandoz: Το νερό που χρησιμοποιείται για να σβηστεί μία πυρκαγιά περιέχει υδράργυρο και μετά την κατάσβεση εισέρχεται στον ανώτερο Ρήνο με αποτέλεσμα να μολυνθεί έκταση μεγαλύτερη από 100 χιλιόμετρα.
- 1998 – Ισπανία: Μετά από μία έκρηξη και τη καταστροφή ενός φράγματος σε ένα ορυχείο στη Νότια Ισπανία ο ποταμός Rio Guadimar και ο κόλπος Coto de Donana πλημμύρισαν από εκατομμύρια τόνους λάσπης, η οποία περιείχε υψηλές ποσότητες θείου, μολύβδου, καδμίου και ψευδαργύρου. Σύμφωνα με έρευνες ένα από τα μεγαλύτερα καταφύγια πτηνών στην Ευρώπη καθώς και η αλιεία και η γεωργία της περιοχής έχουν πληγεί ανεπανόρθωτα.
[Σαμαρίδης,2009]



Εικόνα 8: Ρύπανση από βαρέα μέταλλα (Πηγή: www.zoomstagegonota.wordpress.com)

1.5 ΧΑΛΚΟΣ- ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΣ

1.5.1 Χαλκός (Copper- Cu)

Ο χαλκός είναι από τα πρώτα μέταλλα που χρησιμοποίησε ο άνθρωπος και έχει αρκετές εφαρμογές στην καθημερινή ζωή. Αποτελεί βασικό στοιχείο για τον ανθρώπινο μεταβολισμό καθώς είναι απαραίτητος για πολλά ένζυμα. Η ημερήσια ανάγκη σε χαλκό υπολογίζεται σε 30 μg ανά κιλό βάρους σώματος για τους ενήλικες και σε 80 μg για τα νεογνά. Το κρέας, τα εντόσθια, το ψάρι και τα λαχανικά είναι καλές πηγές χαλκού. Το 50% του χαλκού του λαμβάνεται με τη τροφή αφομοιώνεται. Ο χαλκός βρίσκεται σε όλα τα όργανα και ο χρόνος ημι-ζωής του είναι 4 εβδομάδες. [Ανδρέου, 2010]

Επίσης, χρησιμοποιείται σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες, επιμεταλλώσεις, σωληνουργίες, συρματοουργίες, ηλεκτρικά καλώδια χαλκού-ορείχαλκου, στην κατασκευή εναλλακτών, στα διύλιστήρια πετρελαίου, ναυπηγεία, βιομηχανίες χημικών προϊόντων, λιπασμάτων. [Manning, 1999]

Ο χαλκός στο υδάτινο περιβάλλον βρίσκεται συνήθως σε σωματιδιακή μορφή μέσα σε πλέγματα ενώσεων και στη συνέχεια καταβυθίζεται με μορφή ιζημάτων σε κλειστους κόλπους και παραλιακά νερά ή παραμένει σε αιωρούμενη φάση. Στο θαλασσίνο νερό συναντάται υπό τη μορφή Cu^+ , CuOH^+ ή CuSO_4 καθώς και δεσμευμένος με οργανική ύλη.

Καταλήγει στα υδάτινα οικοσυστήματα λόγω της διάβρωσης των χάλκινων σωληνώσεων, η οποία εξαρτάται από τη σκληρότητα, το pH, το διαλυμένο οξυγόνο και τη θερμοκρασία του νερού και διαλύεται με το πόσιμο νερό. Εάν το νερό παραμένει στάσιμο στις σωληνώσεις για 12 ώρες, η συγκέντρωση του χαλκού μπορεί να υπερβεί τα 20 mg/L . Ο χαλκός προσδίδει χρώμα και στυπτική γεύση στο πόσιμο νερό. Δημιουργεί λεκέδες στα υφάσματα και στα είδη υγιεινής. Η παραμετρική τιμή είναι τα **2 mg/L** , η οποία έχει οριστεί από την Οδηγία 98/83/EK.

Τα άλατα του χαλκού είναι ιδιαίτερα τοξικά για τα υδρόβια φυτά και χρησιμοποιούνται (κυρίως ο θειικός χαλκός) για την αναστολή της ανάπτυξης των φυκών. Ο κυριότερος μηχανισμός τοξικής δράσης του χαλκού είναι η καταστροφή – δηλητηρίαση των ενζύμων. [Hellowell, 1988]

Η πρόσληψη υψηλής ποσότητας χαλκού (15-17 mg) δίνεται να προκαλέσει γαστρεντερικές ανωμαλίες. Φαινόμενο χρόνιας δηλητηρίασης με χαλκό δεν έχει αναφερθεί. Η παρουσία χαλκού στο πόσιμο νερό παρόλου που δεν συνιστά κίνδυνο για την υγεία μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το χρώμα, την οσμή και τη γεύση του νερού. Οι συγκεντρώσεις στο πόσιμο νερό κυμαίνονται και εξαρτώνται από το pH, την σκληρότητα και το είδος των σωληνώσεων και των υδραυλικών εξαρτημάτων. [Παϊταρίδης, 2010]

1.5.2 Ψευδάργυρος (Zinc- Zn)

Το ορυκτό που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο για την παραγωγή ψευδαργύρου είναι ο σφαλερίτης (ZnS). Ο ψευδάργυρος βρίσκει εφαρμογές στη χημική βιομηχανία και στη μεταλλουργία. Χρησιμοποιείται στο γαλβανισμό των προϊόντων σιδήρου και χάλυβα (κατασκευή εξαρτημάτων αυτοκινήτων, οικοδόμησης κτιρίων), στις μπαταρίες Ni-Zn ηλεκτρικών οχημάτων, στο βουλκανισμό (κατεργασία με θειάφι) του τεχνητού και φυσικού καουτσούκ που δρα ως καταλύτης και σε βαφές υφασμάτων. [Ανδρέου, 2010]

Οι εκπομπές ψευδαργύρου οφείλονται κυρίως στη διάβρωση γαλβανισμένων σωλήνων και στα απόβλητα μεταλλείων και επιμεταλλωτηρίων. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από **5 mg/L** προσδίδουν χρώμα και στυπτική γεύση στο πόσιμο νερό. Δεν έχουν παρατηρηθεί αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία.

Στο θαλασσινό νερό ο ψευδάργυρος υπάρχει κυρίως σε διαλυτή μορφή ή δεσμευμένος με οργανικές ή ανόργανες ενώσεις. Επίσης, μπορεί να βρίσκεται στα αιωρούμενα σωματίδια ανάλογα με τις φυσικοχημικές συνθήκες. Έχει βρεθεί ότι στο ίζημα βρίσκεται συνδεδεμένος με οξειδία σιδήρου, μαγγανίου, ή υπό μορφή ZnS σε αναερόβιες συνθήκες, ενώ η διαλυτοποίησή του εξαρτάται από το pH, τις οξειδοαναγωγικές συνθήκες και την παρουσία συμπλοκοποιητικών ενώσεων. [Manning, 1999]

Ο ψευδάργυρος είναι απαραίτητο στοιχείο για τα ζώα και τον άνθρωπο, διότι συμμετέχει στις ενζυμικές αντιδράσεις και η έλλειψη του προκαλεί βλάβη στο ανοσοποιητικό τους σύστημα. Η απορρόφησή του από τους οργανισμούς εξαρτάται από την παρουσία άλλων μετάλλων, ιδιαίτερα του ασβεστίου και γίνεται μέσω της τροφικής αλυσίδας και κυμαίνεται από 10% έως 90%. Ο χρόνος ημι-ζωής του είναι ένα έτος. Η συνιστώμενη ημερήσια δόση για τους ενήλικες είναι 15 mg και για τις θηλάζουσες μητέρες 25 mg. Οι τροφές πλούσιες σε πρωτεΐνες όπως είναι το ψάρι και το κρέας, περιέχουν υψηλά ποσά ψευδαργύρου (10-50 mg ανά κιλό βάρους).

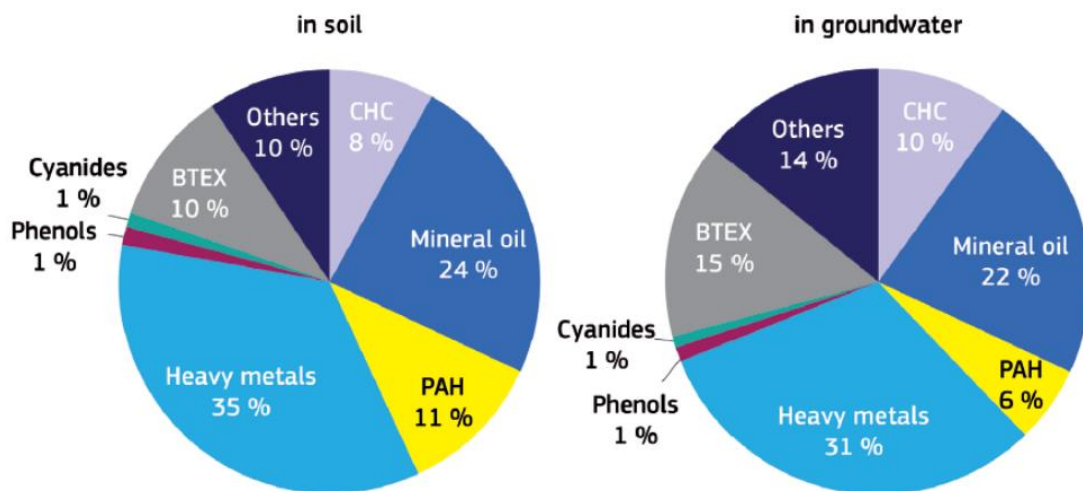
Αναφορές δηλητηριάσεων από ψευδάργυρο είναι σπάνιες και ο ψευδάργυρος σε σύγκριση με άλλα μέταλλα είναι σε μεγάλο βαθμό μη τοξικός. Η κατάποση μεγάλων ποσοτήτων ψευδαργύρου (300-12,000 mg) μπορεί να προκαλέσει ναυτία, εμετοί, διάρροια, στομαχικούς πόνους, πονοκέφαλο και υπνηλία.

Μετά το σίδηρο είναι το αφθονότερο βαρύ μέταλλο που παρατηρείται στο ζωοπλαγκτόν. Έχουν βρεθεί υψηλές συγκεντρώσεις ψευδαργύρου σε όργανα οργανισμών, κυρίως στον χωνευτικό αδένα. Επίσης, έχει μελετηθεί ότι η έκθεση των ψαριών σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης ψευδαργύρου προκαλεί βλάβη στα βράγχια. Η σπάνια τοξικότητά του οφείλεται στην ανταγωνιστική ή συνεργιστική δράση του με άλλα μέταλλα, όπως το κάδμιο. [Hellawell, 1988]

Στο θαλασσινό και το φυσικό νερό η συγκέντρωση του ψευδαργύρου κυμαίνεται από 1 µg/L έως 10 µg/L. Στο πόσιμο νερό η συγκέντρωση είναι 10-20 µg/L. [Παϊταρίδης, 2010]

1.6 ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Τις τελευταίες δεκαετίες η επιβάρυνση του περιβάλλοντος κυρίως λόγω της ανθρώπινης δραστηριότητας έχει αυξηθεί ραγδαία τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Συγκεκριμένα, τα βαρέα μέταλλα καταλαμβάνουν ένα μεγάλο ποσοστό της περιβαλλοντικής ρύπανσης, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα (9), που ακολουθεί.



Εικόνα 9: Οι κυριότερες κατηγορίες ρύπων στο έδαφος και στα υπόγεια νερά. Στοιχεία Ευρωπαϊκής Επιτροπής Περιβάλλοντος, 2011 (Πηγή: <https://ocw.aoc.ntua.gr>)

Κατά καιρούς έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την ανάπτυξη βιώσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον τεχνολογιών για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων από το νερό και το έδαφος. Έχει βρεθεί ότι οι συμβατικές μέθοδοι αποκατάστασης ρυπασμένων με βαρέα μέταλλα περιοχών είναι καταστροφικές για το περιβάλλον και δαπανηρές. Για το λόγο αυτό, καλείται επιτακτική η ανάγκη για εφαρμογή εξελιγμένων μεθόδων βιολογικής απορρύπανσης, δηλαδή χρήση της μεταβολικής ικανότητας των μικροοργανισμών με στόχο την απορρύπανση και αποκατάσταση των ρυπασμένων εδαφών, υδροφόρων και λοιπών οικοσυστημάτων. Η απομάκρυνση ή η ακινητοποίηση βαρέων μετάλλων με τη χρήση ανθεκτικών βακτηρίων θεωρείται μία νέα, φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία αλλά και μία τεχνολογία που δεν εγκυμονεί κινδύνους για τη δημόσια υγεία. [Samakshi, 2019]

Η **βιοεξυγίανση**, δηλαδή η αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών με τη βοήθεια βακτηρίων, περιλαμβάνει αερόβιες και αναερόβιες μικροβιολογικές διαδικασίες. Η αερόβια αποδόμηση συχνά απαιτεί την προσθήκη ατόμων οξυγόνου κατά τις καταλυτικές αντιδράσεις. Η αναερόβια αποδόμηση περιλαμβάνει αντιδράσεις

ενεργοποίησης, οι οποίες ακολουθούνται από οξειδωτικό καταβολισμό με τη συμμετοχή ανοξικών δεικτών ηλεκτρονίων. [Jadia, 2009]

Οι μικροοργανισμοί μπορούν να μετατρέψουν τα επιβλαβή μέταλλα σε μη τοξικές μορφές, ανοργανοποιώντας τις οργανικές ενώσεις σε τελικά προϊόντα, όπως είναι το CO₂ και το H₂O, ή σε ενδιάμεσους μεταβολιτές, οι οποίοι δρουν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη νέων κυττάρων. Ακόμη, οι μικροοργανισμοί μπορούν να διαλύουν τα μέταλλα και να οξειδώνουν ή να ανάγουν τα στοιχεία μετάπτωσης.

Η βιολογική απομάκρυνση των μετάλλων μπορεί να συμβεί μέσω των εξής μεθόδων:

- Βιοπροσρόφηση (Biosorption) και Βιοσυσσώρευση (Bioaccumulation)
- Αναγωγή (Reduction)
- Μεθυλίωση (Methylation)
- Κατακρήμνιση (Precipitation) .

1.6.1 Βιοπροσρόφηση (Biosorption) και Βιοσυσσώρευση (Bioaccumulation)

Η διαδικασία της **βιοπροσρόφησης** βασίζεται στην υψηλότερη δραστικότητα του βιοπροσροφητή σε σχέση με το προσρόφημα (ιόντα μετάλλου) και συνεχίζεται μέχρι την ισορρόπηση των δύο συστατικών. Κατά την βιοπροσρόφηση οι μικροοργανισμοί απαιτούν συμπληρωματικές θρεπτικές ουσίες για την ενεργή απορρόφηση βαρέων μετάλλων, γεγονός που αυξάνει τις απαιτήσεις τους σε διαθέσιμο οξυγόνο. Επίσης, η διατήρηση του μικροβιακού πληθυσμού σε ισορροπία είναι αρκετά δύσκολο, λόγω της τοξικότητας των βαρέων μετάλλων αλλά και άλλων παραγόντων του περιβάλλοντος.

Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να απορροφούν τα βαρέα μέταλλα ενεργά μέσω της **βιο-συσσώρευσης** και παθητικά μέσω της **βιο-προσρόφησης**. Κατά τις διεργασίες αυτές μπορεί να χρησιμοποιηθεί νεκρή ή ζωντανή μικροβιακή μάζα. Επίσης, οι διάφοροι μικροοργανισμοί παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς την ικανότητα απορρόφησης μετάλλων. [Tirry, 2018]

Οι μικροοργανισμοί μέσω της βιοσυσσώρευσης και της βιοπροσρόφησης εξουδετερώνουν τα βαρέα μέταλλα είτε δημιουργώντας οργανικά σύμπλοκα μεταξύ εξωκυτταρικών πολυμερών που παράγουν οι μικροοργανισμοί και τα μέταλλα, είτε δεσμεύουν τα κατιόντα μετάλλων στα αρνητικά φορτισμένα συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών όπως τειχικό οξύ (θετικά κατά Gram βακτήρια) και στα στρώματα S (θετικά κατά Gram βακτήρια και Αρχαία).

Για την εφαρμογή των μεθόδων αυτών απαιτείται η χρήση φθηνής βιομάζας για την προσρόφηση των μετάλλων. Η απαιτούμενη βιομάζα μπορεί να προέρχεται από ζυμώσεις, από άλγη ή από συστήματα επεξεργασίας αποβλήτων. [Samakshi, 2019]

1.6.2 Αναγωγή (Reduction)

Οι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να ανάγουν τα μέταλλα σε μορφές με χαμηλότερη διαλυτότητα, συνεπώς περιορισμένη διαθεσιμότητα των μετάλλων στο περιβάλλον.

Οι διεργασίες **αναγωγής** λαμβάνουν χώρα συνήθως υπό **αναερόβιες συνθήκες** και με τη παρουσία κάποιου οργανικού μορίου ως δότη ηλεκτρονίων και πηγή άνθρακα, χρησιμοποιούνται τα μέταλλα ως τερματικοί δέκτες ηλεκτρονίων για την παραγωγή ενέργειας (ATP). Οι μικροοργανισμοί, οι οποίοι συμμετέχουν σε αναγωγικές αντιδράσεις είναι τα θειο-αναγωγικά βακτήρια (*Desulfonvibrio*) και τα μεταλλο-αναγωγικά βακτήρια (*Geobacter*). [Tirry, 2018]

1.6.3 Μεθυλίωση (Methylation)

Η **μεθυλίωση** διαφόρων μετάλλων μπορεί να οδηγήσει στη παραγωγή **πιο τοξικών προϊόντων** ή σε **πηητικά παράγωγα** με χαμηλή τοξικότητα που απελευθερώνονται στον αέρα. [Samakshi, 2019]

1.6.4 Κατακρήμνιση (Precipitation)

Διάφοροι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τις διαλυτοποιημένες μορφές μετάλλων σε αδιάλυτες μορφές όπως σουλφίδια (MS) ή σύμπλοκα με φωσφορικές ομάδες. Η διαδικασία της κατακρήμνισης πραγματοποιείται υπό **αναερόβιες συνθήκες** και με την παρουσία οργανικών υποστρωμάτων. Τα θειο-αναγωγικά βακτήρια μετατρέπουν τα διαλυτά μέταλλα ή τις διαλυτές μορφές μετάλλων σε αδιάλυτα μεταλλο-σουλφίδια (MS). [Tirry, 2018]

Η κατακρήμνιση βρίσκει εφαρμογή στους τεχνητούς υδροβιότοπους, στους οποίους διοχετεύονται υγρά απόβλητα, που περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις διαλυτών μετάλλων (αναερόβιο ίζημα και οργανικά υποστρώματα). Καθώς επίσης και στους βιοαντιδραστήρες, οι οποίοι εμβολιάζονται με θειο-αναγωγικά βακτήρια για την αποτοξικοποίηση αποβλήτων πλούσιων σε Cd, Ni και Zn. [Samakshi, 2019]

Για την αποκατάσταση ρυπασμένων περιοχών η **φυτοθεραπεία** αναγνωρίζεται από πολλούς ερευνητές ως μία αναδυόμενη, αποδοτική και οικονομική λύση. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ικανότητα των φυτών να απανεργοποιούν ή να μετατοπίζουν τους ρύπους, προκειμένου να βελτιωθεί η ποιότητα του εδάφους και των υδάτων. Η φυτοθεραπεία δεν προκαλεί αρνητικές επιπτώσεις στη γονιμότητα, τη δομή και τη βιολογική δραστηριότητα του εδάφους.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής οφείλεται στις φυσικές, βιολογικές και χημικές διεργασίες των φυτών. Κατά την εφαρμογή της φυτοθεραπείας μπορούν να λάβουν χώρα οι εξής διαδικασίες: (1) Φυτοαποβολή – με τη χρήση των φυτών μέσω της βιοσυσσώρευσης τα μέταλλα απομακρύνονται από το έδαφος, (2) Ριζοδιήθηση – με τη χρήση των φυτών απομακρύνονται τα τοξικά μέταλλα από τα ύδατα, (3) Φυτοσταθεροποίηση – με τη χρήση των φυτών μειώνεται σημαντικά η βιοδιαθεσιμότητα των τοξικών βαρέων μετάλλων στα εδάφη. [Salt, 1995]

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι :

1. Ο έλεγχος τοξικότητας δύο βαρέων μετάλλων, του χαλκού (Cu) και του ψευδαργύρου (Zn), σε περιβαλλοντικά βακτήρια, τα οποία απομονώθηκαν από το έδαφος και το θαλασσινό νερό.
2. Η διερεύνηση δυνατότητας των απομονωμένων βακτηρίων να απομακρύνουν τα μέταλλα αυτά από το θαλασσινό νερό.

Προκειμένου να επιτευχθούν αυτοί στόχοι στο πλαίσιο της εργασίας πραγματοποιήθηκαν οι κάτωθι ενέργειες:

1. Συλλογή δείγματος θαλασσινού νερού από δύο διαφορετικές περιοχές του Νομού Χανίων (Σούδα και Κουμ Καπί) και απομόνωση μικροοργανισμών (*Escherichia coli* και *Enterococcus* sp.).
2. Χρήση βακτηρίων απομονωμένων από το έδαφος στο πλαίσιο της διπλωματικής εργασίας «Απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από το έδαφος με τη συμβολή μικροοργανισμών», [Χατζηβεργή, 2016]
3. Έλεγχος ανθεκτικότητας των βακτηρίων από το υδάτινο περιβάλλον, αλλά και βακτηρίων από το έδαφος σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις των δύο μετάλλων.
4. Εύρεση των ανασταλτικών συγκεντρώσεων MIC₆₀ και MBC για καθένα από τα υπό μελέτη μέταλλα.
5. Σύγκριση ανθεκτικότητας ανάμεσα σε μικροβιακά στελέχη διαφορετικής προέλευσης.
6. Εγκλιματισμός των ανθεκτικότερων στελεχών σε μία μέση συγκέντρωση για το κάθε μέταλλο και η παράλληλη παρακολούθηση της ανάπτυξης τους για μία εβδομάδα με φωτομέτρηση.
7. Δοκιμή απομάκρυνσης των μετάλλων από το θαλασσινό νερό κατόπιν δράσης των ανθεκτικών βακτηρίων .

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1 Εργαστηριακά υλικά

- Αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 92mm * 16mm (Sarstedt)
- Πλακέτες μικρο-τιτλοδότησης μικρο-τιτλοδότησης 96 θέσεων (microplates)
- Φίλτρο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαμέτρου πόρων 0.45 μm (Whatman)
- Φίλτρο διήθησης 0,45 μm (siringe filter, Minisart NY, Biotech)
- Φιάλες διήθησης (Whatman)

3.1.2 Θρεπτικά υλικά

- Nutrient Agar (Lab M)
- Nutrient Broth (Lab M)
- HiCrome Coliform Agar (HiMedia Laboratories)
- Slanetz and Bartley Medium (Oxoid)

3.1.3 Συσκευές και Όργανα

- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (Raypa)
- Θάλαμος επώασης (Thermo Scientific Heraeus)
- Microplate reader (Labtech LT-4000 Plate Reader)
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240)
- Ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- Λύχνος Bunsen
- Συσκευή διήθησης υπό κενό (PALL Gelman Laboratory)

3.1.4 Βαρέα μέταλλα

- $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)
- $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Riedel)

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 Δειγματοληψία

Για την απομόνωση των επιθυμητών βακτηριακών στελεχών από το θαλασσινό νερό πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες κατά τους μήνες Οκτώβριο του 2018 και Φεβρουάριο του 2019. Οι δειγματοληψίες έγιναν στην ευρύτερη περιοχή της πόλης των Χανίων κατά τις πρωινές ώρες. Το θαλασσινό νερό συλλέχθηκε από την ακτή σε βάθος περίπου 0,30 cm. Αποφεύχθηκε η συλλογή δειγμάτων κατά τις βροχερές μέρες, διότι η βροχή αλλοιώνει το δείγμα.

Συγκεκριμένα, οι περιοχές δειγματοληψίας θαλασσινού νερού είναι:

1. Σούδα
2. Κουμ Καπί

3.2.2 Απομόνωση βακτηριακών στελεχών

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από το υδάτινο περιβάλλον, ελέγχθηκαν για την παρουσία βακτηρίων που ανήκουν στα γένη *Escherichia coli* και *Enterococcus faecalis*. Για την απομόνωση των επιθυμητών βακτηρίων, αφού αποστειρώθηκαν τα δείγματα, πραγματοποιήθηκε διήθηση αυτών μέσω φίλτρων. Η διήθηση του θαλασσινού νερού έγινε χωρίς να προηγηθεί αραίωση. Στη συνέχεια, τα φίλτρα αυτά τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα θρεπτικά υλικά, έτσι ώστε να επιτευχθεί η καλλιέργεια των επιθυμητών ειδών. Οι διηθήσεις έλαβαν χώρα υπό κενό σε αποστειρωμένες συνθηκές, χρησιμοποιώντας 100 mL υγρού δείγματος κάθε φορά.

Οι μεμβράνες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διήθηση ήταν από νιτροκυτταρίνη, με διάμετρο 47mm και με μέγεθος πόρων 0,45 μm. Οι μεμβράνες μετά τη διήθηση τοποθετήθηκαν σε κατάλληλο, εκλεκτικό, χρωμογόνο, θρεπτικό υπόστρωμα. Έπειτα, έγινε η καλλιέργεια των βακτηρίων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εκάστοτε δείκτη.

Τα θρεπτικά υλικά, που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τα είδη στα οποία ήταν αυτά εκλεκτικά παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Εκλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα

Θρεπτικό υπόστρωμα	Ανιχνευόμενη ομάδα
Slanetz & Bartley Medium	<i>Enterococcus sp.</i>
HiCrome Coliform Agar	<i>E. coli</i>

Τα βακτηριακά στελέχη, που προέρχονται από το έδαφος, είχαν απομονωθεί και συντηρηθεί σε βαθιά κατάψυξη (στους -80°C) από προηγούμενη διπλωματική εργασία. Προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα, έγιναν ανα- καλλιέργειες σε τρυβλία Petri και ως θρεπτικό υλικό για την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό τους χρησιμοποιήθηκε το Nutrient Agar.

3.2.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας

Για τον έλεγχο της ανθεκτικότητας στα μέταλλα χρησιμοποιήθηκε η **μέθοδος της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης** με μικρο- αραιώσεις σε θρεπτικό ζωμό (**MIC₆₀ Broth Microdilution Method**). Με αυτή τη μέθοδο εξετάζεται η ανάπτυξη του βακτηρίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μετάλλου. Επιλέχθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος, λόγω του χαμηλού κόστους της και του μικρού χρόνου διεξαγωγής των πειραμάτων. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε πλάκες μικρό-τιτλοδότησης 96 θέσεων.

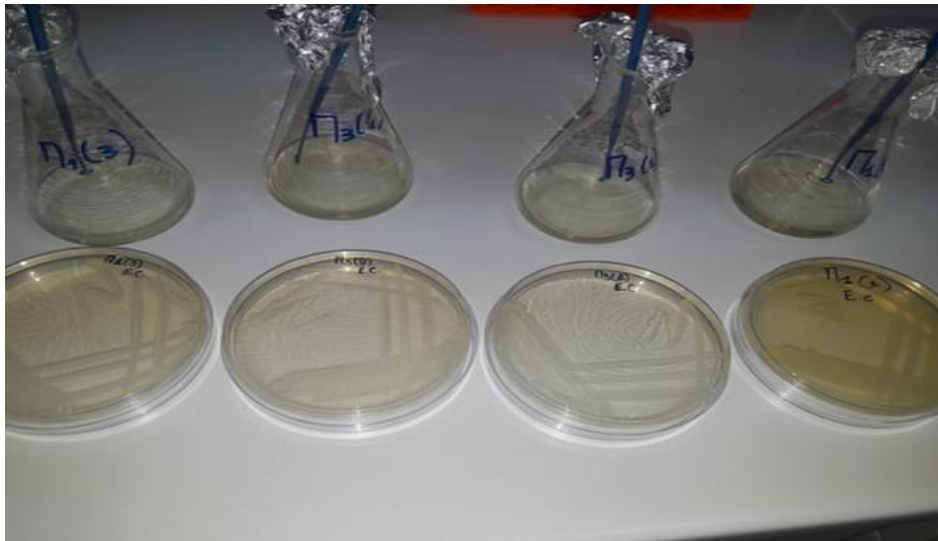
Το εύρος των συγκεντρώσεων των δύο μετάλλων, που χρησιμοποιήθηκε, παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 2: Εύρος συγκεντρώσεων μετάλλων [Πηγή: Zhisong, 2018]

Στοιχείο	Concentration Units	Εύρος συγκεντρώσεων
Copper	mg/L	0.01 – 1.25
Zinc	mg/L	1.5 - 200

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα πυκνά διαλύματα για κάθε μέταλλο, χρησιμοποιώντας ως διαλύτη το αποστειρωμένο νερό και για τα δύο μέταλλα. Τα πυκνά διαλύματα των μετάλλων είχαν συγκέντρωση διπλάσια από την μέγιστη εξεταζόμενη, καθώς κατά την εφαρμογή της μεθόδου υφίσταται αραιώση 1:2.

Η μέθοδος των μικρο-αραιώσεων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το **πρωτόκολλο του οργανισμού CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, January 2012)**. Με βάση αυτό, το κάθε βακτήριο καλλιεργήθηκε σε μη εκλεκτικό θρεπτικό ζωμό (Nutrient Broth), όπως φαίνεται στην εικόνα (10). Και με φωτομέτρηση στα 600nm, βρέθηκε η οπτική απορρόφηση (A) ίση με 0,1D, η τιμή αυτή της οπτικής απορρόφησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού 10^8 CFUs/mL βάσει της κλίμακας McFarland. Με τη μέθοδο των διαδοχικές δεκαδικών αραιώσεων επιτεύχθηκε η επιθυμητή συγκέντρωση, η οποία είναι 10^5 CFUs/mL.



Εικόνα 10: Καλλιέργεια βακτηρίων σε θρεπτικό ζωμό στο εργαστήριο (Nutrient Broth)

Η μέθοδος MIC διεξήχθη σε πλάκα μικροτιτλοδότησης 96 βυθισμάτων. Σε όλες τις θέσεις της πλακέτας μικρο-τιτλοδότησης τοποθετήθηκαν 100 μ L από το ίδιο θρεπτικό υλικό (Nutrient Broth). Στη συνέχεια, στις θέσεις της πρώτης γραμμής έγινε προσθήκη της ίδιας συγκέντρωσης μετάλλου, επιτυγχάνοντας έτσι αραίωση 1:2. Με τη χρήση πολυκάναλης πιπέτας διαμοιράζονταν 100 μ L στις θέσεις των επόμενων γραμμών. Με τη μεταφορά του μετάλλου από την μία στήλη στην επόμενη επιτυγχάνονταν κάθε φορά αραίωση $1 \div 2$. Με αυτό το τρόπο προέκυψαν οι συγκεντρώσεις, που παρουσιάζονται στον Πίνακα (3). Στις στήλες 10 και 11 δεν έγινε προσθήκη μετάλλου, διότι μελετάται η ανάπτυξη του μικροοργανισμού απουσία μετάλλου (control) (βλέπε εικόνα 11). Τέλος, προστίθενται κατάλληλη ποσότητα από τη βακτηριακή καλλιέργεια, έτσι ώστε στις θέσεις της πλακέτας ο μικροοργανισμός να βρίσκεται σε συγκέντρωση 10^5 CFUs/mL. Η τελευταία στήλη (12) χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό διάλυμα, καθώς δεν προστέθηκε σε αυτήν ούτε διάλυμα μετάλλου ούτε μικροοργανισμός. Το τυφλό διάλυμα ήταν απαραίτητο για την πρόβλεψη επιμόλυνσης. Η επιμόλυνση γίνονταν αντιληπτή εάν οι τιμές της οπτικής απορρόφησης του τυφλού διαλύματος ήταν υψηλές. Σε αυτές τις περιπτώσεις η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν.

Κάθε πλακέτα μικρο-τιτλοδότησης χρησιμοποιήθηκε για την εξέταση τεσσάρων (4) μικροοργανισμών και η διάταξη της είναι η ακόλουθη:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Broth
B	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	Broth
C	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	Broth
D	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	Broth
E	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	Broth
F	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	Broth
G	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	Broth
H	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	Broth

Εικόνα 11: Διάταξη της πλακέτας μικρο-τιτλοδότησης. Η γραμμή A περιλαμβάνει τη μέγιστη συγκέντρωση μετάλλου, η οποία κατανέμεται έως τη γραμμή H με αραιώση 1÷2. Στις στήλες 1 έως 8 εξετάστηκαν οι τέσσερις μικροοργανισμοί, σε 2 στήλες ο καθένας για να υπάρχει επαναληψιμότητα, ενώ η στήλη 9 περιλαμβάνει Broth και μέταλλο, οι στήλες 10 και 11 αποτελούν τα διαλύματα ελέγχου και η στήλη 12 το τυφλό διάλυμα.

Αφού έγινε η προετοιμασία των πλακετών οι μικροοργανισμοί επωάζονταν για μία ημέρα (24 ώρες) στους 37°C. Η ανάπτυξη των βακτηρίων ελέγχθηκε με τη βοήθεια ειδικού φασματοφωτομέτρου (microplate reader).

3.2.4 Έλεγχος απομάκρυνσης

Αρχικά, επιλέχθηκαν με βάση τη προηγούμενη διαδικασία (έλεγχος ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα μέταλλα) τα πιο ανθεκτικά βακτηριακά στελέχη για κάθε μέταλλο, καθώς και η συγκέντρωση του μετάλλου αυτού. Η συγκέντρωση του μετάλλου, που επιλέχθηκε αντιστοιχούσε στη μίση από εκείνη που προκαλούσε θνησιμότητα στο 50% του βακτηριακού πληθυσμού.

Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές των συγκεντρώσεων, οι οποίες μελετήθηκαν, για κάθε μέταλλο.

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις μετάλλων κατά τον εγκλιματισμό των ανθεκτικών βακτηρίων

Στοιχείο	Concentration Units	Συγκέντρωση
Copper	mg/L	0,04
Zinc	mg/L	100

Από τα εικοσιένα (21) συνολικά βακτήρια, δέκα (10) από το θαλασσινό νερό και (11) από το έδαφος, που ελέγχθηκαν ως προς την ανθεκτικότητά τους στο Χαλκό και στον Ψευδάργυρο, επιλέχθηκαν τέσσερα (5) για τον Ψευδάργυρο και επτά (7) για το Χαλκό, που παρουσίαζαν την υψηλότερη ανθεκτικότητα.

Ο έλεγχος απομάκρυνσης των μετάλλων, ψευδαργύρου και χαλκού, στα ανθεκτικότερα βακτήρια πραγματοποιήθηκε σε δύο (2) στάδια και βασίζονταν στη δράση των μικροοργανισμών.

Το πρώτο στάδιο, αφορά τον **εγκλιματισμό** των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στις κατάλληλες για αυτά συγκεντρώσεις του εκάστοτε μετάλλου. Ο εγκλιματισμός των ανθεκτικών βακτηρίων σε συγκέντρωση 10^5 CFUs/mL, γίνονταν σε θρεπτικό ζωμό, στη συγκεκριμένη περίπτωση σε 30 mL Nutrient Broth, προκειμένου να ευνοηθεί η ανάπτυξη του μικροοργανισμού. Η περίοδος εγκλιματισμού των βακτηρίων διήρκεσε μία εβδομάδα (7 ημέρες) και τα βακτήρια βρίσκονταν σε θερμοκρασία δωματίου. Κατά την περίοδο αυτή γίνονταν καθημερινή παρακολούθηση της ανάπτυξης του εκάστοτε βακτηρίου με φωτομέτρηση.

Το δεύτερο στάδιο, αφορά τη δοκιμή απομάκρυνσης του Χαλκού και του Ψευδαργύρου από το θαλασσινό νερό. Αρχικά, αποστειρώθηκε το δείγμα του θαλασσινού νερού, που συλλέχθηκε. Στη συνέχεια, σε 100 mL θαλασσινού νερού προστέθηκε το ανθεκτικό βακτήριο κατόπιν εγκλιματισμού (10^5 CFUs/mL) και η απαιτούμενη συγκέντρωση μετάλλου για κάθε βακτήριο. Τα διαλύματα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 7 ημέρες. Και η ανάπτυξη του κάθε βακτηρίου παρακολουθείται καθημερινά με φωτομέτρηση.

Τα βακτήρια που παρουσίαζαν καλύτερη προσαρμογή και εγκλιματισμό για το κάθε μέταλλο (τέσσερα βακτήρια για το κάθε μέταλλο) αναλύθηκαν για τον ποσοστικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης των μετάλλων με τη χρήση του ICP-MS 7500cx, αφού έγινε διήθηση των διαλυμάτων με φίλτρο 0,45μm (Whatman).

Η ανάλυση των διαλυμάτων για τα μέταλλα έγινε με τη χρήση του επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος με φασματομετρία μαζών (**ICP-MS**). Κατά την ανάλυση αυτή αξιοποιήθηκε η ικανότητα του οργάνου να λειτουργεί σε collision (He) ή/και reaction (H₂) mode, ώστε να προκύπτουν πιο αξιόπιστα αποτελέσματα εξαιτίας του περιορισμού των ισοβαρών παρεμποδίσεων.

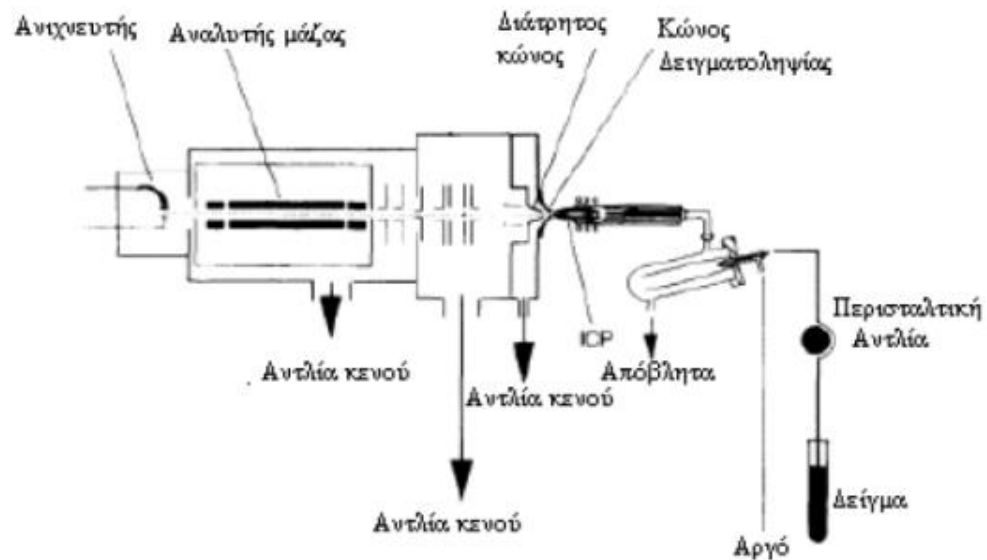
Η λειτουργία της μεθόδου ICP-MS βασίζεται σε συγκεκριμένες συνθήκες, οι οποίες αναλύονται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 4: Συνθήκες λειτουργίας του ICP-MS

RF power(W)	1500	Collision gas	He
Plasma gas flow (L/min)	0,82	Collision gas flow (mL/min)	4,5
Auxiliary gas flow (L/min)	0,26	Reaction gas	H ₂
Sampling/Skimmer cone	Ni	Reaction gas flow (mL/min)	3,5
Nebulizer type	MicroMist	Solution uptake (uL/min)	160
S/C temperature	2° C	Integration time (sec per mass)	0,30
Replicates	3		

Τα παραγόμενα αποτελέσματα προέκυψαν μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης (με συντελεστή συσχέτισης περίπου ίσο με 0,99) με τη χρήση πρότυπων ενώσεων κατάλληλης καθαρότητας της εταιρείας Merck. Μέσω των καμπυλών βαθμονόμησης προέκυψαν τα όρια ανίχνευσης με κατάλληλους μαθηματικούς υπολογισμούς (Chemstation Software by Agilent).

Το μοντέλο του οργάνου που χρησιμοποιήθηκε ήταν το 7500CX της εταιρείας Agilent, του εργαστηρίου Υδρογεωχημικής Μηχανικής και Αποκατάστασης Εδαφών. Τα μέρη του οργάνου εμφανίζονται στην παρακάτω εικόνα:



Εικόνα 12: Τα μέρη ενός φασματομέτρου μάζας με απαγωγικά συζευγμένο πλάσμα

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ

4.1.1 Βακτήρια που απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό

Αφού έγινε δειγματοληψία θαλασσινού νερού από δύο περιοχές του Νομού Χανίων (Σούδα και Κουμ Καπί) απομονώθηκαν τα βακτηριακά στελέχη που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα σε κατάλληλο εκλεκτικό θρεπτικό υλικό για το κάθε βακτήριο.

Πίνακας 5: Ονοματολογία βακτηριακών στελεχών που απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό

Βακτήριο	Δείγμα 1 (Σούδα)	Δείγμα 2 (Κουμ Καπί)
<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> 1	<i>E. coli</i> 4
	<i>E. coli</i> 2	<i>E. coli</i> 5
	<i>E. coli</i> 3	
<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i> 1	<i>Enterococcus sp.</i> 4
	<i>Enterococcus sp.</i> 2	<i>Enterococcus sp.</i> 5
	<i>Enterococcus sp.</i> 3	

Συνοπτικές πληροφορίες των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών

- *Escherichia coli* : είναι αρνητικό κατά Gram κολοβακτηρίδιο. Συνδέεται άμεσα με τους παθογόνους μικροοργανισμούς του εντερικού των ανθρώπων και των ζώων και είναι χρήσιμος δείκτης της κοπρανώδους μόλυνσης των υδάτων.
- *Enterococcus sp.* : ανήκουν στους Gram θετικούς κόκκους. Προέρχονται κυρίως από τα ανθρώπινα κόπρανα και είναι ανθεκτικότεροι από τα υπόλοιπα κοπρανώδη βακτήρια. Αποτελούν σημαντικό βακτηριακό δείκτη για τον έλεγχο της κοπρανώδους μόλυνσης των επιφανειακών υδάτων.

4.1.2 Βακτήρια που απομονώθηκαν από το έδαφος

Τα βακτήρια του εδάφους, που μελετήθηκαν, είχαν απομονωθεί και διατηρηθεί στους -80°C από παλαιότερη ερευνητική εργασία και παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 6: Ονοματολογία βακτηριακών στελεχών που εξετάστηκαν από το έδαφος [Πηγή: Χατζηβγερή, 2016]

Μικροοργανισμοί εδάφους
<i>Curtobacterium</i> sp.
<i>Pseudomonas</i> sp.
<i>Chryseobacterium</i> sp.
<i>Paenibacillus</i> sp.
<i>Enterococcus</i> sp. [KR 153958]
<i>Enterococcus</i> sp. [KR 153959]
<i>Enterococcus</i> sp. [KJ 175075]
<i>Streptococcus sanguinis</i>
<i>Pedobacter</i> sp.
<i>Staphylococcus</i> sp.

Συνοπτικές πληροφορίες των εξεταζόμενων βακτηριακών στελεχών

- **Curtobacterium sp.**: ανήκουν στη τάξη *Actinomycetales* και στη κλάση των ακτινοβακτηρίων. Είναι θετικοί κατά Gram μικροοργανισμοί, οι οποίοι συναντώνται στο έδαφος.
- **Pseudomonas sp.**: είναι Gram αρνητικά βακτήρια, τα οποία ανήκουν στα πρωτεοβακτήρια. Παρουσιάζουν μεγάλη μεταβολική ποικιλομορφία και πρόκειται για υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια. Εμφανίζονται σε φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς, στα ύδατα και στο χώμα. Αρκετά είδη από αυτά είναι ιδιαίτερα παθογόνα για τους οργανισμούς.
- **Chryseobacterium sp.**: είναι Gram αρνητικά βακτήρια και ανήκουν στη τάξη των *Flavobacteria*. Είναι προαιρετικά αναερόβιοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι συναντώνται στα ύδατα, στο έδαφος και σε διάφορα τρόφιμα.
- **Paenibacillus sp.**: είναι βάκιλοι προαιρετικά αναερόβιοι, Gram θετικά βακτήρια . Συναντώνται στα ύδατα, στο χώμα, στις ρίζες φυτών, σε πρόνυμφα έντομα καθώς και σε διάφορα φάρμακα. Έχουν εφαρμογές στη γεωργία και στη βιοτεχνολογία.
- **Enterococcus sp.** : είναι Gram θετικά βακτήρια, που ανήκουν στην τάξη των λακτοβάκιλων (*Lactobacillales*). Είναι αναερόβιοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για μηνιγγίτιδα και για λοιμώξεις στο ουροποιητικό σύστημα.
- **Pedobacter sp.**: ανήκουν στη τάξη των *Sphingobacteriales* και στη κλάση των *Sphingobacteria*. Είναι αρνητικά κατά Gram βακτήρια.
- **Staphylococcus sp.** : είναι βάκιλοι, οι οποίοι ανήκουν στη κλάση των *Bacilli* και στη τάξη των *Bacillales*. Είναι θετικά κατά Gram βακτήρια και συναντώνται στο δέρμα, στη βλεννογόνο των ζωικών οργανισμών, αλλά και στο έδαφος.

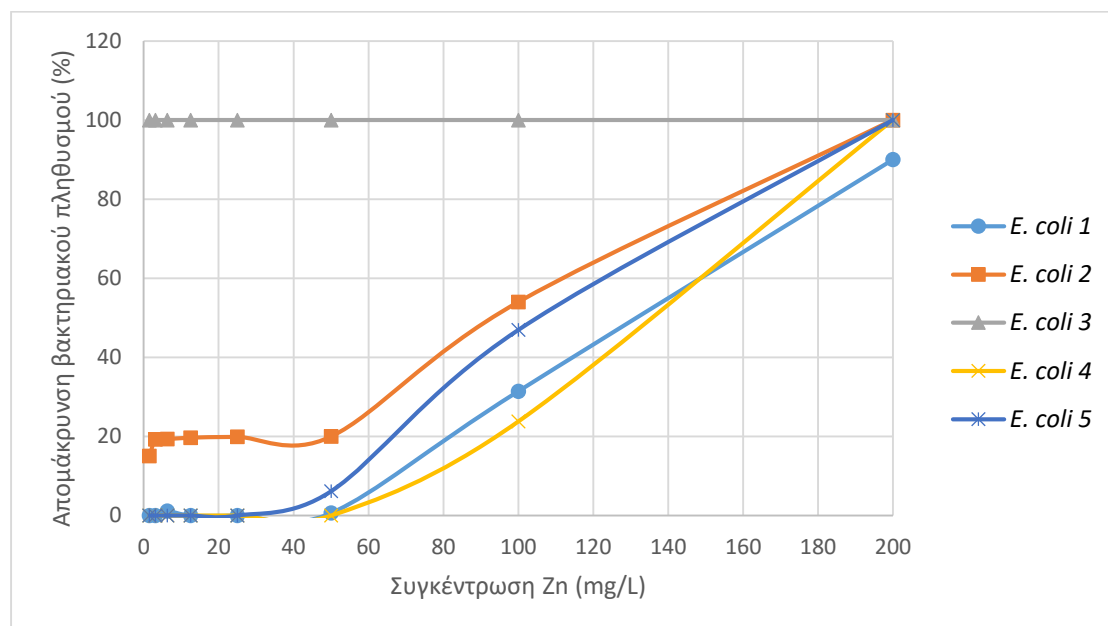
4.2 ΕΛΕΓΧΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΤΑ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Η εύρεση των ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών μέσω της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης στα εξεταζόμενα μέταλλα (Ψευδάργυρο και Χαλκό) σκόπευε στη διερεύνηση των ανθεκτικών στελεχών με βάση την προέλευση και το είδος τους, αλλά και στον εντοπισμό των κατάλληλων βακτηρίων για την απομάκρυνση των βαρέων μετάλλων αυτών από δείγμα θαλασσινού νερού (Βιοαποκατάσταση).

4.2.1 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Ψευδαργύρου

Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν τη συμπεριφορά των εξεταζόμενων βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό, παρουσία του άλατος Ψευδαργύρου.

I. *E. coli* :

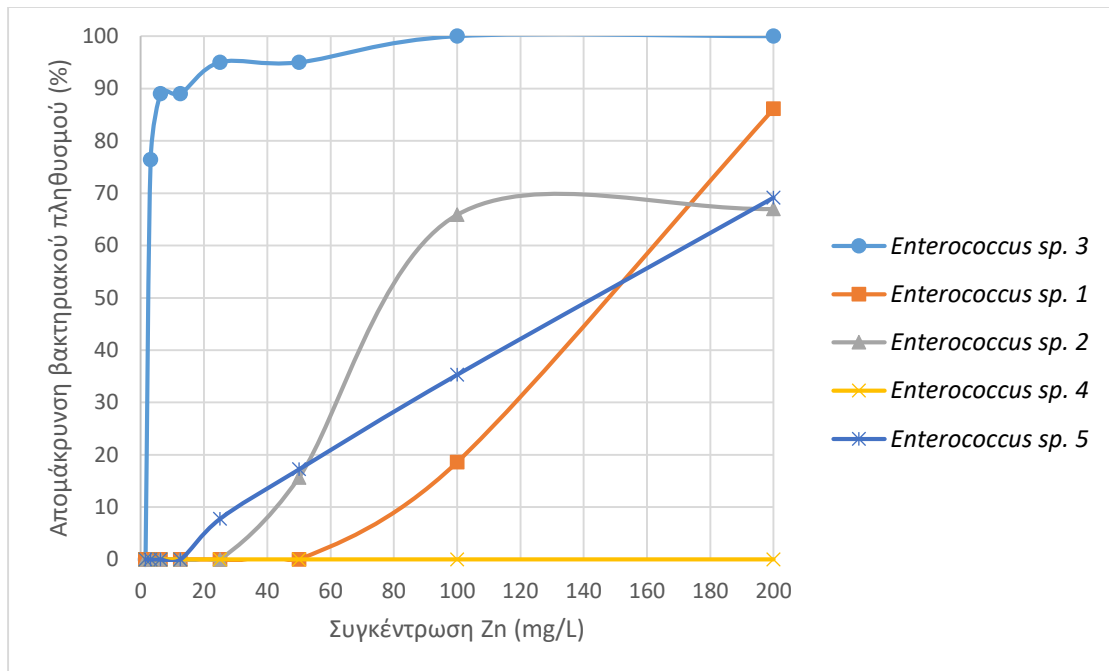


Διάγραμμα 1: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών *E. coli* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.

Τα στελέχη *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 4 και *E. coli* 5 παρουσιάζουν ανθεκτικότητα για χαμηλές συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου έως 50 mg/L. Ενώ για συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου μεγαλύτερες από 50 mg/L παρατηρείται μείωση του βακτηριακού τους πληθυσμού και στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση μετάλλου (200 mg/L) παρατηρείται 100% μείωση του πληθυσμού τους. Η *E. coli* 3 είναι αρκετά ευαίσθητη στον Ψευδάργυρο στο εύρος των συγκεντρώσεων, που αυτή μελετήθηκε, αφού ο πληθυσμός της παύει να αναπτύσσεται από την μικρότερη συγκέντρωση μετάλλου.

Επίσης, παρατηρείται ότι η συγκέντρωση Ψευδαργύρου, που προκαλεί θνησιμότητα στον μισό πληθυσμό των στελεχών *E. coli* 1, *E. coli* 2, *E. coli* 4 και *E. coli* 5 (LC₅₀) είναι ίση με 100 mg/L. Οι Agarwal et. al. (2019) στα πειράματά τους παρατήρησαν διαφορετική τοξική συγκέντρωση Ψευδαργύρου. Συγκεκριμένα, μελέτησαν την επίδραση του Οξειδίου του Ψευδαργύρου (ZnO) στην *Escherichia coli* και βρήκαν ότι η συγκέντρωση του μετάλλου, που προκαλεί θνησιμότητα στο μισό πληθυσμό του συγκεκριμένου βακτηρίου είναι ίση με 20 mg/L, το εύρος των συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου που μελέτησαν ήταν 10-100 mg/L.

II. *Enterococcus* sp. :



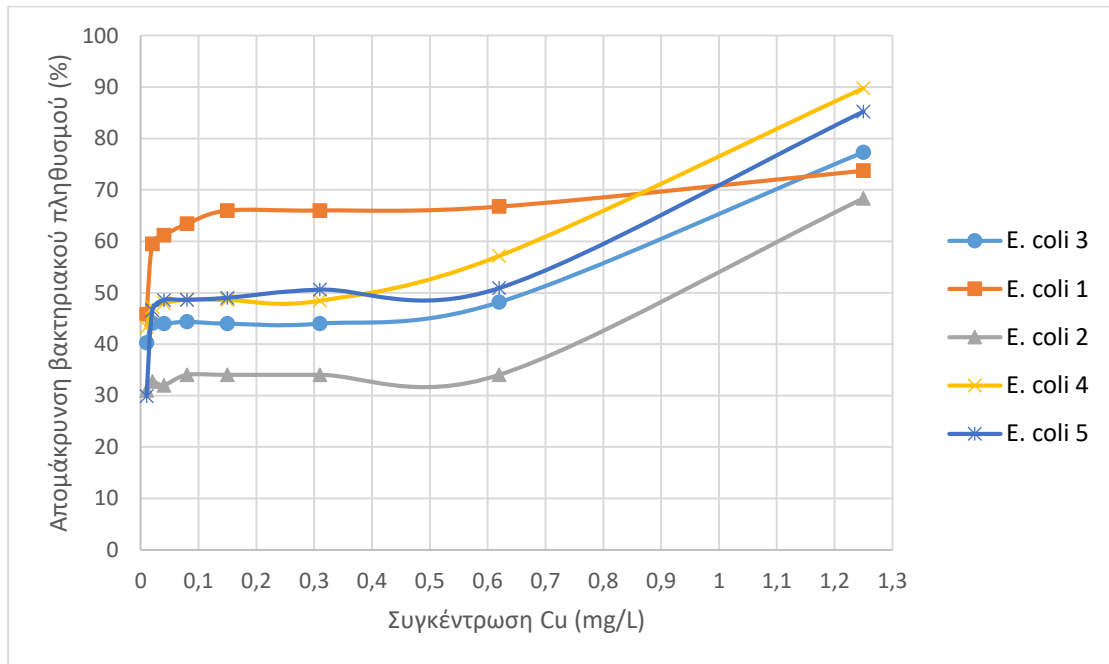
Διάγραμμα 2: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών *Enterococcus* sp. παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.

Με βάση το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο *Enterococcus* sp. 4 παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στο εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκε, αφού ο πληθυσμός του δε μειώθηκε ούτε στη μέγιστη μελετούμενη συγκέντρωση μετάλλου. Ο *Enterococcus* sp. 3 είναι ευαίσθητο βακτήριο καθώς από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις μετάλλου επιτυγχάνεται μείωση του πληθυσμού του από 70% και άνω. Τα στελέχη *Enterococcus* sp. 1 και *Enterococcus* sp. 5 είναι ανθεκτικά στο συγκεκριμένο μέταλλο για χαμηλές συγκεντρώσεις έως 50 mg/L και έως 10 mg/L αντίστοιχα. Και ο *Enterococcus* sp. 2 παρουσιάζει ανθεκτικότητα για συγκεντρώσεις έως 50 mg/L μετάλλου Ψευδαργύρου. Τα αποτελέσματα αυτά διαφέρουν με την έρευνα των Resende et. al. (2012), οι οποίοι παρατήρησαν ότι ο *Enterococcus* sp., παρουσίασε ανθεκτικότητα για συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου μεγαλύτερες ή ίσες από 1,024 mg/L.

4.2.2 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Χαλκού

Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν τη συμπεριφορά των εξεταζόμενων βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό, παρουσία του άλατος Χαλκού.

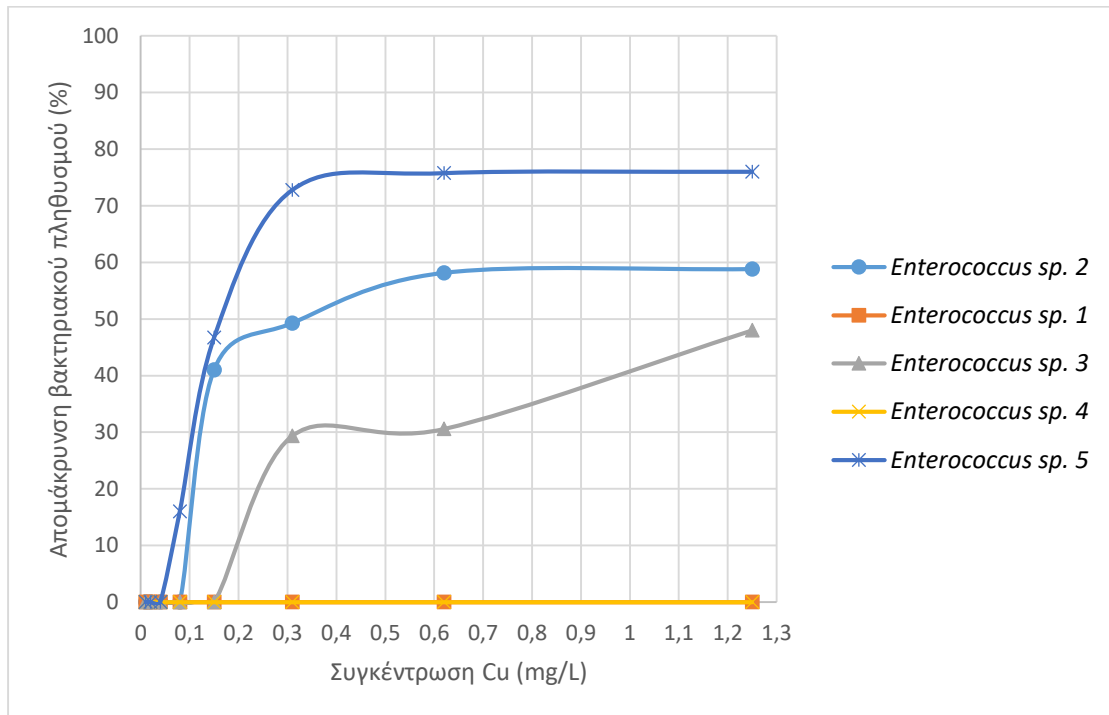
Ι. *E. coli* :



Διάγραμμα 3: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών *E. coli* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.

Στο διάγραμμα αυτό φαίνεται ότι ο πληθυσμός των βακτηριακών στελεχών *E. coli*, οι οποίες απομονώθηκαν από το θαλασσινό νερό μειώνεται από τη μικρότερη κιάλας συγκέντρωση του Χαλκού, που αυτές μελετήθηκαν, άρα δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο μέταλλο αυτό. Οι Agarwal et. al. (2019) στα πειράματά τους μελέτησαν μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων του Χαλκού (CuO) και παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση που προκαλεί θνησιμότητα στο 50% του πληθυσμού της *Escherichia coli* βρίσκεται μεταξύ 28,6 mg/L και 65,9 mg/L.

I. *Enterococcus* sp. :

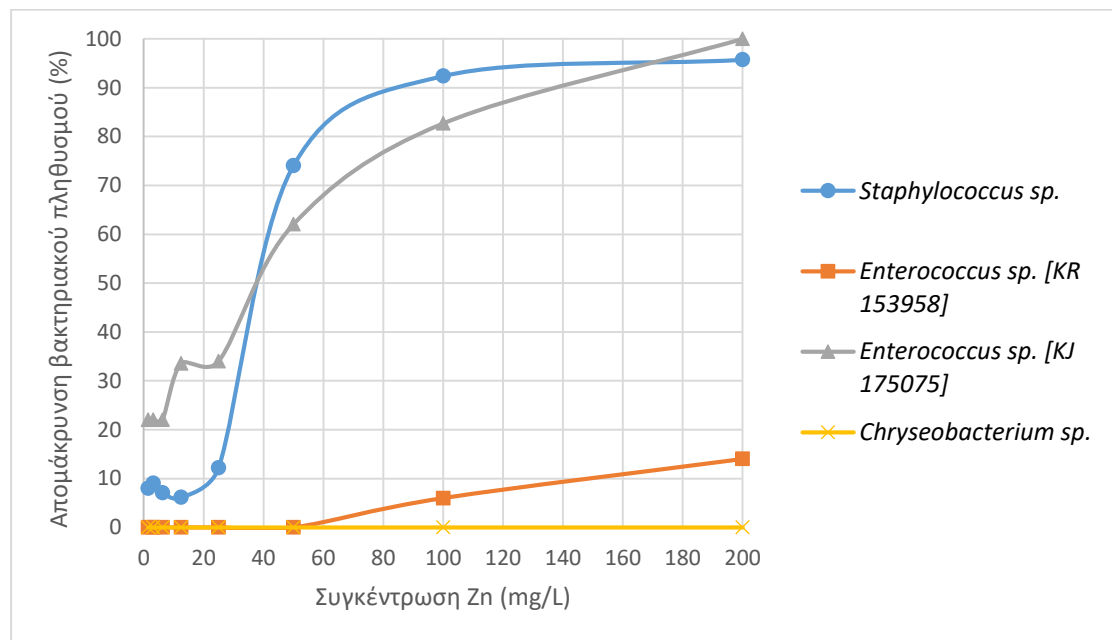


Διάγραμμα 4: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών *Enterococcus* sp. παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.

Τα βακτήρια *Enterococcus* sp. 1 και *Enterococcus* sp. 4 παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα στο εύρος των συγκεντρώσεων Χαλκού που μελετήθηκε, καθώς ο πληθυσμός τους δε μειώθηκε ούτε στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση μετάλλου. Τα στελέχη *Enterococcus* sp 2 και *Enterococcus* sp 5 παρουσιάζουν μεγάλη ανθεκτικότητα (0% απομάκρυνση βακτηριακού πληθυσμού) στο συγκεκριμένο μέταλλο για χαμηλές συγκεντρώσεις (0- 0,08 mg/L), ενώ καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του μετάλλου, ο πληθυσμός τους μειώνεται. Η μείωση αυτή φτάνει σε ποσοστό 60% για το *Enterococcus* sp 2 και 76% για το *Enterococcus* sp 5 στη μέγιστη μελετούμενη συγκέντρωση Χαλκού. Τέλος, ο *Enterococcus* sp 3 είναι ανθεκτικός για συγκεντρώσεις Χαλκού έως 0,15 mg/L, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η μείωση του πληθυσμού του δε ξεπερνά το 50%. Οι Silva et.al. (2012) στα πειράματά τους παρατήρησαν ότι η συγκέντρωση του Χαλκού, η οποία αναστέλλει πλήρως την ανάπτυξη των στελεχών *Enterococcus* sp. (100% απόνακρυνση) είναι ίση με 1,024 mg/L.

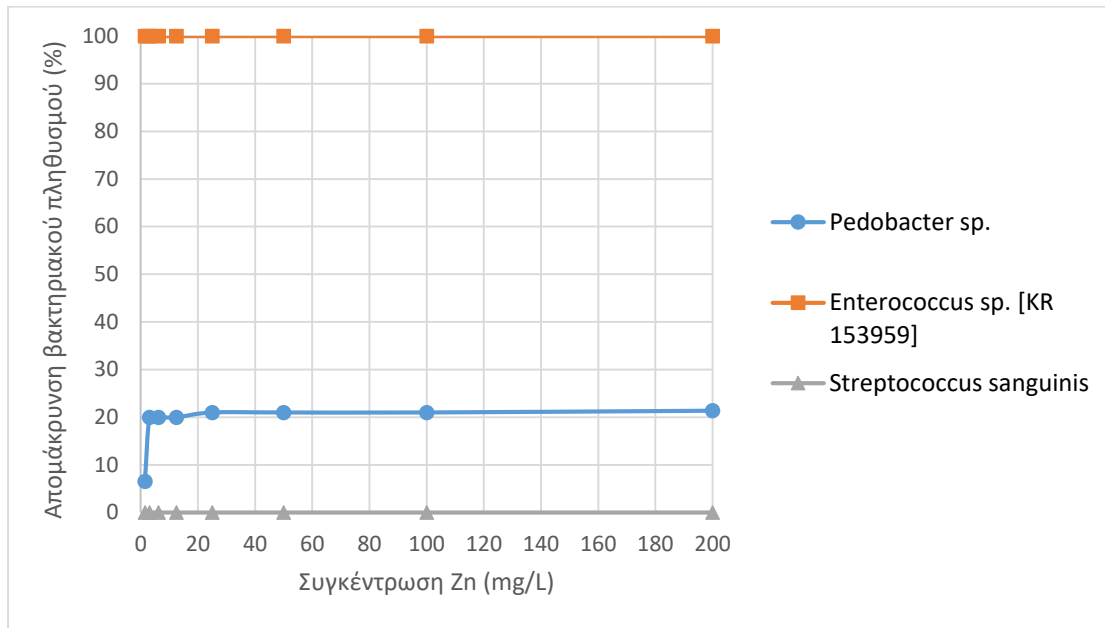
4.2.3 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων εδάφους στο άλας Ψευδαργύρου

Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν τη συμπεριφορά των εξεταζόμενων βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από το έδαφος, παρουσία του άλατος Ψευδαργύρου.



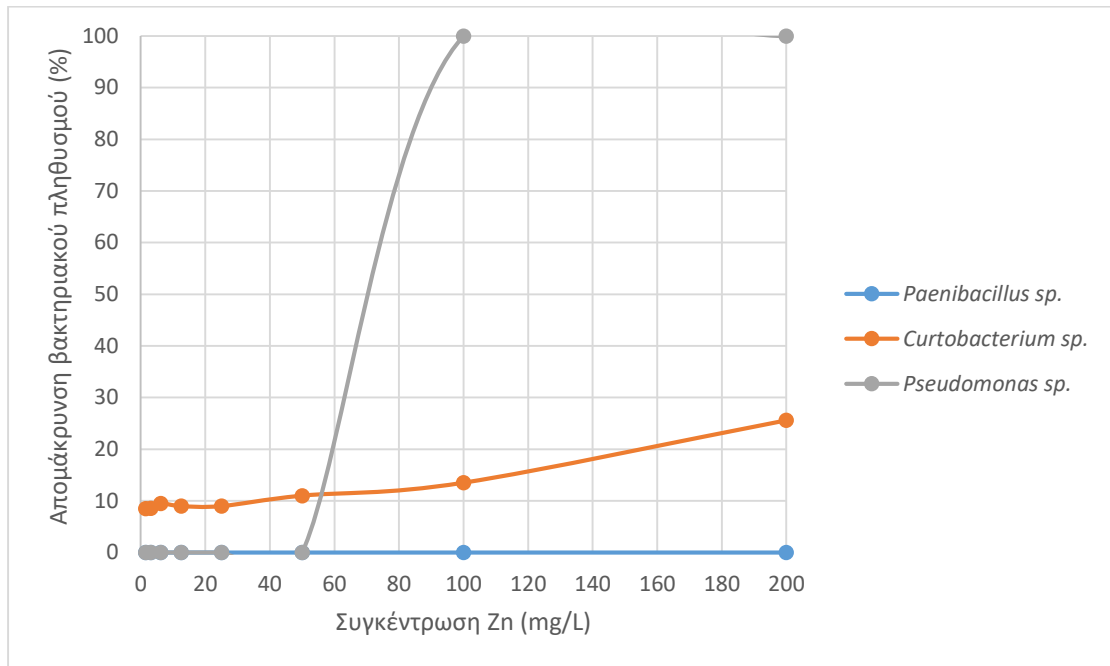
Διάγραμμα 5: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.

Από το παραπάνω γράφημα προκύπτει ότι το στέλεχος *Chryseobacterium sp.* παρουσιάζει ανθεκτικότητα στον Ψευδάργυρο στο εύρος των συγκεντρώσεων, που μελετήθηκε καθώς δε μειώνεται καθόλου ο βακτηριακός πληθυσμός του. Ο πληθυσμός του στελέχους *Enterococcus sp.* [KR 153958] μειώνεται έως 10% στις μεγαλύτερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου, οπότε είναι ανθεκτικό στο συγκεκριμένο μέταλλο. Τέλος, παρατηρείται ότι ο βακτηριακός πληθυσμός των στελεχών *Staphylococcus sp.* και *Enterococcus sp.* [KJ 175075] μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του μετάλλου και για συγκέντρωση μετάλλου μεγαλύτερη από 50 mg/L δεν παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο μέταλλο καθώς ο πληθυσμός τους μειώνεται από 60% και άνω. Οι Akbar et. al. (2019) μελέτησαν την αντιμικροβιακή δραστηριότητα νανοσωματιδίων οξειδίου του Ψευδαργύρου στους μικροοργανισμούς *Salmonella typhimurium* και *Staphylococcus aureus*. Παρατήρησαν ότι τα βακτηριακά κύτταρα, τα οποία εκτέθηκαν στα νανοσωματίδια ZnO παρουσίασαν μορφολικές μεταβολές και ορισμένα καταστράφηκαν ή παραμορφώθηκαν. Οι αλλαγές αυτές οδήγησαν σε μείωση της βακτηριακής ανάπτυξης και σταδιακά σε κυτταρικό θάνατο αλλά και αποσύνθεση.



Διάγραμμα 6: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.

Από το Διάγραμμα 9 φαίνεται ότι τα βακτήρια *Streptococcus sanguinis* και *Pedobacter sp.* είναι ανθεκτικά, καθώς στο πρώτο δε μειώνεται ο πληθυσμός του καθόλου, ενώ στο δεύτερο μειώνεται σε ποσοστό έως 20% στο εύρος των συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου, που εξετάστηκαν. Σε αντίθεση, με το στέλεχος *Enterococcus sp.* [KR 153959], το οποίο χαρακτηρίζεται αρκετά ευαίσθητο βακτήριο, αφού από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση Ψευδαργύρου ο πληθυσμός του μειώνεται εξ ολοκλήρου. Οι Bhattacharyya et. al. (2018) στα πειράματά τους απέδειξαν ότι τα οξείδια Ψευδαργύρου προκαλούν αναστολή της ανάπτυξης βιοφίλμ για το στέλεχος *Streptococcus pneumoniae* σε συγκέντρωση 12 mg/L, γεγονός που καθιστά το βακτήριο ευαίσθητο στο συγκεκριμένο μέταλλο.

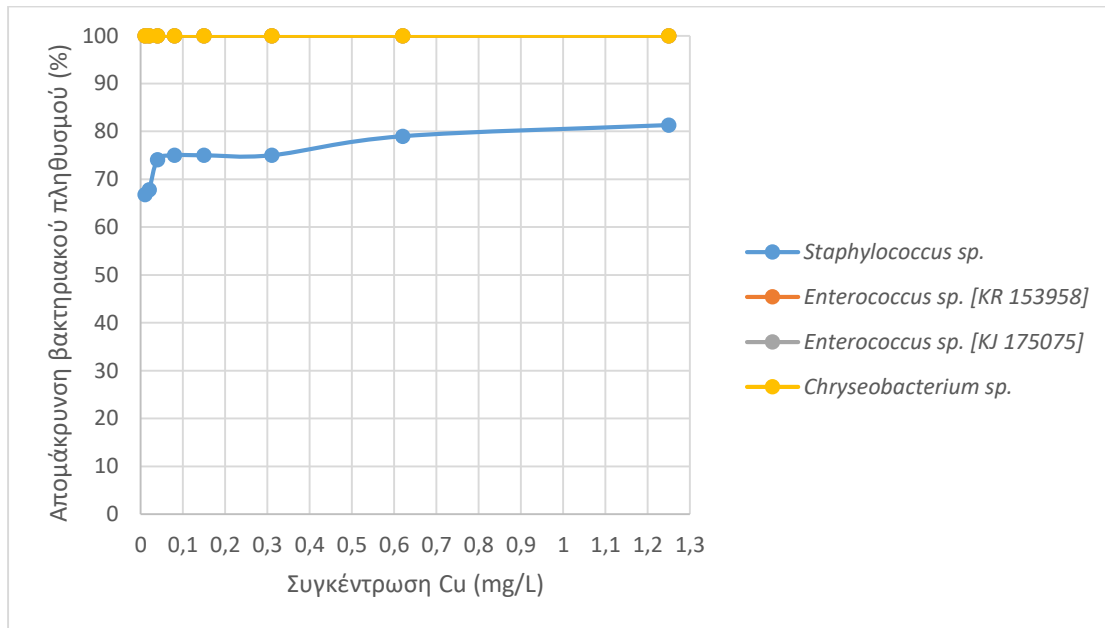


Διάγραμμα 7: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Ψευδαργύρου.

Από το παραπάνω γράφημα προκύπτει το συμπέρασμα ότι το βακτήριο εδάφους *Paenibacillus sp.* είναι αρκετά ευαίσθητο στον Ψευδάργυρο καθώς ο πληθυσμός του δεν ελαττώνεται ούτε στην ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση του μετάλλου. Επίσης, το *Curtobacterium sp.* παρουσιάζει μικρή μείωση (έως 25%) του πληθυσμού του στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του συγκεκριμένου μετάλλου, συνεπώς μπορεί να χαρακτηριστεί ανθεκτικό βακτήριο. Τέλος, το στέλεχος *Pseudomonas sp.* για συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου έως 50 mg/L παρουσιάζει ανθεκτικότητα, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι αρκετά ευαίσθητο αφού ο πληθυσμός του μειώνεται σε ποσοστό 100%. Οι Perelomon et.al. (2018) μελέτησαν την τοξικότητα του Ψευδαργύρου σε βακτηριακά στελέχη (*Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas fluorescens* και *Rhodococcus*). Τα στελέχη αυτά παρουσίασαν ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση (MIC_{60}) από 0,1 mM έως 0,3 mM. Επίσης, συμπέραναν ότι η προσθήκη χουμικών ουσιών και χουμικών οξέων μειώνει σημαντικά την τοξικότητα του μετάλλου μέσω της συμπλοκοποίησης των μεταλλικών ιόντων με τις χουμικές ουσίες και τα κλάσματά τους.

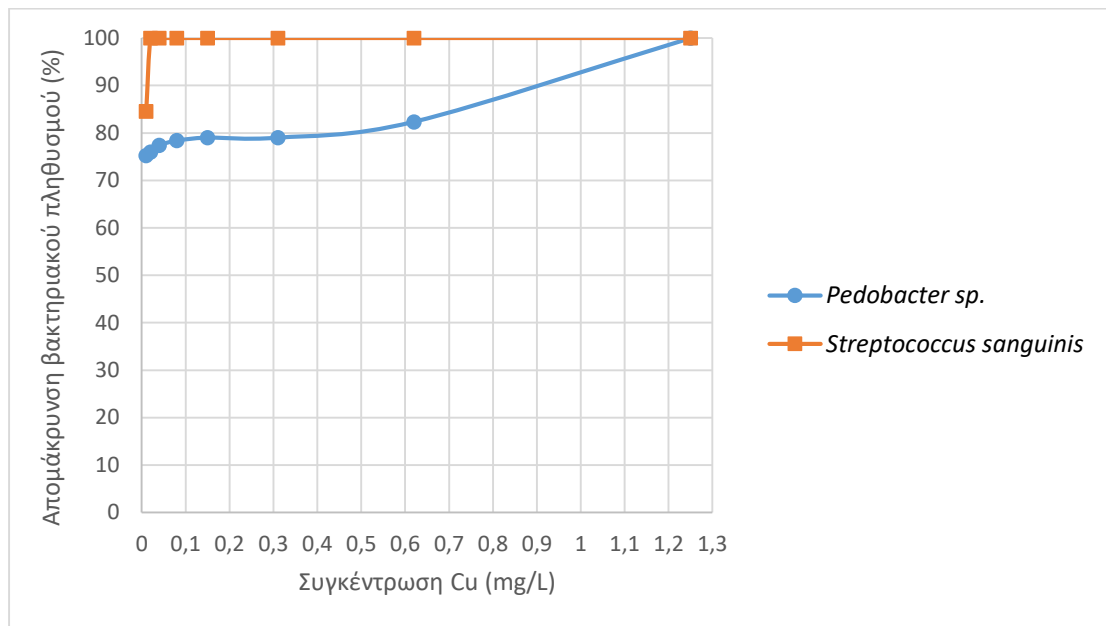
4.2.4 Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων εδάφους στο άλας Χαλκού

Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν τη συμπεριφορά των εξεταζόμενων βακτηρίων, τα οποία απομονώθηκαν από το έδαφος, παρουσία του άλατος Χαλκού.



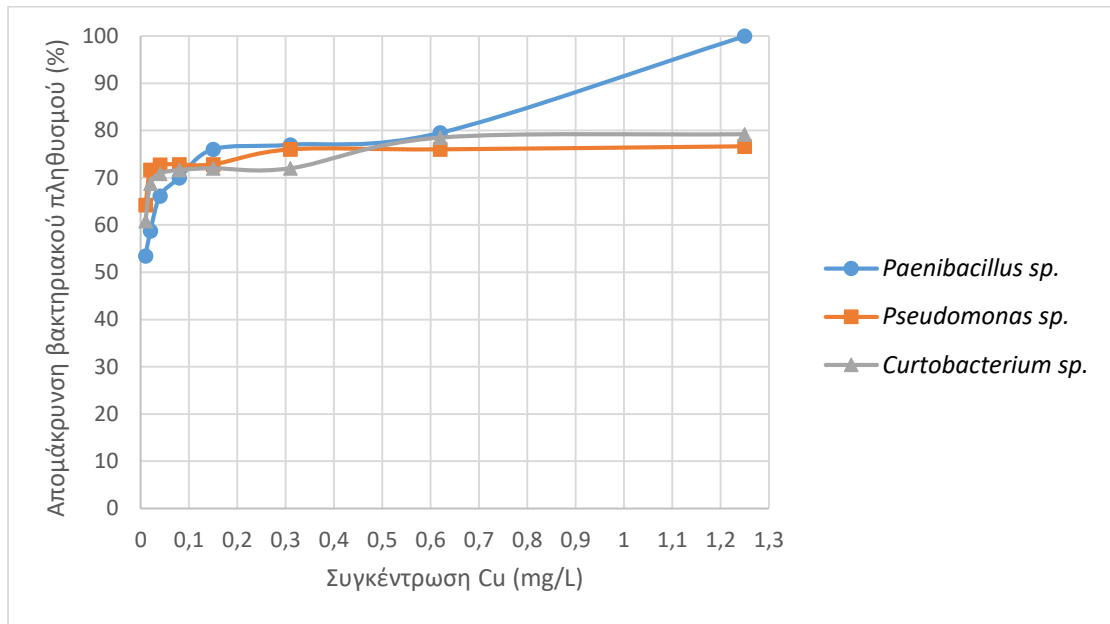
Διάγραμμα 8: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.

Τα βακτήρια του εδάφους που εμφανίζονται στο παραπάνω Διάγραμμα χαρακτηρίζονται ευαίσθητα στο μέταλλο του Χαλκού στις συγκεντρώσεις που αυτά εξετάστηκαν. Πιο αναλυτικά, τα στελέχη *Enterococcus sp. [KR 153958]*, *Enterococcus sp. [KJ 175075]* και *Chryseobacterium sp.* παρουσιάζουν 100% μείωση του βακτηριακού τους πληθυσμού από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση του μετάλλου. Και ο πληθυσμός του *Staphylococcus sp.* εμφανίζει επί τις εκατό απομάκρυνση περίπου 66% από την μικρότερη συγκέντρωση Χαλκού (0,01 mg/L). Οι Mansano et. al. (2018) μελετώντας την τοξικότητα νανοσωματιδίων οξειδίου του Χαλκού στα βακτήρια *Ceriodaphnia silvestrii* και *Hyphessobrycon eques* κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι για συγκέντρωση 12,6 μg Cu / L για πρώτο και 211,4 μg Cu / L παρατηρήθηκε σημαντική αναστολή της ανάπτυξής τους.



Διάγραμμα 9: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.

Τα στελέχη του εδάφους που εμφανίζονται στο συγκεκριμένο Διάγραμμα μπορούν να χαρακτηριστούν ως ευαίσθητα στο Χαλκό στο εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν, καθώς ο βακτηριακός τους πληθυσμός μεώθηκε σε ποσοστό 75% για το *Pedobacter sp.* και 85% για το *Streptococcus sanguinis* από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση. Οι Long et. al. (2019) μελέτησαν την επίδραση του Χαλκού στο βακτήριο *Alexandrium minutum* για συγκεντρώσεις διαλυμένου Χαλκού 7μM, 79 μM και 164 μM και παρατήρησαν ότι η υψηλότερη συγκέντρωση προκαλούσε αναστολή και καθυστέρηση της ανάπτυξής του.



Διάγραμμα 10: Ποσοστό απομάκρυνσης βακτηριακού πληθυσμού των στελεχών εδάφους παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του μετάλλου Χαλκού.

Τα εδαφικά βακτήρια, τα οποία παρουσιάζονται στο συγκεκριμένο Διάγραμμα, μπορούν να χαρακτηριστούν ως ευαίσθητα στελέχη στο Χαλκό στο εύρος των συγκεντρώσεων που αυτά εξετάστηκαν. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε διότι ο βακτηριακός τους πληθυσμός ελαττώθηκε σε ποσοστό 50% και άνω από την ελάχιστη συγκέντρωση του μετάλλου, στην οποία αυτά εκτέθηκαν. Οι Bondarenko et. al. (2012) στα πειράματά τους παρατήρησαν ότι τα νανοσωματίδια CuO μπορούν να προκαλέσουν βλάβες στο DNA των βακτηρίων από πολύ μικρές συγκεντρώσεις (0,1 mg Cu / L).

4.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΛΑΧΙΣΤΩΝ ΑΝΑΣΤΑΛΤΙΚΩΝ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (MIC₆₀, MBC) ΨΕΥΔΑΡΓΥΡΟΥ ΚΑΙ ΧΑΛΚΟΥ

Από τα διαγράμματα, που προηγήθηκαν, βρέθηκαν οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις MIC₆₀ και MBC, οι οποίες είναι:

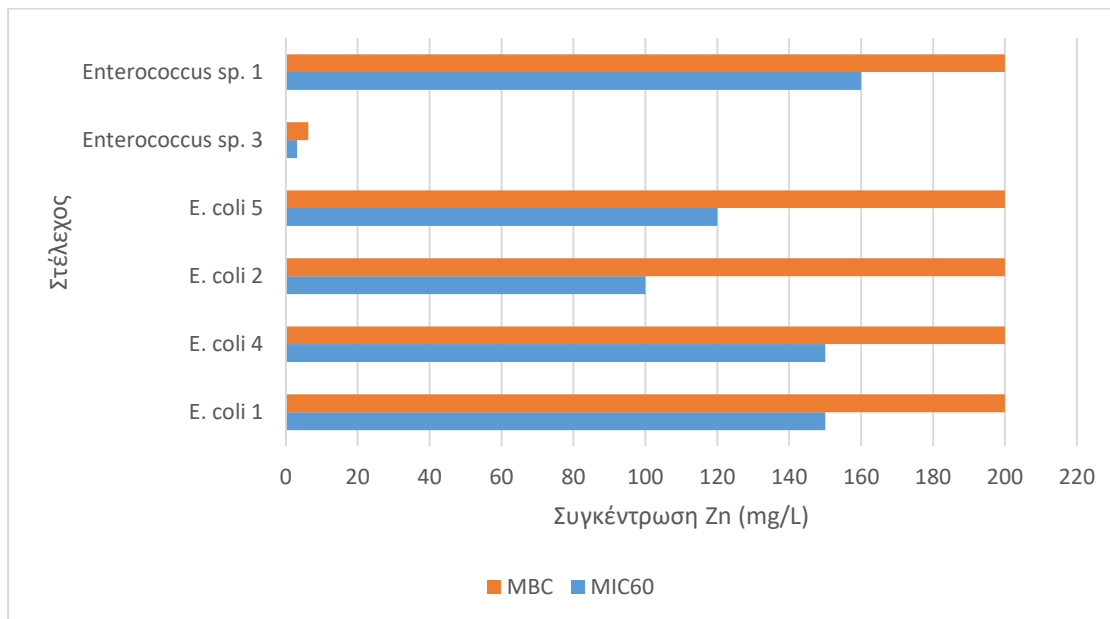
- **Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (Minimum Inhibitory Concentration, MIC₆₀)** : η ελάχιστη συγκέντρωση του μετάλλου, που αναστέλλει την ανάπτυξη των υπό μελέτη στελεχών από 60% και άνω.
- **Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (Minimal Bactericidal Concentration, MBC)** : η ελάχιστη συγκέντρωση του μετάλλου, που επιτρέπει την επιβίωση 1/10.000 βακτήρια.

4.3.1 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου σε βακτήρια θαλασσινού νερού

Στο γράφημα που ακολουθεί δεν συμπεριλαμβάνονται τα βακτήρια, τα οποία είναι ανθεκτικά σε όλες τις συγκεντρώσεις άλατος Ψευδαργύρου, που μελετήθηκαν. Ακόμη, δεν παρουσιάζονται τα βακτήρια τα οποία είναι ευαίσθητα στο συγκεκριμένο μέταλλο σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων, που αυτά εξετάστηκαν.

Συγκεκριμένα, τα στελέχη αυτά είναι τα εξής:

- **E. coli 3** : χαρακτηρίζεται ως **ευαίσθητο βακτήριο**, αφού ο πληθυσμός της μειώνεται εξ ολοκλήρου από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση Ψευδαργύρου.
- **Enterococcus sp. 2**: για συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου έως 25 mg/L είναι **ανθεκτικός**, ενώ για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μετάλλου ο πληθυσμός του ελαττώνεται και στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση (200 mg/L) η επί τοις εκατό απομάκρυνση του βακτηριακού πληθυσμού του είναι 70%.
- **Enterococcus sp. 5**: είναι **ανθεκτικός** στον Ψευδάργυρο για συγκεντρώσεις έως 12,5 mg/L, παρουσιάζοντας μικρή μείωση του πληθυσμού του σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση μετάλλου (200 mg/L) ο βακτηριακός του πληθυσμός μειώνεται σε ποσοστό ίσο με 70%.



Διάγραμμα 11: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του θαλασσινού νερού παρουσία Ψευδαργύρου

Από το παραπάνω διάγραμμα διαπιστώνεται ότι μεγαλύτερη ευαισθησία στον Ψευδάργυρο εμφανίζει ο *Enterococcus sp. 3*, καθώς ο πληθυσμός του μειώνεται σε ποσοστό 100% για συγκέντρωση μετάλλου 6,25 mg/L. Επίσης, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση Ψευδαργύρου (MIC₆₀) για τα υπόλοιπα στελέχη είναι από 100 mg/L έως 150 mg/L και η έκθεση τους στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση Ψευδαργύρου προκάλεσε 100% μείωση του πληθυσμού τους.

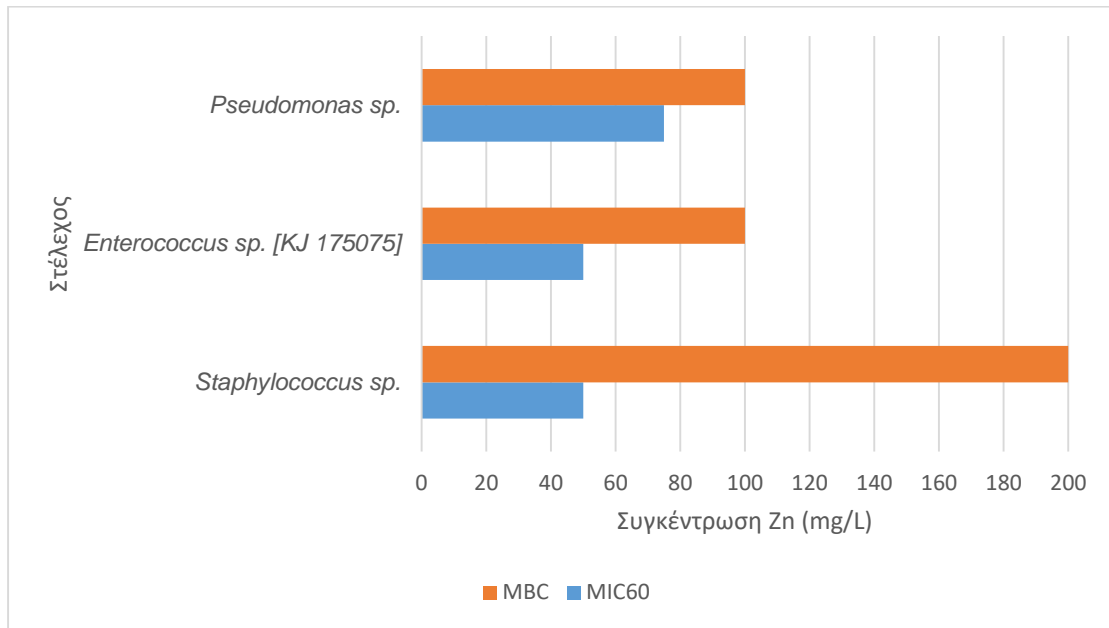
Από τα παραπάνω προκύπτει το συμπέρασμα ότι ο Ψευδάργυρος είναι πιο τοξικός στα στελέχη του *Enterococcus sp.*, τα οποία είναι θετικά κατά Gram βακτήρια, σε σχέση με αρνητικά κατά Gram βακτήρια, *E.coli*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην ύπαρξη της εξωτερικής μεμβράνης, που διαθέτουν τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, η οποία τους προσδίδει ανθεκτικότητα .

4.3.2 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου σε βακτήρια εδάφους

Στο γράφημα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι ελάχιστες ανασταλτικές συγκεντρώσεις του άλατος Ψευδαργύρου για τα βακτήρια, που απομονώθηκαν από το έδαφος, οι οποίες προέκυψαν από τα διαγράμματα 5 έως 7. Δεν συμπεριλαμβάνονται στο διάγραμμα τα πολύ ανθεκτικά βακτήρια (0% απομάκρυνση βακτηριακού πληθυσμού από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση), ούτε τα πολύ ευαίσθητα βακτήρια (100% απομάκρυνση βακτηριακού πληθυσμού από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση).

Συγκεκριμένα, τα βακτηριακά στελέχη που δεν εμφανίζονται είναι:

- *Enterococcus sp. [KR 153958]*: είναι **ανθεκτικό βακτήριο** στο εύρος των συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου που μελετήθηκε, παρουσιάζοντας μικρή μείωση (έως 10%) του πληθυσμού του στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μετάλλου, που αυτό εκτέθηκε.
- *Pedobacter sp.* : είναι **ανθεκτικό βακτήριο** στο εύρος των συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου που μελετήθηκε, παρουσιάζοντας μικρή μείωση (έως 20%) του πληθυσμού του στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μετάλλου, που αυτό εκτέθηκε.
- *Streptococcus sanguinis sp., Paenibacillus sp., Chryseobacterium sp.*: είναι **ανθεκτικά βακτήρια** σε όλες τις συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου, που αυτά εκτέθηκαν.
- *Enterococcus sp. [KR 153959]*: είναι **ευαίσθητο βακτήριο** σε όλες τις συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου, που αυτό εκτέθηκε.
- *Curtobacterium sp.* : είναι **ανθεκτικό βακτήριο** στο εύρος των συγκεντρώσεων Ψευδαργύρου που μελετήθηκε, παρουσιάζοντας μικρή μείωση (έως 25%) του πληθυσμού του στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του μετάλλου, που αυτό εκτέθηκε.



Διάγραμμα 12: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του εδάφους παρουσία Ψευδαργύρου.

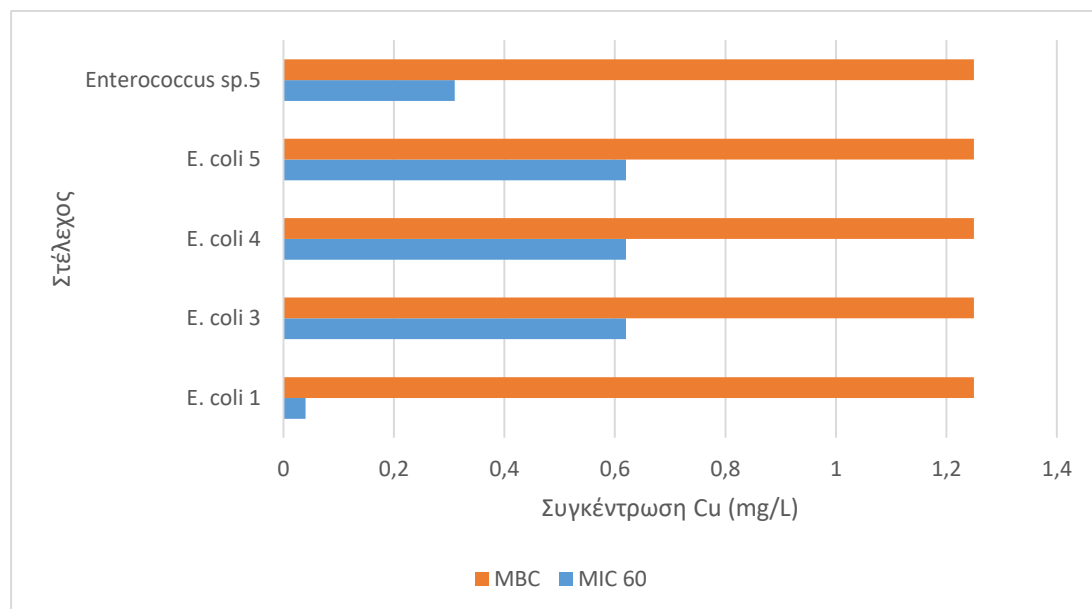
Για τα στελέχη *Enterococcus sp. [KJ 175075]*, *Staphylococcus sp.* και *Pseudomonas sp.* η αντιμικροβιακή δράση του Ψευδαργύρου ξεκίνησε με αναστολή σε συγκέντρωση 50 mg/L για τα δύο πρώτα και 75 mg/L για το τρίτο, και εξελίχθηκε σε θανάτωση σε συγκέντρωση 100 mg/L για τα βακτήρια *Enterococcus sp. [KJ 175075]* και *Pseudomonas sp.* και σε συγκέντρωση 200 mg/L για το *Staphylococcus sp.*.

Η ανθεκτικότητα του *Staphylococcus sp.* στο μέταλλο του Ψευδαργύρου ενδέχεται να οφείλεται στο παχύ κυτταρικό τοίχωμα, που διαθέτει, καθώς είναι θετικό κατά Gram βακτήριο.

4.3.3 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Χαλκού σε βακτήρια θαλασσινού νερού

Τα βακτήρια του θαλασσινού νερού, τα οποία δεν εμφανίζονται στο παρακάτω διάγραμμα είναι:

- *Enterococcus sp. 1*, *Enterococcus sp. 4*: είναι **ευαίσθητα βακτήρια** στο Χαλκό, καθώς από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση του μετάλλου προκλήθηκε απευθείας καταστροφή των κυττάρων τους.
- *Enterococcus sp. 2*, *E. coli 2*, *Enterococcus sp. 3*: είναι **ανθεκτικά βακτήρια** στο Χαλκό, καθώς για χαμηλές συγκεντρώσεις μετάλλου δεν παρατηρήθηκε μείωση του πληθυσμού τους, ενώ στη μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση προκλήθηκε αναστολή της ανάπτυξής τους.



Διάγραμμα 13: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του θαλασσινού νερού παρουσία Χαλκού.

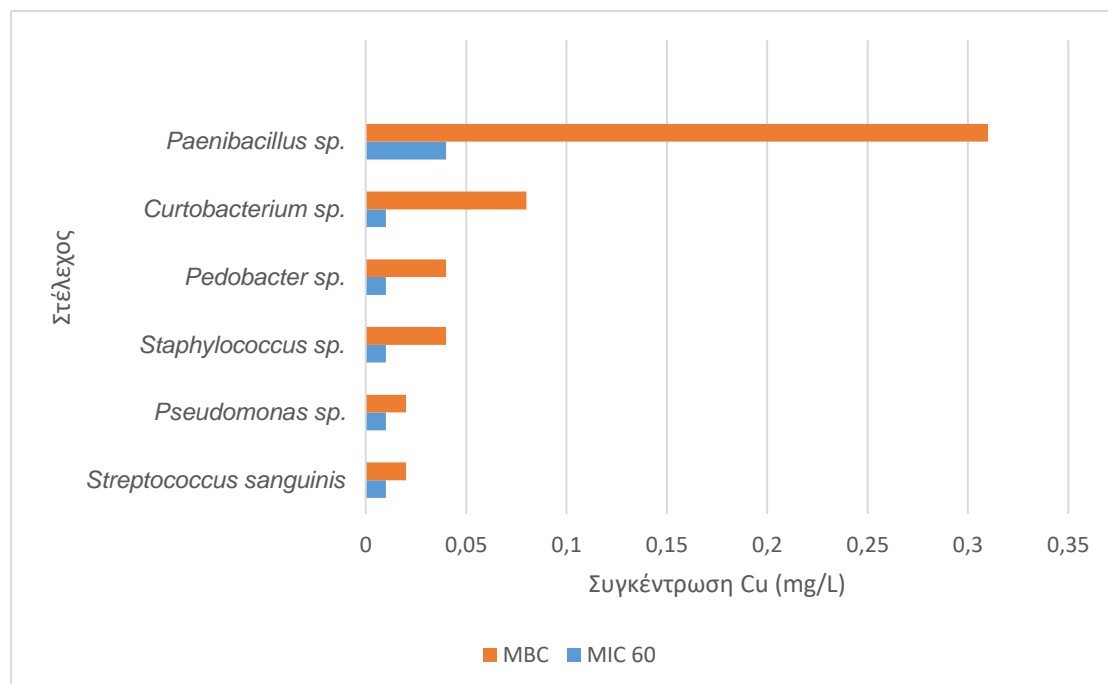
Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται ότι η μέγιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση του Χαλκού (1,25 mg/L) προκάλεσε καταστροφή των κυττάρων σε όλα τα στελέχη. Και η αντιμικροβιακή δράση του Χαλκού ξεκίνησε με αναστολή σε συγκέντρωση 0,62 mg/L για τα βακτήρια *E. coli 3*, *E. coli 4*, *E. coli 5*, σε συγκέντρωση 0,04 mg/L για την *E. coli 1* και σε συγκέντρωση 0,31 mg/L για τον *Enterococcus sp 5*.

Ο χαλκός είναι περισσότερο τοξικός στα θετικά κατά Gram βακτήρια, δηλαδή στους *Enterococcus sp.*, η ανθεκτικότητα των βακτηρίων *E. coli* ενδέχεται να οφείλεται στο εξωτερικό περίβλημα που διαθέτουν.

4.3.4 Προσδιορισμός ελαχίστων ανασταλτικών συγκεντρώσεων Χαλκού σε βακτήρια εδάφους

Τα βακτηριακά στελέχη που δεν εμφανίζονται στο διάγραμμα που ακολουθεί είναι:

- *Chryseobacterium sp.*, *Enterococcus sp.* [KR 153958], *Enterococcus sp.* [KJ 175075]: είναι **ευαίσθητα βακτήρια** στο εύρος των συγκεντρώσεων Χαλκού που εξετάστηκαν, αφού από την ελάχιστη εξεταζόμενη συγκέντρωση του μετάλλου προκλήθηκε απευθείας καταστροφή των κυττάρων τους.



Διάγραμμα 14: Προσδιορισμός ελαχίστων συγκεντρώσεων MIC60 και MBC για τα βακτήρια του εδάφους παρουσία Χαλκού

Από το παραπάνω γράφημα παρατηρείται ότι από τις μικρότερες εξεταζόμενες συγκεντρώσεις του Χαλκού τα βακτήρια του εδάφους παρουσιάζουν υψηλά ποσοστά μείωσης του πληθυσμού τους. Αναλυτικότερα, η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση του Χαλκού κυμαίνεται από 0,01 mg/L έως 0,04 mg/L. Επίσης, φαίνεται ότι η βακτηριοκτόνος συγκέντρωση του Χαλκού είναι μικρότερη από 0,05 mg/L για τα περισσότερα βακτήρια. Ενώ το στέλεχος *Paenibacillus sp.* απαιτεί μεγαλύτερη συγκέντρωση Χαλκού (0,31 mg/L) για τη θανάτωση του πληθυσμού του σε σχέση με τα υπόλοιπα βακτήρια.

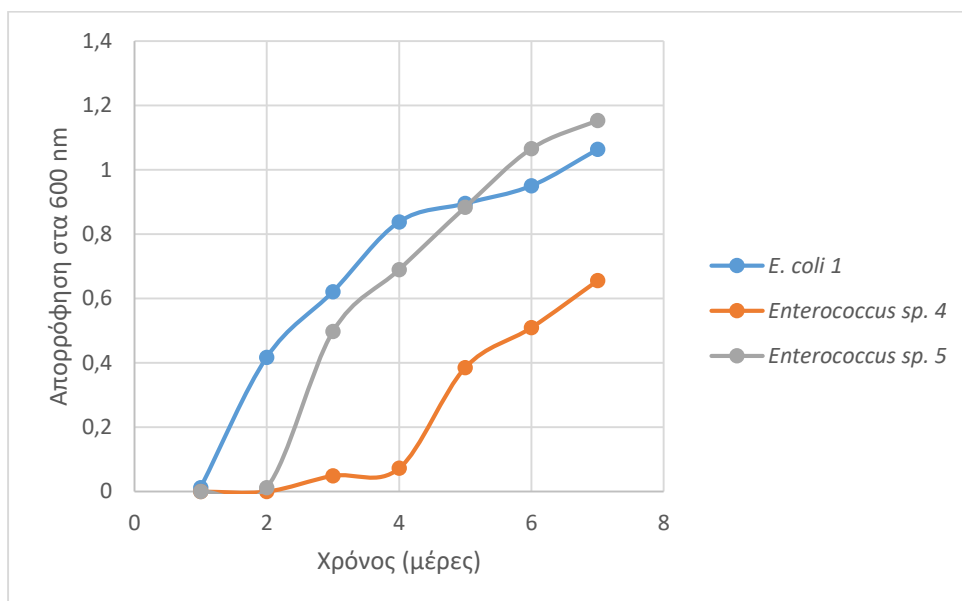
Η ανθεκτικότητα του στελέχους *Paenibacillus sp.* μπορεί να αποδωθεί στο παχύ κυτταρικό τοίχωμα, που διαθέτει, ως θετικό κατά Gram βακτήριο.

4.4 ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ ΣΕ ΜΕΣΕΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΜΕΤΑΛΛΩΝ

Κατά το στάδιο του εγκλιματισμού τα ανθεκτικά βακτήρια για κάθε μέταλλο βρίσκονταν σε θρεπτικό ζωμό και εκτέθηκαν σε μία μέση συγκέντρωση μετάλλου. Η ανάπτυξή τους παρακολουθήθηκε για μία εβδομάδα με φωτομέτρηση και προέκυψαν τα διαγράμματα που ακολουθούν.

4.4.1 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Ψευδαργύρου

Τα βακτήρια του θαλασσινού νερού, που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στον Ψευδάργυρο εγκλιματίστηκαν σε **συγκέντρωση άλατος Ψευδαργύρου 50 mg/L** και εξετάστηκε η ανάπτυξή τους για μία εβδομάδα με φωτομέτρηση.

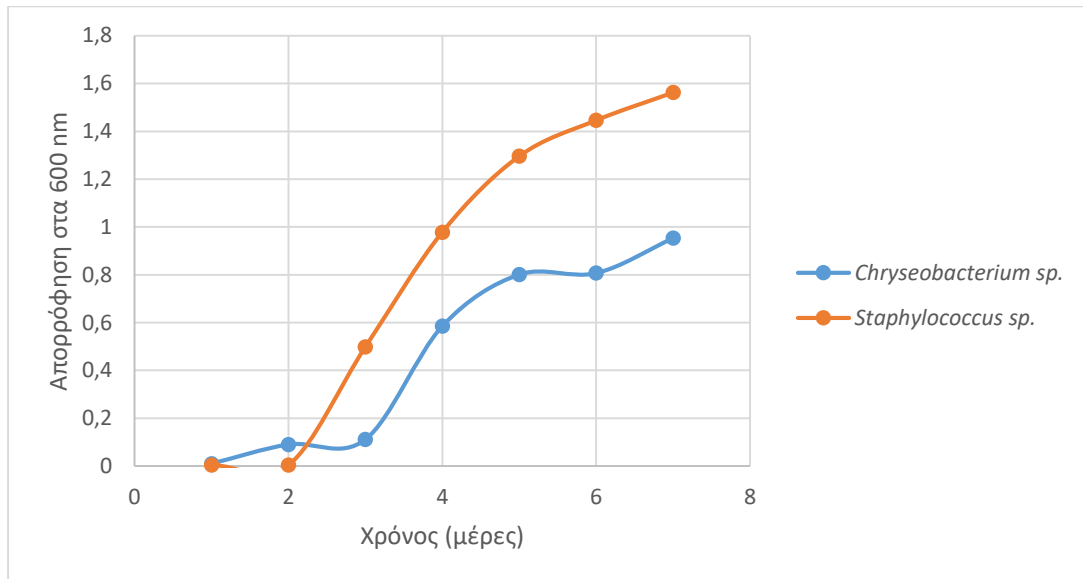


Διάγραμμα 15: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων νερού στο Ψευδάργυρο κατά το στάδιο εγκλιματισμού

Παρατηρείται αύξηση του πληθυσμού των βακτηρίων μετά το πέρας της δεύτερης ημέρας και η αύξηση αυτή συνεχίζεται με τη πάροδο του χρόνου. Τις δύο πρώτες ημέρες τα βακτήρια προσαρμόζονται στη συγκέντρωση Ψευδαργύρου. Τα στελέχη *E. coli 1* και *Enterococcus sp. 5* φαίνεται να εγκλιματίζονται καλύτερα στο μέταλλο αυτό σε σχέση με το στέλεχος *Enterococcus sp. 4*, διότι η ανάπτυξή τους είναι μεγαλύτερη. Για το λόγο αυτό το στέλεχος *Enterococcus sp. 4* δεν επιλέχθηκε για τη βιοαποκατάσταση νερού, που έχει ρυπανθεί από Ψευδάργυρο.

4.4.2 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο άλας Ψευδαργύρου

Τα βακτήρια του εδάφους, που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στον Ψευδάργυρο εγκλιματίστηκαν σε **συγκέντρωση άλατος Ψευδαργύρου 50 mg/L** και εξετάστηκε η ανάπτυξή τους για μία εβδομάδα με φωτομέτρηση.

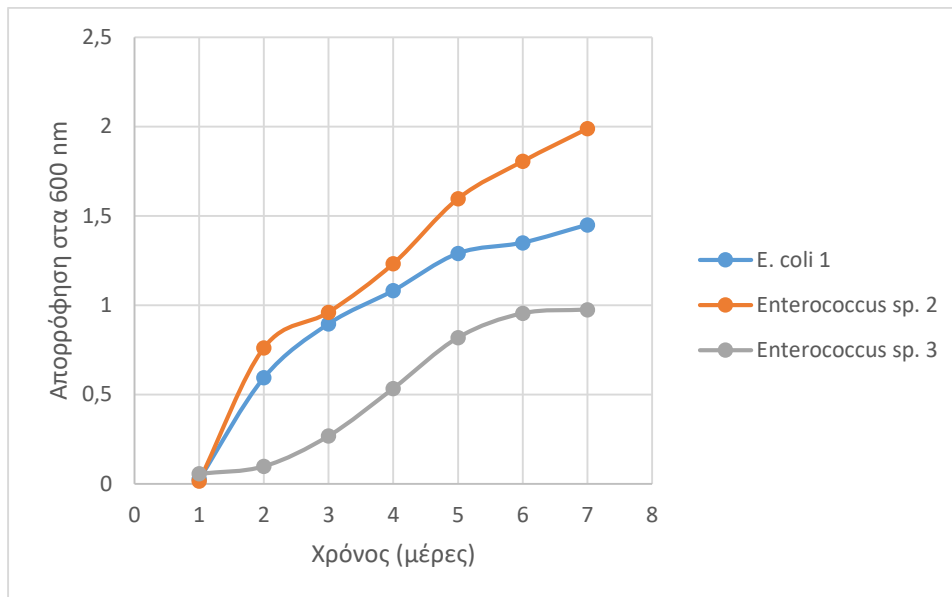


Διάγραμμα 16: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο Ψευδάργυρο κατά το στάδιο εγκλιματισμού

Και τα δύο βακτήρια χρειάζονται μία έως δύο ημέρες προσαρμογής στο μέταλλο του Ψευδαργύρου, για το λόγο αυτό τις πρώτες μέρες η τιμή της απορρόφησης είναι κοντά στο μηδέν. Στη συνέχεια, ο πληθυσμός τους αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, εγκλιματίζονται δηλαδή στη συγκέντρωση άλατος Χαλκού, που επιλέχθηκε. Επίσης, παρατηρείται ότι ο *Staphylococcus sp.* αναπτύσσεται περισσότερο σε σύγκριση με το *Chryseobacterium sp.*

4.4.3 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων θαλασσινού νερού στο άλας Χαλκού

Τα βακτήρια του θαλασσινού νερού, που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο Χαλκό εγκλιματίστηκαν σε **συγκέντρωση άλατος Χαλκού 0,02 mg/L** και εξετάστηκε η ανάπτυξή τους για μία εβδομάδα με φωτομέτρηση.

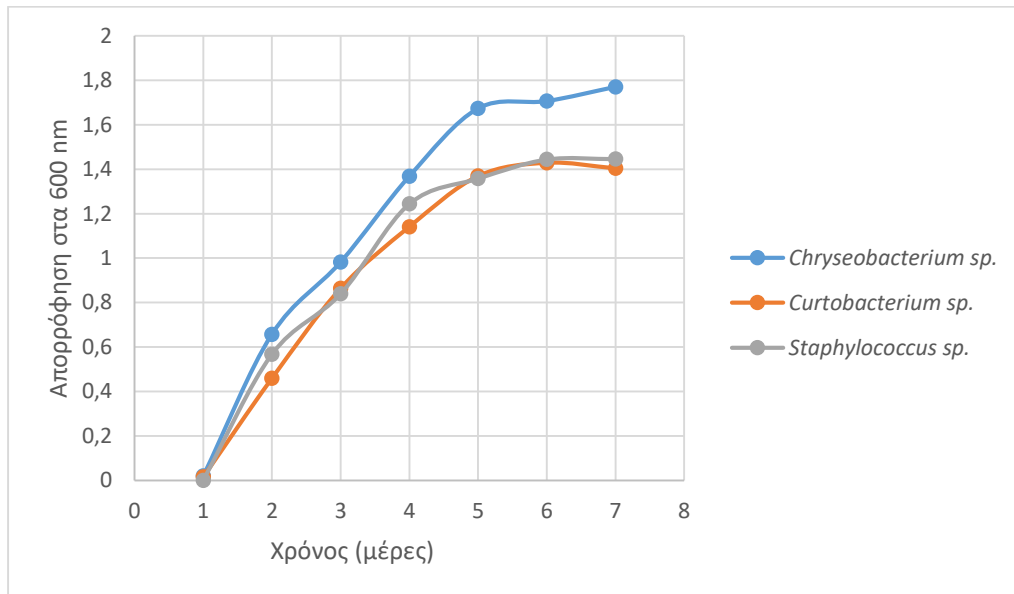


Διάγραμμα 17: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων νερού στο Χαλκό κατά το στάδιο εγκλιματισμού

Και στα τρία βακτήρια παρατηρείται σταδιακή αύξηση της απορρόφησής τους συναρτήσει του χρόνου στη συγκέντρωση άλατος Χαλκού, που αυτά εγκλιματίστηκαν. Επίσης, παρατηρείται ότι ο *Enterococcus sp.3* παρουσιάζει μικρότερη ανάπτυξη σε σχέση με τα άλλα δύο βακτήρια, για το λόγο αυτό δεν επιλέχθηκε στο στάδιο της βιοαποκατάστασης ρυπασμένου θαλασσινού νερού από Χαλκό.

4.4.4 Εγκλιματισμός ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο άλας Χαλκού

Τα βακτήρια του εδάφους, που παρουσίαζαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στο Χαλκό εγκλιματίστηκαν σε **συγκέντρωση άλατος Χαλκού 0,02 mg/L** και παρακολούθηθηκε η ανάπτυξή τους για μία εβδομάδα με φωτομέτρηση.



Διάγραμμα 18: Διακύμανση απορρόφησης ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους στο Χαλκό κατά το στάδιο του εγκλιματισμού

Παρατηρείται ότι η απορρόφηση των ανθεκτικών βακτηρίων εδάφους αυξάνεται με τη πάροδο του χρόνου, γεγονός που δηλώνει ότι ο εγκλιματισμός των βακτηρίων στη συγκέντρωση άλατος Χαλκού, που επιλέχθηκε, ήταν επιτυχής.

4.5 ΔΟΚΙΜΗ ΒΙΟΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΝΕΡΟΥ ΠΟΥ ΕΧΕΙ ΥΠΟΣΤΕΙ ΡΥΠΑΝΣΗ ΑΠΟ ΤΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Τα βακτηριακά στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά στα συγκεκριμένα μέταλλα (Ψευδάργυρο και Χαλκό) και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν κατά το στάδιο του εγκλιματισμού επιλέχθηκαν για τη δοκιμή βιοαποκατάστασης του θαλασσινού νερού, το οποίο έχει υποστεί ρύπανση από τα εξεταζόμενα βαρέα μέταλλα.

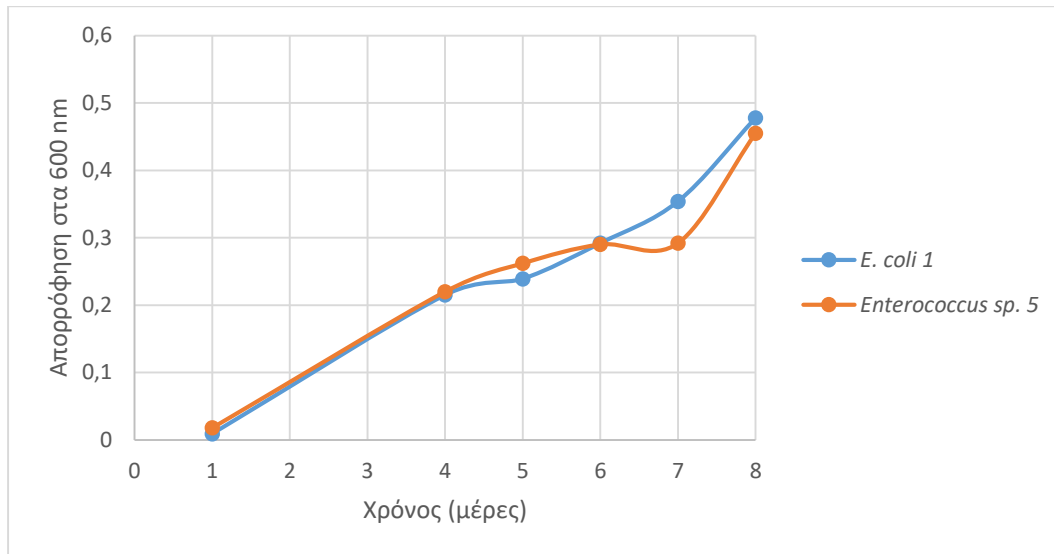
Στα διαγράμματα που ακολουθούν εμφανίζεται η απορρόφηση των εγκλιματισμένων βακτηρίων σε δείγμα θαλασσινού νερού ρυπασμένο με τα εξεταζόμενα μέταλλα. Η αύξηση της απορρόφησης των στελεχών με τον χρόνο δηλώνει ότι αυτά αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, συνεπώς η δράση τους ενάντια στα τοξικά βαρέα μέταλλα ευνοείται. Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να μετατρέπουν τα τοξικά βαρέα μέταλλα σε άλλες μη τοξικές μορφές. Αυτό επιτυγχάνεται ανοργανοποιώντας τις οργανικές ενώσεις σε τελικά προϊόντα, διοξείδιο του άνθρακα (CO_2) και νερό (H_2O), είτε σε ενδιάμεσους μεταβολιτές, οι οποίοι δρουν ως υπόστρωμα για την ανάπτυξη νέων κυττάρων.

Αφού μελετήθηκε η ανάπτυξη των εγκλιματισμένων βακτηρίων σε ρυπασμένο με μέταλλα θαλασσινό νερό μέσω της φωτομέτρησης υπολογίστηκε το ποσοστό απομάκρυνσης των μετάλλων από αυτό.

4.5.1 Δοκιμή βιοαποκατάστασης νερού που έχει υποστεί ρύπανση από Ψευδάργυρο

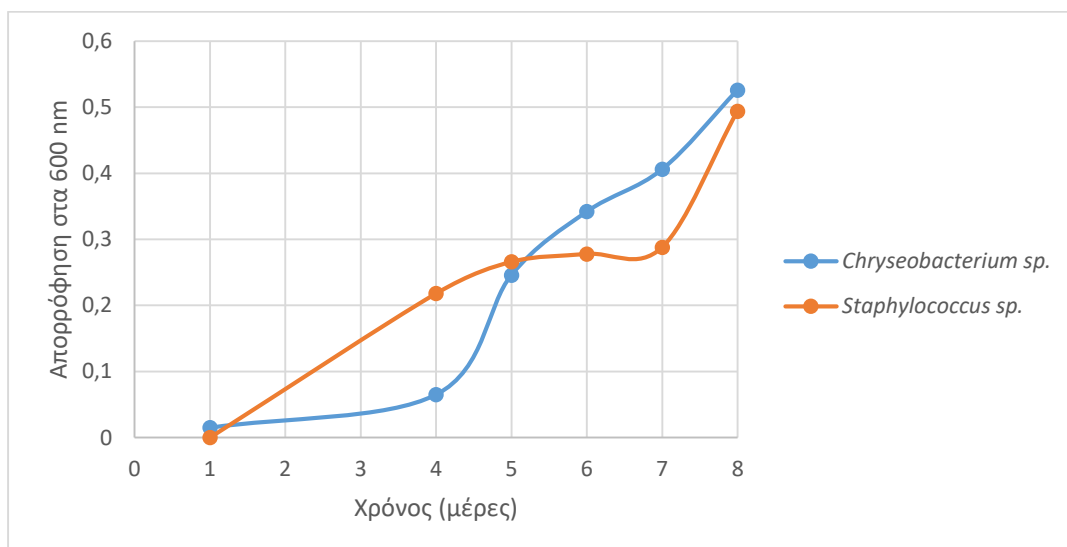
Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την ανάπτυξη των εγκλιματισμένων, ανθεκτικών βακτηρίων σε ρυπασμένο με Ψευδάργυρο θαλασσινό νερό.

i. Βακτήρια θαλασσινού νερού κατόπιν εγκλιματισμού



Διάγραμμα 19: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων νερού σε θαλασσινό νερό παρουσία Ψευδαργύρου

ii. Βακτήρια εδάφους κατόπιν εγκλιματισμού



Διάγραμμα 20: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων εδάφους σε θαλασσινό νερό παρουσία Ψευδαργύρου

Στα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται συνεχής αύξηση της απορρόφησης των βακτηρίων θαλασσινού νερού και εδάφους από την πρώτη έως και την τελευταία ημέρα φωτομέτρησης παρουσία Ψευδαργύρου. Αυτό δηλώνει ότι ο Ψευδάργυρος μετατρέπεται από τα βακτήρια αυτά σε μη τοξικές μορφές. Και συνεπώς είναι δυνατή η βιοαποκατάσταση του ρυπασμένου με Ψευδάργυρο θαλασσινού νερού με τη χρήση των συγκεκριμένων βακτηρίων.

Ο πίνακας που ακολουθεί παρουσιάζει το ποσοστό απομάκρυνσης του Ψευδαργύρου από το θαλασσινό νερό με τη δράση των ανθεκτικών εγκλιματισμένων βακτηρίων.

Πίνακας 7: Ποσοστό απομάκρυνσης του Ψευδαργύρου από το θαλασσινό νερό

Είδος βακτηρίου	Αρχική συγκέντρωση Zn (ppb)	Τελική συγκέντρωση Zn (ppb)	Απομάκρυνση (%)
<i>Enterococcus sp. 5</i>	20190	1661	91,77
<i>E. coli 1</i>	20190	3636	81,99
<i>Chryseobacterium sp.</i>	20190	2354	88,34
<i>Staphylococcus sp.</i>	20190	2585	87,19

Στη τελευταία στήλη του παραπάνω πίνακα χρησιμοποιήθηκε ο εξής μαθηματικός τύπος για κάθε βακτήριο :

$$\frac{(\text{Αρχική συγκέντρωση Ψευδαργύρου} - \text{Τελική συγκέντρωση Ψευδαργύρου})}{\text{Αρχική συγκέντρωση Ψευδαργύρου}} * 100\%$$

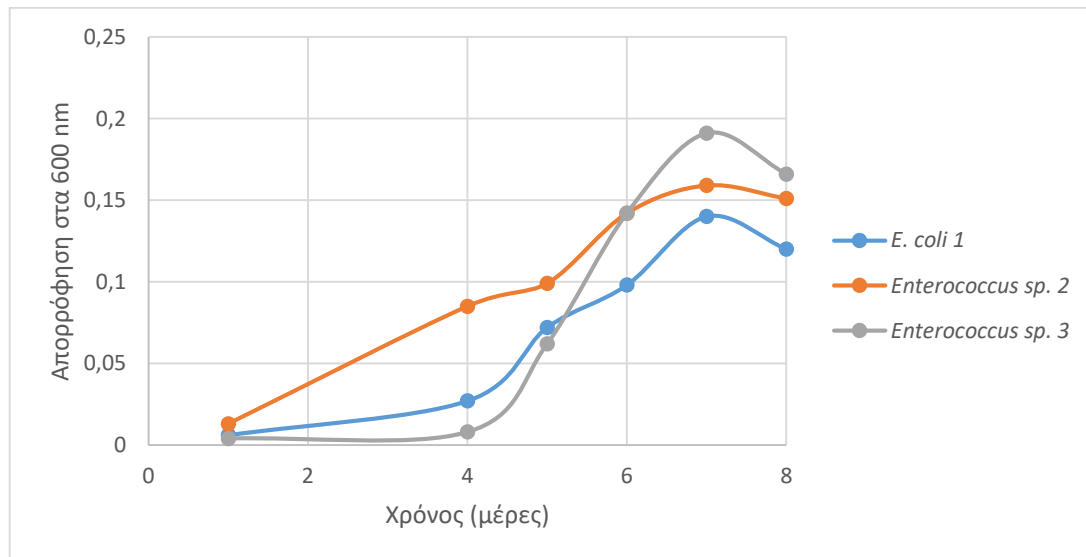
Επίσης, η τελική συγκέντρωση Ψευδαργύρου για κάθε βακτήριο του πίνακα 8, βρέθηκε με τη μέθοδο ICP-MS στο εργαστήριο του κυρίου Νικολαΐδη και αναφέρεται στο ιόν του Ψευδαργύρου.

Στα πειράματά τους οι Saranya et. al. (2018) διαπίστωσαν ότι είναι ικανή η βιολογική απομάκρυνση Ψευδαργύρου με τη χρήση του *Cronobacter muytjensii*. Για αρχική συγκέντρωση Ψευδαργύρου 100 mg/L το μέταλλο απομακρύνθηκε σε ποσοστό 61,51%, ενώ για αρχική συγκέντρωση μετάλλου 200 mg/L η απομάκρυνση ήταν ίση με 52,80%. Το βακτήριο αυτό διαθέτει στο κυτταρικό του τοίχωμα μία ποικιλία λειτουργικών ομάδων, οι οποίες δεσμεύουν το μέταλλο και συμβάλλουν στην απομάκρυνσή του από το θαλασσινό νερό.

4.5.2 Δοκιμή βιοαποκατάστασης νερού που έχει υποστεί ρύπανση από Χαλκό

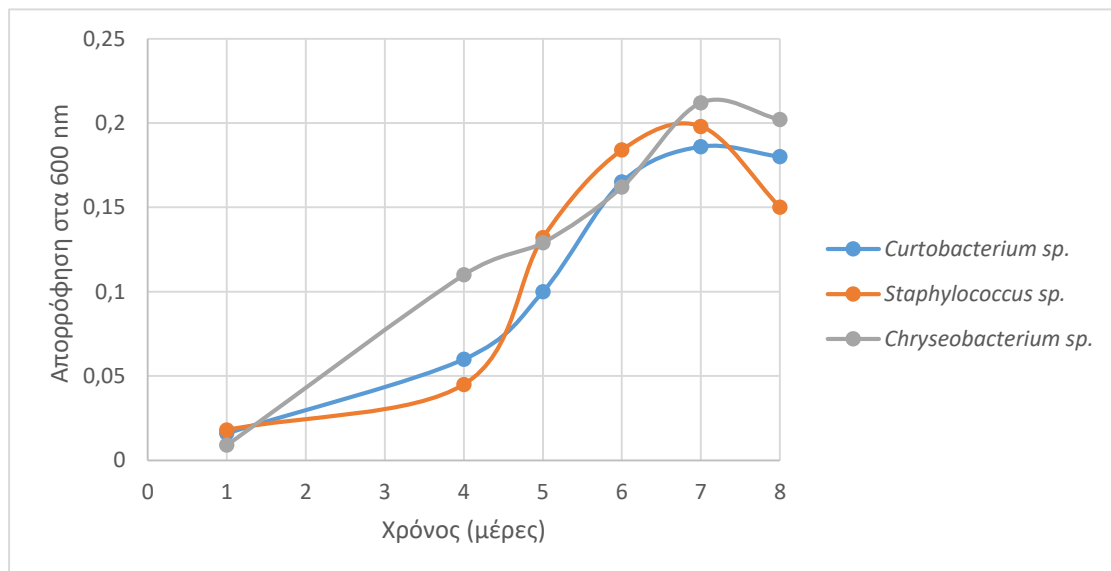
Τα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζουν την ανάπτυξη των εγκλιματισμένων, ανθεκτικών βακτηρίων σε ρυπασμένο με Χαλκό θαλασσινό νερό.

ι. Βακτήρια θαλασσινού νερού κατόπιν εγκλιματισμού



Διάγραμμα 21: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων νερού σε θαλασσινό νερό παρουσία Χαλκού

ii. Βακτήρια εδάφους κατόπιν εγκλιματισμού



Διάγραμμα 22: Διακύμανση απορρόφησης εγκλιματισμένων βακτηρίων εδάφους σε θαλασσινό νερό παρουσία Χαλκού

Από τα παραπάνω διαγράμματα παρατηρείται ότι η απορρόφηση των περισσότερων βακτηρίων τις πρώτες ημέρες είναι χαμηλή, παρουσιάζει μία μικρή αύξηση από την πέμπτη έως την έβδομη ημέρα και στη συνέχεια μειώνεται. Η μείωση αυτή οφείλεται στην υψηλή τοξικότητα του Χαλκού, η οποία εμποδίζει την ανάπτυξη και τη δράση των βακτηρίων.

Δεν δοκιμάστηκε η απομάκρυνση του Χαλκού από τα ανθεκτικά βακτήρια εδάφους και θαλασσινού νερού, γιατί παρόλο που εγκλιματίστηκαν στη συγκέντρωση άλατος Χαλκού που επιλέχθηκε, κατά το στάδιο της βιοαποκατάστασης (διαγράμματα 21 και 22) παρατηρείται ότι οι τιμές των απορροφήσεων τους έχουν καθοδική πορεία από την έβδομη ημέρα και έπειτα και παρουσιάζουν αργή ανάπτυξη.

Τα παραπάνω αποτελέσματα διαφέρουν από εκείνα που προέκυψαν από τα πειράματα των Saranya et. al. (2018), οι οποίοι διαπίστωσαν ότι είναι ικανή η βιολογική απομάκρυνση του Χαλκού με τη χρήση του βακτηρίου *Cronobacter mytjensis*. Για αρχική συγκέντρωση Χαλκού 100 mg/L το βακτήριο απομάκρυνε το μέταλλο σε ποσοστό 76,51%, ενώ για αρχική συγκέντρωση μετάλλου 200 mg/L η απομάκρυνση ήταν ίση με 67%. Το βακτήριο αυτό διαθέτει στο κυτταρικό του τοίχωμα μία ποικιλία λειτουργικών ομάδων, οι οποίες δεσμεύουν το μέταλλο και συμβάλλουν στην απομάκρυνσή του από το θαλασσινό νερό.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος τοξικότητας δύο βαρέων μετάλλων, του Ψευδαργύρου και του Χαλκού, σε βακτήρια προερχόμενα από το θαλασσινό νερό και από το έδαφος, έτσι ώστε να επιτευχθεί η απομάκρυνσή τους από το θαλασσινό νερό.

Τα συμπεράσματα, που προέκυψαν, επικεντρώνονται στη συμπεριφορά των εξεταζόμενων βακτηρίων παρουσία των συγκεκριμένων μετάλλων, καθώς και στη δυνατότητα απομάκρυνσης τους από δείγμα θαλασσινού νερού κατόπιν δράσης των ανθεκτικών βακτηρίων.

Με βάση τα αποτελέσματα της συμπεριφοράς των βακτηριακών στελεχών παρουσία των μετάλλων παρατηρήθηκαν τα εξής:

- Με βάση το εύρος των συγκεντρώσεων των δύο μετάλλων, που χρησιμοποιήθηκε, ο Χαλκός θεωρείται πιο τοξικός από τον Ψευδάργυρο. Καθώς οι συγκεντρώσεις του Χαλκού, που εξετάστηκαν, ήταν από 0,01 έως 1,25 mg/L, ενώ του Ψευδαργύρου ήταν από 1,5 έως 200 mg/L. Συνεπώς, επιβεβαιώνεται η σειρά τοξικότητας, η οποία παρουσιάζεται στην εικόνα (7).
- Τα μισά από τα εξεταζόμενα βακτήρια (10/20 στελέχη) παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου, με βάση τα διαγράμματα του ποσοστού απομάκρυνσης του βακτηριακού πληθυσμού τους παρουσία του συγκεκριμένου μετάλλου. Ενώ, για το Χαλκό ελάχιστα βακτήρια (3/20 στελέχη) εμφάνισαν ανθεκτικότητα σε χαμηλές συγκεντρώσεις του. Συνεπώς, η τοξική δράση του Χαλκού είναι μεγαλύτερη από αυτή του Ψευδαργύρου.
- Λίγα ήταν τα βακτήρια (7/20 στελέχη), που έδειξαν ανθεκτικότητα σε όλες τις συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου, που μελετήθηκαν. Ακόμη πιο λίγα (2/20 στελέχη) ήταν εκείνα που παρουσίασαν ανθεκτικότητα σε όλες τις μελετούμενες συγκεντρώσεις Χαλκού.
- Ενώ τέσσερα (4/20 στελέχη) ήταν τα βακτήρια, τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα στον Ψευδάργυρο, καθώς ο πληθυσμός τους μειώθηκε σε ποσοστό 100% από την μικρότερη μελετούμενη συγκέντρωση μετάλλου. Στη περίπτωση του Χαλκού η πλειοψηφία των βακτηρίων (14/20) ήταν ευαίσθητα στο συγκεκριμένο μέταλλο, καθώς ο πληθυσμός τους μειωνόταν σημαντικά από την μικρότερη μελετούμενη συγκέντρωση Χαλκού.

- Συγκρίνοντας την προέλευση (νερό ή έδαφος) των βακτηρίων παρατηρήθηκε ότι τα περισσότερα βακτήρια (8/10 στελέχη), που απομονώθηκαν από το νερό, ήταν ανθεκτικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις Ψευδαργύρου. Ενώ, λίγα ήταν εκείνα, που ήταν ανθεκτικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις Χαλκού (3/10 στελέχη). Τα περισσότερα βακτήρια από το έδαφος (8/10 στελέχη) ήταν ευαίσθητα στο Χαλκό στο εύρος των συγκεντρώσεων, που εξετάστηκε και τα υπόλοιπα ήταν ανθεκτικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις του μετάλλου. Ενώ, τα περισσότερα βακτήρια από το έδαφος (6/10 στελέχη) ήταν ανθεκτικά στον Ψευδάργυρο σε όλες τις συγκεντρώσεις, που αυτά εκτέθηκαν και μόνο ένα ήταν ευαίσθητο στο μέταλλο αυτό.

Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας των βακτηρίων έναντι των μετάλλων εξαρτώνται από το είδος του μετάλλου και από τον τρόπο που αυτό προσλαμβάνεται από το εκάστοτε βακτήριο. Η διαφορετική συμπεριφορά των βακτηρίων οφείλεται στα δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά τους, που υπαγορεύονται από την διάκρισή τους σε Gram θετικά και Gram αρνητικά βακτήρια. Τα βακτήρια Gram θετικά έχουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης, το οποίο ενδέχεται να τους προσδίδει ανθεκτικότητα απέναντι στα μέταλλα. Τα βακτήρια Gram αρνητικά διαθέτουν επιπλέον εξωτερικό περίβλημα, στο οποίο μπορεί να αποδοθεί η ανθεκτικότητά τους.

Ακόμη, η ανθεκτικότητα ορισμένων βακτηρίων μπορεί να οφείλεται στα πολυμερή, που αυτά διαθέτουν γύρω - γύρω από το κυτταρικό τους τοίχωμα, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν συγκεκριμένα μέταλλα, με αποτέλεσμα να μην επιτρέπουν την είσοδο τους στο εσωτερικό των κυττάρων και έτσι δεν μπορούν να τους προκαλέσουν κάποια βλάβη.

Με βάση τα διαγράμματα του εγκλιματισμού των βακτηρίων στα εξεταζόμενα μέταλλα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Κατά το στάδιο εγκλιματισμού παρατηρήθηκε ότι στελέχη, τα οποία παρουσίαζαν ευαισθησία κυρίως στο Χαλκό, αφού εγκλιματίζονταν σε μία μέση συγκέντρωση μετάλλου, και μετά το πέρας δύο ημερών προσαρμογής, αναπτύσσονταν και πολλαπλασιάζονταν.
- Τα βακτηριακά στελέχη που χαρακτηρίστηκαν ανθεκτικά στον Ψευδάργυρο και εγκλιματίστηκαν σε συγκέντρωση 50 mg/L άλατος Ψευδαργύρου παρουσίασαν ανάπτυξη κατά την εβδομάδα εγκλιματισμού. Ενώ, τα ανθεκτικά στελέχη στον Χαλκό, που εγκλιματίστηκαν σε συγκέντρωση 0,02 mg/L άλατος Χαλκού, παρουσίασαν πιο αργή προσαρμογή στο μέταλλο αλλά και ανάπτυξη. Επίσης, παρατηρείται μικρή μείωση τους μετά το πέρας της εβδομης ημέρας, γεγονός που δηλώνει ότι ο Χαλκός αναστέλλει τις βασικές λειτουργίες τους.

Με βάση τα διαγράμματα της βιοαποκατάστασης ρυπασμένου θαλασσινού νερού με τα εξεταζόμενα μέταλλα προέκυψαν τα εξής συμπεράσματα:

- Αποδεικνύεται ότι τα εγκλιματισμένα ανθεκτικά βακτήρια καταφέρνουμε με μεγάλη αποτελεσματικότητα να απομακρύνουν τον Ψευδάργυρο από το θαλασσινό νερό.
- Δεν δοκιμαστήκε η απομάκρυνση του Χαλκού από το θαλασσινό νερό, διότι τα ανθεκτικά στελέχη δεν παρουσίασαν καλή προσαρμογή και εγκλιματισμό στο συγκεκριμένο μέταλλο.

Συνοψίζοντας, αξίζει να τονιστεί ότι η χρήση ανθεκτικών βακτηρίων για την απομάκρυνση τοξικών βαρέων μετάλλων από το ρυπασμένο περιβάλλον αποτελεί μία αποδοτική και συνάμα οικονομική μέθοδο. Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής συνιστάται η χρήση εγκλιματισμένων βακτηρίων στα μέταλλα, που επιθυμούμε να απομακρύνουμε.

6. ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ ΓΙΑ ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Οι προτάσεις για μελλοντική έρευνα συνοψίζονται στις εξής:

- Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων σε διαφορετικά μέταλλα (όπως χρώμιο, υδράργυρο, κάδμιο, μόλυβδο και άλλα) από τα εξεταζόμενα στην παρούσα εργασία.
- Έλεγχος ανθεκτικότητας βακτηρίων σε μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων των εξεταζόμενων μετάλλων.
- Ανίχνευση γονιδίων, που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των βακτηρίων στα υπό μελέτη μέταλλα.
- Βιοαποκατάσταση ρυπασμένου με βαρέα μέταλλα εδάφους με τη χρήση ανθεκτικών βακτηρίων.
- Έλεγχος για βιοαποκατάσταση πρωτοβάθμιας ή τριτοβάθμιας εκροής βιολογικού καθαρισμού από βαρέα μέταλλα με τη χρήση ανθεκτικών βακτηρίων, ιδιαίτερα εάν στον βιολογικό καταλήγουν υγρά βιομηχανικά απόβλητα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

7.1 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. G. Nelson EBY, 2012, Αρχές Περιβαλλοντικής Γεωχημείας, Εκδόσεις Κωσταράκη
2. Paul Claus - Dieter, 1997, Βιολογία Τεχνολογία και Περιβάλλον, Ευρωπαϊκές Τεχνολογικές Εκδόσεις
3. Ανδρέου Σ., Κρουσταλά Α., 2010, Προσδιορισμός των Βαρέων Μετάλλων Χαλκού (Cu) και Ψευδαργύρου (Zn), σε νωπά και κονσερβοποιημένα καλαμάρια, Πτυχιακή εργασία, Αλεξάνδρειο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα, Θεσσαλονίκη
4. Βενιέρη Δ, 2018, Περιβαλλοντική Μικροβιολογία, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά
5. Γιαννής, Α., 2008, Απομάκρυνση Βαρέων Μετάλλων με Χρήση Ηλεκτροκινητικής Τεχνικής και Πλύσης από Ρυπασμένα Εδάφη με έμφαση στο Κάδμιο, Διδακτορική διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά
6. Γρηγορόπουλος Ε., 2005, Διαχείριση Βιομηχανικών Αποβλήτων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις
7. Δρ. Σαμαρίδης, Ν., 2009, Τοξικά βαρέα μέταλλα και η επίπτωσή τους στην υγεία [online] www.greenmed.gr [προσβάσιμο στις 20 Μαΐου 2019]
8. Κίρλαππου Μ., 2004, Οι επιπτώσεις της ρύπανσης του περιβάλλοντος στη τροφική αλυσίδα. Η περίπτωση των παραμενόντων οργανικών ρύπων και των βαρέων μετάλλων, Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Οικονομίας και Οικολογίας, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα
9. Κοκκόρης, Β., 2014, Βιοσυσσώρευση Βαρέων Μετάλλων από τους Βασidioμύκητες *Coprinus comatus* Και *Psathyrella candolleana* σε Διάφορες Περιοχές του Λεκανοπεδίου της Αθήνας, Μεταπτυχιακή Διπλωματική εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

10. Κουϊμτζής Θ., Φυτιανός Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., 1998, Χημεία Περιβάλλοντος, Εκδόσεις UNIVERSITY STUDIO PRESS, Θεσσαλονίκη
11. Κώστα Φυτιάνος, 1996, Η Ρύπανση των Υδάτων, Εκδόσεις University Studio Press
12. Νιάρχος, Γ., 2015, Μικροοργανισμοί και αντιβιοτικά: διασπορά ανθεκτικών βακτηρίων και αντίστοιχων γονιδίων τους στο υδάτινο περιβάλλον, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά
13. Νικηφόρου Ο., Κύκνα Α., 2013, Μελέτη της ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα αερομεταφερόμενων μικροοργανισμών, Τμήμα Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Χανιά
14. Παϊταρίδης, Δ., 2010, Ρύπανση Θαλάσσιου Περιβάλλοντος από Βαρέα Μέταλλα: Επίπεδα Ρύπανσης Ελληνικών Θαλασσών & Μεσογείου, Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Αιγαίου
15. Σαμπατάκης Δ., 1991, Ρύπανση του Περιβάλλοντος από χημικές ουσίες, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, Πειραιάς
16. Υψηλάντη, Ο., 2012, Βαρέα μέταλλα σε υγρά απόβλητα. Η περίπτωση του Υδραργύρου, του Καδμίου και του Μολύβδου, Πτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Αιγαίου
17. Χατζηβεργή, Α., 2016, Απομάκρυνση τοξικών μετάλλων από το έδαφος με τη συμβολή μικροοργανισμών, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά

7.2 ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

18. Agarwal H., Menon S., Kumar V., Rajeshjumar S., 2018, *Mechanistic study on antibacterial action of zinc oxide nanoparticles synthesized using green route*, *Chemico-Biological Interactions*, Volume 286, pp. 60-70
19. Akbar A., Sadiq M., Imran A., Niaz M., Ziaur R., Khan M., Javed M., Khan S., Fazal R., Anal A., 2019, *Synthesis and antimicrobial activity of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens Salmonella typhimurium and Staphylococcus aureus*, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 17, pp. 36-42
20. Allen H., Garrison W., 1998, Luther G., Metal in Surface Waters
Bhattacharyya P., Agarwal B., Goswami M., Maiti D., 2018, *Zinc oxide nanoparticle inhibits the biofilm formation of Streptococcus pneumoniae*, Volume 111, Issue1, pp. 89-99
21. Bondarenko O., Ivask A., Kakinen A., Kahru A., 2012, *Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action*, *Environmental Pollution*, Volume 169, pp. 81-89
22. Ecosystems Database Observatory, 2007. *Βαρέα μέταλλα* [online]
23. www.ecodonet.gr [προσβάσιμο στις 20 Μαΐου 2019]
24. Hellawell John. M., 1988, *Toxic Substances in Rivers and Streams*
25. Jadia C.D., Fulekar M.H., 2009, *Phytoremediation of heavy metals Recent techiques*, *African Journal of Biotechnology*, Volume 8, Issue 6, pp. 921-928
26. Long M., Holland A., Planquette H., Santana D., Whitby H., Soudant P., Sarthou G., Hegaret H., Jolley D., 2019, *Effects of copper on the dinoflagellate Alexandrium minutum and its allelochemical potency*, *Aquatic Toxicology*, Volume 210, pp. 251-261
27. Mansano A., Souza J., Bernardi J., Venturini F., Marangoni V., Zucolotto V., 2018, *Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species Ceriodaphnia silvestrii and Hyphessobrycon eques*, *Envinmental Pollution*, Volume 243, pp. 723-733
28. Molecular Nutrition Labs, 2012, [online] www.nutrilabs.gr [προσβάσιμο στις 19 Μαΐου 2019]
29. Perelomov L., Sarkar B., Sizova O., Chilachava K., Shvikin A., Perelomova I., Atroshchenko Y., 2018, *Zinc and lead detoxifying abilities of humic substances*

- relevant to environmental bacterial species, Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 151, pp. 178-183
30. Resende J., Silva V., Fontes C., Souza-Filho J., Oliveira T., Coelho C., Cesar D., Diniz C., 2012, *Multidrug-Resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System*, Volume 27
31. Roane T.M., Kellogg S.T., 1996, *Characterization of bacterial communities in heavy metal contaminated soils*, Can J. Microbiol 42, pp. 593-603
32. Salt D.E., Blaylock M., Kumar N.P.B.A., Dushenkov V., Ensley B.D., Chet I., Raskin I., 1995, *Phytoremediation: A novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants*, Bio/Techology, Volume 13, Issue 5, pp.468-474
33. Samakshi V., Arindam K., 2019, *Bioremediation of heavy metals by microbial process*, *Environmental Techonology & Innovation*, Τόμος 14
34. Saranya K., Sundaramanickam A., Shekhar S., Meena M., Sathishkumar R., Balasubramanian T., 2018, *Biosorption of multi-heavy metals by coral associated phosphate solubilising bacteria Cronobacter muytjensii KSCAS2*, *Journal of Environmental Management*, Volume 222, pp. 396-401
35. Tirry N., Tahri J. N., Sayel H., Kouchou A., Bahafid W., Asri M., Ghachtouli N., El., 2018, *Screening of plant growth promoting traits in heavy metals resistant bacteria: Prospects in phytoremediation*, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, Volume 16, Issue 2, pp. 613-619
36. W.J. MANNING, 1999, *Environmental Pollution*, Εκδόσεις ELSEVIER
37. www.lenntech.com [προσβάσιμο 22 Μαΐου 2019]
38. Zhisong C., Xiao L., Huichao J., Qian L., Guangfei X., Chengjun S., Li Z., Yizhi S., Paul A.D., Wei E.H., 2018, *Application of a bacterial whole cell biosensor for the rapid detection of cytotoxicity in heavy metal contaminated seawater*, *Chemosphere* 200 pp. 322-329