

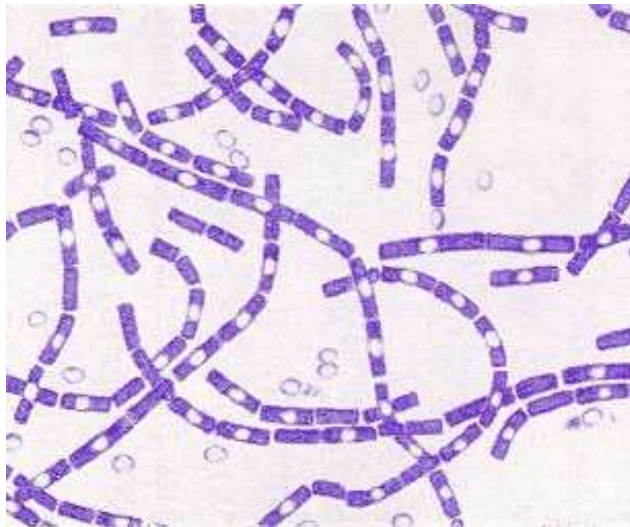


ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ :

**«Αδρανοποίηση του βάκιλλου του άνθρακα με
ακτινοβολία UVA, UVC και υπέρηχους.»**



Συγγραφή: Μαρκογιαννάκη Ευαγγελία

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Βενιέρη Δανάη

~ ΧΑΝΙΑ 2012 ~

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και στο Εργαστήριο Τεχνικής Χημικών Διεργασιών και Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω για την άπογη και άκρως εποικοδομητική συνεργασία καθόλη τη διάρκεια της διπλωματικής, από τα πειράματα έως και τη συγγραφή, τη Λέκτορα κα. Βενιέρη Δανάη. Επίσης ευχαριστώ τον Καθηγητή κ. Διαμαντόπουλο Ευάγγελο, ο οποίος μεσολάβησε για να αναλάβω και να διεξάγω την παρούσα έρευνα, όπως και τον Καθηγητή κ. Μαντζαβίνο Διονύση, ο οποίος τελικά μου την εμπιστεύτηκε.

Δε θα παραλείψω να ευχαριστήσω θερμά την κα. Γουνάκη Ιωσηφίνα για την πολύτιμη και ουσιαστική συνεργασία αλλά και στήριξη τόσο κατά το διάστημα της συνύπαρξης μας στο εργαστήριο Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας, όσο και εκτός. Σημαντική υπήρξε για μένα η καθοδήγηση που μου παρείχε η Δρ. Χατζησυμεών Θάλεια, τόσο στο σχεδιασμό των πειραμάτων όσο και στη συγγραφή της παρούσας διπλωματικής. Το τελευταίο ευχαριστώ ανήκει στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την ψυχολογική στήριξη και αμέριστη συμπαράσταση τους όλο αυτό το διάστημα.

Στον επίλογο αυτής της εργασίας θα ήθελα να τονίσω ότι η εμπειρία μου στο Πολυτεχνείο Κρήτης ήταν γεμάτη όμορφες αναμνήσεις, γνωριμίες, φιλίες και



συνεργασίες που θα θυμάμαι σε όλη μου τη ζωή. Η παρουσία μου εδώ αποτέλεσε για μένα σκαλοπάτι για την εξέλιξη μου, τόσο την πνευματική όσο και την προσωπική. Μόνο καλά έχω να θυμάμαι από αυτόν τον ενάμιση χρόνο που βρίσκομαι στα Χανιά και ευχαριστώ το Θεό που είχα αυτήν την τύχη!

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ολοένα αυξανόμενη έκθεση των ανθρώπων σε παθογόνους μικροβιακούς πληθυσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται και μεταδίδονται μέσω του υδάτινου περιβάλλοντος, καθιστά την ανάγκη της απολύμανσης επιτακτική. Μέχρι σήμερα έχει αναπτυχθεί πληθώρα μεθόδων απολύμανσης του πόσιμου νερού, όπως είναι η χρήση χημικών ενώσεων, η διήθηση και η ακτινοβολία.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής διατριβής ήταν η μελέτη της επίδρασης των ακτινοβολιών UVA, UVC καθώς και των υπερήχων, στην αδρανοποίηση του βάκιλλου του άνθρακα σε νερό. Ο ρυθμός απολύμανσης του νερού μετρήθηκε σε δείγματα νερού, υπό την επίδραση ποικίλων παραμέτρων, όπως είναι η αρχική βακτηριακή συγκέντρωση, η ισχύς του υπέρηχου, η συγκέντρωση καταλύτη, η ενίσχυση της απολυμαντικής δράσης των ακτινοβολιών με την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, καθώς και η χρονική διάρκεια της απολύμανσης.

Το βακτηριακό στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας διπλωματικής διατριβής είναι *Bacillus anthracis* NCTC 10340 (National Collection of Type Cultures, HPA). Λεπτομέρειες για το προαναφερθέν στέλεχος δίνονται παρακάτω.

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας batch με horn-type sonicator, Ultrason 250 (LabPlant, Huddersfield, UK), όπου έχουμε την έκλυση υπερήχων χαμηλής συχνότητας στο μέσο του δοχείου της αντίδρασης. Ο συγκεκριμένος τύπος υπέρηχου δίνει τη δυνατότητα συνεχόμενης είτε διακοπτόμενης λειτουργίας σε καθορισμένη συχνότητα 80 kHz και ισχύ ως 250Watt. Αναφέρεται επίσης ότι όλα τα πειράματα εκτελέστηκαν υπό συνθήκες θερμοκρασίας περιβάλλοντος και συνεχούς ανάδευσης.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα απολύμανσης με τη χρήση ακτινοβολιών UVA και UVC. Και στις δύο περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε αντιδραστήρας ίδιου τύπου με αυτόν του υπέρηχου, ο οποίος ωστόσο μονώθηκε για να επιτευχθεί περιορισμός της δράσης του εξωτερικού φωτός σε συνδυασμό με τις ακτινοβολίες UVA και UVC. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν λαμπτήρες ισχύος 9 Watt και 11Watt αντίστοιχα.

Προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός απολύμανσης έγινε ποσοτικοποίηση του *B. anthracis* με την κλασσική μικροβιολογική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, καθώς και με τη μοριακή μέθοδο Real-time PCR και τη χρήση χρωμοσωμικού γονιδίου. Η καλλιέργεια του βακτηρίου πραγματοποιήθηκε σε τριβλία που περιείχαν θρεπτικό υλικό Nutrient Agar και επακολουθούσε επώαση στους 37 °C για περίπου 24 hr.

Επιπροσθέτως διερευνήθηκε η παθογένεια του υπό εξέταση στελέχους, κατόπιν εφαρμογής των μεθόδων απολύμανσης με τη μοριακή μέθοδο Real-time PCR, μέσω ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης δύο γονιδίων που βρίσκονται στα δύο πλασμίδια του *B. anthracis*, το γονίδιο *lef* στο πλασμίδιο pX01 και το γονίδιο *capA* στο πλασμίδιο pX02.

Συμπερασματικά αναφέρεται ότι παρατηρήθηκε μείωση του βακτηριακού πληθυσμού όσο αυξανόταν η ισχύς των υπέρηχων. Ωστόσο η αύξηση της αρχικής συγκέντρωσης των βακτηρίων στο αρχικό εναιώρημα είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της απολυμαντικής δράσης των υπέρηχων. Αναφορικά με την αποτελεσματικότητα της απολυμαντικής δράσης των ακτινοβολιών UVA και UVC, προέκυψε ότι η ακτινοβολία UVC αποδείχθηκε ότι έχει πολύ πιο άμεση δράση σε σχέση με τη UVA, επιφέροντας την εξαφάνιση ολόκληρου του μικροβιακού φορτίου. Η δράση της UVA παρατηρήθηκε να ενισχύεται με τη χρήση μεγαλύτερης συγκέντρωσης καταλύτη TiO₂ αλλά και σε συνδυασμό με την απολυμαντική δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Συγκριτικά με τις τρεις μεθόδους που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διπλωματική διατριβή προκύπτει ότι η ακτινοβολία UVC είναι αποτελεσματικότερη και γρηγορότερη όλων.

ABSTRACT

Disinfection is an essential and final barrier against human exposure to disease-causing pathogenic microorganisms. Waterborne diseases, which are transmitted through the ingestion of contaminated water that serves as the passive carrier of the infectious agent, illustrate the importance of effective inactivation of pathogens contained in water. This is most commonly accomplished by disinfection techniques involving chemical compounds, filtration or radiation.

The goal of this work was to study the effect of ultrasonic irradiation, as well as UVA and UVC radiation, for the inactivation of *B. anthracis* in water. Disinfection rate was measured in terms of *B. anthracis* removal from aqueous samples as a function of various operating parameters, namely ultrasound power, initial bacterial concentration, concentration of TiO₂ catalyst, presence of H₂O₂ (20ppm) and the duration of the disinfection treatment.

The bacterial strain used in the present study was *B. anthracis* NCTC 10340 (National Collection of Type Cultures, HPA). More details for this strain are given below.

An Ultrason 250 (LabPlant, Huddersfield, UK) horn-type sonicator capable of operating either continuously or in pulse mode at a fixed frequency of 80 kHz and a variable power output up to 250 W was used. Reactions took place in a cylindrical batch reactor under continuous stirring. All the experiments were performed at ambient room temperature.

Moreover, disinfection experiments were carried out applying UVA and UVC radiation. In both processes the reactor was the same as the one used in the experiments with the ultrasound irradiation, and the intensity of UVA and UVC lamp was 9 W and 11 W respectively.

In order to estimate the disinfection rate quantification of the microorganisms was carried out by means of both the common microbiological method of successive dilutions and the molecular biology technique of Real-time PCR. The *B. anthracis*

was cultured in Petri dishes, containing Nutrient Agar, and incubated at 37 °C for 24 hr.

Furthermore, it was investigated the pathogenicity of *B. anthracis*, after the application of the disinfection methods, through Real-time PCR, via detection and quantification of the genes *lef* and *capA*, which are contained in the two virulent plasmids of *B. anthracis*, pX01 and pX02 respectively.

The conclusion that was extracted through the results of the present study is that increasing the ultrasound power resulted in a slight enhancement of *B. anthracis* inactivation. Also, an increase in bacterial concentration led to a decrease in the inactivation rate. Regarding, UVA and UVC radiation and according to our results, UVC radiation proved to be much more effective, resulting in total disinfection of the initial bacterial concentration in a few minutes. Furthermore, in UVA experiments it was observed that increasing the concentration of TiO₂ catalyst resulted in better disinfection rate. The same results were observed in the presence of peroxide. Comparing the three methods, that were performed in the present study, UVC radiation proved to be the most effective of all.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	iii
ABSTRACT	x
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΝΕΡΟΥ	1
1.1 Το νερό και η σημασία του.	1
1.2 Η ποιότητα του νερού.	2
1.3 Απολύμανση νερού	3
1.3.1 Ορισμός Απολύμανσης.	7
1.4 Μηχανισμοί δράσης απολύμανσης νερού.	8
1.5 Συμβατικές και σύγχρονοι μέθοδοι απολύμανσης.	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ	11
2.1 Χλωρίωση.	11
2.2 Προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι απολύμανσης.	13
2.3 Απολύμανση με χρήση υπερήχων.	15
2.3.1 Βασικές αρχές της χημείας των υπερήχων.	15
2.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της χημείας των υπερήχων.	18
2.4 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).	21
2.5 Φωτοκατάλυση.	25
2.5.1 Ετερογενής Φωτοκατάλυση.	26
2.5.2 Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο.	27
2.5.3 Μηχανισμός φωτοκαταλυτικής οξείδωσης.	28
2.5.4 Ημιαγώγιμα υλικά – Καταλύτες.	30
2.5.5 Ενίσχυση φωτοκαταλύτη TiO ₂ .	31
2.5.6 Υπεροξειδίο του Υδρογόνου (hydrogen peroxide).	32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΝΕΡΟΥ – ΒΑΚΙΛΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ.	35
3.1 Δείκτες ποιότητας νερού.	35
3.2 Βάκιλλος Άνθρακα (Bacillus anthracis).	36
3.2.1 Γενικές πληροφορίες.	37
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ	40
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	41
5.1 Υλικά.	41
5.1.1 Θρεπτικά Υλικά.	41
5.1.2 Χημικά Υλικά.	41
5.1.3 Διαλύματα.	41
5.1.4 Εκκινητές (PCR)	42
5.1.5 Πρότυπο Στέλεχος.	42
5.2 Μεθοδολογία.	43
5.2.1 Προετοιμασία πειράματος.	43
5.2.2 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων - Καλλιεργητική διαδικασία.	44
5.2.3 Real-time PCR	45
5.3 Πειραματικός εξοπλισμός – Συσκευές.	46
5.3.1 Πειραματική διάταξη υπερήχων.	46
5.3.2 Πειραματική διάταξη UVC ακτινοβολίας.	48
5.3.3 Πειραματική διάταξη UVA ακτινοβολίας.	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ.	51
6.1 Πειράματα απολύμανσης με χρήση υπερήχων.	51

6.2 Πειράματα απολύμανσης με UVC και UVA ακτινοβολία.	53
6.3 Πειράματα απολύμανσης με υπεροξείδιο, H ₂ O ₂ .	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	55
7.1 Πειράματα απολύμανσης με χρήση υπερήχων.	55
7.1.1 Επίδραση της ισχύος των υπερήχων στην απολύμανση.	55
7.2 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVC.	58
7.3 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA.	59
7.3.1 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA – Επίδραση συγκέντρωσης καταλύτη.	59
7.3.2 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA – Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης βακτηριακού φορτίου.	61
7.4 Πειράματα απολύμανσης με προσθήκη Υπεροξειδίου του Υδρογόνου, H ₂ O ₂ .	64
7.4.1 Πειράματα απολύμανσης παρουσία Υπεροξειδίου του Υδρογόνου.	64
7.4.2 Συνδυαστικά πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA, παρουσία Υπεροξειδίου του Υδρογόνου.	66
7.5 Ποσοτικοποίηση του βάκιλλου με τη μέθοδο Real-time PCR και ανίχνευση των παθογόνων πλασμιδιακών γονιδίων	69
7.5.1 Ποσοτικοποίηση του βάκιλλου με τη μέθοδο Real-time PCR – UVC ακτινοβολία	77
7.5.2 Ποσοτικοποίηση του βάκιλλου με τη μέθοδο Real-time PCR – UVA ακτινοβολία	78
7.6 Βιβλιογραφική ανασκόπηση	80
7.7 Συμπεράσματα	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ	84
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	85

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΝΕΡΟΥ

1.1 Το νερό και η σημασία του

Το νερό είναι η περισσότερο διαδεδομένη χημική ένωση που είναι απαραίτητη σε όλες τις γνωστές μορφές ζωής που υπάρχουν στον πλανήτη μας. Οι άνθρωποι και τα ζώα έχουν στο σώμα τους 60 - 70% νερό κατά βάρος, ενώ φτάνει μέχρι και το 90% εκείνου των κυττάρων. Το νερό αποτελείται από υδρογόνο (H) και οξυγόνο (O). Ο χημικός τύπος του νερού είναι H₂O και η σχετική αναλογία βαρών του υδρογόνου και του οξυγόνου είναι 2,016 : 16,000. Το νερό είναι υγρό, διαυγές, άχρωμο σε λεπτά στρώματα, κυανίζον σε μεγάλους όγκους. Η καθαρή ουσία είναι άγευστη, ενώ το καλό πόσιμο νερό έχει ευχάριστη γεύση, που οφείλεται στα διαλυμένα άλατα και αέρια. Η πυκνότητα του νερού είναι διαφορετική σε διάφορες θερμοκρασίες, παίρνοντας την μέγιστη τιμή της στους 4 °C. Το νερό έχει ποικίλη χημική δράση. Σχηματίζει "ενώσεις διά προσθήκης" με πολλά άλατα, καθώς και με πολλά μόρια άλλων ουσιών. Οι ενώσεις αυτές ονομάζονται υδρίτες ή ένυδρες ενώσεις. Το πόσιμο νερό πρέπει να είναι διαυγές, άχρωμο, άοσμο, δροσερό (7-11°C). Το πόσιμο νερό περιέχει διαλυμένο οξυγόνο, άζωτο, διοξείδιο του άνθρακα, ελάχιστα ίχνη οργανικών ουσιών, καθώς και ίχνη φυτικών μικροοργανισμών. Πρέπει να εξετάζεται φυσικώς (θερμοκρασία, διαύγεια, γεύση, οσμή), χημικώς (ποιοτικός και ποσοτικός έλεγχος ουσιών, σκληρομετρία), μικροσκοπικώς (έρευνα μικροοργανισμών), βακτηριολογικώς (καλλιέργεια των μικροβίων του νερού) και τοπογραφικώς (θέση πηγής, διαδρομής του νερού) (www.watersave.gr).

Το νερό κυκλοφορεί στα διάφορα τμήματα του πλανήτη (δηλαδή στην ατμόσφαιρα, στο έδαφος και στην υδρόσφαιρα) μέσω μιας κυκλικής διεργασίας η οποία έχει καθιερωθεί να αποκαλείται ως ο κύκλος του νερού. Χωρίς το νερό η ζωή πάνω στη γη θα ήταν αδύνατη (Αμπελιώτης Κ., 2008).

1.2 Η ποιότητα του νερού

Για να κατανοηθεί η ανάγκη της απολύμανσης του πόσιμου ύδατος κρίνεται σκόπιμο να γίνει μια σύντομη αναφορά στο πολυσυζητημένο κομμάτι της ποιότητας του νερού, καθώς και στους λόγους που επιβάλλουν την ανάγκη διατήρησης αυτής σε υψηλά επίπεδα.

Το χρησιμοποιούμενο για ανθρώπινη κατανάλωση νερό πρέπει να είναι από κάθε άποψη αβλαβές για την υγεία των ανθρώπων, οργανοληπτικά άμεμπτο και απολύτως καθαρό, απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς και οποιεσδήποτε ενώσεις σε συγκεντρώσεις που αποτελούν ενδεχόμενο κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Επομένως, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία αποτελούν τα πρότυπα ποιότητας του νερού και θεσπίζονται νομοθετικά (Μήτρακας, 2001).

Η ανθρωπότητα πλήρωσε πολύ ακριβά την επί σειρά ετών έλλειψη του μικροβιολογικού ελέγχου του υδάτινου περιβάλλοντος, καθώς εκατομμύρια άνθρωποι έπεσαν θύματα σοβαρών υδατογενών λοιμώξεων. Ακόμα και σήμερα που είναι γνωστή η σημασία της μικροβιολογικής καθαρότητας του νερού για τη δημόσια υγεία, ο αριθμός των υδατογενών λοιμώξεων εξακολουθεί να είναι μεγάλος. Είναι γνωστό ότι στις χώρες του τρίτου κόσμου αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου των παιδιών. Οι λοιμώξεις αυτές οφείλονται στην παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι, εισερχόμενοι στο νερό μέσω των λυμάτων, επιβιώνουν παρά το ολιγοτροφικό, αφιλόξενο υδάτινο περιβάλλον και μεταδίδουν νοσήματα με ποικίλους τρόπους, όπως με κατάποση, επαφή, εισπνοή υδατοσταγονιδίων (Χολέβα, 2007).

Έτσι, η ποιότητα του νερού παίζει κυρίαρχο ρόλο στην υποβάθμιση των υδάτινων αλλά και των χερσαίων οικοσυστημάτων και πρέπει να εξετάζεται προκειμένου να ελέγχεται η επίδρασή του στα οικοσυστήματα και η δυνατότητα χρήσης του από τον άνθρωπο, που αποτελεί αναπόσπαστο μέρος τους.

1.3 Απολύμανση νερού

Ο κίνδυνος μετάδοσης λοιμωδών νοσημάτων καθιστά απαραίτητη την απολύμανση τόσο του πόσιμου νερού όσο και του νερού που προέρχεται από εξόδους εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων και προορίζεται για επαναχρησιμοποίηση, δηλαδή για άρδευση, αλιεία, κολύμβηση (Δρούμπαλη, 2010).

Η απολύμανση του πόσιμου νερού μπορεί να θεωρηθεί το σημαντικότερο μέτρο του τελευταίου αιώνα για την προστασία της δημόσιας υγείας. Η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών που περιέχονται στο πόσιμο νερό έχει συμβάλει στη δραστική μείωση των κρουσμάτων από τις νόσους των υδάτων, όπως η χολέρα και ο τυφοειδής, στις αναπτυγμένες κυρίως χώρες, ενώ η έλλειψη του μέτρου αυτού σε ορισμένες αναπτυσσόμενες χώρες αποτελεί την αιτία πολλών θανάτων.

Στις αναπτυσσόμενες χώρες συνήθως δεν υπάρχει αρκετό καθαρό πόσιμο νερό. Στις χώρες αυτές το πρόβλημα της μη ορθής απολύμανσης του νερού προκαλεί ασθένειες και θανάτους σε μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού, κυρίως στις ευπαθείς ομάδες όπως είναι τα μικρά παιδιά, οι ηλικιωμένοι και τα άτομα με ασθενές ανοσοποιητικό σύστημα (φορείς του Aids, καρκινοπαθείς, δέκτες μεταμόσχευσης οργάνων κλπ.) (www.watermicro.gr).

Στην απολύμανση το μεγαλύτερο μέρος των μικροοργανισμών αφαιρείται με την βοήθεια διαφόρων τεχνικών επεξεργασίας νερού όπως είναι η υπεριώδης ακτινοβολία, η οζόνωση και η χλωρίωση. Σκοπός των τεχνικών επεξεργασίας είναι η όσο το δυνατόν καλύτερη απομάκρυνση, απενεργοποίηση και θανάτωση των παθογόνων μικροοργανισμών, ώστε να αποφεύγεται η μετάδοση ασθενειών στον άνθρωπο και στα ζώα. Οι μικροοργανισμοί καταστρέφονται με αποτέλεσμα τον τερματισμό της ανάπτυξης και της αναπαραγωγής τους (Δρούμπαλη, 2010).

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, εξαρτάται από τους εξής βασικούς παράγοντες (Φεσά, 2009) :

- τον χρόνο επαφής

Ο χρόνος επαφής αποτελεί ίσως μία 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 των παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτή η παρατήρηση αναφέρθηκε για πρώτη φορά στη βιβλιογραφία το 1908 και σε διαφορετική μορφή ο νόμος της Chick είναι (Metcalf and Eddy, 2007; Haas and Karra, 1984; Lambert and Johnston, 2000) :

$$\frac{dN}{dt} = -kN$$

Όπου :

$\frac{dN}{dt}$ = ο ρυθμός μεταβολής της συγκέντρωσης των μικροοργανισμών με τον χρόνο

k = η σταθερά ταχύτητας αδρανοποίησης των μικροοργανισμών, [T⁻¹]

N = ο αριθμός των μικροοργανισμών σε χρόνο t

t = ο χρόνος

- την συγκέντρωση του απολυμαντικού

Ο Watson (1908) πρότεινε μια εμπειρική λογαριθμική σχέση που συσχετίζει τη σταθερά ρυθμού αδρανοποίησης k με την συγκέντρωση του απολυμαντικού C :

$$k = C^n t$$

Όπου :

k = η σταθερά ρυθμού αδρανοποίησης των μ/ο

C = η συγκέντρωση του απολυμαντικού

t = ο χρόνος

n = ο συντελεστής αραίωσης του απολυμαντικού

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

$n = 1$ σημαίνει ότι η συγκέντρωση και ο χρόνος έχουν την ίδια βαρύτητα

$n < 1$ σημαίνει ότι ο χρόνος είναι πιο σημαντικός από την συγκέντρωση του απολυμαντικού

Συνήθως, χρησιμοποιείται η σταθερά k που αντιστοιχεί σε 99 % αδρανοποίηση των μικροοργανισμών.

Από την παραπάνω εξίσωση προκύπτει ότι για μεγάλες συγκεντρώσεις απολυμαντικού απαιτούνται μικροί χρόνοι επαφής, ενώ για μικρές συγκεντρώσεις μεγάλοι χρόνοι επαφής και συνεπώς μεγάλες δεξαμενές απολύμανσης (Λέκκας, 2005).

- το είδος του απολυμαντικού

Είναι λογικό ότι ανάλογα με την περίπτωση μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορα είδη απολυμαντικών, τα οποία έχουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και διαφορετική αποτελεσματικότητα. Ένα από αυτά αποτελεί το υπεροξειδίο του υδρογόνου που χρησιμοποιήθηκε συνδυαστικά με τις απολυμαντικές τεχνολογίες στην παρούσα μελέτη.

- το είδος και την κατάσταση του μικροοργανισμού

Η απόδοση της απολύμανσης επηρεάζεται από τη φύση, τον τύπο και την κατάσταση των μικροοργανισμών. Τα πρωτόζωα είναι πιο δύσκολο να καταπολεμηθούν και ακολουθούν τα βακτήρια και οι ιοί. Μερικοί μικροοργανισμοί εμφανίζονται με ανθεκτικές μορφές (π.χ. κύστες, σπόρια), οπότε και αδρανοποιούνται δυσκολότερα. Η επιλογή του κατάλληλου απολυμαντικού γίνεται ανάλογα με την εκάστοτε περίπτωση.

- το pH

Ανάλογα με την τιμή του pH επηρεάζεται η αποδοτικότητα τόσο των απολυμαντικών μέσων όσο και των τεχνολογιών απολύμανσης. Σε κάθε περίπτωση υπάρχουν βέλτιστες τιμές pH ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη αποτελεσματικότητα.

- τη θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό θανάτωσης των μικροοργανισμών με χημικά απολυμαντικά μπορεί να προσδιορισθεί από μια μορφή της εξίσωσης Van't Hoff – Arrhenius. Η σχέση για τον απαιτούμενο χρόνο t , ώστε να επιτευχθεί συγκεκριμένο ποσοστό θανάτωσης είναι (Metcalf and Eddy, 2002) :

$$\ln \frac{t_1}{t_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{RT_1 T_2}$$

Όπου :

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

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

R = η σταθερά των αερίων, 8.3144 J/mole·K (ή 1.99 cal/mole·K)

Η αύξηση της θερμοκρασίας έχει ως αποτέλεσμα μια πιο γρήγορη θανάτωση των μικροοργανισμών.

- τη θολερότητα

Η θολερότητα χρησιμοποιείται ευρέως ως μέτρο της συγκέντρωσης των αιωρούμενων σωματιδίων στο νερό. Έχει αποδειχθεί ότι επιδρά αρνητικά στη διαδικασία απολύμανσης, επειδή τα σωματίδια που τη δημιουργούν μπορεί να περιβάλλουν και να προστατεύουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς από τη δράση του απολυμαντικού. Επιπλέον, το υλικό από το οποίο αποτελούνται τα σωματίδια αυτά απαιτεί αυξημένες δόσεις απολύμανσης, προκαλώντας έτσι μεγαλύτερη κατανάλωση απολυμαντικού.

- το διαλυτό οργανικό υλικό

Το διαλυτό οργανικό υλικό που περιέχεται στο υπό επεξεργασία υγρό είναι δυνατόν να καταναλώσει απολυμαντικό και να οδηγήσει στη δημιουργία ενώσεων με μικρή ή καθόλου απολυμαντική ικανότητα. Επιπλέον, η παρουσία αυτού του υλικού οδηγεί στη δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων απολύμανσης.

1.3.1 Ορισμός Απολύμανσης

Απολύμανση είναι η επεξεργασία εκείνη του νερού που έχει ως σκοπό την καταστροφή ή την αδρανοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών που τυχόν περιέχει, ώστε να μην είναι ικανοί για την μετάδοση των αντίστοιχων ασθενειών και να προστατευτεί η δημόσια υγεία.

Γενικότερα, ως απολύμανση ορίζεται η επεξεργασία εκείνη που έχει ως σκοπό τη διατήρηση των μικροοργανισμών ενός ανοικτού ή κλειστού δικτύου νερού σε επίπεδα που παρέχουν τη βεβαιότητα ότι το νερό είναι ασφαλές για αστική κατανάλωση. Στην περίπτωση των αποβλήτων η απολύμανση αποβλέπει στην προστασία των υδάτινων αποδεκτών (Παλαιολόγου, 2008).

Είναι ουσιώδες να διευκρινισθεί η διαφορά μεταξύ της αποστείρωσης, η οποία σημαίνει πλήρη καταστροφή όλων των μικροοργανισμών και της απολύμανσης η οποία χαρακτηρίζεται ως η εκλεκτική ελάττωση σε ανεκτά επίπεδα των μικροοργανισμών (Μήτρακας, 2001).

1.4 Μηχανισμοί δράσης απολύμανσης νερού

Ο τρόπος με τον οποίο τα διάφορα απολυμαντικά μέσα επιδρούν στην κυτταρική λειτουργία των παθογόνων μικροοργανισμών δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως, όμως έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί για την επεξήγηση της μικροβιοκτόνου δράσης. Οι πιο βασικοί είναι (Palaiologou et al., 2007) :

- Φθορά του κυτταρικού τοιχώματος

Έχει σαν αποτέλεσμα τη λύση και το θάνατο του κυττάρου. Ορισμένες ενώσεις, όπως η πενικιλίνη, που είναι από τα σημαντικότερα αντιβιοτικά, παρεμποδίζουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων.

- Μεταβολή της κυτταρικής διαπερατότητας

Απολυμαντικά μέσα όπως οι φαινολικές ενώσεις και τα απορρυπαντικά μεταβάλλουν τη διαπερατότητα της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που πλέον παύει να είναι εκλεκτική, επιτρέποντας έτσι τη διαφυγή ζωτικών συστατικών όπως το άζωτο και ο φώσφορος.

- Μεταβολή της κολλοειδούς φύσης του πρωτοπλάσματος

Η θερμότητα, η ακτινοβολία και τα ισχυρά οξέα ή τα αλκαλικά μέσα μετατρέπουν την κολλοειδή φύση του πρωτοπλάσματος. Η θερμότητα προκαλεί πήξη στην κυτταρική πρωτεΐνη, ενώ τα οξέα ή οι βάσεις μετουσιώνουν τις πρωτεΐνες με θανατηφόρο επίπτωση.

- Μεταβολή του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών

Η ακτινοβολία UV μπορεί να προκαλέσει ρήξη των δεσμών υδρογόνου στο μόριο των νουκλεϊκών οξέων και να προκληθεί σχηματισμών διμερών πυριμιδίνης και καταστροφή του DNA. Ο σχηματισμός τέτοιων διμερών διακόπτει τη διαδικασία της αντιγραφής, ο οργανισμός δεν μπορεί πλέον να αναπαραχθεί κι έτσι παραμένει ανενεργός.

- Παρεμπόδιση της ενζυμικής δράσης

Οξειδωτικά μέσα όπως το χλώριο μπορούν να μεταβάλουν τη χημική διευθέτηση των ενζύμων και να απενεργοποιήσουν ένζυμα που είναι απαραίτητα για τους μικροοργανισμούς.

1.5 Συμβατικές και σύγχρονοι μέθοδοι απολύμανσης

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για απολύμανση διακρίνονται σε χημικές και μη χημικές, ανάλογα με τα μέσα που χρησιμοποιεί η κάθε μια.

• Χημικά μέσα

Τα χημικά μέσα μπορούν να διαχωριστούν σε 2 μεγάλες κατηγορίες, τα οξειδωτικά και τα μη οξειδωτικά απολυμαντικά.

Τα οξειδωτικά απολυμαντικά περιλαμβάνουν μία σειρά από ενώσεις με οξειδωτικό δυναμικό, όπως :

- Αέριο χλώριο (Cl_2)
- Υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) ή χλωριώδες νάτριο (NaOCl_2)
- Διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2)
- Βρώμιο (Br_2)
- Ιώδιο (I_2)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2)
- Όζον (O_3)

Στα μη οξειδωτικά απολυμαντικά ανήκουν οργανικές κυρίως ενώσεις, όπως :

- μεθυλενοδιθειοκυάνιο (MBT)
- διβρωμονιτριλοπροπιοναμίδιο (BNPA)
- ισοθειαζόλεις κ.α.

• Μη χημικά μέσα

Στα μη χημικά μέσα απολύμανσης του νερού ανήκουν :

- η υπεριώδης ακτινοβολία
- η αποστειρωτική διήθηση
- η θερμότητα
- η ραδιενεργός ακτινοβολία

Το πιο συνηθισμένο μέσο απολύμανσης είναι το χλώριο, ενώ εναλλακτικά χρησιμοποιούνται το όζον και η υπεριώδης ακτινοβολία (Μήτρακας, 2001).

Τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του ιδανικού απολυμαντικού είναι :

- υψηλός ρυθμός εξουδετέρωσης παθογόνων μικροοργανισμών
- χαμηλή δραστικότητα με ουσίες που περιέχονται στο νερό και χαμηλή παραγωγή επικίνδυνων παραπροϊόντων
- χαμηλό κόστος λειτουργίας και μικρές απαιτήσεις συντήρησης
- μηδενικός κίνδυνος κατά τη χρήση του
- εύκολη ανιχνευσιμότητα στο νερό
- χαμηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς

Οι παραπάνω ιδιότητες δεν είναι όλες συγκεντρωμένες σε ένα απολυμαντικό, θα πρέπει όμως να λαμβάνονται υπόψη κατά την αξιολόγηση των εναλλακτικών μεθόδων (Ανδρεαδάκης et al., 2005).

Όλες οι τεχνολογίες απολύμανσης που χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα, στοχεύουν στην καταστροφή των βακτηριδίων, ιών και των λοιπών μικροοργανισμών που πιθανό να είναι φορείς ασθενειών, ή μπορούν να εξελιχθούν σε τέτοιους.

Παρακάτω αναγράφονται οι πιο διαδεδομένες μέθοδοι απολύμανσης που χρησιμοποιούνται σήμερα:

- **Χλωρίωση**
- **Προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι απολύμανσης**
- **Έκθεση σε Υπεριώδη Ακτινοβολία (UV)**
- **Φωτοκατάλυση**

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΝΕΡΟΥ

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω λόγο της αναγκαιότητας διατήρησης του πόσιμου νερού σε υψηλά επίπεδα ποιότητας, έχει αναπτυχθεί μία πληθώρα μεθόδων απολύμανσης με διαφορετικά τεχνικά χαρακτηριστικά, δυνατότητα εφαρμογής και αποτελεσματικότητα. Παρακάτω ακολουθεί εκτενέστερη παρουσίαση των μεθόδων αυτών, εντείνοντας ωστόσο περισσότερο την προσοχή στις μεθόδους απολύμανσης που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία και είναι η απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία UVA και UVC, καθώς και η απολύμανση με υπέρηχους.

2.1 Χλωρίωση

Η χλωρίωση είναι η πρώτη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την απολύμανση τόσο των υγρών αποβλήτων όσο και του πόσιμου νερού και αποτελεί την πιο συνηθισμένη σήμερα τεχνολογία απολύμανσης. Τα πρώτα προβλήματα που παρουσιάστηκαν στις αρχές της δεκαετίας του '40 στις Η.Π.Α. και συνδέονταν με τη δυσάρεστη γεύση και οσμή του νερού έγιναν αφορμή για την προσπάθεια βελτίωσης της μεθόδου. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, αλλά και θεμάτων που σχετίζονται με την ασφαλή διαχείριση των εγκαταστάσεων απολύμανσης, την ελάττωση των επιπτώσεων των παραπροϊόντων απολύμανσης, τη μείωση του λειτουργικού κόστους και φυσικά τη βελτίωση της απολυμαντικής δράσης, αναπτύχθηκαν παράλληλα και με τις τεχνολογικές εξελίξεις νέες μέθοδοι χλωρίωσης ή και παραλλαγές της απολύμανσης με χλώριο (διοξείδιο του χλωρίου, υποχλωριώδες νάτριο) (Parsons et al., 2004).

Το χλώριο (Cl_2) είναι ουσία τοξική για τον άνθρωπο και τα ζώα, όμως σε χαμηλές συγκεντρώσεις οι οποίες απαιτούνται για την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών είναι αβλαβές. Πέραν της μικροβιοκτόνου του ικανότητας, το χλώριο ενεργεί και σαν οξειδωτικός παράγοντας και διασπά τις οργανικές ουσίες.

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)
- υποχλωριώδη άλατα (NaOCl ή Ca(OCl)_2)
- διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2)

Η ποσότητα του χλωρίου που απαιτείται για απολύμανση εξαρτάται από την περιεκτικότητα των οργανικών ουσιών στο νερό. Σε συνήθεις περιπτώσεις, πλήρης απολύμανση επιτυγχάνεται όταν, μετά την ανάμειξη και οξείδωση, η περιεκτικότητα του **ελεύθερου διαθέσιμου χλωρίου**, στο οποίο γίνεται αναφορά παρακάτω, είναι περίπου 0.2 ppm. Περισσότερη χλωρίωση προσδίδει στο νερό οσμή και γεύση, ενώ για περιεκτικότητα μικρότερη του ορίου των 0.2 ppm δεν εξασφαλίζεται πλήρης απολύμανση. Για να μην επιδρά δυσμενώς το ελεύθερο χλώριο στον φυσικό αποδέκτη πρέπει να ελέγχεται η περιεκτικότητά του και αυτή η μέτρηση δείχνει παράλληλα αν η χλωρίωση που γίνεται είναι επαρκής. Επιπλέον, το ποσοστό καταστροφής των βακτηρίων εξαρτάται από τον χρόνο επαφής τους με το χλώριο και σαν ελάχιστος χρόνος χλωρίωσης στην καλύτερη των περιπτώσεων θεωρούνται τα 15-30 λεπτά (Νταρακάς, 2009).

Αν και ο τρόπος με τον οποίο το χλώριο καταστρέφει τους παθογόνους μικροοργανισμούς δεν είναι απόλυτα εξακριβωμένος, για τα βακτήρια η πιο πιθανή εξήγηση είναι ότι το χλώριο διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη τους και αδρανοποιεί ορισμένα ένζυμα που είναι απαραίτητα για την επιβίωσή τους. Επειδή η αντίδραση χλωρίου-ενζύμων είναι αντιστρέψιμη, σε χαμηλές συγκεντρώσεις χλωρίου είναι δυνατόν τα ένζυμα να επανασχηματιστούν και να συνεχίσουν τη λειτουργία τους (Μάρακας, 2006).

Ωστόσο όπως κάθε μέθοδος, έτσι και η χλωρίωση έχει αποδειχθεί να έχει τόσο πλεονεκτήματα όσο και μειονεκτήματα.

Πλεονεκτήματα χλωρίωσης (Δρούμπαλη, 2010) :

- ευκολία χρήσης της
- χαμηλό κόστος

- ισχυρή δραστηριότητα σε ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών
- υπολειμματική δράση (το χλώριο παραμένει σαν προστατευτικός παράγοντας για αρκετό χρονικό διάστημα μέσα στο νερό)

Μειονεκτήματα της 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.

2.2 Προηγμένες οξειδωτικές μέθοδοι απολύμανσης

Στο πλαίσιο αναζήτησης εναλλακτικών μεθόδων απολύμανσης, φιλικών προς το περιβάλλον (καθαρές τεχνολογίες), μπορεί να ενταχθεί και το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την χρησιμοποίηση των προηγμένων οξειδωτικών μεθόδων απολύμανσης (ΠΟΜΑ).

Με τον όρο ΠΟΜΑ εννοούνται κυρίως εκείνες οι τεχνολογίες οι οποίες στηρίζονται στη χρήση μεθόδων όπως ο οζονισμός (O_3 , O_3/UV , O_3/H_2O_2), η ετερογενής φωτοκατάλυση (TiO_2/UV), το αντιδραστήριο Fenton (Fe_2^+/H_2O_2) και

φωτο-Fenton ($UV/Fe_2^+/H_2O_2$), η ηλεκτροχημική οξείδωση, η οξείδωση σε υψηλές πιέσεις και θερμοκρασίες (καταλυτική ή μη), η χρήση υπερήχων καθώς και άλλες (Parsons et al., 2004).

Η ραγδαία ανάπτυξη τους την τελευταία δεκαετία οφείλεται, αφενός στην ικανότητα τους να αδρανοποιούν τις πλέον βλαβερές/ τοξικές και μη βιοδιασπώμενες οργανικές ουσίες που συναντώνται σε υγρή και αέρια φάση, αφετέρου δε στους ολοένα και πιο αυστηρούς περιβαλλοντικούς νόμους που θέτει σε εφαρμογή η πολιτεία.

Οι διεργασίες προχωρημένης οξείδωσης αφορούν το σχηματισμό και τη χρήση της ελεύθερης ρίζας υδροξυλίου (HO^\cdot) ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό μέσο για την καταστροφή των ενώσεων οι οποίες δεν μπορούν να οξειδωθούν με τη χρήση συμβατικών οξειδωτικών μέσων, όπως το οξυγόνο, το όζον και το χλώριο. Η ρίζα υδροξυλίου αντιδρά με τα διαλυτά συστατικά εκκινώντας μια σειρά αντιδράσεων οξείδωσης. Πρόκειται για ιδιαίτερα ισχυρά οξειδωτικά σώματα, τα οποία, αντιδρούν με οργανικές ενώσεις αποσπώντας H^\cdot και δημιουργώντας υπεροξειδικές ρίζες. Οι τελευταίες προκαλούν οξειδωτικές θερμικές αντιδράσεις, οι οποίες τελικά οδηγούν στην πλήρη μετατροπή των οργανικών ενώσεων σε CO_2 και H_2O καθώς και ανόργανα άλατα. Οι ρίζες υδροξυλίου δεν είναι επιλεκτικές, μπορούν να δράσουν σε κανονική θερμοκρασία και πίεση και είναι ικανές να οξειδώσουν σχεδόν όλες τις υπάρχουσες ανηγμένες ενώσεις χωρίς κάποιο περιορισμό στην κλάση ή την ομάδα των ενώσεων σε αντίθεση με άλλα οξειδωτικά (Δρόσου, 2007).

Ωστόσο και οι ΠΟΜΑ έχουν εξίσου πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Πλεονεκτήματα ΠΟΜΑ (Δρόσου, 2007):

- Συντελούν στην επίλυση και όχι στη μεταφορά του προβλήματος,
- αδρανοποιούν τις περισσότερες βλαβερές και ανόργανες ουσίες,
- σημαντικό πλεονέκτημα των OH^\cdot είναι 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 ΠΟΜΑ διευκολύνει τη ν ακολουθούμενη βιολογική επεξεργασία, λόγω της δημιουργίας

βιοαποικοδομήσιμων προϊόντων, καθώς και λόγω της μείωσης σε πολλές περιπτώσεις τοξικότητας των λυμάτων,

- η προεπεξεργασία των λυμάτων, καθιστά μεθόδους όπως η αντίστροφη όσμωση και ιοντοανταλλαγή κατά πολύ οικονομικότερες λόγω της αποτροπής δημιουργίας συσσωματωμάτων οργανικής ύλης,
- χρησιμοποιούν φιλικότερα προς το περιβάλλον αντιδραστήρια,
- συντελούν στη δραστική μείωση της παραγόμενης λάσπης,
- έχουν δυνατότητα χρήσης της ηλιακής ακτινοβολίας.

Μειονεκτήματα χρήσης των ΠΟΜΑ (Δρόσου, 2007):

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

2.3 Απολύμανση με χρήση υπερήχων

Η μέθοδος της απολύμανσης με τη χρήση υπερήχων ανήκει στην κατηγορία των ΠΟΜΑ, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και αποτέλεσε μία από τις μεθόδους που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διπλωματική μελέτη.

2.3.1 Βασικές αρχές της χημείας των υπερήχων

Η χημεία των υπερήχων (sonochemistry) ορίζεται ως η χημική δραστηριότητα που προκαλείται και ή καταλύεται από κύματα υψηλής πίεσης σε ένα υγρό μέσο (Ince et al., 2001). Τα συστήματα εφαρμογής υπερήχων είναι πολύ ευαίσθητα και για να προσδιοριστούν οι κατάλληλες συνθήκες λειτουργίας απαιτείται πολύ καλή γνώση των φυσικών και χημικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα.

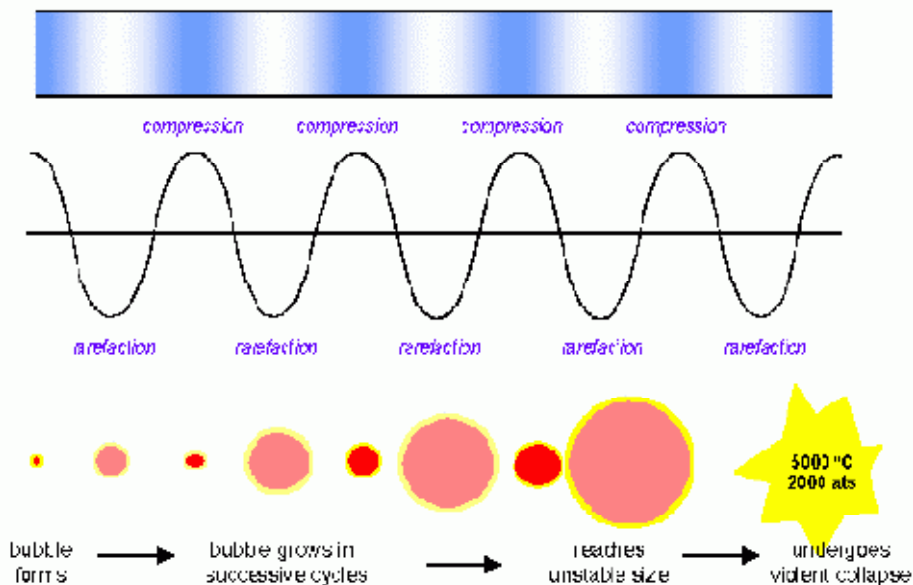
Ως «υπέρηχος» ορίζεται κάθε ήχος που η συχνότητα του είναι μεγαλύτερη από αυτήν, την οποία αντιλαμβάνεται το ανθρώπινο αυτί (δηλαδή πάνω από 16 kHz). Στην πράξη, διακρίνουμε τους υπερήχους σε τρεις διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τη χρήση τους (Mason and Cordemans, 1996):

1. Υψηλής συχνότητας ή διαγνωστικοί υπέρηχοι (2-10 kHz).
2. Χαμηλής συχνότητας ή υπέρηχοι συμβατικής ισχύος (20-100 kHz).
3. Μέσης συχνότητας ή υπέρηχοι «χημικών φαινομένων» (300-1000 kHz).

Όταν ένα υγρό εκτίθεται σε ένα ακουστικό πεδίο, τα κύματα πίεσης των ακουστικών δονήσεων δημιουργούν ακουστική πίεση που εξαρτάται από τη συχνότητα. Η πίεση αυτή εκδηλώνεται με εναλλαγή κύκλων συμπίεσης και εκτόνωσης (Manson, 1990). Αν η εφαρμοζόμενη πίεση είναι ίση με την αρνητική πίεση που αναπτύσσεται στον κύκλο της εκτόνωσης του ακουστικού κύματος, έτσι ώστε η απόσταση μεταξύ των μορίων του υγρού να είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη μοριακή απόσταση, το υγρό «σπάει» και σχηματίζονται κοιλότητες (cavities) που αποτελούνται από μικροφουσαλίδες γεμάτες με ατμό και αέρα (Manson, 1990, Dahlem et al., 1998).

Το φαινόμενο, που ονομάζεται ακουστική σπηλαιώση (acoustic cavitation) συντελείται σε τρία τουλάχιστον διαδοχικά στάδια:

1. Δημιουργία του πυρήνα της φουσαλίδας (nucleation).
2. Ανάπτυξη και επέκταση της φουσαλίδας.
3. Έκρηξη της φουσαλίδας (implosive collapse) (Suslick, 1990).



Εικόνα 2.1: Η κίνηση της φουσαλίδας σε εφαρμοσμένο ακουστικό πεδίο (Mason T.J., 1990).

Στο πρώτο στάδιο, μικροφουσαλίδες που βρίσκονται σε μικροκοιλότητες αιωρούμενων σωματιδίων δημιουργούν πυρήνες σπηλαιώσης (Suslick, 1990). Στο δεύτερο στάδιο οι φουσαλίδες μεγαλώνουν με τρόπο που εξαρτάται από την ένταση του υπέρηχου που εφαρμόζεται. Με υπέρηχους υψηλής συχνότητας μια μικρή φουσαλίδα μεγαλώνει πολύ γρήγορα, ενώ σε μικρότερες εντάσεις μεγαλώνει με πολύ χαμηλότερο ρυθμό και διαρκεί πολύ περισσότερους ακουστικούς κύκλους πριν τη έκρηξη (Suslick, 1990). Το τρίτο στάδιο συμβαίνει μόνο αν η ένταση του υπέρηχου υπερβαίνει ένα όριο (συνήθως μερικά W/cm^2 για συνηθισμένα υγρά που εκτίθενται σε συχνότητα 20 kHz).

Σε αυτό το σημείο οι μικροφουσαλίδες μεγαλώνουν τόσο ώστε δε μπορούν πλέον να απορροφήσουν ενέργεια από τον υπέρηχο και γίνεται βίαιη έκρηξη τους, συμβαίνει δηλαδή η λεγόμενη καταστροφική κατάρρευση» (catastrophic collapse) (Manson, 1990; Dahlem et al., 1998). Κατά το στάδιο της κατάρρευσης η θερμοκρασία και η πίεση έχουν τόσο υψηλές τιμές που τα αέρια που βρίσκονται μέσα στη φουσαλίδα υφίστανται μοριακό θρυμματισμό, ο οποίος είναι το χαρακτηριστικό φαινόμενο στην ομογενή χημεία των υπερήχων (Crum, 1994; Dahlem et al., 1998; Kidak and Ince, 2006).

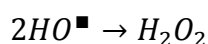
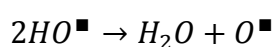
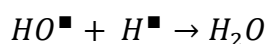
Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι λίγο πριν την κατάρρευση της φουσαλίδας παράγεται μια λάμψη φωτός που λέγεται υπερηχοφωταύγεια (sonoluminescence) και δίνει μια οξεία κορυφή στα 310 nm και μια ευρεία κορυφή σε όλο το ορατό φάσμα (Verrall et al., 1998; Crum, 1994). Το φάσμα υπερηχοφωταύγειας του νερού συσχετίζεται κυρίως με το σχηματισμό ειδών υψηλής ενέργειας (π.χ. διεγερμένες ρίζες υδροξυλίου) από τη μοριακή αποδόμηση των πεπιεσμένων αερίων και όχι τόσο με την ακτινοβολία μέλανος σώματος (Suslick et. al., 1990; Crum, 1994; Lepoint-Mullie et. al., 1996). Όπως και στη χημειοφωταυγεία στην υπερηχοφωταυγεία πραγματοποιείται εισαγωγή πολύ μεγάλων ποσών ενέργειας σε πολύ μικρό χρόνο, αλλά στην υπερηχοφωταυγεία η μοριακή διέγερση γίνεται με θερμικό τρόπο ενώ στη χημειοφωταυγεία με τη βοήθεια ηλεκτρονίων (Suslick et. al., 1990). Έχουν προταθεί διάφορες θεωρίες για τη φυσική εξήγηση του σταδίου της κατάρρευσης (Rayleigh, 1917; Noltingk and Neppiras, 1950; Lepoint and Mullie, 1994; Dahlem et. al., 1998). Η θερμοκρασία και η πίεση που αναπτύσσονται στη μικροφουσαλίδα λίγο πριν καταρρεύσει μπορεί να φτάσουν μέχρι και 4200-5000 K και 200-500 atm, αντίστοιχα (Suslick, 1990; Dahlem et. al., 1998). Οι συνθήκες αυτές διαρκούν ελάχιστα (< 10

μs), κάτι που σημαίνει ότι στην περιοχή αναπτύσσονται πολύ υψηλοί ρυθμοί ψύξης και θέρμανσης, της τάξης των 10^{10} K/s (Suslick, 1990; Crum, 1994).

2.3.2 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της χημείας των υπερήχων

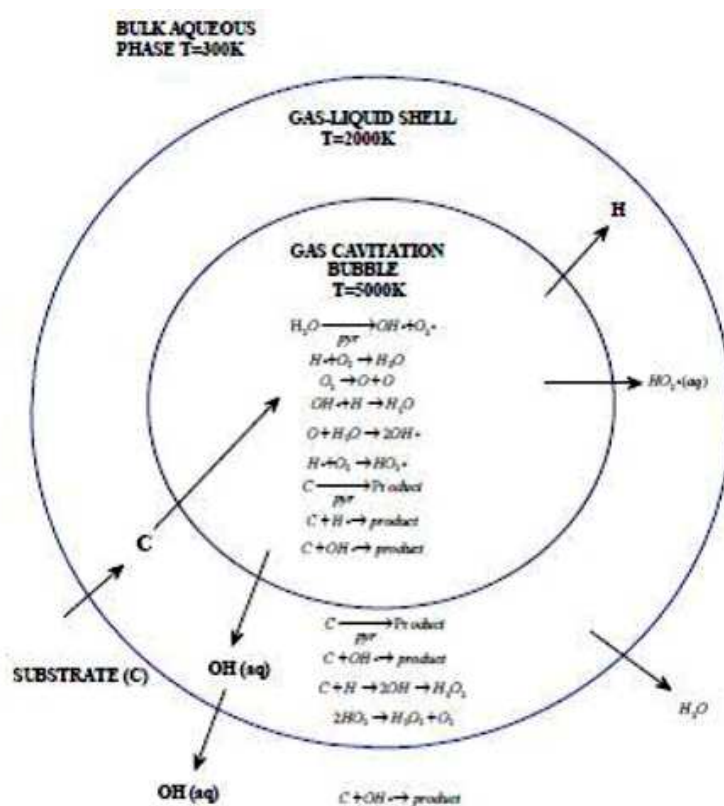
Τα περισσότερα συστήματα υπερήχων που έχουν βιομηχανικές εφαρμογές είναι ετερογενή, όπου η αύξηση της χημικής δραστηριότητας γίνεται μέσω των φυσικών φαινομένων των υπερήχων, όπως η μεταφορά μάζας και ενέργειας, η επιφανειακή ενεργοποίηση και η ανάμιξη φάσεων (Suslick, 1990; Marguilis, 1994). Η ομογενής χημεία των υπερήχων σχετίζεται άμεσα με τις ακραίες συνθήκες που υπάρχουν στις μικροφουσαλίδες που καταρρέουν. Αυτές οι ακραίες συνθήκες έχουν μοναδικά καταλυτικά αποτελέσματα που οφείλονται στα χαρακτηριστικά του συστήματος των υπερήχων, δηλαδή στην ικανότητα δημιουργίας ενώσεων υψηλής ενέργειας και την πολύ υψηλή πίεση και θερμοκρασία σε μικροσκοπική κλίμακα (Suslick, 1990). Αυτά τα φαινόμενα αρχίζουν στα «σπήλαια» που αποτελούνται από μικροφουσαλίδες γεμάτες με ατμό του υγρού μέσου και /ή διαλυμένα πτητικά συστατικά και αέρια (Mason and Cordemans, 1996). Κατά την κατάρρευση αυτών των «σπηλαίων» σε υδατικά συστήματα, μόρια ατμού που έχουν παγιδευτεί στις μικροφουσαλίδες διασπώνται όπως στην πυρόλυση και δίνουν πολύ ενεργές ρίζες υδροξυλίου HO^\bullet (Hart and Henglein, 1985; Petrier et al., 1992; Manson et al., 1994; Serpone et al., 1994).

Σε μη υδάτινους οργανικούς διαλύτες ή υδατικά μέσα που περιέχουν πτητικές οργανικές ενώσεις και συστατικά, η κατάρρευση δημιουργεί όχι μόνο ρίζες υδροξυλίου και υδρογόνου αλλά και οργανικές ρίζες, όπως αποδείχθηκε με φασματοσκοπία ESR (Seghal et al., 1982). Οι ρίζες υδροξυλίου που δημιουργούνται από την εφαρμογή υπερήχων στο νερό μπορεί να αντιδράσουν στην αέρια φάση ή μπορεί να επανενωθούν στη διεπιφάνεια αερίου-υγρού που είναι πιο ψυχρή και/ή στην κυρίως φάση του διαλύματος, και να δώσουν υπεροξειδίο του υδρογόνου και νερό, όπως φαίνεται στις παρακάτω αντιδράσεις (Serpone et al., 1994):



Αν το διάλυμα είναι κορεσμένο με οξυγόνο, σχηματίζονται περισσότερες ρίζες υδροξυλίου και ρίζες υπεροξειδίου στην αέρια φάση (λόγω της αποσύνθεσης του αερίου οξυγόνου) και ο συνδυασμός τους στη συνέχεια στις πιο ψυχρές περιοχές (διεπιφάνεια ή κυρίως όγκος διαλύματος) δίνει περισσότερο υπεροξείδιο του υδρογόνου (Petrier et al., 1994). Σύμφωνα με τους περισσότερους ερευνητές υπάρχουν τρεις πιθανές περιοχές για χημική αντίδραση (σχήμα 2.1):

- (α) Μέσα στη ίδια τη φυσαλίδα.
- (β) Στη διεπιφάνεια ανάμεσα στη φυσαλίδα και το υγρό που την περιβάλλει.
- (γ) Στον κυρίως όγκο του διαλύματος (Weavers, 1998).



Σχήμα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση της φυσαλίδας σπηλαίωσης. Πιθανά κέντρα αντίδρασης (Mason T.J., 1990).

Κατά την επεξεργασία του νερού ή υγρών αποβλήτων, οι οργανικοί ρύποι μπορεί να καταστραφούν είτε στις δύο πρώτες περιοχές με συνδυασμό πυρολυτικής αποσύνθεσης και υδροξυλίωσης, είτε στον κύριο όγκο του υγρού με οξειδωτική αποδόμηση από τις ρίζες υδροξυλίου και το υπεροξείδιο του υδρογόνου.

Ο βαθμός οξειδωσης στην τρίτη περιοχή εξαρτάται από την ποσότητα ελευθέρων ριζών υδροξυλίου, που είναι διαθέσιμες στο διάλυμα, οι οποίες με τη σειρά τους εξαρτώνται από το χρόνο ζωής και τη διάρκεια των φυσαλίδων, αλλά και από τη γεωμετρία του δοχείου της αντίδρασης. Το φαινόμενο της σπηλαιώσης φαίνεται να είναι σημαντικότερο όταν η συχνότητα του κύματος είναι ίση με τη συχνότητα συντονισμού της φυσαλίδας (Manson, 1990). Η ακτίνα συντονισμού της φυσαλίδας που διεγείρεται από κύματα χαμηλής συχνότητας είναι ~ 170 μm (στα 20 kHz) και τα «σπήλαια» που παγιδεύουν τέτοιες φυσαλίδες θεωρούνται «σταθερά» με μέσο χρόνο ζωής ~ 10 μs (Manson, 1990; Petrier et al., 1994).

Σε αυτό το είδος σπηλαιώσης, η φάση της κατάρρευσης καθυστερεί για μερικούς κύκλους συμπίεσης και εκτόνωσης, οπότε υπάρχει ο χρόνος για να περάσουν στην αέρια φάση σημαντικές ποσότητες πτητικών διαλυμένων ουσιών και ατμών του διαλύτη (Manson, 1990).

Η αργή ανάπτυξη της φυσαλίδας και η μεγάλη διάρκεια κατάρρευσης της δίνουν το χρόνο για να συμβούν οι αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στη διεπιφάνεια και έτσι παρεμποδίζεται η μεταφορά της ρίζας υδροξυλίου και άλλων ενεργών ειδών στο διάλυμα (Barbier and Petrier, 1996). Έτσι, οι υπέρηχοι χαμηλής συχνότητας αναμένεται να έχουν καταστροφικά αποτελέσματα μόνο για υδρόφοβα συστατικά, τα οποία διαχέονται εύκολα μέσα στις φυσαλίδες. Αντίθετα, η ακτίνα συντονισμού των φυσαλίδων που έχουν δημιουργηθεί από υπερήχους μέσης συχνότητας (300 – 1000 kHz) είναι εξαιρετικά μικρή (4.6 μs στα 500 kHz) και ο χρόνος ζωής τους πολύς βραχύς (0.6 μs κατά μέσο όρο). Η θερμοκρασία και η πίεση που αναπτύσσεται σε αυτά τα «σπήλαια» είναι πολύ μεγαλύτερες από αυτές στα «σταθερά σπήλαια» και μεγαλύτερα ποσά ενέργειας εκλύονται στο γύρω χώρο κατά τη βίαιη κατάρρευσή τους (Manson, 1990). Κατά συνέπεια, οι υπέρηχοι μέσης συχνότητας είναι κατάλληλοι για την καταστροφή μη πτητικών οργανικών συστατικών. Το καταστροφικό αποτέλεσμα οφείλεται στην υψηλή πιθανότητα που έχουν οι ρίζες υδροξυλίου να βρεθούν στον κυρίως όγκο του διαλύματος μετά την κατάρρευση του ακουστικού «σπηλαίου» (Petrier et al., 1992; Barbier and Petrier, 1996).

Είναι λοιπόν προφανές ότι η επιλογή της κατάλληλης συχνότητας υπερηχητικών κυμάτων έχει μεγάλη σημασία για να επιτευχθεί ικανοποιητικός βαθμός καταστροφής των ρύπων. Η επιλογή βασίζεται κυρίως στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά των συστατικών που θα υποστούν επεξεργασία, όπως η τάση ατμών, η διαλυτότητα και ο συντελεστής κατανομής σε οκτανόλη – νερό (Suslick, 1990). Τα

υδρόφοβα συστατικά με μεγάλη τάση ατμών έχουν την τάση να διαχέονται στην αέρια φάση της φυσαλίδας οπότε οι περιοχές όπου γίνεται καταστροφή τους είναι η διεπιφάνεια αερίου – υγρού και μέσα στη φυσαλίδα (Kotronarou et al., 1991). Έτσι, υδατικά διαλύματα που περιέχουν πτητικούς ρύπους πρέπει να εκτίθενται σε υπέρηχους υψηλής ισχύος (δημιουργία μακρόβιων σταθερών «σπηλαίων») για να γίνεται θερμική και οξειδωτική καταστροφή τους (Kotronarou et al., 1991; Weavers et al., 1998).

Αντίθετα τα υδρόφιλα συστατικά, όταν έχουν χαμηλή τάση ατμών και χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν τάση να παραμένουν στον κυρίως όγκο του διαλύματος αφού απωθούνται από την υδρόφοβη επιφάνεια της φυσαλίδας. Η περιοχλή όπου γίνεται κατά συνέπεια η οξειδωτική καταστροφή αυτών των συστατικών είναι το υγρό μέσο, με την προϋπόθεση ότι μεταφέρονται αρκετές ρίζες υδροξυλίου από τη φυσαλίδα στο διάλυμα κατά την κατάρρευση της. Η μεταφορά αυτή θα είναι η μέγιστη όταν η κατάρρευση της φυσαλίδας γίνεται στιγμιαία, όταν δηλαδή χρησιμοποιούνται υπέρηχοι μέσης συχνότητας. Μπορεί ακόμα να συμβεί και θερμική πυρόλυση αυτών των μη πτητικών συστατικών όταν αυτά βρίσκονται σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, οπότε γίνεται προσρόφηση τους στη διεπιφάνεια αερίου – υγρού όπου και αποσυντίθεται (Serpone et al., 1994).

2.4 Έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV)

Η μέθοδος της απολύμανσης μέσω χρήσης υπεριώδους ακτινοβολίας επιλέχθηκε ως μία από της μεθόδους απολύμανσης που εφαρμόστηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας διπλωματικής εργασίας.

Η υπεριώδης ακτινοβολία βρίσκεται στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα μεταξύ του ορατού φωτός και των ακτίνων X και μπορεί καλύτερα να περιγραφεί ως αόρατη ακτινοβολία. Για να σκοτωθούν οι μικροοργανισμοί, οι ακτίνες UV πρέπει στην κυριολεξία να χτυπήσουν το κύτταρο. Η UV ενέργεια διαπερνά την εξωτερική μεμβράνη των κυττάρων, περνά μέσω του σώματος κυττάρων και διασπά το DNA τους, αποτρέποντας την αναπαραγωγή. Ο βαθμός αδρανοποίησης από την υπεριώδη ακτινοβολία συσχετίζεται άμεσα με τη δόση της UV ακτινοβολίας που εφαρμόζεται στο υγρό. Η δόση μετριέται σε μικρο-Watt επί τα δευτερόλεπτα εφαρμογής ανά

τετραγωνικό εκατοστό της επιφάνειας που εκπέμπεται στο υγρό ($\mu\text{Ws}/\text{cm}^2$) (Μάρακας, 2006).

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι μη-ιονίζουσα και έχει ένα εύρος μήκους κύματος από 100-400 nm. Αυτό το εύρος υποδιαιρείται σε τρεις ζώνες.

- ✓ Τη UVA (μεγάλου κύματος) από 315-400 nm,
- ✓ τη UVB (μεσαίου κύματος) από 280-325 nm και
- ✓ τη UVC (μικρού κύματος) από 100-280 nm. (Μάρακας, 2006)

Η απολύμανση μέσω της ακτινοβολίας UV είναι μια εύχρηστη λύση. Η πιο κοινή πηγή της UVC ακτινοβολίας είναι ένας λαμπτήρας ατμών υδραργύρου κατασκευασμένος από χαλαζία ή από παρόμοιο υλικό, όπου δεν απορροφάει στο έντονο και καταστρεπτικό μη ορατό φως των 245 nm. Η υπεριώδης ακτινοβολία εκπέμπεται από τη δημιουργία ενός τόξου εντός της λάμπας ατμού υδραργύρου εξαιτίας ηλεκτρικής εκκένωσης. Για να εξασφαλιστεί η απολύμανση, το νερό πρέπει να είναι κατά το δυνατόν απαλλαγμένο από αιωρούμενα στερεά και ουσίες που απορροφούν το φως (Μάρακας, 2006).

Η υπεριώδης ακτινοβολία είναι μια φυσική διαδικασία απολύμανσης και υπό αυτή τη μορφή έχει διάφορα θεμελιώδη χαρακτηριστικά που τη διακρίνουν από τις χημικές διαδικασίες απολύμανσης, όπως είναι η χλωρίωση. Η υπεριώδης ακτινοβολία επιτυγχάνει την απολύμανση προκαλώντας φωτο-βιοχημικές αλλαγές μέσα στους μικροοργανισμούς. Για να πραγματοποιηθεί μια φωτοχημική αντίδραση, δύο τουλάχιστον όροι πρέπει να ικανοποιούνται: πρέπει να είναι διαθέσιμη ακτινοβολία ικανοποιητικής ενέργειας ώστε να μπορέσει να αλλάξει τους χημικούς δεσμούς, η ακτινοβολία πρέπει να απορροφηθεί από το μόριο στόχο (οργανισμός). Στην πλειοψηφία των UV εφαρμογών απολύμανσης, οι λαμπτήρες χαμηλής πίεσεως τόξων υδραργύρου έχουν επιλεγεί ως πηγή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Το μεγαλύτερο ποσοστό της παραγωγής ακτινοβολίας από αυτούς τους λαμπτήρες είναι μονοχρωματικό σε ένα μήκος κύματος (λ) 254 nm (Parsons et al., 2004).

Υπάρχουν και άλλα μήκη κύματος που είναι εμφανή στο φάσμα παραγωγής από έναν λαμπτήρα τόξων υδραργύρου χαμηλής πίεσεως. Το μήκος κύματος των 185 nm αντιπροσωπεύει την ακτινοβολία με πολύ υψηλότερη ενέργεια απ'ότι των 245 nm, αλλά σε αυτό το μήκος είναι ασήμαντο στις περισσότερες εφαρμογές λόγω της απορροφητικότητας του από το περίβλημα χαλαζία που περιβάλλει το λαμπτήρα και τα υδάτινα συστατικά.

Κάποια μήκη κύματος είναι εμφανή στο ορατό φάσμα ($\lambda \geq 400$ nm). Η ακτινοβολία αυτών των μηκών κύματος είναι ατελέσφορη όσον αφορά την απολύμανση και είναι υπεύθυνη για το απαλό μπλε χρώμα που επιδεικνύεται από τους λαμπτήρες χαμηλής πίεσεως.

Η ενέργεια που συνδέεται με την ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μπορεί να υπολογιστεί ως:

$$E_{\lambda} = \frac{h \times C}{\lambda} \times A$$

Όπου:

E_{λ} = ακτινοβόλος ενέργεια που συνδέεται με το δεδομένο μήκος κύματος, kcal/einstein

C = ταχύτητα ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας σε ένα κενό- $3 \cdot 10^{17}$ nm/s

h = σταθερά του Planck = $1,583 \cdot 10^{-37}$ kcal·s

λ = μήκος κύματος ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας, nm

A = αριθμός Avogadro = $6.023 \cdot 10^{23}$ φωτόνια /einstein

Όπως περιγράφεται παραπάνω, η φωτοχημική αλλαγή είναι δυνατή μόνο αν η ακτινοβολούμενη ενέργεια είναι διαθέσιμη να απορροφηθεί. Η μέθοδος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με την χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην καταστροφή μονοκύτταρων μικροοργανισμών, όπως είναι οι παθογόνοι ιοί. Η καταστροφή των μικροοργανισμών οφείλεται στην απορρόφηση της ακτινοβολίας από το γενετικό υλικό (DNA) των κυττάρων. Η μέγιστη καταστροφική ικανότητα της υπεριώδους ακτινοβολίας επιτυγχάνεται σε μήκος κύματος 250 - 265 nm, όπου αναφέρεται η μέγιστη απορρόφησή της από τα νουκλεϊκά οξέα. Η ευαισθησία των μικροοργανισμών που προσβάλλονται από την υπεριώδη ακτινοβολία ποικίλλει εξαρτώμενη από την αντίσταση στη διείσδυση της.

Η χημική σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος και το πάχος του καθορίζουν την αντίσταση των μικροοργανισμών στην υπεριώδη ακτινοβολία. Έκθεση των μορίων με προσβεβλημένο μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία DNA, σε ακτινοβολία στην περιοχή του ορατού γαλάζιου φωτός (310 - 500 nm), μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την επανόρθωση της βλάβης και πρέπει να αποφεύγεται. Αυτό το φαινόμενο αφορά σε ορισμένους μόνο μικροοργανισμούς και γενικά δεν αφορά στους ιούς.

Μέτρο της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης με υπεριώδη ακτινοβολία αποτελεί η ποσότητα της ενέργειας που απορροφάται από το μικροοργανισμό. Η ποσότητα αυτή είναι το γινόμενο του ρυθμού με τον οποίο η ενέργεια παρέχεται επί τον χρόνο κατά τον οποίο ο μικροοργανισμός εκτίθεται σε αυτή. Παρ' όλα αυτά, αύξηση της δόσης οδηγεί συχνά σε μειωμένη απολυμαντική δράση, γεγονός που οφείλεται στην προσρόφηση των βακτηρίων στα αιωρούμενα σωματίδια. Μια άλλη παράμετρος που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι ότι ορισμένες ανόργανες και οργανικές ενώσεις που υπάρχουν στα απόβλητα απορροφούν στο μήκος κύματος της εκπεμπόμενης υπεριώδους ακτινοβολίας. Ο χρόνος και η ένταση της ακτινοβολίας είναι οι παράμετροι που προκαθορίζουν το αποτέλεσμα της ακτινοβολίας στην απολύμανση των νερών (Νταρακάς, 2009).

Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου απολύμανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (Δρόσου, 2007):

- Αποδοτικό απολυμαντικό,
- μη υπολειμματική τοξικότητα,
- είναι περισσότερο αποδοτική από το χλώριο στην απενεργοποίηση των περισσότερων ιών, σπόρων, κυστών,
- δεν ευνοεί τον σχηματισμό DBP (Disinfection By-Products - Παραπροϊόντα Απολύμανσης) στις δοσολογίες που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση,
- δεν αυξάνει το επίπεδο των TDS (Total Dissolved Solids - Ολικά Διαλυμένα Στερεα) στην επεξεργασμένη εκροή,
- αποδοτικό στην καταστροφή των ανθεκτικών οργανικών συστατικών όπως η NDMA (N- νιτροσοδιμεθυλαμίνη),
- βελτιωμένη ασφάλεια σε σχέση με την χρήση χημικών απολυμαντικών,
- απαιτεί μικρότερο χώρο σε σχέση με την απολύμανση με χλώριο,
- σε υψηλότερες δόσεις UV από αυτές που απαιτούνται, η ακτινοβολία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τη συγκέντρωση ιχνοποσοτήτων οργανικών συστατικών (π.χ. NDMA, νιτροσοδιμεθυλαμίνη).

Μειονεκτήματα μεθόδου απολύμανσης με χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας
(Δρόσου, 2007):

- Μη άμεση μέτρηση για τον έλεγχο της επιτυχίας της απολύμανσης,
- δεν παρέχει υπολειμματική συγκέντρωση,
- είναι λιγότερο αποδοτικό στην απενεργοποίηση κάποιων ιών, σπόρων και κυστών στις χαμηλές δοσολογίες που χρησιμοποιούνται για κολοβακτηρίδια,
- καταναλώνει ενέργεια,
- είναι κρίσιμος ο υδραυλικός σχεδιασμός του UV συστήματος,
- είναι σχετικά ακριβό,
- απαιτείται μεγάλος αριθμός UV λυχνιών όταν χρησιμοποιούνται συστήματα χαμηλής- πίεσης, χαμηλής- έντασης,
- οι λυχνίες χαμηλής-πίεσης, χαμηλής-έντασης απαιτούν καθαρισμό με οξύ για να απομακρυνθούν οι επικαθίσεις αλάτων,
- διαθεσιμότητα του χημικού συστήματος για βοηθητικές χρήσεις, όπως ο έλεγχος οσμών.

2.5 Φωτοκατάλυση

Η φωτοκατάλυση είναι συνδυασμός της υπεριώδους ακτινοβολίας UV με χρήση κάποιου καταλύτη (π.χ. διοξείδιο του Τιτανίου, TiO_2), με σκοπό τη δημιουργία οξειδωτικών συνθηκών (φωτοκαταλυτική οξείδωση). Με την φωτοκατάλυση επιτυγχάνεται ακόμη και πλήρης οξείδωση διάφορων οργανικών ρύπων καθώς και η απενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών. Πρόκειται για μια μέθοδο αντιρρύπανσης, η οποία λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας, και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον (Malato et al., 2007).

2.5.1 Ετερογενής Φωτοκατάλυση

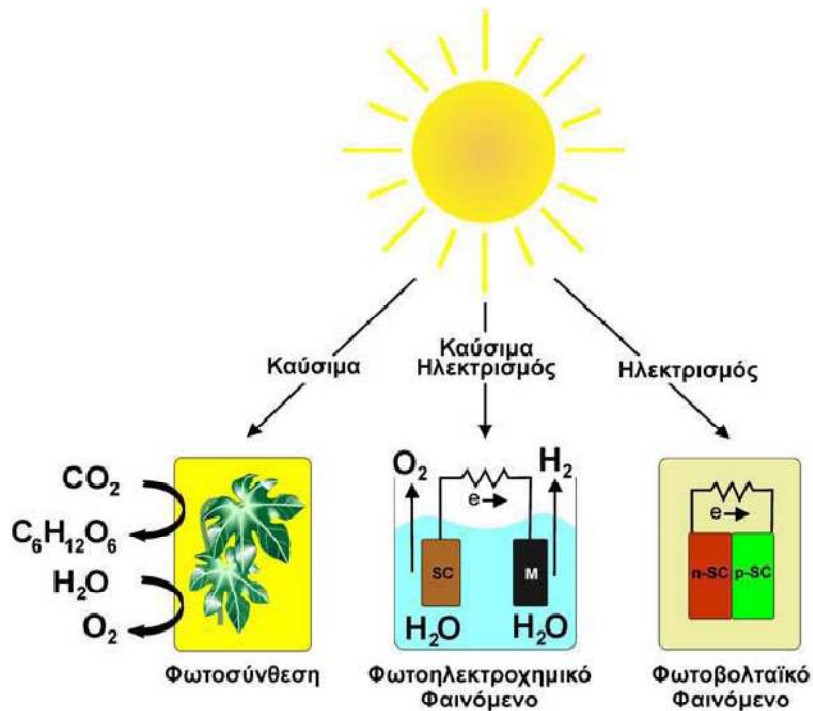
Η ετερογενής φωτοκατάλυση αξιοποιεί τις καταλυτικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα σε αιωρήματα ημιαγώγιμων κόνεων (TiO_2 , ZnO , WO_3) με παρουσία τεχνητού ή φυσικού φωτισμού, οι οποίες μπορούν να επιφέρουν την πλήρη οξείδωση διαφόρων οργανικών και ανόργανων ρύπων, καθώς και την απενεργοποίηση των παθογόνων μικροοργανισμών, χωρίς την περαιτέρω επιβάρυνση του περιβάλλοντος. Αναπτύχθηκε ραγδαία την τελευταία δεκαετία λόγω ορισμένων σημαντικών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους στην αδρανοποίηση τοξικών ρύπων στα υγρά απόβλητα και στον αέρα. Η ανάμειξη του προς καθαρισμό αποβλήτου με έναν ημιαγώγιμο καταλύτη, ο οποίος είναι χημικά και βιολογικά αδρανής και ο φωτισμός του συστήματος με τεχνητό ή ηλιακό φως, επιφέρουν τελικά την πλήρη καταστροφή των οργανικών ενώσεων που υπάρχουν στο απόβλητο. Πρόκειται για μία μέθοδο απολύμανσης η οποία λαμβάνει χώρα σε ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας και είναι ιδιαίτερα φιλική προς το περιβάλλον και αυτό επειδή έχει τεράστιες ομοιότητες με τις διεργασίες αυτοκαθαρισμού της φύσης. Η παρουσία του καταλύτη απλώς επιταχύνει κατά πολλές τάξεις μεγέθους την αποικοδόμηση.

Πλεονεκτήματα της μεθόδου (Πούλιος, 2007):

- Την πλήρη φωτοκαταλυτική οξείδωση(καύση, mineralization) των οργανικών μορίων,
- το γεγονός ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για πολύ μικρές συγκεντρώσεις ρύπων,
- την δυνατότητα χρησιμοποίησης ως φωτοευαίσθητων καταλυτών, ημιαγώγιμων υλικών που είναι χημικά και βιολογικά αδρανή (π.χ. TiO_2) και το χαμηλό τους κόστος,
- το ότι είναι δυνατή η ανάκτηση και συνεπώς η επαναχρησιμοποίησή τους, γεγονός που συνεπάγεται αφ' ενός τη μείωση του κόστους εφαρμογής της μεθόδου, αφ' ετέρου την αποφυγή της επιπλέον επιβάρυνσης του περιβάλλοντος με χημικούς ρύπους,
- την δυνατότητα εκμετάλλευσης του ηλιακού φωτός για την ενεργοποίηση του καταλύτη ένα πλεονέκτημα που αποκτά ιδιαίτερη βαρύτητα σε περιοχές μεγάλης ηλιοφάνειας, όπως είναι η χώρα μας,
- και τέλος την απολυμαντική ικανότητα της μεθόδου.

2.5.2 Το φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο

Η φωτοκαταλυτική οξείδωση των διαφόρων οργανικών ενώσεων βασίζεται στο φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο, το οποίο αποτελεί έναν από τους τρεις τρόπους άμεσης μετατροπής της φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Μετατροπή φωτεινής ενέργειας σε ηλεκτρική ή χημική (Πούλιος, 2007)..

Γενικά, φωτοηλεκτροχημικό φαινόμενο είναι το φαινόμενο εκείνο όπου ο φωτισμός της διεπιφάνειας ηλεκτρόδιο/ηλεκτρολύτης επιφέρει αλλαγή στο δυναμικό του ηλεκτροδίου (ανοικτό κύκλωμα) ή στο ρεύμα που ρέει στη διαφανική περιοχή (κλειστό κύκλωμα). Το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται κατά το φωτισμό της διεπιφάνειας μεταξύ ενός φωτοευαίσθητου ημιαγωγικού υλικού (ηλεκτρόδιο) και ενός ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Τα στερεά διακρίνονται βάσει των ηλεκτρονικών ιδιοτήτων τους σε μέταλλα, ημιαγωγούς και μονωτές. Μακροσκοπικά, η διαφορετικότητα αυτή εμφανίζεται στην αντίσταση που παρουσιάζουν στη διέλευση

ηλεκτρικού ρεύματος. Μικροσκοπικά, οι ηλεκτρονικές ιδιότητες των στερεών περιγράφονται με τη βοήθεια του μοντέλου των ενεργειακών τροχιακών, το οποίο περιγράφει τη συμπεριφορά ενός ηλεκτρονίου που βρίσκεται στην εξωτερική στιβάδα σθένους, κατά την κίνησή του στο πεδίο που δημιουργεί ο πυρήνας και τα ηλεκτρόνια που τον περιβάλλουν (Πούλιος, 2007).

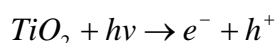
Η εμφάνιση του φωτοηλεκτροχημικού φαινομένου προϋποθέτει :

- την ύπαρξη φωτοευαίσθητων ημιαγωγικών υλικών ικανών να απορροφήσουν τμήμα της φωτεινής ακτινοβολίας και να την μετατρέψουν σε φορείς ηλεκτρικού ρεύματος (σε ηλεκτρόνια e^- και οπές h^+)
- την ταυτόχρονη ύπαρξη ενός ηλεκτρικού πεδίου, ικανού να διαχωρίσει τους φωτοδημιουργούμενους φορείς και να άγει το ηλεκτρικό ρεύμα.

2.5.3 Μηχανισμός φωτοκαταλυτικής οξειδωσης

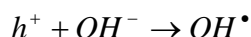
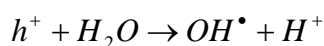
Σύμφωνα με το μοντέλο των ενεργειακών τροχιακών, μεταξύ των κατελιημένων δεσμικών τροχιακών στη ζώνη σθένους (ΖΣ) και των μη κατελιημένων αντιδεσμικών τροχιακών στη ζώνη αγωγιμότητας (ΖΑ) ενός στερεού, παρεμβάλλεται μια περιοχή απαγορευμένων ενεργειακών καταστάσεων, η οποία ονομάζεται απαγορευμένη ζώνη ή αλλιώς απαγορευμένο ενεργειακό χάσμα (E_g).

Κατά τον φωτισμό ενός φωτοευαίσθητου ημιαγωγικού υλικού, το οποίο βρίσκεται σε επαφή με ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα, με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος, τα ηλεκτρόνια (e^-) της ΖΣ διεγείρονται, απορροφώντας φωτόνια ενέργειας ίσης ή μεγαλύτερης από αυτή που αντιστοιχεί στο ενεργειακό χάσμα του ημιαγωγού ($h\nu \geq E_g$) και μεταπηδούν στη ΖΑ, δημιουργώντας παράλληλα θετικά φορτισμένες οπές (h^+) στη ΖΣ. Στην περίπτωση που ως ημιαγωγός χρησιμοποιείται το διοξείδιο του τιτανίου, TiO_2 , ισχύει :

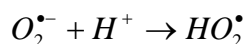
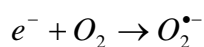


Τα φωτοπαραγόμενα ζεύγη οπών/ηλεκτρονίων διαχωρίζονται υπό την επίδραση του ηλεκτρικού πεδίου της διαφασικής περιοχής και στην περίπτωση ενός n-τύπου

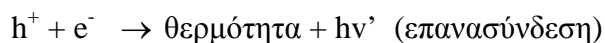
ημιαγωγού, όπως το TiO_2 , τα μεν ηλεκτρόνια κινούνται προς το εσωτερικό του κρυστάλλου, ενώ οι οπές ρέουν προς την επιφάνεια. Σε υδατικά διαλύματα οι φωτοπαραγόμενες οπές αντιδρούν με τα ανιόντα υδροξυλίου OH^- ή με τα μόρια του H_2O που είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του ημιαγωγού και τα οξειδώνουν προς τις αντίστοιχες ρίζες υδροξυλίου, σύμφωνα με τις εξής αντιδράσεις (Χατζησιμεών, 2009) :



Οργανικές ενώσεις + h^+ \rightarrow Προϊόντα οξείδωσης

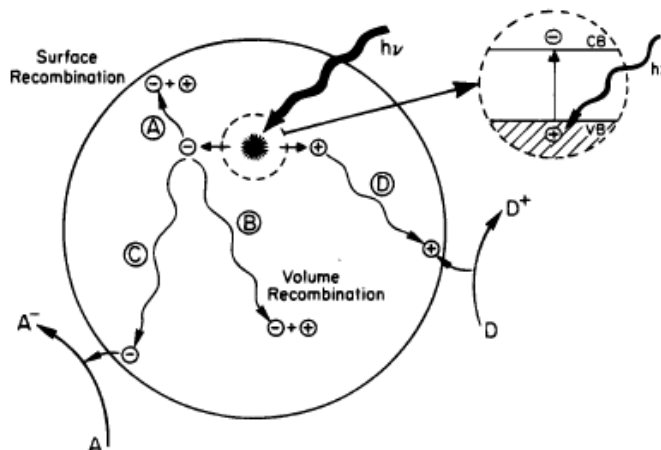


Οργανικές ενώσεις + e^- \rightarrow Προϊόντα αναγωγής



Οι ρίζες υδροξυλίου και υπερωδροξυλίου μπορούν να ανοργανοποιήσουν τις περισσότερες οργανικές ενώσεις που περιέχονται στο διάλυμα :

Ρίζες (HO^\bullet , HO_2^\bullet) + Οργανικές ενώσεις \rightarrow Προϊόντα ανοργανοποίησης



Σχήμα 2.2: Κύριες διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μέσα σε κόκκο ημιαγωγικής σκόνης, κατά τη φωτοδιέγερσή του από ακτινοβολία $h\nu \geq E_g$: (A) και (B) επανασύνδεση ζεύγους οπών/ηλεκτρονίων στην επιφάνεια και στο εσωτερικό του κόκκου αντίστοιχα, (C) αναγωγή του δέκτη ηλεκτρονίων A και (D) οξείδωση του δότη ηλεκτρονίων D (Χατζησιμεών, 2009).

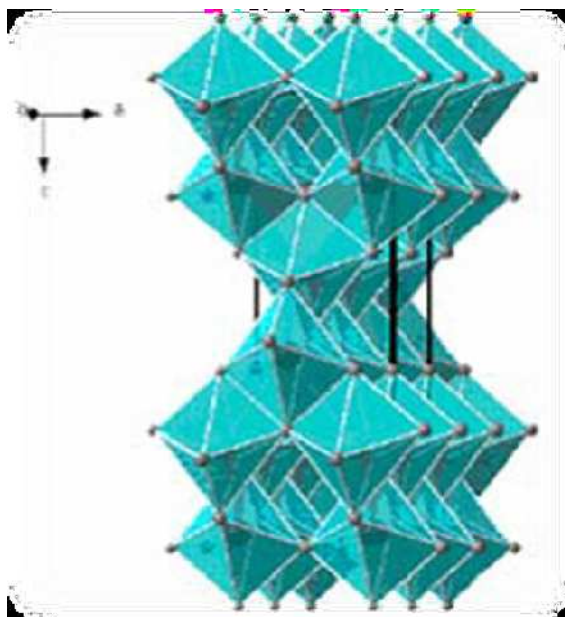
2.5.4 Ημιαγώγιμα υλικά – Καταλύτες

Οι φωτοκαταλύτες είναι στερεά υλικά που μπορούν να επάγουν αντιδράσεις παρουσία φωτός και δεν καταναλώνονται κατά τη διαδικασία αυτή. Συνήθως, είναι ημιαγωγοί. Ο ρόλος του ημιαγωγού στη φωτοκαταλυτική οξείδωση οργανικών ρύπων είναι καθοριστικής σημασίας. Τόσο οι φυσικές όσο και οι φυσικοχημικές του ιδιότητες είναι παράγοντες που επιδρούν αποφασιστικά στη λειτουργικότητα του συστήματος. Οι ημιαγώγιμες ουσίες που ως επί των πλείστων έχουν χρησιμοποιηθεί για φωτοκαταλυτικές εφαρμογές, τόσο στο περιβαλλοντικό έργο όσο και στον ενεργειακό τομέα, είναι οι ακόλουθες: TiO_2 , ZnO , SrTiO_3 , O_3 , Fe_2O_3 , ZnS , CdS .

Ο καταλύτης TiO_2 είναι σχεδόν ο ιδανικός καταλύτης για τις φωτοκαταλυτικές αντιδράσεις οξείδωσης καθώς είναι χημικά και βιολογικά αδρανής, φωτοκαταλυτικά ενεργός υπό κατάλληλη ακτινοβολία, παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση, το κόστος του είναι σχετικά χαμηλό και η παραγωγή/χρήση του είναι εύκολη. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα είναι ο χαμηλός ρυθμός επανασύνδεσης των h^+/e^- , τόσο στο εσωτερικό όσο και στην επιφάνεια του κόκκου. Η επανασύνδεση οπών και ηλεκτρονίων μειώνει τη φωτοκαταλυτική δραστηριότητα των ημιαγωγών, επειδή οδηγεί στην παραγωγή φωτονίων ή θερμότητας και όχι ριζών υδροξυλίου.

Το μεγάλο μειονέκτημα του TiO_2 είναι το μεγάλο ενεργειακό του χάσμα $E_g = 3.2 \text{ eV}$ και σαν συνέπεια ενεργοποιείται μόνο με υπεριώδη ακτινοβολία, συγκεκριμένα με φως μήκους κύματος μικρότερου των 385 nm, επομένως είναι δυνατή η αξιοποίηση μικρού μόνο μέρους της ηλιακής ακτινοβολίας (περίπου 6%). Παρόλα αυτά, η ύπαρξη τόσων πολλών πλεονεκτημάτων του TiO_2 σαν ημιαγώγιμος φωτοκαταλύτης καθιστά όχι και τόσο σημαντικούς τους περιορισμούς όσον αφορά το φασματικό προφίλ του και γι' αυτό αποτελεί το ιδανικότερο ημιαγώγιμο υλικό για τον καθαρισμό του νερού μέσω ημιαγώγιμης φωτοκατάλυσης. (Parsons et al., 2004)

Το TiO_2 συναντάται σε τρεις κρυσταλλικές μορφές, οι οποίες είναι η ανατάση (anatase), το ρουτίλιο (rutile) και ο μπρουκίτης (brookite). Η ανατάση είναι η πιο δραστηρική φωτοκαταλυτικά, λόγω της ισχυρότερης προσρόφησης των ανιόντων OH^- και του H_2O στην επιφάνειά της, καθώς και λόγω του χαμηλότερου βαθμού επανασύνδεσης των φωτοπαραγόμενων e^- και h^+ .



Εικόνα 2.3: Κρυσταλλική μορφή ανάτασης καταλύτη TiO_2 (Parsons et al., 2004).

Κατά τη φωτοελαχιστοποίηση ρύπων μέσω TiO_2 , τα φωτοδημιουργούμενα ηλεκτρόνια μειώνουν το οξυγόνο στο νερό και οι φωτοδημιουργούμενες οπές ελαχιστοποιούν το ρύπο. Το τελευταίο στάδιο της διαδικασίας περιλαμβάνει την αρχική οξείδωση των υδροξυλ-ομάδων που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια του καταλύτη σε ρίζες υδροξυλίου οι οποίες στη συνέχεια οξειδώνουν τον ρύπο και κάθε επόμενο ενδιάμεσο. Το τελικό προϊόν είναι συνήθως CO_2 και νερό.

Τέλος σημειώνεται ότι ο καταλύτης αυτός παρουσιάζει μεγάλη ανθεκτικότητα στη διάβρωση και φωτοδιάβρωση, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα ανακύκλωσης του. Παρόλα αυτά η υποχρέωση του διαχωρισμού των πολύ μικρών μορίων του από το αιώρημα μετά την επεξεργασία περιορίζει την πρόοδο της διαδικασίας. Βέβαια ο καταλύτης αυτής της μορφής μπορεί να ακινητοποιηθεί σε ένα κατάλληλο αδρανές υλικό το οποίο εξαλείφει το στάδιο απομάκρυνσης του καταλύτη. Σα συνέπεια όμως αυτού η επιφάνεια του καταλύτη μειώνεται (Parsons et al., 2004).

2.5.5 Ενίσχυση φωτοκαταλύτη TiO_2

Το TiO_2 είναι ένας καταλύτης που δουλεύει σε ήπιες συνθήκες με ήπια οξειδωτικά. Παρόλα αυτά όταν η συγκέντρωση και ο αριθμός των ρύπων αυξάνει, η

διεργασία γίνεται πιο πολύπλοκη και προκύπτουν προβλήματα όπως η απενεργοποίηση του καταλύτη, η αργή κινητική, η χαμηλή αποδοτικότητα στο φως και μηχανισμοί που δεν είναι δυνατόν να προβλεφθούν. Είναι φανερό λοιπόν ότι το καθαρό TiO_2 συνήθως χρειάζεται ενίσχυση για να ανταπεξέλθει σε πρακτικές βιομηχανικές και περιβαλλοντικές εφαρμογές και αυτό μπορεί να οδηγήσει σε άρση του πλεονεκτήματος των ήπιων συνθηκών λειτουργίας. Επίσης στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ορατό φως, το κόστος θα είναι πολύ μικρότερο από ότι στην περίπτωση του τεχνητού φωτισμού με λάμπες και η διεργασία θα είναι περισσότερο περιβαλλοντικά φιλική.

Υπάρχουν δύο παράλληλες προσπάθειες έρευνας για να ενισχυθεί η δράση του καταλύτη. Η μία είναι προσθέτοντας δότες ηλεκτρονίων, δηλαδή επιπρόσθετα οξειδωτικά, και η δεύτερη τροποποιώντας τη δομή και σύσταση του καταλύτη (Carp et al., 2004).

2.5.6 Υπεροξείδιο του Υδρογόνου (hydrogen peroxide)

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου αποτελεί ένα από τα προαναφερόμενα οξειδωτικά μέσα που προστίθενται στις τεχνολογίες απολύμανσης, με σκοπό τη βελτίωση της αποδοτικότητας τόσο αυτών γενικότερα, καθώς και του καταλύτη ειδικότερα, όπως αναφέρθηκε και προγενέστερα.



Εικόνα 2.4: Μοριακή δομή υπεροξειδίου του υδρογόνου (www.solvaychemicals.us).

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου, H_2O_2 , είναι υγρό με πολύ ανοιχτό κυανό χρώμα, όταν είναι καθαρό και σε μεγάλα στρώματα. Σε αραιά διαλύματα είναι άχρωμο. Επίσης είναι άοσμο και με κάπως πικρή γεύση (σε διαλ. 3%). Έχει σχετική μοριακή μάζα 32,015 και ειδικό βάρος $1,44 \text{ g/cm}^3$. Η ένωση έχει ισχυρές οξειδωτικές

ιδιότητες και είναι μία πολύ ισχυρή λευκαντική ουσία. Χρησιμοποιείται επίσης ως απολυμαντικό και αντισηπτικό. Η εμπορική του ονομασία είναι οξυζενέ ή περιντρόλ.

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται στην φύση από τους οργανισμούς ως παραπροϊόν του μεταβολισμού τους. Σχεδόν όλα τα ζωντανά όντα διαθέτουν ειδικά ένζυμα, τις υπεροξειδάσες, τα οποία το αποικοδομούν.

Το μόριο του H_2O_2 έχει διεδρική διαμόρφωση με γωνία $111,5^\circ$ σε αέρια φάση και $90,2^\circ$ σε στερεή φάση. Η γωνία αυτή είναι αποτέλεσμα της άπωσης μεταξύ των ζευγών ηλεκτρονίων των ομάδων $-OH$. Ενδιάμεσες γωνίες εμφανίζονται σε υδατικά διαλύματα με τιμή που επηρεάζεται από δεσμούς υδρογόνου και εξαρτάται από την περιεκτικότητα και την παρουσία άλλων ουσιών (Cotton S., 2006).

Το H_2O_2 είναι ισχυρότατο οξειδωτικό αντιδραστήριο, ισχυρότερο και από το χλώριο (Cl_2), το διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2) και τα υπερμαγγανικά ανιόντα (MnO_4^-). Ωστόσο, είναι χαρακτηριστικό το ότι το H_2O_2 δρα και ως ήπιο αναγωγικό μέσον, τόσο σε όξινα, όσο και σε αλκαλικά διαλύματα (με έκλυση πάντοτε O_2). Ως οξειδωτική ουσία το H_2O_2 θεωρείται ως η πλέον φιλική στο περιβάλλον, αφού η οξειδωτική δράση του δεν δημιουργεί τοξικά παραπροϊόντα σε αντίθεση με άλλα ισχυρά οξειδωτικά μέσα (χλώριο, νιτρικό οξύ, όζον) και η περίσσειά του καταστρέφεται πλήρως είτε με θέρμανση είτε καταλυτικά.

Ο ογκομετρικός προσδιορισμός του H_2O_2 βασίζεται στην αντίδρασή του (ως αναγωγικού) με πρότυπα διαλύματα υπερμαγγανικού καλίου ή δημητρίου (IV) σε όξινα διαλύματα, αλλά και ως οξειδωτικού (προσθήκη περίσσειας ιωδιούχων, οξείδωση μέρους τους από το H_2O_2 προς ιώδιο, ογκομέτρηση του ιωδίου με πρότυπο διάλυμα θειοθειικών). Σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις το H_2O_2 προσδιορίζεται με μια μεγάλη ποικιλία φωτομετρικών, φθορισμομετρικών και ηλεκτροχημικών μεθόδων.

Υδατικό διάλυμα 3% w/w H_2O_2 διατίθεται ελεύθερα από τα φαρμακεία ως ήπιο αντισηπτικό (οξυζενέ) για καθαρισμούς τραυμάτων και ως λευκαντικό οικιακής χρήσης. Ως πυκνότερο διάλυμα (τυπικά 15% w/w) διατίθεται σε επαγγελματίες κομμωτές σε διάφορα εμπορικά καλλυντικά σκευάσματα ως "ξεβαφτικό μαλλιών". Σημειώνεται ότι διαλύματα H_2O_2 με περιεκτικότητα ίση ή μεγαλύτερη από 8% χαρακτηρίζονται ως προς τη διακίνησή τους ως "οξειδωτικά" και πρέπει να φέρουν τη χαρακτηριστική σήμανση.

Το H_2O_2 διατίθεται από οίκους χημικών αντιδραστηρίων σε χημικά εργαστήρια ως υδατικό διάλυμα 30-35% w/w, το οποίο είναι γνωστό ως Perhydrol. Στο Perhydrol συχνά προστίθενται μικρές συγκεντρώσεις σταθεροποιητικών ουσιών, όπως 0,02%

ακετανιλίδιο (Aldrich) ή 0,006% νιτρικό αμμώνιο (Merck). Στη συγκέντρωση αυτή το H_2O_2 είναι ιδιαίτερα καυστικό για το δέρμα στο οποίο προκαλεί λεύκανση ("λευκό έγκαυμα") και χαρακτηριστικό πόνο (σαν να μπήγονται βελόνες στο δέρμα). Αυτό οφείλεται στην είσοδο H_2O_2 στα τριχοειδή αιμοφόρα αγγεία, όπου διασπάται εκλύοντας οξυγόνο το οποίο προκαλεί εμβολή (απόφραξη) σε αυτά καταστρέφοντας τοπικά τον ιστό. Το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να έχει και παρατεταμένη επαφή του δέρματος με αραιότερα διαλύματά του.

Ως πυκνότερο διάλυμα (50-70% w/w) το H_2O_2 διατίθεται μόνο σε εξουσιοδοτημένους χρήστες, όπως π.χ. σε χημικές βιομηχανίες, βιομηχανίες χάρτου και ξυλείας, όπως και σε μονάδες επεξεργασίας λημμάτων. Εξειδικευμένοι οίκοι διαθέτουν H_2O_2 σε ακόμη μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (85-98% w/w), το οποίο είναι γνωστό ως high test peroxide (HTP) και χρησιμοποιείται κυρίως ως προωθητικό πτητικών συσκευών (jetpacks) και πυραύλων. Αυτά τα πυκνά διαλύματα του H_2O_2 συχνά σταθεροποιούνται με μικρές συγκεντρώσεις κασσιτερώδους νατρίου (sodium stannate, Na_2SnO_3). Αυτές οι μορφές του H_2O_2 είναι εξαιρετικά επικίνδυνες, η κάθε επαφή τους με οργανικά υλικά μπορεί να οδηγήσει σε αναφλέξεις και εκρήξεις και ο χειρισμός τους απαιτεί ιδιαίτερες προφυλάξεις (γάντια, προστατευτικά γυαλιά) και εκπαιδευμένο προσωπικό (Solvay Chemicals, www.solvaychemicals.us).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΟ ΦΟΡΤΙΟ ΝΕΡΟΥ – ΒΑΚΙΛΛΟΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

Μέρος των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα υγρά απόβλητα και στους υδάτινους φορείς είναι παθογόνοι. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι κυρίως βακτήρια αλλά και πρωτόζωα καθώς και ιοί. Ο λόγος που καθιστά απαραίτητη την εφαρμογή της απολύμανσης, τόσο στο νερό όσο και στα απόβλητα, είναι η πληθώρα ασθενειών που μπορούν να προκαλέσουν στον άνθρωπο. Οι πιο γνωστές και σημαντικότερες από αυτές αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 3.1: Παθογόνοι μ/ο και ασθένειες που μπορούν να μεταδοθούν μέσω του νερού (Schoenen, 2002).

Βακτήρια	Ιοί	Πρωτόζωα
Cholera	Poliomyelitis	Amoebiasis
Typhoid fever	Hepatitis A και E	Giardiasis
Paratyphoid fever	Enterovirus	Cryptosporidiasis
Salmonellosis	Rotavirus	Toxoplasmosis
Shigellosis	Adenovirus	
Yersiniosis	Norwalk like virus	
Campylobacter Enteritis	Coxsackievirus	
E.coli (EHEC)		
Leptospirosis		

3.1 Δείκτες ποιότητας νερού

Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που εντοπίζονται σε υδάτινο περιβάλλον, βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις αλλά σε μεγάλη ποικιλία ειδών, είναι πρακτικά αδύνατο να προσδιοριστεί η ταυτότητα και η ποσότητα κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών. Έτσι, αντί για τον προσδιορισμό κάθε είδους παθογόνων μικροοργανισμών γίνεται ο προσδιορισμός ενδεικτικών μικροοργανισμών, οι οποίοι ονομάζονται δείκτες και η παρουσία των οποίων σημαίνει την πιθανή μόλυνση του νερού από παθογόνους μικροοργανισμούς (Δρούμπαλη, 2010).

Οι σπουδαιότεροι μικροοργανισμοί-δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας του νερού είναι τα ολικά κολοβακτηριοειδή (total coliforms), τα κοπρανώδη κολοβακτηριοειδή (faecal coliforms), οι κοπρανώδεις στρεπτόκοκκοι (faecal streptococci) και οι εντερόκοκκοι (enterococci). Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι βακτήρια και επιλέγονται ως δείκτες γιατί είναι γενικά παρόντες σε νερό που περιέχει παθογόνα, είναι σχετικά ακίνδυνοι κι επίσης αναπτύσσονται, απομονώνονται και προσδιορίζονται εύκολα (Νταρακάς, 2009).

Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί που σημαίνει ότι ως κύτταρα δεν διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα. Είναι ετερότροφοι ή αυτότροφοι (συνήθως χημειοσυνθετικοί) μικροοργανισμοί, αερόβιοι, αναερόβιοι ή επαμφοτερίζοντες. Βρίσκονται στον αέρα, στο νερό, σε οργανικές ουσίες ή σε ζωντανούς οργανισμούς των φυτών και των ζώων. Ζουν κάτω από μεγάλη ποικιλία συνθηκών θερμοκρασίας, οξυγόνου, pH και αναπτύσσονται ταχύτατα όταν υπάρχει επαρκής τροφή και τα αναγκαία θρεπτικά συστατικά. Τα ετερότροφα βακτήρια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, διότι καταναλώνουν ως τροφή τις οργανικές ουσίες που περιέχονται στα απόβλητα, συμβάλλοντας έτσι στη μείωση του ρυπαντικού φορτίου των αποβλήτων (Μαντζαβίνος, 2003).

Η ανίχνευση των ανθρώπινων εντερικών παθογόνων καθίσταται δύσκολη καθώς, όπως προαναφέρθηκε, οι παθογόνοι αυτοί μικροοργανισμοί βρίσκονται στο υδάτινο περιβάλλον σε εξαιρετικά χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ η μολυσματική τους δόση κυμαίνεται σε χαμηλά επίπεδα. Επομένως, καταφεύγουμε εναλλακτικά στον προσδιορισμό δεικτών που υποδηλώνουν την κοπρανώδη μόλυνση του νερού.

3.2 Βάκιλλος Άνθρακα (*Bacillus anthracis*)

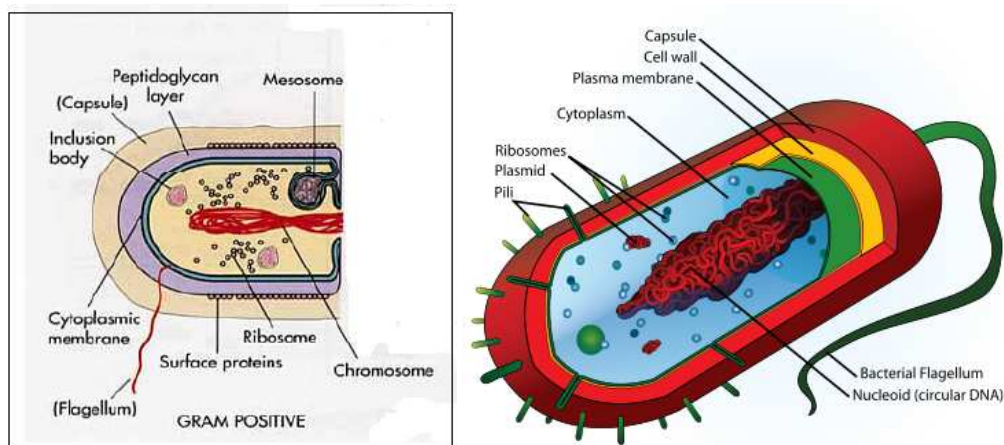
Πάντα ελλοχεύει ο κίνδυνος μόλυνσης του νερού από μικροοργανισμούς, εκτός των κοινών βακτηρίων, στους οποίους το νερό δεν αποτελεί φυσικό περιβάλλον ανάπτυξης. Κατά καιρούς εμφανίζονται διάφορα κρούσματα μόλυνσης υδάτων, είτε γενικότερα του περιβάλλοντος, από παθογόνους μικροοργανισμούς, οι οποίοι πολλές φορές προκαλούν θανατηφόρα κρούσματα. Μία από αυτές τις περιπτώσεις αποτελεί ο

βάκιλλος του άνθρακα, η περίπτωση του οποίου μελετήθηκε στην παρούσα διπλωματική διατριβή.

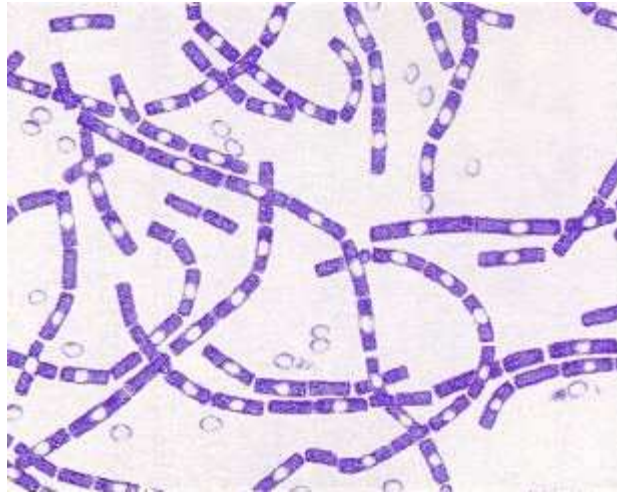
3.2.1 Γενικές πληροφορίες

Ο βάκιλλος του άνθρακα έγινε γνωστός το 2001 όταν χρησιμοποιήθηκε από τρομοκράτες κατά τη διάρκεια επιθέσεων τους. Η αιτία που ο βάκιλλος του άνθρακα χρησιμοποιήθηκε ως βιολογικό όπλο αποδείχθηκε πως είναι η υψηλή ανθεκτικότητα του αλλά και η έντονη παθογένεια που προκαλεί, σε σχέση με άλλα βακτήρια. Η ασθένεια που προκαλεί ο βάκιλλος αυτός ονομάζεται και η ίδια άνθρακας και αποτελεί μία επικίνδυνη, οξείας μορφής μολυσματική ασθένεια, η οποία σύμφωνα με επιστήμονες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όπλο μαζικής καταστροφής σε περίπτωση βιολογικού πολέμου. Οι επιπτώσεις που προκαλεί στην ανθρώπινη υγεία αφορούν το αναπνευστικό σύστημα, το δέρμα και το γαστρεντερικό σύστημα. Η ασθένεια εμφανίζεται κατά κύριο λόγο σε ζώα και κατ' επέκταση στον άνθρωπο σε περίπτωση που έρθει σε επαφή με αυτά (www.medlook.net).

Η κατηγορία βακτηρίων στην οποία εντάσσεται ο εν λόγω βάκιλλος είναι τα Gram-θετικά βακτήρια. Η συγκεκριμένη κατηγορία εμφανίζει σε γενικές γραμμές τα ίδια μορφολογικά χαρακτηριστικά με όλα τα κοινά βακτήρια. Ωστόσο υπάρχουν μερικά στοιχεία που τη διαφοροποιούν, όπως φαίνεται και στο παρακάτω σχήμα, και την καθιστούν πιο ανθεκτική.



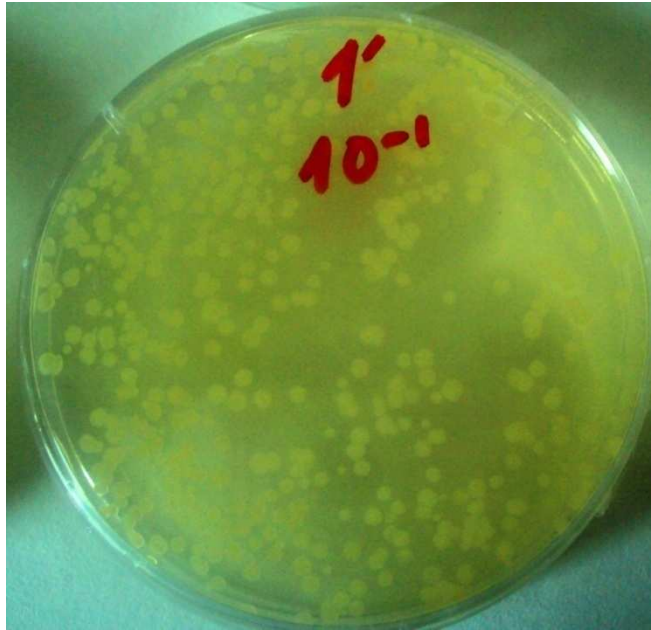
Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση της δομής Gram positive βακτηρίου (www.so83ctp.edu.glogster.com).



Εικόνα 3.2: Απεικόνιση *B. anthracis* στο μικροσκόπιο (www.textbookofbacteriology.net).

Η ανίχνευση και ταυτοποίηση του *B. anthracis* με κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους δεν καθίσταται πάντα εύκολη διαδικασία, δεδομένου ότι το συγκεκριμένο παθογόνο στέλεχος φέρει στενή συγγένεια με τα είδη *B. cereus* και *B. thuringiensis*. Η παθογένεια του *B. anthracis* συνίσταται σε δύο πλασμίδια που φέρει, το pX01 και το pX02, μεγέθους 174kb και 95kb αντίστοιχα. Το πρώτο πλασμίδιο έχει τα γονίδια *pag*, *lef* και *cytA* και το δεύτερο τα γονίδια *capA*, *capB* και *capC*. Προκειμένου ένα στέλεχος *B. anthracis* να είναι πλήρως παθογόνο πρέπει να φέρει και τα δύο πλασμίδια, τα οποία ενδέχεται να χαθούν είτε φυσιολογικά είτε κατόπιν κάποιας επεξεργασίας (Ellerbrok et al. 2002, Kim et al. 2005).

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση δειγμάτων στην παρούσα μελέτη είναι NCTC 10340 (National Collection of Type Cultures, HPA). Το συγκεκριμένο στέλεχος αναπτύσσεται σε στερεή καλλιέργεια με θρεπτικό συστατικό Nutrient Agar και σε υγρή με θρεπτικό Nutrient Broth, κατόπιν επώασης στους 37°C για περίπου 24 ώρες. Οι αποικίες που σχηματίζονται είναι κατά κύριο λόγο σφαιρικές, τραχείς και θαμπές με κρεμώδη απόχρωση (www.hpa.org.uk).



Εικόνα 3.3: Στερεή καλλιέργεια *B. anthracis*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι :

- ❖ Η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης νερού με χρήση υπερήχων καθώς και με φωτόλυση και φωτοκατάλυση, μέσω των ακτινοβολιών UVA - UVC .
- ❖ Ο έλεγχος της απόδοσης των απολυμαντικών μεθόδων υπό την επίδραση διαφόρων παραμέτρων. Αυτός ο έλεγχος πραγματοποιείται μετρώντας την αδρανοποίηση του βακτηρίου *B. anthracis* σε συνάρτηση με τον χρόνο απολύμανσης, την αρχική συγκέντρωση του βακτηρίου και τη συγκέντρωση του καταλύτη και την ισχύ των υπερήχων.
- ❖ Η ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών με την κλασσική καλλιεργητική μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων.
- ❖ Ποσοτικοποίηση του βακτηρίου με τη μοριακή μέθοδο Real-time PCR και τη χρήση χρωμοσωμικού γονιδίου.
- ❖ Διερεύνηση της παθογένειας του υπό εξέταση στελέχους κατόπιν εφαρμογής των μεθόδων απολύμανσης μέσω ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης δύο γονιδίων που βρίσκονται στα δύο πλασμίδια του *B. anthracis* : γονίδιο *lef* στο πλασμίδιο pX01 και γονίδιο *capA* στο πλασμίδιο pX02.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Στο κεφάλαιο αυτό θα ακολουθήσει η περιγραφή της πειραματικής διαδικασίας. Αυτή συμπεριλαμβάνει την αναφορά των χημικών ενώσεων, των διαλυμάτων, των μηχανημάτων και συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και του τύπου του στελέχους που επιλέχθηκε για την επιμόλυνση των δειγμάτων και της συνολικής πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε.

5.1 Υλικά

5.1.1 Θρεπτικά Υλικά

- Nutrient Agar (Oxoid)
- Nutrient Broth (Oxoid)

5.1.2 Χημικά Υλικά

- Αιθανόλη (Merck)
- Χλωριούχο νάτριο, NaCl (Merck)
- TiO₂ (Aeroxide P 25 (Degussa P 25), Degussa AG)
- H₂O₂ (Merck)
- QIAamp DNA Mini Kit (50), QIAGEN GmbH, Cat. No. 51304
- KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism™

5.1.3 Διαλύματα

- Διάλυμα αιθανόλης, συγκέντρωσης 70 %
- Υδατικό διάλυμα NaCl 0.9 % w/v

5.1.4 Εκκινητές (PCR)

	Εκκινητής	Γονίδιο	Αλληλουχία (5' to 3')	Μέγεθος προϊόντος PCR
1	groB-F	Χρωμοσωμικό γονίδιο groB	CCACCAACAGTAGAAAATGCC	175bp
2	groB-R		AAATTCACCAGTTTCTGGATCT	
3	lef-F	Πλασμιδιακό γονίδιο lef (πλασμίδιο pX01)	TGAACCCGTACTIONTGTAAATCCAATC	475bp
4	lef-R		ATCGCTCCAGTGTGATAGTGCT	
5	cap29-F	Πλασμιδιακό γονίδιο capA (πλασμίδιο pX02)	GTTGTACCTGGTTATTTAGCACTC	318bp
6	cap29-R		ACCACTTAACAAAATTGTAGTCC	

5.1.5 Πρότυπο Στέλεχος

Το στέλεχος που χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση δειγμάτων στην παρούσα μελέτη είναι το βακτήριο *Bacillus Anthracis*, NCTC 10340 (National Collection of Type Cultures, HPA).

Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του βακτηρίου. Για να ταυτοποιηθεί η συγκέντρωση πραγματοποιούνταν πριν από κάθε πείραμα, οπτική φωτομέτρηση του εκάστοτε εναιωρήματος, δηλαδή η μέτρηση της θολότητας σε φωτόμετρο σε μήκος κύματος 600nm. Η τιμή της συγκέντρωσης προκύπτει μέσω των προτύπων “Mc Farland”.

Ακολουθεί ο πίνακας με τις αντιστοιχίες των συγκεντρώσεων με τις τιμές των απορροφήσεων.

Πίνακας 5.1: Αντιστοιχία τιμών απορρόφησης – συγκέντρωσης.

McFarland Standard No.	0.5	1	2	3	4
1.0% <u>Χλωριούχο βάριο</u> (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4
1.0% <u>Θειικό οξύ</u> (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6
Πυκνότητα κυττάρων (1×10^8 CFU/mL)	1.5	3.0	6.0	9.0	12.0
% Διαπερατότητα*	74.3	55.6	35.6	26.4	21.5
Απορρόφηση*	0.132	0.257	0.451	0.582	0.669

*σε μήκος κύματος των 600 nm

Στην παρούσα διπλωματική θεωρήθηκε ωστόσο ότι οπτική απορρόφηση ίση με OD= 0,1 στα 600nm, αντιστοιχεί σε συγκέντρωση περίπου 10^7 CFU/ml. Προκειμένου να παρασκευαστούν εναιωρήματα χαμηλότερης συγκέντρωσης, πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις από το πυκνό διάλυμα, των 10^7 CFU/ml.

5.2 Μεθοδολογία

5.2.1 Προετοιμασία πειράματος

Σε όλα τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του εναιωρήματος, υδατικό διάλυμα NaCl 0,9 %. Σε κάθε πείραμα απαιτούνταν 300 ml εναιωρήματος του βακίλλου. Το κάθε εναιώρημα ανάλογα με την αρχική συγκέντρωση βακτηριακού φορτίου που απαιτούνταν παρασκευάζονταν από αρχικό πυκνό, της τάξης του 10^7 CFU/ ml, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

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 20-30 min. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Αναφορικά με την καλλιέργεια του βακίλλου, έγινε σε τριβλία, τα οποία περιείχαν αποστειρωμένο, το στερεό θρεπτικό Nutrient Agar. Πριν από κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν ανακαλλιέργεια του στελέχους. Η διαδικασία ανακαλλιέργειας περιλαμβάνει την επίστρωση αποικιών του βακτηρίου, από προγενέστερη καλλιέργεια, σε τριβλία με Nutrient Agar, με τη βοήθεια πλαστικών κρίκων. Κατόπιν ακολουθεί επώαση των νέων καλλιεργειών σε κλίβανο, στους 37°C για περίπου 24 hr. Από την εκάστοτε πρόσφατη ανακαλλιέργεια λαμβάνονταν οι απαραίτητες αποικίες, με τη βοήθεια πλαστικών κρίκων, με τις οποίες επιμολύνονταν αποστειρωμένο υδατικό διάλυμα NaCl 0,9 %, με σκοπό την προετοιμασία των 300 ml αρχικού εναιωρήματος. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με αρχικές συγκεντρώσεις 10^3 - 10^6 CFU/ ml, η ταυτοποίηση των οποίων έγινε όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, με τη βοήθεια φωτομέτρησης και των προτύπων “Mc Farland”.

5.2.2 Μέθοδος διαδοχικών αραιώσεων - Καλλιεργητική διαδικασία

Με σκοπό την διαπίστωση της αποτελεσματικότητας της απολυμαντικής διαδικασίας, λαμβάνονταν δείγματα των 1-1,5 ml, σε διάφορες χρονικές στιγμές (0-120 min), κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Ακολούθως πραγματοποιούνταν η μέθοδος των διαδοχικών αραιώσεων και κατόπιν η καλλιεργητική διαδικασία.

Σύμφωνα με τη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, όγκος 1 ml από κάθε δείγμα τοποθετείται σε δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει 9 ml υδατικό διάλυμα NaCl 0,9 % . Για την περαιτέρω αραιώση του δείγματος, λαμβάνεται 1 ml από το δοκιμαστικό σωλήνα, που περιέχει το αραιωμένο εναιώρημα (10^{-1}) και τοποθετείται εκ νέου σε 9 ml υδατικό διάλυμα NaCl 0,9 %. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται σταδιακά, όσες φορές είναι επιθυμητή η 1:10 αραιώση. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, κάθε δείγμα αραιώνονταν διαδοχικά δύο φορές (10^{-1} , 10^{-2}). Αναφέρεται ότι σημαντικό ρόλο στη μέθοδο των διαδοχικών αραιώσεων, παίζει η πολύ καλή ανάδευση του κάθε δοκιμαστικού σωλήνα ούτως ώστε να επιτυγχάνεται η όσο το δυνατόν πιο ομοιόμορφη διασπορά των βακτηρίων.

Στη συνέχεια, κατά την καλλιεργητική μέθοδο, λαμβάνεται μικρή ποσότητα από κάθε αραιώση και στρώνεται σε τριβλίο, που περιέχει θρεπτικό υλικό. Στην προκειμένη περίπτωση ποσότητα 100 μ l, που λαμβάνονταν από κάθε αραιώση

στρώνονταν σε τριβλίο με Nutrient Agar, με τη βοήθεια πλαστικών κρίκων . Για λόγους επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων, κάθε αραίωση από κάθε δείγμα στρωνόταν σε 2 – 3 τριβλία. Κατόπιν τα επιστρωμένα τριβλία τοποθετούνταν για επώαση σε κλίβανο στους 37°C για περίπου 24 ώρες, όπως υποδεικνύεται από τις οδηγίες καλλιέργειας του βάκιλλου του άνθρακα.

Στο τελευταίο στάδιο πραγματοποιείται καταμέτρηση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τριβλία. Επειδή οι αποικίες εκφράζονται ως CFU/mL, ο αριθμός τους επιβάλλεται να αναχθεί από τα 100 μl σε 1 mL του αρχικού εναιωρήματος μέσω αριθμητικών υπολογισμών. Σε ένα τριβλίο μπορούν να μετρηθούν μέχρι 300 αποικίες. Αν είναι περισσότερες, η καταμέτρησή τους είναι δύσκολη και για το συγκεκριμένο τριβλίο οι αποικίες χαρακτηρίζονται ως μη αριθμήσιμες (NN, Non-Numerable). Με τις μετρήσιμες αποικίες γίνονται αριθμητικοί υπολογισμοί. Για την ουσιαστικότερη εκτίμηση των αποτελεσμάτων την απολύμανσης, μεταφέρονται τα αριθμητικά αποτελέσματα στο υπολογιστικό πρόγραμμα Excell και κατασκευάζοντας τα αντίστοιχα διαγράμματα, της συγκέντρωσης αποικιών του κάθε δείγματος ως προς τη χρονική διάρκεια της διεργασίας, $C/C_0 : t$, προκύπτουν τα αποτελέσματα της απολύμανσης.

Παράλληλα με τις καλλιέργειες πραγματοποιήθηκε σε κάθε δείγμα απομόνωση του γενετικού υλικού του Βάκιλλου. Η απομόνωση έγινε με το QIAamp DNA Mini Kit με επιπλέον χρήση διαλύματος λύσης που περιείχε λυσοζύμη.

5.2.3 Real-time PCR

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν με το σύστημα StepONE Plus (Applied Biosystems) ως εξής:

- Master mix 1X
- Συγκέντρωση εκκινητών 500nM

Για το γονίδιο groB (χρωμοσωμικό) εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο:

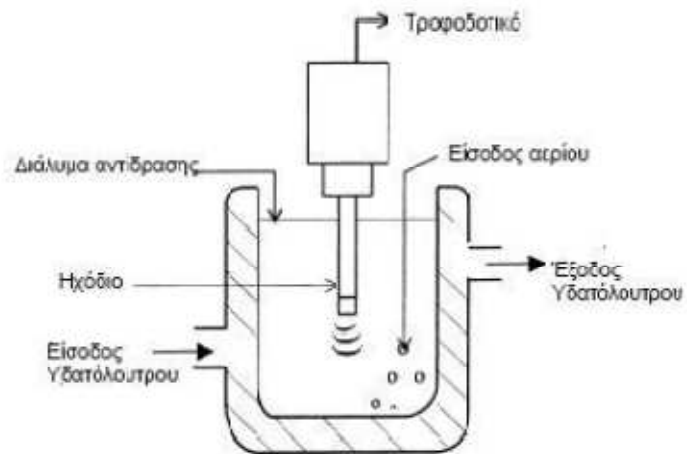
95°C για 10 min, 40 κύκλοι αποτελούμενοι από 95°C για 15 sec, 60°C για 30sec και 72°C για 10 sec, melt curve analysis: 95°C για 15sec, 60°C για 30 sec και 95°C για 15 sec.

Για τα γονίδια *lef* και *capA* (πλασμιδιακά) εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο: 95°C για 10 min, 40 κύκλοι αποτελούμενοι από 95°C για 15 sec, 58°C για 30sec και 72°C για 10 sec, melt curve analysis: 95°C για 15sec, 60°C για 30 sec και 95°C για 15 sec.

5.3 Πειραματικός εξοπλισμός – Συσκευές

5.3.1 Πειραματική διάταξη υπερήχων

Στα πειράματα απολύμανσης με χρήση υπερήχων χρησιμοποιήθηκε μια γεννήτρια υπερήχων που λειτουργούσε σε καθορισμένη συχνότητα 20 kHz και παρείχε ηλεκτρική ισχύ ως την τιμή των 250W (125 W, 187,5 W, 250 W), (Ultrason 250, Labplant, England), ενώ ήταν συνδεδεμένη με ένα ηχόδιο από τιτάνιο διαμέτρου 1 cm για την παραγωγή των υπερήχων. Περίπου 300ml από το εναιώρημα του βάκιλλου του άνθρακα σε κάθε πείραμα τοποθετούνταν σε κυλινδρικό διπλότοιχο ποτήρι ζέσεως Ace Glass (Vineland, NJ, USA). Μεταξύ των τοιχωμάτων του διπλότοιχου ποτηριού ζέσεως, κυκλοφορούσε νερό μέσω σύνδεσης με παροχή νερού, για την ψύξη του μίγματος της αντίδρασης και τη σταθεροποίηση της θερμοκρασίας, στην ανάλογη του περιβάλλοντος (~25°C). Το προς απολύμανση διάλυμα αναδεύονταν συνεχώς με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα. Το ηχόδιο εισέρχονταν στο ποτήρι ζέσεως από το επάνω μέρος του και βυθίζονταν στο διάλυμα κατά τα 2/3 και σε απόσταση 3 cm από τον πυθμένα του αντιδραστήρα. Εφόσον η πειραματική διάταξη πληρούσε τις προαναφερόμενες προϋποθέσεις, άρχιζε η συνεχόμενη ακτινοβολία των υπερήχων. Για τη μείωση της πιθανότητας επιμόλυνσης τόσο του περιβάλλοντα χώρου όσο και των δειγμάτων, η πειραματική διάταξη τοποθετήθηκε εντός κλειστού απαγωγού, και όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εντός αυτού. Ακολουθεί σχηματική απεικόνιση της πειραματικής διάταξης.



Σχήμα 5.1: Πειραματική διάταξη υπερήχων.



Εικόνα 5.1: Υπέρηχος, Ultrasound 250, Labplant.

Η χρονική διάρκεια των πειραμάτων με τη χρήση υπερήχων ήταν περίπου 2 ώρες. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν πάντα υπό συνεχόμενη ακτινοβολία αλλά υπό διαφορετικές συνθήκες ισχύος, αρχικής συγκέντρωσης εναιωρήματος και

χρονικής διάρκειας. Δείγματα λαμβανόταν μεταξύ 20 και 30 λεπτών από τη χρονική στιγμή 0' μέχρι και το τέλος του πειράματος.

5.3.2 Πειραματική διάταξη UVC ακτινοβολίας

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων απολύμανσης με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας UVC χρησιμοποιήθηκε ως πηγή ακτινοβολίας, λάμπα χαμηλής πίεσης ατμών υδραργύρου της PHILIPS, TUV PL-S, υπεριώδους ακτινοβολίας με ισχύ 11 Watt, η οποία τοποθετείται μέσα σε κυλινδρική υποδοχή κατασκευασμένη από χαλαζία (3,5 x 15 cm), ώστε να μην απορροφάει τα μήκη κύματος της UVC ακτινοβολίας. Η συνδεσμολογία αυτή τοποθετούνταν σε κυλινδρικό διπλότοιχο δοχείο ζέσεως, ακριβώς όπως και στην περίπτωση των υπερήχων. Ο όγκος του προς απολύμανσης διαλύματος ήταν 300 ml, και καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιούνταν μαγνητική ανάδευση, για λόγους ομογενοποίησης. Ο αντιδραστήρας ήταν συνδεδεμένος με παροχή νερού, με σκοπό τη διατήρηση της θερμοκρασίας σε σταθερή τιμή και ανάλογη με την αντίστοιχη του περιβάλλοντος. Αναφέρεται ότι για την αποδοτικότερη λειτουργία της λάμπας υπεριώδους ακτινοβολίας UVC και τη μείωση των επιρροών του ηλιακού ή εξωτερικού φωτός, το δοχείο ζέσεως καλύφθηκε με αλουμινοχαρτο και ολόκληρος ο απαγωγός, μέσα στον οποίο πραγματοποιούνταν τα πειράματα για λόγους επιμόλυνσης, με μαύρα χαρτόνια.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν είχαν χρονική διάρκεια από 15 – 120 min και δείγματα λαμβανόταν ανά 1 min κατά τα πρώτα λεπτά της απολύμανσης και κατόπιν σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα σε δύο διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις του εναιωρήματος του βάκιλλου του άνθρακα. Σε όλα τις περιπτώσεις έγινε έλεγχος του ενδεχομένου φωτοενεργοποίησης μετά το πέρας των πειραμάτων. Ακολουθούν οι φωτογραφίες της πειραματικής διάταξης και του απαγωγού, μέσα στον οποίο βρισκόταν αυτή και λάμβαναν χώρα τα πειράματα.



Εικόνα 5.2: Πειραματική διάταξη απολύμανσης με UVC ακτινοβολία.



Εικόνα 5.3: Απαγωγός.

5.3.3 Πειραματική διάταξη UVA ακτινοβολίας.

Με την ίδια λογική, όπως και στα πειράματα απολύμανσης με UVC ακτινοβολία, έτσι και σε αυτά της φωτοκατάλυσης μέσω UVA ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε η ίδια πειραματική διάταξη με μόνη διαφορά την πηγή φωτός, που ήταν λάμπα Radium Ralutec 9 W/78, UVA 350 – 400 nm υπεριώδους ακτινοβολίας 9 Watt.

Τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, είχαν διαφορετική χρονική διάρκεια με μέγιστη διάρκεια τις δύο ώρες και όλα έγιναν παρουσία καταλύτη TiO_2 . Οι μεταβλητές που διαφοροποιούνταν στα διαφορετικά πειράματα ήταν αρχική συγκέντρωση του εναιωρήματος του βάκιλλου, καθώς και η συγκέντρωση του καταλύτη. Έλαβαν χώρα επιπρόσθετα πειράματα, με προσθήκη μικρής ποσότητας απολυμαντικού, Υπεροξειδίου του Υδρογόνου, H_2O_2 .



Εικόνα 5.4: Λάμπα παραγωγής UVA ακτινοβολίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΩΝ

6.1 Πειράματα απολύμανσης με χρήση υπερήχων

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 6 πειράματα απολύμανσης με τη χρήση υπερηχητικής ακτινοβολίας, 4 από αυτά πραγματοποιήθηκαν σε ισχύ υπερήχων 187,5 W (ένδειξη 7 στην κλίμακα από 5-9 της συσκευής του υπερήχου) και τα υπόλοιπα 2 εφαρμόζοντας ισχύ 250 W (ένδειξη 9 στην κλίμακα από 5-9 της συσκευής του υπερήχου). Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε υδατικό διάλυμα NaCl 0,9% το οποίο επιμολύνθηκε με αποικίες του βάκιλλου του άνθρακα από καλλιέργεια σε Nutrient Agar. Σε όλα τα πειράματα η αρχική συγκέντρωση του εναιωρήματος ήταν κατά προσέγγιση 10^3 CFU/ml και η θερμοκρασία ανάλογη με τη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η χρονική διάρκεια των πειραμάτων ήταν 120 λεπτά. Για κάθε δείγμα γίνονταν δύο διαδοχικές αραιώσεις, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω και για κάθε αραιώση στρώνονταν δύο τριβλία.

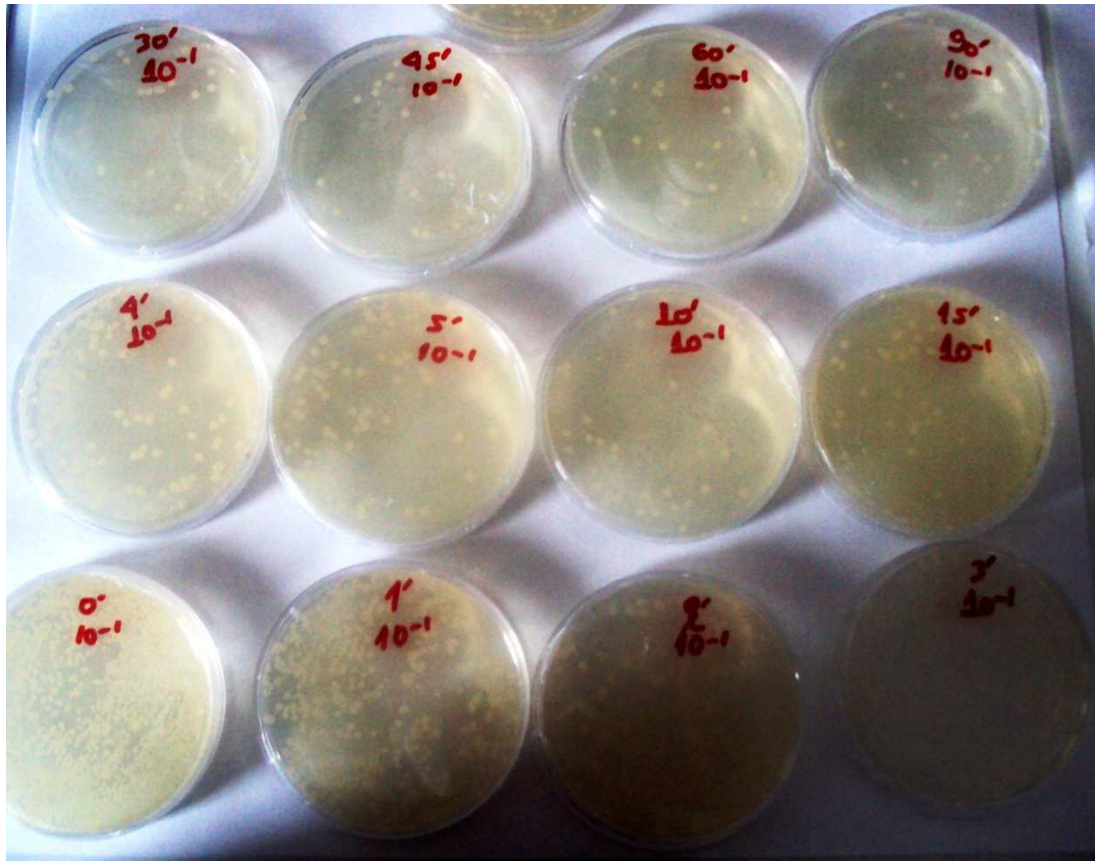
Τα τριβλία τοποθετούνταν για επώαση περίπου 24 hr στους 37°C. Κατόπιν πραγματοποιούνταν καταμέτρηση των αποικιών και αναγωγή αυτών των αποτελεσμάτων στο αρχικό διάλυμα, με σκοπό τη διαπίστωση της αποτελεσματικότητας της απολύμανσης, σύμφωνα με τη σχέση:

Για τα τριβλία που περιέχουν αραιωμένο δείγμα 10^{-v} , όπου $v = 1, 2$.

Μετρώντας x αποικίες στο δείγμα $10^{-v} \rightarrow$ περίπου $x \cdot 10^v$ αποικίες στο αρχικό δείγμα. Αυτός είναι ο αριθμός CFU/100 μl του κάθε τριβλίου. Μετατροπή σε

$$\text{CFU/mL} : \frac{x \cdot 10^v \text{ CFU}}{100 \mu\text{L}} \cdot \frac{1000 \mu\text{L}}{1 \text{ mL}} = x \cdot 10^{v+1} \frac{\text{CFU}}{\text{mL}}$$

Έτσι, υπολογίζουμε τις αποικίες (CFU/mL) σε κάθε τριβλίο και παίρνοντας τον μέσο όρο των επιμέρους τιμών, προκύπτει ο πιθανός αριθμός αποικιών του αρχικού δείγματος (των 0 min).



Εικόνα 6.1: Τριβλία με καλλιέργειες *B.anthraxis*, πριν την καταμέτρηση.

Ακολουθεί πίνακας με συνοψισμένες πληροφορίες για κάθε πείραμα:

Πίνακας 6.1: Σχέδιο πειραμάτων απολύμανσης με υπέρηχους.

ΠΕΙΡΑΜΑ	ΙΣΧΥΣ (Watt)	ΔΙΑΡΚΕΙΑ (min)	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (CFU/ml)
1	187,5	120	10^3
2	187,5	120	10^3
3	187,5	120	10^3
4	187,5	120	10^3
5	250	120	10^3
6	250	120	10^3

6.2 Πειράματα απολύμανσης με UVC και UVA ακτινοβολία

Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 2 πειράματα υπό την επίδραση της UVC ακτινοβολίας για 20 λεπτά και 6 πειράματα με UVA ακτινοβολία μέγιστης χρονικής διάρκειας 90 λεπτών. Και στα δύο πειράματα της UVC ακτινοβολίας αλλά και σε κάποια της UVA η αρχική συγκέντρωση του εναιωρήματος ήταν 10^6 CFU/ml ενώ πραγματοποιήθηκαν και πειράματα με χαμηλότερη συγκέντρωση της τάξης των 10^4 CFU/ml. Στην περίπτωση της UVA ακτινοβολίας χρησιμοποιήθηκε καταλύτης TiO_2 σε δύο συγκεντρώσεις. Ακολουθήθηκε η ίδια πειραματική διαδικασία με αυτήν κατά την απολύμανση με υπέρηχους.

Παρατίθεται πίνακας με αναλυτικές πληροφορίες για τα πειράματα.

Πίνακας 6.2: Σχέδιο πειραμάτων απολύμανσης με υπέρηχους.

ΠΕΙΡΑΜΑ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ (min)	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (CFU/ml)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ TiO_2 (gr/l)
1	UVC	20	10^6	-
2	UVC	20	10^6	-
3	UVA	30	10^6	1,5
4	UVA	30	10^6	1,5
5	UVA	60	10^6	1,0
6	UVA	60	10^6	1,0
7	UVA	90	10^4	1,5
8	UVA	90	10^4	1,5

6.3 Πειράματα απολύμανσης με υπεροξείδιο, H_2O_2

Τελευταία πραγματοποιήθηκαν πειράματα με Υπεροξείδιο του Υδρογόνου, H_2O_2 , τόσο σκέτο όσο και σε συνδυασμό με UVA ακτινοβολία. Το H_2O_2 δε συνδυάστηκε με τη UVC ακτινοβολία, καθώς αποδείχθηκε πως έχει ισχυρή απολυμαντική δράση από μόνη της, αφού μέσα σε λίγα λεπτά αδρανοποιούσε πληθυσμό βακτηρίων της τάξης των 10^6 CFU/ml. Αναφέρεται ότι δεν

πραγματοποιήθηκαν συνδυαστικά πειράματα με Υπεροξείδιο και υπερήχους, καθώς η συσκευή παρουσίασε μη αναστρέψιμη βλάβη κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Από προγενέστερα πειράματα επιλέχθηκε ως βέλτιστη ποσότητα H_2O_2 αυτή των 20 ppm και έτσι όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με αυτήν τη συγκέντρωση.

Πίνακας 6.3: Σχέδιο πειραμάτων απολύμανσης με 20 ppm Υπεροξείδιο του Υδρογόνου .

ΠΕΙΡΑΜΑ	ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ (min)	ΑΡΧΙΚΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (CFU/ml)	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ TiO₂ (gr/l)
1	-	120	10^6	-
2	-	120	10^6	-
3	-	120	10^6	-
4	UVA	90	10^6	1,5
5	UVA	60	10^6	1,0
6	UVA	60	10^6	1,0
7	UVA	90	10^4	1,5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7:

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

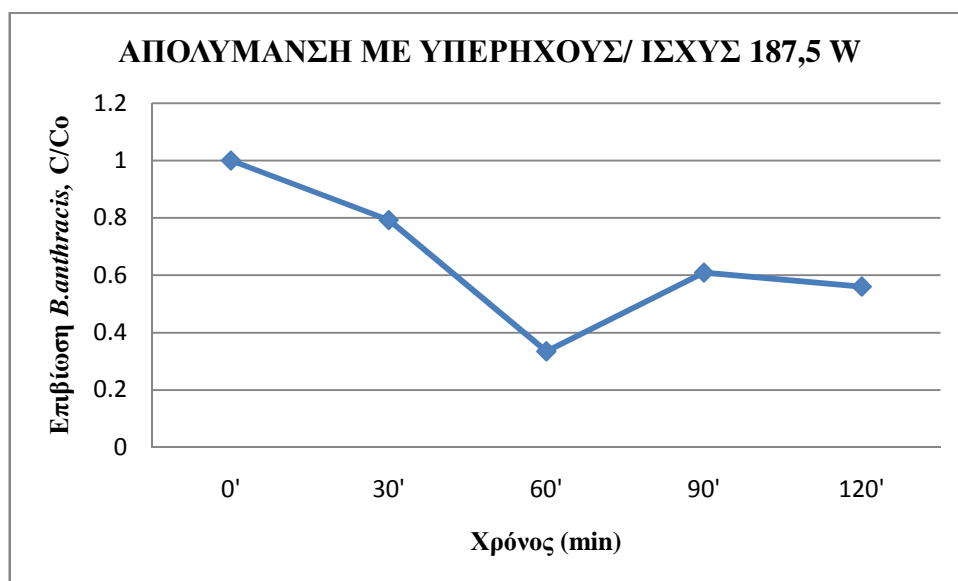
ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Πειράματα απολύμανσης με χρήση υπερήχων

Με σκοπό την καλύτερη κατανόηση και επεξήγηση των αποτελεσμάτων της απολύμανσης με τις τρεις μεθόδους που εφαρμόστηκαν, παρακάτω παρατίθενται αναλυτικά οι γραφικές απεικονίσεις των αποτελεσμάτων. Η πρώτη μέθοδος που εφαρμόστηκε όπως αναφέρθηκε και προγενέστερα ήταν η απολύμανση με χρήση υπερήχων.

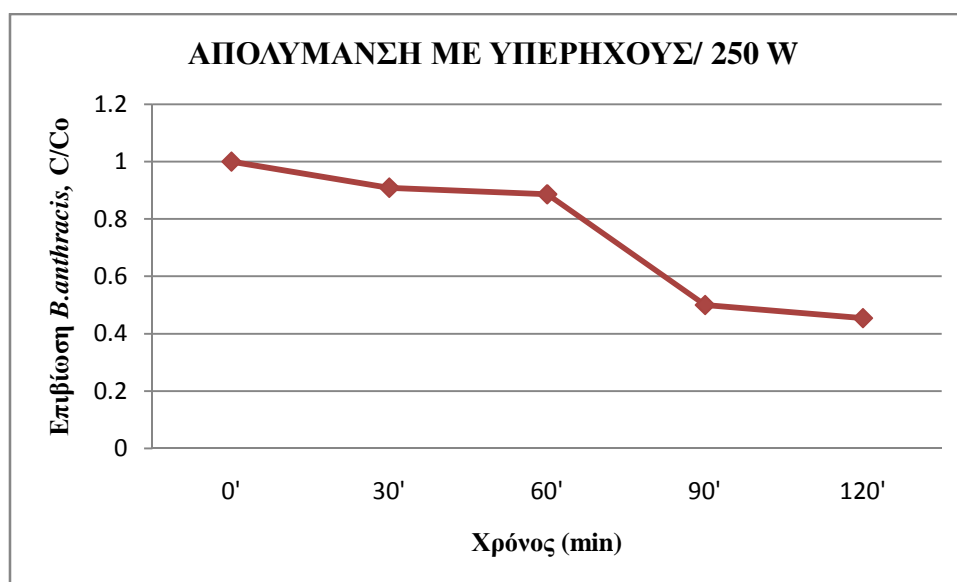
7.1.1 Επίδραση της ισχύος των υπερήχων στην απολύμανση

Οι υπέρηχοι εφαρμόστηκαν σε δύο ισχύς για την ίδια διάρκεια, και πάντα διατηρώντας σταθερή την αρχική συγκέντρωση του εναιωρήματος του βακίλλου στις 10^3 CFU στα 300 ml.



Διάγραμμα 7.1: Απολύμανση με υπέρηχους στα 187,5 W με $C_0 = 10^3$ CFU/ml.

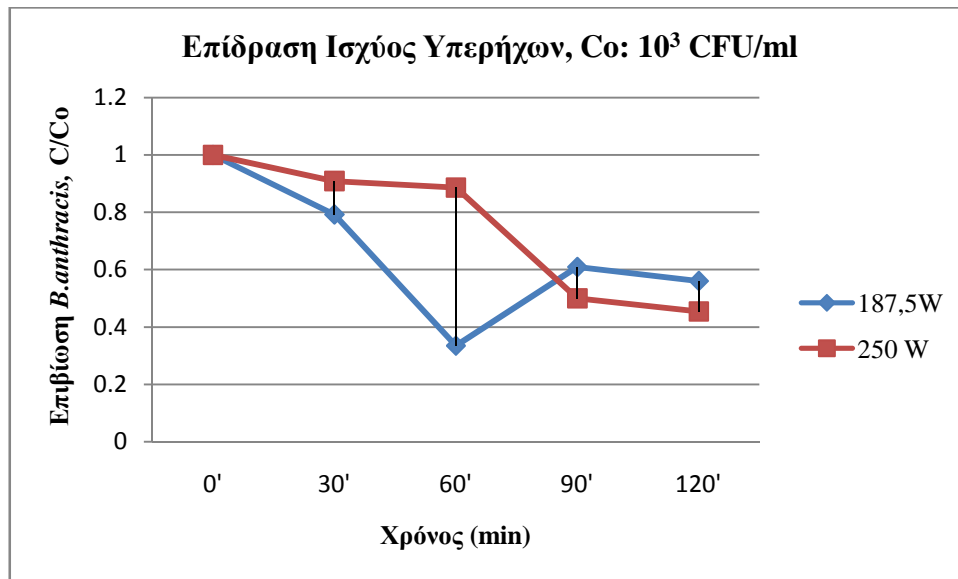
Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι η απολύμανση με υπερηχητική ακτινοβολία, στην ισχύ των 187,5 W, δε φαίνεται να επιφέρει δραστική μείωση στον πληθυσμό του βάκιλλου του άνθρακα, καθώς κυμαίνεται περίπου στο 40 % επί του αρχικού φορτίου, πόσο μάλλον ολοκληρωτική απολύμανση στο υδατικό διάλυμα. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός ότι το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ιδιαίτερα ανθεκτικό, όπως έχει ήδη τονιστεί, με συνέπεια η δεδομένη ισχύς να μην επαρκεί για την αποδόμηση του, είτε ενδεχομένως να χρειαζόταν μεγαλύτερης χρονικής διάρκειας επεξεργασία. Ωστόσο κάτι τέτοιο κρίνεται μη συμφέρον για εφαρμογή σε ευρεία κλίμακα απολύμανσης καθώς είναι πολύ χρονοβόρο, ελάχιστα αποδοτικό και αμφίβολα οικονομικό.



Διάγραμμα 7.2: Απολύμανση με υπέρηχους στα 250 W με $C_0 = 10^3$ CFU/ml.

Εφαρμόζοντας τη μεγαλύτερη δυνατή ισχύ που παρείχε η συσκευή υπέρηχων που χρησιμοποιήθηκε, παρατηρείται κάπως μεγαλύτερη μείωση του μικροβιακού φορτίου, της τάξεως του 60% σε σχέση με τον αρχικό πληθυσμό του βακίλλου.

Εντούτοις για να είναι δυνατή η πιο ολοκληρωμένη σύγκριση της απόδοσης των δύο ισχύων, παρατίθεται το συγκριτικό διάγραμμα. Προκειμένου να υπάρχει κοινό μέτρο σύγκρισης για τις δύο ισχύς, ανάχθηκαν οι συγκεντρώσεις του εκάστοτε πειράματος στο λόγο C/C_0 .

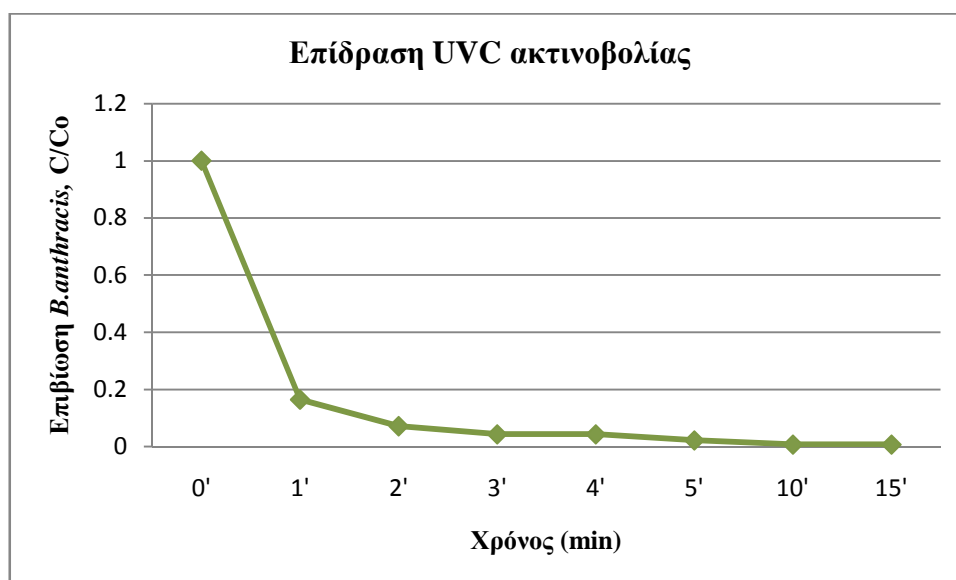


Διάγραμμα 7.3: Συγκριτική γραφική απεικόνιση απολύμανσης με υπέρηχους στα 187,5 W και στα 250 W με C₀= 10³ CFU/ml.

Παρατηρώντας το συγκριτικό διάγραμμα των δύο τιμών ισχύος, προκύπτει ένα αρκετά ενδιαφέρον συμπέρασμα. Η χαμηλότερη ισχύς φαίνεται να δρα πιο άμεσα και πιο αποτελεσματικά μέχρι τα μισά της διεργασίας, αδρανοποιώντας τον πληθυσμό των βακτηρίων περίπου κατά το ήμισυ. Ωστόσο στην πορεία υπάρχει εκ νέου ανάκαμψη του μικροβιακού φορτίου, η οποία σταματάει κάπου στα 90 min, εμφανίζοντας σχεδόν ανεπαίσθητη πτωτική πορεία τα τελευταία 30 min της διεργασίας. Σε αντίθεση η υψηλότερη ισχύς μέχρι τη μισή διεργασία φαίνεται να δρα με αρκετά χαμηλούς ρυθμούς, γεγονός το οποίο αναιρείται από εκεί και έπειτα καθώς τελικά επιφέρεται μείωση του μισού και παραπάνω βακτηριακού πληθυσμού. Η καθυστέρηση της απόκρισης του συστήματος στην απολύμανση ίσως έγκειται στο γεγονός ότι τα βακτήρια υφίστανται σοκ λόγω της υψηλής ισχύος για την πρώτη μία ώρα της επεξεργασίας. Αυτό που προκαλεί εντύπωση είναι ότι ενώ η χαμηλότερη ισχύς φαίνεται εξ αρχής να είναι αποδοτικότερη, καταλήγει η ισχύς των 250 W να επιφέρει το καλύτερο απολυμαντικό αποτέλεσμα.

7.2 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVC

Το δεύτερο κατά σειρά σετ πειραμάτων που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την μελέτη της απολυμαντικής δράσης της ακτινοβολίας UVC. Τα πειράματα έγιναν μόνο στην υψηλή συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού, 10^6 CFU/ml, καθώς αποδείχθηκε τόσο ισχυρή η δράση της παρούσας ακτινοβολίας που θεωρήθηκαν άσκοπα τα πειράματα σε χαμηλότερη συγκέντρωση. Όλες οι συνθήκες, όπως ισχύς ακτινοβολίας, θερμοκρασία και διάρκεια πειράματος διατηρήθηκαν σταθερές σε όλα τα πειράματα.



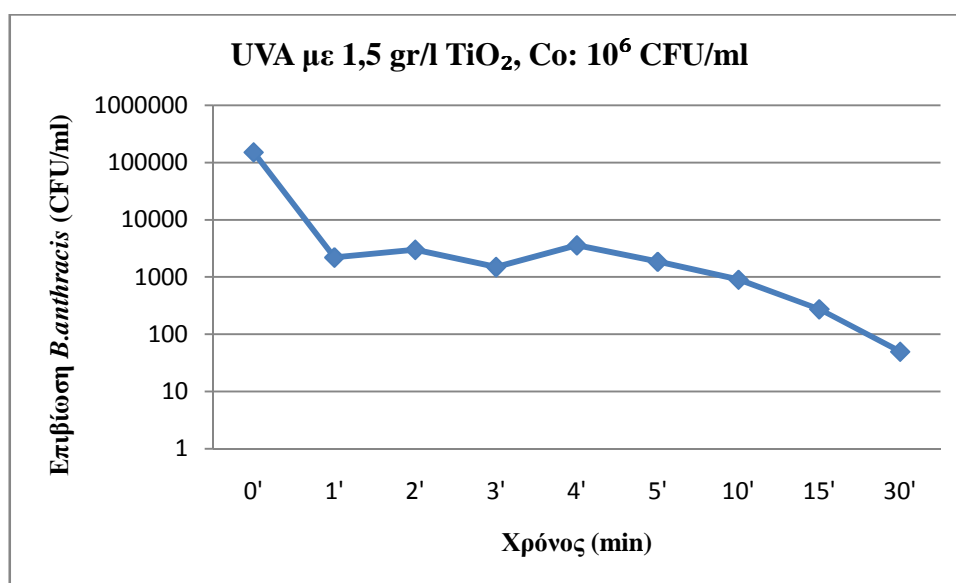
Διάγραμμα 7.4: Απολύμανση με ακτινοβολία UVC για $C_0 = 10^6$ CFU/ml.

Όπως παρατηρείται λοιπόν από το παραπάνω διάγραμμα, η UVC ακτινοβολία έχει σχεδόν ακαριαία απολυμαντική δράση για τον πληθυσμό του βάκιλλου του άνθρακα, παρά το γεγονός ότι στην έναρξη των πειραμάτων ο πληθυσμός του κυμαινόταν σε ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα. Ήδη από το πρώτο λεπτό της επεξεργασίας το μικροβιακό φορτίο μειώνεται στο 80% του αρχικού, ενώ από το πέμπτο λεπτό και έπειτα επιτυγχάνεται μηδενισμός του βακτηριακού πληθυσμού στα δείγματα. Η απολύμανση μέσω της ακτινοβολίας UVC αποδείχθηκε η αποδοτικότερη και γρηγορότερη όλων.

7.3 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων υπό την επίδραση της ακτινοβολίας UVA. Στα πειράματα αυτά ελέγχθηκαν οι παράμετροι, της αρχικής συγκέντρωσης του βακτηριακού φορτίου, η συγκέντρωση του καταλύτη TiO_2 , όπως επίσης και η ενισχυτική δράση του Υπεροξειδίου του Υδρογόνου όταν προστίθεται στο επιμολυσμένο υδατικό διάλυμα. Σε όλες τις περιπτώσεις διατηρήθηκαν σταθερές η θερμοκρασία, που ήταν ίση με του περιβάλλοντος και η ισχύς της ακτινοβολίας, 9 Watt. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

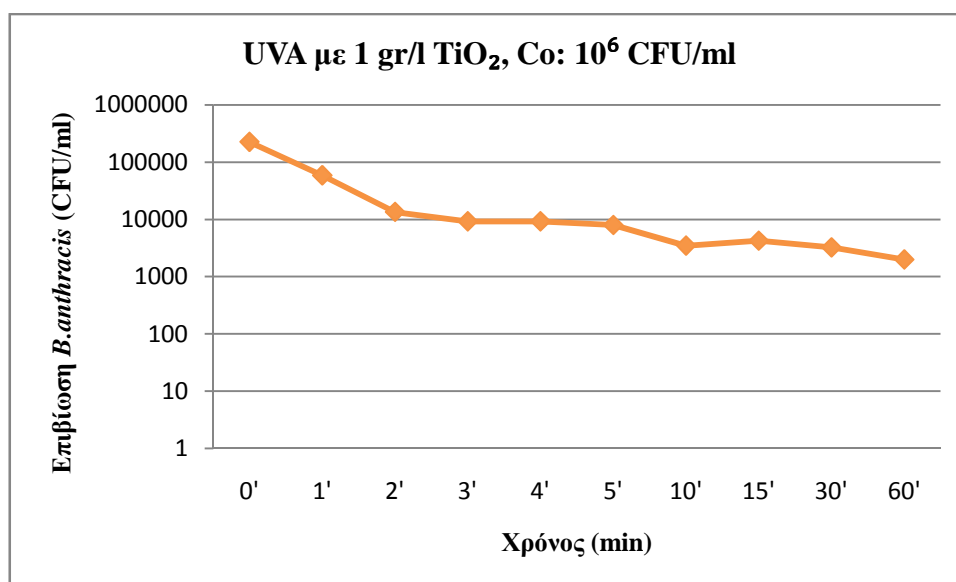
7.3.1 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA – Επίδραση συγκέντρωσης καταλύτη.



Διάγραμμα 7.5: Απολύμανση με ακτινοβολία UVA, 1.5 gr/l TiO_2 για $C_0 = 10^6$ CFU/ml.

Στα πρώτα πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση καταλύτη ίση με 1,5 gr/l, η οποία αποδείχθηκε η βέλτιστη σύμφωνα με προγενέστερα πειράματα καθώς και τη βιβλιογραφία. Επίσης η συγκέντρωση των βακτηρίων ήταν όπως φαίνεται και στο διάγραμμα, $C_0 = 10^6$ CFU/ml. Η γραφική

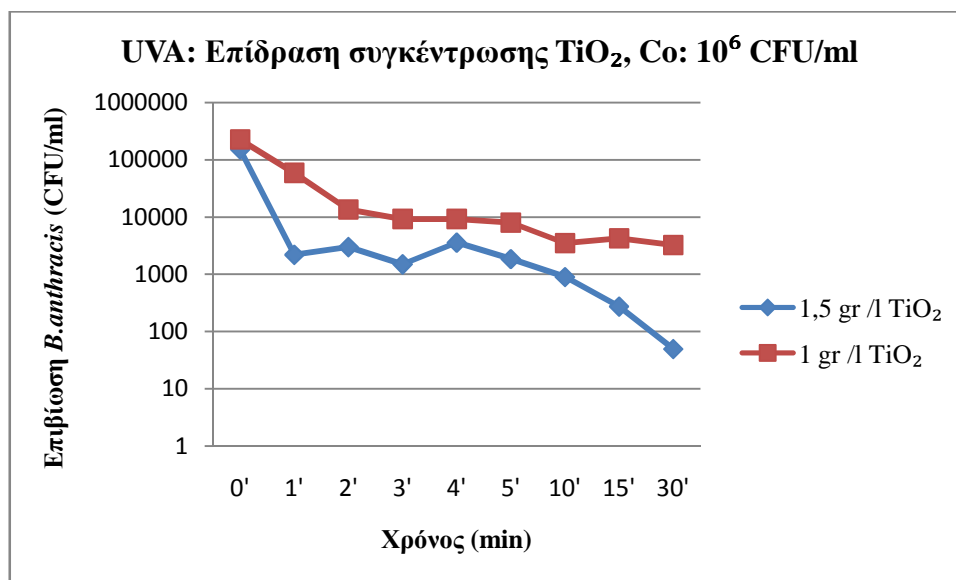
παράσταση, που απεικονίζει τα αποτελέσματα της απολύμανσης κάτω από τις συνθήκες που αναφέρθηκαν, παρουσιάζεται σε λογαριθμική κλίμακα, με σκοπό να είναι ευκρινέστερη η πρόοδος της απολυμαντικής δράσης της ακτινοβολίας UVA. Όπως παρατηρείται λοιπόν, από το πρώτο λεπτό της διεργασίας η μείωση του μικροβιακού φορτίου είναι σημαντική, της τάξης του 98%. Για τα επόμενα πέντε λεπτά εμφανίζεται κάποιου είδους πλατό, όπου δεν υπάρχουν αξιοσημείωτες διακυμάνσεις του βακτηριακού πληθυσμού. Ωστόσο στη συνέχεια της επεξεργασίας, παρατηρείται ακόμη μεγαλύτερη μείωση, χωρίς ωστόσο στη διάρκεια των 30 λεπτών να επιτυγχάνεται ολοκληρωτική απολύμανση. Παραταύτα κρίνεται πως το αποτέλεσμα της απολύμανσης με τις δεδομένες συνθήκες είναι αρκετά ικανοποιητικό.



Διάγραμμα 7.6: Απολύμανση με ακτινοβολία UVA, 1gr/l TiO₂ για C₀= 10⁶ CFU/ml.

Στην περίπτωση της χαμηλότερης συγκέντρωσης καταλύτη παρατηρείται πιο ομαλή πτωτική τάση του μικροβιακού φορτίου και επίσης χαμηλότερη συνολικά απόδοση της απολύμανσης σε σχέση με την υψηλότερη τιμή. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι το 1,5 gr/l είναι η βέλτιστη συγκέντρωση καταλύτη για τα πειράματα με τη UVA ακτινοβολία.

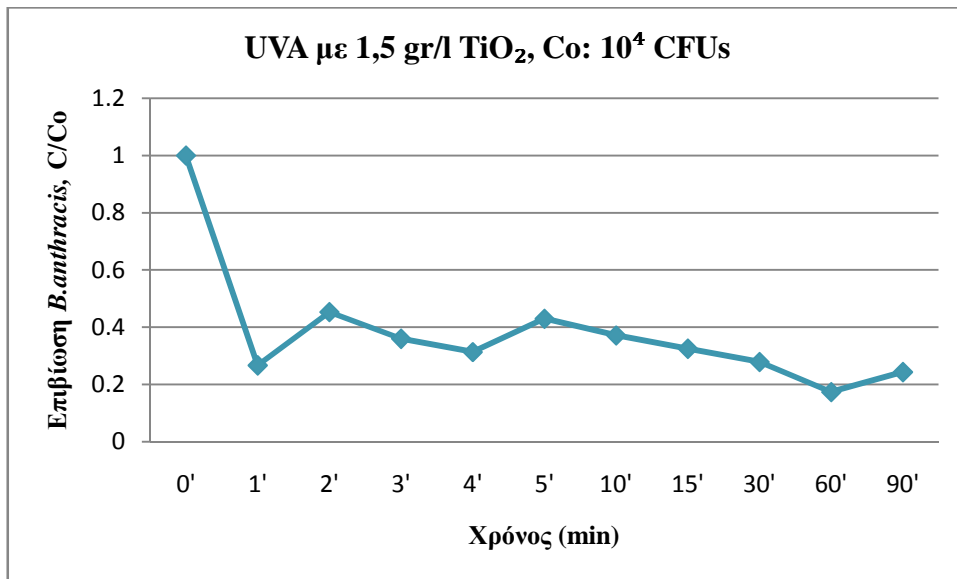
Τα συμπεράσματα αυτά είναι ευκρινέστερα στο συγκριτικό διάγραμμα που παρατίθεται παρακάτω και συνοψίζει τα πειραματικά αποτελέσματα για τις δύο διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης καταλύτη.



Διάγραμμα 7.7: Συγκριτικό διάγραμμα επίδρασης της συγκέντρωσης του καταλύτη, TiO₂, στην απολύμανση με ακτινοβολία UVA, για C₀= 10⁶ CFU/ml.

7.3.2 Πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA – Επίδραση αρχικής συγκέντρωσης βακτηριακού φορτίου

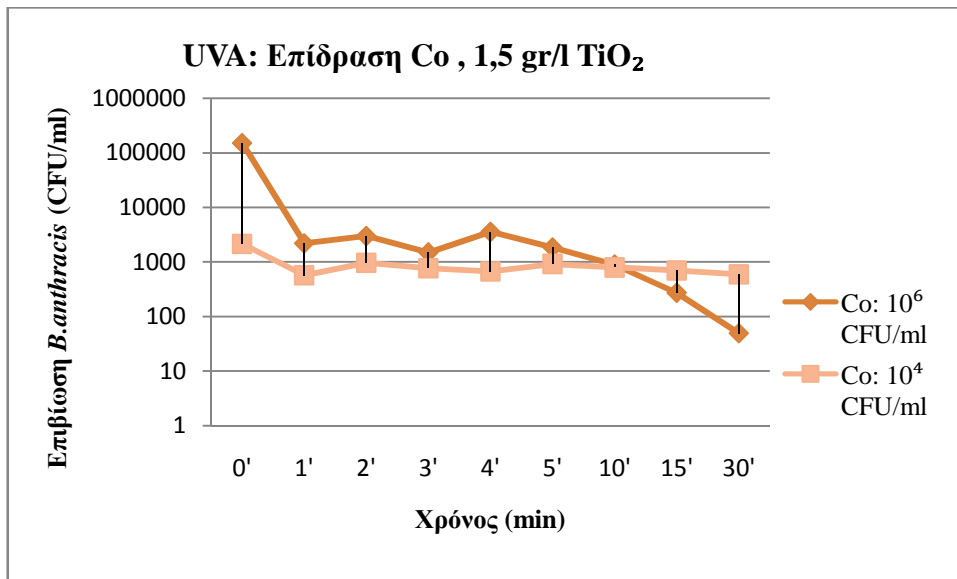
Εν συνεχεία πραγματοποιήθηκαν μερικά πειράματα σε χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση εναιωρήματος, της τάξης των 10⁴ CFU/ml. Επισημαίνεται ότι όλα τα πειράματα έγιναν στη βέλτιστη συγκέντρωση καταλύτη, δηλαδή 1,5 gr/l. Παρακάτω παρατίθεται τα σχετικά διαγράμματα, όπου φαίνεται η απόκριση του συστήματος στις παραπάνω συνθήκες.



Διάγραμμα 7.8: Απολύμανση με ακτινοβολία UVA, 1.5 gr/l TiO₂ για C₀= 10⁴ CFU/ml.

Όπως παρατηρείται από το παραπάνω διάγραμμα από το πρώτο κίολας λεπτό επιτυγχάνεται μείωση του μικροβιακού φορτίου ως και 77 %. Στην πορεία υπάρχει μια μικρή άνοδος του φορτίου, χωρίς ωστόσο σημαντικές διακυμάνσεις. Μετά τα 90 λεπτά της απολύμανσης δεν επιφέρεται ούτε ολοκληρωτική απολύμανση αλλά ούτε και περαιτέρω μείωση φορτίου, από αυτή που πραγματοποιείται κατά τα πρώτα λεπτά της επεξεργασίας.

Παρακάτω παρατίθεται το συγκριτικό διάγραμμα για τις δύο αρχικές συγκεντρώσεις μικροβιακού φορτίου, ώστε να εξαχθούν πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα για την επίδραση αυτού του παράγοντα στη δράση της ακτινοβολίας UVA. Αναφέρεται ότι προκειμένου να είναι εφικτή η σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο συγκεντρώσεων, τα αποτελέσματα ανάχθηκαν σε λογαριθμική κλίμακα.



Διάγραμμα 7.9: Συγκριτικό διάγραμμα επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του βακτηριακού φορτίου, στην απολύμανση με ακτινοβολία UVA με 1,5 gr/l TiO₂.

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον αποτέλεσμα. Σύμφωνα με αυτό η μείωση του μικροβιακού φορτίου είναι θεαματικότερη για την υψηλότερη συγκέντρωση βακτηρίων και τελικά η απολύμανση υπό αυτές τις συνθήκες είναι αποδοτικότερη. Το γεγονός αυτό έρχεται σε σύγκρουση με την κοινή λογική, σύμφωνα με την οποία αναμενόταν αποδοτικότερη απολυμαντική δράση για τη χαμηλότερη αρχική συγκέντρωση, κάτι το οποίο δε συμβαίνει στην πραγματικότητα. Και στις δύο περιπτώσεις ωστόσο, παρατηρείται μείωση κοντά στο 80% χωρίς όμως περεταίρω μείωση μέχρι το πέρας της επεξεργασίας. Αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω πειραματικού λάθους, καθώς η καλλιεργητική μέθοδος εμπεριέχει σοβαρό ποσοστό σφάλματος, είτε λόγω της αποτελεσματικότητας της παρούσας διεργασίας υπό τις δεδομένες συνθήκες, η οποία ίσως παρουσιάζει πλαφόν στο 80%.

7.4 Πειράματα απολύμανσης με προσθήκη Υπεροξειδίου του Υδρογόνου, H₂O₂

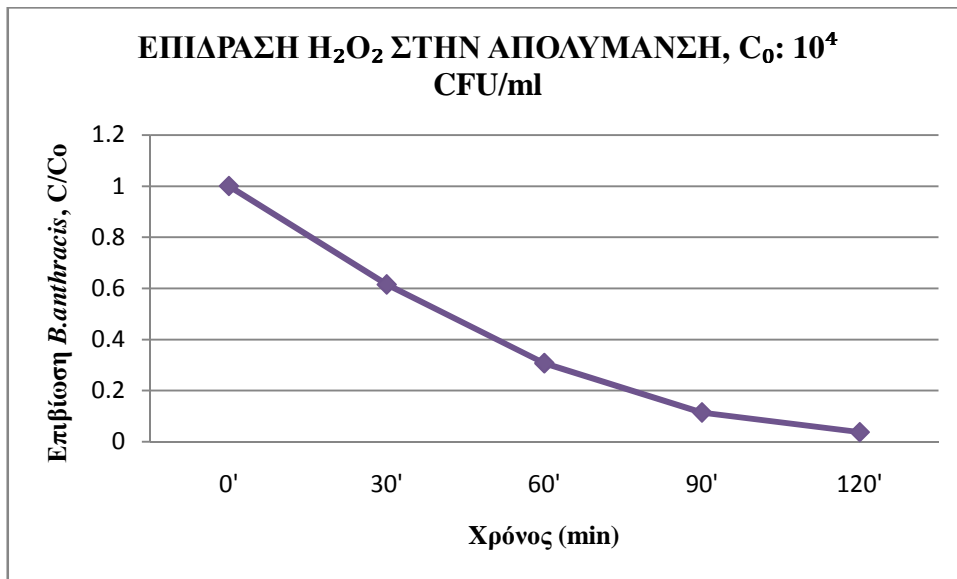
Στο τελευταίο κομμάτι της πειραματικής διαδικασίας πραγματοποιήθηκαν πειράματα παρουσία Υπεροξειδίου του Υδρογόνου. Μελετήθηκαν τόσο η μεμονωμένη απολυμαντική δράση του H₂O₂, όσο και η αλληλεπίδραση αυτού με την ακτινοβολία UVA.

Τα πειράματα που έγιναν παρουσία μόνο Υπεροξειδίου, πραγματοποιήθηκαν και στις δύο αρχικές συγκεντρώσεις του εναιωρήματος, δηλαδή 10⁴ και 10⁶ CFU/ml. Η συγκέντρωση υπεροξειδίου στο υδατικό επιμολυσμένο διάλυμα του βακίλλου επιλέχθηκε, καθαρά εμπειρικά, να είναι 20 ppm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε αυτή τη συγκέντρωση H₂O₂. Στην περίπτωση συνδυασμού με τη UVA ακτινοβολία χρησιμοποιήθηκε η βέλτιστη συγκέντρωση καταλύτη, όπως και σε όλα τα προηγούμενα πειράματα.

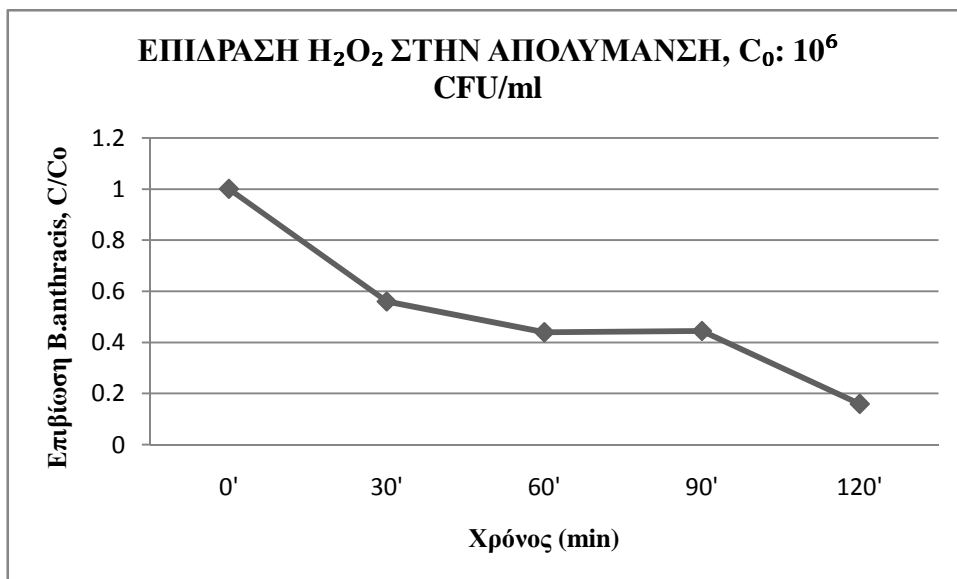
Αναφέρεται ότι δεν πραγματοποιήθηκαν συνδυαστικά πειράματα του Υπεροξειδίου με τη UVC ακτινοβολία και με τους υπέρηχους, λόγω της έντονης και άμεσης απολυμαντικής της δράσης της πρώτης, και λόγω βλάβης της συσκευής των υπέρηχων πριν την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας.

7.4.1 Πειράματα απολύμανσης παρουσία Υπεροξειδίου του Υδρογόνου

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω σε πρώτη φάση πραγματοποιήθηκαν πειράματα απολύμανσης μόνο με χρήση του απολυμαντικού Υπεροξειδίου του Υδρογόνου, σε συγκέντρωση 20 ppm. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν και για τις δύο αρχικές συγκεντρώσεις του εναιωρήματος για την ίδια χρονική διάρκεια. Παρακάτω παρατίθενται τα σχετικά διαγράμματα και ακολουθεί η επεξήγησή τους.

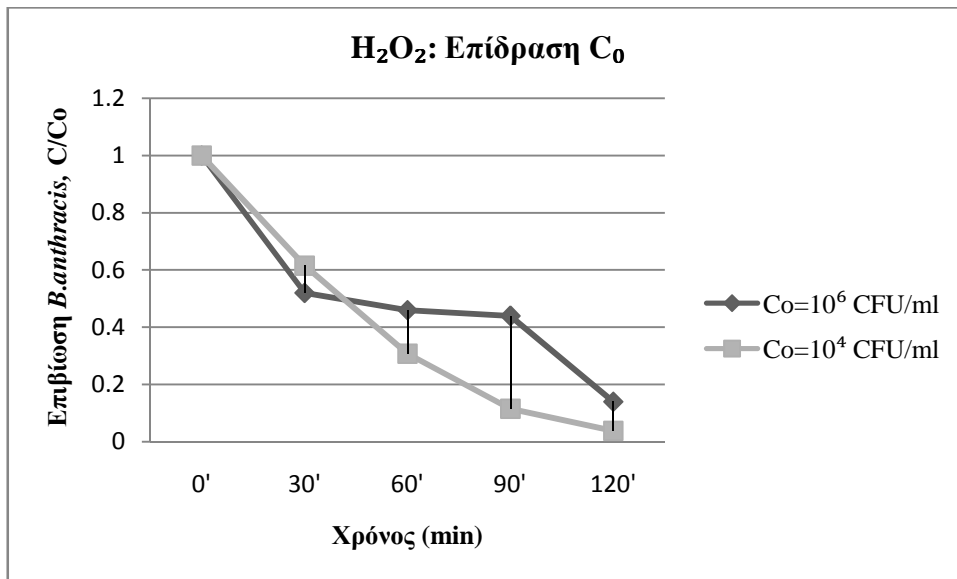


Διάγραμμα 7.10: Απολύμανση με H₂O₂ για C₀= 10⁴ CFU/ml.



Διάγραμμα 7.11: Απολύμανση με H₂O₂ για C₀= 10⁶ CFU/ml.

Όπως παρατηρείται από τα παραπάνω διαγράμματα το Υπεροξειδίο του Υδρογόνου στη συγκέντρωση των 20 ppm, παρουσιάζει ιδιαίτερα αποτελεσματική απολυμαντική δράση από μόνο του. Και για τις δύο αρχικές συγκεντρώσεις επιφέρει μείωση φορτίου ως και 90%.



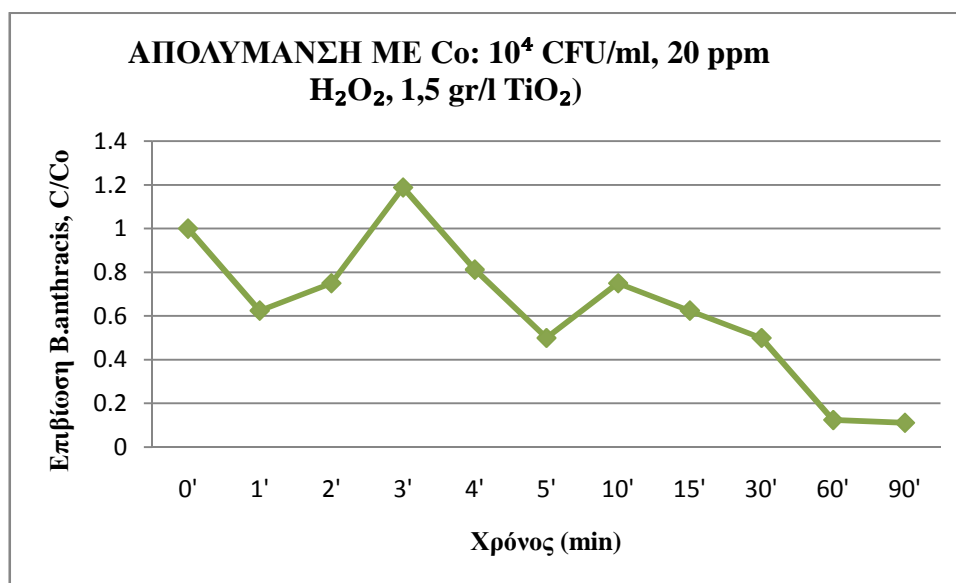
Διάγραμμα 7.12: Συγκριτικό διάγραμμα επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του βακτηριακού φορτίου, στην απολύμανση με H₂O₂.

Όπως είναι αναμενόμενο το Υπεροξείδιο επιφέρει αποτελεσματικότερη απολύμανση στην περίπτωση της χαμηλότερης αρχικής συγκέντρωσης. Ωστόσο ιδιαίτερα ικανοποιητικά είναι τα αντίστοιχα αποτελέσματα για την υψηλή συγκέντρωση. Σε αντίθεση με τη χαμηλή αρχική συγκέντρωση που εμφανίζει συνεχόμενα πτωτική τάση μέχρι σχεδόν το μηδενισμό του μικροβιακού φορτίου, στην περίπτωση των 10⁶ CFU/ml παρατηρείται πλατό για το δεύτερο μισάωρο της επεξεργασίας, το οποίο εντέλει κατορθώνεται να ξεπεραστεί με αποτέλεσμα την περεταίρω μείωση του βακτηριακού πληθυσμού.

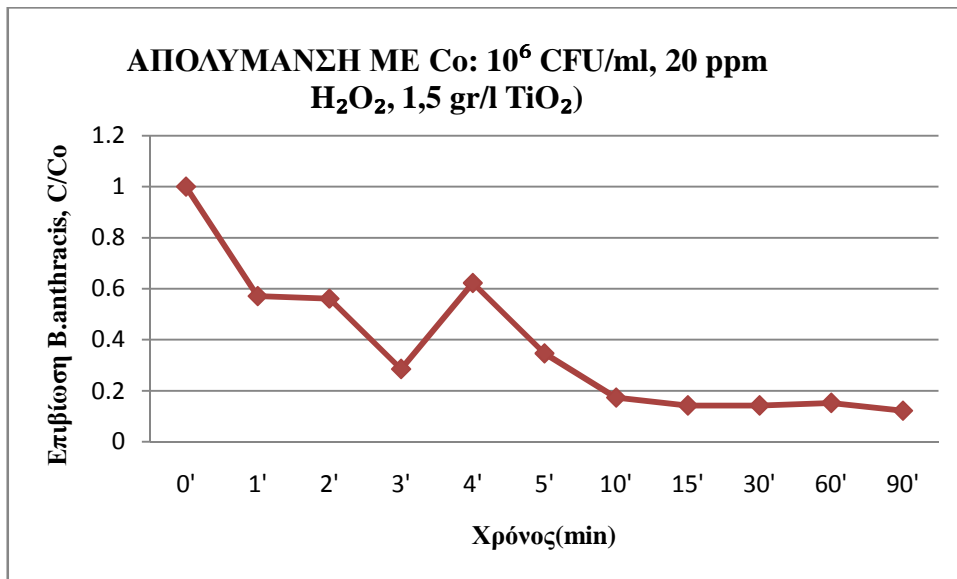
Τα παραπάνω αποτελέσματα κρίνουν τη συγκέντρωση των 20 ppm του Υπεροξειδίου, κατάλληλη για να συνδυαστεί με την ακτινοβολία UVA, η οποία από μόνη της δεν επιφέρει ολοκληρωτική απολύμανση.

7.4.2 Συνδυαστικά πειράματα απολύμανσης με ακτινοβολία UVA, παρουσία Υπεροξειδίου του Υδρογόνου

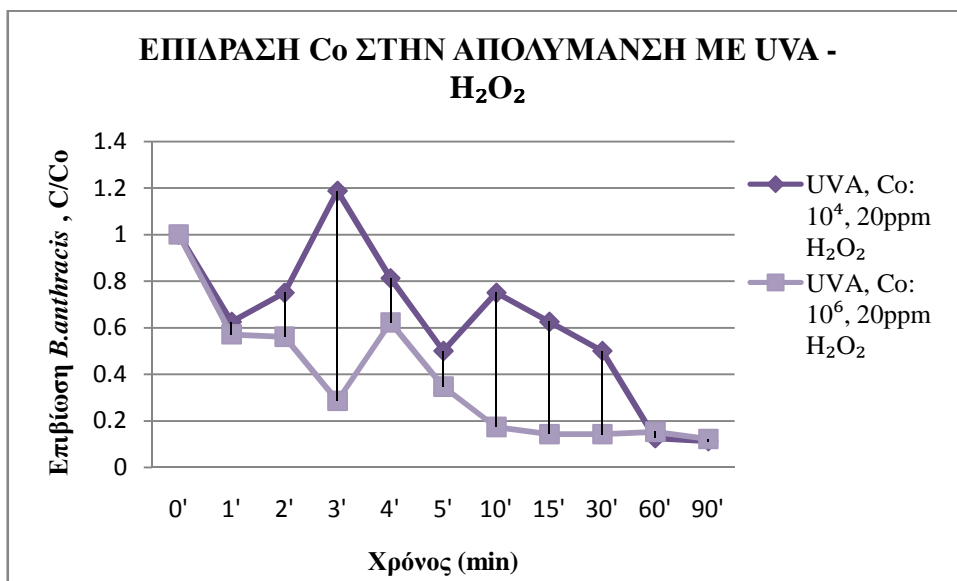
Στο τελευταίο κομμάτι της πειραματικής διαδικασίας συνδυάστηκε η μέθοδος απολύμανσης με ακτινοβολία UVA, με τη χρήση του απολυμαντικού Υπεροξειδίου του Υδρογόνου. Οι συνθήκες των πειραμάτων συνοψίστηκαν παραπάνω και τα αποτελέσματα των πειραμάτων κρίθηκαν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα.



Διάγραμμα 7.13: Απολύμανση με 20 ppm H_2O_2 , ακτινοβολία UVA, 1.5 gr/l TiO_2 για $C_0=10^4$ CFU/ml.



Διάγραμμα 7.14: Απολύμανση με 20 ppm H_2O_2 , ακτινοβολία UVA, 1.5 gr/l TiO_2 για $C_0= 10^6$ CFU/ml.



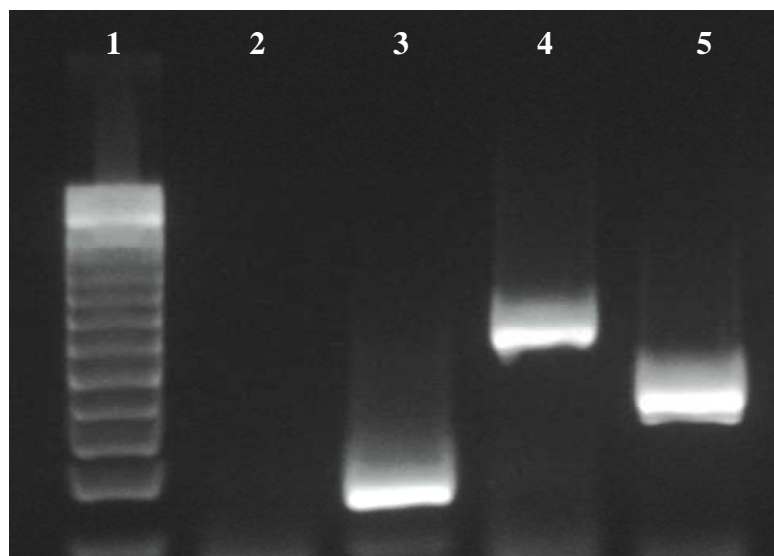
Διάγραμμα 7.15: Συγκριτικό διάγραμμα επίδρασης της αρχικής συγκέντρωσης του βακτηριακού φορτίου, στην απολύμανση με H_2O_2 και ακτινοβολία UVA.

Στο συνδυαστικό διάγραμμα παρατηρείται κάτι εξαιρετικά παράδοξο. Και στις δύο περιπτώσεις τελικά επιφέρεται το ίδιο απολυμαντικό αποτέλεσμα. Ωστόσο προκαλεί εντύπωση το γεγονός ότι κατά τη διεργασία της απολύμανσης, στην περίπτωση της χαμηλής αρχικής συγκέντρωσης, η συγκέντρωση του μικροβιακού φορτίου κυμαίνεται σε υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την ανάλογη συγκέντρωση

της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης. Το γεγονός αυτό ίσως να μπορεί να αποδοθεί στο σοκ που υφίστανται τα βακτήρια από την έντονη απολυμαντική δράση, είτε σε πειραματικό λάθος. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται περίπου στο 3-4 λεπτό ξαφνική άνοδος του βακτηριακού φορτίου, παρά την αρχική του μείωση. Κατόπιν η πτωτική πορεία του φορτίου της υψηλής αρχικής συγκέντρωσης, είναι πιο ομαλή και παραμένει σταθερή μετά τα δέκα λεπτά της διεργασίας. Σε αντίθεση στην άλλη περίπτωση παρατηρείται απότομη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού μετά τα 30 λεπτά.

7.5 Ποσοτικοποίηση του βάκιλλου με τη μέθοδο Real-time PCR και ανίχνευση των παθογόνων πλασμιδιακών γονιδίων

Στο πλαίσιο των μοριακών αναλύσεων που πραγματοποιήθηκαν έγινε ανίχνευση και των τριών γονιδίων στο πρότυπο στέλεχος του βάκιλλου. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην PCR και για τα τρία γονίδια ήταν κατάλληλοι για την ανίχνευση του *B. anthracis*. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η δυσκολία διάκρισης του συγκεκριμένου στελέχους από τα συγγενικά του (*B. cereus* & *B. thuringiensis*) έγκειται στη μεγάλη ομολογία που υπάρχει στο χρωμόσωμά τους. Στην παρούσα εργασία οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το χρωμοσωμικό γονίδιο *groB* ήταν κατάλληλοι κι εξειδικευμένοι για την παραγωγή προϊόντος μεγέθους 175bp, το οποίο πιστοποιεί αποκλειστικά το είδος *B. anthracis*.



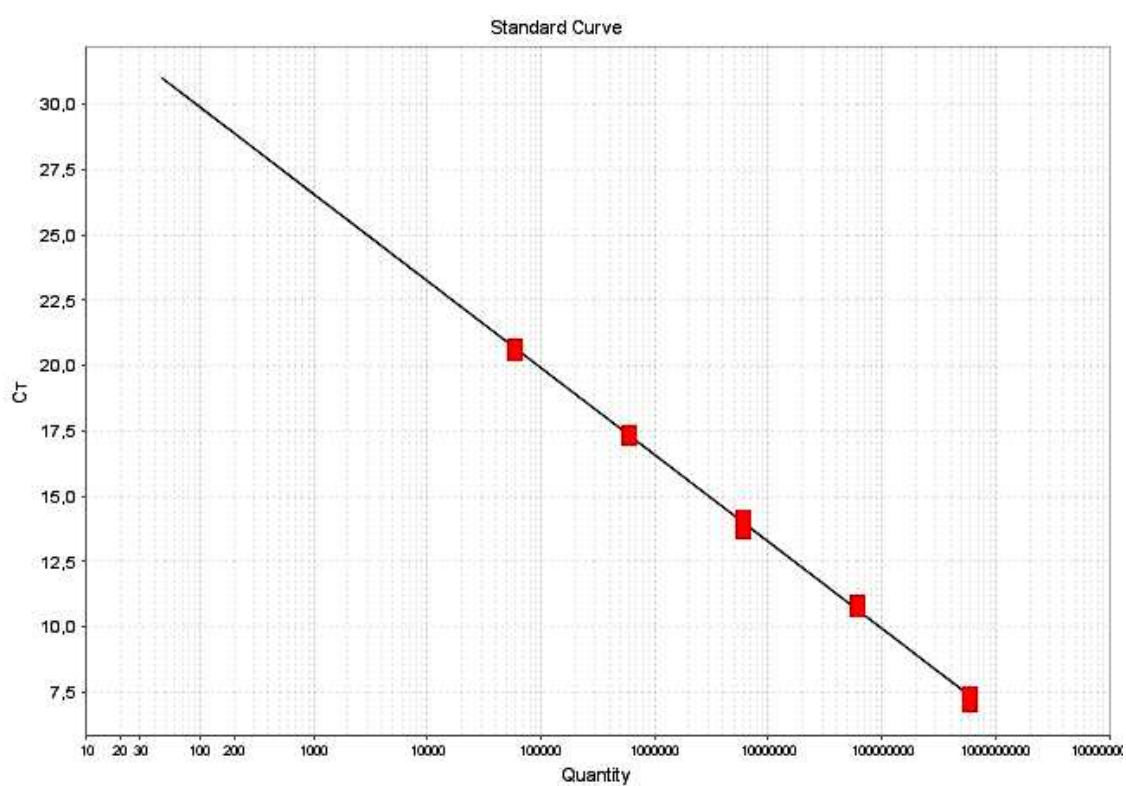
Εικόνα 7.1: Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% των προϊόντων PCR και για τα τρία γονίδια του πρότυπου στελέχους *B. Anthracis* (1: marker 100bp, 2: αρνητικό δείγμα, 3: PCR product *groB* 175bp, 4: PCR product *lef* 475bp, 5: PCR product *capA* 318bp).

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πρότυπες καμπύλες για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των τριών γονιδίων με την Real-time PCR στα δείγματα νερού, κατόπιν εφαρμογής των μεθόδων απολύμανσης. Η μεθοδολογία της PCR που εφαρμόστηκε ήταν η SYBR Green. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία επιτρέπει τον έλεγχο των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων με την κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης (Melting curve), με την οποία μπορεί να γίνει αξιολόγηση των προϊόντων της αντίδρασης, εάν δηλαδή πρόκειται για τα επιθυμητά ή όχι. Η κατασκευή αυτής της καμπύλης βασίζεται στη θερμοκρασία αποδιάταξης (Melting temperature, T_m) των προϊόντων της αντίδρασης. Η T_m είναι η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται το κάθε τμήμα DNA και εξαρτάται από το μέγεθός του. Γίνεται, λοιπόν, φανερό ότι κάθε τμήμα γονιδίου έχει τη δική του θερμοκρασία αποδιάταξης. Τα προϊόντα της PCR πρέπει να έχουν την ίδια T_m , εκτός εάν υπάρχει επιμόλυνση ή τμήματα που προέρχονται από ένωση μεταξύ των

εκκινητών (primer-dimers). Εάν τα προϊόντα έχουν την ίδια T_m , τότε στην καμπύλη θα εμφανιστεί μία μόνον κορυφή, ενώ εάν στα προϊόντα υπάρχουν και τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, τότε θα εμφανιστούν και άλλες κορυφές που θα αντιστοιχούν σε διαφορετικές T_m .

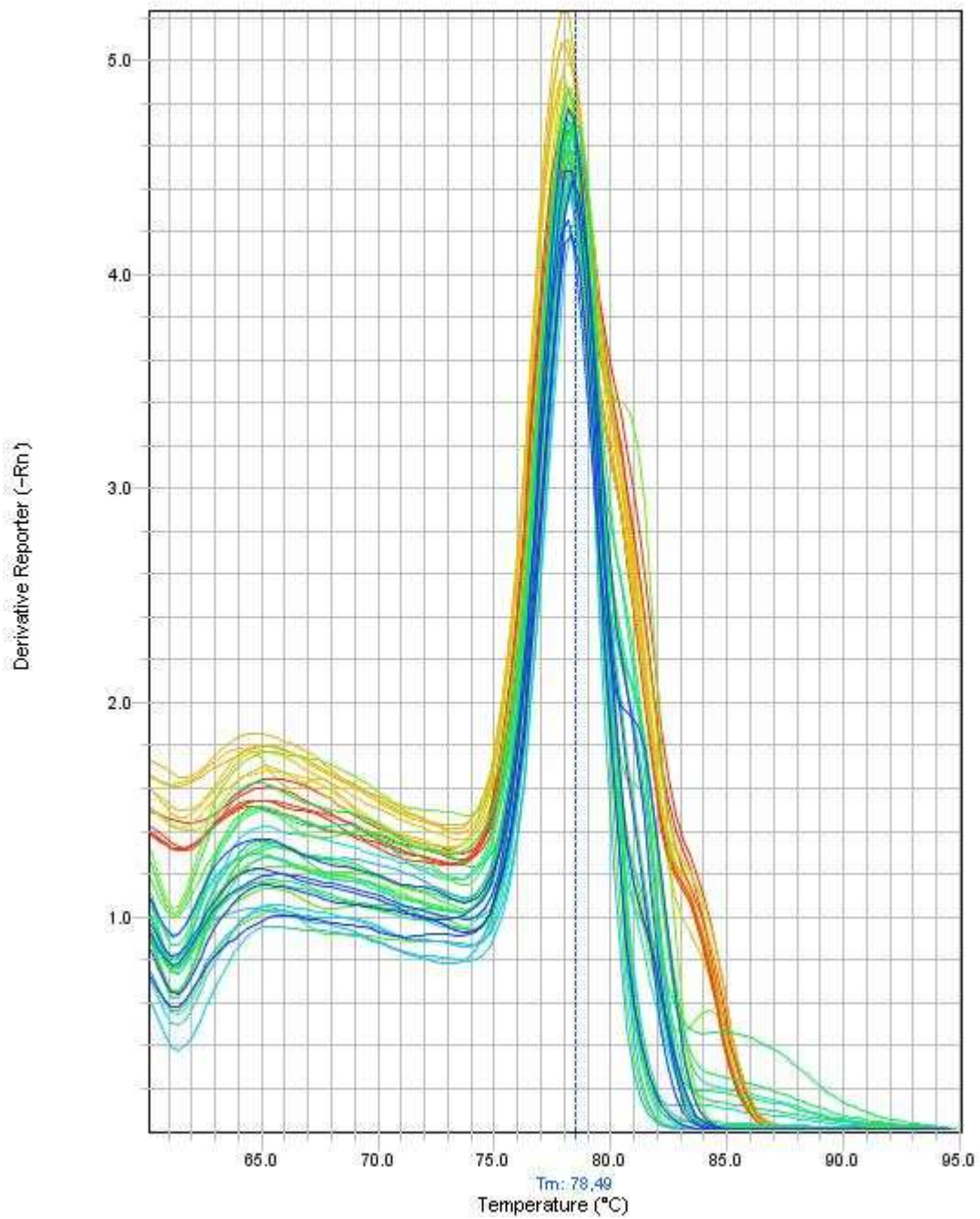
Παρακάτω παρουσιάζονται οι πρότυπες καμπύλες και για τα τρία γονίδια καθώς και οι καμπύλες αποδιάταξης που αναπτύχθηκαν με τη SYBR Green PCR, επιβεβαιώνοντας την ορθότητα των πειραματικών αποτελεσμάτων της παρούσας διπλωματικής, σύμφωνα με το θεωρητικό υπόβαθρο της PCR.

- *Χρωμοσωμικό γονίδιο groB*



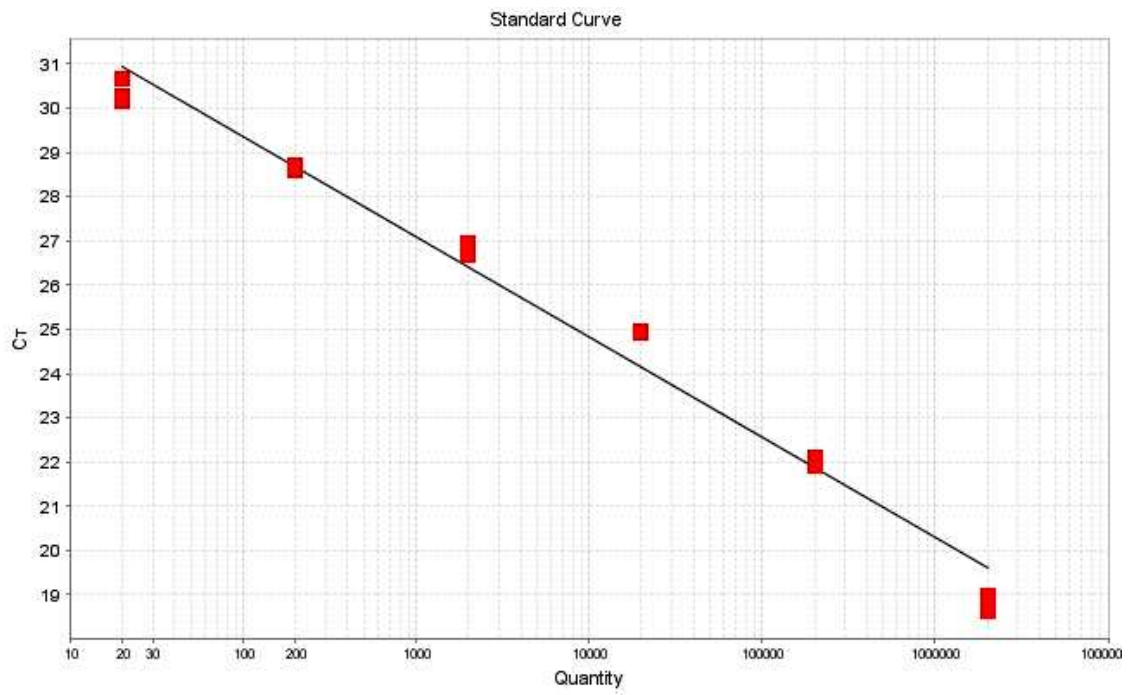
Διάγραμμα 7.16: Πρότυπη καμπύλη για την αντίγνωση και ποσοτικοποίηση του χρωμοσωμικού γονιδίου groB με τη SYBR Green PCR (slope= -3,32 & $R^2= 0,99$).

Melt Curve



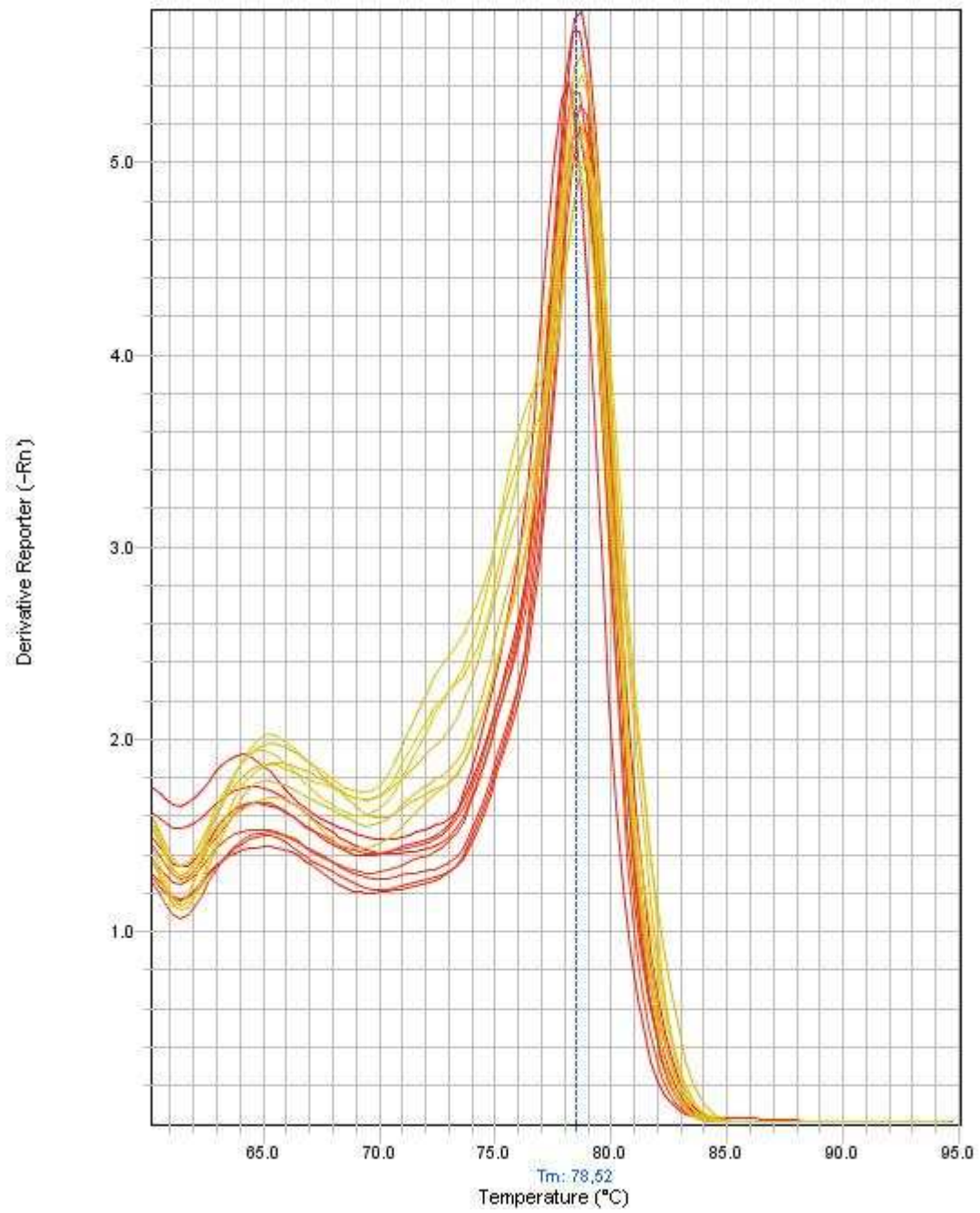
Διάγραμμα 7.17: Καμπύλη αποδιάταξης προϊόντων SYBR Green PCR για το γονίδιο *groB*.

- Πλασμιδιακό γονίδιο *lef*



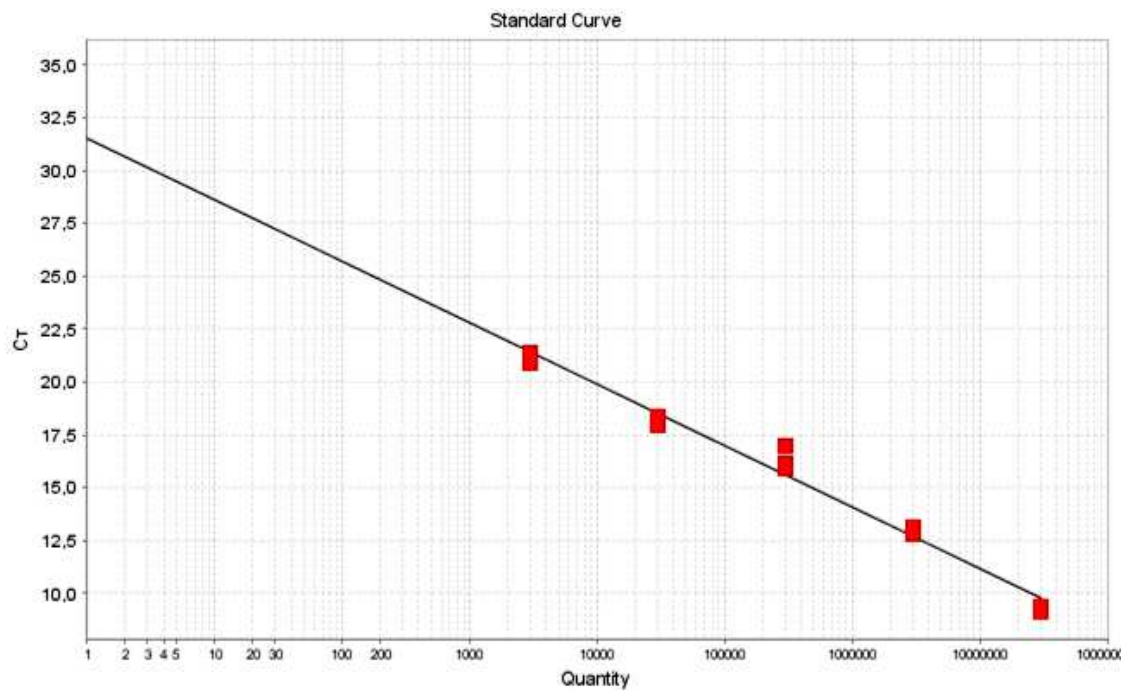
Διάγραμμα 7.18: Πρότυπη καμπύλη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού γονιδίου *lef* με τη SYBR Green PCR (slope= -3,1 & $R^2= 0,98$).

Melt Curve

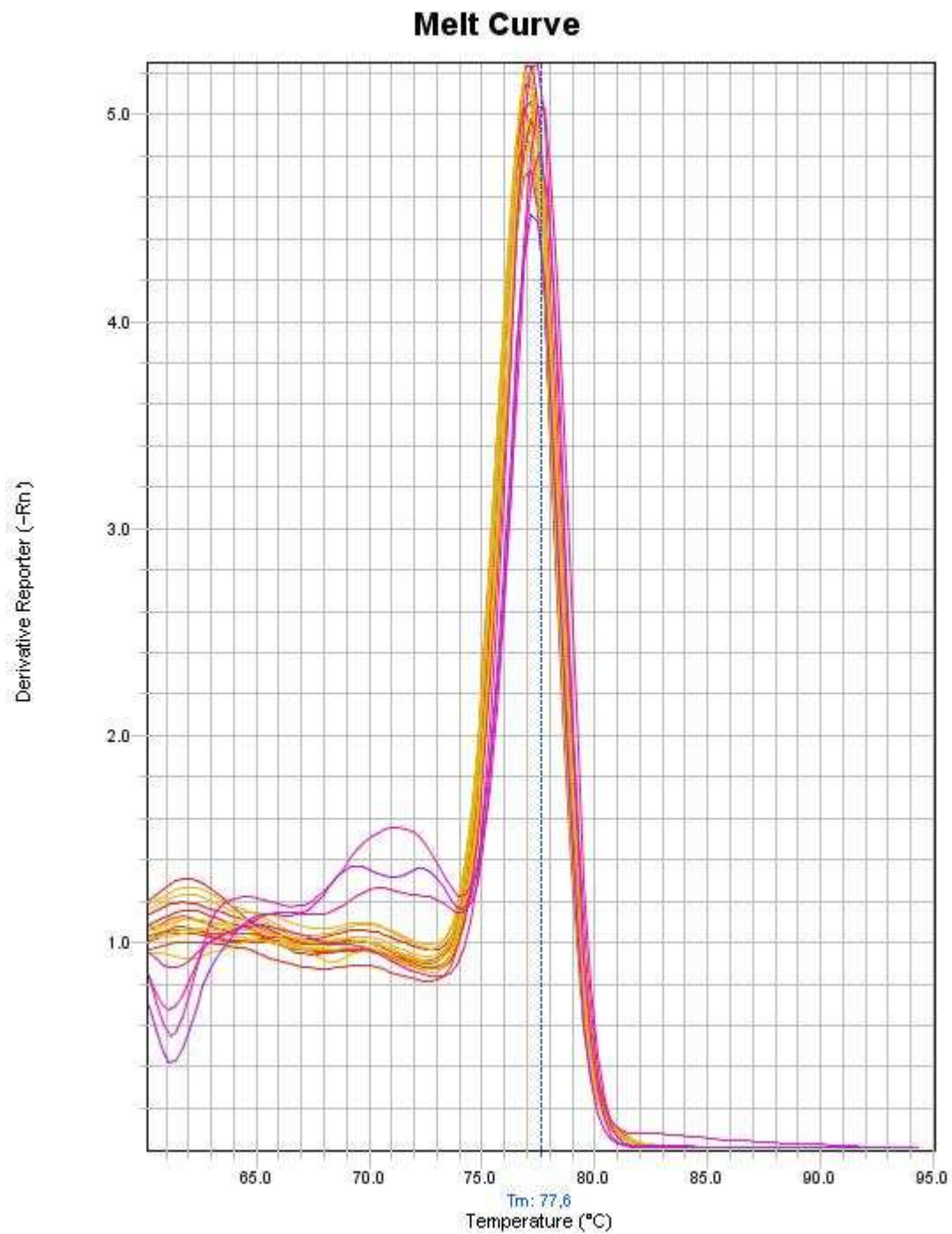


Διάγραμμα 7.19: Καμπύλη αποδιάταξης προϊόντων SYBR Green PCR για το γονίδιο Ief.

- Πλασμιδιακό γονίδιο *carA*



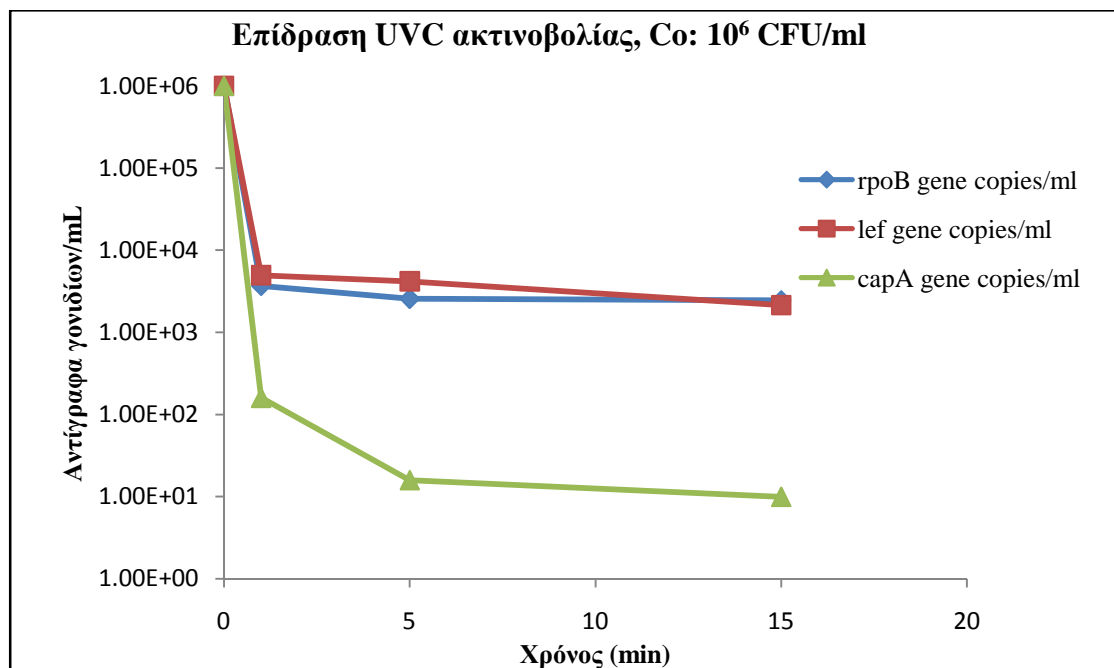
Διάγραμμα 7.20: Πρότυπη καμπύλη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση του πλασμιδιακού γονιδίου *lef* με τη SYBR Green PCR (slope= -3,1 & $R^2= 0,98$).



Διάγραμμα 7.21: Καμπύλη αποδιάταξης προϊόντων SYBR Green PCR για το γονίδιο capA.

Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα διαγράμματα μεταβολής συγκέντρωσης των γονιδίων κατά την επεξεργασία του νερού με τις μεθόδους απολύμανσης.

7.5.1 Ποσοτικοποίηση του βάκιλλου με τη μέθοδο Real-time PCR – UVC ακτινοβολία

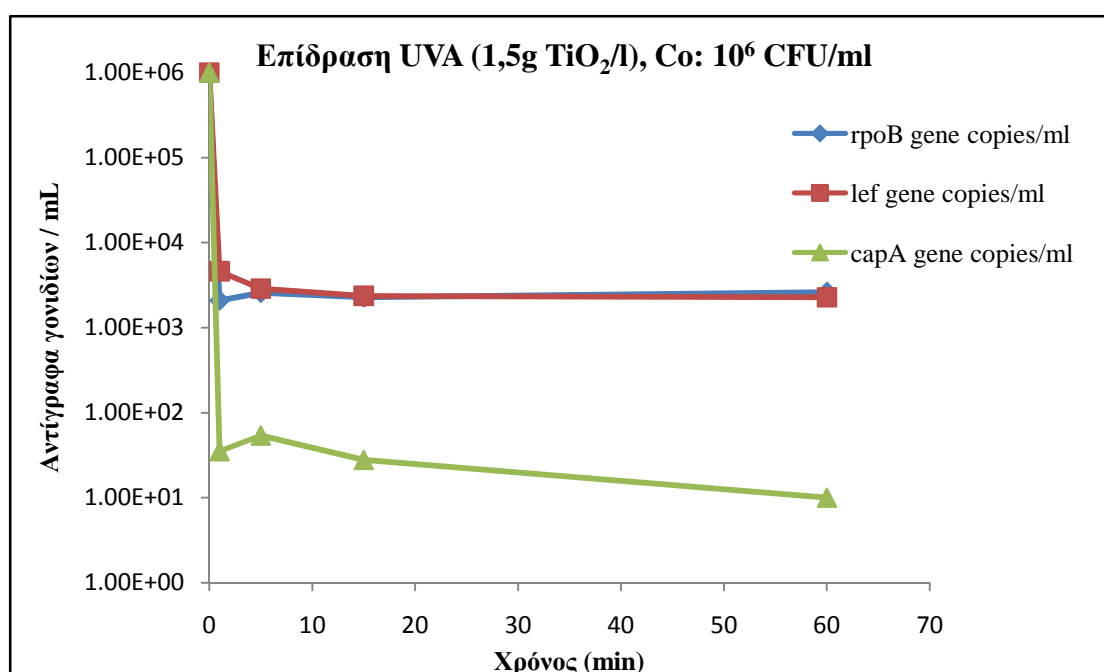


Διάγραμμα 7.22: Επίδραση της ακτινοβολίας UVC στα γονίδια rpoB, lef & capA, για Co: 10⁶ CFU/ml.

Από το παραπάνω διάγραμμα της PCR παρατηρείται ότι κατά τη διάρκεια της απολύμανσης με την ακτινοβολία UVC, το γονίδιο που υφίσταται τη μεγαλύτερη μείωση, και μάλιστα μέσα στα πέντε πρώτα λεπτά της επεξεργασίας, είναι το capA. Τα υπόλοιπα δύο χαρακτηριστικά γονίδια του βάκιλλου, rpoB και lef, μειώνονται σε μικρότερο βαθμό, παραμένοντας ωστόσο σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση μέχρι το τέλος της επεξεργασίας. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα της απολύμανσης με την επίδραση της ακτινοβολίας UVC, με τα αντίστοιχα που προέκυψαν από την καλλιεργητική μέθοδο, προκύπτει ότι ενώ στη Real-time PCR ανιχνεύονται σημαντικές συγκεντρώσεις των παθογόνων γονιδίων, στην καλλιεργητική μέθοδο αποικίες του βακίλλου εμφανίζονται μόνο κατά τα πρώτα πέντε λεπτά της επεξεργασίας. Από τα αριθμητικά αποτελέσματα των δύο μεθόδων συμπερένεται ότι ο βάκιλλος κατόπιν επεξεργασίας, ίσως έχει υποστεί μεταλλάξεις, ώστε να καθίσταται μη καλλιεργήσιμος παρά το γεγονός ότι εξακολουθεί να είναι ζωντανός. Επίσης λαμβάνοντας υπόψη την αντίστοιχη βιβλιογραφία, εξάγεται ακόμη ένα

σημαντικό συμπέρασμα. Σύμφωνα λοιπόν με αυτήν, για να εμφανίζει παθογένεια ο βάκιλλος του άνθρακα, θα πρέπει να παρίστανται και τα δύο παθογόνα πλασμίδια, *lef* και *capA* (Ellerbrok H. et. al., 2002). Επομένως δεδομένου ότι το πλασμίδιο *capA*, στη δεδομένη περίπτωση επεξεργασίας, μειώνεται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, αυτομάτως ο βάκιλλος μπορεί να χαρακτηριστεί ανενεργός αναφορικά με την παθογένειά του.

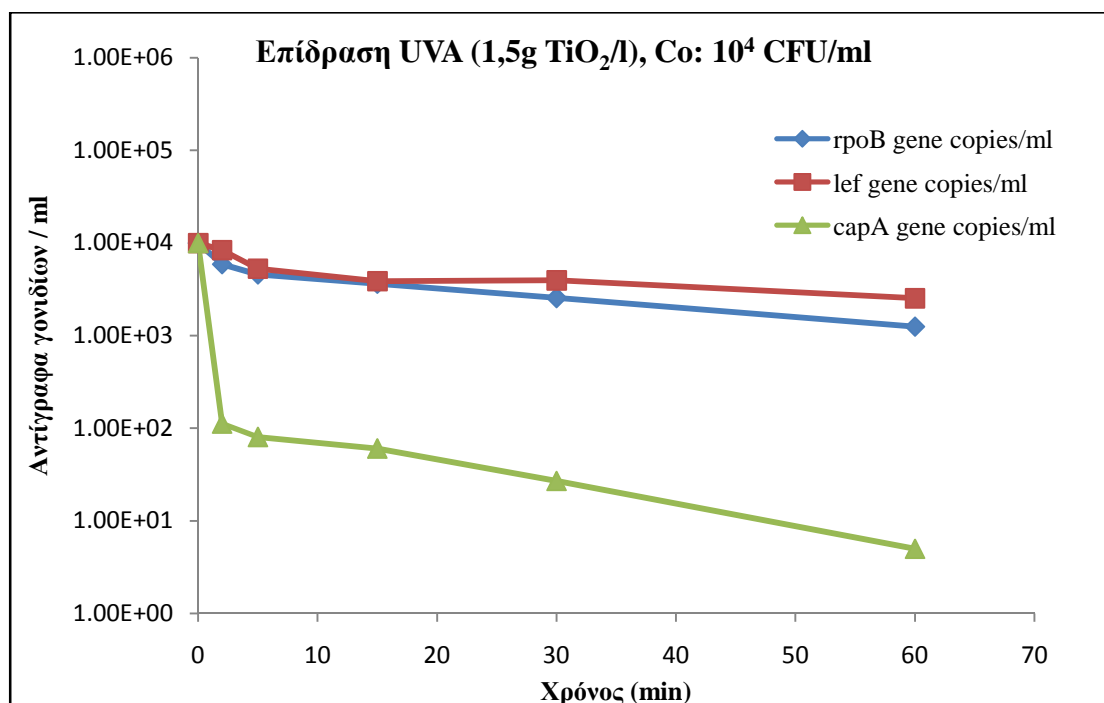
7.5.2 Ποσοτικοποίηση του βάκιλλου με τη μέθοδο Real-time PCR – UVA ακτινοβολία



Διάγραμμα 7.23: Επίδραση της ακτινοβολίας UVA (1,5 g/l TiO₂) στα γονίδια *rpoB*, *lef* & *capA*, για Co: 10⁶ CFU/ml.

Και στην περίπτωση της επεξεργασίας με την ακτινοβολία UVA για αρχική συγκέντρωση 10⁶ CFU/ml, όπως ακριβώς και στην αντίστοιχη της UVC παρατηρείται σημαντική μείωση του *capA* γονιδίου, μέσα στα πρώτα λεπτά της επεξεργασίας. Συγκρίνοντας τα αριθμητικά αποτελέσματα της Real-time PCR με τα αντίστοιχα της καλλιεργητικής μεθόδου, προκύπτει κατά αναλογία με τα αποτελέσματα της UVC, ότι ενώ δεν εμφανίζεται σημαντικός αριθμός αποικιών κατά την πρώτη, η συγκέντρωση των παθογόνων βακτηρίων διατηρείται σε υψηλά επίπεδα κατά τη

δεύτερη, με εξαίρεση το *capA* που μειώνεται σημαντικά, καθιστώντας το βακτήριο λιγότερο παθογόνο είτε πλήρως ανενεργό.



Διάγραμμα 7.24: Επίδραση της ακτινοβολίας UVA (1,5 g/l TiO₂) στα γονίδια *rpoB*, *lef* & *capA*, για Co: 10⁴ CFU/ml.

Στην περίπτωση της επεξεργασίας με ακτινοβολία UVA, αλλά με μικρότερη αρχική συγκέντρωση, προκύπτουν ανάλογα συμπεράσματα όπως ακριβώς στις δύο παραπάνω περιπτώσεις. Επιπροσθέτως, παρατηρείται ότι οι συγκεντρώσεις των γονιδίων *rpoB* και *lef* διατηρούνται στα ίδια επίπεδα, όπως και στην περίπτωση της υψηλότερης αρχικής συγκέντρωσης, ενώ σε αντίθεση το γονίδιο *capA* μειώνεται ακόμη πιο αισθητά, φτάνοντας σε ακόμη πιο χαμηλές συγκεντρώσεις.

Από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι η UVC ακτινοβολία είναι αποτελεσματικότερη συγκρινόμενη με τη UVA, όσον αφορά στη μείωση συγκέντρωσης των επιλεγμένων γονιδίων και κυρίως αυτών των πλασμιδίων, στα οποία οποία οφείλεται η παθογένεια του βάκιλλου. Αξίζει να αναφερθεί ότι το γονίδιο *capA* μειώνεται σημαντικά με την πάροδο του χρόνου επεξεργασίας, γεγονός που καθιστά το βακτήριο λιγότερο ή και καθόλου παθογόνο. Τέλος οι συγκεντρώσεις των γονιδίων *rpoB* και *lef* φαίνεται να παρουσιάζουν πλατώ, το οποίο κυμαίνεται στα ίδια

επίπεδα τόσο στη περίπτωση απολύμανσης με τη UVA ακτινοβολία, όσο και με τη UVC. Το φαινόμενο αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα γονίδια ενδεχομένως να είναι ανθεκτικότερα συγκρινόμενα με το γονίδιο *carA*, απέναντι στις δεδομένες μεθόδους απολύμανσης, είτε και γενικότερα.

7.6 Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Με σκοπό την ουσιαστικότερη αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων απολύμανσης που εφαρμόστηκαν στην παρούσα διπλωματική, έγινε μια σύντομη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας που είναι δημοσιευμένη και αφορά τεχνολογίες απολύμανσης που έχουν εφαρμοστεί σε νερό, επιμολυσμένο με βάκιλλο του άνθρακα. Για το λόγο αυτό αναφερθούν μόνο οι σημαντικότερες.

Σύμφωνα λοιπόν με τα δημοσιευμένα άρθρα, μία από τις πιο κοινές μεθόδους απολύμανσης, που χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση του βάκιλλου του άνθρακα, είναι η χλωρίωση. Τα αποτελέσματα της χλωρίωσης, στην απενεργοποίηση του βάκιλλου του άνθρακα, ποικίλουν ανάλογα με τη θερμοκρασία και το pH. Οι Rice et al. απέδειξαν ότι η απολύμανση ήταν αποδοτικότερη και ταχύτερη σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες, με ιδανικότερη αυτή των 23°C και τιμές pH γύρω στο 7. Ωστόσο οι επιστήμονες έχουν αμφιβολίες σχετικά με την αποτελεσματικότητα της χλωρίωσης υπό τις συνθήκες που επικρατούν στις μονάδες επεξεργασίας πόσιμου νερού, οι οποίες δε συμφωνούν με τις ιδανικές που προτείνει η προαναφερόμενη μελέτη (Rice et al., 2005).

Οι Rogers et al., ενίσχυσαν τη μέθοδο απολύμανσης με απλή χλωρίωση και εφάρμοσαν τη μέθοδο απολύμανσης με τη παραγωγή ηλεκτροχημικά ενεργού διαλύματος (ECASOL™). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι για την παραγωγή ηλεκτροχημικά ενεργού νερού, καθώς θεωρούνται προηγμένες μέθοδοι αντιμικροβιακής προστασίας του νερού. Στην παρούσα μελέτη λοιπόν, οι ερευνητές εφάρμοσαν τη μέθοδο ECASOL™ μεταβάλλοντας μόνο δύο από τις παραμέτρους που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Αυτές οι μεταβλητές είναι οι FAC (Free Available Chlorine) και ORP (Oxidative-Reduction Potential), οι οποίες κυμαίνονταν μεταξύ 305-464 ppm και +826 ως +1000 mV αντίστοιχα. Ιδανικότερες αποδείχθηκαν οι τιμές 300 ppm για τον παράγοντα FAC

και +800 mV για τον ORP. Σε όλες τις περιπτώσεις ECASOL™ που εφαρμόστηκαν για 30 λεπτά σε δείγμα επιμολυσμένο με βάκιλλο του άνθρακα παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του μικροβιακού φορτίου. Εντούτοις τονίζεται ότι στην πραγματικότητα είναι πολλοί περισσότεροι οι παράγοντες που μεταβάλλονται και επιδρούν στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου, γεγονός που καθιστά εκκρεμή τα αποτελέσματα της έρευνας (Rogers et al., 2006).

Μια άλλη μέθοδος που έχει εφαρμοστεί για την απενεργοποίηση του βάκιλλου του άνθρακα είναι με τη χρήση διαλύματος φορμαλδεΐδης, βάση των Manchee et al. Η μέθοδος αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική, αλλά οι επιστήμονες διατηρούν τις επιφυλάξεις τους τονίζοντας ότι κάθε περίπτωση μόλυνσης έχει τις ιδιαιτερότητες της και χρειάζεται ξεχωριστή μεταχείριση (Manchee et al., 1994).

Ωστόσο οι έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί πάνω στο κομμάτι της απολύμανσης πόσιμου νερού επιμολυσμένου με το βάκιλλο του άνθρακα είναι περιορισμένες και πολλές από αυτές χρησιμοποίησαν υποκατάστατα στη θέση του άνθρακα.. Για το λόγο αυτό η παρούσα μελέτη εστιάζει στο πρόβλημα εφαρμόζοντας σύγχρονες μεθόδους απολύμανσης απευθείας σε πόσιμο νερό που περιέχει τον εν λόγω βάκιλλο.

7.7 Συμπεράσματα

Από τα πειράματα απολύμανσης με χρήση υπερήχων, ακτινοβολίας UVC και UVA προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Η απολυμαντική δράση των υπερήχων στην ισχύ των 250 W είναι εντονότερη και αποτελεσματικότερη, όπως αναμενόταν λόγω της υψηλότερης έντασης της.
- ✓ Η απολύμανση με την ακτινοβολία UVC επιφέρει σχεδόν ακαριαία μηδενισμό του μικροβιακού φορτίου, ο οποίος δεν έχει επέλθει σε καμία από τις άλλες δύο μεθόδους απολύμανσης.
- ✓ Η απολυμαντική δράση της UVA ακτινοβολίας ενισχύεται το περισσότερο δυνατό σε συνδυασμό με 1,5 gr/l TiO₂, η οποία αποδείχθηκε ως βέλτιστη συγκέντρωση καταλύτη.
- ✓ Σε υψηλή συγκέντρωση βακτηριακού πληθυσμού, 10⁶ CFU/ml επιτυγχάνεται καλύτερη απολύμανση με χρήση της UVA ακτινοβολίας, παρουσία 1,5 gr/l TiO₂, σε σχέση χαμηλότερες συγκεντρώσεις, της τάξης των 10⁴ CFU/ml .
- ✓ Το Υπεροξειδίο του Υδρογόνου έχει από μόνο του ισχυρή απολυμαντική δράση κατά αναλογία συγκεντρώσεων.
- ✓ Συνδυαστική χρήση Υπεροξειδίου του Υδρογόνου με UVA ακτινοβολία σε βέλτιστες συνθήκες, επιφέρει το ίδιο απολυμαντικό αποτέλεσμα τόσο στις υψηλές όσο και στις χαμηλές αρχικές συγκεντρώσεις του βακτηριακού πληθυσμού.
- ✓ Στην καλλιεργητική μέθοδο είναι εύκολο να υπεισέλθουν πειραματικά σφάλματα, τα οποία ευθύνονται για τυχόν μη αναμενόμενα αποτελέσματα στην καταμέτρηση των αποικιών στα τριβλία.
- ✓ Σύμφωνα με τη Real- time PCR, επιβεβαιώνεται και ενισχύεται το συμπέρασμα ότι η UVC ακτινοβολία είναι αποτελεσματικότερη συγκρινόμενη με τη UVA, όσον αφορά στη μείωση συγκέντρωσης των επιλεγμένων γονιδίων και κυρίως αυτών των πλασμιδίων, στα οποία οφείλεται η παθογένεια του βάκιλλου.

- ✓ Από τα δύο παθογόνα πλασμίδια του βάκιλλου, *lef* και *capA*, το *capA* εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερη μείωση, γεγονός που καθιστά το βακτήριο λιγότερο είτε καθόλου παθογόνο.
- ✓ Τα γονίδια *groB* και *lef* εμφανίζονται ανθεκτικότερα σε σχέση με το *capA*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8: ΠΡΟΤΑΣΕΙΣ

Κατά την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκε ένας σεβαστός αριθμός πειραμάτων, από τα οποία διεξήχθησαν αρκετά ενδιαφέροντα συμπεράσματα, τα οποία με τη σειρά τους απαριθμήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Ωστόσο είναι προφανές ότι υπάρχει ακόμη πληθώρα παραγόντων που θα μπορούσαν να ερευνηθούν, ώστε να βγουν ακόμη πιο ολοκληρωμένα συμπεράσματα.

Κατά γενική εκτίμηση μερικοί από τους εν λόγω παράγοντες θα μπορούσαν να είναι:

- Η ενίσχυση της αποδοτικότητας των υπερήχων με προσθήκη απολυμαντικού μέσου, όπως είναι το Υπεροξειδίο του Υδρογόνου.
- Ο συνδυασμός τεχνικών μεθόδων απολύμανσης, όπως για παράδειγμα της υπερηχητικής ακτινοβολίας με την ακτινοβολία UVA.
- Η εφαρμογή της ακτινοβολίας UVA σε συνδυασμό με περισσότερους καταλύτες, εκτός του TiO_2 , και σύγκριση της αποδοτικότητας αυτών με σκοπό την ανεύρεση του βέλτιστου.
- Έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας στην απόδοση των απολυμαντικών τεχνολογιών.
- Μελέτη της απενεργοποίησης των βακτηρίων του *B.anthraxis* σε λύμα με τις ίδιες τεχνικές απολύμανσης όπως και στο νερό, ώστε να συγκριθεί η απόκριση του συστήματος σε σχέση με το υδατικό μέσο.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

1. **Αμπελιώτης Κ.**, (2008), “Περιβάλλον-Οικολογία”, Εκδόσεις: Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Αθήνα.
2. **Ανδρεαδάκης Α.**, Μαμάης Δ., Γαβαλάκη Ε. (2005), Διαχείριση υγρών αποβλήτων με αποκεντρωμένα συστήματα επεξεργασίας, Καρδίτσα.
3. **Δρόσου Α.** (2007), Φωτοκαταλυτική απολύμανση νερού παρουσία διοξειδίου του τιτανίου και υπεροξικού οξέος, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
4. **Δρούμπαλη Α.** (2010), Έλεγχος απολύμανσης νερού και υγρών αποβλήτων με χρήση UV-A και UV-C ακτινοβολίας, Διπλωματική εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
5. **Λέκκας Θ.** (2005), Περιβαλλοντική Μηχανική, Διαχείριση υδατικών πόρων, Κόσμος ΠΕΜΕΡ ΕΠΕ, Αθήνα.
6. **Μαντζαβίνος Δ.** (2003), Επεξεργασία υγρών αποβλήτων, Πανεπιστημιακές Σημειώσεις Διαλέξεων, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
7. **Μάρακας Χ.** (2006), Απολύμανση επεξεργασμένων αστικών λυμάτων με χρήση εξελιγμένων διεργασιών οξειδωσης και χλωρίωσης με συνδυασμό και σύγκριση των μεθόδων, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
8. **Μήτρακας Μ.** (2001), *Ποιοτικά χαρακτηριστικά και επεξεργασία νερού*, Εκδόσεις: Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.
9. **Νταρακάς Ε.** (2009), Βασικές παράμετροι ελέγχου ποιότητας νερού και λυμάτων, Θεσσαλονίκη.
10. **Παλαιολόγου, Α.** (2008). “Εφαρμογές των εξελιγμένων διεργασιών οξειδωσης στην απολύμανση του νερού”, Διπλωματική Εργασία, Πολυτεχνείο Κρήτης.
11. **Πούλιος Ι.** (2007), Φωτοηλεκτροχημεία των Ημιαγωγών - Βασικές αρχές και Εφαρμογές, Θεσσαλονίκη.
12. **Φεσά Μ.** (2009), Τεχνικές απολύμανσης πόσιμου νερού, Μεταπτυχιακή διατριβή, Πανεπιστήμιο Αιγαίου, Μυτιλήνη.

13. **Χατζησυμεών** Ε. (2009), Επεξεργασία υγρών αποβλήτων κατεργασίας ελιάς με εφαρμογή χημικών και βιολογικών διεργασιών, Διδακτορική διατριβή, Πολυτεχνείο Κρήτης, Χανιά.
14. **Χολέβα** Ε. (2007), Η γνώμη των κατοίκων του δήμου Νέσσωνος για το πόσιμο νερό, Διπλωματική εργασία, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα.

Ξένη βιβλιογραφία

1. **Barbier** P. and Petrier, C. (1996), *Study at 20 kHz and 500 kHz of the ultrasound-ozone advanced oxidation system: 4-nitrophenol degradation*. Journal of Advanced Oxidation Technologies, **1**: 154-159.
2. **Carp** O., Huisman C.L., Reller A. (2004), *Photoinduced reactivity of titanium dioxide*. Progress in Solid State Chemistry, **32**: 33-177.
3. **Cotton** S. (2006), "Molecule of the Month: Hydrogen Peroxide", Chemistry Department, University of Bristol, UK.
4. **Crum** L. (1994) *Sonoluminescence, sonochemistry, and sonophysics* (35). Journal of the Acoustical Society of America, **95(1)**: 559-562.
5. **Dahlem** O., Demaiffe, V., Halloin, V. and Reisse, J. (1998), *Direct sonication system suitable for medium scale sonochemical reactors*. AIChE Journal, **44(12)**: 2724-2730.
6. **Ellerbrok** H., Nattermann H., Ozel M., Beutin L., Appel B. and Pauli G. (2002), *Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic Bacillus anthracis by real-time PCR*, FEMS Microbiology Letters, **214**: 51-59.
7. **Haas** C.N. and Karra S.A.B. (1984), *Kinetics of Microbial Inactivation By Chlorine – I, Review of Results in Demand Free Systems*, Water research, **18(11)**: 1443-1449.
8. **Hart** E.J. and Henglein, A. (1985), *Free radical and free atom reactions in the sonolysis of aqueous iodide and formate solutions*. The Journal of Physical Chemistry, **89(20)**: 4342-4347.
9. **Ince** N. H. G. Tezcanli, R. K. Belen and . G. Apikyan. (2001), *Review: Ultrasound as a catalyzer of aqueous reaction systems: the state of the art and environmental applications*, Applied Catalysis B: Environmental, **29**: 167-176.

10. **Kidak R.** and Ince, N.H. (2006), *Ultrasonic destruction of phenol and substituted phenols: A review of current research*. Ultrasonics Sonochemistry, **13(3)**: 195-199.
11. **Kim K.**, Seo J., Wheeler K., Park C., Kim D., Park S., Kim W., Chung S.-I. and Leighton T. (2005), *Rapid genotypic detection of Bacillus anthracis and the Bacillus cereus group by multiplex real-time PCR melting curve analysis*. Immunology and Medical Microbiology, **43**: 301-310.
12. **Kotronarou A.**, Mills, G. and Hoffmann, M.R. (1991), *Ultrasonic irradiation of p-nitrophenol in aqueous solution*. The Journal of Physical Chemistry, **95(9)**: 3630-3638.
13. **Lambert R.J.W.** and Johnston M.D. (2000), *Disinfection kinetics: a new hypothesis and model for the tailing of log-survivor/time curves*, Journal of Applied Microbiology, **88**: 907-913.
14. **Lepoint T.** and Mullie, F. (1994), *What exactly is cavitation chemistry?* Ultrasonics Sonochemistry, **1(1)**: 13-22.
15. **Lepoint-Mullie, F.**, De Pauw, D. and Lepoint, T. (1996), *Analysis of the 'new electrical model' of sonoluminescence*. Ultrasonics Sonochemistry, **3(1)**: 73-76.
16. **Malato S.**, Fernandez-Ibanez P., Maldonado M. I., Blanco J., Gernjak W. (2009), *Decontamination and disinfection of water by solar photocatalysis: Recent overview and trends*, Catal Today, **147**: 1-59.
17. **Manchee J. R.**, Broster G. M., Stagg J. A. and Hibbs E. S., (1994), *Formaldehyde Solution Effectively Inactivates Spores of Bacillus anthracis on the Scottish Island of Gruinard*. Applied and Environmental Microbiology. **60 (11)**: 4167-4171.
18. **Mason T.** and Cordemans, E. (1996), *Ultrasonic intensification of chemical processing and related operations: a review*. Chemical Engineering Research & Design, **74(5)**: 511-516.
19. **Mason T.J.** (1990) Chemistry with ultrasound, Chapman & Hall.
20. **Margulis M.** (1994), *Fundamental problems of sonochemistry and cavitation*. Ultrasonics Sonochemistry, **1(2)**: S87-S90.
21. **Metcalf & Eddy**, (2002), “Μηχανική Υγρών Αποβλήτων, Επεξεργασία και Επαναχρησιμοποίηση” Εκδόσεις Τζιόλα.
22. **Noltingk B.E.** and Neppiras, E.A. (1950), *Cavitation produced by ultrasonics*. Proceedings of the Physical Society. Section B, **63**: 674-685.

23. **Oi Y.**, Patra G., Liang X., Williams E. L., Rose S., Redkar J. R. and Delvecchio G. V. (2011), *Utilization of the rpoB Gene as the Specific Chromosomal Marker for Real-Time PCR Detection of Bacillus anthracis*. Applied and Environmental Microbiology, **67(8)**: 3720-3727.
24. **Palaiologou A.**, Marakas H., Xekoukoulotakis N., Moya A., Vergara Y., Kalogerakis N., Gikas P., Mantzavinos D. (2007), *Disinfection of water and wastewater by TiO₂ photocatalysis, sonolysis and UV-C irradiation*, Catal. Today.
25. **Parsons S.**, Mills A. and Lee S. (2004), *Advanced Oxidation Processes for Water and Wastewater Treatment*, IWA Publishing.
26. **Petrier C.**, Jeunet, A., Luche, J.L. and Reverdy, G. (1992), *Unexpected frequency effects on the rate of oxidative processes induced by ultrasound*. Journal of the American Chemical Society, **114(8)**: 3148-3150.
27. **Petrier C.**, Lamy, M.F., Francony, A., Benahcene, A., David, B., Renaudin, V. and Gondrexon, N. (1994), *Sonochemical degradation of phenol in dilute aqueous solutions: comparison of the reaction rates at 20 and 487 kHz*. The Journal of Physical Chemistry, **98(41)**: 10514-10520.
28. **Rayleigh L.** (1917), *On the pressure developed in a liquid during the collapse of a spherical cavity*. Phil. Mag, **34(200)**: 94-98.
29. **Rice W. E.** Adcock J. N., Sivaganesan M. and Rose J. L., (2005), *Inactivation of Spores of Bacillus anthracis Sterne, Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis subsp. israelensis by Chlorination*. Applied and Environmental Microbiology. **71(9)**: 5587–5589.
30. **Rogers V. J.**, Ducatte R. G., Choi W. Y. and Early C. P., (2006), *A preliminary assessment of Bacillus anthracis spore inactivation using an electrochemically activated solution (ECASOLTM)*. Letters in Applied Microbiology, **43**: 482-488.
31. **Schoenen D.** (2002), *Role of disinfection in suppressing the spread of pathogens with drinking water: possibilities and limitations*. Water Research, **36**: 3784-3888.
32. **Sehgal C.**, Yu, T., Sutherland, R. and Verrall, R. (1982), *Use of 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl to investigate the chemical behavior of free radicals induced by ultrasonic cavitation*. The Journal of Physical Chemistry, **86(15)**: 2982-2986.
33. **Serpone N.**, Terzian, R., Hidaka, H. and Pelizzetti, E. (1994), *Ultrasonic induced dehalogenation and oxidation of 2-, 3-, and 4-chlorophenol in air-*

equilibrated aqueous media. Similarities with irradiated semiconductor particulates.
The Journal of Physical Chemistry, **98(10)**: 2634-2640.

34. **Solvay Chemicals**: "Hydrogen peroxide, Safety and Handling Technical Data Sheet.

35. **Suslick K.S.** (1990) *Sonochemistry*. Science, **247(4949)**: 1439-1445.

36. **Verrall R.** and Sehgal, C. (1988), *Ultrasound: Its Chemical, Physical and Biological Effects*.

37. **Weavers L.K.**, Ling, F.H. and Hoffmann, M.R. (1998), *Aromatic compound degradation in water using a combination of sonolysis and ozonolysis*. Environmental Science & Technology, **32(18)**: 2727-2733.

Σελίδες στο διαδίκτυο

1. <http://www.hpa.org.uk>
2. <http://www.medlook.net>
3. <http://www.solvaychemicals.us>
4. <http://www.so83ctp.edu.glogster.com>
5. <http://www.textbookofbacteriology.net>
6. <http://www.watermicro.gr>
7. <http://www.watersave.gr>