



**ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Μεταπτυχιακή Διατριβή
**«Μελέτη των μηχανισμών αδρανοποίησης
βακτηρίων κατά την απολύμανση υδατικών
δειγμάτων »**

Λυρώνη Μαρία – Αικατερίνη
Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δανάη Βενιέρη

Χανιά, Οκτώβριος 2020

Στην οικογένειά μου

Ευχαριστίες

Μετά το πέρας της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

- Την καθηγήτρια του Πολυτεχνείου Κρήτης, κα Δανάη Βενιέρη για την επίβλεψη, τη διαρκή υποστήριξη, τις γόνιμες παρατηρήσεις και την πολύτιμη καθοδήγησή της.
- Την κα Ιωσηφίνα Γουνάκη (Ε.Τ.Ε.Π.) για τις οξυδερκείς συμβουλές, τη συνεχή στήριξη και την πολύπλευρη βοήθειά της.
- Τους καθηγητές του Πολυτεχνείου Κρήτης, κ. Ευάγγελο Διαμαντόπουλο και κ. Νίκο Ξεκουκουλωτάκη για τη συνεισφορά τους, ως μέλη της εξεταστικής επιτροπής, στην αξιολόγηση της εργασίας.

Περίληψη

Η ανάπτυξη εναλλακτικών, οικονομικών και αποδοτικών τεχνικών απολύμανσης κρίνεται επιτακτική λόγω της αυξημένης πίεσης στο περιβάλλον και της απειλής πόρων «κλειδιών», όπως το νερό, από παθογόνους μικροοργανισμούς. Στο πλαίσιο αυτό, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν η φωτοκατάλυση και η οζόνωση ως μέθοδοι απολύμανσης. Στόχο της εργασίας αποτέλεσε η εξέταση της αποτελεσματικότητας αυτών των δύο τεχνικών στην αδρανοποίηση τριών αντιπροσωπευτικών βακτηρίων (*Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* & *Bacillus cereus*), τα οποία θεωρούνται σημαντικά για τη δημόσια υγεία, καθώς και η μελέτη αλλοιώσεων σε υποκυτταρικό επίπεδο από την επίδραση της απολύμανσης σε κυτταρικά συστατικά, όπως είναι τα λιπίδια, η μεμβράνη και οι πρωτεΐνες. Χρησιμοποιήθηκε ο εμπορικός καταλύτης TiO_2 σε συγκεντρώσεις 25 - 100 mg/L στα φωτοκαταλυτικά πειράματα, ενώ κατά την οζόνωση χρησιμοποιήθηκαν διάφορες δόσεις όζοντος στο εύρος συγκεντρώσεων 2,40 – 19,99 mg/L. Τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν την αποτελεσματικότητα και των δύο απολυμαντικών τεχνικών. Η αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη οδήγησε σε υψηλότερους ρυθμούς αδρανοποίησης, με τα Gram αρνητικά *E. coli* και *P. aeruginosa* να σημειώνουν 7-8 Logs μείωση σε 20 min, ενώ για το Gram θετικό *B. cereus* καταγράφηκε απομάκρυνση της τάξης των 4 Log σε 60 min επεξεργασίας, παρά τη μικρότερη αρχική του συγκέντρωση (10^5 CFU/mL). Η οζόνωση αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική για την απολύμανση υδατικών δειγμάτων σε σύγκριση με τη φωτοκατάλυση UV-A, καθώς για τα βακτήρια Gram (-) επιτεύχθηκε πλήρης μείωση εντός 15 min, ενώ για τα βακτήρια Gram (+) η ίδια μείωση επιτεύχθηκε εντός 30 min. Παρατηρήθηκε φωτοενεργοποίηση της *E. coli*, αλλά τα επίπεδα που καταγράφηκαν ήταν χαμηλά. Όσον αφορά το υποκυτταρικό επίπεδο, οι απολυμαντικές τεχνικές συνοδεύονταν από υπεροξείδωση των λιπιδίων, η οποία εξελίχθηκε με εκθετικό ρυθμό κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας. Η ανάλυση υδρόλυσης του ONPG (ortho nitrophenyl-β-D-galactopyranoside) έδειξε μεταβολές στην πορεία της επεξεργασίας, υποδεικνύοντας ότι η κυτταρική μεμβράνη μπορεί να υποστεί αύξηση της διαπερατότητάς της, επιτρέποντας τη διείσδυση του κυτοπλάσματος στο εξωτερικό διάλυμα. Η ανάλυση SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) έδειξε ότι σε κάποιες περιπτώσεις η αύξηση του χρόνου επεξεργασίας οδηγεί σε διαφοροποίηση των πρωτεϊνικών ζωνών, με γενικά υψηλά επίπεδα ομολογίας για το δείγμα των ανέπαφων κυττάρων και των δειγμάτων που είχαν υποστεί επεξεργασία.

Abstract

Due to the increasing pressure on the environment and the threat of some key resources, such as water, from microbial pathogens, the development of alternative, economical and efficient disinfection techniques, is of high importance. In this context, in the present study, it was investigated the disinfection potential of photocatalysis and ozonation, regarding the inactivation rates of three reference bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* & *Bacillus cereus*), which are considered important for public health. Also, we studied the damages in the subcellular level in terms of disinfection effects on cellular components, namely, lipids, membrane and proteins. The commercially available P25 catalyst was used at concentrations of 25 - 100 mg/L for the photocatalytic experiments, while during ozone treatment the applied ozone dose ranged from 2,40 to 19,99 mg /L. The results confirmed the effectiveness of both disinfection techniques. The increase in catalyst concentration led to higher inactivation rates, with Gram-negative *E. coli* and *P. aeruginosa* being inactivated by 7-8 Logs in 20 min, while Gram-positive *B. cereus* exhibited a 4 Log reduction in 60 min of treatment, despite its lower initial concentration (10^5 CFU/mL). Ozonation proved to be more effective as a disinfection method of water samples compared to UV-A photocatalysis, as a complete microbial decay was achieved within 15 min for Gram-negative bacteria, while for *B. cereus* the same reduction was achieved within 30 min. Photoreactivation of *E. coli* was observed, however, the recorded levels were low. Regarding the subcellular level, disinfection techniques were accompanied by lipid peroxidation, which developed exponentially during treatment. The ONPG (ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) hydrolysis assay showed alterations in the course of treatment, indicating the increase in cell membrane permeability, allowing the free efflux of cytoplasm into the outer solution. The SDS PAGE (Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) analysis showed that in the course of treatment the protein pattern did not alter significantly, with generally high levels of homology between the samples of the intact cells and the samples after each treatment.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	5
1. Εισαγωγή	9
1.1 Απολύμανση	10
1.2 Μέσα και μέθοδοι απολύμανσης	10
1.3 Χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού	11
1.4 Μηχανισμοί απολύμανσης	11
1.5 Διαχείριση των παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό	12
1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης	12
1.5.2 Κινητικές της απολύμανσης	15
1.6 Συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης.....	16
1.6.1 Χλωρίωση	16
1.6.1.1 Αντιδράσεις του χλωρίου στο νερό.....	17
1.6.1.2 Παραπροϊόντα χλωρίωσης	17
1.6.1.3 Πλεονεκτήματα χλωρίωσης (Δρούμπαλη, 2010)	18
1.6.1.4 Μειονεκτήματα χλωρίωσης (Δρούμπαλη, 2010).....	18
1.6.2 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία UV	18
1.6.2.1 Πλεονεκτήματα ακτινοβολίας UV (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014)	21
1.6.2.2 Μειονεκτήματα ακτινοβολίας UV (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014)	21
1.6.3 Οζόνωση	21
1.6.3.1 Παραπροϊόντα οζόνωσης	22
1.6.3.2 Πλεονεκτήματα όζοντος (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014).....	23
1.6.3.3 Μειονεκτήματα όζοντος (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014).....	23
1.7 Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης (Advanced Oxidation Processes – AOPs)	23
1.7.1 Πλεονεκτήματα προηγμένων διεργασιών οξείδωσης (AOPs)	24
1.7.2 Μειονεκτήματα χρήσης AOPs	24
2. Φωτοκατάλυση	25
2.1 Ετερογενής φωτοκατάλυση	25
2.1.1 Μηχανισμός λειτουργίας της ετερογενούς φωτοκατάλυσης	26
2.1.2 Φωτοκαταλύτες	29
2.1.3 Φωτοκαταλύτης TiO ₂	29

2.1.4 Παράγοντες που επιδρούν στην ετερογενή φωτοκατάλυση	30
2.1.4.1 Πλεονεκτήματα της φωτοκατάλυσης (Φραγγεδάκη, 2014)	33
2.1.4.2 Μειονεκτήματα (Φραγγεδάκη, 2014)	33
3. Αλλοιώσεις σε υποκυτταρικό επίπεδο κατά την απολύμανση	34
4. Βακτήρια	39
4.1 <i>Escherichia coli</i>	39
4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39
4.3 <i>Bacillus cereus</i>	40
5. Σκοπός της Εργασίας	42
6. Υλικά και Μέθοδοι	43
6.1 Υλικά	43
6.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός	43
6.1.2 Αναλώσιμα	43
6.1.3 Θρεπτικά υλικά	44
6.1.4 Χημικά υλικά	44
6.1.5 Διαλύματα	44
6.1.6 Βακτηριακά στελέχη	45
6.1.7 Καταλύτης	45
6.1.8 Φασματοφωτόμετρο	45
6.1.9 Λαμπτήρας φωτοκατάλυσης	45
6.1.10 Συσκευή ηλεκτροφόρησης	45
6.2 Πειραματική διαδικασία	45
6.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού	46
6.2.2 Παρασκευή εναιωρήματος	46
6.2.3 Φωτοκατάλυση	46
6.2.4 Έλεγχος ως προς το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης	47
6.2.5 Οζόνωση	48
6.2.6 Προσδιορισμός της υπεροξείδωσης των λιπιδίων	49
6.2.7 Μεταβολή διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης	50
6.2.8 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford	51
6.2.9 Λύση κυττάρων	52
6.2.10 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)	53
6.2.10.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου	57

6.2.10.2 Παρασκευή δειγμάτων	57
6.2.11 Παρατήρηση πηκτώματος έπειτα από την ηλεκτροφόρηση	58
6.2.11.1 Βαφή με <i>Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250</i>	58
6.2.11.2 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της <i>SDS – PAGE</i>	58
6.2.12 Μέτρηση της έντασης της πηγής φωτός	59
6.2.12.1 Ακτινομετρία <i>UVA</i>	59
7. Αποτελέσματα – Συζήτηση	61
7.1 Αποτελέσματα απολυμαντικών μεθόδων.....	61
7.1.1 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία <i>UVA</i> - Επίδραση συγκέντρωσης του καταλύτη.....	61
7.1.2 Επίδραση του είδους του βακτηρίου	65
7.1.2.1 Μέγεθος $I \cdot t$	67
7.1.3 Έλεγχος απενεργοποίησης των βακτηρίων μετά την απολύμανση.....	68
7.1.4 Πειράματα απολύμανσης με όζον	70
7.1.4.1 Μέγεθος $C \cdot t$	75
7.2 Επίδραση της <i>UVA</i> φωτοκατάλυσης και της οζόνωσης στα βακτηριακά περιβλήματα....	76
7.2.1 Υπεροξείδωση λιπιδίων.....	76
7.2.2 Μεταβολή διαπερατότητας κυτταρικής μεμβράνης.....	79
7.2.3 Μέτρηση της απελευθέρωσης των πρωτεϊνών κατά την αδρανοποίηση βακτηρίων	82
7.2.4 <i>SDS – PAGE</i> ηλεκτροφόρηση	84
8. Συμπεράσματα.....	91
9. Βιβλιογραφία	93

1. Εισαγωγή

Τις επόμενες δεκαετίες θα ασκηθεί αυξανόμενη πίεση στο περιβάλλον, λόγω της παγκόσμιας αύξησης του πληθυσμού, απειλώντας έτσι πόρους «κλειδιά», όπως το νερό. Ακόμα είναι πιθανό, λόγω των αυξανόμενων βιομηχανικών, γεωργικών και εγχώριων απαιτήσεων, οι πεπερασμένοι πόροι της γης σε καθαρό και πόσιμο νερό να αποτελέσουν ένα στρατηγικό εμπόρευμα κλειδί (Pigeot-Remy et al., 2012).

Ήδη έχουν γίνει αισθητές οι επιπτώσεις της τρέχουσας κρίσης του νερού παγκοσμίως: 1,2 δισεκατομμύρια άνθρωποι δεν έχουν πρόσβαση σε ασφαλές πόσιμο νερό, λόγω μικροβιακής μόλυνσης και χημικής ρύπανσης και 2,6 δισεκατομμύρια έχουν έλλειψη επαρκούς υγιεινής. Κατά συνέπεια, χιλιάδες άνθρωποι και κυρίως παιδιά πεθαίνουν ετησίως από ασθένειες που μεταδίδονται με το νερό (Malato et al., 2009, Fernandez – Ibanez et al., 2015). Η ανίχνευση των μικροοργανισμών που ευθύνονται για αυτές τις ασθένειες έχει βελτιωθεί σε μεγάλο βαθμό. Επίσης, έρευνες έχουν ότι αρκετοί μικροοργανισμοί που μεταφέρονται με το νερό, συμπεριλαμβάνοντας τους ιούς, τα πρωτόζωα και τα βακτήρια, μπορούν να παραμένουν στο λεγόμενο «ασφαλές» πόσιμο νερό (Pigeot-Remy et al., 2012). Έτσι προκύπτει η επείγουσα ανάγκη ανάπτυξης οικονομικών και αποδοτικών μέσων για την εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών (Pigeot-Remy et al., 2011).

Πολλά χρόνια τώρα είναι διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται εκτενώς διάφορες τεχνολογίες απολύμανσης του νερού, όπως η χλωρίωση, η οζόνωση, οι λαμπτήρες UV ακτινοβολίας κ.α.. Παρόλα αυτά, οι παραδοσιακές αυτές μέθοδοι απολύμανσης εγείρουν κάποιους προβληματισμούς και ελλείψεις. Πιθανές ανησυχίες για την υγεία προκαλούν τα υποπροϊόντα της απολύμανσης με χλώριο (DBPs, Disinfection by-products), καθώς αυτά θεωρούνται καρκινογόνα, μεταλλαξιογόνα και τερατογόνα (Constanza & Ricard, 2018). Οι εναλλακτικές μέθοδοι απολύμανσης με όζον και UV ακτινοβολία, είναι πολύ ασφαλέστερες, αλλά έχουν αυξημένο λειτουργικό κόστος.

Η μελέτη του υποκυτταρικού μηχανισμού της βακτηριακής απενεργοποίησης είναι ευρεία. Η αποτελεσματική απενεργοποίηση των βακτηρίων συνεπάγεται συχνά διακοπή ή πλήρη καταστροφή των βασικών φυσιολογικών τους λειτουργιών, όπως κυτταρική μεμβράνη, κυτταρόπλασμα και νουκλεϊκά οξέα. Έτσι, διαφορετικές διαδικασίες απολύμανσης μπορεί να έχουν ποικίλες επιδράσεις σε αυτές τις υποκυτταρικές δομές των βακτηρίων. Στην απενεργοποίηση των βακτηρίων θα μπορούσαν ενδεχομένως να οδηγήσουν κάποιες διαταραχές της κυτταρικής μεμβράνης (διαπερατότητα μεμβράνης, υπεροξειδωση λιπιδίων, πρωτεΐνη μεμβράνης) (Cai et al., 2018).

1.1 Απολύμανση

Η απολύμανση αφορά στην αδρανοποίηση των μικροοργανισμών που προκαλούν ασθένειες. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται στα απόβλητα μπορεί να προέρχονται από τις απεκκρίσεις ανθρώπων ή ζώων που έχουν προσβληθεί από κάποια μολυσματική ασθένεια ή είναι φορείς αυτής. Δεν καταστρέφονται όλοι οι οργανισμοί κατά τη διάρκεια της διεργασίας. Η απολύμανση έχει σκοπό την διατήρηση των μικροοργανισμών ενός ανοικτού, ή κλειστού δικτύου νερού, σε επίπεδα πληθυσμού και κατάσταση τέτοια που να μην επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία και δεν πρέπει να συγχέεται με την αποστείρωση, που σημαίνει πλήρη καταστροφή των μικροοργανισμών (Σπύρου, 2014).

Στην επεξεργασία των υγρών αποβλήτων, οι τέσσερις κατηγορίες ανθρώπινων εντερικών οργανισμών με τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα για την πρόκληση ασθενειών είναι τα βακτήρια, τα πρωτόζωα, οι ιοί και οι έλμινθες.

1.2 Μέσα και μέθοδοι απολύμανσης

Η απολύμανση συνήθως επιτυγχάνεται με τη χρήση (Metcalf & Eddy, 2007) :

- **Χημικών αντιδραστηρίων:** στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται (1) το χλώριο και οι ενώσεις του, (2) το βρώμιο, (3) το ιώδιο, (4) το όζον, (5) η φαινόλη και φαινολικές ενώσεις, (6) αλκοόλες, (7) βαρέα μέταλλα και σχετικές ενώσεις, (8) χρωστικές ενώσεις/ βαφές, (9) σαπούνια και συνθετικά απορρυπαντικά, (10) ενώσεις τεταρτογενούς αμμωνίου, (11) το υπεροξείδιο του υδρογόνου, (12) το υπεροξικό οξύ, (13) διάφορα αλκάλια, (14) διάφορα οξέα.
- **Φυσικών αντιδραστηρίων:** στην κατηγορία αυτή ανήκουν η θερμότητα, το φως και τα ηχητικά κύματα.
- **Μηχανικών μέσων:** η απομάκρυνση των μικροοργανισμών μπορεί να γίνει με διεργασίες όπως:
 1. Χονδρές σχάρες
 2. Λεπτές σχάρες
 3. Εξαμμωτές
 4. Καθίζηση
 5. Χημική κατακρήμνιση
 6. Βιολογικά φίλτρα
 7. Ενεργός ιλύς
 8. Χλωρίωση επεξεργασμένων αποβλήτων
- **Ακτινοβολίας:** οι κυριότεροι τύποι ακτινοβολίας είναι η ηλεκτρομαγνητική, η ηχητική και η σωματιδιακή.

1.3 Χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού

Ένα ιδανικό απολυμαντικό θα πρέπει να παρουσιάζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- υψηλό ρυθμό εξουδετέρωσης παθογόνων μικροοργανισμών
- χαμηλή δραστικότητα με ουσίες που περιέχονται στο νερό και χαμηλή παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων
- χαμηλό κόστος λειτουργίας και μικρές απαιτήσεις συντήρησης
- μηδενικό κίνδυνο κατά τη χρήση του
- εύκολη ανιχνευσιμότητα στο νερό και
- χαμηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς.
- εύκολη και ασφαλή αποθήκευση και μεταφορά
- υψηλή διαθεσιμότητα στην αγορά
- αποδοτικότητα στις θερμοκρασίες περιβάλλοντος
- υψηλή σταθερότητα δηλαδή να διατηρεί την απολυμαντική του ικανότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα
- μη διαβρωτικό για τις διάφορες επιφάνειες με τις οποίες έρχεται σε επαφή
- ομοιογένεια

(Μήτρακας, 2001; Ανδρεαδάκης, 2005)

Οι παραπάνω ιδιότητες δεν είναι συγκεντρωμένες σε ένα απολυμαντικό, δεδομένου ότι καθένα διαθέτει κάποια από τα παραπάνω απολυμαντικά. Θα πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των εναλλακτικών μεθόδων.

1.4 Μηχανισμοί απολύμανσης

Οι πέντε βασικοί μηχανισμοί που έχουν προταθεί για την επεξεργασία της δράσης των απολυμαντικών μέσων είναι (Metcalf & Eddy, 2007):

- 1) **Φθορά του κυτταρικού τοιχώματος:** οδηγεί στη λύση και στο θάνατο του κυττάρου (πενικιλίνη).
- 2) **Μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας:** φαινολικές ενώσεις και απορρυπαντικά καταστρέφουν την εκλεκτική διαπερατότητα της μεμβράνης και επιτρέπουν τη διαφυγή ζωτικών θρεπτικών συστατικών, όπως το άζωτο και ο φώσφορος.
- 3) **Μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος:** η θερμοκρασία προκαλεί πήξη στην κυτταρική πρωτεΐνη και τα οξέα ή οι βάσεις μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες προκαλώντας θανατηφόρες επιπτώσεις.
- 4) **Μεταβολή του DNA ή RNA των οργανισμών:** η ακτινοβολία UV μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό διπλών δεσμών στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών και να προκαλέσει ρήξη ορισμένων κλώνων DNA.

- 5) Παρεμπόδιση της ενζυματικής δράσης:** οξειδωτικά μέσα όπως το χλώριο, μπορούν να μεταβάλλουν τη χημική διεύθυνση των ενζύμων και να απενεργοποιήσουν τα ένζυμα.

1.5 Διαχείριση των παθογόνων μικροοργανισμών στο νερό

Η αποτελεσματικότητα των διαδικασιών επεξεργασίας νερού και λυμάτων μετράται με τη χρήση μιας έννοιας που ονομάζεται “λογαριθμικός δείκτης απομάκρυνσης (LRV)”. Οι δείκτες λογαριθμικής απομάκρυνσης είναι μέτρο της ικανότητας των διαδικασιών επεξεργασίας για την απομάκρυνση των παθογόνων μικροοργανισμών. Ο LRV καθορίζεται λαμβάνοντας το λογάριθμο της αναλογίας της συγκέντρωσης των παθογόνων στην εισροή και στην εκροή του αιωρήματος μιας διαδικασίας επεξεργασίας.

$$LRV = \log_{10} \frac{C_{in}}{C_{out}} \quad (1)$$

Συνεπώς για συγκεκριμένο παθογόνο τιμές LRV ίσες με 1, 2, 3 αντιστοιχούν σε 90%, 99% και 99,99% απολύμανση αντίστοιχα. (water research Australia, Fact sheet, 2014).

1.5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης

- **Το είδος του απολυμαντικού**

Η απόδοση της απολύμανσης εξαρτάται από το είδος του απολυμαντικού που χρησιμοποιούμε εναντίον συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Το χλώριο και οι διάφορες ενώσεις του, για παράδειγμα, δεν επιτυγχάνουν τον υψηλό ρυθμό θανάτωσης κάποιων ιών που επιτυγχάνει το όζον (Metcalf & Eddy, 2007).

- **Το είδος των μικροοργανισμών**

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται από τη φύση και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Γενικά είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν τα πρωτόζωα, λόγω της κυτταρικής τους δομής, και ακολουθούν οι ιοί και τα βακτήρια. Αυξημένη αντίσταση στην απολύμανση παρουσιάζουν οι μικροοργανισμοί που εμφανίζουν ανθεκτικές μορφές όπως κύστες και σπόρια (Πολίτη Ε., 2012). Επίσης, είναι σαφές ότι μικροοργανισμοί που για κάποιο λόγο έχουν καταστεί λιγότερο ακμαίοι, είναι πιο ευαίσθητοι στα διάφορα απολυμαντικά.

- **Η συγκέντρωση του απολυμαντικού**

Ο Watson ανέφερε ότι η σταθερά του ρυθμού απενεργοποίησης σχετίζεται με τη συγκέντρωση του απολυμαντικού μέσου C, ως ακολούθως:

$$k = k' \cdot C^n \quad (2)$$

Όπου,

k = σταθερά ρυθμού απενεργοποίησης

k' = σταθερά αποδεκατισμού

C = συγκέντρωση του απολυμαντικού

n = συντελεστής διάλυσης

$n = 1$, σημαίνει ότι η συγκέντρωση του απολυμαντικού και ο χρόνος επαφής είναι εξίσου σημαντικοί παράγοντες.

$n > 1$, σημαίνει ότι η συγκέντρωση του απολυμαντικού είναι πιο σημαντική από το χρόνο επαφής.

$n < 1$, σημαίνει ότι ο χρόνος επαφής είναι πιο σημαντικός από τη συγκέντρωση του απολυμαντικού.

Από τον νόμο της Chick, υπάρχουν αποκλίσεις: (α) το φαινόμενο υστέρησης (ή ώμου) όπου τα συστατικά του υγρού αντιδρούν αρχικά με το απολυμαντικό, καθιστώντας το απολυμαντικό ανενεργό, (β) το φαινόμενο απόληξης όπου μεγάλα σωματίδια προστατεύουν τους οργανισμούς που πρόκειται να απολυμανθούν, (γ) ο συνδυασμός των φαινομένων υστέρησης και απόληξης (Metcalf & Eddy, 2007).

• Ο χρόνος επαφής

Ο χρόνος επαφής αποτελεί μια από τις σημαντικότερες μεταβλητές στη διεργασία της απολύμανσης. Η Harriet Chick, εργαζόμενη στην Αγγλία στις αρχές του 1900, παρατήρησε ότι για μία συγκεκριμένη συγκέντρωση απολυμαντικού, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος επαφής, τόσο μεγαλύτερη είναι η θανάτωση. Αυτό εκφράζεται με τις ακόλουθες μαθηματικές σχέσεις (Metcalf & Eddy, 2007):

$$\frac{dN_t}{dt} = -k \cdot N_t \quad (3)$$

Όπου,

dN_t/dt = ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των οργανισμών με το χρόνο

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

N_t = αριθμός των οργανισμών σε χρόνο t

t = χρόνος

Αν N_0 είναι ο αριθμός των οργανισμών όταν t ισούται με το μηδέν τότε:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-k \cdot t} \quad (4)$$

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad (5)$$

Η τιμή της σταθεράς του ρυθμού απενεργοποίησης k λαμβάνεται από το διάγραμμα του $-\ln \frac{N_t}{N_0}$ ως προς το χρόνο επαφής t .

• Το pH

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

• Η θερμοκρασία

Η θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση, καθώς ελέγχει το ρυθμό των χημικών αντιδράσεων. Έτσι καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία, ο ρυθμός θανάτωσης μ' ένα χημικό απολυμαντικό αυξάνεται. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό θανάτωσης με χημικά απολυμαντικά μπορεί να γίνει κατανοητή από μία μορφή της εξίσωσης Van't Hoff- Arrhenius (Metcalf & Eddy, 2007):

$$\ln \frac{t_1}{t_2} = \frac{E \cdot (T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2} \quad (6)$$

Όπου,

t_1, t_2 = χρόνο για δεδομένο ποσοστό θανάτωσης σε θερμοκρασίες T_1 και T_2 αντίστοιχα

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

R = σταθερά αερίων, 8,3144 J/mole K (1,99 cal/mole K)

• Η φύση του υγρού

Κατά την ανασκόπηση της ανάπτυξης διαφόρων σχέσεων που προτάθηκαν για την απενεργοποίηση των μικροοργανισμών, είναι απαραίτητο να σημειωθεί ότι οι περισσότερες δοκιμές έγιναν σε αντιδραστήρες ασυνεχούς λειτουργίας με τη χρήση απεσταγμένου νερού ή νερού με ρυθμιστικό διάλυμα υπό συνθήκες εργαστηρίου. Στην πράξη η φύση του υγρού πρέπει να αξιολογηθεί προσεκτικά. Για παράδειγμα, ξένα οργανικά υλικά θα αντιδράσουν με τα περισσότερα οξειδωτικά απολυμαντικά μέσα και θα μειώσουν την αποδοτικότητά τους. Η παρουσία αιωρούμενης ύλης θα μειώσει την αποδοτικότητα των απολυμαντικών με την απορρόφηση του

απολυμαντικού και με την προστασία των παγιδευμένων βακτηρίων (Metcalf & Eddy, 2007).

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

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

- **Το βιοφίλμ**

Η ύπαρξη συσσωματωμάτων μικροοργανισμών που έχουν προσκολληθεί στις διάφορες επιφάνειες (π.χ δίκτυο ύδρευσης, αντιδραστήρες) φαίνεται ότι δυσχεραίνει τη διαδικασία της απολύμανσης (Farkas et al., 2012). Οι ποικίλοι μικροοργανισμοί, που δημιουργούν το βιοφίλμ εκκρίνοντας πολυσακχαρίτες, προστατεύονται ως ένα βαθμό από τη δράση των απολυμαντικών μέσων καθώς τα τελευταία δυσκολεύονται να διεισδύσουν στο εσωτερικό του υμενίου. Ταυτόχρονα, η επιβίωση των προσκολλημένων μικροβίων διευκολύνεται και από την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων μεταξύ διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών ενώ παράλληλα υποβοηθάται ο πολλαπλασιασμός τους λόγω των ευνοϊκών συνθηκών (κατάλληλο pH, θερμοκρασία) που επικρατούν στο υμένιο σε σχέση με το ελαιώρημα, καθιστώντας τη διαδικασία της απολύμανσης ακόμη πιο δύσκολη (Φραγγεδάκη, 2014).

1.5.2 Κινητικές της απολύμανσης

Η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών είναι μια σταδιακή διαδικασία, που περιλαμβάνει μια σειρά από φυσικοχημικά και βιοχημικά βήματα. Σε μια προσπάθεια να προβλέψουμε τα αποτελέσματα της απολύμανσης έχουν αναπτυχθεί διάφορα μοντέλα, βάσει πειραματικών δεδομένων. Η κύρια θεωρία απολύμανσης που χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα είναι αυτή των Chick και Watson, η οποία εκφράζει το ρυθμό αδρανοποίησης των μικροοργανισμών με μια πρώτης τάξης χημική κινητική:

$$\frac{N_t}{N_0} = e^{-k \cdot t} \quad (7)$$

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -k \cdot t \quad (8)$$

Όπου,

N_0 = ο αριθμός των μικροοργανισμών στο χρόνο 0

N_t = ο αριθμός των μικροοργανισμών στο χρόνο t

k = σταθερά ρυθμού αδρανοποίησης των μικροοργανισμών

t = ο χρόνος

$$\frac{dN_t}{dt} = -k \cdot N_t \quad (9)$$

Σύμφωνα με το Νόμο της Chick, ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών με το χρόνο εξαρτάται από την σταθερά του ρυθμού αδρανοποίησης k και από τον αριθμό των μικροοργανισμών σε χρόνο t.

$$\frac{dN_t}{dt} = -k \cdot N_t \quad (10)$$

(Pepper et al., 2011)

1.6 Συμβατικές μέθοδοι απολύμανσης

Οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης σήμερα είναι η χλωρίωση, η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και η οζόνωση.

1.6.1 Χλωρίωση

Από όλα τα απολυμαντικά μέσα, το χλώριο είναι αυτό που χρησιμοποιείται συνήθως παγκοσμίως. Το χλώριο και οι ενώσεις του είναι τα πιο κοινά χρησιμοποιούμενα απολυμαντικά για την επεξεργασία νερού και υγρών αποβλήτων. Ο κύριος σκοπός της χλωρίωσης είναι να αποτρέψει την εξάπλωση των παθογόνων μικροοργανισμών. Η χλωρίωση επιτυγχάνεται με προσθήκη στο νερό είτε ελεύθερου χλωρίου, είτε χημικών ενώσεων του χλωρίου. Συγκεκριμένα, οι βασικές μορφές με τις οποίες χρησιμοποιείται το χλώριο ως απολυμαντικό είναι:

- Υγρό - αέριο χλώριο (Cl_2)
- Υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl), το οποίο διαλυόμενο στο νερό σχηματίζει υποχλωριώδες οξύ (HOCl) και υδροχλωρικό οξύ (HCl).
- Υποχλωριώδες ασβέστιο (Ca(OCl)_2)
- Διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2), που δε διαλύεται στο νερό.

Η ποσότητα του χλωρίου που απαιτείται για απολύμανση εξαρτάται από την περιεκτικότητα των οργανικών ουσιών στο νερό.

Αν και ο τρόπος με τον οποίο καταστρέφει το χλώριο τους παθογόνους μικροοργανισμούς δεν έχει εξακριβωθεί, για τα βακτήρια η πιο πιθανή εξήγηση είναι οι βλάβες της φυσιολογικής λειτουργίας τους, που συνδέονται με την κυτταρική τους

μεμβράνη. Η αδρανοποίηση των ιών γίνεται μέσω αντίδρασης του χλωρίου με το πρωτεϊνικό καψίδιο ή/και με τα νουκλειικά οξέα των ιών (Metcalf & Eddy, 2007).

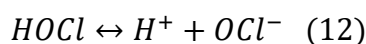
1.6.1.1 Αντιδράσεις του χλωρίου στο νερό

Όταν το χλώριο στη μορφή αερίου Cl_2 , προστίθεται στο νερό, λαμβάνουν χώρα δύο αντιδράσεις: η υδρόλυση και ο ιονισμός.

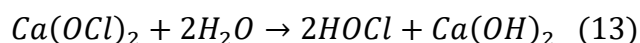
Η υδρόλυση μπορεί να προσδιοριστεί ως η αντίδραση στην οποία το αέριο χλώριο ενώνεται με το νερό και σχηματίζεται το υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$).



Ο ιονισμός του υποχλωριώδους οξέος σε υποχλωριώδες ιόν (OCl^-) μπορεί να οριστεί ως:



Το υποχλωριώδες ασβέστιο και το νάτριο υδρολύονται για να σχηματίσουν υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$) ως εξής:



Ακολουθεί ο ιονισμός του υποχλωριώδους οξέως όπως παραπάνω.

(Metcalf & Eddy, 2007)

1.6.1.2 Παραπροϊόντα χλωρίωσης

Στις αρχές της δεκαετίας του 1970 βρέθηκε ότι η χρήση οξειδωτικών όπως είναι το χλώριο και το όζον στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας νερού, για απολύμανση και για άλλου είδους χρήση, είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή ανεπιθύμητων παραπροϊόντων απολύμανσης (DBPs). Στα DBPs ανήκουν τα τριαλογονομεθάνια, τα οποία συναντώνται πιο συχνά και στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις. Τα τριαλογονομεθάνια (THM), καθώς και άλλα παραπροϊόντα είναι αποτέλεσμα μιας σειράς πολύπλοκων αντιδράσεων του ελεύθερου χλωρίου με μια ομάδα οργανικών οξέων, γνωστά ως χουμικά οξέα και έχουν επιπτώσεις τόσο στη δημόσια υγεία, όσο και στο περιβάλλον. Το χλωροφόρμιο και τα αλογονομεθάνια είναι γνωστά για την καρκινογόνο δράση τους (Metcalf & Eddy, 2007).

1.6.1.3 Πλεονεκτήματα χλωρίωσης (Δρούμπαλη, 2010)

- Χαμηλό κόστος
- Ευκολία χρήσης της
- Ισχυρή δραστικότητα σε ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών
- Υπολειμματική δράση (το χλώριο παραμένει σαν προστατευτικός παράγοντας για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα στο νερό).

1.6.1.4 Μειονεκτήματα χλωρίωσης (Δρούμπαλη, 2010)

- Αντίδραση του χλωρίου με ορισμένες χημικές ενώσεις που περιέχονται στο νερό και δημιουργία επικίνδυνων παραπροϊόντων όπως τα τριαλομεθάνια, που θεωρούνται ύποπτα για καρκινογένεση.
- Η χλωρίωση προσδίδει χαρακτηριστική έντονη οσμή και γεύση στο νερό, η οποία οφείλεται όχι μόνο στο χλώριο, αλλά και σε διάφορα παραπροϊόντα απολύμανσης.
- Απαιτείται ένα ακόλουθο βήμα αποχλωρίωσης του χλωριωμένου νερού, με στόχο να ελαχιστοποιηθούν οι πιθανές τοξικές επιδράσεις των υπολειμμάτων χλωρίου καθώς και των παραπροϊόντων απολύμανσης στους υδρόβιους οργανισμούς, ειδικά στην περίπτωση που το νερό αυτό προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση.
- Η χλωρίωση δεν καθιστά το νερό απολύτως καθαρό, καθώς αρκετοί μικροοργανισμοί, όπως ιοί και παθογόνα βακτήρια, είναι ανθεκτικοί στο χλώριο, γεγονός που εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία καθιστώντας απαραίτητη τη χρήση εναλλακτικών μεθόδων απολύμανσης. Για παράδειγμα, παράσιτα όπως η *Giardia* και το *Cryptosporidium* ευθύνονται για αρκετές γαστρεντερικές παθήσεις.

1.6.2 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία UV

Οι μικροβιοκτόνες ιδιότητες της ακτινοβολίας που εκπέμπεται από υπεριώδεις πηγές φωτός, έχουν χρησιμοποιηθεί σε μια ποικιλία εφαρμογών από το χρόνο που πρωτοανακαλύφθηκαν, στις αρχές του 1900. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε στην τροφοδοσία νερού υψηλής ποιότητας, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία ως απολυμαντικό υγρών αποβλήτων εξελίχθηκε κατά τη διάρκεια του 1990 με την ανάπτυξη νέων λυχνιών.

Από τα διάφορα είδη της ακτινοβολίας UV αυτή που χρησιμοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στην επεξεργασία νερού και υγρών αποβλήτων είναι η ακτινοβολία UV-C (200-280 nm). Η UV-C ακτινοβολία έχει χρησιμοποιηθεί για την απολύμανση νερού και υγρών αποβλήτων από τις αρχές του 20^{ου} αιώνα (1917, ΗΠΑ).

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι ηλεκτρομαγνητική ενέργεια που τοποθετείται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ των ακτίνων Χ και του ορατού φωτός (Κυριακόπουλος, 2009) και συγκεκριμένα στα 100 nm - 400 nm. Διαχωρίζεται σε 4 περιοχές, σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Φωτισμού:

- UV-A: Αυτή η ακτινοβολία κυμαίνεται στο κενό μεταξύ 315 και 400 νανόμετρα. Είναι το πιο ακίνδυνο είδος.
- UV-B: Αυτή η ακτινοβολία κυμαίνεται στο κενό μεταξύ 280 και 315 nm. Αυτή προκαλεί το μαύρισμα, αλλά μπορεί να γίνει επικίνδυνη.
- UV-C: Αυτή η ακτινοβολία κυμαίνεται στο κενό μεταξύ 40 nm και 280 nm. Είναι το πιο επικίνδυνο είδος της υπεριώδους ακτινοβολίας, καθώς με αυτήν έχουν επιτευχθεί εργαστηριακά μεταλλάξεις.
- V-UV: Αυτή η ακτινοβολία κυμαίνεται μεταξύ 100 nm – 200 nm (Chen et al., 2007).

Η χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας ως μεθόδου απολύμανσης του νερού και των λυμάτων έχει σημειώσει αυξημένη δημοτικότητα, διότι δεν είναι γνωστό να παράγει καρκινογόνα ή τοξικά παραπροϊόντα ή να προκαλεί προβλήματα οσμής και γεύσης, και δεν υπάρχει καμία ανάγκη αποθήκευσης ή χειρισμού τοξικών χημικών. Δυστυχώς, έχει αρκετά μειονεκτήματα συμπεριλαμβανομένων του υψηλότερου κόστους από τα αλογόνα, της απουσίας υπολειμματικής δράσης, της δυσκολίας στον προσδιορισμό της δόσης UV, της συντήρησης και του καθαρισμού των λαμπτήρων UV και της φωτοενεργοποίησης κάποιων εντερικών βακτηρίων.

Ωστόσο, οι πρόοδοι στην τεχνολογία UV προσφέρουν χαμηλότερο κόστος, πιο αποδοτικούς λαμπτήρες και πιο αξιόπιστο εξοπλισμό. Αυτές οι πρόοδοι βοήθησαν στην εμπορική εφαρμογή της UV για την επεξεργασία του νερού στις βιομηχανίες φαρμάκων, καλλυντικών, ποτών και ηλεκτρονικών, εκτός από την δημοτική εφαρμογή του νερού και των λυμάτων.

Ο προσδιορισμός της UV ευαισθησίας διαφόρων δεικτών και παθογόνων μικροοργανισμών που μεταδίδονται μέσω του νερού είναι θεμελιώδης για την ποσοτικοποίηση της UV δόσης που απαιτείται για την επαρκή απολύμανση του νερού. Παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τη δόση UV περιλαμβάνουν συσσώρευση και σκίαση κυττάρων, αιωρούμενα στερεά, θολρότητα και απορρόφηση UV. Πειράματα ευαισθησίας UV που περιγράφονται στη βιβλιογραφία βασίζονται συχνά στην έκθεση των μικροοργανισμών κάτω από βελτιστοποιημένες συνθήκες για UV απολύμανση.

Η αποτελεσματικότητα του υπεριώδους φωτός μειώνεται στα υγρά απόβλητα από ουσίες που επηρεάζουν τη μετάδοση της UV. Αυτές περιλαμβάνουν χουμικές ουσίες, φαινολικές ενώσεις, σουλφονικά λιγνίνης και τρισθενούς σιδήρου. Αιωρούμενα

σωματίδια μπορεί να προστατεύσουν τους μικροοργανισμούς από τη δράση του υπεριώδους φωτός, έτσι η διήθηση των λυμάτων είναι συνήθως απαραίτητη για την αποτελεσματική απολύμανση με υπεριώδες φως.

Η μέθοδος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταστροφή ορισμένων παθογόνων, όπως είναι τα βακτήρια και οι ιοί.

Σε γενικές γραμμές η αντοχή των μικροοργανισμών στο υπεριώδες φως ακολουθεί ίδιο μοτίβο όπως η αντίσταση σε χημικά απολυμαντικά, δηλαδή, βακτηριακά σπόρια > μύκητες > Gram-θετικά βακτήρια > Gram-αρνητικά βακτήρια > ιοί (Pigeot-Rémy et al., 2011).

Η υπεριώδης ακτινοβολία καταστρέφει το μικροβιακό DNA ή RNA σε μήκος κύματος περίπου 260 nm. Η πιο κοινή πηγή της UV-C ακτινοβολίας είναι ένας λαμπτήρας ατμών υδραργύρου κατασκευασμένος από χαλαζία ή από παρόμοιο υλικό, όπου δεν απορροφά στο έντονο και καταστρεπτικό μη ορατό φως των 254 nm. Η UV ακτινοβολία εκπέμπεται από τη δημιουργία εντός του λαμπτήρα ενός τόξου ατμών υδραργύρου εξαιτίας ηλεκτρικής εκκένωσης. Προκαλεί διμερισμό θυμίνης, το οποίο εμποδίζει την αντιγραφή των νουκλεϊνικών οξέων και αδρανοποιεί αποτελεσματικά τους μικροοργανισμούς.

Υπάρχουν τρεις τύποι πηγών υπεριώδους φωτός που χρησιμοποιούνται σήμερα. Αυτοί περιλαμβάνουν λαμπτήρες χαμηλής πίεσης, μέσης πίεσης λαμπτήρες και παλμικό UV φως. Χαμηλής πίεσης λαμπτήρες UV είναι αυτές που χρησιμοποιούνται πιο συχνά για την απολύμανση, και παράγουν ουσιαστικά μονοχρωματικό υπεριώδες φως σε ένα μήκος κύματος 253,7 nm. Οι λαμπτήρες UV μέσης πίεσης εκπέμπουν πολυχρωματικό υπεριώδες φως που κυμαίνεται από 200 έως 1400 nm με αρκετές κορυφές στα 185 και 300 nm. Η παλμική UV εκπέμπει έντονους παλμούς φωτός σε υψηλές πυκνότητες φωτονίων. Η χαμηλής πίεσης υπεριώδης ακτινοβολία εκπέμπει πολύ κοντά στα 260 nm, μέγιστη απορρόφηση για το DNA, αδρανοποιώντας τους μικροοργανισμούς σε μεγάλο βαθμό καταστρέφοντας το DNA/RNA. Η μεσαία και η παλμική υπεριώδης ακτινοβολία εκπέμπεται σε μήκη κύματος, τα οποία μπορεί να βλάψουν άλλα κυτταρικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπίδια και μικρά μόρια, όπως τα καρβοξυλικά. Ένα πλεονέκτημα των μεσαίων και παλμικών υπεριώδων ακτινοβολιών είναι ότι εμποδίζουν την φωτοενεργοποίηση βακτηρίων και αδενοϊών, επιτρέποντας τη χρήση χαμηλότερων δόσεων (Pepper et al. 2014; Metcalf & Eddy, 2007).

1.6.2.1 Πλεονεκτήματα ακτινοβολίας UV (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014)

- Δεν σχηματίζονται τοξικά/επικίνδυνα παραπροϊόντα απολύμανσης
- Αποτελεσματική στην αδρανοποίηση μεγάλου εύρους μικροοργανισμών, όπως βακτηρίων, των περισσότερων ιών, σπορίων και κυστών, συμπεριλαμβανομένων μικροοργανισμών ανθεκτικών στην απολύμανση με χλωρίωση.
- Δεν απαιτείται η προσθήκη χημικών οξειδωτικών αντιδραστηρίων
- Μειώνεται ο κίνδυνος από την παραγωγή, μεταφορά, αποθήκευση και χειρισμό τοξικών χημικών αντιδραστηρίων
- Πολύ μικροί χρόνοι επαφής
- Απαιτεί μικρότερο χώρο εγκατάστασης από την απολύμανση με χλώριο

1.6.2.2 Μειονεκτήματα ακτινοβολίας UV (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014)

- Φαινόμενο φωτοενεργοποίησης ορισμένων οργανισμών: η επίδραση του φωτός ορισμένου μήκους κύματος είναι δυνατόν να ενεργοποιήσει ορισμένους μικροοργανισμούς μετά την απολύμανση με UV.
- Ελάχιστη δράση έναντι πρωτοζώων.
- Δε μπορεί να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, λόγω απουσίας της υπολειμματικής δράσης.
- Ένα UV σύστημα είναι αρκετά ακριβό, καθώς καταναλώνει ενέργεια και απαιτεί μεγάλο αριθμό UV λυχνιών. Η απόδοση των λυχνιών μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζωής τους, ενώ ακόμα απαιτείται συχνός καθαρισμός τους για να απομακρυνθούν οι όποιες επικαθήσεις αλάτων.
- Επηρεάζεται σημαντικά από την ύπαρξη αιωρούμενων στερεών και θολότητας

1.6.3 Οζόνωση

Το όζον (O_3) είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας και μπορεί να παραχθεί με ηλεκτρόλυση, φωτοχημική αντίδραση με ηλεκτρική εκκένωση περνώντας μέσω ενός ρεύματος αέρα ή οξυγόνου. Το όζον συχνά παράγεται από υπεριώδη ακτινοβολία και από την ακτινοβολία κατά τη διάρκεια ενός κεραυνού. Η μέθοδος της ηλεκτρικής εκκένωσης χρησιμοποιείται για την παραγωγή του όζοντος στις εφαρμογές απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων. Το όζον είναι μπλε αέριο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και έχει χαρακτηριστική οσμή. Μπορεί να ανιχνευτεί σε συγκεντρώσεις από 2×10^{-5} έως 1×10^{-4} g/m³. Επειδή έχει μια χαρακτηριστική οσμή μπορεί συνήθως να ανιχνευτεί πριν προκύψουν προβλήματα για την υγεία. Η σταθερότητα του αέριου όζοντος είναι μεγαλύτερη από αυτή στο νερό, αλλά και στις δύο περιπτώσεις είναι της τάξης των min.

Το όζον είναι πιο ακριβό από τη χλωρίωση για να εφαρμοστεί στο πόσιμο νερό, ωστόσο, η δημοτικότητά του ως απολυμαντικού έχει αυξηθεί διότι δεν παράγει τριαλογονομεθάνια ή άλλα χλωριωμένα παραπροϊόντα, τα οποία θεωρούνται καρκινογόνες ουσίες. Οι αλδεΐδες και τα βρωμικά μπορούν να παραχθούν με οζόνωση και μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Το όζον είναι γνωστό ότι επιτίθεται σε ακόρεστους δεσμούς, σχηματίζοντας αλδεΐδες, κετόνες και καρβονυλικές ενώσεις. Επειδή το όζον δεν αφήνει υπολείμματα στο νερό, η επεξεργασία με όζον συνήθως ακολουθείται από χλωρίωση ή προσθήκη χλωραμίνων. Αυτό είναι απαραίτητο για να αποφευχθεί η αναγέννηση των μικροοργανισμών, καθώς το όζον διασπά πολύπλοκες οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στο νερό, σε απλούστερες, που αυτές χρησιμεύουν ως υποστρώματα για την ανάπτυξη μέσα στο σύστημα διανομής νερού. Η αποτελεσματικότητα του όζοντος ως απολυμαντικού δεν επηρεάζεται από το pH και την αμμωνία. Ο μηχανισμός με τον οποίο το όζον αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς δεν είναι πλήρως κατανοητός. Το όζον σε υδατικά διαλύματα μπορεί να αντιδράσει με τα μικρόβια είτε με άμεση αντίδραση με το μοριακό όζον, είτε με έμμεση αντίδραση με τα είδη ριζών που δημιουργούνται όταν το όζον αποσυντίθεται. Οι ελεύθερες ρίζες που σχηματίζονται από την αποσύνθεση του όζοντος είναι γενικά λιγότερο αποτελεσματικές στην αδρανοποίηση των μικροβίων, απ' ό,τι το μοριακό όζον, επειδή τα μικροβιακά κύτταρα περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση σε διττανθρακικά ιόντα, τα οποία σβήνουν την αντίδραση της ελεύθερης ρίζας, και επίσης πολλά μικροβιακά κύτταρα περιέχουν ένζυμα όπως καταλάση και υπεροξειδάση για να αντιμετωπίσουν τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από την αερόβια αναπνοή. Το όζον φαίνεται να αδρανοποιεί τα βακτήρια χρησιμοποιώντας τον ίδιο μηχανισμό όπως αυτόν της απολύμανσης με βάση το χλώριο, δηλαδή διασπώντας τη διαπερατότητα της μεμβράνης, παρεμποδίζοντας έτσι την ενζυμική λειτουργία ή /και την ακεραιότητα της πρωτεΐνης, με οξείδωση των σουλφιδρυλικών ομάδων, είτε με μετουσίωση νουκλεϊκού οξέος. Η επίδραση του όζοντος στην καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων και των ωκύστεων των πρωτοζώων είναι δραματική (Pepper et al., 2011; Metcalf & Eddy, 2007; Langlais et al., 1991; Wolf et al., 1989).

Οι ιοί είναι γενικά πιο ανθεκτικοί στο όζον από ότι τα βακτήρια, παρόλο που οι φάγοι φαίνεται να είναι πιο ευαίσθητοι από τους ιούς που προσβάλλουν τον άνθρωπο (Pepper et al., 2011; Metcalf & Eddy, 2007; Langlais et al., 1991; Wolf et al., 1989). Τα πιο ανθεκτικά είδη βακτηρίων στο όζον είναι οι Gram-θετικοί κόκκοι, οι βάκιλοι και τα μυκοβακτήρια (Langlais et al., 1991).

1.6.3.1 Παραπροϊόντα οζόνωσης

Το όζον είναι ένα ισχυρό οξειδωτικό και μπορεί να μετατρέψει τα βρωμιούχα ιόντα που προκύπτουν φυσικά σε βρώμιο και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό

βρωμιούχων τριαλογονομεθανίων (THMs), βρωμιούχων οξικών οξέων, όπως και βρωμικών αλάτων. Παρόλα αυτά, τα βρωμιούχα τριαλογονομεθάνια που παράγονται κατά την οζόνωση συνήθως προκύπτουν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τα τριαλογομεθάνια που παράγονται κατά τη χλωρίωση. Χαμηλού μοριακού βάρους αλδεΐδες, όπως φορμαλδεΐδες, έχουν επίσης ανιχνευτεί ως παραπροϊόντα της οζόνωσης.

1.6.3.2 Πλεονεκτήματα όζοντος (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014)

- Έχει ισχυρή οξειδωτική δράση γι' αυτό αποτελεί ισχυρό απολυμαντικό.
- Δεν παράγονται χλωριωμένα παράγωγα.
- Δεν παρουσιάζει προβλήματα ασφαλείας σε σχέση με τη μεταφορά και την αποθήκευσή του.
- Καταστρέφει ταχύτατα μικροοργανισμούς ανθεκτικούς στο χλώριο ή άλλα απολυμαντικά.
- Απαιτεί μικρούς χρόνους εφαρμογής, με την απολύμανση σχεδόν ακαριαία.
- Έχει μικρότερη ευαισθησία στο pH και στη θερμοκρασία.
- Συντελεί στην απομάκρυνση του χρώματος και των οσμών.

1.6.3.3 Μειονεκτήματα όζοντος (Μαντζαβίνος, 2015; Σπύρου, 2014)

- Δεν παρέχει καμία υπολειμματική δράση.
- Σχηματίζονται επικίνδυνα παραπροϊόντα, αν στο νερό βρίσκονται βρωμιόντα.
- Είναι δύσκολος ο έλεγχος και η παρακολούθησή του ειδικά κάτω από μεταβαλλόμενες συνθήκες φορτίου.
- Απαιτεί πιλοτική εγκατάσταση ώστε να βρεθεί η βέλτιστη δόση όζοντος.

1.7 Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης (Advanced Oxidation Processes – AOPs)

Οι «Προηγμένες διεργασίες οξείδωσης» χρησιμοποιούνται ως εναλλακτικές μέθοδοι απολύμανσης και είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Οι μέθοδοι αυτές στηρίζονται στη δημιουργία ριζών υδροξυλίου που αποτελούν το ισχυρότερο οξειδωτικό μέσο μετά το φθόριο. Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση και την απορρύπανση των υδάτων είναι η φωτοκατάλυση χρησιμοποιώντας συστήματα, UV/TiO₂ (φωτοχημική διάσπαση του H₂O₂/UV-B, ετερογενής φωτοκατάλυση TiO₂/UV-A). Επίσης, συστήματα που βασίζονται στη χρήση όζοντος (O₃, O₃/UV-B, O₃/H₂O₂), οδηγούν στην παραγωγή ριζικών ενδιάμεσων (ιδίως ρίζες υδροξυλίου οι οποίες είναι εξαιρετικά δραστικές και αντιδρούν με τις περισσότερες οργανικές ενώσεις). Ο συνδυασμός O₃/H₂O₂ είναι η ευρύτερα εφαρμοσμένη AOP στη διαχείριση του πόσιμου νερού, ιδιαίτερα για την αντιμετώπιση των χλωροφαινολών (Βαλαβανίδης, 2006). Κάποιες τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται ακόμα είναι το

αντιδραστήριο Fenton και Photo-Fenton (ομογενής φωτοκατάλυση), η υγρή οξείδωση, η ηλεκτροχημική οξείδωση κ.α. (Πολίτη, 2012). Η ραγδαία ανάπτυξη τους την τελευταία δεκαετία οφείλεται αφενός στην ικανότητα τους να αδρανοποιούν τις πλέον βλαβερές/τοξικές οργανικές ουσίες και αφετέρου δε στους ολοένα και πιο αυστηρούς περιβαλλοντικούς νόμους που θέτει σε εφαρμογή η πολιτεία.

1.7.1 Πλεονεκτήματα προηγμένων διεργασιών οξείδωσης (AOPs)

- Συντελούν στην επίλυση και όχι στη μεταφορά του προβλήματος.
- Αδρανοποιούν τις περισσότερες βλαβερές και ανόργανες ουσίες, καθώς και πλήθος παθογόνων μικροοργανισμών.
- Σημαντικό πλεονέκτημα των OH^\bullet είναι η μη επιλεκτική προσβολή των διαφόρων οργανικών ενώσεων, στοιχείο που επιτρέπει την εφαρμογή τους σε όλων των ειδών τα απόβλητα, που περιέχουν οργανικούς ρύπους.
- Η προεπεξεργασία λυμάτων με κάποια AOP διευκολύνει την ακολουθούμενη βιολογική επεξεργασία, λόγω της δημιουργίας βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων, καθώς και λόγω της μείωσης σε πολλές περιπτώσεις της τοξικότητας των λυμάτων.
- Χρησιμοποιούν φιλικότερα προς το περιβάλλον αντιδραστήρια.
- Έχουν δυνατότητα χρήσης της ηλιακής ακτινοβολίας.

(Δρόσου, 2007)

1.7.2 Μειονεκτήματα χρήσης AOPs

- Σχετικά ακριβά αντιδραστήρια.
- Υψηλό κόστος λόγω της χρήσης πηγών φωτός για παραγωγή υπεριώδους ακτινοβολίας

(Δρόσου, 2007)

2. Φωτοκατάλυση

Στο πλαίσιο αναζήτησης αποτελεσματικών και φιλικών στο περιβάλλον μεθόδων, για την καταστροφή των οργανικών ενώσεων και των μικροοργανισμών που συναντώνται στους υδάτινους πόρους και στον αέρα, μπορεί να ενταχθεί και το αυξανόμενο ενδιαφέρον τελευταία για τη χρησιμοποίηση των λεγόμενων "Προηγμένες Διεργασίες Οξείδωσης (Advanced Oxidation Processes)" (AOPs), στις οποίες ανήκει η διεργασία της φωτοκατάλυσης. Με τον όρο φωτοκατάλυση εννοούμε τη διεργασία κατά την οποία ο ρυθμός μιας χημικής αντίδρασης επιταχύνεται με την ενεργοποίηση μιας ουσίας, του καταλύτη με κατάλληλης ενέργειας φωτόνια (φωτοευαισθητοποίηση, μια διαδικασία στην οποία μία φωτοχημική μεταβολή λαμβάνει χώρα σε μία μοριακή ουσία ως αποτέλεσμα της απορρόφησης ακτινοβολίας από μια άλλη μοριακή ουσία που ονομάζεται φωτοευαισθητοποιητής). Ο καταλύτης δεν αλλάζει, τροποποιείται ή καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της χημικής αντίδρασης (Αθανασίου, 2014).

Οι φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, ανάλογα με τη φύση του καταλύτη και του καταλυόμενου συστήματος: (α) στις Ομογενείς και (β) στις Ετερογενείς φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις. Όταν ο φωτοκαταλύτης βρίσκεται στην ίδια φάση με το φωτοκαταλυόμενο σύστημα τότε η φωτοκατάλυση είναι ομογενής, ενώ όταν βρίσκεται σε διαφορετική φάση είναι ετερογενής (Γαλανοπούλου Μ., 2013).

2.1 Ετερογενής φωτοκατάλυση

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

Σε σύγκριση με τις υπόλοιπες AOPs, η ετερογενής φωτοκατάλυση έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- Η χρήση φωτοκαταλυτών σχετικά χαμηλού κόστους.
- Η δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίηση των φωτοκαταλυτών, γεγονός που συνεπάγεται τη μείωση του λειτουργικού κόστους της μεθόδου.
- Χρησιμοποιεί χαμηλής ενέργειας υπεριώδες φως με τους ημιαγωγούς να δρουν ως φωτοκαταλύτες και οδηγεί σε πλήρη ανοργανοποίηση των ρύπων σε περιβαλλοντικά μη επιβλαβείς ενώσεις.

- Οι φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις καθιστούν εφικτή την καταστροφή των μη βιοαποδομήσιμων πυρίμαχων ρύπων.
- Ενώ οι καταλυτικές διαδικασίες κανονικά απαιτούν υψηλή θερμοκρασία ή υψηλή πίεση, η φωτοκαταλυτική οξείδωση είναι μία υποσχόμενη τεχνική για πολλούς σκοπούς λόγω της ικανότητάς της να λειτουργεί στις – ή και ελαφρώς πάνω – συνθήκες περιβάλλοντος.
- Το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις ρύπων.

Η φωτοκατάλυση έχει λάβει πολλή προσοχή, λόγω των δυνατοτήτων των εφαρμογών της στους τομείς της ενέργειας και του περιβάλλοντος. Παραδοσιακά, η φωτοκατάλυση με TiO_2 έχει χρησιμοποιηθεί για την καταστροφή οργανικών χημικών στον αέρα και το νερό, αλλά η τεχνολογία αυτή έχει επίσης αποδειχθεί ότι αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς. Πολλές από τις μελέτες απολύμανσης έχουν κατευθυνθεί προς την ηλιακή φωτοκατάλυση για την επεξεργασία πόσιμου νερού στις αναπτυσσόμενες χώρες ή έχουν διεξαχθεί με μεγάλου μήκους κύματος ($> 315 \text{ nm}$) UV ακτινοβολία. Λίγη έρευνα έχει διεξαχθεί για να αξιολογηθεί η συνέργεια μεταξύ της φωτοκατάλυσης με TiO_2 και του μικροβιοκτόνου (254 nm) UV φωτός, το οποίο αποτελεί τη μορφή του υπεριώδους φωτός, που συνήθως χρησιμοποιείται σε εφαρμογές μονάδων επεξεργασίας. Ασχέτως εφαρμογής, η βιβλιογραφία υποδεικνύει ότι η φωτοκαταλυτική απολύμανση απαιτεί μεγαλύτερους χρόνους έκθεσης και ουσιαστικά υψηλότερες ενεργειακές απαιτήσεις από ό,τι το πρότυπο της UV απολύμανσης (Gerrity et al., 2014).

2.1.1 Μηχανισμός λειτουργίας της ετερογενούς φωτοκατάλυσης

Η φωτοκατάλυση χρησιμοποιείται ευρέως για να περιγράψει τη διαδικασία με την οποία η επιτάχυνση της αντίδρασης συμβαίνει όταν ένα υλικό, συνήθως ένας ημιαγωγός, αλληλεπιδρά με φως επαρκούς ενέργειας (ή ενός ορισμένου μήκους κύματος) για την παραγωγή αντιδραστικών οξειδωτικών ειδών (Reactive oxygen species, ROS), το οποίο μπορεί να οδηγήσει στην φωτοκαταλυτική αποδόμηση ενός ρύπου. Πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής αντίδρασης, τουλάχιστον δύο αντιδράσεις πρέπει να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα, προκειμένου να έχουμε επιτυχημένη παραγωγή αντιδραστικών οξειδωτικών ειδών. Συνήθως, η πρώτη περιλαμβάνει την οξείδωση του διασπαστικά προσροφημένου H_2O από τις φωτοπαραγόμενες οπές και η δεύτερη περιλαμβάνει την αναγωγή ενός δέκτη ηλεκτρονίων (συνήθως του διαλυμένου οξυγόνου) από τα φωτοεπαγόμενα ηλεκτρόνια για την παραγωγή ριζών υδροξυλίου (HO^\bullet) και υπεροξειδικών ανιοντικών ριζών ($^\bullet\text{O}_2$) αντίστοιχα. Είναι σαφές ότι η διεργασία της φωτοκατάλυσης υποδηλώνει κυρίως τη δημιουργία καταλυτικών δραστικών ειδών χρησιμοποιώντας τη φωτεινή ακτινοβολία παρά τη δράση του φωτός σαν καταλύτη στην αντίδραση. Αν η αρχική διαδικασία φωτοδιέγερσης λαμβάνει χώρα σε ένα προσροφημένο μόριο, το οποίο

στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τη θεμελιώδη κατάσταση του υποστρώματος του καταλύτη, η διαδικασία αναφέρεται ως μια “ καταλυτική φωτοαντίδραση”, αν από την άλλη πλευρά η αρχική φωτοδιέγερση λαμβάνει χώρα στο υπόστρωμα του καταλύτη και στο φωτοδιεγερμένο καταλύτη, στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τη θεμελιώδη κατάσταση του προσροφημένου μορίου, η διαδικασία είναι μια “ευαισθητοποιημένη φωτοαντίδραση”. Στις περισσότερες περιπτώσεις η ετερογενής φωτοκατάλυση αναφέρεται σε ημιαγωγούς ή σε ευαισθητοποιημένους ημιαγωγούς φωτοκατάλυσης. Η μέθοδος της ετερογενούς φωτοκαταλυτικής αποδόμησης των οργανικών ρύπων βασίζεται στο φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο. Σύμφωνα με το μοντέλο των μοριακών τροχιακών, η ηλεκτρονιακή δομή των περισσότερων ημιαγωγικών υλικών περιλαμβάνει δύο σημαντικές ενεργειακές στάθμες. Η πρώτη, που ονομάζεται ζώνη σθένους (valence band, VB), αποτελεί την ανώτερη στάθμη που είναι πληρωμένη από ηλεκτρόνια. Η δεύτερη, που ονομάζεται ζώνη αγωγιμότητας (conduction band, CB), αποτελεί την χαμηλότερη στάθμη που είναι ελεύθερη ηλεκτρονίων. Ανάμεσά τους παρεμβάλλεται μια περιοχή απαγορευμένων ενεργειακών καταστάσεων, η οποία ονομάζεται απαγορευμένη ζώνη. Η απαγορευμένη αυτή ζώνη εκτείνεται από το πάνω άκρο της κατειλημμένης ζώνης σθένους ως το κάτω άκρο της κενής ζώνης αγωγιμότητας και χαρακτηρίζεται από μια ενέργεια $\leq 4\text{eV}$, γνωστή και ως ενεργειακό χάσμα (band gap energy, E_g) (Ευγενίδου, 2005).

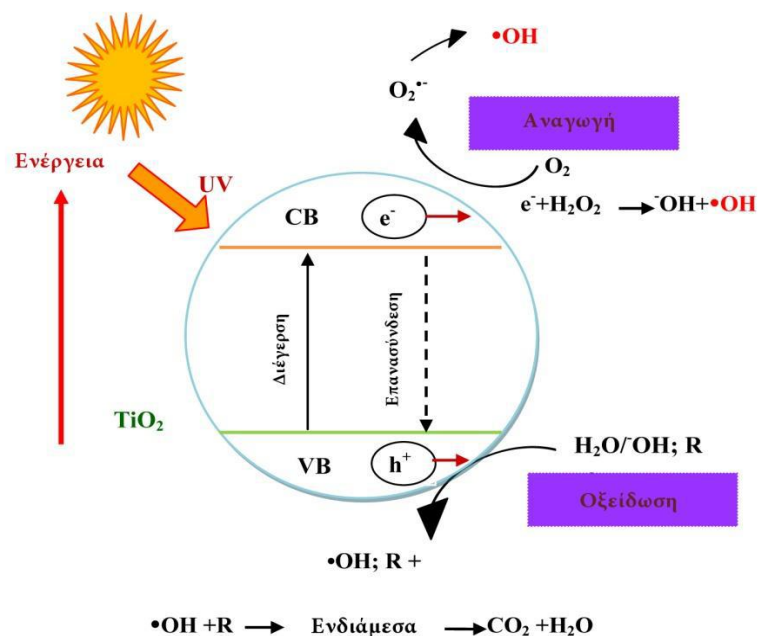
Το ενεργειακό χάσμα, καθώς και η θέση του κατώτερου τμήματος της ζώνης αγωγιμότητας και του ανώτερου σημείου της ζώνης σθένους, είναι οι τρεις σημαντικότεροι παράγοντες της δομής των ημιαγωγών αναφορικά με τις φωτοκαταλυτικές διεργασίες. Το ενεργειακό χάσμα, καθορίζει ποιο μήκος κύματος ακτινοβολίας είναι το πιο αποτελεσματικό, και η θέση του ανώτερου σημείου της ζώνης σθένους καθορίζει κυρίως την οξειδωτική δύναμη αποδόμησης του καταλύτη (Τσίμας, 2007).

Στη φωτοκατάλυση, φως μεγαλύτερης ενέργειας από το χάσμα του ημιαγωγού, διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο από τη ζώνη σθένους στη ζώνη αγωγιμότητας. Στην περίπτωση της ανάτασης του TiO_2 το χάσμα είναι 3,2 eV, ως εκ τούτου το υπεριώδες φως ($\leq 387\text{ nm}$) είναι απαραίτητο. Η απορρόφηση ενός φωτονίου διεγείρει ένα ηλεκτρόνιο στη ζώνη αγωγιμότητας (e_{CB}^-) δημιουργώντας μια θετική οπή στη ζώνη σθένους (h_{VB}^+). Τα σωματίδια που φέρουν φορτίο μπορούν να παγιδευτούν ως Ti^{3+} και O^- σε ελαττωματικές θέσεις στο πλέγμα του TiO_2 ή μπορούν να επανασυνδυαστούν διαχέοντας ενέργεια. Εναλλακτικά οι φορείς φορτίων μπορούν να μεταναστεύσουν στην επιφάνεια του καταλύτη και να ξεκινήσουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις με προσροφήσεις. Θετικές οπές μπορούν να οξειδώσουν OH^- ή νερό στην επιφάνεια για να παράγουν ρίζες $^*\text{OH}$ οι οποίες, είναι εξαιρετικά ισχυρά οξειδωτικά. Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν στη συνέχεια να οξειδώσουν οργανικά είδη με ανοργανοποίηση παράγοντας μεταλλικά άλατα, CO_2 και H_2O .

Τα ηλεκτρόνια στη ζώνη αγωγιμότητας μπορεί να παγιδευτούν γρήγορα από το προσροφημένο στο σωματίδιο της τιτάνιας, μοριακό οξυγόνο, το οποίο ανάγεται για το σχηματισμό ανιονικής υπεροξειδικής ρίζας, που μπορεί να αντιδράσει περαιτέρω με H^+ για να δημιουργήσει ρίζα $\bullet OOH$ και περαιτέρω ηλεκτροχημική αναγωγή των αποδόσεων H_2O_2 . Αυτά τα αντιδραστικά είδη μπορούν επίσης να συμβάλλουν σε οξειδωτικές οδούς όπως η επιδείνωση του ρύπου. Οι αντιδράσεις οξείδωσης – αναγωγής που συμβαίνουν στην φωτοδιεγερόμενη επιφάνεια είναι οι εξής:

- Φωτονιακή διέγερση του καταλύτη: $TiO_2 + h\nu \rightarrow h\nu_{VB}^+ + e_{CB}^-$ (15)
- Ανασυνδυασμός ηλεκτρονίου- οπής: $e_{CB}^- + h\nu_{VB}^+ \rightarrow \text{ενέργεια}$ (16)
- Σχηματισμός οξειδωτικών ριζών $H_2O + h\nu_{VB}^+ \rightarrow \bullet OH + H^+$ (17)
- Παγίδευση φωτοδιεγερμένου e^- : $O_2 + e_{CB}^- \rightarrow O_2^{\bullet -}$ (18)
- $\bullet OH + \text{ρύπος} \rightarrow H_2O + CO_2$ (19)
- $O_2^{\bullet -} + H^+ \rightarrow \bullet OOH$ (20)
- $\bullet OOH + \bullet OOH \rightarrow H_2O_2 + O_2$ (21)
- $O_2^{\bullet -} + \text{ρύπος} \rightarrow CO_2 + H_2O$ (22)
- $\bullet OOH + \text{ρύπος} \rightarrow CO_2 + H_2O$ (23)

(Pelaez et al., 2012)



Εικόνα 1: Σχηματική απεικόνιση της αρχής της φωτοκατάλυσης με TiO_2 (Ahmed et al., 2011).

2.1.2 Φωτοκαταλύτες

Ως φωτοκαταλύτες ορίζονται τα στερεά εκείνα που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Κατά κανόνα είναι ημιαγωγοί.

Ένας καλός φωτοκαταλύτης πρέπει να είναι (Κατσανάκη, 2012):

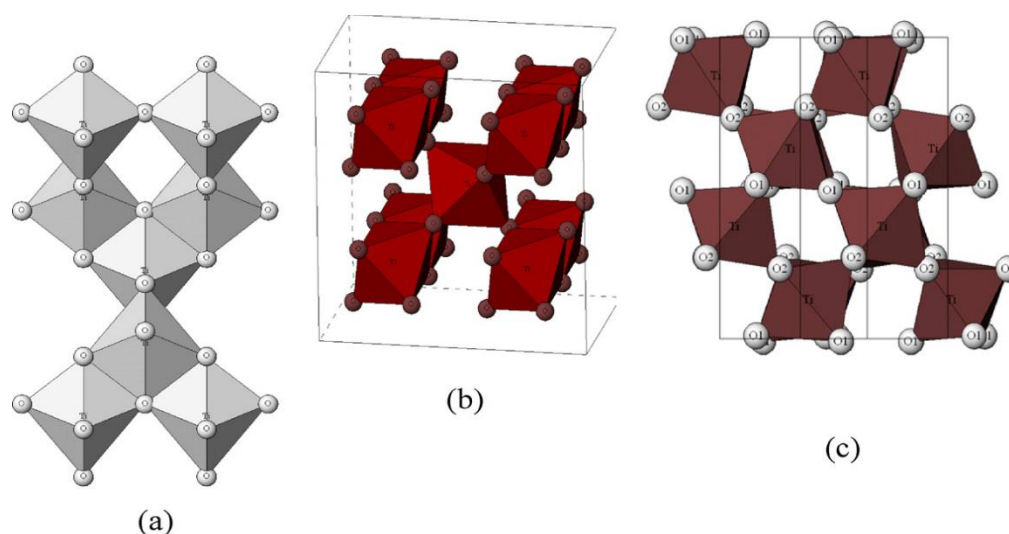
- φωτοενεργός
- να έχει τη δυνατότητα να αξιοποιεί φως στο ορατό ή υπεριώδες φάσμα
- βιολογικά και χημικά αδρανής
- φωτοσταθερός
- χαμηλού κόστους
- μη τοξικός

2.1.3 Φωτοκαταλύτης TiO_2

Πολλά μεταλλικά οξείδια και σουλφίδια έχουν διερευνηθεί για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές. Λόγω της υψηλής φωτοδραστηριότητας, του χαμηλού κόστους, της χαμηλής τοξικότητας και της καλής χημικής και θερμικής του σταθερότητας το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) θεωρείται ως ένας πολλά υποσχόμενος φωτοκαταλύτης. Έχει μελετηθεί σε διάφορα ερευνητικά πεδία, όπως η ηλιακή φωτοβολταϊκή, η φωτοκαταλυτική διάσπαση νερού, η θεραπεία ρύπων και υδρογονανθράκων της γενιάς των καυσίμων. Ωστόσο, λόγω του σχετικά μεγάλου ενεργειακού χάσματος ($E_g = 3,2 \text{ eV}$ για ανατάση), η φωτοκαταλυτική ικανότητα του TiO_2 μπορεί να ενεργοποιείται από το υπεριώδες φως, το οποίο αντιπροσωπεύει μόνο το 4% του ηλιακού φωτός. Επιπλέον, η σοβαρή επιβάρυνση ανασυνδυασμού περιορίζει την πρακτική της εφαρμογή. Προκειμένου να κάνουμε το TiO_2 να ανταποκρίνεται στο ορατό φως, πολλές στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί για τη μείωση του χάσματος του TiO_2 όπως ντοπάρισμα με μεταλλικά και μη μεταλλικά στοιχεία. Ωστόσο, το ντοπάρισμα με μέταλλα θα μειώσει τη θερμική σταθερότητα και θα αυξήσει την επιβάρυνση των οπών ανασυνδυασμού (Wang et al., 2013).

Το TiO_2 απαντάται συνήθως σε τρεις κρυσταλλικές δομές, οι οποίες είναι η ανατάση, το ρουτίλιο και ο μπρουκίτης. Η δομή που υπερτερεί, όσον αφορά στη φωτοκαταλυτική της δραστηριότητα, είναι η πρώτη λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των HO^\cdot και H_2O στην επιφάνειά της και επιπλέον λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτοδιεγερμένων e^- και h^+ . Ωστόσο η ανατάση TiO_2 είναι θερμοδυναμικά πιο ασταθής και για θερμοκρασίες $>600^\circ\text{C}$ μετασχηματίζεται στη σταθερή φάση του ρουτίλιου με αποτέλεσμα τη μείωση της φωτοκαταλυτικής δραστηριότητας του καταλύτη (Carp et al., 2004). Έτσι, μετά από πλήθος ερευνών τις τελευταίες δύο δεκαετίες που υποστηρίζουν το παραπάνω,

χρησιμοποιείται κυρίως στη μορφή της ανατάσης ή στη συνδυασμένη μορφή ανατάσης – ρουτιλίου (Gaya and Abdulah, 2008; Malato et al., 2009; Parsons, 2004).



Εικόνα 2: Κρυσταλλικές δομές του διοξειδίου του τιτανίου α) ανατάση β) ρουτιλίου γ) μπρουκίτη (Pelaez et al., 2012).

2.1.4 Παράγοντες που επιδρούν στην ετερογενή φωτοκατάλυση

- **Μάζα του καταλύτη**

Γενικά ο ρυθμός των φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων αυξάνεται με την αύξηση της ποσότητας του καταλύτη, ως συνέπεια της αύξησης της διαθέσιμης επιφάνειας για τη ρόφηση των αντιδρώντων και στα ενεργά κέντρα που είναι διαθέσιμα για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων. Για αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε αιωρήματα ο ρυθμός της αντίδρασης αρχικά αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της μάζας του καταλύτη μέχρι μια ορισμένη τιμή και στη συνέχεια φτάνει σε πλάτο. Για μεγαλύτερες ποσότητες καταλύτη παρατηρείται μείωση του ρυθμού της αντίδρασης, η οποία οφείλεται, κυρίως σε μείωση της διείσδυσης του φωτός στο διάλυμα (Herrmann, 1999). Όταν η συγκέντρωση του καταλύτη είναι πολύ υψηλή, μετά που θα έχει διανύσει μια ορισμένη απόσταση σε ένα οπτικό μονοπάτι, η θολότητα παρεμποδίζει την περαιτέρω διείσδυση του φωτός στον αντιδραστήρα. Σε οποιαδήποτε δεδομένη εφαρμογή, αυτή η βέλτιστη μάζα του καταλύτη πρέπει να βρεθεί, ώστε να αποφεύγεται η υπερβολή του καταλύτη και να εξασφαλιστεί η συνολική απορρόφηση των αποδοτικών φωτονίων (Malato et al., 2009). Για την επιλογή της συγκέντρωσης που θα χρησιμοποιηθεί, ιδίως εάν πρόκειται για διεργασία μεγάλης κλίμακας, απαιτούνται αποτελέσματα μετρήσεων σε εργαστηριακή κλίμακα καθώς επίσης και εκτενής ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, για διεργασίες σε αντίστοιχες συνθήκες (Gogate et al., 2004).

- **pH διαλύματος**

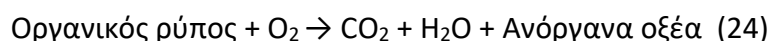
Ο ρυθμός των καταλυτικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε ένα υδατικό περιβάλλον επηρεάζεται σημαντικά από το pH του διαλύματος, μιας και αυτό μεταβάλλει τις θέσεις των ζωνών σθένους και αγωγιμότητας, καθώς και την ισορροπία προσρόφησης και την κατανομή των φορτίων στην επιφάνεια του ημιαγωγού (Φροντιστής, 2011).

- **Θερμοκρασία**

Η αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι μια τιμή οδηγεί αρχικά σε αύξηση του καταλυτικού ρυθμού και έπειτα στη σταθεροποίησή του. Περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση του ρυθμού (Φροντιστής, 2011). Η βέλτιστη θερμοκρασία της αντίδρασης θεωρείται ότι είναι μεταξύ 20°C και 80°C για τη φωτοανοργανοποίηση (Malato et al., 2009) καθώς υψηλότερες θερμοκρασίες ευνοούν την επανασύνδεση των φορέων φορτίου και δυσχεραίνει την προσρόφηση των οργανικών ενώσεων πάνω στην επιφάνεια του TiO₂ (Gaya and Abdullah, 2008) ενώ κάτω των 80°C ενισχύεται η προσρόφηση (αυθόρμητο εξώθερμο φαινόμενο). Όταν σκοπός της επεξεργασίας είναι η απολύμανση, γενικά όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία τόσο αυξάνεται ο ρυθμός αδρανοποίησης των μικροοργανισμών (Rincón and Pulgarin, 2003). Έτσι, προκειμένου να αποφεύγεται το υψηλό κόστος θέρμανσης του νερού είθισται η φωτοκατάλυση να πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου καθώς παραμένει αποτελεσματική και σε αυτές τις συνθήκες.

- **Οξυγόνο**

Στις διεργασίες που χρησιμοποιούν την ετερογενή φωτοκατάλυση για καθαρισμό νερού, οι ρύποι είναι συνήθως οργανικοί και η συνολική αντίδραση ανοργανοποίησής τους περιγράφεται από την παρακάτω αντίδραση:



Δεδομένης της στοιχειομετρίας της αντίδρασης αυτής, δεν είναι δυνατή η ανοργανοποίηση του ρύπου απουσία O₂. Η παρουσία αέριου ρεύματος επίσης παρέχει τους απαραίτητους δέκτες ηλεκτρονίων, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αντίδραση επανασυνδυασμού των θετικών οπών με τα ηλεκτρόνια, ενώ ταυτόχρονα βοηθάει την καλύτερη ανάδευση του διαλύματος (Malato, 2004).

- **Αρχική συγκέντρωση υποστρώματος**

Γενικά έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του ρύπου μέχρι ένα βαθμό, ευνοεί τον ρυθμό αποδόμησης, ενώ πέραν της τιμής αυτής ο ρυθμός μειώνεται. Ο ρυθμός σχετίζεται με την πιθανότητα σχηματισμού OH• στον καταλύτη και την πιθανότητα αντίδρασής τους με τον ρύπο. Καθώς αυξάνεται η αρχική

συγκέντρωση του ρύπου, συγχρόνως αυξάνεται και η πιθανότητα αντίδρασης ρύπου-ρίζας. Πέραν του σημείου αυτού, μία περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του ρύπου οδηγεί στην μείωση του ρυθμού παραγωγής των ριζών υδροξυλίου. Αιτία αποτελεί το γεγονός ότι οι ρίζες υδροξυλίου παράγονται στα ενεργά κέντρα του καταλύτη, τα οποία καλύπτονται από ιόντα του ρύπου (Τσίμας, 2007; Δημητρακοπούλου, 2013).

- **Μήκος κύματος**

Η μεταβολή του ρυθμού της διεργασίας σε σχέση με το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στον καταλύτη έχει άμεση σχέση με το φάσμα απορρόφησης του καταλύτη. Το παράθυρο λειτουργίας θα αντιστοιχεί στο ενεργειακό χάσμα, με την προϋπόθεση ότι τα αντιδρώντα δεν απορροφούν ακτινοβολία, έτσι ώστε αυτή να χρησιμοποιείται αποκλειστικά για τη φωτοδιέγερση του καταλύτη. Για το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2), η ενέργεια χάσματος είναι $E_g = 3.2 \text{ eV}$ και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας που απαιτείται είναι $\lambda < 380 \text{ nm}$. Το ηλιακό φως μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την διέγερση του καταλύτη σε ορισμένες περιπτώσεις. Στην περίπτωση του TiO_2 , η χρήση του είναι δυνατή, μιας και τα απαιτούμενα μήκη κύματος περιέχονται, αν και σε μικρό ποσοστό (~5%), στο φάσμα του (Gogate et al., 2004; Δημητρακοπούλου, 2013).

- **Ένταση φωτός**

Σε χαμηλές εντάσεις ($0\text{--}20 \text{ mW/cm}^2$), ο ρυθμός αποδόμησης του ρύπου αυξάνεται γραμμικά με την αύξηση της έντασης της ακτινοβολίας. Σε ενδιάμεσες εντάσεις (περίπου 25 mW/cm^2), ο ρυθμός εξαρτάται από την τετραγωνική ρίζα της έντασης, ενώ σε μεγάλες εντάσεις, ο ρυθμός αποδόμησης, είναι ανεξάρτητος της έντασης της ακτινοβολίας. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο ότι σε χαμηλές εντάσεις ακτινοβολίας, οι αντιδράσεις που περιλαμβάνουν τον σχηματισμό ζεύγους θετικής οπής-ηλεκτρονίου κυριαρχούν, ενώ ο επανασυνδυασμός τους είναι αμελητέος. Ωστόσο, καθώς η ένταση της παρεχόμενης ακτινοβολίας αυξάνεται, οι δύο αυτές δράσεις λειτουργούν ανταγωνιστικά, προκαλώντας έτσι την μείωση του ρυθμού αποδόμησης του ρύπου (Τσίμας, 2007, Δημητρακοπούλου, 2013).

Σε σύγκριση με τις συμβατικές προσεγγίσεις επεξεργασίας νερού, όπως είναι η οζόνωση, η υπεριώδης ακτινοβολία και οι προηγμένες διεργασίες διήθησης, η φωτοκατάλυση έχει μια σειρά από πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένων των παραπροϊόντων με υψηλή απόδοση οξείδωσης και με ελάχιστη απολύμανση (Swetha et al., 2010).

2.1.4.1 Πλεονεκτήματα της φωτοκατάλυσης (Φραγγεδάκη, 2014)

- Τα επεξεργασμένα υγρά απόβλητα περιέχουν πολλές φορές, πέρα από παθογόνους μικροοργανισμούς και οργανικά μόρια (φυτοφάρμακα). Συνεπώς, η φωτοκατάλυση βοηθάει στην καταστροφή των οργανικών αυτών μορίων, κατά την επεξεργασία των υγρών αποβλήτων.
- Η δυνατότητα για ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση των φωτοκαταλυτών, συνεπάγεται περαιτέρω μείωση του κόστους στην εφαρμογή της μεθόδου, ενώ δεν επιβαρύνεται το περιβάλλον με επιπλέον χημικούς ρύπους.
- Ο φωτοκαταλύτης TiO_2 που συνήθως χρησιμοποιείται δεν είναι τοξικός, ενώ παρουσιάζει χημική σταθερότητα σε μεγάλο εύρος τιμών pH.
- Η απαίτηση σε O_2 της διεργασίας της φωτοκατάλυσης ικανοποιείται από την αφθονία που υπάρχει στην ατμόσφαιρα.
- Δυνατότητα εκμετάλλευσης του ηλιακού φωτός (ως ανανεώσιμη πηγή ενέργειας) για να ενεργοποιηθεί ο καταλύτης, ιδιαίτερα σε περιοχές μεγάλης ηλιοφάνειας.
- Λειτουργεί σε συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας δωματίου.
- Μπορεί να εφαρμοστεί και για χαμηλές συγκεντρώσεις ενός ρύπου.
- Η διάταξη είναι απλή, με μεγάλη διάρκεια ζωής και μικρές απαιτήσεις ελέγχου (Ξεκουκουλωτάκης, 2008).
- Μονιμότερα αποτελέσματα στην απολύμανση, καθώς η δράση των υδροξυλίων, που παράγονται κυρίως από τη φωτοκατάλυση, έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση και συνεπώς την καταστροφή των κυτταρικών μεμβρανών. Αποτέλεσμα αυτής της δράσης είναι η μείωση του ρυθμού αναγέννησης των παθογόνων μικροοργανισμών, αλλά και η μείωση του αναγεννημένου πληθυσμού.

2.1.4.2 Μειονεκτήματα (Φραγγεδάκη, 2014)

- Σε μεγάλης κλίμακας συστήματα, ο ανταγωνισμός των ενώσεων για να προσρροφηθούν στις ενεργές περιοχές στην επιφάνεια του καταλύτη αυξάνεται, με αποτέλεσμα οι ενώσεις με την ψηλότερη συγγένεια προσρόφησης μπορούν να αλλοιωθούν πολύ γρήγορα και με καλύτερα αποτελέσματα, ενώ οι ρυπογόνες ενώσεις δεν αλλοιώνονται καθόλου ή αρκετά.
- Ο ρυθμός των φωτοκαταλυτικών αντιδράσεων είναι συνήθως μικρός, με αποτέλεσμα να χρειάζεται η παροχή μεγάλης ποσότητας φωτοκαταλύτη στον αντιδραστήρα.
- Είναι πρακτικά αδύνατο να επιτευχθεί ομοιόμορφη ακτινοβολήση της επιφάνειας του καταλύτη, λόγω της θολότητας του διαλύματος και της διασποράς του φωτός από το υγρό.
- Η απομάκρυνση του καταλύτη είναι μια δαπανηρή, αλλά και χρονοβόρα διαδικασία.

3. Αλλοιώσεις σε υποκυτταρικό επίπεδο κατά την απολύμανση

Ο μηχανισμός που οδηγεί στη βακτηριακή αδρανοποίηση δεν είναι πλήρως κατανοητός και προκαλεί ανησυχία σε πολλούς ερευνητές. Αρκετή συζήτηση υπάρχει αναφορικά με τη διεργασία ή τις διεργασίες που οδηγούν στη θανάτωση ενός μικροοργανισμού που εκτίθεται σε κάποια απολυμαντική μέθοδο. Στο σύστημα φωτοκατάλυσης TiO_2 και στις συμβατικές διαδικασίες χημικής απολύμανσης, όπως χλωρίωση, όζον και ακτινοβολία UV, έχει μελετηθεί ευρέως ο υποκυτταρικός μηχανισμός βακτηριακής αδρανοποίησης. Όπως είναι γνωστό σε όλους, οι βασικές φυσιολογικές λειτουργίες των βακτηρίων βασίζονται στην κυτταρική μεμβράνη, στο κυτταρόπλασμα και στα νουκλεϊκά οξέα. Ωστόσο, οι έρευνες ως επί το πλείστον υποδεικνύουν ότι κυρίαρχη διαδικασία στη βακτηριακή αδρανοποίηση αποτελεί η καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης (Long et al., 2015).

Παρακάτω θα γίνει ανάλυση των πιο σημαντικών θέσεων - στόχων που παίζουν κυρίαρχο ρόλο στη συνολική διαδικασία αδρανοποίησης. Για απλότητα, οι διάφορες θέσεις-στόχοι κατά τις δύο απολυμαντικές διεργασίες (οζόνωση & φωτοκατάλυση) ταξινομούνται σε εξωκυτταρικές και ενδοκυτταρικές (Dalrymple et al., 2010).

Εξωκυτταρικές θέσεις-στόχοι

Λαμβάνοντας υπόψη ότι η περιφερειακή δομή των κυττάρων (π.χ., βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα, κυτταρική μεμβράνη και σπόρια) παρέχει ένα πρωταρχικό προστατευτικό εμπόδιο ενάντια στο περιβαλλοντικό στρες στους μικροοργανισμούς, οι βλάβες στα συστατικά της επιφάνειας των κυττάρων θα ήταν το πρώτο και ίσως το σημαντικότερο βήμα για τη μικροβιακή αδρανοποίηση. Η φυσικοχημική αλλαγή στην επιφάνεια των κυττάρων θα προηγηθεί οποιασδήποτε περαιτέρω ζημιάς στα ενδοκυτταρικά συστατικά και τις λειτουργίες τους. Ωστόσο, αυτές οι εξωτερικές δομές είναι από μόνες τους σύνθετες και με πολλαπλές θέσεις επίθεσης που στοχεύουν οι ROS. Στην περίπτωση των βακτηρίων, μπορούν να καθοριστούν τουλάχιστον τρεις ταξινομήσεις των περιβλημάτων τους: (1) το πεπτιδογλυκανικό στρώμα, που υπάρχει τόσο σε Gram-αρνητικά όσο και σε Gram-θετικά βακτήρια, (2) το στρώμα λιποπολυσακχαρίτη (LPS), το στρώμα αυτό βρίσκεται μόνο σε αρνητικά κατά Gram βακτήρια και (3) η διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίων, όπου τα Gram-αρνητικά βακτήρια έχουν δύο διπλοστιβάδες, ενώ τα Gram-θετικά μόνο μία (Cho et al., 2010, Dalrymple et al., 2010).

Το πεπτιδογλυκανικό στρώμα στα Gram-θετικά βακτήρια μπορεί να αντιπροσωπεύει έως και το 90% του κυτταρικού τοιχώματος με πολλαπλά (έως 25) φύλλα να στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο. Στα Gram-αρνητικά βακτήρια, αποτελεί περίπου μόνο το 10% του κυτταρικού τοιχώματος. Η πεπτιδογλυκάνη προσδίδει ακαμψία στη διατήρηση του σχήματος και της εσωτερικής πίεσης.

Το στρώμα πεπτιδογλυκάνης μπορεί να είναι ευαίσθητο στην επίθεση από οξειδωτικές ρίζες. Ωστόσο, η πεπτιδογλυκάνη είναι πολύ πορώδης, τόσο στα Gram-αρνητικά όσο και στα Gram-θετικά βακτήρια και επιτρέπει να περάσουν σωματίδια

περίπου 2 nm. Ενώ αυτοί οι πόροι είναι αρκετοί για να επιτρέψουν τη διέλευση οξειδωτικών ειδών, όπως τη ρίζα υδροξυλίου και το υπεροξειδίο, μπορεί ακόμη να είναι δύσκολο για τέτοια μόρια να διεισδύσουν στην εσωτερική μεμβράνη, λόγω της αντιδραστικότητάς τους στο εξωτερικό περιβάλλον. Τα θετικά κατά Gram βακτήρια αναμένεται να είχαν πλεονέκτημα στην επιβίωση κατά τη φωτοκατάλυση/οζόνωση, εάν η αδρανοποίηση ήταν συνάρτηση του πάχους της πεπτιδογλυκάνης.

Ωστόσο, η σύγκριση μεταξύ των ποσοστών αδρανοποίησης θετικών και αρνητικών κατά Gram ειδών που βασίζονται απλώς στο πάχος της στιβάδας πεπτιδογλυκάνης έχει μικρή αξία, λόγω της διαφοράς στη θέση των στιβάδων σε κάθε ομάδα. Στην πραγματικότητα, η σύγκριση βασίζεται στην πολυπλοκότητα και την πυκνότητα του κυτταρικού τοιχώματος συνολικά. Πιο συγκεκριμένα, η ικανότητα της παχιάς στιβάδας πεπτιδογλυκάνης σε Gram-θετικά βακτήρια προσδίδει μεγαλύτερη αντίσταση από την εξωτερική μεμβράνη των Gram-αρνητικών βακτηρίων, δεδομένου ότι το καθένα αντιπροσωπεύει την πρώτη γραμμή άμυνας.

Ωστόσο, το στρώμα πεπτιδογλυκάνης δεν έχει αποδειχθεί εάν αποτελεί έναν πραγματικό σημαντικό στόχο των οξειδωτικών ριζών ή καθυστερεί τη διάχυση των οξειδωτικών στις υποκείμενες ζωτικές περιοχές, ιδιαίτερα στα Gram-θετικά βακτήρια. Η πολυπλοκότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων είναι μια νεφελώδης παράμετρος και είναι ακόμα δύσκολο να εξαχθούν οριστικά συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο της πεπτιδογλυκάνης στο μηχανισμό αδρανοποίησης (ή στην αντίσταση αυτών), παρόλου που ορισμένοι ερευνητές παρατήρησαν μείωση του ρυθμού αδρανοποίησης με αυξημένη πυκνότητα και πολυπλοκότητα στρώματος.

Μέχρι σήμερα, έρευνες έχουν δείξει ότι τα λιπίδια, ιδιαίτερα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs, polyunsaturated fatty acids) είναι οι κυριότεροι στόχοι των οξειδωτικών ριζών. Φωτοκαταλυτικά πειράματα και άλλες αντιδράσεις που περιλαμβάνουν ρίζες έχουν αποδείξει τα ανασταλτικά αποτελέσματα της υπεροξειδωσής των λιπιδίων στα κύτταρα.

Αυτές οι ρίζες μπορούν φυσικά να εμφανιστούν σε βιολογικά συστήματα και όταν δεν ελέγχονται, ευθύνονται για βλάβη σε σημαντικά κυτταρικά συστατικά, όπως τα νουκλεϊκά οξέα, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια.

Στην φωτοκαταλυτική απολύμανση, η υπεροξειδωσής των λιπιδίων έχει ενδιαφέρον επειδή η στιβάδα LPS και η διπλοστιβάδα φωσφολιπιδίου αποτελούνται από λιπαρά οξέα, τα οποία μπορεί να είναι επιρρεπή σε υπεροξειδωσής. Οι ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται στο εξωκυτταρικό περιβάλλον είναι πιθανό να ταξιδεύουν σε πολύ μικρές αποστάσεις προτού συναντήσουν οξειδωτικό υπόστρωμα όπως λιπαρά οξέα. Μόλις δημιουργηθούν οι ρίζες πολύ κοντά στα μόρια-στόχους, θα είναι σε θέση να προκαλέσουν βλάβη κατευθείαν.

Η LPS είναι ζωτικής σημασίας για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια, καθώς συμβάλει στη δομική τους ακεραιότητα. Η LPS σχετίζεται με τη δράση της ενδοτοξίνης. Τα συστατικά του πολυσακχαρίτη σχετίζονται με ανοσογονικότητα. Η καταστροφή του LPS είναι σημαντική όχι μόνο ως παράγοντα στη συνολική αδρανοποίηση, αλλά και

στην εξουδετέρωση των τοξικών επιδράσεων που μπορεί να εξακολουθούν να υφίστανται και μετά την αδρανοποίηση ενός μικροοργανισμού.

Επειδή οι μεμβράνες φωσfolιπιδίου αποτελούνται κυρίως από μια διάταξη επαναλαμβανόμενων λιπιδίων, μια αλυσιδωτή αντίδραση που ξεκινά από τις ROS μπορεί να επιτρέψει την εμφάνιση κυτταρικής βλάβης σε θέσεις σχετικά μακρινές από την πηγή έναρξης. Αυτό συμβαίνει επειδή η αντίδραση ενός ακόρεστου λιπαρού οξέος με μια ελεύθερη ρίζα παρουσία οξυγόνου οδηγεί στο σχηματισμό μιας ρίζας υπεροξυλίου, η οποία με τη σειρά της μπορεί να αντιδράσει με άλλα κοντινά μόρια λιπιδίων για να δημιουργήσει επιπλέον ρίζες λιπιδίων. Η διαδικασία συνεχίζεται, καθώς αυτές οι λιπιδικές ρίζες αντιδρούν με άλλα ακόρεστα λιπίδια. Η αλυσιδωτή αντίδραση καταλήγει τελικά στην οξειδωση των βιομορίων σε τοποθεσίες που είναι πολύ μακρινές από εκεί όπου εμφανίστηκε η αρχική αντίδραση των ελεύθερων ριζών. Το φαινόμενο αυτό καλείται "λιπιδική υπεροξείδωση" και αναδεικνύει τη διαρκή και μη ελεγχόμενη δράση των ελευθέρων ριζών (Maness et al., 1999). Οι πιθανές επιπτώσεις της υπεροξείδωσης της μεμβράνης είναι αλλαγές στην διαπερατότητα των κυττάρων και διαταραχή της άθικτης μεμβράνης, που οδηγούν και στην απελευθέρωση του κυτταροπλάσματος και στην αναστολή της μεσολαβούμενης μεμβράνης (Dalrymple et al., 2010, Kim et al., 2013). Πολλές ενδείξεις σχετικά με την αλλοίωση της επιφάνειας των κυττάρων έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες και ιδίως η αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης ή στη δομή του τοιχώματος, κατά τη διάρκεια χημικής απολύμανσης. Για παράδειγμα, οι Arana et al. (1999) αναφέρουν ότι η αδρανοποίηση του *E. coli* από το όζον πυροδοτήθηκε από την αλλαγή στη διαπερατότητα της κυτταρικής του μεμβράνης (Cho et al., 2010). Ο Maness et al. (1999) είχαν αναφέρει ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων ήταν ο υποκείμενος μηχανισμός θανάτου των κυττάρων του *E. coli* με φωτοκατάλυση TiO_2 .

Ενδοκυτταρικές θέσεις-στόχοι

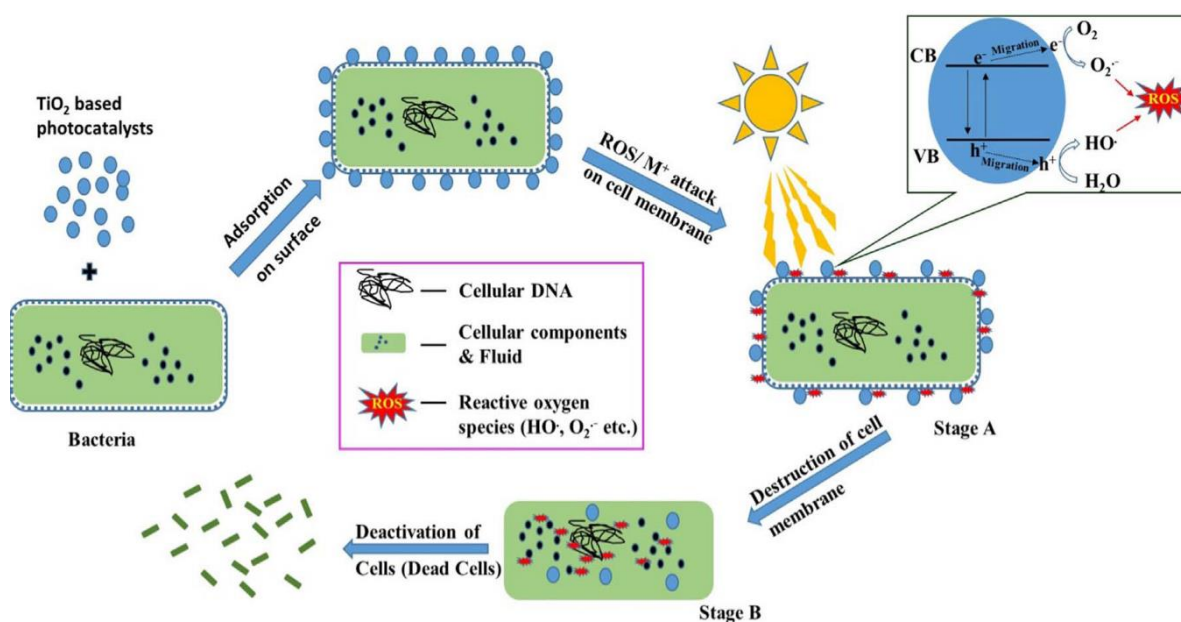
Το σύνθετο μείγμα ουσιών και δομών στο κύτταρο ονομάζεται συλλογικά το κυτταρόπλασμα. Στο κυτταρόπλασμα, υπάρχουν DNA, RNA και ριβοσώματα μαζί με άλλα διαλυμένα ή αιωρούμενα υλικά. Αυτές όλες οι ουσίες είναι σημαντικές για την καλή λειτουργία του οργανισμού. Φυσικά, το κυτταρόπλασμα προστατεύεται από την κυτταρική μεμβράνη, η οποία είναι αδιαπέραστη από τα περισσότερα βασικά μόρια και ιόντα. Μόνο το νερό και μερικά άλλα μικρά μόρια όπως το οξυγόνο και το διοξείδιο του άνθρακα διαχέονται ελεύθερα σε όλη τη μεμβράνη. Όλες οι άλλες ουσίες εισέρχονται μέσω ενεργού μεταφοράς ή διαχέονται μέσω των πρωτεϊνών της μεμβράνης, οι οποίες επιτρέπουν τη μεταφορά ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου.

Περιορίζεται η πιθανότητα τα ενδοκυτταρικά συστατικά να γίνουν στόχος των οξειδωτικών μέσων, καθώς όταν τα οξειδωτικά μέσα συναντήσουν άλλες ουσίες μπορεί να αντιδράσουν μ'αυτές πριν έρθουν σε επαφή με το εσωτερικό του κυττάρου. Αυτό σημαίνει πως τα ενδοκυτταρικά συστατικά μπορούν να υποστούν οξειδωτικό στρες είτε μετά από έντονη καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης,

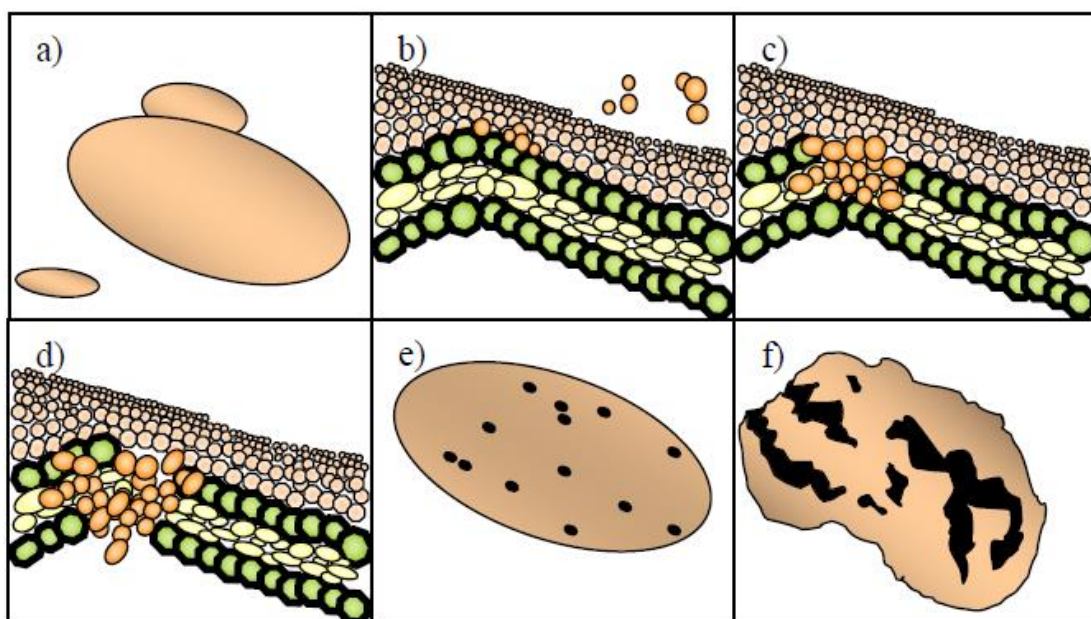
είτε από τη δημιουργία άλλων οξειδωτικών που παράγονται όπως ρίζες λιπαρών οξέων ή ρίζες υπεροξειδίου.

Στις πιο ζωτικές ουσίες του κυτταροπλάσματος, για την υποστήριξη της φυσιολογικής λειτουργίας των βακτηρίων, συγκαταλέγονται τα ένζυμα, τα οποία καταλύουν ευρεία ποικιλία χημικών αντιδράσεων στο κύτταρο. Κατά συνέπεια, η αδρανοποίηση των κυττάρων θα ήταν αποτέλεσμα της υποβάθμισης των ενδοκυτταρικών ενζύμων. Η μελέτη των Matsunaga et al. (1985) απέδειξε ότι η οξείδωση του συνένζυμου A ανέστειλε την αναπνευστική δραστηριότητα αποτελώντας έτσι τον κύριο μηχανισμό αδρανοποίησης στη φωτοκαταλυτική απολύμανση (Dalrymple et al., 2010, Pigeot-Rémy et al., 2011).

Εναλλακτικά, θα μπορούσε να επέλθει κυτταρικός θάνατος χωρίς να συνεπάγεται βλάβη στην επιφανειακή δομή. Σε μια τέτοια περίπτωση, πρωταρχικό λόγο για τον θάνατο και την αναστολή της ανάπτυξης του κυττάρου θα αποτελούσε η άμεση βλάβη στις ενδοκυτταρικές λειτουργίες. Σε αυτό το σενάριο μια ακραία περίπτωση θα ήταν η ακτινοβολία UV, στην οποία το υπεριώδες φως μικρού μήκους κύματος (που χρησιμοποιείται συνήθως στην απολύμανση νερού) προσβάλλει άμεσα το DNA/RNA, προκαλώντας απενεργοποίηση του DNA/RNA, κυρίως μέσω διμερισμού πυριμιδίνης και κατά συνέπεια αναστολής της ανάπτυξης κυττάρων (Oguma et al., 2001, Cho et al., 2010, Cutler & Zimmerman 2011, Long et al., 2015).



Εικόνα 3: Πιθανός φωτοκαταλυτικός μηχανισμός αδρανοποίησης βακτηρίων (Venkata et al., 2017).



Εικόνα 4: Βακτήρια που υποβάλλονται σε λύση κατά την απολύμανση με όζον. α) η κυτταρική μεμβράνη είναι η πρώτη που δέχεται επίθεση, β) το όζον προσβάλλει γλυκοπρωτεΐνες, γλυκολιπίδια ή ορισμένα αμινοξέα και επίσης δρα στις ομάδες σουλφυδριλίου ορισμένων ενζύμων, γ) η επίδραση του όζοντος στο κυτταρικό τοίχωμα αρχίζει να γίνεται εμφανής, δ) το βακτηριακό κύτταρο αρχίζει να διασπάται μετά από την επαφή με το όζον, ε) η κυτταρική μεμβράνη είναι διάτρητη κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας και τέλος στο στ) το κύτταρο διαλύεται ή πάσχει από κυτταρική λύση (Rojas-Valencia, 2011).

4. Βακτήρια

4.1 *Escherichia coli*

Η *Escherichia coli* (*E. coli*) είναι ένα αρνητικό κατά Gram βακτήριο, σε σχήμα ράβδου, προαιρετικά αναερόβιο και μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae. Η κοινή ονομασία του είδους που επικράτησε στα ελληνικά είναι η λέξη κολοβακτηρίδιο (Βενιέρη, 2005). Τα περισσότερα στελέχη αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα θερμόαιμων ζώων και εντοπίζονται στα κόπρανα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Είναι ένας προκαρυωτικός οργανισμός και χρησιμοποιείται ευρέως σε πλήθος μελετών. Συνήθως δεν είναι παθογόνο για τον άνθρωπο και αποτελεί μέρος της φυσιολογικής μικροβιακής χλωρίδας του εντέρου του. Αποτελεί τον πιο μελετημένο και καλύτερα κατανοητό μικροοργανισμό, λόγω της ανθεκτικότητάς του, της ευελιξίας του και της ευκολίας χειρισμού του (Diéguez-Casal et al., 2014). Μπορεί να επιβιώσει στο νερό για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Ανήκει στα κοπρωνώδη κολοβακτηριοειδή (Faecal coliforms, FC) και η παρουσία του στο νερό αποτελεί δείκτη πρόσφατης κοπρανώδους μόλυνσης, λόγω της διαθεσιμότητας απλών, προσιτών, γρήγορων και ευαίσθητων μεθόδων ανίχνευσης. Ακόμα, η παρουσία του μπορεί να υποδεικνύει την πιθανή παρουσία και άλλων παθογόνων, που μπορούν να προκαλέσουν ασθένειες. Οι πηγές των βακτηρίων *E. coli* συνήθως συνδέονται με απορρίψεις λυμάτων και χωρίζονται σε τρεις γενικές κατηγορίες: ανθρώπους, ζώα και φυτά (D Blount 2015, Khan & Gupta 2019).

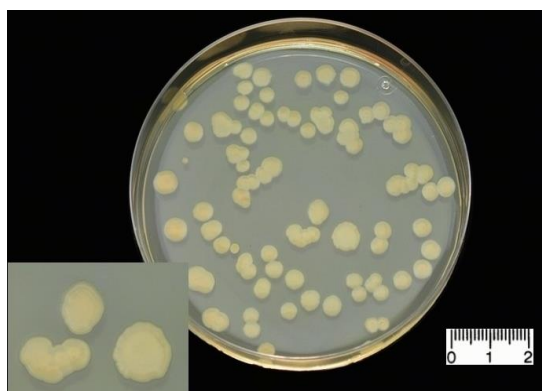
4.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) είναι μέλος της ομάδας των Pseudomonadaceae και είναι ένα αερόβιο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο. Ένα βασικό χαρακτηριστικό της, το οποίο συνδέεται σχεδόν με όλα τα είδη της (με κάποιες εξαιρέσεις βέβαια), είναι η έκκριση πυοκυανίνης, μιας κιτρινοπράσινη χρωστική αυτού του είδους (Σαζακλή 2005).

Βρίσκεται κυρίως στο χώμα, στο θαλασσινό νερό και στο πόσιμο νερό. Επίσης αποικίζει τα φυτά και τα θηλαστικά και συχνά βρίσκεται σε κλινικές. Η παρουσία της στο περιβάλλον είναι συνεχής, λόγω της εξαιρετικής προσαρμοστικότητάς της σε ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Είναι ένα ολιγαρκές βακτήριο, καθώς επιβιώνει για αρκετές ημέρες σε νερό χωρίς καθόλου ή με χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, όπως το απεσταγμένο νερό. Κύρια αιτία μόλυνσης στα νοσοκομεία αποτελεί η παραγωγή βιοφίλμ στα συστήματα διανομής νερού. Έχει την τάση να δημιουργεί βιοφίλμ στις επιφάνειες που εγκαθίσταται και έτσι γίνεται ανιχνεύσιμη στα συστήματα διανομής πόσιμου νερού.

Αποτελεί έναν ευκαιριακά παθογόνο μικροοργανισμό, ο οποίος μπορεί να προκαλέσει λοιμώξεις, αλλά σε υγιή άτομα σπάνια προκαλεί σοβαρές ασθένειες. Σχετίζεται κατά κύριο λόγο με ενδονοσοκομειακές λοιμώξεις και αποτελεί την κύρια αιτία ασθένειας σε ανοσοκατασταλμένα άτομα. Ακόμα αποτελεί εδραιωμένη αιτία λοιμώξεων του δέρματος, των αυτιών και των ματιών σε άτομα που κάνουν χρήση μολυσμένων νερών αναψυχής. Η ικανότητά της να προκαλεί ασθένειες είναι λόγω της συνεχής παρουσίας της, της τεράστιας ευελιξίας της και της ανοχής της σε πολλά απορρυπαντικά, απολυμαντικά και αντιμικροβιακές ενώσεις (Mena & Gerbab, 2009, Bédard E., Prévost M. & Déziel E., 2016, Schiavano et al., 2017).

Η *P. aeruginosa* αποτελεί δείκτη ποιότητας κολυμβητικών νερών, νερών βρύσης και νερών δικτύων (Sazakli et al., 2005). Ωστόσο η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης του βακτηρίου στο πόσιμο και στο εμφιαλωμένο νερό, μπορεί να σχετιστεί με τη δυσάρεστη γεύση, οσμή και θολότητα (WHO, 2008).



Εικόνα 5: Εμφάνιση και μορφολογία αποικιών της *P. aeruginosa* (microbiology pictures).

4.3 *Bacillus cereus*

Ο *Bacillus cereus* (*B. cereus*) είναι ένα θετικό κατά Gram, αερόβιο ή προαιρετικά αναερόβιο και σπορογόνο βακτήριο σε σχήμα ράβδου, με ευρεία διάδοση στο περιβάλλον. Απαντάται συχνά στο έδαφος, στη σκόνη, στα ιζήματα, στο νερό, στο γάλα, στο κρέας, στη γαστρεντερική οδό των θηλαστικών και στα φυτά. Αναπτύσσεται σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (4 έως 50°C) και είναι ανθεκτικό στη θερμότητα, στις χημικές επεξεργασίες και στην ακτινοβολία (Soni et al., 2016).

Η εξάπλωσή του σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης καθίσταται εύκολη, δεδομένου του σαπροφυτικού κύκλου ζωής του. Ο *B. cereus* ως το πιο γνωστό τροφιμογενές παθογόνο, μπορεί να προκαλέσει δύο διαφορετικούς τύπους γαστρεντερικών παθήσεων, που χαρακτηρίζονται από εμετό και διάρροια. Παράγει περισσότερες

από τέσσερις τοξίνες, οι οποίες σχετίζονται με τη διάρροια, ενώ ο εμετός με μία μόλις τοξίνη (Yu et al., 2020).

Εκτός από τροφιογενή δηλητηρίαση ο *B. cereus* συνδέεται και με άλλες δυνητικά θανατηφόρες λοιμώξεις (πνευμονία, οστεομυελίτιδα κ.α.), οι οποίες δεν σχετίζονται με το γαστρεντερικό σωλήνα, αλλά με ανοσοκαταστολή του ασθενούς. Ακόμα μπορεί να προκαλέσει λοίμωξη των οφθαλμών, μόλυνση της περιοχής του εγκεφάλου και της καρδιάς, μέχρι και σηψαιμία (Yu et al., 2020, Bottone, 2010).

Ο *B. cereus* μπορεί να θεωρηθεί κλώνος του *B. anthracis*, λόγω της γενετικής ομοιογένειας των δύο βακτηρίων και μπορεί το πρώτο να χρησιμοποιηθεί αντί του δεύτερου βακτηρίου. Ο *B. anthracis* αποτελεί ένα από τα πιο επικίνδυνα και παθογόνα βακτηριακά είδη, με επίμονη παρουσία του στο νερό, αποτελώντας σοβαρή δημόσια απειλή όταν εισέρχεται σε υδρόβια περιβάλλοντα (Venieri et al., 2013, Arnesen et al., 2008).

5. Σκοπός της Εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η αξιολόγηση και η μελέτη της αποτελεσματικότητας δύο επιλεγμένων τεχνικών απολύμανσης (οζόνωση, φωτοκατάλυση) στην αδρανοποίηση τριών βιοδεικτών μεγάλης σημασίας για τη δημόσια υγεία, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* που βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον.

Η εφαρμογή των δύο μεθόδων απολύμανσης είχε ως στόχο την παρατήρηση της σταδιακής μείωσης των πληθυσμών των βακτηρίων, ώστε να μελετηθεί η κινητική απολύμανσης της κάθε μεθόδου. Βάσει των κινητικών θα εξαχθεί συμπέρασμα για την καταλληλότητα/αποτελεσματικότητα της κάθε μεθόδου σε σχέση με τα συγκεκριμένα είδη των βακτηρίων (gram αρνητικά, gram θετικά). Γίνεται προσπάθεια σύγκρισης των δύο μεθόδων απολύμανσης, καθώς και εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών απολύμανσης, όπως είναι οι συγκεντρώσεις όζοντος και φωτοκαταλύτη $\text{TiO}_2\text{-P25}$ και η διάρκεια εφαρμογής της κάθε μεθόδου. Επιχειρείται να ελεγχθεί η φωτοενεργοποίηση των τριών βιοδεικτών μετά τη φωτοκατάλυση.

Τέλος, έγινε μελέτη των καταστροφών/αλλοιώσεων που προκλήθηκαν στα βακτήρια από τις μεθόδους απολύμανσης σε ενδοκυτταρικό επίπεδο, με σκοπό την κατανόηση των μηχανισμών αδρανοποίησης των βακτηριακών δεικτών. Κατά την αδρανοποίηση των κυττάρων, εξετάστηκαν συγκριτικά η απελευθέρωση των πρωτεϊνών, μέσω της μεθόδου Bradford και της ηλεκτροφόρησής τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS – PAGE), η υπεροξειδωση των λιπιδίων και η αλλαγή της διαπερατότητας της μεμβράνης, μέσω των μεθόδων TBARs και της υδρόλυσης του ONPG αντίστοιχα.

6. Υλικά και Μέθοδοι

Στο κεφάλαιο αυτό θα ακολουθήσει η περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας. Αυτή περιλαμβάνει την αναφορά των θρεπτικών υλικών, των χημικών υλικών, των διαλυμάτων, των μηχανημάτων και συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και τη συνολική πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε.

6.1 Υλικά

6.1.1 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Επωαστικός θάλαμος για τις καλλιέργειες βακτηρίων (Thermo Scientific Heraeus)
- Φυγόκεντρος (eppendorf)
- Ηλεκτρονικός ζυγός
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (TRADE Raypa)
- Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης
- Φασματοφωτόμετρο (Shimadzu)
- Φωτόμετρο - Αναγνώστης μικροπλακών (Labtech LT-400 Plate Reader)
- Λογισμικό Manta LML
- Λογισμικό UVibandmap – UVITEC Cambridge
- Ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (Adventurer OHAUS Balance)
- Aqua-Flo CD1B ozone generator
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Velp Scientifica)
- Υδατόλουτρο (GFL)
- Συσκευή υπερήχων για τη λύση των κυττάρων
- Στροβιλοποιητικός αναδευτήρας vortex
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

6.1.2 Αναλώσιμα

- Τρυβλία Petri για στερεές καλλιέργειες
- Αποστειρωμένοι πλαστικοί μικροβιολογικοί κρίκοι μιας χρήσης
- Πλαστικά ακρορύγχια (tips)
- Κωνικές φιάλες
- Πλαστικά σωληνάρια 1,5 ml και 2 ml (eppendorf)
- Πλαστικές κυψελίδες μιας χρήσης
- Κυψελίδα χαλαζία για τη μέτρηση οπτικής απορρόφησης
- Πλαστικοί σωλήνες πολυπροπυλενίου των 15 ml και 50 ml από (Falcon)
- Υάλινα σιφώνια των 5 και 10 ml
- Γυάλινοι σωλήνες
- Ογκομετρικοί κύλινδροι για τη μέτρηση υγρών

- Πλάκες μικρο-τιτλοποίησης (96 υποδοχών)
- Πιπέτες της errendorf για τη μετάγγιση υγρών από 1 μl έως 1 ml

6.1.3 Θρεπτικά υλικά

- Luria Bertani agar (LB agar)
- LB Broth

6.1.4 Χημικά υλικά

- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac)
- Ιωδιούχο κάλιο KI (Fluka)
- Θειοθειικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) κανονικότητας 0,1 N (Panreac)
- Οξικό οξύ (Glacial acetic acid) (Fluka)
- Θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric acid) συν. TBA (Sigma-Aldrich)
- Τριχλωροοξικό οξύ (Trichloroacetic acid) (Sigma-Aldrich)
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) (Riedel de Haen)
- Μεθανόλη (Honeywell)
- Αιθυλενο-διαμινο-τετρα-οξικό οξύ συν. EDTA (Sigma)
- Δωδεκυλοθειικό νάτριο συν. SDS (Sigma Aldrich)
- Ισοπροπανόλη (Merck)
- Λυσοζύμη (Sigma)
- Tris – (hydroxymethyl) – aminomethan συν. Trizma base (Merck)
- IsoPropyl-beta-D-1-ThioGalactopyranoside συν. IPTG (Sigma)
- Malondialdehyde συν. MDA (Sigma-Aldrich)
- Ortho-Nitrophenyl-β-Galactoside συν. ONPG (Sigma)
- Ammonium persulfate συν. APS (PanReac – Applichem)
- Tetramethylethylenediamine συν. TEMED (PanReac - Applichem)
- Ladder (Biolab)

6.1.5 Διαλύματα

- Χλωριούχο νάτριο NaCl 0,8% w/v
- Θειοθειικό νάτριο $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ κανονικότητας 0,1 N
- Ιωδιούχο κάλιο KI 2% w/v
- Διάλυμα SDS 10% w/v
- Διάλυμα TCA 10% w/v
- Διάλυμα TBA 0,67% w/v

6.1.6 Βακτηριακά στελέχη

Κατά την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα βακτηριακά στελέχη:

- *E. coli* DSM – 498
- *P. aeruginosa* (απομονωμένο στέλεχος από δείγμα θαλάσσιου νερού, το οποίο ταυτοποιήθηκε βιοχημικά με το σύστημα API®20NE-Biomérieux)
- *B. cereus* NCTC 2599

6.1.7 Καταλύτης

Στα φωτοκαταλυτικά πειράματα που διεξήχθησαν χρησιμοποιήθηκε ο καταλύτης:

- Εμπορικός καταλύτης TiO₂ (P25) της εταιρίας Degussa AG, που περιέχει κυρίως ανατάση σε κρυσταλλική μορφή (ανατάση/ ρουτίλιο = 80/20) μ' ένα μέσο μέγεθος σωματιδίων 20 – 30 nm. Η πυκνότητά του είναι ίση με 3,8 g/cm³ και η ειδική του επιφάνεια είναι περίπου 50 m²/g.

6.1.8 Φασματοφωτόμετρο

Η συγκέντρωση των μικροβιακών κυττάρων μέσα στο εναιώρημα υπολογιζόταν μέσω της μέτρησης της οπτικής πυκνότητας του εναιωρήματος στα 600 nm σε φασματοφωτόμετρο (Shimadzu UV 1240 spectrophotometer).

6.1.9 Λαμπτήρας φωτοκατάλυσης

Για τα πειράματα απολύμανσης που διεξάχθηκαν με χρήση ακτινοβολίας UV-A, χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ακτινοβολίας λάμπα 9 Watt (Radium Ralutec 9W/78). Η φασματική έξοδος του λαμπτήρα είναι από 350 έως περίπου 400 nm. Η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στον αντιδραστήρα στην υπεριώδη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος μετρήθηκε και βρέθηκε $2,63 \times 10^{-6}$ Einstein/(L x s). Χημικό ακτινόμετρο αποτέλεσε η ουσία 2-nitrobenzaldehyde, βάσει της οποίας πραγματοποιήθηκαν οι ακτινομετρικές μετρήσεις.

6.1.10 Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Χρησιμοποιήθηκε συσκευή κάθετης ηλεκτροφόρησης, omniPAGE Maxi, με πλάκες διαστάσεων 20 x 20 x 0,75 cm της Cleaver Scientific Ltd.

6.2 Πειραματική διαδικασία

Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι όλα τα υλικά, τα διαλύματα και τα σκεύη εργαστηριακού εξοπλισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια όλων των πειραμάτων, αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο στους 121°C για 30 min. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

6.2.1 Παρασκευή θρεπτικού υλικού

- Παρασκευή διαλύματος θρεπτικού υλικού για στερεή καλλιέργεια LB agar (μη εκλεκτικό), σύμφωνα με τις αναγραφόμενες ποσότητες στη συσκευασία.
- Ακολούθως απαιτείτο η αποστείρωσή του σε αυτόκαυστο σε πίεση 1,1 atm και θερμοκρασία 121°C για 30 min.
- Επίστρωση τρυβλίων με LB άγαρ και στερεοποίησή τους.
- Κατάλληλη συσκευασία των τρυβλίων, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο κίνδυνος επιμόλυνσής τους.
- Φύλαξη των τρυβλίων που περιείχαν το άγαρ στους 4 °C.

6.2.2 Παρασκευή εναιωρήματος

Τα πειράματα φωτοκατάλυσης και οζόνωσης έγιναν ξεχωριστά για τα τρία βακτήρια που επιλέχθηκαν. Πριν την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας ήταν απαραίτητη η προετοιμασία του χρησιμοποιούμενου κάθε φορά εναιωρήματος. Για το εναιώρημα, αποστειρωμένο διάλυμα 0,8% (w/v) NaCl με διαλύτη το απιονισμένο νερό επιμολυνόταν με ποσότητα του μικροοργανισμού που χρησιμοποιούνταν κάθε φορά. Ο εκάστοτε μικροοργανισμός προερχόταν από στερεή καλλιέργεια, στην οποία είχε χρησιμοποιηθεί στέλεχος φυλασσόμενο στους -80°C. Η παρασκευή δειγμάτων με συγκεκριμένη συγκέντρωση μικροοργανισμών έγινε βάσει της κλίμακας McFarland. Έτσι με την κατάλληλη βαθμονόμηση του φασματοφωτόμετρου, όταν η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 600 nm εμφανίζει τιμή 0,1, σύμφωνα με την κλίμακα McFarland η ισοδύναμη συγκέντρωση του μικροοργανισμού είναι περίπου $1,5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹.

Κατά την έναρξη των πειραμάτων αποικίες του εκάστοτε χρησιμοποιούμενου μικροοργανισμού ενυδατώνονται σε αποστειρωμένο διάλυμα 0,8% w/v NaCl, μέχρι να επιτευχθεί οπτική απορρόφηση 0,1 στα 600 nm, όπου η συγκέντρωση του μικροοργανισμού είναι περίπου 10^8 CFU mL⁻¹. Στη συνέχεια, για τα φωτοκαταλυτικά πειράματα 30 mL εναιωρήματος προστίθενται σε 270 mL αποστειρωμένου διαλύματος 0,8% w/v NaCl, με τελικό αποτέλεσμα 300 mL δείγματος και συγκέντρωση κυττάρων 10^7 CFU mL⁻¹, ενώ για τα πειράματα οζόνωσης χρησιμοποιήθηκαν 300 mL δείγματος/ εναιωρήματος με συγκέντρωση κυττάρων 10^8 CFU mL⁻¹.

6.2.3 Φωτοκατάλυση

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είχαν όλα την ίδια διάρκεια αυτή της 1h και όλα έγιναν παρουσία καταλύτη TiO₂. Ακόμα όλα είχαν την ίδια αρχική συγκέντρωση βακτηρίου 10^7 CFU mL⁻¹. Τα πειράματα διαφοροποιούνταν ως προς τη συγκέντρωση του καταλύτη.

- Τοποθέτηση 300 mL δείγματος σε δοχείο υπό ανάδευση.
- Προσθήκη του καταλύτη (η προστιθέμενη μάζα του διέφερε ανάλογα με τη συγκέντρωση του καταλύτη που ήταν επιθυμητό να χρησιμοποιηθεί στο εκάστοτε πείραμα).
- Προσρόφηση του καταλύτη για 20 min.
- Ενεργοποίηση της λάμπας.
- Λήψη δειγμάτων 2mL σε χρόνους 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 60 min.
- Διαδοχικές αραιώσεις των παραπάνω δειγμάτων και έλεγχος απενεργοποίησης των βακτηρίων, μέσω επίστρωσης σε θρεπτικό υλικό.
- Επώαση των τριβλίων σε επωαστικό θάλαμο ρυθμισμένο στους 37 °C για 20-24h.
- Καταμέτρηση των αποικιών.



Εικόνα 6: Πειραματική διάταξη φωτοκατάλυσης παρουσία ακτινοβολίας UVA.

6.2.4. Έλεγχος ως προς το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης

Ελέγχθηκε κατά πόσο τα πρότυπα βακτήρια, που εκτέθηκαν σε ακτινοβολία UVA παρουσία του εμπορικού καταλύτη P25, μπορούν να ανασυγκροτηθούν και να αρχίσει ξανά η ανάπτυξή τους με βάση το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης.

Ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα:

- Μετά το πέρας της φωτοκατάλυσης, 30 και 60 min αντίστοιχα για τα Gram αρνητικά και το Gram θετικό βακτήριο, το κάθε διάλυμα των 300 mL χωρίστηκε σε δύο ίσα μέρη και τοποθετήθηκε σε δύο κωνικές φιάλες.
- Η μία κωνική φιάλη τοποθετήθηκε κοντά στο παράθυρο, όπου η ακτινοβολία του ήλιου είναι έντονη, ενώ η άλλη τοποθετήθηκε στο σκοτάδι, απουσία φωτός.

- Κατόπιν 24 και 48 h έγινε λήψη και καλλιέργεια των διαλυμάτων και των δύο κωνικών, ώστε να ελεγχθεί το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης.

6.2.5 Οζόνωση

Κατά τη δοκιμή της οζόνωσης έγιναν τρία πειράματα για κάθε βακτήριο και η δόση του όζοντος διέφερε για το ίδιο βακτήριο και μεταξύ των τριών βακτηρίων. Η δόση που εφαρμόστηκε βρέθηκε μετά το πέρας του εκάστοτε πειράματος με βάση τις ακόλουθες πράξεις:

$$O_{3in} (mg/min) = \frac{mL Na_2S_2O_3 \cdot 0,1N \cdot 24}{t} \quad (25)$$

t: χρόνος σταθεροποίησης (min)

0,1 N: κανονικότητα

24: MBO₃/2

Flow rate: 2.36 L/min

$$Inlet[O_3](mg/L) = \frac{O_{3in}(mg/min)}{Flow\ rate} \quad (26)$$

Ομοίως υπολογίζεται το O_{3out} & $Outlet[O_3]$ (27)

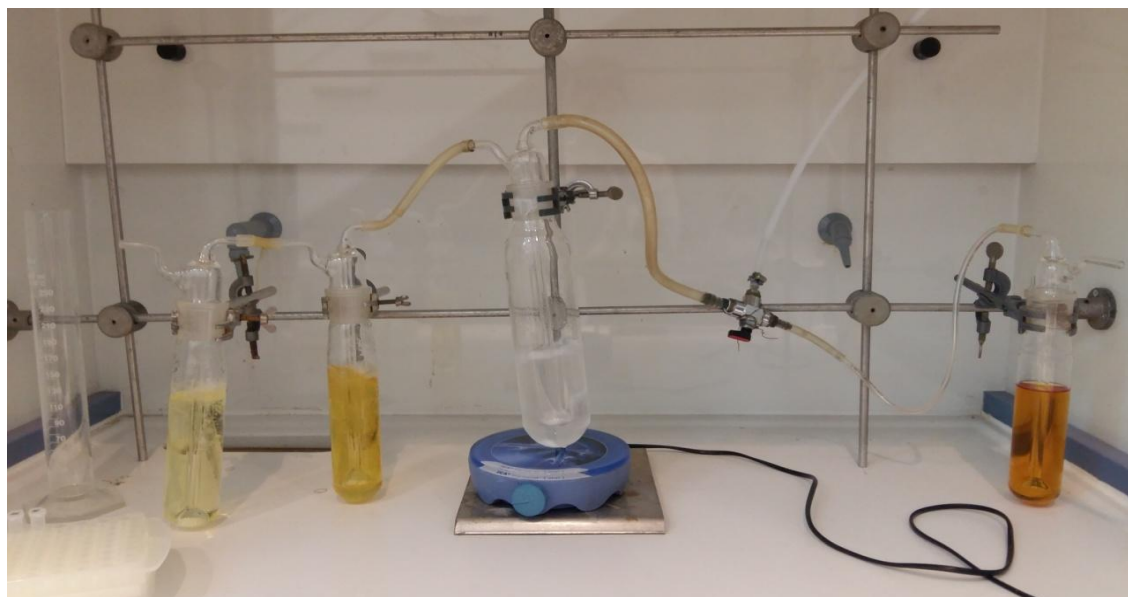
$$Applied\ ozone\ dose = \frac{(Inlet[O_3] - Outlet[O_3]) \cdot Flow\ rate \cdot contact\ time}{V_{sample}} \quad (28)$$

$$Applied\ ozone\ dose [mg/L]$$

Το όζον παρήχθη με παροχή ξηρού αέρα σε μια γεννήτρια όζοντος. Η παροχή του αέρα ήταν ρυθμισμένη στα 2,36 L/min. Η έξοδος του οζονιστήρα συνδεόταν με τον αντιδραστήρα της οζόνωσης μέσω σωληνώσεως τέφλον. Ο αντιδραστήρας οζονισμού ήταν γυάλινος και κυλινδρικός με όγκο 500 mL και ημισυνεχούς λειτουργίας. Το εναιώρημα εισαγόταν μέσα στον αντιδραστήρα κατά την έναρξη της λειτουργίας, ενώ η προσθήκη του όζοντος λάμβανε χώρα συνεχώς κατά τη διάρκεια του πειράματος μέσα από μία πέτρα διαχυτή. Το ρεύμα του όζοντος που εγκατέλειπε τον αντιδραστήρα παγιδευόταν σε δύο γυάλινες παγίδες που περιείχαν διάλυμα ιωδιούχου καλίου (KI) 2%. Πριν από κάθε πείραμα οζόνωσης, μετρούνταν ο ρυθμός εφαρμογής του όζοντος κατευθύνοντας τη ροή του όζοντος σε μία παγίδα ιωδιούχου καλίου για μια περίοδο 30 min.

Για να ξεκινήσει το πείραμα στρεφόταν η βαλβίδα προς την αντίθετη κατεύθυνση, έτσι ώστε η ροή του όζοντος να κατευθύνεται σε μία άλλη παγίδα ιωδιούχου καλίου μέχρι το πέρας του πειράματος. Όταν είχε ολοκληρωθεί το πείραμα γινόταν

τιτλοδότηση των δύο παγίδων με διάλυμα $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ κανονικότητας 0,1N, έτσι ώστε με κατάλληλες πράξεις να βρεθεί η εφαρμοσμένη δόση του όζοντος.



Εικόνα 7: Πειραματική διάταξη οζόνωσης.

Σε κάθε πείραμα οζόνωσης το βακτηριακό εναιώρημα που χρησιμοποιήθηκε έγινε σε διάλυμα NaCl 0,8% w/v. και περιείχε 10^8 CFU/mL από το κάθε στέλεχος. Ο όγκος του δείγματος ήταν 300 mL. Πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα οζόνωσης για καθένα στέλεχος, όπου διέφερε η εφαρμοσμένη δόση όζοντος μεταξύ του ίδιου βακτηρίου και μεταξύ των διαφορετικών βακτηρίων. Οι χρόνοι επαφής που μελετήθηκαν ήταν τα 0, 1, 3, 5, 8, 10, 15, 20 και 30 min. Όταν είχε επιτευχθεί ο επιθυμητός χρόνος επαφής διακοπτόταν η τροφοδοσία του όζοντος και παίρναμε δείγμα.

Προσδιορίζουμε την έξοδο της γεννήτριας όζοντος με πέρασμα του αέριου όζοντος μέσω μιας παγίδας ιωδιούχου καλίου. Κάθε παγίδα είναι μία φιάλη πλυσίματος αερίου που περιέχει ένα γνωστό όγκο (τουλάχιστον 200 mL) διαλύματος ιωδιούχου καλίου 2% w/v. Κατευθύνουμε αέριο όζον μέσα σ' αυτό το δοχείο αντίδρασης.

6.2.6 Προσδιορισμός της υπεροξειδωσής των λιπιδίων

Η μέθοδος βασίζεται στην αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBA) με αλδεϋδικά παράγωγα υπεροξειδωσής των λιπιδίων, όπως η μαλονδιαλδεϋδη (MDA), στους 100°C . Η MDA είναι παράγωγο της υπεροξειδωσής των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που περιέχουν περισσότερους από δύο διπλούς δεσμούς. Επειδή εκτός από την MDA, υπάρχουν και άλλα αλδεϋδικά παράγωγα υπεροξειδωσής στο κύτταρο που μπορεί να αντιδράσουν με το TBA, η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως μη εξειδικευμένη και υπολογίζει το σύνολο όλων των αλδεϋδικών παραγώγων (πρωτεϊνικών και μη πρωτεϊνικών) που εν συντομία καλούνται TBARS

(Ενώσεις αντιδρούσες με TBA, ή TBA reactive substances) (Zamora et al., 1997, Παπαποστόλου 2007).

Ως δείκτης για τη μέτρηση της υπεροξειδωσής των λιπιδίων χρησιμοποιείται ο σχηματισμός της μαλονδιαλδεΐδης (MDA). Η ποσοτικοποίησή της MDA έγινε βάσει την αντίδρασή της με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA) για το σχηματισμό ενός ροζ MDA – TBA προϊόντος προσθήκης.

- Την κάθε χρονική στιγμή γίνεται λήψη 1 mL δείγματος από το σύστημα απολύμανσης και αναμιγνύεται με 2 mL διαλύματος 10% (w/v) τριχλωροοξικού οξέος
- Για να απομακρυνθούν τα στερεά γίνεται φυγοκέντρηση στα 11.000 X g για 35 min
- Ακολουθεί και δεύτερη φυγοκέντρηση στις ίδιες στροφές για 20 min αυτή τη φορά, για να απομακρυνθούν πλήρως τα σωματίδια του καταλύτη, τα κύτταρα και οι κατακρημνισμένες πρωτεΐνες
- Προστίθενται στο υπερκείμενο υγρό 3 mL φρέσκου διαλύματος 0,67 % (w/v) TBA
- Τα δείγματα επωάζονται σε βραστό νερό 95°C για 10 min και αφήνονται να κρυώσουν σε θερμοκρασία δωματίου
- Τέλος, μετράται η απορρόφηση στα 532 nm με φασματοφωτόμετρο.

Οι τιμές του MDA δίνονται ως nanomoles MDA ανά mg (ξηρό βάρος, dry weight DW)) κυττάρων (Maness et al., 1999).

Πρότυπη καμπύλη:

Προετοιμάστηκε πρότυπο αποθεματικό διάλυμα MDA (1 mM) σε οξικό οξύ. Ζυγίστηκε ποσότητα MDA ίση με 31,35 mg και διαλύθηκε σε 100 mL διαλύτη. Από το stock διάλυμα MDA προετοιμάζονται οι συγκεντρώσεις 0,1, 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 mM. Το εύρος των συγκεντρώσεων που κατασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης ήταν από 0,1 μέχρι 1 mM. Ακολουθήθηκαν τα παραπάνω στάδια (Zeb & Ullah, 2016).

6.2.7 Μεταβολή διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης

Η μεταβολή διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης μπορεί να εκτιμηθεί από την έκταση της διείσδυσης του εξωκυτταρικού υποστρώματος στο κυτταρόπλασμα. Η μεταβολή της διαπερατότητας του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής απολύμανσης και της απολύμανσης με όζον εκτιμήθηκε με βάση τον ρυθμό υδρόλυσης ONPG. Το ONPG υπό την κατάλυση από το ενδοκυτταρικό ένζυμο β-D-galactosidase υδρολύεται σε D- galactosidase και ο-νιτροφαινόλη. Το τελευταίο προϊόν είναι κίτρινου χρώματος και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοφωτόμετρο στα 420 nm (Huang et al, 2000, Cho et al., 2010).

Για τη μέτρηση του ρυθμού υδρόλυσης του ONPG:

- Ποσότητα των 1,8 mL από το κάθε βακτηριακό δείγμα λαμβάνεται από το σύστημα απολύμανσης σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα και αναμιγνύεται με 0,2 mL διαλύματος ONPG (5 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/ άλατος (PBS)). Οι χρόνοι διέφεραν για κάθε βακτήριο, αλλά και για κάθε μέθοδο απολύμανσης. Για τα βακτήρια *E. coli* & *P. aeruginosa* οι χρόνοι λήψης δείγματος ήταν τα 0, 10, 20, 40, 60 min και 0, 3, 8, 15 min, αντίστοιχα και για τον *B. cereus* τα 0, 5, 10, 15, 20 και 0, 3, 10, 20, 30 min, για την φωτοκατάλυση και την οζόνωση, αντίστοιχα.
- Η καταλυτική αντίδραση της υδρόλυσης λαμβάνει χώρα στο υδατόλουτρο στους 37°C για 30 min.
- Αμέσως μετά το πέρας των 30 min λαμβάνονται 1,8 mL από το δείγμα και γίνεται προσθήκη 0,2 mL ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικού νατρίου/ διττανθρακικού νατρίου (pH 10,0) για να αποκτήσουμε τη μέγιστη απορρόφηση και για να τερματίσει η αντίδραση ενζύμου – υποστρώματος.
- Τέλος, μετράται η απορρόφηση του προϊόντος ο-νιτροφαινόλη (ONP) στα 420 nm με φασματοφωτόμετρο.

Ο ρυθμός υδρόλυσης του ONPG ορίζεται ως το προϊόν ONP (μmol) ανά mg ξηρού βάρους του κυττάρου ανά λεπτά.

Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε χρήση του νόμου Beer - Lambert,

$$A = \varepsilon \cdot I \cdot c \Rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon \cdot I} \quad (29)$$

Όπου,

A: η απορρόφηση του δείγματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος

ε : η μοριακή απορρόφηση (στην συγκεκριμένη περίπτωση $\varepsilon = 4500 \text{ (M cm)}^{-1}$)

I: το μήκος του δείγματος (πάχος κυψελίδας σε cm, $I = 1\text{cm}$)

c: η συγκέντρωση της διαλυμένης ουσίας (σε mole/L)

6.2.8 Μέτρηση συγκέντρωσης πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Έγινε χρήση του kit της Bio-Rad (Quick Start Bradford Protein Assay), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, για την ποσοτικοποίηση των πρωτεϊνών. Η μέθοδος Bradford αποτελεί μία φασματοφωτομετρική μέθοδο που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης σε ένα διάλυμα. Η αρχή της μεθόδου αυτής στηρίζεται στην ιδιότητα που έχει η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 να δεσμεύεται στα μόρια των πρωτεϊνών. Η χρωστική αυτή σε ελεύθερη κατάσταση

και κάτω από όξινες συνθήκες, απορροφά στα 465nm και εμφανίζει καστανό χρώμα. Το χρώμα της χρωστικής παρουσία πρωτεΐνης στο διάλυμα μεταβάλλεται από καστανό σε κυανό, λόγω της δημιουργίας συμπλόκου πρωτεΐνης – χρωστικής. Είναι αυτή η μπλε μορφή πρωτεΐνης-χρωστικής που ανιχνεύεται στα 595 nm, όπου και μετράται φωτομετρικά ή με αναγνώστη μικροπλακών. Η σχέση μεταξύ απορρόφησης και συγκέντρωσης πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί με τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης με τη χρήση δειγμάτων εγνωσμένης συγκέντρωσης πρωτεΐνης και είναι γραμμική. Ο προσδιορισμός αυτής της γραμμικής σχέσης καθιστά δυνατό τον προσδιορισμό της άγνωστης συγκέντρωσης της πρωτεΐνης στο διάλυμα, μέσω της μέτρησης της απορρόφησης του δείγματος στα 595 nm. Συγκεκριμένα, ποσότητες από 1,25 μ g έως 25 μ g αλβουμίνης του ορού βοός (Bovine Serum Albumine - BSA) διαλύθηκαν σε όγκο διαλύματος 0,8% NaCl σε αποστειρωμένο σωληνάριο. Οι ποσότητες αυτές δημιουργήθηκαν από stock διάλυμα της πρωτεΐνης BSA (2 mg/mL), κάνοντας τις αναγραφόμενες αραιώσεις. Κατόπιν, προστέθηκαν 150 μ L από το αντιδραστήριο της Bio-Rad και 150 μ L από το κάθε στάνταρ ή δείγμα, το μίγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και φωτομετρήθηκε στα 595 nm (Bradford 1976).

6.2.9 Λύση κυττάρων

Η λύση των κυττάρων και η απομόνωση των πρωτεϊνών έγινε με τον παρακάτω τρόπο: κατά την κάθε μέθοδο απολύμανσης γινόταν λήψη δείγματος σε επιθυμητά χρονικά διαστήματα, ακολουθούσε η επίστρωσή του σε τριβλία και η επώασή τους στους 37°C. Αποικίες από κάθε επιθυμητό χρόνο διαλύονταν σε ποσότητα LB υγρού θρεπτικού υλικού και ακολουθούσε η επώασή τους για 18 – 22 h στους 37°C. Από κάθε βακτηριακή καλλιέργεια προστέθηκαν 500 μ L σε 50 mL LB θρεπτικού υλικού υργής καλλιέργειας και ακολούθησε επώασή τους στους 37°C μέχρι η οπτική τους απορρόφηση στα 600 nm να φτάσει περίπου 0,5.

Κάθε βακτηριακή καλλιέργεια χωρίστηκε σε δύο μικρότερες καλλιέργειες των 25mL. Προστέθηκε IPTG (από 0,5 M διάλυμα stock σε νερό) σε μία από τις δύο καλλιέργειες, σε τελική συγκέντρωση 1mM, για την επαγωγή της έκφρασης των πρωτεϊνών. Ακολούθησε ανάπτυξη των υγρών καλλιεργειών στους 37°C για 3 h και 30 min και κατόπιν συλλέχθηκαν τα κύτταρα με φυγοκέντρηση στους 4°C για 5 min στα 12.000 g.

Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και τα κύτταρα διαλύονται σε 2mL ρυθμιστικού διαλύματος λύσης (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 200 mM NaCl και 1 mM EDTA) και αποθηκεύονται στον πάγο (μπορούν να φυλαχθούν στους -20°C), αφού πριν έχουν μεταφερθεί σε αποστειρωμένα γυάλινα φιαλίδια.

Τα κύτταρα αφήνονται να ξεπαγώσουν, κατόπιν προστίθεται λυσοζύμη σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL και επώάζονται για 20 με 30 min στον πάγο πριν την επεξεργασία με υπερήχους.

Χρήση υπερήχων:

Έγινε χρήση υπερήχων για τη θραύση της κυτταρικής μεμβράνης και την ομογενοποίηση του δείγματος. Τα δείγματα καθόλη τη διάρκεια διατηρούνται στον πάγο, ώστε να αποφευχθεί η μετουσίωση των πρωτεϊνών.

Διάλυμα μικρού όγκου (περίπου 2 mL): 15 s x 8 επαναλήψεις με ενδιάμεσα διαλείμματα 5 s.

Το ομογενοποιημένο διάλυμα κυττάρων φυγοκεντρείται στους 4°C για 20 min στις 12.000 g και διαχωρίζεται σε υπερκείμενο και κυτταρικό ίζημα.

Το υπερκείμενο υγρό συγκεντρώνεται σε νέο φιαλίδιο (erpendorf), ενώ το ίζημα διαλύεται σε ίσο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος λύσης.

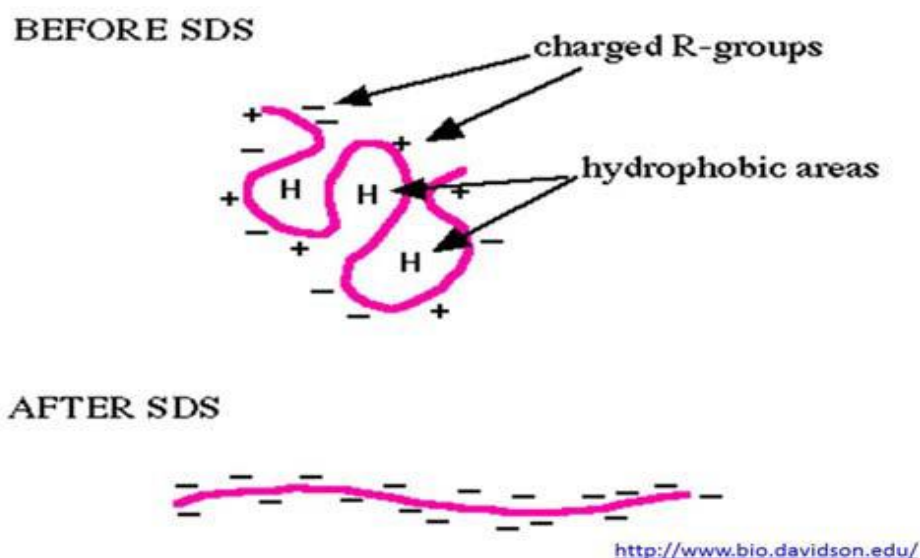
Προστίθεται σε κάθε δείγμα (και υπερκείμενο και ίζημα) 33% του συνολικού όγκου 4x sample buffer και τοποθετούνται για επώαση στους 100 °C για 5 min.

Τέλος, το πρωτεϊνικό κλάσμα λαμβάνεται φυγοκεντρώντας τα δείγματα για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου στις 13.000 g.

6.2.10 Ανάλυση πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE)

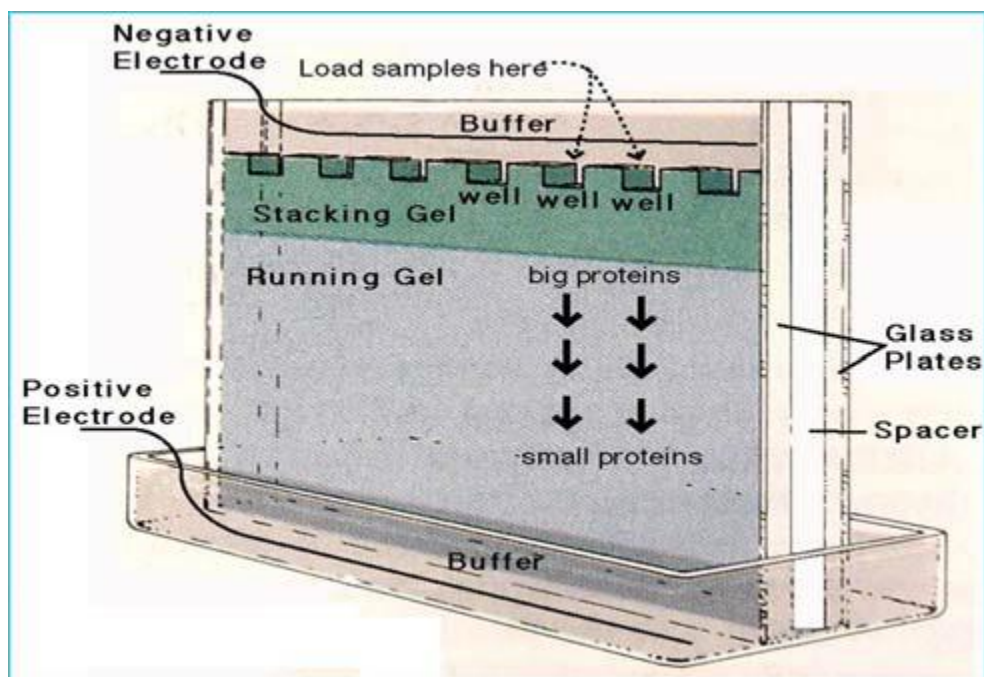
Η SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis) είναι σήμερα μία από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τον χαρακτηρισμό και την ανάλυση των πρωτεϊνών και έχει χρησιμοποιηθεί ως ταξονομικό εργαλείο για την αναγνώριση διαφόρων βακτηριακών ειδών και για την απόδοση πολύτιμων πληροφοριών για την ομοιότητα μεταξύ βακτηριακών καλλιεργειών (Elgaml et al., 2014). Ακόμα, αποτελεί μια γρήγορη και σχετικά απλή στην εφαρμογή μέθοδο, αξιόπιστη και με υψηλή διακριτική ικανότητα (Durrani et al., 2008). Βασική αρχή της μεθόδου της ηλεκτροφόρησης αποτελεί ο διαχωρισμός βιολογικών μορίων (πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων) ανάλογα με το μέγεθος και το φορτίο τους, καθώς αυτά κινούνται διαμέσου πορώδους υλικού εντός ηλεκτρικού πεδίου. Για τα πρωτεϊνικά δείγματα ο διαχωρισμός και η ταυτοποίησή τους γίνεται με βάση το μοριακό τους βάρος με ηλεκτροφόρηση σε κάθετη πηκτή πολυακρυλαμίδιου παρουσία SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Το SDS αποτελεί ισχυρό ανιονικό απορρυπαντικό που δεσμεύεται στις πρωτεΐνες και αποδιατάσσει τη δευτεροταγή δομή τους. Η αποδιάταξη των πρωτεϊνών οδηγεί στο σχηματισμό ενός ευθύγραμμου

μορίου το οποίο φέρει ισχυρό αρνητικό φορτίο. Έτσι είναι δυνατός ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών του δείγματος με βάση το μέγεθός τους (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Απεικόνιση του τι συμβαίνει σε μία πρωτεΐνη (ροζ γραμμή) όταν επώάζεται με το απορρυπαντικό SDS (Roy & Kumar, 2014).

Το σύστημα της ηλεκτροφόρησης είναι ασυνεχές. Παρασκευάζονται δύο διαφορετικές ζώνες πηκτώματος (separating gel, stacking gel) με διαφορετική σύσταση και πάχος. Αρχικά τα αρνητικά φορτισμένα δείγματα τοποθετούνται σε πηκτή χαμηλής περιεκτικότητας σε ακριλαμίδιο (πηκτή επιστοίβαξης) με pH 8,8 και στη συνέχεια περνούν και διαχωρίζονται σε πηκτή υψηλής περιεκτικότητας σε ακριλαμίδιο (πηκτή διαχωρισμού) με pH 6,8. Σε σύγκριση με τη γέλη στοίβαξης, η γέλη διαχωρισμού αποτελείται από μικρότερο μέγεθος πόρων και υψηλότερη συγκέντρωση άλατος και pH. Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορούνται πρωτεϊνικοί μάρτυρες γνωστών μοριακών βαρών. Το αποτέλεσμα της ηλεκτροφόρησης παρατηρείται μετά τη χρώση και τον αποχρωματισμό του πηκτώματος. Η χρώση πραγματοποιείται με τη βοήθεια διαλύματος που περιέχει χρωστική, όπως το Coomassie Brilliant blue R-250, η οποία προσδένεται στα πρωτεϊνικά μόρια, ενώ κατά τον αποχρωματισμό παρατηρούνται μπλε ζώνες στα σημεία που βρίσκονται οι πρωτεΐνες (Wu & Koiwa 2012, Roy & Kumar, 2014).



Εικόνα 9: Απεικόνιση συσκευής που χρησιμοποιείται για SDS PAGE.

Διαλύματα ηλεκτροφόρησης

- **Stock 30% Acrylamide Gel Solution**
- **4 x Resolving Gel Tris (1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,4% SDS)**

Διαλύονται 36,34 g Tris Base σε 110 mL dH₂O. Προστίθενται 8 mL από 10% SDS. Το pH ρυθμίζεται στο 8,8 με HCl και προστίθεται dH₂O σε τελικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **4 x Stacking Tris (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,4% SDS)**

Διαλύονται 12,12 g Tris Base σε 110 mL dH₂O. Προστίθενται 8 mL από 10% SDS. Το pH ρυθμίζεται στο 6,8 με HCl και προστίθεται dH₂O σε τελικό όγκο 200 mL. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 4 x (Stock 4 x Tris-glycine tank buffer – SDS)**

Διαλύονται 36 g Tris base και 172,8 g γλυκίνης σε 3 L dH₂O. Το διάλυμα διατηρείται στους 4°C.

- **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1 x (1 x Tris-glycine tank buffer – SDS)**

Σε 3 L dH₂O προστίθενται 750 mL διαλύματος ηλεκτροφόρησης 4 x και 30 mL 10% SDS.

- **Stock 4 x Sample Buffer**

Διαλύονται σε 20 mL γλυκερόλης, 4 g SDS, 10 mL διαλύματος Tris-HCl 1 M (pH=6,8), 0,1 g μπλε της βρωμοφαινόλης και 10 mL β-μερκαπτοαιθανόλης. Προστίθεται dH₂O σε τελικό όγκο 50 mL.

- **Separating Gel (12%)**

Πίνακας 1: Παρασκευή Separating Gel (12%)

d.H₂O	12,35 mL
4 x Resolving Tris Solution	8,8 mL
Acrylamide Bis-acrylamide (30%, 0,8% w/v)	14,1 mL
10% (w/v) ammonium persulfate	350 μL
TEMED	30 μL
Total	35,63 mL

Αναμιγνύουμε τα πρώτα τρία διαλύματα μεταξύ τους. Λίγο πριν γίνει η μετάγγιση του παραπάνω διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε 350 μL διαλύματος APS 10% και 30 μL TEMED ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και να σχηματιστεί η πηκτή εντός της συσκευής. Αναμιγνύουμε καλά αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων αέρα.

- **Stacking Gel (5%)**

Πίνακας 2: Παρασκευή Stacking Gel (5%)

d.H₂O	8,4 mL
4 x Stacking Gel Tris Solution	3,2 mL
30% Stock Acrylamide Solution	1,3 mL
10% (w/v) ammonium persulfate	97,5 μL
TEMED	18,4 μL
Total	13,02 mL

Αναμιγνύουμε τα πρώτα τρία διαλύματα μεταξύ τους. Λίγο πριν γίνει η μετάγγιση του παραπάνω διαλύματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης προσθέτουμε 97,5 μL διαλύματος APS 10% και 18,4 μL TEMED ώστε να γίνει ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου και να σχηματιστεί η πηκτή εντός της συσκευής. Αναμιγνύουμε καλά αποφεύγοντας τη δημιουργία φυσαλίδων αέρα.

- **Διάλυμα χρώσης (Staining buffer)**
0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
10% (v/v) Acetic acid
50% (v/v) Methanol
- **Διάλυμα αποχρωματισμού (Destaining buffer)**
10% (v/v) Acetic acid
50% (v/v) Methanol

6.2.10.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου

Συναρμολογούνται τα δύο γυάλινα τμήματα της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα 12% για το διαχωρισμό (Separating Gel) και τοποθετείται μεταξύ των δύο γυάλινων επιφανειών της συσκευής μέχρι πλήρωσης του 60% του όγκου που δέχονται. Έπειτα προστίθεται ισοπροπανόλη (1 mL). Όταν πήξει το μίγμα (απαιτούνται 20 με 30 min), απομακρύνεται η ισοπροπανόλη και η επιφάνεια του πηκτώματος στεγνώνει καλά. Έπειτα παρασκευάζεται το stacking gel, με το οποίο πληρώνεται ο χώρος μεταξύ των δύο επιφανειών και στην άκρη του τοποθετείται η υποδοχή για το σχηματισμό των πηγαδιών φόρτωσης των δειγμάτων. Όταν το πήκτωμα πολυμεριστεί, τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης (περιέχει ήδη όγκο διαλύματος 1 x Tris glycine που καλύπτει την υποδοχή), όπου και αφαιρείται η πλαστική οδοντωτή μήτρα που βοήθησε στο σχηματισμό των πηγαδιών. Φορτώνονται 30 μ L από κάθε δείγμα στα πηγάδια φόρτωσης. Η συσκευή πληρώνεται με 1 x διάλυμα Tris Glycine, μέχρι τον μέγιστο αναγραφόμενο όγκο της συσκευής.

6.2.10.2 Παρασκευή δειγμάτων

Για την παρασκευή των δειγμάτων χρησιμοποιείται 4 x διάλυμα (Laemmli buffer) σε αναλογία 1:3. Για να επιτευχθεί πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών τα δείγματα επωάζονται στους 100°C για 5 min και έπειτα δείγμα κατάλληλου όγκου (30 μ L) φορτώνεται στο πήκτωμα. Αν κάποια από τις 24 θέσεις φόρτωσης δειγμάτων που διαθέτει η συσκευή μείνει κενή, πληρώνεται με 30 μ L 4 x διάλυμα φόρτωσης (Laemmli buffer). Επιπλέον για να μπορεί να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος των δειγμάτων προστίθενται μάρτυρες γνωστού μοριακού βάρους. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά σε τάση 100 V μέχρι τα δείγματα να περάσουν στη ζώνη διαχωρισμού, όπου και αλλάζει η τάση σε 200 V έως ότου το μέτωπο της χρωστικής διατρέξει όλο το μήκος του πηκτώματος (Laemmli 1970).

6.2.11 Παρατήρηση πηκτώματος έπειτα από την ηλεκτροφόρηση

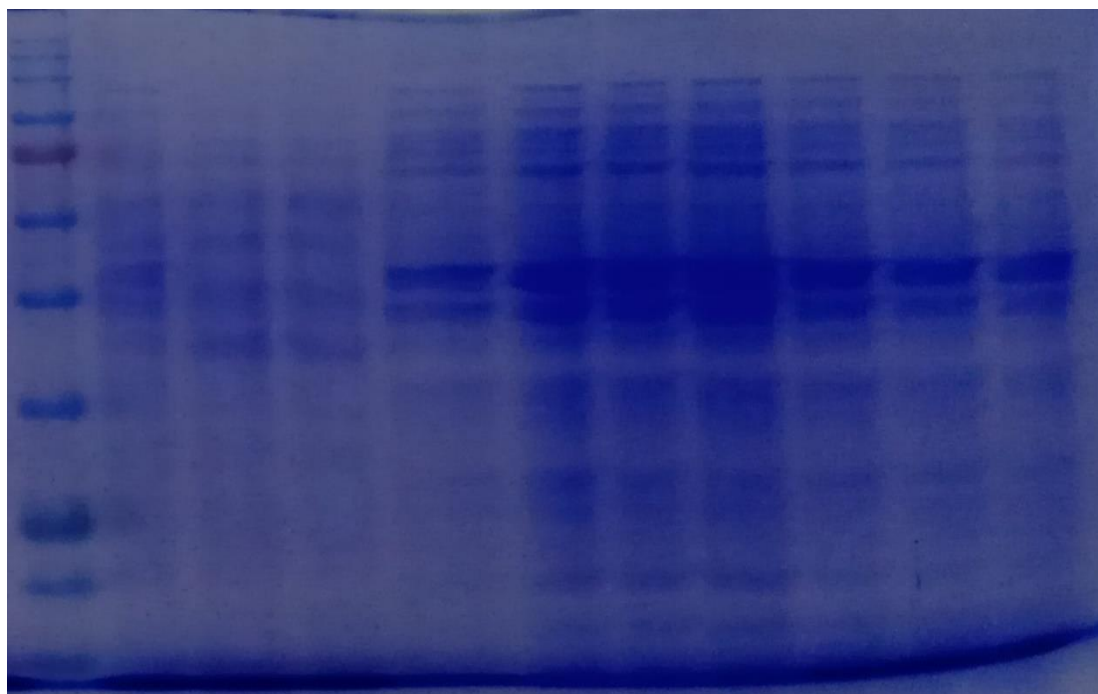
6.2.11.1 Βαφή με Coomassie Brilliant Blue (CBB) R-250

Η αρχή αυτής της μεθόδου στηρίζεται στη δημιουργία συμπλόκου χρώματος κυανού, μεταξύ των πρωτεϊνών και της χρωστικής CBB R-250.

Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, για να δημιουργηθεί το σύμπλοκο, η πηκτή μεταφέρεται σε πλαστικό δοχείο και εμβαπτίζεται στο διάλυμα χρώσης. Με το διάλυμα αυτό γίνεται συγχρόνως και στερέωση των πρωτεϊνικών ζωνών στην πηκτή. Για τη χρώση γίνεται επώαση της πηκτής για περίπου 1 h υπό ανάδευση. Ακολούθως η πηκτή αποχρωματίζεται. Αρχικά γίνεται έκπλυση της πηκτής με νερό και εφόσον απομακρυνθεί η περίσσεια χρωστικής ακολουθούν συνεχόμενες εκπλύσεις με διάλυμα αποχρωματισμού για αρκετές ώρες. Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανίχνευση μέχρι και 0,1 µg πρωτεΐνης.

6.2.11.2 Αξιολόγηση των αποτελεσμάτων της SDS – PAGE

Τα πρωτεϊνικά ηλεκτροφορητικά μοτίβα φωτογραφίζονται με σύστημα UniTecCambridge και αναλύονται με το λογισμικό UVIbandmap (UVITEC Cambridge), που ανέλυε τον δυαδικό κώδικα και δημιουργούσε δενδρογράμματα βασισμένα στο συντελεστή Dice και στη μέθοδο ομαδοποίησης UPGMA (unweighted – pair group method with arithmetic mean).



Εικόνα 10: Χρώση πηκτής με coomassie blue. Διακρίνονται αριστερά ο μοριακός μάρτυρας βάρους (1) και 10 πειραματικά δείγματα.

6.2.12 Μέτρηση της έντασης της πηγής φωτός

6.2.12.1 Ακτινομετρία UVA

Είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε την ένταση της εργαστηριακής πηγής φωτός τουλάχιστον σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, για να μπορεί να γίνει σύγκριση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Η χημική ακτινομετρία αποτελεί έναν τρόπο για τον προσδιορισμό της έντασης του φωτός. Η μέτρηση της έντασης της πηγής φωτός σε ένα καθορισμένο μήκος κύματος γίνεται με τη χρήση της αντίδρασης μιας ένωσης με το φως. Το ακτινόμετρο συνήθως χρησιμοποιείται ως διάλυμα που περιέχει μία χημική ένωση, που υφίσταται μία συγκεκριμένη συγκεκριμένη χημική αντίδραση, ως αποτέλεσμα απορρόφησης φωτονίων. Ο ρυθμός με τον οποίο αυτή η αντίδραση λαμβάνει χώρα, σχετίζεται με τον ρυθμό απορρόφησης των φωτονίων από το ακτινόμετρο. Η έκταση της αντίδρασης ως συνάρτηση του χρόνου μπορεί να μετρηθεί με κοινές αναλυτικές τεχνικές και ο προκύπτων ρυθμός απώλειας του αντιδραστήριου μπορεί να μετατραπεί σε ένταση φωτός. Οι ακτινομετρικές μετρήσεις πραγματοποιούνται με ραδιομετρία ή φασματοσκοπία. Αν η ακτινομετρία χρησιμοποιηθεί για τη μέτρηση ακτινοβολίας θα πρέπει να γίνει βαθμονόμηση των οργάνων με πρότυπες πηγές φωτισμού. Η βαθμονόμηση αυτή θα πρέπει να πραγματοποιείται σε τακτική βάση. Το ιδανικό χημικό ακτινόμετρο θα πρέπει να εμφανίζει κάποια χαρακτηριστικά, όπως θερμική σταθερότητα, σχετικά απλή (και κατανοητή) φωτοχημεία σε ένα ευρύ φάσμα μηκών κύματος, εύκολη ανάλυση και να μην επηρεάζεται από τα φωτοπροϊόντα του. Η 2-νιτροβενζαλδεΰδη (2NB) ταιριάζει σε αυτήν την περιγραφή, καθώς είναι ένα γρήγορο, απλό ακτινόμετρο που υφίσταται ενδομοριακό φωτοϊσομερισμός για να παράγει κυρίως 2-νιτροβενζοϊκό οξύ (Kristine et al., 2000, Allen et al., 2000, Galbavy et al., 2009).

- Για τη βαθμονόμηση του οργάνου

Φτιάχνεται ένα stock διάλυμα 2-νιτρο-βενζαλδεΰδης 100 mL με συγκέντρωση 100 mg/L. Το stock διάλυμα προετοιμάστηκε σε 60 mL ακετονιτρίλιο και 40 mL υπερκάθαρο νερό, όπου έγινε προσθήκη 10 mg της 2-νιτρο-βενζαλδεΰδης. Χρησιμοποιώντας διαφορετικούς όγκους από το stock διάλυμα δημιουργήθηκαν άλλα stock διαλύματα γνωστής συγκέντρωσης. Σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας τοποθετούνται εις διπλούν ποσότητες από τα stock διαλύματα, όπου και αναλύονται στα 258 nm.

- Για την καμπύλη βαθμονόμησης

Σχεδιάζεται η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης των stock διαλυμάτων σε σχέση με το μέσο όρο των δύο τιμών απορρόφησης που έχουν προκύψει από την ανάλυση με το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας. Βρίσκεται η εξίσωση της ευθείας και ο συντελεστής R^2 με τη βοήθεια του excel.

- Για τα πειράματα φωτόλυσης

Προετοιμάστηκε διάλυμα 2-νιτρο-βενζαλδεΐδης συγκέντρωσης 500mg/L σε υπερκάρθαιο νερό και αποθηκεύτηκε στο σκοτάδι. Έτσι σε μία ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε 1g της ουσίας και υπερκάρθαιο νερό μέχρι πλήρωσης όγκου 2L. Ποσότητα από το διάλυμα της νιτροβενζαλδεΐδης (300 mL) τοποθετείται στον αντιδραστήρα και πριν ξεκινήσει η ακτινοβολήση ($t=0$) λαμβάνεται δείγμα. Στη συνέχεια τίθεται σε λειτουργία η λάμπα λαμβάνοντας δείγματα σε διάφορα χρονικά διαστήματα. Τα δείγματα που λαμβάνονται ανά τα χρονικά διαστήματα αραιώνονται με υπερκάρθαιο νερό (1:10), τοποθετούνται στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας και αναλύονται. Το πείραμα πραγματοποιήθηκε εις τριπλούν.

- Για την επεξεργασία των πειραμάτων

Με βάση τα αποτελέσματα της απορρόφησης που λάβαμε από την HPLC για κάθε δείγμα και την πρότυπη καμπύλη, βρίσκεται η συγκέντρωση της ουσίας (mol/L). Σχεδιάζεται η γραφική παράσταση της συγκέντρωσης νιτροβενζαλδεΐδης του κάθε δείγματος (mol/L) σε σχέση με το χρόνο (σε s). Με τη βοήθεια του excel βρίσκουμε την εξίσωση της ευθείας και το συντελεστή R^2 . Για να βρεθεί η ένταση του φωτός χρησιμοποιείται η σχέση $I_0 = k_0 / \phi$ με μονάδες [mol/(L*s)], όπου ϕ η κβαντική απόδοση της νιτροβενζαλδεΐδης και ισούται με 0,5 και k_0 ισούται με το συντελεστή a της εξίσωσης της ευθείας $y = ax+b$.

7. Αποτελέσματα – Συζήτηση

7.1 Αποτελέσματα απολυμαντικών μεθόδων

7.1.1 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA - Επίδραση συγκέντρωσης του καταλύτη

Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, όπου εξετάστηκε η ικανότητα του εμπορικού καταλύτη (P25) να αδρανοποιεί βακτηριακά στελέχη σε υδατικό διάλυμα υπό την επίδραση της ακτινοβολίας UVA. Πιο συγκεκριμένα, στα πειράματα αυτά ελέγχθηκαν οι παράμετροι της συγκέντρωσης του καταλύτη TiO_2 και το είδος του βακτηριακού στελέχους. Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά τα αποτελέσματα.

Αρχικά εξετάστηκε η αδρανοποίηση των μικροοργανισμών υπό την επίδραση της ακτινοβολίας UVA και απουσία καταλύτη. Κατά τα πειράματα αυτά της φωτόλυσης του χλωριούχου νατρίου NaCl 0,8% (w/v) επιμολυσμένου με το εκάστοτε βακτήριο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπάρχει σημαντική μείωση της αρχικής βακτηριακής συγκέντρωσης, αφού αυτή μειώνεται κατά δύο τάξεις μεγέθους μετά από 1 ώρα επεξεργασίας. Αυτό αποτελεί διαπίστωση του ότι η συνεργιστική δράση της ακτινοβολίας UVA με την προσρόφηση του καταλύτη οδήγησε στην αδρανοποίηση των τριών μικροοργανισμών.

Πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων υπό την επίδραση της ακτινοβολίας UVA. Στα πειράματα αυτά ελέγχθηκε η συγκέντρωση του χρησιμοποιούμενου καταλύτη TiO_2 που είχε εύρος 25 – 100 mg/L. Τα πειράματα αυτά έγιναν με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του καταλύτη στην αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας και να επιλεγεί η βέλτιστη. Ο εμπορικός καταλύτης P25 είναι ευρέως γνωστός με πολλές εφαρμογές, καθώς είναι υψηλά φωτοενεργός, λόγω της αργής επανασύνδεσης του ζεύγους ηλεκτρονίου-οπής (Suri et al., 2012). Για τα Gram αρνητικά βακτήρια (*E. coli*, *P. aeruginosa*) χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 25 και 50 mg/L καταλύτη, ενώ για το *B. cereus* ελέγχθηκαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις καταλύτη, αυτές των 50 και 100 mg/L. Ο *B. cereus* ως ένα θετικό κατά Gram βακτήριο είναι πιο ανθεκτικό, λόγω της διαφορετικής δομής του, και έτσι κρίθηκε σκόπιμο να γίνει χρήση παρόμοιων ή πιο υψηλών συγκεντρώσεων καταλύτη σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούνται συνήθως για άλλα βακτήρια.

Όπως παρατηρείται (Εικόνα 11) η αρχική συγκέντρωση του πληθυσμού της *E. coli* (10^7 CFU/mL) φαίνεται ότι μειώνεται με ρυθμό 3-Logs και 5-Logs μετά από 15 min επεξεργασίας με συγκέντρωση καταλύτη 25 mg/L και 50 mg/L αντίστοιχα. Στην παρούσα εργασία τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι η απόδοση της διεργασίας αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη στο δείγμα,

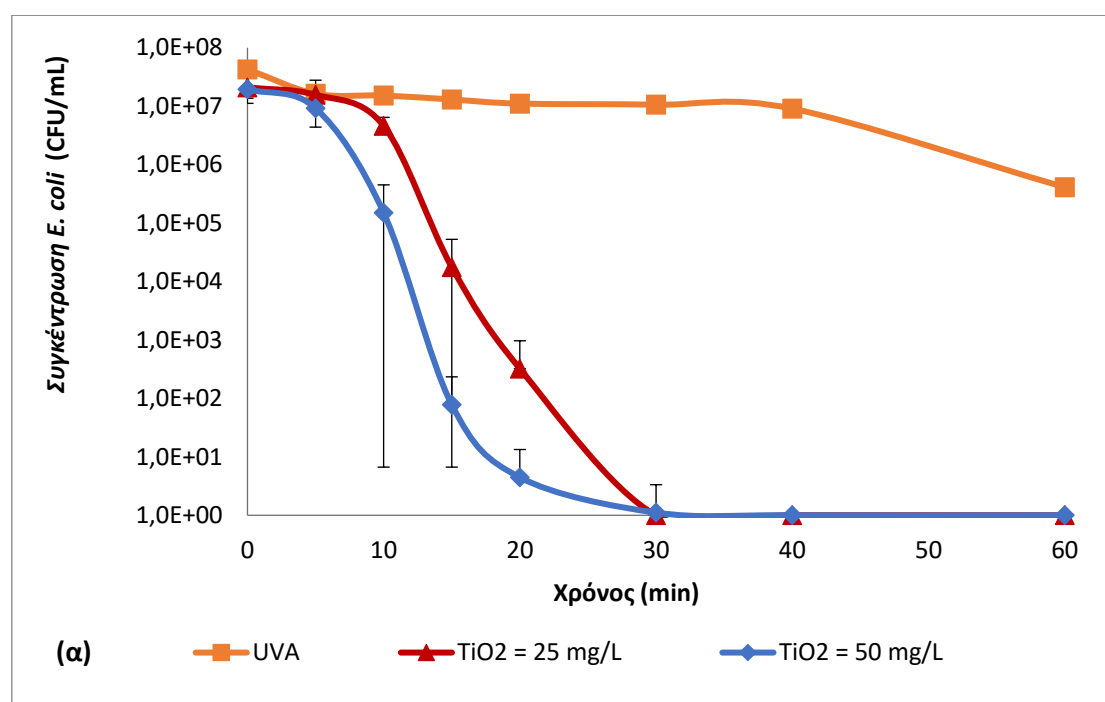
δηλαδή συγκέντρωση καταλύτη 50 mg/L οδήγησε σε καλύτερο ρυθμό αδρανοποίησης της *E. coli*. Ωστόσο, παρατηρείται ακόμα μεγαλύτερη μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου στη διάρκεια της επεξεργασίας, επιτυγχάνοντας 100% μείωση του πληθυσμού μετά το πέρας των 30 min.

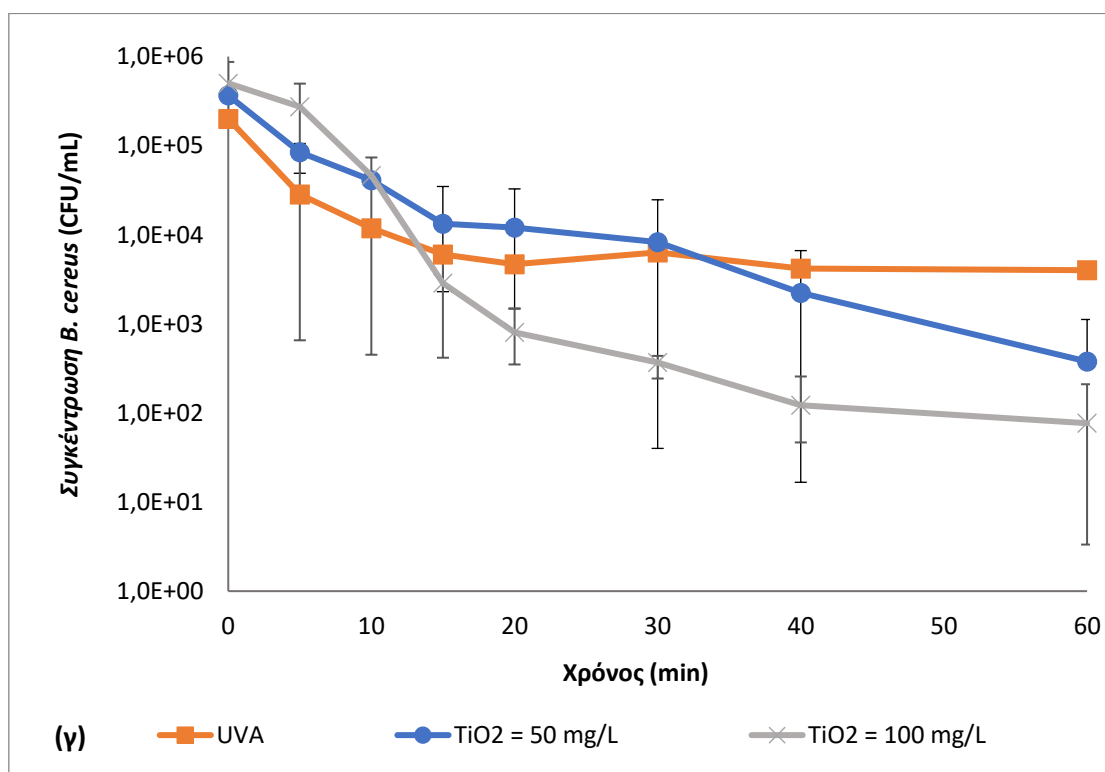
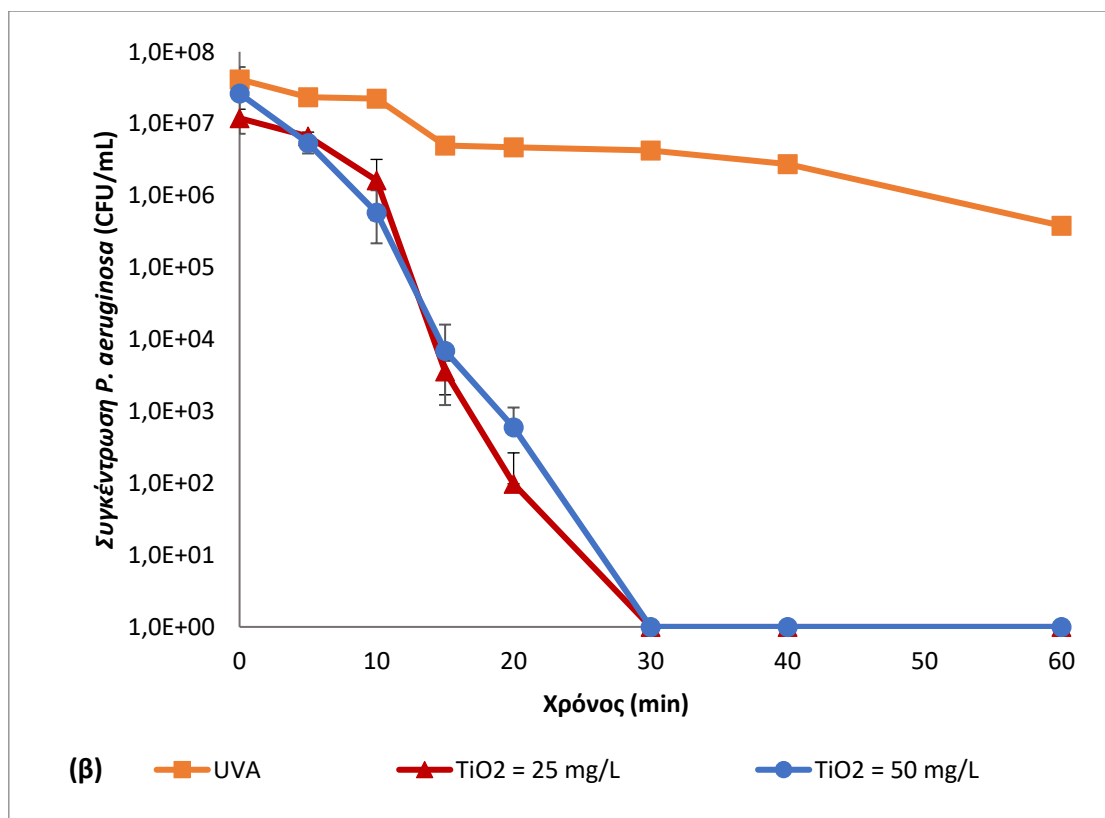
Οι συγκεντρώσεις του εμπορικού καταλύτη P25 που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα που εκτελέστηκαν με την *P. aeruginosa*, ήταν αντίστοιχες με αυτές της *E. coli* (25 mg/L & 50 mg/L). Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρείται μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου περίπου 5-Logs μετά από 20 min και για τις δύο συγκεντρώσεις καταλύτη. Ωστόσο κι εδώ το βακτήριο αδρανοποιείται πλήρως μετά από 30 min επεξεργασίας, δηλαδή μειώνεται 7 τάξεις μεγέθους.

Αντίθετα για τον *B. cereus*, ως ένα περισσότερο ανθεκτικό βακτήριο, επιλέχθηκε μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλύτη (50 mg/L & 100 mg/L) και μειωμένη αρχική συγκέντρωση του βακτηρίου στο εναιώρημα (10^5 CFU/mL). Παρατηρώντας το διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω είναι εμφανές ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης του καταλύτη, όπως και στις προηγούμενες περιπτώσεις, επιτυγχάνονται μικρότερα ποσοστά επιβίωσης του βακτηρίου και συνεπώς βελτίωση της απολυμαντικής δράσης του καταλύτη. Η συγκέντρωση των 50 mg/L επέφερε 99,8% μείωση του αρχικού πληθυσμού του βακτηρίου σε χρονική διάρκεια 1 h, ενώ η συγκέντρωση των 100 mg/L στο ίδιο χρονικό διάστημα κατάφερε να αδρανοποιήσει το βακτήριο σε ποσοστό 99,9%. Παρόλο που το βακτήριο δεν απενεργοποιείται σε ποσοστό 100% το αποτέλεσμα της απολύμανσης κρίνεται αρκετά ικανοποιητικό.

Η αύξηση της φόρτισης του καταλύτη επιφέρει ταυτόχρονη αύξηση και του ρυθμού αδρανοποίησης των βακτηρίων, υποδεικνύοντας έτσι ότι με την προσθήκη περισσότερων σωματιδίων TiO_2 στο εναιώρημα ενισχύεται ο αριθμός των φωτοενεργών θέσεων. Γενικά, η αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη από ένα σημείο και μετά οδηγεί σε συσσωμάτωση των σωματιδίων TiO_2 , μειώνοντας τα επιφανειακά ενεργά κέντρα και σε μειωμένη διείσδυση του φωτός μέσα στο εναιώρημα, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της επεξεργασίας (Suri et al., 2012). Η καταγραφή συγκεντρώσεων καταλύτη κοντά στα 100 mg/L θεωρείται ως βέλτιστη σε πλήθος εργασιών (Malato et al., 2009; Vijay et al., 2013; Rizzo et al., 2014). Οι Cho & Yoon, χρησιμοποίησαν τις συγκεντρώσεις 0,1, 0,5 & 1 g/L του καταλύτη TiO_2 για την αδρανοποίηση του πρωτοζώου *Cryptosporidium parvum* και των σπορίων του *Bacillus subtilis* (Cho & Yoon, 2008). Στην έρευνα των Rincón & Pulgarin το *E.coli* μειώθηκε σε μη ανιχνεύσιμο επίπεδο μέσα σε 2,5 h, υπό την παρουσία ηλιακού φωτός και TiO_2 καταλύτη σε συγκέντρωση 0,02 g/L (Rincón & Pulgarin. Σε άλλη έρευνα που έγινε για τα βακτήρια *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* και *E. cloacae*, η χρήση ακτινοβολίας UVA παρουσία καταλύτη TiO_2 (P25) συγκέντρωσης 0,1 g/L, επέφερε μείωση σε ποσοστό πάνω από 99,9% και στα

τέσσερα βακτήρια σε διάρκεια επεξεργασίας 40 min (Ibáñez et al., 2003). Οι Van Grieken et al., μελέτησαν τη συμπεριφορά των *E. coli* και *E. faecalis* τόσο σε απιονισμένο νερό, όσο και σε προσομειωμένο απόβλητο, κατά τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία με συγκεντρώσεις TiO_2 0,05, 0,1 & 0,2 g/L. Και τα δύο είδη μικροοργανισμών φαίνεται να παρουσιάζουν παρόμοια προφίλ αδρανοποίησης παρά τις διαφορές στη μορφολογία, τη χημική σύνθεση, το φορτίο ή την υδροφοβία της εξωτερικής κυτταρικής δομής τους (Van Grieken et al., 2010). Ακόμα σε μια μελέτη ερευνήθηκε η αδρανοποίηση των *E. coli*, *P. aeruginosa* και *B. cereus* υπό την επίδραση προσομειωμένης ηλιακής ακτινοβολίας με χρήση του εμπορικού καταλύτη P25 αλλά και καταλυτών ενισχυμένων με άζωτο. Οι συγκεντρώσεις του καταλύτη που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50 & 100 για τα *E. coli* και *B. cereus* και 25 & 50mg/L για την *P. aeruginosa* (Makropoulou et al., 2019).





Εικόνα 11: Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων του καταλύτη TiO₂ (25 mg/L – 100 mg/L) στη μικροβιακή αδρανοποίηση κατόπιν έκθεσης σε UVA ακτινοβολία. Αρχική συγκέντρωση βακτηρίων 10⁷ CFU/mL.

7.1.2 Επίδραση του είδους του βακτηρίου

Η δομή των βακτηρίων που εξετάζονται επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα της μελέτης. Το συμπέρασμα που εξάγεται είναι ότι κατά τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία το θετικό κατά gram βακτήριο *B. cereus* είναι πολύ πιο ανθεκτικό συγκριτικά με τα αρνητικά κατά gram βακτήρια *E. coli* και *P. aeruginosa*.

Ο μηχανισμός απενεργοποίησης των βακτηρίων μέσω της φωτοκατάλυσης με TiO_2 εξηγείται με τον ακόλουθο τρόπο. Η πρώτη οξειδωτική καταστροφή γίνεται στο κυτταρικό τοίχωμα όταν τα σωματίδια του καταλύτη έρχονται σε επαφή με τα ανέπαφα κύτταρα. Τα κύτταρα παραμένουν ζωντανά παρόλο που το κυτταρικό τοίχωμα έχει υποστεί καταστροφή. Η επόμενη καταστροφή γίνεται στην μεμβράνη, όπου λόγω της φωτοκαταλυτικής δράσης σταδιακά αυξάνεται η διαπερατότητά της, ελευθερώνεται το εσωτερικό περιεχόμενο του κυττάρου και τελικά επέρχεται λύση και θάνατος (Vijay et al., 2013).

Η αποτελεσματικότητα της φωτοκαταλυτικής αδρανοποίησης θεωρείται ότι οφείλεται στη διαφορετική δομή του κυτταρικού τοιχώματος των δύο ειδών βακτηρίων. Συγκεκριμένα, τα Gram-θετικά βακτήρια έχουν παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα πεπτιδογλυκάνης από τα Gram-αρνητικά, όμως τα τελευταία έχουν μια επιπλέον εξωτερική μεμβράνη, η οποία περιέχει λιπίδια, καθιστώντας τη δομή τους περισσότερο πολύπλοκη. Παρόλο την πολυπλοκότητα της δομής των Gram-αρνητικών βακτηρίων, αυτά αποκρίνονται καλύτερα στην φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση. Το λεπτότερο τοίχωμά τους παρέχει λιγότερη προστασία έναντι των οξειδωτικών ειδών. Οι ελεύθερες δραστικές ρίζες που παράγονται από την φωτοκαταλυτική διαδικασία, μπορούν να απορροφηθούν από το παχύ στρώμα πεπτιδογλυκάνης των Gram-θετικών βακτηρίων, αποτελώντας ένα φυσικό εμπόδιο, περιορίζοντας έτσι κάποια θανατηφόρα βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη και στα εσωτερικά οργάνια (Pal et al., 2006, Yoo et al., 2015, Kim et al., 2011, Cai et al., 2018). Για την πλήρη αδρανοποίηση των Gram θετικών βακτηρίων απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός επιθέσεων από υδροξυλικές ρίζες στο τοίχωμα (van Grieken et al., 2010).

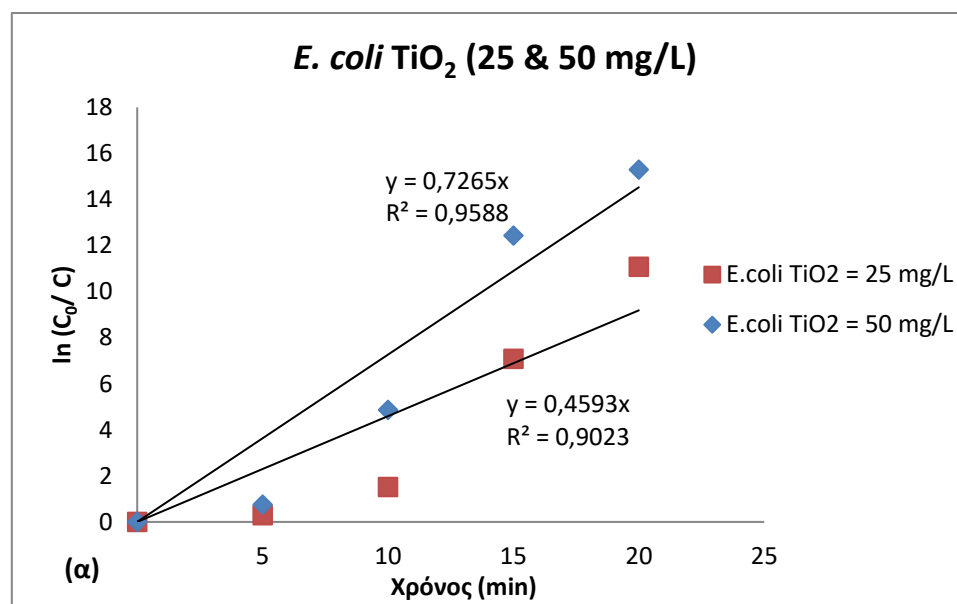
Σύμφωνα με κάποιους συγγραφείς, ο ρυθμός της αδρανοποίησης των βακτηρίων με τη μέθοδο της φωτοκαταλυτικής απολύμανσης ακολουθεί την εξής σειρά: *E. coli* > υπόλοιπα αρνητικά κατά Gram βακτήρια > κολοβακτηρίδια (εκτός του *E. coli*) > θετικά κατά Gram βακτήρια (εκτός του εντερόκοκκου) > είδη εντερόκοκκου (Bogdan et al., 2015, Markowska – Szczupak et al., 2011, Kuhn et al., 2003).

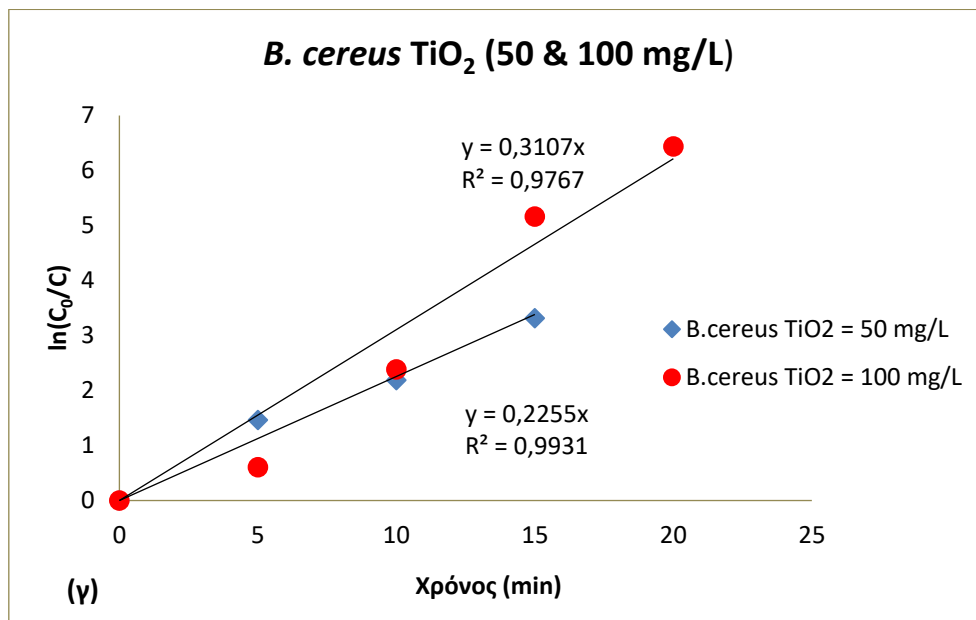
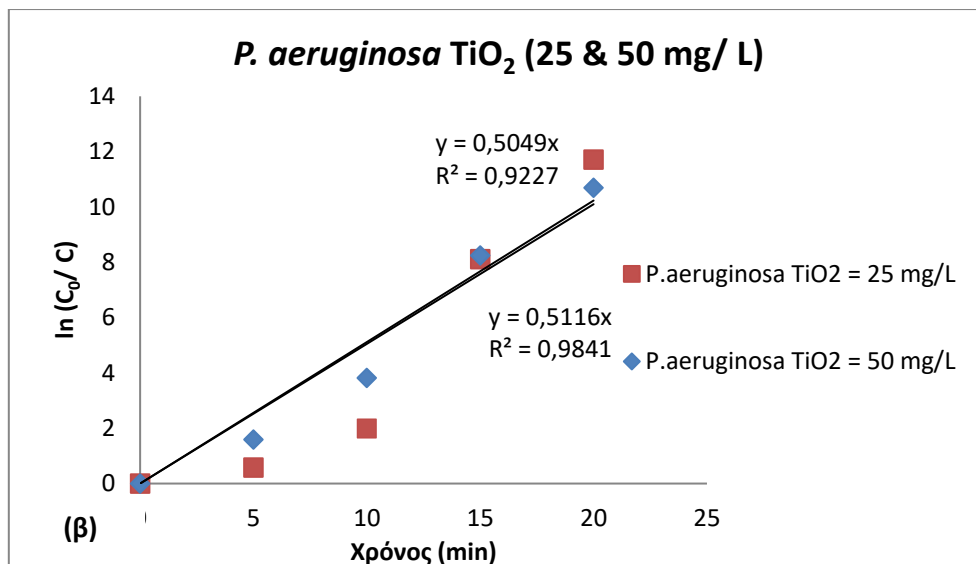
Ωστόσο, η παραπάνω σειρά αδρανοποίησης των βακτηρίων δεν υποστηρίζεται από όλους. Αρκετοί μελετητές υποστηρίζουν ότι τα Gram θετικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα σε σχέση με τα Gram αρνητικά στη φωτοκαταλυτική διαδικασία. Αυτό υποστηρίζεται λόγω μιας πιο σύνθετης δομής των Gram-αρνητικών βακτηρίων, που προσδίδει η πρόσθετη εξωτερική μεμβράνη τους, η οποία μπορεί να προστατεύει

από απολυμαντικούς παράγοντες (van Grieken et al., 2010, Foster et al., 2011). Οι Nanako et al., εξέτασαν το διάστημα που χρειάστηκε ένα Gram θετικό (*S.aureus*) και δύο Gram αρνητικά βακτήρια (*E. coli* & *S. marcescens*) να απενεργοποιηθούν πλήρως μέσω της φωτοκατάλυσης με TiO_2 . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πρώτο χρειάστηκε 4 φορές λιγότερο χρόνο συγκριτικά με τα άλλα δύο (Nanako et al., 2013). Ακόμα σύμφωνα με τους Kubacka et al. και Wolfrum et al., δεν αναφέρθηκε διαφορά, ως προς την ευαισθησία, μεταξύ των δύο ειδών βακτηρίων (Kubacka et al., 2008, Wolfrum et al., 2002).

Σύμφωνα με τους Skorb et al., μια άλλη εξήγηση της ευαισθησίας των Gram-αρνητικών βακτηρίων στη φωτοκατάλυση πιθανώς να αποτελεί η διαφορετική χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των δύο ειδών βακτηρίων, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική ανθεκτικότητα στις ρίζες υδροξυλίου (van Grieken et al., 2010, Skorb et al., 2008).

Ο ρυθμός απολύμανσης μπορεί να ακολουθήσει ικανοποιητικά μια ψευδοπρώτης τάξης κινητική, όπως φαίνεται στην εικόνα 12. Οι σταθερές του ρυθμού της κινητικής που υπολογίστηκαν για την *E. coli* και την *P. aeruginosa* (Εικόνα 12 (α & β)) για συγκέντρωση καταλύτη 25 mg/L ήταν: $0,50 \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0,82$), $0,50 \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0,85$) και $0,73 \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0,91$), $0,51$ ($r^2 = 0,96$) για συγκέντρωση καταλύτη 50 mg/L αντίστοιχα. Ενώ για το *B. cereus* (Εικόνα 12 (γ)) οι σταθερές του ρυθμού της κινητικής που υπολογίστηκαν για τον καταλύτη TiO_2 συγκέντρωσης 50 και 100 mg/L ήταν: $0,23 \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0,98$) και $0,31 \text{ min}^{-1}$ ($r^2 = 0,95$) αντίστοιχα.





Εικόνα 12: Επίδραση της συγκέντρωσης του καταλύτη TiO₂ στην αποτελεσματικότητα της φωτοκαταλυτικής απολύμανσης έναντι των βακτηρίων α) *E.coli* b) *P.aeruginosa* c) *B.cereus*. Συγκέντρωση καταλύτη: 25 – 100 mg/L.

7.1.2.1 Μέγεθος $I \cdot t$

Σε μεθόδους απολύμανσης με υπεριώδες φως η μικροβιακή αδρανοποίηση είναι ανάλογη με τη δόση UV, η οποία εκφράζεται ως εξής: $UV \text{ δόση} = I \cdot t$, όπου I η δόση της ακτινοβολίας σε W/cm^2 και t είναι ο χρόνος έκθεσης του βακτηρίου μέχρι την αδρανοποίησή του κατά 99%.

Η λάμπα που χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια των πειραμάτων είχε ισχύ 9 Watt και το δοχείο ζέσεως είχε διάμετρο 9 cm. Έτσι το εμβαδόν της επιφάνειας είναι ίσο με 63.6 cm^2 και η δόση της ακτινοβολίας ισούται με $I = 9W/63,6 \text{ cm}^2 = 0,14 \text{ W/cm}^2$.

Πίνακας 3: Τιμές I^*t για τα πρότυπα βακτήρια που υποβλήθηκαν σε φωτοκατάλυση παρουσία TiO_2 συγκέντρωσης 25 – 100 mg/L.

	<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>B. cereus</i>	
Συγκέντρωση Καταλύτη TiO_2 (mg/L)	25	50	25	50	50	100
Χρόνος μείωσης (min)	20	20	20	20	15	20
k (κινητική σταθερά αδρανοποίησης)	0,4593	0,7265	0,5049	0,5116	0,2255	0,3107
R^2 (συντελεστής γραμμικής συσχέτισης)	0,8208	0,9108	0,8502	0,9608	0,9787	0,9453
I^*t ($W/cm^2 \cdot min$)	2,8	2,8	2,8	2,8	2,1	2,8

Στη φωτοκατάλυση τίθεται το ερώτημα αν είναι καταλληλότερο να χρησιμοποιηθεί το γινόμενο C^*t ή το I^*t . Αν δηλαδή ευθύνεται το απολυμαντικό (ο καταλύτης TiO_2) ή η ακτινοβολία UVA για την αδρανοποίηση των βακτηρίων. Στην προκειμένη περίπτωση υπάρχει μια συνεργιστική δράση της ακτινοβολίας UVA και του καταλύτη TiO_2 που συμβάλλει στην αδρανοποίηση των βακτηρίων. Οι τιμές του γινομένου I^*t στην παρούσα εργασία δε συνάδουν με βιβλιογραφικές τιμές, καθώς οι τελευταίες στις περισσότερες έρευνες αναφέρονται στη δράση της ακτινοβολίας UVC.

7.1.3 Έλεγχος απενεργοποίησης των βακτηρίων μετά την απολύμανση

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με υπεριώδη ακτινοβολία μετριέται συνήθως παρακολουθώντας το κλάσμα των κυττάρων που παραμένουν αναπαραγόμενα χωρίς αυτά να είναι απαραίτητα νεκρά (Shang et al., 2009).

Η διεργασία της φωτοκατάλυσης μπορεί να προκαλέσει βλάβες στα μικροβιακά κύτταρα που είναι αναστρέψιμες, έτσι μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης με UV ακτινοβολία μετά την επεξεργασία και συνεπώς να θέσει σε κίνδυνο τη δημόσια υγεία (Shang et al, 2009).

Η φωτοενεργοποίηση επιτρέπει την ανάκτηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των βακτηρίων που έχουν υποστεί απολύμανση, έχοντας ως αποτέλεσμα την

αναγέννησή τους (Lee et al., 2015). Το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης λαμβάνει χώρα για ορισμένα βακτηρία που έχουν υποστεί βλάβη από το υπεριώδες φως, όταν αυτά εκτίθενται σε μήκη κύματος του ορατού φάσματος μεταξύ 300 και 500 nm.

Είναι γνωστό πως με το πέρας της UV ακτινοβολίας, κάποιοι μικροοργανισμοί και κυρίως βακτήρια, είναι ικανά να επιδιορθώνουν το DNA τους, παρουσία ή απουσία του ορατού φωτός με μηχανισμούς που αναφέρονται ως φωτοενεργοποίηση (photoreactivation) και σκιερή αποκατάσταση (dark repair) αντίστοιχα (Shang et al., 2009, Chong et al., 2010). Επίσης, η επιδιόρθωση του DNA και του RNA μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ενός μηχανισμού σύμφωνα με τον οποίο οι πυριμιδίνες του μορίου του DNA αλλά και του RNA επιδιορθώνονται μέσω της δράσης ειδικών ενζύμων. Το φαινόμενο της φωτοενεργοποίησης των μικροοργανισμών και στις δύο περιπτώσεις, εξαρτάται αποκλειστικά από το είδος του βακτηρίου (Maier, Pepper, Gerba, 2000).

Για την εκτίμηση της πιθανής εκ νέου ανάπτυξης των εξεταζόμενων μικροοργανισμών πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε σκοτάδι και σε φυσικό φως για 48 ώρες μετά το τέλος της φωτοκατάλυσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (4).

Πίνακας 4: Ενεργοποίηση των εξεταζόμενων βακτηρίων μετά το πέρας της φωτοκατάλυσης στο σκοτάδι και σε φυσικό φωτισμό.

Βακτήρια	Συγκέντρωση χρησιμοποιούμενου καταλύτη (mg/L)	Παραμονή στο σκοτάδι μετά από 24 h (CFU/mL)	Παραμονή σε φυσικό φως μετά από 24 h (CFU/mL)	Παραμονή στο σκοτάδι μετά από 48 h (CFU/mL)	Παραμονή σε φυσικό φως μετά από 48 h (CFU/mL)
<i>E. coli</i>	50	5	60	25	90
<i>P. aeruginosa</i>	50	0	25	0	10
<i>B. cereus</i>	100	0	0	0	0

Αυτό που παρατηρείται από τα αποτελέσματα είναι ότι η *E. coli* και η *P. aeruginosa* φωτοενεργοποιήθηκαν ευκολότερα στο φυσικό φως παρά στο σκοτάδι.

Άλλη μια παρατήρηση είναι ότι ο αυξημένος αριθμός του βακτηριακού πληθυσμού στις 24 h δεν συνεπάγεται περαιτέρω αύξηση στις 48 h. Πιο συγκεκριμένα, ο πληθυσμός της *E. coli* σε συνθήκες φωτισμού μετά από 24 h ήταν 60 CFU/mL, ενώ μετά από 48 h 90 CFU/mL, πράγμα που σημαίνει ότι η UVA ακτινοβολία δεν προκάλεσε σημαντική βλάβη στα κύτταρα του βακτηρίου. Το βακτήριο ανέπτυξε μηχανισμούς διόρθωσης των βλαβών. Αντίθετα, ο πληθυσμός της *P. aeruginosa* σε συνθήκες φυσικού φωτισμού και διάστημα 24 h ήταν 25 CFU/mL, ενώ μετά από 48 h μειώθηκε σε 10 CFU/mL.

Αξιοσημείωτο είναι το ότι ο *B. cereus* δεν αναπτύχθηκε εκ νέου, παρόλη την ανθεκτικότητά του σαν βακτήριο. Εξάγεται το συμπέρασμα ότι η αλληλεπίδραση των σωματιδίων του καταλύτη με τα βακτηριακά κύτταρα προκάλεσε οξειδωτικό στρες. Τα οξειδωτικά μέσα που παράχθηκαν κατάστρεψαν τις κυτταρικές μεμβράνες του βακτηρίου, προκαλώντας κυτταρικό θάνατο, αποτρέποντας έτσι την αναγέννησή του.

7.1.4 Πειράματα απολύμανσης με όζον

Είναι ευρέως γνωστή η δυνατότητα που έχει το όζον να ανδρανοποιεί τους παθογόνους μικροοργανισμούς στο νερό. Η ικανότητά του αυτή φαίνεται ότι οφείλεται στις ελεύθερες ρίζες που παράγονται (Manousaridis et al., 2005). Σ' αυτήν την μελέτη διερευνήθηκε η αποτελεσματικότητα του όζοντος στην αδρανοποίηση των βακτηρίων *E. coli*, *P. aeruginosa* και *B. cereus*. Κατά τη δοκιμή του όζοντος στην απολυμαντική διαδικασία, πραγματοποιήθηκαν τρία πειράματα για κάθε βακτηριακό στέλεχος. Όλα τα πειράματα είχαν την ίδια διάρκεια, αυτή των 30 λεπτών, ενώ διέφερε η δόση όζοντος που εφαρμόστηκε στα πειράματα μεταξύ των τριών βακτηρίων, αλλά και μεταξύ του ίδιου βακτηρίου. Η επίδραση του όζοντος στην αδρανοποίηση των βακτηρίων παρατηρήθηκε τόσο στα Gram θετικά όσο και στα Gram αρνητικά βακτήρια.

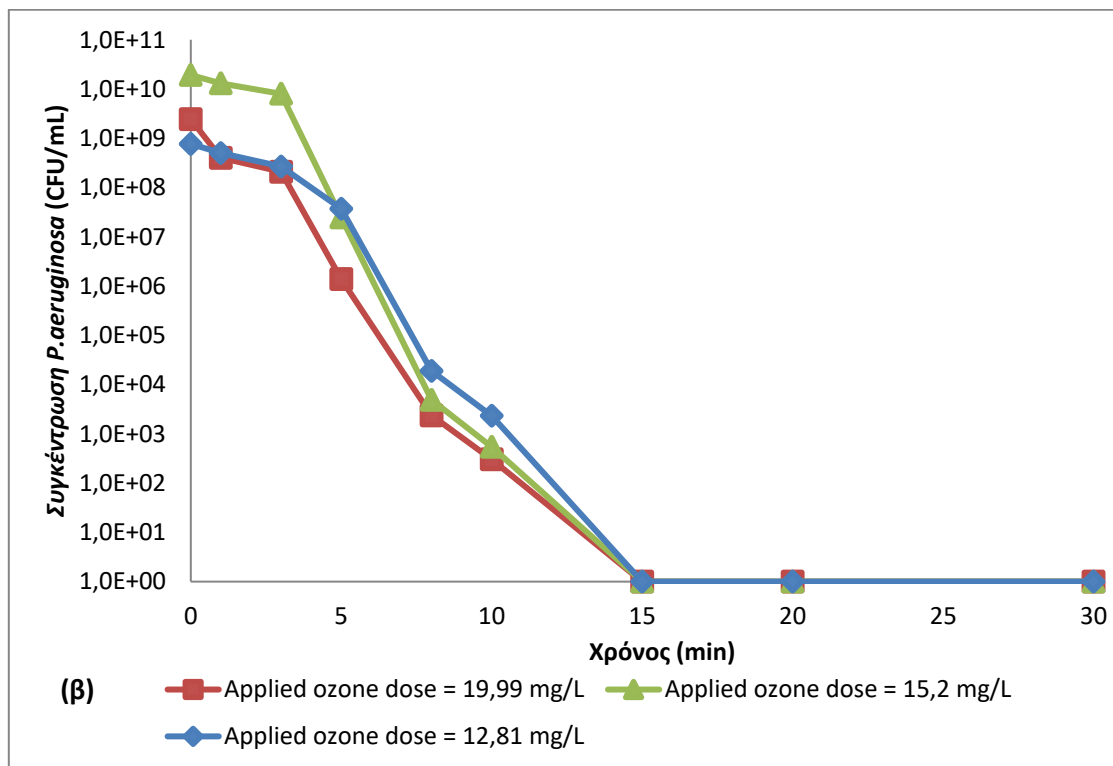
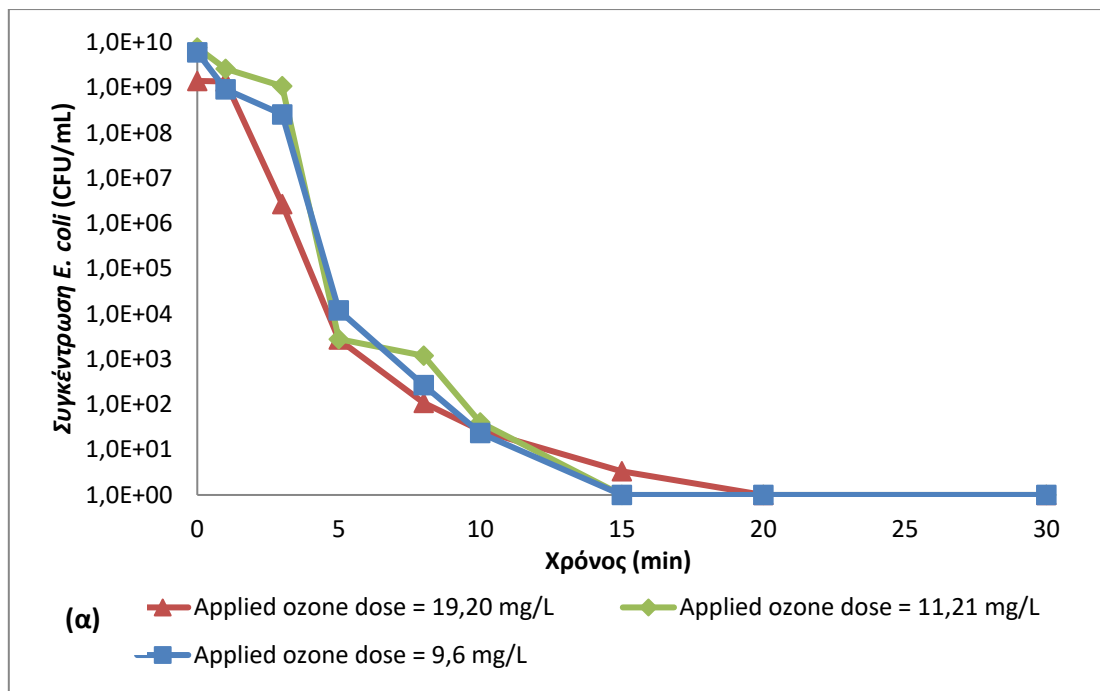
Η βακτηριακή αδρανοποίηση με όζον βασίζεται στην προοδευτική οξείδωση κάποιων ζωτικών κυτταρικών συστατικών, καταλήγωντας στον θάνατο του κυττάρου. Σύμφωνα με έρευνες κύριο στόχο δράσης του όζοντος, αποτελεί η περιφερειακή κυτταρική δομή (π.χ., το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα), η οποία λειτουργεί ως προστατευτικό εμπόδιο κατά του περιβαλλοντικού στρες σε μικροοργανισμούς. Το όζον επιτίθεται στα ακόρεστα λιπίδια, στις πρωτεΐνες και στα ένζυμα της δομής του κυτταρικού τοιχώματος. Η φυσικοχημική αλλαγή στην κυτταρική επιφάνεια συνεπώς θα προηγηθεί οποιασδήποτε περαιτέρω βλάβης στα ενδοκυτταρικά συστατικά και τις λειτουργίες τους. Η λύση και τελικά ο θάνατος του κυττάρου επέρχονται με την υποβάθμιση του κυτταρικού τοιχώματος (Cho et al., 2010, Ersoy et al., 2019, Nahim – Granados et al., 2020). Στα Gram αρνητικά βακτήρια, πρωτεύουσα θέση προσβολής του όζοντος αποτελεί η εξωτερική στιβάδα του κυτταρικού τους τοιχώματος, η οποία είναι λιποσακχαριτικής φύσης (LPS) και διαφέρει από αυτήν των Gram θετικών κυττάρων. Οι θέσεις στόχοι στα κύτταρα διαφέρουν λόγω της μοναδικής μορφής του όζοντος και ο μηχανισμός απενεργοποίησής του μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τα βακτήρια (Ersoy et al., 2019).

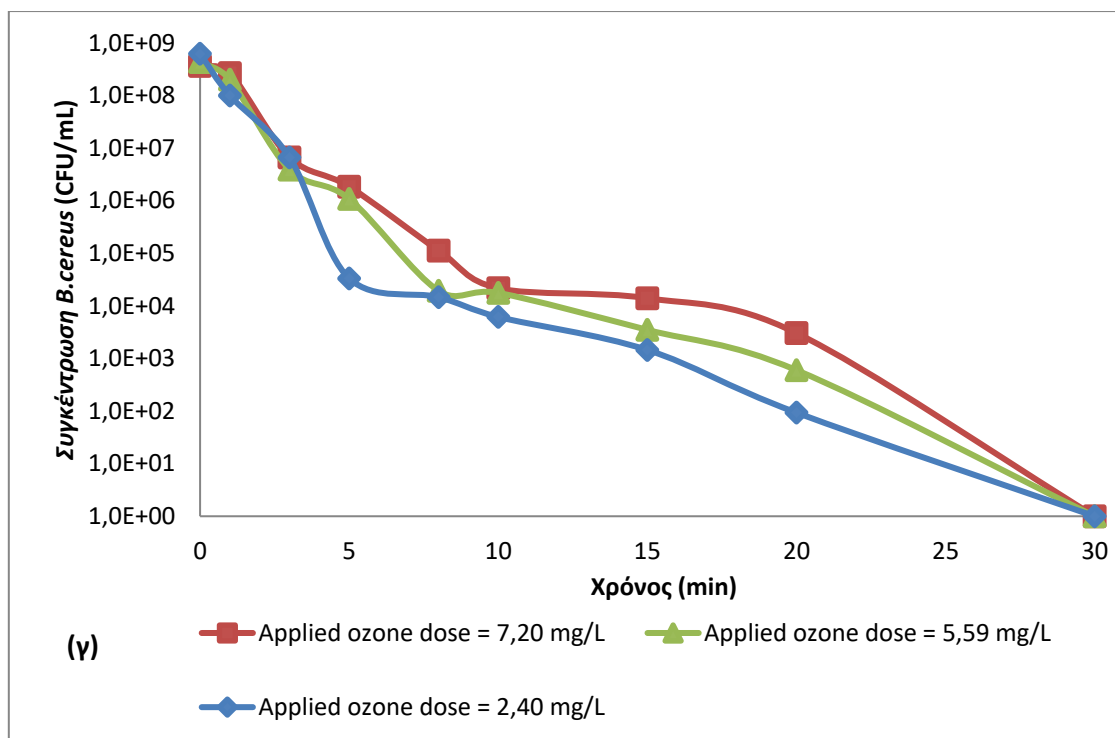
Στις παρακάτω εικόνες παρουσιάζεται λογαριθμικά η αδρανοποίηση των βακτηρίων σε σχέση με το χρόνο εφαρμογής του όζοντος. Παρατηρείται λοιπόν ότι στα πρώτα λεπτά της επεξεργασίας (0 – 3 min), ο πληθυσμός της *E. coli* και της *P. aeruginosa*

παραμένει σχετικά σταθερός, ενώ στη συνέχεια μειώνεται απότομα. Αυτό συμβαίνει διότι οι μικροοργανισμοί τείνουν να αντιστέκονται στις αντίξοες συνθήκες στις οποίες υποβάλλονται. Ήδη από το πέμπτο λεπτό της διεργασίας η μείωση του μικροβιακού φορτίου είναι σημαντική, της τάξης του 99,99%, 95,17%, 99,50% και άνω, για τα βακτήρια *E. coli*, *P. aeruginosa* και *B. cereus* αντίστοιχα. Στη συνέχεια ακολουθεί ακόμα μεγαλύτερη μείωση του φορτίου, ώσπου στα 15 min τα στελέχη *E. coli* και *P. aeruginosa* αδρανοποιούνται πλήρως, ενώ για τον *B. cereus* ολοκληρωτική απολύμανση επιτυγχάνεται στα 30 min επεξεργασίας.

Γενικά, εξάγεται το συμπέρασμα ότι το θετικό κατά gram βακτήριο είναι πιο ανθεκτικό από τα αρνητικά κατά gram βακτήρια κατά την επεξεργασία με όζον. Η σχετική εξήγηση πιθανώς να οφείλεται στη διαφορά της δομής του κυτταρικού τοιχώματος μεταξύ των δύο ειδών βακτηρίων. Τα κυτταρικά τοιχώματα των Gram θετικών βακτηρίων αποτελούνται από πολλά στρώματα πεπτιδογλυκανών που σχηματίζουν μια παχιά άκαμπτη δομή, ενώ τα κυτταρικά τοιχώματα των Gram αρνητικών βακτηρίων αποτελούνται από μία εξωτερική μεμβράνη, η οποία περιέχει λιποπρωτεΐνες, λιποσακχαρίτες και λίγα στρώματα πεπτιδογλυκανών από κάτω. Το όζον φαίνεται ότι αντιδρά πιο εύκολα με τα λιπίδια από τις πρωτεΐνες.

Η μεγαλύτερη ανθεκτικότητα που αναφέρθηκε για το *B. cereus* συγκριτικά με τα *E. coli* και *P. aeruginosa*, μπορεί να οφείλεται στο παχύτερο στρώμα πεπτιδογλυκάνης που διαθέτει, το οποίο αύξησε την ακαμψία του κυτταρικού τοιχώματος προσφέροντας επιπλέον προστασία στην κυτταρική μεμβράνη ενάντια στο όζον. Παρά την παρουσία μιας επιπλέον εξωτερικής μεμβράνης στη δομή των *E. coli* και *P. aeruginosa*, δύο αρνητικά κατά gram βακτήρια, το κυτταρικό τους τοίχωμα ήταν πιο ευαίσθητο στη δράση του όζοντος. Το όζον όταν αλληλεπιδρά με το κυτταρικό τοίχωμα του *B. cereus* μπορεί να χάσει την οξειδωτική του δύναμη.





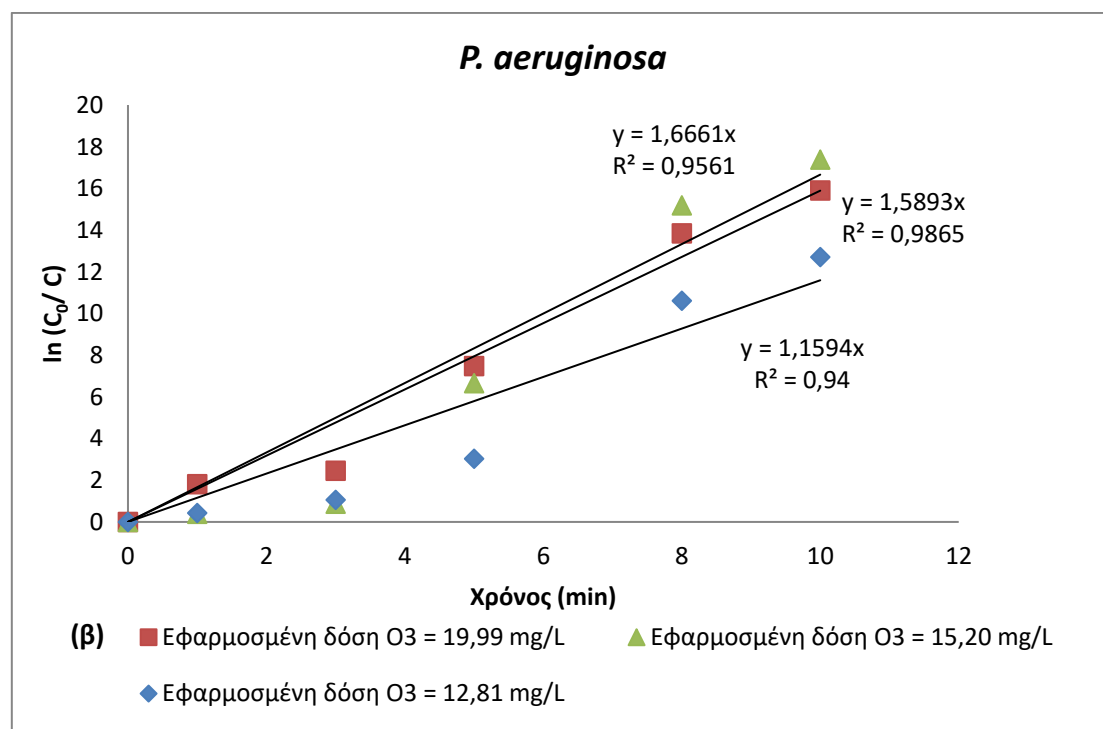
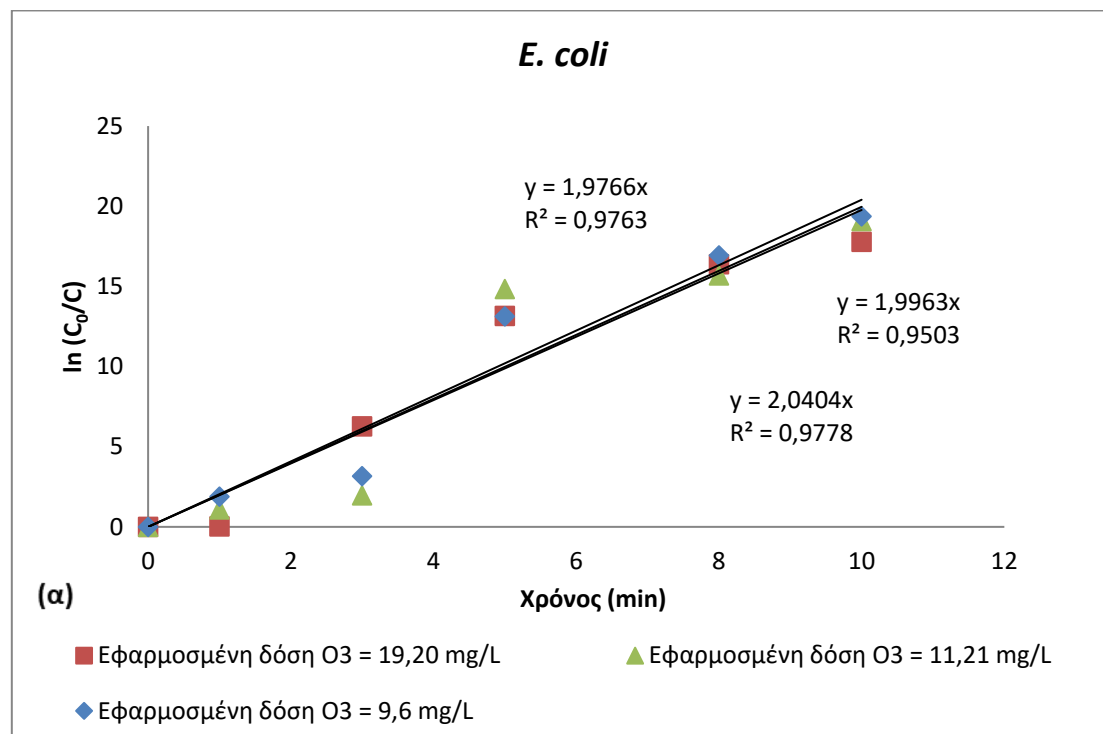
Εικόνα 13: Αδρανοποίηση των βακτηρίων (α) *E. coli*, (β) *P. aeruginosa* και (γ) *B. cereus* σε υδατικό διάλυμα κάτω από την επίδραση όζοντος. Εφαρμοσμένη δόση όζοντος: 2,40 mg/L – 19,9 mg/L.

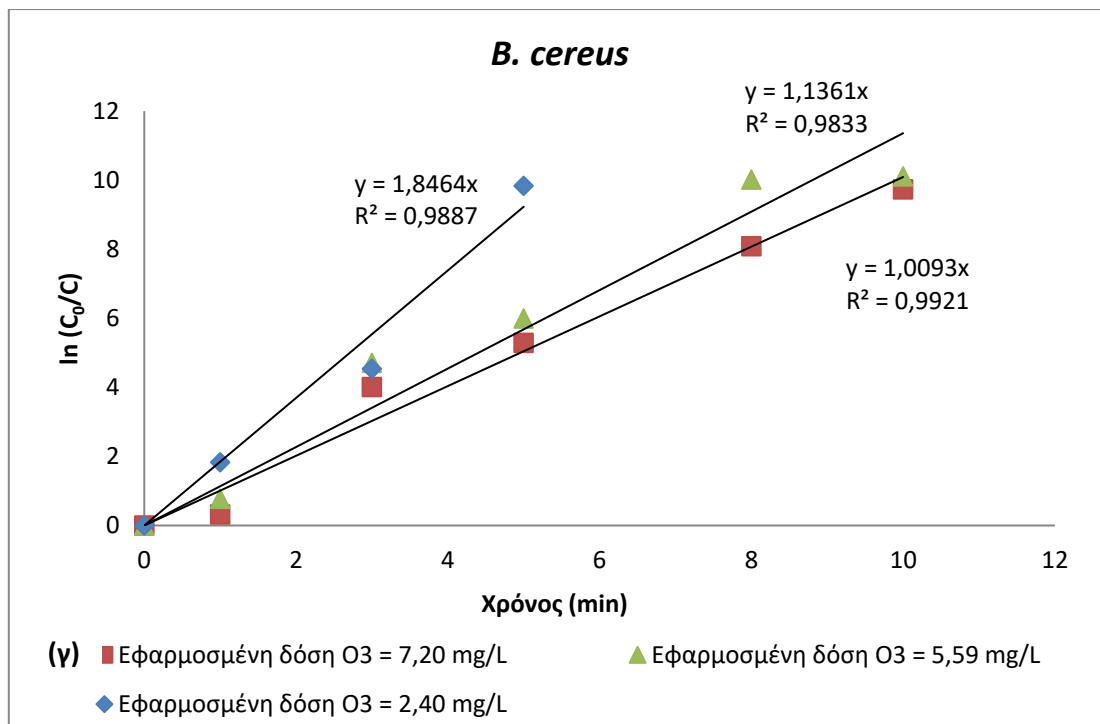
Για το βακτήριο *E. coli* στην περίπτωση της μικρότερης δόσης όζοντος (δηλαδή 9.6 mg/L) παρατηρείται πιο υψηλή συνολικά απόδοση της απολύμανσης σε σχέση με τη μέση και την υψηλή τιμή δόσης (11,21 mg/L & 19,20 mg/L). Η αντίδραση μπορεί να θεωρηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό ως ψευδοπρώτης τάξης με σταθερές ταχύτητας αδρανοποίησης $2,0404 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,95$), $1,9963 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,89$) και $1,9766 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,94$) για εφαρμοσμένη δόση όζοντος 9,6, 11,21 και 19,20 mg/L αντίστοιχα.

Η μέση δόση όζοντος για την *P. aeruginosa* φαίνεται να επιφέρει τον υψηλότερο ρυθμό αδρανοποίησης, ακολουθεί η υψηλότερη δόση και τέλος η χαμηλότερη, κατά την οποία καταγράφηκε η χαμηλότερη τιμή σταθεράς ταχύτητας. Η αντίδραση μπορεί να θεωρηθεί σε ικανοποιητικό βαθμό ως ψευδοπρώτης τάξης με σταθερές ταχύτητας αδρανοποίησης $1,1594 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,8901$), $1,6661 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,9167$) και $1,5893 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,9691$) για εφαρμοσμένη δόση όζοντος 12,81, 15,20 και 19,99 mg/L αντίστοιχα.

Από τα πειραματικά αποτελέσματα για το *B. cereus* και σ' αυτήν την περίπτωση παρατηρείται ότι αυξημένη δόση όζοντος οδηγεί σε μείωση του ρυθμού αδρανοποίησης των βακτηρίων. Υψηλότερη απόδοση απολύμανσης επιτεύχθηκε με τη χαμηλότερη δόση όζοντος, αυτή των 2,40 mg/L, αμέσως μετά με την μέση 5,59 mg/L και τέλος με την υψηλή δόση όζοντος 7,20 mg/L. Η αντίδραση χαρακτηρίζεται ως ψευδοπρώτης με σταθερές ταχύτητας $1,8464 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,9752$), $1,1361 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,954$), $1,0093 \text{ min}^{-1}$ ($R^2 = 0,9794$) για εφαρμοσμένη δόση όζοντος 2,40, 5,59 και 7,20 mg/L αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας τις σταθερές ταχύτητες και των τριών βακτηρίων, μεγαλύτερες σταθερές ταχύτητας επιτεύχθηκαν για τις τρεις δόσεις όζοντος της *E. coli* και αμέσως μετά για την χαμηλότερη δόση όζοντος του *B. cereus*. Έτσι, συμπεραίνουμε ότι αποτελεσματικότερη απολύμανση έγινε για το gram αρνητικό *E. coli*.





Εικόνα 14: των βακτηρίων (α) *E. coli*, (β) *P. aeruginosa* και (γ) *B. cereus* σε υδατικό διάλυμα κάτω από την επίδραση όζοντος. Εφαρμοσμένη δόση όζοντος: 2,40 mg/L – 19,9 mg/L.

7.1.4.1 Μέγεθος C^*t

Η αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού μέσου μπορεί να εκφραστεί ως C^*t , όπου C είναι η συγκέντρωση του απολυμαντικού μέσου και t ο χρόνος που απαιτείται για την απενεργοποίηση ενός ορισμένου ποσοστού του πληθυσμού υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις (pH και θερμοκρασία). Τυπικά χρησιμοποιείται ένα ποσοστό της τάξης του 99% κατά τη σύγκριση C^*t τιμών. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή του γινομένου C^*t , τόσο πιο αποτελεσματικό κρίνεται το απολυμαντικό μέσο. Το μέγεθος C^*t επιτρέπει μια γενική σύγκριση της αποτελεσματικότητας των διάφορων απολυμαντικών σε διαφορετικούς μικροβιακούς παράγοντες (Pepper et al., 2014).

Πίνακας 3: Τιμές C*t για μεγαλύτερη από 95% μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων που υποβλήθηκαν σε οζόνωση με διαφορετικές εφαρμοσμένες δόσεις όζοντος.

	<i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>B. cereus</i>		
Εφαρμοσμένη δόση όζοντος C (mg/L)	9,60	11,21	19,20	12,81	15,20	19,99	2,40	5,59	7,20
Χρόνος μείωσης t (min)	10	10	10	10	10	10	5	10	10
k (κινητική σταθερά αδρανοποίησης)	2,0404	1,9963	1,9766	1,1594	1,6661	1,5893	1,8464	1,1361	1,0093
R² (συντελεστής γραμμικής συσχέτισης)	0,9468	0,8888	0,9406	0,8901	0,9167	0,9691	0,9752	0,9540	0,9794
C*t (mg/L*min)	96	112,1	192,0	128,1	152,0	199,9	12,01	55,9	72,0

7.2 Επίδραση της UVA φωτοκατάλυσης και της οζόνωσης στα βακτηριακά περιβλήματα

7.2.1 Υπεροξείδωση λιπιδίων

Κύριο στόχο των απολυμαντικών μέσων (όπως το όζον)/μεθόδων αποτελεί η βακτηριακή κυτταρική μεμβράνη, λόγω του υψηλού περιεχομένου της σε λιπίδια (Han et al., 2015, Ersoy et al., 2019). Για την εκτίμηση της οξείδωσης των βακτηριακών μεμβρανών κατά τις διεργασίες της φωτοκατάλυσης κ της οζόνωσης, παρακολουθήθηκε η παραγωγή του MDA. Η μαλονδυαλδεΰδη (MDA) σχηματίζεται από την υπεροξείδωση των πολυακόρεστων φωσφολιπιδίων σε λιπιδικές μεμβράνες και αποτελεί την αλδεΰδη που βρίσκεται σε αφθονία (Maness et al., 1999, Cho et al., 2010, Pigeot-Remy et al., 2012, Long Y., Jinren N., Zuhui W., 2015, Ersoy et al., 2019). Επομένως, η υπεροξείδωση των λιπιδίων σχετίζεται άμεσα με τη βλάβη στην κυτταρική μεμβράνη, οδηγώντας σε διαρροή των ενδοκυτταρικών μορίων, απώλεια της αναπνευστικής δραστηριότητας και τελικά στον κυτταρικό θάνατο (Maness et al., 1999, Cho et al., 2010, Foster et al., 2011, Ersoy Z.G., Barisci S. & Dinc O., 2019). Έτσι η υπεροξείδωση λιπιδίων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης (Zhang et al., 2016).

Φαίνεται ότι λόγω της λιποπρωτεϊνικής στιβάδας στη δομή του κυτταρικού τοιχώματος, τα gram αρνητικά βακτήρια είναι πιο ευάλωτα στην υπεροξείδωση των λιπιδίων (Cho et al., 2010). Παρατηρείται ότι η υπεροξείδωση των λιπιδίων, κατά τις δύο μεθόδους απολύμανσης, ξεκινάει πιο γρήγορα για τα αρνητικά κατά Gram βακτήρια σε σχέση με το θετικό κατά Gram βακτήριο. Πιο συγκεκριμένα, στην εικόνα 15, φαίνεται ότι για το *E. coli*, κατά τη διεργασία της φωτοκατάλυσης με συγκεντρώσεις καταλύτη TiO_2 25 και 50 mg/L η υπεροξείδωση των λιπιδίων κορυφώνεται στα 15 και 5 min και για το *P. aeruginosa* στα 5 και 10 min αντίστοιχα και στη συνέχεια μειώνεται και στις δύο περιπτώσεις. Αντίθετα με τα παραπάνω, για το *B. cereus* (Gram (+)), κατά τη φωτοκατάλυση και για τις δύο συγκεντρώσεις καταλύτη (50 & 100 mg/L), χρειάστηκαν 20 min για να φτάσει τις μέγιστες τιμές υπεροξείδωσης λιπιδίων, όπου στη συνέχεια μειώθηκαν σταδιακά με το χρόνο. Ακόμα, κατά τη διαδικασία της οζόνωσης για τα Gram αρνητικά βακτήρια ο σχηματισμός της MDA έφτασε τις μέγιστες τιμές 12,08 και 12,94 nmol/mg ξηρού βάρους του κυττάρου στα 15 και στα 8 min αντίστοιχα για το *E. coli* και *P. aeruginosa*. Σε αντίθεση, η μέγιστη τιμή της MDA για το *B. cereus* σημειώθηκε στα 30 min και βρέθηκε 41,39 nmol/mg ξηρού βάρους του κυττάρου.

Η MDA έφτασε τη μέγιστη τιμή 50,87 και 31,04 nmol/mg ξηρού βάρους του κυττάρου μετά από 15 και 5 min έκθεσης των κυττάρων της *E. coli* σε UVA και TiO_2 με συγκέντρωση καταλύτη 25 mg/L και 50 mg/L αντίστοιχα. Επιπρόσθετα, για το ίδιο βακτήριο, συγκριτικά με τη διεργασία της φωτοκατάλυσης η ποσότητα της MDA κατά την οζόνωση ήταν σχετικά χαμηλή με τη μέγιστη τιμή στα 12,08 nmol/mg ξηρού βάρους του κυττάρου, η οποία επιτεύχθηκε στα 15 min της διεργασίας. Έτσι, προκύπτει ότι η μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλύτη επέφερε πιο γρήγορη υπεροξείδωση λιπιδίων, ακολούθησε η διεργασία της φωτοκατάλυσης με τη μικρότερη συγκέντρωση καταλύτη και τέλος η οζόνωση.

Για το βακτήριο *P. aeruginosa* ο σχηματισμός της MDA ήταν γρηγορότερος κατά τη φωτοκατάλυση με συγκέντρωση καταλύτη 25 mg/L, μέτριος κατά την οζόνωση και ο πιο αργός κατά την φωτοκατάλυση με συγκέντρωση TiO_2 ίση με 50 mg/L.

Αναφορικά με το *B. cereus*, αν και η μέγιστη συγκέντρωση της MDA ήταν 41,39 nmol/mg ξηρού βάρους του κυττάρου μετά από 30 min επεξεργασίας με όζον, έφτασε 13,37 και 32,77 nmol/mg ξηρού βάρους του κυττάρου μετά από 20 min επεξεργασίας με UVA ακτινοβολία και συγκέντρωση TiO_2 50 και 100mg/L αντίστοιχα. Έτσι προέκυψε ότι με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλύτη επιτεύχθηκε πιο γρήγορη υπεροξείδωση λιπιδίων, ακολούθησε η επεξεργασία με συγκέντρωση καταλύτη 50 mg/L και τέλος η πιο αργή ήταν κατά την επεξεργασία με όζον.

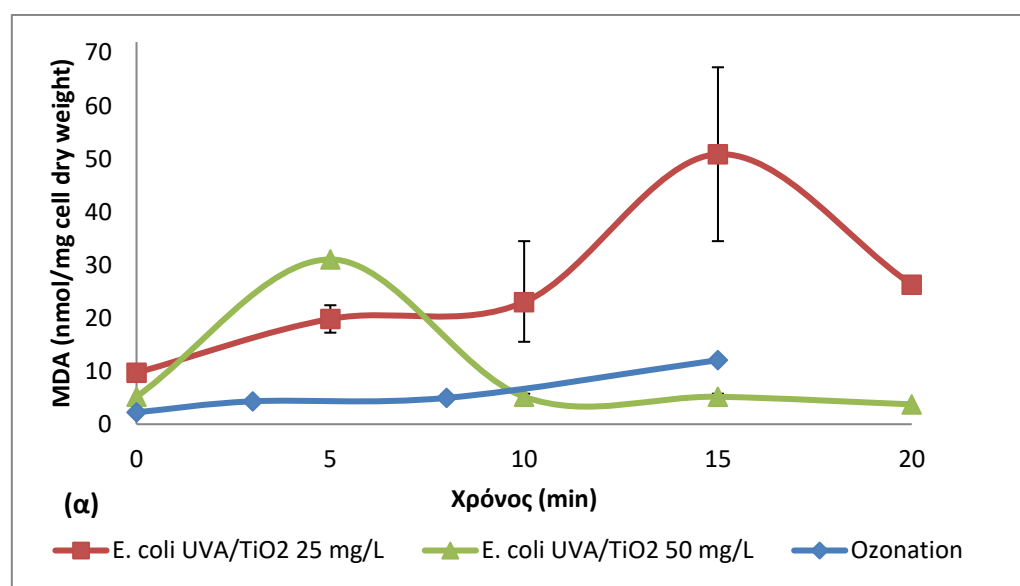
Τα οξειδωτικά που παράχθηκαν κατά την αδρανοποίηση της *E. coli* κατά τη φωτοκατάλυση ήταν εξαιρετικά αποτελεσματικά στην καταστροφή των συστατικών που περιείχαν λιπίδια στην κυτταρική μεμβράνη και στο κυτταρικό τοίχωμα (Long et al., 2015, Foster et al., 2011).

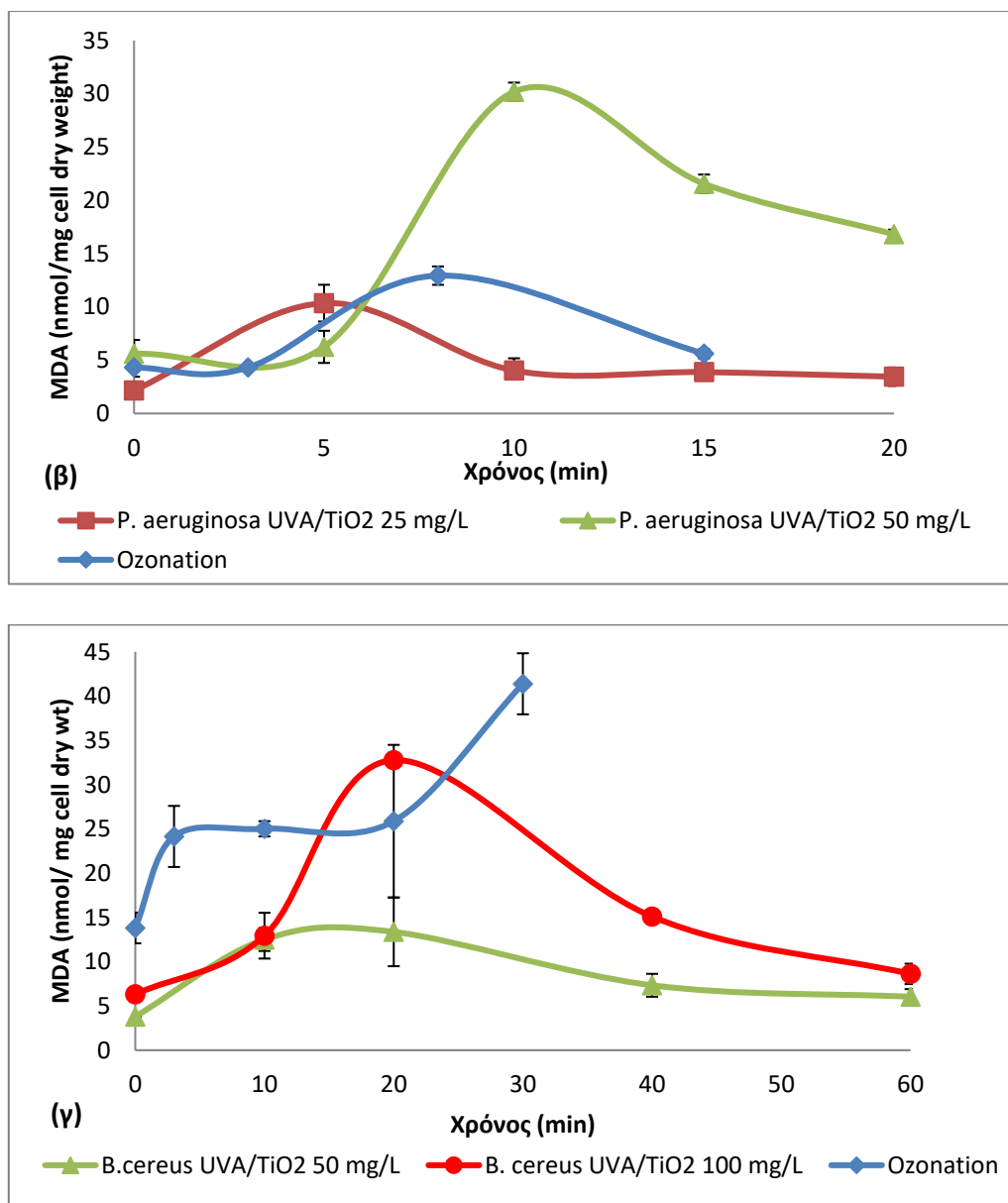
Σαν αποτέλεσμα, η γρηγορότερη υπεροξείδωση των λιπιδίων των μεμβρανών εξηγεί τις γρηγορότερες ζημιές στη διαπερατότητα των βακτηριακών μεμβρανών και ακόμα μπορεί να σχετίζεται και να συνεισφέρει στην ολική αδρανοποίηση των βακτηρίων, κάτω από τη συγκεκριμένη μέθοδο απολύμανσης (Pigeot-Remy et al., 2012).

Οι μετρήσεις της MDA και για τις δύο μεθόδους απολύμανσης έδειξαν μια σημαντική αύξηση εξαρτώμενη από το χρόνο, οι οποίες έφθασαν στην κορυφή και στη συνέχεια σταθερά έπεσαν. Μετά από κάθε μέγιστο της MDA παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής της, αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι η MDA ως οργανική ένωση μπορεί να αποικοδομηθεί από το οξειδωτικό όζον και από τις φωτοπαραγώμενες ρίζες (Maness et al., 1999, Pigeot-Remy et al., 2012, Long et al., 2015, Ersoy Z.G., Barisci S., Dinc O., 2019, Yan et al., 2020). Ακόμα, είναι γνωστό ότι η MDA είναι αρκετά δραστική και ικανή να σχηματίζει ενώσεις με το DNA και τις πρωτεΐνες, γεγονός που μπορεί να υποδηλώνει επίσης την ελάττωσή της (Ibrahim R., Shi M. & Wu C., 2004, Shi et al., 2009).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η ανάλυση με το MDA – TBA, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, αποτελεί δείκτη μέτρησης της έκτασης της βλάβης που έχει υποστεί η μεμβράνη των βακτηρίων και όχι του ρυθμού της βακτηριακής θανάτωσης. Τέλος, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η βλάβη της μεμβράνης δεν συνεπάγεται κατ' ανάγκη και κυτταρικό θάνατο, καθώς τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να επιδιορθώνουν βλάβες στην μεμβράνη (Ibrahim R., Shi M. & Wu C., 2004, Shi et al., 2009).

Μια επιπλέον παρατήρηση για τα βακτήρια *E. coli* και *B. cereus* είναι ότι κατά την οζόνωση η μέγιστη συγκέντρωση αλδεϋδης καταγράφηκε το χρονικό διάστημα κατά το οποίο επήλθε πλήρης αδρανοποίηση των βακτηρίων, δηλαδή στα 15 και στα 30 min αντίστοιχα. Ενώ, κατά τη φωτοκατάλυση η υπεροξειδωση των λιπιδίων ξεκίνησε και κορυφώθηκε πριν το χρονικό διάστημα, στο οποίο επιτεύχθηκε πλήρης απολύμανση και των τριών βακτηρίων.



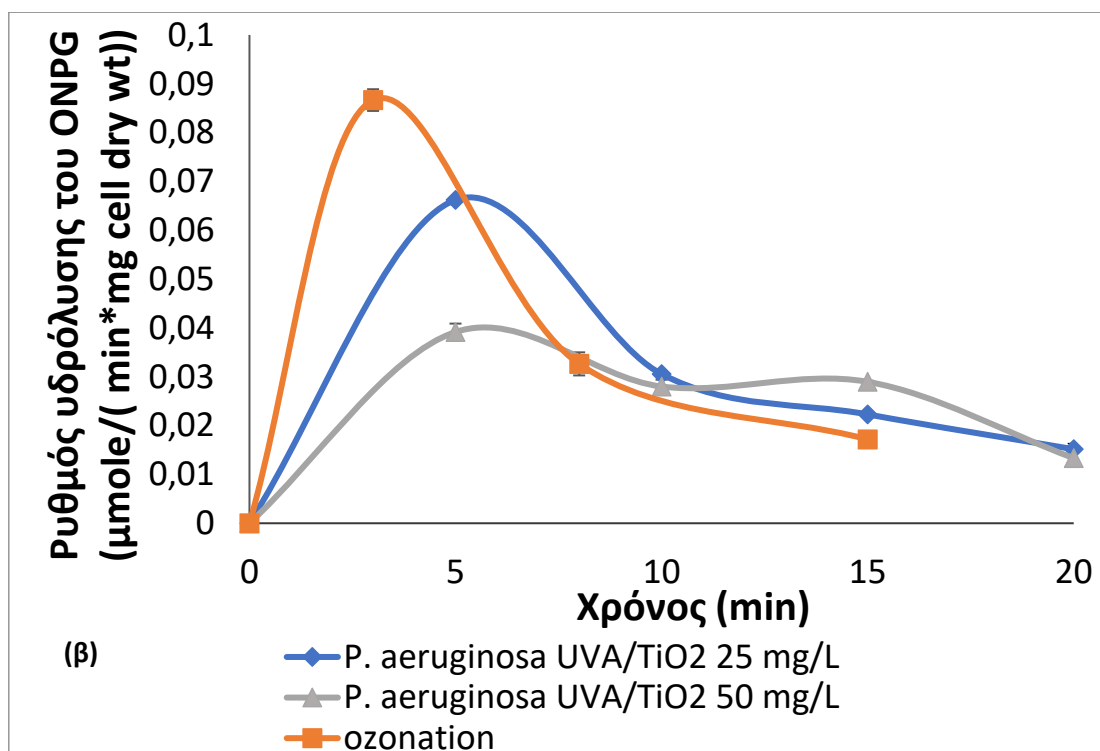
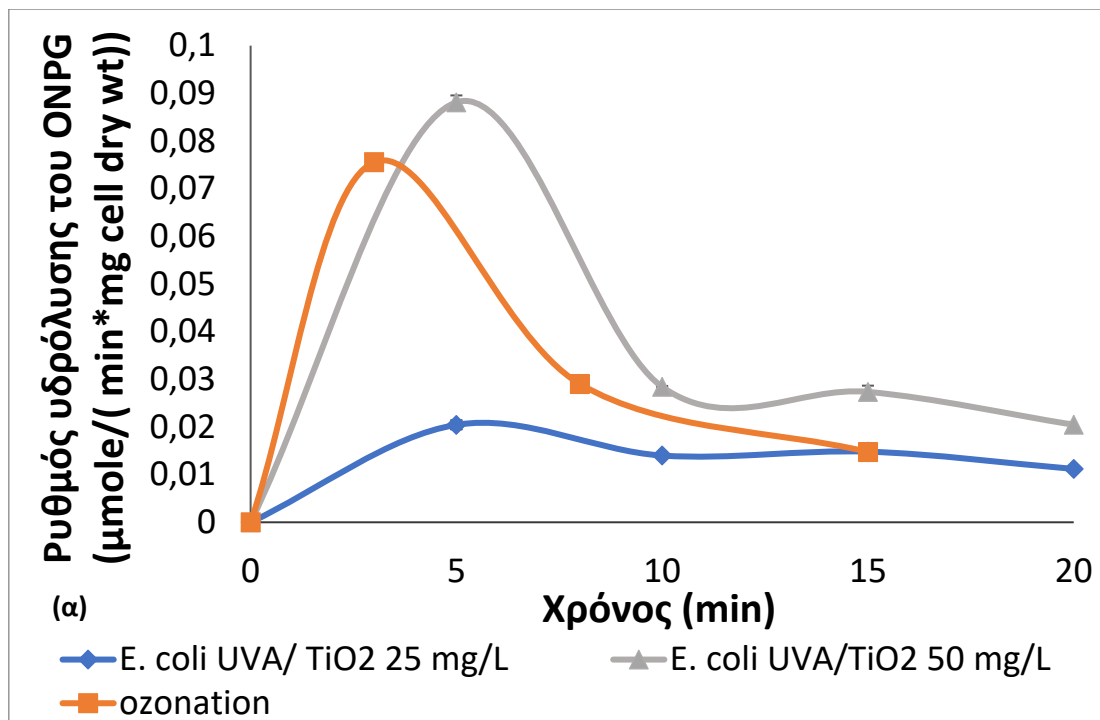


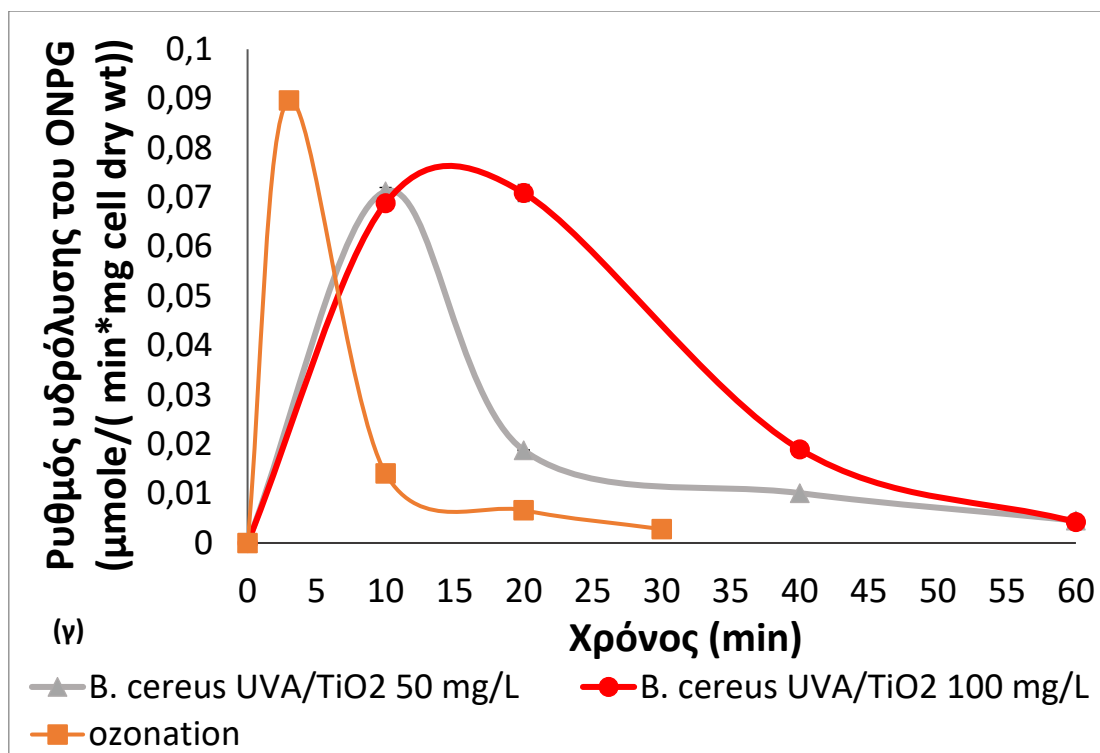
Εικόνα 15: Υπεροξειδωση λιπιδίων που προκαλείται στις μεμβράνες των (α) *E. coli* (β) *P. aeruginosa* (γ) *B. cereus* κατά την επεξεργασία με όζον και κατά την έκθεσή τους σε ακτινοβολία UVA και TiO₂ (25 – 100 mg/L).

7.2.2 Μεταβολή διαπερατότητας κυτταρικής μεμβράνης

Εξετάστηκε η επίδραση της TiO₂ φωτοκαταλυτικής αντίδρασης και του όζοντος στη διαπερατότητα της κυτταρικής βακτηριακής μεμβράνης, μέσω της ανάλυσης ONPG. Το ONPG αποτελεί ανιχνευτή της διαπερατότητας, που σχηματίζει ένα χρωμογόνο υπόστρωμα από την αντίδραση υδρόλυσης με το ενδοκυτταρικό ένζυμο των βακτηρίων, β-d- γαλακτοσιδάση (Huang et al., 2000, Cho et al., 2010, Sun et al., 2014, Cai et al., 2018). Τα άθικτα βακτηριακά κύτταρα έχουν περιορισμένη διαπερατότητα στο ONPG (Huang et al., 2000, Yang et al., 2012, Sun et al., 2014). Ο ρυθμός υδρόλυσης του ONPG ήταν κάτω από 0,09 μmol/(min mg cell dry weight) όταν

εφαρμόστηκε ONPG στα κύτταρα των *E. coli*, *P. aeruginosa* και *B. cereus*. Παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στο ρυθμό υδρόλυσης του ONPG κατά τα πρώτα λεπτά επεξεργασίας, ενώ στη συνέχεια έπεσε και παρέμεινε σχετικά σταθερός και για τα τρία βακτήρια σε όλη τη διάρκεια των απολυμαντικών πειραμάτων (0,09 – 0,0028 μmol/(min mg cell dry weight) (εικόνα 16). Αυτό σημαίνει ότι η μεμβράνη υφίσταται μεταβολές κατά τα πρώτα λεπτά επεξεργασίας και με τις δύο μεθόδους απολύμανσης, ενώ μετά δεν παρατηρείται περαιτέρω μεταβολή. Και για τους τρεις περιβαλλοντικούς δείκτες η μέγιστη τιμή του ρυθμού υδρόλυσης καταγράφηκε στα 3 min επεξεργασίας με όζον. Κατά τη φωτοκατάλυση, για τα δύο Gram-αρνητικά βακτήρια η μέγιστη τιμή του ρυθμού καταγράφηκε στα 5 min επεξεργασίας και για τις δύο συγκεντρώσεις καταλύτη (25 & 50 mg/L), ενώ για το Gram-θετικό *B. cereus* στα 10 και στα 15 min επεξεργασίας για συγκεντρώσεις καταλύτη 50 και 100 mg/L αντίστοιχα. Οι παραπάνω παρατηρήσεις συμφωνούν με τις καμπύλες αδρανοποίησης των τριών βιοδεικτών και με τις δύο μεθόδους απολύμανσης (εικόνες 11 & 13). Κατά τους πρώτους χρόνους εφαρμογής των απολυμαντικών μεθόδων, η συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού αρχίζει να μειώνεται, αυξάνεται ο ρυθμός υδρόλυσης του ONPG φτάνοντας τη μέγιστη τιμή και κατά συνέπεια αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης των κυττάρων. Στους τελευταίους χρόνους επεξεργασίας ο βακτηριακός πληθυσμός έχει μειωθεί σημαντικά, υπάρχουν ελάχιστα κύτταρα κι έτσι δικαιολογείται η μειωμένη τιμή του ONPG, καθώς αυτό πιθανώς δε μπορεί ν' ανιχνευτεί. Αν και απελευθερώνεται στο εναιώρημα ορισμένη ποσότητα β-D-γαλακτοσιδάσης, απενεργοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα από τα οξειδωτικά που βρίσκονται στο εξωτερικό διάλυμα, γι' αυτό το λόγο ο παρατηρούμενος ρυθμός υδρόλυσης του ONPG κορυφώνεται και μετά πέφτει και σταθεροποιείται. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι κάποια κύτταρα παρέμειναν άθικτα, ενώ κάποια άλλα υπέστησαν πλήρη ζημιά κατά τις απολυμαντικές διεργασίες (Cho et al., 2010, Long et al., 2015). Βάσει των παραπάνω παρατηρήσεων συμπεραίνουμε ότι η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης των βακτηρίων αυξήθηκε σε ένα βαθμό κατά τις δύο απολυμαντικές διεργασίες (τη φωτοκαταλυτική επεξεργασία και την επεξεργασία με όζον). Τελικά, η φωτοκατάλυση και η οζόνωση πιθανότατα μπορούν να βλάψουν την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων μέσα σε λίγα λεπτά, επιτρέποντας τη διείσδυση του ONPG στο κυτταρόπλασμα.





Εικόνα 16: Διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης, εκτιμώμενη με το ρυθμό υδρόλυσης ONPG ως συνάρτηση της αδρανοποίησης α) *E. coli* β) *P. aeruginosa* γ) *B. cereus* κατά τη διάρκεια οζονισμού και TiO₂ φωτοκατάλυσης.

7.2.3 Μέτρηση της απελευθέρωσης των πρωτεϊνών κατά την αδρανοποίηση βακτηρίων

Σημαντικό δείκτη της διαταραχής της ακεραιότητας της κυτταρικής μεμβράνης αποτελούν οι πρωτεΐνες. Με την καταστροφή της κυτταρικής δομής με την φωτοκαταλυτική αντίδραση και με το όζον, εκτός από τη διαρροή μικρών μορίων απελευθερώνονται και μακρομόρια στα βακτήρια, όπως οι πρωτεΐνες. Έτσι, στην παρούσα μελέτη η καταστροφή της κυτταρικής δομής αντικατοπτρίζεται από τη διαρροή πρωτεϊνών από τ' αδρανοποιημένα βακτήρια (Wu et al., 2011). Στην εικόνα 17 φαίνεται η ποσότητα των ολικών πρωτεϊνών που απελευθερώθηκε στο διάλυμα κατά την αδρανοποίηση των βακτηρίων *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. cereus* μέσω της TiO₂ φωτοκατάλυσης και της οζόνωσης. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε με την ανάλυση Bradford.

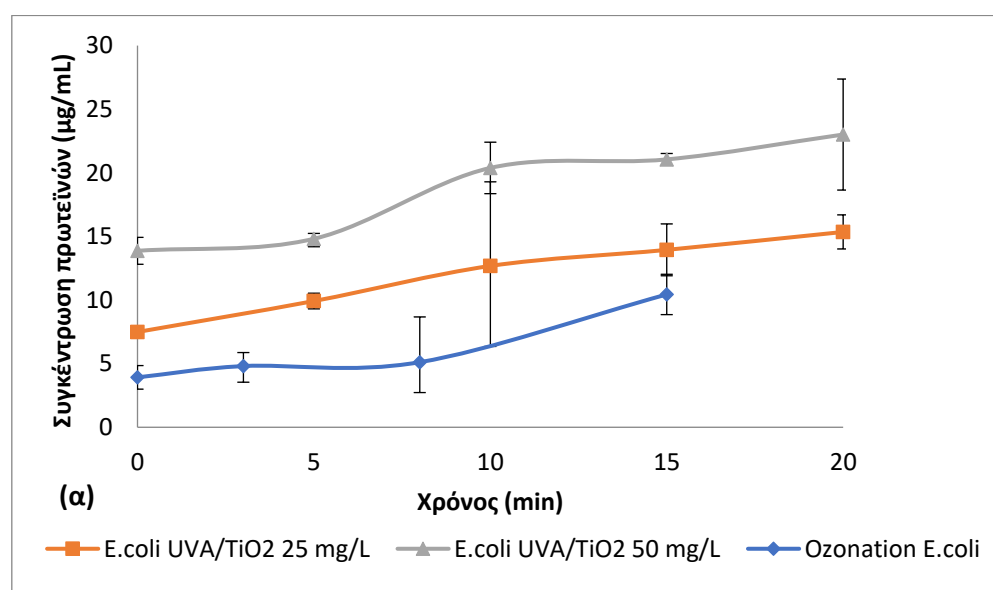
Και με τις δύο τεχνικές απολύμανσης παρατηρείται παρόμοια τάση στην διαρροή των πρωτεϊνών στα κύτταρα και των τριών βακτηρίων. Αρχικά προκαλείται σταδιακή αύξηση στην απελευθέρωση των πρωτεϊνών και στη συνέχεια φτάνει σε μια σταθερή κατάσταση. Στην περίπτωση της TiO₂ φωτοκατάλυσης για το βακτήριο *E. coli*, η μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλύτη οδήγησε σε μεγαλύτερη διαρροή της ποσότητας πρωτεϊνών (23,01 μg/mL), συγκριτικά με τη χαμηλότερη συγκέντρωση καταλύτη (15,35 μg/mL) μέσα σε 20 min και ακολούθησε η διεργασία της οζόνωσης, κατά την οποία απελευθερώθηκε η μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών με τιμή 10,44 μg/mL σε διάρκεια 15 min.

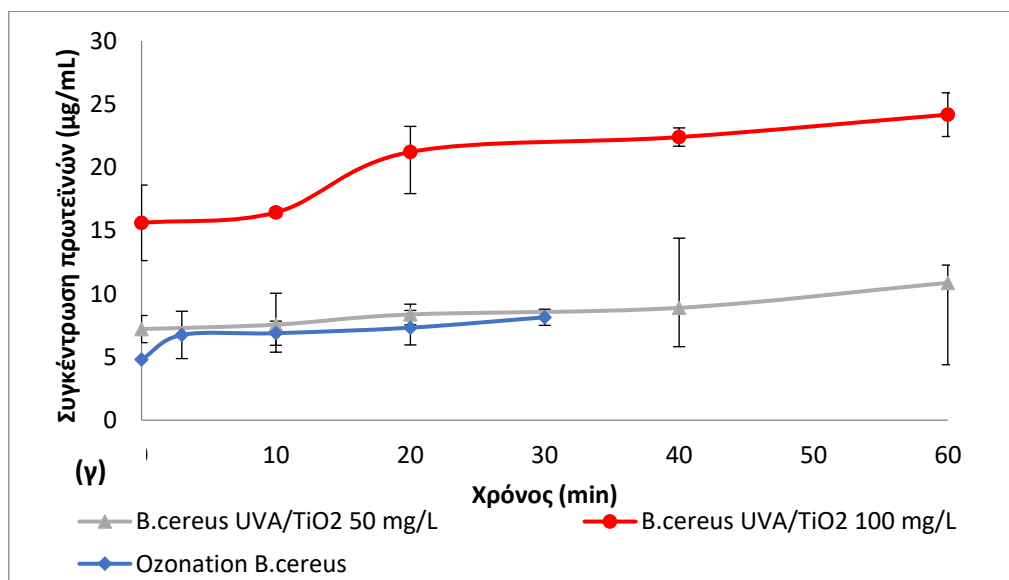
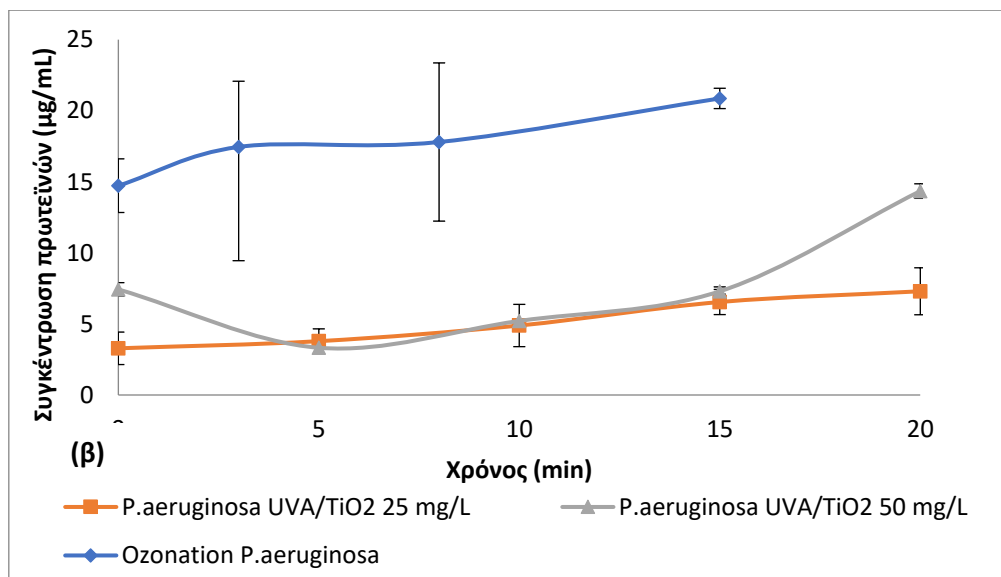
Κατά την επεξεργασία με όζον, το επίπεδο της απελευθέρωσης των πρωτεϊνών στα κύτταρα της *P. aeruginosa* σταδιακά αυξάνεται, μέχρι που φτάνει τη μέγιστη τιμή 20,87 $\mu\text{g/mL}$ σε 15 min επεξεργασίας. Κατά τη φωτοκαταλυτική διεργασία (50 mg/L) η διαρροή πρωτεϊνών από 7,43 $\mu\text{g/mL}$ μειώθηκε σε 3,32 $\mu\text{g/mL}$ μέσα στα πρώτα 5 min και στη συνέχεια αυξήθηκε και πάλι, ώσπου στα 20 min είχε τιμή 14,35 $\mu\text{g/mL}$. Πιθανό λόγο αυτής της μικρής μείωσης αποτελεί η στερεοποίηση του ενδοκυτταρικού υλικού που περιλαμβάνει πρωτεΐνες παρουσία των αντιδραστικών ειδών.

Η διεργασία της φωτοκατάλυσης, και συγκεκριμένα η χρήση μεγαλύτερης συγκέντρωσης καταλύτη, 50 και 100 mg/L για τα *E. coli* και *B. cereus* αντίστοιχα, φαίνεται ότι επιφέρει μεγαλύτερη ζημιά στις μεμβράνες των κυττάρων συγκριτικά με το όζον. Έτσι, η διαδικασία της φωτοκατάλυσης προκάλεσε περισσότερες ζημιές στην κυτταρική μεμβράνη των *E. coli* και *B. cereus*. Το ισχυρό αποτέλεσμα της διεργασίας αυτής οφείλεται είτε στα ενεργά είδη, είτε στα οξειδωτικά μέσα, όπως είναι οι ελεύθερες ρίζες. Αντίθετα, μεγαλύτερη ζημιά στη μεμβράνη των κυττάρων της *P. aeruginosa* φαίνεται να επιφέρει το όζον, πράγμα που οφείλεται στην παρουσία ενεργών ειδών, είτε στα οξειδωτικά μέσα, όπως είναι οι ελεύθερες αντιδραστικές ρίζες και το όζον (Ersoy et al., 2019).

Ακόμα, κατά τη διάρκεια των δύο απολυμαντικών μεθόδων και για τους τρεις βιοδείκτες η συγκέντρωση των πρωτεϊνών δε μειώνεται, πράγμα το οποίο πιθανότατα σημαίνει ότι τα βακτήρια διατήρησαν την αποτελεσματική αμυντική τους ικανότητα ενάντια στο οξειδωτικό στρες. Αυτό όμως για να το πούμε με βεβαιότητα θα έπρεπε να έχει γίνει μέτρηση και του πρωτεϊνικού καρβονυλικού επιπέδου (Sun et al., 2014).

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα αυτά με τις καμπύλες αδρανοποίησης των βακτηρίων (εικόνες 11 & 13), βρήκαμε ότι οι συγκεντρώσεις των πρωτεϊνών που ανιχνεύθηκαν είναι ανάλογες με τα νεκρά βακτήρια. Όταν τα περισσότερα ή σχεδόν όλα τα κύτταρα είχαν απενεργοποιηθεί, σημειώθηκε η μεγαλύτερη διαρροή πρωτεϊνών.





Εικόνα 17: Απελευθέρωση πρωτεϊνών από τα κύτταρα των (α) *E. coli* (β) *P. aeruginosa* (γ) *B. cereus* κατά την επεξεργασία με UVA ακτινοβολία και TiO_2 και με οζόνωση.

7.2.4 SDS – PAGE ηλεκτροφόρηση

Στην κυτταρική μεμβράνη και στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων βρίσκονται πολλές πρωτεΐνες με βασικές φυσιολογικές λειτουργίες (Long et al., 2015). Οι παρακάτω εικόνες έδειξαν ότι κατά τις δύο μεθόδους απολύμανσης, οι ολικές πρωτεΐνες υπέστησαν βλάβη σε διαφορετικά επίπεδα. Για να αποκτήσουμε περισσότερες λεπτομέρειες σχετικά με την επίδραση των απολυμαντικών τεχνικών στις ενδοκυτταρικές πρωτεΐνες, διεξήχθη η ανάλυση SDS-PAGE. Οι πρωτεϊνικές ζώνες με μοριακά βάρη 11-245 kDa έδειξαν εξάρτηση με το χρόνο κατά τη φωτοκαταλυτική αδρανοποίηση και κατά την οζόνωση. Στα εναιωρήματα των βακτηρίων βρέθηκαν

πολλές πρωτεϊνικές ζώνες, ακόμα και αυτές των 35, 37 και 47 kDa, οι οποίες αντιπροσωπεύουν τις κύριες πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος (Kim et al., 2007, Cho et al., 2010, Long et al., 2015, Ersoy et al., 2019).

Τα πρωτεϊνικά προφίλ της ανεπεξέργαστης *E. coli* δε διέφεραν από εκείνα, που είχαν υποστεί επεξεργασία με φωτοκατάλυση. Ακόμα ούτε τα πρωτεϊνικά προφίλ του βακτηρίου που είχαν υποστεί επεξεργασία με διαφορετικές συγκεντρώσεις καταλύτη διέφεραν. Η λήψη του εναιωρήματος μετά την επεξεργασία με UVA ακτινοβολία και TiO_2 καταλύτη για το *E. coli*, έδειξε σχεδόν το ίδιο μοτίβο, παρόλου που οι εντάσεις των ζωνών κατά τη φωτοκατάλυση με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση καταλύτη ήταν ελαφρώς ασθενέστερες σε σχέση με την μικρότερη συγκέντρωση καταλύτη.

Για το ίδιο βακτήριο κατά την επεξεργασία με όζον, παρατηρείται σταδιακή εξασθένηση της έντασης των πρωτεϊνών σε σχέση με το χρόνο έκθεσης στο όζον, αλλά η τάση μείωσης της έντασης δεν είναι σημαντική. Μετά τα 8 και τα 15 min έκθεσης του βακτηρίου στο όζον, έχει εξαφανιστεί η πρώτη ζώνη με μοριακό βάρος 180 kDa, η οποία ήταν εμφανής στο δείγμα του μάρτυρα και σ' αυτό των 3 min. Κατά τη διάρκεια των δύο βακτηριοκτόνων διεργασιών, η ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών δεν παρουσίασε προφανή μείωση, πράγμα που δηλώνει ότι η συγκέντρωση των πρωτεϊνών δεν έχει μειωθεί εμφανώς (Shi et al., 2019).

Για το βακτήριο *P. aeruginosa* ανιχνεύθηκαν ελάχιστες διαφορές στο πρωτεϊνικό προφίλ του μάρτυρα και των επεξεργασμένων με φωτοκατάλυση δειγμάτων. Η ένταση των ζωνών παρουσίασε μικρή αύξηση με την αύξηση του χρόνου έκθεσης του βακτηρίου στην ακτινοβολία και με την αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη. Αναλυτικότερα, 50 mg/L καταλύτη οδήγησαν σε ισχυρότερης έντασης ζώνες και η αύξηση της έντασης παρατηρήθηκε σε ζώνες και μικρότερου και μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Η αύξηση της έντασης των ζωνών συνεπάγεται την εξαγωγή ή την απελευθέρωση πρωτεϊνών στο διάλυμα του κυτταρικού εναιωρήματος από την φωτοκατάλυση (Kim et al., 2007). Αντίθετα, κατά την οζόνωση η ένταση των ζωνών εξασθενεί σταδιακά με την αύξηση του χρόνου επεξεργασίας της *P. aeruginosa*, ώπου στον τελευταίο χρόνο, 15 min, εξαφανίζονται κάποιες ζώνες, κυρίως μικρότερου μοριακού βάρους. Αυτό υποδηλώνει ότι το όζον μπορεί να προκάλεσε το θάνατο του βακτηρίου μέσω της καταστροφής των πρωτεϊνών.

Πολλές πρωτεϊνικές ζώνες παρατηρήθηκαν για το δείγμα μάρτυρα του *B. cereus*, ενώ λιγότερες ζώνες παρατηρήθηκαν για τα ίδια κύτταρα μετά την έκθεσή τους στη διεργασία της φωτοκατάλυσης. Η ένταση των επεξεργασμένων ζωνών μειώθηκε εμφανώς, όπως ακόμα μειώθηκαν ή και εξαφανίστηκαν κάποιες ζώνες με το χρόνο και με την αύξηση της συγκέντρωσης καταλύτη, υποδεικνύοντας ότι η πρωτεϊνική μείωση και η βλάβη των πρωτεϊνών εμφανίστηκε κατά τη διάρκεια της φωτοκαταλυτικής διεργασίας (Shi et al., 2019). Ενώ, η διαδικασία την οζόνωσης φαίνεται ότι επέφερε μικρή αύξηση του αριθμού των ζωνών των επεξεργασμένων δειγμάτων συγκριτικά με αυτές του δείγματος του μάρτυρα και αυτές του χρόνου των 3 min. Οι επιπλέον πρωτεϊνικές ζώνες ήταν τόσο μεγαλύτερου όσο και χαμηλότερου μοριακού βάρους από αυτές που υπάρχουν στο βακτήριο που δεν έχει υποστεί επεξεργασία. Οι πρωτεΐνες χαμηλού μοριακού βάρους πιθανότατα να

προέκυψαν από τον κατακερματισμό των πρωτεϊνών σε μικρότερα πεπτίδια (Cloete et al., 2008).

Οι Sun et al., αναφέρουν την οξειδωτική βλάβη των πρωτεϊνών εξαιτίας της επίθεσής τους από ROS. Ακόμα, κατά την παρατεταμένη φωτοηλεκτροκαταλυτική διαδικασία αδρανοποίησης των βακτηρίων, παρατηρήθηκε διαρροή πρωτεϊνών και νουκλειικών οξέων. Πιο συγκεκριμένα παρατήρησαν ότι κατά τη φωτοηλεκτροκαταλυτική διαδικασία, η ένταση των πρωτεϊνικών ζωνών μειωνόταν σε σχέση με το χρόνο. Η οξείδωση των πρωτεϊνών επιταχύνθηκε μετά τη 1 h επεξεργασίας, υποδηλώνοντας ότι τα ένζυμα υπεράσπισης του κυττάρου (CAT, SOD) απενεργοποιήθηκαν από τις οξειδωτικές ρίζες και οι πρωτεΐνες υπέστησαν οξειδωτική βλάβη. Ενώ κατά τη φωτοκαταλυτική και ηλεκτροχημική διαδικασία σε διάστημα επεξεργασίας 8 h οι πρωτεϊνικές ζώνες διατηρούσαν την έντασή τους. Μετά από ηλιακή ακτινοβολία αναφέρθηκε ότι οι πρωτεΐνες τείνουν να είναι οξειδωμένες και συσσωματωμένες, πιθανώς μέσω της δημιουργίας ROS. Οι Shi et al., επίσης αναφέρουν ότι ο μηχανισμός φωτοαδρανοποίησης της *E. coli* μπορεί να αποδοθεί στη βλάβη της κυτταρικής μεμβράνης και στη διαρροή βιομορίων (πρωτεΐνες & DNA).

Η διαρροή και ο τραυματισμός των πρωτεϊνών δεν αποτελεί καθοριστικό παράγοντα στο θάνατο των βακτηρίων, λόγω της δυνατότητας των βακτηρίων να επιδιορθώνουν βλάβες (Sun et al., 2014, Shi et al., 2019).

Διάφορες ρίζες και άλλα αντιδραστικά είδη οξυγόνου και αζώτου μπορούν να τροποποιήσουν τα αμινοξέα εντός των πρωτεϊνών (έμμεσα ή άμεσα), να καταστρέψουν ζωτικές ομάδες ή να οξειδώσουν μεταλλικά κέντρα μετάβασης. Κάποιες απ' αυτές τις τροποποιήσεις μπορεί να είναι αβλαβείς, ενώ κάποιες άλλες μπορούν να μειώσουν, να αναστείλλουν ή και να τροποποιήσουν τη λειτουργία της πρωτεΐνης. Η λειτουργία των κυττάρων θα τεθεί σε κίνδυνο αν συσσωρευτούν οξειδωτικά τροποποιημένες πρωτεΐνες. Έτσι κρίνεται απαραίτητο κάθε κύτταρο να έχει ένα σύστημα απομάκρυνσης των οξειδωτικά κατεστραμμένων πρωτεϊνών.

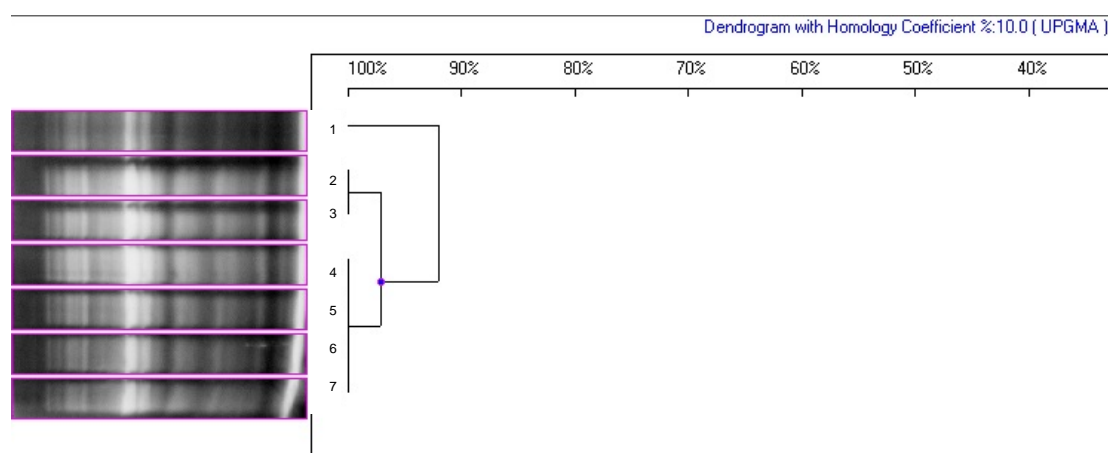
Σχεδόν όλοι οι αερόβιοι οργανισμοί είναι εξοπλισμένοι με περίπλοκους μηχανισμούς άμυνας και επιδιόρθωσης κατά του οξειδωτικού στρες από το περιβάλλον εκτός από τον φυσικό αερόβιο μεταβολισμό μέσα στα βακτήρια. Κάποια παραδείγματα περιλαμβάνουν ένζυμα όπως η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η καταλάση (CAT). Υποτίθεται ότι τα βακτήρια με αυτούς τους αμυντικούς μηχανισμούς κατά του οξειδωτικού στρες θα είναι δυσκολότερο να απενεργοποιηθούν από φωτοκαταλυτική οξείδωση (Leung et al., 2008).

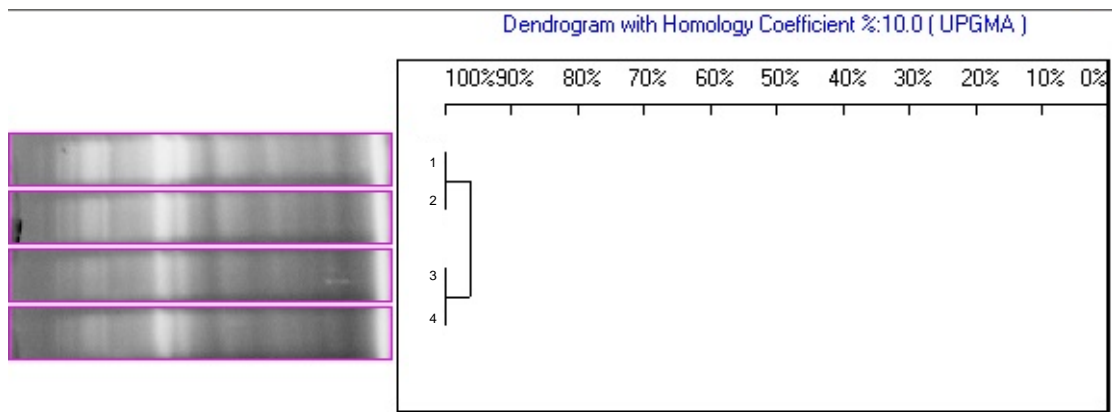
Η απομάκρυνση των ριζών οξυγόνου και η αποτοξίνωση των αντιδραστικών οξειδωτικών, αποτελούν την πρώτη γραμμή άμυνας των κυττάρων για να σταματήσει η τροποποίηση των πρωτεϊνών. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι ένα σχετικά ήπιο οξειδωτικό, αν και μπορεί να αναχθεί για να δημιουργήσει ρίζες υδροξυλίου οι οποίες είναι πολύ πιο αντιδραστικές. Εξαιτίας αυτού κρίνεται σημαντική η απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτό γίνεται κυρίως μέσω της υπεροξειδάσης γλουταθειόνης. Ένα άλλο ισχυρό ένζυμο που συντελεί στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι η καταλάση.

Εκτός από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το ανιόν του υπεροξειδίου είναι επίσης ικανό να αντιδρά με ρίζες χαλκού, σιδήρου ή μονοξειδίου του αζώτου. Ως αποτέλεσμα αυτού, ακόμη και με την αποτελεσματική απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου μέσω της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, υπάρχουν και άλλοι τρόποι με τους οποίους μπορεί να προκληθεί βλάβη στην πρωτεΐνη. Τα κύτταρα έχουν εξελιγμένο το υπεροξείδιο της δισμουτάσης (SOD). Το SOD καταλύει το σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου από ρίζες οξυγόνου μειώνοντας έτσι την πιθανότητα αντίδρασης του υπεροξειδίου με χαλκό, σίδηρο ή νιτρικό οξύ. Παρόλο που μπορεί να φαίνεται αντίθετο τα κύτταρα να παράγουν SOD που παράγει υπεροξείδιο του υδρογόνου, φαίνεται ότι ο συνδυασμός SOD και υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης διασφαλίζει ότι το μεγαλύτερο μέρος του παραγόμενου υπεροξειδίου μετατρέπεται ακίνδυνα σε νερό χωρίς να περάσει από το βήμα της ρίζας υδροξυλίου για τη μείωση του οξυγόνου. Η στρατηγική που χρησιμοποιούν τα κύτταρα, φαίνεται να είναι η ελαχιστοποίηση της παραγωγής των ριζών υδροξυλίου (πιο ισχυρή ρίζα οξυγόνου βιολογικής σημασίας) (Pickering & Davies, 2013).

Οι Xiao et al., χρησιμοποίησαν έναν καινοτόμο και αποτελεσματικό βιοϋβριδικό καταλύτη για την απολύμανση του νερού. Εξετάστηκε ο μηχανισμός αδρανοποίησης των βακτηρίων και βρέθηκε ότι τα οξειδωτικά είδη έπαιξαν τον κύριο ρόλο στην αδρανοποίηση των βακτηρίων. Ακόμα, παρατηρήθηκε ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα των βακτηρίων επέδειξε ικανότητα αυτοπροστασίας, εξαλείφοντας τα φωτοεπαγόμενα οξειδωτικά είδη σε αρχικό στάδιο της αδρανοποίησης. Ο μηχανισμός αδρανοποίησης των βακτηρίων ξεκίνησε με τη ρήξη της μεμβράνης, ακολουθούμενη από την οξείδωση και τη διαρροή ενδοκυτταρικών ουσιών.

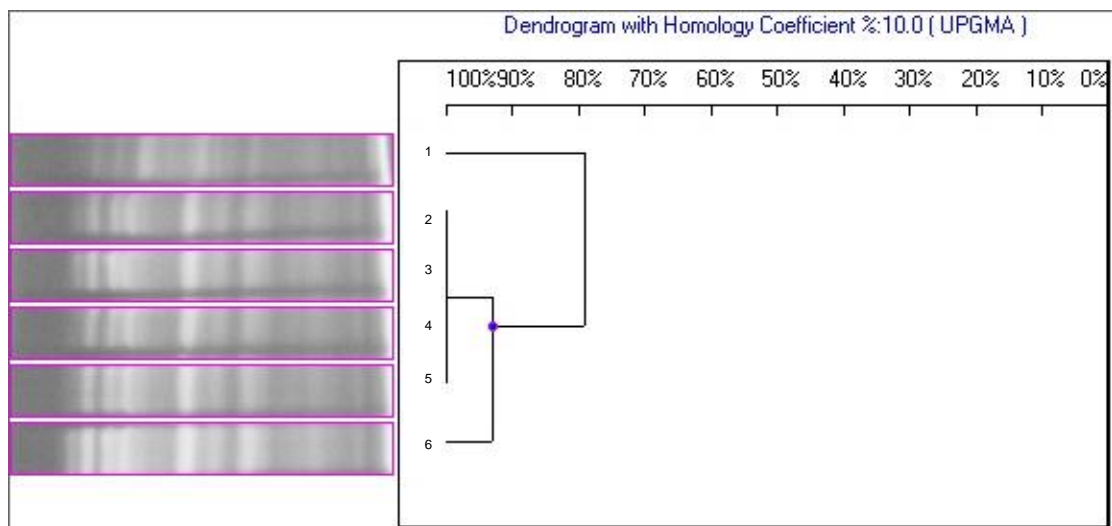
(α)



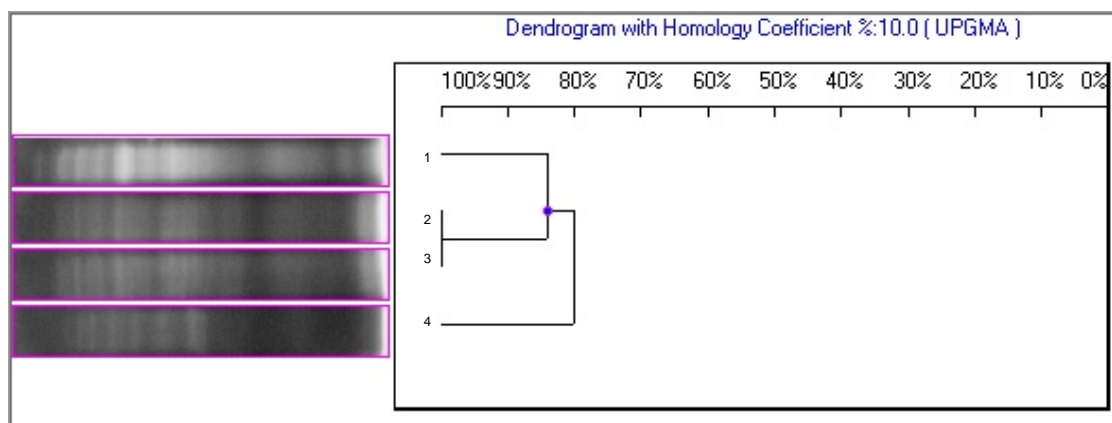


(β)

Εικόνα 18: Ανάλυση κατά συστάδες των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων της *E. coli*. Το δενδρόγραμμα παρήχθη με τη μέθοδο UPGMA. Οι αριθμοί στον οριζόντιο άξονα δείχνουν την % ομοιότητα όπως ορίστηκε από τον συντελεστή συσχέτισης Dice. Στον κάθετο άξονα οι αριθμοί αντιστοιχούν στα στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία α) με UVA/TiO₂ και β) με οζόνωση. Στην 18 (α) ο αριθμός 1 αφορά στο ανέπαφο κύτταρο, οι αριθμοί 2, 3, 4: στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με 25 mg/L TiO₂ μετά 10, 15 και 20 min αντίστοιχα, -5, 6, 7: δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με 50 mg/L TiO₂ μετά από 5, 10 και 15 min αντίστοιχα. Στην εικόνα 18 (β) ο αριθμός 1 αφορά στο ανέπαφο κύτταρο, οι αριθμοί 2, 3, 4: στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με όζον μετά από 3, 8 και 15 min αντίστοιχα.

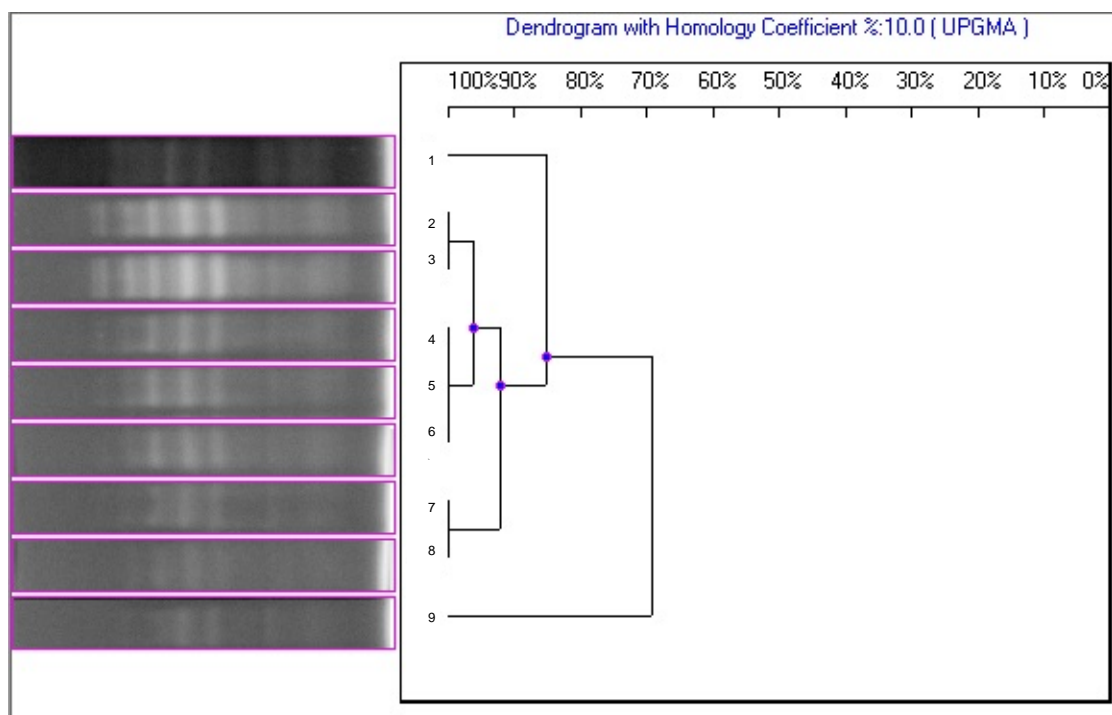


(α)

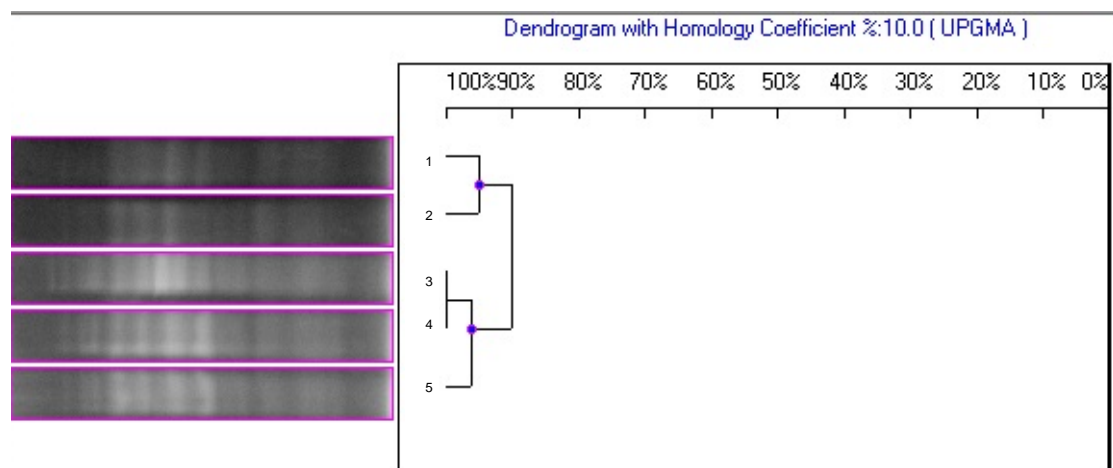


(β)

Εικόνα 19: Ανάλυση κατά συστάδες των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων της *P. aeruginosa*. Το δενδρόγραμμα παρήχθη με τη μέθοδο UPGMA. Οι αριθμοί στον οριζόντιο άξονα δείχνουν την % ομοιότητα όπως ορίστηκε από τον συντελεστή συσχέτισης Dice. Στον κάθετο άξονα οι αριθμοί αντιστοιχούν στα στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία α) με UVA/TiO₂ και β) με οζόνωση. Στην εικόνα 19 (α) ο αριθμός 1 αφορά στο ανέπαφο κύτταρο, οι αριθμοί 2, 3, 4: στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με 25 mg/L TiO₂ μετά 10, 15 και 20 min αντίστοιχα, -5, 6: δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με 50 mg/L TiO₂ μετά από 10 και 15 min αντίστοιχα. Στην εικόνα 19 (β) ο αριθμός 1 αφορά στο ανέπαφο κύτταρο, οι αριθμοί 2, 3, 4: στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με όζον μετά από 3, 8 και 15 min αντίστοιχα.



(α)



(β)

Εικόνα 20: Ανάλυση κατά συστάδες των πρωτεϊνικών αποτυπωμάτων του *B. cereus*. Το δενδρόγραμμα παρήχθη με τη μέθοδο UPGMA. Οι αριθμοί στον οριζόντιο άξονα δείχνουν την % ομοιότητα όπως ορίστηκε από τον συντελεστή συσχέτισης Dice. Στον κάθετο άξονα οι αριθμοί αντιστοιχούν στα στελέχη που υπέστησαν επεξεργασία α) με UVA/TiO₂ και β) με οζόνωση. Στην εικόνα 20 (α) ο αριθμός 1 αφορά στο ανέπαφο κύτταρο, οι αριθμοί 2, 3, 4, 5: στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με 50 mg/L TiO₂ μετά 10, 20, 40 και 60 min αντίστοιχα, -6, 7, 8, 9: δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με 100 mg/L TiO₂ μετά από 10, 20, 40, 60 min αντίστοιχα. Στην εικόνα 20 (β) ο αριθμός 1 αφορά στο ανέπαφο κύτταρο, οι αριθμοί 2, 3, 4, 5: στα δείγματα που υπέστησαν επεξεργασία με όζον μετά από 3, 10, 20 και 30 min αντίστοιχα.

8. Συμπεράσματα

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την καταστροφή των μικροοργανισμών ποικίλουν, η δόση του απολυμαντικού, ο χρόνος επαφής, η θερμοκρασία είναι κάποιοι απ' αυτούς. Επιπλέον, σημαντικό παράγοντα για μια αποτελεσματική απολυμαντική διεργασία αποτελεί το είδος του βακτηρίου, καθώς είναι πιθανό οι μηχανισμοί απενεργοποίησης να διαφέρουν ανάλογα με το είδος του βακτηρίου. Η παρούσα μελέτη επικεντρώθηκε στην περιγραφή ενός πιο λεπτομερή μηχανισμού αδρανοποίησης δύο Gram αρνητικών (*E. coli* & *P. aeruginosa*) και ενός Gram θετικού βακτηρίου (*B. cereus*) με τη μέθοδο της TiO_2 φωτοκατάλυσης και της οζόνωσης. Τα κυριότερα αποτελέσματα που εξάγονται από την παρούσα εργασία συνοψίζονται παρακάτω:

- Και οι δύο απολυμαντικές τεχνικές αποδείχτηκαν αποτελεσματικές στην αδρανοποίηση των βακτηρίων. Ωστόσο, το όζον προσδιορίστηκε ως το ισχυρότερο απολυμαντικό, καθώς αδρανοποίησε τα Gram αρνητικά και το Gram θετικό βακτήριο σε μικρότερο χρονικό διάστημα, 15 και 30 min αντίστοιχα.
- Κατά τη φωτοκαταλυτική διαδικασία η αύξηση της συγκέντρωσης του καταλύτη TiO_2 , οδήγησε σε υψηλότερο ρυθμό αδρανοποίησης και των δύο ειδών βακτηρίων.
- Ακόμα, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ανθεκτικότητα του Gram θετικού βακτηρίου (*B. cereus*) συγκριτικά με τα Gram αρνητικά (*E. coli*, *P. aeruginosa*), έπειτα και από τις δύο μεθόδους απολύμανσης, παρά την πιο περίπλοκη εξωτερική δομή των τελευταίων.
- Τα επίπεδα εκ νέου ανάπτυξης των βακτηρίων υπό σκοτάδι και υπό φυσικό φωτισμό που καταγράφηκαν ήταν πολύ χαμηλά, με υψηλότερα τα επίπεδα φωτοενεργοποίησης της *E. coli*.
- Τα αποτελέσματα υποστήριξαν ότι κύριο στόχο δράσης του όζοντος και του καταλύτη TiO_2 αποτελεί το κυτταρικό τοίχωμα και αμέσως μετά η κυτταρική μεμβράνη αυτών των βακτηρίων.
- Η αντιβακτηριακή φωτοκαταλυτική δραστηριότητα και η δράση του όζοντος συνοδεύτηκαν από υπεροξείδωση των λιπιδίων και καταστροφή του MDA, η οποία εξελίχθηκε με εκθετικό ρυθμό με την πάροδο του χρόνου. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων επέφερε ρήξη της δομής της κυτταρικής μεμβράνης και σχετίστηκε με τον υποκείμενο μηχανισμό αδρανοποίησης των βακτηρίων.
- Ο προσδιορισμός υδρόλυσης ONPG, κατόπιν φωτοκαταλυτικής και οζονωτικής επεξεργασίας, έδειξε μεταβολές, οι οποίες υποδεικνύουν την αύξηση της διαπερατότητας της κυτταρικής μεμβράνης επιτρέποντας τη διείσδυση του κυτοπλάσματος στο εξωτερικό διάλυμα.
- Όσον αφορά τις ολικές πρωτεΐνες, η διαρροή τους αυξήθηκε κατά τη διάρκεια της βακτηριακής απενεργοποίησης. Παρουσιάστηκαν αλλαγές στα πρωτεϊνικά προφίλ κατά τη διάρκεια της απολύμανσης, με πιο έντονη διάκριση για το *B. cereus* κατά τη διάρκεια της φωτοκατάλυσης.

Η πραγματική σύγκριση που πρέπει να εξεταστεί είναι μεταξύ του τοιχώματος του Gram (+) και της εξωτερικής μεμβράνης του Gram (-), καθώς το καθένα

αντιπροσωπεύει την πρώτη γραμμή άμυνας. Η πολυπλοκότητα του κυτταρικού τοιχώματος παραμένει μια νεφελώδης παράμετρος και τα συμπεράσματα σχετικά με τον ρόλο του στην αντίσταση κατά την απολύμανση είναι ακόμη δύσκολο να είναι οριστικά.

9. Βιβλιογραφία

1. Ahmed S., Rasul M.G., Brown R., Hashi M.A., 2011, Influence of parameters on the heterogeneous photocatalytic degradation of pesticides and phenolic contaminants in wastewater: A short review. *Journal of Environmental Management* 92 (3): 311-330.
2. Allen J.M., Allen S.K., Baertschi S.W., 2000, 2-Nitrobenzaldehyde: a convenient UV-A and UV-B chemical actinometer for drug photostability testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 24: 167–178.
3. Bédard E., Prévost M., Déziel E., 2016, *Pseudomonas aeruginosa* in premise plumbing of large buildings. *Microbiologyopen*. 6: 937–956.
4. Bottone, E. J. (2010). *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 23: 382–398.
5. Bradford M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254.
6. Cai R., Zou S., Zhang B., Li M., He Z., 2018, Highly-efficient Photocatalytic Disinfection of *Escherichia coli* under Visible Light Using Carbon Supported Vanadium Tetrasulfide Nanocomposites, *Applied Catalysis B: Environmental* 224: 383-393.
7. Carp O., Huisman C. L., Reller L., 2004, Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Progress in Solid State Chemistry*, 32: 33-177.
8. Chen P.J., Yang L., Wang L.K., Zhang B., 2007, Advanced Physicochemical Treatment Processes, *Handbook of Environmental Engineering*, Edited by: Wang L.K., Hung Y.T. and Shammas N.K., The Humana Press Inc., Totowa, NJ.
9. Cho M., Kim J., Kim J.Y., Yoon J., Kim J.H., 2010, Mechanisms of *Escherichia coli* inactivation by several disinfectants, *Water research* 44(11):3410 – 3418.
10. Cho M. & Yoon J., 2008, Measurement of OH radical CT for inactivating *Cryptosporidium parvum* using photo/ferrioxalate and photo/TiO₂ systems. *Journal of Applied Microbiology* 104: 759–766.
11. Cloete T.E., Thantsha M.S., Maluleke M.R., Kirkpatrick R., 2009, The antimicrobial mechanism of electrochemically activated water against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as determined by SDS-PAGE analysis. *Journal of Applied Microbiology*.

12. Constanza C. & Ricard M., 2018, Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: A review of recent literature. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 831:1-12.
13. Diéguez-Casal E., Freixeiro P., Costoya L., Criado M.T., Ferreirós C., Sánchez S., 2014, High resolution clear native electrophoresis is a good alternative to blue native electrophoresis for the characterization of the *Escherichia coli* membrane complexes. *Journal of Microbiological Methods* 102: 45 – 54.
14. D Blount Z., 2015, The unexhausted potential of *E. coli*, *eLife*, 4: e05826.
15. Durrani R., Abubakar M., Arshed M.J., Saleha S., Ullah I., Ali Q., 2008, Biological characteriazation and proteinprofiles of two model bacteria by SDS-PAGE and FT-IR. *ARPJ Journal of Agricultural and Biological Science*, 3.
16. Elgaml A., Hassan R., Barwa R., Shokralla S., El-Naggar W., 2014, Antimicrobial susceptibility and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) typing of Gram-negative bacteria isolated from urinary tract infections in Mansoura, Egypt. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 6(2): 43-50.
17. Ersoy Z.G., Dinc O., Cinar B., Gedik S.T., Dimoglo A., 2019, Comparative evaluation of disinfection mechanism of sodium hypochlorite, chlorine dioxide and electroactivated water on *Enterococcus faecalis*, *LWT- Food Science and Technology* 102: 205 – 213.
18. Ersoy Z.G., Barisci S., Dinc O., 2019, Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone, *LWT – Food Science and Technology* 100: 306 – 313.
19. Fernandez – Ibanez P., Polo-Lopez M.I., Malato S. et al., 2015, Solar photocatalytic disinfection of water using titanium dioxide grapheme composites, *Chemical Engineering Journal* 261: 36 – 44.
20. Foster H.A., Ditta I.B., Varghese S, Steele A., 2011, Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1847 – 1868.
21. Galbavya E.S., Ram K., Anastasio C., 2000, 2-Nitrobenzaldehyde as a chemical actinometer for solution and ice photochemistry. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 209: 186 – 192.
22. Gaya U.I. and Abdullah A.H., 2008, Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* 9: 1-12.

23. Gerrity D., Ryu H., Crittenden J., Abbaszadegan M., 2014, Photocatalytic inactivation of viruses using titanium dioxide nanoparticles and low-pressure UV light. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 43(11): 1261-1270.
24. Gogate P.R., Pandit A.B., 2004, A review of imperative technologies for wastewater treatment I oxidation technologies at ambient conditions. *Journal of Advances in Environmental Research* 8: 501–551.
25. Han, L., Patil, S., Boehm, D., Milosavljevic, V., Cullen, P. J., & Bourke, P. (2015). Mechanisms of Inactivation by High-Voltage Atmospheric Cold Plasma Differ for *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(2): 450–458.
26. Huang Z., Maness P.C., Blake D.M., Wolfrum, E.J., Smolinski S.L., Jacoby W.A., 2000, Bactericidal mode of titanium dioxide photocatalysis. *J. Photochem. Photobio. A* 130: 163 - 170.
27. Ibáñez J.A., Litter M.I., Pizarro R.A., 2003, Photocatalytic bactericidal effect of TiO₂ on *Enterobacter cloacae* comparative study with other Gram (–) bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 157: 81-85.
28. Ibrahim R., Shi M. & Wu C., 2004, The Effect of Immobilized Anatase Photocatalyst Nanopowder in the UV-A Mediated Killing of *Escherichia coli* B23, *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 12: 67-71.
29. Katircioglu, H., B. Aslim, Z.N. Yuksekdao, N. Mercan and Y. Beyatli, 2003. Production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) and differentiation of putative *Bacillus* mutant strains by SDS-PAGE of total cell protein. *Afr. J. Biotechnol.*, 2: 147-149.
30. Khan F.M., Gupta R., 2019, *Escherichia coli* (E. coli) as an indicator of fecal contamination in water: A review. Preprints 2019100081.
31. Kim, S., Ghafoor, K., Lee, J., Feng, M., Hong, J., Lee, D.U. and Park, J. (2013) Bacterial inactivation in water, DNA strand breaking, and membrane damage induced by ultraviolet-assisted titanium dioxide photocatalysis. *Water Res* 47: 4403–4411.
32. Kim, S. R., Rhee, M. S., Kim, B. C., Lee, H., & Kim, K. H. (2007). Modeling of the inactivation of *Salmonella typhimurium* by supercritical carbon dioxide in physiological saline and phosphate-buffered saline. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1): 132–141.
33. Kubacka A, Ferrer M, Martínez-Arias A, Fernández-García M., 2008, Ag promotion of TiO₂-anatase disinfection capability: study of *Escherichia coli* inactivation. *Appl Catal B*. 84 (1–2): 87–93.

34. Kuhn K.P., Chaberny I.F., Massholder K., Stickler M., BenzV.W., Sonntag H.G., Erdinger L., 2003, Disinfection of surfaces by photocatalytic oxidation with titanium dioxide and UVA light. *Chemosphere* 53: 71–77.
 35. Laemmli U.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Leung T.Y., Chan C.Y., Hu C., Yu J.C., Wong P.K., 2008, Photocatalytic disinfection of marine bacteria using fluorescent light. *water research* 42: 4827–4837.
36. Long Y., Jinren N., Zuhui W., 2015, Subcellular mechanism of *Escherichia coli* inactivation during electrochemical disinfection with boron-doped diamond anode: A comparative study of three electrolytes. *Water Research* 84: 198 – 206.
 37. Lotte P. Stenfors Arnesen, Fagerlund A., Granum P.E., 2008, From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 (4): 579-606.
 38. Makropoulou T., Panagiotopoulou P., Venieri D., 2019, N-doped TiO₂ photocatalysts for bacterial inactivation in water. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 93 (9): 2518-2526.
 39. Malato S., Fernández-Ibáñez P., Maldonado M.I., Blanco J., Gernjak W., 2009, Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends. *Catalysis Today* 147: 1–59.
 40. Maness, P.C., Smolinski, S., Blake, D.M., Huang, Z., Wolfrum, E.J., Jacoby, W.A., 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (9): 4094-4098.
 41. Manousaridis G., Nerantzaki A., Paleologos E.K., Tsiotsias A., Savvaidis I.N., Kontominas M.G., 2005, Effect of ozone on microbial, chemical and sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology* 22 (1): 1 – 9
 42. Markowska-Szczupak A, Ulfig K, Morawski AW, 2011, The application of titanium dioxide for deactivation of bioparticulates: an overview. *Catal Today*. 169(1): 249–57.
- Mena, K. & Gerbab, C., 2009. Risk Assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in Water. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 201: 71-115.
43. Metcalf & Eddy, 2007, Μηχανική Υγρών Αποβλήτων: Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση, Αθήνα, Εκδόσεις Τζιόλα

44. Nahim-Granados S., Rivas-Ibanez G., Sanchez Perez J.A., Oller I., Malato S., Polo-Lopez M.I., 2020, Synthetic fresh-cut wastewater disinfection and decontamination by ozonation at pilot scale, *Water Research* 170: 115304.
45. Nowakowski A.B., Wobig W.J., Petering D.H., 2014, Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. *Metallomics* 6(5): 1068 – 1078.
46. Parsons S., *Advanced oxidation processes for water and wastewater treatment*, Iwa Publishing, 2004.
47. Pelaez M., Nolan N.T., Pillai S.C., Seery M.K., Falaras P., Kontos A.G., Dunlop P.S.M., Hamilton J.W.J., Byrne J.A., O'Sheaf K., Entezari M.H., Dionysiou D., 2012, A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. *Applied Catalysis B: Environmental* 125: 331-349.
48. Pepper I.L., Gerba C.P., Gentry T.J., *Environmental Microbiology* 3rd Edition, 2014, Academic Press. Chapter 29- Disinfection.
49. Pickering A.M. and Davies K.J.A., 2012, Degradation of Damaged Proteins - The Main Function of the 20S Proteasome. *Prog. Mol. Biol. Transl Sci.* 109: 227–248.
50. Pigeot-Remy, S., Simonet, F., Atlan, D., Lazzaroni, J.C., Guillard, C., 2012. Bactericidal efficiency and mode of action: a comparative study of photochemistry and photocatalysis. *Water Res.* 46 (10): 3208-3218.
51. Pigeot-Rémy S., Simoneta F., Errazuriz-Cerdad E., Lazzaronie J.C., Atlane D., Guillard C., 2011, Photocatalysis and disinfection of water: Identification of potential bacterial targets. *Applied Catalysis B: Environmental* 104: 390 – 398.
52. Rincón A.G. & Pulgarin C., 2004, Field solar *E. coli* inactivation in the absence and presence of TiO₂: is UV solar dose an appropriate parameter for standardization of water solar disinfection?. *Solar Energy* 77 (5): 635-648.
53. Rojas-Valencia M.N., 2011, Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. Book: *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances* (pp.263-271). Chapter: Research on ozone application as disinfectant and action mechanisms on wastewater microorganisms. Editors: Antonio Méndez-Vilas.
54. Roy S., Kumar V., 2014, A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein. *International Journal of Science and Research (IJSR)*, 3(8).

55. Sazakli E., Leotsinidis M., Vantarakis A., Papapetropoulou M., 2005, Comparative typing of *Pseudomonas* species isolated from the aquatic environment in Greece by SDS-PAGE and RAPD analysis. *Journal of Applied Microbiology* 99: 1191–1203.
56. Schiavano G.F., Carloni E., Andreoni F., Magi S., Chironna M., Brandi G., Amagliani G., 2017, Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples in central Italy and molecular characterization of *oprD* in imipenem resistant isolates. *PLoS One*, (12): e0189172.
57. Shi Y., Cao X.E., Tang F., Du H.R., Wang Y.Z., Qiu X.Q., Yu H.P., Lu B., 2009, In vitro toxicity of surface water disinfected by different sequential treatments, *Water Research* 43 (1): 218-228.
58. Shi H., Fan J., Zhao Y., Hu X., Zhang X., Tang Z., 2019, Visible light driven CuBi₂O₄/Bi₂MoO₆ p-n heterojunction with enhanced photocatalytic inactivation of *E. coli* and mechanism insight. *Journal of Hazardous Material*, 381: 121006.
59. Shi H., Wang C., Zhao Y., Liu E., Fan J., Ji Z., 2019, Highly efficient visible light driven photocatalytic inactivation of *E. coli* with Ag QDs decorated Z-scheme Bi₂S₃/SnIn₄S₈ composite. *Applied Catalysis B: Environmental* 254: 403 – 413.
60. Skorba E.V., Antonouskayab L.I., Belyasovab N.A., Shchukinc D.G., Möhwalde H., Sviridov D.V., 2008, Antibacterial activity of thin-film photocatalysts based on metal-modified TiO₂ and TiO₂:In₂O₃ nanocomposite, *Applied Catalysis B: Environmental* 84: 94-99.
61. Soni A., Oey I., Silcock P., Bremer P., 2016, *Bacillus* Spores in the Food Industry: A Review on Resistance and Response to Novel Inactivation Technologies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (6): 1139 - 1148.
62. Sun H., Li G., Nie X., Shi H., Wong P.K., Zhao H., An T., 2014, Systematic Approach to In-Depth Understanding of Photoelectrocatalytic Bacterial Inactivation Mechanisms by Tracking the Decomposed Building Blocks. *Environmental Science of Technology* 48: 9412–9419.
63. Swetha S., Santhosh S.M., Geetha B.R., 2010, enhanced bactericidal activity of modified titania in sunlight against *Pseudomonas aeruginosa*, a water-borne pathogen. *Photochemistry and Photobiology*, 86: 1127–1134.
64. Van Grieken, R. et al., 2010. Comparison between the photocatalytic inactivation of Gram-positive *E. faecalis* and Gram - negative *E. coli* faecal contamination indicator microorganisms. *Applied Catalysis B: Environmental* 100 (1-2) : 212-220.

65. Venieri, D., Chatzisyneon, E. & Markogiannaki, E., 2013. Inactivation of *Bacillus anthracis* in water by photocatalytic, photolytic and sonochemical treatment. *Photochem. Photobiol. Sci.* 12(4): 64-52.
66. Reddy P.V.L, Kavitha B., Reddy P.A.K., Kim K.H., 2017, TiO₂-based photocatalytic disinfection of microbes in aqueous media: A review. *Environmental Research* 154: 296 – 303.
67. Wang B., Leung M.K.H., Lu X.Y., Chen S.Y., 2013, Synthesis and photocatalytic activity of boron and fluorine codoped TiO₂ nanosheets with reactive facets. *Applied Energy* 112:1190–1197.
68. Water research Australia, Log removal values of wastewater treatment, Fact sheet, April 2014.
69. Willett K.L., Hites R.A., 2000, Chemical Actinometry: Using o-Nitrobenzaldehyde to Measure Light Intensity in Photochemical Experiments. *Journal of Chemical Education* 77(7).
70. Wolfrum EJ, Huang J, Blake DM, Maness PC, Huang Z, Fiest J, Jacoby WA., 2002, Photocatalytic oxidation of bacteria, bacterial and fungal spores, and model biofilm components to carbon dioxide on titanium dioxide-coated surfaces. *Environ Sci Technol.* 36(15): 3412–9.
71. Wu D., You H., Jin D., Li X., 2011, Enhanced inactivation of *Escherichia coli* with Ag-coated TiO₂ thin film under UV-C irradiation, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 217: 177 – 183.
72. Wu X., Koiwa H., 2012, One-step casting of Laemmli discontinued sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis gel. *Analytical Biochemistry* 421(1): 347 – 349.
73. Xiao K., Wang T., Sun M., Hanif A., Gu Q., Tian B., Jiang Z., Wang B., Sun H., Shang J., Wong P.K., 2020, Photocatalytic Bacterial Inactivation by a Rape Pollen-MoS₂ Biohybrid Catalyst: Synergetic Effects and Inactivation Mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* 54 (1): 537–549
74. Yan Y., Zhou X., Yu P., Li Z., Zheng T., 2020, Characteristics, mechanisms and bacteria behavior of photocatalysis with a solid Z-scheme Ag/A, gBr/g-C₃N₄ nanosheet in water disinfection. *Applied Catalysis A: General*, 590.
75. Yang W., Yang D., Zhu S.Y., Chen B.Y., Huo M.X., Li J.W., 2012, The synergistic effect of *Escherichia coli* inactivation by sequential disinfection with low level chlorine dioxide followed by free chlorine. *Journal of Water and Health*, 4: 557-64.

76. Yu S., Yu P., Wang J., Li C., Guo H., Liu C., Kong L., Yu L., Wu S., Lei T., Chen M., Zeng H., Pang R., Zhang Y., Wei X., Zhang J., Wu Q., Yu D., 2020, A Study on Prevalence and Characterization of *Bacillus cereus* in Ready-to-Eat Foods in China. *Front. Microbiol.*
77. Zamora, R., Alaiz, M. and Hidalgo, J. F., 1997, Feed-Back inhibition of oxidative stress by oxidized lipid/amino acid reaction products. *Biochemistry*. 36: 15765-15771.
78. Zeb A. & Ullah F, 2016, A simple Spectrophotometric Method for the Determination of Thiobarbituric Acid Reactive Substances in Fried Fast Foods. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. Article ID 9412767.
79. Zhang Y., Qingping W., Zhang J., Yang X., 2016, Alteration in *Escherichia coli* and *Streptococcus faecalis* cells induced by ozone. *SDRP Journal of Food Science & Technology*, 1(3).
80. Ανδρεαδάκης Α., Μαμάης Δ., Γαβαλάκη Ε., 2005, «Απολύμανση Λυμάτων», Εργαστήριο Υγειονομικής Τεχνολογίας, Σχολή Πολιτικών Μηχανικών Ε.Μ.Π. Αθήνα.
81. Βενιέρη Δανάη, 2005, Προσδιορισμός της ανθρώπινης ή μη προέλευσης του κολοβακτηριδίου που απομονώνεται από το υδάτινο περιβάλλον με καλλιεργητικές και μοριακές τεχνικές, Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Ιατρικής, Πάτρας.
82. Γαλανοπούλου Μ., 2013, Μελέτη διατάξεων φωτοκατάλυσης για διάσπαση ρύπων, Ειδική Ερευνητική Εργασία, Σχολή Θετικών επιστημών, Τμήμα Φυσικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.
83. Δημητρακοπούλου Δ., 2013, Ετερογενής φωτοκαταλυτική διάσπαση της αντιβιοτικής ουσίας 'αμοξικιλίνη' σε υδατικά διαλύματα, Πολυτεχνείο Κρήτης.
84. Δρόσου Α., 2007, Φωτοκαταλυτική απολύμανση νερού παρουσία διοξειδίου του τιτανίου και υπεροξικού οξέος, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
85. Δρούμπαλη, Α., 2010, Έλεγχος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με χρήση UV-A και UV-C ακτινοβολίας, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
86. Ευγενίδου Ε., 2005, Μελέτη της φωτοκαταλυτικής αποικοδόμησης επιλεγμένων οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων σε υδατικά διαλύματα, Τμήμα Χημείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Α.Π.Θ.

87. Κατσανάκη Α., 2012, Φωτοκαταλυτική δράση νανοδομημένων οξειδίων του Τιτανίου σε πρότυπους αντιδραστήρες αερίων ρύπων, Διδακτορική Διατριβή.
88. Κυριακόπουλος Σ., 2009, Τριαλογονομεθάνια στο πόσιμο νερό της Αθήνας, BSc Thesis, TEI Δυτικής Μακεδονίας.
89. Μαντζαβίνος Δ., 2015, Τεχνολογία Περιβάλλοντος: Επεξεργασία Βιομηχανικών Υγρών Αποβλήτων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Διαλέξεων, Πανεπιστήμιο Πατρών.
90. Μήτρακας, Μ., 2001. Ποιοτικά χαρακτηριστικά και επεξεργασία νερού, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.
91. Ξεκουκουλωτάκης Ν., 2008, Προηγμένες Διεργασίες Οξείδωσης για την επεξεργασία νερού και υγρών αποβλήτων, Πανεπιστημιακές Παραδόσεις.
92. Παπαποστόλου Ι., 2007, Ο ρόλος του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου και της ρίζας του Σουπεροξειδίου στην σκληρωτική διαφοροποίηση των Μυκήτων, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών.
93. Πολίτη, Ε., 2012, Έλεγχος απολύμανσης νερού και λυμάτων με τη χρήση ηλεκτρόλυσης και φωτοηλεκτροκατάλυσης.
94. Σαζακλή Ε., 2005, Ταυτοποίηση ψευδομονάδων που απομονώνονται από το υδάτινο περιβάλλον, με βιοχημικές, ηλεκτροφορητικές και μοριακές τεχνικές, Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών.
95. Σπύρου Στυλιανός, 2014, Τεχνική Επιτροπή Ε.Δ.Ε.Υ.Α., Διερεύνηση εναλλακτικών τρόπων απολύμανσης του πόσιμου νερού, Ρέθυμνο,
96. Τσίμας Μ., 2007, Ταυτόχρονη επεξεργασία As(III) και χουμικών οξέων με χρήση ετερογενούς φωτοκατάλυσης, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πολυτεχνείο Κρήτης.
97. Φραγγεδάκη Α., 2014, Απολύμανση νερού με τη χρήση φωτοκατάλυσης: Αδρανοποίηση της *Klebsiella pneumoniae* και επίδραση στο γενετικό υλικό της, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
98. Φροντιστής Ζ., 2011, Απομάκρυνση διαταρακτών ενδοκρινικής δράσης από την υδατική φάση με την χρήση προχωρημένων διεργασιών οξείδωσης, Διδακτορική Διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Σχολή Μηχανικών Περιβάλλοντος.